

Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Fakultät für Biologie



**Präklinische Verwendung onkolytischer Vaccinia-
Viren zur Therapie von Human- und Hundetumoren**

Dissertation

Zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der Julius-Maximilians-
Universität Würzburg

vorgelegt von

Marion Adelfinger

aus Frickenhausen

Würzburg, Dezember 2012



„Der Gesunde weiß nicht, wie reich er ist“

-Deutsches Sprichwort-

Eingereicht am: _____

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: _____

Erstgutachter: _____

Zweitgutachter: _____

Tag des Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	7
Summary	11
1 Einleitung	14
1.1 Tumorerkrankungen.....	14
1.2 Tumorthherapie.....	14
1.2.1 Konventionelle Tumorthherapie.....	14
1.2.2 Onkolytische Virotherapie	16
1.2.3 Das Vaccinia-Virus	17
1.3 Das Tumormikromilieu	21
1.3.1 Tumervaskulatur	23
1.4 Immunsystem und Krebs.....	24
1.4.1 Heterogenität von Makrophagen	26
1.4.2 Tumor-assoziierte Makrophagen.....	27
1.4.3 Tumor-assoziierte Neutrophile	29
1.5 Aufgabenstellung der Arbeit	31
2 Material	32
2.1 Bezugsquellen der verwendeten Materialien	32
2.2 Zusammensetzung von Puffern und Lösungen	33
2.3 Zelllinien und Zellkulturmedien	33
2.3.1 Zelllinien.....	33
2.3.2 Zellkulturmedien.....	34
2.4 Rekombinante Viruskonstrukte.....	34
2.5 Antikörper.....	35
2.6 Geräte und sonstige Materialien.....	36
2.7 Software.....	37
3 Methoden	38
3.1 Zellbiologische Methoden.....	38
3.1.1 Kultivierung von adhärennten Zelllinien	38
3.1.2 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer	39
3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen	40
3.1.4 Mykoplasmenachweis	41
3.1.5 Konfluenztest	42
3.2 Virologische Techniken	42
3.2.1 Infektion mit Vaccinia-Virus	42

3.2.2	Bestimmung des Virustiters mittels Plaque-Assay	43
3.2.3	Analyse der Virusreplikation	44
3.2.4	MTT-Assay	45
3.3	Methoden für die Durchflusszytometrie	45
3.3.1	Was ist Durchflusszytometrie?	45
3.3.2	Prinzip	46
3.3.3	Aufbau eines Durchflusszytometers am Beispiel des BD Accuri C6	46
3.3.4	Probenvorbereitung für die durchflusszytometrische Messung	49
3.3.5	Messung von Leukozytenpopulationen in Blut und Gewebe	50
3.4	Tierexperimentelle Untersuchungen	51
3.4.1	Versuchstiere	51
3.4.2	Implantation von Tumorzellen	51
3.4.3	Infektion mit Vaccinia-Virus	52
3.4.4	Blut- und Tumorentnahme	52
4	Ergebnisse	53
4.1	Durchflusszytometrische Untersuchung von Einzelzellsuspensionen der humanen Melanomzelllinien 888-MEL und 1936-MEL	53
4.1.1	Die humanen Melanomzelllinien 888-MEL und 1936-MEL	53
4.1.2	Vergleich der Immunzellpopulationen von 888-MEL- und 1936-MEL-Tumoren nach Infektion mit 5×10^6 pfu GLV-1h68	54
4.1.3	Vergleich der GFP-positiven Zellen von 1936-MEL-Tumoren nach Infektion mit 5×10^6 pfu oder 1×10^7 pfu GLV-1h68	57
4.1.4	Analyse der Immunzellpopulation von 1936-MEL-Tumoren nach Infektion mit 1×10^7 pfu GLV-1h68	59
4.2	Efficient Colonization and Therapy of Human Hepatocellular Carcinoma (HCC) Using the Oncolytic Vaccinia Strain GLV-1h68	61
4.3	Vergleichende Onkologie	72
4.4	Preclinical Evaluation of Oncolytic Vaccinia Virus for Therapy of Canine Soft Tissue Sarcoma	74
4.5	Characterization and evaluation of a new oncolytic Vaccinia Virus strain LIVP6.1.1 for canine cancer therapy	88
4.6	Virotherapy of Canine Tumors with Oncolytic Vaccinia Virus GLV-1h109 Expressing an Anti-VEGF Single-Chain Antibody	96
5	Diskussion	111
6	Referenzen	119
7	Anhang	128
7.1	Abkürzungen	128
7.2	Danksagung	132

7.3	Eidesstattliche Erklärung	133
8	Publikationen.....	134

Zusammenfassung

Nach Einschätzung der Weltgesundheitsorganisation WHO wird Krebs im Jahr 2013 die weltweit häufigste Todesursache bei Menschen und Haustieren sein. Diese Situation erfordert die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze. Hauptziel einer Tumorthherapie ist es, sowohl den Primärtumor als auch die Metastasen möglichst vollständig zu entfernen. Dabei wird nach Methoden gesucht, die im Gegensatz zu den meisten gegenwärtigen therapeutischen Einsätzen, wie der chirurgischen Entfernung bösartiger Neubildungen, Chemotherapie und Strahlentherapie, selektiv die bösartigen Zellen erkennen und zerstören können. Eine faszinierende Möglichkeit in dieser Hinsicht ist die Verwendung von onkolytischen Viren, die die Fähigkeit besitzen, sich selektiv sowohl in Primärtumoren als auch in Metastasen anzusiedeln und die Krebszellen dort zu zerstören. Das Konzept, dass Viren nützlich für die Bekämpfung von Krebs sein könnten, ist nicht neu. Allerdings konnte erst in den letzten Jahren durch zahlreiche Studien bestätigt werden, dass verschiedene Viren in der Lage sind, eine signifikante Antitumorwirkung *in vivo* auszuüben. Zu den erfolgversprechenden onkolytischen Viren zählen insbesondere Adenovirus, Herpes simplex Virus, Reovirus und Vaccinia-Virus, die sich bereits in Phase III der klinischen Studien befinden oder kurz davor sind. Die therapeutische Nutzung von tumorspezifischen onkolytischen Viren beim Menschen hat bereits begonnen.

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden verschiedene Aspekte der Wirkungsweise von Vaccinia-Virus-Stämmen bei der Therapie verschiedener Tumore aus Mensch und Hund im Xenotransplantat-Mausmodell bearbeitet: die Onkolyse der Krebszellen und Inhibition des Tumorstwachstums sowie die Effekte der Virusinfektion auf das Tumormikromilieu und die Mitwirkung des angeborenen Immunsystems bei der Virotherapie.

Das Tumormikromilieu (Stroma) setzt sich aus einer Vielzahl verschiedener Zellen und Komponenten der extrazellulären Matrix zusammen. Die Krebszellen bilden unter anderem mit Endothelzellen des Blut- und Lymphsystems und verschiedenen Immunzellen eine komplexe Organ-ähnliche Struktur. Weitere wichtige Bestandteile des Stromas sind Wachstumsfaktoren, Chemokine und Zytokine und die Tumorstvaskulatur. Diese ist durch zahlreiche strukturelle und funktionelle Abnormalitäten charakterisiert, wodurch die Effektivität von Strahlen- und Chemotherapie herabgesetzt wird. Weiterhin ist das Tumormikromilieu durch seine Ähnlichkeit mit einer chronischen Entzündungsreaktion gekennzeichnet und wirkt immunsupprimierend auf rekrutierte Leukozyten, die wiederum die Inflammation verstärken und die Angiogenese und das Tumorstwachstum weiter fördern.

Aufgrund dieser vielen Komponenten ist die Zusammensetzung jedes Tumors einzigartig, weswegen Standardtherapien häufig nicht zu einer Heilung führen.

Die Wirkung der Viren bei der Virotherapie beruht vermutlich auf 4 Mechanismen, die einzeln oder in Kombination auftreten können: die direkte Onkolyse der Krebszellen, die Zerstörung des Tumorblutgefäßsystems, die Aktivierung des Immunsystems des Wirts und die Suppression der microRNA-Expression des Wirtes. Zusätzlich kann die Expression therapeutischer Gene die onkolytische Wirkung verstärken.

Zum Nachweis der Onkolyse der Krebszellen und Inhibition des Tumorwachstums wurde zuerst das Virus GLV-1h68 in einem autologen humanen Melanomzellpaar, 888-MEL und 1936-MEL, eingesetzt. Das GLV-1h68-Virus wurde auf Basis des Wildtyp Vaccinia-Virus LIVP durch die Insertion von 3 Expressionskassetten in den drei Genloci F14.5L, J2R und A56 genetisch konstruiert. 888-MEL, eine zu einem frühen Zeitpunkt der Krebserkrankung aus einer Metastase isolierte Zelllinie, zeigt nach Infektion mit GLV-1h68 im Mausmodell Tumornekrose („Responder“), während 1936-MEL aus einer späten Metastasierungsphase kaum mit Onkolyse auf eine Virusinfektion reagiert („Poor-Responder“). Die onkolytische Wirkung konnte mittels Durchflusszytometrie in Tumoren beider Zelllinien zu einem frühen Zeitpunkt nach Virusinfektion nachgewiesen werden. In 888-MEL-Tumoren wurde hierbei eine große Zahl infizierter und toter Zellen nach Virusinfektion gefunden. Gleichzeitig wurde eine hohe Zahl an Immunzellen detektiert, die nach Virusinfektion reduziert war. In den schwächer reagierenden 1936-MEL-Tumoren konnte eine Onkolyse bei Infektion mit höherer Virusmenge und zu einem früheren Zeitpunkt demonstriert werden, wodurch mehr Zellen infiziert wurden. Zusätzlich wurde eine Steigerung der nur in geringer Zahl vorhandenen Immunzellen nachgewiesen. Trotz des unterschiedlichen Tumormikromilieus konnte somit ein onkolytischer Effekt in beiden Tumormodellen erzielt werden.

Zum Nachweis der positiven Effekte der Virusinfektion auf das Tumormikromilieu und der Mitwirkung des angeborenen Immunsystems bei der Virotherapie wurde die infiltrierende Immunzellpopulation in Tumoren aus zwei humanen Leberzellkarzinomzelllinien, PLC/RPF/5 und HuH7, mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Es konnte eine Zunahme der Immunzellpopulation gezeigt werden, die mit einer Hochregulierung von pro-inflammatorischen Zytokinen und anti-angiogenen Faktoren einherging, wie durch die Analyse der immunbezogenen Proteinantigene nachgewiesen wurde. Hierdurch wurde die immunsupprimierende Wirkung der Krebszellen auf die Komponenten des Tumormikromilieus aufgehoben und stattdessen eine Aktivierung der anti-tumoralen Wirkung der rekrutierten Immunzellen erreicht.

Als zusätzlicher positiver Effekt auf das Tumormikromilieu konnte in PLC-Tumoren mittels immunhistochemischer Färbung des endothelialen Zellmarkers CD31 eine Reduzierung und Normalisierung der Blutgefäßdichte belegt werden. Dies hatte sich aufgrund des nach Infektion verschwundenen hämorrhagischen Phänotyps bereits angedeutet. Im Rahmen einer adjuvanten Therapie mit Chemotherapeutika oder Bestrahlung würde dies eine Erhöhung der Wirksamkeit bedeuten, da die Versorgung mit Sauerstoff verbessert und der Blutfluss normalisiert wird.

In Hunden treten ebenfalls Tumore spontan und mit großer Häufigkeit auf und entwickeln sich im Kontext eines intakten Immunsystems, wobei Tumorinitiation und –fortschritt durch dieselben Faktoren beeinflusst sind, wie beim Menschen. Außerdem sind sich Hunde und Menschen genetisch und physiologisch relativ ähnlich. Dies spiegelt sich auch beim Krebs wider, da die verantwortlichen genetischen Veränderungen in Hunden und Menschen höchst analog sind. Hunde reagieren auf Medikamente ähnlich und wandeln diese vergleichbar zum Menschen um. Daher wurden auch für Hunde in vorklinischen Studien bereits verschiedene onkolytische Viren, wie Adenoviren, Hundestaube und Vaccinia Virus, getestet.

Im dritten Teil der Arbeit wurden Hunde-Tumorzelllinien in Zellkultur und im Maus-Xenotransplantat mit verschiedenen Viren des LIVP-Stammes infiziert und die onkolytischen Auswirkungen sowie die therapeutische Effizienz bestimmt.

Die verwendeten Vaccinia-Viren waren GLV-1h68, GLV-1h109, das für GLAF-1, einen anti-Vascular Endothelial Growth Factor- (VEGF) Antikörper kodiert, und die zwei natürlichen Isolate LIVP1.1.1 und LIVP6.1.1, die beide eine Mutation im Gen für die Thymidinkinase tragen.

Die Virus-vermittelte Onkolyse wurde in Zellkultur in vier Hundetumorzelllinien demonstriert: dem Osteosarkom D17, dem Melanom CHAS, dem Prostatakarzinom DT08/40 und dem neu isolierten Weichgewebstumor STSA-1.

Weiterhin wurde eine Inhibition des Tumorwachstums für DT08/40 im Mausmodell nach Infektion mit GLV-1h109 oder LIVP6.1.1 und für Virus-infizierte STSA-1-Tumoren gezeigt.

Zum Nachweis der Tumorselektivität der Viren wurde die Virusverteilung in Tumor und Organen mittels Plaque Assay bestimmt, wodurch zusätzlich in der späten Phase des Tumorwachstums Metastasen nachgewiesen werden konnten. Weiterhin konnte anhand der durchflusszytometrischen Bestimmung der Infiltration der Tumore durch Immunzellen die Aktivierung des Wirtsimmunsystems gezeigt werden, die mit der Virulenz der Viren und der Inhibition des Tumorwachstums bzw. Regression der Tumore in Korrelation gesetzt werden konnte.

Der Nachweis von Produktion und Sekretion des Virus-kodierten anti-VEGF-Antikörpers GLAF-1 in Zellkultur, und in Blut und Tumorgewebe im Mausmodell, konnte mittels Western Blot und GLAF-1-ELISA erbracht werden. Außerdem konnte dessen anti-angiogene Wirkung

im Mausmodell demonstriert werden. Dieser Beleg für die Virus-vermittelte Expression von therapeutischen Genen bietet die Möglichkeit neue Therapiestrategien zu entwickeln, die auf eine Veränderung des Tumormikromilieus abzielen, um auf diese Weise das Tumorwachstum zu verhindern.

Diese Ergebnisse der Arbeit haben wesentlich für den schnelleren Beginn der ersten klinischen Phase I-Studie mit Hundepatienten beigetragen.

Summary

The cancer mortality rate is increasing steadily in man and pet animals and it is estimated by the World Health Organisation (WHO) to be number one cause of deaths in 2013. This situation raises the need for developing new therapeutic approaches whereby the main goal of tumor therapy always is the complete elimination of primary tumor and metastases. In contrast to most current therapies, like surgical resection of malignant neoplasia, chemotherapy and radiation, the new cancer treatments should selectively recognize and destroy malignant cells. The application of oncolytic viruses offers fascinating opportunities, because of their ability to selectively colonize primary tumors and metastases and directly destroy cancer cells. The concept of fighting cancer with viruses is not new, but the significant anti-tumoral effect of different viruses *in vivo* was demonstrated by several studies in the last few years. Promising oncolytic viruses are adenovirus, Herpes simplex virus, reovirus and vaccinia virus. These viruses are currently in or entering phase III clinical trials but the therapeutic use of tumor specific oncolytic viruses for humans has already started.

In this work, different aspects of the effects of vaccinia virus strains during therapy of canine and human tumors in mouse xenograft models were analyzed: oncolysis of cancer cells, inhibition of tumor growth, influence of virus infection on the tumor microenvironment and participation of the innate immunity in virotherapy.

The tumor microenvironment (stroma) is composed of many different cells and components of the extracellular matrix. Cancer cells form structures similar to organs including endothelial cells of the blood and lymph system, different immune cells and many other cell types. Other important components of the stroma are growth factors, chemokines and cytokines as well as the tumor vasculature that is characterized by numerous structural and functional abnormalities which decrease the efficacy of radiation and chemotherapy. Another hallmark of the tumor microenvironment is its similarity to chronic inflammation and its immunosuppressive effect on recruited leukocytes which in turn increase the inflammation and angiogenesis and promote tumor growth. Due to the many different components the composition of each tumor is unique and that is why standard therapies often do not result in cure.

The effects of the viruses in the virotherapy are probably based on four mechanisms working alone or in combination: direct oncolysis of cancer cells, destruction of tumor vasculature, activation of host immune system and suppression of host microRNA expression. Additionally the expression of therapeutic genes can increase the oncolytic effect of the viruses.

To analyze the oncolysis of cancer cells and the inhibition of tumor growth first the GLV-1h68 virus was used in an autologous pair of human melanoma 888-MEL and 1936-MEL. GLV-1h68 was genetically constructed on the basis of wild-type vaccinia virus Lister strain by insertion of 3 expression cassettes into F14.5L, J2R and A56 gene loci. 888-MEL was isolated from metastases early during cancer disease and exhibits tumor necrosis after infection with GLV-1h68 in mouse xenograft model (responder) whereas 1936-MEL which was isolated in the late phase of metastases formation hardly shows oncolysis following virus treatment (poor-responder). The oncolytic effect was demonstrated by flow cytometric analysis of tumors of both cell lines at an early time after virus infection. In 888-MEL tumors high numbers of infected and dead cells were found after virus infection. Simultaneously, a high number of immune cells were detected which was reduced after infection. In the lower responding 1936-MEL tumors oncolysis was only observed after infection with higher amount of virus at an earlier time whereby the number of infected cells increased. Additionally, the low number of immune cells increased after infection. Despite the different tumor microenvironment an oncolytic effect was achieved in both tumor models.

To verify the positive effects of virus infection on the tumor microenvironment and the participation of the innate immune system in virotherapy the infiltrating immune cell population in tumors of two human hepatoma cell lines PLC/RPF/5 and HuH7 was analyzed. Here an increase of the immune cell population was detected accompanied by an upregulation of pro-inflammatory cytokines and anti-angiogenic factors as shown by immune-related antigen profiling. Accordingly, the immune-suppressive influence of cancer cells on the components of the tumor microenvironment was neutralized and an activation of anti-tumoral effects of the recruited immune cells was achieved.

Additionally the tumor microenvironment is positively affected by the reduction and normalization of the tumor vasculature. This was demonstrated in GLV-1h68-infected PLC tumors in comparison to non-infected tumors by immunohistochemical analysis of the endothelial marker CD31 and visualized by the disappearance of the hemorrhagic phenotype. In the course of an adjuvant therapy with chemotherapeutics or radiation the efficacy is increased due to the improved oxygen supply and normalized blood flow.

In dogs tumors occur spontaneously with high incidence and develop in the context of an intact immune system whereby tumor initiation and progress are influenced by the same factors as in humans. Furthermore dogs and humans resemble genetically and physiologically. This is also reflected in cancer since the responsible genetic mutations are highly analogous similarities in dog and human. Dogs also respond to and metabolize drugs similarly to humans. Therefore different oncolytic viruses like adenoviruses, canine distemper

virus and vaccinia virus were tested for the use in preclinical studies in canine cancer patients.

In the third part of this work canine cancer cell lines were infected in cell culture and in mouse xenograft models with different viruses derived from Lister strain and the oncolytic effect and therapeutic efficacy were determined.

The vaccinia viruses used were GLV-1h68, GLV-1h109, encoding for GLAF-1, a single chain antibody against vascular endothelial growth factor (VEGF), and two of the natural isolates LIVP1.1.1 and LIVP6.1.1 strain both with a mutation in the thymidine kinase gene.

In cell cultures the virus-mediated oncolysis was demonstrated for four canine cancer cell lines: D17 osteosarcoma, CHAS melanoma, DT08/40 prostate carcinoma and the newly isolated soft tissue sarcoma STSA-1.

Furthermore the inhibition of tumor growth was shown for GLV-1h109 and LIVP6.1.1 in a mouse model for DT08/40 and for all viruses in STSA-1 xenografts.

To verify the tumor selectivity of the viruses the viral distribution in tumors and organs were analyzed by plaque assay and additional metastases were also detected in the late phase of solid tumor growth. Further activation of host immune system was shown on the basis of the analysis of infiltrating immune cells in tumors by flow cytometry. These findings were correlated with viral virulence and inhibition of tumor growth.

Production and secretion of the virus encoded anti-VEGF antibody GLAF-1 in cell cultures and in blood and tumor tissues in mouse models was determined by Western blot analysis and GLAF-1 ELISA experiments. Moreover the anti-angiogenic effect was also demonstrated in mouse xenograft models. This evidence for virus-mediated expression of therapeutic genes offers the opportunity to develop new therapeutic strategies targeting the modification of the tumor microenvironment to inhibit tumor growth.

These results presented in this thesis significantly contributed to the initiation of first clinical trials with canine cancer patients using the LIVP6.1.1 Lister vaccinia virus isolate.

1 Einleitung

1.1 Tumorerkrankungen

Die Begriffe „Tumor“ (lat.) und „Neoplasie“ (griech.) werden synonym verwendet und stehen allgemein für Gewebszubildungen entzündlicher und nicht entzündlicher Art. Der Begriff „Krebs“ wird hingegen nur für maligne Tumore verwendet. Er stammt aus dem Altgriechischen (*karkínos*), wo mit diesem Begriff sowohl die Krankheit, als auch das Tier benannt wurde.¹ Krebs ist eine allgemeine Bezeichnung für eine große Gruppe von Krankheiten, die den ganzen Körper betreffen kann und durch ein anormales Zellwachstum und Invasion in angrenzende und entfernte Körperregionen gekennzeichnet ist (Metastasierung).² Als pathologische Ursachen für die Entwicklung der meisten Tumoren gelten Störungen im Immunsystem, genetische Mutationen, chronische Inflammation und virale Infektionen.^{3,4}

In Deutschland ist Krebs nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache,⁵ aber auch auf viele andere Industrieländern, wie z.B. den USA, trifft dies zu.⁶ Mit mehr als 220.000 Todesfällen in Deutschland im Jahr 2010 und mehr als 560.000 in den USA im Jahr 2008, starb ungefähr jeder vierte Mensch in diesen beiden Ländern infolge von Krebs.^{5,6}

Allerdings könnten mehr als 30 % aller Tumorerkrankungen durch gesunde Ernährung, körperliche Aktivität, nur mäßigen Genuss von Alkohol und Nichtrauchen verhindert werden. In Entwicklungsländern könnte die Zahl der Todesfälle durch Krebs alleine durch Impfungen gegen HBV (Hepatitis B Virus) und HPV (Humanes Papilloma Virus) um bis zu 20 % verringert werden.⁷

1.2 Tumorthherapie

1.2.1 Konventionelle Tumorthherapie

Krebs ist eine genetische Krankheit, die aber nicht durch den Defekt eines einzelnen Gens verursacht wird,⁸ sondern durch eine Akkumulation genetischer und epigenetischer Mutationen,⁹ die die klonale Selektion von Zellen mit zunehmend aggressiverem Verhalten fördern.¹⁰ Aber auch Störungen im Immunsystem, chronische Inflammation und virale Infektionen können ein Auslöser für Krebs sein.^{3,4} Daher ist jede Tumorart anders und der Verlauf der Tumorerkrankung kann sich von Mensch zu Mensch unterscheiden.¹¹ Aus diesem Grund gibt es nicht eine universelle Behandlungsmethode, sondern verschiedene Therapien, die miteinander kombiniert werden können.

Die **chirurgische Resektion** im Zuge einer Operation ist die älteste und noch immer die häufigste Behandlungsmethode bei einer Tumorerkrankung.¹² Sie wird häufig in Kombination mit nichtoperativen adjuvanten/neoadjuvanten Therapiemaßnahmen durchgeführt.¹³ Man unterscheidet zwischen kurativer, zytoreduktiver und palliativer Chirurgie.

Als *kurative Eingriffe* gelten solche, die den Tumor radikal resezierern (R0), wobei keine Fernmetastasen vorliegen bzw. diese ebenfalls radikal entfernt werden können. Hierbei werden der Tumor und angrenzendes gesundes Gewebe entfernt.¹³

Die *zytoreduktive Chirurgie* hat die Entfernung eines Großteils der Tumormasse (Senkung der Tumorlast) zum Ziel, um hierdurch die Chancen zu erhöhen, das restliche nicht resezierbare Gewebe durch andere tumorspezifische Maßnahmen auszuschalten.¹⁴

Die *palliative Chirurgie* ist ein Versuch durch Linderung von Schmerzen oder Krankheitssymptomen die Lebensqualität des Patienten zu verbessern, aber nicht notwendigerweise das Leben zu verlängern.¹⁵

Unter **Chemotherapie** im engeren Sinne versteht man die Applikation von Substanzen, die durch Eingriff in den Stoffwechsel maligner Zellen und deren Zellteilungsvorgänge entweder zytostatisch oder zytotoxisch-zytolytisch wirken.¹⁶ Chemotherapeutika können auch auf gesunde Zellen wirken, aber aufgrund der Unterschiede im Stoffwechsel von gesunden und malignen Zellen werden Erstere stärker angegriffen.¹³

Das Ziel der **Strahlenbehandlung** maligner Tumoren ist die Zerstörung der Tumorzellen unter weitgehender Schonung von gesunden Geweben und Organen.^{16,17} Dabei kommen zwei Wirkmechanismen zum Tragen. Die Verringerung von reifen, funktionellen Zellen durch Apoptose und der Verlust der Fähigkeit zur Reproduktion.¹²

Die therapeutische Breite einer Bestrahlung lässt sich vergrößern, wenn die Dosis fraktioniert verabreicht wird. Dadurch wird gesundem Gewebe Zeit gelassen sich durch Regeneration und Reparaturmechanismen zu erholen. Im Tumorgewebe arbeiten diese Mechanismen weniger effektiv und daher kommt es zu einer zunehmenden Devitalisierung.¹⁸

Immuntherapeutische Verfahren bei Patienten mit malignen Tumoren können in aktive und passive Ansätze unterteilt werden.¹⁹ Unter aktiver Immuntherapie versteht man die Stimulation des Immunsystems des Patienten, damit dieses die Tumorzellen bekämpft.¹³ Bei der passiven Immuntherapie werden Antikörper oder spezifische Immunzellen verabreicht, die eine direkte oder indirekte Antitumorwirkung hervorrufen können.¹⁹

In den meisten Industrieländern liegt die 5-Jahres-Überlebensrate von Krebspatienten nach Behandlung mit den konventionellen Tumorthérapien bei über 40%.²⁰ In Deutschland leben

sogar mehr als 50 % der Krebspatienten länger als 5 Jahre.²¹ Dies bedeutet aber auch, dass immer noch in Abhängigkeit von der Tumorart ca. jeder Zweite an Krebs stirbt. Für das Jahr 2008 geht man davon aus, dass ca. 7,6 Millionen Menschen an Krebs gestorben sind.²⁰ Deswegen ist es noch immer notwendig nach neuen Methoden zur Behandlung von Krebs zu suchen. Idealerweise sollten diese mit den konventionellen Krebstherapien kombinierbar sein und eine hohe Tumorselektivität aufweisen. Die onkolytische Virotherapie scheint hierfür ein vielversprechender Kandidat zu sein.

1.2.2 Onkolytische Virotherapie

Onkolytische Viren zeichnen sich durch mehrere Fähigkeiten aus. Sie sind selbst-replizierend, dabei tumorspezifisch und in der Lage Tumorzellen zu lysieren.²² Aufgrund der Freisetzung neuer Viruspartikel innerhalb des Tumors wird der zerstörerische Effekt der Viren verstärkt und gleichzeitig sind aufgrund der Tumorspezifität die Nebenwirkungen geringer.²³

Die anti-tumorale Wirkung der onkolytischen Viren ist noch nicht vollständig verstanden, aber es werden 4 Mechanismen vermutet, die einzeln oder in Kombination zur Zerstörung des Tumors beitragen können: die Onkolyse, d. h. die infizierten Zellen werden durch Lyse zerstört; die Zerstörung der Tumervaskulatur, wodurch der Tumor von Sauerstoff und Nährstoffen abgeschnitten wird, die Induktion der Immunantwort des Wirts gegen den Tumor²⁴ und die Suppression der microRNA-Expression.

Die onkolytische Wirkung von Viren wurde bereits in den ersten Jahrzehnten des 20. Jahrhunderts entdeckt, nachdem Tumorremissionen nach einer Infektion des Patienten mit Viren beobachtet wurden.^{25,26} Erste klinische Versuche mit onkolytischen Viren wurden daraufhin in den 1950er und 1960er Jahren unter anderem bei Patienten mit Gebärmutterhalskrebs²⁶ oder Melanomen²⁷ durchgeführt. Diese Studien waren bahnbrechend und es zeigten sich erste Hinweise auf das therapeutische Potential beim Menschen, aber die Wirksamkeit der Virotherapie war gering und viele Viren zeigten Nebenwirkungen, die zum Abbruch der Versuche führten.^{28,29}

Erst in den 1990er Jahren, mit dem Aufkommen der modernen Biotechnologie und dem Konzept der Gentherapie, stieg wieder das Interesse an Viren zum Einsatz in der Krebstherapie.²⁹ Durch Deletion von Virusgenen, die zur Replikation in normalen Zellen, aber nicht in Krebszellen, benötigt werden, wurden onkolytische Viren attenuiert und gleichzeitig ihre Tumorspezifität verbessert. Beispielsweise die Deletion der Thymidinkinase (TK)^{30,31} oder eines Wachstumsfaktors^{31,32} verringern die Pathogenität verglichen mit wildtypischen Viren. Es wurden aber auch Wildtypviren gefunden, die aufgrund von Deletion oder

Punktmutation im Gen für die Thymidinkinase^{33,34} oder anderer Virusgene³⁵ auf natürliche Weise attenuiert sind.

Durch die Insertion von Genen für immunstimulierende Faktoren,^{36,37} anti-angiogene Moleküle^{38,39} oder Suizidgene^{40,41} kann die Anti-Tumor-Wirkung der onkolytischen Viren zusätzlich verstärkt werden.

Für die Tumordiagnostik können Viren eingesetzt werden, die Reportergene exprimieren und damit eine optische Darstellung der Tumormasse ermöglichen. Dazu gehören die Expression von fluoreszierenden Proteinen wie z.B. GFP (green fluorescent protein)⁴²⁻⁴⁴ oder Transmembranproteinen, die eine Aufnahme von Radionukliden fördern, die wiederum mit Hilfe der Emissionscomputertomographie sichtbar gemacht werden können.^{45,46}

Bis heute wurden unter anderem Viren aus den Familien der Adenoviridae, Herpesviridae, Poxviridae, Reoviridae, Paramyxoviridae und Flaviviridae auf ihre Wirksamkeit zur Tumorbekämpfung überprüft.^{28,29} Inzwischen existieren viele klinische Studien der Phasen I bis III in denen verschiedene onkolytische Viren auf ihre Wirksamkeit zur Bekämpfung von Krebs überprüft werden.⁴⁷ Bereits 2005 wurde als erstes onkolytisches Virus das genetisch modifizierte Adenovirus H101 in China für die Tumorbehandlung zugelassen.⁴⁸

1.2.3 Das Vaccinia-Virus

1.2.3.1 Systematik der Poxviridae

Die Familie der Poxviridae wird in zwei große Unterfamilien unterteilt: die Entomopoxvirinae, die nur Insekten infizieren und die Chordopoxvirinae, die Vertebraten als Wirt bevorzugen.

Die Chordopoxvirinae setzen sich aus acht Gattungen zusammen. Für den Menschen sind die Orthopoxviren von Bedeutung, da sowohl das humanpathogene Variola-Virus, als auch das Vaccinia-Virus dieser Gattung angehören.^{49,50}

1.2.3.2 Morphologie der Vaccinia-Viren

Die Pockenviren und damit auch die Vaccinia-Viren, sind große, komplexe DNA-Viren, die sich vollständig im Cytoplasma von infizierten Zellen replizieren.⁵¹ Das Vaccinia-Virus besteht aus einer Lipoproteinhülle, die eine komplexe Kernstruktur umhüllt.⁴⁹ Diese Kernstruktur enthält lineare, doppelsträngige DNA mit einer Größe von 192 kbp,⁵² die für nahezu 200 Proteine kodiert^{8,12} und an den Enden Haarnadelschleifen aufweist.^{53,54}

Es existieren 4 Formen von infektiösen Partikeln: das reife Virion, das intrazellulär vorliegt (IMV, intracellular mature virus) und das umhüllte Virion, das intrazellulär (IEV, intracellular enveloped virus), zell-assoziiert (CEV, cell-associated enveloped virus) oder extrazellulär (EEV, extracellular enveloped virus) vorliegen kann.⁵⁵

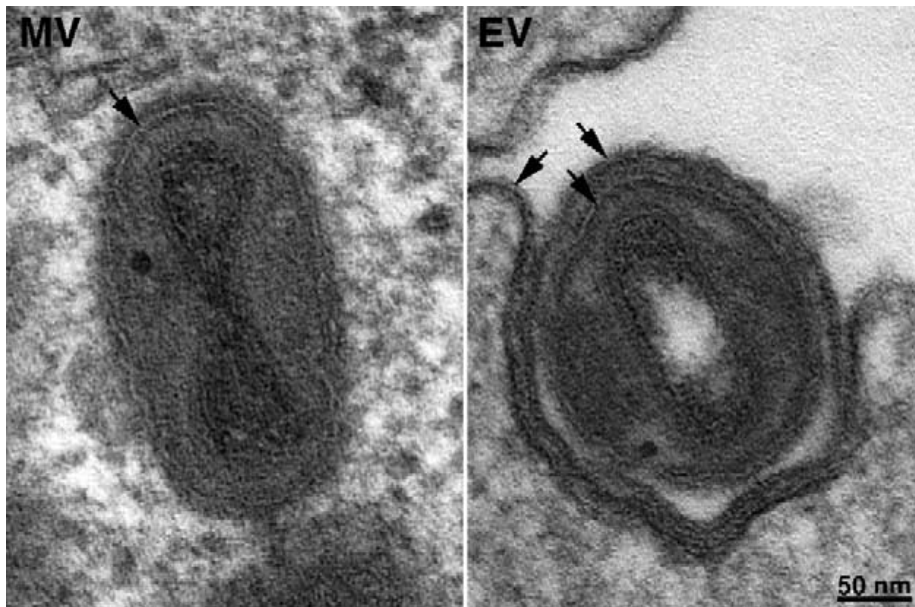


Abb. 1: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines intrazellulären reifen Virions (MV, linkes Bild) und eines umhüllten Virions (EV, rechtes Bild). Linke Bildhälfte: das reife Virion wird von einer einzelnen Membran umschlossen (Pfeil); rechte Bildhälfte: während der Exocytose fusioniert die äußere Hüllmembran (linker Pfeil) mit der Plasmamembran, das extrazelluläre Virion ist zusätzlich zu der Einzelmembran (mittlerer Pfeil) noch von der inneren Hüllmembran umschlossen (rechter Pfeil).⁵¹

1.2.3.3 Das Vaccinia Virus in seiner Rolle als Impfstoff gegen Pocken

Das Vaccinia-Virus hat die längste und umfangreichste Geschichte vom Einsatz im Menschen, verglichen mit anderen Viren und vermutlich auch anderen medizinischen Produkten.⁵⁶ Bereits 1796 isolierte Dr. Edward Jenner Kuhpocken von einer Melkerin und nutzte sie zur Impfung gegen die Pocken. In den folgenden 80 Jahren wurde der Impfstoff fast ausschließlich von Arm zu Arm übertragen, wodurch ein Risiko für die Kontamination mit anderen Viren oder Bakterien bestand.⁵⁷ Dies konnte aber nicht verhindern, dass der Pockenimpfstoff ab 1850 weltweit eingesetzt wurde.⁵⁶ Aufgrund des Risikos für die Übertragung von Syphilis, wurden in den darauf folgenden Jahren Impfinstitute gegründet, in denen der Impfstoff auf der Haut von Kälbern vermehrt wurde, so dass die Impfung von Arm zu Arm immer mehr ersetzt werden konnte.⁵⁷

In den 1930er Jahren wurde schließlich klar, dass das zur Impfung eingesetzte Virus sich von dem Kuhpocken Virus unterschied, weswegen es von diesem Zeitpunkt an als „Vaccinia-Virus“ bezeichnet wurde.⁵⁸ Trotz der Impfungen gegen die Pocken gab es in den 1950er Jahren noch ca. 50 Millionen Fälle von Pocken weltweit, deren Zahl sich aber in den folgenden Jahren auch aufgrund eines von der WHO (World Health Organisation)

intensivierten Plans zur Ausrottung der Pocken verringerte. 1978 wurden schließlich von der WHO die Pocken als ausgerottet erklärt.^{56,59}

Um einer möglichen Nutzung von Pocken im Zuge einer terroristischen oder militärischen Attacke entgegenzutreten, wurde im Dezember 2002 ein nationales Impfungsprogramm in den USA begonnen. Seither wurden mehr als 2,1 Millionen Armeeangehörige und 40.000 Ersthelfer geimpft.⁶⁰ Seit 2007 wurde hierfür ein neu entwickelter Impfstoff eingesetzt, der aufgrund der Vermehrung in Zellkultur anstelle mit Hilfe der veralteten Technik, der Vermehrung auf der Haut von Kälbern, aseptisch gewonnen werden kann.⁶¹

1.2.3.4 Vorteile des Vaccinia-Virus als onkolytisches Virus in der Krebstherapie

Aufgrund seines langjährigen und weltweiten Einsatzes als Impfstoff gegen die Pocken und seiner Verwendung als Vektor für die Expression von Fremdgenen in Zielzellen existieren viele Aufzeichnungen über Immunantworten, den zeitlichen Umfang der Immunität, die sichere Anwendung des Virus und seine Nebenwirkungen.⁵⁶ Diese wurden intensiv studiert und sind besser verstanden worden als für jedes andere Virus.^{56,58} Ein Grund für die sichere Anwendung des Virus für den Menschen ist, dass das Virus ein DNA-Virus ist, das sich im Zytoplasma der Wirtszelle repliziert,^{56,58} weswegen keine Gefahr für eine Integration ins Wirtsgenom besteht.⁵⁶ Das Virus verursacht keine latente Infektion, d.h. nach einer anfänglichen Ausbreitung wird es vom Immunsystem aus dem Wirt komplett entfernt. Außerdem ist es unwahrscheinlich, dass sich das Vaccinia Virus mit einem wildtypischen Virus rekombiniert und einen virulenteren Stamm erzeugt, da Infektionen mit Pockenviren nicht endemisch auftreten.⁶²

Weiterhin kodiert das Virus seine eigenen Proteine für die DNA-Replikation und RNA-Synthese und ist somit nur minimal von der Wirtszelle abhängig.^{53,58} Dies ermöglicht es dem Virus, in vielen verschiedenen Zelltypen zu replizieren und die Immunabwehr des Wirtes zu umgehen.⁵⁸ Der Lebenszyklus des Vaccinia-Virus ist mit einer Dauer von 24 Stunden sehr kurz und wird mit der Lyse der infizierten Zelle abgeschlossen, wobei ca. 5000-10.000 reife Viren gebildet werden. Aber bereits 6 h nach Infektion einer Zelle können schon CEV und EEV freigesetzt werden, wodurch eine schnelle Ausbreitung des Virus möglich ist,⁵⁸ noch bevor eine starke zell-vermittelte Immunantwort an der Infektionsstelle induziert werden kann.⁵⁶ Damit ist das Vaccinia-Virus deutlich schneller als z.B. das Adenovirus, dessen Replikationszyklus 48-72 h dauert.⁶³

Das Vaccinia-Virus hat eine große Bandbreite von Wirtszellen, in denen es replizieren kann. Bisher wurde aber noch kein Rezeptor gefunden, der zum Eindringen des Virus in eine Zelle benötigt wird.^{51,53}

Ein weiterer Vorteil ist, dass das Vaccinia-Virus einen natürlichen Tumortropismus zeigt.⁶⁴ Das Vaccinia-Virus benötigt aufgrund seiner Größe von ca. 350 nm x 240 nm durchlässige Blutgefäße für die Extravasation ins Gewebe.^{56,65} Dies ist in Tumorgewebe der Fall. Zusätzlich sind Tumorgewebe auch noch durch eine hohe Proliferation und ein immundefizientes Milieu gekennzeichnet, wodurch die Tumorselektivität weiterhin verstärkt wird.⁵⁶ Mit Hilfe von Deletionen kann die Tumorselektivität nochmals gesteigert werden. Häufig wird das Gen für die Thymidinkinase des Virus deletiert, wodurch neben der Steigerung der Tumorselektivität auch noch zusätzlich eine Attenuierung des Virus erreicht wird und somit die Sicherheit bei der Verwendung für Menschen erhöht wird.^{30,31,36,56}

Ein sehr großer Vorteil ist es, dass in das Genom des Vaccinia Virus große Mengen ($\geq 25\text{kb}$) an Fremd-DNA eingeschleust werden können,^{58,66} ohne dass die Replikationseffizienz des Virus verringert wird⁶⁶ und gleichzeitig wird der Genexpressions-Level der Virus-spezifischen Proteine nicht vermindert.⁵⁶

Eine Kombinationstherapie von attenuierten Vaccinia-Virus mit Chemotherapie^{48,67,68} oder Bestrahlung⁶⁹ konnte im Mausversuch keine zusätzlichen Nebenwirkungen zeigen. Dies gilt auch für die Kombination eines Vaccinia-Virus und der Behandlung mit einer Prodrug.⁷⁰ Hierbei wird die Prodrug, die die Vorstufe eines gegen Krebs wirksamen Medikaments ist, durch ein vom Virus kodiertes Enzym in seine aktive Form (drug) umgewandelt.

Zum Sicherheitsaspekt des Vaccinia Virus trägt zusätzlich bei, dass für den Fall einer unkontrollierten Replikation des Virus eine Behandlung mit Virustherapeutika wie Cidofovir oder Anti-Vaccinia-Antikörpern erfolgen kann.^{56,58}

Das Vaccinia Virus ist ein vielversprechender Kandidat für den Einsatz als onkolytisches Virus in der Krebstherapie, da es viele der Attribute besitzt, die ein ideales onkolytisches Virus besitzen sollte.

1.2.3.5 Vaccinia-Viren auf Basis des Lister-Stammes

In dieser Arbeit wurden verschiedene Vaccinia Viren eingesetzt, die vom Lister-Stamm (*Lister* strain, Institute of Viral Preparations, Moscow, Russia) abgeleitet wurden. Durch die Insertion von 3 Expressionskassetten wurde eine Attenuierung des Virus erreicht.

Das Replikations-kompetente, rekombinante Vaccinia Virus GLV-1h68 (Genelux virus-1h68) trägt im F14.5L-Locus hinter dem synthetischen early/late-Promotor das *Renilla* Luziferase-GFP Fusionsprodukt und im Thymidinkinase-Locus (TK) das *lacZ*-Gen unter Kontrolle des Promotors p7.5. Weiterhin besitzt das Virus das reverse Transferrin-Rezeptor-Gen (rTFR) im TK-Genlocus und das Markergen Glucuronidase (*gusA*). Das *gusA*-Gen wird durch den viralen Promotor p11 kontrolliert und ist im HA-Locus (Hämagglutinin-Gen) inseriert. Die inserierten Gene ermöglichen eine Detektion des Virus, wodurch dieser in der Diagnostik eingesetzt werden kann. So ist es möglich Tumore aufgrund der Virus-vermittelten

Lumineszenz oder Fluoreszenz zu detektieren oder sezernierte Glucuronidase im Blut nachzuweisen.³⁰

Ein weiteres rekombinantes Virus ist GLV-1h109, das aus GLV-1h68 durch Insertion des Gens für GLAF-1 unter der Kontrolle eines synthetischen late-Promotors in den J2R-Lokus konstruiert wurde. Das *glaf-1* Gen kodiert für einen Einzelketten-Antikörper, der spezifisch VEGF von Maus, Mensch und Hund erkennt und bindet.^{38,71}

Die Vaccinia-Viren LIVP1.1.1 und LIVP6.1.1 sind natürliche Isolate des LIVP-Stammes, die genetisch nicht modifiziert wurden. Sequenzanalysen der beiden Viren zeigten, dass das Gen für die Thymidinkinase neben weiteren Genen aufgrund von Mutationen nicht funktionell ist (Chen *et al.*, unveröffentlichte Daten).

1.3 Das Tumormikromilieu

Tumore sind nicht einfach ungeordnete Anhäufungen von Krebszellen. Sie bestehen neben den Tumorzellen aus vielen verschiedenen Zelltypen^{72,73} und Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) und entwickeln sich durch komplexe Interaktionen dieser verschiedenen Komponenten miteinander, wobei diese Prozesse oftmals denen gleichen, die während der Entwicklung von Organen stattfinden.⁷³

Das Tumormikromilieu (Stroma) setzt sich aus einer Vielzahl von mesenchymalen Zelltypen und extrazellulären Komponenten zusammen. Hierzu gehören Endothelzellen des Blut- und Lymphsystems, Perizyten, Fibroblasten und Myofibroblasten, Adipozyten und Zellen aus dem Knochenmark, inklusive verschiedener Immunzellen und mesenchymaler Stammzellen (Abb. 2).⁷⁴⁻⁷⁷ Außerdem sind auch verschiedene Faktoren, wie Wachstumsfaktoren, Chemokine, Zytokine und Antikörper, sowie Metabolite Bestandteile des Stromas.⁷³

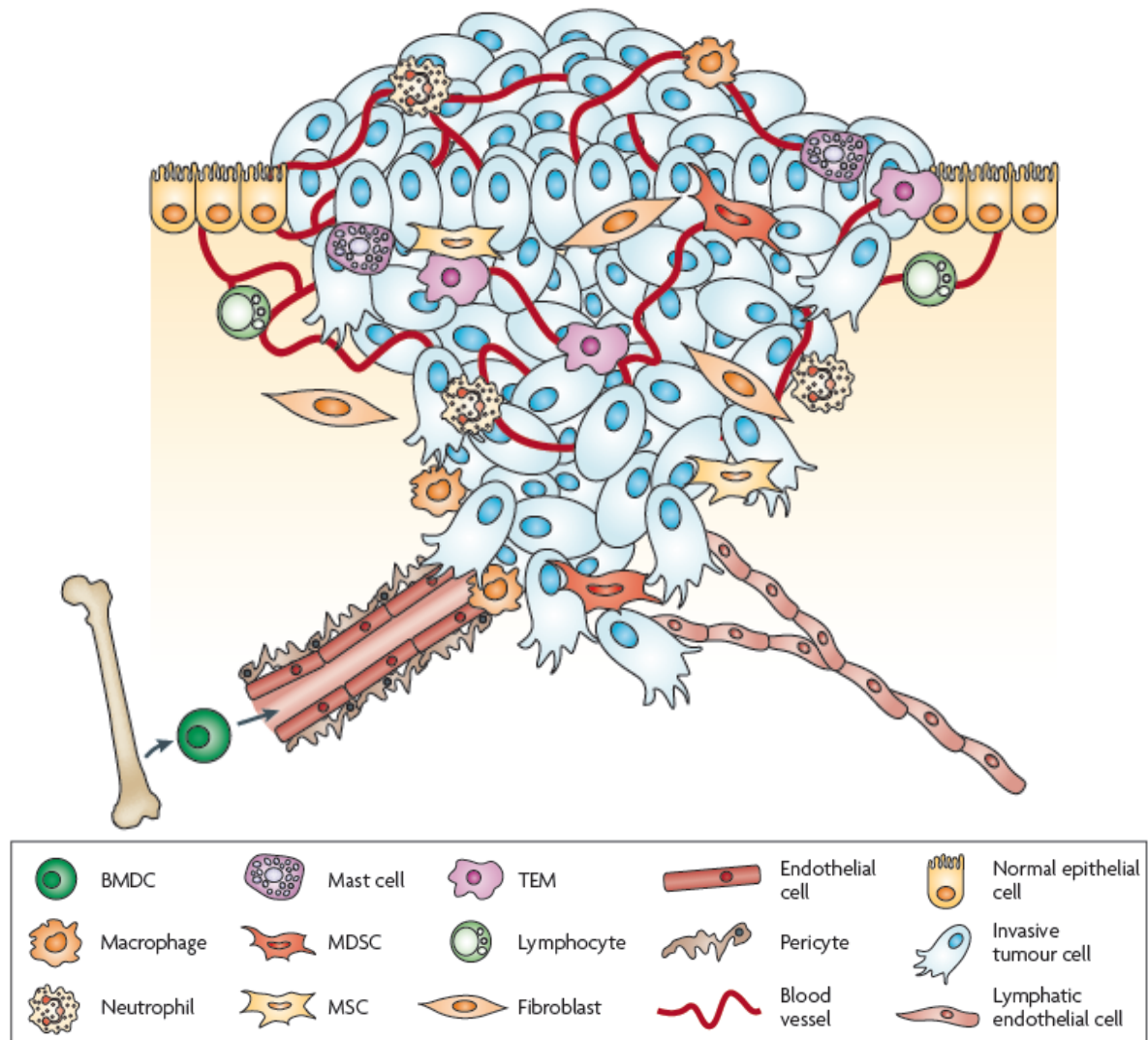


Abb. 2: Das Tumormikromilieu. Krebszellen sind von einem komplexen Tumormikromilieu umgeben, das sich aus zahlreichen Zelltypen zusammensetzt. Hierzu gehören Endothelzellen des Blut- und Lymphsystems, Perizyten, Fibroblasten und verschiedene Zellen aus dem Knochenmark (bone marrow-derived cells, BMDC) wie z.B. Makrophagen, MDSC-Zellen (myeloid-derived suppressor cells), TIE2-exprimierende Monozyten (TEM) und mesenchymale Stammzellen (MSC).⁷⁶

Die verschiedenen Bestandteile des Tumorstromas wirken alle gleichermaßen auf die Entwicklung des Tumors ein. Sie interagieren mit den malignen Tumorzellen und formen ein dynamisches Tumormikromilieu in dem die nicht-transformierten Zellen sowohl positive als auch negative Effekte auf Wachstum und Streuung der Krebszellen ausüben und diese wiederum beeinflussen den Phänotyp der nicht-transformierten Zellen.⁷⁸

Normale Epithelzellen und Fibroblasten sind Beispiele für Zellen, die das Tumorstromawachstum inhibieren,⁷⁹ wohingegen aktivierte Fibroblasten (auch bekannt als cancer-associated fibroblasts, CAFs), eine Vielzahl an tumorfördernden Prozessen aufgrund ihrer Produktion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Chemokinen und extrazellulären Matrixproteinen regulieren⁷⁵. Die sezernierten Zytokine und Chemokine führen zu einer Infiltration von

Immunzellen in den Tumor und fördern die Neubildung von Blutgefäßen aus bereits bestehender Mikrovaskulatur (Angiogenese), die wiederum eine Voraussetzung für die Bildung von Metastasen sind.⁸⁰ Weiterhin sezernieren die CAF Matrixmetalloproteinasen, die eine Degradation der extrazellulären Matrix auslösen, wodurch gespeicherte Wachstumsfaktoren und Zytokine biologisch verfügbar werden.⁸¹ Da die im Tumor zahlreich vorhandenen CAF⁷⁴ weder durch Apoptose aus dem Tumor entfernt werden können, noch ihre Aktivierung rückgängig gemacht werden kann, stellen sie den bedeutendsten Zelltyp in vielen Tumortypen dar.⁸²

Eine ebenfalls wichtige Zellpopulation des Tumors sind die Immunzellen, die, wie auch die CAFs, das Tumorwachstum, die Angiogenese und die Metastasierung fördern können.^{82,83} Aktivierte Fibroblasten sind daher zusammen mit den Immunzellen die Hauptverursacher einer veränderten extrazellulären Matrix.⁸⁴

Die extrazelluläre Matrix setzt sich aus Proteoglykanen, Hyaluronsäure und fibrösen Proteinen, wie z.B. Kollagen, Fibronectin und Laminin zusammen.^{73,84,85} Sie erfüllt im Tumorgewebe viele Funktionen, unter anderem dient sie als Grundgerüst, erleichtert die Interaktion zwischen den verschiedenen Zelltypen und sendet Signale aus, die für das Überleben und die Differenzierung benötigt werden.⁷⁶ Während der embryonalen Entwicklung und der Organhomöostase ist die EZM straff reguliert, obwohl sie gleichzeitig sehr dynamisch ist. Im Falle von Krankheiten, wie z.B. Krebs, funktioniert ihre Regulierung aber meistens nicht mehr korrekt.⁸⁴ Diese Desorganisation der Dynamik der EZM führt zu Veränderungen in ihren Eigenschaften, wie z.B. einer größeren Steifheit des Gewebes,^{73,82,84} und ist eines der Kennzeichen von Krebs.⁸⁴

1.3.1 Tumorvaskulatur

Eine wichtige Tumor-Komponente ist die Vaskulatur. Säugerzellen benötigen Sauerstoff und Nährstoffe für ihr Überleben und sind daher innerhalb eines Umkreises von 100-200 µm um Blutgefäße herum lokalisiert. Diese Entfernung wird durch die maximal mögliche Diffusion von Sauerstoff beschränkt. Für ein weiteres Wachstum müssen neue Blutgefäße durch Vaskulogenese (Bildung aus endothelialen Vorläuferzellen) und Angiogenese (Sprossung aus bereits vorhandenen Blutgefäßen) gebildet werden.⁸⁶ Eine Vielzahl angiogen wirksamer Faktoren wird üblicherweise in vielen Tumortypen exprimiert und erhöht die Proliferation von Endothel- und Tumorzellen. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) gilt als einer der Hauptfaktoren für die Tumorangiogenese und ist vermutlich der am besten studierte unter diesen.⁸⁷

Blutgefäße von Tumoren sind durch zahlreiche strukturelle und funktionelle Abnormalitäten charakterisiert, zu denen auch eine veränderte Assoziation von Endothelzellen und Perizyten

gehört.⁸⁸ Die Tumorblutgefäße sind ungleichmäßig verteilt, weisen einen vergrößerten Durchmesser auf und bilden chaotische, verworrene Netzwerke mit irregulären Verzweigungsmustern. Sie ermöglichen den Blutfluss in beide Richtungen und sind nicht dauerhaft durchströmt,⁸¹ weswegen in Tumoren hypoxische und säurehaltige Bereiche entstehen, wodurch die Effektivität einiger Tumortherapien herabgesetzt und eine Selektion von Zellen vorangetrieben wird, die auf Hypoxie nicht mit Apoptose antworten.⁸⁶ Weiterhin besitzen die Wände der Tumorblutgefäße zahlreiche Öffnungen aufgrund von geweiteten zwischen-endothelialen Verbindungen, weshalb sie „undicht“ sind und den Durchtritt großer Moleküle zulassen.⁸¹ Da viele der Abnormalitäten der Tumolvaskulatur durch VEGF verursacht werden, geht man davon aus, dass eine gegen VEGF gerichtete Therapie eine Normalisierung der Vaskulatur zur Folge hat, wodurch der Blutfluss und der Transport von Chemotherapeutika und Sauerstoff, der die Effizienz von Bestrahlung erhöht, verbessert werden sollte.⁸⁹ Bevacizumab, ein humanisierter, monoklonaler Antikörper gegen VEGF, konnte bereits klinisch bedeutsamen Nutzen in Verbindung mit Chemotherapie bei Patienten mit metastasierendem kolorektalem Karzinom zeigen und wird in Phase II- und III-Studien bezüglich seiner Rolle bei verschiedenen Stufen der Metastasierung untersucht.⁹⁰

1.4 Immunsystem und Krebs

1863 identifizierte Rudolf Virchow erstmals Leukozyten in Tumorgewebe und stellte daraufhin die Hypothese auf, dass Tumore sich an Orten chronischer Inflammation entwickeln.⁹¹ Tatsächlich geht man inzwischen davon aus, dass zwischen 15 und 25 % der Krebsfälle aufgrund einer Infektion oder Entzündungsreaktion auftreten.^{92,93} In den meisten Tumoren findet man eine entzündliche Komponente, sogar dann, wenn Inflammation nicht als eigentlicher Auslöser gilt.

