

**Fakultät für Medizin der Technischen Universität München**

Urologische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar

# Untersuchung immunologischer Aspekte der YB-1 basierten Virotherapie in Harnblasenkarzinomzelllinien

Florestan Johannes Koll

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

**Vorsitzender:** Prof. Dr. Jürgen Schlegel

**Prüfender der Dissertation:**

1. apl. Prof. Dr. Per S. Holm
2. Prof. Dr. Percy A. Knolle

Die Dissertation wurde am 06.03.2018 bei der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.11.2018 angenommen.



# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| Inhaltsverzeichnis .....                                | II        |
| Abkürzungsverzeichnis.....                              | V         |
| Tabellenverzeichnis.....                                | VIII      |
| Abbildungsverzeichnis .....                             | IX        |
| <b>1</b> Einleitung.....                                | <b>11</b> |
| 1.1 Das Harnblasenkarzinom .....                        | 11        |
| 1.1.1 Definition, Epidemiologie und Risikofaktoren..... | 11        |
| 1.1.2 Pathologie, Grading und Staging .....             | 12        |
| 1.1.3 Diagnostik, Therapie und Prognose.....            | 14        |
| 1.1.4 Immuntherapien beim Blasenkarzinom.....           | 16        |
| 1.2 Onkolytische Virotherapie .....                     | 19        |
| 1.2.1 Onkolytische Immuntherapie.....                   | 19        |
| 1.3.2 Immunogener Zelltod .....                         | 20        |
| 1.3.3 Aktueller Stand in der Klinik.....                | 22        |
| 1.3 YB-1 abhängige onkolytische Adenoviren .....        | 25        |
| 1.3.1 Adenoviren.....                                   | 25        |
| 1.3.2 Onkolytische Adenoviren .....                     | 27        |
| 1.3.3 Das Protein YB-1 .....                            | 29        |
| 1.3.4 YB-1 abhängige Viren.....                         | 31        |
| 1.4 Ziele der Arbeit.....                               | 33        |
| <b>2</b> Material.....                                  | <b>34</b> |
| 2.1 Geräte.....   | 34        |
| 2.2 Verbrauchsmaterialien .....                         | 35        |
| 2.3 Chemikalien .....                                   | 35        |
| 2.4 Selbsthergestellte Lösungen und Puffer .....        | 37        |
| 2.5 Kits.....   | 38        |
| 2.6 Zellkulturmedien und Zusätze.....                   | 38        |
| 2.7 PCR-Primer.....                                     | 38        |
| 2.8 Antikörper.....                                     | 39        |
| 2.9 Zelllinien.....                                     | 40        |
| 2.10 Viren .....  | 40        |
| 2.11 Verwendete Software.....                           | 42        |
| <b>3</b> Methoden.....                                  | <b>43</b> |
| 3.1 Zellkultur.....                                     | 43        |
| 3.2 Virusinfektion.....                                 | 43        |
| 3.3 Virusvermehrung.....                                | 44        |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 3.4    | Proteinisolation und Western Blot.....  | 45 |
| 3.4.1  | Proteinisolation aus Zellen.....  | 45 |
| 3.4.2  | Proteinisolation aus dem Zellkulturüberstand.....   | 45 |
| 3.4.3  | Proteinmessung und Proteinverarbeitung.....   | 46 |
| 3.4.4  | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....  | 46 |
| 3.4.5  | Western Blot und Proteindetektion.....  | 47 |
| 3.5    | Bestimmung der gebildeten infektiösen Viruspartikel.....  | 48 |
| 3.6    | DNA-Isolation zur Analyse der Replikationskinetik.....  | 49 |
| 3.7    | RNA-Isolation und cDNA-Herstellung.....   | 49 |
| 3.8    | Genexpressionsanalyse mittels qPCR.....   | 49 |
| 3.9    | Immunofluoreszenz.....  | 50 |
| 3.10   | Durchflusszytometrie.....   | 51 |
| 3.11   | SRB-Zytotoxizitätsassay.....  | 51 |
| 3.12   | ELISA.....  | 52 |
| 3.13   | Isolation und Analyse von Exosomen.....   | 52 |
| 3.13.1 | Exosomenisolation mittels Ultrazentrifugation.....  | 52 |
| 3.13.2 | Exosomenisolation mit ExoQuick-TC Exosome precipitation Solution.....   | 53 |
| 3.13.3 | Analyse der Exosomen.....   | 53 |
| 3.14   | PBMC-Isolation und Kultivierung.....  | 54 |
| 3.15   | PBMC-Stimulation und Ko-Kultivierung mit Tumorzellen.....   | 55 |
| 3.16   | Grafische Darstellung.....  | 56 |
| 4      | Ergebnisse.....   | 57 |
| 4.1    | Charakterisierung der Infektion, Replikation und Zelllyse durch YB-1 abhängige onkolytische Adenoviren in Blasenkarzinomzelllinien..... | 57 |
| 4.1.1  | YB-1-Status.....  | 57 |
| 4.1.2  | CAR-Status.....   | 58 |
| 4.1.3  | Infektion und Replikation.....  | 59 |
| 4.1.4  | Zelllyse.....   | 61 |
| 4.1.5  | Zytotoxizitätsassay.....  | 61 |
| 4.1.6  | In Tumorzellen gebildete Viruspartikel.....   | 62 |
| 4.2    | Analyse der freigesetzten Proteine YB-1, HSP70, HMGB-1.....   | 64 |
| 4.2.1  | ELISA zur Freisetzung von HSP70 und HMGB-1.....   | 64 |
| 4.2.2  | Western Blot zur genaueren Analyse der Freisetzung.....   | 65 |
| 4.2.3  | Analyse der isolierten Exosomen.....  | 68 |
| 4.3    | Evaluation der Immunantwort auf infizierte Tumorzellen.....   | 69 |
| 4.3.1  | Bestimmung der viralen Replikation in PBMC.....   | 69 |
| 4.3.2  | Ko-Kultivierung von PBMC mit Tumorzelllysate und Bestimmung der IFN $\gamma$ -Freisetzung.....  | 70 |
| 4.3.3  | PD-L1-Status der Blasenkarzinomzelllinien.....  | 72 |
| 4.3.4  | IFN $\gamma$ -Freisetzung aus PBMC bei Behandlung von Blasenkarzinomzelllinien mit PD-L1-Inhibitor und onkolytischer Virotherapie.....  | 73 |
| 5      | Diskussion.....   | 74 |

---

|     |  |     |
|-----|--|-----|
| 5.1 | Blasenkarzinomzellen sind für die YB-1 abhängige onkolytische Virotherapie<br>geeignet ..... | 74  |
| 5.2 | Effektive Lyse von Harnblasenkarzinomzellen durch onkolytische Adenoviren.....               | 75  |
| 5.3 | Onkolytische Adenoviren führen zur Freisetzung von HSP70 und HMGB-1.....                     | 78  |
| 5.4 | Freisetzung von YB-1 durch onkolytische Adenoviren .....                                     | 81  |
| 5.5 | Freisetzung der Proteine in Exosomen/Mikrovesikeln.....                                      | 82  |
| 5.6 | PBMC setzen IFN $\gamma$ nach Ko-Kultivierung mit virus-infizierten Tumorzellen frei....     | 84  |
| 5.7 | Indikation zur Kombination von Virotherapie und Immuncheckpoint-Blockade ...                 | 89  |
| 5.8 | Ausblick zur YB-1 basierten onkolytischen Virotherapie für das Blasenkarzinom..              | 90  |
| 6   | Zusammenfassung .....  | 93  |
| 7   | Literaturverzeichnis .....   | 95  |
| 8   | Anhang .....   | 117 |
| 9   | Danksagungen .....   | 118 |
| 10  | Lebenslauf .....   | 119 |

## Abkürzungsverzeichnis

| <b>Abkürzung</b> | <b>Beschreibung</b>                                |
|------------------|--|
| °C               | <i>Grad Celsius</i>                                |
| Abb.             | <i>Abbildung</i>                                   |
| Ad               | <i>Adenovirus</i>                                  |
| ADP              | <i>Adenovirus Death Protein</i>                    |
| APS              | <i>Ammonium Persulfat</i>                          |
| ATCC             | <i>American Type Culture Collection</i>            |
| ATP              | <i>Adenosintriphosphat</i>                         |
| BCA              | <i>Bicinchoninic acid</i>                          |
| BCG              | <i>Bacillus Calmette-Guerin</i>                    |
| BSA              | <i>Bovines Serumalbumin</i>                        |
| CAR              | <i>Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor</i>               |
| CD               | <i>Cluster of Differentiation</i>                  |
| cDNA             | <i>Complementary DNA</i>                           |
| Cis              | <i>Carcinoma in situ</i>                           |
| CO <sub>2</sub>  | <i>Kohlenstoffdioxid</i>                           |
| CPE              | <i>Zytopathischer Effekt</i>                       |
| CRT              | <i>Calreticulin</i>                                |
| CsCl             | <i>Caesiumchlorid</i>                              |
| CTL              | <i>Zytotoxischen T-Lymphozyten</i>                 |
| CTLA-4           | <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4</i> |
| DAB              | <i>Diaminobenzidin</i>                             |
| DAMP             | <i>Damage-associated molecular pattern</i>         |
| DC               | <i>Dendritic cell (Dendritische Zellen)</i>        |
| DLS              | <i>Dynamische Lichtstreuung</i>                    |
| DMEM             | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>          |
| DNA              | <i>Desoxyribonucleotide Acid</i>                   |
| DTT              | <i>Dithiothreitol</i>                              |
| EAU              | <i>European Association of Urology</i>             |
| EDTA             | <i>Ethylendiamintetraacetat</i>                    |
| ELISA            | <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>           |
| EMT              | <i>Epitheliale Mesenchymale Transition</i>         |
| EtOH             | <i>Ethanol</i>                                     |
| FACS             | <i>Fluorescence-Activated Cell Scanning</i>        |
| FBS, FCS         | <i>Fetales Bovines Serum, Fetal calf serum</i>     |
| FDA              | <i>Food and Drug Administration</i>                |
| g                | <i>Gramm</i>                                       |
| <i>g</i>         | <i>Relative Zentrifugalbeschleunigung</i>          |
| GC               | <i>Gemcitabin/Cisplatin</i>                        |

---

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| GM-CSF                        | <i>Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor</i>  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | <i>Wasserstoffperoxid</i>                                    |
| HCl                           | <i>Chlorwasserstoff</i>                                      |
| HEK                           | <i>Human Embryonal Kidney</i>                                |
| HSP                           | <i>Hitzeschock Protein</i>                                   |
| HSV                           | <i>Herpes-simplex-Virus</i>                                  |
| ICD                           | <i>Immunogenic cell death; Immunogener Zelltod</i>           |
| iDC                           | <i>Immature dendritic cell (unreife dendritische Zellen)</i> |
| IF                            | <i>Immunofluorescens</i>                                     |
| IFN                           | <i>Interferon</i>  |
| IFU                           | <i>Infectious Units</i>                                      |
| IgG                           | <i>Immunglobulin G</i>                                       |
| IL                            | <i>Interleukin</i>   |
| kb                            | <i>Kilobasen</i>   |
| kDa                           | <i>Kilodalton</i>  |
| l                             | <i>Liter</i>   |
| m                             | <i>Meter</i>   |
| M                             | <i>Molar</i>   |
| MeOH                          | <i>Methanol</i>  |
| MHC                           | <i>Major Histocompatibility Complex</i>                      |
| MIBC                          | <i>Muscle-invasive Bladder Cancer</i>                        |
| min                           | <i>Minuten</i>   |
| ml                            | <i>Milliliter</i>  |
| mM                            | <i>Millimolar</i>  |
| MOI                           | <i>Multiplicity of infection</i>                             |
| MVAC                          | <i>Methotrexat/Vinblastin/Adriamycin/Cisplatin</i>           |
| NaCl                          | <i>Natriumchlorid</i>  |
| NDV                           | <i>Newcastle-Disease-Virus</i>                               |
| NEA                           | <i>Nicht-essentielle Aminosäuren</i>                         |
| ng                            | <i>Nanogramm</i>   |
| NK-Zellen                     | <i>natürliche Killerzellen</i>                               |
| nm                            | <i>Nanometer</i>   |
| NMIBC                         | <i>Non-muscle-invasive Bladder Cancer</i>                    |
| OV                            | <i>Onkolytische Viren</i>                                    |
| P/S                           | <i>Penicillin/Streptomycin</i>                               |
| PAMP                          | <i>Pathogen-associated molecular patterns</i>                |
| PBMC                          | <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>                     |
| PBS                           | <i>Phosphate buffered saline</i>                             |
| PCR                           | <i>Polymerase chain reaction</i>                             |
| PD-1                          | <i>programmed cell death protein-1</i>                       |
| PD-L1                         | <i>Programmed death-ligand 1</i>                             |
| PdI                           | <i>Polydispersity Index</i>                                  |
| pH                            | <i>Potentia hydrogenii</i>                                   |

---

|        |   |
|--------|---|
| PUNLMP | <i>Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential</i> |
| qPCR   | <i>Quantitative Polymerase chain reaction</i>                   |
| Rb     | <i>Retinoblastom</i>  |
| RGD    | <i>Arginin-Glycin-Asparaginsäure</i>                            |
| RKI    | <i>Robert Koch-Institut</i>                                     |
| RNA    | <i>Ribonucleic Acid</i>   |
| rpm    | <i>Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)</i>          |
| Rt-PCR | <i>Real-time Polymerase chain reaction</i>                      |
| s      | <i>Sekunde</i>  |
| SRB    | <i>Sulforhodamine B</i>   |
| TBS    | <i>Tris-buffered saline</i>                                     |
| TCA    | <i>Trichloressigsäure</i>                                       |
| TEM    | <i>Transmissionselektronenmikroskopie</i>                       |
| TLR    | <i>Toll-like Rezeptor</i>                                       |
| TSg101 | <i>Tumor Susceptibility gene 101</i>                            |
| TUR-B  | <i>Transurethrale Resektion der Blase</i>                       |
| UICC   | <i>Union International contre le cancer</i>                     |
| V      | <i>Volt</i>   |
| WB     | <i>Western Blot</i>   |
| WT     | <i>Wildtyp</i>  |
| YB-1   | <i>Y-Box-binding Protein 1</i>                                  |
| µg     | <i>Mikrogramm</i>   |
| µl     | <i>Mikroliter</i>   |
| µm     | <i>Mikrometer</i>   |



## Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 1. 1: Auswahl an onkolytische Viren in klinischen Studien ..... | 24 |
| Tabelle 2. 1: Geräte .....  | 34 |
| Tabelle 2. 2: Verbrauchsmaterialien .....                               | 35 |
| Tabelle 2. 3: Chemikalien .....   | 35 |
| Tabelle 2. 4: Selbsthergestellte Lösungen .....                         | 37 |
| Tabelle 2. 5: Kits .....  | 38 |
| Tabelle 2. 6: Zellkulturmedien und Zusätze.....                         | 38 |
| Tabelle 2. 7: Primer .....  | 39 |
| Tabelle 2. 8: Antikörper .....  | 39 |
| Tabelle 2. 9: Verwendete Zelllinien.....                                | 40 |
| Tabelle 2. 10: Angenommene Titer der verwendeten Viren.....             | 42 |
| Tabelle 2. 11: Verwendete Software.....                                 | 42 |
| Tabelle 3. 1: Inhalt eines 12%igen Polyacrylamid-Trenngels.....         | 47 |
| Tabelle 3. 2: Inhalt eines Polyacrylamid-Sammelgels .....               | 47 |

## Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1. 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2012 .....                               | 11 |
| Abbildung 1. 2: Staging und Grading des Blasenkarzinoms .....  | 13 |
| Abbildung 1. 3: Eine Immunantwort gegen Tumore kann durch die onkolytische Virotherapie induziert werden.....  | 21 |
| Abbildung 1. 4: Synergistische Effekte der onkolytischen Virotherapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren .....  | 22 |
| Abbildung 1. 5: Struktur von Adenoviren.....   | 25 |
| Abbildung 1. 6: Schematische Darstellung des adenoviralen Genoms mit seinen Funktionen ..  | 27 |
| Abbildung 1. 7: Schematische Genomkarte von XVir-N-31.....   | 32 |
| Abbildung 2. 1: Schematische Genomkarte von Ad-Delo3-YB1/Fib35 .....   | 41 |
| Abbildung 3. 1: Versuchsablauf zur Generierung von Exosomen.....   | 53 |
| Abbildung 3. 2: PBMC-Isolation; Ficoll-Gradient vor und nach der Zentrifugation .....  | 54 |
| Abbildung 3. 3: Versuchsablauf der Ko-Kultivierung von PBMC mit infizierten Tumorzellen und der Behandlung mit einem PD-L1-Inhibitor.....                    | 56 |
| Abbildung 4. 1: Western Blot Analyse auf YB-1 in Harnblasenkarzinomzelllinien.....   | 57 |
| Abbildung 4. 2: Immunofluoreszenz auf YB-1 in J82- und T24-Zellen.....   | 58 |
| Abbildung 4. 3: IF auf YB-1 in J82-Zellen 24 Stunden nach der Infektion mit AdWT und AdDeloYB1 .....   | 58 |
| Abbildung 4. 4: FACS-Analyse zur Bestimmung des CAR-Status.....  | 59 |
| Abbildung 4. 5: qPCR zur virale Replikation in J82- und T24-Zellen.....  | 60 |
| Abbildung 4. 6: Virale Infektions- und Replikationsrate in T24 (absolut) .....   | 60 |
| Abbildung 4. 7: Lichtmikroskopische Bilder der Zelllyse von J82-, T24- und UM-UC 3-Zellen durch unterschiedliche Viren.....                                  | 61 |
| Abbildung 4. 8: SRB-Assay der Zelllinien J82, T24 und UM-UC 3 mit Ad-dl703, AdWT, XVir-N-31 und AdDeloYB1 .....  | 62 |
| Abbildung 4. 9: In J82- und T24-Zellen gebildete infektiöse Partikel.....  | 63 |
| Abbildung 4. 10: qPCR zur Quantifizierung der Viruskopien im Lysat von J82- und T24-Zellen..   | 64 |
| Abbildung 4. 11: ELISA zur HSP70- und HMGB-1-Freisetzung aus J82-, T24 und UM-UC 3-Zellen .....  | 65 |
| Abbildung 4. 12: Western Blots zur Analyse von Lysat, Überstand und Exosomen nach Virusinfektion aus J82-, T24- und UM-UC 3-Zellen .....                     | 67 |
| Abbildung 4. 13: qPCR und Western Blot zur HSP70-Expression nach Virusinfektion.....   | 68 |
| Abbildung 4. 14: Analyse der durch Zentrifugation aus dem Zellkulturüberstand von J82-Zellen gewonnenen Exosomen mittels DLS und Elektronenmikroskopie ..... | 69 |
| Abbildung 4. 15: qPCR zur Replikation der Viren in PBMC.....   | 70 |
| Abbildung 4. 16: ELISA zur IFN $\gamma$ -Freisetzung aus PBMC nach Ko-Kultivierung mit Tumorzelllysate .....   | 71 |
| Abbildung 4. 17: ELISA zur IFN $\gamma$ -Freisetzung aus unreifen dendritischen Zellen (iDC) nach Ko-Kultivierung mit infizierten Tumorzellen.....           | 72 |

---

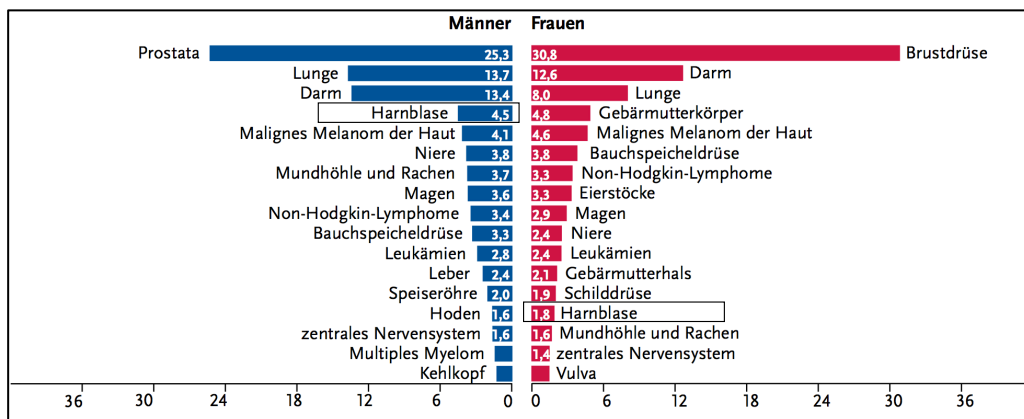
|  |     |
|--|-----|
| Abbildung 4. 18: FACS-Analyse zur Bestimmung des PD-L1-Status auf T24-, J82- und UM-UC 3-Zellen .....                                      | 72  |
| Abbildung 4. 19: IFN $\gamma$ -Freisetzung aus PBMC bei Behandlung von T24-Zellen mit PD-L1-Inhibitor und onkolytischer Virotherapie ..... | 73  |
| Abbildung 8. 1: SRB-Assay zur Ermittlung der tödlichen Konzentration von Doxorubicin auf T24- und J82-Zellen.....                          | 117 |

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Harnblasenkarzinom

### 1.1.1 Definition, Epidemiologie und Risikofaktoren

Das Harnblasenkarzinom führte 2012 weltweit zu ca. 165000 Sterbefällen (Antoni et al., 2017). In Deutschland waren es ca. 5600 Sterbefälle. Nach Angaben des Robert Koch-Instituts gab es 2012 in Deutschland insgesamt ca. 28000 Neuerkrankungen wobei Männer dreimal häufiger betroffen waren als Frauen; damit ist das Blasenkarzinom der vierthäufigste Krebs beim Mann (Abbildung 1. 1) (RKI, 2015). Die 10-Jahres-Überlebensrate (overall-survival rate) beträgt insgesamt ca. 44% (Hautmann et al., 2012).



**Abbildung 1. 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2012**

Beim Mann ist das Harnblasenkarzinom der vierthäufigste Tumor. Männer sind deutlich häufiger betroffen als Frauen. Daten des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch-Institut (RKI, 2015).

Hauptsächlich sind ältere Menschen vom Blasenkarzinom betroffen. Die meisten Blasenkarzinome sind mit Risikofaktoren aus der Umwelt und der Exposition gegenüber Noxen assoziiert (Burger et al., 2013), wobei der wichtigste Risikofaktor an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken das Tabakrauchen ist. Über 50% der Blasenkarzinomfälle sind mit Rauchen assoziiert (Freedman et al., 2011) und Raucher haben ein 2,5-fach höheres Risiko an Blasenkrebs zu erkranken als Nichtraucher (Cumberbatch et al., 2016). Studien konnten sogar ein erhöhtes Blasenkarzinomrisiko

durch die Exposition gegenüber Tabakrauch bei einer nichtrauchenden Population nachweisen (X. Jiang et al., 2007).

Nach dem Rauchen stellen berufsbedingte Expositionen den zweitwichtigsten Risikofaktor an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken dar – ca. 20% der Fälle sind damit assoziiert (Burger et al., 2013). Dazu gehören vor allem aromatische Amine, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) und Chlorkohlenwasserstoff (Cogliano et al., 2011; Vlaanderen et al., 2014), deren Verarbeitung hauptsächlich in der Farb-, Färb-, Metall-, Petroleum-, Leder- oder Textilindustrie stattfindet. Die Exposition ist jedoch rückläufig, da das Bewusstsein für die Sicherheit in den letzten Jahren gestiegen ist (Burger et al., 2013).

Das Blasenkarzinom weist eine starke Assoziation zur Infektion mit *Schistosoma haematobium* auf, einem Parasiten, welches die Schistosomiasis – eine chronische Entzündung des Harntraktes – verursacht. Insgesamt scheinen ca. 3% der Blasenkarzinome mit Schistosomiasis assoziiert zu sein, in endemischen Gebieten, vor allem in Nordafrika, ist die Prävalenz jedoch deutlich höher (IARC, 1994; Parkin, 2006). Beispielsweise war Blasenkrebs in Ägypten lange das am häufigsten diagnostizierte Karzinom (Antoni et al., 2017). Typischerweise sind die mit Schistosomiasis assoziierten Karzinome Plattenepithelkarzinome (Parkin et al., 2008).

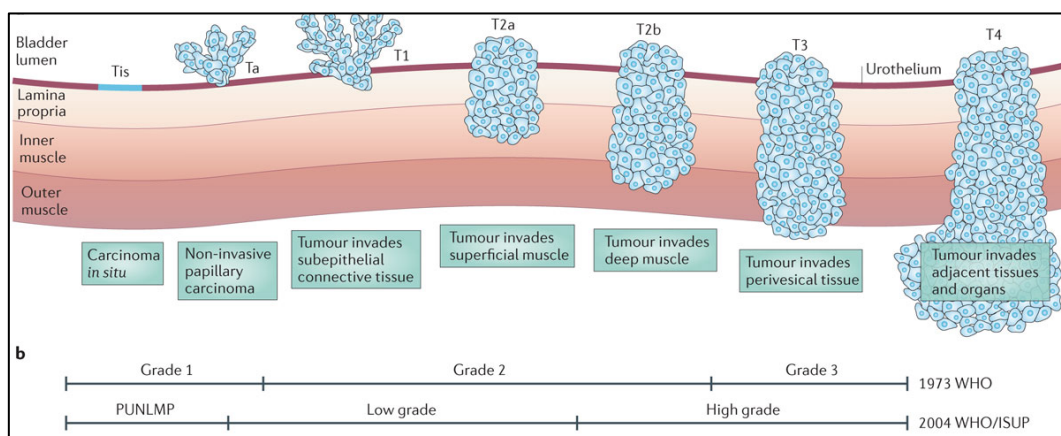
Neben den externen Risiken bestehen erbliche Risiken. Das Risiko an einem Urothelkarzinom der Blase zu erkranken ist für erstgradig Verwandte eines Patienten doppelt so hoch wie das der Normalbevölkerung. Insbesondere sind genetische Veränderungen der N-Acetyltransferase 2 (NAT2), die zu einer langsamen Acetylierung von Karzinogenen wie Tabakprodukten und aromatischen Aminen führen, als Risikofaktoren beschrieben (Burger et al., 2013).

### 1.1.2 Pathologie, Grading und Staging

Über 90% der Blasenkarzinome in Europa und Nordamerika sind Urothelkarzinome (Knowles et al., 2015). Neben reinen Urothelkarzinomen kommen auch Anteile mit glandulärer, papillärer oder plattenepithelialer Differenzierung vor (Amin, 2009).

Bei Erstdiagnose präsentieren sich ca. 75% der Patienten mit einem nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinom (Non-muscle-invasive Bladder Cancer, NMIBC), bei

den anderen ca. 25% liegt ein muskelinvasives Blasenkarzinom (Muscle-invasive Bladder Cancer, MIBC) vor (Kamat et al., 2016). Insgesamt sind bei Präsentation ca. 60% papilläre low grade Tumore (Knowles et al., 2015). Das Staging erfolgt nach der TNM-Klassifikation der UICC (Union internationale contre le cancer). Dafür werden die Tumorausbreitung (T), der Lymphknotenbefall (N) und die Fernmetastasierung (M) erhoben (Abbildung 1. 2) (Babjuk et al., 2017; Witjes et al., 2017). Zu den MIBC gehören die Stadien T<sub>a</sub>, T<sub>1</sub> und T<sub>is</sub>. T<sub>a</sub> beschreibt papilläre, nicht invasive Tumore; T<sub>1</sub>-Tumore infiltrieren bis in die Lamina submucosa und flache Tumore mit geringer Differenzierung und ohne Invasion werden als T<sub>is</sub> bezeichnet (Brierley et al., 2017). Für die Prognose dieser Tumore hat das Grading die höchste Wertigkeit. Das WHO-Grading wurde erstmals 1973 erstellt und 2004 sowie 2016 aktualisiert und unterscheidet in den neuen Versionen zwischen Papillom, PUNLMP (papillary urothelial neoplasm of low malignant potential), low grade- und high grade-Läsionen (Eble et al., 2004; Kamat et al., 2016; Mostofi et al., 1973). Ab dem T<sub>2</sub>-Stadium liegt ein MIBC vor. T<sub>2</sub>-Tumore infiltrieren die Harnblasenmuskulatur, T<sub>3</sub>-Tumore das perivesikale Gewebe und T<sub>4</sub>-Tumore wachsen über die Blase hinaus und infiltrieren Nachbarorgane. Soweit keine Lymphknoten befallen sind wird von einem N<sub>0</sub>-Stadium gesprochen, N<sub>1</sub> beschreibt eine solitäre Lymphknotenmetastase, N<sub>2</sub> multiple Lymphknotenmetastasen und N<sub>3</sub> Lymphknotenmetastasen entlang der Arteriae Iliacae communes. Liegen Fernmetastasen in z.B. Leber, Lunge, Knochen oder Haut vor, so wird dies als M<sub>1</sub> beschrieben (Brierley et al., 2017).



**Abbildung 1. 2: Staging und Grading des Blasenkarzinoms**

Oben ist das Staging nach TNM-Stadien (Brierley et al., 2017) abgebildet. Das T-Stadium wird durch die Tumordinfiltrationstiefe bestimmt. Unten sind das Grading nach WHO von 1973 (Mostofi et al., 1973) und WHO/ISUP von 2004 (Eble et al., 2004) dargestellt. Nach der alten Klassifikation werden papilläre Tumore in „Grade“ 1, 2 oder 3 eingeteilt; nach der neuen Klassifikation von 2004 in PUNLMP, low- oder high-grade. PUNLMP entspricht einem „Grade“ 1 Tumor. Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Cancer, (Knowles et al., 2015), ©2014

### 1.1.3 Diagnostik, Therapie und Prognose

Das Blasenkarzinom präsentiert sich in etwa 85% der Fälle durch eine schmerzlose Hämaturie als erstes Symptom (Varkarakis et al., 1974). Die Makrohämaturie hat einen positiven Vorhersagewert von 7,4% bei Männern und 3,4% bei Frauen (Jones et al., 2007). Weitere Symptome können Dysurie, Drangsymptomatik oder irritative Miktionsbeschwerden sein (Anastasiadis et al., 2012). Zur weiteren Abklärung sollten die körperliche Untersuchung, eine Zystoskopie und eine Bildgebung des oberen Harntraktes durchgeführt werden sowie Zellen für eine zytologische Untersuchung gewonnen werden (Witjes et al., 2017). Die Sensitivität der Zytologie ist abhängig vom Grading der Tumore und beträgt für low-grade Läsionen 16% und für high-grade Läsionen 84% (Yafi et al., 2015). Aus diagnostischen und therapeutischen Gründen wird als nächster Schritt eine transurethrale Resektion der Blase (TUR-B) durchgeführt. Dabei sollte bis in den Musculus detrusor vesicae reseziert werden, um ein T2-Stadium auszuschließen und um den Tumor möglichst komplett zu entfernen (Babjuk et al., 2017). Eine zweite Resektion 2 - 6 Wochen nach der ersten TUR-B wird in vielen Fällen empfohlen, um das Rezidivrisiko zu senken. Beim NMIBC schließt sich an die TUR-B eine intravesikale Chemo- oder Immuntherapie an (Babjuk et al., 2017). Bei einem niedrigen Rezidiv- und Progressionsrisiko ist die einmalige Instillation, die bis spätestens 24 Stunden nach der TUR-B erfolgen sollte, einer Chemotherapie mit Mitomycin C, Epirubicin oder Pirarubicin empfohlen (Sylvester et al., 2016). Bei Tumoren mit mittlerem Progressionsrisiko wird nach der TUR-B eine intravesikale Chemo- oder BCG-Immuntherapie (Bacillus Calmette-Guerin) über ein Jahr durchgeführt, bei Tumoren mit hohem Risiko eine BCG-Immuntherapie über bis zu drei Jahre (Anastasiadis et al., 2012; Babjuk et al., 2017). Bei sehr hohem Progressionsrisiko oder bei BCG-Therapieversagern sollte auch eine radikale Zystektomie erwogen bzw. empfohlen werden (Babjuk et al., 2017). BCG ist ein abgeschwächtes Mykobakterium, welches bei Instillation in die Blase eine massive Entzündungsreaktion hervorruft und so zu einer Zerstörung von Tumorzellen und einer Immunisierung gegen Tumorzellen führt (Böhle et al., 2003). Mehrere Studien haben zwar gezeigt, dass die BCG-Therapie nach TUR-B die Rezidiv- und Progressionsraten im Vergleich zur alleinigen TUR-B deutlich senken konnte, bei high-risk T1-Läsionen lagen die Rezidivraten trotzdem bei 16 - 40% und die Progressionsraten bei 4,4 - 40% (Anastasiadis et al., 2012).

NMIBC haben mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von über 90% eine sehr gute Prognose. Rezidive sind jedoch häufig und bei einem Tis entwickeln ca. 54% der Patienten ohne Behandlung ein MIBC (Lamm, 1992). Mithilfe eines Scores, in den Anzahl, Größe, T-Status (T<sub>a</sub> oder T<sub>1</sub>), Grading, Cis und die frühere Rezidivrate einfließen, lässt sich die Rezidiv- und Progressions-Wahrscheinlichkeit berechnen. Die Rezidiv-Wahrscheinlichkeit beträgt nach 5 Jahren 31% - 78% und die Progressions-Wahrscheinlichkeit 0,8% - 45% (Sylvester et al., 2006). Rezidive und Progress sowie die aufwendige Nachsorge und das relativ lange Überleben beim NMIBC machen Blasenkrebs zu dem Karzinom mit den höchsten „lifetime“ Therapiekosten pro Patient (Sievert et al., 2009).

Die Prognose und die Therapie der invasiven Karzinome wird hauptsächlich durch das Tumor- und Lymphknoten-Stadium bestimmt (Hautmann et al., 2012; Stein et al., 2001). 10 Jahre nach der Diagnose leben noch 90,5% der Patienten mit NMIBC ohne Lymphknotenmetastasen, noch 36,6% im Stadium T<sub>4</sub> N<sub>0</sub>, aber nur noch 16,7% der Patienten mit Lymphknotenbefall (N<sub>1</sub>, jedes T-Stadium) (Hautmann et al., 2012). Deshalb ist ein umfangreiches Staging mit bildgebenden Verfahren für die weitere Therapieplanung von großer Bedeutung.

Die Standardtherapie beim MIBC ohne Fernmetastasen ist die radikale Zystektomie mit pelviner Lymphadenektomie (Witjes et al., 2017). Da jedoch besonders beim Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen die Prognose ungünstiger ist, sind zusätzliche Chemotherapien notwendig, um die Prognose zu verbessern. Die eingesetzten neoadjuvanten Cisplatin-haltigen Chemotherapien verbessern das 5-Jahres Gesamtüberleben um 5 - 8% (Vale, 2005; Witjes et al., 2017). Mit vergleichbaren Ergebnissen werden vor allem die Kombinationen Methotrexat/Vinblastin/Doxorubicin/Cisplatin (MVAC) oder Gemcitabin/Cisplatin (GC) eingesetzt. Aufgrund des günstigeren Nebenwirkungsprofils hat sich in der klinischen Praxis die GC-Kombination durchgesetzt (Fairey et al., 2013). Der Vorteil einer neoadjuvanten Chemotherapie ist, dass sie besser vertragen wird und höhere Dosen erzielt werden können als bei einer postoperativen Chemotherapie. Durch den schnellen systemischen Therapiebeginn können Mikrometastasen eliminiert werden, bevor es zu weiteren Metastasen kommt. Außerdem kann die präoperative Therapie zu einem „Downstaging“ des Tumors führen, was das Resektionsausmaß verringern kann. Da jedoch nicht alle Patienten auf die neoadjuvante Chemotherapie ansprechen,



werden einige Patienten unnötiger Toxizität ausgesetzt (Rosenberg et al., 2005). Der Vorteil einer adjuvanten Chemotherapie liegt in der schnellen lokalen Kontrolle durch die radikale Zystektomie und einem besseren Staging mit Hilfe des Zystektomiepräparates. Die Datenlage dazu ist noch nicht ausreichend, eine adjuvante Chemotherapie wird in den EAU-Leitlinien jedoch bei pT3/T4 und/oder Lymphknoten positiven Tumoren empfohlen (Schmid et al., 2014; Witjes et al., 2017).

Eine besonders schlechte Prognose hat das metastasierte Blasenkarzinom. Bei Erstdiagnose weisen ca. 10 - 15% der Patienten bereits Fernmetastasen auf und etwa die Hälfte der Patienten nach radikaler Zystektomie rezidiert – am häufigsten in Form von Fernmetastasen (Rosenberg et al., 2005). Ohne Therapie überleben diese Patienten 3 - 6 Monate (Schmid et al., 2014; Witjes et al., 2017). Als Therapiestandard ist eine systemische Chemotherapie mit GC oder MVAC etabliert. Damit beträgt das mediane Gesamtüberleben 14 Monate (GC) bzw. 15,3 Monate (MVAC) (von der Maase et al., 2005). In der klinischen Praxis wird auf Grund der geringeren Toxizität häufiger die GC-Kombination angewandt, da vor allem die MVAC-Kombination erhebliche Nebenwirkungen, wie schwere Neutropenien, neutropenisches Fieber, Mukosiden, Übelkeit, Erbrechen sowie Haarausfall zeigt und eine therapiebedingte Sterblichkeit von ca. 3% beschrieben ist (Sternberg et al., 1989; von der Maase et al., 2000). Als Zweitlinienchemotherapie des metastasierten Blasenkarzinoms wird von der EAU nur Vinflunin empfohlen (Witjes et al., 2017). Vinflunin verlängert das mediane Gesamtüberleben auf 6,9 Monate im Vergleich zu 4,6 Monaten mit Best-Supportive Care (Bellmunt et al., 2013).

Abdollah et al. analysierten die Inzidenz-, Mortalitäts- und Überlebensraten von 1973 - 2009 und stellten fest, dass sich die Mortalitätsraten in dem Zeitraum nicht verbessert haben und bei der Behandlung des Blasenkarzinoms in über 30 Jahren keine Fortschritte gemacht wurden (Abdollah et al., 2013).

#### 1.1.4 Immuntherapien beim Blasenkarzinom

Aufgrund der unbefriedigenden Prognose des metastasierten Blasenkarzinoms und der hohen Behandlungskosten des NMIBC ist die Entwicklung neuer Therapien zwingend erforderlich. Bei Studien mit sogenannten zielgerichteten Therapien (targeted therapies) wurden bisher hauptsächlich mTOR- und Tyrosinkinaseinhibitoren

untersucht. Es konnte bisher jedoch keine Substanz ein verlängertes Überleben zeigen und sich in der Praxis durchsetzen (Sonpavde et al., 2010).

Das Blasenkarzinom ist ein vielversprechendes Ziel für die Behandlung mit Immuntherapien. Zum einen ist es ein sehr immunogener Tumor, der zu den Tumoren mit den meisten Mutationen überhaupt gehört, was dazu führt, dass besonders viele Neoantigene produziert und Immunzellen präsentiert werden (Kates et al., 2016; Lawrence et al., 2013). Und zweitens gibt es mit der BCG-Instillationstherapie schon jahrzehntelange Erfahrung mit der Immuntherapie beim NMIBC.

Immuntherapien zielen darauf ab das Immunsystem gegen Tumorzellen zu richten. Eigentlich sollten fremde und entartete Zellen durch das Immunsystem erkannt und abgebaut werden, da sie sich durch veränderte Oberflächenmoleküle und die Präsentation von Antigenen deutlich von gesunden Zellen unterscheiden. Tumore haben aber eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt dem Immunsystem zu entkommen: die Herunterregulation der Expression von Tumorantigenen, die Expression von Molekülen, welche die zelluläre Immunantwort hemmen und die Beeinflussung des Tumormikromilieus (tumor microenvironment) durch ein verändertes Zytokinprofil, was zu einer lokalen Immunsuppression führt (Bellmunt et al., 2017; Poschke et al., 2011).

Die Immuntherapie spielt schon seit den 1970er Jahren mit der BCG-Instillationstherapie eine entscheidende Rolle bei der Behandlung des NMIBC (Gandhi et al., 2013; A. Morales et al., 1976). Die BCG-Immuntherapie hat eine Ansprechrate von ca. 70% und senkt die Rezidivrate bei Ta-, T1-Tumoren und dem Cis (Farina et al., 2017). BCG bindet an Blasenkarzinomzellen und ist ein unspezifischer Stimulus für das Immunsystem. Es führt zu einer lokalen Entzündungsreaktion, bei der es zur Infiltration von Granulozyten, Makrophagen und T-Helferzellen kommt. Eine große Anzahl von Zytokinen wird freigesetzt. Die Zerstörung der Tumorzellen korreliert mit der zellulären Th1-Antwort und wird dann durch CD8+ Lymphozyten, NK-Zellen und Granulozyten ausgelöst (Donin et al., 2017; Gandhi et al., 2013).

