UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Kopf-und Neurozentrum Abteilung für Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie

Komm. Direktor: PD. Dr.med. Dr.med.dent. Henning Hanken

Wachstumsbeeinflussung plexiformer Neurofibrome durch das onkolytische Herpes-simplex-Virus G47 delta

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Marcus Freytag aus Dortmund

Hamburg 2017

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 27.09.2017

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, Vorsitzende:	Dr.rer.nat. (habil.) Lan Kluwe
Prüfungsausschuss, Gutachter:	PD Dr.med. Jörg Flitsch
Prüfungsausschuss, Prüfer:	Prof. Dr.rer.nat. Joachim Hauber
Prüfungsausschuss, stellv. Mitglied:	PD Dr.med. Christian Bernreuther

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1.	Neurofibromatose Typ I	5
1.1.1	plexiforme Neurofibrome (PNF)	9
1.2.	onkolytische Viren	12
1.2.1	Herpes Virus	13
1.2.2	Herpes-simplex-Virus	19
1.2.3	Vom Wildtyp Herpes-simplex-Virus-1 zum Vektor G47delta	21
1.2.3.	1 Erste Generation	21
1.2.3.2	2 Zweite Generation	22
1.2.3.3	3 Dritte Generation	22
1.3	LacZ und X-gal	23
1.4	Zielsetzungen	24

2. Material und Methoden

2.1	Entnahme eines humanen plexiformen Neurofibromes	25
2.1.1	Neuropathologische Untersuchung des Hauptpräparates	26
2.2	Mausmodell	27
2.2.1	Xenograft Transplantation am Nervus ischiadicus der Maus	27
2.3	Vervielfältigung des Herpes-simplex-Virus G47delta	28
2.3.1	Quantifizieren des initialen Virusstock mit Plaques Assay	29
2.3.2	Infektion	31
2.3.3	Purification (Aufreinigung)	32
2.3.4	Quantifizieren des vervielfältigten G47delta mit Plaques Assay	34
2.4	Tumorinjektion des Herpes-simplex-Virus G47delta	36
2.5	Virennachweis in Cryoschnitten	38

3. Ergebnisse

3.1	Das humane plexiforme Neurobibrom	41
3.1.1	Das humane PNF in der neuropathologischen Aufbereitung	41
3.2	Xenografttransplantation am N.ischiadicus der Maus	44
3.3	Virenvermehrung	44

3.4	Vireninjektion	46	
3.5	Post mortem Ergebnisse	47	
3.5.1	Die Xenografttumoren in der histologischen Aufbereitung	49	
4. Dis	skussion		
4.1	Xenograft	53	
4.2	Messung der Xenografttumoren	54	
4.3	Virusreplikation	54	
4.4	Fehlende onkolytische Wirkung	55	
4.5	Fazit	55	
5. Zu	sammenfassung		
	deutsch	56	
	englisch	57	
6. Ab	kürzungsverzeichnis	58	
7 ;+,	oraturvorzoichnic	60	
7. LIU		00	
8. Da	8. Danksagung		
		-	
9. Lel	benslauf	68	
10. Ei	idesstattliche Erklärung	69	

1. Einleitung

1.1 Neurofibromatose Typ I

Die Neurofibromatose Typ I (NF1) ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, die durch Tumoren des Nervensystems sowie Fehlbildungen, bevorzugt des Skeletts, gekennzeichnet ist (Gutmann et al. 1997). Die NF1 tritt in Deutschland mit einer Inzidenz von 1:3.000 Lebendgeburten sporadisch und familiär auf und ist eine der häufigsten vererbbaren Erkrankungen des Menschen (Lammert et al. 2005).

Das *NF1*-Gen liegt auf Chromosom 17q11.2 (Ledbetter et al. 1989) und hat eine Größe von 350 kb mit einem 8.457 bp großen offenen Leserahmen, der für 2.818 Aminosäuren kodiert. Das Gen besitzt 57 Exons, wobei die kodierte messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) etwa 9 kb umfasst (Trovo-Marqi et al. 2006). Die am besten untersuchte Region des *NF1*-Gens ist die gap-related domain (GRD), eine Region, die für 360 Aminosäuren (AS) kodiert und sich von Exon 21 bis 27 erstreckt. Die Sequenz weist eine hohe Homologie zur katalytischen Domäne anderer GTPase-aktivierender Proteine (GAP) auf. Diese GAP können die Aktivität von Rat sarcoma (RAS)-Proteinen regulieren und sind damit in Signaltransduktion und Zellwachstum involviert (Ballester et al. 1990, Xu et al. 1990).

Das *NF1*-Gen verhält sich wie ein Tumorsuppressor-Gen. Entsprechend wurden in diversen NF1-assoziierten Tumoren *NF1*-Allelverlust und somatische Mutationen gefunden (Kluwe et al. 1999a).

Klinisch sind die Café-au-Lait-Flecken (Abbildung 1 und 2), das axilläre und inguinale Freckling (Abbildung 3 und 4), die Lischknötchen der Iris (Abbildung 5), die dermalen Neurofibrome (NF, Abbildung 6) sowie plexiformen Neurofibrome (PNF, Abbildung 7 bis 10) die typischerweise auftretenden Merkmale bei NF1 Patienten, aus dessen Beobachtung die Diagnose auch primär gestellt wird. Die genauen diagnostischen Kriterien wurden von der National Institutes of Health (NIH, USA) 1988 festgelegt, wobei mindestens zwei Merkmale für die Diagnosestellung vorliegen müssen:

- ≥6 Café-au-Lait-Flecken (1,5cm Durchmesser bei Erwachsenen, 0,5cm bei Kindern)
- ≥2 Neurofibrome jeden Typs oder ein plexiformes Neurofibrom
- Freckling im axillären und inguinalen Bereich
- Optikusgliom
- ≥2 Lischknötchen
- Knochendysplasien wie Skoliose, kongenitale anterolaterale Verbiegung der Tibia, Pseudarthrosen, Keilbeinflügeldysplasie
- Betroffener Verwandter ersten Grades

Das statistische chronologische Erscheinen der klinischen Bilder wird in Tabelle 1 dargestellt.

Birth	1–2 y	3–5 y	Early adolescence	Adulthood
1	1	1		1
			فتعريط بعد أعريه أحشب الطرواري	
	Birth	Birth 1–2 y	Birth 1–2 y 3–5 y	Birth 1–2 y 3–5 y Early adolescence

Tabelle 1: Chronologisch eingeordnetes Auftreten der klinischen Manifestationen(National Institutes of Health, 1988; modifiziert Williams et al. 2009).



Abbildungen 1 und 2: Cafe-au-Lait-Flecken (Friedrich RE, MKG, UKE)



Abbildungen 3 und 4: Axilläres Freckling (Friedrich RE, MKG, UKE)



Abbildung 5: Lisch Knötchen (Friedrich RE, MKG, UKE)



Abbildung 6: Dermale Neurofibrome (Friedrich RE, MKG, UKE)



Abbildungen 7 und 8: Plexiforme Neurofibrome (Friedrich RE, MKG, UKE)



Abbildungen 9 und 10: MRT mit ausgedehntem PNF, welches klinisch mit Asymmetrie und Hyperpigmentierung imponiert (Friedrich RE, MKG, UKE)

1.1.1 Plexiforme Neurofibrome

Ein Hauptmerkmal der NF1 ist das plexiforme Neurofibrom (PNF), welches bei mehr als 50% der NF1-Patienten mittels MRT nachzuweisen ist (Nguyen et al. 2012).

PNF sind zwar weniger häufig als andere Hauptmerkmale wie Cafe-au-Lait-Flecken und dermale Neurofibrome, jedoch klinisch relevant, denn ein PNF infiltriert den Nerven und kann folglich zu neurologischen Defiziten führen. Organkompression und schwerwiegende Entstellungen sind ebenso häufige Konsequenzen.

Insbesondere PNF in Gesicht-, Kopf- und Halsbereichen führen zu fazialen Entstellungen und funktionellen Störungen. Untermauert wird dies durch MRT-

Untersuchungen, welche die PNF in "oberflächlich", "verdrängend" und "invasiv" einteilen (Mautner et al. 2006)

Darüber hinaus kann ein PNF entarten und zu einem malignen peripheren Nervscheidentumor (MPNST) progressieren. MPNST ist der Hauptfaktor für die deutlich reduzierte Lebenserwartung von NF1 Patienten (Rasmussen et al. 2001). Die 5-Jahres-Überlebensrate (ob Overall-Survival oder Desease-Specific-Survival) bewegt sich um 40%, unabhängig ob NF-assoziiert oder sporadisch auftretend (Kolberg et al. 2013)

PNF sind konnatal und einige PNF sind bereits zum Zeitpunkt der Geburt klinisch imponierend. Generell ist das Wachstum von PNF im Kindsalter am höchsten, kann später sistieren, kann sich aber auch mit unberechenbarer Dynamik fortsetzen (Waggoner et al. 2000).

Histologisch bestehen PNF primär aus Schwannzellen und Fibroblasten. Wie bei den dermalen Neurofibromen (Kluwe et al. 1998, Serra et al. 2000) ist auch bei PNF die somatische *NF1*-Inaktivierung (Mutationen oder Allelverlust) auf die Schwannzellen begrenzt (Frahm et al. 2001). Dies deutet darauf hin, dass die Schwannzellen, aber nicht die Fibroblasten, "die Tumorzellen" sind (Kluwe et al. 1999b).

Aufgrund der Größe und Beteiligung von multiplen Gewebeschichten ist die chirurgische Möglichkeit der Entfernung begrenzt. Eine vollständige Resektion ist in den meisten Fällen nicht möglich, ohne die beteiligten Nerven und Gewebe zu schädigen.

Auch wenn es zu einer Operation kommt, wird in der Regel nur eine Teilresektion im Sinne eines Debulking durchgeführt.

Der überbleibende Teil des PNF kann weiterwachsen. Nicht selten wird ein Patient mehrfach am selben Tumor operiert (Friedrich 2013).

Mit zunehmenden Kenntnissen über die Molekularbiologie und die Pathogenese des PNF wurden diverse medikamentöse Therapien entwickelt, die an verschiedenen Stellen unterschiedlicher "pathways", also Signaltransduktionswegen angreifen. Der aktuelle Status ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Wirkstoff	Wirkprinzip	Studiendesign	Alter	n	Resultate
Tipifarnib	Farnesyltransferase- inhibitor	Phase 2 Doppelblind- placebo- kontrolliert	3–25	62	Zeit bis Tumor- progression in MRT nicht signifikant - Tipifarnib versus Kontrollen
Pirfenidone	anti-fibrotisch, anti-inflammatorisch ↓ Kollagen, ↓ Fibroblasten	Phase 2 Einzelarm offenes Design	3–21	36	Zeit bis Tumor- progression in MRT nicht signifikant - Pirfenidone versus Kontrolle der Tipifarnib- studie
Sorafenib	Multi-Kinaseinhibitor (BRAF, VEGFR2, PDGFR, c-kit)	Phase 1 und Pharmakokinetik- studie	3–18	9	Schlechte Toleranz bei niedrigerer Maximaldosis als Patienten mit soliden Tumoren
Sirolimus	mTORC1 Inhibitor	Phase 2	≥3	13	Verlängerung der Zeit bis zur Progression. Keine Tumorreduktion. Lebensqualität erhöht.

Tabelle 2: Medikamentöse Therapien inoperabler oder progressiver plexiformer Neurofibrome (≥20% Volumenzunahme in der MRT-Bildgebung) (übersetzt aus Karajannis et al 2015).

Die bisherigen Ergebnisse sind noch nicht zufriedenstellend. Einzig Sirolimus konnte die Zeit bis zur Progression von PNF um ca. 4 Monate verlängern und die Lebensqualität erhöhen (Weiss et al. 2015).

1.2 Onkolytische Viren

Die Geschichte onkolytischer Viren reicht zurück bis 1904. Damals wurde zunächst eine leukozytäre Reaktion auf eine Influenza einer Leukämiepatientin beschrieben (Dock 1904). 1912 wurde eine Tumorregression bei einem Gebärmutterhalskarzinom nach einer Tollwutimpfung festgestellt (de Page 1912).