Hauptmerkmale der Inflammation bei Krebs ist die Infiltration durch Leukozyten, vornehmlich Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM), die Expression von Entzündungsmediatoren wie z.B. Zytokinen, Chemokinen und Prostaglandinen im Tumorgewebe, der Gewebeumbau und die Angiogenese. Diese Merkmale sind vergleichbar mit denen, die in chronischen Entzündungen und während der Heilung von Geweben beobachtet werden können.^{94,95} Mantovani postuliert daher zwei Signalwege, die Inflammation und Krebs miteinander verbinden (Abb. 3).⁹⁶

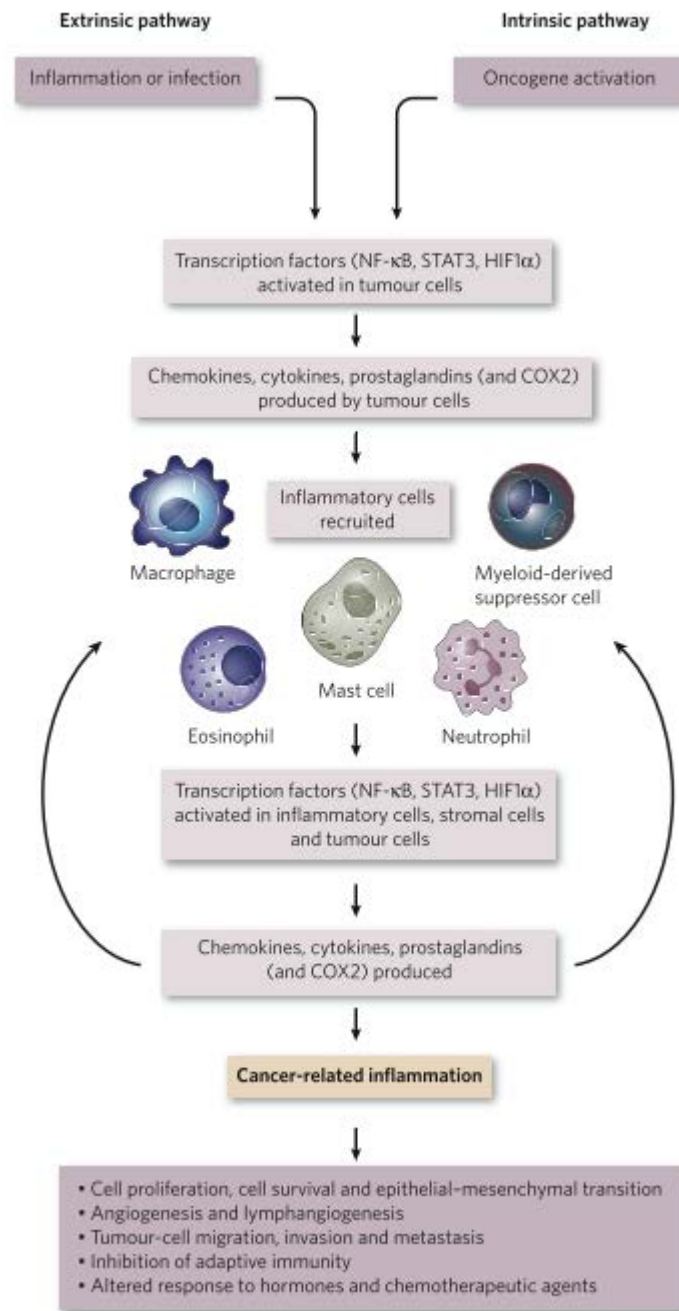


Abb. 3: Verknüpfung von Inflammation und Krebs. Krebs und Inflammation sind über zwei Signalwege verbunden: den intrinsischen und den extrinsischen Signalweg. Der intrinsische Signalweg wird durch genetische Ereignisse aktiviert, die eine Gewebszubildung verursachen. Hierzu gehören die Aktivierung von Onkogenen durch eine Mutation, Chromosomentranslokation oder -amplifikation und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Die veränderten Zellen produzieren daraufhin Entzündungsmediatoren und verändern das Tumormikromilieu zu dem wie es bei einer Entzündungsreaktion vorliegt, obwohl eigentlich keine Voraussetzung dafür gegeben ist. Im Gegensatz dazu liegt beim extrinsischen Signalweg eine Entzündung oder Infektion vor und verstärkt das Risiko Krebs zu entwickeln. Die zwei Signalwege vereinigen sich und es kommt zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in Tumorzellen. Die Transkriptionsfaktoren koordinieren die

Produktion von Zytokinen, Chemokinen und der Cyclooxygenase 2 (COX2), die wiederum zu einer Produktion von Prostaglandinen führt. Die Zytokine rekrutieren zahlreiche Leukozyten in den Tumor und aktivieren die gleichen Transkriptionsfaktoren in den rekrutierten Immunzellen, den Zellen im Stroma und den Tumorzellen, wodurch noch mehr Entzündungsmediatoren produziert werden und ein inflammatorisches Mikroenvironment im Tumor geschaffen wird.⁹⁶

Sowohl der extrinsische als auch der intrinsische Signalweg führen zu einer Rekrutierung von Immunzellen in das Tumorgewebe. Diese setzen, wie auch die Tumorzellen, Zytokine und Chemokine frei und verstärken somit die Inflammation im Tumorgewebe.⁹⁶ Die Zellen des angeborenen Immunsystems (Makrophagen, Neutrophile, dendritische Zellen, NK Zellen, Mastzellen) sind damit die Hauptförderer der Inflammation in Tumoren.⁹⁷

1.4.1 Heterogenität von Makrophagen

Makrophagen sind Zellen der myeloiden Linie. Sie entstehen aus monozytischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, die in Osteoklasten, Antigen-präsentierende dendritische Zellen und Makrophagen differenzieren können.^{98,99} Makrophagen sind eine sehr heterogene Population, die dadurch entsteht, dass die Differenzierung bei der Einwanderung ins Gewebe durch die vorhandenen Stimuli (z.B. Produkte von Bakterien, beschädigte Zellen, aktivierte Lymphozyten) beeinflusst wird.^{100,101} Als Reaktion auf verschiedene Signale können die Makrophagen klassisch oder alternativ aktiviert werden. Die klassische Aktivierung erfolgt aufgrund von Stimulierung der Makrophagen durch Lipopolysaccharide (LPS) und Interferon γ (IFN γ) und erzeugt den M1-Phänotyp. Die Aktivierung aufgrund der Interleukine IL-4, IL-10 und IL-13 wird als alternative Aktivierung bezeichnet und erzeugt den M2-Phänotyp (Abb. 4).¹⁰⁰⁻¹⁰³

M1-Makrophagen produzieren eine große Menge an proinflammatorischen und anti-angiogenen Zytokinen und sind durch eine hohe zytotoxische Aktivität gegen Mikroorganismen und Tumorzellen, eine hohe Expression von reaktiven Sauerstoffzwischenverbindungen (Reactive Oxygen Intermediate, ROI) und ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation gekennzeichnet. M2-Makrophagen sind dagegen an der Bekämpfung von Parasiten beteiligt, fördern die Heilung von Wunden, die Angiogenese, das Entfernen von Zelltrümmern und das Tumorwachstum und sind phagozytisch aktiv. Außerdem kontrollieren sie die Immunantwort, indem sie durch M1-Makrophagen vermittelte Funktionen und die adaptive Immunantwort herunterregulieren.^{101,102} Der exprimierte IL-1R Köder (IL-1R decoy) puffert das von M1-Makrophagen sekretierte IL-1 ab¹⁰⁴ und die Produktion von IL-10 verstärkt die Differenzierung der Makrophagen zum M2-Phänotyp hin.^{102,105}

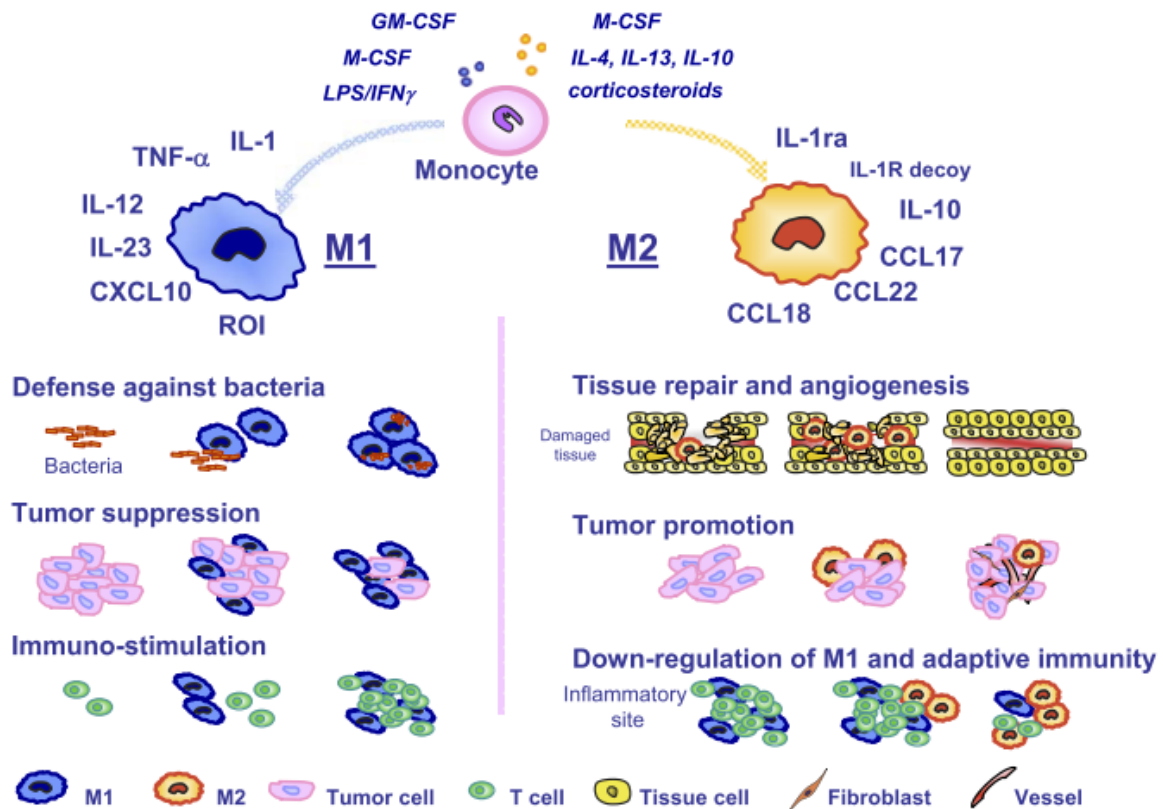


Abb. 4: Die Heterogenität der Makrophagen. Makrophagen können klassisch durch LPS oder IFN γ aktiviert werden (M1-Makrophagen) oder alternativ durch IL-4, IL-13 oder IL-10 (M2-Makrophagen). M1-Makrophagen produzieren viel IL-12, IL-1, IL-23, TNF α (Tumornekrosefaktor), das Chemokin CXCL10 und reaktive Sauerstoffverbindungen. Sie stimulieren das Immunsystem aufgrund ihrer Fähigkeit, Antigene zu präsentieren, supprimieren das Tumorstadium und bekämpfen Mikroorganismen. M2-Makrophagen sekretieren IL-10, CCL17, CCL22, CCL18, IL-1ra und den IL-1R Köder. Sie fördern hierdurch das Tumorstadium, die Angiogenese und die Wundheilung und regulieren die immunstimulierende Wirkung der M1-Makrophagen und sowie die adaptive Immunantwort herunter.^{101,102}

1.4.2 Tumor-assoziierte Makrophagen

Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) sind eine wichtige Komponente des Tumorstromas in humanen und murinen Patienten.¹⁰⁶ Tumorzellen und Stromazellen produzieren verschiedene Moleküle, die im Blutkreislauf zirkulierende Monozyten in das Tumorgewebe rekrutieren, wo sie sich dann zu Makrophagen differenzieren.¹⁰² Da das Tumormikromilieu im Allgemeinen hohe Konzentrationen der immunsupprimierenden Zytokine IL-10 und TGF- β (Transforming Growth Factor) aufweist,¹⁰⁷ erfolgt die Polarisierung der Makrophagen in Richtung des M2-Phänotyps hin.^{102,105,107} Man spricht hierbei von einem „M2-ähnlichen“ Phänotyp,^{106,108–110} denn tatsächlich stellen der M1- und M2-Phänotyp nur die zwei äußersten Punkte der möglichen Polarisierung von Makrophagen dar.^{103,108} Es existiert eine Vielfalt von

TAM-Phänotypen basierend auf ihrer Lokalisation im Tumor, bzw. auf das sie speziell umgebende Mikroenvironment.¹⁰³ Die Polarisierung zu M1-Makrophagen erfolgt wie bereits oben beschrieben durch IFN γ und mikrobielle Stimuli wie z.B. LPS. Die M1-Makrophagen sind durch die Produktion von IL-12^{high}, IL-23 und ROI gekennzeichnet und zeigen zytotoxische Aktivität gegen phagozytierte Mikroorganismen und Tumorzellen und aktivieren das Immunsystem.^{96,101,102} Die M2-ähnlichen Tumor-assoziierten Makrophagen haben hingegen im Allgemeinen einen IL-12^{low}IL-10^{high}-Phänotyp, eine starke Expression von angiogenen Faktoren (VEGF, Epidermal Growth Factor EGF und Semaphorin 4D), Metalloproteinasen und Cathepsinen sowie eine beeinträchtigte Expression von reaktiven Stickstoffzwischenprodukten, eine geringe Fähigkeit zur Antigenpräsentation und antitumorale Wirkung.¹⁰⁸

Verschiedene Bereiche im Tumor sind durch Hypoxie und Nährstoffmangel geprägt, andere durch die Nähe von Blutgefäßen ausreichend mit Sauerstoff versorgt. Weiterhin unterscheidet sich das Mikroenvironment im Innenbereich von dem des Randbereichs, an dem die Invasion in benachbartes Gewebe stattfindet.¹⁰³ Dies bedeutet, die Makrophagen können bei der M2-Aktivierung derart polarisiert werden, dass sie der Gewebeerneuerung oder Angiogenese dienen, das Tumorstadium und die –entwicklung fördern oder die Immunantwort regulieren, je nach Bedarf des sie umgebenden Gewebes (Abb. 5).¹⁰⁹ Die Polarisierung der TAM zu einem M2-ähnlichen Phänotyp ist aber nicht endgültig, sondern kann durch Änderung des Tumormikromilieus zu einem M1-Phänotyp verschoben werden. Dies ist der Ansatz für neue Tumorthérapien.¹⁰⁵

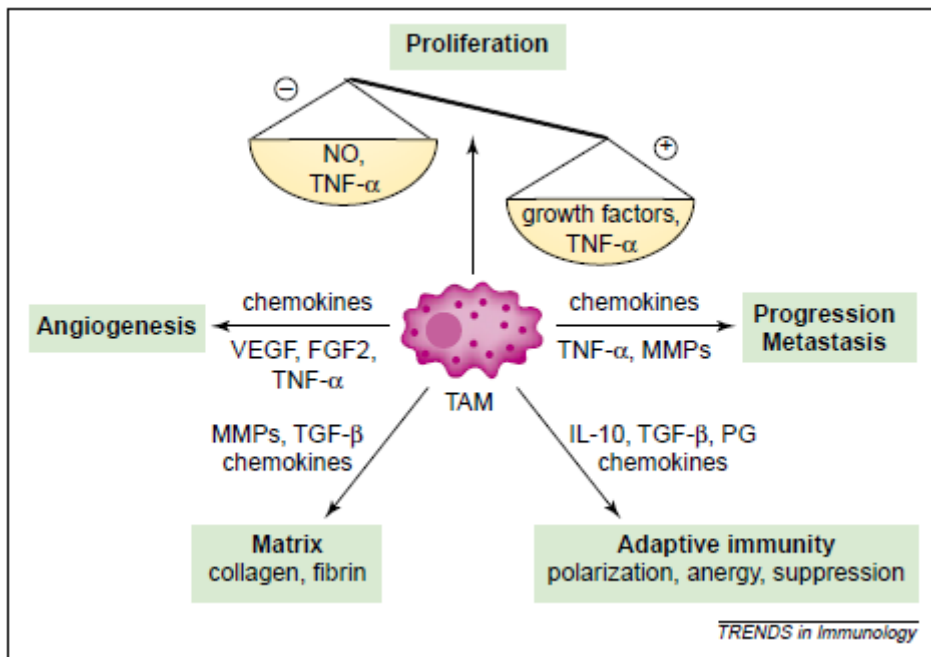


Abb. 5: Vereinfachte Übersicht über die Rolle der Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) in der Immunbiologie von Tumoren. TAM produzieren verschiedene Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und Metalloproteinasen (MMP) und sind hierdurch an der Regulation von Angiogenese, Tumorwachstum und -entwicklung, Metastasierung, adaptiver Immunantwort und Bildung des Stromas beteiligt.¹¹¹

1.4.3 Tumor-assoziierte Neutrophile

Neutrophile sind mit einem Anteil von 50-70 % aller zirkulierenden Leukozyten die dominierende Leukozytenpopulation im Menschen.¹¹² Die Aufgaben der kurzlebigen Neutrophilen¹¹³ sind die Phagozytose und Elimination von Bakterien durch zytotoxische Substanzen, Aktivierung des Immunsystems durch die Produktion zahlreicher Zytokine und Chemokine und Induktion der Zerstörung des Gewebes während einer Infektion.^{112,114}

Es wird vermutet, dass die Migration von Neutrophilen ins Tumorgewebe durch CXCL8 (Interleukin 8) induziert wird, da CXCL8 das stärkste Chemoattraktant für Neutrophile ist.¹¹⁵ Aber auch humanes MIP-1 α (Macrophage Inflammatory Protein-1 α) und huGCP-2 (human Granulocyte Chemotactic Protein-2) bzw. die murinen Chemokine MIP-1 α , GCP-2 und KC (Keratinocyte-derived Chemokine) sind starke Chemoattraktanten und Aktivatoren für Neutrophile und werden von vielen Tumoren produziert.¹¹³ Sobald die Neutrophilen sich im Tumor befinden, werden sie als Tumor-assoziierte Neutrophile (TAN) bezeichnet.¹¹⁶

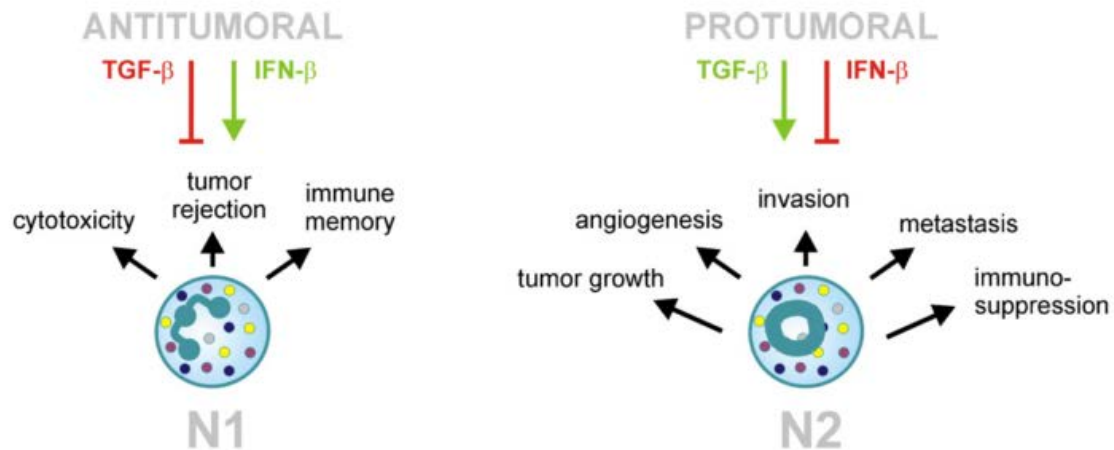


Abb. 6: Vereinfachtes Schema der Polarisierung von Tumor-assoziierten Neutrophilen. Die Polarisierung der TAN zu einem anti-tumorigenen Phänotyp (N1) oder Tumor-fördernden Phänotyp (N2) wird durch die Zytokine TGF-β und IFN-β beeinflusst, die die phänotypische Polarisierung entweder stimulieren (grüner Pfeil) oder inhibieren (roter Pfeil).¹¹³

TAN können in Abhängigkeit vom Tumormikromilieu verschiedene Aktivierungs- bzw. Differenzierungszustände annehmen, wobei die Klassifizierung in Anlehnung an die TAM in einen tumorsupprimierenden N1-Phänotyp und einen tumorfördernden N2-Phänotyp erfolgt.¹¹⁷ Die Zytokine TGF-β¹¹⁷ und IFN-β¹¹⁸ beeinflussen die Polarisierung der TAN (Abb. 6). IFN-β polarisiert die TAN hin zum N1-Phänotyp, wodurch gleichzeitig der N2-Phänotyp blockiert wird, TGF-β hingegen induziert die Polarisierung zum N2-Phänotyp und blockiert den N1-Phänotyp.¹¹³

N1-TAN sind gekennzeichnet durch die Expression von CD11b und Ly6G als Oberflächenmarker und besitzen einen hypersegmentierten Nucleus.¹¹³ Sie wirken zytotoxisch gegen den Tumor aufgrund ihrer Sekretion von reaktiven Sauerstoffverbindungen (Reactive Oxygen Species, ROS), inhibieren das Tumorwachstum, aktivieren das Immunsystem durch die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen und aktivieren zytotoxische T-Zellen durch die Interaktion mit dendritischen Zellen.^{112,113,117}

N2-TAN sind durch die Expression von CD11b, Gr-1 und in geringen Mengen auch Ly6C gekennzeichnet und besitzen einen ringförmigen Nucleus.¹¹³ N2-Neutrophile fördern das Tumorwachstum und die Angiogenese durch die Sekretion von MMP-9 und weiteren angiogenen Faktoren und Matrix-degradierenden Enzymen, wie z.B. Collagenase. Hierdurch wird ebenfalls die Extravasation und Metastasierung gefördert. Außerdem supprimieren N2-Neutrophile das adaptive Immunsystem. Sie setzen gespeicherte Arginase frei, die zelluläres Arginin gedradert, das für die korrekte Aktivität von T-Zellen benötigt wird.^{112,113,117,119}

1.5 Aufgabenstellung der Arbeit

Aufgabe dieser Arbeit war es, verschiedene Aspekte der Wirkungsweise von vier verschiedenen Vaccinia-Virus-Stämmen bei der Therapie von Tumoren des Menschen und des Hundes im Mausmodell zu untersuchen.

Hierfür sollte die onkolytische Wirkung der Viren in Zellkultur und in Xenotransplantaten analysiert werden. Weiterhin sollte die Inhibition des Tumorwachstums nach Virusinfektion untersucht werden.

Außerdem sollten die Effekte der Virusinfektion auf das Tumormikromilieu und die Mitwirkung des angeborenen Immunsystems bei der Virotherapie bestimmt werden. Hierfür sollte mittels Analyse der immunbezogenen Proteinantigene die Veränderung von Zytokinen und anti-angiogenen Faktoren im Stroma untersucht werden. Weiterhin sollte mit Hilfe von Western Blot und ELISA die Produktion und Sekretion des durch GLV-1h109 kodierten anti-VEGF-Antikörpers GLAF-1 in Zellkultur, Blut und Tumorgewebe untersucht werden. Zusätzlich sollte dessen anti-angiogene Wirkung sowie die Reduzierung und Normalisierung der abnormalen Tumervaskulatur in immunhistochemischen Färbungen analysiert werden. Mittels Bestimmung der Virusverteilung in Tumor und Organen sollte die Selektivität der Viren für Tumore und Metastasen untersucht werden. Schließlich sollte die Durchflusszytometrie zur Analyse der Immunzellpopulation von Tumoren etabliert und die Aktivierung des Wirtsimmunsystems analysiert werden.

Der Vergleich der onkolytischen Vaccinia-Virus-Stämme in Hunde-Xenotransplantaten sollte der Bestimmung des besten Kandidaten für eine mögliche klinische Phase I-Studie mit Hundepatienten dienen.

2 Material

2.1 Bezugsquellen der verwendeten Materialien

Materialien	Hersteller
1x BSS	PAA, A-Pasching
Carboxymethylcellulose (CMC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Collagenase I	Sigma-Aldrich, Steinheim
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEM-Medium	PAA, A-Pasching
DNase I	Calbiochem, Darmstadt
EDTA	Serva, Heidelberg
EGTA	
Ethanol 96 %	Chemikalienausgabe der Universität Würzburg
Fötales Kälberserum (FBS)	PAA, A-Pasching
Glutamax	PAA, A-Pasching
Hank's BSS	PAA, A-Pasching
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, Steinheim
MEM-Medium	PAA, A-Pasching
Mycoplasma Detection Kit Venor®GeM	Minerva Biolabs, Berlin
1x PBS	PAA, A-Pasching
Penicillin/Streptomycin	PAA, A-Pasching
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Steinheim
NEAA (Nicht essentielle Aminosäuren)	PAA, A-Pasching
RPMI-Medium 1640	PAA, A-Pasching
Trypsin-EDTA	PAA, A-Pasching

2.2 Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

Collagenase I-Lösung: 10.000 CDU/ml Collagenase I in 1x PBS

DNase I-Lösung: 5 MU/ml DNase I in ddH₂O

10x Erythrozyten-Lysepuffer: 8,29 g NH₄HCl
1,09 g KHCO₃
37 mg EDTA-Na₂
In 100 ml ddH₂O lösen

0,5 M EGTA-Lösung: 1,9 g EGTA
auf 10 ml ddH₂O auffüllen

FACS-Puffer: 500 ml PBS
10 ml FBS

MTT-Lösung: 50 ml HCL (37,5 %)
450 ml Isopropanol

2.3 Zelllinien und Zellkulturmedien

2.3.1 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Bezugsquelle
CV-1:	adhärent wachsende Fibroblasten aus der Niere der afrikanischen grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>)	ATCC LGC Standards GmbH Wesel
HuH7:	adhärent wachsende Zellen eines Leberkarzinoms eines 57-jährigen Japaners	ATCC LGC Standards GmbH Wesel
PLC/PRF/5:	adhärent wachsende Zellen eines Leberkarzinoms aus einem Menschen	ATCC LGC Standards GmbH Wesel
888-MEL:	adhärent wachsende humane Melanomzelllinie aus Patient 888 im Juni 1989 isoliert	Dr. F. Marincola National Institutes of Health Bethesda, USA

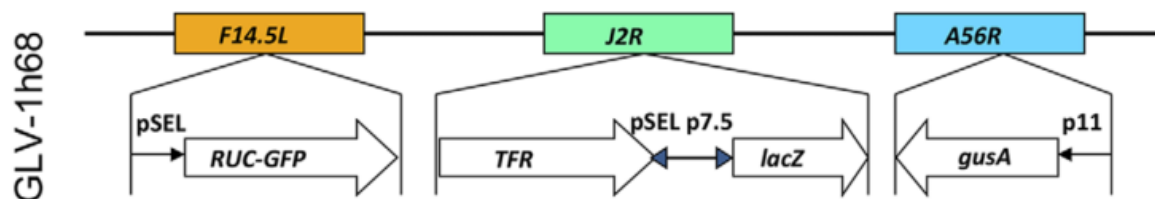
1936-MEL:	adhärent wachsende humane Melanomzelllinie aus Patient 888 im Juni 2001 isoliert	Dr. F. Marincola National Institutes of Health Bethesda, USA
STSA-1:	adhärent wachsende Zellen eines Weichgewebstumors aus einem Hund	Dr. A. McNeill University of Illinois, College of Veterinary Medicine

2.3.2 Zellkulturmedien

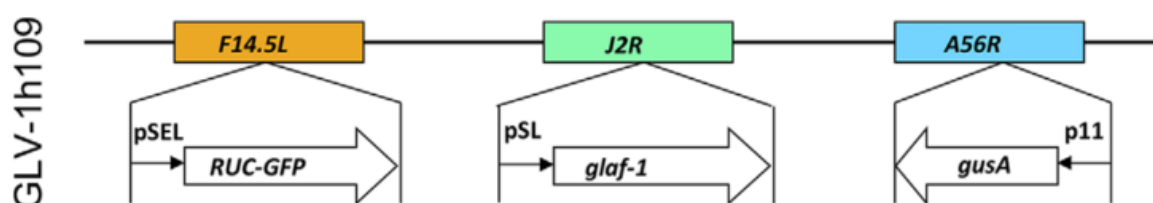
CV-1:	500 ml	DMEM
	50 ml	FBS
	5,5 ml	Antibiotika (Penicillin/Streptomycin)
HuH7 und PLC:	500 ml	DMEM
	50 ml	FBS
	5,5 ml	Antibiotika (Penicillin/Streptomycin)
888-MEL und 1936-MEL:	500 ml	RPMI1640
	50 ml	FBS
	5,5 ml	Antibiotika (Penicillin/Streptomycin)
STSA-1:	500 ml	MEM
	50 ml	FBS
	5,5 ml	Antibiotika (Penicillin/Streptomycin)
	5,5 ml	NEAA
	5,5 ml	Glutamax
	5,5 ml	Natriumpyruvat

2.4 Rekombinante Viruskonstrukte

GLV-1h68 (Genelux virus-1h68) trägt im F14.5L-Locus hinter dem early/late-Promotor das *Renilla* Luziferase-GFP Fusionsprodukt und im TK-Locus (J2R) das lacZ-Gen unter Kontrolle des Promotors p7.5. Weiterhin besitzt das Virus das reverse Transferrin-Rezeptor-Gen (rTFR) im TK-Genlocus und das Markergen Glucuronidase (*gusA*). Das *gusA*-Gen wird durch den viralen Promotor p11 kontrolliert und ist im HA-Locus (Hämagglutinin-Gen) inseriert.⁴³



GLV-1h109 basiert auf dem Virus GLV-1h68. Der Unterschied findet sich im TK-Locus. Hier ist das Gen für GLAF-1, einen einzelkettigen anti-VEGF Antikörper, unter der Kontrolle eines synthetischen late-Promotors inseriert.⁷¹



Die LIVP-Viren des Lister Stammes sind verschiedene natürliche Isolate, die aufgrund von Mutationen in verschiedenen Genen, zu denen auch das Gen für die Thymidinkinase gehört, attenuiert sind.¹²⁰



Die Viren wurden von Dr. Q. Zhang und Dr. N. Chen bei der Genelux Corp., San Diego, USA, isoliert, konstruiert und zur Verfügung gestellt.

2.5 Antikörper

Antikörper (Klon)	Isotyp	Hersteller
Anti-CD11b-PerCPCy5.5 (M1/70)	Rat IgG2b	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Anti-CD11b-APC (M1/70)	Rat IgG2b	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Anti-CD11c-APC (N418)	Hamster IgG	Biolegend, San Diego, CA, USA
Anti-CD16/32 purified (93)	Rat IgG2a	Biolegend, San Diego, CA, USA
Anti-CD19-PECy5.5 (6D5)	Rat IgG2a	Beckman Coulter, Krefeld
Anti-CD19-PerCPCy5.5 (6D5)	Rat IgG2a	Biolegend, San Diego, CA, USA

Anti-CD45-PerCP (30-F11)	Rat IgG2b	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Anti-CD49b-APC (DX5)	Rat IgM	Biolegend, San Diego, CA, USA
Anti-F4/80-APC (BM8)	Rat IgG2a	eBioscience, San Diego, CA, USA
Anti-Gr-1-APC (RB6-8C5)	Rat IgG2b	eBioscience, San Diego, CA, USA
Anti-Gr-1-APC-eFluor780 (RB6-8C5)		eBioscience, San Diego, CA, USA
Anti-IgG2b-PerCPCy5.5 (eB149/10H5)		eBioscience, San Diego, CA, USA
Anti-IgG2b-APC (eB149/10H5)		eBioscience, San Diego, CA, USA
Anti-IgG2a-APC (eBR2a)		eBioscience, San Diego, CA, USA
Anti-IgG2a-PE (eBR2a)		eBioscience, San Diego, CA, USA
Anti-Ly6G-PE (1A8)	Rat IgG2a	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Anti-MHCII-PE (M5/114.15.2)	Rat IgG2b	eBioscience, San Diego, CA, USA

2.6 Geräte und sonstige Materialien

Durchflusszytometer BD Accuri C6	Becton Dickinson, US-Franklin Lakes New Jersey
Insulinspritze	Becton Dickinson, US-Franklin Lakes New Jersey
Feinwaage JL-180	Chyo Balance Corporation, Japan
Kanülen	Braun, Melsungen
Kryoröhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Mikroskope: Axiovert 25	Zeiss, Göttingen
M2 16 FA	Leica, Wetzlar
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Pipetten	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Anthos, Krefeld
Reagenzgefäße: 0,5, 1,5 und 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagenzgefäße: 15 und 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Skalpell Fig.21	megro, Wesel
Sonifier Branson 450	Heinemann, Schwäbisch-Gmünd
Spritzen 1 ml	Braun, Melsungen
Spritzen 10 ml	Braun, Melsungen
Sterilfilter	Schleicher & Schuell, Dassel

Tischzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus
Vortex	Hartenstein, Würzburg
Waage EMB220-I	Kern, Balingen-Frommern
Zellkulturflaschen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturinkubator	RS Biotech
Zellkulturinkubator HERACELL 150i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zellkulturschalen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellsiebe 70 µm	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.7 Software

Zur Auswertung der Messungen im Durchflusszytometer wurde die FACS Analysis Software CFlow Version 1.0.227.4 von Accuri Cytometers, Inc. Ann Arbor, MI, USA verwendet.

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von adhärenenten Zelllinien

Die im Nachfolgenden beschriebenen zellbiologischen Methoden wurden alle unter einer Flow-Hood (Lamin-Air, Kendro) durchgeführt, um sterile Bedingungen zu gewährleisten. Verwendete Gebrauchsmaterialien und Lösungen wurden vor Benutzung autoklaviert oder mit Ethanollösung (70%) desinfiziert.

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in speziell beschichteten Zellkulturflaschen oder –schalen, die es den Zellen ermöglicht, sich mit Hilfe ihrer extrazellulären Matrixproteine (Laminin, Fibronectin, Kollagen) an die Oberfläche anzuheften.

Da die Fläche, die den Zellen für die Vermehrung zur Verfügung steht, begrenzt ist und die Zellen keine Bi- oder Multilayer ausbilden sollen, wurden diese in regelmäßigen Abständen passagiert. Dies geschah bei einer Konfluenz von 90-100 %. Weiterhin dient das Passagieren dazu, eine Überalterung und einen Wachstumsstopp der Zellen zu verhindern. Das Splitverhältnis sollte nicht zu hoch sein, da die Zellen den Kontakt zu anderen Zellen benötigen.

Wie lange die Zellen zum Erreichen der Konfluenz benötigen, ist unter anderem von ihrer Teilungsrate abhängig, aber auch die Nährstoffzufuhr spielt eine wichtige Rolle. Die Inhaltsstoffe des Mediums werden innerhalb von 2-4 Tagen verbraucht, je nach Zelldichte. Zusätzlich sammeln sich Stoffwechselprodukte der Zellen und Reste abgestorbener Zellen im Überstand an. Um den fortschreitenden Verbrauch des Mediums kontrollieren zu können, enthält dieses einen pH-Indikator, der durch einen Farbumschlag von rot nach gelb den Verbrauch anzeigt.

Zusätzlich wurde dem Medium noch Penicillin/Streptomycin zugefügt, um bakterielle Kontamination zu verhindern. Zur schonenderen Behandlung der Zellen sollten Kulturmedium und Waschpuffer vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt werden. Die Zellen wurden in sensorgesteuerten Inkubatoren inkubiert, die die exogenen Parameter (100 % Luftfeuchtigkeit, 37 °C, 5 % CO₂) aufrechterhalten, wodurch ein optimales Wachstum ermöglicht wird.

Beim Passagieren wurde zuerst das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml Hank's BSS gewaschen, um Mediumreste und Zelltrümmer zu beseitigen. Anschließend wurde mit 5 ml Trypsin-EDTA bei 37 °C inkubiert, um die Zellen vom Flaschenboden abzulösen. Trypsin ist eine Endopeptidase, die spezifisch Peptidbindungen nach den Aminosäuren Lysin, Arginin und modifiziertem Cystein spaltet. Die Proteolyse wurde durch die Zugabe von 10 ml frischem Medium gestoppt, das die Trypsininhibitoren Magnesium und

Calcium enthält. Durch Auf- und Abpipettieren des Mediums wurden aneinanderhängende Zellen getrennt, um eine einheitliche Zellsuspension zu erhalten. Die Zellsuspension wurde anschließend in einem definierten Splitverhältnis in eine oder mehrere neue Zellkulturflaschen überführt, in denen das benötigte Medium bereits vorgelegt war.

3.1.1.1 Kultivierung von CV-1-Zellen

CV-1-Zellen sind sehr stoffwechselaktiv und bilden in Zellkulturgefäßen lückenlose Monolayer. Deshalb werden diese in der Regel für die Anfertigung von Plaque Assays verwendet. Bei einer Aussaat von 2×10^5 Zellen in eine große Zellkulturflasche (175 cm^2) und Mediumwechsel nach 4 Tagen sind die Zellen nach 7 Tagen konfluent.

3.1.1.2 Kultivierung von 888-MEL und 1936-MEL Zellen

888-MEL und 1936-MEL sind humane Melanomzelllinien, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus demselben Patienten isoliert wurden.

Die beiden Zelllinien wurden im gleichen Medium kultiviert und zweimal in der Woche in neue Flaschen gesplittet.

3.1.1.3 Kultivierung von HuH7-Zellen und PLC/PRF/5

HuH7 und PLC/PRF/5 sind humane Leberzellkarzinomzelllinien. Die Zellen wurden im gleichen Medium kultiviert und zweimal in der Woche in neue Flaschen gesplittet

3.1.1.4 Kultivierung von STSA-1-Zellen

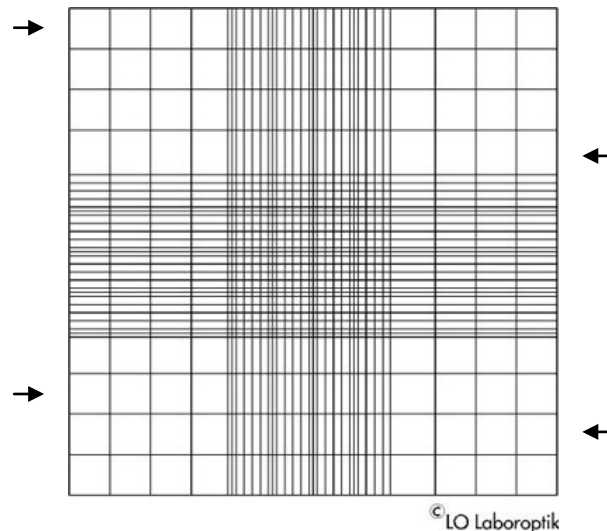
STSA-1 ist eine Hunde-Tumorzelllinie, die aus einem Weichgewebstumour eines Hundes isoliert wurde. Die Zellen ähneln morphologisch Fibroblasten und bilden keine konfluenten Monolayer. Nach 4 Tagen wurde das Medium erneuert und alle 7 Tage wurden die Zellen gesplittet.

3.1.2 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer

Viele Versuche sowie das Passagieren der Zellen, machen eine Bestimmung der Zellzahl in der vorhandenen Zellsuspension notwendig. Diese lässt sich mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmen.

Bei der Neubauer-Zählkammer handelt es sich um einen Objektträger, in den ein Gitternetz eingätzt ist. Mit aufgelegtem Deckgläschen ergibt sich ein definiertes Flüssigkeitsvolumen,

welches durch Kapillarkräfte eingesaugt wird. Das Gitternetz besteht aus 4 großen Quadraten, die jeweils in 16 kleine Quadrate unterteilt sind. Zur Bestimmung der Zellzahl wird aus jedem der 4 großen Quadrate jeweils eine Reihe von 4 kleinen Quadraten unter dem Mikroskop ausgezählt.



Um eine Zellsuspension zu erhalten, wurden die Zellen mit 10 ml Hank's BSS gewaschen, mit 5 ml Trypsin-EDTA überschichtet und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe von 10 ml Medium gestoppt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurde eine Trennung von aneinanderhängenden Zellen erreicht. Das eingesaugte Volumen der Neubauer-Zählkammer betrug 10 µl und es wurden wie oben angezeigt 4 Reihen der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellzahl wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{gezählte Zellzahl} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor der Zellsuspension}$$

3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zelllinien sollten nur eine gewisse Anzahl an Passagen kultiviert werden, da sich im Laufe der Zeit Mutationen in der Population akkumulieren können und damit eine Veränderung von Genotyp und Phänotyp einhergehen können. Deswegen wird in der Regel von neu erworbenen Zelllinien ein Kryostock angelegt, auf den je nach Bedarf zurückgegriffen werden kann.

Das Einfrieren von Zellen erfolgte bei Erreichen von ca. 90% Konfluenz im Kulturgefäß. Die Zellen wurden mit 10 ml Hank's BSS gewaschen, mit 5 ml Trypsin-EDTA überschichtet und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe

von 10 ml Medium gestoppt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurde eine Trennung von zusammenhängenden Zellen erreicht. Die Zellzahlbestimmung wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Währenddessen wurde die Zellsuspension bei 750 rpm für 5 min zentrifugiert und anschließend das Zellpellet in 0,9 ml Medium pro Aliquot resuspendiert. Die Aliquots wurden in Kryoröhrchen überführt und nach Zugabe von 100 µl DMSO über Nacht bei -80 °C in einer Einfrierbox, die für eine langsame Abkühlung der Zellsuspension sorgt, eingefroren. Die dauerhafte Lagerung der Kryoröhrchen erfolgt in einem Stickstofftank in der Gasphase.

Um ein Aliquot einer Zelllinie aufzutauen, wurde das Kryoröhrchen für ca. 30 s in ein 37 °C warmes Wasserbad gehalten. Durch Zupipettieren von 1 ml frischem Medium wurde das Zellpellet vollständig aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in 5 ml Medium überführt und bei 750 rpm 5 min abzentrifugiert. Der DMSO-haltige Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und die Zellsuspension in ein geeignetes Kulturgefäß überführt. Die Zellen wurden anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Brutschrank inkubiert. Nach 24 h waren die Zellen adhärent und das Medium konnte gewechselt werden.

3.1.4 Mykoplasmenachweis

Mykoplasmen sind die kleinsten selbstreplizierenden prokaryotischen Organismen (~150 nm), weshalb eine Kontamination mikroskopisch nicht erkannt werden kann. Da Mykoplasmen parasitär leben, beeinflussen sie Stoffwechsel, Wachstum und Vitalität der Zellen. Eine Kontamination tritt in bis zu 30 % aller Zellkulturen auf, weswegen es notwendig ist, Zellen in bestimmten Abständen auf eine Mykoplasmenkontamination zu testen.

Hierfür wurde das Mycoplasma Detection-Kit von Minerva Biolabs verwendet, das mittels geeigneten Primern in einer PCR-Reaktion im Zellkulturüberstand vorhandene Mykoplasmen-DNA vervielfältigt. Das Vorhandensein von Mykoplasmen wurde durch den Vergleich der Bandengröße von Probe und parallel mitgeführter Positiv- und Negativkontrolle bei einer DNA-Gelelektrophorese bestimmt.

Hierfür wurden von einer Zellkultur, die zu 90-100 % konfluent war, 100 µl Überstand abgenommen, für 5 min gekocht und anschließend abzentrifugiert (5 s, 13000 rpm). Vom Überstand wurden 2 µl für die PCR-Reaktion eingesetzt. Zusätzlich zu den Proben wurden parallel die Negativ- und Positivkontrolle mitgeführt, um eine mögliche Inhibition der PCR erkennen zu können. Nach der PCR wurden 20 µl jedes PCR-Reaktionsansatzes, gemischt mit Bromphenolblau-Ladepuffer, auf ein 1,6%iges Standard-Agarosegel aufgetragen.

Die Negativkontrolle zeigte sich als Bande bei 191 bp, während die Bande der Positivkontrolle bei 267 bp lag.

Reaktionsansatz für PCR (3 Reaktionen):	45,9 µl	HPLC-H ₂ O
	7,5 µl	10x Reaktionspuffer
	7,5 µl	Primer/Nukleotide
	7,5 µl	Internal control
	0,6 µl	Taq-Polymerase (5U/µl)

PCR-Bedingungen:	Denaturierung	94 °C	2 min	} 39 Zyklen
	Denaturierung	94 °C	30 s	
	Annealing	55 °C	30 s	
	Elongation	72 °C	30 s	
	Pause	4 °C		

3.1.5 Konfluenztest

Mit Hilfe eines Konfluenztests wird die Anzahl an Zellen einer Zelllinie bestimmt, die ausgesät werden muss, um nach einer bestimmten Zeit die gewünschte Konfluenz der Zellen in dem verwendeten Zellkulturgefäß zu erreichen.

Hierfür wurden Zellen, die 90% Konfluenz erreicht hatten, mit Trypsin-EDTA von der Oberfläche der Zellkulturflasche abgelöst und die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für 24-Well-Platten wurden Zellsuspensionen mit folgenden Zellzahlen hergestellt und in jeweils 3 Wells ausgesät: 6×10^4 , 8×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 , 4×10^5 und 6×10^5 Zellen.

Nach 24, 48 und 72 h wurde die Konfluenz der Zellen überprüft.

3.2 Virologische Techniken

3.2.1 Infektion mit Vaccinia-Virus

Für die Infektion von Zellen mit Vaccinia-Virus wurden die Zellen 1 bis 3 Tage vor Infektion in 24-Well-Platten ausgesät. Bei einer Konfluenz von 90 % wurden 2 Wells ausgezählt um die benötigte Virusmenge für die Infektion berechnen zu können.

Die Berechnung erfolgt auf Basis der gewünschten Infektionsrate (= Rate der infektiösen Partikel pro Zelle). Die Angabe multiplicity of infection (MOI) 1 bedeutet, dass theoretisch jede Zelle mit einem Viruspartikel infiziert wird, d.h. MOI 0,5 entspricht einer Infektionsrate von 0,5 Viren pro Zelle.

Die Angabe der Viruskonzentration (Virustiter) erfolgt in pfu/ml (plaque forming units/ml).

Mit Hilfe dieser beiden Werte lässt sich das Infektionsvolumen bestimmen:

$$\frac{\text{Gesamtzellzahl} \times \text{MOI}}{\text{Virustiter (pfu/ml)}} = \text{Virusmenge (ml)}$$

Vor jeder Infektion wurde die Virus-Suspension 3x für je 30 sec bei 4 °C mit Ultraschall behandelt, um Virusaggregate zu trennen.

Anschließend wurde die berechnete Virusmenge in der benötigten Menge Infektionsmedium aufgenommen. Infektionsmedium enthält im Vergleich zu Kulturmedium nur 2 % FBS, um die Infektion der Zellen mit dem Virus nicht zu beeinträchtigen. Die Virussuspension wurde durch Vortexen durchmischt und nach Absaugen des Wachstumsmediums wurden je 250 µl des Virusinokulums in jedes Well gegeben.

Um zu gewährleisten, dass das Virus gleichmäßig verteilt ist, wurde während der einstündigen Inkubationszeit zweimal im Abstand von je 20 min das Kulturgefäß geschwenkt. Eine Stunde nach Infektion (1 hpi = 1 hour post infection) wurde das Virusinokulum abgenommen und durch frisches Kulturmedium ersetzt.

3.2.2 Bestimmung des Virustiters mittels Plaque-Assay

Mit Hilfe eines Plaque-Assays lässt sich die Anzahl der infektiösen Viruspartikel in einer Suspension bestimmen. Der Virustiter wird bestimmt, damit man die einzusetzende Menge an Virus für die Infektion von Zellen oder Mäusen berechnen kann.

CV-1-Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät, so dass sich nach 1-3 Tagen ein konfluentes Monolayer gebildet hatte.

Vor der Infektion wurde von der Virussuspension, die zuvor 3x 30 s mit Ultraschall behandelt wurde, eine Verdünnungsreihe bis 10^{-9} in Infektionsmedium hergestellt. Dieses enthält nur 2 % FBS im Gegensatz zum Kulturmedium.

Für die Infektion wurde zuerst das Kulturmedium von den CV-1-Zellen abgesaugt und danach die zuvor berechnete Virusmenge, die in Infektionsmedium aufgenommen wurde, zugegeben. Dabei wurden pro 24-Well 250 µl Infektionsmedium gerechnet und pro Verdünnung 3 Wells.

Nach 1 hpi wurden zum Infektionsmedium je 1 ml Carboxymethylcellulose-Medium hinzugegeben. Die Carboxymethylcellulose (CMC) bildet ein engmaschiges Netzwerk aus Cellulosefasern, wodurch die Virusausbreitung verhindert wird.

Zwei Tage nach der Infektion wurden pro Well 250 µl Kristallviolett-Lösung (0,13 % (w/v)) zugegeben. Nach mindestens 3 h Inkubation bei RT, wurde der Farbstoff im Wasserbad abgewaschen.

Nachdem die Platten an der Luft getrocknet waren, konnten die Plaques auf einem Leuchtschirm ausgezählt werden. Jeder Plaque steht hierbei für ein infektiöses Viruspartikel.

Der Virustiter lässt sich mit Hilfe folgender Formel bestimmen:

$$\frac{\text{Anzahl Plaques x Verdünnungsfaktor}}{\text{Infektionsvolumen (hier: 0,25 ml)}} = \text{Titer (pfu/ml)}$$

CMC-Medium: 7,5 g CMC
500 ml DMEM (+ Antibiotika, + 5 % FBS)

Kristallviolett: 1,3 g Kristallviolett
50 ml Ethanol
300 ml Formaldehyd 37 %
650 ml ddH₂O

3.2.3 Analyse der Virusreplikation

Zur Bestimmung des Replikationsverhaltens eines Virus, wurden Plaque-Assays von Zelllysaten verschiedener Stundenwerte nach Infektion mit dem zu untersuchenden Virus durchgeführt.

Zunächst wurden die Zellen, in denen das Virus-Replikationsverhalten untersucht werden sollte, in 24-Well-Platten ausgesät. Es wurden für jeden Stundenwert 3 Wells und zusätzlich noch 2 Wells zum Auszählen der Zellzahl benötigt. Bei Erreichen von 90-95 % Konfluenz erfolgte die Infektion (MOI 0,1).

Das Virus-Replikationsverhalten wurde 1, 6, 12, 24, 48, 72 und 96 hpi untersucht. Zu diesen Zeiten wurde jeweils der Überstand abgenommen und die Zellen wurden durch Trypsinbehandlung von der 24-Well-Platte gelöst. Die Zellen wurden bei 13000 rpm für 2 min zentrifugiert und in 1 ml Hanks BSS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen und der Überstand in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert.

Bevor die Proben im Plaque-Assay eingesetzt werden konnten um den Virustiter zu bestimmen, wurden die Proben 2x im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und anschließend in flüssigem Stickstoff wieder eingefroren. Dadurch wurden die Zellen lysiert und das Virus freigesetzt.

3.2.4 MTT-Assay

Der MTT-Assay ist ein Test auf Zytotoxizität. Das bedeutet, es wird der Anteil der noch lebenden Zellen nach Infektion mit einem Virus im Vergleich zu einer uninfizierten Kontrollgruppe gemessen.

Zunächst wurden die zu untersuchenden Zellen in 24-Well-Platten ausgesät. Es wurden für jeden Stundenwert 9 Wells und zusätzlich 2 Wells zum Auszählen benötigt. Bei Erreichen von 90 % Konfluenz wurden jeweils 3 Wells infiziert (MOI von 0,1 und 1,0), die restlichen drei Wells dienten als Kontrollgruppe.

Das Medium wurde 24, 48, 72 und 96 hpi abgesaugt und pro Well wurden 500 µl MTT-Medium, das zuvor frisch angesetzt wurde, zugegeben. MTT ist ein gelber, wasserlöslicher Farbstoff [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid], der von vitalen Zellen zu einem blau-violetten, wasserunlöslichen Formazan reduziert wird.

Das MTT-Medium wurde nach 2 Stunden vorsichtig abgenommen. Die 24-Well-Platte kann bei -20 °C eingefroren werden oder gleich weiterverwendet werden. Je nach Blaufärbung wurden 200-400 µl einer HCl/Isopropanollösung pro Well zugegeben und die Farbe gelöst. Es muss aber für alle Stundenwerte dieselbe Menge der Lösung verwendet werden, damit die erhaltenen Werte vergleichbar sind. Anschließend wurden 100 µl der jetzt gelben bis braunen Lösung in 96-Well-Platten überführt und die Absorption wurde am Elisa-Reader bei 570 und 650 nm gemessen.

Aus den drei Werten der nicht infizierten Kontrollgruppe und der zwei Infektionen wurde der Mittelwert gebildet. Der Mittelwert der Kontrollgruppe wurde als 100 % definiert und die Mittelwerte der infizierten Zellen wurden dazu in Relation gesetzt. Der Anteil der noch lebenden Zellen wurde in Prozent angegeben.

MTT-Medium:

50 mg	MTT
20 ml	farbloses RPMI

Lösung:

50 ml	HCl (37,5 %)
450 ml	Isopropanol

3.3 Methoden für die Durchflusszytometrie

3.3.1 Was ist Durchflusszytometrie?

Der Begriff Zytometrie steht für eine Messung physikalischer oder chemischer Eigenschaften von Zellen oder biologischen Partikeln. Die Durchflusszytometrie ist demnach ein Prozess,

bei dem solche Messungen durchgeführt werden, während die Zellen oder Partikel in einem Flüssigkeitsstrahl vorzugsweise einzeln durch den Messapparat fließen.¹²¹ Das erste fluoreszenzbasierte Durchflusszytometer wurde 1968 von Wolfgang Göhde von der Universität Münster entwickelt.

3.3.2 Prinzip

Das Messprinzip eines Durchflusszytometers besteht darin, dass Lichtstreuung und Fluoreszenzen gemessen werden, während die Zellen einen zum Probenstrahl rechtwinklig angeordneten Laserstrahl passieren. Die Zuführung des Probenstrahls ist langsam und liegt typischerweise bei 10 - 60 µl und es können Zellen mit einer Größe von 0,2 - 20 µm mit einer Geschwindigkeit von 200 – 2000 Ereignissen/s analysiert werden.¹²²

3.3.3 Aufbau eines Durchflusszytometers am Beispiel des BD Accuri C6

3.3.3.1 Flüssigkeitssystem

Das Flüssigkeitssystem besteht aus einer Durchflusszelle in die die Probe aus Einzelzellen injiziert wird. Mittels einer Trägerflüssigkeit wird ein Hüllstrom erzeugt, der aufgrund der sich verjüngenden Form der Durchflusszelle beschleunigt wird und dabei die Zellen zu einem Strahl einzelner Zellen aufreht (hydrodynamische Fokussierung).

Beim BD Accuri C6 werden die Flüssigkeiten durch Pumpen bewegt anstelle eines Drucksystems. Der Vorteil hierbei ist, dass die Probe direkt aus verschiedenen Mikrogefäßen aufgesaugt werden kann, wobei 50 µl als Probe bereits ausreichend sind. Als Trägerflüssigkeit dient 0,2 µm filtriertes ddH₂O und es können bis zu 10.000 Ereignisse pro Sekunde gemessen werden.

3.3.3.2 Optisches System

Lichtquelle

Das BD Accuri C6 ist mit 2 Lichtquellen ausgestattet: einem blauen und einem roten Laser mit Wellenlängen von 488 nm bzw. 633 nm.

Das *Selectable Laser Module* ist eine Erweiterung, die es ermöglicht, den blauen und roten Laser für eine unterschiedliche Anzahl von Fluoreszenzkanälen zu benutzen. Die übliche Konfiguration ist 3:1, d.h. Anregung mit dem blauen Laser für die Fluoreszenzkanäle 1-3 und

Anregung mit dem roten Laser für den vierten Fluoreszenzkanal. Weiterhin ist es möglich für alle Fluoreszenzkanäle mit dem blauen Laser anzuregen (4:0) oder pro Laser für je 2 Fluoreszenzkanäle (2:2) anzuregen.

Fluoreszenz und Fluorochrome

Für die Durchflusszytometrie existiert eine Vielzahl von Antikörpern, die direkt mit einem Fluorochrom gekoppelt sind. Fluorochrome sind Moleküle, die Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und mit geringerer Energie (größerer Wellenlänge) wieder abgeben.

Gebräuchliche Fluorochrome für den blauen Laser sind FITC, PE, PI, PerCP-Cy5.5 und PE-Cy7 und für den roten Laser APC und APC-Cy7. Außerdem existieren noch fluoreszierende Proteine wie z.B. GFP (Grün Fluoreszierendes Protein), RFP (Rot Fluoreszierendes Protein) und TurboFP635.

Filter

Da sich das von den Fluorochromen emittierte Licht über mehrere hundert Nanometer (nm) erstrecken kann und sich somit bei der gleichzeitigen Messung von 2 oder mehr fluoreszierenden Molekülen in der Regel Überschneidungen ergeben, werden Filter genutzt, die das Licht, das von den Detektoren aufgefangen wird, im Wellenlängenbereich begrenzen.

Man unterscheidet zwischen Bandpass- und Langpassfiltern. Bandpassfilter selektieren aus dem Spektrum des emittierten Lichts schmale Bänder um eine definierte Wellenlänge heraus. Langpassfilter verhindern den Durchtritt von Licht unterhalb einer bestimmten Wellenlänge. Die Filter werden so gewählt, dass sie für die eingesetzten Fluorochrome relativ spezifisch sind.

Streulicht

Beim Durchtritt der Zelle durch den Laserstrahl wird das Licht gestreut. Man unterscheidet das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) und das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC), das in einem Winkel von 90° gemessen wird. Das Vorwärtsstreulicht gibt Auskunft über die Größe der Zelle. Das BD Accuri C6 kann Zellen ab einer Größe von 0,5 µm auflösen. Das Seitwärtsstreulicht ist von der Mehrfachstreuung durch intrazelluläre Kompartimente abhängig und zeigt damit die Granularität der Zellen.

Detektion und Signalumwandlung

Die Detektion des von der Zelle ausgesendeten Lichts erfolgt mit Hilfe von Streulicht- und Fluoreszenzdetektoren. Für die Messung der teils schwachen Fluoreszenzsignale werden in der Regel Photomultiplier verwendet, d.h. das aufgefangene Signal wird verstärkt. Die Messung kann hierbei linear oder logarithmisch erfolgen.

Die elektrischen Signale werden anschließend als digitaler Datensatz für jede einzelne Zelle gespeichert. Um das Hintergrundrauschen zu verringern, wird ein Schwellenwert (threshold) gesetzt, bei dessen Überschreiten erst die Speicherung der erhaltenen Messergebnisse erfolgt. Als Schwellenwert kann z.B. der FSC dienen, d.h. es werden nur Zellen registriert, die eine bestimmte Größe überschreiten.

Der Vorteil einer digitalen Speicherung der Daten ist, dass alle Messergebnisse nachträglich bearbeitet werden können, d.h. es ist z.B. möglich erst im Anschluss an die Messung zu kompensieren.

3.3.3.3 Datenanalyse

Kompensation

Trotz der vor die Fluoreszenzdetektoren vorgeschalteten Filter überlappen sich bei Mehrfarbenmessungen die Fluoreszenzspektren von Fluorochromen. Dies bedeutet, es werden auch für die Fluoreszenz negative Zellen fälschlicherweise als positiv detektiert. Zur Korrektur wird jeweils ein bestimmter Prozentsatz des Fluoreszenzsignals von dem der anderen Fluoreszenz subtrahiert.

Auswertung

Um die Auswertung der erhaltenen Daten zu vereinfachen, ist es möglich die Zellpopulation zu definieren, die man im Folgenden analysieren möchte. Hierzu legt man ein Auswahlfeld fest („Gaten“), das Zelltrümmer und zusammenhängende Zellen ausschließt. Die anschließende Auswertung kann auf 2 Arten erfolgen.

Das Histogramm stellt die Intensitätsverteilung für einen Parameter (Streulicht, Fluoreszenz) dar. Auf der X-Achse wird die Intensität des gemessenen Signals aufgetragen und auf der Y-Achse die Häufigkeit mit der diese Signalstärke detektiert wird.

Beim Dotplot werden die Intensitäten zweier Messparameter gegeneinander aufgetragen. Jede Zelle wird entsprechend ihrer Intensität für die auf die X- oder Y-Achse aufgetragenen Fluoreszenz oder dem Streulicht als Punkt dargestellt.

3.3.4 Probenvorbereitung für die durchflusszytometrische Messung

3.3.4.1 Herstellen einer Einzelzellsuspension aus Tumoren

Da bei der Durchflusszytometrie die Eigenschaften von Einzelzellen gemessen werden, müssen für die Untersuchung von Geweben zuerst Einzelzellsuspensionen aus diesen hergestellt werden.

Dafür wurde der Tumor aus der Maus heraus präpariert und sofort mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten. Diese wurden in ein Collagenase I- und DNase I-haltiges Medium gegeben und für 40-75 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die Gewebestücke in der Enzymlösung mehrmals aufgeschüttelt, um das Ablösen der Einzelzellen zu beschleunigen. Anschließend wurden die Zellsuspensionen durch ein Zellsieb mit 70 µm Maschengröße filtriert. Die zurückgebliebenen Gewebestücke wurden zusätzlich mechanisch vereinzelt, indem sie mit Hilfe eines sterilen Spritzenstempels durch das Zellsieb gestrichen wurden. Anschließend wurde das Zellsieb mit Medium gespült und der Falcon aufgefüllt. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Zellsuspension immer auf Eis gestellt.

Die Zellsuspension wurde bei 1200 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das Zellpellet wurde zum Waschen in 30 ml eiskaltem PBS, das 2 % FBS enthielt, resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 1200 rpm und 4 °C für 10 min wurde das Zellpellet, abhängig von der Anzahl der Zellen in 4 bis 10 ml PBS/2 % FBS resuspendiert.