Immuncheckpoint-Inhibitoren gehören seit einigen Jahren zu den vielversprechendsten und intensiv untersuchten Therapien zur Behandlung einer Vielzahl von Krebsentitäten (Donin et al., 2017). Tumorzellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche immunmodulierende Oberflächenmoleküle, die „Checkpoint-Proteine“

genannt werden. Diese Oberflächenmoleküle, die mit Rezeptoren auf T-Zellen interagieren, führen dazu, dass T-Zellen entartete Zellen nicht als pathologisch erkennen. So bleibt das Immunsystem inaktiv gegenüber Tumorzellen, welche sich dann ungestört und unreguliert vermehren können. Immuncheckpoint-Inhibitoren sind monoklonale Antikörper, welche die Interaktion zwischen Oberflächenmolekül und Rezeptor blockieren und eine Antitumor-Immunantwort so wiederherstellen. Das Immunsystem erkennt und zerstört dann entartete Tumorzellen (Bellmunt et al., 2017; Bidnur et al., 2016). Antikörper gegen die drei Zielmoleküle „T-lymphocyte associated protein 4“ (CTLA-4), „programmed cell death“ (PD-1) und „PD-Ligand-1“ (PD-L1) haben in den letzten Jahren vielversprechende Ergebnisse in klinischen Studien zu einer Vielzahl von Tumorentitäten geliefert. Das von Tumorzellen exprimierte PD-L1 bindet an PD-1, welches sich auf aktivierten B- und T-Lymphozyten sowie Makrophagen befindet und führt so zur Immunsuppression (Bellmunt et al., 2017). CTLA-4 wird nur von T-Lymphozyten exprimiert und reguliert die frühe T-Zell-Aktivität (Bidnur et al., 2016).

Beim Blasenkarzinom korreliert die PD-L1-Expression mit dem Tumorgrad, der Aggressivität und der Prognose und ist besonders hoch bei Patienten, die nicht auf eine BCG-Therapie angesprochen haben (Inman et al., 2007; Nakanishi et al., 2007). 2014 zeigte eine Studie für den PD-L1-Inhibitor Atezolizumab (MPDL3280A) gute Ansprechraten beim metastasierten Urothelkarzinom. Die Ansprechrate unabhängig von der PD-L1-Expression war ca. 15% und das Ansprechen war umso besser, je höher die PD-L1-Expression auf tumorinfiltrierenden Immunzellen war (Powles et al., 2014). Das Nebenwirkungsprofil von Atezolizumab war günstig und im Vergleich zur platinhaltigen Chemotherapie werden Therapien mit PD-L1-Inhibitoren gut vertragen (Bellmunt et al., 2017; Powles et al., 2014). Atezolizumab wurde im Mai 2016 durch die „US Food and Drug Administration“ (FDA) für Patienten, welche einen Tumorprogress nach bzw. während platinhaltiger Chemotherapie hatten, zugelassen und findet auch Erwähnung in der EAU-Leitlinien (Witjes et al., 2017). Neben Atezolizumab wurden zwei weitere PD-1-/PD-L1-Antikörper von der FDA zur Therapie des Blasenkarzinoms zugelassen und es laufen eine Vielzahl an klinischen Studien zu weiteren Immuncheckpoint-Inhibitoren (PD-L1-, PD-1-, CTLA-4-Antikörper) und verschiedenen Kombinationen aus diesen oder aus Immun- und Chemotherapie (Bellmunt et al., 2017; Kamat et al., 2016). Getestet wird deren Einsatz unter anderem für die Therapie

beim metastasierten Urothelkarzinom, beim MIBC, beim high-risk NMIBC und weiteren Krebserkrankungen, darunter Kopf-Hals-Tumore, das Lungenkarzinom und das Melanom (Bellmunt et al., 2017). Mit der Einführung der Immuncheckpoint-Inhibitoren zur Therapie von Blasenkrebs ist die Hoffnung verbunden auch Patienten mit metastasierten oder chemotherapie-resistenten Erkrankungen erfolgreich zu therapieren. Bellmunt et al nehmen an, dass Immuncheckpoint-Inhibitoren langfristig eine wichtige Rolle in der Therapie des Blasenkarzinoms spielen werden (Bellmunt et al., 2017).

## 1.2 Onkolytische Virotherapie

Die Idee, Karzinome mit Viren zu therapieren, entstand schon in den 1950er Jahren als Fälle beschrieben wurden, bei denen Krebserkrankungen durch Viren geheilt wurden (Kelly et al., 2007). Onkolytische Viren sind Viren, die sich selektiv in Tumorzellen vermehren und diese zerstören ohne das gesunde Gewebe zu schädigen. Nach der Infektion dienen die Krebszellen bzw. der Tumor dann als Produktionsstätte für neue Viren, die erneut Tumorzellen infizieren können (Nettelbeck, 2003). Die tumorselektive Replikation kann eine Eigenschaft bestimmter Viren sein oder durch genetische Veränderungen erreicht werden (S. J. Russell et al., 2007; S. J. Russell et al., 2012). Adenoviren, Herpes-simplex-Viren (HSV) oder Vacciniavirus sind DNA-Viren, die genetisch verändert werden, um die Tumorselektivität zu erreichen. Hingegen sind Newcastle-Disease-Viren (NDV) einzelsträngige RNA-Viren und Reoviren doppelsträngige RNA-Viren mit inhärenter Tumorselektivität (Aghi et al., 2005). Krebszellen haben viele genetische Defekte, die unter anderem dazu führen, dass antivirale Abwehrmechanismen nicht funktionieren, dass sie dem Immunsystem entkommen und dass sie erhöhte Proliferationsraten sowie einen gesteigerten Metabolismus haben, was eine effektive Replikation und Zelllyse onkolytischer Viren ermöglicht (Ilkow et al., 2014).

### 1.2.1 Onkolytische Immuntherapie

Neben der direkten Onkolyse führen onkolytische Viren zur Antiangiogenese (Breitbach et al., 2013) und können eine Immunantwort gegen den Tumor induzieren

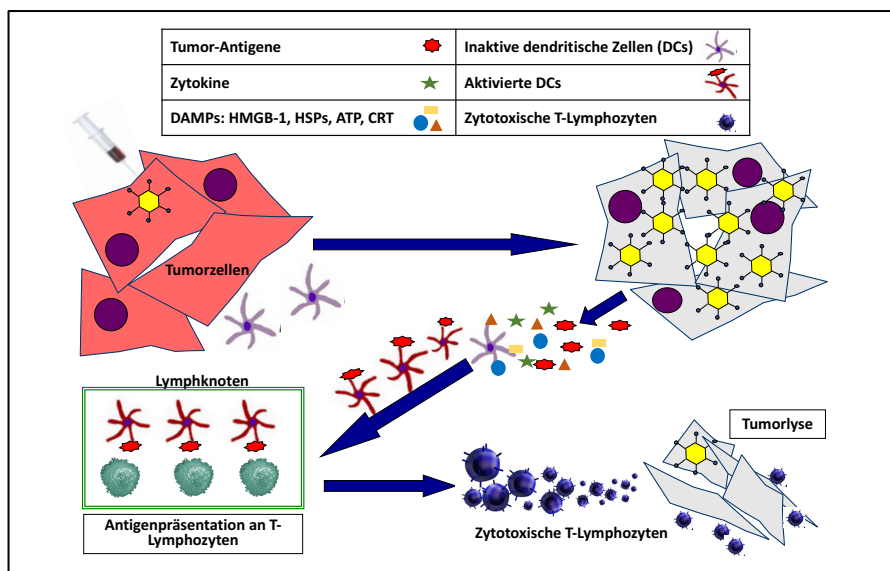
(Cerullo et al., 2012; Gujar et al., 2014; Pesonen et al., 2011). Onkolytische Viren aktivieren Toll-like Rezeptoren, was zu einer lokalen Entzündung führt (Di Paolo et al., 2009; Takeuchi et al., 2009). Aktivierte Immunzellen schütten daraufhin Zytokine aus und mobilisieren so weitere Immunzellen, die virusinfizierte Zellen lysieren (Di Paolo et al., 2014). Neben der angeborenen unspezifischen Immunantwort trägt die durch onkolytische Viren induzierte adaptive zelluläre Immunantwort gegen Tumore zum Erfolg der Therapie bei (Sobol et al., 2011). Die Onkolyse und die inflammatorische Reaktion setzen Tumorantigene und Gefahrenmoleküle frei und bewirken so eine spezifische Immunantwort gegen den Tumor (Pesonen et al., 2011). Die onkolytische Virotherapie stellt eine Form der Immuntherapie dar und wird daher auch als „onkolytische Immuntherapie“ bezeichnet (Guo et al., 2014; Guo et al., 2017).

Um die Immunantwort gegen Tumorzellen zu verstärken werden viele onkolytische Viren mit Tumor-spezifischen Antigenen oder Zytokinen „bewaffnet“ (Guo et al., 2014). So exprimiert zum Beispiel das Herpes-simplex-Virus Talimogene laherparepvec (T-VEC) GM-CSF (B. L. Liu et al., 2003) und es gibt Adenoviren, die GM-CSF (Ramesh et al., 2006), den CD-40-Ligand (Pesonen et al., 2012), RANTES (Lapteva et al., 2009) oder IL-12 (Freytag et al., 2013) exprimieren, um die zelluläre und systemische Antitumor-Immunantwort zu verstärken. Es können aber auch „unbewaffnete“ Viren die Antwort der natürlichen Killerzellen gegen Krebszellen triggern (Bhat et al., 2011). Insgesamt scheint der Erfolg der Virotherapie maßgeblich von der induzierten Immunantwort gegen den Tumor abhängig zu sein (Kleijn et al., 2014a; Lichty et al., 2014).

### 1.3.2 Immunogener Zelltod

Für den Aufbau einer Antitumor-Immunantwort ist der durch onkolytische Viren induzierte immunogene Zelltod von großer Bedeutung. Der immunogene Zelltod ist eine Form der Apoptose, Nekrose, Autophagie oder Pyroptose (Inoue et al., 2014). Er ist durch die Exposition und Freisetzung von „Gefahren-assoziierten molekularen Mustern“ (Damage-associated molecular patterns, DAMPs) und „Pathogen-assoziierten molekularen Mustern“ (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) charakterisiert und führt so zur Aktivierung einer Immunantwort gegen Tumorzellen (Guo et al., 2014; Inoue et al., 2014). Zu den DAMPs gehören „High-Mobility Group Box 1-Protein“ (HMGB-1), Calreticulin (CRT), extrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP) und

Hitzeschock Proteine (HSP70 und HSP90) (Kepp et al., 2014). Diese Moleküle binden an purinerge Rezeptoren, Toll-like Rezeptoren (TLR) und CD91 auf dendritischen Zellen und aktivieren diese, sodass sie tumorspezifische Antigene exprimieren (Garg et al., 2015; Kroemer et al., 2013). PAMPs sind Moleküle von Krankheitserregern, wie RNA, DNA oder Proteine, die ebenfalls an TLR und andere Rezeptoren binden und so die Bildung einer Immunantwort bewirken (Bianchi, 2007). Dendritische Zellen präsentieren tumorspezifische Antigene an T-Lymphozyten. Zytotoxische CD8+ Lymphozyten können dann durch die Freisetzung von Interferon gamma (IFN $\gamma$ ) zur Tumorzelllyse führen (Kroemer et al., 2013). Neben Viren induzieren auch Chemotherapien, insbesondere Anthrazykline wie Doxorubicin, Oxaliplatin, Bortezomib, UVC- oder Gammabestrahlung und die photodynamische Therapie einen immunogenen Zelltod (Inoue et al., 2014; Kroemer et al., 2013).

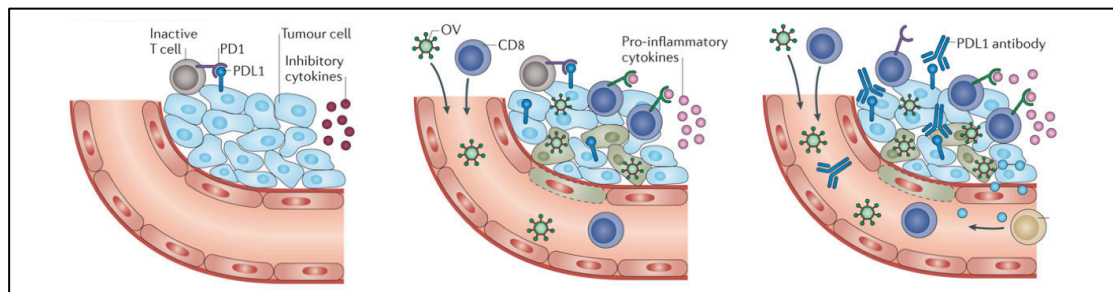


**Abbildung 1. 3: Eine Immunantwort gegen Tumore kann durch die onkolytische Virotherapie induziert werden**

Onkolytische Viren replizieren selektiv in Tumorzellen und lysieren diese. Sie können einen immunogenen Zelltod verursachen, bei dem PAMPs und DAMPs wie HMGB-1, HSP70, ATP, CRT sowie tumorspezifische Antigene freigesetzt werden, an Rezeptoren auf dendritischen Zellen binden und diese dadurch aktivieren. Tumorantigene werden durch antigenpräsentierende Zellen für die T-Lymphozyten präsentiert. Zytotoxische T-Lymphozyten können durch IFN $\gamma$ -Freisetzung Tumorzellen lysieren. Modifiziert mit der Zustimmung des Autors Per Sonne Holm (Holm et al., 2016).

Ein besonderes Augenmerk der aktuellen Forschung zur onkolytischen Virotherapie liegt auf der Kombinationstherapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren, welche in aktuelle Reviews und Studien befürwortet wird (Fountzilias et al., 2017; Guo et al., 2017; Hamid et al., 2017; Lichty et al., 2014; Niemann et al., 2017). Hierbei zeigen Daten zur Kombination aus einem Immuncheckpoint-Inhibitor und Adenoviren (H.

Jiang et al., 2017; Shin et al., 2013), Newcastle-Disease-Viren (Zamarin et al., 2014), Masernviren (Engeland et al., 2014), Semliki-Forest-Viren (Quetglas et al., 2015), Vacciniaviren (Rojas et al., 2015) oder zum Herpes-simplex-Virus T-Vec (Puzanov et al., 2016) synergistische Effekte bei der Induktion einer T-Zellantwort gegen Tumore und der therapeutischen Effektivität. Der Mechanismus des synergistischen Effektes beruht darauf, dass durch die virale Onkolyse ein Kreislauf in Gang gesetzt wird, bei dem DAMPs und tumorspezifische Antigene freigesetzt werden und dendritische Zellen eine spezifische T-Zell-Antwort gegen den Tumor induzieren. Die Immuncheckpoint-Inhibitoren erhalten und verstärken die T-Zell-Antwort dabei und sind systemisch wirksam (Abb. 1. 4)(Lichty et al., 2014; Niemann et al., 2017).



**Abbildung 1. 4: Synergistische Effekte der onkolytischen Virotherapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren**

Links: Tumorinfiltrierende T-Lymphozyten sind durch die Interaktion von PD-L1 (auf Tumorzellen) und PD-1 (auf Immunzellen) inaktiv. Inhibitorische Zytokine führen zu einer immunsuppressiven Tumorumgebung. Mitte: Onkolytische Viren vermehren sich in Tumorzellen und führen zu deren Lyse. Dabei wird ein immunogener Zelltod verursacht, DAMPs, PAMPs und Tumorantigene freigesetzt, was zu der Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und der Rekrutierung von Immunzellen führt. Außerdem kann es durch die Viren und IFN $\gamma$  zu einer verstärkten PD-L1 Expression kommen (Muhlbauer et al., 2006). Rechts: Systemisch verabreichte Antikörper z.B. gegen PD-L1 richten die T-Zellantwort gegen Tumorzellen und potenzieren die durch onkolytische Viren induzierte Immunantwort. Reprinted with permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Cancer, (Lichty et al., 2014), ©2014

### 1.3.3 Aktueller Stand in der Klinik

Besondere Aufmerksamkeit erfährt die onkolytische Virotherapie seitdem das Herpes-simplex-Virus Talimogene laherparepvec (T-VEC) von Amgen (Amgen Inc., USA) zur Behandlung des fortgeschrittenen Melanoms 2015 sowohl in den USA als auch in Europa zugelassen wurde (R. H. Andtbacka et al., 2015a; Coffin, 2016). T-VEC ist ein HSV-1, welches das Gen des Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors (GM-CSF) enthält, welcher dadurch produziert wird. GM-CSF führt zur Rekrutierung und Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen und zur Antitumor-Immunantwort (Kaufman et al., 2014). In der Zulassungsstudie lag die Heilungsrate (durable response

rate) bei Patienten mit nicht-resezierbarem Melanom mit T-VEC bei 16,3%, im Vergleich dazu lag die Heilungsrate bei den Patienten, die nur mit GM-CSF behandelt wurden, bei 2,1%. Das Gesamtüberleben war mit T-VEC 4,4 Monate länger (nicht signifikant) (R. H. Andtbacka et al., 2015a). Die Nebenwirkungen von T-VEC, wie auch von anderen onkolytischen Viren, verlaufen eher mild und präsentieren sich häufig durch Abgeschlagenheit, grippeähnlichen Symptome oder Fieber; die Inzidenz von schweren Nebenwirkungen ist sehr gering (R. H. Andtbacka et al., 2015a; T. C. Liu et al., 2007; Pol et al., 2016). In einer weiteren Studie beim inoperablen Melanom scheint die Kombination aus T-VEC und dem CTLA-4-Antikörper Ipilimumab effektiver zu sein, als die Therapie mit T-VEC alleine (Puzanov et al., 2016); eine Studie zur Kombination aus T-VEC und dem PD-1-Inhibitor Pembrolizumab zeigt ähnliche Ergebnisse (Long et al., 2016). Insgesamt gibt es eine Vielzahl abgeschlossener und laufender klinische Studien zur onkolytischen Virotherapie für die Behandlung von verschiedenen Krebsentitäten. Dabei werden entweder Viren alleine verabreicht oder in Kombination mit Chemo-, Strahlen- oder Immuntherapien (Pol et al., 2016).

Für die Therapie des Blasenkarzinoms wird das Adenovirus CG0070 in klinischen Studien erprobt. Dieses repliziert selektiv in Zellen, bei denen der RB-Signalweg defekt ist. Die Replikation wird über den E2F1 Promoter kontrolliert. Außerdem exprimiert es GM-CSF (Ramesh et al., 2006). In der aktuellen klinischen Phase II/III-Studie wird das Virus zur Therapie bei Patienten mit nicht-resezierbarem Cis oder high-grade Ta/T1 mit Cis oder Cis alleine intravesikal instilliert (Packiam et al., 2016). In der Phase I-Studie lag die Ansprechrate insgesamt bei 48,6%, die Heilungsrate beim Cis betrug 50%. Die Nebenwirkungen waren mild und präsentierten sich in Form von Dysurie, Hämaturie, Drangsymptomatik oder Symptomen grippaler Infekte (J. M. Burke et al., 2012). Bei Instillation der Viren in die Blase werden lokal hohe Konzentrationen erreicht, während die systemische Exposition gering ist (J. Burke, 2010).



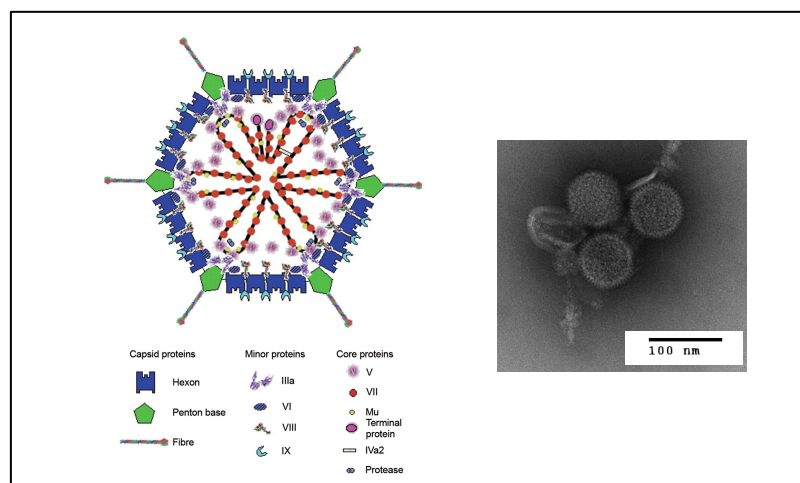
Tabelle 1. 1: Auswahl an onkolytische Viren in klinischen Studien

| Onkolytisches Virus  | Modifikation/<br>Transgen                      | Tumor, Studie/Zulassung  | Referenz   |
|--|--|--|--|
| Adenovirus<br>CG0070   | E1A<br>E2F-Promoter<br>GM-CSF                  | NMIBC nach BCG-Versagen,<br>Phase II/III laufend<br>(NCT02365818)  | (Packiam et al.,<br>2016; Ramesh et al.,<br>2006)  |
| Adenovirus<br>H101   | E1B55K-<br>Deletion                            | Kopf-Hals-Tumore, In China<br>seit 2005 zugelassen   | (Garber, 2006; Raty<br>et al., 2008)   |
| Adenovirus<br>ONYX-015<br>(entspricht dem Konstrukt<br>von H101) | E1B55K-<br>Deletion                            | Kopf-Hals-Tumore, Phase II<br>abgeschlossen  | (Nemunaitis et al.,<br>2001)   |
| Adenovirus<br>Ad5/3-D24-GMCSF<br>(auch ONCOS-102)                | E1A-CR2-<br>Deletion<br>GM-CSF                 | Verschiedene solide Tumore,<br>Phase I abgeschlossen<br>Melanom, präklinisch<br>Mesotheliom, Phase I                                       | (Kanerva et al.,<br>2015; Ranki et al.,<br>2016)<br>(Bramante et al.,<br>2015)<br>(Kuryk et al., 2016) |
| Adenovirus<br>H103   | E1B55K-<br>Deletion<br>HSP70                   | Verschiedene solide Tumore,<br>Phase I abgeschlossen   | (J. L. Li et al., 2009)  |
| Coxsackievirus A21   | Keine  | Fortgeschrittenes Melanom,<br>Phase II abgeschlossen<br><br>NMIBC, Phase I   | (R. H. I. Andtbacka<br>et al., 2015b;<br>Bradley et al., 2014)<br>(Annels et al., 2015)                |
| HSV<br>Talimogene laherparepvec<br>(T-VEC)                       | ICP34.5-<br>Deletion<br>GM-CSF                 | Nicht resezierbares Melanom<br>Stadium IIIB-IV, Phase III<br>abgeschlossen,<br>in den USA und Europa seit<br>2015 zugelassen               | (R. H. Andtbacka et<br>al., 2015a; Coffin,<br>2016; B. L. Liu et al.,<br>2003)                         |
| Parovirus H1   | Keine  | Glioblastom, Phase I/IIa<br>abgeschlossen  | (Geletneky et al.,<br>2012)  |
| Reovirus<br>Reolysin   | Keine  | Phase I/II zu verschiedenen<br>Tumoren abgeschlossen und<br>laufend, Phase III zu<br>fortgeschrittenen Kopf-Hals-<br>Tumoren laufend       | (Gong et al., 2016)  |
| Vacciniavirus<br>JX-594  | Thymidin<br>Kinase-<br>Inaktivierung<br>GM-CSF | Hepatozelluläres Karzinom,<br>Phase II abgeschlossen, Phase<br>III läuft (NCT02562755)<br>Kolorektales Karzinom, Phase<br>Ib abgeschlossen | (Heo et al., 2013)<br>(Park et al., 2015)  |

## 1.3 YB-1 abhängige onkolytische Adenoviren

### 1.3.1 Adenoviren

Adenoviren wurden das erste Mal 1953 von Rowe et al. aus Adenoiden isoliert und beschrieben (Rowe et al., 1953). Sie verursachen in der Regel mild verlaufende respiratorische Infekte, Pharyngitiden, Konjunktividen oder Infekte des Gastrointestinaltrakts, der Nieren oder der ableitenden Harnwege (Enders et al., 1956; Robinson et al., 2011). Bisher sind über 60 Typen humaner Adenoviren identifiziert, die in die Gruppen A - G eingeteilt werden (Robinson et al., 2013). Das adenovirale Genom besteht aus einer linearen doppelsträngigen DNA und ist 34 - 36 kb lang (Cerullo et al., 2012; Robinson et al., 2013). Der Durchmesser von Adenoviren – ohne die abstehenden Fiberproteine – beträgt etwa 90 nm (Harrison, 2010). Das ikosaedrische Kapsid der unbehüllten Viren besteht aus 240 sechseckigen Hexons und 12 Pentons an den Ecken, von denen Fiberproteine abstehen (W. C. Russell, 2009).



**Abbildung 1. 5: Struktur von Adenoviren**

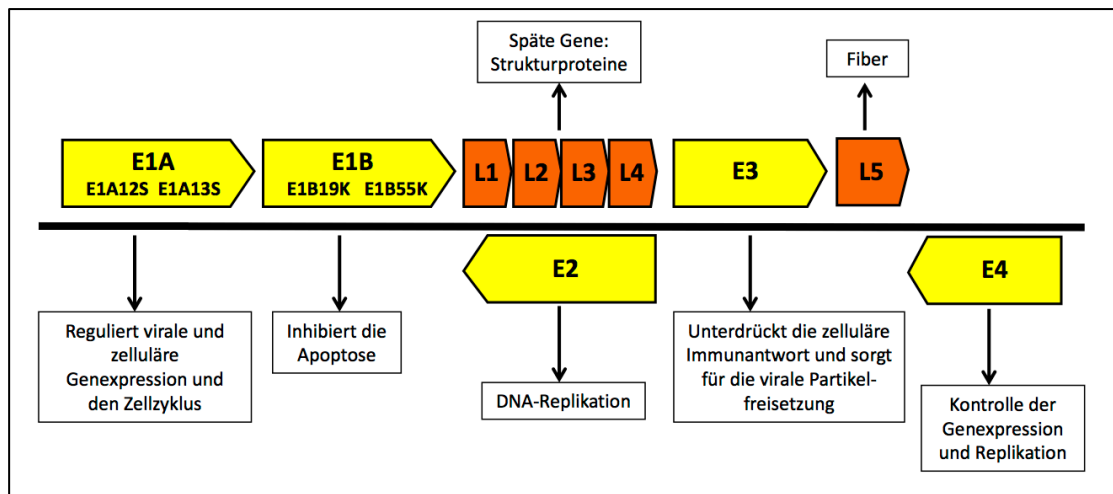
Links: Schematische Darstellung der adenoviralen Struktur. Die Proteine lassen sich in Kapsidproteine und Kernproteine (Core proteins) einteilen. Abbildung mit Erlaubnis der Microbiology Society (W. C. Russell, 2009) ©2017. Rechts: Elektronenmikroskopische Aufnahme von drei Adenoviren, die bei der Analyse der isolierten Exosomen entstanden ist; Vergrößerung x28500.

Die adenovirale Infektion verläuft in zwei Phasen: Die frühe Phase umfasst den Eintritt des Virus in die Zelle, den Transport der Virus-DNA in den Zellkern, die Transkription und die Translation der frühen Gene und dauert ca. 6 - 8 Stunden. In der späten Phase werden die viralen Strukturproteine zusammengebaut und infektiöse Viren gebildet, was 4 - 6 Stunden dauert (W. C. Russell, 2000). Adenoviren binden über Fiber

üblicherweise an den Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR), um Zellen zu infizieren (Bergelson et al., 1997). Es sind jedoch auch Interaktionen mit anderen Zellrezeptoren wie CD46, CD80 oder CD86 beschrieben (W. C. Russell, 2009). Die Bindung des Peptids aus Arginin, Glycin und Asparaginsäure (RGD) an  $\alpha\beta 3/\alpha\beta 5$  Integrine führt zur Internalisierung in Endosomen (W. C. Russell, 2009; Wickham et al., 1993). Das teilweise zerstörte Virus wird in der Zelle zum Zellkern transportiert, wo die virale DNA in den Nukleus transloziert und die Transkription eingeleitet wird (W. C. Russell, 2000).

Die adenovirale Transkription und Replikation läuft in zwei Phasen ab und beginnt mit der Transkription der frühen Gene (early genes) (Abbildung 1. 6). Das E1-Gen codiert für E1A und E1B (W. C. Russell, 2000). Aus dem E1A-Gen entstehen durch alternatives Splicing verschieden Genprodukte, wobei für die Funktionen von E1A hauptsächlich die Produkte aus 289 und 243 Aminosäuren bedeutend sind, die aus der 13S- bzw. der 12S-mRNA entstehen. Die 289R- und 243R-Proteine unterscheiden sich ausschließlich durch die konservierte Region CR3 im 289R-Protein (Frisch et al., 2002). Das E1A-Protein moduliert den Zellmetabolismus, macht die Zelle für die virale Replikation empfänglich und führt durch die Induktion der S-Phase zur Transkription der E2-Gene und der weiteren frühen Gene (W. C. Russell, 2000). Danach werden die anderen frühen Gene E1B, E2, E3 und E4 transkribiert. Die E1B-Proteine E1B55K und E1B19K inhibieren die zellulären Apoptosemechanismen. E1B55K interagiert mit p53, einem Tumorsuppressorgen, welches zum Zellzyklusarrest und zur Apoptose von geschädigten Zellen führt. Und E1B19K ist ein Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) Homolog, welches durch Interaktion mit Bax-Proteinen die Apoptose und Nekrose hemmt (Han et al., 1996). Die E2-Gene codieren für Proteine, welche für die virale Replikation und die Transkription der späten Gene benötigt werden (Hay et al., 1995). Den E3-Genprodukten kommt eine wichtige Rolle zu die humanen Immunreaktionen gegen infizierte Zellen zu unterdrücken und neugebildete Viren bei der Zelllyse effektiv freizusetzen. Zum Beispiel bindet E3-gp19K an MHC-1-Moleküle und verhindert so deren Transport zur Zelloberfläche, sodass infizierte Zellen nicht von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) abgetötet werden. Das „Adenovirus Death Protein“ (ADP) ist entscheidend für die Zelllyse und die effektive Freisetzung neugebildeter Partikel (Lichtenstein et al., 2004). Die E4-Genprodukte haben mehrere Funktionen bei der RNA-Verarbeitung sowie der DNA-Replikation und modulieren so die Genexpression und Replikation (Leppard, 1997).

Nach der Transkription der frühen Gene folgt die DNA-Replikation. Im Anschluss werden die späten Gene L1 – L5, welche für die viralen Strukturproteine codieren, transkribiert. Nach der Fertigstellung der neuen Viren, wandern diese vom Zellkern ins Zytoplasma und werden dann durch den Zerfall der Zellmembran freigesetzt (W. C. Russell, 2000).



**Abbildung 1. 6: Schematische Darstellung des adenoviralen Genoms mit seinen Funktionen**

Sowohl die Darstellung des Genoms als auch die Funktionen der Gene bzw. ihrer Produkte sind stark vereinfacht. Adenoviren haben eine doppelsträngige DNA. Die Transkription des Genoms kann in eine frühe (E1 - E4) und eine späte (L1 - L5) Phase eingeteilt werden. Die späten Gene codieren hauptsächlich für Strukturproteine.

### 1.3.2 Onkolytische Adenoviren

Als onkolytische Adenoviren werden am häufigsten Adenoviren des Serotyps 5 der Subgruppe C verwendet. Das Genom, die Struktur und der Infektionshergang dieser Viren sind gut bekannt. Adenoviren haben einen lytischen Zellzyklus, der zum Tod der infizierten Zelle führt und erfüllen damit die Grundvoraussetzung für die onkolytische Virotherapie. Von Vorteil ist, dass sich Adenoviren leicht herstellen lassen und die Partikel eine hohe Stabilität aufweisen. Die relativ geringe Pathogenität, die genetische Stabilität und das nicht-integrierende Genom von Adenoviren machen sie relativ sicher im Einsatz als Therapeutikum (Nettelbeck, 2003; Pesonen et al., 2011). Andererseits weisen Adenoviren eine hohe Immunogenität auf, was bei systemischer Gabe zu einer schnellen Elimination durch das Immunsystem führt, sodass sie hauptsächlich zur intratumoralen und lokalen Applikation erprobt werden (Pesonen et al., 2011).

Entscheidend bei der onkolytischen Virotherapie ist die Tumorselektivität. Zur Herstellung der tumorselektiven Replikation von Viren sind zwei hauptsächliche Mechanismen beschrieben. Eine Strategie, die Replikation tumorselektiv zu machen, besteht darin, spezifische Promoter einzusetzen, die nur in Tumorzellen aktiviert werden und dann die Transkription von Genen zur Replikation ermöglichen (Curiel, 2000; Nettelbeck, 2003). Ein Beispiel ist die Abhängigkeit der Transkription von der humanen Telomerase Reversen Transkriptase (hTERT), die fast nur von Tumorzellen exprimiert wird (Wirth et al., 2003).

Die andere Möglichkeit, einen tumorselektiven Replikationsmechanismus herzustellen, ist die komplette oder teilweise Deletion von E1-Genen. Dieser Mechanismus beruht auf der Überexpression von Onkogenen oder der Mutation von Tumorsuppressorgenen (Curiel, 2000; Nettelbeck, 2003). Der Mechanismus des Virus ONYX-015 (dl1520) beruht auf der Deletion von E1B55K. Normalerweise verhindert E1B55K die Induktion der Apoptose durch Bindung an p53. P53 ist ein Tumorsuppressorgen und in einer Vielzahl von Krebsentitäten mutiert. Bischoff et al. nahmen an, dass ONYX-015 in normalen Zellen zur Apoptose und somit nicht zur Replikation führt, hingegen in Zellen mit mutiertem p53 replizieren kann und zur Zelllyse führt (Bischoff et al., 1996; Toth et al., 2010). Zwar wurde der p53-abhängige Replikationsmechanismus später widerlegt (Harada et al., 1999), trotzdem kann das Virus Tumorzellen effektiv abtöten, besonders in Kombination mit Chemo- oder Strahlentherapie und wurde in China unter dem Namen H101 2006 zur Krebstherapie zugelassen (Garber, 2006; Niemann et al., 2017). Das onkolytische Adenovirus Delta24 wurde unter der Annahme konstruiert, dass E1A den Transkriptionsfaktor E2F aus seiner Bindung mit Rb löst und dass E2F dann an den E2-early Promoter bindet (Kovesdi et al., 1987; Yee et al., 1987). Delta24 weist eine Deletion in E1A auf, was zu einer veränderten Rb-Bindungsstelle im E1A-Protein führt, sodass es nicht mehr zur E2F-Freisetzung kommt und die S-Phase in gesunden Zellen nicht induziert wird. Da Tumorzellen unreguliert die S-Phase induzieren, repliziert Delta24 in diesen Zellen und führt zur Lyse (Fueyo et al., 2000; Toth et al., 2010). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das E1A-Protein den Rb/E2F1-Komplex nicht löst sondern stabilisiert (Nemajerova et al., 2008; Seifried et al., 2008). Somit kann infrage gestellt werden, ob E2F wirklich die Rolle des wichtigen Aktivators am E2-early Promoter zukommt, wie dies früher angenommen wurde.

Aufgrund der Erkenntnis, dass der E2-late Promoter, der bei der adenoviralen Transkription eine wichtige Rolle spielt, von YB-1 kontrolliert wird, wurde das onkolytische Adenovirus XVir-N-31 entwickelt, dessen Replikation von der nukleären Expression des Tumorkogens YB-1 abhängig ist (Holm et al., 2002; Mantwill et al., 2006; Rognoni et al., 2009).

Limitiert wird die adenovirale Transduktion bzw. Infektion durch die sehr geringe CAR-Expression auf vielen Tumorzellen (Y. Li et al., 1999; Pesonen et al., 2011). Um die Infektion effektiver zu machen, wurden Viren mit dem RGD-Motiv im HI Loop des Fiber-Knobs ausgestattet und ermöglichen so eine CAR-unabhängige Infektion (Dmitriev et al., 1998). Außerdem weisen viele Tumore eine starke Expression von CD46 auf (Fishelson et al., 2003), was eine Infektion mit Ad35 ermöglicht. Es werden dafür Chimäre Ad5 verwendet, die das Fiber des Ad35 enthalten (Gaggar et al., 2003).

### 1.3.3 Das Protein YB-1

Y-Box-binding Protein 1 (YB-1) ist ein multifunktionales Onkoprotein. Es gehört zur Familie der Kälteschockproteine und bindet mit einer hoch-konservierten Region an DNA und RNA (Lasham et al., 2013; Wolffe, 1994). Ursprünglich wurde YB-1 als Transkriptionsfaktor identifiziert, der an die Y-Box, eine umgedrehte CCAAT-Box, des MHC-II-Promoters bindet (Didier et al., 1988). Seither wurden für YB-1 eine Vielzahl an Prozessen beschrieben, die es als Transkriptions- und Translationsfaktor reguliert. Dies beinhaltet DNA-Replikation und -Reparatur, Transkription, RNA-Splicing, Translation und Kontrolle der Genexpression (Eliseeva et al., 2011). Physiologisch spielt YB-1 eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung, die Expression von YB-1 nimmt jedoch mit zunehmendem Alter in gesunden Zellen ab und ist in adulten Zellen kaum nachweisbar (Kosnopfel et al., 2014; Lu et al., 2005). Eine signifikante Überexpression von YB-1 ist für viele verschiedene Tumorentitäten beschrieben. Diese Überexpression korreliert häufig mit einer schlechten Prognose und Chemotherapieresistenz, so zum Beispiel beim Mammakarzinom (Janz et al., 2002), bei Kopf-Hals-Tumoren (Kolk et al., 2011), beim Lungenkarzinom (Gessner et al., 2004), beim Osteosarkom (Fujiwara-Okada et al., 2013) und beim Blasenkarzinom (Song et al., 2014) sowie bei zahlreichen weiteren Tumorentitäten (Kosnopfel et al., 2014). Auch im Serum von Patienten mit

Krebserkrankungen scheint die YB-1 Konzentrationen erhöht zu sein (Rohr et al., 2016; Tacke et al., 2014).

In gesunden Zellen ist YB-1, wenn überhaupt, im Zytoplasma detektierbar, bewegt sich jedoch bei Zellstress, Hyperthermie, UV-Bestrahlung, Chemotherapiebehandlung oder Adenovirusinfektion in den Zellkern (Eliseeva et al., 2011; Holm et al., 2002). Krebszellen hingegen weisen häufig eine nukleäre Lokalisation von YB-1 auf. Denn in Tumoren reguliert YB-1 die Zellzyklusprogression (Jurchott et al., 2003), Zellproliferation (Oda et al., 2003), Chemotherapieresistenz (Bargou et al., 1997), Angiogenese (Coles et al., 2005) und die epitheliale mesenchymale Transition (EMT) (Evdokimova et al., 2009; Gopal et al., 2015), welche eine Voraussetzung für Tumorinvasion, -migration und Metastasierung darstellt. TWIST, welches ebenfalls an der EMT beteiligt ist, reguliert YB-1 (Shiota et al., 2008). Daneben stehen mehrere Tumorsignalwege, wie der PI3K/Akt/mTOR-, der Ras/Raf/MEK/ERK- und der E2F-Signalweg, die für die Tumorzellproliferation eine wichtige Rolle spielen, in Verbindung mit YB-1 (Lasham et al., 2013).

Beim Blasenkarzinom ist eine erhöhte YB-1-Expression mit Tumorwachstum und Invasion assoziiert. Der immunhistochemische YB-1-Status korreliert mit einem verkürzten Überleben und stellt einen potentiellen prognostischen Faktor dar. Außerdem führt eine hohe nukleäre YB-1-Expression zur Therapieresistenz (Shiota et al., 2011; Song et al., 2014; Yamashita et al., 2017).

Neben der Rolle von YB-1 im Krebsgeschehen scheint es auch bei inflammatorischen Prozessen beteiligt zu sein (Lindquist et al., 2014). Es kommen erhöhte YB-1-Konzentrationen bei Patienten mit Sepsis vor und YB-1 ist an der Regulation der Synthese der Chemokine CCL-2 und CCL-5 und des Zytokins IL-2 beteiligt (C. Y. Chen et al., 2000; Hanssen et al., 2013). Es wurde gezeigt, dass YB-1 - ähnlich wie HMGB-1 - bei Entzündungssignalen über einen nicht-klassischen Weg sezerniert wird und dass extrazelluläres YB-1 Einfluss auf die Zellproliferation und Zellmigration hat (Frye et al., 2009).

Durch die zentrale Rolle in vielen Krebsentitäten stellt YB-1 einerseits einen interessanten prognostischen Marker dar und scheint andererseits ein gutes Ziel für den Einsatz von Krebstherapien zu sein (Kosnopfel et al., 2014).