Viele, zunächst unveränderte, Viren-Wildtypen wurden seither auf ihre onkolytische Fähigkeit hin getestet. Hierzu gehören unter anderm Adenoviren (Huebner et al. 1956), Masern (Gross 1971) und Mumps (Asada 1974), um die bekanntesten Vertreter auf zu zählen.

Da die tumorauflösende Wirkung entweder als zu schwach oder zu unvorhersehbar gesehen wurde und neue Chemotherapeutika bessere Erfolge erzielten, wurde die Virusforschung hinsichtlich der onkolytischen Viren zunächst zurückgestellt.

Nachdem die Forschung immer mehr Erkenntnisse über die Virusreplikation, rekombinante DNA-Technologie sowie die Tumorbiologie gewinnen konnte, konnten Parallelen von Viren und Tumoren gesehen werden, die zu einer Wiederaufnahme der wissenschaftlichen Arbeit an onkolytischen Viren führte (Zeicher 2009).

Die neuere Forschung auf dem Gebiet der onkolytischen Viren versucht über die Veränderungen der genetischen Information des Virus mehrere Ziele zu erreichen. Zunächst spielt die Sicherheit eine große Rolle. Die Viren sollen nicht in normalen Zellen replizieren. Bekannte Virostatika sollen ihre Wirkung beibehalten. Die Viren sollen selektiv Tumorzellen lysieren. Die Lysefähigkeit soll verstärkt werden (Zeicher 2009).

Letztlich können über Transgene sogar unterstützende Proteine, zum Beispiel Botenstoffe des Immunsystems, vom Virus gebildet werden (Zeicher 2009).

Der Grund für die Onkoselektivität besteht im Wesentlichen aufgrund des Fehlens der Autolysefähigkeit von Tumorzellen. Onkolytische Viren können nur in Zellen ohne Autolysefähigkeit replizieren (Zeicher 2009).

1.2.1 Herpes Virus

Herpesviren sind doppelsträngige DNA Viren. Die onkolytische Funktion ist abhängig von der Tumorspezifität und spielt sich wesentlich auf der Transkriptionsebene ab, da hier entsprechende virale Proteine produziert werden, die die natürliche Abwehr einer Zelle unterbinden (Zeicher 2009).

Zu den Herpesviren gehören etwa 100 bekannte Viren, von denen 8 den Menschen infizieren können. Zu diesen 8 Viren gehören das Varizella-zoster-Virus, Cytomegalie- Virus, Eppstein-Barr-Virus, das humane Herpes-Virus 6 (Typ A und B), das humane Herpes-Virus 7 und 8 (auch bekannt als Kaposi-Sarcoma-Virus) sowie das hier relevante Herpes-simplex-Virus (Typ 1 und 2) (Shubladze und Huang 1959).

Die Struktur eines Herpes Virus ist typischerweise vierlagig. Ein Kern, welcher die doppelsträngige DNA enthält, wird von einem Kapsid, gebildet aus Kapsomeren, umhüllt. Dieses Kapsid wiederum wird von einem Proteinmantel, dem Tegument-Protein, und dieser von einer zweilagigen Glyko- Protein-Lipid-Schicht umhüllt (Abbildungen 11 und 12).



Abbildung 11: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines HSV-1 Virion (links und mittig). Die Virusmembran, das Tegument, Kapsid und die doppelsträngige DNA sind gekennzeichnet. Schematische Zeichnung rechts. Der Durchmesser des Virion beträgt etwa 200 nm (The University of Virginia, Charlottesville, VA, USA).



Abbildung 12: Alle Herpesviren besitzen ein regelmäßiges Ikosaeder-(Zwanzigflächner-) förmiges Kapsid (Gleiberg, CC BY-SA 2.0 de, 20.10.2016, Deutschland).

Herpesviren werden in Alpha-, Beta-, und Gamma- Herpesvirengruppen unterteilt. Das Herpes-simplex-Virus gehört zur Alphagruppe, welche sich durch einen kurzen Replikationszyklus und ein breites Wirtsspektrum von den beiden anderen Gruppen unterscheidet (Roizman 1982). Die Transkription, Genomreplikation sowie der Kapsidaufbau erfolgen im Kern der Wirtszelle.



Nature Reviews | Microbiology

Abbildung 13: HSV – Eindringen in die Zelle und intrazellulärer Transport (Brandenburg und Zhuang (2007) Virus trafficking – learning from single-virus tracking. *Nature Reviews Microbiology* 5, 197–208, figure 2).

Abbildung 13 beschreibt den Eintritt des Virions und Transport innerhalb der Wirtszelle. Viren binden an die Plasmamembran, gleiten auf der Zelloberfläche oder entlang der Filopodien (1–3) und binden an spezifischen Rezeptoren bevor sie in die

Zelle eindringen. Die Viren können auch direkt mit der Plasmamembran fusionieren (2). Sie erobern endozytische Pathways, insbesondere Clathrin-abhängige (1), Caveolin-abhängige (3) oder Clathrin- und Caveolin-abhängige (4) Pathways. Nach dem Eindringen und Transport durch die Actinmatrix werden Vesikel, die einen Virus enthalten, durch Dynein oder Dynactin entlang der Mikrotubuli bis hin zum Mikrotubuli- Organisations-Center (MTOC) transportiert. Dies beinhaltet einen regelrechten "Handelsweg" des Virus durch Endosome, Caveosome oder das endoplasmische Retikulum, bevor sie in das Zytoplasma entlassen werden. Kapside können ebenso mittels Dynein oder Dynactin entlang der Mikrotubuli transportiert werden. Vom MTOC aus können Kapside mit Kinesin hin zum Replikationsort des Nucleus (5). Einige Viren entladen ihr genetisches Material in das Zytosol, während andere ihr Genom in den Nucleus transportieren. Das eingeblendete Bild zeigt die Caveolin-vermittelte Endozytose eines Simian Virus 40 (SV40). Die Pfeilspitzen zeigen auf SV40-enthaltende Caveolae neben Actinschweifen. Die farbmarkierten SV40 Partikel sind rot und die Fluoreszenzprotein-markierten Caveolin und Actin sind lila bzw. grün (Brandenburg und Zhuang 2007).

Bei der Replikation der Gene kann man eine zeitliche Folge feststellen und ordnet hierzu bezugnehmend die Gene in drei chronologische Gruppen ein. Die Immediate-Early-Gene (IEG) kodieren für Regulatorproteine, die Early-Gene (EG) kodieren für Replikationsenzyme der viralen DNA und die späten Gene (late genes, LG) für Strukturproteine. (Beth et al. 1976).

Die Konstruktion der Virionen wird nach Durchbruch durch den Zellkern komplettiert, der Transport zur Zellmembran erfolgt mittels des Golgiapparates (Abbildung 14). Wenn die reifen Virionen die Zelle durch die Membran verlassen, ist das weitere Überleben der Zelle abhängig vom Zelltyp. Ohne den genauen Mechanismus zu kennen, weiss man, dass bestimmte Zellen nicht absterben, sondern einen reaktivierbaren Zustand annehmen. Dieser "Schlafzustand" gilt für Herpes-Simplex Typ 1 und 2 sowie Varizella-zoster in den Nervenzellen der Rückenmarksganglien (Flexner 1927).

Abbildung 14 zeigt den Weg des Virus von der Konstruktion bis zum Austritt aus der Zelle, hier allgemein für alle Viren erläutert. Virale Genome werden in Kapside

verpackt und entlang der Mikrotubuli transportiert (1). Virale Membranproteine werden am ER transkribiert (2) und entlang der Mikrotubuli zum Golgiapparat transportiert. Hier bekommt das Kapsid die Umhüllung (3). Viren entwickeln sich auch in den zu den Endosomen gehörenden multivesicular bodies (MVB) (4). Komplette Viren in Transportvehikeln (5) oder subviralen Partikeln (6) werden mittels Kinesin auf Mikrotubuli zur Plasmamembran befördert und verlassen die Zelle durch Exozytose (7) oder Ausknospen (8) an der Plasmamembran. Während des Zellaustritts kann die Actinkruste das Virus durch den dynamischen Actinschweif zu einer benachbarten Zelle schleudern (9). Das eingeblendete Bild zeigt die Actin-Schweifbildung während des Austritts eines Vacciniavirus. Actin (grün) und das phosphorylierte virale Membranprotein A36R (rot) werden mittels Immunfluoreszenz dargestellt. (Brandenburg und Zhuang 2007).



Nature Reviews | Microbiology

Abbildung 14: Viruskonstruktion und Austritt aus der Zelle. Erläuterungen im Text. (Brandenburg and Zhuang (2007) Virus trafficking – learning from single-virus tracking. Nature Reviews Microbiology 5, 197–208, figure 3).

1.2.2 Herpes-simplex-Virus

Im hier vorliegenden Versuch mit dem onkolytischen Virus G47 delta handelt es sich um einen Herpes-simplex-Virustyp 1.

Die beiden Herpes-simplex-Typen 1 und 2 sind mit etwa 70% genetisch identisch.

Der Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) ist der beim Menschen am häufigsten vorkommende Typ.

Etwa 82 Prozent der Bevölkerung sind HSV1-AG positiv, etwa 13 Prozent HSV2-AG positiv (Hellenbrandt et al. 2005).

Im Verhältnis zu anderen Viren hat der HSV-1 einen relativ kurzen Lysezeitraum und vermehrt sich sehr schnell.

Es existieren antiherpetische Medikamente (Aciclovir, Ganciclovir), welche einen Sicherheitsmechanismus in der Anwendung darstellen.

Dennoch kann der HSV-1 viele Erkrankungen auslösen. Neben Herpes labialis, Herpes-Retinitis und Ekzema herpeticatum ist die herpetische Enzephalitis sicher die gravierendste Erkrankung.

Von den 152 kb des Genoms stehen etwa 30 kb zur freien Verfügung, sodass hier Transgene und Promoter eingefügt werden können.

Das Genom ist in ein kurzes (US) und ein langes Segment (UL) aufgeteilt. Zwischen diesen Segmenten und an deren Enden befinden sich repetitive Sequenzen (McGeoch et al. 1988).



Abbildung 15: Genomkarte des Herpes simplex Virus 1. Das HSV-1 Genom ist ein lineares Molekül einer doppelsträngigen DNA von etwa 152,000 bp Länge. Es ist in zwei Segmente unterteilt, das lange (UL) und das kurze (US) Segment. Kurze Wiederholungssequenzen (a/b/c and a'/b'/ c') finden sich am Ende des Genomes und zwischen den Segmenten L und S. Wenn sich die DNA repliziert, bilden sich Inversionen der Segmente mit insgesamt 4 Genomisomeren. Diese 4 Isomere kommen in gleichen Zahlen in den meisten Wild-Typ HSV-1 Populationen vor. Das Genom kodiert 74 Proteine, zumeist in den Segmenten L und S mit der entsprechenden Bezeichnung. Als Beispiel kodiert das Gen US6 das Glykoprotein D, ein Membranglykoprotein für den Zelleintritt. UL30 kodiert eine DNA Polymerase. Vom HSV-1 kodierte Proteine werden nach ihrer Funktion in 4 Kategorien eingeteilt: Proteine zur/m (1.) Virus-DNA-Replikation und Rekombination; (2.) transkriptionalen Regulation der HSV-1 Genexpression und Modulation der Wirtszelle; (3.) Kapsidformation und Zusammenbau und (4.) Virushülleinbau. (Everts und van der Poel 2005; Abbildung und Abbildungstext, übersetzt).

1.2.3 Vom Wildtyp HSV-1 zum Vektor G47 delta

In der Entwicklung eines onkolytischen Virus spielt die Sicherheit eine maßgebliche Rolle. Das Virus darf keine Infektion normaler Zellen bewirken, sondern Tumorzellen infizieren, sich dort vermehren und diese schließlich lysieren. Hier spricht man von Tumorspezifität. Heute kennen wir bereits drei Generationen modifizierter HSV-1-Viren.