Collagenase I-Lösung: 10.000 CDU/ml Collagenase I in PBS

DNase I-Lösung: 5 MU/ml DNase I in ddH₂O

Enzymhaltiges Medium: 5 ml Medium
150 µl Collagenase I-Lösung
5 µl DNase I-Lösung

3.3.4.2 Erythrozytenlyse

Die Erythrozytenlyse wird bei einer durchflusszytometrischen Untersuchung von Leukozytenpopulationen immer durchgeführt, da eine unerwünschte Bindung von Antikörpern an die Oberfläche der Erythrozyten erfolgt. Aufgrund der großen Zahl der Erythrozyten im Vergleich zu den Leukozyten würde dies ein starkes Hintergrundsignal bei der Messung verursachen. Außerdem müsste erheblich mehr Antikörperlösung zur Färbung eingesetzt werden, da die unspezifische Bindung die Verfügbarkeit für eine Bindung des Antikörpers an die Leukozytenoberfläche reduziert.¹²²

Der Puffer für die Erythrozytenlyse wurde kurz vor Benutzung durch Verdünnen von einem Teil 10x Lyse-Puffer mit 9 Teilen ddH₂O hergestellt. Es wurden 10 ml des Lyse-Puffers in Falcons vorgelegt. Nach Zugabe von 500 µl Blut wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit 5 ml PBS/2 % FBS gewaschen und auf Eis gestellt.

10x Erythrozytenlyse-Puffer: 8,29 g NH₄HCl
 1,09 g KHCO₃
 37 mg EDTA-Na₂
 In 100 ml ddH₂O lösen

3.3.4.3 Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern

Die Färbung von Zellen, die aus Blut oder Gewebe erhalten wurden, erfolgte nach demselben Protokoll.

Die Zellen wurden im Durchflusszytometer gezählt (threshold: 400000, Durchflussrate: slow). Für je 1x10⁶ Zellen wurde 0,5 µg anti-CD16/32 Antikörper zugegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Hierdurch wurden die FcγII und FcγIII-Rezeptoren der Zellen blockiert und damit die unspezifische Bindung von Antikörper verringert. Je 1x10⁶ Zellen pro Färbung wurden in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und bei 2100 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl Antikörperlösung resuspendiert und für 15 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Zum Waschen wurde 1 ml PBS/2 % FBS zupipettiert und die Zellen anschließend bei 3000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 ml PBS/2 % FBS resuspendiert und bis zur Messung am Durchflusszytometer lichtgeschützt auf Eis gestellt.

3.3.5 Messung von Leukozytenpopulationen in Blut und Gewebe

Zur Messung der Leukozytenpopulationen am Durchflusszytometer wurde zuerst ein Auswahlfeld (P1) festgelegt, durch das der größte Teil der Zelltrümmer ausgeschlossen wurde. Anschließend wurden für alle Messungen 10.000 Ereignisse in P1 gezählt.

3.4 Tierexperimentelle Untersuchungen

3.4.1 Versuchstiere

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Versuchstieren handelt es sich um fünf bis sechs Wochen alte weibliche, athymische nu/nu⁻ Mäuse (Hsd: Athymic Nude-Foxn1^{nu}), geliefert von der Fa. Harlan (Borchen).

Der nu-Lokus auf Chromosom 11 ist autosomal rezessiv. Da es sich bei diesen mutierten Mäusen um den Genotyp nu⁻/nu⁻ handelt, sind die Tiere unbehaart und nur an einzelnen Stellen ist Haarwuchs möglich.

Weiterhin besitzen die Tiere einen dysfunktionalen rudimentären Thymus. Dies bedeutet, dass eine T-Zell-Defizienz vorliegt und die Tiere somit nicht in der Lage sind cytotoxische Effektorzellen zu bilden. Die Funktion der B-Zellen hingegen ist normal. Mit steigendem Alter der Tiere steigt die Zahl der Lymphozyten, die die T-Zellmarker CD4⁺ und CD8⁺ aufweisen.

Die Tiere eignen sich sehr gut für die Krebsforschung, da aufgrund des defekten Immunsystems Xenotransplantate nicht abgestoßen werden.

3.4.2 Implantation von Tumorzellen

Die Implantation der Tumore erfolgte bei 6-7 Wochen alten Mäusen. Es wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet.

Die Anzahl der Zellen, die den Mäusen injiziert wurden, war von Zelllinie zu Zelllinie verschieden, da die Tumorzellen unterschiedlich gut anwuchsen und die Tumore verschiedene Wachstumsgeschwindigkeiten aufwiesen.

Zur Herstellung der Zellsuspension für die Implantation wurden die Zellen zuerst mit BSS gewaschen und trypsinisiert. Durch Zugabe von Medium wurde die Trypsin-Reaktion gestoppt und durch anschließendes mehrmaliges Auf- und Abpipettieren die Trennung von zusammenhängenden Zellen erreicht. Nach Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min, wurden die Zellen in 30 ml 1x PBS resuspendiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt, um die Zellen vom Trypsin und von Zellresten zu befreien. Die Zellen wurden ausgezählt und die zu implantierende Zellzahl in 100 µl PBS/Maus aufgenommen:

$$\frac{\text{Gesamtzellzahl}}{1 \times 10^6} \times 0,1 \text{ ml} = \text{Volumen PBS [ml]}$$

Die Zellen wurden anschließend subkutan am rechten Oberschenkel implantiert.

Bei allen Implantationen/Injektionen ist darauf zu achten, dass die Substanzen steril, isoton und von neutralem pH-Wert sind.

Der Fortschritt des Tumorwachstums wurde ein bis zweimal in der Woche dokumentiert. Hierfür wurden mit einer Schieblehre Länge und Breite des Tumors vermessen und das Tumolvolumen mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Länge} \times (\text{Breite})^2}{2} = \text{Volumen [mm}^3\text{]}$$

3.4.3 Infektion mit Vaccinia-Virus

Bei einer durchschnittlichen TumorgroÙe von 300-500 mm³, abhängig von der Tumorzelllinie, erfolgte die Infektion mit einem der Vaccinia-Viren GLV-1h68, GLV-1h109, LIVP1.1.1 oder LIVP6.1.1.

Das Virus wurde 3 mal 30 s sonifiziert und in PBS verdünnt, so dass eine Endkonzentration von 5x10⁶ pfu in 100 µl PBS vorlag. Den Tieren wurden 100 µl der Virusverdünnung in die Schwanzvene injiziert.

Es ist wichtig, darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen in der Injektionslösung befinden, da die Injektion von Luft zu Embolien und zum Tod der Tiere führen kann.

3.4.4 Blut- und Tumorentnahme

Für die Entnahme von Blut und Tumor wurden die Mäuse zuerst durch Inhalation von CO₂ getötet. Das Blut wurde durch Punktion des Herzens mit einer Spritze entnommen, die 100µl 0,05 M EGTA-Lösung enthielt, um die Blutgerinnung zu verhindern.

Bei der Präparation des Tumors wurde darauf geachtet, dass umgebendes Bindegewebe, Muskelgewebe, Knochen, Haut und Haare möglichst gründlich entfernt wurden, da diese bei der späteren Herstellung von Homogenisaten, Gewebeschnitten oder Einzelzellsuspensionen stören würden.

Die Tumore können bis zur weiteren Verwertung bei -80 °C gelagert werden. Für die Herstellung von Einzelzellsuspensionen wurden die frisch präparierten Tumore direkt weiter bearbeitet, wie unter 3.3.4.1 beschrieben.

4 Ergebnisse

4.1 Durchflusszytometrische Untersuchung von Einzelzellsuspensionen der humanen Melanomzelllinien 888-MEL und 1936-MEL

4.1.1 Die humanen Melanomzelllinien 888-MEL und 1936-MEL

Die humanen Melanomzelllinien 888-MEL und 1936-MEL wurden am National Institutes of Health (NIH) generiert. Hierfür wurden der Patientin Nr. 888 im Laufe ihrer Krankheitsgeschichte, die länger als 10 Jahre währte, mehrmals Melanom-Metastasen entnommen und zu diagnostischen und therapeutischen Zwecken untersucht. 888-MEL wurde bereits im Juni 1989 generiert, während die Metastase aus der die 1936-MEL-Zellen hervorgehen, erst im Juni 2001 entnommen wurde.

Die 888-MEL-Zelllinie wurde aus einem klar differenzierten Tumor isoliert, der einen hohen Level von Melanom-typischen Differenzierungsantigenen, einen Melanozyten-typischen Phänotyp in Zellkultur und eine begrenzte Anzahl von genetischen Veränderungen aufwies. Im Vergleich hierzu zeigte 1936-MEL einen erhöhten Level genetischer Degeneration. Es konnten schwerwiegende Änderungen in der Transkription, der Translation und dem Phänotyp (keine Pigmentierung und abgerundete Zellmorphologie) nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass auch downstream liegende zelluläre Funktionen verändert sein können, die anhand der chromosomalen Änderungen nicht nachweisbar sind.¹²³ Weiterhin war der Tumor zum Zeitpunkt der Isolation von 888-MEL noch für eine immuntherapeutische Behandlung mit Interleukin-2 (IL-2) empfänglich, während er nicht mehr auf die Immuntherapie ansprach, als 1936-MEL aus Metastasen isoliert wurde.²⁴ Damit sind 888-MEL und 1936-MEL trotz der Tatsache, dass sie aus demselben Patienten generiert wurden, zwei sehr individuelle Zelllinien.

Dies zeigte sich auch in Wachstumskurven in athymischen Mäusen. Die Tumore aus 1936-MEL-Zellen wuchsen deutlich schneller als 888-MEL-Tumore. Außerdem waren 1936-MEL-Tumore zwar mit GLV-1h68 infizierbar, aber im Gegensatz zu 888-MEL wurde ihr Wachstum nicht gestoppt, sondern nur geringfügig verlangsamt. Deswegen wird 888-MEL als *Responder* und 1936-MEL als *Poor-Responder* bezeichnet. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Infektion in 1936-MEL-Tumoren sehr inhomogen und partiell verläuft, während sie in 888-MEL-Tumoren großflächig stattfand (Weibel S., Raab V., unveröffentlichte Daten).

4.1.2 Vergleich der Immunzellpopulationen von 888-MEL- und 1936-MEL-Tumoren nach Infektion mit 5×10^6 pfu GLV-1h68

Um die Immunzellpopulation von 888-MEL und 1936-MEL-Tumoren durchflusszytometrisch untersuchen zu können, wurden zuerst 4×10^6 888-MEL- oder $7,5 \times 10^6$ 1936-MEL-Zellen subkutan in die hintere rechte Flanke von athymischen Mäusen (Hsd: Athymic Nude-Foxn1^{nu}) implantiert. Nach Erreichen eines Tumolvolumens von 500-600 mm³ wurde den Mäusen (n=3) 5×10^6 pfu GLV-1h68 intravenös injiziert. Der Kontrollgruppe wurde anstelle von Virus PBS injiziert. Sieben Tage nach Infektion wurden je 3 Mäuse pro Gruppe durch Inhalation von CO₂ getötet, die Tumore entnommen und Einzelzellsuspensionen hergestellt. Nach dem Blockieren der Fc-Rezeptoren mit einem CD16/32-Antikörper wurden Aliquots mit jeweils ca 1×10^6 Zellen hergestellt, die mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern für CD45 und F4/80 gefärbt wurden. Für jede Färbung wurden am Durchflusszytometer 10.000 Ereignisse in einem vorher definierten Auswahlfeld P1 gemessen und im Anschluss an das Kompensieren analysiert. Für die Messung des grün fluoreszierenden Proteins GFP ist keine Färbung notwendig. Die Anregung mit dem blauen Laser, der Licht der Wellenlänge 488 nm aussendet, genügt, um die Fluoreszenz anzuregen.

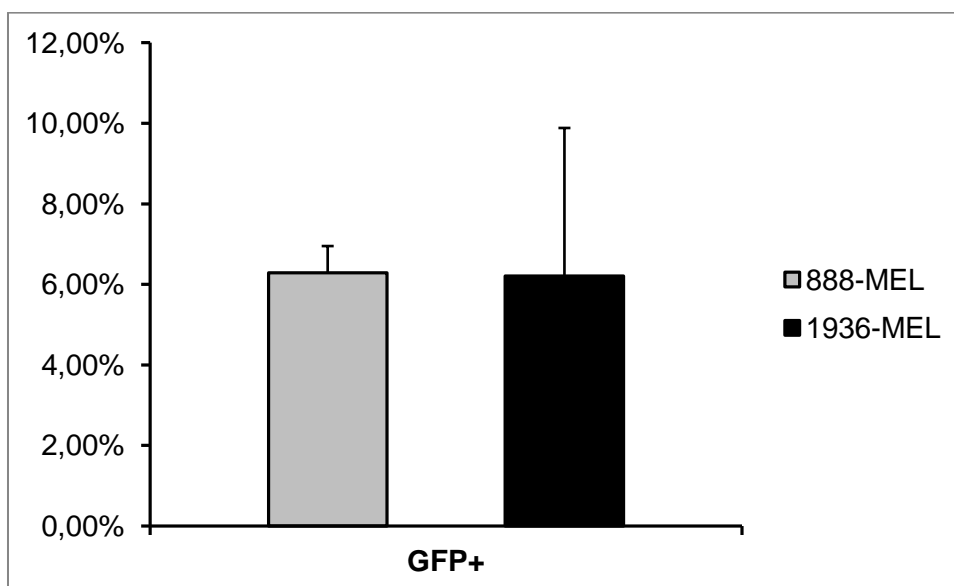


Abb. 7: Prozentualer Anteil GFP-positiver Zellen von Einzelzellsuspensionen aus 888-MEL- und 1936-MEL-Tumoren (n=3) 7 dpi nach Injektion von 5×10^6 pfu GLV-1h68. Die Anzeige erfolgt in Prozent (%) als Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (STABW).

Für 888-MEL-Tumore (n=3) wurden im Mittel 6,29 % \pm 0,66 GFP-positive Zellen gefunden und für 1936-MEL-Tumore 6,21 % \pm 3,6 (Abb. 7). Es konnte somit 7 dpi kein Unterschied in der Infizierbarkeit gefunden werden. Die hohe Standardabweichung für 1936-MEL-Tumore

ergab sich, da die Einzelwerte mit 3,08, 5,28 und 10,26 % recht stark voneinander abwichen. Dies spricht für eine inhomogene Infektion der Tumore.

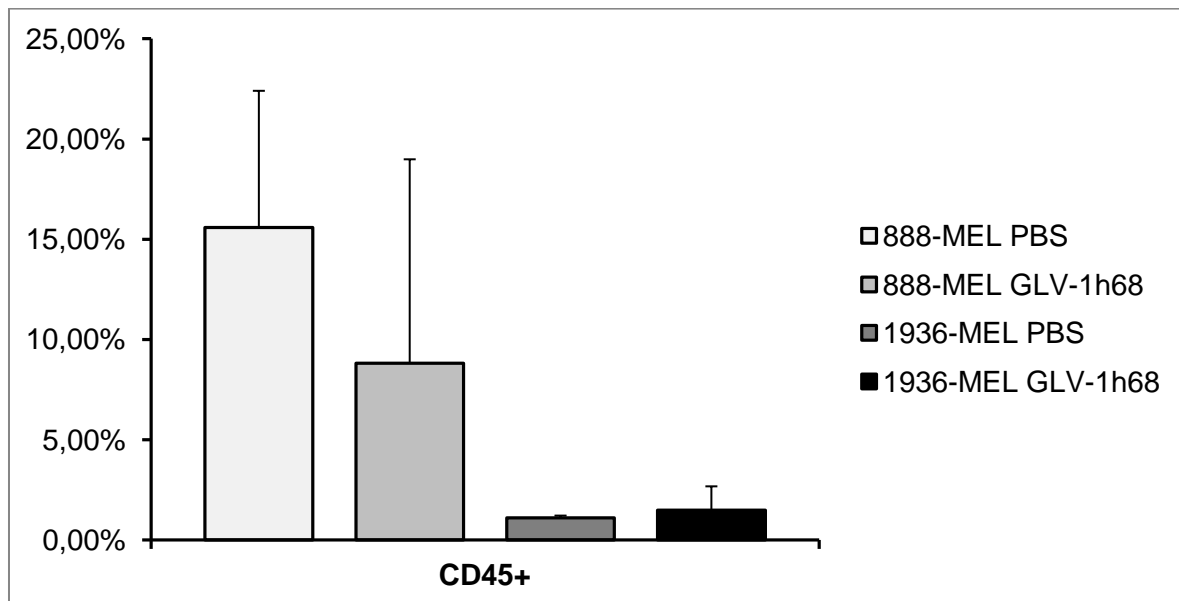


Abb. 8: Prozentualer Anteil CD45-positiver Zellen von Einzelzellsuspensionen aus 888-MEL- und 1936-MEL-Tumoren (n=3) 7 dpi nach Injektion von 5×10^6 pfu GLV-1h68. Die Anzeige erfolgt in Prozent (%) als Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (STABW).

Der Oberflächenmarker CD45 kann auf allen Leukozyten gefunden werden. In nicht infizierten 888-MEL-Tumoren konnten 15,59 % \pm 6,81 CD45-positive Zellen nachgewiesen werden (Abb. 8). Dies ist ein Vielfaches mehr als in nicht infizierten 1936-MEL-Tumoren, bei denen 1,10 % \pm 0,12 CD45-positive Zellen gefunden wurden. Bei den 888-MEL-Tumoren sank die Zahl der Leukozyten 7 dpi in 2 von 3 Tumoren deutlich auf einen Mittelwert von 8,82 % \pm 10,17, während diese bei infizierten 1936-MEL-Tumoren auf 1,49 % \pm 1,19 leicht anstieg. Für diese Unterschiede konnte aber keine statistische Signifikanz mittels T-Test gezeigt werden, vermutlich aufgrund der hohen Standardabweichung der 888-MEL-Tumoren.

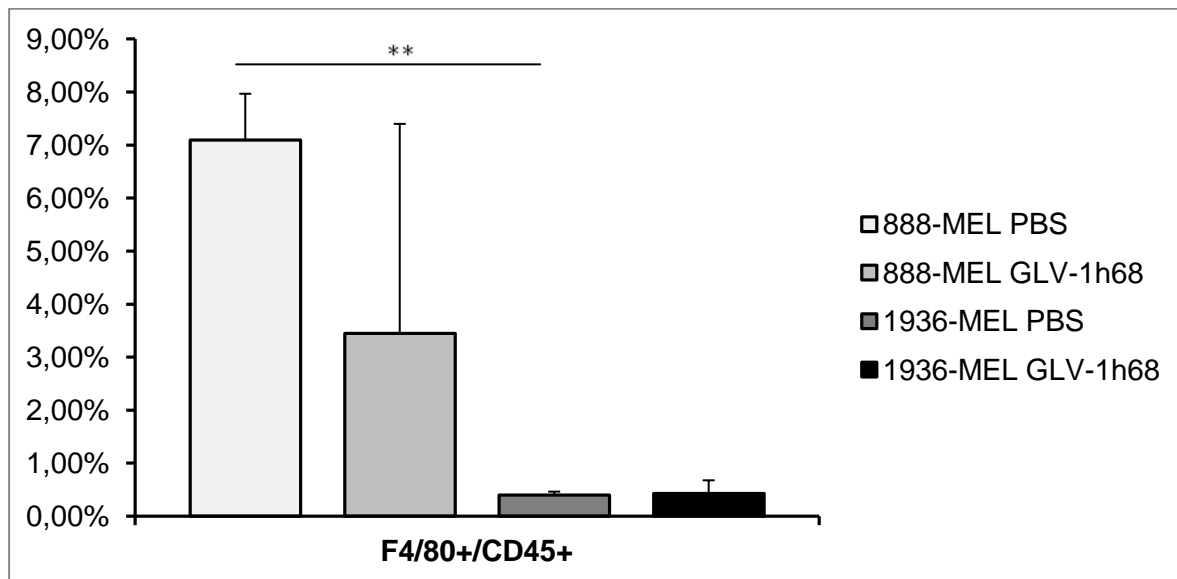


Abb. 9: Prozentualer Anteil F4/80- und CD45-positiver Zellen von Einzelzellsuspensionen aus 888-MEL- und 1936-MEL-Tumoren (n=3) 7 dpi nach Injektion von 5×10^6 pfu GLV-1h68. Die Anzeige erfolgt in Prozent (%) als Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (STABW). Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem ungepaarten T-Test nachgewiesen (** $P < 0,01$).

Der Oberflächenmarker F4/80 ist für Mäuse spezifisch und wird von reifen Makrophagen in Geweben exprimiert. Bei der Bestimmung der Makrophagen (Abb. 9) wurde ein ähnliches Ergebnis gefunden, wie für die CD45-positiven Leukozyten. In nicht infizierten 888-MEL-Tumoren konnten mit 7,09 % \pm 0,8 ein hoher prozentualer Anteil von F4/80⁺CD45⁺-Makrophagen nachgewiesen werden, deren Zahl in infizierten Tumoren 7 dpi in 2 von 3 Tumoren deutlich reduziert war (3,45 % \pm 3,95). In 1936-MEL-Tumoren hingegen konnte mit 0,40 % \pm 0,06 F4/80⁺CD45⁺-Positiven in PBS-Tumoren und 0,43 % \pm 0,25 in Virus-behandelten Tumoren kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen gefunden werden. Beim Vergleich des prozentualen Anteils an Makrophagen in den PBS-Tumoren beider Melanomzelllinien zeigte sich ein signifikanter Unterschied (** $P = 0,005$). In den 888-MEL-Tumoren konnten 17mal mehr F4/80⁺CD45⁺-Positive nachgewiesen werden. Dies spricht für ein stark inflammatorisches Tumormikromilieu in 888-MEL-Kontrolltumoren.

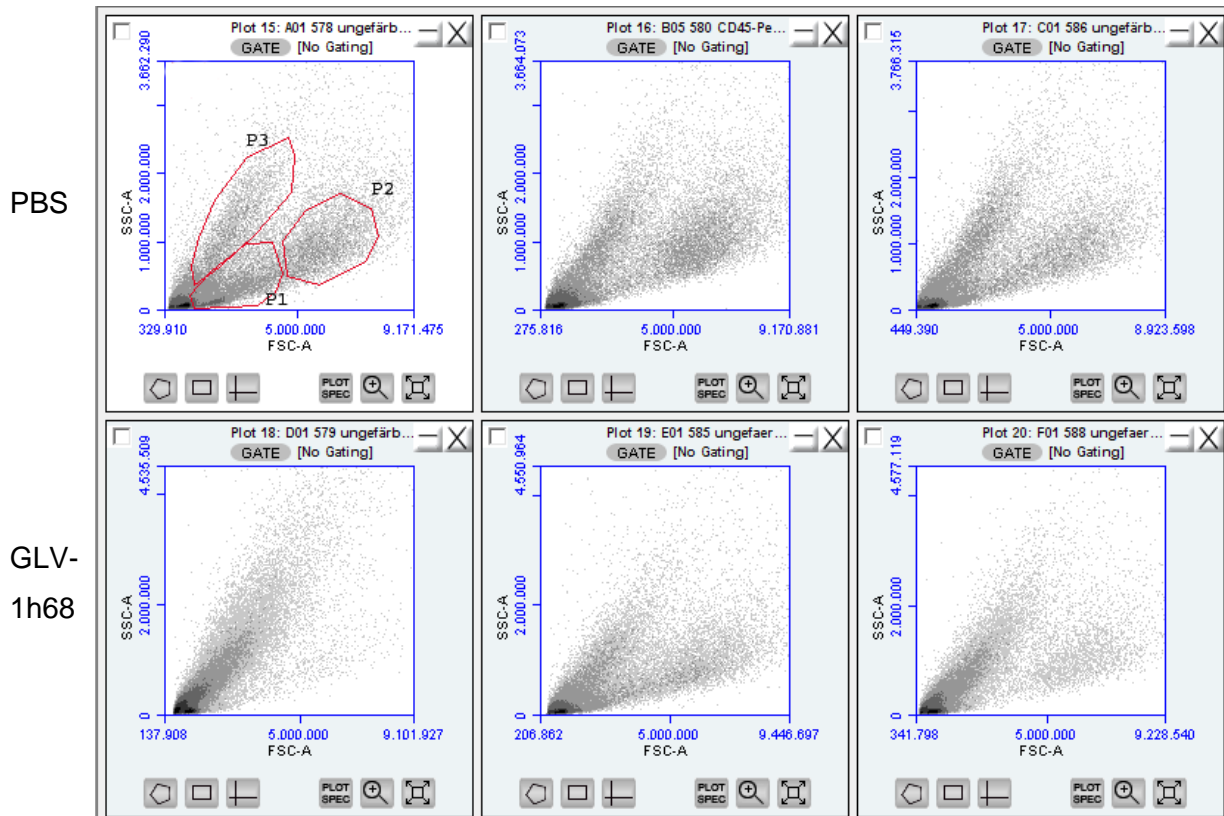


Abb. 10: Darstellung der Dotplots für FSC und SSC der nicht-infizierten und infizierten 888-MEL-Tumore 7dpi. Der FSC veranschaulicht die Größe der gemessenen Zellen, während der SSC ein Maß für die Granularität („Körnigkeit“) der Zellen ist.

Abbildung 10 zeigt die Dotplots für FSC und SSC der nicht infizierten (obere Reihe) und infizierten (untere Reihe) 888-MEL-Tumore. Der FSC ist ein Maß für die relative Größe der Zelle und der SSC ein Maß für die Granularität, bzw. interne Komplexität, der Zelle. Stirbt eine Zelle ab, so schrumpft diese, ihre Oberfläche ist nicht mehr glatt, sondern rau, weswegen ihr FSC sinkt und ihr SSC steigt. Sieben Tage nach Infektion hatte in 2 von 3 Tumoren die Population der großen Tumorzellen (P2) deutlich abgenommen im Vergleich zu nicht-infizierten Tumoren und die hohe Zahl an granulären Zellen (P3) zeigt, dass viele Zellen bereits abgestorben waren. Ebenso ist erkennbar, dass die Immunzellpopulation (P1) kleiner geworden ist.

4.1.3 Vergleich der GFP-positiven Zellen von 1936-MEL-Tumoren nach Infektion mit 5×10^6 pfu oder 1×10^7 pfu GLV-1h68

Aufgrund einer deutlichen Wachstumsverlangsamung 11 dpi bei 1936-MEL Tumoren, wenn diese zu einem früheren Zeitpunkt, also bei geringerem Tumolvolumen, und mit der

größeren Virusmenge von 1×10^7 pfu GLV-1h68 infiziert wurden (S. Weibel, unveröffentlichte Daten), sollte in einem unabhängigen Experiment nochmals die Immunzellpopulation der Tumore unter diesen Gegebenheiten überprüft werden.

Hierfür wurden $7,5 \times 10^6$ 1936-MEL-Zellen subkutan in die hintere rechte Flanke von athymischen Mäusen (Hsd: Athymic Nude-Foxn1^{nu}) implantiert. Nach Erreichen eines Tumolvolumens von 120-130 mm³ wurde 1×10^7 pfu GLV-1h68 pro Maus (n=5) intravenös injiziert. Die Kontrollgruppe erhielt eine Injektion mit PBS. Sieben Tage nach Infektion wurden die Mäuse durch Inhalation von CO₂ getötet, die Tumore entnommen und Einzelzellsuspensionen hergestellt. Es wurden am Durchflusszytometer 10.000 Ereignisse in einem vorher definierten Auswahlfeld P1 gemessen und im Anschluss an das Kompensieren analysiert. Die Ergebnisse wurden mit denen der 1936-MEL-Tumore aus dem ersten Versuch verglichen.

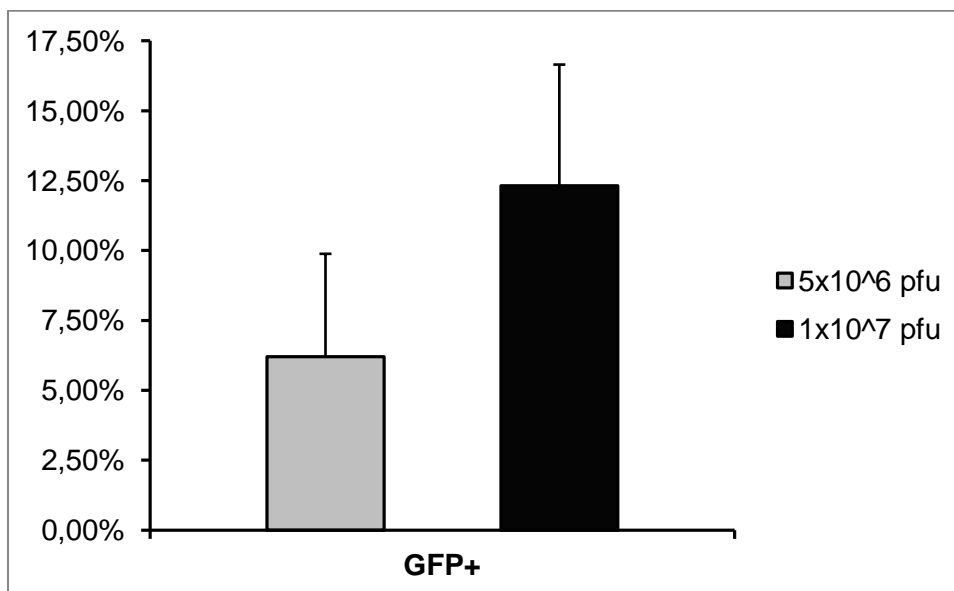


Abb. 11: Vergleich der GFP-positiven Zellen von 1936-MEL-Tumoren 7 dpi nach Infektion mit 5×10^6 pfu (n=3) oder 1×10^7 pfu GLV-1h68 (n=5). Die Anzeige erfolgt in Prozent (%) als Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (STABW).

Die Messung der GFP-positiven Zellen ergab eine Verdoppelung in den Tumoren, die mit der höheren Virusmenge bei kleinerem Tumolvolumen infiziert wurden. Bei Infektion von 1936-MEL-Tumoren mit 5×10^6 pfu GLV-1h68 wurden 6,21 % \pm 3,68 GFP-positive Zellen gemessen, während bei Tumoren, die mit 1×10^7 pfu GLV-1h68 infiziert worden waren, 12,32 % \pm 4,34 GFP-positiv waren (Abb. 11).

4.1.4 Analyse der Immunzellpopulation von 1936-MEL-Tumoren nach Infektion mit 1×10^7 pfu GLV-1h68

Um zu überprüfen, ob neben dem erhöhten Anteil an GFP-positiven Zellen, die Infektion mit 1×10^7 pfu GLV-1h68 auch Effekte auf die Immunzellpopulation zeigt, wurden die Einzelzellsuspensionen dahingehend untersucht.

Hierfür wurden nach dem Blockieren der Fc-Rezeptoren mit einem CD16/32-Antikörper Aliquots mit jeweils ca 1×10^6 Zellen hergestellt, die mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern für CD45, CD11b, Gr-1 und F4/80 gefärbt wurden. Für jede Färbung wurden am Durchflusszytometer 10.000 Ereignisse in einem vorher definierten Auswahlfeld P1 gemessen und im Anschluss an das Kompensieren analysiert.

Tab. 1: Prozentuale Anteile der Immunzellen in Kontroll- und Virus-infizierten 1936-MEL-Tumoren (n=5) 7dpi nach Injektion von 1×10^7 pfu GLV-1h68.

Marker	PBS	GLV-1h68	P-Wert PBS vs. GLV-1h68	Positive Zellen
CD45⁺	0,73 % ± 1,22 %	3,11 % ± 2,35 %	P=0,091	Leukozyten
CD45⁺MHCII⁺	0,40 % ± 0,30 %	0,69 % ± 0,32 %	P=0,190	B Zellen, DC, Monozyten, Makrophagen
CD45⁺F4/80⁺	0,23 % ± 0,18 %	1,01 % ± 0,67 %	P=0,058	Makrophagen
CD11b⁺Gr-1^{high}	0,12 % ± 0,11 %	1,7 % ± 1,26 %	*P=0,048	Granulozytäre MDSC

Die Anzeige erfolgt in Prozent (%) als Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (STABW). Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem ungepaarten T-Test nachgewiesen (*P<0,05).

Die Messung des Oberflächenmarkers CD45 zeigte eine Erhöhung des prozentualen Anteils der Leukozyten von 0,73 % ± 1,22 in PBS Tumoren auf 3,11 % ± 2,35 in GLV-1h68-infizierten Tumoren (Tab. 1). Es kam somit zu einer verstärkten Infiltration der Tumore durch Immunzellen 7 Tage nach Infektion mit 1×10^7 pfu GLV-1h68.

Um zu Klären, welche Immunzellen in den Tumor einwandern, wurde zusätzlich der prozentuale Anteil von CD45⁺MHCII⁺-positiven Zellen, CD45⁺F4/80⁺-positiven Makrophagen und CD11b⁺Gr-1⁺-positiven myeloiden Suppressorzellen (MDSC) bestimmt, bei denen man zwischen granulozytischen (CD11b⁺Gr-1^{high}) und monozytischen MDSC (CD11b⁺Gr-1^{int}) unterscheiden kann.

Bei den CD45⁺MHCII⁺-positiven Zellen, zu denen B-Zellen, dendritische Zellen und Monozyten/Makrophagen gehören, konnte nur ein leichter Anstieg in den Virus-infizierten Tumoren gefunden werden. Dagegen konnte ein deutlicher Anstieg der CD45⁺F4/80⁺-positiven Makrophagen von 0,23 % ± 0,18 in nicht infizierten Tumoren auf 1,01 % ± 0,67 in GLV-1h68-infizierten Tumoren festgestellt werden. Der Anteil der Makrophagen erhöhte sich somit auf das ca. 4-fache in Virus-infizierten im Vergleich zu nicht infizierten 1936-MEL-Tumoren, womit die Makrophagen eine der Haupt-Immunkomponenten im Tumor ausmachen. Messungen der CD11b⁺Gr-1^{high}-positiven granulozytären MDSC zeigten sogar einen signifikanten Anstieg des prozentualen Anteils um mehr als das Zehnfache von 0,12 % ± 0,11 in PBS-injizierten Tumoren auf 1,7 % ± 1,26 in Virus-infizierten Tumoren. Damit stellten die granulozytären MDSC die größte Immunkomponente in 1936-MEL-Tumoren nach Infektion mit 1x10⁷ pfu GLV-1h68 dar.

Es konnte somit gezeigt werden, dass die Infektion von 1936-MEL-Tumoren mit 1x10⁷ pfu GLV-1h68, im Gegensatz zu einer Infektion mit 5x10⁶ pfu, zu einer Steigerung der Infiltration von Immunzellen in die Tumore führt.

4.2 Efficient Colonization and Therapy of Human Hepatocellular Carcinoma (HCC) Using the Oncolytic Vaccinia Strain GLV-1h68

Efficient Colonization and Therapy of Human Hepatocellular Carcinoma (HCC) Using the Oncolytic Vaccinia Strain GLV-1h68

Ivaylo Gentshev^{1,2,6§}, Meike Müller^{2,§}, Stephanie Weibel², Marion Adelfinger², Martina Zimmermann⁵, Michael Bitzer⁵, Qian Zhang^{1,6}, Nanhai Chen^{1,6}, Yong A. Yu^{1,6}, Jochen Stritzker^{1,2} Ulrich M. Lauer^{5,7} and Aladar A. Szalay^{1,2,3,4,6,7*}

¹ Genelux Corporation, San Diego Science Center, San Diego, California, USA

² Department of Biochemistry, University of Wuerzburg, D-97074 Wuerzburg, Germany

³ Rudolf Virchow Center for Experimental Biomedicine, University of Wuerzburg, D-97078 Wuerzburg, Germany

⁴ Institute for Molecular Infection Biology, University of Wuerzburg, D-97078 Wuerzburg, Germany

⁵ Department of Gastroenterology and Hepatology, Medical University Hospital, D-72076 Tuebingen, Germany

⁶ Department of Radiation Oncology, Moores Cancer Center, University of California, San Diego, 3855 Health Sciences Drive # 0843, La Jolla, CA 92093-0843, USA

⁷ U.M. Lauer and A.A. Szalay share senior authorship for this work.

[§] Authors contributed equally.

Efficient Colonization and Therapy of Human Hepatocellular Carcinoma (HCC) Using the Oncolytic Vaccinia Strain GLV-1h68

Implantation of tumor cells, infection of the animals, supervision of the cell viability assay and the virus replication assay, development, establishment and analysis of the flow cytometric experiments were performed by Marion Adelfinger with help and supervision of the following co-authors to the manuscript:

Dr. I. Gentschev designed the study, helped with the flow cytometric experiments, analyzed the data and wrote the paper.

M. Müller designed, performed and analyzed the cell culture experiments and the *in vivo* mouse experiments.

Dr. S. Weibel designed, performed and analyzed the tumor immunohistochemistry.

Dr. F. Grummt supervised the study.

Dr. M. Zimmermann helped to design the study.

Prof. Dr. M. Bitzer provided material.

Dr. M. Heisig performed the statistical analysis.

Dr. Q. Zhang and Dr. Y. A. Yu and generated and provided the viral construct.

Dr. N. Chen analysed cell culture data.

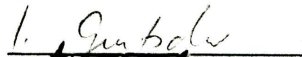
Dr. J. Stritzker designed, performed and analyzed the *in vivo* mouse experiments.

Dr. U. M. Lauer helped to design the study, analyze the data and to write the paper.

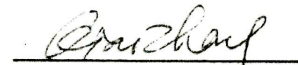
Prof. Dr. A. A. Szalay supervised and designed the study, analyzed the data and helped to write the paper.

I hereby confirm the above statements:

Dr. I. Gentschev



Dr. Q. Zhang



M. Müller



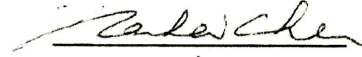
Dr. YA. Yu



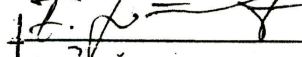
Dr. S. Weibel



Dr. N. Chen




Dr. F. Grummt



Dr. J. Stritzker



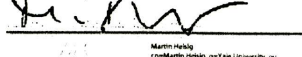
Dr. M. Zimmermann



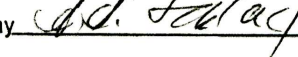
Dr. U. M. Lauer



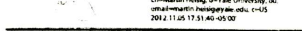
Dr. M. Bitzer



Prof. Dr. AA. Szalay



Dr. M. Heisig



Martin Heisig
condamartin.heisig@unifae.uniroma2.it
orcid=heisig@uniroma2.it
2012-11-05 17:31:40+05:00

Efficient Colonization and Therapy of Human Hepatocellular Carcinoma (HCC) Using the Oncolytic Vaccinia Virus Strain GLV-1h68

Ivaylo Gentshev^{1,2,3}, Meike Müller^{2,3}, Marion Adelfinger², Stephanie Weibel², Friedrich Grummt², Martina Zimmermann⁵, Michael Bitzer⁵, Martin Heisig⁶, Qian Zhang^{1,7}, Yong A. Yu^{1,7}, Nanhai G. Chen^{1,7}, Jochen Stritzker^{1,2}, Ulrich M. Lauer^{5¶}, Aladar A. Szalay^{1,2,3,4,7*¶}

1 Genelux Corporation, San Diego Science Center, San Diego, California, United States of America, **2** Department of Biochemistry, University of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany, **3** Rudolf Virchow Center for Experimental Biomedicine, University of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany, **4** Institute for Molecular Infection Biology, University of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany, **5** Department of Gastroenterology and Hepatology, Medical University Hospital, Tuebingen, Germany, **6** Department of Internal Medicine, School of Medicine, Yale University, New Haven, Connecticut, United States of America, **7** Department of Radiation Oncology, Rebecca and John Moores Comprehensive Cancer Center, University of California San Diego, La Jolla, California, United States of America

Abstract

Virotherapy using oncolytic vaccinia virus strains is one of the most promising new strategies for cancer therapy. In this study, we analyzed for the first time the therapeutic efficacy of the oncolytic vaccinia virus GLV-1h68 in two human hepatocellular carcinoma cell lines HuH7 and PLC/PRF/5 (PLC) in cell culture and in tumor xenograft models. By viral proliferation assays and cell survival tests, we demonstrated that GLV-1h68 efficiently colonized, replicated in, and did lyse these cancer cells in culture. Experiments with HuH7 and PLC xenografts have revealed that a single intravenous injection (i.v.) of mice with GLV-1h68 resulted in a significant reduction of primary tumor sizes compared to uninjected controls. In addition, replication of GLV-1h68 in tumor cells led to strong inflammatory and oncolytic effects resulting in intense infiltration of MHC class II-positive cells like neutrophils, macrophages, B cells and dendritic cells and in up-regulation of 13 pro-inflammatory cytokines. Furthermore, GLV-1h68 infection of PLC tumors inhibited the formation of hemorrhagic structures which occur naturally in PLC tumors. Interestingly, we found a strongly reduced vascular density in infected PLC tumors only, but not in the non-hemorrhagic HuH7 tumor model. These data demonstrate that the GLV-1h68 vaccinia virus may have an enormous potential for treatment of human hepatocellular carcinoma in man.

Citation: Gentshev I, Müller M, Adelfinger M, Weibel S, Grummt F, et al. (2011) Efficient Colonization and Therapy of Human Hepatocellular Carcinoma (HCC) Using the Oncolytic Vaccinia Virus Strain GLV-1h68. PLoS ONE 6(7): e22069. doi:10.1371/journal.pone.0022069

Editor: Irina Agoulnik, Florida International University, United States of America

Received: October 13, 2010; **Accepted:** June 16, 2011; **Published:** July 11, 2011

Copyright: © 2011 Gentshev et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The research was supported by the Research and Development Division of Genelux Corporation, San Diego, USA, and a Service Grant to the University of Würzburg, Germany also funded by Genelux Corp., San Diego, USA. IG QZ YAY NGC JS and AAS are employees and shareholders of Genelux. MA and SW were supported by grants of Genelux Corporation. This work also was supported in part by grants from the German Research Council (DFG) SFB 773 (project C3). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have read the journal's policy and have the following conflicts: IG QZ YAY NGC JS and AAS are employees and shareholders of Genelux Corporation. However, no direct financial support was provided by Genelux for the completion of this study. This does not alter the authors' adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials, as detailed online in the guide for authors. All of the other authors declare that they have no conflict of interest.

* E-mail: aaszalay@genelux.com

¶ These authors contributed equally to this work.

¶ These authors also contributed equally to this work.

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common malignancies worldwide [1,2]. Despite progress in the diagnosis and treatment of HCC, overall patient treatment outcome has not substantially improved in the past. Therefore, the development of new therapies for HCC is a high priority. One of the most promising novel cancer therapies is oncolytic virotherapy. This method is based on the capacity of oncolytic viruses (OVs) to preferentially infect and lyse cancer cells. At the moment, several OV platforms (vaccinia virus, herpes simplex virus and reovirus) are in or entering Phase III clinical trials.

Here, we have investigated the therapeutic potential of the oncolytic vaccinia virus GLV-1h68 against HCC in preclinical

studies. GLV-1h68 was derived from vaccinia virus Lister strain (LIVP) that contains an inactive thymidine kinase (tk) gene and shows inherently more tumor-selective replication than vaccinia virus WR strain [3,4]. The virus strain GLV-1h68 was engineered by inserting 3 expression cassettes encoding a) *Renilla* luciferase-green fluorescent protein (Ruc-GFP) fusion protein into the F14.5L locus, b) β -galactosidase into the thymidine kinase (tk) locus, and c) β -glucuronidase into the hemagglutinin locus in the genome of the LIVP strain. The insertion resulted in highly attenuated virus strain compared to the wild-type parental strain [3].

We and others have already demonstrated tumor selectivity and efficacy of GLV-1h68 in many different tumor xenograft models, including human breast cancer [3], anaplastic thyroid carcinoma

[5,6], malignant pleural mesothelioma [7], pancreatic tumor [8], prostate carcinoma [9], squamous cell carcinoma [10], and canine breast cancer [11,12]. In addition, Kelly et al. reported that GLV-1h68 virus could be used as a tool for detection of melanoma lymph node metastases in an immunocompetent animal model [13]. More recently, a GLV-1h68 derivative (GLV-1h99) that expresses the human norepinephrine transporter was shown to be useful for both therapy and deep-tissue imaging of tumors [14,15].

Here, we describe that GLV-1h68 was able to infect, replicate in, and lyse human hepatocellular carcinoma cell lines HuH7 and PLC/PRF/5.

We also found that a single intravenous injection of GLV-1h68 into mice with subcutaneously grown hepatocellular carcinoma xenografts dramatically reduced tumor growth. Lastly, the oncolytic and immunological effects of GLV-1h68 in HCC tumors were analyzed by fluorescence imaging, immunohistochemistry, flow cytometry (FACS) and immune-related protein antigen profiling.

Materials and Methods

Ethics statement

All animal experiments were approved by the government of Unterfranken, Germany, and conducted according to the German animal protection guidelines (permit number: 55.2–2531.01-17/08).

Cell lines

African green monkey kidney fibroblasts (CV-1, American Type Culture Collection, ATCC-No. CCL-70) and two human hepatocellular carcinoma cell lines HuH7 (ATCC CCL-185) and PLC/PRF/5 (PLC; ATCC CRL 8024) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with antibiotics (100 units/ml penicillin G, 100 units/ml streptomycin) and 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany) at 37°C under 5% CO₂.

Virus strain

GLV-1h68 is a genetically stable oncolytic virus strain designed to locate, enter, colonize and destroy cancer cells without harming healthy tissues or organs [3].

Cell viability assay with GLV-1h68

HuH7 and PLC cells were seeded onto 24-well plates (Nunc, Wiesbaden, Germany). After 24 h in culture, cells were infected with GLV-1h68 using multiplicities of infection (MOI) of 0.1 and 1. Cells were incubated at 37°C for 1 h, then the infection medium was removed and the cells were incubated in fresh growth medium. The amount of viable cells after infection with GLV-1h68 was measured using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, Taufkirchen, Germany). At 24, 48, 72, or 96 h after infection of cells, medium was replaced by 0.5 ml MTT solution at a concentration of 2.5 mg/ml MTT dissolved in RPMI 1640 without phenol red and incubated at 37°C for 2 h in a 5% CO₂ atmosphere. After removal of the MTT solution, the color reaction was stopped by adding 1 N HCl diluted in isopropanol. The optical density was then measured at a wavelength of 570 nm. Uninfected cells were used as reference and were considered as 100% viable. The amount of viable cells after infection with GLV-1h68 was measured in triplicates.

Viral replication

HuH7 and PLC cells grown in 24-well plates were infected with GLV-1h68 at an MOI of 0.1. After incubation at 37°C for 1 h

with gentle agitation every 20 min, the infection medium was removed and replaced by fresh growth medium. Supernatants were collected from virally treated cells at 1, 6, 12, 24, 48, 72 or 96 h post-infection. Serial dilutions of supernatants were titrated by standard plaque assays on CV-1 cells. All samples were measured in triplicates.

Fluorescence imaging

The GFP signals of virus-infected cells were analyzed with a fluorescence microscope (Leica DM IRB; Wetzlar, Germany). Images were captured with an electronic camera and were processed using META-MORPH (Universal Imaging; Downingtown, PA, USA) and Photoshop 7.0 (Adobe Systems, Mountain View, CA, USA).

GLV-1h68-mediated therapy of HuH7 and PLC xenografts

Tumors were generated by implanting hepatoma cells HuH7 or PLC (5×10^6 cells in 100 μ l of PBS) subcutaneously on the right flank above the hind leg of 6- to 8-week-old male or female nude mice (NCI/Hsd/Athymic Nude-*Foxn1*tm, Harlan Winkelmann GmbH, Borchon, Germany). Tumor growth was recorded twice a week using a digital caliper. Tumor volume was calculated as $[(\text{length} \times \text{width}^2)/2]$. On day 10 post implantation, a single dose of the GLV-1h68 virus (5×10^6 plaque forming units [pfu] in 100 μ l PBS) was injected into the tail vein (i.v.) of HuH7 or PLC tumor-bearing mice. The animals of the control groups were injected i.v. with PBS only.

The statistical significance of the data was calculated by two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni comparison post-test (GraphPad Prism software, San Diego, USA). The post-test was only performed when ANOVA revealed significance. Results are displayed as means \pm s.d. *P* values of <0.05 were considered significant.

Histological analysis of tumors

For histological studies, tumors were excised and snap-frozen in liquid N₂, followed by fixation in 4% paraformaldehyde/PBS at pH 7.4 for 16 h at 4°C. Tissue sectioning was performed as described by Weibel et al. [16]. GLV-1h68 was labeled using polyclonal rabbit anti-vaccinia virus (anti-VACV) antibody (Abcam, Cambridge, UK), which was stained using Cy3-conjugated donkey anti-rabbit secondary antibodies obtained from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA). Phalloidin-TRITC (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) was used to label actin and Hoechst 33342 to label nuclei in tissue sections.

Endothelial cells were labeled with monoclonal rat anti-mouse CD31 antibody (BD Pharmingen, San Diego, CA) or hamster anti-mouse CD31 antibody (Chemicon, International, Temecula, CA). Immune cells were labeled using rat anti-mouse MHCII antibody detecting a polymorphic determinant present on B cells, monocytes, macrophages and dendritic cells (eBioscience, San Diego, CA). The Cy3- or Cy5-conjugated secondary antibodies (donkey) were obtained from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA).

The fluorescence-labeled preparations were examined using the MZ16 FA Stereo-Fluorescence microscope (Leica) equipped with the digital DC500 CCD camera and the Leica IM1000 4.0 software (1300 \times 1030 pixel RGB-color images) as well as the Leica TCS SP2 AOBs confocal laser microscope equipped with an argon, helium-neon and UV laser and the LCS 2.16 software (1024 \times 1024 pixel RGB-color images). Digital images were processed with Photoshop 7.0 (Adobe Systems, Mountain View, CA, USA) and merged to yield overlay images.

Measurements of microvessel density

The vascular density was determined in microscopic images (x10 objective, x10 ocular, tissue region 1445 μm by 1445 μm) of CD31-labeled tumor sections captured with identical settings using the Leica TCS SP2 AOBs confocal laser microscope. All images were decorated with eight horizontal lines at identical positions using Photoshop 7.0 and all vessels which intersected these lines were counted to yield the vascular density. The vascular density was calculated for six images per group and presented as mean values \pm standard deviations (s.d.).

Preparation of tumor lysates for a mouse immune-related protein profiling

For preparation of tumor lysates, at 10 days after virus treatment, three mice from each group were sacrificed. Tumors were removed, resuspended in 9 volumes (W/V) lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM EDTA (pH 7.4), 2 mM PMSF and Complete Mini protease inhibitors (Roche, Mannheim, Germany)] and lysed using FastPrep FP120 Cell Disruptor (BIO 101, Qiogene, Germany) at a speed of 6 for 20 s (three times). Samples were then centrifuged at 20,000 g at 4°C for 5 min and the supernatants were analyzed for mouse immune-related protein antigen profiling by Multi-Analyte Profiles (mouse MAPs; Rules Based Medicine, Austin, USA) using antibody linked beads. Results were normalized based on total protein concentration.

Flow cytometric (FACS) analysis

For flow cytometric analysis, three or four mice from each group were sacrificed by CO₂ inhalation and the tumors were removed. The tumor tissues were minced and incubated individually in 10.000 CDU/ml Collagenase I (Sigma, Steinheim, Germany), 32 mg/ml Dispase II (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) and 5 MU/ml DNase I (Calbiochem, Darmstadt, Germany) for 40 min at 37°C and then passed through a 70- μm nylon mesh filter (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium). Cells were incubated at 4°C for 40 min in PBS with 2% FCS, in the presence of appropriate dilutions of labeled monoclonal antibodies: anti-mouse MHCII-PE (Clone M5, eBioscience, Frankfurt, Germany), anti-CD19-PE-Cy5.5 (Clone 6D5, Beckman Coulter, Krefeld, Germany), anti-F4/80-APC (Clone BM8, eBioscience), and anti-Ly6G-PE (Clone 1A8, BD Biosciences). Stained cells were subsequently analyzed, using an Accuri C6 Cytometer and FACS analysis software CFlow Version 1.0.227.4 (Accuri Cytometers, Inc. Ann Arbor, MI USA).

Results

Viral replication and viability of the human hepatocellular carcinoma cells HuH7 and PLC after infection with GLV-1h68 in culture

The replication efficiency of GLV-1h68 in HuH7 and PLC cells was analyzed as described in Materials and Methods. As a result, GLV-1h68 was found to replicate efficiently in both hepatocellular carcinoma cell lines HuH7 (Fig. 1A) and PLC (Fig. 1B). The highest virus titer was identified in wells of virus-infected PLC cells at 72 h post infection (2.7×10^5 pfu/well).

In order to test the ability of the GLV-1h68 virus to infect and lyse HuH7 and PLC cells we performed a cell viability assay (Fig. 2). Ninety-six hours after GLV-1h68 infection at MOIs of 0.1 and 1.0, 18.7% and 17.2% of the HuH7 cells (Fig. 2A) and 24.2% and 16.2% of the PLC cells (Fig. 2B) survived the treatment, respectively.

To confirm the efficient infection and replication of GLV-1h68 in hepatocellular carcinoma HuH7 and PLC cells, we followed the virus-mediated expression of the *Renilla* luciferase-green fluores-

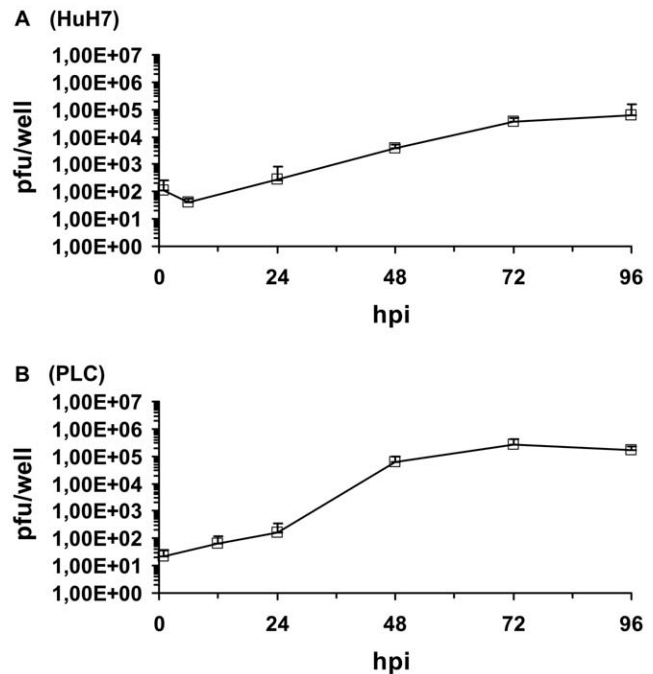


Figure 1. Replication efficiency of vaccinia virus strain GLV-1h68 in HuH7 (A) and PLC (B) cells at an MOI of 0.1. Supernatants were collected from virus-infected cells at various time points (hours) post-infection (hpi). Viral titers were determined as pfu per well in triplicates. Averages plus standard deviation are plotted. doi:10.1371/journal.pone.0022069.g001

cent protein (Ruc-GFP) fusion protein by fluorescence microscopy. In this experimental setting we found that infection with GLV-1h68 at an MOI of 1.0 exhibited the strongest GFP expression at 96 h in both HuH7 and PLC cells (Figure S1). At this time point most dead/dying cells (detectable by positive propidium iodide (PI) staining) were observed.

These results indicated that GLV-1h68 was able to efficiently infect and kill both, HuH7 and PLC cells in cell culture.

Effects of the GLV-1h68 treatment *in vivo*

To test the therapeutic efficacy of GLV-1h68 against human hepatocellular carcinoma *in vivo*, nude mice at the age of 6-8 weeks were implanted with either HuH7 or PLC tumor cells. Ten days after transplantation, tumor-bearing mice were intravenously injected either with 5×10^6 pfu of GLV-1h68 ($n = 5$) or with PBS only ($n = 5$) and were monitored for tumor growth twice a week (Fig. 3). As a result, intravenous injection of GLV-1h68 was found to significantly inhibit the growth of both HuH7 (Fig. 3A) and PLC tumors (Fig. 3B) at 21 dpi. Since one mouse of the virus-injected HuH7 xenograft group developed a tumor volume greater than 3000 mm³ at 35 dpi we prematurely had to terminate the study with this verum group. In contrast, all virus-treated PLC xenografted mice showed a significant tumor reduction compared to controls by the end of the study (at 46 dpi) (Fig. 3B).

Analysis of tumor phenotype differences in GLV-1h68-infected and uninfected HuH7/PLC xenograft-bearing animals by visual inspection, immunohistochemistry and FACS

In the animal studies previously described, we observed a phenotypic difference (switch) in the tumor appearance of virus-

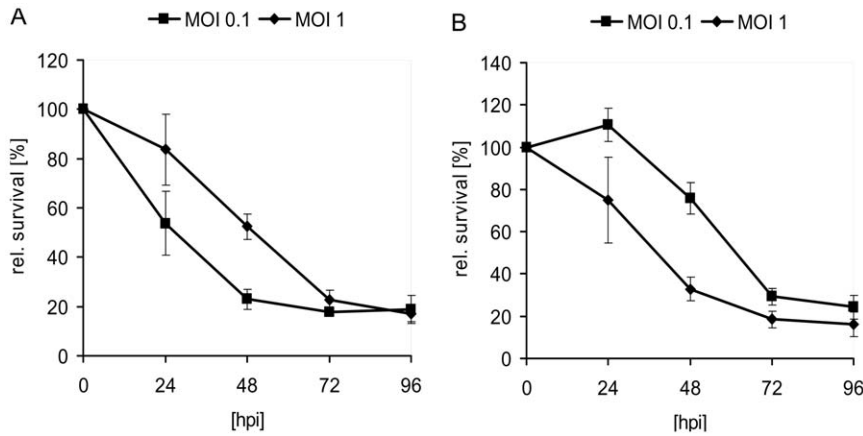


Figure 2. Viability of hepatocellular carcinoma HuH7 (A) and PLC (B) cells after GLV-1h68 infection at MOIs of 0.1 and 1.0, respectively. Viable cells after infection with GLV-1h68 were determined by use of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, Taufkirchen, Germany). Mean values ($n=3$) and standard deviations are shown as percentages of respective controls. doi:10.1371/journal.pone.0022069.g002

infected versus mock-treated PLC tumor-bearing mice by day 14 p.i. The control mice developed dark bluish, hemorrhagic tumors as shown in (Fig. 4A, C), the PLC tumors with GLV-1h68, however, remained small and exhibited light colors (Fig. 4B, D). In contrast to PLC tumors, no hemorrhagic phenotype was observed in the uninfected HuH7 tumors (data not shown). Histological and immunological analysis was made to study the phenotypic differences in two groups ($n=4$ per group) of virus-infected and uninfected PLC mice. Tumorous mice were sacrificed at 10 dpi and using CD31 immunohistochemistry tumor vasculature in GLV-1h68-treated and control-PLC tumors was quantified (Fig. 5). The data showed a significant (** $P<0.01$) decrease in the number of blood vessels in virus-treated PLC xenografts in comparison to controls at day 10 after virus injection (Fig. 5A). HuH7 tumors treated with GLV-1h68, however, exhibited no difference in density of the tumor vasculature. The drastic change in tumor vascularization in virus-treated PLC tumors may explain the loss of the hemorrhagic phenotype. Subsequently, we also analyzed the cell entry of GLV-1h68 virus into and the presence of host

immune cells in tumor tissue of virus-infected and uninfected mice (Fig. 6). Ten-days post-infection HuH7 and PLC tumors both revealed an intense intratumoral virus colonization and a specific peri- and intra-tumoral infiltration of MHC class II-expressing host cells (monocytes/macrophages, dendritic cells and B cells) surrounding virus-infected cancer cells (Fig. 6). Interestingly, we found more extensive viral load in the tumor tissues of PLC tumor-bearing mice (Fig. 6D, GFP) compared to the HuH7 tumor-bearing mice at 10 dpi (Fig. 6B, GFP), as indicated by the amount of GFP detection. In addition, MHC class II-positive host cells were absent in the uninfected PLC tumors (Fig. 6C, row 3). In contrast, a strong peritumoral recruitment of MHC class II-positive cells was observed in uninfected HuH7 tumors (Fig. 6A, row 3).