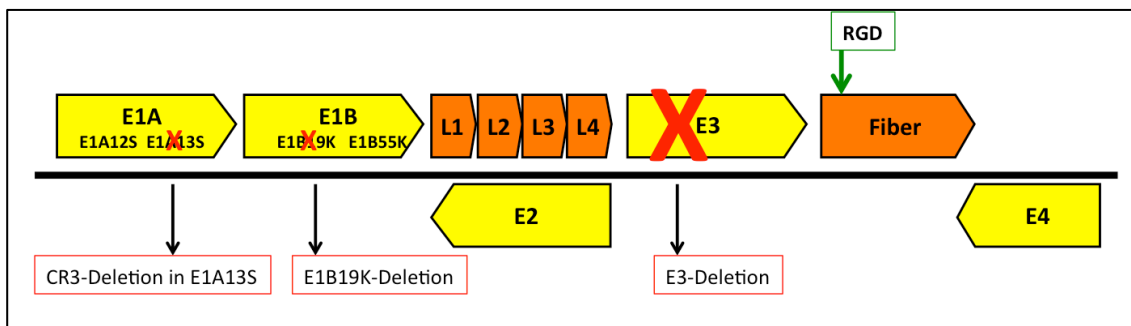
### 1.3.4 YB-1 abhängige Viren

Holm et al. konnten zeigen, dass YB-1 bei der Adenovirus Wildtyp-Infektion durch einen E1B55K/E4orf6-abhängigen Mechanismus in den Zellkern transportiert wird und an der Regulation der adenoviralen Replikation beteiligt ist, indem es an den E2-late Promoter bindet (Holm et al., 2002; Holm et al., 2004). Die E2-Region codiert für Proteine wie das terminale Präkursor-Proteine pTP, die DNA-Polymerase, und das DNA-bindende Protein DBP, welche für die Replikation notwendig sind. E2 wird von einem frühen (E2-early) und einem späten (E2-late) Promoter kontrolliert (Swaminathan et al., 1995). Zuerst wurde E2F als Transkriptionsfaktor identifiziert, der E1A-abhängig aus seiner Bindung mit Rb freigesetzt wird und den E2-early Promoter kontrolliert (Kovesdi et al., 1987; Yee et al., 1987). E1A scheint den Rb/E2F-Komplex jedoch eher zu stabilisieren als zu lösen, was eine komplexere Regulation der adenoviralen Transkription nahelegt als ursprünglich angenommen (Nemajerova et al., 2008; Seifried et al., 2008). Der E2-late Promoter wird durch die Bindung von YB-1 an eine invertierte CCAAT-Box (Y-Box) aktiviert, was für die volle Aktivierung der Transkription notwendig ist (Holm et al., 2002). Die E1A-deletierten Viren dl520 und Ad312, deren Replikation in gesunden Zellen nicht möglich ist, können in therapieresistenten Tumorzellen replizieren, da YB-1 dort stark überexprimiert im Zellkern vorliegt und die Transkription der E2-Gene ermöglicht (Holm et al., 2004; Mantwill et al., 2006).

Mantwill, Holm et al. haben das Virus dl520 zu XVir-N-31 (auch Ad-Delo3-RGD) weiterentwickelt. Es hat dieselbe Mutation in der CR3-Untereinheit (conserved region) in E1A13S (Haley et al., 1984), was zur insuffizienten Replikation führt, wenn der E2-late Promoter nicht durch YB-1 aktiviert wird und die Replikation so YB-1 abhängig macht (Abb. 1. 7) (Mantwill et al., 2006; Rognoni et al., 2009). Da YB-1 von gesunden Zellen kaum exprimiert wird (Bargou et al., 1997), kommt es hier nicht zur Aktivierung des E2-late Promoters und es findet in diesen Zellen keine Replikation statt. Und weil YB-1 bei Zellstress und Chemotherapiebehandlung in den Zellkern wandert, führt die Kombination mit Chemotherapeutika zu effektiverer Replikation und Zelllyse onkolytischer Adenoviren und bietet einen Angriffspunkt für therapieresistente Zellen (Holm et al., 2004; Mantwill et al., 2006). Die CAR-Expression auf Krebszellen ist sehr variabel bzw. gering, deshalb wurde XVir-N-31 mit dem RGD-Motiv in der Fiberregion ausgestattet, um eine CAR-unabhängige Infektion zu ermöglichen (Dmitriev et al.,



1998; Pesonen et al., 2011; Rognoni et al., 2009). Des Weiteren führt die Deletion des Bcl-2-Homologs E1B19K bei XVir-N-31 zu einer schnelleren Zelllyse und effektiveren Replikation der Viren (Sauthoff et al., 2000). Die Deletion der E3-Region führt zu einer besseren Detektion sterbender Zellen durch das Immunsystem und ermöglicht den Einbau von Transgenen wie YB-1 (Glockzin et al., 2006; Lichtenstein et al., 2004; Rognoni et al., 2009). XVir-N-31 hat beim Pankreastumor und Glioblastom *in vitro* und *in vivo* schon gezeigt, dass es YB-1 abhängig repliziert sowie effektiv zur Zelllyse und Tumorreduktion führt (R. Holzmüller et al., 2011; Mantwill et al., 2013; Rognoni et al., 2009).



**Abbildung 1. 7: Schematische Genomkarte von XVir-N-31**

Das Virus weist Deletionen in E1A13S, E1B19K sowie der E3-Region auf und hat ein RGD-Motiv in der Fiber-Region.

## 1.4 Ziele der Arbeit

Aufgrund der unbefriedigenden Therapie und Prognose des Blasenkarzinoms ist die Entwicklung neuer Therapiemodalitäten notwendig. Der Ansatz der onkolytischen Virotherapie zur Therapie des Blasenkarzinoms scheint sinnvoll zu sein, da sich onkolytische Viren einfach in die Blase instillieren lassen (J. Burke, 2010). Zudem ist das Blasenkarzinom ein stark immunogener Tumor, weshalb eine hohe Ansprechrate auf Immuntherapien erwartet werden kann (Kates et al., 2016). Wir verfolgen die Idee mit YB-1 abhängigen Adenoviren, da YB-1 ein zentrales Protein in der Tumorbilogie ist und die Expression beim Blasenkarzinom eine prognostische Bedeutung hat (Song et al., 2014).

In dieser Arbeit wurde die YB-1 basierte Virotherapie erstmals *in vitro* in Blasenkarzinomzelllinien erprobt. Es wurden immunologische Aspekte der Zelllyse und der Virotherapie untersucht. Dabei wurde den folgenden Fragestellungen nachgegangen:

1. Überprüfung der Grundvoraussetzungen einer YB-1 basierten Virotherapie in Blasenkarzinomzelllinien.
  - a. Erhebung des YB-1- und CAR-Status von Blasenkarzinomzelllinien.
  - b. Messung der Replikation, der Partikelbildung und der Zytotoxizität der Viren in Blasenkarzinomzelllinien.
2. Untersuchung des Zelltods durch die Viren.
  - a. Kommt es zur Freisetzung von YB-1 und den immunologischen Gefahrenmolekülen HSP70 und HMGB-1?
  - b. Wie werden diese Proteine freigesetzt?
3. Evaluation der Immunantwort von PBMC auf die onkolytische Virotherapie
  - a. Etablierung eines Systems zur schnellen Evaluation der Immunreaktion mittels IFN $\gamma$ -Freisetzung aus PBMC.
  - b. Evaluation der IFN $\gamma$ -Freisetzung nach Kombinationsbehandlung von onkolytischer Virotherapie und PD-L1-Inhibitor.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Tabelle 2. 1: Geräte

| Gerät  | Beschreibung, Hersteller                           |
|--|--|
| Autoklav Syntec DX-65                          | Syntec GmbH, Linden, Deutschland                   |
| BD FACSCalibur Flow Cytometry System           | BD Bioscience, San Jose, CA, USA                   |
| Biologische Sicherheitswerkbank, Herasafe KS12 | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA                |
| Blockthermostat BT100                          | Rettberg, Göttingen, Deutschland                   |
| BVC professional Flüssigkeits-Absaugsystem     | Vacuubrand GmbH, Wertheim, Deutschland             |
| C1000™ Thermal Cycler CFX96™                   | Bio-Rad, Hercules, CA, USA                         |
| Chemidoc™ XRS Imaging System                   | BioRad, Hercules, CA, USA                          |
| Eismaschine Manitowoc                          | Manitowoc Ice, Manitowoc, WI, USA                  |
| Electrophoresis Power Supply EPS 601           | Amersham Pharmacia Biotech., Uppsala, Schweden     |
| Filmentwickler Curix CP1000                    | Agfa Healthcare, Mortsel, Belgien                  |
| Freezing Container, 1Deg C                     | Nalgene, Rochester, NY, USA                        |
| Grammwaage Typ 2254                            | Sartorius, Göttingen, Deutschland                  |
| Inkubationsschüttler                           | Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland         |
| Intellimixer RM-2L                             | Elmi Ltd. Laboratory Equipment, Calabasas, CA, USA |
| Magnetrührer                                   | Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland       |
| Mikropipetten Pipetman®                        | Gilson Inc., Middleton, WI, USA                    |
| Mikroskop AxioVert.135                         | Zeiss, Oberkochen, Deutschland                     |
| Mikroskop AxioVert.A1                          | Zeiss, Oberkochen, Deutschland                     |
| Mikroskop-Kamera AxioCam ERc5s                 | Zeiss, Oberkochen, Deutschland                     |
| Mikrozentrifuge 5430R                          | Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland               |
| Mini Protean System                            | BioRad, Hercules, CA, USA                          |
| Mini Trans-blot cell transfer system           | BioRad, Hercules, CA, USA                          |
| Mini-Protean Tetra Cell gel system             | BioRad, Hercules, CA, USA                          |
| Minishaker IKA® MS2                            | IKA Works Inc., Staufen, Deutschland               |
| Multilable plate reader VICTOR X3              | Perkin Elmer, Waltham, MA, USA                     |
| Nanowaage AT250                                | Mettler Toledo, Gießen, Deutschland                |
| Neubauerzählkammer                             | LO Laboroptik, Lancing, England                    |
| PCR-Gerät iCycler                              | BioRad, Hercules, CA, USA                          |
| PerfectBlue Gelsystem Mini M                   | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland  |
| pH Meter 691                                   | Metrohm, Filderstadt, Deutschland                  |
| PowerPac HC                                    | BioRad, Hercules, CA, USA                          |
| Spectrophotometer Nanodrop 2000c               | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA                |
| Transmissionselektronenmikroskop Philips CM100 | Philips, Amsterdam, Niederlande                    |
| Ultrazentrifuge Optima™ LE-80K                 | Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA                |
| VMax® Kinetic Microplate Reader                | Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA              |
| Vortex-Genie® 2                                | Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA       |
| Wasseraufbereitungssystem Purelab              | ELGA LabWater, Celle, Deutschland                  |
| Wasserbad W350                                 | Memmert, Schwabach, Deutschland                    |
| Zellkultur Inkubator HERA Cell240              | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA                |

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| Zellkultur Inkubator HERA Cell240i | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA               |
| Zentrifuge 5180R                   | Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland              |
| Zentrifuge MIKRO 22R               | Hettich, Tuttlingen, Deutschland                  |
| Zentrifuge QikSpin QS7000          | Edwards Instruments Co., Narellan NSW, Australien |
| Zentrifuge ROTINA 35R              | Hettich, Tuttlingen, Deutschland                  |
| Zetasizer® Nano ZS                 | Malvern, Worcestershire, England                  |

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

*Tabelle 2. 2: Verbrauchsmaterialien*

| <b>Material</b>                                    | <b>Beschreibung, Hersteller</b>           |
|--|---|
| Bioshere® FilterTips                               | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland          |
| Eppendorf Reaktionsgefäße 0,5ml, 1,5mL, 2mL        | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland          |
| Hard-Shell® PCR Plates 96-well                     | BioRad, Hercules, CA, USA                 |
| Kryoröhrchen 1,8ml Nunc                            | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA       |
| Mikroskop Deckgläser                               | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA       |
| Mikroskop Objektträger                             | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA       |
| PCR Sealers Microseal `B` Film                     | BioRad, Hercules, CA, USA                 |
| PCR SoftTubes 0,5mL                                | Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland |
| PD-10 Desalting Columns, Sephadex                  | GE-Healthcare, Buckinghamshire, England   |
| Pipettenspitzen 10µL, 20µL, 200µL, 1000µL          | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland          |
| Polystyrol Röhrchen, konischer Boden               | Elkay, Hampshire, England                 |
| PVDF-Membran Hybond                                | GE-Healthcare, Buckinghamshire, England   |
| Röntgenfilm CEA RP New                             | Agfa Healthcare, Mortsel, Belgien         |
| S-Monovette Blutentnahmesystem                     | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland          |
| SafetyMultifly-Kanülen                             | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland          |
| Serologische Pipetten 5mL, 10mL, 25mL              | Greiner, Kremsmünster, Österreich         |
| Sterilfilter Nalgene® 0,25µm, 0,45µm               | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA       |
| Ultrazentrifugenröhrchen Ultra-Clear™ 25x89mm      | Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA       |
| Zellkulturplatten 6-, 12-, 24-, 96-Well; 10-, 15cm | Greiner, Kremsmünster, Österreich         |
| Zellkulturschalen Falcon® ø10cm, ø15cm             | Corning, Corning, NY, USA                 |
| Zellspatel Cell Lifter                             | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA         |
| Zentrifugenröhrchen, Falcon® 15ml, 50ml            | Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland  |

## 2.3 Chemikalien

*Tabelle 2. 3: Chemikalien*

| <b>Chemikalie</b>                               | <b>Hersteller</b>                       |
|---|---|
| Acrylamid Rotiphorese Gel30                     | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland       |
| Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent | GE-Healthcare, Buckinghamshire, England |
| Ammonium Persulfat (APS)                        | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA       |
| Borsäure  | Merck, Darmstadt, Deutschland           |
| Bovines Serumalbumin (BSA)                      | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA       |

|  |   |
|--|---|
| Caesiumchlorid (CsCl)                                  | MP Biomedicals Europe, Illkirch, Frankreich                         |
| Chloroform   | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA                                   |
| Complete Mini – Protease Inhibitor                     | Roche, Basel, Schweiz   |
| DAB+ Substrat Lösung                                   | Dako, Hamburg, Deutschland  |
| DAKO REAL Antibody diluent                             | Dako, Hamburg, Deutschland  |
| Diethyl pyrocarbonat (DEPC)                            | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA                                   |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                                | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA                                   |
| Dithiothreitol (DTT)                                   | Cell-Signaling, Cambridge, England                                  |
| DNA Ladepuffer (6x)                                    | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA                                 |
| DNA Leiter 100bp                                       | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA                                 |
| Doxorubicin  | Krankenhausapotheke, Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland |
| Entwickler- und Fixierkonzentrat Vision X GV 60        | Röntgen Bender GmbH & Co. KG, Baden-Baden, Deutschland              |
| Essigsäure   | Merck, Darmstadt, Deutschland                                       |
| Ethanol 70%  | BrüggemannAlcohol Heilbronn GmbH, Heilbronn, Deutschland            |
| Ethanol absolut  | Merck, Darmstadt, Deutschland                                       |
| Ethidumbromid 10mg/mL                                  | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA                                   |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)                    | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA                                   |
| Formaldehydlösung (36,5 – 38%)                         | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA                                   |
| Glycerin   | Merck, Darmstadt, Deutschland                                       |
| GoTaq Green PCR Master Mix                             | Promega, Madison, WI, USA   |
| GoTaq qPCR Master Mix                                  | Promega, Madison, WI, USA   |
| High Range RNA Leiter                                  | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA                                 |
| Incidin Plus   | Ecolab Engineering GmbH, Siegsdorf, Deutschland                     |
| Isopropanol  | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA                                   |
| Lipofectamine  | Invitrogen, Carlsbad, CA, USA                                       |
| Lipopolisaccharides from Escherichia coli 055:B5 (LPS) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA                                   |
| Luminol  | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA                                   |
| Lysepuffer (pH 9)                                      | Biochrom, Merck Millipore, Berlin, Deutschland                      |
| Magermilchpulver                                       | Saliter, Obergünzburg, Deutschland                                  |
| Methanol Chromosolv®                                   | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA                                   |
| Natriumacetat  | Merck, Darmstadt, Deutschland                                       |
| Natriumchlorid   | Merck, Darmstadt, Deutschland                                       |
| p-Cumarsäure   | Biochrom, Merck Millipore, Berlin, Deutschland                      |
| Phosphate-Buffered Saline (PBS)                        | Biochrom, Merck Millipore, Berlin, Deutschland                      |
| Precision Plus Protein Standard                        | Bio-Rad, Hercules, CA, USA  |
| ProLong® Gold Antifade Mountant mit DAPI               | Life Technologies, Carlsbad, CA, USA                                |
| Rekombinantes GM-CSF                                   | R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA                             |
| Rekombinantes Interleukin 2 (rhIL-2)                   | R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA                             |
| Rekombinantes Interleukin 4 (rhIL-4)                   | R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA                             |
| Salzsäure, rauchend 37% (HCl)                          | Merck, Darmstadt, Deutschland                                       |
| Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)                           | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA                                   |
| Sulforhodamine B (SRB)                                 | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA                                   |
| SYBR® Green I Mastermix                                | Eurogentec, Liege, Belgien  |
| Tetramethylethylenediamine (TEMED)                     | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                                   |
| Trichloressigsäure (TCA)                               | Merck, Darmstadt, Deutschland                                       |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan                        | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA                                   |
| Triton X100  | Invitrogen, Carlsbad, CA, USA                                       |
| Trizol   | Biochrom, Merck Millipore, Berlin, Deutschland                      |

|   |   |
|---|---|
| Tryptone  | ICI Specialty Chemicals, London, England            |
| Tween-20  | Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| UltraPure™ Agarose                                  | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA                   |
| Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | Merck, Darmstadt, Deutschland                       |

## 2.4 Selbsthergestellte Lösungen und Puffer

*Tabelle 2. 4: Selbsthergestellte Lösungen*

| <b>Lösung</b>                      | <b>Enthält</b>   |
|------------------------------------|--|
| FACS-Puffer                        | 1% BSA in PBS  |
| IF: Blocking-Puffer                | 5% FCS in PBS<br>0,1% Triton X-100   |
| TBE 10x                            | 1 M Tris<br>1 M Borsäure<br>0,02 M EDTA  |
| Virus Storage Puffer               | Lysepuffer (pH 9) mit 2% Glycerin  |
| WB: Blotting Puffer 10x            | 25 nM Tris<br>192 mM Glycin  |
| WB: Blottingpuffer gebrauchsfertig | 10% Blotting-Puffer x10<br>20% Methanol  |
| WB: Chemilumineszenz (ECL) A       | 0,1 M Tris 1M; pH 8,5<br>2,5 mM Luminol<br>0,4% p-Cumarsäure                       |
| WB: Chemilumineszenz (ECL) B       | 0,1 M Tris 1M; pH 8,5<br>0,18% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                       |
| WB: Gelladepuffer 4x               | 0,25 M Tris; pH6,8<br>8% SDS<br>40% Glycerin<br>0,04% Bromphenolblau               |
| WB: Lysepuffer                     | 150 mM NaCl<br>50 mM Tris/HCl; pH 7,2<br>1% Triton X-100<br>0,05% SDS<br>5 mM EDTA |
| WB: Lysepuffer 10x                 | 1,5 M NaCl<br>0,5 M Tris/HCl; pH 7,2<br>10% Triton X-100<br>0,5% SDS<br>50 mM EDTA |
| WB: Sammelgel Puffer               | 0,5 M Tris-HCl; pH 6,8   |
| WB: TBS 10x                        | 1 M Tris-HCl; pH 7,6   |
| WB: TBS-T                          | 1x TBS<br>0,001% TWEEN 20  |
| WB: Trenngel Puffer                | 1,5 M Tris-HCl; pH 8,8   |
| Zelleinfriermedium                 | 40% FBS<br>50% RPMI oder DMEM<br>10% DMSO  |

## 2.5 Kits

Tabelle 2. 5: Kits

| <b>Kit</b>                                   | <b>Hersteller</b>                          |
|--|--|
| DNeasy-Blood & Tissue Kit                    | Qiagen, Venlo, Niederlande                 |
| ExoQuick-TC Exosome precipitation Solution   | System Biosciences, Mountain View, CA, USA |
| High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA   |
| HMGB-1-ELISA Kit                             | IBL International, Hamburg, Deutschland    |
| HSP70-ELISA Kit                              | Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland   |
| LEGEND MAX Human IFN-gamma ELISA Kit         | BioLegend, San Diego, CA, USA              |
| Pierce BCA-Protein Assay Kit                 | Thermo Scientific, Waltham, MA, USA        |
| SV Total RNA Isolation System                | Promega, Madison, WI, USA                  |

## 2.6 Zellkulturmedien und Zusätze

Tabelle 2. 6: Zellkulturmedien und Zusätze

| <b>Material</b>                                       | <b>Hersteller</b>                              |
|---|--|
| Dulbeccos' MEM (DMEM)                                 | Biochrom, Merck Millipore, Berlin, Deutschland |
| Fetales Bovines Serum (FBS)                           | Biochrom, Merck Millipore, Berlin, Deutschland |
| Ficoll  | Biochrom, Merck Millipore, Berlin, Deutschland |
| Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)                  | Biochrom, Merck Millipore, Berlin, Deutschland |
| OptiMem Medium  | Life Technologies, Carlsbad, CA, USA           |
| PBS-Dulbecco 1x                                       | Biochrom, Merck Millipore, Berlin, Deutschland |
| Penicillin/Streptomycin<br>10.000 U/ml / 10.000 µg/ml | Biochrom, Merck Millipore, Berlin, Deutschland |
| Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI<br>1640) | Biochrom, Merck Millipore, Berlin, Deutschland |
| Trypan Blau   | Biochrom, Merck Millipore, Berlin, Deutschland |
| Trypsin   | Biochrom, Merck Millipore, Berlin, Deutschland |
| Türks Lösung  | Merck, Darmstadt, Deutschland                  |

Zur Kultivierung der Zellen wurde zu DMEM 10% Fetales Bovines Serum (FBS) und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) und zu RPMI zusätzlich 1% nicht-essentielle Aminosäuren (100x) hinzugegeben. Im Folgenden werden diese, mit FBS und Penicillin/Streptomycin komplettierten Medien als „Zellkulturmedium“ bezeichnet.

## 2.7 PCR-Primer

Alle Primer wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) oder von Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) erworben. Nach dem Lösen in Nuklease freiem Wasser wurden 10mM Stammlösungen hergestellt.

Tabelle 2. 7: Primer

| Zielgen         | Sequenz Vorwärts-Primer (5'→3') | Sequenz Rückwärts-Primer (5'→3') |
|-----------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Beta-Aktin (rt) | TAAGTAGGTGCACAGTAGGTCTGA        | AAAGTCCAAXAACACGGCTAAG           |
| E1A             | AATGGCCGCCAGTCTTTT              | GCCATGCAAGTTAAACATTATC           |
| E1B19K          | GGGCTAATCTTGTTACATCTG           | ATTCATTCCCGAGGGTCCAG             |
| E3-ADP          | ATGTCAGCATCTGACTTTGGCC          | CTCGAGGAATCATGTCTC               |
| GAPDH (rt)      | TGGCATGGACTGTGGTCATGAG          | ACTGGCGTCTTCACCACCATGG           |
| Hexon (rt)      | GGCCATTACCTTTGACTCTTC           | GCATTTGTACCAGGAACCAGTC           |
| HSP70 (rt)      | ACATCAGCCAGAACAAGCGA            | AGTCGATGCCCTCAAACAGG             |

## 2.8 Antikörper

Tabelle 2. 8: Antikörper

| Antikörper gegen                                  | Verwendung      | Aus (Tier) | Verdünnung              | Hersteller                                      |
|---|-----------------|------------|-------------------------|---|
| Anti-Goat HRP                                     | Titer Test      | Kaninchen  | 1:1000                  | Dako, Hamburg, Deutschland                      |
| Anti-Mouse HRP                                    | WB              | Esel       | 1:10000                 | Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland              |
| Anti-Mouse PE                                     | FACS            | Ziege      | 1:50                    | Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland              |
| Anti-Rabbit FITC                                  | IF              | Schwein    | 1:100                   | Dako, Hamburg, Deutschland                      |
| Anti-Rabbit HRP                                   | WB              | Esel       | 1:10000                 | Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland              |
| Calnexin  | WB              | Kaninchen  | 1:1000                  | Cell Signaling, Beverly, MA, USA                |
| CAR, Klon RmcB                                    | FACS            | Maus       | 1:40                    | Millipore, Temecula, CA, USA                    |
| CD63  | WB              | Kaninchen  | 1:200                   | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, MA, USA |
| GAPDH   | WB              | Kaninchen  | 1:1000                  | Cell Signaling, Beverly, MA, USA                |
| Hexon   | Titer Test      | Ziege      | 1:500                   | Chemicon, Millipore, Temecula, CA, USA          |
| HSP70   | WB              | Maus       | 1:1000                  | Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland        |
| IgG aus Maus (polyklonal)                         | FACS            | Maus       | Wie primärer Antikörper | Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland              |
| IgG aus Ratte (polyklonal)                        | FACS, IF        | Ratte      | Wie primärer Antikörper | Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland              |
| IgG1 K Isotype Control, Functional Grade Purified | Funktions-assay | Maus       | 10 µg/ml                | eBioscience, San Diego, CA, USA                 |
| IgG1 K Isotype Control PE                         | FACS            | Maus       | 1:20                    | eBioscience, San Diego, CA, USA                 |
| PD-L1 PE  | FACS            | Maus       | 1:20                    | eBioscience, San Diego, CA, USA                 |



|   |                     |           |                 |                                    |
|---|---------------------|-----------|-----------------|------------------------------------|
| PD-L1, Klon MIH1,<br>Functional grade<br>purified | Funktions-<br>assay | Maus      | 10 µg/ml        | eBioscience, San Diego, CA,<br>USA |
| YB-1 (N-terminal)                                 | WB<br>IF            | Kaninchen | 1:1000<br>1:100 | Eurogentec, Liège, Belgien         |

## 2.9 Zelllinien

HEK293: HEK293-Zellen sind humane, embryonale Nierenzellen („Human Embryonal Kidney“), die zur Adenovirusproduktion verwendet werden. Das Genom der HEK293-Zellen enthält 11% des linken Endes des Adenovirus 5-Genoms (Graham et al., 1977). Dies ermöglicht die Produktion aller – inklusive der replikationsdefizienten, E1A-deletierten – Adenoviren.

Für die Versuche wurden die humanen Harnblasenkarzinomzelllinien J82, T24 und UM-UC 3 verwendet. Tabelle 2. 9 beschreibt die klinischen Eigenschaften und die Kulturbedingungen der Zelllinien.

*Tabelle 2. 9: Verwendete Zelllinien*

| Zelllinie | Klinik   | Medium                               | Kulturbedingungen         | ATCC-Name |
|-----------|--|--------------------------------------|---------------------------|-----------|
| HEK293    | Embryonale Nierenzellen<br>Alter: Fetus  | DMEM; 10% FBS;<br>1% P/S             | 37°C, 10% CO <sub>2</sub> | CRL-1573  |
| J82       | Urothelkarzinom<br>Alter: 58 Jahre<br>Geschlecht: Männlich<br>Ethnizität: Kaukasischer Typ | RPMI1640; 10% FBS;<br>1% NEA; 1% P/S | 37°C, 5% CO <sub>2</sub>  | HTB-1     |
| T24       | Urothelkarzinom<br>Alter: 81 Jahre<br>Geschlecht: Weiblich<br>Ethnizität: Kaukasischer Typ | RPMI1640; 10% FBS;<br>1% NEA; 1% P/S | 37°C, 5% CO <sub>2</sub>  | HTB-4     |
| UM-UC 3   | Urothelkarzinom<br>Geschlecht: Männlich  | DMEM; 10% FBS;<br>1% P/S             | 37°C, 10% CO <sub>2</sub> | CRL-1749  |

## 2.10 Viren

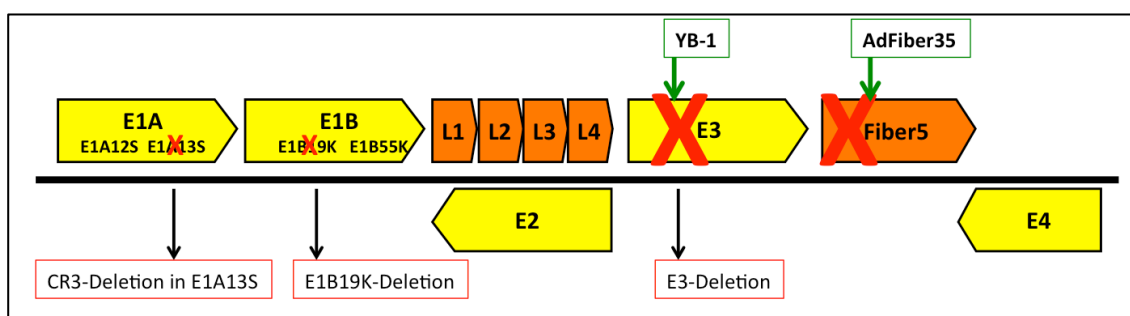
Das Wildtyp Adenovirus (AdWT) ist ein humanes Serotyp 5 Adenovirus der Spezies C. Es handelt sich um ein replikationskompetentes Virus ohne genetische Alterationen. Daher dient es in vielen Versuchen als Positivkontrolle und zum Vergleich. Das AdWT

ist gut charakterisiert und alle weiteren in dieser Arbeit verwendeten Viruskonstrukte leiten sich vom AdWT ab.

Ad-dl703 ist ein Virus, welches auf Grund einer E1-Deletion in niedrigen bis mittleren Dosen replikationsdefizient ist (Bett et al., 1994). Es dient in vielen Versuchen als Negativkontrolle.

Ad-Delo3-RGD, auch XVir-N-31 genannt, wurde von PD Dr. Per Sonne Holm konstruiert und von Klaus Mantwill hergestellt. Es weist eine Deletion der CR3-Domäne des adenoviralen E1A13S-Proteins auf. Dies führt dazu, dass nur noch das 12S-Protein exprimiert wird und die Replikation nur stattfinden kann, wenn sich YB-1 im Zellkern befindet (Holm et al., 2004; Rognoni et al., 2009). Außerdem weist XVir-N-31 eine Deletion im E1B19K-Gen auf, sodass dieses nicht mehr exprimiert wird. Ebenso ist die E3-Region deletiert. Das Virus hat ein RGD-Motiv in der Fiberregion, um Zellen CAR-unabhängig infizieren zu können (Dmitriev et al., 1998) (vgl. Abb. 1. 7).

Ad-Delo3-YB1/Fib35 ist eine Abwandlung von XVir-N-31. Ad-Delo3-YB1/Fib35 wird in dieser Arbeit als AdDeloYB1 bezeichnet. In der deletierten E3-Region enthält dieses Virus YB-1 als Transgen. Im Gegensatz zu XVir-N-31 ist die E3-Region jedoch nicht komplett entfernt, sodass E3-ADP weiterhin exprimiert wird (Mantwill, 2017). Darüberhinaus sind Teile des Fiber5-Gens inklusive des RGD-Motivs entfernt und durch AdFiber35 ersetzt. AdDeloYB1 infiziert Tumorzellen mit Fiber35 über den CD46-Rezeptor (Gaggar et al., 2003) und ermöglicht so eine effektive CAR-unabhängige Infektion von Tumorzellen (R. C. Holzmüller, 2011; Zhao et al., 2011).



**Abbildung 2. 1: Schematische Genomkarte von Ad-Delo3-YB1/Fib35**

Das Virus hat die gleichen Deletionen in E1A und E1B wie XVir-N-31. Es enthält YB-1 als Transgen in der E3-Region und die AdFiber35-Sequenz.

*Tabelle 2. 10: Angenommene Titer der verwendeten Viren*

| <b>Virus</b> | <b>Titer (IFU/ml)</b> | <b>Partikel (Viruspartikel/ml)</b> |
|--------------|-----------------------|------------------------------------|
| Ad-dl703     | $6,5 \times 10^{10}$  | $1,8 \times 10^{12}$               |
| AdDeloYB1    | $1,6 \times 10^9$     | Nicht bekannt                      |
| AdWT         | $7,8 \times 10^{10}$  | $1,9 \times 10^{12}$               |
| XVir-N-31    | $2,5 \times 10^{10}$  | $1-2 \times 10^{12}$               |

## 2.11 Verwendete Software

*Tabelle 2. 11: Verwendete Software*

| <b>Name</b>   | <b>Hersteller</b>                       |
|---------------|---|
| EndNote       | Thomson Reuters, New York, NY, USA      |
| FlowJo        | FlowJo LLC, Ashland, OR, USA            |
| Keynote       | Apple Inc., Cupertino, CA, USA          |
| MS Office     | Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA |
| Zen Lite 2012 | Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland     |

## 3 Methoden

### 3.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die Zelllinien wurden unter den in Tabelle 2. 9 angegebenen Bedingungen kultiviert und zweimal pro Woche passagiert. Zum Passagieren der Zellen wurde das Kulturmedium durch Aspiration entfernt und der Zellrasen ein bis zweimal mit PBS gewaschen. Die adhärennten Zellen wurden mit Trypsin für 3 - 8 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert, bis sich der Zellrasen vom Kulturschalenboden ablöste. Die enzymatische Reaktion des Trypsins wurde durch die Zugabe von Medium mit FBS gestoppt und die Zellsuspension zentrifugiert (300 g, 5 min). Das Zellpellet wurde in frisches Zellkulturmedium aufgenommen und die Zellen auf einer neuen Zellkulturschale in adäquater Verdünnung ausplattiert. Zum Einfrieren der Zellen wurde das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium aufgenommen, in ein Kryoröhrchen gefüllt, in einer Einfrierbox mit Isopropanol bei -80°C langsam heruntergekühlt und nach 24 Stunden in Flüssigstickstoff überführt. Das Auftauen kryokonservierter Zellen erfolgte bei 37°C im Wasserbad. Die aufgetauten Zellen wurden sofort in neues Zellkulturmedium überführt und herunterzentrifugiert, um das toxische DMSO zu entfernen. Das Zellpellet wurde in frisches Zellkulturmedium aufgenommen, ausplattiert und wie oben beschrieben kultiviert.

Zum Ausplattieren der Zellen für die Versuche wurden die Zellen wie oben beschrieben geerntet. Die Zellen wurden 1:2 in Trypanblau verdünnt und mit der Neubauer-Zellzählkammer gezählt. Die Zellzahl/ml ergibt sich durch die Berechnung: *Durchschnitt der lebenden Zellen im Großquadrat  $\times 10^4 \times$  Verdünnungsfaktor.*

### 3.2 Virusinfektion

Alle Experimente in denen Viren involviert waren, wurden nach dem Gentechnikgesetz unter der biologischen Sicherheitsstufe „S2“ durchgeführt.

Die zu infizierenden Zellen wurden einen Tag vor der Virusinfektion in entsprechender Zellzahl auf Zellkulturschalen ausplattiert. Zur Zeit der Virusinfektion sollten die Zellen eine Konfluenz von 60 - 70% aufweisen. Für die Infektion wurde das Zellkulturmedium entfernt und durch eine dünne Schicht (12-Well-Platte: 200  $\mu$ l; 6-Well-Platte: 400  $\mu$ l, 10 cm-Platte: 2 ml) OptiMEM (ohne FCS) ersetzt. Die Viren wurden in entsprechender Verdünnung hinzugegeben, um die angegebenen MOI (Multiplicity of infection) zu erreichen. Die MOI berechnet sich aus IFU/angenommene Zellzahl. Während der Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C im Inkubationsschrank wurde die Platte alle 10 - 15 min vorsichtig geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung der Viren zu gewährleisten. Bei den uninfizierten Kontrollen wurden die Zellen ebenfalls eine Stunde mit OptiMEM ohne Virus inkubiert. Nach der Inkubationszeit von einer Stunde wurde das Infektionsmedium durch frisches Zellkulturmedium ersetzt und die Zellen weiter im Brutschrank inkubiert.

### 3.3 Virusvermehrung

Die Virusvermehrung wurde in HEK293 Zellen auf 10 - 20 Platten mit einem Durchmesser von 15 cm durchgeführt. Diese wurden bei einer Konfluenz von 80 - 90% mit insgesamt 3 ml des entsprechenden Virus in DMEM mit 2% FCS infiziert und wie bei 3.2 beschrieben für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden 7 ml Zellkulturmedium dazugegeben und die Zellen im Inkubator kultiviert. Nach 48 Stunden ließen sich die infizierten Zellen durch Schütteln von den Zellkulturplatten lösen, wurden geerntet und in 50 ml Falconröhrchen zusammengeführt. Die Zellen, welche die Viren enthalten, wurden bei 3000 rpm für 15 min herunterzentrifugiert und in insgesamt 10 - 20 ml Lysepuffer mit pH 9 aufgenommen. Um die gebildeten Viren aus den Zellen freizusetzen wurden die Zellen durch dreimaliges Einfrieren auf Trockeneis und Auftauen bei 37°C im Wasserbad (thaw/freeze) zerstört. Die Zelltrümmer wurden bei 3000 rpm für 15 min herunterzentrifugiert und der die Viren enthaltende Überstand abgenommen und entweder bei -80°C eingefroren oder direkt der Caesiumchlorid-Aufreinigung zugeführt. Die CsCl-Reinigung wurde freundlicherweise von PD Dr. Per Sonne Holm durchgeführt. Hierfür wurde zunächst 17 ml des leichteren CsCl 1,33 in ein Ultrazentrifugationsröhrchen gefüllt und diese mit 9 ml des schwereren CsCl 1,45 vorsichtig unterschichtet. Dann wurde das Viruslysat

vorsichtig hinzugegeben. Es folgte die Zentrifugation bei 30000 rpm für 3 - 5 Stunden. Die in einer trüben Bande zwischen den beiden Schichten enthaltenen Viren sollten nun frei von etwaigen Zellbruchstücken oder unvollständigen Viruspartikeln sein. Das Ultrazentrifugationsröhrchen wurde dann mit einer 20G Kanüle angestochen und die Bande abgezogen. In einem zweiten Aufreinigungsschritt wurde diese Lösung nochmals auf einen CsCl-Gradienten in Ultrazentrifugationsröhrchen aufgetragen und bei 25000 rpm über Nacht zentrifugiert. Am nächsten Tag wurde die Bande abgezogen. Anschließend wurde die Viruslösung von dem Schwermetallsalz CsCl gereinigt: Die PD-10-Entsalzungssäule wurde zunächst mit Storage Puffer äquilibriert, dann wurde die Viruslösung aufgetragen und die Viren am Ende in Storage Puffer eluiert.

## 3.4 Proteinisolation und Western Blot

### 3.4.1 Proteinisolation aus Zellen

Die Proteinisolation erfolgte auf Eis. Das Zellkulturmedium wurde entfernt und die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen. 500 µl Zellysepuffer mit Proteaseinhibitor (eine Tablette/10 ml Zellysepuffer) wurde auf die 10 cm Zellkulturschalen pipettiert. Die Zellen wurden mit Zellschabern geerntet und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Lysate wurden bei 30000 g für 30 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lysate wurden sofort weiterverwendet oder bei -80°C eingefroren.

### 3.4.2 Proteinisolation aus dem Zellkulturüberstand

Zur Isolation der Proteine aus dem Zellkulturüberstand wurden die Zellen nach der Virusinfektion unter serumfreien Bedingungen kultiviert. Hierfür waren die Zellen zuvor langsam an eine Kultivierung mit 2% FCS im Zellkulturmedium adaptiert worden. Nach der Virusinfektion wurde das Zellkulturmedium durch serumfreies RPMI oder DMEM ersetzt, was die Zellen für die Zeit der Behandlung gut tolerierten.

Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen und in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und bei 500 g für 5 min zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde in neue

Reaktionsgefäße überführt. Zu 1 ml Zellkulturüberstand wurden 110 µl 100% TCA hinzugegeben (Endkonzentration 10% TCA) und die Proteine über Nacht bei 4°C gefällt. Der Ansatz wurde bei 20000 g für 30 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Das Pellet wurde zweimal mit eiskaltem 70%igen Ethanol gewaschen und 5 - 10 min mit der Vakuumpumpe getrocknet. Schließlich wurden die Proteine in Zellysepuffer aufgenommen und sofort weiterverarbeitet oder bei -80°C eingefroren.

### 3.4.3 Proteinmessung und Proteinverarbeitung

Die Quantifizierung von Proteinen erfolgte mittels BCA-Assay nach Herstellerangaben in 96-Well-Platten. Alle Proben sowie eine BSA-Standard Verdünnungsreihe wurden als Duplikate pipettiert und zusammen mit den Arbeitslösungen für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 562 nm gemessen und die Proteinmenge durch den Vergleich zum BSA-Standard bestimmt. Die Proteinlysate wurden mit Zellysepuffer auf die gleiche Proteinmenge angepasst und der 4-fach Proteinladepuffer mit DTT wurde hinzugegeben. Die Proben wurden bei 95°C für 5 min denaturiert und anschließend auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen oder bei -20°C eingefroren.

### 3.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gele wurden in Gelgießkammern gegossen. Die Inhaltsstoffe der Polyacrylamid-Trenngele sind in Tabelle 3. 1 und die der Sammelgele in Tabelle 3. 2 angegeben. Nach kompletter Polymerisation beider Gele wurden sie in die Elektrophorese-Einheit eingespannt und die Geltaschen mit 5 - 10 µl einer Proteinstandard-Leiter sowie 10 - 30 µg Protein aus den Lysaten in 40 µl Ladepuffer beladen. Die Elektrophorese lief mit 90 V bis die Proteinproben das Trenngel erreichten und wurde dann mit 150 V fortgesetzt.

*Tabelle 3. 1: Inhalt eines 12%igen Polyacrylamid-Trenngels*

| Inhalt                            | Volumen (ml) |
|-----------------------------------|--------------|
| H <sub>2</sub> O                  | 3,45         |
| 1,5M Tris; pH 8,8                 | 2,5          |
| 30% Acrylamid-/Bisacrylamidlösung | 4            |
| 10% APS                           | 0,05         |
| TEMED                             | 0,01         |

*Tabelle 3. 2: Inhalt eines Polyacrylamid-Sammelgels*

| Inhalt                            | Volumen (ml) |
|-----------------------------------|--------------|
| H <sub>2</sub> O                  | 3,07         |
| 0,5M Tris; pH 6,8                 | 1,25         |
| 30% Acrylamid-/Bisacrylamidlösung | 0,65         |
| 10% APS                           | 0,025        |
| TEMED                             | 0,005        |

### 3.4.5 Western Blot und Proteindetektion

Im Anschluss an die Elektrophorese erfolgte der Proteintransfer auf eine PVDF-Membran. Die Membran wurde für ca. 5 min in Methanol aktiviert und die Blotting-Einheit wurde in Blotting-Puffer folgendermaßen zusammengesetzt: Schwamm – Filterpapier – SDS-Gel – PVDF-Membran – Filterpapier – Schwamm. Die Blotting-Einheit wurde in dem mit kaltem Blotting-Puffer gefüllten Tank-Blot-System eingespannt und der Proteintransfer für 1 - 2 Stunden mit 100 V durchgeführt. Nach dem Transfer wurden die Membranen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 5% Magermilchpulver in TBS-T geblockt. Für die Detektion mit dem YB-1-Antikörper (Eurogentec) erfolgte das Blockieren für eine Stunde mit 5% BSA in TBS-T.