1.2.3.1 Erste Generation

In der ersten Generation wurde mittels Deletion das Gen für die Thymidinkinase verändert. Der hieraus entstandene Virusmutant bedarf zur Replikation die zelleigene Thymidinkinase, welche in der notwendig hohen Konzentration nur in sich replizierenden Zellen, also zum Beispiel Tumorzellen, vorkommt (Martuza et al. 1991). Diese Selektivität konnte für Gliomzellen und Gliommausmodelle nachgewiesen werden (Jia et al. 1994), jedoch wurden auch normale Zellen infiziert und eine Neurotoxizität festgestellt (Boviatsis et al. 1994).

Da das Thymidinkinasegen für die Sensibilität gegenüber der Antiherpetika (Aciclovir, Ganciclovir) verantwortlich ist, wurden diese Virusmutationen unempfindlich gegenüber einer medikamentösen Therapie.

Eine weitere Mutation der ersten Generation erfolgte wiederum mittels Deletion, hier des γ 34.5-Genes. Das kodierte Protein blockiert den "Shut-Off" der wirtseigenen Proteinsynthese, welche für die Virusreplikation notwendig ist. Hierdurch kommt es in normalen Zellen zu einer abgeschwächten Replikation. Hier ist das Thymidinkinasegen unberührt, sodass weiterhin eine Sensibilität gegenüber Antiherpetika besteht (Whitley et al. 1993, Bolovan et al. 1994).

Die nächste Variante ist die Mutation des ICP6-Genes, welches für die Ribonukleotidreduktase kodiert. Auch hier gilt, dass sich eine zu infizierende Zelle in Replikation befinden muss, woraus sich die Tumorspezifität generiert (Mineta et al. 1994, Carroll et al. 1996).

1.2.3.2 Zweite Generation

In der zweiten Generation der Virusmutationen wurden mehrere Mutationen in einem Vektor integriert, um Rückmutationen in Wildtypen zu verhindern. Der Vektor G207 verbindet die Deletionen beider γ 34.5 - Gene mit der Inaktivierung des ICP 6-Genes (Mineta et al. 1995). Die Effektivität wurde in Studien mehrerer Tumorentitäten nachgewiesen (Varghese und Rabkin 2002). Eine Antiangiogenesewirkung wurde diesem Vektor zudem zugeschrieben (Cinatl et al. 2004).

Der Vektor NV1020 integriert die Mutationen des Thymidinkinase-Genes und eines der beiden γ 34.5-Gene. Das Thymidinkinasegen wird jedoch von der HSV-2-DNA übertragen, sodass die Antiherpetika-Sensibilität erhalten bleibt (Meignier et al. 1988).

Auch der Vektor NV 1020 zeigte in mehreren Tumorentitäten hohe Selektivität und tumorlysierende Aktivität.

In einem Vergleich der beiden Vektoren konnte NV 1020 sowohl effizienter replizieren als G207 (Cozzi et al. 2001), als auch eine höhere onkolytische Fähigkeit bei niedrigerer Konzentration nachgewiesen werden (Bennett et al. 2002).

1.2.3.3 Dritte Generation

Die aus unserer Arbeitsgruppe um Samuel Rabkin, Boston, stammende dritte Generation eines HSV- 1-Vektors G47 delta, welcher im hier beschriebenen Versuch verwendet wird, ist eine Weiterentwicklung des Vektors G207.

Die Mutationen liegen auf dem ICP 6-Gen, dem γ 34.5-sowie α 47-Gen. Das α 47-Gen kodiert für ICP 47, welches das Transport-Antigen-Protein (TAP) blockiert. Das Fehlen des α 47-Genes sorgt also für eine erhöhte MHC-Class-1-Präsentation und hierdurch für eine erhöhte Lyserate der infizierten Zellen, da hierdurch die Virusabwehr der Zelle nicht mehr geschwächt wird (Todo et al. 2001).

1.3 LacZ und X-gal

ß-Galactosidase spielt eine zentrale Rolle in der Molekularbiologie. Das Enzym wird vom LacZ-Operon synthetisiert und diente Jacob und Monod als Model für die Beschreibung der Regulierung der Genexpression (Pardee et al. 1958).

Im hier verwendeten Vektor G47delta wurde das LacZ aus E.coli transgen in den ICP6-Lokus integriert. (Liu et al. 2005).

X-gal ist die abkürzende Bezeichnung für 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-ß-D-Galaktopyranosid, welches durch ß-Galaktosidase zu Galaktose und das blaufärbende 5-Brom-4-chlor-indoxyl (nach Oxidation durch Sauerstoff 5,5'-Dibrom-4,4'dibrom-indigo) gespalten wird (Juers et al. 2012). Somit ergibt sich eine Anfärbemöglichkeit für den Vektor G47delta.

Als Beispiel sei hier in Abbildung 16 die Anfärbung von Brustkrebsmetastasen in Hirnschnitten mit X-gal nach Injektion von G47delta in die Karotis dargestellt (Liu et al. 2005).



Abbildung 16: Ausbreitung des Vektors G47delta in Brustkrebsmetastasen (Liu R, Martuza RL, Rabkin SD (2005) Intracarotid delivery of oncolytic HSV vector G47delta to metastatic breast cancer in the brain. Gene Therapy 12, 650 figure 3).

1.4 Zielsetzungen

Die Neurofibromatose Typ 1 ist eine der häufigsten vererbbaren Erkrankungen (Huson et al. 1989, Lammert et al. 2005, Wimmer 2005). Neben weiteren Symptomen leiden die Patienten vor allem unter der Tumorbildung. Die Tumoren können ubiquitär am gesamten Körper auftreten (Woodraff 1999). Es werden kutane lokal begrenzte Neurofibrome - dann benigne und als dermal bezeichnet - von plexiformen peripheren Neurofibromen (PNF) unterschieden.

Die plexiformen Neurofibrome wachsen auch im Körperinneren zwischen den Organen und können diese komprimieren sowie als nervassoziierte Tumoren Schmerzen auslösen. Wir wissen, dass das Risiko der Patienten mit einem PNF einen malignen peripheren Nervscheidentumor (MPNST) entwickeln zu können, bei etwa 10% liegt (Hagel et al. 2007, Woddraff 1999). Ein MPNST ist potenziell lebensbedrohlich (Hagel et al. 2007).

Aktuell ist die chirurgische Entfernung der Goldstandard (Ferner und Gutmann 2002). Aufgrund der Ausdehnung und Nervinfiltration sind der Resektion eines Tumors natürliche Grenzen gesetzt (Horch et al. 1988). Der empfohlene Sicherheitsabstand der Resektion eines MPNST beträgt 10cm (Ferner und Gutmann 2002) und begrenzt die Möglichkeiten einer chirurgischen Intervention um ein Weiteres.

Die medikamentöse oder konservative Therapie zeigt bislang nur kleine Fortschritte im Bereich der experimentellen Forschung. Hier werden vor allem der Forschung im Bereich der Antiangiogenese aufgrund der vaskulären Tumorkomponente die größten Erfolge zugesprochen (Karajannis et al. 2015, Friedrich et al. 2012).

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit liegt in der Ermittlung erster Erfahrungen mit dem Einsatz onkolytischer Viren, hier insbesondere einem Herpes-simplex-Virus in dritter modifizierter Generation, namentlich dem onkolytischen Herpes-simplex-Virus (oHSV) G47 delta. Zum einen soll die Handhabung der Virusvermehrung etabliert, das PNF-Xenograft-Mausmodell und die Virusinjektion optimiert werden. Zum anderen soll die Wirkung der onkolytischen Wirkung an den Xenograft-Tumorstücken untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Entnahme eines humanen plexiformen Neurofibromes

Die Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg hat unter der Bearbeitungsnummer WF-017 /11 keine Bedenken gegen die Entnahme eines humanen plexiformen Neurofibromes geäußert.

Die Einwilligung des Patienten auf Grundlage der Vorschriften der Ethikkomission liegt vor.

Einschlusskriterien

- Diagnose der NF1 nach NIH- Kriterien (National Institutes of Health)
- Alter bis 40 Jahre
- Patienten, bei denen unabhängig von der Studie eine operative Tumorreduktion aus klinischen Gründen vorgesehen ist

Ausschlusskriterien

- Patienten mit atypischen NF1-Symptomen
- Patienten mit chronischen Erkrankungen neben der NF1

Vorgehen im OP

Die Verwendung von Tumormaterial beschränkt sich auf den üblicherweise zu verwerfenden Tumorrest des plexiformen Neurofibromes, welches aus klinischen Gründen reseziert bzw. reduziert wird. Somit ergeben sich drei Tumorvolumina: das Hauptpräparat zur neuropathologischen Bestimmung und Beurteilung der Dignität und nachrangig der zu verwerfende Tumorrest, aus dem das Präparat für die Xenograft-Transplantation gewonnen wird.

Die Probe für die Neuropathologie wird in vierprozentigem Formaldehyd transportiert. Die Probe für die Xenograft Transplantation wird in sogenanntem Standardmedium transportiert.

Standardmedium:

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM™, Gibco, Carlsbad, CA, USA)500mlFetal Bovine Serum (FBS™, Gibco, Carlsbad, CA, USA)50ml

Natrium-Pyruvat (Sodium Pyruvate™, Biochrom, Berlin, Deutschland)	5ml
Glutamin (L-Glutamine™, Gibco, Carlsbad, CA, USA)	5ml
Penicillin/Streptomycin (Pen Strep™, Gibco, Carlsbad, CA, USA)	5ml
Amphotericin B (Fungizone™, Bristol-Myers Squibb, New York, NY, USA)	5ml

2.1.1 Neuropathologische Untersuchung des Hauptpräparates

Im Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurde das Tumorhauptpräparat untersucht.

Paraffineinbettung

Nach Fixierung in gepuffertem Formaldehyd wird ein Standardprotokoll der Neuropathologie zur Paraffineinbettung angewandt (SOP 2.6.3 V.07 QM-Handbuch Neuropathologie UKE)

Schnitte

Die Paraffinblöcke werden 2 Stunden bei -20°C aufbewahrt und die Schnitte mit einem Mikrotom (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) angefertigt. Die Schnitte werden in einem Kaltwasser- (20°C), dann in einem Heißwasserbad (45°C) gestreckt und auf den Objektträger aufgezogen. Die Trocknung erfolgt bei etwa 40°C über 12 Stunden.

Mikrowellenbehandlung

Teilweise wird bei den immunhistochemischen Färbungen eine Mikrowellenvorbehandlung verlangt (hierzu SOP 2.6.3 V.07 QM-Handbuch Neuropathologie UKE).

Die Färbungen und immunhistochemischen Färbungen werden mit einem Vollautomaten (Ventana benchmark XTTM, Ventana, Tuscon AZ, USA) durchgeführt. Die Programmdurchführung wird computergestützt gesteuert (NexES V. 9.3, VentanaRoche). (SOP 2.6.8 V.04, QM-Handbuch Neuropathologie, UKE).

26

HE-Färbung (VentanaRoche #760-2021) van Gieson-Färbung PAS-Färbung S 100, keine Vorbehandlung (DAKO Agilent, Santa Clara CA, USA) NF (Neurofilamente), Mikrowelle, Citratpuffer (DAKO Agilent, Santa Clara CA, USA) EMA (epitheliales Membranantigen), Mikrowelle, Citratpuffer (DAKO Agilent, Santa Clara CA, USA)

2.2 Mausmodell

Das Amt für Verbaucherschutz, Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen der Freien und Hansestadt Hamburg hat unter der Genehmigungsnummer 11/11 keine Bedenken gegen die Durchführung des angezeigten Tierversuches geäußert.

Der Promovend hat erfolgreich den Versuchstierkundekurs nach FELASA C absolviert.

2.2.1 Xenograft Transplantation am Nervus ischiadicus der Maus

20 athymische Mäuse vom Typ NMRI/nu (Naval Medical Research Institute/nude; Charles River) werden 8 Wochen nach Geburt bezogen und zunächst 1 Woche an den S1-Tierversuchsbereich Campus Forschung (Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf UKE, Hamburg, Deutschland) gewöhnt.