These immunohistological data were also quantitatively analyzed and verified by flow cytometric analysis (FACS) of tumor single cell suspensions derived from infected and uninfected HuH7 and PLC tumors at 7dpi (Table 1). The amount of MHCII⁺, F4/80⁺, CD19⁺ and Ly6G⁺ cells were much higher in cells derived from virus-infected tumors than from uninfected controls. The

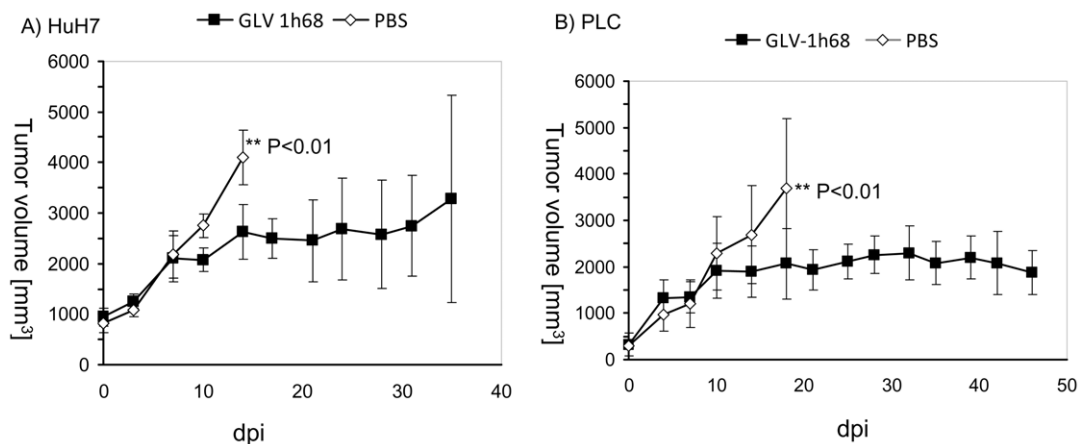


Figure 3. Growth of HuH7 and PLC tumors in GLV-1h68- and mock-treated mice. Groups of HuH7 (Fig. 5A) or PLC tumor-bearing nude mice (Fig. 5B) were either treated with a single dose of 5×10^6 pfu GLV-1h68 ($n=5$) or with PBS (mock control, $n=5$). Tumor size was measured twice a week. Two-way analysis of variance (2way ANOVA) with Bonferroni post-test was used for comparison of two corresponding data points between groups. $P<0.05$ was considered statistically significant. ** $P<0.01$. In addition, statistical power was calculated post-hoc using G*power 3.1.2 software (<http://www.psych.uni-duesseldorf.de/abteilungen/aap/gpower3/>). The statistical power for $\alpha=0.05$ was 75%, for $\alpha=0.01$ 42%. doi:10.1371/journal.pone.0022069.g003

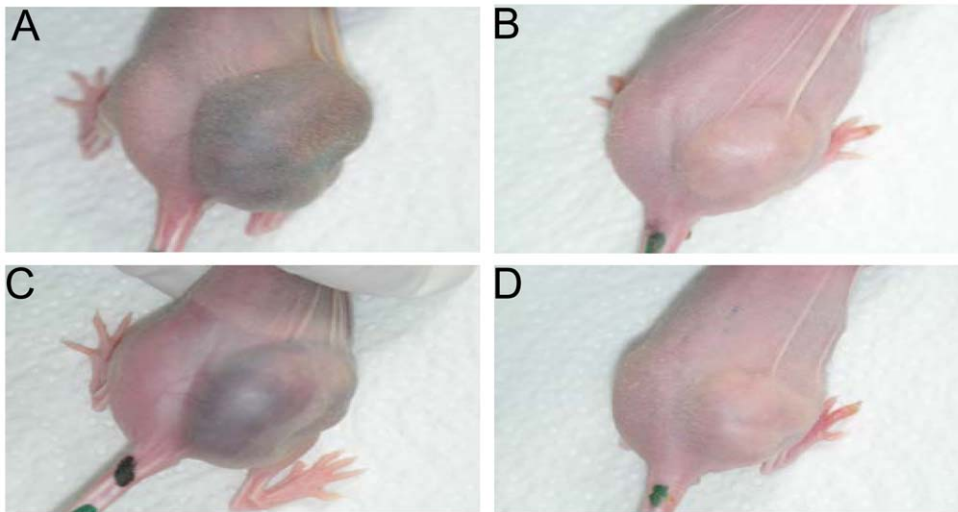


Figure 4. Phenotypic difference between GLV-1h68- and non-treated PLC-tumor-bearing mice. Pictures were taken at day 18 after injection with PBS (mock) (A, C) or GLV-1h68 (B, D). doi:10.1371/journal.pone.0022069.g004

increased accumulation of host immune cells after virus injection was observed in both xenograft models (Table 1). Interestingly, the presence of F4/80⁺, MHCII⁺, CD19⁺ and Ly6G⁺ was 2.79- to 12.98-fold higher in uninfected HuH7 mice compared to uninfected PLC mice (Table 1). We found also 5.91-fold more GFP-positive cells in infected PLC tumors upon comparison to infected HuH7 tumor at 7dpi (Table 1).

The increased presence of host immune cells in tumor tissue before virus injection might be responsible for the different infection and therapeutic efficacies of GLV-1h68 in these two xenograft models.

Mouse immune-related protein profiling of infected and uninfected HuH7 and PLC derived tumors

In order to study the influence of the tumor microenvironment on the efficiency of cancer therapy, we analyzed and compared the protein profiles of infected and uninfected HuH7 and PLC

tumors. Lysates of tumors were prepared and aliquots used for examination of the expression levels of immune-related proteins of mouse origin, as described in Materials and Methods. Data showed that, GLV-1h68 injection led to an increased production of most of the pro-inflammatory cytokines and chemokines tested (Table 2). Many of these cytokines and chemokines, such as IP-10, IL-6, IL-12, IL-18, MCP-1, MCP-3, MCP-5, M-CSF, TNF-alpha etc., are known to activate macrophages, monocytes, neutrophils, eosinophils, etc., and to trigger pro-inflammatory responses in target tissues. In contrast, only MIP-1-gamma was highly down-regulated upon virus injection in both xenograft models. In addition, our protein profile data revealed a 6.4- to 22.2-fold down-regulation of coagulation factors such as fibrinogen and factor VII, concerning the ratio of GLV-1h68 treated/untreated PLC human hepatoma xenografts when compared with the ratio of GLV-1h68 treated/untreated HuH7 human hepatoma xenografts at 10 dpi (Table 2).

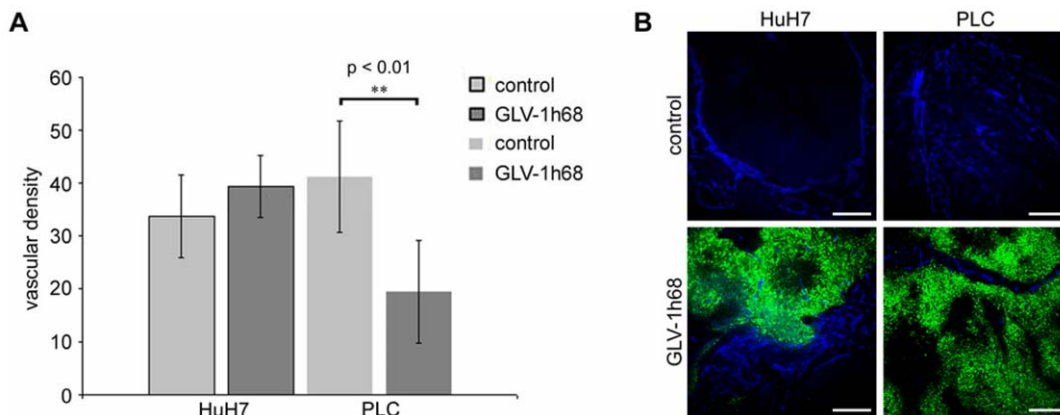


Figure 5. Analysis of GLV-1h68 virus-induced changes in HuH7- or PLC-tumor vascularization by confocal laser microscopy. Determination of vascular density using CD31 immunohistochemistry in virus- treated and non-treated HuH7 or PLC, tumors (A). The vascular density was measured in CD31-labeled tumor cross-sections (n = 6 per group) and presented as mean values \pm standard deviations. The asterisks (**) indicate a significant difference between experimental groups (** $P < 0.01$; Student's *t*-test). **Confocal images of virus-treated and non-treated HuH7- or PLC-tumors (B).** Tumor vasculature was labeled with anti-CD31 antibody (blue) and viral infection was indicated by GFP fluorescence (green). Scale bars represent 300 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0022069.g005

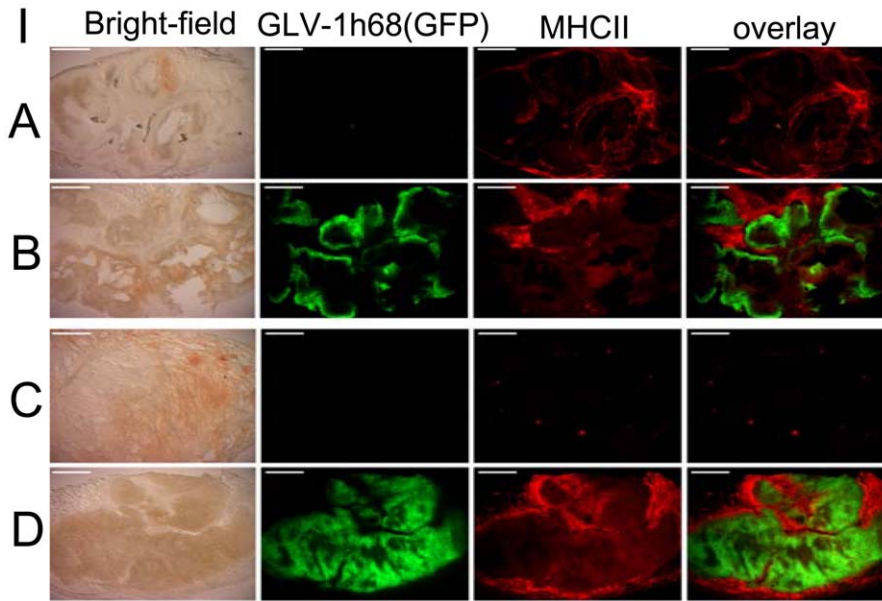


Figure 6. Immunohistochemical staining of MHC class II-positive cells in GLV-1h68-infected and uninfected HuH7 or PLC xenograft tumors at 10 dpi. Mice bearing tumors of HuH7 (A, B) or PLC (C, D) origin either were mock treated (A, C) or infected with GLV-1h68 (B, D). Tumor sections were labeled with an anti-MHCII antibody (red) and viral infection was indicated by GFP fluorescence (green). In addition, overlays of MHCII and GFP signals and transmission images (bright-field) are shown. Scale bars represent 1 mm. doi:10.1371/journal.pone.0022069.g006

Thus, the drastic reduction of fibrinogen and factor VII in the course of application of GLV-1h68 could also be an explanation for the loss of the hemorrhagic phenotype in virus-treated PLC human hepatoma xenografts.

Lastly, we also compared the protein profiles of uninfected HuH7 and PLC derived tumors (Table 3). Interestingly, several significant differences in the expression levels of factors such as CD40, factor VII, GST-alpha, haptoglobin and MPO were observed (Table 3).

Discussion

Approximately 7% of all newly diagnosed cancers worldwide are liver cancers with the third most common cause of death

worldwide (<http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/liver.asp>). The increasing incidence and poor prognosis of hepatocellular carcinoma [1,17] emphasizes the urgent need to find novel therapies for HCC (<http://globocan.iarc.fr>).

In this study, we investigated the oncolytic efficiency of the vaccinia virus strain GLV-1h68 against the two hepatocellular carcinoma cell lines HuH7 and PLC in culture and the therapeutic efficacy in xenograft models. The results showed that GLV-1h68 was able to effectively infect, replicate in, and lyse hepatocellular carcinoma cells in culture. The efficiency of viral replication correlated well with degree of cell lysis and with expression of the marker *Renilla* luciferase-green fluorescent protein fusion protein. In addition, the current study also demonstrated the suitability of GLV-1h68 to achieve a highly effective form of virotherapy in

Table 1. FACS characterization and comparison of tumor single cell suspensions derived from infected and uninfected HuH7 and PLC tumors.

Tumor ^B	GLV-1h68/untreated Ratio (HuH7)	GLV-1h68/untreated Ratio (PLC)	uninfected HuH7/uninfected PLC
Marker^A			
MHCII	2.28	5.68	4.68
F4/80	1.01	3.34	2.79
CD19	1.56	5.63	6.41
Ly6G	1.86	10.22	12.98
^C Total virus-infected cells (GFP-positive in %)	1.20% +/- 0.012%	7.10% +/- 0.044%	

^AMarkers: MHCII-PE antibody detects a polymorphic determinant present on B cells, monocytes, macrophages and dendritic cells. F4/80-APC antibody recognises the F4/80 antigen, that is expressed by a majority of mature macrophages and is the best marker for this population of cells. CD19 is expressed on B cells and follicular dendritic cells. Ly6G-PE, also known as Gr-1- antigen, is expressed on mouse neutrophils, predominantly granulocytes. ^BSingle cell suspensions derived from infected and uninfected HuH7 and PLC tumors 7dpi (n = 4 for uninfected and n = 3 for virus-infected groups) were used for FACS characterization. Ratios greater than 1 indicate an increased accumulation of host immune cells. ^CGFP-positive cells of the infected tumors were presented as mean values (n = 3) +/- standard deviations in percentages. doi:10.1371/journal.pone.0022069.t001

Table 2. Comparison of mouse immune-related protein antigen profiling in primary PLC and HuH7 tumors with or without GLV-1h68 at day 10 after virus injection (n = 3).

Antigen	GLV-1h68 / untreated Ratio (HuH7)	GLV-1h68 / untreated Ratio (PLC)	Classification
GM-CSF	2.18	6.23	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
IFN-gamma	1.29	1.24	proinflammatory cytokine
IL-6	5.67	11	proinflammatory cytokine
IL-12 (IL-12p70)	3	4.27	pleiotropic cytokine
IL-18	1.2	3.7	proinflammatory cytokine
IP-10 (CXCL10)	3.12	112.2	interferon-gamma-induced protein
MCP-1 (CCL2)	6.55	40.9	proinflammatory cytokine
MCP-3 (CCL7)	2.06	26.6	proinflammatory cytokine
MCP-5 (CCL12)	18.17	40.6	proinflammatory cytokine
MPO	0.9	70	myeloperoxidase
M-CSF-1	1.15	5.23	proinflammatory cytokine
MIP-1beta	1.59	6.57	proinflammatory cytokine
MIP-2 (CXCL2)	0.81	15.44	proinflammatory chemokine
TNF-alpha	1.2	2.91	proinflammatory cytokine
MIP-1gamma (CCL9)	0.03	0.0227	macrophage inflammatory protein
Factor VII	1.045	0.047	plays a role in coagulation cascade
Fibrinogen	0.812	0.126	plays a role in coagulation cascade
GST-alpha	0.92	0.0071	biomarker
Haptoglobin	1.632	0.17	biomarker

All ratios greater than 1 indicate an up-regulation of the protein expression, and all ratios less than 1 indicate down-regulation.

doi:10.1371/journal.pone.0022069.t002

mice. We also observed a significant inhibition of tumor growth and damage to the tumor tissues in the GLV-1h68-treated HuH7 and PLC tumor-bearing mice when compared to untreated controls.

More importantly, the data clearly demonstrated that the optimal oncolytic effect of the GLV-1h68 is dependent on the interactions with the components of the tumor microenvironment, such as tumor vasculature and with the cells of the host immune system. The finding of the phenotypic switch in virus-infected PLC-xenograft tumors revealed a significant decrease in the number of blood vessels when compared to controls at day 10 after virus injection ($P < 0.01$). The vascular density in infected HuH7 tumors, however, did not change in comparison to uninfected controls, which were non-hemorrhagic.

The protein profiling data of infected and uninfected PLC tumors (Table 2) clearly revealed that this process was associated with a strong induction of cytokines like TNF- α , IL-12 and IP-10 that are known to have negative effects on vascularization [18,19,20]. We also found a significant down-regulation of factor VII, fibrinogen, glutathione S-transferase alpha (GST-alpha), and haptoglobin in GLV-1h68-colonized PLC tumors only (Table 2). Increased levels of these proteins are found upon injury to blood vessels or interference with hemorrhagic process (Table 3, classification). Taken together, these data did provide direct evidence for the anti-vascular and anti-hemorrhagic effects of GLV-1h68-virus, which may be responsible for the phenotypic switch of PLC-tumor xenografts. In contrast, no hemorrhagic tumor phenotype was observed in HuH7 xenografts. Molecular

Table 3. Comparison of mouse immune-related protein antigen profiling in uninfected primary HuH7 and PLC tumors at day 20 after implantation (n = 3).

Antigen (least detectable dose *)	HuH7 tumor tissue	PLC tumor tissue	Classification
CD40 * 3.3 pg/ml	272 pg/ml	109 pg/ml	a type I glycoprotein belonging to the TNF receptor superfamily
Factor VII (FVII) * 3.5 ng/ml	198 ng/ml	851 ng/ml	plays a role in coagulation cascade (increased FVII indicates blood vessel injury)
Fibrinogen * 0.89 μ g/ml	38 μ g/ml	300 μ g/ml	plays a role in coagulation cascade
GST-alpha * 0.083 ng/ml	6.3 ng/ml	851 ng/ml	biomarker of hepatocyte injury
Haptoglobin * 0.072 μ g/ml	0.98 μ g/ml	14 μ g/ml	biomarker
MPO * 0.21 ng/ml	822 ng/ml	25 ng/ml	myeloperoxidase

*The least detectable dose was determined as the mean + 3 standard deviations of 20 blank readings.

doi:10.1371/journal.pone.0022069.t003

mechanisms causing such differences between PLC and HuH7 tumors in nude mice are currently unknown.

Injection of GLV-1h68 to tumorous mice led to inhibition of tumor growth in both HuH7 and PLC xenografts at 21 dpi and beyond. Therefore, we investigated which components of the tumor microenvironment may play a crucial role in the optimal oncolytic effect of GLV-1h68-virus. In this context, we analyzed the virus colonization and the presence of host immune cells in the tumor tissues of virus-infected and uninfected HuH7- and PLC-tumor bearing mice at 7 and 10 dpi (Fig. 6, Table 1). We found a more extensive viral load in the tumor tissues of PLC mice in comparison to the HuH7 mice at 7 and 10 dpi (Fig. 6, Table 1). Further, at these time points we also observed a 2.79- to 12.98-fold higher peri-tumoral infiltration of MHC class II-expressing host cells especially granulocytes and CD19+ in uninfected HuH7 mice than in uninfected PLC mice (Fig. 6, Table 1). These findings were also confirmed by mouse protein profiling experiments. Approximately a 2.5- to 33-fold higher presence of CD40- or MPO-positive cells were located in uninfected HuH7 tumors upon comparison with uninfected PLC tumor (Table 3). The marker CD40 is constitutively expressed by antigen presenting cells, including dendritic cells, B cells and macrophages [21]. MPO is an enzyme, most abundantly present in neutrophil granulocytes [22]. The increase in MHC class II-expressing immune cells which surround HuH7 tumor tissues already before virus treatment may be responsible for the lower tumor colonization shortly after virus injection resulting possibly in less efficient therapeutic effect of GLV-1h68 in the HuH7 mice, but not in PLC xenografts. The differences between PLC and HuH7 tumors might be due to the different expression levels of cyclooxygenase-2 (COX-2) in these cancer cell lines [23]. It has been shown that COX-2 is associated with carcinogenesis in hepatocellular carcinoma [24,25] and an elevated COX-2 levels led to inflammation in liver tissues [26]. Such high COX-2 expression in HuH7 tumors might be responsible for stronger peri-tumoral infiltration of MHC class II-expressing host cells in comparison to PLC tumors. The observed heterogeneity of tumor tissues indicates the need for analysis of the tumor microenvironment which may help to design optimized therapeutic strategies. In our opinion an optimally designed vaccinia virus therapy needs to consider the interplay among the components of the tumor microenvironment.

References

- Llovet JM, Burroughs A, Bruix J (2003) Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 362: 1907–1917.
- El-Serag HB, Rudolph KL (2007) Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 132: 2557–2576.
- Zhang Q, Yu YA, Wang E, Chen N, Danner RL, et al. (2007) Eradication of solid human breast tumors in nude mice with an intravenously injected light-emitting oncolytic vaccinia virus. *Cancer Res* 67: 10038–10046.
- Zhang Q, Liang C, Yu YA, Chen N, Dandekar T, et al. (2009) The highly attenuated oncolytic recombinant vaccinia virus GLV-1h68: comparative genomic features and the contribution of F14.5L inactivation. *Mol Genet Genomics* 282: 417–435.
- Lin SF, Yu Z, Riedl C, Woo Y, Zhang Q, et al. (2007) Treatment of anaplastic thyroid carcinoma in vitro with a mutant vaccinia virus. *Surgery* 142: 976–983. discussion 976–983.
- Lin SF, Price DL, Chen CH, Brader P, Li S, et al. (2008) Oncolytic vaccinia virotherapy of anaplastic thyroid cancer in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 4403–4407.
- Kelly KJ, Woo Y, Brader P, Yu Z, Riedl C, et al. (2008) Novel oncolytic agent GLV-1h68 is effective against malignant pleural mesothelioma. *Hum Gene Ther* 19: 774–782.
- Yu YA, Galanis C, Woo Y, Chen N, Zhang Q, et al. (2009) Regression of human pancreatic tumor xenografts in mice after a single systemic injection of recombinant vaccinia virus GLV-1h68. *Mol Cancer Ther* 8: 141–151.
- Gentschev I, Donat U, Hofmann E, Weibel S, Adelfinger M, et al. (2010) Regression of human prostate tumors and metastases in nude mice following treatment with the recombinant oncolytic vaccinia virus GLV-1h68. *J Biomed Biotechnol*. pp 489759.
- Yu Z, Li S, Brader P, Chen N, Yu YA, et al. (2009) Oncolytic vaccinia viral therapy of squamous cell carcinoma. *Mol Cancer* 8: 45.
- Gentschev I, Stritzker J, Hofmann E, Weibel S, Yu YA, et al. (2009) Use of an oncolytic vaccinia virus for the treatment of canine breast cancer in nude mice: preclinical development of a therapeutic agent. *Cancer Gene Ther* 16: 320–328.
- Gentschev I, Ehrig K, Donat U, Hess M, Rudolph S, et al. (2010) Significant Growth Inhibition of Canine Mammary Carcinoma Xenografts following Treatment with Oncolytic Vaccinia Virus GLV-1h68. *J Oncol*: 736907.
- Kelly KJ, Brader P, Woo Y, Li S, Chen N, et al. (2009) Real-time intraoperative detection of melanoma lymph node metastases using recombinant vaccinia virus GLV-1h68 in an immunocompetent animal model. *Int J Cancer* 124: 911–918.
- Chen N, Zhang Q, Yu YA, Stritzker J, Brader P, et al. (2009) A novel recombinant vaccinia virus expressing the human norepinephrine transporter retains oncolytic potential and facilitates deep-tissue imaging. *Mol Med* 15: 144–151.
- Brader P, Kelly KJ, Chen N, Yu YA, Zhang Q, et al. (2009) Imaging a Genetically Engineered Oncolytic Vaccinia Virus (GLV-1h99) Using a Human Norepinephrine Transporter Reporter Gene. *Clin Cancer Res* 15: 3791–3801.
- Weibel S, Stritzker J, Eck M, Goebel W, Szalay AA (2008) Colonization of experimental murine breast tumours by *Escherichia coli* K-12 significantly alters the tumour microenvironment. *Cell Microbiol* 10: 1235–1248.
- Thomas MB, Zhu AX (2005) Hepatocellular carcinoma: the need for progress. *J Clin Oncol* 23: 2892–2899.
- Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, Liao F, Farber JM, et al. (1995) Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* 182: 155–162.
- Lee JC, Kim DC, Gee MS, Saunders HM, Sehgal CM, et al. (2002) Interleukin-12 inhibits angiogenesis and growth of transplanted but not in situ mouse

In summary, use of GLV-1h68 strain demonstrated outstanding anti-tumor and anti-vascular effects in PLC and lesser efficacy in HuH7 hepatocellular carcinoma xenografts. Therefore we propose that GLV-1h68 strain is a very potent live drug in preclinical studies to be used soon for the treatment of primary liver cancer in humans. Moreover, results of a Phase 1 study of intravenous administration of GL-ONC1 (GLV-1h68) Vaccinia virus in patients with advanced solid cancer demonstrated acceptable safety, preliminary evidence of anticancer activity and virus replication in several patients (positive for GL-ONC1 viral plaque assay and GFP imaging; (<http://www.ncri.org.uk/ncriconference/2010abstracts/abstracts/C122.htm>)).

Supporting Information

Figure S1 Figure S1 shows the effects of GLV-1h68 virus infection on HuH7 and PLC cells. Hepatocellular carcinoma cells HuH7 (Fig. 1A) and PLC (Fig. 1B) were infected with GLV-1h68 at an MOI of 1.0 followed by monitoring of virus-mediated expression of the Ruc-GFP fusion protein by fluorescence microscopy. **(BF)** Transmitted light view of virus-infected cells; **(GFP)** Expression of GFP in infected cells detected by direct fluorescence; **(PI)** Propidium iodide staining of dead cells; **(Hoechst)** Nuclear staining; **(Merged)** Co-localization of GFP with the dead cells. All pictures in this set were taken at the same magnification. Scale bars represent 0.25 mm. (TIF)

Acknowledgments

We thank Ms. J. Langbein, Mr. Jason Aguilar, Mr. Terry Trevino, and Mrs. Irina Smirnow for excellent technical support and Dr. Z. Sokolovic for critical reading of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: IG MM SW MA FG MZ JS UML AAS. Performed the experiments: IG MM SW JS. Analyzed the data: IG MM MA SW MH NGC JS UML AAS. Contributed reagents/materials/analysis tools: MB QZ YAY. Wrote the paper: IG UML AAS.

- mammary tumor virus-induced mammary carcinomas. *Cancer Res* 62: 747–755.
20. ten Hagen TL, Eggermont AM (2003) Solid tumor therapy: manipulation of the vasculature with TNF. *Technol Cancer Res Treat* 2: 195–203.
 21. Schonbeck U, Libby P (2001) The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 58: 4–43.
 22. Klebanoff SJ (2005) Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 77: 598–625.
 23. Hu KQ, Yu CH, Mineyama Y, McCracken JD, Hillebrand DJ, et al. (2003) Inhibited proliferation of cyclooxygenase-2 expressing human hepatoma cells by NS-398, a selective COX-2 inhibitor. *Int J Oncol* 22: 757–763.
 24. Williams CS, Mann M, DuBois RN (1999) The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* 18: 7908–7916.
 25. Hu KQ (2002) Rationale and feasibility of chemoprevention of hepatocellular carcinoma by cyclooxygenase-2 inhibitors. *J Lab Clin Med* 139: 234–243.
 26. Kondo M, Yamamoto H, Nagano H, Okami J, Ito Y, et al. (1999) Increased expression of COX-2 in nontumor liver tissue is associated with shorter disease-free survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 5: 4005–4012.

4.3 Vergleichende Onkologie

Die Krebsinzidenz und –mortalität wird von der Umwelt stark beeinflusst. Dies macht man sich bei der vergleichenden Onkologie zu nutze. Theodor Boveri, der der Meinung war, dass „zwischen Tier- und Humanmedizin keine Grenzen sind, noch solche sein sollten“ wird als Vater der vergleichenden Onkologie angesehen.¹²⁴

Der Begriff vergleichende Onkologie beschreibt eine Disziplin, die das Studium von natürlicherweise auftretendem Krebs in Tieren, in Studien der Tumorbilogie und -therapie integriert.¹²⁵ Dazu gehören das Studium der Krebspathogenese, z.B. der Krebs-assoziierten Gene und Proteine, und die Erforschung neuer Behandlungsmöglichkeiten für Krebs.¹²⁶ Die Interessen und Bemühungen konzentrierten sich hierbei schon sehr früh auf Hunde, obwohl es auch andere Haustiere mit Krebs gibt.¹²⁷ Dafür gibt es verschiedene Gründe.

Zum einen leben in den USA schätzungsweise 73 Millionen Hunde in Haushalten und Krebs ist mit ca. 45 % die Haupttodesursache für Hunde, die älter als 10 Jahre sind.¹²⁸ Damit ist die Krebsrate ausreichend groß, um klinische Versuche, die auch die Bewertung neuer Medikamente einschließen, voranzutreiben.¹²⁹ Da ein Hund eine viel kürzere Lebensspanne hat (~1/7 der des Menschen), können klinische Interventionen in verkürzter Zeitspanne studiert werden. Beim Hund wird hierbei die Überlebensrate für Fälle von Krebs für ein Jahr angegeben, während beim Menschen fünf Jahre abgewartet werden müssen.¹³⁰

Auch treten die Tumore spontan auf und entwickeln sich im Kontext eines intakten Immunsystems, mit genetisch identischem Tumor und Tumormikromilieu.¹²⁷ Hierbei sind Tumorinitiation und –fortschritt durch dieselben Faktoren beeinflusst wie beim Menschen, wie z.B. Alter, Ernährung, Geschlecht und Umwelteinflüsse,¹²⁵ d.h. da Hunde mit uns die alltägliche Umgebung und auch unsere Nahrungsmittel teilen, sind diese denselben Kanzerogenen ausgesetzt wie wir.¹³¹

Weiterhin ist das Spektrum der Tumorerkrankungen in Hunden genauso weitgefächert wie in menschlichen Patienten.¹²⁵ Dies geht sogar so weit, dass sie die einzige nicht-humane Spezies sind, bei denen Prostatakrebs letal sein kann.¹³²

Es hat sich außerdem gezeigt, dass Menschen und Hunde sich genetisch und physiologisch relativ ähnlich sind,¹²⁸ weswegen Hunde auf Medikamente ähnlich reagieren und diese vergleichbar zum Menschen verstoffwechseln.¹³³ Viele der Chemotherapieprotokolle, die in der Veterinärmedizin verwendet werden, wurden von Protokollen aus der Humanmedizin übernommen und ihr Wirkungsspektrum in Hunden ist ähnlich.¹²⁵ Ein Grund hierfür könnte sein, dass die für den Krebs in Hunden und Menschen verantwortlichen genetischen Veränderungen höchst analog sind¹²⁷ und die Tumore sich histologisch ähneln.¹²⁵ Die Tumore in Hunden sind vergleichbar komplex aufgebaut wie humane Tumoren, da sie ebenfalls sehr heterogen in ihrer Zellpopulation sind. Dies zieht wiederum dieselben

tödlichen Eigenschaften aller Tumore nach sich zu denen erworbene Resistenz, das Wiederauftreten und die Metastasenbildung gehören.¹²⁵

Alle diese Gründe zeigen, dass der Hund ein ideales Modell für die Erforschung von Krebs ist, und dies kommt Hunden insofern zugute, weil für diese neue Medikamente und Behandlungsmöglichkeiten entwickelt werden, da bisher die Heilungschancen mit den Therapien, die auch in der Humanmedizin angewendet werden (chirurgische Resektion, Chemotherapie und Bestrahlung) für viele metastasierende Tumorarten gering sind. Daher werden onkolytische Viren als neue Tumorthherapie nicht nur für den Einsatz in der Humanmedizin, sondern auch für die Behandlung von Hunden getestet.¹³⁴ Im Nachfolgenden wurden zwei Hundetumorzelllinien (STSA-1, DT08/40) in Zellkultur und in Maus-Xenotransplantaten mit drei onkolytischen Viren (GLV-1h68, GLV-1h109 und LIVP6.1.1) infiziert und der onkolytische Effekt, das therapeutische Potential und die Immunzellpopulation der Xenotransplantate untersucht.

4.4 Preclinical Evaluation of Oncolytic Vaccinia Virus for Therapy of Canine Soft Tissue Sarcoma

Preclinical evaluation of oncolytic vaccinia virus for therapy of canine soft tissue sarcoma

Ivaylo Gentshev^{1,2,§}, Marion Adelfinger^{2,§}, Rafael Josupeit², Stephan Rudolph², Klaas Ehrig^{1,2}, Ulrike Donat², Stephanie Weibel², Nanhai G. Chen^{1,5}, Yong A. Yu^{1,5}, Qian Zhang^{1,5}, Martin Heisig^{6,7}, Douglas Thamm⁸, Jochen Stritzker^{1,2}, Amy MacNeill⁹ and Aladar A. Szalay^{1,2,3,4,5*}

¹ Genelux Corporation, San Diego Science Center, San Diego, California, USA

² Department of Biochemistry, University of Wuerzburg, D-97074 Wuerzburg, Germany

³ Rudolf Virchow Center for Experimental Biomedicine, University of Wuerzburg, D-97078 Wuerzburg, Germany

⁴ Institute for Molecular Infection Biology, University of Wuerzburg, D-97078 Wuerzburg, Germany

⁵ Department of Radiation Oncology, Moores Cancer Center, University of California, San Diego, La Jolla, CA 92093, USA

⁶ Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung (MSZ), University of Wuerzburg, 97078 Wuerzburg, Germany

⁷ Department of Internal Medicine, School of Medicine, Yale University, New Haven, CT 06520, USA

⁸ Department of Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Colorado State University, Fort Collins, CO 80523, USA

⁹ Department of Pathobiology, College of Veterinary Medicine, University of Illinois, 2001 S Lincoln Ave, Urbana, IL 61802, USA

§Authors contributed equally.

Preclinical Evaluation of Oncolytic Vaccinia Virus for Therapy of Canine Soft Tissue Sarcoma

Implantation of tumor cells, infection of the animals, cell viability assay, design, measurements and analysis of flow cytometric experiments and parts of the virus replication and biodistribution were performed by Marion Adelfinger with help and supervision of the following co-authors to the manuscript:

Dr. I. Gentschev designed the study, helped with the flow cytometric experiments, analyzed the data and wrote the paper.

R. Josupeit and S. Rudolph performed and analyzed cell culture immunohistochemistry and *in vivo* mouse experiments.

K. Ehrig performed cell culture experiments.

Dr. U. Donat determined the vascular density.

Dr. S. Weibel designed and analyzed the tumor immunohistochemistry.

Dr. N. Chen, Dr. Y. A. Yu and Dr. Q. Zhang generated and provided the viral construct.

Dr. N. Chen analyzed cell culture data.

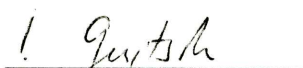

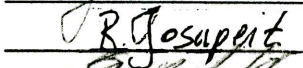
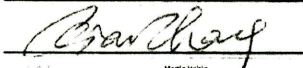


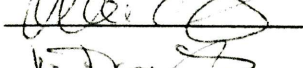
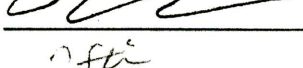
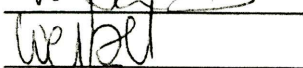

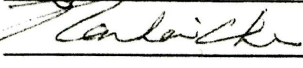
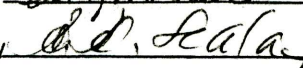


Dr. M. Heisig performed the statistical analysis.

Dr. D. Thamm validated the soft tissue sarcoma cell line by Short tandem repeat analysis (STR).

Dr. J. Stritzker designed, performed and analyzed the *in vivo* mouse experiments.

Dr. A. McNeill helped to design the study, isolated and provided the canine soft tissue sarcoma cell line and helped to write the paper.

Prof. Dr. A. A. Szalay supervised and designed the study, analyzed the data and helped to write the paper.

Dr. I. Gentschev		Dr. Y. A. Yu	
R. Josupeit		Dr. Q. Zhang	
S. Rudolph		Dr. M. Heisig	 <small>Martin Heisig Christian Heisig, on the University, Inc. email=marth.heisig@yu.edu, c425 2012-11-09 17:52:23 -0500</small>
K. Ehrig		Dr. D. Thamm	
Dr. U. Donat		Dr. J. Stritzker	
Dr. S. Weibel		Dr. A. McNeill	
Dr. N. Chen		Prof. Dr. AA. Szalay	

Preclinical Evaluation of Oncolytic Vaccinia Virus for Therapy of Canine Soft Tissue Sarcoma

Ivaylo Gentshev^{1,2,3}, Marion Adelfinger^{2,3}, Rafael Josupeit², Stephan Rudolph², Klaas Ehrig^{1,2}, Ulrike Donat², Stephanie Weibel², Nanhai G. Chen^{1,5}, Yong A. Yu^{1,5}, Qian Zhang^{1,5}, Martin Heisig^{6,7}, Douglas Thamm⁷, Jochen Stritzker^{1,2}, Amy MacNeill⁸, Aladar A. Szalay^{1,2,3,4,5*}

1 Genelux Corporation, San Diego Science Center, San Diego, California, United States of America, **2** Department of Biochemistry, University of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany, **3** Rudolf Virchow Center for Experimental Biomedicine, University of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany, **4** Institute for Molecular Infection Biology, University of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany, **5** Department of Radiation Oncology, Moores Cancer Center, University of California San Diego, La Jolla, California, United States of America, **6** Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung (MSZ), University of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany, **7** Department of Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Colorado State University, Fort Collins, Colorado, United States of America, **8** Department of Pathobiology, College of Veterinary Medicine, University of Illinois, Urbana, Illinois, United States of America

Abstract

Virotherapy using oncolytic vaccinia virus (VACV) strains is one promising new strategy for canine cancer therapy. In this study we describe the establishment of an *in vivo* model of canine soft tissue sarcoma (CSTS) using the new isolated cell line STSA-1 and the analysis of the virus-mediated oncolytic and immunological effects of two different Lister VACV LVP1.1.1 and GLV-1h68 strains against CSTS. Cell culture data demonstrated that both tested VACV strains efficiently infected and destroyed cells of the canine soft tissue sarcoma line STSA-1. In addition, in our new canine sarcoma tumor xenograft mouse model, systemic administration of LVP1.1.1 or GLV-1h68 viruses led to significant inhibition of tumor growth compared to control mice. Furthermore, LVP1.1.1 mediated therapy resulted in almost complete tumor regression and resulted in long-term survival of sarcoma-bearing mice. The replication of the tested VACV strains in tumor tissues led to strong oncolytic effects accompanied by an intense intratumoral infiltration of host immune cells, mainly neutrophils. These findings suggest that the direct viral oncolysis of tumor cells and the virus-dependent activation of tumor-associated host immune cells could be crucial parts of anti-tumor mechanism in STSA-1 xenografts. In summary, the data showed that both tested vaccinia virus strains and especially LVP1.1.1 have great potential for effective treatment of CSTS.

Citation: Gentshev I, Adelfinger M, Josupeit R, Rudolph S, Ehrig K, et al. (2012) Preclinical Evaluation of Oncolytic Vaccinia Virus for Therapy of Canine Soft Tissue Sarcoma. PLoS ONE 7(5): e37239. doi:10.1371/journal.pone.0037239

Editor: Ilya Ulasov, University of Chicago, United States of America

Received: July 26, 2011; **Accepted:** April 18, 2012; **Published:** May 15, 2012

Copyright: © 2012 Gentshev et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The research was supported by the Research and Development Division of Genelux Corporation, San Diego, USA, and a Service Grant to the University of Würzburg, Germany also funded by Genelux Corp., San Diego, USA. This work also was supported in part by the American Kennel Club Canine Health Foundation (grant 01502-A). Individual employees of Genelux participated in the study as outlined in the Contributions section. Otherwise, the funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have read the journal's policy and have the following conflicts: IG QZ YAY NGC JS and AAS are employees and shareholders of Genelux Corporation. MA, KE and SW were supported by grants of Genelux Corporation. Sequences of the two Lister Vaccinia virus strains (LVP1.1.1 and LVP5.1.1.) tested in this study are subject of the patent application 'Clonal strains of attenuated vaccinia viruses and methods of use thereof (U.S. Application No. 61/517,297)'. There are no products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials, as detailed online in the guide for authors (<http://www.plosone.org/static/policies.action#sharing>). The authors do not have any other relevant declarations relating to employment, consultancy, patents, products in development or marketed products, etc. The title and the permit number for the patent are: 'Clonal strains of attenuated vaccinia viruses and methods of use thereof (U.S. Application No. 61/517,297)'.

* E-mail: aaszalay@genelux.com

¶ These authors contributed equally to this work.

‡ Current address: Department of Internal Medicine, School of Medicine, Yale University, New Haven, Connecticut, United States of America

Introduction

Canine soft tissue sarcomas (CSTSs) typically arise in middle-age to old dogs and are a diverse group of cancers that collectively comprise 7% of cutaneous and 15% of subcutaneous canine cancers [1–5]. The annual incidence of CSTSs is about 35 per 100,000 dogs at risk [4]. Although CSTSs have similarity in histological features and clinical behavior, these tumors are phenotypically diverse with frequently controversial histogenesis [6]. They include fibrosarcomas, myxosarcomas, liposarcomas, perivascular wall tumors, peripheral nerve sheath tumors (PNST), pleomorphic sarcoma, mesenchymoma, leiomyosarcoma and rhabdomyosarcomas [1,2,6,7]. CSTSs are graded as low (grade

I), intermediate (grade II) and high (grade III) grade tumors based on mitotic index, tumor necrosis, and degree of differentiation [6,8,9]. Histological grading is considered a prognostic indicator for CSTSs [10]. Grade I soft tissue sarcomas tend to be locally invasive but rarely metastasize, whereas grade II tumors are invasive and have a 7–33% chance of spreading to the lung or regional lymph nodes [6]. Grade III tumors are uncommon and are thought to have a higher rate of recurrence and metastasis [6].

Treatment routines consist of wide surgical excision, radiation therapy and adjuvant chemotherapy. Despite progress in the diagnosis and treatment of CSTSs, the prognosis for canine patients with high-grade soft tissue sarcoma is poor due to the high

probability of metastasis [1,2,11]. Therefore, the development of new therapies for CSTSs is very important. One of the most promising novel cancer therapies is oncolytic virotherapy. This method is based on the capacity of oncolytic viruses (OVs) to eliminate malignancies by direct targeting and lysis of cancer cells. Currently several OV platforms (herpes simplex virus, vaccinia virus, Seneca valley virus and reovirus) are in or entering Phase III human clinical trials. In addition, in China the oncolytic adenovirus H101 has been approved in the treatment of human patients with head and neck cancer since 2005 [12].

In this study, we analyzed the therapeutic potential of two different oncolytic vaccinia virus strains against CSTSs in a preclinical mouse model. Two tested viruses, namely GLV-1h68 and LIVP1.1.1 contain an inactive thymidine kinase (*tk*) gene and show inherently more tumor-selective replication than vaccinia virus WR strain [13,14]. LIVP1.1.1 was isolated from a wild type stock of Lister strain of vaccinia virus (Lister strain, Institute of Viral Preparations, Moscow, Russia). We have chosen LIVP1.1.1 for this study, since it was less virulent compared to other Lister strain isolates (Chen et al manuscript in preparation).

The virus strain GLV-1h68 was engineered by inserting 3 expression cassettes encoding a) *Renilla* luciferase-green fluorescent protein (Ruc-GFP) fusion protein into the F14.5L locus, b) β -galactosidase into the thymidine kinase (*tk*) locus, and c) β -glucuronidase into the hemagglutinin locus from the genome of the LIVP strain [13]. GLV-1h68 showed potent anticancer efficacy in many different human tumor xenograft models, including human breast cancer [13], anaplastic thyroid carcinoma [15,16], malignant pleural mesothelioma [17], pancreatic tumor [18], hepatocellular carcinoma (HCC) [19], prostate carcinoma [20], and squamous cell carcinoma [21]. Moreover, results of a Phase 1 study of intravenous administration of GL-ONC1 (GLV-1h68) vaccinia virus in human patients with advanced solid cancer

demonstrated safety, preliminary evidence of anticancer activity and virus replication (<http://www.ncri.org.uk/ncriconference/2010abstracts/abstracts/C122.htm>).

In addition, we have already demonstrated the therapeutic effect of GLV-1h68 against canine mammary adenoma and carcinoma using ZMTH3 and MTH52c cells, respectively, in xenograft models [22,23].

Here, we describe the establishment of an *in vivo* model of CSTS using a newly isolated cell line derived from a canine patient with a low grade II soft tissue sarcoma. The development of this new xenograft model was necessary, because very few canine soft tissue sarcoma cell lines exist [24]. In addition, we analyzed the virus-mediated oncolytic and immunological effects of two different Lister VACV strains against CSTS by using fluorescence imaging, immunohistochemistry and flow cytometry.

Materials and Methods

Ethics statement

All animal experiments were carried out in accordance with protocols approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Explora Biolabs (San Diego, CA) and/or the government of Unterfranken, Germany (permit number: 55.2-2531.01-17/08).

Donor

The cell line STSA-1 was derived from a tumor of a seven-year-old, male, neutered golden retriever dog that presented with a firm, painful, erythematous mass on the left forelimb. The mass was surgically debulked with excision of the deep digital flexor and flexor carpi muscles as they were extensively infiltrated by the tumor. Histopathology performed on the surgically excised mass was described in Results. The patient underwent full course

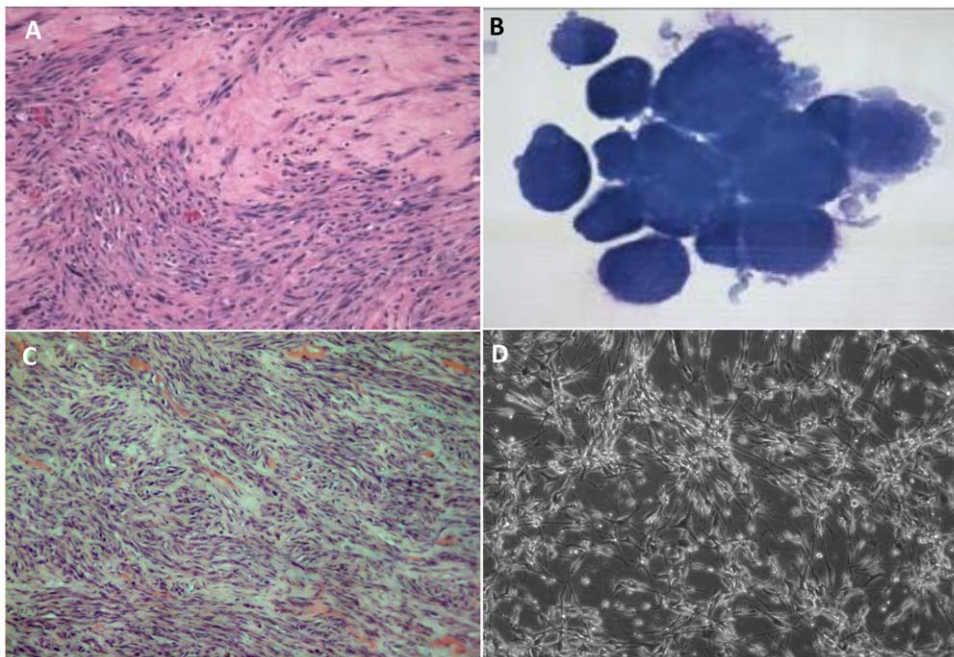


Figure 1. Imaging of STSA-1 tumors (A, C) and canine soft tissue sarcoma cells (B, D). (A) Histologic section of a canine soft tissue sarcoma from the limb of a golden retriever dog, hematoxylin and eosin stain (H&E, $\times 200$ magnification). (B) Cytology of canine soft tissue sarcoma cells STSA-1 isolated from a subcutaneous mass on a golden retriever dog, Wright-Giemsa stain ($\times 1000$ magnification). (C) Canine soft tissue sarcoma STSA-1 xenograft, right flank, athymic nude mouse (H&E, $\times 200$ magnification). (D) Transmitted light microscopy of uninfected STSA-1 cells in MEM-C culture ($\times 100$ magnification).

doi:10.1371/journal.pone.0037239.g001

Table 1. Staining characteristics of cells isolated from a spontaneous tumor growth on a golden retriever dog.

Cell Name	Histopathological Diagnosis	Positive Cytochemical Staining	Negative Cytochemical Staining
STSA-1	Soft tissue sarcoma	Vimentin	Alkaline phosphatase CD18 Cytokeratin

doi:10.1371/journal.pone.0037239.t001

radiation therapy. At a three month recheck examination, thoracic radiographs and abdominal ultrasound showed no evidence of metastasis, but radiographs of the left front limb revealed severe lysis of the distal ulna, caudal distal radius, and carpal bones. A fine needle aspirate of an enlarged left prescapular lymph node was diagnosed by cytology as metastatic mesenchymal neoplasia. At this time, the limb was amputated and enlarged lymph nodes were removed. Cells were isolated aseptically from the mass for culture in the laboratory as described in Materials and Methods. Cytochemical staining and genetic analysis of the isolated canine cells were performed as described below.

The entire limb as well as axillary and prescapular lymph nodes were formalin-fixed and submitted for histology. Histologically, the lesion was consistent with a soft tissue sarcoma of intermediate grade with vascular invasion, infiltration of the tumor cells into the bone marrow cavity and metastases to draining lymph nodes. Over the next two months, the canine patient received chemotherapy, but regrowth of the mass was observed and the dog was euthanized due to side effects caused by the chemotherapeutics.

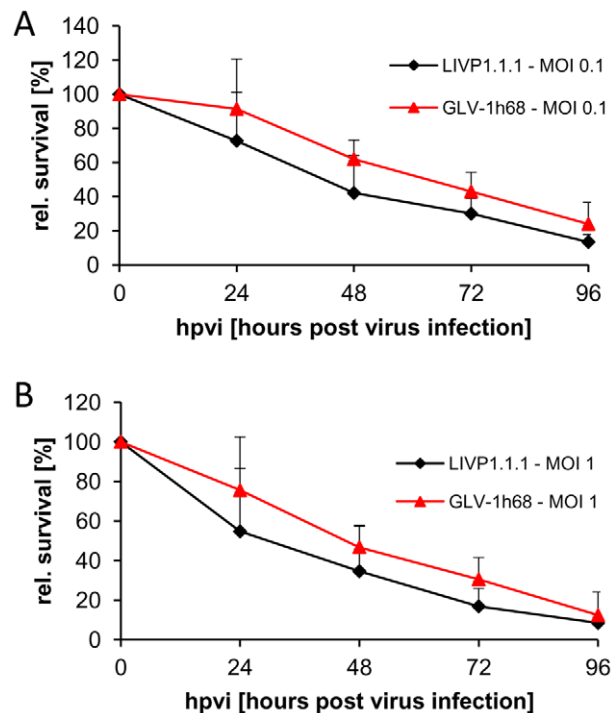


Figure 2. Viability of canine soft tissue sarcoma cells after LIVP1.1.1 or GLV-1h68 infection at MOIs of 0.1 (A) and 1.0 (B), respectively. Viable cells after infection were detected using 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, Taufkirchen, Germany). Mean values ($n=3$) and standard deviations are shown as percentages of respective controls. The data represent two independent experiments. There were no significant differences between groups ($P>0.05$).

doi:10.1371/journal.pone.0037239.g002

Cell culture

African green monkey kidney fibroblasts (CV-1) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). CV-1 cells were cultured in DMEM supplemented with antibiotic-solution (100 U/ml penicillin G, 100 units/ml streptomycin) and 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany).

STSA-1 cells described in this paper were isolated from surgically excised spontaneous canine tumor removed from a patient at the University of Illinois Veterinary Teaching Hospital. Fat and necrotic tissue were removed from an unfixed section of the tumor. The mass was then minced into one millimeter cubes, placed in a 25 cm² cell culture flask (Nunc, Wiesbaden, Germany) and left to adhere for 10 min at room temperature with subsequent addition of minimum essential medium with Earle's salts supplemented with 2 mM glutamine, 50 U/mL penicillin G, 50 µg/mL streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non-essential amino acids (MEM-C), and 10% FBS, then incubated at 37°C, 5% CO₂, and 100% humidity. Trypsinization and passage of the cultured cells was performed when cells covered approximately 80% of the flask surface or sooner if tissue explants were decaying. Once a primary culture was established, it was maintained in MEM-C with 10% FBS and incubated as above.

To analyze cell type using cytochemical and immunocytochemical stains, primary cells were grown in 35 mm diameter plates (Nunc) as described above. Then cells were trypsinized, collected in MEM-C with 10% FBS and pelleted by centrifugation at 400 ×g for 5 min. The cellular pellets were suspended in 1 mL phosphate-buffered saline (PBS) from which 100 µL aliquots of cells were

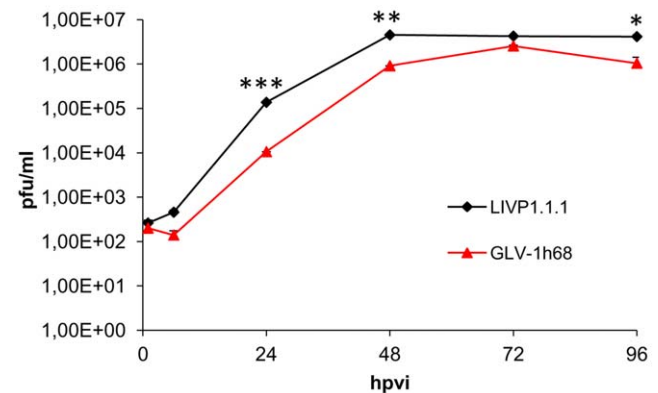


Figure 3. Comparison of the replication capacity of the vaccinia virus strains GLV-1h68 and LIVP1.1.1 in canine soft tissue sarcoma cells. For the viral replication assay, STSA-1 cells grown in 24-well plates were infected with either GLV-1h68 or LIVP1.1.1 at an MOI of 0.1. Cells and supernatants were collected for the determination of virus titer at various time points. Viral titers were determined as pfu per well in triplicates by standard plaque assay in CV-1 cell monolayers. Averages plus standard deviation are plotted. The data represent two independent experiments. The statistical significance was analyzed using two-way ANOVA followed Bonferroni post-test on log transformed PFU data. *, **, and *** indicate $P<0.05$, 0.01, and 0.001, respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0037239.g003

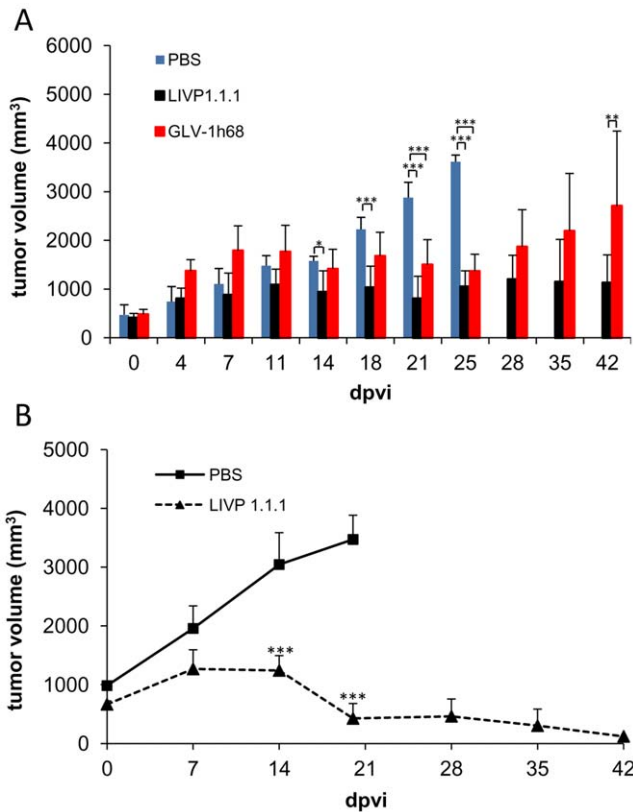


Figure 4. Growth of canine soft tissue sarcoma tumors in virus- and mock-treated mice. (A) Groups of STSA-1 tumor-bearing nude mice ($n=6$) were either treated with a single dose of 1×10^7 pfu GLV-1h68, LIVP1.1.1 or with PBS (mock control). Tumor size was measured twice a week. Two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post-test was used for comparison of two corresponding data points between groups. *, **, and *** indicate $P < 0.05$, 0.01 , and 0.001 , respectively. (B) Animals with established STSA-1 flank tumors (>600 mm³) were distributed into two experimental groups ($n=4$ per group). Flank tumors were treated with injections of a single dose of LIVP1.1.1 (1×10^7 pfu) or PBS alone as control. The statistical significance was confirmed by Student's t-test (** $p < 0.001$). doi:10.1371/journal.pone.0037239.g004

cytocentrifuged at 1000 rpm for 3 min onto charged glass slides. Subsequently, the adherent cells were incubated for 10 minutes with BCIP/NBT phosphatase substrate (KPL, Inc., Gaithersburg, Maryland, USA) to detect alkaline phosphatase (ALP) activity or were immunostained directly with a murine anti-canine CD18 monoclonal antibody (CA16.3C10, a gift from Dr. Peter Moore, University of California, Davis, CA, USA). Additional slides were subjected to antigen retrieval in a decloaking chamber (Biocare Medical, Concord, CA, USA) and incubated with a cocktail of murine monoclonal anti-AE1 and anti-AE3 antibodies (Biogenex, San Ramon, CA, USA) to detect cytokeratin, or with a murine monoclonal anti-vimentin antibody (V-9, Biogenex).

Following successful cell line establishment, cells were confirmed to be of canine origin and identity validated through multiplex species-specific PCR and short tandem repeat analysis, as recently described [25].