Die primären Antikörper wurden in 5% BSA in TBS-T mit 0,02% Natriumazid verdünnt und über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert. Dabei war die Membran ständig in leichter Bewegung. Nach 3 - 5 Waschschritten mit TBS-T erfolgte die Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur mit den HRP-konjugierten sekundären Antikörpern, die in 5% Magermilchpulver in TBS-T verdünnt wurden. Es wurde 5 weitere Male gewaschen und die Proteine dann mittels ECL-Reaktion detektiert. Die Chemielumineszenz wurde mit Röntgenfilmen im Fotolabor detektiert und die Filme entwickelt und anschließend gescannt.



### 3.5 Bestimmung der gebildeten infektiösen Viruspartikel

Um festzustellen, wie viele infektiöse Partikel in den Zelllinien J82 und T24 gebildet wurden, wurden  $2 \times 10^5$  Zellen auf 6-Well-Patten ausplattiert und mit 10 MOI infiziert. Nach 3 Tagen wurde der Überstand mit den Zellen abgenommen und die Viren mittels thaw/freeze-Methode isoliert. Die Zelltrümmer wurden bei 3000 rpm für 15 min herunterzentrifugiert und der die Viren enthaltende Überstand abgenommen. Mit den aus J82 und T24 gewonnenen Viren wurde eine serielle 6-stufige 1:10 Verdünnungsreihe in Medium hergestellt, um einen Titer-Test auf HEK293-Zellen durchzuführen. Für den Titer Test wurden  $2,2 \times 10^5$  HEK293-Zellen auf 24-Well Platten in 500  $\mu$ l Medium ausgebracht und 50  $\mu$ l der verdünnten Viren hinzugegeben. Die Bestimmung erfolgte im Doppelansatz. Nach 48-stündiger Kultivierung im Brutschrank bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen fixiert: Das Medium wurde abgesaugt, die Zellkulturplatten unter der Sterilbank 5 min lang getrocknet, jedes Well mit 500  $\mu$ l eiskalten Methanol beschichtet und 10 min bei -20°C inkubiert. Zum Färben der Zellen wurde das Methanol abgesaugt und die fixierten Zellen mit 1% BSA in PBS gewaschen. 250  $\mu$ l des primären Hexon-Antikörpers wurde in die Wells pipettiert und die Platten für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit 1% BSA in PBS gewaschen und 250  $\mu$ l des sekundären Anti-Maus-Antikörpers in die Wells gegeben und erneut eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend mit 1% BSA in PBS gewaschen. Zur Färbung wurden 250  $\mu$ l einer DAB-Lösung (aus DAB Substrat-Puffer und 1 Tropfen/ml DAB Chromogen) in die Wells gegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Substrat wurde entfernt und die gefärbten Zellen mit PBS überschichtet. Mit der 20x-Vergrößerung wurden unter dem Mikroskop 10 Sichtfelder ausgezählt. Es wurde die Verdünnung verwendet, bei der ca. 10% der Zellen angefärbt waren. Die infektiösen Partikel berechnen sich wie folgt:

$$\frac{IFU}{ml} = \frac{\text{Durchschnittliche Anzahl von positiven Zellen/Sichtfeld} \times \text{Sichtfelder/Well}}{\text{Volumen des verdünnten Virus (ml)} \times \text{Verdünnungsfaktor}}$$

In einem anderen Ansatz wurde die Menge viraler DNA drei Tage nach Virusinfektion mittels qPCR bestimmt. Hierfür wurde die DNA aus dem Überstand mit den schwimmenden Zellen mit dem „DNeasy-Blood & Tissue Kit“ isoliert und die qPCR mit Hexon-spezifischen Primern wie unter 3.8 beschrieben durchgeführt.

### 3.6 DNA-Isolation zur Analyse der Replikationskinetik

$1 \times 10^5$  Harnblasenkarzinomzellen bzw.  $1 \times 10^6$  PBMC wurden auf 6-Well-Platten ausplattiert und nach 24 Stunden wie unter 3.2 beschrieben mit Viren infiziert (J82 und T24 mit 10 MOI; PBMC mit 20 MOI). Die Zellen wurden nach 4, 24, 48 und 72 Stunden geerntet und es wurde jeweils die DNA mit dem „DNeasy-Blood & Tissue Kit“ isoliert und bis zum Zeitpunkt der PCR bei 4°C gelagert. Die DNA-Konzentration wurde mit dem Nanodrop gemessen und in allen Proben auf die gleiche Konzentration angeglichen.

### 3.7 RNA-Isolation und cDNA-Herstellung

Die RNA-Isolation wurde mit dem „SV Total RNA Isolation System“-Kit unter Befolgung der Herstellerangaben durchgeführt. Die RNA wurde abschließend in 50 - 100 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert und bei -80°C eingefroren. Die RNA-Konzentration und Reinheit wurde mit dem Nanodrop bestimmt.

Aus der gewonnenen RNA wurde durch reverse Transkription mit dem „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ cDNA hergestellt. In einem 20 µl Ansatz wurde 1 µg RNA eingesetzt und nach Herstellerangaben vorgegangen.

### 3.8 Genexpressionsanalyse mittels qPCR

Zur Ermittlung der Replikationskinetik wurden in einem Ansatz zwischen 5 - 20 ng genomische bzw. virale DNA eingesetzt; es wurden Hexon-spezifische Primer verwendet. Zur Ermittlung der Genexpression von HSP70 wurden 50 ng cDNA eingesetzt. Für die quantitativen Echtzeit PCR wurden 10 µl Ansätze mit 5 µl SYBR Green Mastermix, 1 µl Vorwärts-Primer 10 µM, 1 µl Rückwärts-Primer 10 µM und 3 µl DNA-Probe in Duplikaten oder Triplikaten auf 96-Well PCR-Platten hergestellt. Die Reaktion wurde mit dem CFX 96 Real-Time-PCR-Gerät unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 95°C für 2 min und 45 Zyklen 94°C für 15 s, 60°C für 15 s, 72°C für 15 s. Abschließend wurde für jede qPCR eine Schmelzkurve erstellt. Die virale Replikation wurde mit Hexon-spezifischen Primern gemessen. Die relative Replikations- bzw.

Genexpressionsrate wurde nach der  $\Delta\Delta CT$ -Methode (Livak et al., 2001) berechnet. Hierbei werden die CT-Werte der Probe gegen das humane, zelluläre  $\beta$ -Aktin-Gen oder das GAPDH-Gen normalisiert. Nach dieser Methode ist

$$\Delta CT = CT(\text{Probe}) - CT(\beta\text{-Aktin-Gen oder GAPDH})$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{Probe}) - \Delta CT(\text{Kontrolle})$$

$$\text{Relative Genexpression} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Um aktive Infektions- und Replikationswerte zu erhalten wurde ein Hexon-Standard mit bekannter Konzentration bei der qPCR mit amplifiziert, analysiert und die Werte der Proben auf den Standard bezogen.

### 3.9 Immunofluoreszenz

Runde Deckgläser wurden in 24-Well-Platten ausgelegt und für 5 min mit 70%igen Ethanol gewaschen. Der Rest des Ethanols verdampfte unter der Sterilbank und die Wells wurden dreimal mit sterilem PBS gewaschen. Zellen wurden in 400  $\mu$ l Zellkulturmedium ausplattiert und entsprechend behandelt. Zur Fixierung der Zellen wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit eiskaltem Methanol für 15 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  fixiert. Nach 5-maligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit IF-Blocking-Puffer für 40 min geblockt und permeabilisiert. Die Deckgläser wurden dreimal mit PBS gewaschen und auf Parafilm mit dem primären Antikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Antikörper wurden in „DAKO REAL Antibody diluent“ verdünnt. Es wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen und die Deckgläser für 45 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde ein Tropfen „ProLong Gold Antifade Mountant mit DAPI“ auf einen Objektträger gegeben und die Deckgläser mit der Zellseite nach unten langsam daraufgelegt. Die Proben wurden sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert oder bei  $4^{\circ}\text{C}$  in Dunkelheit gelagert.

### 3.10 Durchflusszytometrie

Auf 6-Well-Platten wurden  $1 \times 10^5$  Zellen ausplattiert. Zur Ernte der Zellen 48 Stunden später wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und die Zellen mit Zellschabern geerntet, in FACS-Puffer (1% BSA in PBS) aufgenommen und in einem FACS-Röhrchen bei 500 g für 5 min bei 4°C pelletiert. Die primären Antikörper wurden in FACS-Puffer verdünnt (vergleiche Tabelle 2. 8) und die Zellen in 100 µl Antikörperlösung für 30 min bei 4°C im Dunklen inkubiert. Sofern der primäre Antikörper nicht direkt FITC- oder PE-konjugiert war, wurden die Zellen zweimal in FACS-Puffer gewaschen und für 30 min bei 4°C lichtgeschützt mit einem sekundären Antikörper inkubiert und anschließend zweimal gewaschen. Die markierten Zellen wurden in 100 µl 1 - 2% Paraformaldehyd für 20 min bei 4°C fixiert, anschließend in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen und bis zur Analyse bei 4°C lichtgeschützt gelagert. Mit dem „FACSCalibur“-Durchflusszytometer wurden 10000 Ereignisse gezählt und die Daten mit der Software „FlowJo“ ausgewertet.

### 3.11 SRB-Zytotoxizitätsassay

Es wurde die Zytotoxizität von Doxorubicin auf die Harnblasenkarzinomzellen bestimmt, um für die Versuche mit der Kombinationsbehandlung eine angemessene Dosis zu verwenden. Außerdem wurde die Zytotoxizität der Viren auf die verschiedenen Zelllinien bestimmt.  $5 \times 10^4$  Zellen wurde auf 12-Well-Platten ausplattiert und 24 Stunden später mit verschiedenen Konzentrationen von Doxorubicin behandelt bzw. wie unter 3.2 beschrieben mit Viren infiziert. Nach drei Behandlungstagen mit Doxorubicin bzw. nach vier Tagen Virusbehandlung wurde das Zellkulturmedium entfernt, die noch adhärenen Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit 500 µl 10%iger kalter TCA über Nacht bei 4°C fixiert. Nach 5-maligem Waschen mit Leitungswasser wurden die Zellen mit 0,5% SRB (Sulforhodamine B) in 1% Essigsäure für 30 min bei Raumtemperatur gefärbt. Der ungebundene Farbstoff wurde durch 4-maliges Waschen mit 1% Essigsäure entfernt und die gefärbten Zellen für mindestens zwei Stunden zum Trocknen ausgelegt, um die Platten zu scannen. Zur quantitativen Auswertung wurde der Farbstoff mit 10 mM Tris-base gelöst und die Extinktion bei 590 nm (Multilable plate reader VICTOR X3) gemessen.

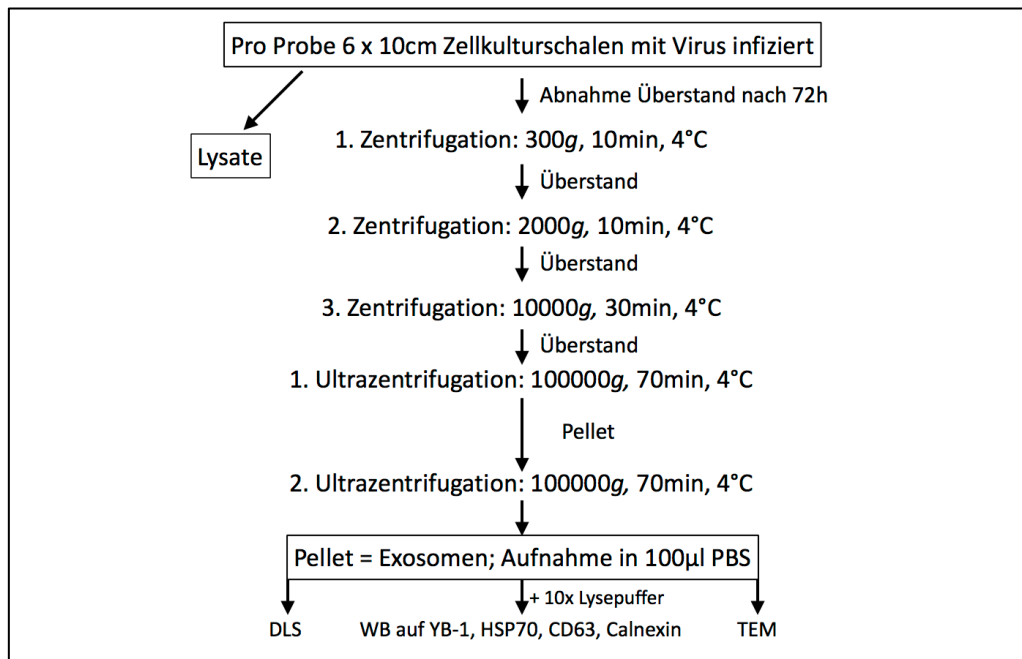
## 3.12 ELISA

Sämtliche ELISA wurden mit den Materialien der Kits nach Herstellerangaben durchgeführt und mit dem VMax Kinetic ELISA Microplate Reader ausgewertet. Proben für die IFN $\gamma$ -ELISA wurden 1:5 - 1:10 verdünnt.

## 3.13 Isolation und Analyse von Exosomen

### 3.13.1 Exosomenisolation mittels Ultrazentrifugation

Um ausreichend Exosomen isolieren zu können, wurden pro Probe sechs 10 cm-Zellkulturplatten mit je  $1 \times 10^6$  ausplattierten Zellen infiziert. Der Zellkulturüberstand wurde 72 Stunden nach der Virusinfektion abgenommen. Die Isolation durch Zentrifugation wurde nach einem Protokoll von They et al. durchgeführt, welches in Abbildung 3. 1 dargestellt ist (They et al., 2006). Aus den adhären Zellen wurden, wie unter 3.4.1 beschrieben, Proteinlysate hergestellt. In einer ersten Zentrifugation bei 300 *g* wurden Zellen aus dem Überstand entfernt. Der Überstand wurde erneut bei 2000 *g* und bei 10000 *g* zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Aus dem Überstand wurden die Exosomen mittels Ultrazentrifugation mit 100.000 *g* für 70 min abzentrifugiert. Das Pellet, welches die Exosomen enthält, wurde 1x mit PBS gewaschen und nochmal mit 100.000 *g* für 70 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100  $\mu$ l PBS aufgenommen und weiter analysiert.



**Abbildung 3. 1: Versuchsablauf zur Generierung von Exosomen**

Abbildung modifiziert nach einer Abbildung von They et al. (They et al., 2006). DLS = Dynamische Lichtstreuung; TEM = Transmissionselektronenmikroskopie

### 3.13.2 Exosomenisolation mit ExoQuick-TC Exosome precipitation Solution

Die Exosomenisolation wurde mit der „ExoQuick-TC Exosome precipitation Solution“ nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür wurde der abgenommene Zellkulturüberstand bei 3000 g zentrifugiert, um Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zu 10 ml Überstand wurden 2 ml Präzipitations-Lösung hinzugegeben und für mindestens 12 Stunden über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Die Exosomen wurden bei 1500 g für 30 min herunterzentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in 100 µl Lysepuffer aufgenommen.

### 3.13.3 Analyse der Exosomen

Die mittels Zentrifugationsmethode gewonnenen Exosomen wurden mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) charakterisiert. Die TEM wurde freundlicherweise von Florian Praetorius im Labor von Prof. Dr. Hendrik Dietz

durchgeführt. Die TEM-Bilder wurden bei 100 kV und mit einer Vergrößerung von x28500 aufgenommen.

Die dynamische Lichtstreuung (DLS) wurde mit dem Gerät Zetasizer® Nano ZS von Malvern mit der Hilfe von PD Dr. Per Sonne Holm durchgeführt.

Für den Western Blot der in PBS aufgenommenen Exosomen aus der Zentrifugation wurde der in Tabelle 2. 4 beschriebene 10x-Lysepuffer hinzugegeben und der Western Blot wie unter 3.4 beschrieben durchgeführt.

### 3.14 PBMC-Isolation und Kultivierung

Blut wurde im Einverständnis von gesunden Spendern in EDTA-Röhrchen abgenommen und im Verhältnis 1:1,5 mit PBS gemischt. 20 ml Ficoll wurden langsam mit dem PBS-Blut-Gemisch überschichtet und mit 800 *g* bei Raumtemperatur für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Der Ficoll-Gradient ist schematisch vor und nach der Zentrifugation in Abbildung 3. 2 dargestellt. Der Buffy-Coat zwischen Ficoll und Serum, der die Leukozyten enthält, wurde mit 5 ml-Pipettenspitzen abgenommen und in ein neues Falcon-Röhrchen überführt und zweimal mit PBS gewaschen. Die PBMC wurden in RPMI-Zellkulturmedium resuspendiert. Zum Zählen der Zellen wurden 10  $\mu$ l abgenommen, 1:10 mit Türck'scher Lösung verdünnt und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Kultivierung erfolgte in RPMI-Medium, komplementiert mit 10% FCS, 1% NEA und 1% P/S.

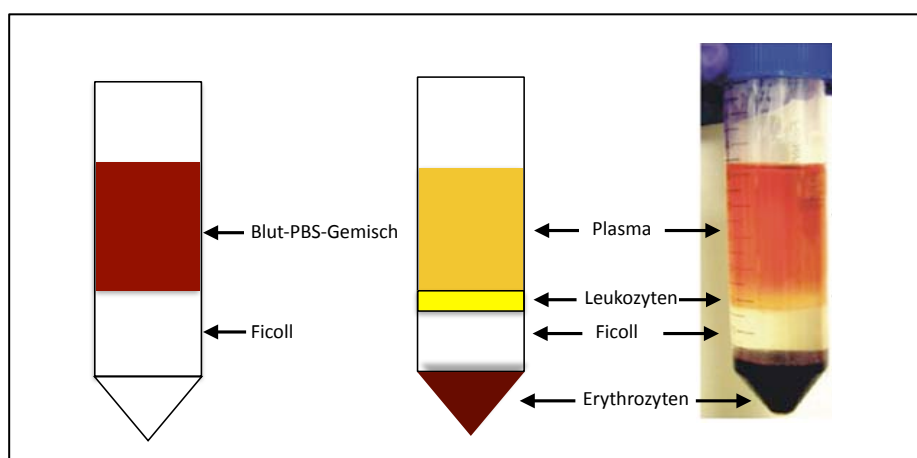


Abbildung 3. 2: PBMC-Isolation; Ficoll-Gradient vor und nach der Zentrifugation

### 3.15 PBMC-Stimulation und Ko-Kultivierung mit Tumorzellen

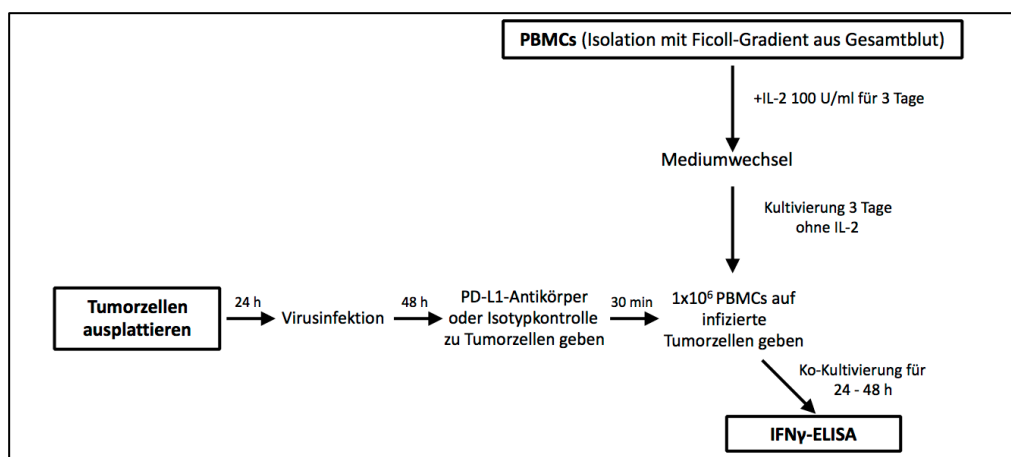
In einem ersten Versuch wurden  $1 \times 10^6$  PBMC pro Well auf 6-Well-Platten ausgelegt und das Medium mit 50 IU/ml IL-2 komplettiert (Kasahara et al., 1983). Es wurde 700  $\mu$ l Tumorzelllysate hinzugegeben. Das Tumorzelllysate wurde gewonnen, indem mit 20 MOI infizierte Tumorzellen nach 72 Stunden geerntet wurden. Es wurden sowohl die adhärennten Zellen abgeschabt, als auch die im Medium schwimmenden Zellen aufgenommen. Als Kontrollen wurden durch 3 Zyklen thaw/freeze getötet Tumorzellen hinzugegeben sowie 10 ng/ml LPS. Die PBMC wurden mit dem Tumorzelllysate für insgesamt 6 Tage inkubiert, wobei nach 2 Tagen die Hälfte des Mediums abgenommen wurde und durch frisches Medium mit IL-2 sowie 200  $\mu$ l Tumorzelllysate ersetzt wurde. Nach 6 Tagen wurde das Medium abgenommen und Zellen sowie Zelltrümmer herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde eingefroren und für den IFN $\gamma$ -ELISA verwendet.

In einem weiteren Experiment wurden unreife dendritische Zellen generiert. Hierfür wurden die gewonnenen PBMC auf eine 10 cm-Zellkulturplatte gegeben und für 3 Stunden inkubiert, um die Monozyten anwachsen zu lassen. Es wurden dann die nicht-adhärennten Zellen abgenommen und die adhärennten Monozyten einmal vorsichtig gewaschen. Durch IL-4 und GM-CSF wird die Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen stimuliert (Banchereau et al., 2000), die Konzentrationen von IL-4 und GM-CSF, die dazu publiziert sind, variieren jedoch in unterschiedlichen Protokollen (Castiello et al., 2011). Ich gab neues Medium mit 250 IU/ml IL-4 und 800 IU/ml GM-CSF auf die Zellen, um die Monozyten zu unreifen dendritischen Zellen zu differenzieren (Schaft et al., 2005). Die Zellen wurden 6 Tage lang inkubiert, wobei das Medium alle 2 - 3 Tage gewechselt wurde. Nach 6 Tagen wurden  $1 \times 10^5$  unreife dendritische Zellen in 500  $\mu$ l Medium auf 48 Stunden lang infizierte Tumorzellen gegeben und diese für weitere 48 Stunden ko-kultiviert. Das Medium wurde abgenommen und Zellen sowie Zelltrümmer bei 7000 g für 10 Minuten herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde eingefroren und für den IFN $\gamma$ -ELISA verwendet.

Ein weiteres Experiment sollte den Effekt von der Kombinationsbehandlung aus einem PD-L1-Inhibitor und der onkolytischen Virotherapie auf die IFN $\gamma$ -Ausschüttung aus PBMC untersuchen. Der Versuchsablauf ist schematisch in Abbildung 3.3 dargestellt.



Für diesen Versuch wurden einerseits PBMC mittels Ficoll-Gradient gewonnen und für 3 Tage mit 100 IU/ml IL-2 und anschließend für drei Tage ohne IL-2 kultiviert. Ebenso wurden  $5 \times 10^4$  T24-Zellen pro Well auf 12-Well-Platten ausgebracht und nach 24 Stunden mit AdWT und XVir-N-31 (30 MOI) infiziert. Nach zwei Tagen wurde zu den infizierten Tumorzellen 10 µg/ml eines PD-L1-Antikörpers (eBioscience, Klon MIH1) oder 10 µg/ml der Isotypkontrolle hinzugegeben. Der Antikörper wurde schon mehrfach für Funktionsassays in der verwendeten Konzentration beschrieben (Andorsky et al., 2011; Y. Chen et al., 2006). Nach 30-minütiger Inkubation wurden  $1 \times 10^6$  PBMC zu den mit Virus und PD-L1-Inhibitor behandelten Tumorzellen gegeben und der Ansatz für weitere 48 Stunden inkubiert. 24 Stunden nach der Behandlung wurden 200 µl Medium abgenommen, Zellen und Zelltrümmer herunterzentrifugiert und für den IFN-gamma-ELISA aufbewahrt. 48 Stunden nach der Behandlung wurde der restliche Zellkulturüberstand abgenommen, Zellen und Zelltrümmer herunterzentrifugiert (7000 g, 5 min), die Proben 1:10 verdünnt und der IFN $\gamma$ -ELISA nach Herstellerangaben durchgeführt.



**Abbildung 3. 3: Versuchsablauf der Ko-Kultivierung von PBMC mit infizierten Tumorzellen und der Behandlung mit einem PD-L1-Inhibitor**

### 3.16 Grafische Darstellung

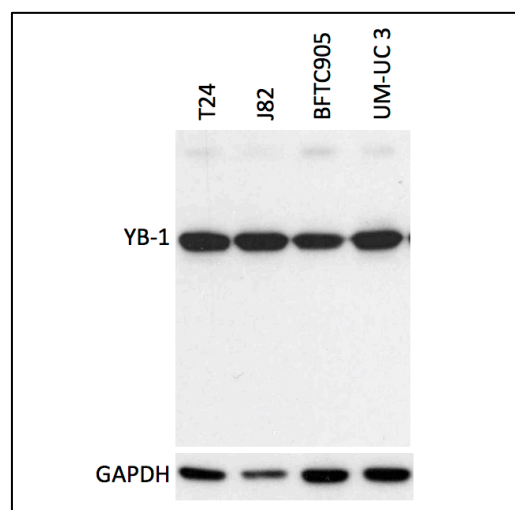
Die meisten Versuche wurden in Dupli- oder Triplikaten durchgeführt, dann wurden Mittelwerte gebildet und der Standardfehler oder die Standardabweichung berechnet. Die Auswertung wurde mit Microsoft Excel durchgeführt. Die Grafiken wurden mit Microsoft PowerPoint oder Apple Keynote erstellt. Die Daten wurden in zwei bis drei unabhängigen Experimenten erhoben, wovon eins in dieser Arbeit dargestellt ist.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der Infektion, Replikation und Zellyse durch YB-1 abhängige onkolytische Adenoviren in Blasenkarzinomzelllinien

#### 4.1.1 YB-1-Status

Der YB-1-Status von Harnblasenkarzinomzelllinien ist einerseits von Interesse, da YB-1 das Tumorwachstum, die Tumorinvasion und die Therapieresistenz von Blasenkarzinomen fördert (Shiota et al., 2011; Song et al., 2014). Andererseits ist die YB-1-Expression eine Voraussetzung für die Replikation YB-1 abhängiger onkolytischer Adenoviren (Rognoni et al., 2009). Deshalb wurde die YB-1-Expression mittels Western Blot untersucht. Der am N-terminalen Epitop bindende YB-1-Antikörper zeigte bei den hier getesteten Harnblasenkarzinomzelllinien T24, J82, BFTC905 und UM-UC 3 eine klare Expression von YB-1 durch eine starke Bande bei der erwarteten Größe von ca. 50 kDa (Abbildung 4. 1).

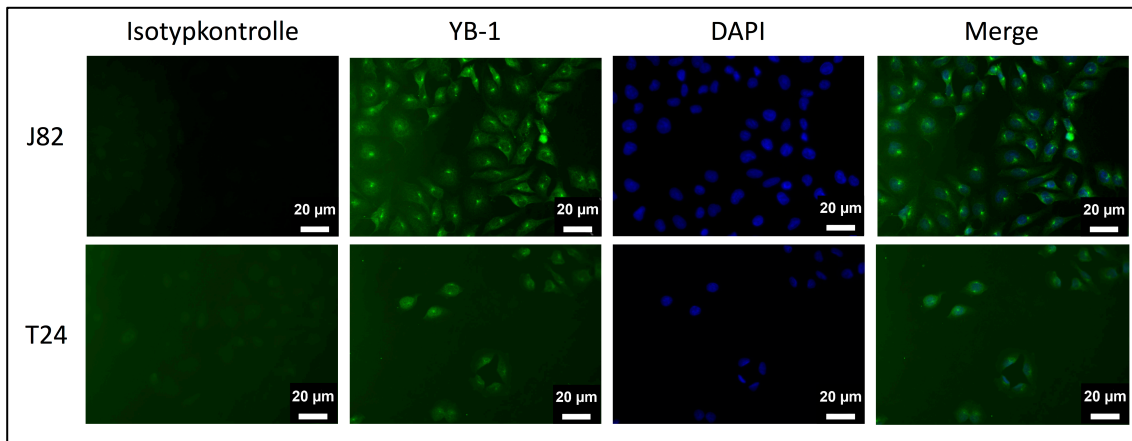


**Abbildung 4. 1: Western Blot Analyse auf YB-1 in Harnblasenkarzinomzelllinien**

Ein 12% Gel wurde mit 15 µg Protein in 40 µl Ladepuffer beladen. Alle untersuchten Zelllinien zeigten deutliche YB-1-Banden bei ca. 50 kDa.

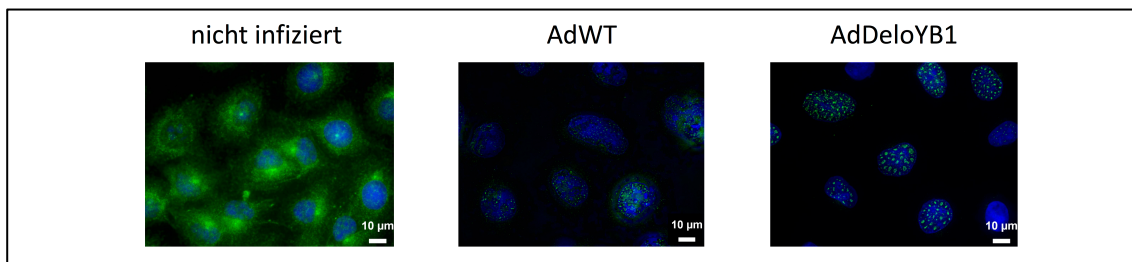
Neben der generellen YB-1-Expression spielt die subzelluläre Lokalisation von YB-1 eine entscheidende Rolle für dessen Funktion in Tumoren (Lasham et al., 2013). Außerdem

bewegt sich YB-1 mit E1B55k bei der adenoviralen Infektion in den Zellkern und ermöglicht dort die virale Replikation (Holm et al., 2002). Mittels Immunofluoreszenz zeigte ich für die Zelllinien J82 und T24 eine hauptsächlich perinukleäre, aber auch nukleäre Lokalisation von YB-1 (Abbildung 4. 2). Sowohl nach der Infektion mit AdWT als auch mit AdDeloYB1 war die größte Menge des YB-1 nukleär in sogenannten „Viral Inclusion Bodies“ lokalisiert (Abbildung 4. 3).



**Abbildung 4. 2: Immunfluoreszenz auf YB-1 in J82- und T24-Zellen**

YB-1 wurde in den fixierten Zellen mit dem primären YB-1-Antikörper markiert und mit einem sekundären FITC-konjugierten Antikörper angefärbt und unter dem Mikroskop sichtbar gemacht. Im Vergleich zur Isotypkontrolle zeigte sich eine kräftige Färbung auf YB-1. Dies war teilweise im Zellkern (mit DAPI gefärbt) aber hauptsächlich perinukleär lokalisiert. Vergrößerung x20.



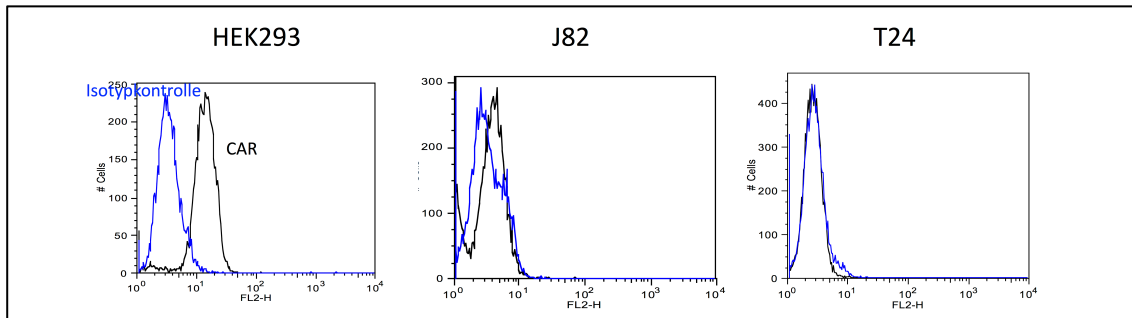
**Abbildung 4. 3: IF auf YB-1 in J82-Zellen 24 Stunden nach der Infektion mit AdWT und AdDeloYB1**

Bei nicht infizierten J82-Zellen befand sich YB-1 hauptsächlich perinukleär. 24 Stunden nach der Infektion mit Adenoviren war der Großteil von YB-1 im Zellkern lokalisiert. Vergrößerung x63.

#### 4.1.2 CAR-Status

Adenoviren binden an den Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR), um Zellen zu infizieren (Bergelson et al., 1997). XVir-N-31 ermöglicht mit dem RGD-Motiv (Dmitriev et al., 1998) und AdDeloYB1 mit Fiber35 über CD46 (Gaggar et al., 2003) eine CAR-unabhängige Infektion von Tumorzellen. Um jedoch die Harnblasenkarzinomzelllinien in Bezug auf die adenovirale Infektion besser zu charakterisieren, wurde der CAR-

Status mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abbildung 4. 4). Als Positivkontrolle wurden HEK293-Zellen verwendet, die hier eine CAR-Expression von ca. 77% aufwiesen. Die Blasenkarzinomzelllinien J82 und T24 exprimierten CAR zu 7% bzw. zu 1%.

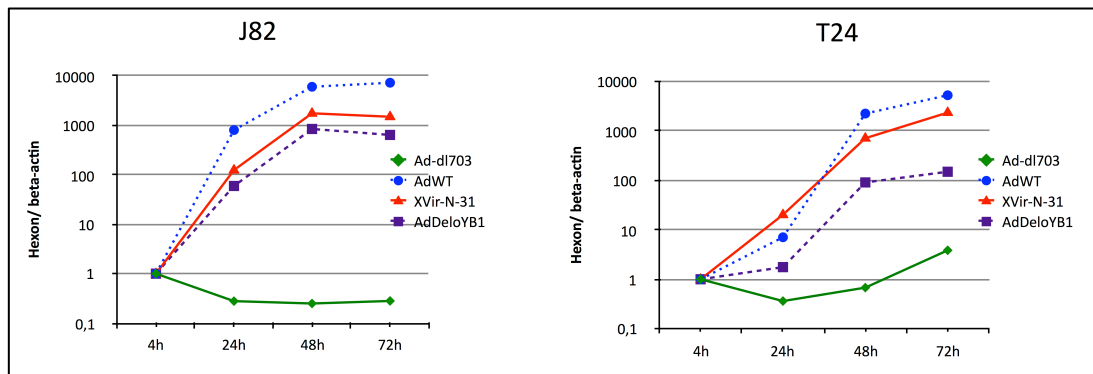


**Abbildung 4. 4: FACS-Analyse zur Bestimmung des CAR-Status**

HEK293-Zellen dienen als Positivkontrolle und wiesen eine CAR-Expression (schwarz) von ca. 77% im Vergleich zur Isotypkontrolle (blau) auf. Auf J82-Zellen war CAR bei ca. 7% und auf T24-Zellen nur bei ca. 1% im Vergleich zur Isotypkontrolle exprimiert.

#### 4.1.3 Infektion und Replikation

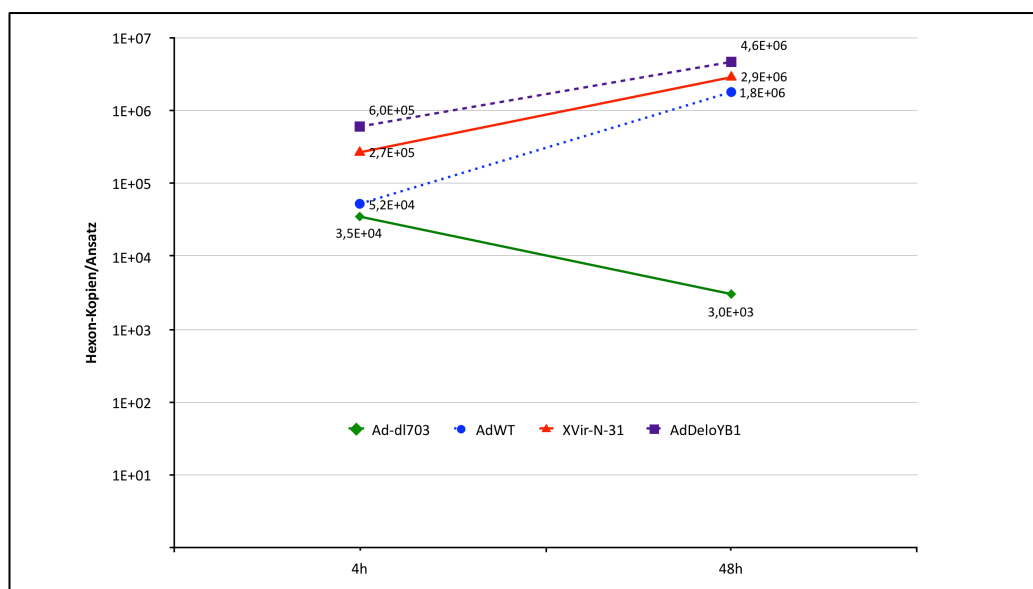
Die virale Replikation in J82- und T24-Zellen wurde mittels qPCR zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Nach der Infektion wurde das erste Mal nach 4 Stunden die DNA isoliert; dieser Wert diente als Ausgangswert für die Berechnung der relativen Replikationsrate und wurde gleich 1 gesetzt (Abbildung 4. 5). Ad-dl703 replizierte in keiner der beiden Zelllinien; bei T24-Zellen ist lediglich nach 72 Stunden eine minimale Erhöhung der Hexon-Kopien sichtbar. Es fällt auf, dass die Replikation in den ersten 48 Stunden nach Infektion am stärksten war und die Kurven zwischen 48 und 72 Stunden deutlich abflachen. In J82-Zellen wies AdWT nach 72 Stunden eine Steigerung der DNA-Menge auf das 7200-fache, XVir-N-31 auf das 1500-fache und AdDeloYB1 auf das 630-fache des Ausgangswertes auf. In T24-Zellen wies AdWT nach 72 Stunden eine Replikation auf das 5200-fache, XVir-N-31 auf das 2300-fache und AdDeloYB1 auf das 150-fache des Ausgangswertes auf. Wie erwartet replizierte AdWT in Blasenkarzinomzelllinien besser als die onkolytischen Adenoviren, deren Replikationskinetik am ehesten aufgrund der genetischen Alterationen, wie der E1A13S-Deletion, verändert ist.



**Abbildung 4. 5: qPCR zur virale Replikation in J82- und T24-Zellen**

4, 24, 48 und 72 Stunden nach der Infektion von  $1 \times 10^5$  Blasenkarzinomzellen mit den vier Viren (10 MOI) wurde die DNA isoliert. Mittels qPCR wurde die Anzahl der Hexon-Kopien bestimmt auf Beta-Aktin normiert nach der  $\Delta\Delta CT$ -Methode quantifiziert.

AdWT zeigte zwar relativ die stärkste Replikation, aber da sich vor allem die CAR-negativen T24-Zellen nur schlecht mit AdWT infizieren ließen, untersuchte ich auch die absoluten Viruskopien 4 und 48 Stunden nach der Infektion (Abbildung 4. 6). 4 Stunden nach der Infektion fanden sich 12x mehr Hexon-Kopien in den mit AdDeloYB1 und 5x mehr Hexon-Kopien in den mit XVir-N-31 infizierten Zellen im Unterschied zu den mit AdWT infizierten Zellen. AdWT replizierte am stärksten und näherte sich nach 48 Stunden den Werten von AdDeloYB1 und XVir-N-31 an, die jedoch absolut die meisten DNA-Kopien aufwiesen.