Die Probe des humanen plexiformen Neurofibromes wird aus dem OP in das Labor transportiert und unter sterilen Kautelen unter der Sicherheitswerkbank in 3x3x3mm große Stücke geschnitten. Die Stücke werden zur Kontrolle ein zweites Mal abgemessen und in einer basalmembranartigen Matrix (Matrigel[™], Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) eingelegt.

Im S1-Tierversuchsbereich Campus Forschung erfolgt nun die Narkose der Mäuse, gewichtsadaptiert mit Ketamin/Xylazin intraperitoneal (i.p.).

Ketamin (Narketan™, Vetoquinol, Ravensburg, Deutschland)/ml NaCl12mgXylazin (Rompun™, Bayer, Leverkusen, Deutschland)/ml NaCl1,6mgApplikation 10ml/kg KG i.p.1

auf Kork/sterilem Abdecktuch, Arbeiten Fixierung der Maus unter der Sicherheitswerkbank. Kleiner Einschnitt (ca. 5-10mm) in die Haut lateral am linken Oberschenkel, um den N. ischiadicus freizulegen. Der Einschnitt wird mit einem Antiseptikum auf Alkoholbasis (Cutasept[™], BodeChemie/Hartmann, Heidenheim, desinfiziert. Danach wird der N. ischiadicus mit einem stumpfen Deutschland) Haken hochgezogen, vorsichtig in Längsrichtung angeschnitten und stabilisiert. Ein kleines Stück Tumor (3x3x3mm) wird am Nerv platziert (ähnlich Abbildung 17). Nach der Platzierung des Implantates wird der Nerv wieder zurückgelegt und die Wunde mittels resorbierbaren Polyglykolsäure-Fäden (Serafit™4-0, Serag-Wiessner, Naila, Deutschland) und Wundklammern verschlossen.

Die Tiere werden je Käfig folgend am Ohr markiert: Keine Marke, 1x rechts, 1x links, 2x rechts und 2x links.

Eine analgetische Behandlung nach Tumorimplantation erfolgt durch die orale Gabe von 0,5 mg/ml Meloxicam (Metacam[™], Boehringer, Ingelheim, Deutschland) drei Tage post operativ.

2.3 Vervielfältigung des Herpes-simplex-Virus G 47 delta

Die Arbeiten unter 2.3 erfolgen in einem S2-Labor des Campus Forschung, UKE. Es wurden die Sicherheitsbestimmungen erfüllt und die Arbeiten durch den zuständigen Sicherheitsbeauftragten genehmigt. Die Arbeitsschutzrichtlinien wurden eingehalten. Entsprechende betriebsärztliche Gutachten wurden eingeholt.

Der Virusstock des oHSV G47delta wurde unter vorgeschriebenen Sicherheitsbestimmungen von unserer Arbeitsgruppe im Labor Samuel D. Rabkin, PhD (Brain Tumor Research Center, Harvard Medical School, Boston, MA, USA) in Transportgefäßen bei -80°C bezogen. Hier wurden auch die im Folgenden beschriebenen Techniken erlernt.

2.3.1 Quantifizieren des initialen Virusstock mit Plaque-Assay

Der erste Arbeitsschritt umfasst die Vorbereitung der Verozellen (Nierenzellen der grünen Meerkatze), welche in einer P24-Passage aus eigenem Bestand vorliegen. Das vorliegende Medium wird gegen eine phosphatgepufferte Salzlösung ausgetauscht (PBS[™], Gibco, Carlsbad, CA, USA). Mit 5ml Trypsin (Trypsin[™], Gibco, Carlsbad, CA, USA) zur Zelldissoziation 3 Minuten inkubieren und mit Standardmedium (s.o.) diesen Vorgang stoppen.

Nun 5 Minuten zentrifugieren bei 1200U/min. Das Pellet wird in 10ml Verozellmedium aufgelöst.

Verozellmedium

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM™, Gibco, Carlsbad, CA, USA)500mlFetal Bovine Serum (FBS™, Gibco, Carlsbad, CA, USA)50ml

50µl dieser Zellsuspension werden mit 50µl Trypanblau (Trypan Blue Solution, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) vermischt und auf einen Objektträger mit Zählkammer (Neubauer™, Hecht Assistent, Sondheim, Deutschland) zur Auszählung aufgetragen.

Um eine geregelte Vermehrung (Growing) der Viren mit Hilfe der Verozellen zu erreichen, wird die Standard-Zellzahl von 175.000 pro Well einer Zellkulturplatte (6-Well, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) angestrebt. Hierzu wird der Verdünnungsfaktor errechnet und die Zellsuspension entsprechend mit Verozellmedium aufgefüllt.

12 Wells werden mit je 2ml bestückt.

Es folgt eine Inkubation von 24 Stunden bei 37°C, 5% CO₂.

Es wird eine Verdünnungsreihe angesetzt. Hierzu wird zu 2ml Viruspuffer 2 μ l Virusstock gegeben (10⁻³), dann hiervon 10 μ l in 1ml Viruspuffer (10⁻⁵), hiervon 100 μ l in 900 μ l Viruspuffer (10⁻⁶), hiervon 100 μ l in 900 μ l Viruspuffer (10⁻⁷), hiervon 100 μ l in 900 μ l Viruspuffer (10⁻⁸).

Das Verozellmedium aus den Wells wird gegen Viruspuffer getauscht. Pro Well wird je 0,7ml aus der jeweiligen Verdünnung hinzugegeben. Es werden die Verdünnungsreihen 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ verwendet.

Die Wells werden 10 Minuten auf den Rüttler gestellt und 90 Minuten bei 37°C und 10% CO_2 inkubiert. Der Überstand wird abgesaugt.

Den Wells wird je 2ml Viruspuffer/IgG-Medium (6 ml Viruspuffer+6µl IgG; Verhältnis 1:1000) zugegeben.

Inkubation 72 Stunden bei 37°C, 10% CO₂.

Das Medium wird abgenommen und gegen 1ml Fixativ getauscht.

Fixativ Glutaraldehyd 0,2% (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) para-Formaldehyd 2% (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) H₂O

Ruhen bei 10 Minuten Raumtemperatur. Absaugen und 3x mit PBS waschen. 1ml x-gal-Lösung pro Well.

x-gal-Lösung

K-Ferricyanid 500 mM (Gentrochema, Sleeuwijk, Niederlande)	10µl
K-Ferrocyanid 500 mM (Gentrochema, Sleeuwijk, Niederlande)	10µl
MgCl ₂ MgCl2 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)	2µl
x-gal 20mg/ml DMSO (ThermoFisher, Carlsbad, CA, USA)	10µl
PBS (PBS™, Gibco, Carlsbad, CA, USA)	958µl

Inkubation 2 Stunden bei 37°C, 10% CO₂
x-gal abnehmen und Wells mit Leitungswasser spülen.
1ml Neutral-Rot für 2 Minuten bei Raumtemperatur.

Neutral-Rot1mlMethanol (MerckMillipore, Darmstadt, Deutschland)1mlNeutral-Rot (MerckMillipore, Darmstadt, Deutschland)40µlH2O7ml

Spülung mit Leitungswasser. Deckel zum Trocknen aufstellen unter Sicherheitswerkbank.

Auszählen der Plaques unter dem Mikroskop.

2.3.2 Infektion

Die Verozellen werden nun mit dem Virusstock infiziert, um eine Vermehrung zu erreichen.

Analog dem beschriebenen Vorgang zur Vorbereitung der Verozellen, werden diese trypsiniert und gezählt.

Es werden 6 T150 Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) mit 8 Millionen Zellen in 20ml Verozellmedium bestückt.

Viruspuffer

phosphatgepufferte Salzlösung (PBS™, Gibco, Carlsbad, CA, USA)500mlGlycerol (ThermoFisher, Carlsbad, CA, USA)50mlFetal Bovine Serum (FBS™, Gibco, Carlsbad, CA, USA)5ml

Der bezogene Virusstock beträgt 190 μ l mit 4x10⁴ PFU (plaque forming units). Um eine Virusanzahl von 1x10⁵ PFU pro T150-Flasche zu erreichen, werden jeweils 2,5 μ l Virusstock mit 6ml Viruspuffer in jede Flasche appliziert.

Inkubation von 1,5 Stunden bei 37° C und 5% CO₂. Austausch des Mediums mit 20ml DMEM + 1% FBS.

Inkubation bei 34°C und 5% CO₂. Tägliche Überprüfung des Zellrasens.

Etwa nach zwei Tagen ist die weitestgehende Infektion zu erwarten, der Zellrasen löst sich um 20-40%.

Die Zellrasenschicht wird nun mit dem CellScraper™ (320 mm, 12 mm Klinge, CytoOne, Orlando, FL, USA) abgelöst. Vorsichtiges Spülen mit Viruspuffer ohne die Zellen dabei aufzureißen.

Die Zellen werden mit dem Medium in 50ml Falcons (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) überführt

und bei 4°C für 10 Minuten mit 2000U/min zentrifugiert.

Die Überstände werden als "supernatant " beschriftet und eingefroren.

Zu 4,5ml der Überstände werden weitere 4,5ml Viruspuffer gegeben und die Pellets aufgelöst. Diese Lösung wird mit "Harvest" beschriftet und ebenso bei -80°C eingefroren.

2.3.3 Aufreinigen der infizierten Verozellen (Purification)

Zum Aufbrechen der infizierten Zellen wird nach dem Prinzip "Freeze, Thaw, Sonic" (FTS) verfahren. Hierbei wird das Gefäß in einem 40°C-Wasserbad aufgetaut und wieder auf Trockeneis eingefroren. Dieser Vorgang wiederholt sich 3 Mal.

Anschließend wird fünf Mal für je 30 Sekunden das Gefäß in ein Ultraschallbad getaucht.

Der Virussuspension wird nun 12µl MgCl₂ (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) und 20µl Benzonase™(MerckMillipore, Darmstadt, Deutschland) zugeführt und gevortext (Ratek, Victoria, Australien).

Inkubation für 30 Minuten bei 37°C unter 10% CO₂.

Zentrifugieren bei 4°C mit 1200U/min für 10 Minuten.

Der Überstand wird in ein 15ml Falcon mit der Beschriftung "LS_{sp1}" (lowspeed, supernatant 1) überführt und zentrifugiert (1600U/min; 4°C; 10 Minuten).

Wiederum wird der Überstand abgenommen und in ein 15ml Falcon mit der Beschriftung "LS_{sp2}" überführt.

Die Pellets werden mit je 1ml Viruspuffer gelöst und in 1,5ml Eppendorfgefäße mit der Beschriftung $LS_{p1/2}$ " (lowspeed pellet 1 und 2) überführt.

Die Eppendorfgefäße " $LS_{p1/2}$ " werden je 2 Mal gevortext und 30 Sekunden in das Ultraschallbad gehalten.

Zentrifugieren bei 4°C für 10 Minuten bei 2000U/min.

Der Überstand wird in das 15ml Falcon LS_{sp2} gegeben, gevortext und 50µl werden in ein Eppendorfgefäß LS_{sup} überführt.

Die Pellets aus $LS_{p1/2}$ werden mit Viruspuffer 500µl resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß LS_p überführt. LS_{sup} und LS_p werden bei -80°C eingefroren.

Der Inhalt des 15ml Falcon mit der Beschriftung " LS_{sp2} " wird über eine 10ml Spritze in absteigender Folge gefiltert: 5µl, 0,8µl, 0,45µl. Ein Aliquot von 50µl wird in ein Eppendorfgefäß mit der Aufschrift HSLD überführt und bei -80 eingefroren.

In ein 50ml Falcon wird 5ml Saccharose (Sucrose, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) vorgelegt und vorsichtig die gefilterte Suspension aufpipettiert.

Zum Ausgleich in der Zentrifuge wird die gleiche Menge Viruspuffer in einem zweiten 50ml Falcon aufpipettiert.

Zentrifugieren in der Hochgeschwindigkeitszentrifuge bei 4°C 95 Minuten bei 11500 U/min. Beschleunigung 2 Minuten. Bremsung 6 Minuten.

50µl vom Überstand werden in ein 1,5ml Eppendorfgefäß mit der Aufschrift "HS_{sup}" (highspeed supernatant) überführt und bei -80°C eingefroren.