Virus strains

GLV-1h68 is a genetically stable oncolytic virus strain designed to locate, enter, colonize and destroy cancer cells without harming healthy tissues or organs [13].

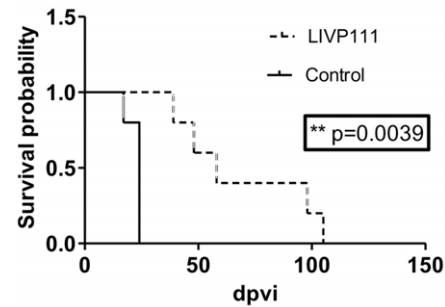


Figure 5. Survival curves of LIVP1.1.1-treated and non-treated STSA-1 tumor-bearing mice. The comparison of the survival between the different treatment groups ($n=5$) was statistically evaluated by Kaplan-Meier and log-rank (Mantel-Cox) tests (GraphPad Prism, San Diego, CA). $P < 0.05$ was considered statistically significant. ** $P = 0.0039$. doi:10.1371/journal.pone.0037239.g005

LIVP1.1.1 was derived from LIVP (Lister strain, Institute of Viral Preparations, Moscow, Russia). The sequence analysis of LIVP1.1.1 revealed the presence of different mutations in several genes including that of thymidine kinase (Chen et al manuscript in preparation). In addition, LIVP1.1.1 demonstrated also different plaque form morphology in comparison to GLV-1h68 in CV-1 cells.

Cell viability assay

8×10^4 cells/well were seeded in 24-well plates (Nunc, Wiesbaden, Germany). After 24 h in culture, cells were infected with either LIVP1.1.1 or GLV-1h68 using multiplicities of infection (MOI) of 0.1 and 1.0. The cells were incubated at 37°C for 1 h, then the infection medium was removed and subsequently the cells were incubated in fresh growth medium. The amount of viable cells after infection was measured using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, Taufkirchen, Germany). At 24, 48, 72, or 96 h after infection of cells, medium was replaced by 0.5 ml MTT solution at a concentration of 2.5 mg/ml MTT dissolved in RPMI 1640 without phenol red and incubated for 2 h at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere. After removal of the MTT solution, the color reaction was stopped by adding 1 N HCl diluted in isopropanol. The optical density was then measured at a wavelength of 570 nm. Uninfected cells were used as reference and were considered as 100% viable.

Viral replication

For the viral replication assay, cells grown in 24-well plates were infected with either LIVP1.1.1 or GLV-1h68 at an MOI of 0.1. After one hour of incubation at 37°C with gentle agitation every 20 min, the infection medium was removed and replaced by a fresh growth medium. After 1, 6, 24, 48, 72 and 96 hours, the cells and supernatants were harvested. Following three freeze-thaw cycles, serial dilutions of the lysates were titered by standard plaque assays on CV-1 cells. All samples were measured in triplicate.

Vaccinia virus-mediated therapy of STSA-1 xenografts

Tumors were generated by implanting 1×10^6 canine soft tissue sarcoma cells in 100 μl PBS subcutaneously into the right hind leg of 6- to 8-week-old female nude mice (NCI/Hsd/Athymic Nude-Foxn1tm, Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, Germany). On day 28, a single dose of LIVP1.1.1 or GLV-1h68 virus (1×10^7 plaque forming units [pfu] in 100 μl PBS) was injected into the tail

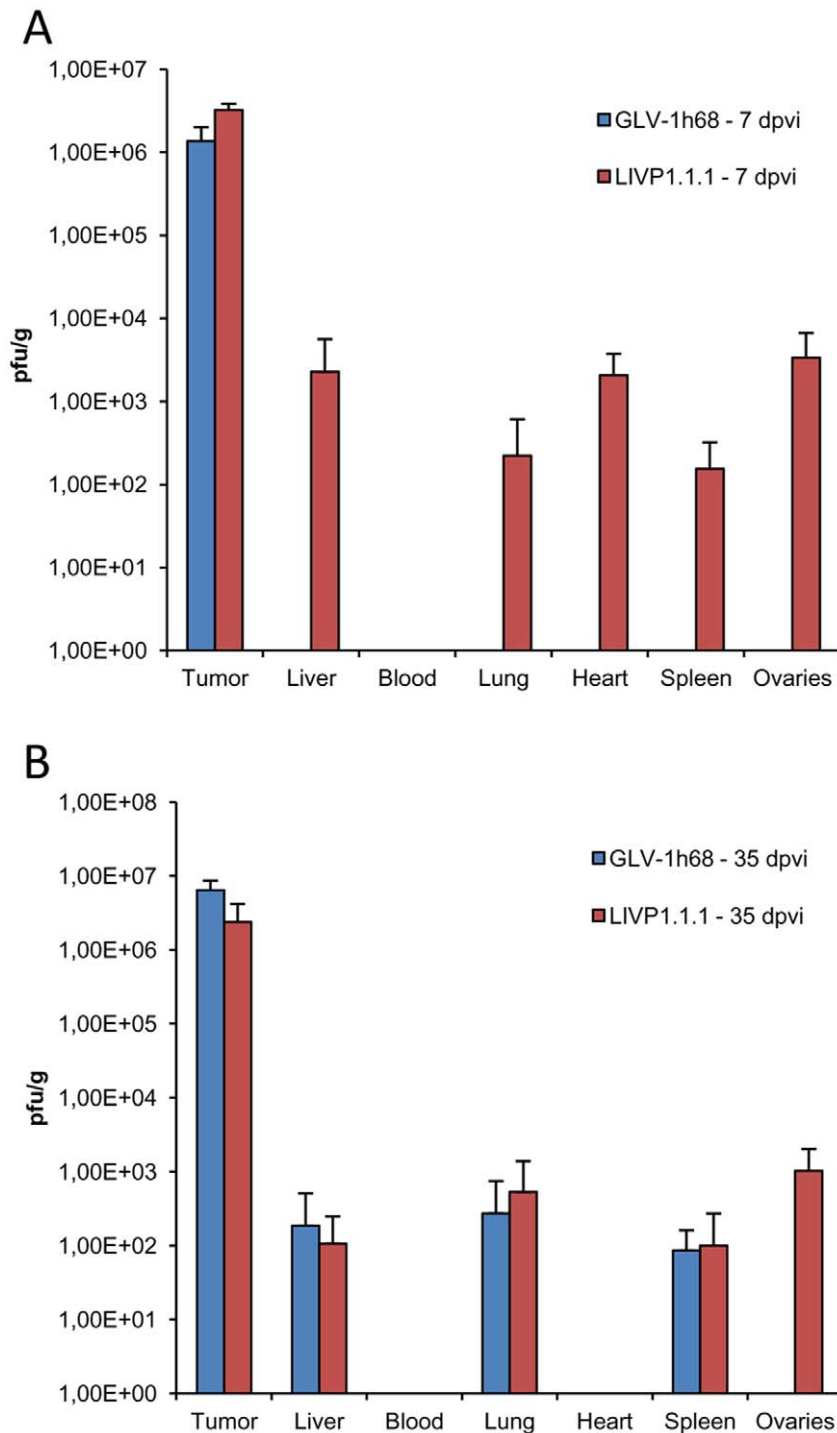


Figure 6. Virus distribution in STSA-1 xenografts after 7 (A) and 35 (B) day post injection with GLV-1h68 or LIVP1.1.1. Tumor-bearing mice were injected with 1×10^7 pfu of GLV-1h68 or LIVP1.1.1. Three mice of each group were analyzed at 7 and 35 dpvi for virus distribution. The data were determined by standard plaque assays on CV-1 cells using aliquots of the homogenized tissue and were displayed as mean pfu/g organ or tissue ($n=3$). For each organ, aliquots of 0.1 ml were measured in triplicates (detection limit: 10 pfu/organ or tissue). The values are the mean of triplicate samples, and the bars indicate SD. Statistical analysis for the tumors was performed using 1-way ANOVA followed by Bonferroni post-test on log transformed pfu data. There were no significant differences between groups ($P>0.05$). The study was repeated in two independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0037239.g006

vein intravenously (i.v.). The control animals were injected i.v. with PBS only. Tumor growth was monitored weekly in two dimensions using a digital caliper. Tumor volume was calculated as $[(\text{length} \times \text{width}^2)/2]$.

The significance of the results was calculated by two-way analysis of variance (ANOVA) or Kaplan-Meier and log-rank (Mantel-Cox) tests (GraphPad Prism software, San Diego, USA) or

Table 2. FACS characterization and comparison of tumor single cell suspensions derived from infected and uninfected STSA-1 tumors at 7 dpvi (n = 3)

Marker	Ratio ^A GLV-1h68/PBS	Ratio ^A LIVP1.1.1/PBS	Positive cells
CD11b	1.37±0.43	1.63±1.37	granulocytes, macs, NK cells
MHCII	1.40±0.75	2.08±2.32	B cells, macs, DC
CD19	0.88±0.57	2.01±0.93	DC, B cells
CD45	1.16±0.58	2.16±1.60	all leukocytes
F4/80	1.37±0.62	2.22±3.04	majority of mature macs
Ly6G high	5.39±3.76	11.03±5.65	neutrophils
CD11c	1.83±2.82	2.03±2.09	DC, NK cells
CD49b	2.51±1.08	3.57±5.62	majority of NK and NKT cells
GFP ⁺	11.15%±6.7%	n.a.	total GFP-positive cells
GFP ⁺ /MHCII ⁺	0.91%±0.7%	n.a.	GFP- and MHCII-positive cells
GFP ⁺ /CD45 ⁺	1.52%±1.2%	n.a.	GFP- and CD45-positive cells
GFP ⁺ /Ly6G	0.26%±0.2%	n.a.	GFP- and Ly6G high-positive cells

^ARatios greater than 1 indicate an increased accumulation of host immune cells in virus-infected tumors.

Abbreviations: macs: macrophages; DC: dendritic cells; NK: natural killer cells; NKT: natural killer T cells; n.a.: not applicable.

doi:10.1371/journal.pone.0037239.t002

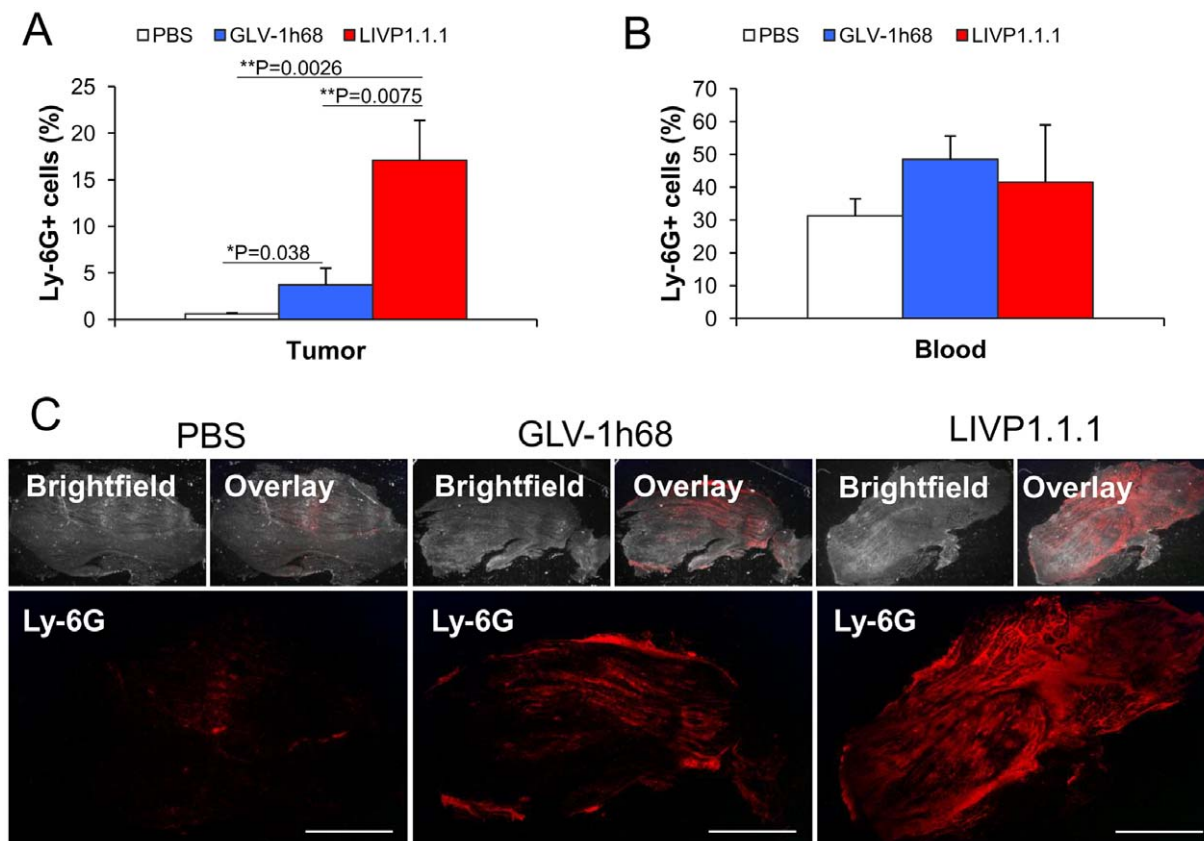


Figure 7. Presence of Ly-6G-positive cells (neutrophils) in virus-infected and non-infected STSA-1 xenografts at 7 dpvi. (A, B) Percentage of Ly-6G-positive cells (neutrophils) in tumors (A) and in peripheral blood (B) of STSA-1 xenografts 7 days after GLV-1h68-, LIVP1.1.1- or PBS-treatment. Experiments were done twice with at least 3 mice per group. The data are presented as mean values \pm standard deviations. The statistical significance was analyzed using two-way ANOVA followed Bonferroni post-test (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$). (C) Immunohistochemical staining of Ly-6G-positive cells (neutrophils). Cryosections (10 μ m-thick) of tumors were labeled with anti-Ly-6G antibody specific for neutrophil granulocytes (red). In addition, bright-field transmission images (BF) and overlays of Ly-6G signals and transmission images (bright-field) are shown. Scale bars, 3 mm.

doi:10.1371/journal.pone.0037239.g007

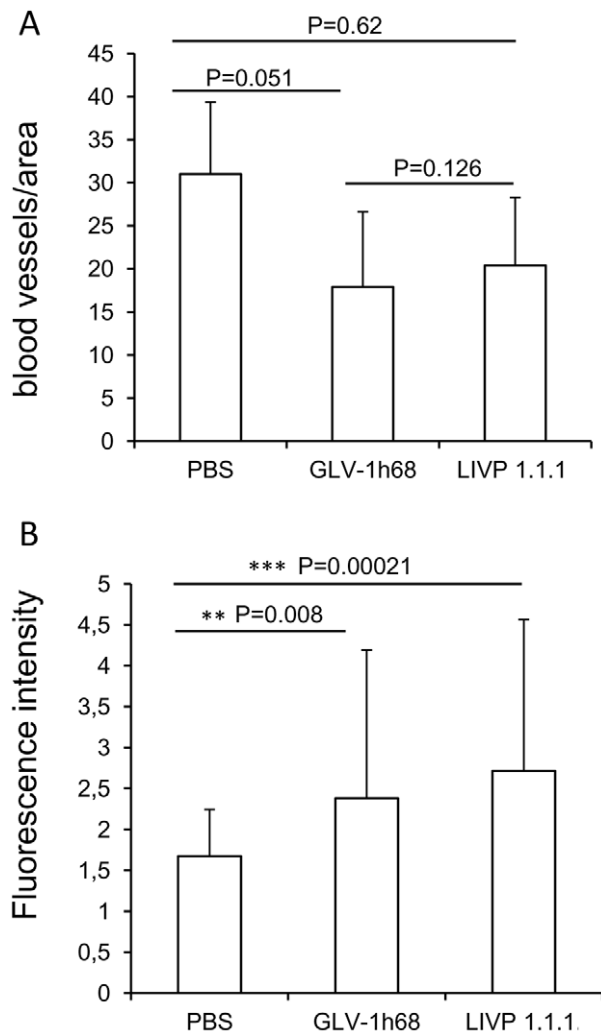


Figure 8. Determination of vascular density using CD31 immunohistochemistry in virus-treated and non-treated tumors at 7 dpvi. (A) Blood vessel density in STSA-1 tumors. The vascular density was measured in CD31-labeled tumor cross-sections ($n=3$ mice per group) and presented as mean values \pm standard deviations. The study was repeated in an independent experiment. There were no significant differences between groups ($P>0.05$, Student's *t*-test). (B) Fluorescence intensity of the CD31 signal of blood vessels. The fluorescence intensity of the CD31-labelling represented the average brightness of all vessel-related pixels and determined as described by [32]. The fluorescence signal was measured in 18 images of each tumor ($n=3$ mice per group). Shown are the mean values \pm standard deviations. The study was repeated in an independent experiment. (** $P<0.01$, *** $P<0.001$, Student's *t*-test) doi:10.1371/journal.pone.0037239.g008

Student's *t*-test. Results are displayed as means \pm s.d. (standard deviation). *P* values of <0.05 were considered significant.

Histological analysis of tumors

The spontaneous canine tumor surgically removed from a patient at the University of Illinois Veterinary Teaching Hospital was submitted to the University of Illinois Veterinary Diagnostic Laboratory (VDL) for histopathologic analysis. Portions of the tissues were paraffin-embedded, sectioned and stained with hematoxylin and eosin (H&E) to identify the tumor type.

For histological studies of xenograft model, tumors were excised and snap-frozen in liquid N_2 , followed by fixation in 4%

paraformaldehyde/PBS at pH 7.4 for 16 h at 4°C. Tissue samples were sectioned (10 μ m thickness) with the cryostat 2800 Frigocut (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). After dehydration in 10% and 30% sucrose (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) specimens were embedded in Tissue-Tek® O.C.T. (Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Netherlands).

Endothelial blood vessel cells were stained with a hamster monoclonal anti-CD31 antibody (Chemicon International, Temecula, USA; MAB1398Z). Anti-Mouse Ly-6G (eBioscience, San Diego, USA; 14-5931-81) was used to stain neutrophil granulocytes. DyLight549- and DyLight649-conjugated secondary antibodies (donkey) were obtained from Jackson ImmunoResearch (Pennsylvania, USA).

A part of tissue sectioning was performed as described by [26]. In this case, VACVs were labeled using polyclonal rabbit anti-vaccinia virus (anti-VACV) antibody (Abcam, Cambridge, UK), which was stained using Cy3-conjugated donkey anti-rabbit secondary antibodies obtained from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA).

Immune cells were labeled using rat anti-mouse MHCII antibody detecting a polymorphic determinant present on B cells, monocytes, macrophages and dendritic cells (eBioscience, San Diego, CA) and Cy5-conjugated secondary antibodies (donkey) obtained from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA).

The fluorescence-labeled preparations were examined using the MZ16 FA Stereo-Fluorescence microscope (Leica) equipped with the digital DC500 CCD camera and the Leica IM1000 4.0 software (1300 \times 1030 pixel RGB-color images). Digital images were processed with Photoshop 7.0 (Adobe Systems, Mountain View, CA, USA).

Measurement of blood vessel density and fluorescence intensity of the CD31 signal in the tumor tissue

Blood vessel density was measured in digital images ($\times 100$ magnification) of CD31-labelled 10- μ m-thick tumor cross-sections using Leica IM1000 4.0 software. Eighteen images per tumor were analyzed per staining (3 tumors per group, 3 sections of each tumor and 6 images per section). Exposure time for individual images was adjusted to ensure clear visibility of all detectable blood vessels and decorated with 6 equidistant horizontal lines using Photoshop 7.0. All blood vessels crossing these lines were counted to obtain the vessel density per section.

Fluorescence intensity of the CD31-labelling in 10- μ m-thick sections of control tumors and infected areas of virus-colonized tumors was measured on digital images ($\times 100$ magnification) of specimens stained for CD31 immunoreactivity. On the fluorescence microscope, the background fluorescence was set to a barely detectable level by adjusting the gain of the CCD camera before all the images were captured with identical settings. RGB-images were converted into 8-bit gray scale images (intensity range 0–255) using Photoshop 7.0. The fluorescence intensity of the CD31-labelling represented the average brightness of all vessel-related pixels and was measured using Image J software <http://rsbweb.nih.gov/ij>.

Flow cytometric (FACS) analysis

For flow cytometric analysis, three or four mice from each group were sacrificed by CO_2 inhalation and the tumors were removed. The tumor tissues were minced and incubated individually in 10.000 CDU/ml Collagenase I (Sigma, Steinheim, Germany) and 5 MU/ml DNase I (Calbiochem, Darmstadt, Germany) for 75 min at 37°C and then passed through a 70- μ m nylon mesh filter (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium).

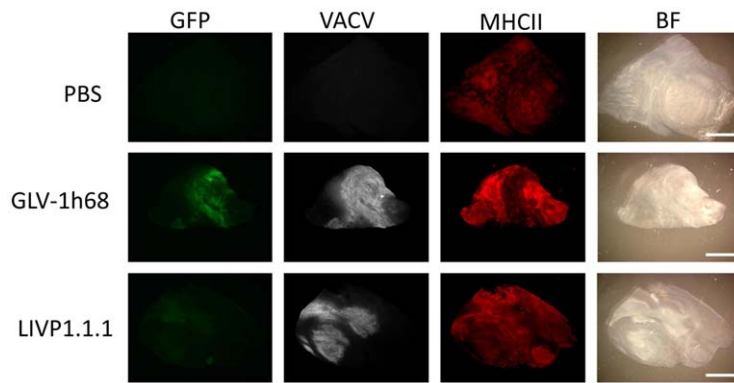


Figure 9. Immunohistochemical staining of infected and uninfected STSA-1 xenograft tumors at 21 dpvi. Tumor-bearing mice were either mock treated (PBS) or infected with GLV-1h68 or LIVP1.1.1. Tumor sections were labeled either with anti-vaccinia virus (VACV, grey) or anti-MHCII antibodies (red). GLV-1h68 infection and/or phagocytosis was indicated by GFP fluorescence (green). In addition, bright-field transmission images (BF) of all tumor sections are shown. Scale bars, 2.5 mm.
doi:10.1371/journal.pone.0037239.g009

To block non-specific staining, single cells were preincubated with 0.5 μ g of anti-mouse CD16/32 antibody (clone 93, Biolegend, San Diego, USA) per one million cells for 20 min on ice. After that, the cells were incubated at 4°C for 10 min in PBS with 2% FCS in the presence of appropriate dilutions of labeled

monoclonal antibodies: anti-mouse MHCII-PE (Clone M5, eBioscience, San Diego, CA, USA), anti-CD11b-PerCPCy5.5 (Clone M1/70, eBioscience), anti-CD11c-APC (Clone N418, BioLegend, San Diego, USA), anti-CD49b-APC (Clone DX5, BioLegend), anti-CD19-PerCP-Cy5.5 (Clone 6D5, BioLegend), anti-F4/80-APC (Clone BM8, eBioscience), anti-Ly-6G-PE (Clone 1A8, BD Biosciences) and anti-CD45-PerCP (Clone 30-F11, BD Biosciences).

Numbers of neutrophils in tumors and peripheral blood of STSA1-tumor-bearing mice were determined in parallel by staining with APC-eFluor 780-conjugated mAbs to Ly-6G (Clone RB6-8C5 eBioscience, San Diego, CA, USA). Before specific Ab staining, cells were incubated with Fc blocker (anti-CD16/CD32 mAb) for 20 min.

Stained cells were subsequently analyzed, using an Accuri C6 Cytometer and FACS analysis software CFlow Version 1.0.227.4 (Accuri Cytometers, Inc. Ann Arbor, MI USA).

Results

Histological and pathological examination of original canine tumor and xenograft tumors

The histological examination of the original primary tumor revealed atypical mesenchymal cells haphazardly arranged in bundles and streams (Fig. 1A). The cells had a moderate amount of eosinophilic cytoplasm and oval nuclei with coarse, clumped chromatin and one to two prominent nucleoli. Moderate anisocytosis and anisokaryosis were noted. There were one to two mitotic figures per $\times 400$ magnification. Neoplastic cells extended into adjacent muscle and areas of compacted collagen. The mass was diagnosed as a low grade II soft tissue sarcoma with narrow surgical margins. In addition, aliquots of canine cell explants from the tumor (in following termed as STSA-1) were analysed by cytochemical staining as described above (Fig. 1B, Table 1 and Figure S1). Alkaline phosphatase (ALP) activity is detectable in cells derived from bone, liver, kidney and intestine; CD18 is a marker for histiocytic cells; cytokeratin is found within cells of epithelial origin; and vimentin is present in mesenchymal cells. Cells were positive for vimentin, but negative for other proteins, which supports the soft tissue sarcoma diagnosis (Table 1 and Figure S1). The canine origin of STSA-1 cells was also confirmed through multiplex species-specific microsatellite PCR (Figure S2).

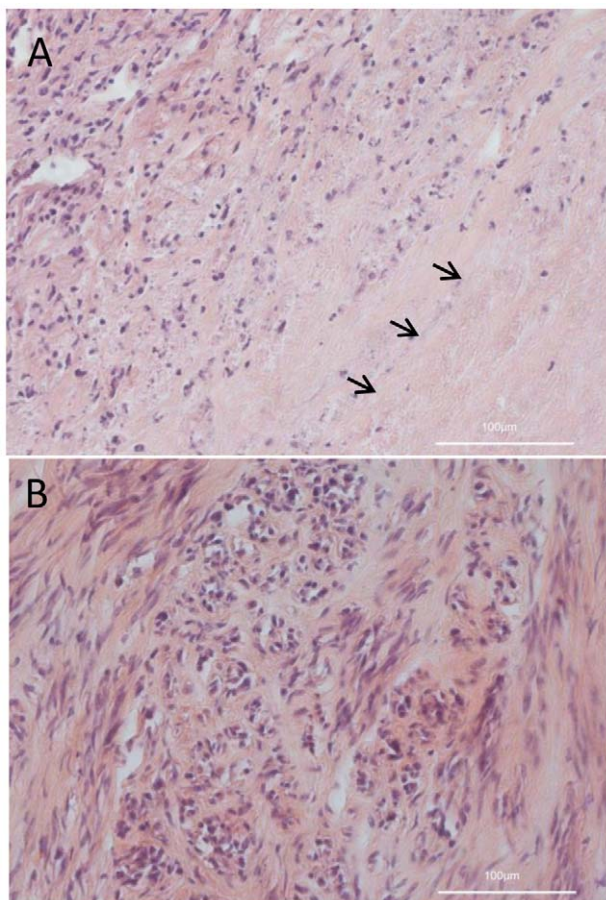


Figure 10. Histological analysis of LIVP1.1.1-infected (A) and non-infected (B) STSA-1 xenograft tumors, 21 dpvi (H&E, bars, 100 μ m). Necrotic area is marked by arrows.
doi:10.1371/journal.pone.0037239.g010

To analyze the tumorigenic potential of the new isolated cell line STSA-1, 1×10^6 cells were implanted into the right hind leg of 6- to 8-week-old female nude mice. Ninety-six percent (58 from 60) of the STSA-1-implanted mice developed a detectable tumor mass. Seven to nine weeks post implantation, most mice developed tumors with volumes of 2500 to 3000 mm³. None of these mice showed any signs of metastasis or of invasive growth pathologically. Histological analysis of the tumors revealed a population of cells with numerous signs of malignancy including mitotic figures, anisokaryosis, anisocytosis, binucleation and multinucleation (Fig. 1C). In cell culture STSA-1 cells are spindle-shaped with long extensions and do not form closed monolayers (Fig. 1D).

The data demonstrated that the STSA-1 cell line is highly tumorigenic in female nude mice and also mimicked the behavior of a soft tissue sarcoma.

Analysis of the oncolytic potential of VACV strains against canine sarcoma cells in culture

STSA-1 cells were seeded three days prior to infection in 24-well plates. Cells were then infected with either LIVP1.1.1 or GLV-1h68 at MOIs of 1.0 and 0.1, respectively. Cell viability was analyzed at 24, 48, 72 and 96 hours post-virus-infection (hpvi) by MTT-assays (Fig. 2). The data demonstrated that both VACV strains efficiently infected and destroyed cells of the canine soft tissue sarcoma line STSA-1 under cell culture conditions.

Although there was no statistically significant difference in number of viable cells between the two virus strains, these results indicated that LIVP1.1.1 virus infection led to a somewhat more efficient eradication of the canine sarcoma cells in culture compared to GLV-1h68- treatment.

Efficacy of LIVP1.1.1- and GLV-1h68-replication in STSA-1 cells

STSA-1 cells were infected with either LIVP1.1.1 or GLV-1h68 at a MOI of 0.1. Standard plaque assay was performed for all samples to determine the viral titers at different time points during the course of infection (Fig. 3). The maximum viral titers (total) of each virus were determined for LIVP1.1.1 (4.54×10^6 pfu/well) at 48 hpvi and for GLV-1h68 (2.55×10^6 pfu/well) at 72 hpvi. In addition, we found significant differences from titers of LIVP1.1.1 compared with GLV-1h68 at 24 hpvi (**P<0.001) and 48 hpvi (**P<0.01) as well as at 96 hpvi (*P<0.05).

These data demonstrated that LIVP1.1.1 can replicate more efficiently than GLV-1h68 in STSA-1 cells under these experimental conditions.

Oncolytic effect of a single systemic application of VACVs on STSA-1 xenografts

Eighteen female nude mice at an age of 6–8 weeks were implanted with 1×10^6 STSA-1 cells. Four weeks post implantation, all mice developed tumors with volumes of 400 to 500 mm³. Animals were separated into three groups (n = 6) and were injected with a single dose of GLV-1h68, LIVP1.1.1 (1×10^7 pfu in 100 µl PBS) or PBS (100 µl) intravenously (i.v.) into the lateral tail vein. Tumor size was measured twice a week. As shown in Fig. 4A, the virus treatment led to a significant difference (**P<0.001) in tumor growth between PBS controls and all virus-treated mice on 21 and 25 days post-virus-injection (dpvi). Due to excessive tumor burden (>3000 mm³), all animals of the control group were euthanized after 25 dpvi. In addition, at 42 dpvi we determined a significant difference (**P<0.01) between GLV-1h68 vs LIVP1.1.1. Moreover, two of six mice of the GLV-1h68-treated

group developed tumors with volumes greater than 3000 mm³ and had to be euthanized after 42 dpvi.

These data indicated that LIVP1.1.1 had a higher oncolytic potential than GLV-1h68 against canine soft tissue sarcoma xenografts.

To determine whether the initial tumor size at the time of virus delivery would affect the outcome of virotherapy, we started a second therapeutic experiment in which the average starting tumor volume before injection was 40% larger compared to that of the corresponding LIVP1.1.1-group in the experiment described before (see Fig. 4A). In this experimental setting, a single i.v. injection of LIVP1.1.1 into mice bearing canine soft tissue sarcoma STSA-1 xenografts led to near-complete tumor regression over a 42-day period without toxicity (Fig. 4B). These data could be evidence, that larger STSA-1-tumors (600 to 1000 mm³) are more responsive to LIVP1.1.1-treatment than smaller STSA-1-tumors under these experimental conditions.

In a third independent therapeutic experiment we analyzed the long-term survival of LIVP1.1.1-treated mice compared to PBS-treated control mice (Fig. 5). Here, the mice of the untreated group were euthanized at day 17 (n = 1) and day 24 (n = 4), due to the development of tumors with volumes greater than 3000 mm³. In the virus-treated group, two animals were found dead at 39 and 58 dpvi, respectively (no pathological changes were observed). The remaining three animals of this group were euthanized under certain criteria, 30% weight loss (n = 2; at days 48 and 98) and tumor greater volume than 3000 mm³ (n = 1; at day 105).

In summary, this experiment demonstrated that a single injection with LIVP1.1.1 vaccinia virus led to significantly longer survival (**P = 0.0039) of the treated mice compared to the non-treated animals.

Comparison of LIVP1.1.1 and GLV-1h68 distribution in tumor-bearing nude mice

In order to analyze the reason for different oncolytic effects of VACV strains in STSA-1 xenografts we first compared the virus colonization and distribution pattern of the virus strains *in vivo* at early and late time points after virus treatment. Figure 6 summarizes the virus distribution data in sarcoma tumor-bearing nude mice after i.v. injection of VACV strains at a single dose of 1×10^7 pfu per mouse. At 7 dpvi the highest viral titers were identified in primary tumors of virus-treated mice (Fig. 6A). In the tumor tissues, there was no significant difference of the virus titers between LIVP1.1.1- and GLV-1h68-injected groups. At the same time point, we also found plaque forming units in some organs of mice injected with LIVP1.1.1 but not with GLV-1h68 (Fig. 6A). Interestingly, a few GLV-1h68 virus particles were detected in liver, lung and spleen on 35 dpvi (Fig. 6B). However, we found about 10^4 – 10^5 fold more pfus of GLV-1h68 in tumors in comparison to healthy tissues (lung, spleen, skin) at this time point (Fig. 6B).

Taken together, our data clearly demonstrated that both viruses GLV-1h68 and LIVP1.1.1 display an enhanced tumor specific replication in STSA-1 xenograft mice.

Analysis of host immune response and the tumor vascularization in the early-phase (before 7 dpvi) of virus infection

For an investigation of the potential anti-tumor mechanism, we analyzed the virus interactions with cells of the host immune system in the early-phase (before 7 dpvi) of virus infection. Tumor single cell suspensions derived from infected and uninfected STSA-1 tumors were analyzed by flow cytometry for the presence

of host immune cells at 7 dpvi (Table 2). The numbers of all tested CD11b-, MHCII-, CD19-, CD45-, F4/80-, Ly6G high, CD11c- and CD49b-positive immune cells were higher in cell suspensions derived from virus-infected tumors compared to that from uninfected controls (Table 2; ratios greater than 1). In addition, at 7 dpvi approximately 0.9% of the MHCII-positive, 1.5% of the CD45-positive and 0.26% Ly6G high⁺ cells were GFP-positive in GLV-1h68-infected tumors, indicating that either these immune cells were infected with vaccinia virus or they phagocytized virus-infected tumor cells. In this experimental setting, approximately 5- and 11-fold higher numbers of Ly6G high⁺ cells (neutrophils) were found in GLV-1h68- and LIVP1.1.1-infected tumors than in uninfected tumors, respectively (Table 2).

Since, it is known that neutrophils are one of the first cell types recruited to the sites of infections [27], we used these cells as markers for monitoring of viral infection on systemic level and in the tumor tissue. A parallel flow cytometric analysis of neutrophils was performed on peripheral blood and tumor samples. As shown in Fig. 7A there was approximately 6.6–42.1 fold higher accumulation of neutrophils in the LIVP1.1.1-treated tumors compared to GLV-1h68- and PBS-treated tumors (**P = 0.0075; **P = 0.0026), respectively. The significantly increased accumulation of neutrophils in tumors did not coincide with any reduction in peripheral blood neutrophils (Fig. 7B). An additional immunohistochemical examination confirmed the increased accumulation of neutrophils in LIVP1.1.1-infected tumors as compared to GLV-1h68-infected tumors (Fig. 7C). On the other hand, in a previous experiment, there was no significant difference of the virus titers between LIVP1.1.1- and GLV-1h68-infected tumors (Fig. 6A).

To assess the impact of viral tumor colonization on the tumor vasculature, we analyzed the CD31-positive vascular network in tissue sections of the same tumors by fluorescence microscopy. In this context, CD31-labelled cross sections of control (PBS), LIVP1.1.1- and GLV-1h68-colonized tumors were used for determination of the vascular density (Fig. 8A). The data revealed that there was no significant difference in the vascular density between the three analyzed groups (Fig. 8A). In addition, fluorescence intensity of the CD31 signal of blood vessels was measured (Fig. 8B). The results revealed that the fluorescence intensity of all vessel-related pixels of both virus-infected tumors were significantly increased in comparison to PBS-injected control tumors (PBS vs. LIVP1.1.1 *** P = 0.00021; PBS vs. GLV-1h68 **P = 0.008). This means that the virus colonization led to an up-regulation of CD31 protein, which mediates transendothelial migration of immune cells to sites of infection. In this experimental setting, however, there was no significant difference between the fluorescence intensity of vessel-related pixels of LIVP1.1.1- and GLV-1h68-tumors (P = 0.0351).

Presence of virus and host immune cells in VACVs-infected and non-infected STSA-1 tumors at a late phase of infection

By immunohistochemistry we analyzed tissue sections of primary tumors of STSA-1 tumor bearing mice injected with LIVP1.1.1, GLV-1h68 or PBS at 21 dpvi (Fig. 9). There was no significant difference in viral distribution of the two different virus strains at this stage of infection (Fig. 9, panel 2, grey color). The histological data revealed also that MHC class II-expressing host cells including B cells, macrophages and dendritic cells were present in the uninfected tumors. The single injection with LIVP1.1.1 or GLV-1h68 led to similar specific intratumoral infiltration of these host cells in the tumor tissue (Fig. 9). In summary, the results suggest that the number of the MHCII-

positive immune cells in the late phase of infection is not crucial for the better oncolytic effect of LIVP1.1.1 compared to GLV-1h68 in STSA-1 xenografts.

In addition, portions of the xenograft tumor tissues were paraffin-embedded, sectioned, and stained with hematoxylin and eosin (H&E) to identify possible differences between LIVP1.1.1 virus-treated (Fig. 10A) and non-treated tumors (Fig. 10B). Indeed, the virus-treated tumors looked inflamed (mixed population of neutrophils, lymphocytes and macrophages), a significant portion of the typical streaming and bundling structure of the tumor mass was disrupted and the main part of the tumor was necrotic.

Discussion

Several oncolytic viruses including adenovirus strains CAV-1 and CAV-2 [28], canine distemper virus [29] and vaccinia virus strain GLV-1h68 [22,23] have been used for canine cancer therapy in preclinical studies [30,31]. However, in contrast to human studies, clinical trials with oncolytic viruses for canine cancer patients have not been reported.

In this study, we investigated the oncolytic efficiency of two vaccinia virus strains GLV-1h68 and LIVP1.1.1, against a new canine soft tissue sarcoma cell line in culture and in a xenograft model. The results showed that both VAVCs tested were able to effectively infect, replicate in and lyse canine soft tissue sarcoma cells in culture. In addition, our data revealed that the cell line STSA-1 is highly tumorigenic in nude mice. Local tumor growth occurred in 96% of the animals that had received 1×10^6 cells subcutaneously. Interestingly, none of the control STSA-1 xenografts showed any signs of metastasis. Because the donor had evidence of lymphatic metastasis, we conclude that time for metastasis formation exceeds the time limitation owed to local tumor growth in mice. Moreover, we observed histological similarities between xenografts in mice and the pattern of the original tumor in the dog (Fig. 1). In addition, we found same indirect evidence for metastases formation in virus-treated STSA-1 mice (see later discussion). Taken together, the described xenograft model could be extremely useful as an *in vivo* tool for preclinical studies against canine soft tissue sarcoma.

The current study also demonstrated the suitability of LIVP1.1.1 and GLV-1h68, to achieve a significant inhibition of tumor growth and damage of tumor tissues in the tumor-bearing mice when compared to PBS controls. We also found that LIVP1.1.1 had a higher oncolytic potential than GLV-1h68 in these experimental settings. To clarify the reason for these differences we investigated the mechanisms by which oncolytic viruses destroy the STSA-1 tumors under these experimental conditions. Generally, it is believed that an oncolytic vaccinia virus destroys tumors by direct viral oncolysis of tumor cells [32,33], by destruction of the tumor vasculature [34] and by induction of host antitumoral immune responses [35], or most likely, a combination of these mechanisms [18,19].

Therefore, we first analyzed the direct viral oncolysis of STSA-1 tumor cells by examination of the virus colonization and distribution pattern of the two virus strains *in vivo*. The highest viral titers were identified in primary tumors of virus-treated mice (Fig. 6) at days 7 and 35 post virus injection. However, there was no significant difference of the tumor titers between the two viruses tested. In contrast, at 7 dpvi we also detected plaque forming units in some organs of mice injected with LIVP1.1.1 only. This fact could be evidence that the LIVP1.1.1 was either less tumor-specific or more virulent in mice compared to GLV-1h68. Surprisingly, GLV-1h68 was detected in liver, lung and spleen on 35 dpvi (Fig. 6B). In this case, the later presence of GLV-1h68

in these organs might also be a mark for metastases formation. Moreover, we have demonstrated that GLV-1h68 is a highly tumor- and metastases-selective [20,36]. It could also be possible that due to leakiness of blood vessels in solid tumors, circulating virus-infected tumor cells or cell particles may end up in healthy tissues such as the lung, liver and spleen. However, the reason for presence of a few pfus of GLV-1h68 in some organs on 35 dpvi is currently unknown.

In summary, the differences of virus distribution after injection with GLV-1h68 or LIVP1.1.1 in STSA-1 xenografts alone could not satisfactorily explain the different oncolytic effects of these strains.

Our survival experiment revealed a significantly longer survival ($P = 0.0039$) of the LIVP1.1.1-treated mice compared to the PBS-treated animals. For a potential optimization of our therapeutic protocol for canine patients, an additional virus injection or combination with standard anti-cancer therapies such as chemotherapy, like demonstrated by [18,37], are currently under investigation.

To identify other factors responsible for better oncolytic effects of LIVP1.1.1 in STSA-1 xenografts, we investigated the virus interactions with the components of the tumor microenvironment, such as tumor vasculature and the cells of the host immune system. The tumor vasculature is an important part of the tumor microenvironment supporting tumor growth by delivery of nutrients, oxygen and immune cells. Therefore, the destruction of the vascular network in tumors may be a potential therapeutic strategy for cancer therapy. In the STSA-1 xenografts model, the vascular density of tumors was not significantly changed between the GLV-1h68, LIVP1.1.1 and PBS (control) groups at 7 dpvi (Fig. 8A). In contrast, significantly increased CD31 expression in the tumor vasculature was observed at the same day after virus infection with LIVP1.1.1 and GLV-1h68 (Fig. 8B). The activated endothelium that is characterized by vascular hyperpermeability could also be one additional reason for significantly increased accumulation of host immune cells in these virus-injected tumors compared to control PBS-tumors. A similar effect on tumor vasculature was found in human breast tumor xenografts upon colonization with GLV-1h68 [32].

In the last part of our study, we investigated the virus interactions with the cells of host immune system. In this context, we analyzed the immunological host response in the early-phase (7 dpvi) of virus infection. Our flow cytometry data demonstrated a specific intratumoral infiltration of host immune cells and especially neutrophils (Ly6G high positive cells) in virus-injected STSA-1 mice after 7 dpvi (Table 2). In order to confirm these data, we have analyzed in parallel the distribution of neutrophils in tumors and peripheral blood of virus-infected and uninfected STSA-1 xenografts (Fig. 7). These experiments again revealed significantly enhanced numbers of neutrophils in tumors of virus-injected mice but not in the peripheral blood at 7 dpvi (Fig. 7). In addition, the number of neutrophils in LIVP1.1.1 infected tumors was significantly higher than that in GLV-1h68 tumors. On the basis of these data, we assume that the stronger anti-tumor effect of LIVP1.1.1 in comparison to GLV-1h68 could be dependent on the increased number of neutrophils in the tumor bed. Several other groups have reported that virotherapy induces massive tumoral infiltration of neutrophils, which may be part of virotherapy-mediated antitumor mechanism [34,38]. In this context, Breitbach and colleagues postulated that massive neutrophil activation followed by vascular damage and apoptosis of uninfected tumor cells one day after infection are the main cause of tumor cell destruction [34]. However, it is known, that the tumor-associated neutrophils (TANs)

may be associated with both pro- and anti-tumoral activities (for reviews, see [27,39]). Recently, after a SM16 therapy, Fridlender and colleagues have identified two different populations (N1 and N2) of TANs, typical TANs (N2) that promote tumor growth and cytotoxic TANs (N1) capable of killing tumor cells [40]. In our STSA-1 model, the significantly enhanced intratumoral accumulation of neutrophils was not associated with significantly reduced vascular density in primary tumors. In these experimental settings, we found evidence for direct interactions between vaccinia virus or virus-infected cells and neutrophils in the tumor tissue (Table 2; GFP-positive cells). Therefore we speculated that high number of the virus-activated neutrophils (“N1-like”) could be cytotoxic in the tumor by providing of free oxygen radicals and proteinases in greater concentrations than typical non-activated TANs. This could be also an explanation for the better oncolytic effect of LIVP1.1.1 strain.

Taken together, however, the anti-tumor effect of virus-activated neutrophils in the virotherapy could be dependent on type and origin of tumors, stage of tumor development, virus strain or host studied, but finally on the balance between antiviral and antitumoral immune responses.

Our findings suggest that the virotherapy-mediated anti-tumor mechanism in STSA-1 xenografts could be a combination of the direct viral oncolysis of tumor cells and the virus-dependent activation of tumor-associated host immune cells, mainly neutrophils.

In summary, therapy with the vaccinia strains and especial LIVP1.1.1 demonstrated outstanding anti-tumor activity in canine soft tissue sarcoma cells and in the STSA-1 xenograft model. Therefore we propose that the LIVP1.1.1 vaccinia virus strain may be useful for the treatment of spontaneous soft-tissue sarcomas in dogs.

Supporting Information

Figure S1 Cytocentrifuged STSA-1 cells magnification $\times 500$. (A) Wright-Giemsa stain, (B) vimentin, (C) ALP activity, (D) CD18, (E) cytokeratin. Brown coloration is indicative of positive staining. Negatively staining samples were counterstained with Wright-Giemsa stain to visualize cells. All positive and negative controls stained adequately (data not shown). (TIF)

Figure S2 Short tandem repeat (STR) analysis of STSA-1 cells. The validation of the cell line was performed as recently described [25]. The STK kit (StockMarks for Dogs: Canine Genotyping Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA) tested 10 different loci (A): PEZ 1, FHC 2054, FHC 2010; (B) PEZ 5, PEZ 20; PEZ 12; (C) PEZ 3, PEZ 6, PEZ 8, FHC 2079. The observed allele sizes were typical for canine cells. (TIF)

Acknowledgments

We thank Mrs. J. Langbein, Mr. Jason Aguilar, Mr. Terry Trevino, and Mrs. Irina Smirnov for technical support and Dr. Z. Sokolovic for critical reading of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: IG MA RJ SR SW AM JS AAS. Performed the experiments: IG MA RJ SR KE UD AM JS. Analyzed the data: IG MA SW NGC DT MH UD AM JS AAS. Contributed reagents/materials/analysis tools: NGC YAY QZ AM. Wrote the paper: IG AM AAS.

References

- Liptak JM, Forrest FL (2007) Soft tissue sarcomas. , SJ InWithrow, DM Vail, eds. editors. Small Animal Clinical Oncology. St Louis, MO: Sanders Elsevier. pp 425–454.
- Forrest LJ, Chun R, Adams WM, Cooley AJ, Vail DM (2000) Postoperative radiotherapy for canine soft tissue sarcoma. *J Vet Intern Med* 14: 578–582.
- Dobson JM, Samuel S, Milstein H, Rogers K, Wood JL (2002) Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J Small Anim Pract* 43: 240–246.
- Dorn ER (1976) Epidemiology of canine and feline tumors. *J Am Anim Hosp Assoc* 12: 307–312.
- Theilen GH MB, ed (1979) Tumors of skin and subcutaneous tissues. : Philadelphia: Lea & Febiger.
- Dennis MM, McSparran KD, Bacon NJ, Schulman FY, Foster RA, et al. (2011) Prognostic factors for cutaneous and subcutaneous soft tissue sarcomas in dogs. *Vet Pathol* 48: 73–84.
- Thrall DE, Gillette EL (1995) Soft-tissue sarcomas. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 10: 173–179.
- Trojani M, Contesso G, Coindre JM, Rouesse J, Bui NB, et al. (1984) Soft-tissue sarcomas of adults; study of pathological prognostic variables and definition of a histopathological grading system. *Int J Cancer* 33: 37–42.
- Kuntz CA, Dernel WS, Powers BE, Devitt C, Straw RC, et al. (1997) Prognostic factors for surgical treatment of soft-tissue sarcomas in dogs: 75 cases (1986–1996). *J Am Vet Med Assoc* 211: 1147–1151.
- McSparran KD (2009) Histologic grade predicts recurrence for marginally excised canine subcutaneous soft tissue sarcomas. *Vet Pathol* 46: 928–933.
- McKnight JA, Mauldin GN, McEntee MC, Meleo KA, Patnaik AK (2000) Radiation treatment for incompletely resected soft-tissue sarcomas in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 217: 205–210.
- Garber K (2006) China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 98: 298–300.
- Zhang Q, Yu YA, Wang E, Chen N, Danner RL, et al. (2007) Eradication of solid human breast tumors in nude mice with an intravenously injected light-emitting oncolytic vaccinia virus. *Cancer Res* 67: 10038–10046.
- Zhang Q, Liang C, Yu YA, Chen N, Dandekar T, et al. (2009) The highly attenuated oncolytic recombinant vaccinia virus GLV-1h68: comparative genomic features and the contribution of F14.5L inactivation. *Mol Genet Genomics* 282: 417–435.
- Lin SF, Yu Z, Riedl C, Woo Y, Zhang Q, et al. (2007) Treatment of anaplastic thyroid carcinoma in vitro with a mutant vaccinia virus. *Surgery* 142: 976–983; discussion 976–983.
- Lin SF, Price DL, Chen CH, Brader P, Li S, et al. (2008) Oncolytic vaccinia virotherapy of anaplastic thyroid cancer in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 4403–4407.
- Kelly KJ, Woo Y, Brader P, Yu Z, Riedl C, et al. (2008) Novel oncolytic agent GLV-1h68 is effective against malignant pleural mesothelioma. *Hum Gene Ther* 19: 774–782.
- Yu YA, Galanis C, Woo Y, Chen N, Zhang Q, et al. (2009) Regression of human pancreatic tumor xenografts in mice after a single systemic injection of recombinant vaccinia virus GLV-1h68. *Mol Cancer Ther* 8: 141–151.
- Gentschev I, Muller M, Adelfinger M, Weibel S, Grummt F, et al. (2011) Efficient colonization and therapy of human hepatocellular carcinoma (HCC) using the oncolytic vaccinia virus strain GLV-1h68. *PLoS One* 6: e22069.
- Gentschev I, Donat U, Hofmann E, Weibel S, Adelfinger M, et al. (2010) Regression of human prostate tumors and metastases in nude mice following treatment with the recombinant oncolytic vaccinia virus GLV-1h68. *J Biomed Biotechnol* 2010: 489759. 489759 p.
- Yu Z, Li S, Brader P, Chen N, Yu YA, et al. (2009) Oncolytic vaccinia viral therapy of squamous cell carcinoma. *Mol Cancer* 8: 45.
- Gentschev I, Stritzker J, Hofmann E, Weibel S, Yu YA, et al. (2009) Use of an oncolytic vaccinia virus for the treatment of canine breast cancer in nude mice: preclinical development of a therapeutic agent. *Cancer Gene Ther* 16: 320–328.
- Gentschev I, Ehrig K, Donat U, Hess M, Rudolph S, et al. (2010) Significant Growth Inhibition of Canine Mammary Carcinoma Xenografts following Treatment with Oncolytic Vaccinia Virus GLV-1h68. *J Oncol* 2010: 736907. 736907 p.
- Snyder SA, Linder K, Hedan B, Hauck ML (2011) Establishment and characterization of a canine soft tissue sarcoma cell line. *Vet Pathol* 48: 482–485.
- O'Donoghue LE, Rivest JR, Duval RL (2011) Polymerase chain reaction-based species verification and microsatellite analysis for canine cell line validation. *J Vet Diagn Invest* 23: 780–785.
- Weibel S, Stritzker J, Eck M, Goebel W, Szalay AA (2008) Colonization of experimental murine breast tumours by *Escherichia coli* K-12 significantly alters the tumour microenvironment. *Cell Microbiol* 10: 1235–1248.
- Nathan C (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6: 173–182.
- Hemminki A, Kanerva A, Kremer EJ, Bauerschmitz GJ, Smith BF, et al. (2003) A canine conditionally replicating adenovirus for evaluating oncolytic virotherapy in a syngeneic animal model. *Mol Ther* 7: 163–173.
- Suter SE, Chein MB, von Messling V, Yip B, Cattaneo R, et al. (2005) In vitro canine distemper virus infection of canine lymphoid cells: a prelude to oncolytic therapy for lymphoma. *Clin Cancer Res* 11: 1579–1587.
- Arendt M, Nasir L, Morgan IM (2009) Oncolytic gene therapy for canine cancers: teaching old dog viruses new tricks. *Vet Comp Oncol* 7: 153–161.
- Patil SS, Gentschev I, Nolte I, Ogilvie G, Szalay AA (2012) Oncolytic virotherapy in veterinary medicine: current status and future prospects for canine patients. *J Transl Med* 10: 3.
- Weibel S, Raab V, Yu YA, Worschech A, Wang E, et al. (2011) Viral-mediated oncolysis is the most critical factor in the late-phase of the tumor regression process upon vaccinia virus infection. *BMC Cancer* 11: 68.
- Chen NG, Yu YA, Zhang Q, Szalay AA (2011) Replication efficiency of oncolytic vaccinia virus in cell cultures prognosticates the virulence and antitumor efficacy in mice. *J Transl Med* 9: 164.
- Breitbach CJ, Paterson JM, Lemay CG, Falls TJ, McGuire A, et al. (2007) Targeted inflammation during oncolytic virus therapy severely compromises tumor blood flow. *Mol Ther* 15: 1686–1693.
- Prestwich RJ, Errington F, Diaz RM, Pandha HS, Harrington KJ, et al. (2009) The case of oncolytic viruses versus the immune system: waiting on the judgment of Solomon. *Hum Gene Ther* 20: 1119–1132.
- Kelly KJ, Brader P, Woo Y, Li S, Chen N, et al. (2009) Real-time intraoperative detection of melanoma lymph node metastases using recombinant vaccinia virus GLV-1h68 in an immunocompetent animal model. *Int J Cancer* 124: 911–918.
- Seubert CM, Stritzker J, Hess M, Donat U, Sturm JB, et al. (2011) Enhanced tumor therapy using vaccinia virus strain GLV-1h68 in combination with a beta-galactosidase-activatable prodrug seco-analog of duocarmycin SA. *Cancer Gene Ther* 18: 42–52.
- Gil M, Bieniasz M, Seshadri M, Fisher D, Ciesielski MJ, et al. (2011) Photodynamic therapy augments the efficacy of oncolytic vaccinia virus against primary and metastatic tumours in mice. *Br J Cancer* 105: 1512–1521.
- Gregory AD, Houghton AM (2011) Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res* 71: 2411–2416.
- Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, et al. (2009) Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* 16: 183–194.

4.5 Characterization and evaluation of a new oncolytic Vaccinia Virus strain LIVP6.1.1 for canine cancer therapy

Characterization and evaluation of a new oncolytic Vaccinia Virus isolate LIVP6.1.1 for canine cancer therapy

Ivaylo Gentshev^{1,2,§}, Sandeep Patil^{2,§}, Marion Adelfinger^{2,§}, Stephanie Weibel², Ulrike Geissinger¹, Alexa Frentzen¹, Nanhai G. Chen^{1,3}, Yong A. Yu^{1,3}, Qian Zhang^{1,3}, Gregory Ogilvie^{3,4} and Aladar A. Szalay^{1,2,3,5,6*}

¹ Genelux Corporation, San Diego Science Center, San Diego, California, USA

² Department of Biochemistry, University of Wuerzburg, D-97074 Wuerzburg, Germany

³ Department of Radiation Oncology, Rebecca & John Moors Comprehensive Cancer, University of California, San Diego, La Jolla, CA 92093, USA

⁴ Angel Care Cancer Center, California Veterinary Specialists, Carlsbad, CA, 92008, USA

⁵ Rudolf Virchow Center for Experimental Biomedicine, University of Wuerzburg, D-97078 Wuerzburg, Germany

⁶ Institute for Molecular Infection Biology, University of Wuerzburg, D-97078 Wuerzburg, Germany

§ Authors contributed equally.

Characterization and evaluation of a new oncolytic Vaccinia Virus strain LIVP6.1.1 for canine cancer therapy

Implantation of tumor cells, infection of the animals, design, measurements and analysis of the flow cytometric experiments were performed by Marion Adelfinger with help and supervision of the following co-authors to the manuscript:

Dr. I. Gentshev designed the study helped with the flow cytometric experiments, analyzed the data and wrote the paper.

S. Patil designed the study, helped with the flow cytometric experiments and performed cell culture and *in vivo* mouse experiments.

Dr. S. Weibel helped to analyze the immunohistochemistry.




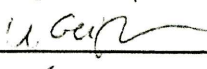



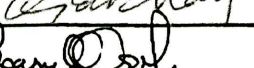

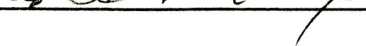
Dr. U. Geissinger and Dr. A. Frentzen analyzed the cell viability for CHAS and D17 cells.

Dr. N. Chen, Dr. Y. A. Yu and Dr. Q. Zhang generated and provided the viral constructs.

Dr. G. Ogilvie provided the canine cell line CHAS.

Prof. Dr. A. A. Szalay supervised and designed the study, analyzed the data and helped to write the paper.

Ms. M. Adelfinger is a graduate student in Dr. Szalay's laboratory in the Department of Biochemistry, University of Würzburg, Germany and is supported by a graduate stipend from Genelux Corporation.

Dr. I. Gentshev	
S. Patil	
Dr. S. Weibel	
Dr. U. Geissinger	
Dr. A. Frentzen	
Dr. N. Chen	
Dr. Y. A. Yu	
Dr. Q. Zhang	
Dr. G. Ogilvie	
Prof. Dr. A. A. Szalay	

Characterization and evaluation of a new oncolytic Vaccinia Virus strain LIVP6.1.1 for canine cancer therapy

Ivaylo Gentshev,^{1,2,†} Sandeep S. Patil,^{2,†} Marion Adelfinger,^{2,†} Stephanie Weibel,² Ulrike Geissinger,¹ Alexa Frentzen,¹ Nanhai G. Chen,^{1,3} Yong A. Yu,^{1,3} Qian Zhang,^{1,3} Gregory Ogilvie^{3,4} and Aladar A. Szalay^{1,2,3,5,6,*}

¹Genelux Corporation; San Diego Science Center; San Diego, CA USA; ²Department of Biochemistry; University of Wuerzburg; Wuerzburg, Germany; ³Department of Radiation Oncology; Rebecca and John Moores Comprehensive Cancer; University of California; San Diego, La Jolla, CA USA; ⁴Angel Care Cancer Center; California Veterinary Specialists; Carlsbad, CA USA; ⁵Rudolf Virchow Center for Experimental Biomedicine; University of Wuerzburg; Wuerzburg, Germany; ⁶Institute for Molecular Infection Biology; University of Wuerzburg; Wuerzburg, Germany

†These authors contributed equally to this work.