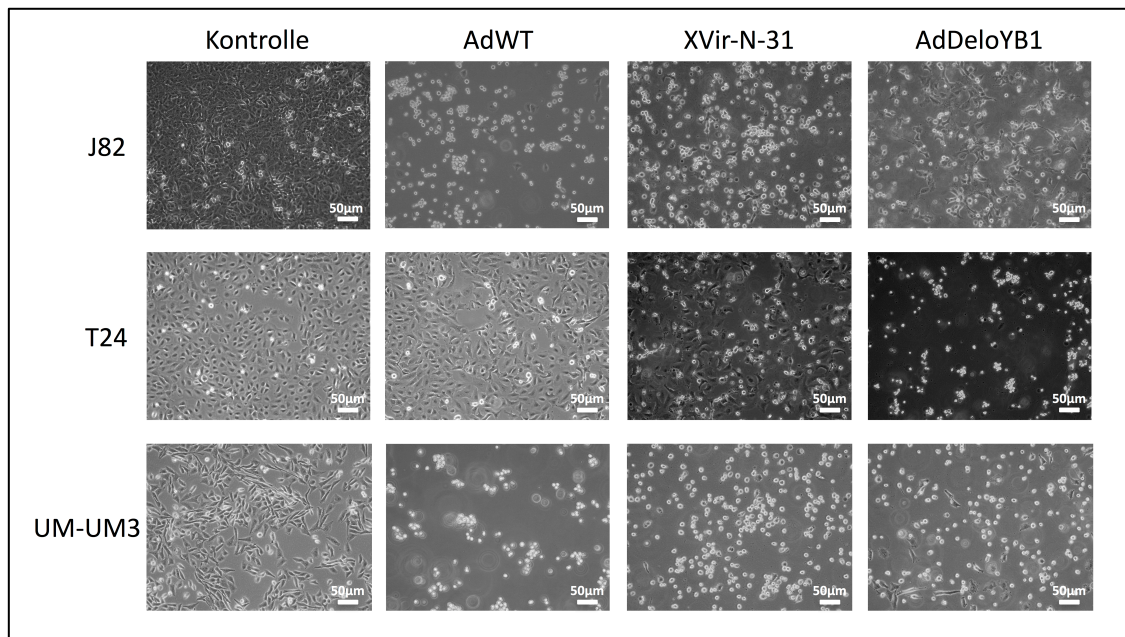


**Abbildung 4. 6: Virale Infektions- und Replikationsrate in T24 (absolut)**

4 und 48 Stunden nach der Infektion der T24-Zellen wurde die DNA isoliert und die Hexon-Kopien durch einen in der qPCR mitlaufenden Standard quantifiziert. Es fiel auf, dass XVir-N-31 und AdDeloYB1 zu einer deutlich höheren Infektionsrate im Vergleich zu AdWT und Ad-dl703 nach vier Stunden führten. AdWT zeigte jedoch die stärkste Replikation.

#### 4.1.4 Zelllyse

72 Stunden nach Virusinfektion zeigten alle drei Zelllinien eine ausgeprägte Zelllyse durch die Viren (Abbildung 4. 7). Am wenigsten stark lysiert waren die T24-Zellen nach AdWT-Infektion, was mit der Infektionsrate korreliert.

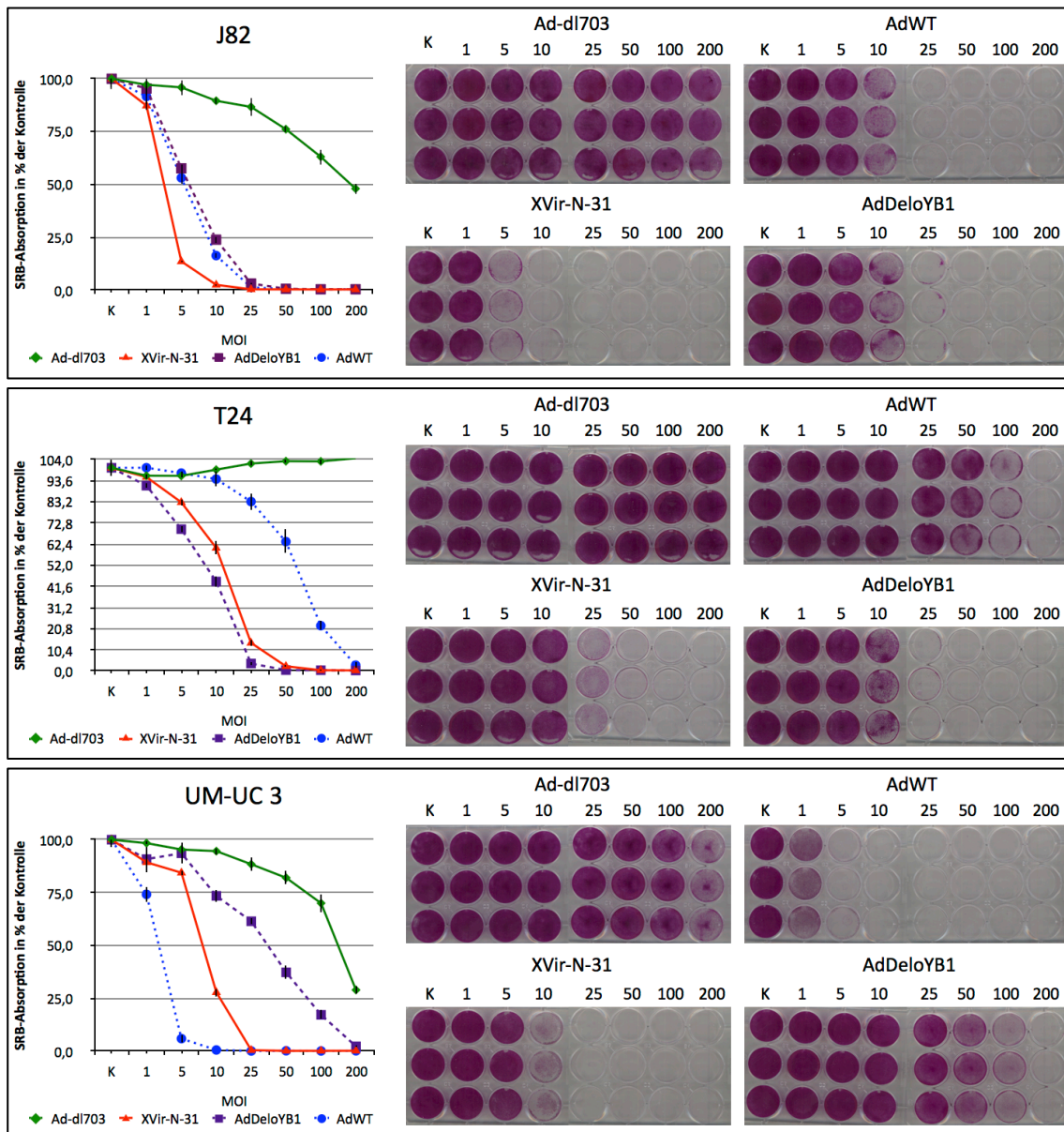


**Abbildung 4. 7: Lichtmikroskopische Bilder der Zelllyse von J82-, T24- und UM-UC 3-Zellen durch unterschiedliche Viren**

Die Zellen wurden mit 20 MOI infiziert und die Zelllyse 72 Stunden später mit dem Mikroskop (x10) visualisiert.

#### 4.1.5 Zytotoxizitätsassay

Der zytopathische Effekt (CPE) wurde mittels SRB-Assay quantifiziert, indem 4 Tage nach der Infektion die noch adhären Zellen fixiert und angefärbt wurden (Abbildung 4. 8). Die drei Zelllinien J82, T24 und UM-UC 3 wurden durch die onkolytischen Viren sowie durch AdWT effektiv lysiert. Es gab aber Unterschiede beim Ansprechen: 50% der J82-Zellen waren mit XVir-N-31 zwischen 1 und 5 MOI lysiert und mit AdDeloYB1 zwischen 5 und 10 MOI. 50% der T24-Zellen waren mit XVir-N-31 zwischen 10 und 25 MOI lysiert und mit AdDeloYB1 zwischen 5 und 10 MOI. 50% der UM-UC 3-Zellen waren mit XVir-N-31 zwischen 5 und 10 MOI und mit AdDeloYB1 zwischen 25 und 50 MOI lysiert. Auch hier korrelierte die geringere Lyse der T24-Zellen durch AdWT mit der geringeren Infektionsrate.



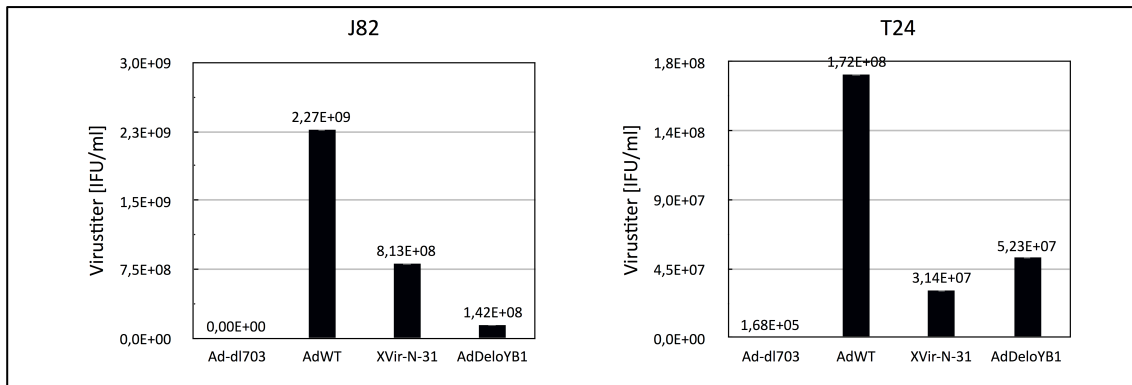
**Abbildung 4. 8: SRB-Assay der Zelllinien J82, T24 und UM-UC 3 mit Ad-dl703, AdWT, XVir-N-31 und AdDeloYB1**

Die Zellen wurden 24 Stunden nach dem Ausplattieren mit der angegebenen MOI infiziert und 4 Tage nach der Infektion fixiert und mit SRB angefärbt. Die Grafik auf der linken Seite zeigt die quantitative Auswertung der photometrisch bestimmten Absorption der angefärbten Zellen, was den lebenden Zellen entspricht, in Prozent von der Kontrolle. Auf der X-Achse ist die jeweilige MOI angegeben. Auf der rechten Seite sind die gescannten, angefärbten 12-Well-Platten abgebildet. Der Versuch wurde jeweils in Triplikaten durchgeführt. Oberhalb der Wells ist die MOI angegeben mit der infiziert wurde. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

#### 4.1.6 In Tumorzellen gebildete Viruspartikel

Die Bildung infektiöser Partikel aus Tumorzellen ist die Voraussetzung, um weitere Zellen infizieren und lysieren zu können. Die Partikelbildung in J82- und T24-Zellen wurde bestimmt, indem die Viren drei Tage nach der Infektion der Zellen isoliert

wurden und mit den neugebildeten Viren dann ein Titertest auf HEK293-Zellen durchgeführt wurde. Bei Ad-dl703 war die Partikelbildung sehr gering bzw. nicht nachweisbar – es diente als Negativkontrolle. In J82-Zellen wurden etwa 5 - 10x mehr infektiöse Partikel als in T24-Zellen. Und in beiden Zelllinien bildet AdWT 5 - 10x mehr infektiöse Partikel als XVir-N-31 oder AdDeloYB-1 (Abbildung 4. 9).

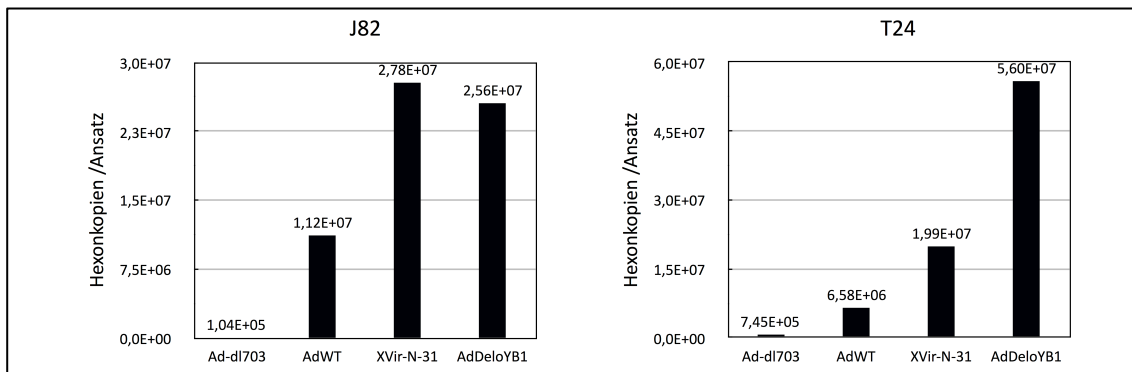


**Abbildung 4. 9: In J82- und T24-Zellen gebildete infektiöse Partikel**

Drei Tage nach der Virusinfektion der Tumorzellen mit 20 MOI wurden aus Zellen und Überstand die Viren mittels „thaw/freeze“ isoliert und mit diesen der Titertest auf HEK293-Zellen durchgeführt.

Da jedoch XVir-N-31 die J82-Zellen und XVir-N-31 sowie AdDeloYB1 die T24-Zellen stärker lysierten als AdWT (Abbildung 4. 8) und da die Infektionsrate der onkolytischen Viren deutlich besser war als von AdWT, untersuchte ich ebenfalls die Viruskopien im Tumorzelllysat. Drei Tage nach der Virusinfektion wurden die Überstände mit den schwimmenden Zellen geerntet, die DNA daraus isoliert und mittels qPCR die absolute Anzahl an Hexon-Kopien bestimmt. Die Anzahl der Viruskopien im Tumorzelllysat weicht zwar von der Menge der gebildeten infektiösen Partikel ab (Abb. 4. 10), korreliert aber sowohl mit der Zelllyse (Abb. 4. 8) als auch mit der Infektionsrate (Abb. 4. 6)





**Abbildung 4. 10: qPCR zur Quantifizierung der Viruskopien im Lysat von J82- und T24-Zellen**

3 Tage nach der Virusinfektion der Tumorzellen wurde die DNA aus dem Überstand mit schwimmenden Zellen isoliert. Die Hexon-Kopien wurden mittels qPCR bestimmt und durch einen mitlaufenden Standard quantifiziert.

## 4.2 Analyse der freigesetzten Proteine YB-1, HSP70, HMGB-1

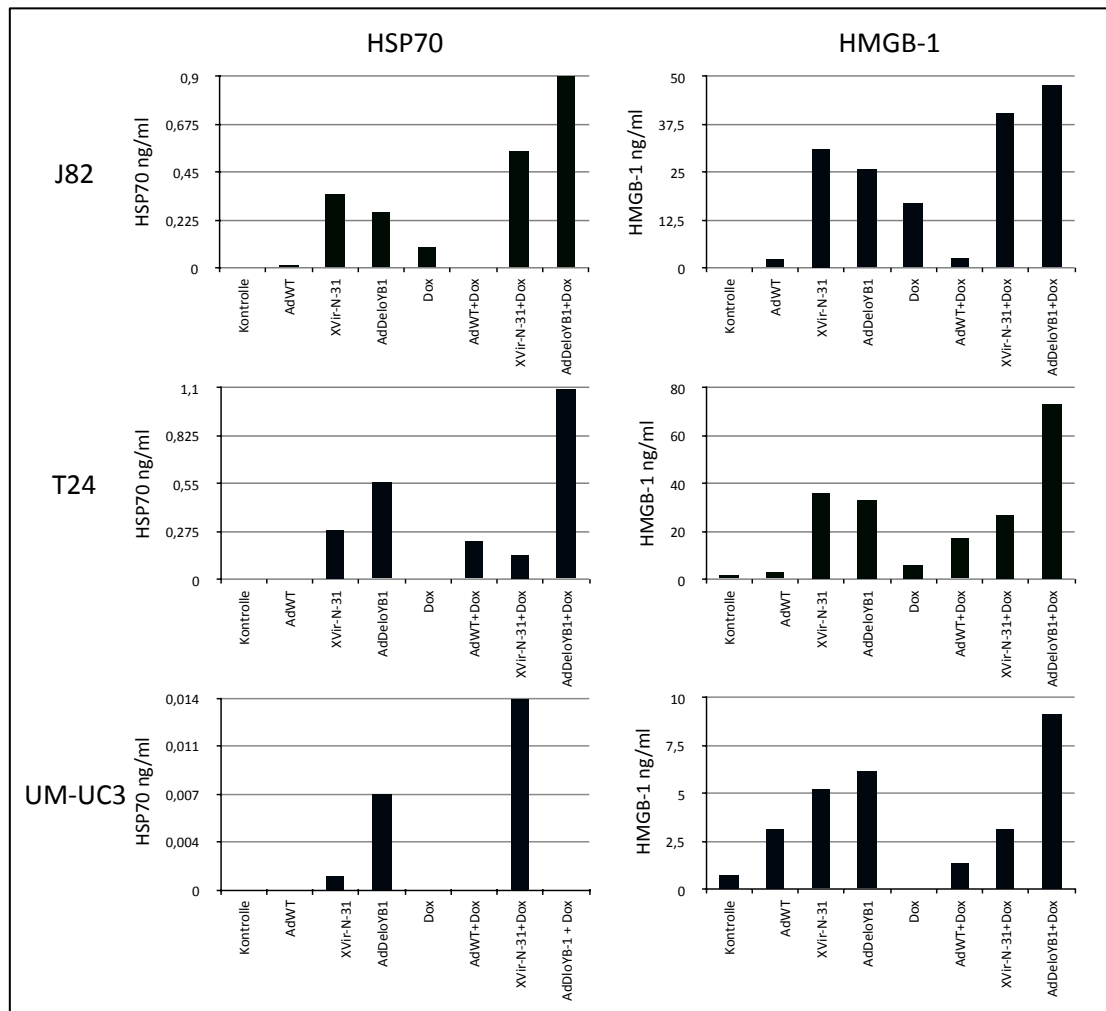
Um den Zelltod durch die onkolytischen Adenoviren XVir-N-31 und AdDeloYB1 genauer zu charakterisieren und um festzustellen, ob sie einen immunogenen Zelltod (ICD) verursachen, analysierten wir die Freisetzung von HSP70 und HMGB-1. HSP70 und HMGB-1 sind DAMPs (Damage-associated molecular pattern), welche den ICD charakterisieren (Garg et al., 2015; Scaffidi et al., 2002).

### 4.2.1 ELISA zur Freisetzung von HSP70 und HMGB-1

Die freigesetzten Proteine wurde drei Tage nach der Virusinfektion im Zellkulturüberstand mittels ELISA untersucht. Die Freisetzung von HSP70 und HMGB-1 war bei den drei Zelllinien nach der Infektion mit XVir-N-31 und AdDeloYB1 im Vergleich zur Infektion mit AdWT in fast allen Ansätzen deutlich erhöht (Abbildung 4. 11). In einigen Ansätzen ließ sich die Freisetzung durch die Kombinationsbehandlung mit 50 ng/ml Doxorubicin noch steigern; insgesamt war jedoch keine eindeutige Steigerung der Freisetzung durch Doxorubicin nachweisbar. Die Dosis von 50 ng/ml Doxorubicin, die zu den Tumorzellen gegeben wurde, ermittelte ich in einen SRB-Zytotoxizitätsassay (siehe Anhang).

Im Zellkulturüberstand von J82-Zellen fand sich nach XVir-N-31-Infektion 25x mehr HSP70 und 14x mehr HMGB-1 als nach AdWT-Infektion. Unter der Zugabe von Doxorubicin waren es 550x mehr HSP70 und 15x mehr HMGB-1. Bei den Zelllinien T24

und UM-UC 3 fand sich eine Steigerung durch Doxorubicin vor allem nach Infektion mit AdDeloYB1. Die Werte für HSP70 und HMGB-1 im Zellkulturüberstand der UM-UC 3-Zellen waren deutlich geringer, als bei T24- und J82-Zellen und lagen für HSP70 teilweise unter der Nachweisgrenze.



**Abbildung 4.11: ELISA zur HSP70- und HMGB-1-Freisetzung aus J82-, T24 und UM-UC 3-Zellen**

Die Zellen wurden mit 20 MOI infiziert und in serumfreiem Medium kultiviert. Die Überstände wurde 72 Stunden nach der Infektion geerntet und nach Herstellerangaben mit den ELISA analysiert. Es ließ sich fast überall eine höhere HSP70 und HMGB-1 Konzentration bei den mit onkolytischen Viren infizierten Zellen erkennen, als bei den mit AdWT infizierten Zellen. Die Freisetzung ließ sich teilweise durch die Zugabe von 50 ng/ml Doxorubicin (als Dox angegeben) noch steigern. Die HSP70-Konzentrationen waren insbesondere bei UM-UC 3-Zellen sehr gering, sodass es hier teilweise nicht nachweisbar war.

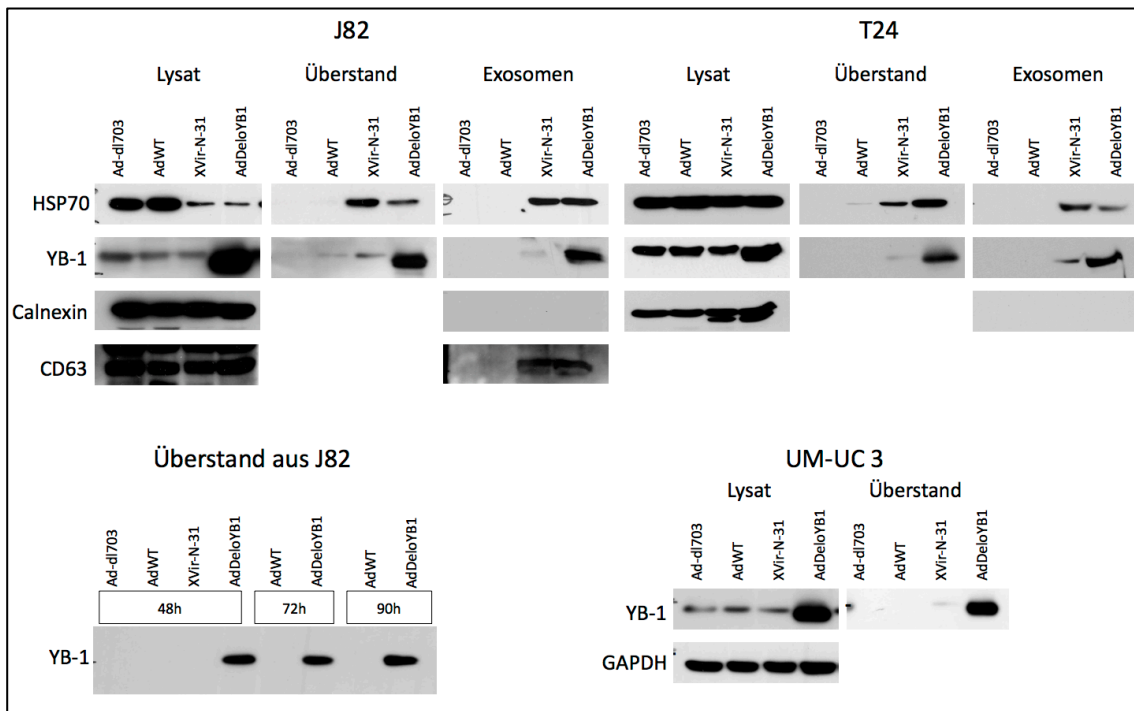
#### 4.2.2 Western Blot zur genaueren Analyse der Freisetzung

Mittels Western Blot sollte einerseits untersucht werden, ob das extrazelluläre HSP70 in Form von Exosomen freigesetzt wird. Andererseits wurde untersucht, ob die Virusinfektion eine Freisetzung von YB-1 zur Folge hat. Die Zellen wurden infiziert und

nach 72 Stunden wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, Zellen und Zelltrümmer herunterzentrifugiert und die Proteine wie in Abschnitt 3.4.2 gefällt bzw. die Exosomen mit einem Kit isoliert.

Nach der Infektion mit AdWT fand sich extrazellulär wenig bis kein HSP70. Hingegen zeigte sich bei der Zelllyse durch XVir-N-31 und AdDeloYB1 eine starke Freisetzung von HSP70 (Abb. 4. 12). Hier decken sich die Daten aus dem Western Blot-Experiment mit denen aus dem ELISA-Experiment. Um genauer zu untersuchen ob HSP70 in Exosomen freigesetzt wurde, wurden diese mit einem Kit isoliert und auf die Exosomenmarker CD63 und HSP70 untersucht. Beide Marker fanden sich im Isolat nach Infektion mit den onkolytischen Adenoviren. Nach AdWT-Infektion hingegen konnten auf Proteinebene keine Exosomen nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit der elektronenmikroskopischen Analyse nach der Ultrazentrifugation der Exosomen, bei der nach AdWT-Infektion nur sehr vereinzelt extrazelluläre Vesikel nachweisbar waren (vgl. 4.2.3). Die Abwesenheit von Calnexin im Western Blot der Exosomen bestätigte die Abwesenheit von zytoplasmatischen Proteinen (They et al., 2006).

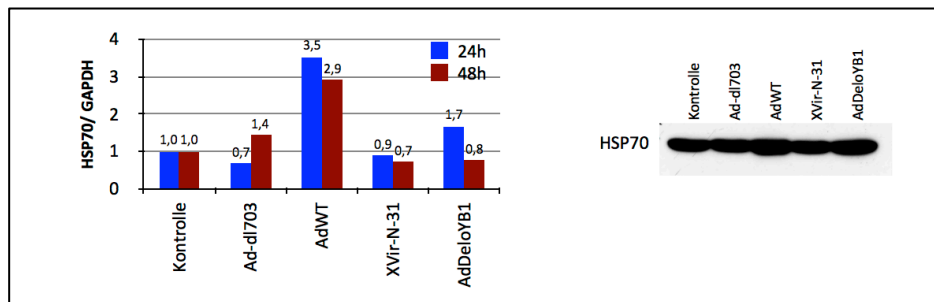
Wie schon in Abschnitt 4.1.1 beschrieben, wiesen alle untersuchten Zelllinien intrinsisches YB-1 auf. Die Menge an YB-1 in den Zellen, welches im Lysat nachgewiesen wurde, wurde durch die Infektion mit AdDeloYB1 deutlich gesteigert. Auch im Zellkulturüberstand und in der mit dem Kit isolierten Exosomenfraktion ließ sich YB-1 nach Infektion mit AdDeloYB1 deutlich nachweisen. Zudem ließ sich nach der Infektion mit XVir-N-31 eine verhältnismäßig schwache Bande von YB-1 im Zellkulturüberstand und in der Exosomenfraktion nachweisen. Noch schwächer ist die YB-1-Bande nach Infektion von J82-Zellen mit AdWT. Nach der Infektion von T24- und UM-UC 3-Zellen mit AdWT ließ sich extrazellulär kein YB-1 im Überstand nachweisen. Unten links in Abbildung 4. 12 ist die Zeitkinetik von YB-1 im Überstand 48, 72 und 90 Stunden nach der Virusinfektion dargestellt. Zu den verschiedenen Zeitpunkten zeigten sich keine signifikanten Veränderungen zwischen der Freisetzung nach AdWT- und AdDeloYB1-Infektion.



**Abbildung 4. 12: Western Blots zur Analyse von Lysat, Überstand und Exosomen nach Virusinfektion aus J82-, T24- und UM-UC 3-Zellen**

J82- und UM-UC 3-Zellen wurden mit 20 MOI infiziert; T24-Zellen wurden mit Ad-dl703 mit 25 MOI, mit AdWT mit 50 MOI, mit XVir-N-31 mit 25MOI und mit AdDeloYB1 mit 15MOI infiziert, um eine angepasste Infektion zu erreichen. Obwohl HSP70 nach der Infektion mit AdWT auf RNA- und Proteinebene hochreguliert wurde (vgl. Abb. 4. 13), schien HSP70 – anders als bei der Infektion mit XVir-N-31 oder AdDeloYB1 – nicht freigesetzt zu werden. AdDeloYB1 führte zu einer starken YB-1-Expression in den Zellen, welches sich 72 Stunden nach der Infektion im Zellkulturüberstand nachweisen ließ. Die Versuche wurden mehrfach mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt. Nach Infektion der Zellen mit den onkolytischen Adenoviren konnten Exosomen im Zellkulturüberstand durch die Proteine HSP70 und CD63 nachgewiesen werden. Nach AdWT-Infektion gelang dieser Nachweis nicht, was gegen eine Exosomensekretion nach AdWT-Infektion spricht.

Im Gegensatz zu dem kaum bis nicht nachweisbaren extrazellulären HSP70 zeigte sich intrazellulär eine erhöhte HSP70-Konzentration nach AdWT-Infektion (Abb. 4. 12). Es ist beschrieben, dass eine Infektion mit dem Adenovirus Wildtyp zu einer Induktion bzw. Hochregulation von HSP70 durch E1A führt (Nevins, 1982). Dies zeigten auch unsere Versuche in J82-Zellen (Abbildung 4. 13). So führte die Infektion mit AdWT zu einer erhöhten HSP70-RNA-Menge sowie zu einer erhöhten HSP70-Proteinmenge in den Zellen. Nach der Infektion mit den onkolytischen Viren, bei denen E1A13S deletiert ist, zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine normale HSP70-Expression. Lediglich bei AdDeloYB1 war die HSP70-Konzentration nach 24 Stunden leicht erhöht.



**Abbildung 4. 13: qPCR und Western Blot zur HSP70-Expression nach Virusinfektion**

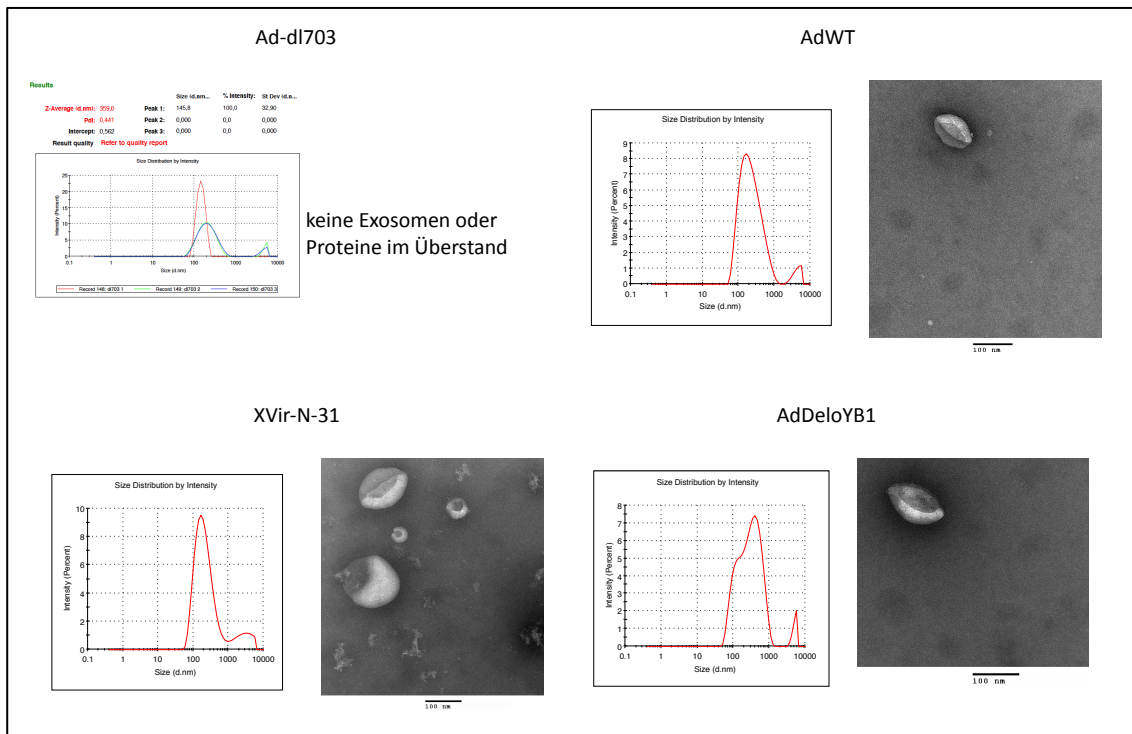
Für die links dargestellten Ergebnisse der qPCR wurde die RNA 24 und 48 Stunden nach Virusinfektion mit 10 MOI von J82-Zellen isoliert. Dargestellt ist die relative HSP70-Expression normiert auf GAPDH im Vergleich zur Kontrolle. Der rechts dargestellte Western Blot zeigt HSP70 im Zelllysatsatz bei der erwarteten Größe von 75 kDa 24 Stunden nach der Infektion von J82-Zellen mit 20 MOI.

#### 4.2.3 Analyse der isolierten Exosomen

Für HSP70 ist beschrieben, dass es von Zellen in Exosomen sezerniert wird (Hightower et al., 1989; Lancaster et al., 2005a; Santos et al., 2017). Für YB-1 ist eine Freisetzung in Mikrovesikeln beschrieben (Frye et al., 2009). Wir hatten festgestellt, dass sich im Zellkulturüberstand der Blasenkarzinomzellen nach der Infektion mit onkolytischen Viren die Proteine HMGB-1, HSP70 und YB-1 befanden. Um die freigesetzten Proteine besser zu charakterisieren, wendete ich die in Abschnitt 3.13.1 beschriebene Methode zur Isolation von Exosomen an und untersuchte die Isolate mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) und Elektronenmikroskopie (Abbildung 4. 14). Im Isolat des Überstandenes nach Infektion mit Ad-dl703 ließen sich weder im BCA-Assay, noch in der dynamischen Lichtstreuung, noch in der Elektronenmikroskopie Proteine oder Vesikel nachweisen. Bei der Isolation der Exosomen nach Infektion mit AdWT, XVir-N-31 und AdDeloYB1 ergaben sich bei der dynamischen Lichtstreuung durchschnittliche Z-Werte zwischen 180 und 250 nm. Die Werte waren somit etwas größer als der zu erwartende Durchmesser von 100 nm, der für Exosomen beschrieben ist. Zu berücksichtigen sind jedoch auch die Pdl-Werte (Polydispersity Index), die zwischen 0,34 und 0,41 lagen und für eine eher breite Verteilung der Partikelgröße in der Lösung, also eine nicht homogene Lösung, sprechen.

In der Elektronenmikroskopie zeigten sich Vesikel mit einer Größe um 100 nm, die in Form und Größe mit Exosomen vereinbar waren. Es waren jedoch auch Adenoviren (vgl. Abb. 1. 5) und teilweise größere Vesikel – gegebenenfalls Mikrovesikel – in der TEM sichtbar. Nach AdWT-Infektion waren jedoch im Vergleich zur Infektion mit den

onkolytischen Adenoviren wenig Vesikel nachweisbar, was erklärt warum der Exosomennachweis auf Proteinebene nach AdWT-Infektion nicht gelang (vgl. 4.2.2).



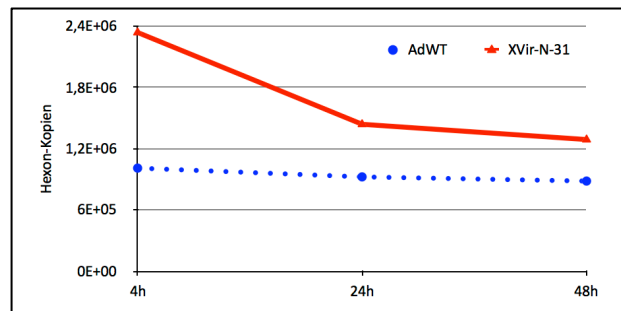
**Abbildung 4. 14: Analyse der durch Zentrifugation aus dem Zellkulturüberstand von J82-Zellen gewonnenen Exosomen mittels DLS und Elektronenmikroskopie**

Im Überstand der mit Ad-dl703 infizierten Zellen ließen sich im BCA-Assay keine Proteine nachweisen. Auch in der dynamischen Lichtstreuung (DLS) und der Elektronenmikroskopie ergab sich kein Nachweis von Vesikeln. Nach AdWT-Infektion wurden im BCA-Assay nur sehr wenig Proteine und in der TEM nur vereinzelt Vesikel nachgewiesen. Bei den onkolytischen Viren hingegen konnten deutliche Mengen an extrazellulären Vesikeln nachgewiesen werden. Typische Exosomenmarker zeigten sich im WB nur bei mit XVir-N-31 und AdDeloYB1 infizierten Zellen (siehe Abb. 4. 12)

## 4.3 Evaluation der Immunantwort auf infizierte Tumorzellen

### 4.3.1 Bestimmung der viralen Replikation in PBMC

Für die weiteren Experimente, bei denen PBMC mit infizierten Tumorzellen kultiviert wurden, schloss ich aus, dass die Viren in PBMC replizieren. Nach der Infektion von PBMC mit AdWT und XVir-N-31 isolierten ich die DNA 4, 24 und 48 Stunden nach der Infektion. Mittels qPCR bestimmten ich die Hexon-Kopien und konnten anhand fallender Werte eine virale Replikation in PBMC ausschließen (Abbildung 4. 15).



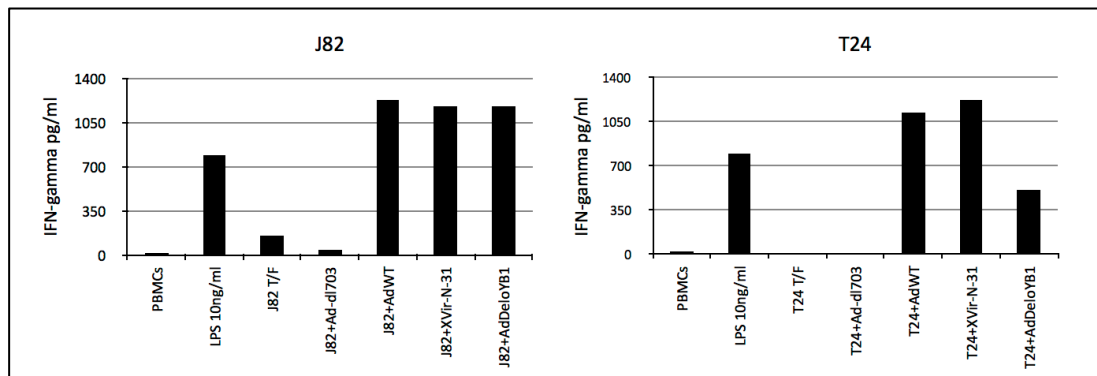
**Abbildung 4. 15: qPCR zur Replikation der Viren in PBMC**

Um auszuschließen, dass die Viren in PBMC replizieren, wurde die DNA 4, 24 und 48 Stunden nach der Virusinfektion der PBMC isoliert und die Hexon-Kopien mittels qPCR quantifiziert. Es zeigte sich eine Abnahme der absoluten Hexon-Kopien.

### 4.3.2 Ko-Kultivierung von PBMC mit Tumorzelllysate und Bestimmung der IFN $\gamma$ -Freisetzung

Um die Frage zu beantworten, ob der durch Viren ausgelöste Zelltod eine gesteigerte Immunantwort zur Folge hat, wurden lysierte Tumorzellen mit PBMC ko-kultiviert und die IFN $\gamma$ -Konzentration im Überstand gemessen.

Die PBMC wurden mittels Ficoll-Gradient aus dem Blut gesunder Spender isoliert und mit IL-2 kultiviert. Infizierte Tumorzellen wurden drei Tage nach der Infektion mitsamt dem Überstand geerntet und auf die PBMC gegeben. Nach sechs Tagen wurde der Überstand der stimulierten PBMC abgenommen und damit ein IFN $\gamma$ -ELISA durchgeführt (Abbildung 4. 16). Nach der Infektion von J82- und T24-Zellen mit Ad-dl703 und bei den durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen getöteten Zellen (thaw/freeze) kam es zu keiner bzw. nur zu einer sehr geringen IFN $\gamma$ -Freisetzung. Bei den anderen mit Viren infizierten Tumorzellen kam es zu einer starken IFN $\gamma$ -Freisetzung aus PBMC. Diese lag in fast allen Ansätzen höher als bei den mit LPS stimulierten PBMC. Es zeigte sich, dass der IFN $\gamma$ -Wert bei mit AdDeloYB1 infizierten T24-Zellen deutlich niedriger lag, als bei der Infektion mit AdWT oder XVir-N-31.

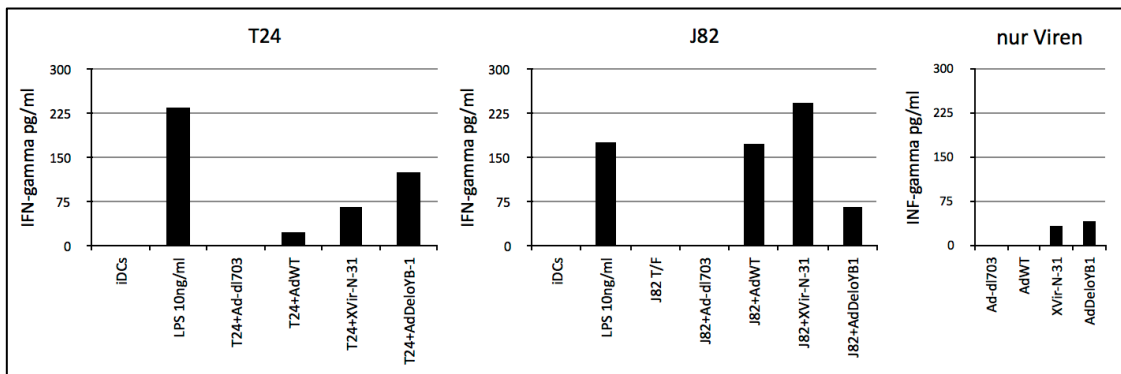


**Abbildung 4.16: ELISA zur IFN $\gamma$ -Freisetzung aus PBMC nach Ko-Kultivierung mit Tumorzelllysaten**

J82- bzw. T24-Zellen und deren Zellkulturüberstand wurden 72 Stunden nach der Infektion mit den angegebenen Viren geerntet und dann auf PBMC gegeben. Zur Reifung der PBMC wurde das Kulturmedium mit 50 IU/ml IL-2 komplettiert. Als Positivkontrolle wurden 10 ng/ml LPS zu den PBMC gegeben. Als Negativkontrolle dienten PBMC ohne Zugabe von Tumorzelllysate (PBMCs) und durch thaw/freeze abgetötete Zellen (als T/F angegeben). 6 Tage nach der Zugabe des Tumorzelllysats zu den PBMCs wurde IFN-gamma im Überstand mittels ELISA gemessen. Eines von mehreren Experimenten ist dargestellt.