Aus der Saccharoseschicht wird analog 50µl in ein Eppendorfgefäß mit der Aufschrift "HS_{suc}" gegeben und bei -80°C eingefroren.

Das Pellet wird mit 1ml Viruspuffer gelöst und resuspendiert. Diese Suspension wird auf Eis in den 4°C-Raum gestellt und über 3 Stunden alle 20 Minuten gevortext und 30 Sekunden in das Ultraschallbad gegeben.

Die Lösung wird in ein neues 15ml Falcon überführt, 2 Mal wird das alte Röhrchen mit 300µl Viruspuffer gespült, gevortext und in das Ultraschallbad gegeben und diese Spülung dem neuen Falcon zugeführt.

Ein 50µl Aliquot Überstand wird in ein Eppendorfgefäß mit der Aufschrift "HS-1" bei -80°C eingefroren.

Zentrifugieren bei 4°C 1600 U/min für 10 Minuten.

Nun wird wieder ein 50µl Aliquot Überstand in ein Eppendorfgefäß mit der Aufschrift "HS" gegeben und bei -80°C eingefroren.

Zuletzt wird das Pellet mit 300 μ l Viruspuffer aufgelöst und ein 50 μ l Aliquot dieser Suspension in ein Eppendorfgefäß mit der Aufschrift "HS_p" gegeben und bei -80°C eingefroren.

Zu allen 50µl-Aliquots für die Titerbestimmung wird parallel ein 350µl-Aliquot bei -80°C eingefroren.

2.3.4 Plaques-Assay der 8 Aliquots

Die Verozellen werden aufgetaut. Das vorliegende Medium wird gegen eine phosphatgepufferte Salzlösung ausgetauscht (PBS[™], Gibco, Carlsbad, CA, USA). Mit 5ml Trypsin (Trypsin[™], Gibco, Carlsbad, CA, USA) zur Zelldissoziation 3 Minuten inkubieren und mit Standardmedium (s.o.) diesen Vorgang stoppen.

Nun 5 Minuten zentrifugieren bei 1200U/min. Das Pellet wird in 10ml Verozellmedium aufgelöst.

50µl dieser Zellsuspension werden mit 50µl Trypanblau (Trypan Blue Solution, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) vermischt und auf einen Objektträger mit Zählkammer (Neubauer™, Hecht Assistent, Sondheim, Deutschland) zur Auszählung aufgetragen.

Um eine geregelte Vermehrung (Growing) der Viren mit Hilfe der Verozellen zu erreichen, wird die Standard-Zellzahl von 175.000 pro Well einer Zellkulturplatte (6-Well, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) angestrebt. Hierzu wird der Verdünnungsfaktor errechnet und die Zellsuspension entsprechend mit Verozellmedium aufgefüllt.

30 Wells werden mit je 2ml bestückt.

Es folgt eine Inkubation von 24 Stunden bei 37°C, 5% CO₂.

Es wird für jedes Aliquot eine Verdünnungsreihe angesetzt. Hierzu wird zu 2ml Viruspuffer 2 μ l Aliquot gegeben (10⁻³), dann hiervon 10 μ l in 1ml Viruspuffer (10⁻⁵),

hiervon 100µl in 900µl Viruspuffer (10^{-6}), hiervon 100µl in 900µl Viruspuffer (10^{-7}), hiervon 100µl in 900µl Viruspuffer (10^{-8}).

Das Verozellmedium aus den Wells wird gegen Viruspuffer getauscht. Pro Well wird je 0,7ml aus der jeweiligen Verdünnung hinzugegeben. Für die Aliquots LS_{sup} , LS_p , HSLD, HS-1, HS_p, HS werden die Verdünnungsreihen 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ verwendet. Die Aliquots HS_{sup} und HS_{suc} werden 10⁻⁵, 10⁻⁶ und 10⁻⁷ verdünnt.

Die Wells werden 10 Minuten auf den Rüttler gestellt und 90 Minuten bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert. Der Überstand wird abgesaugt.

Den Wells wird je 2ml Viruspuffer/IgG-Medium (60 ml Viruspuffer+60µl IgG; Verhältnis 1:1000) zugegeben.

Inkubation 72 Stunden bei 37°C, 10% CO₂.

Das Medium wird abgenommen und gegen 1ml Fixativ getauscht.

Fixativ

Glutaraldehyd 0,2% (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) para-Formaldehyd 2% (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) H₂O

Ruhen bei 10 Minuten Raumtemperatur. Absaugen und 3x mit PBS waschen. 1ml x-gal-Lösung pro Well.

x-gal-Lösung

K-Ferricyanid 500 mM (Gentrochema, Sleeuwijk, Niederlande)10µlK-Ferrocyanid 500 mM (Gentrochema, Sleeuwijk, Niederlande)10µlMgCl₂ MgCl2 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)2µlx-gal 20mg/ml DMSO (ThermoFisher, Carlsbad, CA, USA)10µlPBS (PBS™, Gibco, Carlsbad, CA, USA)958µl

Inkubation 2 Stunden bei 37°C, 10% CO₂

x-gal abnehmen und Wells mit Leitungswasser spülen. 1ml Neutral-Rot für 2 Minuten bei Raumtemperatur.

Neutral-Rot	
Methanol (MerckMillipore, Darmstadt, Deutschland)	1ml
Neutral-Rot (MerckMillipore, Darmstadt, Deutschland)	40µl
H ₂ O	7ml

Spülung mit Leitungswasser. Deckel zum Trocknen aufstellen unter Sicherheitswerkbank.

Auszählen der Plaques unter dem Mikroskop.

Zur Sicherheit wird die Verdünnungsreihe, x-gal-Färbung und Plaques-Auszählung ein zweites Mal für den zu verwendenden Virusstock "HS" durchgeführt.

2.4 Virusinjektion des Herpes-simplex-Virus G47 delta

Bei Tumorgrößenstabilität werden nun die Mäuse zum Transport vorbereitet und in entsprechenden Käfigen (vorrätig im S1 Tierversuchsbereich) in den Sicherheitsbereich S2 verbracht. Auch hier erfolgt zunächst eine mehrtägige Gewöhnungsphase.

Im S2-Tierversuchsbereich erfolgt nun (9 Tage nach Implantation) die Narkose der Mäuse, gewichtsadaptiert mit Ketamin/Xylazin intraperitoneal (i.p.).

Ketamin (Narketan™, Vetoquinol, Ravensburg, Deutschland)/ml NaCl12mgXylazin (Rompun™, Bayer, Leverkusen, Deutschland)/ml NaCl1,6mgApplikation 10ml/kg KG i.p.1

Fixierung der Maus auf Kork/sterilem Abdecktuch mit Klebestreifen, Arbeiten unter der Sicherheitswerkbank. Kleiner Einschnitt (ca. 5-10mm) in die Haut lateral am linken Oberschenkel, um den N. ischiadicus freizulegen. Der Einschnitt wird zuvor mit einem Antiseptikum auf Alkoholbasis (Cutasept[™], BodeChemie/Hartmann, Heidenheim, Deutschland) desinfiziert. Danach wird der N. ischiadicus-Tumorkomplex mit einem stumpfen Haken hochgezogen (Abbildung 17).



Abbildung 17: Xenograft am N. ischiadicus in situ 9 Tage nach Implantation.

2 Käfige à 5 Tiere werden nun mit Virus, 2 weitere Käfige à 5 Tiere mit Pufferlösung (Mock, Nullprobe) behandelt.

Hierzu wird mit der Präzisionsspritze (Hamilton[™], Planegg-Martinsried, Deutschland) jeweils 1µl Lösung in die Mitte eines jeden Tumores injiziert. Die Wunde wird wiederum mittels resorbierbaren Polyglykolsäure-Fäden (Serafit[™]4-0, Serag-Wiessner, Naila, Deutschland) und Wundklammern verschlossen.

Nach einer weiteren Woche erfolgt die Tötung mit zunächst einem CO2/O2 Gemisch (O2-Anteil 20%) zur Narkose, bei sicherer Sedierung dann reines CO2. Die Tötung wird mit der zervikalen Dislokation abgeschlossen.

Bestimmung der Größe der Xenograft-Tumoren

Post mortem wird der Xenograft-Tumor am N. ischiadicus freigelegt und entnommen. Die Xenograft-Tumorstücke werden mit der Schiebleere grob gemessen. Da diese nun unregelmäßige Formen aufweisen und teilweise mit den Umgebungsgeweben verwachsen sind, ist eine genaue Bestimmung der Volumina nicht möglich. Die Größe der Xenograft-Tumorstücke wurde daher mit Hilfe eines 3x3x3mm-Rasters in 3 Gruppen kategorisiert: Im Vergleich zur ursprünglichen Größe (1) kleiner, (2) unverändert oder (3) größer.

Die Abbildungen 18 und 19 zeigen die Xenograft-Tumore in situ post mortem.



Abbildung 18:

Xenograft am N. ischiadicus in situ 16 Tage nach Implantation post mortem.



Abbildung 19: Xenograft am N. ischiadicus in situ 16 Tage nach Implantation post mortem. Hervorgehoben.

2.5 Virusnachweis in Cryoschnitten

Die Präparate werden in eine Einbettschale (embedding molds Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) gelegt, in welcher zuvor eine Schicht Kryoeinbettmedium (TissueTek O.C.T.™, Sakura Finetek, CA, USA) angefroren wurde. Nun wird das

Präparat abschließend mit Einbettmedium bedeckt und auf Trockeneis en bloc gefroren (Abbildung 20).



Abbildung 20:

Xenograft-Tumor am Nerven in Cryobox mit Einbettmedium vor dem Einfrieren. 2 Blutflecken wurden herausgelöscht.

Nach Beschriftung der Einbettschalen und Lagerungskartons werden diese bei -80°C aufbewahrt.

Die Cryoblöcke werden in einem gekühlten Kryo-Mikrotom/Cryostat (Leicabiosystems, Wetzlar, Deutschland) 20µm bei -20°C geschnitten und auf Objektträger (Hecht Assistent, Sondheim, Deutschland) aufgetragen, beschriftet und bei -80°C eingefroren.

Die Kryoschnitte werden aufgetaut.

Fixieren mit Fixativ (2.3.1).

Zweimaliges Waschen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS™, Gibco, Carlsbad, CA, USA).

Die x-gal-Lösung (siehe 2.3.1) wird aufgetragen und 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Hierbei werden die Schnitte mit Parafilm[™] (Bemis, Neenah, WI, USA) in einer feuchten Kammer gelagert.

Die Schnitte werden mit Leitungswasser abgewaschen.

Spülen mit PBS[™] und EDTA (2mM).

Im Färbetrog/Küvette in Leitungswasser 5 Minuten tauchen.

Im Färbetrog/Küvette in Hämatoxylin (Hematoxylin, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) 10 Sekunden tauchen.

In der Spüle unter fließendem Leitungswasser 5 Minuten spülen.

Im Färbetrog/Küvette in Eosin Y[™] (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) 1 Minute tauchen.

Im Färbetrog/Küvette in Ethanol 95% 2x 5 Minuten tauchen.

Im Färbetrog/Küvette in Ethanol 100% 2x 5 Minuten tauchen.

Im Färbetrog/Küvette in Xylol (Xylene™, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) 2x 10 Minuten tauchen.

Mounting der Coverslides mit xylolbasiertem Medium (Poly-Mount Xylene™, Polysciences, Warrington, PA, USA).

Analyse und Anfertigen der Fotos

Die Analyse erfolgt zunächst unter einem Durchlichtmikroskop Axio Zoom V16[™] (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland).

Nun werden repräsentative Schnitte in der Neuropathologie des UKE im NanoZoomer 2HTTM (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) jeweils über etwa 12 Stunden ausgelesen und digital gescannt.

Die selben Scans erfolgen von den Hauptpräparaten der initialen neuropathologischen Diagnostik nach vorheriger Auswahl.

Die Hauptpräparate werden nun mit den Xenograft Schnitten verglichen und die histopathologischen Befunde mit dem Neuropathologen besprochen.