Keywords: cancer, canine cancer therapy, oncolytic virus, oncolysis, canine xenografts

Abbreviations: ATCC, American Type Culture Collection; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; FBS, Fetal Bovine Serum; hpvi, hours post-virus-infection; IACUC, Institutional Animal Care and Use Committee; LIVP, a Lister strain of vaccinia virus; MDSCs, Myeloid-derived suppressor cells; MOI, Multiplicity of Infection; ORF, Open Reading Frame; OV, oncolytic virus; pfu, plaque-forming unit; *tk*, thymidine kinase; VACV, vaccinia virus; XTT, 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2*H*-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt

Virotherapy on the basis of oncolytic vaccinia virus (VACV) strains is one novel approach for canine cancer therapy. In this study we described for the first time the characterization and the use of new VACV strain LIVP6.1.1 as an oncolytic agent against canine cancer in a panel of four canine cancer cell lines including: soft tissue sarcoma (STSA-1), melanoma (CHAS), osteosarcoma (D-17) and prostate carcinoma (DT08/40). Cell culture data demonstrated that LIVP6.1.1 efficiently infected and destroyed all four tested canine cancer cell lines. In two different xenograft models on the basis of the canine soft tissue sarcoma STSA-1 and the prostate carcinoma DT08/40 cell lines, a systemic administration of the LIVP6.1.1 virus was found to be safe and led to anti-tumor and immunological effects resulting in the significant reduction of tumor growth in comparison to untreated control mice.

In summary, the pre-clinical evaluation has demonstrated the efficacy of LIVP6.1.1 for canine cancer therapy. Furthermore, a clinical trial with canine cancer patients has already been started.

Introduction

Cancer is the most common cause of natural death in dogs and endemic in both developed and developing countries (<http://www.wearethecure.org/>). Incidence of cancer ranges from 1 to 2% in the canine population and currently accounts for about half of the deaths in dogs older than 10 years.^{1,2} The major treatment options for canine cancers include surgery, radiation therapy, chemotherapy, hyperthermia and photodynamic therapy. Despite progress in the diagnosis and treatment of advanced canine cancer, overall treatment outcome has not substantially improved in the past. Therefore, the development of new therapies for advanced canine cancer is a high priority. One of the most promising novel cancer therapies is oncolytic virotherapy. This method is based on the capacity of oncolytic viruses (OVs) to preferentially infect and lyse cancer cells without

causing excessive damage to surrounding normal tissue. Several oncolytic viruses including various human and canine adenoviruses,³⁻⁵ canine distemper virus⁶ and vaccinia virus strains, namely GLV-1h68, LIVP1.1.1⁷⁻⁹ and GLV-1h109¹⁰ have been successfully tested for canine cancer therapy in preclinical settings (for reviews see refs. 11 and 12). However, in contrast to human studies, the clinical trials with oncolytic viruses for canine cancer patients are just at the beginning.

In this study, we have analyzed the oncolytic potential of a new vaccinia virus strain LIVP6.1.1 against different canine cancer cells in cell culture and analyzed the therapeutic effect against canine soft tissue sarcoma and prostate carcinoma in xenograft models. LIVP6.1.1 was isolated from a wild type stock of Lister strain of vaccinia virus (Lister strain, Institute of Viral Preparations, Moscow, Russia) and represents a "native" virus (no genetic manipulations were conducted). The sequence analysis

*Correspondence to: Aladar A. Szalay; Email: aaszalay@genelux.com
Submitted: 09/11/12; Revised: 10/04/12; Accepted: 10/04/12
<http://dx.doi.org/10.4161/bioe.22462>

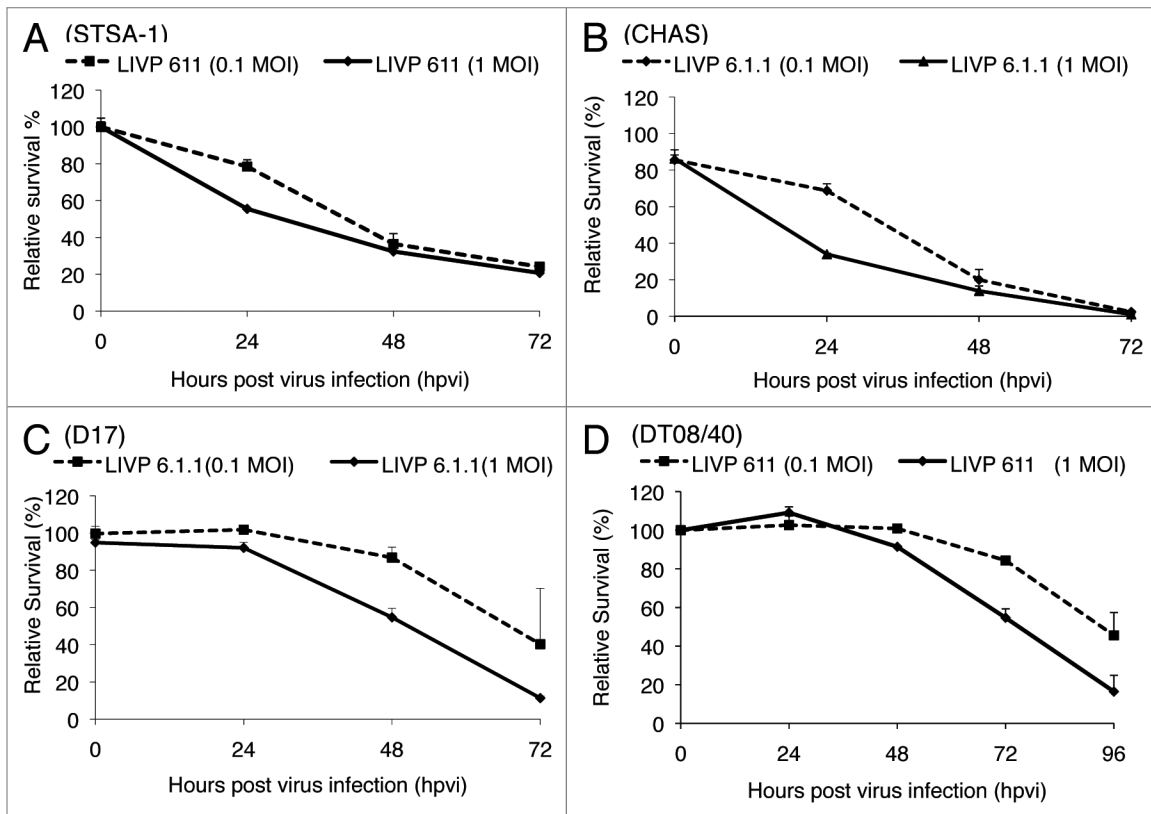


Figure 1. Viability of soft tissue sarcoma STSA-1 (A), melanoma CHAS (B), osteosarcoma D17 (C) and prostate carcinoma DT08/40 (D) cells after LIVP6.1.1 infection at MOIs of 1.0 and 0.1. Viable cells after infections with LIVP6.1.1 virus at MOIs of 0.1 and 1.0 were detected using a XTT assay (Cell Proliferation Kit II, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) (Sigma, Taufkirchen, Germany). Mean values (n = 3) and standard deviations are shown as percentages of respective controls. The data represent three independent experiments.

revealed that the thymidine kinase (*tk*) gene of LIVP6.1.1 was broken into two ORFs and different mutations compared with GLV-1h68 are present (Chen et al. manuscript in preparation). In addition, we have selected LIVP6.1.1 for this study, since it was less virulent compared with other Lister strain isolates (Chen et al. manuscript in preparation).

Here, we analyzed the oncolytic effects of LIVP6.1.1 in a panel of four different canine cancer cell lines and in canine soft tissue sarcoma and prostate carcinoma xenografts in nude mice.

Results and Discussion

Analysis of the oncolytic potential of LIVP6.1.1 virus against different canine cancer cell lines. The oncolytic effect of LIVP6.1.1 against a panel of four different canine cancer cell lines including soft tissue sarcoma STSA-1, melanoma CHAS, osteosarcoma D17 and prostate carcinoma DT08/40 cells, was examined. For this purpose, the cells were seeded three days prior to infection in 24-well plates and then were infected with LIVP6.1.1 at multiplicities of infection (MOIs) of 1.0 and 0.1. The cell viability was analyzed at 24, 48 and 72 h post-virus-infection (hpvi) by XTT-assays (Fig. 1). At MOI of 1.0, the LIVP6.1.1 virus was highly cytotoxic to three cell lines (STSA-1, D17 and CHAS), resulting in at least 83% cytotoxicity over 3 d. One day later similar cytotoxicity was also observed for LIVP6.1.1-infected DT08/40 cells.

These results indicated that the LIVP6.1.1 virus infection led to efficient killing of all four canine cancer cell lines in these experimental settings.

Efficiency of LIVP6.1.1-replication in STSA-1 and DT08/40 canine cancer cells. The oncolytic potential of OVIs is dependent on their ability to efficiently infect and replicate in cancer cells. In order to test the efficiency of virus replication, STSA-1 and DT08/40 cells were infected with either LIVP6.1.1 or GLV-1h68 at an MOI of 0.1. In these experimental setting GLV-1h68 was used as a control. Standard plaque assays were performed for all samples to determine the viral titers at different time points during the course of infection (Fig. 2A and B). Efficient LIVP6.1.1 viral replication (> 100-fold titer increase at 48 or 96 hpvi) was observed in both cell lines. The maximum viral titers were determined for LIVP6.1.1 (5.34×10^6 pfu/well) and for GLV-1h68 (2.98×10^6 pfu/well) in STSA-1 at 48 hpvi (Fig. 2A). Interestingly, the highest virus titers in virus-infected DT08/40 cells were identified for LIVP6.1.1 (8.24×10^6 pfu/well) and for GLV-1h68 (1.53×10^6 pfu/well) at 96 hpvi (Fig. 2B).

These data demonstrated that the virus replication efficiency is dependent on the infection time point and tumor types. Under these experimental conditions, LIVP6.1.1 can replicate more efficiently than GLV-1h68 in both cancer cell lines.

Oncolytic effect of a single systemic application of LIVP6.1.1 on STSA-1 and DT08/40 cell xenografts. In this

study the therapeutic effect of LIPV6.1.1 on the progression of soft tissue sarcoma STSA-1 subcutaneous xenografts was evaluated in vivo by measuring tumor volumes at various time points. Tumors were generated by implanting 1×10^6 STSA-1 canine soft tissue sarcoma cells subcutaneously into the right hind leg of 6- to 8-week-old female nude mice (NCI/Hsd/Athymic Nude-*Foxn1*tm). Five weeks post implantation, all mice developed tumors with volumes of 600 to 1000 mm³. We have chosen mice with larger tumors for virus injection since this late stage of the tumor development is more representative and interesting for the clinical praxis. Animals were separated into two groups (n = 6/group) and were injected either with a single dose of LIPV6.1.1 (5×10^6 pfu) or PBS intravenously into the lateral tail vein. As shown in Figure 3A, the virus treatment led to a significant decrease in STSA-1 tumor growth in all virus-treated mice compared with PBS control mice. Due to excessive tumor burden (> 3000 mm³), all animals in the control PBS group were euthanized after 14 dpi.

The therapeutic effect of LIPV6.1.1 was also evaluated on the progression of the slow growing canine prostate carcinoma DT08/40 tumors in nude mice by measuring the tumor volume at various time points. Data demonstrated again that a single injection with LIPV6.1.1 vaccinia virus led to significant inhibition of the tumor growth (*p < 0.05) of all virus-treated mice compared with the control PBS animals on 35, 42 and 49 dpvi (Fig. 3B).

Finally, the toxicity of the LIPV6.1.1 virus was determined by monitoring the relative weight change of mice over time (Fig. 3C and D). All LIPV6.1.1 treated mice showed relatively stable mean weight over the course of studies. There were no signs of virus-mediated toxicity.

In summary, therapy with the vaccinia strain LIPV6.1.1 demonstrated anti-tumor activity in canine soft tissue sarcoma and canine prostate xenograft models. Therefore we propose that vaccinia virus strain LIPV6.1.1 may be useful for the treatment of these cancer types in dogs.

Biodistribution and persistence of LIPV6.1.1 in STSA-1 tumor-bearing nude mice. At late time points after virus treatment, we analyzed the virus distribution and persistence in LIPV6.1.1-treated STSA-1 xenografted mice. Table 1 summarizes the virus distribution data at 35 dpvi. In all virus-treated mice the highest viral titers were identified in primary tumors. In addition, low copies of LIPV6.1.1 virus particles were also detected in liver, lung, spleen and kidney of the treated animals (Table 1). The later presence of LIPV6.1.1 in these organs could be due to leakiness of blood vessels in solid tumors, circulating virus-infected tumor cells or cell particles may end up in healthy tissues such as the lung, liver, spleen and kidney. However, LIPV6.1.1 seems to be tumor-selective, as we found about 10^4 – 10^5 fold more virus particles in solid tumors compared with healthy tissues of the treated animals.

The virus biodistribution in the primary STSA-1 tumors was also analyzed by immunohistochemical staining at 35 dpvi (Fig. 4). The data revealed that the tumors in all treated mice were completely infected with vaccinia virus, which led to oncolysis and destruction of tumor tissues.

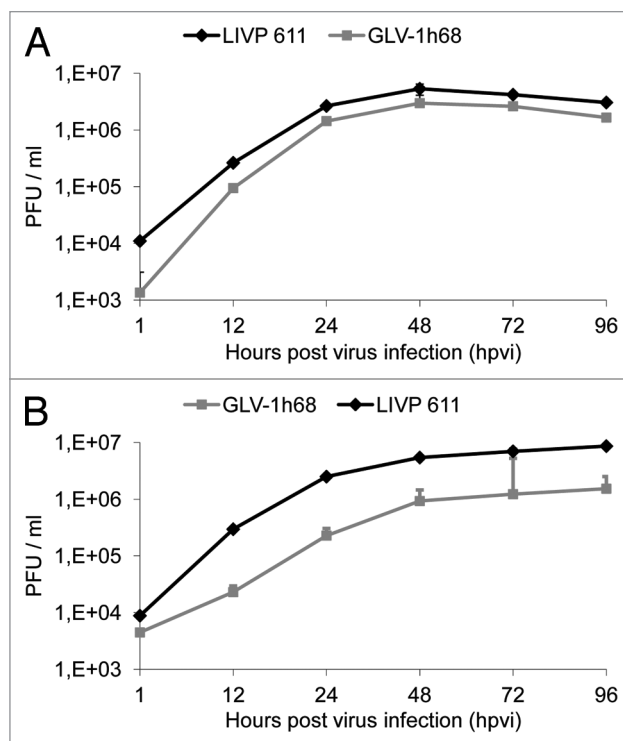


Figure 2. Replication capacity of the vaccinia virus strains LIPV6.1.1 and GLV-1h68 in different canine cancer cells. For the viral replication assay, STSA-1 (A) and DT08/40 (B) cells grown in 24-well plates were infected with either LIPV6.1.1 or GLV-1h68 at an MOI of 0.1. Cells and supernatants were collected for the determination of virus titers at various time points. Viral titers were determined as pfu per ml in triplicates by standard plaque assay in CV-1 cell monolayers. Averages plus standard deviation are plotted. The data represent three independent experiments.

Increased presence of immune cells in tumors of STSA-1 xenografted mice after LIPV6.1.1 treatment. To investigate the immunological aspect of oncolytic therapy, we have analyzed the effect of virus infection on host immune cells in tumors of STSA1-tumor-bearing mice. Our flow cytometry data demonstrated a significant increase of Gr-1^{high}CD11b⁺ (MDSCs, granulocytes), Gr-1^{int}CD11b⁺ (MDSCs, monocytes), F4/80⁺CD45⁺ (macrophages) and MHCII⁺CD45⁺ cells in the LIPV6.1.1 infected tumors compared with PBS-treated tumors (Table 2). In addition, we used the Gr-1^{high}CD11b⁺ cells as markers for monitoring viral infection on a systemic level. For this purpose, a parallel flow cytometric analysis of Gr-1^{high}CD11b⁺ cells in the peripheral blood was performed. There was no significant difference in the number of Gr-1^{high}CD11b⁺ cells in the peripheral blood between virus and PBS-treated STSA-1 xenografted mice (Table 2). These data suggest that the changes in granulocytic MDSCs were not systemic, but rather due to a change in recruitment and/or persistence within virus treated tumors.

On the basis of these data, we assume that the strong anti-tumor effect of LIPV6.1.1 in STSA-1 tumor bearing mice could be at least in part dependent on the increased number of these host immune cells in the tumor bed. Moreover, we and others have reported that virotherapy induces massive tumoral infiltration of

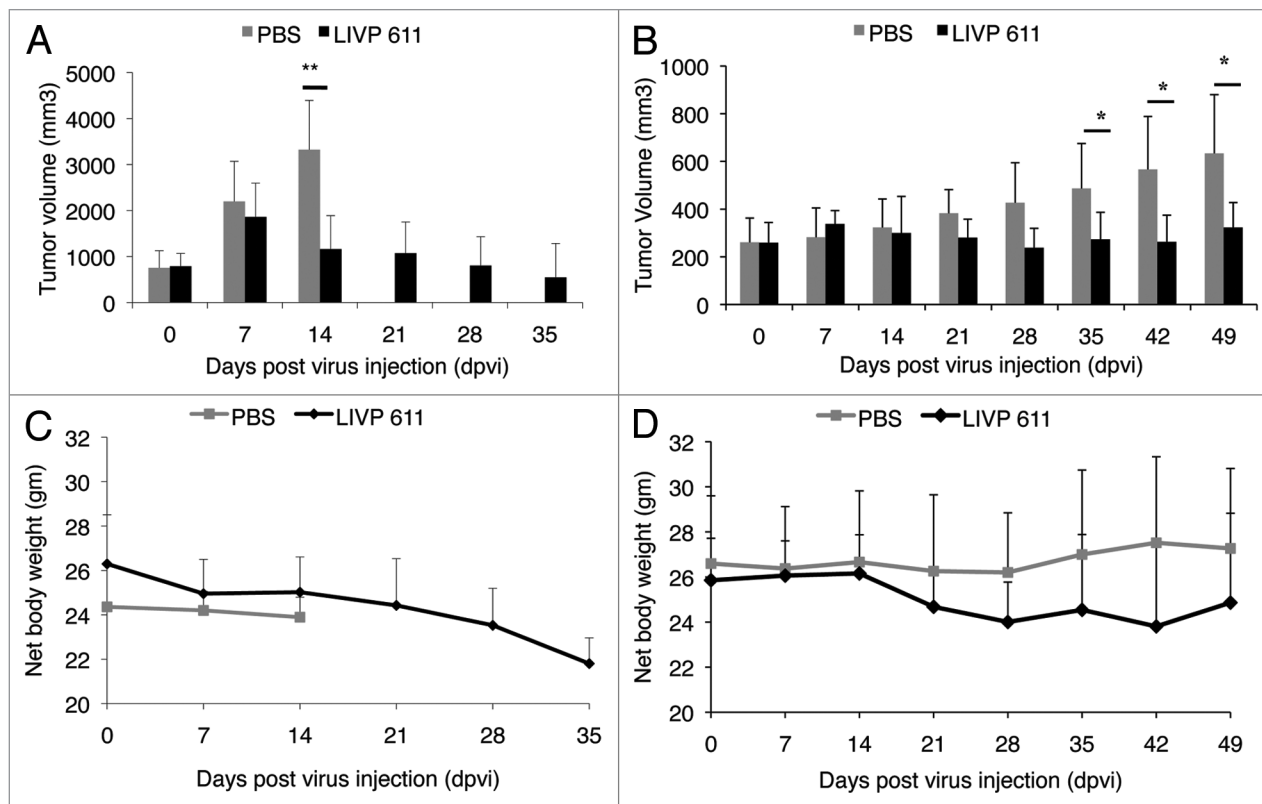


Figure 3. Effects of systemic LIVP6.1 virus injection on tumor growth (A, B) and the body weights (C, D) of STSA-1 or DT08/40 xenografted mice. Two groups each of (A, C) STSA-1 tumor-bearing nude mice (n = 6) and (B, D) DT08/40 tumor bearing mice (n = 6) were either treated with a single dose of 5×10^6 pfu LIVP6.1.1 or with PBS (mock control) intravenously (iv). The statistical significance was confirmed by Student's t-test where * and ** indicate $p < 0.05$ and 0.01 respectively.

Table 1. Biodistribution of LIVP6.1.1 in virus-treated STSA-1 xenografted mice at 35 d post virus injection (dpvi)

PFU/ per gram (g) of organ or tumor tissue	STSA-1 xenografted mice treated with 5×10^6 pfu LIVP6.1.1			
	Mouse No	301	302	304
Tumor		2.75E + 07	3.58E + 07	3.76E + 07
Lung		1.14E + 02	4.40E + 02	1.42E + 02
Liver		4.0E + 01	5.33E + 01	1.0E + 02
Spleen		7.0E + 01	3.33E + 01	1.25E + 02
Kidney		2.50E + 02	1.46E + 02	1.06E + 03

The virus titers were determined by standard plaque assays on CV-1 cells using aliquots of the homogenized organs and were displayed as mean pfu/per gram of organ or tissue. For each organ, two aliquots of 0.1ml were measured in triplicates. nd, not detected (detection LIMIT > 10 pfu/organ).

MDSCs resembling neutrophils and macrophages, which may be part of virotherapy-mediated antitumor mechanism.¹³⁻¹⁵

Taken together, therapy with the vaccinia strain LIVP6.1.1 demonstrated outstanding anti-tumor activity in several canine cancer cell lines and in two xenograft models. Our findings suggest that virotherapy-mediated anti-tumor mechanism in STSA-1 xenografts could be a combination of the direct viral oncolysis of

tumor cells and the virus-dependent infiltration of tumor-associated host immune cells.

In conclusion, we propose that the LIVP6.1.1 vaccinia virus strain may be useful for the treatment of canine cancer patients. First clinical trial with this virus has already started.

Materials and Methods

Ethics statement. All animal experiments were performed in accordance with protocols approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of Explora Biolabs (San Diego, CA, USA; protocol number: EB11-025) and/or the government of Unterfranken, Germany (permit number: 55.2-2531.01-17/08 and 55.2-2531.01-24/12).

Cell culture. African green monkey kidney fibroblasts (CV-1) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). STSA-1 cells were derived from a canine patient with a low grade II soft tissue sarcoma.¹⁵ DT08/40 was diagnosed as canine prostate carcinoma.¹⁶ The canine melanoma CHAS cell line was provided by Dr. Ogilvie (Angel Care Cancer Center, Carlsbad, USA), and canine osteosarcoma D17 was obtained from ATCC.

Cells were cultured in DMEM supplemented with antibiotic-solution (100 U/ml penicillin G, 100 units/ml streptomycin) and 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen GmbH) for CV-1

and 20% FBS for D17 and DT08/40 at 37°C under 5% CO₂.

STSA-1 cells were cultivated in minimum essential medium (MEM) with Earle's salts supplemented with 2 mM glutamine, 50 U/mL penicillin G, 50 µg/mL streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM nonessential amino acids (MEM-C) and 10% FBS.

CHAS cells were cultured in DMEM/F-12 50/50 media (Cellgro) supplemented with antibiotic-solution, HuMEC supplement (Gibco) and 10% FBS (Cellgro), at 37°C under 5% CO₂.

Virus strains. Vaccinia virus strain LIVP6.1.1 was derived from LIVP (Lister strain, Institute of Viral Preparations, Moscow, Russia). The sequence analysis of LIVP6.1.1 revealed the presence of different mutations in several genes (Chen et al., manuscript in preparation). In addition, LIVP6.1.1 demonstrated different plaque morphology in comparison to GLV-1h68 in CV-1 cells. GLV-1h68 is an oncolytic virus strain designed to colonize and destroy cancer cells without harming healthy tissues or organs.¹⁷

Cell viability assay. 1 × 10⁴ cells/well were seeded in 96-well plates (Nunc). After 24 h in culture, cells were infected with vaccinia virus strains using multiplicities of infection (MOI) of 0.1 and 1.0. The cells were incubated at 37°C for 1 h, then the infection medium was removed and subsequently the cells were incubated in fresh growth medium.

The amount of viable cells after infection was measured using 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2*H*-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt (XTT) assay (Cell Proliferation Kit II, Roche Diagnostics), according to the manufacturer's protocol at 24, 48, or 72 h after virus infection. Quantification of cell viability was performed in an ELISA plate reader (Tecan Sunrise, Tecan Trading AG) at 490 nm with a reference wavelength of 690 nm. The relative number of viable cells was expressed as percent cell viability. Uninfected cells were used as reference and were considered as 100% viable.

Viral replication. For the viral replication assay, different canine cancer cells were infected with LIVP6.1.1 or GLV-1h68 at an MOI of 0.1. After one hour of incubation at 37°C with gentle agitation every 20 min, the infection medium was removed and replaced by a fresh growth medium. After 1, 12, 24, 48, 72 and 96 h, the cells and supernatants were harvested. Following three freeze-thaw cycles, serial dilutions of the supernatants and lysates were titered by standard plaque assays on CV-1 cells. All samples were measured in triplicate.

Vaccinia virus-mediated therapy of STSA-1 and DT08/40 xenografts. Tumors were generated by implanting either 1 × 10⁶ canine soft tissue sarcoma STSA-1 cells or 5 × 10⁶ canine prostate DT08/40 cells subcutaneously into the right hind leg of 6- to 8-week-old female nude mice [Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu}; Harlan]. Tumor growth was monitored weekly in two dimensions using a digital caliper. Tumor volume was calculated as [(length × width²)/2]. When tumor volume reached

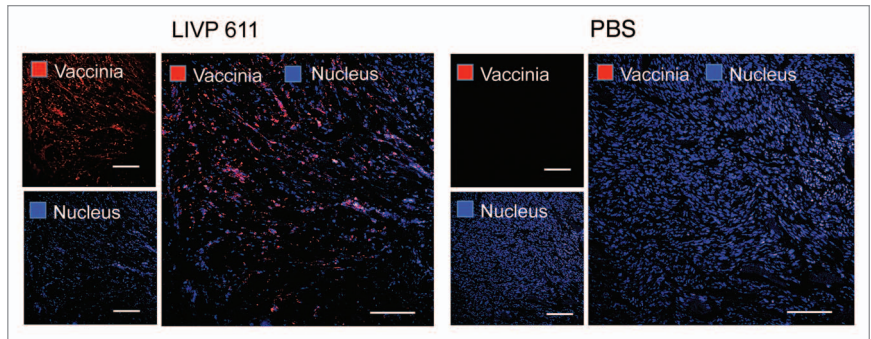


Figure 4. Immunohistochemical staining of infected and uninfected STSA-1 xenograft tumors at 35 dpvi. Tumor-bearing mice were either mock treated (PBS) or infected with LIVP6.1.1. Tumor sections were labeled with anti-vaccinia virus antibodies (red) and nuclei were stained with Hoechst (blue). Scale bars, 2.5 mm.

approximately 600–1000 mm³ (STSA-1) and 200–400 mm³ (DT08/40), groups of mice (n = 6) were injected either with 5 × 10⁶ pfu of LIVP6.1.1 virus or PBS (control) into the tail vein intravenously (i.v.). The significance of the results was calculated by Student's t-test. Results are displayed as means ± standard deviation (SD). P values of < 0.05 were considered significant.

Mice were also monitored for change in body weight and signs of toxicity.

Histology and microscopy. For histological studies, tumors were excised and snap-frozen in liquid nitrogen, followed by fixation in 4% paraformaldehyde/PBS at pH 7.4 for 16 h at 4°C. After dehydration in 10% and 30% sucrose (Carl Roth) specimens were embedded in Tissue-Tek® O.C.T. (Sakura Finetek Europe B.V.). Tissue samples were sectioned (10 µm thickness) with the cryostat 2800 Frigocut (Leica Microsystems GmbH). Labeling of tissue sections was performed as described in detail elsewhere.^{18,19} LIVP6.1.1 was labeled using polyclonal rabbit anti vaccinia virus (anti-VACV) antibody (Abcam), which was stained using Cy3-conjugated donkey anti rabbit secondary antibodies obtained from Jackson ImmunoResearch. Hoechst 33342 was used to label nuclei in tissue sections.

The fluorescence-labeled preparations were examined using the Leica TCS SP2 AOBS confocal laser microscope equipped with argon, helium-neon and UV laser and the LCS 2.16 software (1024 × 1024 pixel RGB-color images). Digital images were processed with Photoshop 7.0 (Adobe Systems, Mountain View, CA, USA).

Flow cytometric (FACS) analysis. For flow cytometric analysis, three mice from each group were sacrificed by CO₂ inhalation and tumors were removed. The preparation of single cell suspensions derived from LIVP6.1.1- or PBS- treated tumors was performed as described by Gentshev et al.⁹

To block non-specific staining, single cells were preincubated with 0.5 µg of anti-mouse CD16/32 antibody (clone 93, Biolegend) per one million cells for 20 min on ice. After that, the cells were incubated at 4°C for 15 min in PBS with 2% FBS in the presence of appropriate dilutions of labeled monoclonal antibodies: anti-mouse MHCII-PE (Clone M5 114.15.2, eBioscience), anti-CD11b-PerCPCy5.5 (Clone M1/70, eBioscience), anti-F4/80-APC (Clone BM8, eBioscience), anti-Gr-1-APC (Ly-6G,

Table 2. Presence of immune cells in tumors and peripheral blood of STSA-1 xenografted mice 7 d after LIPV6.1.1 or PBS-treatments

Immune cells in [%]	PBS/ tumor	LIPV6.1.1/ tumor	P-value PBS vs LIPV6.1.1 tumor	PBS/ blood	LIPV6.1.1/ blood
MHCII ⁺ CD45 ⁺	0.66% ± 0.23%	2.67% ± 0.35%	** (p = 0.002)	nt	nt
F4/80 ⁺ CD45 ⁺	0.77% ± 0.47%	4.61% ± 0.25%	** (p = 0.001)	nt	nt
CD11b ⁺ Gr-1 ^{int}	0.2% ± 0.08%	3% ± 0.69%	* (p = 0.018)	nt	nt
CD11b ⁺ Gr-1 ^{high}	0.27% ± 0.08%	2.48% ± 0.70%	* (p = 0.03)	27.39% ± 7.67%	25.49% ± 3.96%

MHCII⁺CD45⁺ (mainly B cells, macrophages and dendritic cells), F4/80⁺CD45⁺; (macrophages), Gr-1^{high}CD11b⁺ (Myeloid-derived suppressor cells, MDSCs, granulocytes) and Gr-1^{int}CD11b⁺ (MDSCs, monocytes). Experiments were done twice with at least 3 mice per group. The data are presented as mean values ± SD. The statistical significance was analyzed using two-tailed unpaired Student's test (**p < 0.01, *p < 0.05). nt, not tested.

Clone RB6–8C5, eBioscience). The Anti-Gr-1 mAb (RB6–8C5) has long been used to stain MDSCs and allows the distinction of at least two subsets of granulocytes (Gr-1^{high}CD11b⁺) and monocytic cells (Gr-1^{int}CD11b⁺).²⁰

Stained cells were subsequently analyzed, using Accuri C6 Cytometer and FACS analysis software CFlow Version 1.0.227.4 (Accuri Cytometers, Inc.).

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

This work was supported by Genelux Corporation, San Diego, USA, and a Service Grant to the University of Wuerzburg, Germany also funded by Genelux Corporation. I.G., U.G., A.F., N.G.C., Y.A.Y., Q.Z. and A.A.S. are employees and shareholders of Genelux. M.A. and S.W. were supported by grants of

Genelux Corporation. S.S.P. is a graduate fellow and supported by a grant of the German *Excellence Initiative* to the Graduate School of Life Sciences, University of Wuerzburg. No additional external funding was received for this study. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Acknowledgments

We thank Mrs J. Langbein-Laugwitz, Mr J. Aguilar, Mr T. Trevino and Mrs I. Smirnow for technical support, Dr I. Nolte and Dr A. Macneill for providing of canine cell lines used in this study and Dr Z. Sokolovic for critical reading of the manuscript.

References

- Merlo DF, Rossi L, Pellegrino C, Ceppi M, Cardellino U, Capurro C, et al. Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *J Vet Intern Med* 2008; 22:976-84; PMID:18564221; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0133.x>.
- Kelsey JL, Moore AS, Glickman LT. Epidemiologic studies of risk factors for cancer in pet dogs. *Epidemiol Rev* 1998; 20:204-17; PMID:9919439; <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a017981>.
- Ternovoi VV, Le LP, Belousova N, Smith BF, Siegal GP, Curiel DT. Productive replication of human adenovirus type 5 in canine cells. *J Virol* 2005; 79:1308-11; PMID:15613357; <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.79.2.1308-1311.2005>.
- Smith BF, Curiel DT, Ternovoi VV, Borovjagin AV, Baker HJ, Cox N, et al. Administration of a conditionally replicative oncolytic canine adenovirus in normal dogs. *Cancer Biother Radiopharm* 2006; 21:601-6; PMID:17257075; <http://dx.doi.org/10.1089/cbr.2006.21.601>.
- Le LP, Rivera AA, Glasgow JN, Ternovoi VV, Wu H, Wang M, et al. Infectivity enhancement for adenoviral transduction of canine osteosarcoma cells. *Gene Ther* 2006; 13:389-99; PMID:16292351; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gt.3302674>.
- Suter SE, Chein MB, von Messling V, Yip B, Cattaneo R, Vernau W, et al. In vitro canine distemper virus infection of canine lymphoid cells: a prelude to oncolytic therapy for lymphoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11:1579-87; PMID:15746063; <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1944>.
- Gentschev I, Ehrig K, Donat U, Hess M, Rudolph S, Chen N, et al. Significant Growth Inhibition of Canine Mammary Carcinoma Xenografts following Treatment with Oncolytic Vaccinia Virus GLV-1h68. *J Oncol* 2010; 2010:736907; PMID:20631910; <http://dx.doi.org/10.1155/2010/736907>.
- Gentschev I, Stritzker J, Hofmann E, Weibel S, Yu YA, Chen N, et al. Use of an oncolytic vaccinia virus for the treatment of canine breast cancer in nude mice: preclinical development of a therapeutic agent. *Cancer Gene Ther* 2009; 16:320-8; PMID:18949014; <http://dx.doi.org/10.1038/cgt.2008.87>.
- Gentschev I, Müller M, Adelfinger M, Weibel S, Grummt F, Zimmermann M, et al. Efficient colonization and therapy of human hepatocellular carcinoma (HCC) using the oncolytic vaccinia virus strain GLV-1h68. *PLoS One* 2011; 6:e22069; PMID:21779374; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0022069>.
- Patil SS, Gentschev I, Adelfinger M, Donat U, Hess M, Weibel S, et al. Virotherapy of canine tumors with oncolytic vaccinia virus GLV-1h109 expressing an anti-VEGF single-chain antibody. *PLoS One* 2012:e47472; PMID:23091626; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0047472>.
- Arendt M, Nasir L, Morgan IM. Oncolytic gene therapy for canine cancers: teaching old dog viruses new tricks. *Vet Comp Oncol* 2009; 7:153-61; PMID:19691644; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5829.2009.00187.x>.
- Patil SS, Gentschev I, Nolte I, Ogilvie G, Szalay AA. Oncolytic virotherapy in veterinary medicine: current status and future prospects for canine patients. *J Transl Med* 2012; 10:3; PMID:22216938; <http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-10-3>.
- Gil M, Bieniasz M, Seshadri M, Fisher D, Ciesielski MJ, Chen Y, et al. Photodynamic therapy augments the efficacy of oncolytic vaccinia virus against primary and metastatic tumours in mice. *Br J Cancer* 2011; 105:1512-21; PMID:21989183; <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2011.429>.
- Breitbach CJ, Paterson JM, Lemay CG, Falls TJ, McGuire A, Parato KA, et al. Targeted inflammation during oncolytic virus therapy severely compromises tumor blood flow. *Mol Ther* 2007; 15:1686-93; PMID:17579581; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.mt.6300215>.
- Gentschev I, Adelfinger M, Josupeit R, Rudolph S, Ehrig K, Donat U, et al. Preclinical evaluation of oncolytic vaccinia virus for therapy of canine soft tissue sarcoma. *PLoS One* 2012; 7:e37239; PMID:22615950; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0037239>.
- Reimann-Berg N, Willenbrock S, Murua Escobar H, Eberle N, Gerhauser I, Mischke R, et al. Two new cases of polysomy 13 in canine prostate cancer. *Cytogenet Genome Res* 2011; 132:16-21; PMID:20668368; <http://dx.doi.org/10.1159/000317077>.
- Zhang Q, Yu YA, Wang E, Chen N, Danner RL, Munson PJ, et al. Eradication of solid human breast tumors in nude mice with an intravenously injected light-emitting oncolytic vaccinia virus. *Cancer Res* 2007; 67:10038-46; PMID:17942938; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0146>.
- Gentschev I, Donat U, Hofmann E, Weibel S, Adelfinger M, Raab V, et al. Regression of human prostate tumors and metastases in nude mice following treatment with the recombinant oncolytic vaccinia virus GLV-1h68. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010:489759; PMID:20379368; <http://dx.doi.org/10.1155/2010/489759>.
- Weibel S, Stritzker J, Eck M, Goebel W, Szalay AA. Colonization of experimental murine breast tumours by *Escherichia coli* K-12 significantly alters the tumour microenvironment. *Cell Microbiol* 2008; 10:1235-48; PMID:18208564; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01122.x>.
- Peranzoni E, Zilio S, Marigo I, Dolcetti L, Zanovello P, Mandruzzato S, et al. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Curr Opin Immunol* 2010; 22:238-44; PMID:20171075; <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2010.01.021>.

4.6 Virotherapy of Canine Tumors with Oncolytic Vaccinia Virus GLV-1h109 Expressing an Anti-VEGF Single-Chain Antibody

Virotherapy of Canine Tumors with Oncolytic Vaccinia Virus GLV-1h109 Expressing an Anti-VEGF Single-Chain Antibody

Sandeep S. Patil¹., Ivaylo Gentshev^{1,2}., Marion Adelfinger¹, Ulrike Donat¹, Michael Hess¹, Stephanie Weibel¹, Ingo Nolte³, Alexa Frentzen², Aladar A. Szalay^{1,2,4,5,6*}

¹ Department of Biochemistry, University of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany,

² Genelux Corporation, San Diego Science Center, San Diego, California, United States of America,

³ Small Animal Clinic, University of Veterinary Medicine, Hannover, Germany,

⁴ Rudolf Virchow Center for Experimental Biomedicine, University of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany,

⁵ Institute for Molecular Infection Biology, University of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany,

⁶ Department of Radiation Oncology, Moores Cancer Center, University of California San Diego, La Jolla, California, United States of America

Virotherapy of canine tumors via oncolytic Vaccinia virus GLV-1h109 expressing an anti-VEGF single chain antibody GLAF-1

Design, measurement and analysis of the flow cytometric experiments and measurements for the growth curve were performed by Marion Adelfinger with help and supervision of the following co-authors to the manuscript:

S. Patil designed and performed cell culture, immunohistochemistry, biochemistry assays and *in vivo* mouse experiments, helped with the flow cytometric experiments and wrote the paper.

Dr. I. Gentshev designed the study helped with the flow cytometric experiments, analyzed the data and wrote the paper.

Dr. U. Donat helped to design and perform the immunohistochemistry.

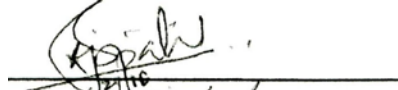
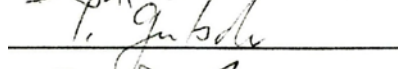

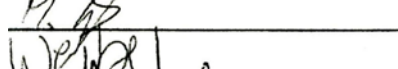
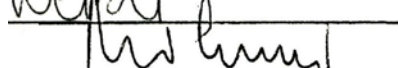
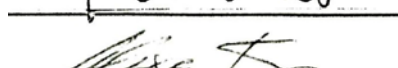
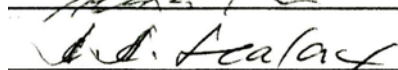
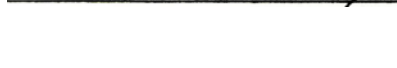
M. Hess helped to design and perform the detection of fluorescence products.

Dr. S. Weibel helped to analyze the immunohistochemistry.

Dr. I. Nolte provided the DT08/40 cellline.

Dr. A. Frentzen provided the viral construct and the GLAF-1 antibody and analyzed the data.

Prof. Dr. A. A. Szalay supervised and designed the study and helped to write the paper.

S. Patil	
Dr. I. Gentshev	
Dr. U. Donat	
M. Hess	
Dr. S. Weibel	
Dr. I. Nolte	
Dr. A. Frentzen	
Prof. Dr. A. A. Szalay	

Virotherapy of Canine Tumors with Oncolytic Vaccinia Virus GLV-1h109 Expressing an Anti-VEGF Single-Chain Antibody

Sandeep S. Patil^{1,9}, Ivaylo Gentshev^{1,2,9}, Marion Adelfinger¹, Ulrike Donat¹, Michael Hess¹, Stephanie Weibel¹, Ingo Nolte³, Alexa Frentzen², Aladar A. Szalay^{1,2,4,5,6*}

1 Department of Biochemistry, University of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany, **2** Genelux Corporation, San Diego Science Center, San Diego, California, United States of America, **3** Small Animal Clinic, University of Veterinary Medicine, Hannover, Germany, **4** Rudolf Virchow Center for Experimental Biomedicine, University of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany, **5** Institute for Molecular Infection Biology, University of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany, **6** Department of Radiation Oncology, Moores Cancer Center, University of California San Diego, La Jolla, California, United States of America

Abstract

Virotherapy using oncolytic vaccinia virus (VACV) strains is one promising new strategy for cancer therapy. We have previously reported that oncolytic vaccinia virus strains expressing an anti-VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) single-chain antibody (scAb) GLAF-1 exhibited significant therapeutic efficacy for treatment of human tumor xenografts. Here, we describe the use of oncolytic vaccinia virus GLV-1h109 encoding GLAF-1 for canine cancer therapy. In this study we analyzed the virus-mediated delivery and production of scAb GLAF-1 and the oncolytic and immunological effects of the GLV-1h109 vaccinia virus strain against canine soft tissue sarcoma and canine prostate carcinoma in xenograft models. Cell culture data demonstrated that the GLV-1h109 virus efficiently infect, replicate in and destroy both tested canine cancer cell lines. In addition, successful expression of GLAF-1 was demonstrated in virus-infected canine cancer cells and the antibody specifically recognized canine VEGF. In two different xenograft models, the systemic administration of the GLV-1h109 virus was found to be safe and led to anti-tumor and immunological effects resulting in the significant reduction of tumor growth in comparison to untreated control mice. Furthermore, tumor-specific virus infection led to a continued production of functional scAb GLAF-1, resulting in inhibition of angiogenesis. Overall, the GLV-1h109-mediated cancer therapy and production of immunotherapeutic anti-VEGF scAb may open the way for combination therapy concept i.e. vaccinia virus mediated oncolysis and intratumoral production of therapeutic drugs in canine cancer patients.

Citation: Patil SS, Gentshev I, Adelfinger M, Donat U, Hess M, et al. (2012) Virotherapy of Canine Tumors with Oncolytic Vaccinia Virus GLV-1h109 Expressing an Anti-VEGF Single-Chain Antibody. PLoS ONE 7(10): e47472. doi:10.1371/journal.pone.0047472

Editor: Chandranu (CV) Dash, Meharry Medical College, United States of America

Received: July 6, 2012; **Accepted:** September 11, 2012; **Published:** October 16, 2012

Copyright: © 2012 Patil et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The research was supported by the Research and Development Division of Genelux Corporation, San Diego, USA, and a Service Grant to the University of Würzburg, Germany also funded by Genelux Corp., San Diego, USA. IG AF and AAS are employees and shareholders of Genelux. MA, UD, MH and SW were supported by grants of Genelux Corporation. SSP is a graduate fellow and supported by a grant of the German Excellence Initiative to the Graduate School of Life Sciences, University of Wuerzburg. This publication was funded by the German Research Foundation (DFG) and the University of Wuerzburg in the funding programme Open Access Publishing. No additional external funding was received for this study. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: I. Gentshev, A. Frentzen and A. A. Szalay have financial interests in Genelux Corporation, and M. Adelfinger U. Donat, M. Hess and S. Weibel were supported by grants of Genelux Corporation. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials. However, no direct financial support was provided by Genelux for the completion of this study.

* E-mail: aaszalay@genelux.com

⁹ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Cancer is the leading cause of disease-related death in dogs worldwide ([1], National Canine Cancer Foundation). Incidence of cancer ranges from 1 to 2% in the canine population and is currently the leading cause of deaths in dogs older than 10 years [1–2]. The major treatment options available for canine cancers include surgery, radiation therapy, chemotherapy, hyperthermia and photodynamic therapy. Despite progress in the diagnosis and treatment of advanced canine cancer, overall patient treatment outcome has not substantially improved in the past. Therefore, the development of new therapies for advanced canine cancer is a high priority. One of the most promising novel cancer therapies is oncolytic virotherapy. This method is based on the capacity of oncolytic viruses (OVs) to preferentially infect and lyse cancer cells

without causing excessive damage to surrounding normal tissues. Several oncolytic viruses including various human and canine adenoviruses, canine distemper virus (CDV) and vaccinia virus strains have been successfully tested for canine cancer therapy in preclinical settings (for review see [3]).

In this study, we analyzed the therapeutic potential of the oncolytic vaccinia virus GLV-1h109 strain in two different xenograft models based on canine soft tissue sarcoma STSA-1 cells [4] and canine prostate carcinoma DT08/40 cells [5]. GLV-1h109 virus was derived from the oncolytic vaccinia virus GLV-1h68 [6] by replacing *lacZ* gene (beta-galactosidase) with GLAF-1 protein encoding gene at *32R* locus [7]. The *glaf-1* gene encodes the single chain anti-VEGF antibody. GLAF-1 protein, comprises of an Ig ϵ light chain leader sequence [8], the V_H chain sequence of

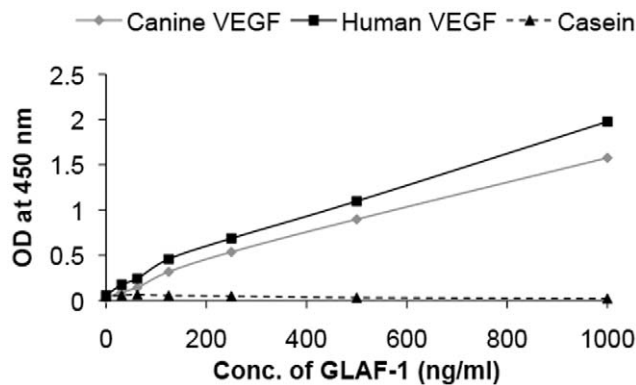


Figure 1. Interaction of purified GLAF-1 antibody with human and canine VEGF. Affinity and cross reactivity of GLAF-1 was demonstrated by ELISA. Equal concentrations of human or canine VEGF (100 ng/well) were coated on ELISA plates. Six two-fold dilutions of purified GLAF-1 protein ranging from 1000 ng/ml to 31.3 ng/ml were incubated with both human and canine VEGF. Plates pre-coated with 1% (w/v) casein (Pierce, 37528) were used as negative control. For further ELISA experimental conditions see material and methods (GLAF-1 ELISA). ODs obtained for various conc. of GLAF-1 against both human and canine VEGF were plotted. ELISA was repeated ($n=3$) in an independent experiment.

doi:10.1371/journal.pone.0047472.g001

the G6–31 antibody [9], a $(G_4S)_3$ linker sequence, the V_L chain sequence of the G6–31 antibody [9], and a C-terminal DDDDK sequence [7]. The G6–31 antibody binds both murine (mu) and human (hu) vascular endothelial growth factor (VEGF) with high affinity [9]. The GLAF-1 antibody encoded by VACV strain GLV-h109 is expressed under the control of the vaccinia virus synthetic late (SL) promoter and also recognizes specifically mu and huVEGF [7]. However, cross reactivity of GLAF-1 with VEGF protein from other species was not known. VEGF or VEGF-A is a potent regulator of angiogenesis and therefore several anti-VEGF strategies have been developed for the treatment of human and canine tumors [10] [11,12]. One of the best characterized strategies is the VEGF blockade using the humanized anti-VEGF monoclonal antibody (mAb) bevacizumab (avastin). However, despite very promising preclinical results, bevacizumab has not been shown to provide a benefit in patients with breast cancer (<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm279485.htm>) or when used in combination with chemotherapy for the treatment of colorectal cancer and non-small-cell carcinoma in humans [13]. The molecular and cellular events underlying resistance to anti-VEGF antibody-based therapy are not completely understood [14]. However, the lack of efficacy of bevacizumab after systemic treatment in patients may be at least attributable to the poor penetration of this antibody into the tumor tissue and metastases. Therefore, new methods or vectors allowing more specific delivery of the anti-VEGF antibodies into the tumor tissue are urgently necessary. We have already shown that the recombinant Vaccinia virus strains (VACV) expressing the GLAF-1 antibody exhibited enhanced tumor inhibition and therapeutic potency, which was comparable to the results seen in combination therapy with separately injected bevacizumab and the parental virus GLV-1h68 [7]. Therefore, the GLV-1h109 virus dependent, intratumoral expression of GLAF-1 may become a new method allowing more optimal continuous delivery of this antibody into tumor tissues in dogs.

Here, we report the virus-mediated oncolytic and immunological effects upon colonization of GLV-1h109 and the constitutive

intratumoral GLAF-1 production in STSA-1- and DT08/40 tumor bearing xenograft mice monitored by fluorescence imaging, Western Blot analysis, immunohistochemistry, flow cytometry and ELISA.

Materials and Methods

Ethics Statement

All animal experiments were carried out in accordance with protocols approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of Explora Biolabs (San Diego, CA, USA; protocol number: EB11-025) and/or the government of Unterfranken, Germany (permit number: 55.2-2531.01-17/08).

Cell Culture

African green monkey kidney fibroblasts (CV-1) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). STSA-1 cells were derived from a canine patient with a grade II soft tissue sarcoma [4]. DT08/40 is a canine prostate carcinoma cell line [5].

CV-1 and DT08/40 cells were cultured in DMEM supplemented with antibiotic-solution (100 U/ml penicillin G, 100 units/ml streptomycin) and 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany) for CV-1 and 20% FBS for DT08/40. STSA-1 cells were cultured in minimum essential medium with Earle's salts supplemented with 2 mM glutamine, 50 U/mL penicillin G, 50 μ g/mL streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM nonessential amino acids (MEM-C), and 10% FBS. All cell lines were cultured at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator.

VEGF ELISA

For the quantitative determination of canine VEGF concentrations in STSA-1 and DT08/40 cell culture supernatants; 5×10^6 cells were cultured under the conditions of MEM and DMEM respectively, containing 10% FBS. Cell culture supernatants were collected at 24 and 48 h and stored at -20°C . Concentrations of VEGF were determined by canine VEGF Quantikine ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's protocol.

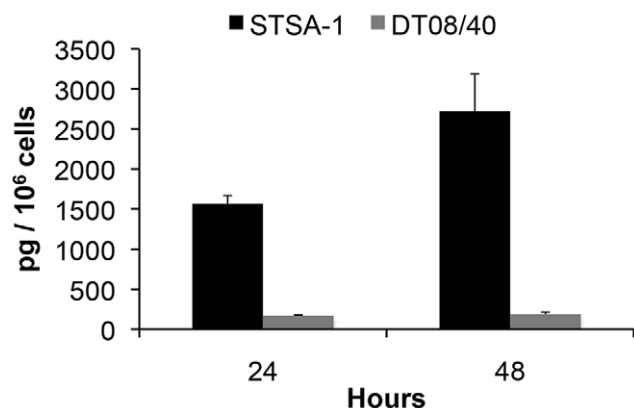


Figure 2. VEGF expression in STSA-1 and DT08/40 canine cancer cells under cell culture conditions. STSA-1 and DT08/40 cells in culture conditions were washed with PBS and cultured in fresh medium with 2% FCS. Culture supernatants were harvested at 24 and 48 h. VEGF levels in supernatants were determined by canine VEGF Quantikine ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Each value represents the mean ($n=3$) \pm standard deviations (SD).

doi:10.1371/journal.pone.0047472.g002

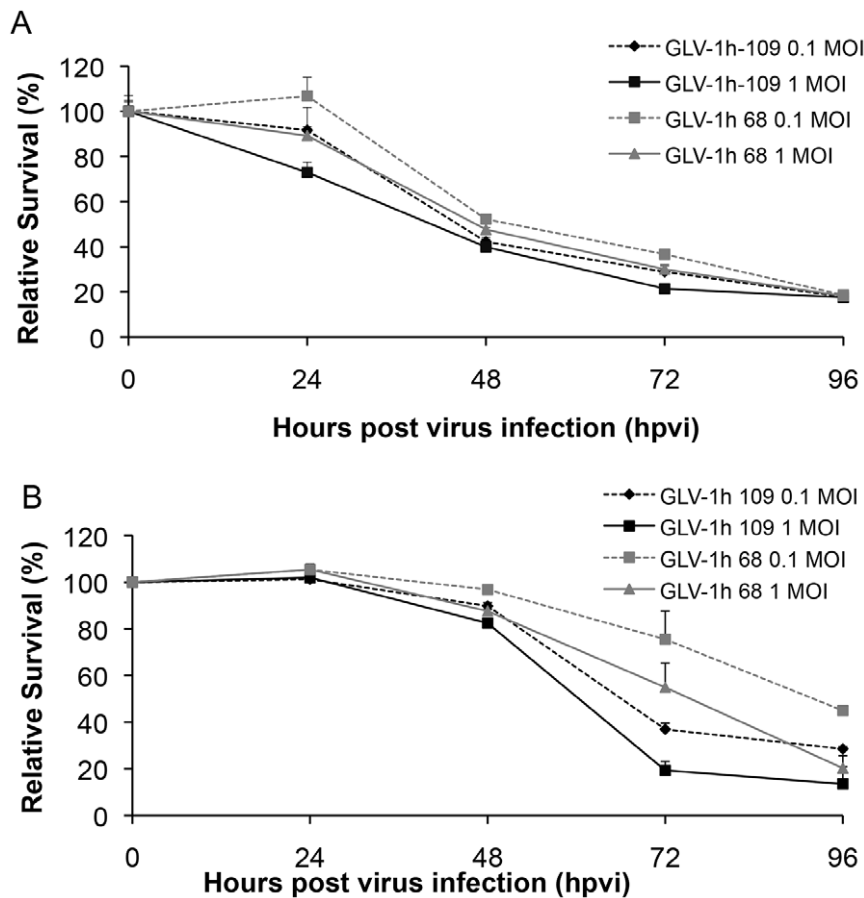


Figure 3. Viability of (A) canine soft tissue sarcoma (STSA-1) and (B) prostate carcinoma (DT08/40) cells after GLV-1h109 or GLV-1h68 infection. Viable cells after infections with two viruses at MOIs of 0.1 and 1.0 were detected using a XTT assay (Cell Proliferation Kit II, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) (Sigma, Taufkirchen, Germany). Mean values ($n=3$) and standard deviations are shown as percentages of respective controls. The data represent three independent experiments. There were no significant differences between groups at 72 and 96 hpvi ($P>0.05$).

doi:10.1371/journal.pone.0047472.g003

Virus Strains

GLV-1h68 is an oncolytic vaccinia virus strain designed to locate, enter, colonize and destroy cancer cells without harming healthy tissues or organs [6]. GLV-1h109 is a GLV-1h68-derivative expressing an anti-VEGF single-chain antibody GLAF-1 [7].

Cell Viability Assay

1×10^4 cells/well were seeded in 96-well plates (Nunc, Wiesbaden, Germany). After 24 h in culture, cells were infected with vaccinia virus strains using multiplicities of infection (MOI) of 0.1 and 1.0. The cells were incubated at 37°C for 1 h, then the infection medium was removed and subsequently the cells were incubated in fresh growth medium.

The amount of viable cells after infection was measured using 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt (XTT) assay (Cell Proliferation Kit II, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's protocol at 24, 48, 72 or 96 h after infection. Quantification of cell viability was performed in an ELISA plate reader (Tecan Sunrise, Tecan Trading AG, Austria) at 490 nm with a reference wavelength of 690 nm. The relative number of viable cells was expressed as percent cell viability. Uninfected cells were used as reference and were considered as 100% viable.

Viral Replication

For the viral replication assay, cells grown in 24-well plates were infected with either GLV-1h68 or GLV-1h109 at an MOI of 0.1. After one hour of incubation at 37°C with gentle agitation every 20 min, the infection medium was removed and replaced by a fresh growth medium. After 1, 12, 24, 48, 72 and 96 hours, the cells and supernatants were harvested. Following three freeze-thaw cycles, serial dilutions of the supernatants and lysates were titered by standard plaque assays on CV-1 cells. All samples were measured in triplicate.

Western Blot Analysis

For detection of proteins, supernatants and infected cells were harvested and resuspended in SDS sample buffer at 24 and 48 hours post virus infection (hpvi). Samples were separated by 10% SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis and subsequently transferred onto a nitrocellulose membrane (Whatman GmbH, Dassel, Germany). After blocking in 5% skim milk in PBS, the membrane was incubated with rabbit anti-DDDDK antibody (ab21536, Abcam, Cambridge, UK) for detection of scAb GLAF-1, anti-beta-glucuronidase rabbit polyclonal antibody (G5420, Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Germany) or anti-beta-actin mouse monoclonal antibody (ab6276, Abcam, Cambridge, UK). The first antibodies were detected using horseradish peroxidase-conjugated

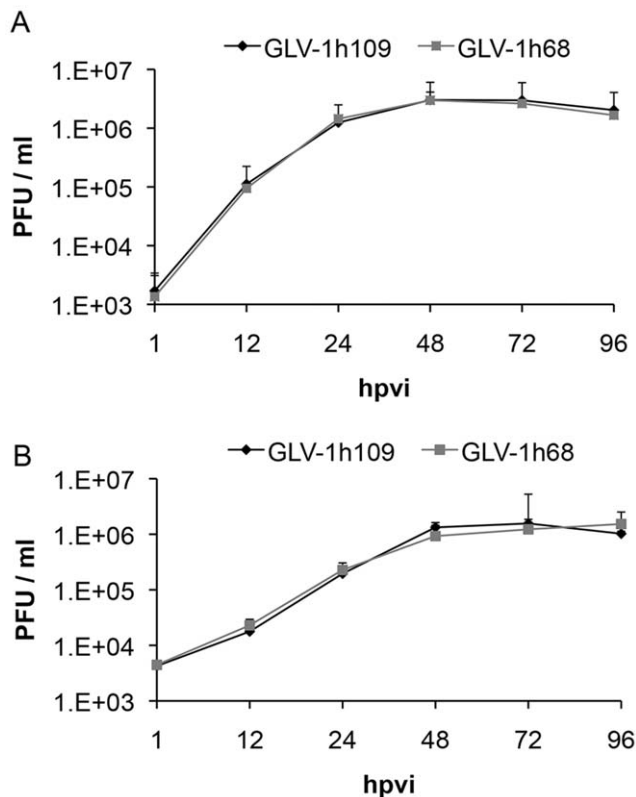


Figure 4. Comparison of the replication capacity of the vaccinia virus strains GLV-1h109 and GLV-1h68 in canine cancer cells. For the viral replication assay, STSA-1 (A) or DT08/40 (B) cells grown in 24-well plates were infected with either GLV-1h109 or GLV-1h68 at a MOI of 0.1. Cells and supernatants were collected for the determination of virus titers at various time points. Viral titers were determined as pfu per well in triplicates by standard plaque assay in CV-1 cell monolayers. Averages plus standard deviation are plotted. The data represent three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0047472.g004

anti-rabbit (ab6721, Abcam, Cambridge, UK) or anti-mouse (ab6728, Abcam, Cambridge, UK) secondary antibodies, followed by enhanced chemiluminescence detection.