Da zuerst dendritische Zellen durch DAMPs und Tumorantigene aktiviert werden, wurde auch deren IFN $\gamma$ -Freisetzung bestimmt. Zur Isolation der dendritischen Zellen wurden nach der PBMC-Isolation die adhären Zellen mit IL-4 und GM-CSF zu unreifen dendritischen Zellen (iDC) differenziert. Diese wurde dann auf infizierte Tumorzellen gegeben. Nach 48 Stunden wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und IFN $\gamma$  mittels ELISA gemessen (Abbildung 4.17). Hierbei fiel auf, dass die Werte generell deutlich niedriger lagen als bei den nicht aufgetrennten PBMC (vgl. Abb. 4.16). Außerdem lagen deutliche Schwankungen der Werte für die beiden Zelllinien vor. So fand sich bei J82-Zellen, die mit AdWT oder XVir-N-31 infiziert wurden, eine höhere IFN $\gamma$ -Konzentration, als bei mit LPS stimulierten iDC. Bei den iDC, die mit infizierten T24-Zellen ko-kultiviert wurden, war die IFN $\gamma$ -Konzentration hingegen deutlich geringer als bei der LPS-Kontrolle. Auch bei den iDC, bei denen zur Kontrolle nur die Viren hinzugegeben wurden, konnte eine leichte IFN $\gamma$ -Freisetzung gemessen werden, die jedoch niedriger war als bei der Ko-Kultivierung der entsprechenden infizierten Tumorzellen mit iDC.



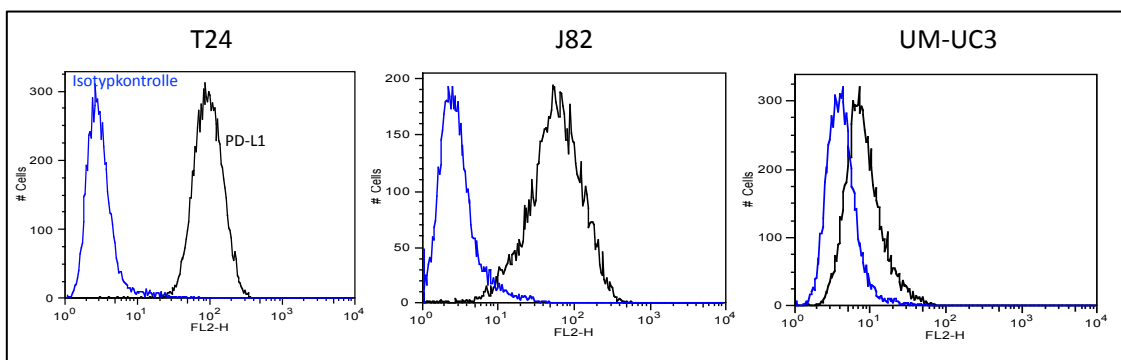


**Abbildung 4. 17: ELISA zur IFN $\gamma$ -Freisetzung aus unreifen dendritischen Zellen (iDC) nach Ko-Kultivierung mit infizierten Tumorzellen**

Nach der PBMC-Isolation wurden die adhärennten Zellen für 6 Tage mit IL-4 und GM-CSF zu iDC gereift. Diese wurden zu seit 48 Stunden infizierten T24- bzw. J82-Zellen hinzugegeben und für weitere zwei Tage ko-kultiviert. Nach der Abnahme des Überstandes wurde IFN $\gamma$  mittels ELISA gemessen. Das rechte Diagramm zeigt die Kontrolle, bei der nur die Viren in der gleichen Konzentration mit der die Tumorzellen infiziert wurden zu den iDC gegeben wurden.

#### 4.3.3 PD-L1-Status der Blasenkarzinomzelllinien

Der PD-L1-Status auf den Zelllinien J82, T24 und UM-UC 3 wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abbildung 4. 18). Die drei Zelllinien wiesen eine hohe PD-L1-Oberflächenexpression auf: T24-Zellen waren zu fast 100% PD-L1 positiv, J82-Zellen zu 97% und UM-UC 3-Zellen zu 79%.

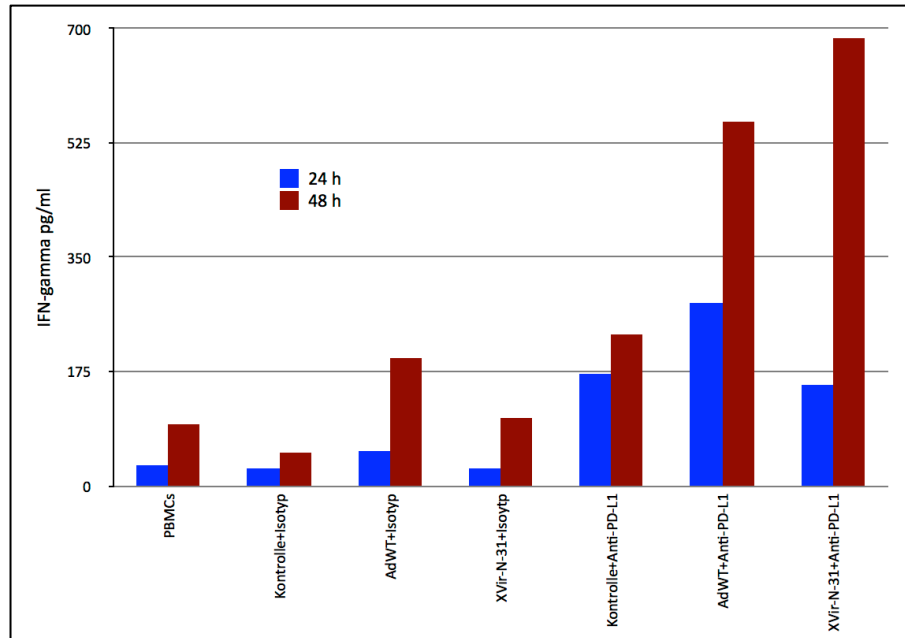


**Abbildung 4. 18: FACS-Analyse zur Bestimmung des PD-L1-Status auf T24-, J82- und UM-UC 3-Zellen**

T24-Zellen wiesen eine PD-L1-Expression (schwarz) von 99,7% im Vergleich zur Isotypkontrolle (blau) auf. Auf J82-Zellen war PD-L1 bei 97,4% und auf UM-UC3-Zellen bei 79,1% im Vergleich zur Isotypkontrolle exprimiert.

#### 4.3.4 IFN $\gamma$ -Freisetzung aus PBMC bei Behandlung von Blasenkarzinomzelllinien mit PD-L1-Inhibitor und onkolytischer Virotherapie

Dieser Versuch wurde mit T24-Zellen durchgeführt, da sie die höchste PD-L1-Expression aufwiesen (vgl. Abb. 4. 18). 48 Stunden nach der Virusinfektion wurde zu den Zellen entweder der PD-L1-Inhibitor (Klon MIH1) oder die entsprechende Isotypkontrolle hinzugegeben. Nach 30 minütiger Kombinationsbehandlung wurden außerdem die PBMC auf die infizierten Tumorzellen gegeben. Der Überstand wurde 24 und 48 Stunden nach Kombinationsbehandlung und Beginn der Ko-Kultivierung abgenommen, um darin die IFN $\gamma$ -Konzentration zu bestimmen (Abbildung 4. 19). Erstens fällt auf, dass in den Ansätzen mit dem PD-L1-Antikörper die IFN $\gamma$ -Freisetzung aus PBMC höher ist als bei den Ansätzen mit der Isotypkontrolle. Zweitens fällt auf, dass die IFN $\gamma$ -Konzentration in allen Ansätzen nach 48 Stunden deutlich höher ist als nach 24 Stunden. Drittens sind die Konzentrationen in den Ansätzen mit PD-L1-Antikörper in Kombination mit AdWT und XVir-N-31 nach 48 Stunden am höchsten.



**Abbildung 4. 19: IFN $\gamma$ -Freisetzung aus PBMC bei Behandlung von T24-Zellen mit PD-L1-Inhibitor und onkolytischer Virotherapie**

Die Behandlung der T24-Zellen und die Ko-Kultivierung erfolgten wie unter Abschnitt 3.15 in Abbildung 3. 3 beschrieben. Die Behandlung mit dem PD-L1-Inhibitor führte zu einer verstärkten IFN $\gamma$ -Freisetzung aus PBMC. Der Effekt war nach 48 Stunden besonders deutlich sichtbar. Eins von zwei unabhängigen Experimenten ist abgebildet.

## 5 Diskussion

Onkolytische Viren stellen seit Jahren ein innovatives und aussichtsreiches Therapiekonzept für das Blasenkarzinom und andere Tumore dar. Diese Arbeit legt mit *in vitro*-Versuchen den Grundstein für die YB-1 basierte Virotherapie in Blasenkarzinomzellen. Die Ergebnisse zeigen eine effektive Replikation, Zelllyse und Partikelbildung der YB-1 abhängigen onkolytischen Viren. Zudem weisen die erhöhten Konzentrationen von HSP70 und HMGB-1 im Zellkulturüberstand nach der viralen Lyse der Blasenkarzinomzellen auf einen immunogenen Zelltod und somit auf ein hohes immunogenes Potential hin.

### 5.1 Blasenkarzinomzellen sind für die YB-1 abhängige onkolytische Virotherapie geeignet

Eine hohe YB-1-Expression korreliert beim Blasenkarzinom und in vielen weiteren Tumoren mit einer verstärkten Progression, Metastasierung, Therapieresistenz und einem verringerten Überleben (Kosnopfel et al., 2014; Shiota et al., 2011; Song et al., 2014; Yamashita et al., 2017). Karzinome mit Viren zu therapieren, deren Replikation abhängig von YB-1 ist, scheint eine Möglichkeit zu sein, diese therapieresistenten und aggressiven Tumore zu behandeln (Holm et al., 2004; Mantwill et al., 2006; Rognoni et al., 2009). Immunhistochemisch wurde gezeigt, dass Blasenkarzinome verstärkt YB-1 exprimieren und dass dies mit der Aggressivität korreliert (Song et al., 2014). Auch Daten zu Western Blots von Zelllinien sind schon publiziert (Shiota et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte eine starke YB-1-Expression in Blasenkarzinomzelllinien mittels Western Blot und Immunofluoreszenz (IF) bestätigt werden (Abb. 4. 1 und Abb. 4. 2). Für die Detektion von YB-1 mittels IF und Immunhistochemie scheint das Epitop, an welches der Antikörper bindet, eine zentrale Rolle zu spielen. Unser YB-1-Antikörper bindet an das N-terminale Epitop von YB-1 (R. C. Holzmüller, 2011), ist somit spezifisch und kann sowohl zytoplasmatisches als auch nukleäres YB-1 detektieren (Woolley et al., 2011). In der Immunofluoreszenz zeigte sich die YB-1-Expression größtenteils perinukleär, teilweise auch nukleär (Abb. 4. 2). Diese Lokalisation deckt sich mit publizierten Daten zur immunhistochemisch bestimmten intrazellulären

Lokalisation von YB-1 beim Blasenkarzinom (Song et al., 2014) sowie mit der typischen Lokalisation bei anderen Tumoren (Bargou et al., 1997; Koike et al., 1997). Nach der Infektion von J82-Zellen mit AdWT sowie mit AdDeloYB1 ließ sich YB-1 in der IF fast ausschließlich als gepunktete Muster im Zellkern nachweisen (Abb. 4. 3). Diese Muster wurden als „Viral Inclusion Bodies“ beschrieben und sind Replikations- und Transkriptionszentren, in denen E1B55k, E4orf6 und YB-1 vorliegen (Holm et al., 2002; Ornelles et al., 1991).

Bedeutend ist auch, dass YB-1 die Chemotherapieresistenz fördert und beim Blasenkarzinom an der Resistenzbildung gegen Cisplatin, Doxorubicin und Gemcitabin beteiligt ist (Shiota et al., 2011; Yamashita et al., 2017). Da sich YB-1 bei chemotherapieresistenten Zellen vermehrt im Zellkern befindet (Eliseeva et al., 2011; Holm et al., 2016; Yamashita et al., 2017), können YB-1 abhängige Viren in diesen Zellen besonders effektiv replizieren und stellen eine Möglichkeit dar diese therapieresistenten Tumore zu behandeln.

Adenoviren binden an den Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR), um Zellen zu infizieren (Bergelson et al., 1997). Die Expression von CAR auf Blasenkarzinomzellen ist jedoch sehr variabel und kann gering ausfallen (Y. Li et al., 1999). Ich stellte eine sehr geringe CAR-Expression auf J82- und T24-Zellen fest, was sich mit den publizierten Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen deckt (Sudarshan et al., 2005; Zhao et al., 2011). Das Ergebnis zeigt, wie wichtig es ist, dass die Viren XVir-N-31 und AdDeloYB1 Zellen CAR-unabhängig über RGD bzw. Fiber35 infizieren (Dmitriev et al., 1998; Gaggari et al., 2003). Außerdem war der CAR-Status von Interesse, um die Infektion von AdWT mit der Infektion von XVir-N-31 und AdDeloYB1 vergleichen und ins Verhältnis setzen zu können.

## 5.2 Effektive Lyse von Harnblasenkarzinomzellen durch onkolytische Adenoviren

XVir-N-31 und AdDeloYB1 sind aufgrund einer selektiven Replikation tumorspezifisch. Aufgrund einer Deletion von 11 Basenpaaren in E1A wird das 13S-Produkt nicht mehr gebildet (Haley et al., 1984), was dazu führt, dass eine effektive Replikation nur abläuft, wenn YB-1 an den E2-late Promoter bindet und diesen aktiviert (Rognoni et al.,

2009). Da YB-1 von den getesteten Zelllinien stark - teilweise auch im Zellkern - exprimiert wird, ist die Replikation YB-1 abhängiger Viren möglich. XVir-N-31 und AdDeloYB1 replizierten effektiv in J82- und T24-Zellen, jedoch um ein Vielfaches weniger als AdWT (Abb. 4. 5). Der Wildtyp des Adenovirus ist unverändert und nutzt alle im Laufe der Evolution erworbenen Möglichkeiten einer effektiven Replikation aus. Die onkolytischen Adenoviren sind genetisch verändert, um die Replikation tumorselektiv zu machen. So führt am ehesten die Deletion in E1A zu einer, im Vergleich zum Wildtyp, verzögerten bzw. verlangsamten Replikationskinetik. Auffällig war, dass AdDeloYB1, welches YB-1 als Transgen aufweist, am schlechtesten replizierte. Es wurde angenommen, dass man mit einer verstärkten YB-1-Expression die Replikation steigern könne (Glockzin et al., 2006). Dies bestätigte sich in meinen durchgeführten Experimenten nicht. Es schien eher als ob die Replikation durch das YB-1-Gen in der E3-Region verlangsamt und weniger effizient war, da eventuell die vielen Veränderungen im Virusgenom zu Instabilität und zu schlechterem Wachstum von Adenoviren führen. Auch bei der Produktion von AdDeloYB1 wurden deutlich geringere Titer erreicht als bei den anderen Viren (vgl. Tabelle 2. 10). Die Replikationskinetik wurde mittels qPCR relativ bestimmt, indem die Werte der jeweiligen Viren nach 24, 48 und 72 Stunden auf den Ausgangswert 4 Stunden nach Infektion normiert wurden. Es fiel jedoch auf, dass vor allem bei der CAR-negativen Zelllinie T24 nach 4 Stunden deutlich mehr Hexon-Kopien von AdDeloYB1 und XVir-N-31 als von AdWT in den Zellen vorhanden waren. Dies wurde mit einer absoluten Bestimmung bestätigt, indem ich bei der qPCR eine Standardreihe mitlaufen ließ (Abb. 4. 6). T24-Zellen wurden von den Viren AdWT und Ad-dl703, deren Infektion CAR-abhängig ist, gleich stark infiziert. Die Infektionsrate von XVir-N-31 mit RGD war deutlich höher. Und am höchsten war die Infektionsrate von AdDeloYB1 mit Fiber 35, da T24-Zellen den CD46-Rezeptor deutlich exprimieren (Gaggar et al., 2003; Gotoh et al., 2013; Zhao et al., 2011). AdWT replizierte also am stärksten, jedoch konnten die onkolytischen Adenoviren dieses Defizit durch eine deutlich bessere Infektion ausgleichen. Da Blasenkarzinomzellen und viele andere Tumore eine hohe CD46-Expression aufweisen (Pesonen et al., 2011; Zhao et al., 2011), würde die Ausstattung des onkolytischen Virus XVir-N-31 mit Fiber35 wahrscheinlich zu einer Steigerung Infektionsrate von Tumorzellen führen.

Zur Beurteilung und Verdeutlichung der Zelllyse sowie der zytotoxischen Aktivität der Viren wurden lichtmikroskopische Bilder und SRB-Assays angefertigt (Abb. 4. 7 und 4. 8). Die Viren XVir-N-31 und AdDeloYB1 lysierten die Zelllinien T24, J82 und UM-UC 3 effektiv zwischen 1 und 50 MOI. Unterschiede ergaben sich vor allem beim Vergleich mit AdWT, die am ehesten mit dem unterschiedlichen CAR-Status und der unterschiedlichen Infektionsrate zu erklären sind. Auch Ad-dl703, welches als Negativkontrolle dient, führte bei den höchsten Konzentrationen zur Zelllyse. Dies fällt besonders in der photometrischen Auswertung auf, denn wenn man die gescannten SRB-Platten betrachtet, ist der Effekt verhältnismäßig gering.

In den Versuchen zur Zytotoxizität und den Viruskopien im Zelllysate zeigte sich eine Korrelation zum CAR-Status bzw. der Infektionsrate der Zelllinien. T24-Zellen wurden von AdDeloYB1 am stärksten und von XVir-N-31 stärker als von AdWT lysiert (Abb. 4. 7 und 4. 8). Für UM-UC 3-Zellen hingegen ist eine hohe CAR- und eine niedrigere CD46-Expression beschrieben (Gotoh et al., 2013). Diese wurden daher von AdWT deutlich stärker lysiert, als von AdDeloYB1 (Abb. 4. 7 und 4. 8). Bei T24-Zellen bestand zudem eine Korrelation von Infektionsrate und Hexon-Kopien im Tumorzelllysate. Nach AdDeloYB1-Infektion fanden sich ca. 8x mehr Hexon-Kopien als nach AdWT-Infektion im Zellkulturüberstand (Abb. 4. 10).

Neben der Replikation und der Zelllyse ist die Bildung neuer infektiöser Partikel wichtig, um benachbarte Zellen zu infizieren. Ad-dl703 bildete sehr geringe bis nicht nachweisbare Partikelzahlen in den Blasenkarzinomzelllinien J82 und T24. AdWT hingegen produzierte wie erwartet die meisten infektiösen Partikel, während XVir-N-31 und AdDeloYB1 etwas weniger infektiöse Partikel bildeten als AdWT (Abb. 4. 9).

Es lässt sich diskutieren, warum einerseits in den Tumorzellen mehr infektiöse Partikel von AdWT als von XVir-N-31 oder AdDeloYB1 gebildet wurden (Abb. 4. 9) und sich andererseits mehr Virus-Kopien von XVir-N-31 bzw. AdDeloYB1 als von AdWT im Zellkulturüberstand befanden (Abb. 4. 10). Erstens unterscheiden sich die Methoden zur Virusquantifizierung. Für die Bestimmung der infektiösen Partikel wurde ein Titertest mit Anti-Hexon-Antikörpern auf HEK293-Zellen durchgeführt. So gelingt einerseits der Nachweis von viralen Strukturproteinen, andererseits weisen HEK293-Zellen eine hohe CAR-Expression auf (Dmitriev et al., 1998), weshalb die Infektion von AdWT hier am effektivsten ist und nach 48 Stunden deshalb mehr AdWT- als XVir-N-

31- oder AdDeloYB1-Partikel in HEK293-Zellen nachweisbar sind. Bei der qPCR werden die Hexon-Kopien gemessen, diese müssen jedoch nicht als infektiöse Partikel vorliegen. So kann es sein, dass die Infektion von AdDeloYB1 in T24-Zellen sehr wirkungsvoll ist und die DNA auch schnell wieder freigesetzt wird, aber die Replikation und Partikelbildung von AdWT effektiver abläuft. Im Vergleich zu XVir-N-31 enthält AdDeloYB1 noch E3-ADP (Mantwill, 2017), was dazu führen könnte, dass die replizierte DNA bei der ADP induzierten Zelllyse freigesetzt wird, aber die Partikel noch nicht fertig formiert sind. AdWT weist zwar E3-ADP ebenfalls auf, hier wird die Apoptose aber durch E1B19K vorerst gehemmt (Han et al., 1996). Zweitens wurden zur Durchführung des Titerstes alle Zellen geerntet und diese mittels Einfrieren und Auftauen zerstört, sodass auch die Viren aus dem Inneren der adhären Zellen freigesetzt wurden. Für die Messung der Hexon-Kopien wurde lediglich der Überstand mit den schwimmenden Zellen abgenommen, um hieraus die DNA zu isolieren.

Zusammenfassend replizieren die onkolytischen Adenoviren XVir-N-31 und AdDeloYB1 effektiv in den Blasenkarzinomzelllinien, bilden neue Partikel und lysieren die Zellen. Unterschiede ergeben sich im Vergleich der unterschiedlichen Zelllinien und im Vergleich mit dem Adenovirus Wildtyp, welches als Positivkontrolle dient.

### 5.3 Onkolytische Adenoviren führen zur Freisetzung von HSP70 und HMGB-1

Effektive Replikation und Zelllyse sind die Voraussetzungen der onkolytischen Virotherapie. Anzumerken ist aber, dass das Hauptaugenmerk der Forschung zur Virotherapie vermehrt auf der Induktion und Verstärkung einer Immunantwort gegen den Tumor liegt (Bartlett et al., 2013; Guo et al., 2017; Lichty et al., 2014). Da bei der Applikation von Viren nie alle Tumorzellen infiziert werden, sind neben der direkten Onkolyse andere Mechanismen notwendig, um nicht-infizierte Zellen bzw. einen kompletten Tumor zu zerstören. Hierbei ist entscheidend, ob die Viren einen immunogenen Zelltod verursachen, der dann zu einer Immunantwort gegen Tumorzellen führen kann (Guo et al., 2014).

Es wird kontrovers diskutiert, welche Art des Zelltods (onkolytische) Adenoviren verursachen. Adenovirale Proteine haben pro- und anti-apoptotische Funktionen.

E1B19K fungiert als Bcl-2 Homolog und inhibiert den Zelltod, E1B55K und E4orf6 haben sowohl pro- als auch anti-apoptotische Funktionen und E3 ADP hingegen induziert die Zelllyse (Braithwaite et al., 2001). Onkolytische Adenoviren führen zur Apoptose (Boozari et al., 2010), zur Autophagie (Ito et al., 2006; H. Jiang et al., 2011), zur Nekrose und häufig zu Mischformen eines multimodalen immunogenen Zelltods (Inoue et al., 2014). Der immunogene Zelltod ist durch die Freisetzung und Präsentation der DAMPs High-Mobility Group Protein B-1 (HMGB-1), Calreticulin (CRT), Adenosintriphosphat (ATP) und Hitzeschockproteine (HSPs) charakterisiert (Inoue et al., 2014; Kroemer et al., 2013).

In der frühen Phase des immunogenen Zelltods werden Proteine wie HSP70 und CRT auf der Zelloberfläche exprimiert und freigesetzt. Sie binden an CD91- und Toll-like-Rezeptoren (TLR) auf dendritischen Zellen, welche dadurch aktiviert werden, Tumor-Antigene aufnehmen und diese präsentieren können (Asea et al., 2000; Basu et al., 2001; Vega et al., 2008). Die physiologische Funktion von HSP besteht intrazellulär in der korrekten Faltung von Proteinen; sie werden in vielen Stresssituationen stark exprimiert (De Maio, 1999). Auch das adenovirale Protein E1A führt zu einer erhöhten Synthese von HSP70 (Nevins, 1982), wobei E1A13S wichtiger für die Induktion der Transkription ist (Simon et al., 1987). In Abbildung 4. 12 und 4. 13 wird deutlich, dass HSP70 sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene durch AdWT hochreguliert wird, nicht jedoch durch die E1A-deletierten Viren Ad-dl703, XVir-N-31 und AdDeloYB1. Neben den intrazellulären Funktionen zur Verbesserung der Stresstoleranz sind für extrazelluläres oder membrangebundenes HSP70 wichtige immunologische Funktionen beschrieben. So wird durch HSP70 einerseits die Antigenpräsentation auf antigenpräsentierenden Zellen gefördert, was zu einer tumorspezifischen CD8+ T-Zell-Antwort führt. Andererseits induziert HSP70 eine Antwort natürlicher Killerzellen (NK-Zellen), welche Tumorzellen Granzym B-vermittelt abtöten können (Multhoff, 2007; Radons et al., 2005). Verschiedene Publikationen haben gezeigt, dass HSP70 nicht nur passiv bei der Zelllyse freigesetzt wird, sondern aktiv sezerniert wird. Diese aktive Freisetzung erfolgt bevorzugt in Exosomen und nicht als freies Protein (Hightower et al., 1989; Lancaster et al., 2005a, b; Multhoff, 2007; Santos et al., 2017).

In der späteren Phase des immunogenen Zelltods wird das DNA-bindende Protein HMGB-1 freigesetzt, welches unter anderem an TLR-4 bindet und so ebenfalls die



Antigenpräsentation auf dendritischen Zellen fördert (Apetoh et al., 2007; Scaffidi et al., 2002).

Untersucht wurde die Freisetzung von HMGB-1 und HSP70 im Zellkulturüberstand mittels ELISA und von HSP70 auch mittels Western Blot drei Tage nach Infektion von drei Blasenkarzinomzelllinien. Ich stellte in fast allen Ansätzen eine gesteigerte Freisetzung beider Proteine nach der Infektion mit XVir-N-31 und AdDeloYB1 im Vergleich zur Infektion mit AdWT fest (Abb. 4. 11 und 4. 12). Die Höhe der Freisetzung korrelierte nicht direkt mit der Stärke der Zelllyse, denn z.B. waren UM-UC 3- und J82-Zellen durch AdWT deutlich stärker lysiert als durch AdDeloYB1, bei dessen Infektion sich jedoch um ein Vielfaches mehr HSP70 bzw. HMGB-1 im Überstand befanden. Auch andere Arbeiten zeigten keine signifikante Freisetzung der DAMPs HMGB-1, ATP und CRT nach AdWT-Infektion (Diaconu et al., 2012; Tazawa et al., 2017). Dies sind Hinweise darauf, dass AdWT die Freisetzung der immunogenen Proteine unterdrückt, während die Freisetzung durch XVir-N-31 und AdDeloYB1 gefördert wird. Vereinzelt, jedoch insgesamt nicht eindeutig, ließ sich die Freisetzung durch die Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin steigern. Für Anthrazyklinen wie Doxorubicin ist beschrieben, dass sie potent den ICD induzieren (Fucikova et al., 2011). Außerdem führen Chemotherapeutika zu einer erhöhten nukleären Lokalisation von YB-1 (Bargou et al., 1997), was die Replikation der YB-1 abhängigen Viren verbessert (Mantwill et al., 2006). Auffällig war auch, dass sich nach Infektion mit AdDeloYB1 in fast jedem Ansatz die höchsten HSP70 und HMGB-1 Konzentrationen fanden. Besonders deutlich wird die Freisetzung von HSP70 bei Betrachtung der Western Blots drei Tage nach Infektion der Zelllinien T24 und J82: Hier führt AdWT zu einer gesteigerten intrazellulären Konzentration von HSP70. Extrazellulär findet sich jedoch im Gegensatz zur Infektion mit den onkolytischen Adenoviren kein HSP70.

Eine Interaktion von YB-1 mit der HSP70-mRNA ist beschrieben (Tanaka et al., 2014). In unseren Experimenten hatte eine erhöhte Konzentration von YB-1 72 Stunden nach AdDeloYB1-Infektion jedoch keine Steigerung der intrazellulären HSP70-Konzentration zur Folge (Abb. 4. 13), sondern eher eine intrazelluläre Verringerung und extrazelluläre Freisetzung (Abb. 4. 12). Es wurde gezeigt, dass das adenovirale Protein VII, welches Adenovirus-DNA bindet, an HMGB-1 binden kann und dessen Freisetzung und inflammatorische Eigenschaften hemmt (Avgousti et al., 2016). E1A interagiert mit Protein VII (Johnson et al., 2004), ob jedoch die veränderte E1-Region der

onkolytischen Viren die Ursache für die verstärkte Freisetzung ist, kann nur spekuliert werden. Sicher hingegen ist, dass die adenoviralen Proteine E1 und E3, die zumindest teilweise bei den onkolytischen Adenoviren deletiert sind, zu einer Suppression der Immunantwort führen (Schaack et al., 2004; Schagen et al., 2004).

Die erhöhte Freisetzung von HSP70 und HMGB-1 aus Blasenkarzinomzellen durch die onkolytischen Adenoviren XVir-N-31 und AdDeloYB1 spricht für die Induktion eines immunogenen Zelltods und zeigt, dass sie ein höheres immunogenes Potential als AdWT haben. Diese Erkenntnis ist relevant, da ein immunogener Zelltod einen größeren Therapieerfolg bedeuten kann und eine Kombinationstherapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren rechtfertigt (siehe 5.7) (Guo et al., 2014; Lichty et al., 2014).

#### 5.4 Freisetzung von YB-1 durch onkolytische Adenoviren

Frye et al. konnten zeigen, dass YB-1 aktiv sezerniert wird und zwar ähnlich wie das immunologische Protein HMGB-1 auf einem nicht-klassischen Weg (Frye et al., 2009). Erhöhte Konzentrationen von YB-1 finden sich bei Patienten mit Sepsis (Hanssen et al., 2013) und für extrazelluläres YB-1 sind Funktionen bei inflammatorischen Erkrankungen, wie der Förderung der Zellproliferation und der Zellmigration, beschrieben (Frye et al., 2009). YB-1 ist an der Regulation des inflammatorischen Cytokins CCL5 in Makrophagen und T-Zellen (Raffetseder et al., 2009) und an der Stabilisierung der IL-2-mRNA beteiligt (C. Y. Chen et al., 2000). Eine Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass YB-1 in einem Mausmodell zum Neuroblastom als tumorspezifisches Antigen fungiert und an der Induktion einer T-Zell-Antwort beteiligt ist (Zheng et al., 2009; Zheng et al., 2012). Diese Hinweise auf immunologische und extrazelluläre Funktionen weckten unser Interesse und so wollten wir feststellen, ob die onkolytischen Viren in der Lage sind YB-1 freizusetzen. Die Infektion mit AdDeloYB1 führte zu einer deutlichen Überexpression von YB-1 in den Blasenkarzinomzellen und zu einem deutlichen Nachweis von YB-1 im Zellkulturüberstand im Western Blot (Abb. 4. 12). Es ergaben sich hierbei Hinweise, dass das YB-1 im Zellkulturüberstand nicht ausschließlich die Folge der Zelllyse war: Denn auch bei der Infektion mit XVir-N-31 war eine leichte Bande im Überstand aller Zelllinien sichtbar, während dies nach der Infektion mit AdWT nicht der Fall war,

obwohl die Zelllyse vergleichbar war. Bei UM-UC 3-Zellen war die Zelllyse nach AdWT-Infektion im Vergleich zu den anderen Viren sogar am stärksten. T24-Zellen infizierte ich in jenem Versuch zum Ausgleich der schlechteren Infektion und schlechteren Lyse durch AdWT mit 50 MOI, während ich sie mit XVir-N-31 mit 25 MOI und mit AdDeloYB1 mit 15 MOI infizierte. Außerdem konnte ich YB-1 in der, nach Virusinfektion isolierten Exosomenfraktion, nachweisen. Ob die Sekretion jedoch ausschließlich aktiv abläuft, blieb in dieser Arbeit unbeantwortet.

## 5.5 Freisetzung der Proteine in Exosomen/Mikrovesikeln

Die Arbeitsgruppe um Frye beschrieb, dass die Sekretion von YB-1 in Mikrovesikeln geschieht (Frye et al., 2009) und eine andere Gruppe konnte zeigen, dass sich YB-1 in Exosomen im Überstand von HEK293-Zellen befindet (Kossinova et al., 2017).

Das in Exosomen freigesetzte HSP70 aktiviert das angeborene und erworbene Immunsystem (Lv et al., 2012; Radons et al., 2005; Vega et al., 2008). Um die Freisetzung von YB-1 und von HSP70 zu analysieren, isolierte ich Exosomen aus dem Zellkulturüberstand nach Virusinfektion.

Exosomen sind Membranvesikel von 50 - 100 nm, die im Zellinneren aus multivesikulären Endosomen entstehen und der aktiven Sekretion von Proteine, mRNA und microRNA dienen. Im Unterschied dazu sind Mikrovesikel Membranabschnürungen mit einer Größe von 100 - 1000 nm (Thery et al., 2009). Beide dieser extrazellulären Vesikel sind an der interzellulären Kommunikation beteiligt. Generell ist die Rolle von Exosomen in der Tumorbilogie umstritten: Einerseits führen sie zur Antigenpräsentation und besonders, wenn sie HSP70 enthalten, zur Aktivierung von Makrophagen und NK-Zellen. Andererseits haben sie auf unterschiedlichen Ebenen inhibitorische Effekte auf Immunzellen und können zur Angiogenese sowie zur Therapieresistenz bei Tumoren führen (Minciacchi et al., 2015; Thery et al., 2009).

Zur Isolation von Exosomen sind mehrere Verfahren etabliert, die hauptsächlich auf Ultrazentrifugation oder Ultrafiltration beruhen und verschiedene kommerzielle „Exosomen-Isolations“ Kits sind verfügbar. Dennoch ist die Isolation einer reinen Exosomenfraktion nicht wirklich praktikabel, da es bei diesen Verfahren zur

Präparation von heterogenen Vesikeln kommen kann (Lobb et al., 2015; Minciacchi et al., 2015; They et al., 2009). Zum Nachweis der Exosomen werden unter anderem die Elektronenmikroskopie, dynamische Lichtstreuung (DLS) und Western Blotting auf die typischen Exosomen-Marker CD63, CD81, CD9 und TSG101 durchgeführt (Erdbrugger et al., 2016; They et al., 2006).

Ich isolierte Exosomen drei Tage nach Virusinfektion mit einem kommerziellen Kit aus dem Zellkulturüberstand und analysierte diese mittels Western Blot. Schon im BCA-Assay fiel auf, dass bei der Isolation nach Infektion mit Ad-dl703 keine und nach Infektion mit AdWT wenig Proteine messbar war. Im Western Blot zeigte sich bei J82- und T24-Zellen, dass nach der Infektion mit XVir-N-31 und AdDeloYB1 der Exosomenmarker CD63 positiv war und keine Kontamination mit zytoplasmatischen Proteinen vorlag, da bei Calnexin keine Bande sichtbar war (Abb. 4. 12). HSP70 zeigte sich deutlich nachweisbar. Da HSP70 häufig in Exosomen vorkommt und wird es auch teilweise als Exosomenmarker gesehen (Erdbrugger et al., 2016; They et al., 2006). Darüber hinaus ließ sich auch YB-1 in dieser Fraktion nach AdDeloYB1-Infektion deutlich und nach XVir-N-31-Infektion schwach detektieren. Nach AdWT-Infektion ließen sich weder YB-1, HSP70 und auch kein CD63 detektieren, was gegen eine Exosomensekretion spricht. Wie schon anhand der ELISA-Ergebnisse zur HSP70- und HMGB-1-Freisetzung vermutet, spricht dies für eine andere Art des Zelltods durch die onkolytischen Viren als durch AdWT.

Des Weiteren isolierte ich Exosomen nach Virusinfektion aus dem Zellkulturüberstand nach einem etablierten Ultrazentrifugationsprotokoll (Abb. 3. 1) (They et al., 2006). Diese wurden dann mittels DLS und Elektronenmikroskopie analysiert. In diesen Versuchen waren bei den mit Ad-dl703 infizierten Zellen weder Proteine im BCA-Assay noch Exosomen in der DLS oder der TEM nachweisbar. In der DLS zeigte sich ein durchschnittlicher Durchmesser von 180 - 250 nm und eine leicht heterogene Gruppe an Vesikeln, erkennbar an PDI-Werten (Polydispersity Index) zwischen 0,34 und 0,41. PDI-Werte von kleiner als 0,1 sprechen für eine sehr homogene Lösung, während Werte über 0,7 auf sehr starke Größenunterschiede hinweisen (Malvern\_Instruments, 2011). Nicht monodisperse Lösungen müssen vorsichtig interpretiert werden (Erdbrugger et al., 2016). Denn die Lichtstreuung reagiert proportional zur sechsten Potenz der Partikelgröße und daher sehr sensibel auf große Partikel, sodass wenige große Partikel den durchschnittlichen Durchmesser stark erhöhen, obwohl der Großteil

der Partikel kleiner ist (Erdrbrugger et al., 2016). In der Elektronenmikroskopie zeigten sich Vesikel, die in Größe und Form mit Exosomen vereinbar waren. Es waren jedoch auch andere Partikel darstellbar: Darunter Vesikel, die größer als 100 nm waren sowie einzelne und zusammenklebende Viren (Abb. 1. 5). Diese erklären die Werte in der DLS über 100 nm.

In der Zusammenschau von Western Blot, TEM und DLS zeigt sich, dass sich im Zellkulturüberstand nach Infektion von Blasenkarzinomzellen mit den onkolytischen Adenoviren Exosomen und Mikrovesikel befanden und dass HSP70 in Exosomen freigesetzt wurde, während es nach AdWT-Infektion zu keiner signifikanten Exosomensekretion kam. Dies ist bedeutend, da exosomales HSP70 zu einer verstärkten Immunzellstimulation und Antitumor-Immunantwort führen kann (Multhoff, 2007; Vega et al., 2008; Wang et al., 2017).

Nach unseren Ergebnissen wurde auch YB-1 in Vesikeln freigesetzt, was mit anderen Publikationen vereinbar ist (Frye et al., 2009; Kossinova et al., 2017). Durch weitere Versuche muss noch beantwortet werden welche Rolle dem in Vesikeln freigesetzten YB-1 in der Tumorbilogie bzw. der Tumورimmunologie zukommt. Ob es sich bei den extrazellulären Vesikeln um Exosomen oder Mikrovesikel handelt, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Es wird jedoch von einigen Autoren angezweifelt, ob die Unterscheidung zwischen Exosomen und Mikrovesikeln technisch mit den aktuellen, etablierten Methoden sicher möglich ist und auch ob sie nötig ist (Caivano et al., 2017).

## 5.6 PBMC setzen IFN $\gamma$ nach Ko-Kultivierung mit virusinfizierten Tumorzellen frei

Tumorzellen produzieren Antigene und sollten deshalb physiologischerweise durch das Immunsystem erkannt und zerstört werden. Tumorzellen haben jedoch Mechanismen entwickelt, die Antigenpräsentation zu unterdrücken, die Reaktion von Lymphozyten zu hemmen und eine immunsuppressive Umgebung zu schaffen. Sie werden deshalb häufig auch durch ein gesundes Immunsystem nicht erkannt und eliminiert (Lichty et al., 2014; Poschke et al., 2011). Ziel der onkolytischen Immuntherapien ist es das

Immunsystem für Tumorzellen zu sensibilisieren und Tumore durch körpereigene Immunzellen abzutöten (Guo et al., 2017).

Onkolytische Viren, die spezifisch in Tumorzellen replizieren und diese lysieren, können das immunsuppressive „Tumor Microenvironment“ durchbrechen, einen immunogenen Zelltod verursachen und so durch die Freisetzung von DAMPs sowie PAMPs zur Aktivierung von dendritischen Zellen führen (Guo et al., 2017; Pesonen et al., 2011). Aktivierte dendritische Zellen und andere antigenpräsentierende Zellen (APC) sind in der Lage Antigene zu präsentieren und so eine spezifische Immunantwort gegen den Tumor durch CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten zu induzieren. Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) und NK-Zellen führen dann zu einer IFN $\gamma$ -vermittelten Zelllyse (vgl. Abb. 1. 3) (Garg et al., 2015; Kroemer et al., 2013). Eine Immunreaktion kann nicht nur durch die Tumorlyse und tumorspezifische Antigene provoziert werden, sondern auch die Adenoviren selber wirken stark immunogen und induzieren eine unspezifische und zelluläre Immunantwort (Prestwich et al., 2009; Schagen et al., 2004). Zur Aktivierung der zellulären Immunantwort werden Viruspartikel und virale Proteine auf MHC-I-Komplexen auf der Oberfläche von APC für CD8+ T-Lymphozyten präsentiert, was zur Bildung spezifischer CTL führt. CD4+ T-Lymphozyten sind ebenso maßgeblich an einer Immunantwort gegen Adenoviren beteiligt (Olive et al., 2001). Antigene werden in MHC-II-Komplexen an CD4+ T-Lymphozyten präsentiert, die durch die Freisetzung von IL-2 und IFN $\gamma$  aus Th1-Zellen die Differenzierung zu CTL verstärken (Schagen et al., 2004). Daneben wird das angeborene Immunsystem durch Bindung von PAMPs an TLR aktiviert, was die Bildung von Chemokinen und Cytokinen induziert und eine lokale Inflammation verursacht (Takeuchi et al., 2009). Die Effektorzellen sind Granulozyten, NK-Zellen, Monozyten und Makrophagen, die einerseits zur Zytolyse und Verstärkung der Immunantwort führen und andererseits entscheidend für die Aktivierung der zellulären Immunantwort sind (Muruve, 2004). Dabei stellt die Expression von IFN $\gamma$  durch NK-Zellen und APC eine wichtige Brücke zwischen angeborener und zellulärer Immunantwort dar (Muruve, 2004; Schroder et al., 2004). Eine Immunreaktion gegen Adenoviren findet auch ohne die adenovirale Genexpression statt (Kafri et al., 1998; Muruve, 2004). Adenovirale Proteine können einer Immunantwort jedoch entgegenwirken: Z.B. kann E1A den IFN $\gamma$ -Signalweg inhibieren (Leonard et al., 1996), E3-14.7K greift in den Tumornekrosefaktor (TNF)-Signalweg ein (Wold et al., 1999) und E3-gp19K hemmt die Expression von MHC-I an der Zelloberfläche (Lichtenstein et al.,

2004). Durch die Deletion von E3 bei XVir-N-31 ist zu erwarten, dass dies unter anderem durch eine stärkere Expression von MHC-I auf Zellen zu einer verstärkten Immunantwort führt (Schagen et al., 2004).