3. Ergebnisse

3.1 Das humane plexiforme Neurofibrom

Der 16 jährige männliche Patient berichtete über eine etwa 4 jährige Anamnese eines weichen pigmentierten Tumores des rechten Hüftbereiches mit Größenprogredienz. Der Tumor war in seinem Ausmaß über das normale Hautniveau hinaus 10x14cm groß. Die Tumordicke betrug 6,5cm. Es wurden nur gelegentliche Beschwerden geäußert, die Hauptbeschwerden ließen sich auf die Ästhetik reduzieren.

3.1.1 Das humane PNF in der neuropathologischen Aufbereitung



Abbildung 21: Übersicht des Hauptpräparates in HE-Färbung. Deutlich sichtbar die wurmartigen Windungen ("bag of worms") sowie die unterschiedlichen Anteile des Tumores mit Fettanteilen, diffusen und plexiformen Anordnungen der Neurofibrome.



Abbildung 22: Vergrößerung des Hauptpräparates in HE-Färbung.

Hier die diffuse Zellanordnung.



Abbildung 23: Vergrößerung des Hauptpräparates in HE-Färbung.

In diesem Ausschnitt wird die plexiforme Anordnung deutlich.

Typisch sind die sogenannten "shredded carrots", Kollagenstränge unterschiedlicher Dicke.



Abbildung 24: Vergrößerung des Hauptpräparates. Zur Darstellung kommen hier die Perineuralzellen in einer immunhistochemischen EMA-Färbung.



Abbildung 25: NF-Anfärbung des Hauptpräparates. Deutlich werden hier die Neurifilamente.



Abbildung 26: Immunhistochemische Anfärbung mit S-100. Neurofibrome zeigen hier eine starke Positivität.

3.2 Xenograft Transplantation am N. Ischiadicus der Maus

Nach Auswahl eines repräsentativen Tumorstückes für die neuropathologische Aufbereitung wurde ein grau-weißliches Gewebestück von 4x4cm für den geplanten Xenograft ausgeschnitten. Wie unter 2.2 beschrieben wurden Stücke von 3x3x3mm präpariert und an den N. ischiadicus der Mäuse implantiert (ähnlich Abbildung 27). Die Transplantation verlief ohne unerwartete Ereignisse. Die Mäuse sind regelrecht aus der Narkose aufgewacht und waren verhaltensunauffällig. Keine Essstörungen oder neurologischen Pathologien.

3.3 Virenvermehrung

Der initiale Virusstock aus unserer Arbeitsgruppe aus Boston um Prof. Samuel Rabkin betrug 190 μ l mit 5x10⁴ PFU.

Nach Aufreinigung (Purification) der vermehrten Viren konnten wir beim Auszählen der Plaques in der ersten Messung folgende Werte erhalten:

Verdünnung 10⁻⁶

-	HSsup	0
-	HSsucc	4,3x10 ⁶ PFU
-	LSsup	4,7x10 ⁸ PFU
-	HS	zu hoch
-	LSp	zu hoch
-	HSLD	3,9x10 ⁸ PFU
-	HS1	zu hoch
-	HSp	zu hoch

Verdünnung 10⁻⁷

-	HSsup	0
-	HSsucc	0
-	LSsup	6,0x10 ⁸ PFU
-	HS	2,9x10 ⁹ PFU
-	LSp	1,9x10 ⁹ PFU
-	HSLD	4,9x10 ⁸ PFU
-	HS1	3,4x10 ⁹ PFU
-	HSp	1,0x10 ⁹ PFU

Verdünnung 10⁻⁸

-	LSsup	5,7x10 ⁸ PFU
-	HS	3,1x10 ⁹ PFU
-	LSp	2,0x10 ⁹ PFU
-	HSLD	1,0x10 ⁹ PFU
-	HS1	4,0x10 ⁹ PFU
-	HSp	1,6x10 ⁹ PFU

In der doppelt angelegten Sicherheitsmessung für den später zu verwendenden HS-Titer ergaben sich folgende Werte:

Verdünnung 10⁻⁶

-	1. Messung	zu hoch

- 2. Messung zu hoch

Verdünnung 10⁻⁷

-	1. Messung	1,6x10 ⁹ PFU
		0 – –

- 2. Messung $1,6x10^9$ PFU

Verdünnung 10⁻⁸

-	1. Messung	2,4x10 ⁹ PFU
-	2. Messung	1,8x10 ⁹ PFU

Verdünnung 10⁻⁹

-	1. Messung	2,9x10 ⁹ PFU
-	2. Messung	7,1x10 ⁹ PFU

Zur Wahrung der Übersichtlichkeit und Genauigkeit wird die zweistellige Plaques-Auswertung pro Schale favorisiert. Hieraus geht für HS die Verdünnung 10⁻⁸ hervor.

Gemittelt ergibt dies:

 $(2,4x10^9)$ PFU + $(1,8x10^9)$ PFU + $(3,1x10^9)$ PFU : $3 = 1.6 \times 10^9$ PFU

3.4 Vireninjektion

9 Tage nach der Implantation der PNF wurde die OP-Wunde wieder unter Narkose eröffnet, um die Xenografts am Nerven freizulegen. Bei allen Mäusen waren die PNF-Xenografts gut sichtbar (Abbildung 27).



Abbildung 27:

Die in Narkose versetzte Maus mit dem Xenografttumor am N. ischiadicus 9 Tage nach Implantation.

Die Herpes-simplex G47 delta Viren wurden direkt in die PNF-Xenografts von 10 Mäusen injiziert. Als Kontrolle wurde Kochsalzlösung in weitere 10 Mäuse in gleicher Art und Weise injiziert.

Auch die Injektion verlief ereignisfrei. Die Mäuse sind regelrecht nach der Narkose aufgewacht und verhaltensunauffällig. Keine Essstörungen oder neurologischen Pathologien. Zwischen den beiden Gruppen mit und ohne Viren waren keine Unterschiede zu sehen.

3.5 Post mortem Ergebnisse

16 Wochen nach der Implantation und eine Woche nach der Vireninjektion wurden alle 20 Mäuse für die weiteren Untersuchungen und Auswertungen euthanasiert. Bei allen Mäusen waren die implantierten PNF-Xenografttumoren gut zu sehen (Abbildungen 28 und 29).



Abbildung 28:

Xenograft am N. ischiadicus in situ 16 Tage nach Implantation post mortem.



Abbildung 29:

Xenograft am N. ischiadicus in situ 16 Tage nach Implantation post mortem. Hervorgehoben.

Die ursprüngliche quadratische Form hat sich geändert, so dass eine genaue Messung und Berechnung der Größen nicht möglich war. Wir entschieden uns zur deskriptiven Statistik mittels Ordinalskalen in 3 Kategorien:

Kategorie 1: kleiner als bei der Implantation.

Kategorie 2: etwa gleiche Größe wie bei der Implantation.

Kagetorie 3: größer als bei der Implantation.

Wie in Abbildung 30 zu sehen ist, scheinen die meisten Xenografttumoren größer geworden zu sein.

Die Verteilung der Xenografttumore unterscheidet sich nicht signifikant (p=0.7, Chi-Square Test).



Abbildung 30:

Volumen der Xenografttumoren nach 16 Tagen (post mortem ex corpore).

3.5.1 Die Xenografttumoren in der histologischen Aufbereitung



Abbildung 31: Übersicht eines plexiformen Neurofibromes ex corpore 16 Tage nach Implantation an den N.ischiadicus (HE-Färbung). Nachweise für X-gal finden sich nicht. Die plexiforme Struktur ist erhalten. Es finden sich typische Quetschartefakte bei Cryoschnitten. Nekrosen sind nicht darstellbar.



Abbildung 32: Plexiformes Neurofibrom ex corpore 16 Tage nach Implantation an den N.ischiadicus (HE-Färbung). Hier deutlich die 4 murinen Faszikel des N.ischiadicus, die das Transplantat umgeben. Kein X-gal-Nachweis, keine Nekrosen.



Abbildung 33: Vergrößerte Darstellung Tumor-Xenograft am murinen Nerv. Die Quetsch-Artefakte sind deutlich, eine Virusanfärbung mittels X-gal ist nicht ersichtlich (HE).



Abbildung 34: Wie Abbildung 33.



Abbildung 35:

Vergrößerung eines Xenograft-Tumores. Die plexiforme Anordnung ist weiterhin gut erkennbar. Im Vergleich zu Abbildung 19 deutliche Quetschartefakte.

Zusammenfassend ist für die histologische Aufbereitung unter 3.5.1 mit den Abbildungen 31 bis 35 in HE Gegenfärbung mit X-gal-staining fest zu halten, dass es zu keinem Virusnachweis gekommen ist. Weder ist eine Anfärbung, noch eine Nekrose zu beobachten. Typisch und für alle Abbildungen geltend sind die Quetschartefakte von Cryoschnitten.

4. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden kleine Stücke von menschlichen PNF erfolgreich an den N. ischiadicus von Mäusen implantiert und durch Injektion des onkolytischen Herpes-simplex-virus G47delta behandelt. Die Mäuse haben sowohl die Implantation als auch die Virusinjektion und Therapie gut überstanden. Es wurde jedoch keine therapeutische Wirkung an den PNF-Xenografttumoren durch die Virenbehandlung erzielt.

4.1 Xenograft

Im Jahr 2010 wurde die Xenografttransplantation von kleinen Stückchen aus menschlichen PNF an den N. ischiadicus von Mäusen in der Forschungsgruppe von Dr. Kluwe / Prof. Mautner etabliert. In der Folge jedoch ergaben sich immer wieder Schwierigkeiten. Oft verschwanden die Xenograft-Transplantate auch ohne jegliche Behandlung. Es ist wahrscheinlich durch die Resorption in den Mäusen zu erklären. Möglichweise waren die PNF, aus denen die zu implantierenden Stücke gewonnen wurden, nicht vital oder groß genug. Aus den klinischen Studien ist bekannt, dass das Wachstum der meisten PNF in Erwachsenen sistiert (Nguyen et al. 2012). Solche PNF können eine Implantation wahrscheinlich nicht überleben. In der vorliegenden Studie wurden alle 20 Xenograft-Tranplantate nach 16 Tagen wieder an den Implantationsstellen gefunden, gut an den Nerven angewachsen und vital im Erscheinungsbild. Dies ergibt eine Erfolgsrate von 100%. Auch die Histologie zeigte identische Eigenschaften wie beim ursprünglichen PNF. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Auswahl in der vorliegenden Studie richtig war: Wir wählten einen jungen Patienten mit der Anamnese eines wachsenden Tumores und aus dem Präparat eine Region mit einem hohen Tumoranteil. Jahrzehntelange Erfahrung in der PNF-Chirurgie durch den Operateur bei der Auswahl des Präparates sowie Kenntnisse und Fertigkeiten in der Mikrochirurgie des Promovenden waren vorteilhaft für einen Erfolg des Xenografts.

PNF sind gutartige Tumoren und wachsen sehr langsam, oftmals stagniert das Wachstum mit fortschreitendem Alter. Daher war in der kurzen Zeit von 16 Tagen kein Wachstum der Xenografttumoren zu erwarten. Die Zunahme der Größe bei der Mehrzahl der Tumoren ist eher durch eine Entzündungsreaktion der murinen Hostgewebe zu erklären (Demestre, et al. 2010).

4.2 Messung der Xenografttumoren

Um die kleinen Xenografttumoren in lebendigen Mäusen zu messen, wurde in der Gruppe von Dr. Kluwe / Prof. Mautner ein durch Hochfrequenz-Ultraschall gestütztes Bildgebungsverfahren etabliert (Gleiss et al. 2014). Dieses Verfahren ermöglicht eine genaue Größenbestimmung der implantierten humanen Tumoren in Mäusen. Auch das inflammatorische Gewebe der Mäuse konnte vom Tumor-Xenograft unterschieden werden. Hier wird das Vevo 770-In-Vivo Micro-Imaging System, welches speziell für die Ultraschalluntersuchung von Kleintieren entwickelt wurde, eingesetzt. Für die Größe der implantierten PNFs von 27mm³ weist das Vevo 770 mit niedrigen intra- und interindividuellen Messfehlern eine gute Reliabilität auf. Mit dieser Methode könnte auch die Größenänderung der Xenografttumoren über die gesamte Behandlungszeit verfolgt werden. Leider konnte dieses Verfahren jedoch aus Sicherheitsgründen nicht in der vorliegenden Studie eingesetzt werden. Den Mäusen wurden Viren im hierfür vorgesehenen Sicherheitsbereich S2 injiziert. Das Vevo 770 Imaging System ist nur für den Sicherheitsbereich S1 zulässig.