Vaccinia Virus-mediated Therapy of STSA-1 and DT08/40 Xenografts

Tumors were generated by implanting either 1×10^6 canine soft tissue sarcoma STSA-1 cells or 5×10^6 canine prostate DT08/40 cells subcutaneously into the right hind leg of 6- to 8-week-old female nude mice [Hsd: Athymic Nude-*Foxn1*^{nu}; Harlan, Holland]. Tumor growth was monitored weekly in two dimensions using a digital caliper. Tumor volume was calculated as $[(\text{length} \times \text{width}^2)/2]$. When tumor volume reached approximately 600–1000 mm³ (STSA-1) and 200–400 mm³ (DT08/40), groups of mice ($n=6$) were injected either with 5×10^6 pfu of GLV-1h109 virus or PBS (control) into the tail vein. The significance of the results was calculated by Student's *t*-test. Results are displayed as means \pm standard deviation (SD). *P* values of <0.05 were considered significant.

Mice were monitored for change in body weight and signs of toxicity. Blood samples for protein expression analysis (see below) were collected at time points 7, 14, 21 and 28 days post virus injection under anesthesia by a heparinised capillary pipet

(No. 554/20, Assistant, Sondheim, Germany) via the retro orbital sinus vein.

Fluorogenic Probes and Detection of Fluorescence Products

The lyophilized fluorogenic probe fluorescein di-beta-D-glucoside (FDGlcU) (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) was dissolved in DMSO (36.5 mM). For analysis of beta glucuronidase in serum, the collected mouse serum was diluted 1:15 with PBS and 80 μ l of each sample were mixed with 2.5 μ g FDGlcU. After incubation for 1 h at 37°C, fluorescence was read in Lumox 384-well plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) using an Infinite 200 Pro Microplate Reader (Tecan, Crailsheim, Germany) and fluorescence intensities are listed as relative fluorescence units as described by Hess et al. [15].

GLAF-1 ELISA

The expression of the recombinant GLAF-1 proteins in sera was quantitatively determined by ELISA. For the standard curve, 6 two-fold serial dilutions of purified GLAF-1 protein ranging from 625 ng/ml to 19.5 ng/ml were prepared in PBS/2% FBS. Purified GLAF-1 protein required to obtain the standard curve was produced as described earlier [7]. Ninety-six well plates pre-coated with recombinant human VEGF (Sigma) were blocked and incubated with standards or 1:25 dilutions of sera samples in triplicates. Following 1.5 h incubation at room temperature, the wells were washed with PBS/0.05% Tween and incubated with a rabbit anti-DDDDK antibody (ab21536, Abcam, Cambridge, UK) for 1 h at room temperature. All wells were washed and incubated with a secondary HRP-conjugated anti-rabbit IgG (Jackson Immuno Research). Color was developed using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (Sigma), and the reaction was stopped with HCl. Absorbance was read in an Infinite 200 Pro Microplate Reader (Tecan, Crailsheim, Germany) at 450 nm.

Histology and Microscopy

For histological studies, tumors were excised and snap-frozen in liquid nitrogen, followed by fixation in 4% paraformaldehyde/PBS at pH 7.4 for 16 h at 4°C. After dehydration in 10% and 30% sucrose (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) specimens were embedded in Tissue-Tek® O.C.T. (Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Netherlands). Tissue samples were sectioned (10 μ m thickness) with the cryostat 2800 Frigocut (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Labeling of tissue sections was performed as described in detail elsewhere [16,17].

Endothelial blood vessel cells were stained with a hamster monoclonal anti-CD31 antibody (Chemicon International, Temecula, USA; MAB1398Z). Anti-Mouse Ly-6G (Gr-1, eBioscience, San Diego, USA; 14-5931-81), anti-Mouse F4/80 (Clone BM8, eBioscience) or rabbit anti-DDDDK antibody (ab21536, Abcam, Cambridge, UK) were used to stain myeloid-derived suppressor cells (MDSCs, mainly granulocytes), macrophages or GLAF-1 protein respectively. Cy3- and Cy5-conjugated secondary antibodies (donkey) were obtained from Jackson ImmunoResearch (Pennsylvania, USA).

The fluorescence-labeled preparations were examined using the Leica TCS SP2 AOBS confocal laser microscope equipped with argon, helium-neon and UV laser and the LCS 2.16 software (1024 \times 1024 pixel RGB-color images). Digital images were processed with Photoshop 7.0 (Adobe Systems, Mountain View, CA, USA) and merged to yield overlay images.

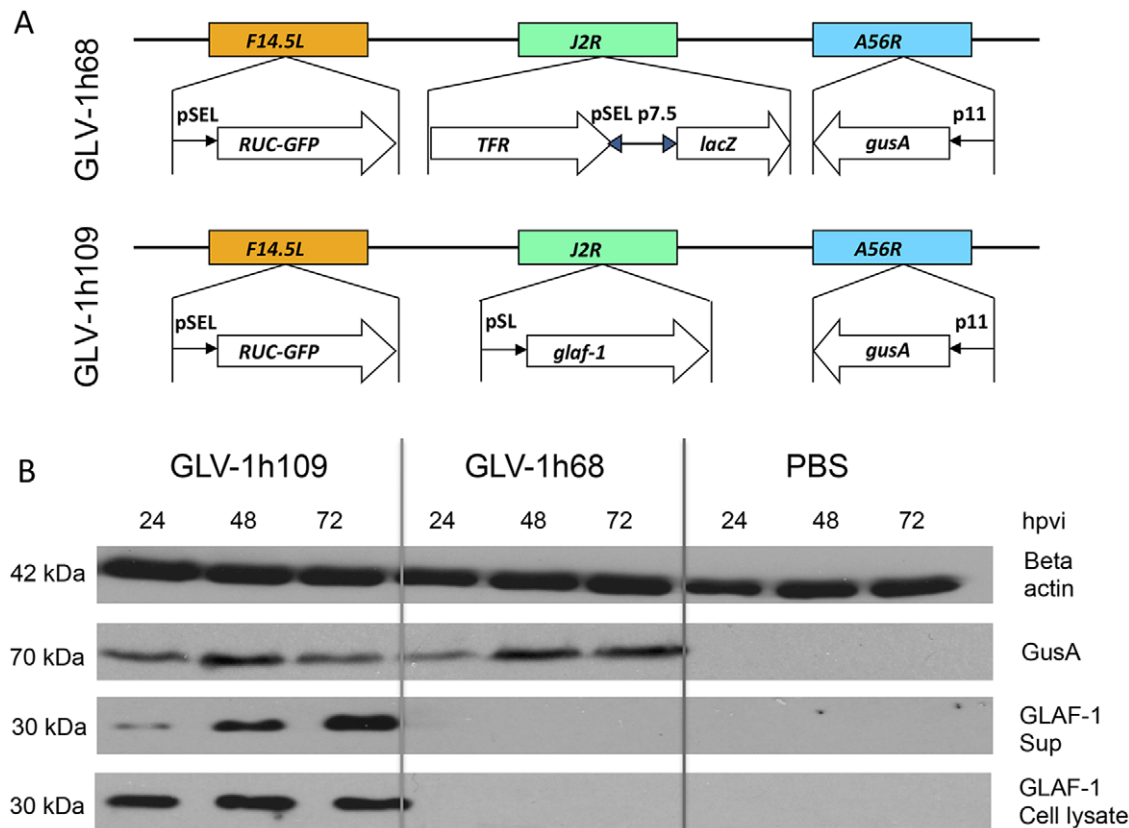


Figure 5. Expression of virus mediated proteins GLAF-1 and GusA in canine soft tissue sarcoma STSA-1 cells. (A) Schematic representation of GLV-1h68 and GLV-1h109 according to Frentzen et al [7]. abbreviations: p11, VACV p11 late promoter; pSEL, VACV SEL promoter; pSE, VACV SE promoter; pSL, VACV SL promoter; p7.5, VACV 7.5 K early/late promoter. (B) Western blot analysis of STSA-1 cells infected with either GLV-1h109, GLV1h 68 virus at an MOI of 1 or PBS. Protein fractions from cell lysate and culture supernatant were isolated at different time points and separated by SDS/PAGE. Western blot analysis was performed as described in material and methods.
doi:10.1371/journal.pone.0047472.g005

Measurement of Blood Vessel Density and Fluorescence Intensity of the CD31 Signal in the Tumor Tissue

Blood vessel density was measured in digital images (100× magnification) of CD31-labelled 10-µm-thick tumor cross-sections using Leica TCS SP2 AOBS confocal laser microscope. Eighteen images per tumor were analyzed per staining (3 tumors per group, 3 sections of each tumor and 6 images per section). Exposure time for individual images was adjusted to ensure clear visibility of all detectable blood vessels and decorated with 8 equidistant horizontal lines using Photoshop 7.0. All blood vessels crossing these lines were counted to obtain the vessel density per section.

Fluorescence intensity of the CD31-labelling in 10-µm-thick sections of control tumors and infected and non-infected areas of virus-colonized tumors was measured on digital images (100× magnification) of specimens stained for CD31 immunoreactivity. On the fluorescence microscope, the background fluorescence was set to a barely detectable level by adjusting the gain of the CCD camera before all the images were captured with identical settings. RGB-images were converted into 8-bit gray scale images (intensity range 0–255) using Photoshop 7.0. The fluorescence intensity of the CD31-labeling represented the average brightness of all vessel-related pixels and was measured using Image J software <http://rsbweb.nih.gov/ij>.

Flow Cytometric (FACS) Analysis

For flow cytometric analysis, three mice from each group were sacrificed by CO₂ inhalation and the tumors were removed. The tumor tissues were minced and incubated individually in 10,000 CDU/ml Collagenase I (Sigma, Steinheim, Germany) and 5 MU/ml DNase I (Calbiochem, Darmstadt, Germany) for 75 min at 37°C and then passed through a 70-µm nylon mesh filter (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium).

To block non-specific staining, single cells were preincubated with 0.5 µg of anti-mouse CD16/32 antibody (clone 93, Biologend, San Diego, USA) per one million cells for 20 min on ice. After that, the cells were incubated at 4°C for 15 min in PBS with 2% FCS in the presence of appropriate dilutions of labeled monoclonal antibodies: anti-mouse MHCII-PE (Clone M5 114.15.2, eBioscience, San Diego, CA, USA), anti-CD11b-PerCPCy5.5 (Clone M1/70, eBioscience, anti-F4/80-APC (Clone BM8, eBioscience), anti-Gr-1-APC (Ly-6G, Clone RB6-8C5, eBioscience). The Anti-Gr-1 mAb (RB6-8C5) has long been used to stain MDSCs and allows the distinction of at least two subsets of granulocytes (Gr-1^{high}CD11b⁺) and monocytic cells (Gr-1^{int}CD11b⁺) [18].

Stained cells were subsequently analyzed, using an Accuri C6 Cytometer and FACS analysis software CFlow Version 1.0.227.4 (Accuri Cytometers, Inc. Ann Arbor, MI USA).

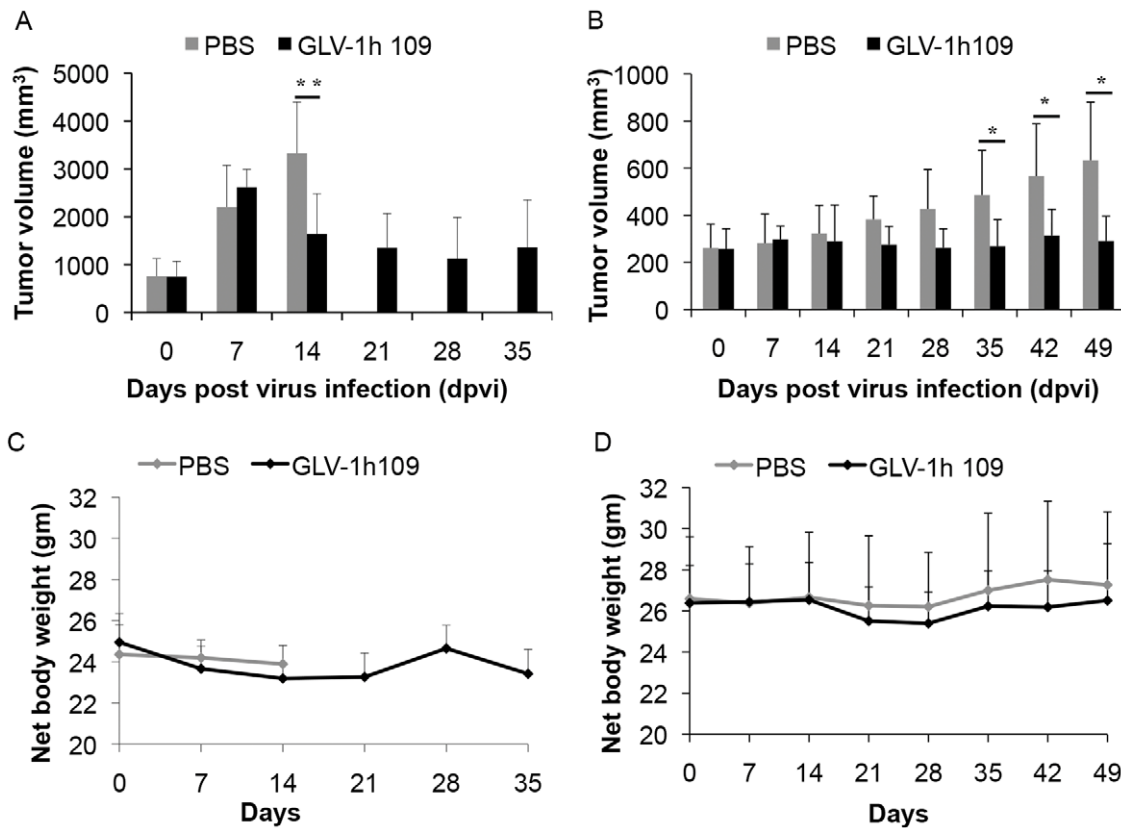


Figure 6. Effects of systemic GLV-1h109 virus injection on tumor growth (A, B) and the body weights (C, D) of STSA-1 or DT08/40 xenografted mice. Two groups each of (A, C) STSA-1 tumor-bearing nude mice (n=6) and (B, D) DT08/40 tumor bearing mice (n=6) were either treated with a single dose of 5×10^6 pfu GLV-1h109 or with PBS (mock control) intravenously (i.v.) into lateral tail vein. The statistical significance was confirmed by Student's t-test where * and ** indicate $P < 0.05$ and 0.01 respectively. doi:10.1371/journal.pone.0047472.g006

Results

The GLAF-1 Antibody Specifically Recognizes Canine VEGF

The anti-VEGF scAb GLAF-1 is directed against human and murine VEGF [7]. Since until now there were no data about the affinity of GLAF-1 to canine (ca) VEGF, we tested the ability of purified GLAF-1 antibody to bind recombinant ca VEGF (R&D

System, Minneapolis, MN, USA) by ELISA. The data demonstrated that this antibody is functional and recognized both ca VEGF and hu VEGF with equal efficiency (Fig. 1).

STSA-1 and DT08/40 Canine Cancer Cells Express VEGF Under Cell Culture Conditions

VEGF, or specially VEGFA is a potent mediator of both angiogenesis and vasculogenesis in dogs and has been proposed

Table 1. Biodistribution of GLV-1h109 in virus-treated DT08/40-or STSA-1 xenografts at 49 or 35 days post virus injection (dpvi).

PFU/per gram (g) of organ or tumor tissue	DT08/40 xenograft			STSA-1 xenograft		
	424/49 dpvi	429/49 dpvi	433/49 dpvi	329/35 dpvi	343/35 dpvi	335/35 dpvi
Tumor	2.67E+02	4.53E+03	1.28E+04	1.86E+07	4.95E+07	2.70E+07
Liver	n.d	n.d	n.d	5.38E+01	1.19E+02	4.87E+01
Lung	n.d	n.d	n.d	2.65E+02	9.60E+01	1.05E+02
Heart	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Kidney	n.d	n.d	n.d	5.58E+01	n.d	n.d
Spleen	n.d	n.d	n.d	4.72E+01	7.24E+01	3.52E+01

The virus titres were determined by standard plaque assays on CV-1 cells using aliquots of the homogenized organs and were displayed as mean pfu/per gram of organ or tissue. For each organ, two aliquots of 0.1 ml were measured in triplicates. n. d.: not detected (detection LIMIT > 10 pfu/organ). doi:10.1371/journal.pone.0047472.t001

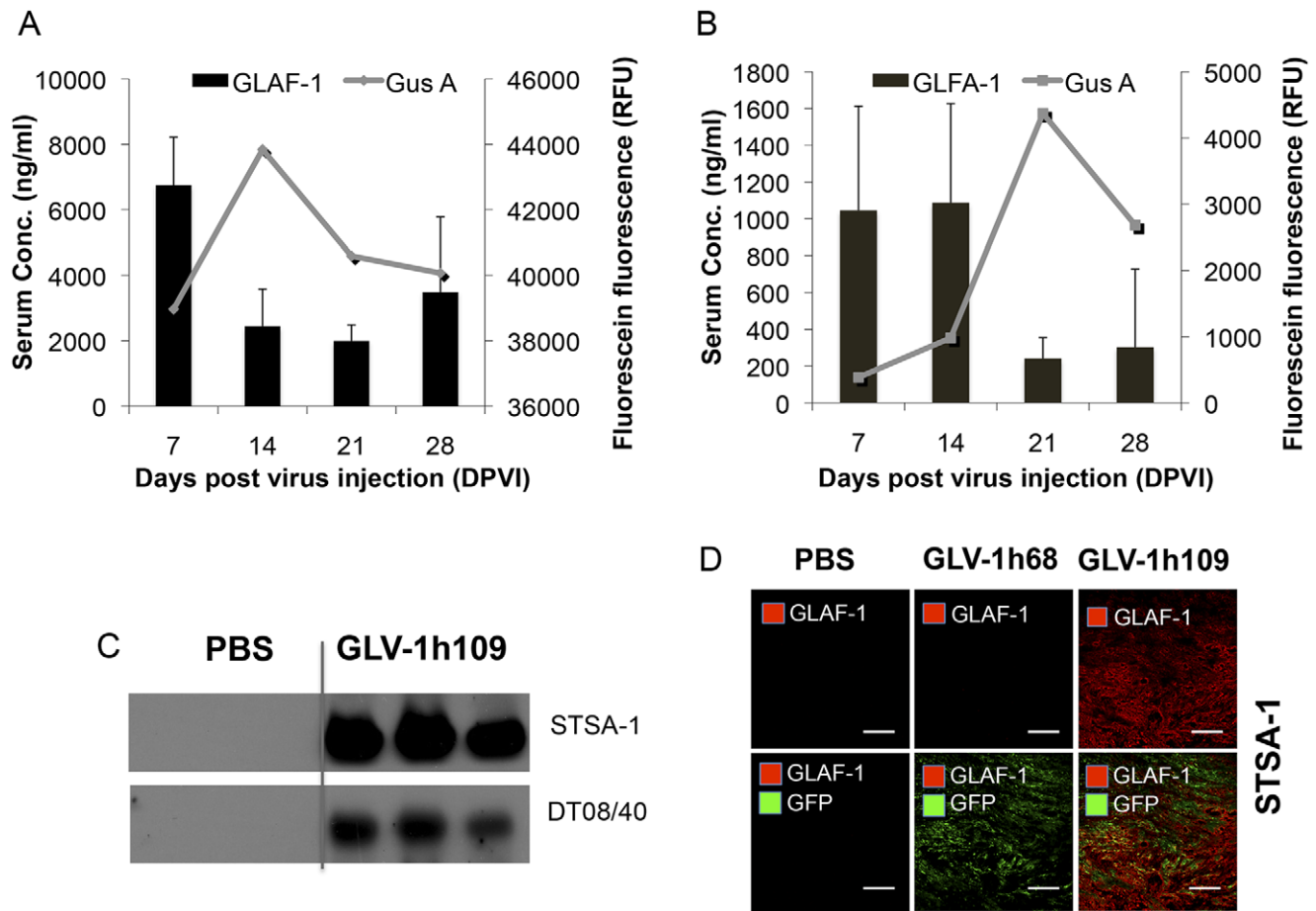


Figure 7. Presence and persistence of the scAb GLAF-1 and GusA in serum (A, B) and tumors (C, D) of GLV-1h109-injected xenograft mice at different time points. **A, B:** Blood samples were collected at day 7, 14, 21 and 28 from **(A)** STSA-1 and **(B)** DT08/40 tumor bearing mice ($n=6$). Expression of GLAF-1 in sera was quantitatively determined using ELISA. GLAF-1 values shown (bars) are mean \pm SD. GusA activity (represented by lines) was measured by detecting the activation of the fluorogenic compound FDGlcU. **C:** The presence of GLAF-1 in tumor tissue monitored by Western Blot. STSA-1 and DT08/40 tumor-bearing mice injected with GLV-1h109 were sacrificed on day 35 and day 49, respectively. Tumors were collected, and protein fractions from tumor lysate were separated by SDS/PAGE. Western blot analysis was performed using an anti-DDDK antibody. **D:** Localization of GLAF-1 protein in virus-infected STSA-1 tumor areas. Overlays represented the virus infection GFP fluorescence (green)/presence of GLAF-1 (red). Scale bars, 500 μ m. (200 \times magnification). doi:10.1371/journal.pone.0047472.g007

as a prognostic indicator in several types of canine cancer [19–21]. Therefore we first analyzed the VEGF expression of the two tested canine cancer cell lines under cell culture conditions (**Fig. 2**). Canine VEGF concentrations were determined using a Quantikine ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) developed for detection of canine VEGF, in accordance with the manufacturer's directions. Concentration of VEGF in supernatant was represented as pg/ 10^6 cells. VEGF levels in the supernatant of STSA-1 cells were 1556.92 ± 103.88 pg/ 10^6 cells (24 hours) and 2962.19 ± 465.84 pg/ 10^6 cells (48 hours), while that of DT08/40 cells were 170.85 ± 6.84 pg/ 10^6 cells (24 hours) and 183.30 ± 28.68 pg/ 10^6 cells (48 hours). The results revealed that STSA-1 cells produced about 9- to 16-fold more ca VEGF compared to the DT08/40 cells at these two different time points.

Oncolytic Vaccinia Virus GLV-1h109 Virus Efficiently Kills Canine Soft Tissue Sarcoma (STSA-1) and Prostate Carcinoma (DT08/40) Cells

STSA-1 cells were seeded three days prior to infection in 24-well plates and were then infected with either GLV-1h109 or GLV-1h68 (positive control) at MOIs of 1.0 and 0.1, respectively. Cell viability was analyzed at 24, 48, 72 and 96 hours post-virus-infection (hpvi) by XTT-assays (**Fig. 3A**). Ninety-six hours after GLV-1h109-infection at MOIs of 0.1 and 1.0, only 17.8% and 17.5% STSA-1 cells survived the treatment, respectively. At the same time point and MOIs, we found 18.60% and 18.2% viable STSA-1 cells after GLV-1h68 infection.

The oncolytic potentials of GLV-1h109 and GLV-1h68 were additionally tested in DT08/40 cell culture (**Fig. 3B**). In these experimental settings the GLV-1h109 and GLV-1h68 virus infections led to a similar oncolytic efficacy at 96 hpvi and at MOIs of 0.1 and 1.0.

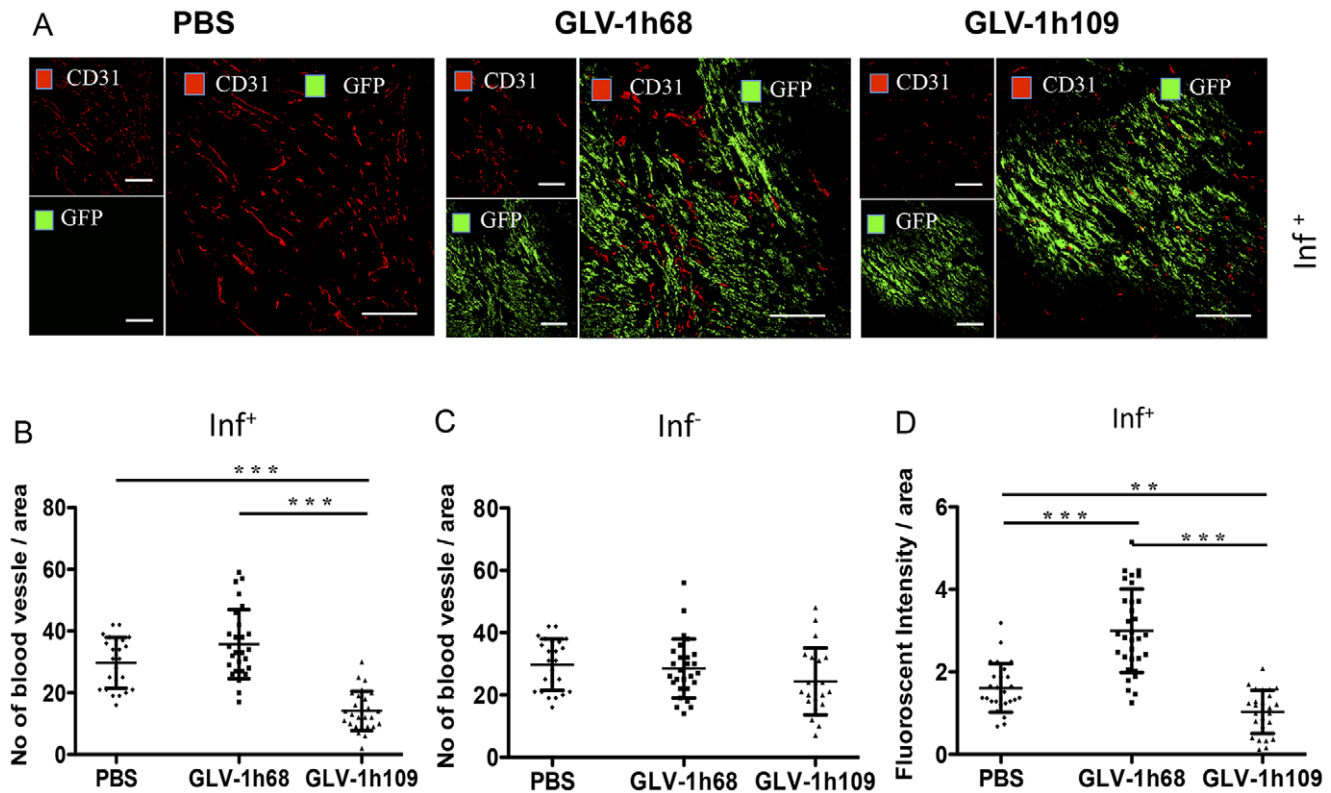


Figure 8. Determination of vascular density using CD31 immunohistochemistry in virus-treated (GLV-1h68, GLV-1h109) and non-treated (PBS) tumors at 7 dpvi. A–C: Blood vessel density in virus-infected (A, B; Inf^+) and virus non-infected (C; Inf^-) STSA-1 tumor areas. The vascular density was measured in CD31-labeled tumor cross-sections ($n=3$ mice per group, 18 images per mice) and presented as mean values \pm SD. (*** $P<0.001$, ** $P<0.01$, Student's t-test). D: Fluorescence intensity of the CD31 signal in virus-infected (Inf^+) STSA-1 tumor areas. The fluorescence intensity of the CD31-labelling represented the average brightness of all vessel-related pixels (VRP) and determined as described [3,16]. The fluorescence signal is a rate of CD31 expression in the blood vessels and was measured in 18 images of each tumor ($n=3$ mice per group). Shown are the mean values \pm SD. (*** $P<0.001$, ** $P<0.01$, Student's t-test). doi:10.1371/journal.pone.0047472.g008

The results demonstrated that the GLV-1h109 is oncolytic to both canine cancer cell lines, however the rate of oncolysis was faster in STSA-1 cells than DT08/40 cells.

GLV-1h109 Efficiently Replicates in STSA-1 and DT08/40 Tumor Cells

One of the factors that regulate the oncolytic potential of OV is their ability to infect and/or efficiently replicate in cancer cells. To determine whether variation in the rate of oncolysis was due to differences in the rate of replication, STSA-1 and DT08/40 cells were infected with either GLV-1h109 or GLV-1h68 at a MOI of 0.1. Standard plaque assay was performed for all samples to determine the viral titers at different time points during the course of infection (Fig. 4). The maximum viral titers (total) were observed at 48 hours post virus infection (hpvi) in STSA-1 cells for both GLV-1h68 (2.98×10^6 pfu/ml) and GLV-1h109 (3.01×10^6 pfu/ml) (Fig. 4A). In addition, GLV-1h68 and GLV-1h109 viruses can also efficiently infect and replicate in DT08/40 cells with a maximum yield of 1.23×10^6 pfu/ml and 1.56×10^6 pfu/ml at 72 hpvi respectively (Fig. 4B). The highest titer of GLV-1h109 in STSA-1 cells at 48 hrs was nearly twice than highest titer of GLV-1h109 in DT08/40 cells at 72 hrs, indicating that GLV-1h109 replicates better and faster in STSA-1 cells (** $P=0.00004$; Student's t-test).

However, the replication efficiency of GLAF-1 expressing GLV-1h109 strain was similar to that of the parental GLV-1h68 virus in both the canine cancer cell lines.

GLV-1h109-infected STSA-1 and DT08/40 Cells Express scAb GLAF-1 and Beta Glucuronidase (GusA)

The efficiency of viral expression was also monitored by detecting anti-VEGF scAb GLAF-1 and beta glucuronidase (GusA) proteins in GLV-1h109 infected STSA-1 or DT08/40 cells. For this purpose, 10^6 STSA-1 or DT08/40 cells were infected either with GLV-1h109 or GLV-1h68 (control) at an MOI of 1.0 in 6 well plates. Supernatants and lysates were harvested and analyzed in Western Blot using anti-GLAF-1, anti-GusA or anti- β -actin antibodies. The β -actin was used as a loading control and GusA was chosen as an additional protein for monitoring of the viral-dependent protein expression.

The results for virus-infected STSA-1 cells are shown in Figure 5. GLAF-1 protein of expected size (30 kDa) was detected in both lysates and supernatants of GLV-1h109-infected STSA-1 cells (Fig. 5B). Similar expression of GLAF-1 protein was detected in GLV-1h109 infected DT08/40 (Figure S1). No protein of similar size was detected in GLV-1h68 infected or uninfected cells of both cancer types. This is evidence that the GLAF-1 protein was successfully expressed and secreted in both canine cancer cell lines.

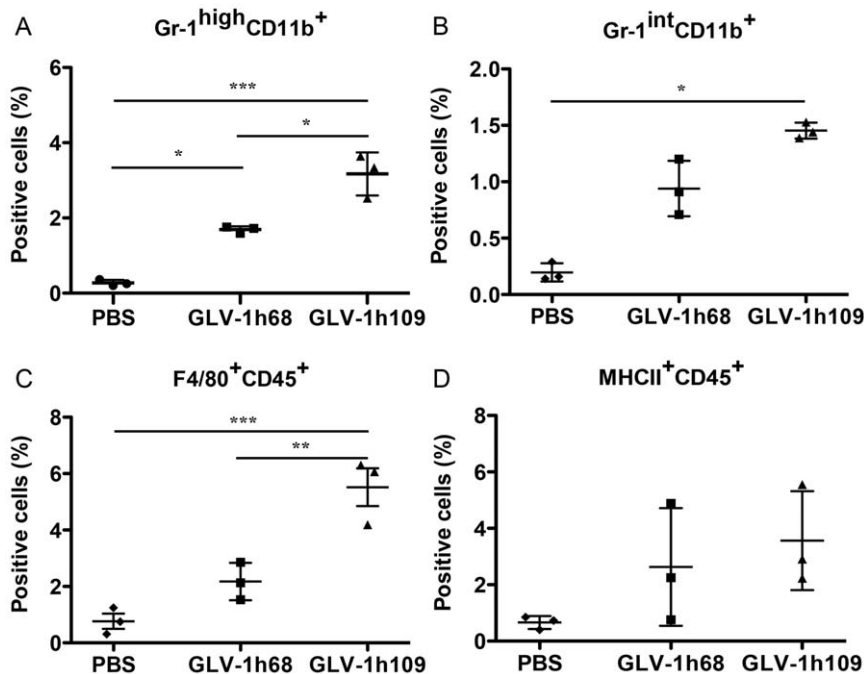


Figure 9. Presence of immune cells in tumors of STSA-1 xenografted mice 7 days after GLV-1h68-, GLV-1h109- or PBS-treatments. Percentage of (A) Gr-1^{high}CD11b⁺ (MDSCs, granulocytes), (B) Gr-1^{int}CD11b⁺ (MDSCs, monocytes), (C) F4/80⁺CD45⁺ (macrophages) or (D) MHCII⁺CD45⁺ (mainly B cells, macrophages and dendritic cells) cells in tumors of STSA-1 xenografted mice. Experiments were done twice with at least 3 mice per group. The data are presented as mean values \pm SD. The statistical significance was analyzed using one-way ANOVA followed Bonferroni's multiple comparison test (*** P <0.001, ** P <0.01, * P <0.05). The Anti-Gr-1 mAb (RB6-8C5) has long been used to stain MDSCs and allows the distinction of at least two subsets of granulocytes (Gr-1^{high}CD11b⁺) and monocytic cells (Gr-1^{int}CD11b⁺). doi:10.1371/journal.pone.0047472.g009

Systemic Administration of GLV-1h109 Virus Significantly Regresses Growth of STSA-1 and DT08/40 Derived Tumors in Nude Mice

Female nude mice [Hsd: Athymic Nude-*Foxn1*^{tm1}; Harlan, Holland] ($n=6$ /group) at an age of 6–8 weeks were implanted with 1×10^6 STSA-1 cells. Four weeks post implantation, all mice developed tumors with volumes of 600 to 1000 mm³. Animals were separated into two groups ($n=6$) and were injected with a single dose of GLV-1h109 (5×10^6 pfu) or PBS (100 μ l) into the tail vein intravenously (i.v.). As shown in **Fig. 6A** the virus treatment led to a significant tumor regression of all GLV-1h109-virus-treated mice. In contrast, due to excessive tumor burden (>3000 mm³), all animals of the PBS control group were euthanized after 14 dpvi.

The therapeutic effect of GLV-1h109 was also evaluated on the progression of canine prostate carcinoma DT08/40 tumors in nude mice by measuring the tumor volume at various time points. The tumors were generated by implanting 5×10^6 canine prostate carcinoma cells DT08/40 subcutaneously into the right hind leg of 6- to 8-week-old nude mice [Hsd: Athymic Nude-*Foxn1*^{tm1}; Harlan, Holland]. Forty-nine days after tumor cell implantation, groups of mice ($n=6$ /group) were injected (i.v.) either with 5×10^6 pfu of GLV-1h109 virus or PBS (control). Data demonstrated that a single injection with GLV-1h109 vaccinia virus led to significant inhibition of the tumor growth (* p <0.05) of all virus-treated mice in comparison to the control PBS animals (**Fig. 6B**).

Finally, the toxicity of the GLV-1h109 virus was determined by monitoring the relative weight change of mice over time (**Fig. 6C, D**). All GLV-1h109 treated mice showed stable mean weight over the course of studies. There were no signs of virus-mediated toxicity.

Biodistribution of GLV-1h109 Virus and Presence of scAb GLAF-1 in Tumor-bearing Nude Mice

The GLV-1h109 distribution in STSA-1 and DT08/40 xenografts was analyzed at the last time points after virus treatment. **Table 1** summarizes the virus distribution data in both xenograft models. The highest viral titers were identified in primary tumors of virus-treated mice (**Table 1**). Interestingly, the mean GLV-1h109 titers in primary solid tumors of STSA-1 xenografts at 35 dpvi were about 10^4 fold higher than that of DT08/40 xenografts at 49 dpvi. In addition, we found presence of plaque forming units in some organs of virus-injected STSA-1 mice, but not in the virus-treated DT08/40 xenografts. However, the number of GLV-1h109 virus particles in the healthy tissues were negligible; e.g. in whole organs: livers (mean weight 1.2 g) about 89 pfu; lungs (mean weight 0.142 g) about 19 pfu and spleens (mean weight 0.2 g) about 10 pfu at 35 dpvi (Table 1, here the pfu were given per gram of organ). In contrast, we found about 10^4 – 10^5 fold more GLV-1h109 pfu in solid tumors at this time point, which clearly shows that GLV-1h109 virus displays an enhanced tumor specific replication.

Using fluorogenic probes activated specifically by virus-mediated glucuronidase (GusA), we have recently shown that the detection of GusA in the serum could be used to evaluate successful tumor colonization and/or transgene expression of oncolytic vaccinia virus in tumor-bearing mice [15]. Therefore, in this study we tested the presence and persistence of scAb GLAF-1 protein in combination with the GusA virus marker (**Fig. 7A, B**).

The maximal yield of scAb GLAF-1 in the serum of GLV-1h109-injected STSA-1 xenografts was about nine-fold higher than corresponding DT08/40 xenografts at 7 dpvi. Interestingly, maximal presence of scAb GLAF-1 protein in serum was a week

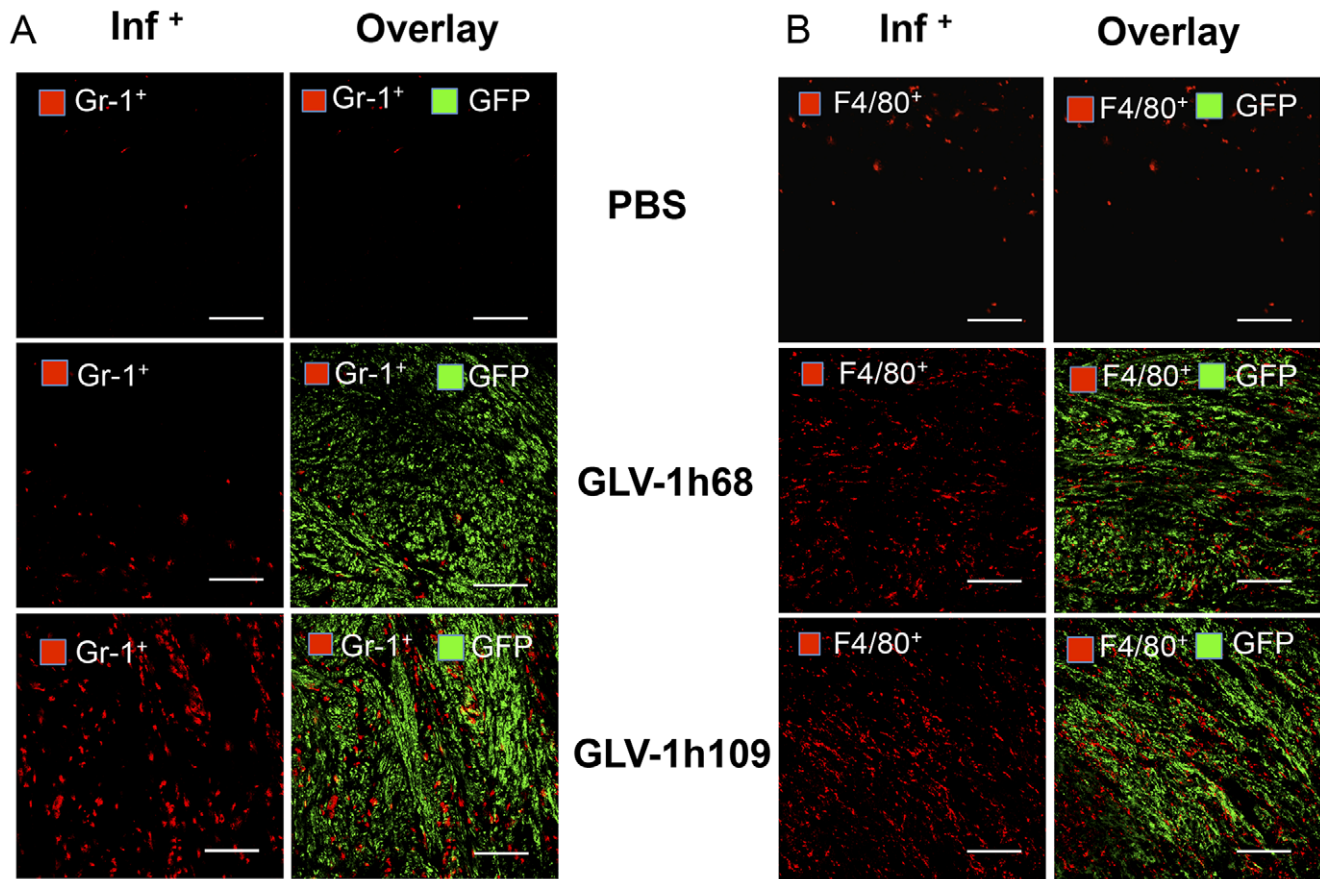


Figure 10. Immunohistochemical staining of infected and uninfected STSA-1 xenograft tumors at 7 dpvi for MDSCs (A) or macrophages (B). Tumor-bearing mice were either infected with GLV-1h109 or GLV-1h68 or mock treated (PBS). Cryosections (10 μ m-thick) of tumors were labeled with either anti- Gr-1 (Ly-6G) antibody (A) for MDSCs (granulocytes) or anti- F4/80⁺ antibody (B) for macrophages; both red. Virus infection and/or phagocytosis was indicated by GFP fluorescence (green). Overlays represented inf⁺(Gr-1⁺)/GFP. Scale bars, 500 μ m. (200 \times magnification).

doi:10.1371/journal.pone.0047472.g010

earlier than the maximal GusA-signal in both the xenograft models (Fig. 7A, B). These different kinetics could be due to the fact that GLAF-1 is secreted while GusA is only released to the blood stream via cell lysis. The presence of GLAF-1 in the tumors of GLV-1h109 injected mice was analyzed using Western Blot. The GLAF-1 protein was detected even at the last points of treatment in both xenograft models (Fig. 7C). In addition, we clearly detected the GLAF-1 protein in GLV-1h109-treated STSA-1 tumor sections (Fig. 7D).

The results demonstrated that analysis of scAb GLAF-1 in the serum could also be used as a pharmacokinetic marker for virus colonization and persistence in GLV-1h109-injected xenograft mice.

Colonization of GLV-1h109 in STSA-1 Tumor Xenograft Significantly Inhibits Development of Tumor Vasculature

STSA-1 cells express 9–16 times more VEGF than DT08/40 cells as well as expression of scAb GLAF-1 was higher in STSA-1 xenografts than DT08/40 xenografts. In addition, an anti-VEGF strategy was successfully evaluated in dogs with canine soft tissue sarcomas [12]. Considering all these factors, the effects of GLV-1h109 on tumor vasculature and tumor microenvironment were tested in STSA-1 xenograft model only.

To test a possible anti-VEGF effect of the GLAF-1 antibody on tumor angiogenesis and vasculogenesis, we analyzed the CD31-positive vascular network in tissue sections of GLV-1h109, GLV-1h68 and PBS-treated STSA-1 tumors by fluorescence microscopy. For this purpose, CD31-labelled cross sections of tumors from PBS-, GLV-1h68- and GLV-1h109- treated mice were used for determination of the vascular density at the day 7 after treatment (Fig. 8). The data revealed that the vascular density of GLV-1h109-infected tumors was significantly decreased in comparison to that of GLV-1h68- and PBS -injected control tumors (GLV-1h109 vs. GLV-1h68 ***P=0.0000672; GLV-1h109 vs. PBS ***P=0.000255) (Fig. 8A, B). Interestingly, a significant reduction of the vascular density was observed in GFP positive areas of tumor sections (Fig. 8C; inf⁺), but not in the corresponding GFP negative areas of tumor sections (Fig. 8C; inf⁻), indicating that the reduction in vascular density is mediated by virus infection. The vascular density between infected (inf⁺) areas of GLV-1h109 tumor was also significantly lower than non-infected (inf⁻) areas (inf⁺ GLV-1h109 (Fig. 8B) vs. inf⁻ GLV-1h109 (Fig. 8C); ***P=0.000534). In addition, fluorescence intensity of the CD31 signal was measured in immunohistochemically stained (inf⁺)-sections of STSA-1 tumors (Fig. 8D). The results revealed that the fluorescence intensity (vessel-related pixels) of GLV-1h109 virus-infected tumors was significantly decreased in comparison to GLV-1h68 or PBS-injected control tumors (GLV-1h109 vs. PBS

P = 0.0051; GLV-1h109 vs. GLV-1h68 *P = 0.00001). This means that only the GLV-1h68 virus colonization led to an up-regulation of CD31 protein. However, there was significant decrease in fluorescence intensity of GLV-1h109-infected tumors, which might be due to the reduction in the vascular density after treatment with this virus.

The results demonstrated that the virus colonization in combination with the scAb GLAF-1 led to local inhibition of the blood vessel development in the GLV-1h109 virus-infected tumor tissue only.

GLV-1h109 Colonization Induces Massive Infiltration of Innate Immune Cells in STSA-1 Xenografts

To investigate potential roles of innate immune cells in the anti-tumor mechanism, we analyzed the effect of virus infection on host immune cells in tumors of STSA1-tumor-bearing mice. Single cell suspensions prepared from STSA-1 tumors, resected 7 days after the treatment were analyzed by flow cytometry for the presence of host immune cells (**Fig. 9**). The presence of various leukocytes was assessed using cellular antigen-specific markers. We used CD45 (leukocyte common antigen), Gr-1 antigen (Ly6C/Ly6G) of MDSCs, CD11b (Mac-1, mainly myeloid cells), F4/80 (macrophages) and MHC II (B cells, monocytes, macrophages and dendritic cells) to visualize the respective cell types in STSA-1 tumors. The tumor-derived Gr-1⁺CD11b⁺ cells consisted of 2 major subfractions based on differential Gr-1 expression, high (Gr-1^{high}) and intermediate (Gr-1^{int}). It is known that a Gr-1^{high}, mainly composed of immature and mature granulocytes, and a Gr-1^{int}, comprising monocytes and other immature myeloid cells [18]. In these experimental settings we found a significant increase of Gr-1^{high} CD11b⁺, Gr-1^{int} CD11b⁺ and F4/80⁺CD45⁺ cells in the GLV-1h109 infected tumors compared with GLV-1h68- or PBS-injected tumors (**Fig. 9A, B, C**). No significant differences were determined in the percentage of MHCII⁺CD45⁺ cells within GLV-1h109 and GLV-1h68 treated tumors (**Fig. 9D**).

An additional immunohistochemical examination confirmed the increased accumulation of MDSCs and macrophages in GLV-1h109-infected tumors as compared to PBS or GLV-1h68-infected tumors (**Fig. 10**). Interestingly, the MDSCs (mainly Gr-1^{high} granulocytes) cells were mostly co-localized with virus in infected tumor regions (**Fig. 10A**), whereas the macrophages were diffusely distributed throughout the tumor (**Fig. 10B**).

We used the Gr-1^{high} CD11b⁺ cells as markers for monitoring viral infection on a systemic level. For this purpose, a parallel flow cytometric analysis of Gr-1^{high} CD11b⁺ on peripheral blood was performed. There was no significant difference between the number of the Gr-1^{high} CD11b⁺ cells in peripheral blood of the viruses or PBS-infected STSA-1 xenografted mice (**Figure S2**). These data suggest that the changes in granulocytic MDSCs were not systemic, but rather due to a change in recruitment and/or persistence within the tumors.

Finally, we also analyzed the direct virus interaction with cells of the host immune system at 7 dpvi. At this time point, 0.11% and 0.37% of Gr-1^{high} CD11b⁺ (MDSCs, granulocytes), 0.06% and 0.15% of Gr-1^{int}CD11b⁺ (MDSCs, monocytes) and 0.24% and 0.81% of F4/80⁺CD45⁺ (macrophages) were GFP-positive in GLV-1h68 and GLV-1h109-infected tumors, respectively (**Table 2**). This indicates that either these immune cells were infected with vaccinia virus or they had phagocytized virus-infected tumor cells. We found also that GLV-1h109 more efficiently infects both tumor and host immune cells, compared to GLV-1h68 (**Table 2**).

Discussion

Several oncolytic viruses including adenovirus strains CAV-1 and CAV-2 [22], canine distemper virus [23] and vaccinia virus strains GLV-1h68 and LIVP1.1.1 [4,24,25] have been used for canine cancer therapy in preclinical studies [3,26]. Our data demonstrated that treatment with oncolytic vaccinia virus GLV-1h109 carrying anti-VEGF scAb GLAF-1 regresses the growth of canine prostate carcinoma and canine soft tissue sarcoma xenografts by oncolysis, inhibition of tumor angiogenesis and recruitment of innate immune cells into tumor tissue.

In the current study, we investigated for the first time the oncolytic vaccinia virus strain GLV-1h109 expressing an anti-VEGF single-chain antibody GLAF-1 as a possible therapeutic agent against canine soft tissue sarcoma and canine prostate carcinoma. GLV-1h109 was able to effectively infect, replicate in and lyse these canine cancer cells in culture. The virus infection led to expression of anti-VEGF scAb GLAF-1 protein in both cell lines (**Fig. 5**). Part of the produced scAb GLAF-1 was specifically secreted into the supernatant of the virus-infected cells (**Fig. 5, Figure S1**). The secretion of scAb GLAF-1 by the infected cell might lead to its quick delivery to surrounding tumor tissue and further binding to VEGF (**Fig. 7C**). In addition, tumor-specific virus infection led to a continued presence of scAb GLAF-1 in peripheral blood (**Fig. 7A and B**). Data clearly demonstrated that scAb GLAF-1 could be useful as a pharmacokinetic marker for virus colonization and persistence in GLV-1h109-injected xenograft mice (**Fig. 7**). These findings have also very well demonstrated the application of our virus-based system for efficient expression and distribution of recombinant antibodies in the tumorigenic host. Recently we have reported that virus-encoded scAb GLAF-1 led to an enhanced therapeutic effect in different human tumor xenograft models, compared with oncolytic viral therapy with the prototype strain GLV-1h68 alone [7]. We have postulated that this enhancement may be caused by the continuous production of the anti-VEGF scAb in colonized tumors. This possible VEGF blockade and the proximate anti-angiogenesis effects would enhance therapeutic efficacy. In order to test this assumption, we analysed the virus-mediated oncolytic and immunological effects of GLV-1h109 in xenograft mice bearing STSA-1 tumors. The data have revealed that GLV-1h109 achieved a significant inhibition of tumor growth and damage of tumor tissues in both tested canine xenografts models. One of the most important purposes of the study was to determine whether the virus-encoded scAb GLAF-1 could elicit therapeutic anti-VEGF responses. We selected STSA-1 xenografted mice to study the effects of scAb GLAF-1 on tumor angiogenesis, because the canine soft tissue sarcoma STSA-1 cells have shown a high level of VEGF expression (**Fig. 2**). In addition, we observed a nine-fold higher expression of scAb GLAF-1 in the serum of GLV-1h109-injected STSA-1 xenografted mice than corresponding DT08/40 xenograft-bearing animals at 7 dpvi (**Fig. 7A and 7B**). However, higher serum GLAF-1 concentration in STSA-1 xenografts might be due to the enhanced replication efficacy of GLV-1h109 in STSA-1 cells (**Fig. 4**).

A CD31 immunohistological staining of STSA-1 tumor sections revealed a significant decrease in the number of blood vessels of GLV-1h109 infected tumors, when compared to GLV-1h68- and PBS-injected control tumors at 7 dpvi (**Fig. 8**). The drastic reduction of the vascular density of tumors might be due to the presence of the scAb GLAF-1 in tumor tissue and blood of the GLV-1h109-treated STSA-1 mice. Interestingly, the significant reduction in vascular density was observed in virus-infected areas only. It is considerable that tumor microenvironment character-

Table 2. Percentage of GFP positive cells in virus-treated STSA-1 tumors.

Cell Markers	Virus GLV-1h68	Virus GLV-1h109	P-value GVL-1h68 vs. GVL-1h109	Positive cells
GFP ⁺	8.67% ± 4.5%	14.27% ± 1.8%	*(P = 0.039)	total GFP-positive cells
GFP ⁺ / Gr-1 ^{high} CD11b ⁺	0.11% ± 0.073%	0.37% ± 0.051%	***(P = 0.006)	GFP-positive tumor associated MDSCs (granulocytes)
GFP ⁺ / Gr-1 ^{int} CD11b ⁺	0.06% ± 0.043%	0.15% ± 0.073%	*(P = 0.042)	GFP-positive tumor associated MDSCs (monocytes)
GFP ⁺ /F4/80 ⁺ CD45 ⁺	0.24% ± 0.072%	0.81% ± 0.28%	*(P = 0.028)	GFP-positive tumor associated macrophages

Percentage GFP-positive cells in tumors of STSA-1 xenografted mice 7 days after GLV-1h109- or GLV-1h68-treatments. Experiments were done twice with at least 3 mice per group. The data are presented as mean values +/- standard deviations. The statistical significance was analyzed using two-tailed unpaired Student's test (**P<0.01, *P<0.05).

doi:10.1371/journal.pone.0047472.t002

ized by interstitial hypertension interferes with intratumoral spread (diffusion) of therapeutic agents [27]. The increased interstitial hypertension in the tumor tissue is the result of abnormal vasculature. Unlike normal blood vessels, tumor vasculature is structurally and functionally abnormal [28]. This abnormal vasculature in STSA-1 tumor xenograft might inhibit intratumoral spread of GLAF-1 protein, which could be the reason for its localized effect. Moreover, effect of GLAF-1 showing decreased vascular density in STSA-1 tumor xenografts is well supported by the previous findings which demonstrated that the treatment with GLV-1h68 and another GLAF-1-negative oncolytic vaccinia virus strain LIVP1.1.1, did not affect the blood vessel density of STSA-1 tumors [4]. We have also shown that GLAF-1 could specifically bind to canine VEGF (Fig. 1). Cross reactivity of GLAF-1 with VEGFs from other species apart from human and mouse was not tested. It was important to know whether GLAF-1 could bind and inhibit canine VEGF. The GLAF-1-binding to VEGF from both canine and mouse origins is advantageous in our canine xenograft models, as blocking of the two VEGF forms could be important for therapeutic efficacy [29].

To investigate the GLV-1h109 virus interactions with the host immune cells we analyzed the innate immune response in the early phase of virus infection by flow cytometry. Data demonstrated a significantly increased accumulation of host immune cells including granulocytic MDSCs and macrophages in GLV-1h109-infected tumors as compared to PBS or GLV-1h68-infected tumors (Fig. 9). On the other hand, a significant reduction of the blood vessel density of GLV-1h109 treated STSA-1 tumors was observed when compared to both controls; GLV-1h68 and PBS (Fig. 8). A possible reason for this phenomenon may be that the GLV-1h109-treatment led to "vascular normalization" in tumor tissue, as described by Winker and colleagues [30]. The "changed" vasculature seems to allow an increased intratumoral infiltration of MDSCs and macrophages in the tumor bed. Interestingly, MDSCs and macrophages may be associated with both pro- and anti-tumoral activities (for reviews, see [31–34]).

Several recent studies have described that virotherapy with vaccinia viruses induces massive tumoral infiltration of MDSCs resembling neutrophils, that may be exerting antitumor effects in vivo through a number of different mechanisms [35–37]. In this context, Breitbach and colleagues have postulated that neutrophils (Gr-1⁺ cells) could mediate antitumor effects by the induction of vascular collapse in tumors [36]. In addition, a recent study has identified a cytotoxic population (N1) of tumor associated

neutrophils expressing CD11b⁺Ly6G⁺, capable of killing tumor cells [38]. In the current work, we found evidence of direct interactions of vaccinia virus or virus-infected cells with MDSCs and macrophages in the STSA-1 tumor tissue (Table 2; GFP-positive cells). Others and we have recently reported that these interactions may increase the activation and strength of host antitumor immune responses [4,37–39]. Therefore, we think that the interactions of MDSCs and macrophages with vaccinia virus in the tumor bed may be crucial for the success of the virotherapy.

In conclusion, systemic administration of oncolytic vaccinia virus GLV-1h109 expressing an anti-VEGF single-chain antibody led to significant inhibition of angiogenesis and tumor growth as well as to increased infiltration of innate immune cells in the treated canine tumors.

Supporting Information

Figure S1 Expression of GLV-1h109 mediated proteins GLAF-1 and GusA in canine soft tissue sarcoma DT08/40 cells. DT08/40 cells were infected with either GLV-1h109, GLV1h 68 virus at an MOI of 1 or PBS. Protein fractions from cell lysate and culture supernatant were isolated at different time points and separated by SDS/PAGE. Western blot analysis was performed using an anti-DDDDK antibody against scAb GLAF-1 and anti-GusA antibody as described in material and methods. (TIF)

Figure S2 Presence of Gr-1^{high} CD11b⁺ cells (granulocytic MDSCs) in peripheral blood of virus-infected and non-infected STSA-1 xenografts at 7 dpvi. Experiments were done twice with at least 3 mice per group. The data are presented as mean values +/- SD. (TIF)

Acknowledgments

We thank Ms. Johanna Langbein-Laugwitz, Mr. Jason Aguilar and Mr. Terry Trevino for technical support, Dr. Z. Sokolovic for critical reading of the manuscript and Dr U. Fischer and Dr. H. Murua Escobar for helpful discussions.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: IG SSP MA UD MH AAS. Performed the experiments: SSP IG MA UD MH SW. Analyzed the data: IG SSP MA AF AAS. Contributed reagents/materials/analysis tools: UD IN AF. Wrote the paper: IG SSP AAS.