Nachdem wir festgestellt hatten, dass die onkolytischen Adenoviren zu einer erhöhten Freisetzung von HSP70 und HMGB-1 führen, was für die Induktion eines immunogenen Zelltods spricht, beschäftigte uns die Frage, in wie weit die virale Onkolyse zu einer gesteigerten Immunreaktion führt. Hierfür sollte eine Methode zur Abschätzung der effektiven Immunantwort aus PBMC mittels IFN $\gamma$ -ELISA entwickelt werden. Auch Kleijn et al. bestimmten IFN $\gamma$  als Marker für die CD8+ T-Zell-Antwort und als Schlüssel-molekül bei Virusinfektionen in Versuchen mit dem Virus Delta24-RGD (Kleijn et al., 2014a).

Ich isolierte PBMC nach einem etablierten Protokoll mit Ficoll-Gradient. Bei PBMC handelt es sich um eine heterogene Gruppe an mononukleären Zellen des peripheren Blutes, deren Zusammensetzung individuell schwankt. Autissier et al. beschrieben eine durchschnittliche Zusammensetzung von ca. 60% CD3+ T-Lymphozyten (bestehend aus CD4+/- und CD8+/- Zellen), ca. 13% CD20+ B-Lymphozyten, ca. 14% CD16+ NK-Zellen, ca. 9% CD14+ Monozyten und ca. 1% dendritischen Zellen (Autissier et al., 2010). Zuerst schloss ich aus, dass die Viren AdWT und XVir-N-31 in PBMC replizieren (Abb. 4. 15). Ich kultivierte die gesamten isolierten PBMC ohne Auftrennung unter Zugabe von IL-2 und gab für 6 Tage das Tumorzelllysats hinzu. Bestandteile des inhomogenen Tumorzelllysats waren lysierte und nicht-lysierte Tumorzellen sowie Zelltrümmer, Proteine und Viren aus dem Zellkulturüberstand. Ich konnte im Zellkulturüberstand der PBMC nach der Inkubation mit virusinfiziertem Tumorzelllysats vs. Negativkontrollen (Ad-dl703, PBMC alleine und durch Einfrieren und Auftauen abgetötete Zellen) eine deutlich erhöhte IFN $\gamma$ -Konzentration messen. Es lässt sich diskutieren, ob die IFN $\gamma$ -Freisetzung durch die virale Zelllyse und die dabei freigesetzten Proteine HSP70, HMGB-1, YB-1 oder durch die viralen Partikel bedingt war. Eine direkte Korrelation zwischen der infektiösen Partikelzahl (Abb. 4. 9) bzw. den Hexon-Kopien im Tumorzelllysats (Abb. 4. 10) war ebenso wenig auszumachen wie eine direkte Korrelation zu der Freisetzung von HSP70 oder HMGB-1 (Abb 4. 11). Außerdem stellte ich, wie auch schon andere Gruppen (Olive et al., 2001), bei verschiedenen PBMC-Spendern starke Unterschiede der IFN $\gamma$ -Freisetzung fest. Aufgrund der Tatsache, dass nicht nur die PBMC eine heterogene Gruppe an Zellen darstellt, sondern auch das Tumorzelllysats eine inhomogene Lösung ist, ließ sich der exakte Auslöser für die

Aktivierung bzw. die IFN $\gamma$ -Freisetzung nicht klar ausmachen. Die Herausfilterung der Viren aus dem Tumorzelllysate war nicht möglich und auch eine Inaktivierung der Viren durch UV-Licht (Linden et al., 2007) wäre nicht zielführend gewesen, da die Immunantwort hauptsächlich gegen virale Proteine gerichtet ist (Kafri et al., 1998; Schagen et al., 2004).

Es wurde hier also ein Ansatz verfolgt, der von der Infektion zur Effektorantwort im Sinne einer IFN $\gamma$ -Freisetzung reicht. IFN $\gamma$  wird zum Großteil aus T-Lymphozyten freigesetzt, aber besonders in der frühen Phase von Infektionen erfolgt die Freisetzung auch aus NK-Zellen und aus APC, wie dendritischen Zellen (Schroder et al., 2004). Welche Zellpopulation IFN $\gamma$  überwiegend freisetzte, konnte hier nicht bestimmt werden. Wir legten jedoch ein weiteres Augenmerk auf die IFN $\gamma$ -Freisetzung aus unreifen dendritischen Zellen.

Dendritische Zellen sind APC und haben die Möglichkeit eine direkte Immunantwort zu erzeugen. Nach der Antigenaufnahme wandern sie in Lymphknoten, wo sie heranreifen und T-Lymphozyten aktivieren und Antigene präsentieren (Banchereau et al., 2000). Unreife dendritische Zellen lassen sich aus im Blut zirkulierenden CD14+ Monozyten unter Zugabe von GM-CSF und IL-4 generieren (Sallusto et al., 1994; Schaft et al., 2005), so wie ich es auch mit den PBMC durchführte. Ich kontrollierte jedoch nicht, ob es sich bei den adherenten Zellen ausschließlich um CD14+ Monozyten handelte. Nach der Zugabe der unreifen dendritischen Zellen zu infizierten Tumorzellen konnte ich auch in diesem Versuch erhöhte IFN $\gamma$ -Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollen messen (Abb. 4. 17).

Um die Immunreaktion genauer zu analysieren, bestünden verschiedene Möglichkeiten. Professionelle APC sezernieren zwar in geringem Maße IFN $\gamma$  (Schroder et al., 2004), wichtiger ist jedoch deren Möglichkeit Interleukin-12 zu sezernieren, sodass gegebenenfalls die Messung von IL-12 aus den dendritischen Zellen aufschlussreicher gewesen wäre. Denn IL-12 fördert die NK- und T-Zell-Proliferation und induziert die IFN $\gamma$ -Produktion aus diesen Zellen (Banchereau et al., 2000; Lee et al., 1998). Des Weiteren wäre eine Reifungsanalyse sinnvoll gewesen: Also ob die Infektion der onkolytischen Viren zur Reifung unreifer dendritischer Zellen zu reifen dendritischen Zellen führt. Reife dendritische Zellen exprimieren vermehrt CD80, CD83



und CD86 (Banchereau et al., 2000), was dann mittels Durchflusszytometrie untersucht werden kann (Moehler et al., 2005).

Denkbar wäre auch dendritische Zellen mit rekombinanten YB-1 zu stimuliert, um zu untersuchen, ob dieses als Antigen präsentiert werden kann, wie es von Zheng et al postuliert wird (Zheng et al., 2012). Weiterhin könnte man die Effektorpopulation nach CD4+ und CD8+ Lymphozyten und nach CD16+, CD56+ NK-Zellen auftrennen und diese mit stimulierten dendritischen Zellen ko-kultivieren, um deren IFN $\gamma$  bzw. auch Granzym B-Antwort zu messen (Moehler et al., 2005; O. Morales et al., 2012; Multhoff, 2007). Es wäre auch mögliche, die inflammatorischen Eigenschaften von HMGB-1 mit Glyzirrhizin zu inhibieren, um dessen Eigenschaften auf die Aktivierung von Immunzellen besser zu charakterisieren (Mollica et al., 2007). Neben IFN $\gamma$  werden viele weitere Cyto- und Chemokine ausgeschüttet, deren Freisetzung nach viraler Onkolyse verändert sein kann und die untersucht werden können. Zum Beispiel könnte die Bestimmung des Chemokins CCL5, welches durch YB-1 reguliert wird, Aufschluss darüber geben, ob YB-1 die Immunantwort steigern kann (Hanssen et al., 2013; Raffetseder et al., 2009). CCL5 ist an der Erzeugung von Killer-Zellen (Maghazachi et al., 1996), der Regulation von dendritischen Zellen (Dieu-Nosjean et al., 1999) und weiteren inflammatorischen Prozessen beteiligt und wird auch nach BCG-Immuntherapie bei Blasenkarzinom-Patienten vermehrt produziert (Reale et al., 2002).

Letztendlich zeigen unsere Versuche, dass die Infektion von Blasenkarzinomzellen mit den onkolytischen Adenoviren ebenso wie mit dem Adeovirus Wildtyp zu einer starken IFN $\gamma$ -Freisetzung aus PBMC führt. Dies ist relevant, da es für die Induktion einer Immunantwort spricht, die potentiell gegen Tumorzellen gerichtet ist (Pesonen et al., 2011). Außerdem hat IFN $\gamma$  eine Vielzahl von Funktionen die zu einer Tumorreduktion führen und eine Tumorentstehung verhindern können (Ikeda et al., 2002). Eine der Hauptfunktionen von IFN $\gamma$  ist die Hochregulation von MHC-I auf APC, was zu einer vermehrten und verbesserten Antigenpräsentation führt (Schroder et al., 2004). Die Beeinflussung einer Vielzahl von Immunzellen, insbesondere T-Lymphozyten, führt zu einer spezifischen inflammatorischen Reaktion. Daneben wirkt IFN $\gamma$  anti-proliferativ sowie pro-apoptotisch und kann die Angiogenese hemmen (Ikeda et al., 2002; Showalter et al., 2017; Zaidi et al., 2011). Es bleibt jedoch zu erwähnen, dass IFN $\gamma$  die Entwicklung von inhibitorischen regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>), die Resistenz von Tumoren gegen NK-Zellen und die Tumorprogression fördern kann (Zaidi

et al., 2011). Zu welchen Effekten IFN $\gamma$  letztlich führt, scheint individuell von der Tumorumgebung, der Signalintensität und weiteren Faktoren abhängig zu sein (Zaidi et al., 2011). Es werden *in vivo*-Versuche notwendig sein, um die Immunantwort gegen den Tumor zu evaluieren. Studien zu anderen onkolytischen Adenoviren zeigen jedoch, dass das Immunsystem und die Immunantwort gegen den Tumor einer der entscheidenden Faktoren der onkolytischen Virotherapie ist (Kleijn et al., 2014a, b; Niemann et al., 2017).

## 5.7 Indikation zur Kombination von Virotherapie und Immuncheckpoint-Blockade

Adenovirus-Infektionen und IFN $\gamma$  führen zu einer Hochregulation von PD-L1 auf Tumorzellen (Blank et al., 2004; Muhlbauer et al., 2006). PD-L1 wird vermehrt von Tumorzellen und tumorassoziierten Immunzellen exprimiert und bindet an den Rezeptor PD-1, welcher auf Immunzellen exprimiert wird. Die Interaktion von PD-1 mit PD-L1 inhibiert die T-Zell-Antwort und führt zu einer immunsuppressiven Umgebung von Tumorzellen (Bidnur et al., 2016; Blank et al., 2005; Pardoll, 2012). Beim Blasenkarzinom ist eine hohe PD-L1 Expression mit einer schlechteren Prognose und einem höheren Tumorstadium assoziiert (Faraj et al., 2015; Nakanishi et al., 2007). Eine konstitutive Expression von PD-L1 wurde auch für Blasenkarzinomzellen beschrieben (Lyon et al., 2014) und steht im Einklang mit meinen Experimenten zur PD-L1 Expression auf den Zelllinien J82, T24 und UM-UC 3 (Abb. 4. 18).

Immuncheckpoint-Inhibitoren, wie PD-L1 Antikörper, haben Eingang in die Therapie des metastasierten Blasenkarzinoms und anderer fortgeschrittener Karzinome gefunden (Bellmunt et al., 2017; Witjes et al., 2017) und werden in vielen klinischen Studien als Einzel- oder Kombinationstherapie erprobt (Swaika et al., 2015). Insbesondere wird auch, wie unter 1.3.2 beschrieben, die Kombinationstherapie aus onkolytischer Virotherapie und Immuncheckpoint-Blockade erforscht. Die lokale Virotherapie kann in Kombination mit Immuncheckpoint-Inhibitoren zu synergistischen Effekten bei der Immunantwort und zu einem systemischen Ansprechen führen (vgl. Abb 1. 4)(Guo et al., 2017; Hamid et al., 2017; Lichty et al., 2014). So hatte das Virus Talimogene Laherparepvec in Kombination mit dem CTLA-4-Antikörper Ipilimumab

sowie in Kombination mit dem PD-1-Antikörper Pembrolizumab in klinischen Studien größere Effekte bei der Therapie des nicht-resezierbaren Melanoms als die Monotherapien (Long et al., 2016; Puzanov et al., 2016).

Die Kombinationstherapie aus Immuncheckpoint-Blockade und dem YB-1 abhängigen onkolytischen Virus XVir-N-31 wird besonders dadurch gerechtfertigt, dass XVir-N-31 einen immunogenen Zelltod verursacht. Denn so werden bei der Lyse der Tumorzellen HMGB-1 und exosomales HSP70 sowie tumorspezifische Antigene freigesetzt und können eine spezifische Immunantwort induzieren. Ein zusätzlich verabreichter Immuncheckpoint-Inhibitor würde die Immunantwort gegen Tumorzellen vermutlich verstärken und erhalten (Hamid et al., 2017).

In unserem Versuch zur Kombinationsbehandlung aus PD-L1-Inhibitor und dem onkolytischen Virus XVir-N-31 sowie dem Adenovirus Wildtyp zeigte sich ein Anstieg der IFN $\gamma$ -Freisetzung aus PBMC sowohl im Vergleich zur Isotypkontrolle des Antikörpers als auch im Vergleich zur Behandlung mit dem PD-L1-Inhibitor alleine (Abb. 4. 19). Der Anstieg wurde besonders 48 Stunden nach Beginn der Ko-Kultivierung und Kombinationsbehandlung deutlich. Diese Ergebnisse zeigen, dass PD-L1, welches auf T24-Zellen exprimiert wird, anscheinend die IFN $\gamma$ -Antwort von Immunzellen hemmt. Diese Hemmung kann jedoch mit einem PD-L1-Antikörper aufgehoben werden und könnte durch die Verstärkung einer Antitumor-Immunantwort synergistisch mit der YB-1 basierten onkolytischen Virotherapie gegen Tumorzellen wirken (Lichty et al., 2014; Niemann et al., 2017).

## 5.8 Ausblick zur YB-1 basierten onkolytischen Virotherapie für das Blasenkarzinom

Unsere *in vitro* erhobenen Daten zeigen eine effektive Infektion und Replikation der getesteten YB-1 abhängigen onkolytischen Adenoviren in Blasenkarzinomzelllinien. Die Lyse der Zellen wurde mit einer angemessenen MOI erreicht und es wurden die immunogenen Proteine HMGB-1 und exosomales HSP70 freigesetzt. Bei der Ko-Kultivierung der infizierten Blasenkarzinomzellen mit PBMC kam es zur Freisetzung von IFN $\gamma$ . Diese Ergebnisse geben Anlass die Erforschung der YB-1 basierte onkolytische Virotherapie für das Blasenkarzinom weiter voranzutreiben.

Zellkulturversuche reichen jedoch nicht aus, um die vielfältigen pathophysiologischen Prozesse und Interaktionen eines Tumors abzubilden, sodass für die weitere Validierung *in vivo*-Versuche nötig sind. Aktuell wird das Ansprechen von XVir-N-31 in einem orthotopen Blasenkarzinom-Mausmodell in unserem Labor evaluiert; eine Publikation dazu ist in Arbeit. Da jedoch bei der Injektion der Viren in einen Tumor nicht alle Zellen infiziert werden, kann keine komplette Tumorlyse erwartet werden, sondern lediglich eine partielle Tumorremission. Um ein volles Ansprechen auf die Therapie mit onkolytischen Adenoviren zu erreichen, sind wahrscheinlich Kombinationen mit Chemo- und Immuntherapie notwendig (Hamid et al., 2017; R. Holzmüller et al., 2011; Woller et al., 2011; Zamarin et al., 2014). In der nächsten Zeit ist es entscheidend eine geeignete Kombinationstherapie zur YB-1 basierten Virotherapie zu finden, um das Potential der Lyse und der Replikation der Viren auszuschöpfen bzw. zu steigern und das immunogene Potential zu nutzen und weiter auszubauen.

Ein funktionierendes Immunsystem ist zudem notwendig, damit onkolytische Viren ihre komplette Wirkung gegen Tumore entfalten können (Guo et al., 2017; Hamid et al., 2017; Kleijn et al., 2014a). Da momentan die Antitumor-Immunantwort im Mittelpunkt der Forschung steht und für den Therapieerfolg relevanter zu sein scheint, als eine noch effektivere Replikation oder Zelllyse (Guo et al., 2017; Lichty et al., 2014), ist die Entwicklung immunkompetenter Tiermodelle zur Untersuchung der onkolytischen Virotherapie von besonderem Interesse. Zur Evaluation des Therapieansprechens und der Immunreaktionen kommt zum Beispiel ein humanisiertes Mausmodell infrage: immundefiziente Mäuse tolerieren die Transplantation von humanen Tumorzellen und nach der Applikation von peripheren Blutstammzellen können die Immunreaktion gegen den Tumor, die Viren sowie die Effekte der onkolytischen Virotherapie abgebildet und analysiert werden (Dranoff, 2011; Pearson et al., 2008). Neben möglichen Risiken und Nebenwirkungen der Virotherapie werden in Zukunft die Immunantwort und Kombinationstherapien zur Steigerung der Effektivität *in vivo* evaluiert.

Via transurethrale Instillation der onkolytischen Viren in die Blase ließen sich hohe lokale Viruskonzentrationen erreichen (J. Burke, 2010). Viren scheinen außerdem ein geeignetes Therapeutikum für das Blasenkarzinom zu sein, da besonders immunogene Tumore wie das Blasenkarzinom auf die Behandlung mit Immuntherapien ansprechen

(Kates et al., 2016; Lawrence et al., 2013). Die bisherigen Daten zeigen, dass die YB-1 basierte Virotherapie eine vielversprechende Behandlungsmöglichkeit darstellt und rechtfertigen eine klinische Evaluation zur Behandlung des Blasenkarzinoms.

## 6 Zusammenfassung

Die Therapie sowie die Prognose des Blasenkarzinoms sind seit langer Zeit unverändert, was die Entwicklung neuer Therapiemodalitäten notwendig macht. Die onkolytische Virotherapie stellt ein vielversprechendes Therapiekonzept dar und hat in klinischen Studien gute Ergebnisse bei einem akzeptablen Nebenwirkungsprofil gezeigt. Neben der direkten Onkolyse ist die Induktion eines immunogenen Zelltods und einer Immunantwort gegen Tumore elementarer Bestandteil der Therapie, um die Ansprechraten zu maximieren und Tumore komplett zu lysieren. Die untersuchten onkolytischen Adenoviren replizieren nur, wenn sich das multifunktionale Onkoprotein YB-1 im Zellkern befindet und dort die virale Replikation ermöglicht. YB-1 ist bei einer Vielzahl von Tumoren überexprimiert und nimmt als Transkriptions- und Translationsfaktor eine zentrale Rolle in der Tumorbiologie ein. Beim Blasenkarzinom korreliert die YB-1-Expression mit der Invasivität, der Metastasierung, dem Tumorstadium und der Prognose, was es zu einem attraktiven Ziel für die Therapie macht. In dieser Arbeit wurde die Effektivität YB-1 abhängiger onkolytischer Adenoviren in Blasenkarzinomzellen untersucht. Dabei wurde besonders auf immunologische Aspekte der Zelllyse und die dabei freigesetzten Proteine eingegangen. Außerdem sollte die Immunreaktion von PBMC auf die Virotherapie untersucht werden.

Ich zeigte für die YB-1 abhängigen onkolytischen Adenoviren mittels qPCR eine, im Vergleich zum Adenovirus Wildtyp weniger starke, aber effektive Replikation in Blasenkarzinomzellen. SRB-Assays bestätigten eine ausgeprägte Lyse verschiedener Zelllinien durch die Viren. Die Lyse korrelierte mit dem CAR-Status der Zelllinien und somit mit der Infektionsrate der Viren. Mittels ELISA und Western Blotting stellte ich fest, dass nach der Infektion mit onkolytischen Adenoviren bei der Lyse HSP70 und HMGB-1 freigesetzt wurde, während dies beim Adenovirus Wildtyp weniger ausgeprägt der Fall war. Dies spricht für die Induktion eines immunogenen Zelltods durch die onkolytischen Adenoviren. In der Tat ließen sich bei der Ko-Kultivierung von virusinfizierten Blasenkarzinomzellen mit PBMC hohe Interferon-gamma Konzentrationen mittels ELISA im Zellkulturüberstand nachweisen.

Tumore entkommen dem Immunsystem unter anderem durch die Expression von Immuncheckpoint-Molekülen, die eine zelluläre Antitumor-Immunantwort inhibieren. Auch Blasenkarzinomzellen exprimieren diese inhibitorischen Liganden. Durch die Kombination aus Immuncheckpoint-Inhibitor und onkolytischer Virotherapie konnte die IFN $\gamma$ -Freisetzung aus PBMC gesteigert werden. Die Kombination aus Virotherapie und Immuncheckpoint-Inhibitor wird vermutlich auch in der Zukunft eine wichtige Rolle spielen, um ein gesteigertes und systemisches Ansprechen gegen Tumore zu erreichen.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit *in vitro*, dass sich YB-1 abhängige onkolytische Viren aufgrund ihrer effektiven Replikation und Lyse sowie wegen des immunogenen Potentials zur Therapie des Blasenkarzinoms eignen. Nach weiterer Analyse in einem immunkompetenten humanisierten Tiermodell, um den therapeutischen Effekt und die Immunantwort zu validieren, rechtfertigen die Daten eine klinische Studie mit einem YB-1 abhängigen onkolytischen Virus.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abdollah, F., Gandaglia, G., Thuret, R., Schmitges, J., Tian, Z., Jeldres, C., Passoni, N. M., Briganti, A., Shariat, S. F., Perrotte, P., Montorsi, F., Karakiewicz, P. I., & Sun, M. (2013). Incidence, survival and mortality rates of stage-specific bladder cancer in United States: a trend analysis. *Cancer Epidemiol*, *37*(3), 219-225.
- Aghi, M., & Martuza, R. L. (2005). Oncolytic viral therapies - the clinical experience. *Oncogene*, *24*(52), 7802-7816.
- Amin, M. B. (2009). Histological variants of urothelial carcinoma: diagnostic, therapeutic and prognostic implications. *Mod Pathol*, *22 Suppl 2*, S96-s118.
- Anastasiadis, A., & de Reijke, T. M. (2012). Best practice in the treatment of nonmuscle invasive bladder cancer. *Ther Adv Urol*, *4*(1), 13-32.
- Andorsky, D. J., Yamada, R. E., Said, J., Pinkus, G. S., Betting, D. J., & Timmerman, J. M. (2011). Programmed death ligand 1 is expressed by non-hodgkin lymphomas and inhibits the activity of tumor-associated T cells. *Clin Cancer Res*, *17*(13), 4232-4244.
- Andtbacka, R. H., Kaufman, H. L., Collichio, F., Amatruda, T., Senzer, N., Chesney, J., Delman, K. A., Spitler, L. E., Puzanov, I., Agarwala, S. S., Milhem, M., Cranmer, L., Curti, B., Lewis, K., Ross, M., Guthrie, T., Linette, G. P., Daniels, G. A., Harrington, K., Middleton, M. R., Miller, W. H., Jr., Zager, J. S., Ye, Y., Yao, B., Li, A., Doleman, S., VanderWalde, A., Gansert, J., & Coffin, R. S. (2015a). Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol*, *33*(25), 2780-2788.
- Andtbacka, R. H. I., Curti, B. D., Kaufman, H., Daniels, G. A., Nemunaitis, J. J., Spitler, L. E., Hallmeyer, S., Lutzky, J., Schultz, S. M., & Whitman, E. D. (2015b). Final data from CALM: A phase II study of Cocksackievirus A21 (CVA21) oncolytic virus immunotherapy in patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol*, *33*(15\_suppl), 9030-9030.
- Annels, N. E., Simpson, G., Arif, M., Denyer, M., Iqbal, A., Mansfield, D., Sandhu, S., Melcher, A., Harrington, K., Au, G., Grose, M., Shafren, D., Mostafid, H., & Pandha, H. (2015). Oncolytic immunotherapy for the treatment of non-muscle invasive bladder cancer using intravesical coxsackievirus A21. *J Immunother Cancer*, *3*(Suppl 2), P331.
- Antoni, S., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Znaor, A., Jemal, A., & Bray, F. (2017). Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *Eur Urol*, *71*(1), 96-108.
- Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., Mignot, G., Maiuri, M. C., Ullrich, E., Saulnier, P., Yang, H., Amigorena, S., Ryffel, B., Barrat, F. J., Saftig, P., Levi, F., Lidereau, R., Nogues, C., Mira, J. P., Chompret, A., Joulin, V., Clavel-Chapelon, F., Bourhis, J., Andre, F., Delaloge, S., Tursz, T., Kroemer, G., & Zitvogel, L. (2007). Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*, *13*(9), 1050-1059.
- Asea, A., Kraeft, S. K., Kurt-Jones, E. A., Stevenson, M. A., Chen, L. B., Finberg, R. W., Koo, G. C., & Calderwood, S. K. (2000). HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-



- dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med*, 6(4), 435-442.
- Autissier, P., Soulas, C., Burdo, T. H., & Williams, K. C. (2010). Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. *Cytometry A*, 77(5), 410-419.
- Avgousti, D. C., Herrmann, C., Kulej, K., Pancholi, N. J., Sekulic, N., Petrescu, J., Molden, R. C., Blumenthal, D., Paris, A. J., Reyes, E. D., Ostapchuk, P., Hearing, P., Seeholzer, S. H., Worthen, G. S., Black, B. E., Garcia, B. A., & Weitzman, M. D. (2016). A core viral protein binds host nucleosomes to sequester immune danger signals. *Nature*, 535(7610), 173-177.
- Babjuk, M., Bohle, A., Burger, M., Capoun, O., Cohen, D., Comperat, E. M., Hernandez, V., Kaasinen, E., Palou, J., Roupert, M., van Rhijn, B. W., Shariat, S. F., Soukup, V., Sylvester, R. J., & Zigeuner, R. (2017). EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur Urol*, 71(3), 447-461.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., & Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 18, 767-811.
- Bargou, R. C., Jurchott, K., Wagener, C., Bergmann, S., Metzner, S., Bommert, K., Mapara, M. Y., Winzer, K. J., Dietel, M., Dorken, B., & Royer, H. D. (1997). Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression. *Nat Med*, 3(4), 447-450.
- Bartlett, D. L., Liu, Z., Sathaiah, M., Ravindranathan, R., Guo, Z., He, Y., & Guo, Z. S. (2013). Oncolytic viruses as therapeutic cancer vaccines. *Mol Cancer*, 12(1), 103.
- Basu, S., Binder, R., Ramalingam, T., & Srivastava, P. (2001). CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity*, 14(3), 303-313.
- Bellmunt, J., Fougeray, R., Rosenberg, J. E., von der Maase, H., Schutz, F. A., Salhi, Y., Culine, S., & Choueiri, T. K. (2013). Long-term survival results of a randomized phase III trial of vinflunine plus best supportive care versus best supportive care alone in advanced urothelial carcinoma patients after failure of platinum-based chemotherapy. *Ann Oncol*, 24(6), 1466-1472.
- Bellmunt, J., Powles, T., & Vogelzang, N. J. (2017). A review on the evolution of PD-1/PD-L1 immunotherapy for bladder cancer: The future is now. *Cancer Treat Rev*, 54, 58-67.
- Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., Crowell, R. L., & Finberg, R. W. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, 275(5304), 1320-1323.
- Bett, A. J., Haddara, W., Prevec, L., & Graham, F. L. (1994). An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(19), 8802-8806.
- Bhat, R., Dempe, S., Dinsart, C., & Rommelaere, J. (2011). Enhancement of NK cell antitumor responses using an oncolytic parvovirus. *Int J Cancer*, 128(4), 908-919.

- Bianchi, M. E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*, *81*(1), 1-5.
- Bidnur, S., Savdie, R., & Black, P. C. (2016). Inhibiting Immune Checkpoints for the Treatment of Bladder Cancer. *Bladder Cancer*, *2*(1), 15-25.
- Bischoff, J. R., Kirn, D. H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J. A., Sampson-Johannes, A., Fattaey, A., & McCormick, F. (1996). An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*, *274*(5286), 373-376.
- Blank, C., Brown, I., Peterson, A. C., Spiotto, M., Iwai, Y., Honjo, T., & Gajewski, T. F. (2004). PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells. *Cancer Res*, *64*(3), 1140-1145.
- Blank, C., Gajewski, T. F., & Mackensen, A. (2005). Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, *54*(4), 307-314.
- Böhle, A., & Brandau, S. (2003). Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J Urol*, *170*(3), 964-969.
- Boozari, B., Mundt, B., Woller, N., Struver, N., Gurlevik, E., Schache, P., Kloos, A., Knocke, S., Manns, M. P., Wirth, T. C., Kubicka, S., & Kuhnel, F. (2010). Antitumoural immunity by virus-mediated immunogenic apoptosis inhibits metastatic growth of hepatocellular carcinoma. *Gut*, *59*(10), 1416-1426.
- Bradley, S., Jakes, A. D., Harrington, K., Pandha, H., Melcher, A., & Errington-Mais, F. (2014). Applications of coxsackievirus A21 in oncology. *Oncolytic Virother*, *3*, 47-55.
- Braithwaite, A. W., & Russell, I. A. (2001). Induction of cell death by adenoviruses. *Apoptosis*, *6*(5), 359-370.
- Bramante, S., Kaufmann, J. K., Veckman, V., Liikanen, I., Nettelbeck, D. M., Hemminki, O., Vassilev, L., Cerullo, V., Oksanen, M., Heiskanen, R., Joensuu, T., Kanerva, A., Pesonen, S., Matikainen, S., Vaha-Koskela, M., Koski, A., & Hemminki, A. (2015). Treatment of melanoma with a serotype 5/3 chimeric oncolytic adenovirus coding for GM-CSF: Results in vitro, in rodents and in humans. *Int J Cancer*, *137*(7), 1775-1783.
- Breitbach, C. J., Arulanandam, R., De Silva, N., Thorne, S. H., Patt, R., Daneshmand, M., Moon, A., Ilkow, C., Burke, J., Hwang, T. H., Heo, J., Cho, M., Chen, H., Angarita, F. A., Addison, C., McCart, J. A., Bell, J. C., & Kirn, D. H. (2013). Oncolytic vaccinia virus disrupts tumor-associated vasculature in humans. *Cancer Res*, *73*(4), 1265-1275.
- Brierley, J. D., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (2017). *TNM Classification of Malignant Tumours, 8th Edition*. Wiley-Blackwell: UICC International Union Against Cancer.
- Burger, M., Catto, J. W., Dalbagni, G., Grossman, H. B., Herr, H., Karakiewicz, P., Kassouf, W., Kiemeny, L. A., La Vecchia, C., Shariat, S., & Lotan, Y. (2013). Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol*, *63*(2), 234-241.
- Burke, J. (2010). Virus therapy for bladder cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, *21*(2-3), 99-102.

- Burke, J. M., Lamm, D. L., Meng, M. V., Nemunaitis, J. J., Stephenson, J. J., Arseneau, J. C., Aimi, J., Lerner, S., Yeung, A. W., Kazarian, T., Maslyar, D. J., & McKiernan, J. M. (2012). A first in human phase 1 study of CG0070, a GM-CSF expressing oncolytic adenovirus, for the treatment of nonmuscle invasive bladder cancer. *J Urol*, *188*(6), 2391-2397.
- Caivano, A., Vecchio, L. D., & Musto, P. (2017). Do we need to distinguish exosomes from microvesicles in hematological malignancies? *Leukemia*.
- Castiello, L., Sabatino, M., Jin, P., Clayberger, C., Marincola, F. M., Krensky, A. M., & Stroncek, D. F. (2011). Monocyte-derived DC maturation strategies and related pathways: a transcriptional view. *Cancer Immunol Immunother*, *60*(4), 457-466.
- Cerullo, V., Koski, A., Vaha-Koskela, M., & Hemminki, A. (2012). Chapter eight--Oncolytic adenoviruses for cancer immunotherapy: data from mice, hamsters, and humans. *Adv Cancer Res*, *115*, 265-318.
- Chen, C. Y., Gherzi, R., Andersen, J. S., Gaietta, G., Jurchott, K., Royer, H. D., Mann, M., & Karin, M. (2000). Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation. *Genes Dev*, *14*(10), 1236-1248.
- Chen, Y., Zhang, J., Li, J., Zou, L., Zhao, T., Tang, Y., & Wu, Y. (2006). Expression of B7-H1 in inflammatory renal tubular epithelial cells. *Nephron Exp Nephrol*, *102*(3-4), e81-92.
- Coffin, R. (2016). Interview with Robert Coffin, inventor of T-VEC: the first oncolytic immunotherapy approved for the treatment of cancer. *Immunotherapy*, *8*(2), 103-106.
- Cogliano, V. J., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L., & Wild, C. P. (2011). Preventable exposures associated with human cancers. *J Natl Cancer Inst*, *103*(24), 1827-1839.
- Coles, L. S., Lambrusco, L., Burrows, J., Hunter, J., Diamond, P., Bert, A. G., Vadas, M. A., & Goodall, G. J. (2005). Phosphorylation of cold shock domain/Y-box proteins by ERK2 and GSK3beta and repression of the human VEGF promoter. *FEBS Lett*, *579*(24), 5372-5378.
- Cumberbatch, M. G., Rota, M., Catto, J. W., & La Vecchia, C. (2016). The Role of Tobacco Smoke in Bladder and Kidney Carcinogenesis: A Comparison of Exposures and Meta-analysis of Incidence and Mortality Risks. *Eur Urol*, *70*(3), 458-466.
- Curiel, D. T. (2000). The development of conditionally replicative adenoviruses for cancer therapy. *Clin Cancer Res*, *6*(9), 3395-3399.
- De Maio, A. (1999). Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock*, *11*(1), 1-12.
- Di Paolo, N. C., Baldwin, L. K., Irons, E. E., Papayannopoulou, T., Tomlinson, S., & Shayakhmetov, D. M. (2014). IL-1alpha and complement cooperate in triggering local neutrophilic inflammation in response to adenovirus and eliminating virus-containing cells. *PLoS Pathog*, *10*(3), e1004035.
- Di Paolo, N. C., Miao, E. A., Iwakura, Y., Murali-Krishna, K., Aderem, A., Flavell, R. A., Papayannopoulou, T., & Shayakhmetov, D. M. (2009). Virus binding to a plasma

- membrane receptor triggers interleukin-1 alpha-mediated proinflammatory macrophage response in vivo. *Immunity*, 31(1), 110-121.
- Diaconu, I., Cerullo, V., Hirvonen, M. L., Escutenaire, S., Ugolini, M., Pesonen, S. K., Bramante, S., Parviainen, S., Kanerva, A., Loskog, A. S., Eliopoulos, A. G., Pesonen, S., & Hemminki, A. (2012). Immune response is an important aspect of the antitumor effect produced by a CD40L-encoding oncolytic adenovirus. *Cancer Res*, 72(9), 2327-2338.
- Didier, D. K., Schifffenbauer, J., Woulfe, S. L., Zacheis, M., & Schwartz, B. D. (1988). Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(19), 7322-7326.
- Dieu-Nosjean, M. C., Vicari, A., Lebecque, S., & Caux, C. (1999). Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *J Leukoc Biol*, 66(2), 252-262.
- Dmitriev, I., Krasnykh, V., Miller, C. R., Wang, M., Kashentseva, E., Mikheeva, G., Belousova, N., & Curiel, D. T. (1998). An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *J Virol*, 72(12), 9706-9713.
- Donin, N. M., Lenis, A. T., Holden, S., Drakaki, A., Pantuck, A., Beldegrun, A., & Chamie, K. (2017). Immunotherapy for the Treatment of Urothelial Carcinoma. *J Urol*, 197(1), 14-22.
- Dranoff, G. (2011). Experimental mouse tumour models: what can be learnt about human cancer immunology? *Nat Rev Immunol*, 12(1), 61-66.
- Eble, J. N., Sauter, G., Epstein, J. I., & Sesterhenn, I. A. (2004). Tumors of the urinary system. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. (pp. 89-123): IARC Press International Agency for Research on Cancer (IARC) 69008 Lyon, France.
- Eliseeva, I. A., Kim, E. R., Guryanov, S. G., Ovchinnikov, L. P., & Lyabin, D. N. (2011). Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions. *Biochemistry (Mosc)*, 76(13), 1402-1433.
- Enders, J. F., Bell, J. A., Dingle, J. H., Francis, T., Jr., Hilleman, M. R., Huebner, R. J., & Payne, A. M. (1956). Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science*, 124(3212), 119-120.
- Engeland, C. E., Grossardt, C., Veinalde, R., Bossow, S., Lutz, D., Kaufmann, J. K., Shevchenko, I., Umansky, V., Nettelbeck, D. M., Weichert, W., Jager, D., von Kalle, C., & Ungerechts, G. (2014). CTLA-4 and PD-L1 checkpoint blockade enhances oncolytic measles virus therapy. *Mol Ther*, 22(11), 1949-1959.
- Erdbrugger, U., & Lannigan, J. (2016). Analytical challenges of extracellular vesicle detection: A comparison of different techniques. *Cytometry A*, 89(2), 123-134.
- Evdokimova, V., Tognon, C., Ng, T., Ruzanov, P., Melnyk, N., Fink, D., Sorokin, A., Ovchinnikov, L. P., Davicioni, E., Triche, T. J., & Sorensen, P. H. (2009). Translational activation of snail1 and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Cell*, 15(5), 402-415.

- Fairey, A. S., Daneshmand, S., Quinn, D., Dorff, T., Dorin, R., Lieskovsky, G., Schuckman, A., Cai, J., Miranda, G., & Skinner, E. C. (2013). Neoadjuvant chemotherapy with gemcitabine/cisplatin vs. methotrexate/vinblastine/doxorubicin/cisplatin for muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: a retrospective analysis from the University of Southern California. *Urol Oncol*, *31*(8), 1737-1743.
- Faraj, S. F., Munari, E., Guner, G., Taube, J., Anders, R., Hicks, J., Meeker, A., Schoenberg, M., Bivalacqua, T., Drake, C., & Netto, G. J. (2015). Assessment of tumoral PD-L1 expression and intratumoral CD8+ T cells in urothelial carcinoma. *Urology*, *85*(3), 703 e701-706.
- Farina, M. S., Lundgren, K. T., & Bellmunt, J. (2017). Immunotherapy in Urothelial Cancer: Recent Results and Future Perspectives. *Drugs*, *77*(10), 1077-1089.
- Fishelson, Z., Donin, N., Zell, S., Schultz, S., & Kirschfink, M. (2003). Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. *Mol Immunol*, *40*(2-4), 109-123.
- Fountzilias, C., Patel, S., & Mahalingam, D. (2017). Review: Oncolytic Virotherapy, updates and future directions. *Oncotarget*.
- Freedman, N. D., Silverman, D. T., Hollenbeck, A. R., Schatzkin, A., & Abnet, C. C. (2011). Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA*, *306*(7), 737-745.
- Freytag, S. O., Barton, K. N., & Zhang, Y. (2013). Efficacy of oncolytic adenovirus expressing suicide genes and interleukin-12 in preclinical model of prostate cancer. *Gene Ther*, *20*(12), 1131-1139.
- Frisch, S. M., & Mymryk, J. S. (2002). Adenovirus-5 E1A: paradox and paradigm. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *3*(6), 441-452.
- Frye, B. C., Halfter, S., Djudjaj, S., Muehlenberg, P., Weber, S., Raffetseder, U., En-Nia, A., Knott, H., Baron, J. M., Dooley, S., Bernhagen, J., & Mertens, P. R. (2009). Y-box protein-1 is actively secreted through a non-classical pathway and acts as an extracellular mitogen. *EMBO Rep*, *10*(7), 783-789.
- Fucikova, J., Kralikova, P., Fialova, A., Brtnicky, T., Rob, L., Bartunkova, J., & Spisek, R. (2011). Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response. *Cancer Res*, *71*(14), 4821-4833.
- Fueyo, J., Gomez-Manzano, C., Alemany, R., Lee, P. S., McDonnell, T. J., Mitlianga, P., Shi, Y. X., Levin, V. A., Yung, W. K., & Kyritsis, A. P. (2000). A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene*, *19*(1), 2-12.
- Fujiwara-Okada, Y., Matsumoto, Y., Fukushi, J., Setsu, N., Matsuura, S., Kamura, S., Fujiwara, T., Iida, K., Hatano, M., Nabeshima, A., Yamada, H., Ono, M., Oda, Y., & Iwamoto, Y. (2013). Y-box binding protein-1 regulates cell proliferation and is associated with clinical outcomes of osteosarcoma. *Br J Cancer*, *108*(4), 836-847.
- Gaggar, A., Shayakhmetov, D. M., & Lieber, A. (2003). CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med*, *9*(11), 1408-1412.