Folglich konnte die Größe der Xenografttumoren erst am Ende des Experimentes ex corpore untersucht werden. Da sich die Form der Xenograftstücke geändert hatte und murine Gewebeverbindungen eingegangen wurden, erschien eine deskriptive Statistik mit Ordinalskala sinnvoll.

Da generell kein Wachstum des PNF-Xenografts zu erwarten ist, kann die Wirkung einer Behandlung nur durch Verkleinerung bzw. Verschwinden der PNF-Xenografttumoren definiert werden (Demestre et al. 2010). Für klinische Studien über die Wirkung von Medikamenten an PNF ist die Schrumpfung der Tumoren der primäre Outcome-Parameter.

4.3 Virusreplikation

Die vorliegenden Plaques-Assays, insbesondere die Wiederholung in doppelter Absicherung zeigen eine zuverlässige Replikation unter den gegebenen S2-Sicherheitsbedingungen im Labor. Die Viruskonzentration kann mit geringen Schwankungen verlässlich gemessen werden und ist sehr hoch bei ausreichend gewonnenem Inhalt von mehreren 350µl Aliquots.

4.4 Fehlende onkolytische Wirkung

Sowohl bei der obigen Definition als auch histologisch ist keine Wirkung der Virenbehandlung zu sehen. Die fehlende Wirkung der onkolytischen Viren ist in erster Linie durch das fehlende Wachstum des PNF-Xenografts zu erklären. Es ist bekannt, dass sich onkolytische Viren nur vermehren, wenn die infizierten Zellen wachsen, bzw. die natürliche Wachstumsbeschränkung aufgehoben ist (Martuza et al. 1991). Da sich das PNF-Wachstum eher bradytroph verhält, können onkolytische Viren nicht wirken. Entsprechend wurden auch tatsächlich keine Viren in den post mortem Xenografttumoren nachgewiesen.

Trotz der negativen Ergebnisse der Behandlung mit onkolytischen Viren konnten wertvolle Kenntnisse und Erfahrungen gewonnen werden. Die Herpes-simplex-Viren G47 delta weisen offensichtlich keine toxische Wirkung auf. Onkolytische Viren können an schnell wachsenden Tumoren, z.B. malignen Nervenscheidentumoren, untersucht werden (Spyra et al. 2014). Auch eine transgene Integration von immunmodulatorischen Faktoren, z.B. IL12, kann weitere Behandlungsmöglichkeiten eröffnen (Varghese et al. 2006). Letztlich ist auch an eine Kombinationstherapie mit mTor-Inhibitoren oder anderen Wirkstoffen im Einflussbereich des Ras-Pathways zu denken. Synergieeffekte sind bereits beschrieben worden (Farassati et al. 2008).

4.5 Fazit

- Um den Erfolg eines PNF-Xenograft Maus-Models zu gewährleisten, sollen (1)
 PNF aus jüngeren Patienten verwendet werden, (2) Xenografttumoren eine
 Größe von ca. 3x3x3 mm aufweisen und (3) die Implantation von Chirurgen
 mit mikrochirurgischen Erfahrungen durchgeführt werden.
- Das onkolytische Herpes-simplex-Virus G47 delta zeigte keine messbaren toxischen Wirkungen an der Maus.
- Das onkolytische Herpes-simplex-Virus G47 delta zeigte keine messbare therapeutische Wirkung an den PNF-Xenografttumoren in Mäusen und ist grundsätzlich nicht für langsam wachsende Tumoren wie PNF geeignet.

5. Zusammenfassung

Die Neurofibromatose Typ 1 ist eine der häufigsten vererbbaren Erkrankungen. Neben weiteren Symptomen leiden die Patienten vor allem unter der Tumorbildung. Die Tumoren können ubiquitär am gesamten Körper auftreten. Es werden kutane lokal begrenzte Neurofibrome - dann benigne und als dermal bezeichnet - von plexiformen peripheren Neurofibromen unterschieden. Die plexiformen Neurofibrome wachsen auch im Körperinneren zwischen den Organen und können diese komprimieren sowie als nervassoziierte Tumoren Schmerzen auslösen. Wir wissen, dass das Risiko der Patienten mit einem PNF einen malignen peripheren Nervscheidentumor entwickeln zu können, bei etwa 10% liegt.

Aktuell ist die chirurgische Entfernung der Goldstandard. Aufgrund der Ausdehnung und Nervinfiltration sind der Resektion eines Tumors natürliche Grenzen gesetzt. Die medikamentöse oder konservative Therapie zeigt bislang nur kleine Fortschritte im Bereich der experimentellen Forschung.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Behandlung mit einem onkolytischen Virus, Herpes-simplex-Virus G47 delta, als eine Therapiemöglichkeit erforscht. Dabei wurde zuerst ein menschliches plexiformes Neurofibrom in kleinen Stücken von 27 mm² als Xenograft am N. ischiadicus von insgesamt 20 Mäusen implantiert. Das Herpessimplex-Virus G47 delta wurde vermehrt und deren Titer bestimmt. Eine Woche nach der Implantation wurden die Viren in 10 Mäuse injiziert. Als Kontrolle wurde Kochsalzlösung in den anderen 10 Mäusen in gleicher Art und Weise injiziert. Nach einer Woche wurden die Mäuse euthanasiert und die Xenografttumoren untersucht.

Die Mäuse haben sowohl die Implantation als auch die Vireninjektion gut überstanden. Nach der Injektion waren keine Auffälligkeiten bei den Mäusen zu beobachten. Auch zwischen den beiden Gruppen mit und ohne Viren waren keine Unterschiede zu sehen. Diese Befunde deuten darauf hin, dass das Herpes-simplex-Virus G47 delta keine gravierende toxische Wirkung auf die Mäuse aufweist.

Am Ende des Experimentes, 16 Tage nach der Implantation, waren in allen Mäusen die implantierten Tumorstücke erhalten. Dies ergibt eine Erfolgsrate des Xenografts von 100%. Generell ist die Tendenz einer Vergrößerung zu sehen, was am ehesten einer Inflammation zuzuschreiben ist. Zwischen der mit Viren behandelten und der Kontrollgruppe waren keine Unterschiede in den Größen der Xenografttumoren festzustellen. In den Xenografttumoren der behandelten Mäuse konnten keine Viren nachgewiesen werden. Die fehlende Wirkung von Herpes-simplex-Virus G47 delta auf den Xenograft plexiformer Neurofibrome ist wahrscheinlich auf das langsame Wachstum der Tumoren zurück zu führen. Dennoch etablierte und optimierte die vorliegende Arbeit die Prozedur der Behandlung an Xenografttumoren mit okolytischen Viren. Auch wertvoll ist die Kenntnis einer fehlenden toxischen Wirkung. An schnell wachsenden Tumoren, z.B. malignen Nervenscheidentumoren, weist diese Behandlung eine Wirkung auf, was in zukünftigen Studien noch weiter untersucht werden sollte. Transgene, wie IL12, können in den G47delta Vektor integriert werden und bei in vitro bereits nachgewiesenen Synergieeffekten in Kombinationstherapien mit Wirkstoffen des Ras-Pathways getestet werden.

Abstract

Neurofibromatosis type 1 is a common genetic disorder characterized by multiple benign and malignant tumors throughout the whole body. The hallmark of the disorder is a cutaneous neurofibroma. A plexiform neurofibroma is a variant of the cutaneous neurofibroma that can be detected in approximately half of the patients. Plexiform neurofibromas (PNF) generally grow deeper than cutaneous neurofibromas and can therefore compress organs, cause pain and lead to serious disfigurement. In addition, PNF have a high risk of malignant transformation into malignant peripheral nerve sheath tumors, which represents the major factor in reduced life expectancy in these patients. To date, surgical treatment is the well-established standard treatment for PNF. However, due to their displacing and infiltrating nature, tumor resection options are limited. Conservative or pharmaceutical treatment options are highly desired. However, little progress has been made to date.

The present study aims to explore the novel possibility of using an oncolytic virus for treating PNF in a xenograft model in vivo. A fresh specimen of human PNF was cut into small pieces of approximately 3x3x3 mm in size and implanted as xenografts onto the sciatic nerve of a total of 20 mice. At the same time, the oncolytic herpes-simplex-virus G47 delta was amplified and the titer was determined. One week after xenograft implantation, the virus was injected into the tumor xenografts of 10 mice, while saline was injected in the same way for the other 10 mice as a control. Both the implantation and the virus injection were free of adverse events and all 20 mice survived well to the end of the experiments. No abnormalities were observed and no differences were found between the virus and the control groups, indicating a lack of serious toxic effects from the treatment with the herpes-simplex-virus G47 delta. One week after the virus injection, all mice were sacrificed and the tumor xenografts were investigated further. In all 20 mice, the implanted tumor xenografts were identified growing along the sciatic nerve. Thus, there was a xenografting success rate of 100%. Generally, there was a trend of xenograft enlargement, which is likely due to host inflammation. Regarding xenograft size, there was no difference between the virus and the control groups. Histological inspection of the xenografts that received the virus injection revealed no virus infection. The lack of virus growth in the xenografts coupled with the lack of effects on the tumor xenografts is explained by the lack of growth in PNF, which is in concordance with clinical observations. Despite the lack of expected effects, the present study delivered valuable data and experience. First, the procedure of xenografting PNF in a mouse model was optimized. Further, oncolytic virus treatment was established. In addition, valuable information was gained on the lack of serious toxicity of the oncolytic virus in mice. Although the oncolytic virus did not show effects on PNF, it could be effective for fast-growing tumors such as malignant nerve sheath tumors. These possibilities should be further explored in future studies. Furthermore, transgenes, such as IL-12, could also be integrated into the G47delta virus vector, which could have synergic effects when combined with drugs targeting the ras pathways.

6. Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
BRAF	Protoonkogen für RAF (rapidly accelerated fibrosarcoma)
c-Kit	Protoonkogen der Tyrosinkinase Kit
DMEM	Dulbecco's modified eagle serum
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EG	early gene
ER	endoplasmatisches Retikulum
FBS	fetal bovine serum
FTS	freeze thaw sonic
G47delta	Bezeichnung eines HSV 3. Generation
GAP	GTP-ase aktivierte Proteine
GRD	gap-related domain
GTPase	Guanosintriphosphat-ase
HSV	Herpes simplex Virus
ICP	infected cell polypeptid
IEG	immediate early gene
i.p.	intraperitoneal
kb	Kilobasen
LG	late gene
MPNST	maligner peripherer Nervscheidentumor
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
mTOR	mammalian target of Rapamycin
MVB	multivesicular body
NF1	Neurofibromatose Typ 1

NF	Neurofilament oder Neurofibrome
NMRI	Naval Medical Research Institute
PDGFR	plateled derived growth factor receptor
PNF	plexiformes Neurofibrom
QM	Qualitätsmanagement
UL	Unit long
Ras	Rat Sarcoma
S1	Sicherheitsbereich 1
S2	Sicherheitsbereich 2
SV40	Simian Virus 40
Us	Unit short
VEGFR	vascular endothelial growth factir receptor
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

7. Literaturverzeichnis

Asada T (1974) Treatment of human cancer with mumps virus. Cancer. 34(6): 1907-28.

-

Ballester R, Marchuk D, Boguski M, Saulino A, Letcher R, Wigler M, Collins F (1990)The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. Cell. 16;63(4):851-9.

-

Beth E, Giraldo G, Bernhard M (1976) Detection of immediate early, early and late antigens in herpes simplex virus type 1 infected cells. Biomedicine. 25(10):366-8.