References

- Merlo DF, Rossi L, Pellegrino C, Ceppi M, Cardellino U, et al. (2008) Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *J Vet Intern Med* 22: 976–984.
- Kelsey JL, Moore AS, Glickman LT (1998) Epidemiologic studies of risk factors for cancer in pet dogs. *Epidemiol Rev* 20: 204–217.
- Patil SS, Gentschev I, Nolte I, Ogilvie G, Szalay AA (2012) Oncolytic virotherapy in veterinary medicine: current status and future prospects for canine patients. *J Transl Med* 10: 3.
- Gentschev I, Adelfinger M, Josupeit R, Rudolph S, Ehrig K, et al. (2012) Preclinical evaluation of oncolytic vaccinia virus for therapy of canine soft tissue sarcoma. *PLoS One* 7: e37239.
- Reimann-Berg N, Willenbrock S, Murua Escobar H, Eberle N, Gerhauser I, et al. (2011) Two new cases of polysomy 13 in canine prostate cancer. *Cytogenet Genome Res* 132: 16–21.
- Zhang Q, Yu YA, Wang E, Chen N, Danner RL, et al. (2007) Eradication of solid human breast tumors in nude mice with an intravenously injected light-emitting oncolytic vaccinia virus. *Cancer Res* 67: 10038–10046.
- Frentzen A, Yu YA, Chen N, Zhang Q, Weibel S, et al. (2009) Anti-VEGF single-chain antibody GLAF-1 encoded by oncolytic vaccinia virus significantly enhances antitumor therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 12915–12920.
- Falkner FG, Moss B (1990) Transient dominant selection of recombinant vaccinia viruses. *J Virol* 64: 3108–3111.
- Liang WC, Wu X, Peale FV, Lee CV, Meng YG, et al. (2006) Cross-species vascular endothelial growth factor (VEGF)-blocking antibodies completely inhibit the growth of human tumor xenografts and measure the contribution of stromal VEGF. *J Biol Chem* 281: 951–961.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9: 669–676.
- Folkman J (2007) Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 6: 273–286.
- Kamstock D, Elmslie R, Thamm D, Dow S (2007) Evaluation of a xenogeneic VEGF vaccine in dogs with soft tissue sarcoma. *Cancer Immunol Immunother* 56: 1299–1309.
- Quesada AR, Medina MA, Alba E (2007) Playing only one instrument may be not enough: limitations and future of the antiangiogenic treatment of cancer. *Bioessays* 29: 1159–1168.
- Gerber HP, Ferrara N (2005) Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res* 65: 671–680.
- Hess M, Stritzker J, Hartl B, Sturm JB, Gentschev I, et al. (2011) Bacterial glucuronidase as general marker for oncolytic virotherapy or other biological therapies. *J Transl Med* 9: 172.
- Weibel S, Stritzker J, Eck M, Goebel W, Szalay AA (2008) Colonization of experimental murine breast tumours by *Escherichia coli* K-12 significantly alters the tumour microenvironment. *Cell Microbiol* 10: 1235–1248.
- Gentschev I, Muller M, Adelfinger M, Weibel S, Grummt F, et al. (2011) Efficient colonization and therapy of human hepatocellular carcinoma (HCC) using the oncolytic vaccinia virus strain GLV-1h68. *PLoS One* 6: e22069.
- Peranzoni E, Zilio S, Marigo I, Dolcetti L, Zanovello P, et al. (2010) Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Curr Opin Immunol* 22: 238–244.
- de Queiroz GF, Dagli ML, Fukumasu H, Zavala AA, Matera JM (2010) Vascular endothelial growth factor expression and microvascular density in soft tissue sarcomas in dogs. *J Vet Diagn Invest* 22: 105–108.
- Zizzo N, Patruno R, Zito FA, Di Summa A, Tinelli A, et al. (2010) Vascular endothelial growth factor concentrations from platelets correlate with tumor angiogenesis and grading in a spontaneous canine non-Hodgkin lymphoma model. *Leuk Lymphoma* 51: 291–296.
- Patruno R, Arpaia N, Gadaleta CD, Passantino L, Zizzo N, et al. (2009) VEGF concentration from plasma-activated platelets rich correlates with microvascular density and grading in canine mast cell tumour spontaneous model. *J Cell Mol Med* 13: 555–561.
- Hemminki A, Kanerva A, Kremer EJ, Bauerschmitz GJ, Smith BF, et al. (2003) A canine conditionally replicating adenovirus for evaluating oncolytic virotherapy in a syngeneic animal model. *Mol Ther* 7: 163–173.
- Suter SE, Chein MB, von Messling V, Yip B, Cattaneo R, et al. (2005) In vitro canine distemper virus infection of canine lymphoid cells: a prelude to oncolytic therapy for lymphoma. *Clin Cancer Res* 11: 1579–1587.
- Gentschev I, Stritzker J, Hofmann E, Weibel S, Yu YA, et al. (2009) Use of an oncolytic vaccinia virus for the treatment of canine breast cancer in nude mice: preclinical development of a therapeutic agent. *Cancer Gene Ther* 16: 320–328.
- Gentschev I, Ehrig K, Donat U, Hess M, Rudolph S, et al. (2010) Significant Growth Inhibition of Canine Mammary Carcinoma Xenografts following Treatment with Oncolytic Vaccinia Virus GLV-1h68. *J Oncol* 2010: 736907.
- Arendt M, Nasir L, Morgan IM (2009) Oncolytic gene therapy for canine cancers: teaching old dog viruses new tricks. *Vet Comp Oncol* 7: 153–161.
- Padera TP, Stoll BR, Tooredman JB, Capen D, di Tomaso E, et al. (2004) Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. *Nature* 427: 695.
- Jain RK (2001) Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Adv Drug Deliv Rev* 46: 149–168.
- Gerber HP, Kowalski J, Sherman D, Eberhard DA, Ferrara N (2000) Complete inhibition of rhabdomyosarcoma xenograft growth and neovascularization requires blockade of both tumor and host vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 60: 6253–6258.
- Winkler F, Kozin SV, Tong RT, Chae SS, Booth MF, et al. (2004) Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell* 6: 553–563.
- Gregory AD, Houghton AM (2011) Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res* 71: 2411–2416.
- Nathan C (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6: 173–182.
- Ruffell B, Affara NI, Coussens LM (2012) Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol* 33: 119–126.
- Ochando JC, Chen SH (2012) Myeloid-derived suppressor cells in transplantation and cancer. *Immunol Res*.
- Gil M, Bieniasz M, Seshadri M, Fisher D, Ciesielski MJ, et al. (2011) Photodynamic therapy augments the efficacy of oncolytic vaccinia virus against primary and metastatic tumours in mice. *Br J Cancer* 105: 1512–1521.
- Breitbach CJ, Paterson JM, Lemay CG, Falls TJ, McGuire A, et al. (2007) Targeted inflammation during oncolytic virus therapy severely compromises tumor blood flow. *Mol Ther* 15: 1686–1693.
- John LB, Howland IJ, Flynn JK, West AC, Devaud C, et al. (2012) Oncolytic virus and anti-4-1BB combination therapy elicits strong antitumor immunity against established cancer. *Cancer Res* 72: 1651–1660.
- Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, et al. (2009) Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell* 16: 183–194.
- Gentschev I, Donat U, Hofmann E, Weibel S, Adelfinger M, et al. (2010) Regression of human prostate tumors and metastases in nude mice following treatment with the recombinant oncolytic vaccinia virus GLV-1h68. *J Biomed Biotechnol* 2010: 489759.

5 Diskussion

Krebs ist eine allgemeine Bezeichnung für eine große Gruppe von Krankheiten, die den ganzen Körper betreffen kann und durch ein anormales Zellwachstum und Metastasierung gekennzeichnet ist.² Ursachen für Krebs können die Akkumulation von genetischen und epigenetischen Mutationen, Störungen im Immunsystem, chronische Inflammation und virale Infektion sein,^{3,4} daher ist jede Tumorart anders und der Verlauf der Tumorerkrankung unterscheidet sich von Patient zu Patient. Dies ist weiterhin durch die individuelle Zusammensetzung des Tumors, dem Tumormikromilieu, begründet. Das Tumormikromilieu (Stroma) ist aus einer Vielzahl von verschiedenen Zellen und den Komponenten der extrazellulären Matrix zusammensetzt. Neben den malignen Krebszellen gehören dazu unter anderem die Endothelzellen des Blut- und Lymphsystems, Perizyten, Fibroblasten und Zellen aus dem Knochenmark, inklusive verschiedener Immunzellen und mesenchymaler Stammzellen.⁷²⁻⁷⁵ Weitere Bestandteile des Stromas sind Wachstumsfaktoren, Chemokine, Zytokine, Antikörper und Metabolite.⁷¹ Das Tumormikromilieu der meisten Tumore gleicht dem einer chronischen Entzündungsreaktion^{84,85} und in den Tumor rekrutierte Leukozyten werden vom immunsuppressiven Tumormikromilieu dahin gehend beeinflusst, dass diese mittels sezernierten Zytokinen und Chemokinen die Inflammation verstärken und die Angiogenese und das Tumorwachstum weiter fördern.⁹⁶ Diese Zusammensetzung macht jeden Tumor einzigartig und daher sind die Standardtherapien für Krebs (chirurgische Resektion, Chemotherapie, Strahlentherapie) selbst in Kombination nicht in allen Fällen erfolgreich, weswegen Krebs in Deutschland noch immer die zweithäufigste Todesursache ist.⁵

Eine neuartige Behandlung für Krebs ist die Virotherapie. Die Wirkung der Viren beruht hierbei vermutlich auf 4 Mechanismen, die einzeln oder in Kombination auftreten können: die Onkolyse, die Zerstörung der Tumolvaskulatur, die Aktivierung des Immunsystems des Wirts und die Suppression der microRNA-Expression des Wirts. Zusätzlich kann die Expression therapeutischer Gene die onkolytische Wirkung verstärken.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung von 4 verschiedenen *Lister* (*Lister* strain, Institute of Viral Preparations, Moscow, Russia) abgeleiteten Vaccinia-Viren auf die Immunzellpopulation in verschiedenen Tumoren aus dem Menschen und dem Hund im Mausmodell untersucht.

In einer ersten Studie der vorliegenden Arbeit wurde das Virus GLV-1h68 verwendet, um 888-MEL- und 1936-MEL-Tumore zu infizieren. Das GLV-1h68-Virus wurde auf die Basis des Wildtyp-Vaccinia-Virus *Lister* durch die Insertion von 3 Expressionskassetten in den drei

Genloci F14.5L, J2R und A56. genetisch konstruiert. In den 14.5L-Locus wurde das Gen für das Fusionsprotein RUC-GFP kloniert, das eine Detektion infizierter Zellen nach Anregung mit einem blauen Laser ermöglicht. 888-MEL und 1936-MEL sind zwei humane Melanomzelllinien, die im Abstand von 12 Jahren aus derselben Krebspatientin isoliert wurden und in bisherigen Versuchen eine unterschiedliche therapeutische Effizienz aufzeigten. Während die Virusreplikation in Zellkultur in beiden Zelllinien ähnlich effizient verläuft, konnte *in vivo* nur bei 888-MEL-Tumoren nach Infektion mit 5×10^6 pfu GLV-1h68 eine Inhibition des Wachstums beobachtet werden, wohingegen bei 1936-MEL-Tumoren nur eine geringe Verlangsamung des Tumorwachstums stattfand.¹³⁵ Aus diesem Grund wird 888-MEL als *Responder* und 1936-MEL als *Poor-Responder* bezeichnet.

Die durchflusszytometrische Untersuchung der Einzelzellsuspensionen von PBS-injizierten 888-MEL und 1936-MEL Tumoren (n=3) zeigte deutliche Unterschiede zwischen den beiden Tumortypen. Während die PBS-injizierten 888-MEL-Tumore eine hohe Immunzellpopulation, aufwiesen, konnten in den 1936-MEL-Tumoren nur wenige Leukozyten nachgewiesen werden. Für die Makrophagen konnte sogar ein signifikanter Unterschied (**P=0,005) zu den 888-MEL-Tumoren gefunden werden. Diese Analyse demonstriert deutlich, dass die Tumore der beiden Melanomzelllinien aus derselben Krebspatientin unterschiedliche Tumormikromilieus besitzen. Dies könnte daran liegen, dass 888-MEL-Zellen aus einem relativ gut differenzierten Tumor mit einer starken Expression von Melanom-Differenzierungsantigenen isoliert wurden, und nur eine begrenzte Anzahl an genetischen Veränderung besitzen, wohingegen die 1936-MEL-Zellen einen erhöhten Level an genetischer Degeneration und starke Veränderungen in Transkription, in Translation und im Phänotyp aufweisen.¹²³ Eine hohe Anzahl differentiell exprimierter Gene wurden in nicht-infizierten Tumoren beider Zelllinien mittels Microarrays sowohl für die humanen Arrays, die die Transkription in den Tumorzellen verdeutlichen, als auch für die Maus-Arrays, die die Transkription in den Zellen des Wirts zeigen, identifiziert (V. Raab, unveröffentlichte Daten). Hierbei wurde festgestellt, dass die Signalwege des angeborenen Immunsystems in 888-MEL-Tumoren wesentlich aktiver als in 1936-MEL-Tumoren waren.

Beim Vergleich von PBS- und Virus-injizierten Tumoren wurden ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse für die Tumore der beiden Melanomzelllinien gefunden. In 888-MEL-Tumoren sank der prozentuale Anteil der CD45⁺-positiven Leukozyten und F4/80⁺CD45⁺-positiven Makrophagen 7 d nach Infektion der Tumoren mit 5×10^6 pfu GLV-1h68 stark ab, wohingegen dieser in 1936-MEL-Tumoren für Makrophagen unverändert blieb oder im Falle der Leukozyten nur minimal anstieg. 888-MEL-Tumore enthielten weiterhin 7 dpi einen großen Anteil an toten Zellen, wie anhand der durchflusszytometrischen Daten belegt werden

konnte. Es ist daher möglich, dass keine neue Rekrutierung von Immunzellen in die Virus-infizierten 888-MEL-Tumore mehr stattfinden konnte, weil die dafür benötigte Tumorstruktur nicht mehr vorhanden war. Die onkolytische Wirkung von GLV-1h68 dürfte daher, möglicherweise in Kombination mit der Zerstörung der Tumolvaskulatur, für die therapeutische Effizienz in 888-MEL-Tumoren ausreichen.

Interessanterweise konnte bei Infektion der 1936-MEL-Tumoren mit 1×10^7 pfu GLV-1h68 bei kleinerem Tumolvolumen nach 7 dpi sowohl ein höherer prozentualer Anteil an GFP-positiven Zellen gefunden werden als auch eine verstärkte Infiltration von Immunzellen, die für die granulozytären MDSC ($CD11b^+Gr-1^{high}$) sogar signifikant war. Somit konnte belegt werden, dass die Infiltration von Immunzellen in 1936-MEL-Tumore eine direkte Folge der Infektion mit GLV-1h68 war. Diese erhöhte Immunzellpopulation in Kombination mit einem höheren Anteil an GFP-positiven Zellen scheint ausreichend zu sein, um die von S. Weibel in einem unabhängigen Experiment gefundene deutliche Wachstumsverlangsamung 11 dpi zu erklären. Allerdings konnte nicht bestimmt werden, ob allein die onkolytische Wirkung des Virus, die Aktivierung des Immunsystems oder die Kombination dieser beider Mechanismen für die anti-tumorale Wirkung verantwortlich war.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurden die 2 humanen Hepatomzelllinien PLC/RPF/5 und HuH7 bezüglich ihrer Empfänglichkeit für die Therapie mit dem onkolytischen Virus GLV-1h68 in Zellkultur und im Mausmodell getestet. In Zellkultur konnte eine effiziente Virusreplikation sowie zytotoxische Aktivität von GLV-1h68 für beide Hepatomzelllinien beobachtet werden, wobei diese in HuH7-Zellen mit geringer zeitlicher Verzögerung zu PLC-Zellen auftraten. Im Mausmodell wurde ausschließlich für nicht infizierte PLC-Tumoren ein hämorrhagischer Phänotyp beobachtet, der nach Infektion mit 5×10^6 pfu GLV-1h68 verschwand. Eine Analyse der Dichte der Blutgefäße 10 dpi mittels immunhistochemischer Färbung von CD31, das auf Endothelzellen und auf Immunzellen beim Übergang von den Blutgefäßen in ein Gewebe gefunden werden kann, bestätigte die Reduzierung der Anzahl der Blutgefäße in PLC-Tumoren. Für HuH7-Tumore wurden weder der hämorrhagische Phänotyp noch eine Veränderung in der Dichte der Blutgefäße beobachtet. Bei einer zum selben Zeitpunkt durchgeführten Analyse der immunbezogenen Proteinantigene konnte eine signifikante Herunterregulierung von Faktor VII, Fibrinogen, Alpha-Glutathion-S-Transferase und Haptoglobin in Virus-infizierten PLC-Tumoren nachgewiesen werden. Diese Proteine werden nach Verletzung von Blutgefäßen oder im Verlauf von hämorrhagischen Prozessen gefunden. Gleichzeitig wurde eine starke Induktion von Zytokinen wie z.B. TNF- α , IL-12 und IP-10 nachgewiesen, die negative Effekte auf die Vaskularisierung haben. Dies zeigt, dass GLV-1h68 in der Lage ist, durch Einwirkung auf das Tumormikromilieu die Vaskulatur zu normalisieren und damit den hämorrhagischen Prozess zu unterbinden.

Weiterhin wurde bei der Analyse der immunbezogenen Proteinantigene eine Induktion verschiedener Zytokine wie M-CSF, GM-CSF, MCP-1, MCP-3, MCP-5 und MIP-1 β gefunden, die alle an der Rekrutierung von Monozyten, NK-Zellen oder Lymphozyten, bzw. an der Differenzierung zu Makrophagen und Granulozyten beteiligt sind. GM-CSF und M-CSF verursachen eine Differenzierung der rekrutierten Monozyten zum M1-Phänotyp der Tumor-assoziierten Makrophagen hin. M1-Makrophagen stimulieren das Immunsystem aufgrund ihrer Fähigkeit Antigene zu präsentieren, bekämpfen Mikroorganismen und supprimieren das Tumorwachstum. Außerdem sind sie durch die Sekretion von IL-12, TNF- α und CXCL10 gekennzeichnet.¹⁰¹ Für diese Zytokine konnte eine deutliche Zunahme in Virus-infizierten Tumoren nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass durch die Infektion der Tumore mit GLV-1h68 eine Differenzierung der TAM zum Tumor-supprimierenden M1-Phänotyp erzielt werden konnte. Die Induktion all dieser Zytokine 10 dpi fiel in den GLV-1h68-infizierten PLC-Tumoren wesentlich stärker aus, als in Virus-infizierten HuH7-Tumoren, weswegen in den PLC-Tumoren nach Infektion eine stärkere Rekrutierung von Immunzellen stattfinden sollte. Diese Hypothese wurde durch die Untersuchung von Einzelzellsuspensionen von Tumoren beider Zelllinien bestätigt. Während in infizierten HuH7-Tumoren 7dpi im Vergleich zu nicht infizierten Tumoren nur eine geringe Zunahme für MHCII-Positive (B Zellen, Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen), CD19-Positive (B-Zellen) oder Ly6G-Positive (Neutrophile) gefunden wurde und der prozentuale Anteil der F4/80-positiven Makrophagen gleich blieb, konnte in PLC-Tumoren aufgrund der Infektion eine deutliche Zunahme dieser Immunzelltypen nachgewiesen werden, wobei diese für Neutrophile am stärksten ausfiel. Neutrophile können, wie auch Makrophagen, verschiedene Aktivierungs- und Differenzierungszustände annehmen, einen Tumor-supprimierenden (N1) und Tumor-fördernden (N2) Phänotyp.^{112,117} In verschiedenen Studien konnte bereits eine Tumorregression nach massiver Infiltration der Tumore durch Neutrophile gezeigt werden,¹³⁶ wobei Breitbach *et al.* einen induzierten Zusammenbruch der Blutgefäße als Mechanismus postulieren.¹³⁷ Die zytotoxische Wirkung der Neutrophile könnte aber auch durch die Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und reaktiven Sauerstoffspezies erzielt werden.^{112,113} Die Analyse der GFP-positiven Zellen ergab zudem, dass der prozentuale Anteil an infizierten Zellen in PLC-Tumoren deutlich höher war als in HuH7-Tumoren. Dies konnte ebenfalls in Agaroseschnitten nachgewiesen werden. In PBS-Tumoren von HuH7 konnte auch eine starke Färbung für MHCII gezeigt werden, d.h. das Vorhandensein vieler Immunzellen, und in den infizierten Tumoren war eine schwächere Fluoreszenz von GFP im Vergleich zu den PLC-Tumoren erkennbar. Diese schlechtere Infizierbarkeit der HuH7-Tumore könnte durch den höheren Anteil an Immunzellen in nicht infizierten Tumoren und einer damit verbundenen Eliminierung des Virus vor Infektion der Tumorzellen begründet sein. Außerdem könnte sie der Grund für die geringere therapeutische Effizienz von GLV-

1h68 in HuH7-Tumoren im Mausmodell im Vergleich zu PLC-Tumoren sein, da die geringere Infektionsrate eine geringere Infiltration von Immunzellen und damit geringere Produktion von Zytokinen verursachte, wodurch die Differenzierung zu M1-Makrophagen schwächer ausfiel.

Es konnte somit gezeigt werden, dass die Infektion mit GLV-1h68 zu einer Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen führte, wodurch Immunzellen in den Tumor rekrutiert und zu einem Tumor-supprimierenden Phänotyp differenziert wurden. Bei HuH7-Tumoren konnte durch die Kombination aus aktiviertem Immunsystem und onkolytischen Effekt nur eine Inhibition des Wachstums erreicht werden. Für PLC-Tumoren wurde zusätzlich ein positiver Effekt auf die Vaskularisierung beobachtet, der zu einer Reduzierung der Blutgefäßdichte führte. Außerdem konnte für PLC-Tumoren eine Tumorregression beobachtet werden. Somit zeigte sich, dass die Infektion mit GLV-1h68 *in vivo* vom Tumormikromilieu abhängt und dieses auch beeinflussen kann.

Im dritten Teil der Arbeit wurden verschiedene Hunde-Tumorzelllinien in Zellkultur und im Maus-Xenotransplantat mit verschiedenen Viren des Lister-Stammes infiziert und die onkolytischen Auswirkungen, sowie die therapeutische Effizienz bestimmt. Die verwendeten Hundetumorzelllinien waren STSA-1, eine neu isolierte Weichgewebstumorzelllinie, die Prostatakarzinomzelllinie DT08/40, CHAS-Zellen aus einem Melanom und die Osteosarkomzelllinie D17. Weiterhin wurden 4 attenuierte, onkolytische Vaccinia-Viren auf Basis des Lister-Stammes eingesetzt: GLV-1h68, dessen onkolytische Wirkung bereits in verschiedenen Human-^{55,69,135,138-140} und Hunde-Tumorzelllinien¹⁴¹ in Zellkultur und Xenotransplantaten nachgewiesen wurde, GLV-1h109, das für GLAF-1, einen anti-VEGF Antikörper kodiert,³⁸ und die 2 natürlichen Isolate LIVP1.1.1 und LIVP6.1.1, die beide eine Mutation im Gen für die Thymidinkinase tragen.

CHAS-Zellen und D17-Zellen wurden ausschließlich in Zellkultur mit LIVP6.1.1 infiziert, wobei gezeigt werden konnte, dass beide Zelllinien effizient infiziert werden und das Virus gegen beide zytotoxisch wirkt.

In STSA-1-Zellen konnte für alle 4 Viren sowohl eine effiziente Virusreplikation als auch zytotoxische Wirkung nachgewiesen werden, wobei das GLV-1h109-Virus eine identische Virusreplikation, aber eine etwas eher einsetzende Zytotoxizität im Vergleich zu GLV-1h68 zeigte. Nach Infektion mit LIVP-Viren konnten sowohl eine höhere Virusreplikation als auch Zytotoxizität nachgewiesen werden.

Weiterhin wurden die Viren bezüglich ihrer therapeutischen Effizienz im Mausmodell untersucht. Im Fall von GLV-1h68 und LIVP1.1.1 wurden je 1×10^7 pfu Virus zur Infektion der Mäuse eingesetzt. Hier konnte für GLV-1h68 nach einer ersten Wachstumsphase des Tumors, die aufgrund der Virusinfektion im Vergleich zu PBS-Tumoren minimal beschleunigt

war, eine Plateauphase beobachtet werden, wobei 28 dpi dann ein erneutes Wachstum der Tumore einsetzte. Für LIVP1.1.1-infizierte Tumore wurde 11 dpi ein Wachstumsplateau erreicht. Interessanterweise konnte bei Infektion von Tumoren mit einem größeren Tumolvolumen eine vollständige Tumorregression erzielt werden. Die Infektionen mit GLV-1h109 und LIVP6.1.1 wurden mit je 5×10^6 pfu Virus durchgeführt. Bei Infektion mit GLV-1h109 folgte einer Wachstumsphase eine Regression, die in einem Plateau endete, während für LIVP6.1.1 ab 7 dpi eine stetige Tumorregression gemessen wurde. Die LIVP-Viren scheinen somit die größte therapeutische Effizienz in STSA-1 Tumoren aufzuweisen. Allerdings konnte in verschiedenen Organen von LIVP1.1.1-infizierten Mäusen 7 dpi Virus nachgewiesen werden, wodurch die höhere Virulenz, bzw. geringere Attenuierung des Virus belegt wurde. An Tag 35 dpi konnten alle 4 Viren in verschiedenen Organen gefunden werden. Dies lässt auf eine Infektion möglicher Metastasen schließen, wie es bereits für das PC-3 Tumormodell gezeigt wurde,¹⁴⁰ oder die Undichtigkeit der Tumorblutgefäße und damit verbundene zirkulierende, Virus-infizierte Tumorzellen oder Zellpartikel, die in den stark durchbluteten Organen Lunge, Leber und Milz hängen geblieben sind.

Um herauszufinden, warum die verschiedenen Viren unterschiedliche therapeutische Effizienz zeigen, wurden die Tumolvaskulatur und die im Xenotransplantat vorhandenen Zellen des Wirtsimmunsystems, beides Komponenten des Tumormikromilieus, untersucht. Bei der Untersuchung der Blutgefäßdichte von PBS-, GLV-1h68- und LIVP1.1.1-injizierten Tumoren mittels CD31-Färbung wurde eine geringe, aber nicht signifikante Reduktion in Virus-infizierten Tumoren im Vergleich zu PBS-Tumoren festgestellt. Nur die Infektion mit GLV-1h109 und der damit verbundenen Virus-vermittelten Expression von GLAF-1, einem Antikörper gegen VEGF, führte zu einer signifikanten Reduktion der Blutgefäßdichte, allerdings nur in infizierten Bereichen, obwohl die Sekretion von GLAF-1 in Zellkultur gezeigt werden konnte und auch im Blut und Tumorgewebe der Antikörper nachgewiesen wurde. Dies bedeutet, dass GLAF-1 als Marker für eine erfolgte Infektion und Persistenz des Virus genutzt werden kann, und es zeigt darüber hinaus, dass es möglich ist, mit Hilfe von genetisch veränderten Viren gezielt Antikörper im Tumor zu produzieren und sezernieren. Weiterhin zeigte sich, dass die Intensität der CD31-Färbung in GLV-1h68- und LIVP1.1.1-infizierten Tumoren signifikant anstieg. Für LIVP6.1.1 wurde die Fluoreszenzintensität nicht bestimmt. Da CD31 ein Marker für Endothelzellen und Immunzellen beim Übergang von Blutgefäßen in ein Gewebe ist, könnte dies ein erstes Anzeichen für eine erhöhte Immunzellpopulation nach Virusinfektion sein. Für GLV-1h109 wurde eine Reduktion der Fluoreszenzintensität gemessen, die vermutlich auf der gleichzeitigen Reduktion der Blutgefäßdichte begründet ist und daher keinen Rückschluss auf einwandernde Immunzellen zulässt. Außerdem ist auf den CD31-gefärbten Tumorschnitten erkennbar, dass die Blutgefäße kleiner sind und einen geringeren Durchmesser aufweisen. Dies wiederum deutet

auf die Normalisierung der Blutgefäße hin. Hierdurch würde die Versorgung mit Sauerstoff verbessert, der für eine Strahlentherapie wichtig ist, aber auch ein besserer Transport von Chemotherapeutika im Zuge einer Kombinationstherapie könnte ermöglicht werden.⁸⁹

Die Untersuchung der Immunzellpopulation von PBS- und Virus-injizierten Tumoren zeigte in PBS-Tumoren eine geringe Immunzellpopulation, vergleichbar mit den humanen PLC-Tumoren und eine Erhöhung der untersuchten Immunzellen 7 dpi in allen Virus-infizierten Tumoren. Diese war, wie bereits für die humanen PLC-Tumoren beobachtet, für Neutrophile bzw. granulozytische MDSC und Makrophagen am stärksten. Trotz allem konnten Unterschiede in der Infiltration durch Immunzellen nach Infektion mit verschiedenen Viren festgestellt werden. In GLV-1h68-infizierten Tumoren wurde die geringste Zunahme verzeichnet und in LIVP1.1.1-infizierten Tumoren war vor allem die Neutrophilen-Population deutlich höher als in GLV-1h68 infizierten Tumoren. Dies spricht für eine starke anti-Tumorwirkung der Neutrophilen, da es bei der Wachstumskurve nach Infektion mit LIVP1.1.1 zu keinem erneuten Tumorwachstum 28 dpi kam, bzw. bei Infektion der Tumoren bei höherem Tumolvolumen sogar zu einer kompletten Tumorregression führte. In LIVP6.1.1-infizierten Tumoren war der prozentuale Anteil der Neutrophilen vergleichbar mit denen in LIVP1.1.1-infizierten Tumoren. Zusätzlich wurde ein höherer Anteil an Makrophagen gemessen und auch hier konnte eine Tumorregression beobachtet werden. Der höchste prozentuale Anteil für Makrophagen konnte in GLV-1h109-infizierten Tumoren gemessen werden. Trotzdem wurde hier nur eine Inhibition des Tumorwachstums erzielt. Da GLV-1h109 wie auch GLV-1h68 durch Insertion von 3 Expressionskassetten attenuiert ist, hat er vermutlich eine geringere Virulenz und damit auch eine geringere onkolytische Wirkung als die LIVP-Viren. Dass trotzdem eine im Vergleich zu GLV-1h68 bessere therapeutische Effizienz erzielt werden konnte, ist somit auf die Expression von GLAF-1 zurückzuführen, das die Tumervaskulatur normalisiert und somit möglicherweise die Infiltration der Immunzellen erleichtert und damit auch verstärkt. Dies zeigt, dass die Tumorregression aus einer Kombination aus der onkolytischen Wirkung des Virus, der Induktion des Wirtsimmunsystems und der Zerstörung der Tumervaskulatur resultiert.

Parallel zu STSA-1 wurde die Wirkung von GLV-1h68, LIVP6.1.1 und GLV-1h109 auf die langsamer wachsende Hunde-Prostatakarzinomzelllinie DT08/40 untersucht. Hier konnte eine geringfügig langsamere Virusreplikation und zytotoxische Wirkung der verschiedenen Viren im Vergleich zu STSA-1-Zellen beobachtet werden. Im Mausmodell wurde eine Inhibition des Tumorwachstums erzielt. Dies lässt vermuten, dass in DT08/40-Tumoren dieselben Mechanismen zum Tragen kommen, wie in den anderen untersuchten Tumoren. Da aber die Immunpopulation nicht bestimmt wurde, kann dies nicht bewiesen werden.

Zusammengefasst konnte somit gezeigt werden, dass die Wirkung der onkolytischen Viren vom Tumormikromilieu abhängt, da die Viren in Zellkultur in allen Human- und Hundetumorzelllinien erfolgreich replizieren konnten und diese auch zu lysieren vermochten, aber im Mausmodell deutliche Unterschiede zeigten. Es konnte keine identische Zusammensetzung des Tumormikromilieus der untersuchten Tumorzelllinien gefunden werden. Dies galt für die untersuchten Zytokine, die Immunzellpopulation und die Tumervaskulatur. Zusätzlich konnte bei Untersuchung der immunbezogenen Proteinantigene eine positive Beeinflussung des Tumormikromilieus durch die rekrutierten Immunzellen nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Effizienz von Viren durch eine geringere Attenuierung oder die Expression eines gegen den Tumor wirkenden Gens erhöht werden kann. Idealerweise könnte aufgrund der Untersuchung einer vorher entnommenen Biopsie festgestellt werden, ob eine Virotherapie Aussicht auf Erfolg hat und ein dafür maßgeschneidertes Virus einsetzen.

6 Referenzen

1. Krebs. at <[http://lexikon.freenet.de/Krebs_\(Medizin\)>](http://lexikon.freenet.de/Krebs_(Medizin)>)
2. Cancer. at <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>>
3. Swann, J. B. *et al.* Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 652–6 (2008).
4. Ioannou, S. & Voulgarelis, M. Toll-like receptors, tissue injury, and tumourigenesis. *Mediators of inflammation* **2010**, (2010).
5. Krebsatlas. at <https://www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/mort_2.html>
6. Siegel, R., Naishadham, D. & Jemal, A. Cancer Statistics , 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **62**, 10–29 (2012).
7. Ten Facts on Cancer. at <<http://www.who.int/features/factfiles/cancer/facts/en/index9.html>>
8. Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine* **10**, 789–99 (2004).
9. Chiba, T., Marusawa, H. & Ushijima, T. Inflammation-Associated Cancer Development in Digestive Organs: Mechanisms and Roles for Genetic and Epigenetic Modulation-. *Gastroenterology* **143**, 550–563 (2012).
10. Fearon, E. R. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science (New York, N.Y.)* **278**, 1043–50 (1997).
11. Behandlung bei Krebs. at <<http://www.krebsinformationsdienst.de>>
12. Cassidy, J., Bisset, D. & Spence Obe, R. *Oxford Handbook of Oncology*.
13. Leischner, H. *Onkologie*.
14. Junginger, T. & Schlag, P. M. Prinzipien der chirurgischen Tumorthherapie: Zytoreduktive Chirurgie. (2004).at <<http://www.onkodin.de/e106/e22669/e22815/>>
15. McCahill, L. E., Dunn, G. P., Mosenthal, A. C., Milch, R. A. & Krouse, R. S. Palliation as a core surgical principle: part 1. *Journal of the American College of Surgeons* **199**, 149–60 (2004).
16. Erbar *Onkologie*.
17. Seeber, S. & Schütte, J. *Therapiekonzepte Onkologie*.
18. Wannemacher, M., Debus, J. & Wenz, F. Strahlentherapie.
19. Schlimok, G. & Riethmüller, G. Prinzipien der Immuntherapie. *Kompendium Internistische Onkologie*

20. Global Cancer Facts and Figures. at
<<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-027766.pdf>>
21. Krebsstatistiken. at
<<http://www.krebsinformationsdienst.de/grundlagen/krebsstatistiken.php>>
22. Prestwich, R. J. *et al.* The Case of Oncolytic Viruses Versus The case of oncolytic viruses versus the immune system: waiting on the judgment of Solomon. *Human Gene Therapy* **20**, 1119–1132 (2009).
23. Butt, A. Q. & Miggin, S. M. Cancer & viruses: A double-edged sword. *Proteomics* 2127–2138 (2012).doi:10.1002/pmic.201100526
24. Reinboth, J. *et al.* Correlates between host and viral transcriptional program associated with different oncolytic vaccinia virus isolates. *Human gene therapy methods* 1–41 (2012).doi:10.1089/hum.2012.057
25. Sinkovics, J. G. & Horvath, J. C. Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **16**, 1–15 (2000).
26. Hartkopf, A. D., Fehm, T., Wallwiener, D. & Lauer, U. Oncolytic virotherapy of gynecologic malignancies. *Gynecologic oncology* **120**, 302–10 (2011).
27. PACK, G. T. Note on the experimental use of rabies vaccine for melanomatosis. *A.M.A. archives of dermatology and syphilology* **62**, 694–5 (1950).
28. Tedcastle, A., Cawood, R., Di, Y., Fisher, K. D. & Seymour, L. W. Virotherapy--cancer targeted pharmacology. *Drug discovery today* **17**, 215–20 (2012).
29. Vähä-Koskela, M. J. V., Heikkilä, J. E. & Hinkkanen, A. E. Oncolytic viruses in cancer therapy. *Cancer letters* **254**, 178–216 (2007).
30. Zhang, Q. *et al.* The highly attenuated oncolytic recombinant vaccinia virus GLV-1h68: comparative genomic features and the contribution of F14.5L inactivation. *Molecular genetics and genomics : MGG* **282**, 417–35 (2009).
31. McCart, J. A. *et al.* Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. *Cancer research* **61**, 8751–7 (2001).
32. Buller, R. M., Chakrabarti, S., Cooper, J. A., Twardzik, D. R. & Moss, B. Deletion of the vaccinia virus growth factor gene reduces virus virulence. *Journal of virology* **62**, 866–74 (1988).
33. Gentschev, I. *et al.* Efficient colonization and therapy of human hepatocellular carcinoma (HCC) using the oncolytic vaccinia virus strain GLV-1h68. *PLoS one* **6**, e22069 (2011).
34. Nishiyama, Y., Kimura, H. & Daikoku, T. Complementary lethal invasion of the central nervous system by nonneuroinvasive herpes simplex virus types 1 and 2. *Journal of virology* **65**, 4520–4 (1991).

35. Takakuwa, H. *et al.* Oncolytic viral therapy using a spontaneously generated herpes simplex virus type 1 variant for disseminated peritoneal tumor in immunocompetent mice. *Archives of virology* **148**, 813–25 (2003).
36. Parato, K. A. *et al.* The oncolytic poxvirus JX-594 selectively replicates in and destroys cancer cells driven by genetic pathways commonly activated in cancers. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **20**, 749–58 (2012).
37. Mastrangelo, M. J. *et al.* Intratumoral recombinant GM-CSF-encoding virus as gene therapy in patients with cutaneous melanoma. *Cancer gene therapy* **6**, 409–22
38. Frentzen, A. *et al.* Anti-VEGF single-chain antibody GLAF-1 encoded by oncolytic vaccinia virus significantly enhances antitumor therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 12915–20 (2009).
39. Guse, K. *et al.* Antiangiogenic arming of an oncolytic vaccinia virus enhances antitumor efficacy in renal cell cancer models. *Journal of virology* **84**, 856–66 (2010).
40. Gnant, M. F., Puhlmann, M., Alexander, H. R. & Bartlett, D. L. Systemic administration of a recombinant vaccinia virus expressing the cytosine deaminase gene and subsequent treatment with 5-fluorocytosine leads to tumor-specific gene expression and prolongation of survival in mice. *Cancer research* **59**, 3396–403 (1999).
41. Foloppe, J. *et al.* Targeted delivery of a suicide gene to human colorectal tumors by a conditionally replicating vaccinia virus. *Gene therapy* **15**, 1361–71 (2008).
42. Fujiwara, T. In vivo imaging of human cancer with telomerase-specific replication-selective adenovirus. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **872**, 129–39 (2012).
43. Zhang, Q. *et al.* The highly attenuated oncolytic recombinant vaccinia virus GLV-1h68: comparative genomic features and the contribution of F14.5L inactivation. *Molecular genetics and genomics : MGG* **282**, 417–35 (2009).
44. Wang, L. *et al.* CD44 antibody-targeted liposomal nanoparticles for molecular imaging and therapy of hepatocellular carcinoma. *Biomaterials* **33**, 5107–14 (2012).
45. Haddad, D. *et al.* Imaging characteristics, tissue distribution, and spread of a novel oncolytic vaccinia virus carrying the human sodium iodide symporter. *PloS one* **7**, e41647 (2012).
46. Rajecki, M. *et al.* SPECT/CT imaging of hNIS-expression after intravenous delivery of an oncolytic adenovirus and ¹³¹I. *PloS one* **7**, e32871 (2012).
47. Clinical Trials. at <<http://clinicaltrials.gov>>
48. Garber, K. China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *Journal of the National Cancer Institute* **98**, 298–300 (2006).
49. Moss, B. Fields Virology Chapter 84 Poxviridae: Viruses and Replication.pdf.
50. Krauss, H. *et al.* *Zoonosen: Von Tier zu Mensch übertragbare Krankheiten.*
51. Moss, B. Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology* **344**, 48–54 (2006).

-
52. Smith, G. L., Vanderplasschen, A. & Law, M. The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *The Journal of general virology* **83**, 2915–31 (2002).
 53. Harrison, S. C. *et al.* Discovery of antivirals against smallpox. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 11178–92 (2004).
 54. Baroudy, B. M., Venkatesan, S. & Moss, B. Incompletely base-paired flip-flop terminal loops link the two DNA strands of the vaccinia virus genome into one uninterrupted polynucleotide chain. *Cell* **28**, 315–24 (1982).
 55. Haddad, D., Gentschev, I., Stritzker, J. & Szalay, A. A. Cancer therapy and diagnostics (theranostics) following treatment with recombinant oncolytic vaccinia virus strains. 1–21 (2010).
 56. Thorne, S. H. & Kirn, D. H. Future directions for the field of oncolytic virotherapy: a perspective on the use of vaccinia virus. *Expert opinion on biological therapy* **4**, 1307–21 (2004).
 57. Huygelen, C. [Jenner's cowpox vaccine in light of current vaccinology]. *Verhandelingen - Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België* **58**, 479–536; discussion 537–8 (1996).
 58. Shen, Y. & Nemunaitis, J. Fighting cancer with vaccinia virus: teaching new tricks to an old dog. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* **11**, 180–95 (2005).
 59. Smallpox. at <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/smallpox/en/>>
 60. Wertheimer, E. R., Olive, D. S., Brundage, J. F. & Clark, L. L. Contact transmission of vaccinia virus from smallpox vaccinees in the United States, 2003–2011. *Vaccine* **30**, 985–8 (2012).
 61. Nalca, A. & Zumbrun, E. E. ACAM2000: the new smallpox vaccine for United States Strategic National Stockpile. *Drug design, development and therapy* **4**, 71–9 (2010).
 62. Sandvik, T. *et al.* Naturally occurring orthopoxviruses: potential for recombination with vaccine vectors. *Journal of clinical microbiology* **36**, 2542–7 (1998).
 63. Schenk, T. E. *Adenoviridae: The Viruses and Their Replication*.
 64. Peplinski, G. R. *et al.* In vivo murine tumor gene delivery and expression by systemic recombinant vaccinia virus encoding interleukin-1beta. *The cancer journal from Scientific American* **2**, 21–7
 65. Guo, Z. S., Thorne, S. H. & Bartlett, D. L. Oncolytic virotherapy: molecular targets in tumor-selective replication and carrier cell-mediated delivery of oncolytic viruses. *Biochimica et biophysica acta* **1785**, 217–31 (2008).
 66. Smith, G. L. & Moss, B. Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25 000 base pairs of foreign DNA. *Gene* **25**, 21–8 (1983).
 67. Huang, P.-I., Chang, J.-F., Kirn, D. H. & Liu, T.-C. Targeted genetic and viral therapy for advanced head and neck cancers. *Drug discovery today* **14**, 570–8 (2009).

68. Davis, J. J. & Fang, B. Oncolytic virotherapy for cancer treatment: challenges and solutions. *The journal of gene medicine* **7**, 1380–9 (2005).
69. Advani, S. J. *et al.* Preferential replication of systemically delivered oncolytic vaccinia virus in focally irradiated glioma xenografts. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**, 2579–90 (2012).
70. Seubert, C. M. *et al.* Enhanced tumor therapy using vaccinia virus strain GLV-1h68 in combination with a β -galactosidase-activatable prodrug seco-analog of duocarmycin SA. *Cancer gene therapy* **18**, 42–52 (2011).
71. Patil, S. S. *et al.* Virotherapy of Canine Tumors with Oncolytic Vaccinia Virus GLV-1h109 Expressing an Anti-VEGF Single-Chain Antibody. *PLoS ONE* **7**, e47472 (2012).
72. Tarin, D. Clinical and Biological Implications of the Tumor Microenvironment. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society* 95–112 (2012).doi:10.1007/s12307-012-0099-6
73. Egeblad, M., Nakasone, E. S. & Werb, Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Developmental cell* **18**, 884–901 (2010).
74. Castells, M., Thibault, B., Delord, J.-P. & Couderc, B. Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death. *International journal of molecular sciences* **13**, 9545–71 (2012).
75. Castaño, Z., Fillmore, C. M., Kim, C. F. & McAllister, S. S. The bed and the bugs: Interactions between the tumor microenvironment and cancer stem cells. *Seminars in cancer biology* **22**, 462–470 (2012).
76. Joyce, J. a & Pollard, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature reviews. Cancer* **9**, 239–52 (2009).
77. Sugimoto, H., Mundel, T. M., Kieran, M. W. & Kalluri, R. Identification of Fibroblast Heterogeneity in the Tumor Microenvironment. *Cancer Biology & Therapy* **5**, 1640–1646 (2006).
78. Emens, L. A., Silverstein, S. C., Khleif, S., Marincola, F. M. & Galon, J. Toward integrative cancer immunotherapy: targeting the tumor microenvironment. *Journal of translational medicine* **10**, 70 (2012).
79. Dong-Le Bourhis, X. *et al.* Effect of stromal and epithelial cells derived from normal and tumorous breast tissue on the proliferation of human breast cancer cell lines in co-culture. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **71**, 42–8 (1997).
80. Gerber, P. A., Hippe, A., Buhren, B. A., Müller, A. & Homey, B. Chemokines in tumor-associated angiogenesis. *Biological chemistry* **390**, 1213–23 (2009).
81. Ziyad, S. & Iruela-Arispe, M. L. Molecular mechanisms of tumor angiogenesis. *Genes & cancer* **2**, 1085–96 (2011).
82. Cirri, P. & Chiarugi, P. Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer metastasis reviews* **31**, 195–208 (2012).

83. Hanahan, D. & Weinberg, R. a Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–74 (2011).
84. Lu, P., Weaver, V. M. & Werb, Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *The Journal of cell biology* **196**, 395–406 (2012).
85. Radisky, D., Hagios, C. & Bissell, M. J. Tumors are unique organs defined by abnormal signaling and context. *Seminars in cancer biology* **11**, 87–95 (2001).
86. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**, 249–257 (2000).
87. Inteeworn, N. *et al.* Simultaneous application of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor inhibitor PTK787/ZK 222584 and ionizing radiation does not further reduce the growth of canine oral melanoma xenografts in nude mice. *Veterinary journal (London, England : 1997)* **173**, 564–70 (2007).
88. Barlow, K. D., Sanders, A. M., Soker, S., Ergun, S. & Metheny-Barlow, L. J. Pericytes on the Tumor Vasculature: Jekyll or Hyde? *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society* (2012).doi:10.1007/s12307-012-0102-2
89. Ellis, L. M. & Hicklin, D. J. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nature reviews. Cancer* **8**, 579–91 (2008).
90. Yeung, Y. & Tebbutt, N. C. Bevacizumab in colorectal cancer: current and future directions. *Expert review of anticancer therapy* (2012).doi:10.1586/era.12.104
91. Balkwill, F. & Mantovani, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* **357**, 539–45 (2001).
92. Pisani, P., Parkin, D. M., Muñoz, N. & Ferlay, J. Cancer and infection: estimates of the attributable fraction in 1990. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **6**, 387–400 (1997).
93. Vendramini-Costa, D. B. & Carvalho, J. E. Molecular Link Mechanisms between Inflammation and Cancer. *Current pharmaceutical design* **18**, 3831–52 (2012).
94. Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C. & Mantovani, A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* **30**, 1073–81 (2009).
95. Allavena, P., Garlanda, C., Borrello, M. G., Sica, A. & Mantovani, A. Pathways connecting inflammation and cancer. *Current opinion in genetics & development* **18**, 3–10 (2008).
96. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436–44 (2008).
97. Mantovani, A., Romero, P., Palucka, a K. & Marincola, F. M. Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. *Lancet* **371**, 771–83 (2008).

98. Schmid, M. C. & Varner, J. A. Myeloid cells in tumor inflammation. *Vascular cell* **4**, 14 (2012).
99. Geissmann, F. *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science (New York, N.Y.)* **327**, 656–61 (2010).
100. Gordon, S. & Taylor, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews. Immunology* **5**, 953–64 (2005).
101. Sica, A. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization : in vivo veritas. *Journal of Clinical Investigation* **122**, 787–795 (2012).
102. Solinas, G., Germano, G., Mantovani, a & Allavena, P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *Journal of leukocyte biology* **86**, 1065–73 (2009).
103. Ruffell, B., Affara, N. I. & Coussens, L. M. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends in immunology* **33**, 119–26 (2012).
104. Mantovani, A., Locati, M., Vecchi, A., Sozzani, S. & Allavena, P. Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. *Trends in immunology* **22**, 328–36 (2001).
105. Sica, A., Allavena, P. & Mantovani, A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer letters* **267**, 204–15 (2008).
106. Movahedi, K. *et al.* Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer research* **70**, 5728–39 (2010).
107. Germano, G., Allavena, P. & Mantovani, A. Cytokines as a key component of cancer-related inflammation. *Cytokine* **43**, 374–9 (2008).
108. Biswas, S. K. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature immunology* **11**, 889–96 (2010).
109. Mantovani, A., Sica, A., Allavena, P., Garlanda, C. & Locati, M. Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation. *Human immunology* **70**, 325–30 (2009).
110. Balkwill, F. R. & Mantovani, A. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. *Seminars in cancer biology* **22**, 33–40 (2012).
111. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. & Sica, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology* **23**, 549–55 (2002).
112. Fridlender, Z. G. & Albelda, S. M. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* **33**, 949–55 (2012).
113. Piccard, H., Muschel, R. J. & Opdenakker, G. On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Critical reviews in oncology/hematology* **82**, 296–309 (2012).

114. Gregory, A. D. & Houghton, A. M. Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer research* **71**, 2411–6 (2011).
115. Ben-Baruch, A. The Tumor-Promoting Flow of Cells Into, Within and Out of the Tumor Site: Regulation by the Inflammatory Axis of TNF α and Chemokines. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society* **5**, 151–64 (2012).
116. Fridlender, Z. G. *et al.* Transcriptomic analysis comparing tumor-associated neutrophils with granulocytic myeloid-derived suppressor cells and normal neutrophils. *PloS one* **7**, e31524 (2012).
117. Fridlender, Z. G. *et al.* Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: “N1” versus “N2” TAN. *Cancer cell* **16**, 183–94 (2009).
118. Jablonska, J., Leschner, S., Westphal, K., Lienenklaus, S. & Weiss, S. Neutrophils responsive to endogenous IFN-beta regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. *The Journal of clinical investigation* **120**, 1151–64 (2010).
119. Mantovani, A., Cassatella, M. a, Costantini, C. & Jaillon, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature reviews. Immunology* **11**, 519–31 (2011).
120. Gentschev, I. *et al.* Preclinical evaluation of oncolytic vaccinia virus for therapy of canine soft tissue sarcoma. *PloS one* **7**, e37239 (2012).
121. Shapiro, H. M. *Practical Flow Cytometry*.
122. Sack, U., Tarnok, A. & Rothe, G. *Zelluläre Diagnostik*.
123. Sabatino, M. *et al.* Conservation of genetic alterations in recurrent melanoma supports the melanoma stem cell hypothesis. *Cancer research* **68**, 122–31 (2008).
124. Monath, T. P., Kahn, L. H. & Kaplan, B. Introduction: one health perspective. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* **51**, 193–8 (2010).
125. Paoloni, M. C. & Khanna, C. Comparative oncology today. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* **37**, 1023–32; v (2007).
126. Withrow, S. J. & Vail, D. M. *Small Animal Clinical Oncology*. (2007).
127. Paoloni, M. & Khanna, C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nature reviews. Cancer* **8**, 147–56 (2008).
128. Gordon, I. K. & Khanna, C. Modeling opportunities in comparative oncology for drug development. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* **51**, 214–20 (2010).
129. Khanna, C. *et al.* The dog as a cancer model. *Nature biotechnology* **24**, 1065–6 (2006).
130. Vail, D. M. & MacEwen, E. G. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer investigation* **18**, 781–92 (2000).

131. Cadieu, E. & Ostrander, E. A. Canine genetics offers new mechanisms for the study of human cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **16**, 2181–3 (2007).
132. Rabinowitz, P. M., Scotch, M. L. & Conti, L. A. Animals as sentinels: using comparative medicine to move beyond the laboratory. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* **51**, 262–7 (2010).
133. Smith, D. *et al.* Preclinical safety evaluation using nonrodent species: an industry/welfare project to minimize dog use. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* **43 Suppl**, S39–42 (2002).
134. Patil, S. S., Gentschev, I., Nolte, I., Ogilvie, G. & Szalay, AA. Oncolytic virotherapy in veterinary medicine: current status and future prospects for canine patients. *Journal of translational medicine* **10**, 3 (2012).
135. Worschech, A. *et al.* Systemic treatment of xenografts with vaccinia virus GLV-1h68 reveals the immunologic facet of oncolytic therapy. *BMC genomics* **10**, 301 (2009).
136. Gil, M. *et al.* Photodynamic therapy augments the efficacy of oncolytic vaccinia virus against primary and metastatic tumours in mice. *British journal of cancer* **105**, 1512–21 (2011).
137. Breitbach, C. J. *et al.* Targeted inflammation during oncolytic virus therapy severely compromises tumor blood flow. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **15**, 1686–93 (2007).
138. Gentschev, I. *et al.* Efficient colonization and therapy of human hepatocellular carcinoma (HCC) using the oncolytic vaccinia virus strain GLV-1h68. *PLoS one* **6**, e22069 (2011).
139. Weibel, S. *et al.* Viral-mediated oncolysis is the most critical factor in the late-phase of the tumor regression process upon vaccinia virus infection. *BMC cancer* **11**, 68 (2011).
140. Gentschev, I. *et al.* Regression of human prostate tumors and metastases in nude mice following treatment with the recombinant oncolytic vaccinia virus GLV-1h68. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2010**, 489759 (2010).
141. Gentschev, I. *et al.* Significant Growth Inhibition of Canine Mammary Carcinoma Xenografts following Treatment with Oncolytic Vaccinia Virus GLV-1h68. *Journal of oncology* **2010**, 736907 (2010).

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
α	alpha
β	beta
γ	gamma
μ	micro
APC	Allophycocyanin
bp	Basenpaar
BMDC	<i>bone marrow-derived cells</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDU	collagen digestion unit
CEV	<i>cell-associated enveloped virus</i>
CMC	Carboxymethylcellulose
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX2	Cyclooxygenase 2
Cy	Cyanin
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
d.h.	das heisst
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	days post infection
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEV	<i>extracellular enveloped virus</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure

<i>et al.</i>	et alia
EV	<i>enveloped virus</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
Fa.	Firma
FBS	Fötales Bovines Serum
Fc	kristallines Antikörperfragment
FSC	forward scatter
g	Gramm
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
<i>gusA</i>	β -Glucuronidase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
Hank's BSS	Hank's Pufferlösung
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Leberzellkarzinom
HCl	Salzsäure
hpi	hours post infection
HPV	Humanes Papilloma Virus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMV	<i>intracellular mature virus</i>
i.v.	intravenous
kbp	Kilobasenpaar
<i>lacZ</i>	β -Galaktosidase
LPS	Lipopolysaccharid
Mg	Magnesium
ml	Milliliter

min	Minute
mm	Millimeter
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MDSC	<i>myeloid-derived suppressor cells</i>
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MU	Megaunit
MV	<i>mature virus</i>
MW	Mittelwert
Na	Natrium
NEAA	nicht-essentielle Aminosäuren
NK Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein Complex
PFU	<i>plaque forming units</i>
R	Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	<i>reactive oxygen intermediate</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RT	Raumtemperatur
RUC	Renilla Luciferase
rVACV	rekombinantes Vaccinia-Virus
sec	Sekunde
SSC	side scatter

STABW	Standardabweichung
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TAN	Tumor-assoziierte Neutrophile
TEM	TIE2-exprimierende Monozyten
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TK	Thymidinkinase
TNF	Tumornekrosefaktor
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
z.B.	zum Beispiel

7.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich bei allen bedanken, die für das Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Szalay möchte ich danken, dass er mir ermöglicht hat an diesem spannenden Thema drei Jahre zu arbeiten und für die große Unterstützung, die er mir in dieser Zeit zukommen hat lassen.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Janzen für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei PD Dr. Gentshev möchte ich mich für die exzellente Betreuung mit Rat und Tat bedanken: für die Hilfe bei der Herstellung der Einzelzellsuspensionen und der Färbungen für die Durchflusszytometrie und für die hilfreichen Ratschläge bei der Erstellung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Grummt für das Korrekturlesen meiner Doktorarbeit und das Interesse an meiner Arbeit.

Thank you very much Sandeep for helping me making single cell suspensions and staining the cells for flow cytometry and for your good neighborhood with discussions.

Vielen Dank auch an Barbara, Stefi, Elisabeth, Susanne, Jochen, Rike, Caroline, Micha, Sandeep, Lorenz, Prisca, Christina, Juliane, Meike und Johanna für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die anregenden und lustigen Gespräche und das Interesse an meiner Arbeit. Danke für die Aufmunterung während meiner Schreibphase und für eure Hilfe, wann immer ich sie nötig hatte. Ein großes Dankeschön an Johanna, die es ermöglicht, dass die Arbeit immer weiter gehen kann und die immer weiß, in welchen Schränken die Sachen verstaut sind, die man gerade dringend braucht.

Vielen Dank auch an die übrige Genelux Family, die mich bei meinem Besuch in San Diego offen empfangen hat und mir neue Anregungen für meine Arbeit gegeben hat.

Schließlich möchte ich mich noch bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich auch ertragen haben, wenn ich mal schlechte Laune hatte und die immer fest an mich geglaubt haben.

7.3 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen angefertigt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt wurde.

Neben dem akademischen Grad „Diplom-Biologin Univ.“ habe ich keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den _____

Marion Adelfinger

8 Publikationen

Gentschev I, Patil SS, **Adelfinger M**, Weibel S, Geissinger U, Frentzen A, Chen NG, Yu YA, Zhang Q, Ogilvie G, Szalay AA. Characterization and evaluation of a new oncolytic Vaccinia Virus strain LIVP6.1.1 for canine cancer therapy. *Bioengineered* **4**, 2 (2012)

Patil SS, Gentschev I, **Adelfinger M**, Donat U, Hess M, Weibel S, Nolze I, Frentzen A, Szalay AA. Virotherapy of Canine Tumors with Oncolytic Vaccinia Virus GLV-1h109 Expressing an Anti-VEGF Single-Chain Antibody. *PLoS ONE* **7**, e47472 (2012).

Gentschev I, **Adelfinger M**, Josupeit R, Rudolph S, Ehrig K, Donat U, Weibel S, Chen NG, Yu YA, Zhang Q, Heisig M, Thamm D, Stritzker J, Macneill A, Szalay AA.. Preclinical evaluation of oncolytic vaccinia virus for therapy of canine soft tissue sarcoma. *PloS one* **7**, e37239 (2012).

Gentschev I, Müller M, **Adelfinger M**, Weibel S, Grummt F, Zimmermann M, Bitzer M, Heisig M, Zhang Q, Yu YA, Chen NG, Stritzker J, Lauer UM, Szalay AA. Efficient colonization and therapy of human hepatocellular carcinoma (HCC) using the oncolytic vaccinia virus strain GLV-1h68. *PloS one* **6**, e22069 (2011).

Gentschev I, Donat U, Hofmann E, Weibel S, **Adelfinger M**, Raab V, Heisig M, Chen N, Yu YA, Stritzker J, Szalay AA. Regression of human prostate tumors and metastases in nude mice following treatment with the recombinant oncolytic vaccinia virus GLV-1h68. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2010**, 489759 (2010).