-

Bennett JJ, Delman KA, Burt BM, Mariotti A, Malhotra S, Zager J, Petrowsky H, Mastorides S, Federoff H, Fong Y (2002) Comparison of safety, delivery, and efficacy of two oncolytic herpes viruses (G207 and NV1020) for peritoneal cancer. Cancer Gene Ther. 9(11):935-45.

Bolovan CA, Sawtell NM, Thompson RL (1994) ICP34.5 mutants of herpes simplex virus type 1 strain 17syn+ are attenuated for neurovirulence in mice and for replication in confluent primary mouse embryo cell cultures. J Virol. 68(1): 48-55.

```
Boviatsis EJ, Scharf JM, Chase M, Harrington K, Kowall NW, Breakefield XO, Chiocca EA (1994) Antitumor activity and reporter gene transfer into rat brain neoplasms inoculated with herpes simplex virus vectors defective in thymidine kinase or ribonucleotide reductase. Gene Ther. 1(5): 323-31.
```

-

Brandenburg B, Zhuang X (2007) Virus trafficking – learning from single-virus tracking. Nature Reviews Microbiology 5, 197–208, figure 2, figure 3. Abbildungstext übersetzt.

-

Carroll NM, Chiocca EA, Takahashi K, Tanabe KK. (1996) Enhancement of gene therapy specificity for diffuse colon carcinoma liver metastases with recombinant herpes simplex virus. Ann Surg. 224(3):323-9; discussion 329-30.

60

Cawthon RM, Weiss R, Xu GF, Viskochil D, Culver M, Stevens J, Robertson M, Dunn D, Gesteland R, O'Connell P (1990) A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. Cell. 13;62(1):193-201. Erratum in: Cell. 10;62(3):following 608.

Cinatl J Jr, Michaelis M, Driever PH, Cinatl J, Hrabeta J, Suhan T, Doerr HW, Vogel JU (2004) Multimutated herpes simplex virus g207 is a potent inhibitor of angiogenesis. Neoplasia. 6(6): 725-35.

Cozzi PJ, Malhotra S, McAuliffe P, Kooby DA, Federoff HJ, Huryk B, Johnson P, Scardino PT, Heston WD, Fong Y (2001) Intravesical oncolytic viral therapy using attenuated, replication-competent herpes simplex viruses G207 and Nv1020 is effective in the treatment of bladder cancer in an orthotopic syngeneic model. FASEB J. 15(7):1306-8.

Dock G (1904) Influence of complicating diseases upon leukemia. Am J Med Sci. 127(4):563.

Everts B, van der Poel HG. (2005) Replication-selective oncolytic viruses in the treatment of cancer. Cancer Gene Ther.12(2):141-61.

-

Farassati F, Pan W, Yamoutpour F, Henke S, Piedra M, Frahm S, Al-Tawil S, Mangrum WI, Parada LF, Rabkin SD, Martuza RL, Kurtz A (2008) Ras signaling influences permissiveness of malignant peripheral nerve sheath tumor cells to oncolytic herpes. Am J Pathol. 173(6):1861-72.

Ferner RE, Gutmann DH (2002) International consensus statement on malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis. Cancer Res. 62(5):1573-7.

Flexner S (1927) Epidemic encephalitis and simple herpes. J Gen Physiol. 8(6):713-26.

- Friedrich RE, Holstein AF, Middendorff R, Davidoff MS (2012) Vascular wall cells contribute to tumourigenesis in cutaneous neurofibromas of patients with

neurofibromatosis type 1. A comparative histological, ultrastructural and immunohistochemical study. Anticancer Res. 32(5): 2139-58.

Gross S (1971) Measles and leukaemia. Lancet. 297(7695):397-8.

Gutmann DH, Aylsworth A, Carey JC, Korf B, Marks J, Pyeritz RE, Rubenstein A, Viskochil D (1997) The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. JAMA. 278(1):51-7.

Hagel C, Zils U, Peiper M, Kluwe L, Gotthard S, Friedrich RE, Zurakowski D, von Deimling A, Mautner VF (2007) Histopathology and clinical outcome of NF1associated vs. sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors. J Neurooncol. 82(2):187-92.

Hellenbrand W, Thierfelder W, Müller-Pebody B, Hamouda O, Breuer T (2005) Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in former East and West Germany, 1997-1998. T Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 24(2):131-5.

Horch HH, Herzog M, Féaux de Lacroix W (1988) Diagnostic and therapeutic aspects of malignant epithelioid schwannomas. Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir. 12(5):372-5

-

_

Huebner RJ, Rowe WP, Schatten WE, Smith RR, Thomas LB (1956) Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. Cancer. 9(6):1211-8.

-

Huson SM, Compston DA, Clark P, Harper PS (1989) A genetic study of von Recklinghausen neurofibromatosis in south east Wales. I. Prevalence, fitness, mutation rate, and effect of parental transmission on severity. J Med Genet. 26(11): 704-11.

-

Jia WW, McDermott M, Goldie J, Cynader M, Tan J, Tufaro F (1994) Selective destruction of gliomas in immunocompetent rats by thymidine kinase-defective herpes simplex virus type 1. J Natl Cancer Inst. 17; 86(16): 1209-15.

Juers, DH, Matthews BW, Huber RE (2012) LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance Protein Sci. 21(12): 1792–1807.

Karajannis MA, Ferner RE (2015) Neurofibromatosis-related tumors: emerging biology and therapies. Curr Opin Pediatr. 27(1):26-33.

_

Kluwe L, Friedrich RE, Mautner VF (1999a) Allelic loss of the NF1 gene in NF1associated plexiform neurofibromas. Cancer Genet Cytogenet. 113(1):65-9.

Kluwe L, Friedrich R, Mautner VF (1999b) Loss of NF1 allele in Schwann cells but not in fibroblasts derived from an NF1-associated neurofibroma. Genes Chromosomes Cancer. 24(3):283-5.

Kolberg M, Høland M, Agesen TH, Brekke HR, Liestøl K, Hall KS, Mertens F, Picci P, Smeland S, Lothe RA (2013) Survival meta-analyses for >1800 malignant peripheral nerve sheath tumor patients with and without neurofibromatosis type 1. Neuro Oncol.;15(2):135-47.

Lammert M, Friedman JM, Kluwe L, Mautner VF (2005) Prevalence of neurofibromatosis 1 in German children at elementary school enrollment. Arch Dermatol. 141(1): 71-4.

Liu R, Martuza RL, Rabkin SD (2005) Intracarotid delivery of oncolytic HSV vector G47delta to metastatic breast cancer in the brain. Gene Therapy 12: 647–654.

Martuza RL, Malick A, Markert JM, Ruffner KL, Coen DM (1991) Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant Science 252, 5007: 854-856.

-

Mautner VF, Hartmann M, Kluwe L, Friedrich RE, Fünsterer C (2006) MRI growth patterns of plexiform neurofibromas in patients with neurofibromatosis type 1. Neuroradiology. 48(3):160-5.

McGeoch DJ, Dalrymple MA, Davison AJ, Dolan A, Frame MC, McNab D, Perry LJ, Scott JE, Taylor P (1988) The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. J Gen Virol. 69 (Pt 7):1531-74.

Meignier B, Longnecker R, Roizman B (1988) In vivo behavior of genetically engineered herpes simplex viruses R7017 and R7020: construction and evaluation in rodents. J Infect Dis. 158(3): 602-14.

-

Mineta T, Rabkin SD, Martuza RL. (1994) Treatment of malignant gliomas using ganciclovir-hypersensitive, ribonucleotide reductase-deficient herpes simplex viral mutant. Cancer Res. 54(15): 3963-6.

-

Mineta T, Rabkin SD, Yazaki T, Hunter WD, Martuza RL (1995) Attenuated multimutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. Nat Med. 1(9):938-43.

National Institutes of Health (1988) Neurofibromatosis. Conference statement. National Institutes of Health Consensus Development Conference. Arch Neurol. 45(5):575-8.

-

Pace NG (1912) Sulla scomprasa di un enorme cancro vegetante del collo dell'utero senza cura chirurgica. Ginecologica. 1912 (9):82-88 (nicht im Original vorliegend)

Pardee AB, Jacob F, Monod J (1958) The role of the inducible alleles and the constructive alleles in the synthesis of beta-galactosidase in zygotes of Escherichia coli. C R Hebd Seances Acad Sci 246: 3125–3128.

Rasmussen SA, Yang Q, Friedman JM (2001) Mortality in neurofibromatosis 1: an analysis using U.S. death certificates. Am J Hum Genet. 68(5):1110-8.

64

Roizman B (1982) The family herpesviridae: general description, taxonomy and classification. The herpesviruses. Vol 1, Plenum Press, New York and London.

Shubladze AK, Huang CS. (1959) Studies on antigenic properties of herpes virus. Vopr Virusol. 4(1):80-5.

Todo T, Martuza RL, Rabkin SD, Johnson PA (2001) Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. Proc Natl Acad Sci U S A. 98(11):6396-401.

Varghese S, Rabkin SD (2002) Oncolytic herpes simplex virus vectors for cancer virotherapy. Cancer Gene Ther. 9(12): 967-78.

```
Varghese S, Rabkin SD, Liu R, Nielsen PG, Ipe T, Martuza RL (2006) Enhanced therapeutic efficacy of IL-12, but not GM-CSF, expressing oncolytic herpes simplex virus for transgenic mouse derived prostate cancers. Cancer Gene Ther. 13(3):253-65.
```

-

Waggoner DJ, Towbin J, Gottesman G, Gutmann DH (2000) Clinic-based study of plexiform neurofibromas in neurofibromatosis 1. Am J Med Genet. 15;92(2):132-5.

-

Whitley RJ, Kern ER, Chatterjee S, Chou J, Roizman B. (1993) Replication, establishment of latency, and induced reactivation of herpes simplex virus gamma 1 34.5 deletion mutants in rodent models. J Clin Invest. 91(6): 2837-43.

-

Williams VC, Lucas J, Babcock MA, Gutmann DH, Korf B, Maria BL (2009) Neurofibromatosis type 1 revisited. Pediatrics. 123(1):124-33.

-

Wimmer K (2005) Neurofibromatosis: the most frequent hereditary tumor predisposition syndrome. Wien Med Wochenschr. 155(11-12): 273-80.

-

Woodruff JM (1999) Pathology of tumors of the peripheral nerve sheath in type 1 neurofibromatosis. Am J Med Genet. 89(1): 23-30. Review.

Xu GF, Lin B, Tanaka K, Dunn D, Wood D, Gesteland R, White R, Weiss R, Tamanoi F (1990) The catalytic domain of the neurofibromatosis type 1 gene product stimulates ras GTPase and complements ira mutants of S. cerevisiae. Cell. 16;63(4):835-41.

Zeicher M (2009) Oncolytic Viruses Cancer Therapy. VDM 11-15

_

-

8. Danksagung

Meiner lieben Freundin und Doktormutter Dr. rer. nat. Lan Kluwe, die mich zur Erstellung dieser Dissertation ermutigt hat.

Ich möchte herzlich Frau Dr. rer.nat. Melanie Spyra für die fachkompetente Beratung und Unterstützung danken, ohne die eine derart komplexe naturwissenschaftliche Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Frau Dr. Spyra hat mir immer gerne ihre in Boston erworbenen Erfahrungen im Umgang mit den Viren weiter gegeben.

Mein Dank geht auch an PD Dr.med. Jakob Matschke, der mich in der neuropathologischen Auswertung und Analyse beraten hat. Durch das Equipment der Neuropathologie konnten wir die hervorragenden histologischen Bilder generieren.

Prof. Samuel Rabkin und sein Team an der Harvard Medical School Boston. Die Konstruktion des Virusvektors und damit die Grundlage für das Projekt entstammen dem "Rabkinlabor".

Die Idee, die Mitteleinwerbung – intellektuelle und finanzielle Unterstützung – basiert auf der Arbeit Prof. Andreas Kurtz, Charité Berlin und University of Seoul.

Die Tumorentnahme erfolgte durch Prof. Friedrich, MKG-Chirurgie, UKE Hamburg, dessen klinischen und wissenschaftlichen Rat ich jederzeit gerne annehme.

9. Lebenslauf

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.