- Gandhi, N. M., Morales, A., & Lamm, D. L. (2013). Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for genitourinary cancer. *BJU Int*, *112*(3), 288-297.
- Garber, K. (2006). China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst*, *98*(5), 298-300.
- Garg, A. D., Galluzzi, L., Apetoh, L., Baert, T., Birge, R. B., Bravo-San Pedro, J. M., Breckpot, K., Brough, D., Chaurio, R., Cirone, M., Coosemans, A., Coulie, P. G., De Ruyscher, D., Dini, L., de Witte, P., Dudek-Peric, A. M., Faggioni, A., Fucikova, J., Gaip, U. S., Golab, J., Gougeon, M. L., Hamblin, M. R., Hemminki, A., Herrmann, M., Hodge, J. W., Kepp, O., Kroemer, G., Krysko, D. V., Land, W. G., Madeo, F., Manfredi, A. A., Mattarollo, S. R., Maueroeder, C., Merendino, N., Multhoff, G., Pabst, T., Ricci, J. E., Riganti, C., Romano, E., Rufo, N., Smyth, M. J., Sonnemann, J., Spisek, R., Stagg, J., Vacchelli, E., Vandenabeele, P., Vandenberk, L., Van den Eynde, B. J., Van Gool, S., Velotti, F., Zitvogel, L., & Agostinis, P. (2015). Molecular and Translational Classifications of DAMPs in Immunogenic Cell Death. *Front Immunol*, *6*(588).
- Geletneky, K., Huesing, J., Rommelaere, J., Schlehofer, J. R., Leuchs, B., Dahm, M., Krebs, O., von Knebel Doeberitz, M., Huber, B., & Hajda, J. (2012). Phase I/IIa study of intratumoral/intracerebral or intravenous/intracerebral administration of Parvovirus H-1 (ParvOryx) in patients with progressive primary or recurrent glioblastoma multiforme: ParvOryx01 protocol. *BMC Cancer*, *12*, 99.
- Gessner, C., Woischwill, C., Schumacher, A., Liebers, U., Kuhn, H., Stiehl, P., Jurchott, K., Royer, H. D., Witt, C., & Wolff, G. (2004). Nuclear YB-1 expression as a negative prognostic marker in nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J*, *23*(1), 14-19.
- Glockzin, G., Mantwill, K., Jurchott, K., Bernshausen, A., Ladhoff, A., Royer, H. D., Gansbacher, B., & Holm, P. S. (2006). Characterization of the recombinant adenovirus vector AdYB-1: implications for oncolytic vector development. *J Virol*, *80*(8), 3904-3911.
- Gong, J., Sachdev, E., Mita, A. C., & Mita, M. M. (2016). Clinical development of reovirus for cancer therapy: An oncolytic virus with immune-mediated antitumor activity. *World J Methodol*, *6*(1), 25-42.
- Gopal, S. K., Greening, D. W., Mathias, R. A., Ji, H., Rai, A., Chen, M., Zhu, H. J., & Simpson, R. J. (2015). YBX1/YB-1 induces partial EMT and tumourigenicity through secretion of angiogenic factors into the extracellular microenvironment. *Oncotarget*, *6*(15), 13718-13730.
- Gotoh, A., Nagaya, H., Kanno, T., Tagawa, M., & Nishizaki, T. (2013). Fiber-substituted conditionally replicating adenovirus Ad5F35 induces oncolysis of human bladder cancer cells in in vitro analysis. *Urology*, *81*(4), 920.e927-911.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, *36*(1), 59-74.
- Gujar, S. A., & Lee, P. W. (2014). Oncolytic virus-mediated reversal of impaired tumor antigen presentation. *Front Oncol*, *4*(April), 77.
- Guo, Z. S., Liu, Z., & Bartlett, D. L. (2014). Oncolytic Immunotherapy: Dying the Right Way is a Key to Eliciting Potent Antitumor Immunity. *Front Oncol*, *4*, 74.

- Guo, Z. S., Liu, Z., Kowalsky, S., Feist, M., Kalinski, P., Lu, B., Storkus, W. J., & Bartlett, D. L. (2017). Oncolytic Immunotherapy: Conceptual Evolution, Current Strategies, and Future Perspectives. *Front Immunol*, *8*, 555.
- Haley, K. P., Overhauser, J., Babiss, L. E., Ginsberg, H. S., & Jones, N. C. (1984). Transformation properties of type 5 adenovirus mutants that differentially express the E1A gene products. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *81*(18), 5734-5738.
- Hamid, O., Hoffner, B., Gasal, E., Hong, J., & Carvajal, R. D. (2017). Oncolytic immunotherapy: unlocking the potential of viruses to help target cancer. *Cancer Immunol Immunother*.
- Han, J., Sabbatini, P., Perez, D., Rao, L., Modha, D., & White, E. (1996). The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. *Genes Dev*, *10*(4), 461-477.
- Hanssen, L., Alidousty, C., Djudjaj, S., Frye, B. C., Rauen, T., Boor, P., Mertens, P. R., van Roeyen, C. R., Tacke, F., Heymann, F., Tittel, A. P., Koch, A., Floege, J., Ostendorf, T., & Raffetseder, U. (2013). YB-1 is an early and central mediator of bacterial and sterile inflammation in vivo. *J Immunol*, *191*(5), 2604-2613.
- Harada, J. N., & Berk, A. J. (1999). p53-Independent and -dependent requirements for E1B-55K in adenovirus type 5 replication. *J Virol*, *73*(7), 5333-5344.
- Harrison, S. C. (2010). Virology. Looking inside adenovirus. *Science*, *329*(5995), 1026-1027.
- Hautmann, R. E., de Petriconi, R. C., Pfeiffer, C., & Volkmer, B. G. (2012). Radical cystectomy for urothelial carcinoma of the bladder without neoadjuvant or adjuvant therapy: long-term results in 1100 patients. *Eur Urol*, *61*(5), 1039-1047.
- Hay, R. T., Freeman, A., Leith, I., Monaghan, A., & Webster, A. (1995). Molecular interactions during adenovirus DNA replication. In W. Doerfler & P. Böhm (Eds.), *The Molecular Repertoire of Adenoviruses II* (1995 ed., Vol. 199 (Pt 2), pp. 31-48): Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Heo, J., Reid, T., Ruo, L., Breitbach, C. J., Rose, S., Bloomston, M., Cho, M., Lim, H. Y., Chung, H. C., Kim, C. W., Burke, J., Lencioni, R., Hickman, T., Moon, A., Lee, Y. S., Kim, M. K., Daneshmand, M., Dubois, K., Longpre, L., Ngo, M., Rooney, C., Bell, J. C., Rhee, B. G., Patt, R., Hwang, T. H., & Kirn, D. H. (2013). Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer. *Nat Med*, *19*(3), 329-336.
- Hightower, L. E., & Guidon, P. T. J. (1989). Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble gliaxon transfer proteins. *J Cell Physiol*, *138*(2), 257-266.
- Holm, P. S., Bergmann, S., Jurchott, K., Lage, H., Brand, K., Ladhoff, A., Mantwill, K., Curiel, D. T., Dobbstein, M., Dietel, M., Gansbacher, B., & Royer, H. D. (2002). YB-1 relocates to the nucleus in adenovirus-infected cells and facilitates viral replication by inducing E2 gene expression through the E2 late promoter. *J Biol Chem*, *277*(12), 10427-10434.
- Holm, P. S., Lage, H., Bergmann, S., Jurchott, K., Glockzin, G., Bernshausen, A., Mantwill, K., Ladhoff, A., Wichert, A., Mymryk, J. S., Ritter, T., Dietel, M., Gansbacher, B., & Royer, H. D. (2004). Multidrug-resistant cancer cells facilitate E1-independent adenoviral replication: impact for cancer gene therapy. *Cancer Res*, *64*(1), 322-328.

- Holm, P. S., Retz, M., Gschwend, J. E., & Nawroth, R. (2016). [YB-1-based virotherapy: A new therapeutic intervention for transitional cell carcinoma of the bladder?]. *Urologe A*, 55(3), 356-363.
- Holzmüller, R., Mantwill, K., Haczek, C., Rognoni, E., Anton, M., Kasajima, A., Weichert, W., Treue, D., Lage, H., Schuster, T., Schlegel, J., Gansbacher, B., & Holm, P. S. (2011). YB-1 dependent virotherapy in combination with temozolomide as a multimodal therapy approach to eradicate malignant glioma. *Int J Cancer*, 129(5), 1265-1276.
- Holzmüller, R. C. (2011). *YB-1-abhängige onkolytische Adenoviren zur Therapie des Glioblastoms: Evaluierung verschiedener Vektoren in vitro und im Xenograft-Modell* (Dissertation), Technische Universität München, München. Retrieved from <http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn:nbn:de:bvb:91-diss-20110505-998089-1-8>
- IARC. (1994). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori*. (1994 ed. Vol. 61). Lyon, France.
- Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev*, 13(2), 95-109.
- Ilkow, C. S., Swift, S. L., Bell, J. C., & Diallo, J. S. (2014). From scourge to cure: tumour-selective viral pathogenesis as a new strategy against cancer. *PLoS Pathog*, 10(1), e1003836.
- Inman, B. A., Sebo, T. J., Frigola, X., Dong, H., Bergstralh, E. J., Frank, I., Fradet, Y., Lacombe, L., & Kwon, E. D. (2007). PD-L1 (B7-H1) expression by urothelial carcinoma of the bladder and BCG-induced granulomata: associations with localized stage progression. *Cancer*, 109(8), 1499-1505.
- Inoue, H., & Tani, K. (2014). Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments. *Cell Death Differ*, 21(1), 39-49.
- Ito, H., Aoki, H., Kuhnel, F., Kondo, Y., Kubicka, S., Wirth, T., Iwado, E., Iwamaru, A., Fujiwara, K., Hess, K. R., Lang, F. F., Sawaya, R., & Kondo, S. (2006). Autophagic cell death of malignant glioma cells induced by a conditionally replicating adenovirus. *J Natl Cancer Inst*, 98(9), 625-636.
- Janz, M., Harbeck, N., Dettmar, P., Berger, U., Schmidt, A., Jurchott, K., Schmitt, M., & Royer, H. D. (2002). Y-box factor YB-1 predicts drug resistance and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumor biologic factors HER2, uPA and PAI-1. *Int J Cancer*, 97(3), 278-282.
- Jiang, H., Rivera-Molina, Y., Gomez-Manzano, C., Clise-Dwyer, K., Bover, L., Vence, L. M., Yuan, Y., Lang, F. F., Toniatti, C., Hossain, M. B., & Fueyo, J. (2017). Oncolytic Adenovirus and Tumor-Targeting Immune Modulatory Therapy Improve Autologous Cancer Vaccination. *Cancer Res*, 77(14), 3894-3907.
- Jiang, H., White, E. J., Rios-Vicil, C. I., Xu, J., Gomez-Manzano, C., & Fueyo, J. (2011). Human adenovirus type 5 induces cell lysis through autophagy and autophagy-triggered caspase activity. *J Virol*, 85(10), 4720-4729.



- Jiang, X., Yuan, J. M., Skipper, P. L., Tannenbaum, S. R., & Yu, M. C. (2007). Environmental tobacco smoke and bladder cancer risk in never smokers of Los Angeles County. *Cancer Res*, *67*(15), 7540-7545.
- Johnson, J. S., Osheim, Y. N., Xue, Y., Emanuel, M. R., Lewis, P. W., Bankovich, A., Beyer, A. L., & Engel, D. A. (2004). Adenovirus protein VII condenses DNA, represses transcription, and associates with transcriptional activator E1A. *J Virol*, *78*(12), 6459-6468.
- Jones, R., Latinovic, R., Charlton, J., & Gulliford, M. C. (2007). Alarm symptoms in early diagnosis of cancer in primary care: cohort study using General Practice Research Database. *Bmj*, *334*(7602), 1040.
- Jurchott, K., Bergmann, S., Stein, U., Walther, W., Janz, M., Manni, I., Piaggio, G., Fietze, E., Diemel, M., & Royer, H. D. (2003). YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression. *J Biol Chem*, *278*(30), 27988-27996.
- Kafri, T., Morgan, D., Krahl, T., Sarvetnick, N., Sherman, L., & Verma, I. (1998). Cellular immune response to adenoviral vector infected cells does not require de novo viral gene expression: implications for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(19), 11377-11382.
- Kamat, A. M., Hahn, N. M., Efstathiou, J. A., Lerner, S. P., Malmstrom, P. U., Choi, W., Guo, C. C., Lotan, Y., & Kassouf, W. (2016). Bladder cancer. *Lancet*, *388*(10061), 2796-2810.
- Kanerva, A., Koski, A., Liikanen, I., Oksanen, M., Joensuu, T., Hemminki, O., Palmgren, J., Hemminki, K., & Hemminki, A. (2015). Case-control estimation of the impact of oncolytic adenovirus on the survival of patients with refractory solid tumors. *Mol Ther*, *23*(2), 321-329.
- Kasahara, T., Hooks, J. J., Dougherty, S. F., & Oppenheim, J. J. (1983). Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-gamma) production by human T cells and T cell subsets. *J Immunol*, *130*(4), 1784-1789.
- Kates, M., Sopko, N. A., Matsui, H., Drake, C. G., Hahn, N. M., & Bivalacqua, T. J. (2016). Immune checkpoint inhibitors: a new frontier in bladder cancer. *World J Urol*, *34*(1), 49-55.
- Kaufman, H. L., Ruby, C. E., Hughes, T., & Slingluff, C. L., Jr. (2014). Current status of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the immunotherapy of melanoma. *J Immunother Cancer*, *2*, 11.
- Kelly, E., & Russell, S. J. (2007). History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Mol Ther*, *15*(4), 651-659.
- Kepp, O., Senovilla, L., Vitale, I., Vacchelli, E., Adjemian, S., Agostinis, P., Apetoh, L., Aranda, F., Barnaba, V., Bloy, N., Bracci, L., Breckpot, K., Brough, D., Buque, A., Castro, M. G., Cirone, M., Colombo, M. I., Cremer, I., Demaria, S., Dini, L., Eliopoulos, A. G., Faggioni, A., Formenti, S. C., Fucikova, J., Gabriele, L., Gaip, U. S., Galon, J., Garg, A., Ghiringhelli, F., Giese, N. A., Guo, Z. S., Hemminki, A., Herrmann, M., Hodge, J. W., Holdenrieder, S., Honeychurch, J., Hu, H. M., Huang, X., Illidge, T. M., Kono, K., Korbely, M., Krysko, D. V., Loi, S., Lowenstein, P. R., Lugli, E., Ma, Y., Madeo, F., Manfredi, A. A., Martins, I., Mavilio, D., Menger, L., Merendino, N., Michaud, M., Mignot, G., Mossman, K. L.,

- Multhoff, G., Oehler, R., Palombo, F., Panaretakis, T., Pol, J., Proietti, E., Ricci, J. E., Riganti, C., Rovere-Querini, P., Rubartelli, A., Sistigu, A., Smyth, M. J., Sonnemann, J., Spisek, R., Stagg, J., Sukkurwala, A. Q., Tartour, E., Thorburn, A., Thorne, S. H., Vandenabeele, P., Velotti, F., Workenhe, S. T., Yang, H., Zong, W. X., Zitvogel, L., Kroemer, G., & Galluzzi, L. (2014). Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology*, *3*(9), e955691.
- Kleijn, A., Kloezeman, J., Treffers-Westerlaken, E., Fulci, G., Leenstra, S., Dirven, C., Debets, R., & Lamfers, M. (2014a). The in vivo therapeutic efficacy of the oncolytic adenovirus Delta24-RGD is mediated by tumor-specific immunity. *PLoS One*, *9*(5), e97495.
- Kleijn, A., Kloezeman, J., Treffers-Westerlaken, E., Fulci, G., Leenstra, S., Dirven, C., Debets, R., & Lamfers, M. (2014b). The therapeutic efficacy of the oncolytic virus Delta24-RGD in a murine glioma model depends primarily on antitumor immunity. *Oncoimmunology*, *3*(9), e955697.
- Knowles, M. A., & Hurst, C. D. (2015). Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer*, *15*(1), 25-41.
- Koike, K., Uchiumi, T., Ohga, T., Toh, S., Wada, M., Kohno, K., & Kuwano, M. (1997). Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. *FEBS Lett*, *417*(3), 390-394.
- Kolk, A., Jubitz, N., Mengele, K., Mantwill, K., Bissinger, O., Schmitt, M., Kremer, M., & Holm, P. S. (2011). Expression of Y-box-binding protein YB-1 allows stratification into long- and short-term survivors of head and neck cancer patients. *Br J Cancer*, *105*(12), 1864-1873.
- Kosnopfel, C., Sinnberg, T., & Schitteck, B. (2014). Y-box binding protein 1--a prognostic marker and target in tumour therapy. *Eur J Cell Biol*, *93*(1-2), 61-70.
- Kossinova, O. A., Gopanenko, A. V., Tamkovich, S. N., Krasheninina, O. A., Tupikin, A. E., Kiseleva, E., Yanshina, D. D., Malygin, A. A., Ven'yaminova, A. G., Kabilov, M. R., & Karpova, G. G. (2017). Cytosolic YB-1 and NSUN2 are the only proteins recognizing specific motifs present in mRNAs enriched in exosomes. *Biochim Biophys Acta*, *1865*(6), 664-673.
- Kovesdi, I., Reichel, R., & Nevins, J. R. (1987). Role of an adenovirus E2 promoter binding factor in E1A-mediated coordinate gene control. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *84*(8), 2180-2184.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., & Zitvogel, L. (2013). Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol*, *31*, 51-72.
- Kuryk, L., Haavisto, E., Garofalo, M., Capasso, C., Hirvonen, M., Pesonen, S., Ranki, T., Vassilev, L., & Cerullo, V. (2016). Synergistic anti-tumor efficacy of immunogenic adenovirus ONCOS-102 (Ad5/3-D24-GM-CSF) and standard of care chemotherapy in preclinical mesothelioma model. *Int J Cancer*, *139*(8), 1883-1893.
- Lamm, D. L. (1992). Carcinoma in situ. *Urol Clin North Am*, *19*(3), 499-508.
- Lancaster, G. I., & Febbraio, M. A. (2005a). Exosome-dependent Trafficking of HSP70. *J Biol Chem*, *280*(24), 23349-23355.

- Lancaster, G. I., & Febbraio, M. A. (2005b). Mechanisms of stress-induced cellular HSP72 release: implications for exercise-induced increases in extracellular HSP72. *Exerc Immunol Rev*, *11*, 46-52.
- Lapteva, N., Aldrich, M., Weksberg, D., Rollins, L., Goltsova, T., Chen, S. Y., & Huang, X. F. (2009). Targeting the intratumoral dendritic cells by the oncolytic adenoviral vaccine expressing RANTES elicits potent antitumor immunity. *J Immunother*, *32*(2), 145-156.
- Lasham, A., Print, C. G., Woolley, A. G., Dunn, S. E., & Braithwaite, A. W. (2013). YB-1: oncoprotein, prognostic marker and therapeutic target? *Biochem J*, *449*(1), 11-23.
- Lawrence, M. S., Stojanov, P., Polak, P., Kryukov, G. V., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Carter, S. L., Stewart, C., Mermel, C. H., Roberts, S. A., Kiezun, A., Hammerman, P. S., McKenna, A., Drier, Y., Zou, L., Ramos, A. H., Pugh, T. J., Stransky, N., Helman, E., Kim, J., Sougnez, C., Ambrogio, L., Nickerson, E., Shefler, E., Cortes, M. L., Auclair, D., Saksena, G., Voet, D., Noble, M., DiCara, D., Lin, P., Lichtenstein, L., Heiman, D. I., Fennell, T., Imielinski, M., Hernandez, B., Hodis, E., Baca, S., Dulak, A. M., Lohr, J., Landau, D. A., Wu, C. J., Melendez-Zajgla, J., Hidalgo-Miranda, A., Koren, A., McCarroll, S. A., Mora, J., Crompton, B., Onofrio, R., Parkin, M., Winckler, W., Ardlie, K., Gabriel, S. B., Roberts, C. W. M., Biegel, J. A., Stegmaier, K., Bass, A. J., Garraway, L. A., Meyerson, M., Golub, T. R., Gordenin, D. A., Sunyaev, S., Lander, E. S., & Getz, G. (2013). Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*, *499*(7457), 214-218.
- Lee, S. M., Suen, Y., Qian, J., Knoppel, E., & Cairo, M. S. (1998). The regulation and biological activity of interleukin 12. *Leuk Lymphoma*, *29*(5-6), 427-438.
- Leonard, G. T., & Sen, G. C. (1996). Effects of adenovirus E1A protein on interferon-signaling. *Virology*, *224*(1), 25-33.
- Leppard, K. N. (1997). E4 gene function in adenovirus, adenovirus vector and adeno-associated virus infections. *J Gen Virol*, *78* ( Pt 9), 2131-2138.
- Li, J. L., Liu, H. L., Zhang, X. R., Xu, J. P., Hu, W. K., Liang, M., Chen, S. Y., Hu, F., & Chu, D. T. (2009). A phase I trial of intratumoral administration of recombinant oncolytic adenovirus overexpressing HSP70 in advanced solid tumor patients. *Gene Ther*, *16*(3), 376-382.
- Li, Y., Pong, R. C., Bergelson, J. M., Hall, M. C., Sagalowsky, A. I., Tseng, C. P., Wang, Z., & Hsieh, J. T. (1999). Loss of adenoviral receptor expression in human bladder cancer cells: a potential impact on the efficacy of gene therapy. *Cancer Res*, *59*(2), 325-330.
- Lichtenstein, D. L., Toth, K., Doronin, K., Tollefson, A. E., & Wold, W. S. (2004). Functions and mechanisms of action of the adenovirus E3 proteins. *Int Rev Immunol*, *23*(1-2), 75-111.
- Lichty, B. D., Breitbach, C. J., Stojdl, D. F., & Bell, J. C. (2014). Going viral with cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, *14*(8), 559-567.
- Linden, K. G., Thurston, J., Schaefer, R., & Malley, J. P., Jr. (2007). Enhanced UV inactivation of adenoviruses under polychromatic UV lamps. *Appl Environ Microbiol*, *73*(23), 7571-7574.

- Lindquist, J. A., Brandt, S., Bernhardt, A., Zhu, C., & Mertens, P. R. (2014). The role of cold shock domain proteins in inflammatory diseases. *J Mol Med (Berl)*, *92*(3), 207-216.
- Liu, B. L., Robinson, M., Han, Z. Q., Branston, R. H., English, C., Reay, P., McGrath, Y., Thomas, S. K., Thornton, M., Bullock, P., Love, C. A., & Coffin, R. S. (2003). ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. *Gene Ther*, *10*(4), 292-303.
- Liu, T. C., Galanis, E., & Kirn, D. (2007). Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress. *Nat Clin Pract Oncol*, *4*(2), 101-117.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, *25*(4), 402-408.
- Lobb, R. J., Becker, M., Wen, S. W., Wong, C. S., Wiegmanns, A. P., Leimgruber, A., & Moller, A. (2015). Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J Extracell Vesicles*, *4*, 27031.
- Long, G. V., Dummer, R., Ribas, A., Puzanov, I., VanderWalde, A., Andtbacka, R. H. I., Michielin, O., Olszanski, A. J., Malvehy, J., Cebon, J. S., Fernandez, E., Kirkwood, J. M., Gajewski, T., Gause, C. K., Chen, L., Gorski, K., Anderson, A., Kaufman, D. R., Chou, J., & Hodi, F. S. (2016). Efficacy analysis of MASTERKEY-265 phase 1b study of talimogene laherparepvec (T-VEC) and pembrolizumab (pembro) for unresectable stage IIIB-IV melanoma. *J Clin Oncol*, *34*(15\_suppl), 9568.
- Lu, Z. H., Books, J. T., & Ley, T. J. (2005). YB-1 is important for late-stage embryonic development, optimal cellular stress responses, and the prevention of premature senescence. *Mol Cell Biol*, *25*(11), 4625-4637.
- Lv, L. H., Wan, Y. L., Lin, Y., Zhang, W., Yang, M., Li, G. L., Lin, H. M., Shang, C. Z., Chen, Y. J., & Min, J. (2012). Anticancer drugs cause release of exosomes with heat shock proteins from human hepatocellular carcinoma cells that elicit effective natural killer cell antitumor responses in vitro. *J Biol Chem*, *287*(19), 15874-15885.
- Lyon, A., Fallon, J., Boyerinas, B., Schmitz, R., Hance, K. W., Lan, Y., Sabzevari, H., Tsang, K., Schlom, J., & Greiner, J. (2014). Anti-tumor effects of anti-PD-L1 therapy in an orthotopic bladder tumor model. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, *2*(Suppl 3), P101.
- Maghazachi, A. A., Al-Aoukaty, A., & Schall, T. J. (1996). CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells. *Eur J Immunol*, *26*(2), 315-319.
- Malvern\_Instruments. (2011). DYNAMIC LIGHT SCATTERING - COMMON TERMS DEFINED. Retrieved from [http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/wp-content/uploads/2011/02/DLS\\_Terms\\_defined\\_Malvern.pdf](http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/wp-content/uploads/2011/02/DLS_Terms_defined_Malvern.pdf) am 10.08.2017
- Mantwill, K. (14.08.2017). Personal Communication: [Ad-Delo3-YB1/Fib35 enthält YB-1 in der E3-Region. E3 ADP ist dabei nicht deletiert.].
- Mantwill, K., Kohler-Vargas, N., Bernshausen, A., Bieler, A., Lage, H., Kaszubiak, A., Surowiak, P., Dravits, T., Treiber, U., Hartung, R., Gansbacher, B., & Holm, P. S. (2006). Inhibition of the multidrug-resistant phenotype by targeting YB-1 with a conditionally oncolytic

- adenovirus: implications for combinatorial treatment regimen with chemotherapeutic agents. *Cancer Res*, 66(14), 7195-7202.
- Mantwill, K., Naumann, U., Seznec, J., Girbinger, V., Lage, H., Surowiak, P., Beier, D., Mittelbronn, M., Schlegel, J., & Holm, P. S. (2013). YB-1 dependent oncolytic adenovirus efficiently inhibits tumor growth of glioma cancer stem like cells. *J Transl Med*, 11, 216.
- Minciocchi, V. R., Freeman, M. R., & Di Vizio, D. (2015). Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Semin Cell Dev Biol*, 40, 41-51.
- Moehler, M. H., Zeidler, M., Wilsberg, V., Cornelis, J. J., Woelfel, T., Rommelaere, J., Galle, P. R., & Heike, M. (2005). Parvovirus H-1-induced tumor cell death enhances human immune response in vitro via increased phagocytosis, maturation, and cross-presentation by dendritic cells. *Hum Gene Ther*, 16(8), 996-1005.
- Mollica, L., De Marchis, F., Spitaleri, A., Dallacosta, C., Pennacchini, D., Zamai, M., Agresti, A., Trisciuglio, L., Musco, G., & Bianchi, M. E. (2007). Glycyrrhizin binds to high-mobility group box 1 protein and inhibits its cytokine activities. *Chem Biol*, 14(4), 431-441.
- Morales, A., Eiding, D., & Bruce, A. W. (1976). Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol*, 116(2), 180-183.
- Morales, O., Richard, A., Martin, N., Mrizak, D., Senechal, M., Miroux, C., Pancre, V., Rommelaere, J., Caillet-Fauquet, P., de Launoit, Y., & Delhem, N. (2012). Activation of a helper and not regulatory human CD4+ T cell response by oncolytic H-1 parvovirus. *PLoS One*, 7(2), e32197.
- Mostofi, F. K., Sobin, L. H., & Torloni, H. (1973). *Histological typing of urinary bladder tumours*. Geneva: WHO. World Health Organization.
- Muhlbauer, M., Fleck, M., Schutz, C., Weiss, T., Froh, M., Blank, C., Scholmerich, J., & Hellerbrand, C. (2006). PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and -gamma and mediates T cell apoptosis. *J Hepatol*, 45(4), 520-528.
- Multhoff, G. (2007). Heat shock protein 70 (Hsp70): membrane location, export and immunological relevance. *Methods*, 43(3), 229-237.
- Muruve, D. A. (2004). The innate immune response to adenovirus vectors. *Hum Gene Ther*, 15(12), 1157-1166.
- Nakanishi, J., Wada, Y., Matsumoto, K., Azuma, M., Kikuchi, K., & Ueda, S. (2007). Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunol Immunother*, 56(8), 1173-1182.
- Nemajerova, A., Talos, F., Moll, U. M., & Petrenko, O. (2008). Rb function is required for E1A-induced S-phase checkpoint activation. *Cell Death Differ*, 15(9), 1440-1449.
- Nemunaitis, J., Khuri, F., Ganly, I., Arseneau, J., Posner, M., Vokes, E., Kuhn, J., McCarty, T., Landers, S., Blackburn, A., Romel, L., Randlev, B., Kaye, S., & Kirn, D. (2001). Phase II

- trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer. *J Clin Oncol*, 19(2), 289-298.
- Nettelbeck, D. M. (2003). Virotherapeutics: conditionally replicative adenoviruses for viral oncolysis. *Anticancer Drugs*, 14(8), 577-584.
- Nevins, J. R. (1982). Induction of the synthesis of a 70,000 dalton mammalian heat shock protein by the adenovirus E1A gene product. *Cell*, 29(3), 913-919.
- Niemann, J., & Kuhnel, F. (2017). Oncolytic viruses: adenoviruses. *Virus Genes*, 1-7.
- Oda, Y., Ohishi, Y., Saito, T., Hinoshita, E., Uchiumi, T., Kinukawa, N., Iwamoto, Y., Kohno, K., Kuwano, M., & Tsuneyoshi, M. (2003). Nuclear expression of Y-box-binding protein-1 correlates with P-glycoprotein and topoisomerase II alpha expression, and with poor prognosis in synovial sarcoma. *J Pathol*, 199(2), 251-258.
- Olive, M., Eisenlohr, L. C., & Flomenberg, P. (2001). Quantitative analysis of adenovirus-specific CD4+ T-cell responses from healthy adults. *Viral Immunol*, 14(4), 403-413.
- Ornelles, D. A., & Shenk, T. (1991). Localization of the adenovirus early region 1B 55-kilodalton protein during lytic infection: association with nuclear viral inclusions requires the early region 4 34-kilodalton protein. *J Virol*, 65(1), 424-429.
- Packiam, V. T., Campanile, A. N., Barocas, D. A., Chamie, K., III, R. L. D., Kader, A. K., Lamm, D. L., Yeung, A. W., & Steinberg, G. D. (2016). A PHASE II/III TRIAL OF CG0070, AN ONCOLYTIC ADENOVIRUS, FOR BCG-REFRACTORY NON-MUSCLE-INVASIVE BLADDER CANCER (NMIBC). *J Urol*, 195(4), e142.
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 12(4), 252-264.
- Park, S. H., Breitbach, C. J., Lee, J., Park, J. O., Lim, H. Y., Kang, W. K., Moon, A., Mun, J. H., Sommermann, E. M., Maruri Avidal, L., Patt, R., Pelusio, A., Burke, J., Hwang, T. H., Kirn, D., & Park, Y. S. (2015). Phase 1b Trial of Biweekly Intravenous Pexa-Vec (JX-594), an Oncolytic and Immunotherapeutic Vaccinia Virus in Colorectal Cancer. *Mol Ther*, 23(9), 1532-1540.
- Parkin, D. M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*, 118(12), 3030-3044.
- Parkin, D. M., Sitas, F., Chirenje, M., Stein, L., Abratt, R., & Wabinga, H. (2008). Part I: Cancer in Indigenous Africans--burden, distribution, and trends. *Lancet Oncol*, 9(7), 683-692.
- Pearson, T., Greiner, D. L., & Shultz, L. D. (2008). Creation of "humanized" mice to study human immunity. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 15, Unit 15 21.
- Pesonen, S., Diaconu, I., Kangasniemi, L., Ranki, T., Kanerva, A., Pesonen, S. K., Gerdemann, U., Leen, A. M., Kairemo, K., Oksanen, M., Haavisto, E., Holm, S. L., Karioja-Kallio, A., Kauppinen, S., Partanen, K. P., Laasonen, L., Joensuu, T., Alanko, T., Cerullo, V., & Hemminki, A. (2012). Oncolytic immunotherapy of advanced solid tumors with a CD40L-expressing replicating adenovirus: assessment of safety and immunologic responses in patients. *Cancer Res*, 72(7), 1621-1631.

- Pesonen, S., Kangasniemi, L., & Hemminki, A. (2011). Oncolytic adenoviruses for the treatment of human cancer: focus on translational and clinical data. *Mol Pharm*, *8*(1), 12-28.
- Pol, J., Buqué, A., Aranda, F., Bloy, N., Cremer, I., Eggermont, A., Erbs, P., Fucikova, J., Galon, J., Limacher, J. M., Preville, X., Sautès-Fridman, C., Spisek, R., Zitvogel, L., Kroemer, G., & Galluzzi, L. (2016). Trial Watch—Oncolytic viruses and cancer therapy. *Oncoimmunology*, *5*(2), e1117740.
- Poschke, I., Mougiakakos, D., & Kiessling, R. (2011). Camouflage and sabotage: tumor escape from the immune system. *Cancer Immunol Immunother*, *60*(8), 1161-1171.
- Powles, T., Eder, J. P., Fine, G. D., Braiteh, F. S., Loria, Y., Cruz, C., Bellmunt, J., Burris, H. A., Petrylak, D. P., Teng, S. L., Shen, X., Boyd, Z., Hegde, P. S., Chen, D. S., & Vogelzang, N. J. (2014). MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature*, *515*(7528), 558-562.
- Prestwich, R. J., Errington, F., Diaz, R. M., Pandha, H. S., Harrington, K. J., Melcher, A. A., & Vile, R. G. (2009). The case of oncolytic viruses versus the immune system: waiting on the judgment of Solomon. *Hum Gene Ther*, *20*(10), 1119-1132.
- Puzanov, I., Milhem, M. M., Minor, D., Hamid, O., Li, A., Chen, L., Chastain, M., Gorski, K. S., Anderson, A., Chou, J., Kaufman, H. L., & Andtbacka, R. H. (2016). Talimogene Laherparepvec in Combination With Ipilimumab in Previously Untreated, Unresectable Stage IIIB-IV Melanoma. *J Clin Oncol*, *34*(22), 2619-2626.
- Quetglas, J. I., Labiano, S., Aznar, M. A., Bolanos, E., Azpilikueta, A., Rodriguez, I., Casales, E., Sanchez-Paulete, A. R., Segura, V., Smerdou, C., & Melero, I. (2015). Virotherapy with a Semliki Forest Virus-Based Vector Encoding IL12 Synergizes with PD-1/PD-L1 Blockade. *Cancer Immunol Res*, *3*(5), 449-454.
- Radons, J., & Multhoff, G. (2005). Immunostimulatory functions of membrane-bound and exported heat shock protein 70. *Exerc Immunol Rev*, *11*, 17-33.
- Raffetseder, U., Rauen, T., Djurdjaj, S., Kretzler, M., En-Nia, A., Tacke, F., Zimmermann, H. W., Nelson, P. J., Frye, B. C., Floege, J., Stefanidis, I., Weber, C., & Mertens, P. R. (2009). Differential regulation of chemokine CCL5 expression in monocytes/macrophages and renal cells by Y-box protein-1. *Kidney Int*, *75*(2), 185-196.
- Ramesh, N., Ge, Y., Ennist, D. L., Zhu, M., Mina, M., Ganesh, S., Reddy, P. S., & Yu, D. C. (2006). CG0070, a conditionally replicating granulocyte macrophage colony-stimulating factor-armed oncolytic adenovirus for the treatment of bladder cancer. *Clin Cancer Res*, *12*(1), 305-313.
- Ranki, T., Pesonen, S., Hemminki, A., Partanen, K., Kairemo, K., Alanko, T., Lundin, J., Linder, N., Turkki, R., Ristimäki, A., Jäger, E., Karbach, J., Wahle, C., Kankainen, M., Backman, C., von Euler, M., Haavisto, E., Hakonen, T., Heiskanen, R., Jäderberg, M., Juhila, J., Priha, P., Suoranta, L., Vassilev, L., Vuolanto, A., & Joensuu, T. (2016). Phase I study with ONCOS-102 for the treatment of solid tumors - an evaluation of clinical response and exploratory analyses of immune markers. *J Immunother Cancer*, *4*, 17.

- Raty, J. K., Pikkarainen, J. T., Wirth, T., & Yla-Herttuala, S. (2008). Gene therapy: the first approved gene-based medicines, molecular mechanisms and clinical indications. *Curr Mol Pharmacol*, *1*(1), 13-23.
- Reale, M., Intorno, R., Tenaglia, R., Feliciani, C., Barbacane, R. C., Santoni, A., & Conti, P. (2002). Production of MCP-1 and RANTES in bladder cancer patients after bacillus Calmette-Guerin immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, *51*(2), 91-98.
- RKI. (2015). Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut - Krebs in Deutschland 2011/2012. Retrieved from [http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2015/krebs\\_in\\_deutschland\\_2015.html](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2015/krebs_in_deutschland_2015.html) am 11.07.2017
- Robinson, C. M., Singh, G., Henquell, C., Walsh, M. P., Peigue-Lafeuille, H., Seto, D., Jones, M. S., Dyer, D. W., & Chodosh, J. (2011). Computational analysis and identification of an emergent human adenovirus pathogen implicated in a respiratory fatality. *Virology*, *409*(2), 141-147.
- Robinson, C. M., Singh, G., Lee, J. Y., Dehghan, S., Rajaiya, J., Liu, E. B., Yousuf, M. A., Betensky, R. A., Jones, M. S., Dyer, D. W., Seto, D., & Chodosh, J. (2013). Molecular evolution of human adenoviruses. *Sci Rep*, *3*, 1812.
- Rognoni, E., Widmaier, M., Haczek, C., Mantwill, K., Holzmüller, R., Gansbacher, B., Kolk, A., Schuster, T., Schmid, R. M., Saur, D., Kaszubiak, A., Lage, H., & Holm, P. S. (2009). Adenovirus-based virotherapy enabled by cellular YB-1 expression in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther*, *16*(10), 753-763.
- Rohr, I., Braicu, E. I., En-Nia, A., Heinrich, M., Richter, R., Chekerov, R., Dechend, R., Heidecke, H., Dragun, D., Schafer, R., Gorny, X., Lindquist, J. A., Brandt, S., Sehoul, J., & Mertens, P. R. (2016). Y-box protein-1/p18 as novel serum marker for ovarian cancer diagnosis: A study by the Tumor Bank Ovarian Cancer (TOC). *Cytokine*, *85*, 157-164.
- Rojas, J. J., Sampath, P., Hou, W., & Thorne, S. H. (2015). Defining Effective Combinations of Immune Checkpoint Blockade and Oncolytic Virotherapy. *Clin Cancer Res*, *21*(24), 5543-5551.
- Rosenberg, J. E., Carroll, P. R., & Small, E. J. (2005). Update on chemotherapy for advanced bladder cancer. *J Urol*, *174*(1), 14-20.
- Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gilmore, L. K., Parrott, R. H., & Ward, T. G. (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med*, *84*(3), 570-573.
- Russell, S. J., & Peng, K. W. (2007). Viruses as anticancer drugs. *Trends Pharmacol Sci*, *28*(7), 326-333.
- Russell, S. J., Peng, K. W., & Bell, J. C. (2012). Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol*, *30*(7), 658-670.
- Russell, W. C. (2000). Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol*, *81*(Pt 11), 2573-2604.
- Russell, W. C. (2009). Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol*, *90*(Pt 1), 1-20.



- Sallusto, F., & Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*, *179*(4), 1109-1118.
- Santos, T. G., Martins, V. R., & Hajj, G. N. M. (2017). Unconventional Secretion of Heat Shock Proteins in Cancer. *Int J Mol Sci*, *18*(5).
- Sauthoff, H., Heitner, S., Rom, W. N., & Hay, J. G. (2000). Deletion of the adenoviral E1b-19kD gene enhances tumor cell killing of a replicating adenoviral vector. *Hum Gene Ther*, *11*(3), 379-388.
- Scaffidi, P., Misteli, T., & Bianchi, M. E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, *418*(6894), 191-195.
- Schaack, J., Bennett, M. L., Colbert, J. D., Torres, A. V., Clayton, G. H., Ornelles, D., & Moorhead, J. (2004). E1A and E1B proteins inhibit inflammation induced by adenovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(9), 3124-3129.
- Schaft, N., Dorrie, J., Thumann, P., Beck, V. E., Muller, I., Schultz, E. S., Kampgen, E., Dieckmann, D., & Schuler, G. (2005). Generation of an optimized polyvalent monocyte-derived dendritic cell vaccine by transfecting defined RNAs after rather than before maturation. *J Immunol*, *174*(5), 3087-3097.
- Schagen, F. H., Ossevoort, M., Toes, R. E., & Hoeben, R. C. (2004). Immune responses against adenoviral vectors and their transgene products: a review of strategies for evasion. *Crit Rev Oncol Hematol*, *50*(1), 51-70.
- Schmid, S. C., Gschwend, J. E., & Retz, M. (2014). [Pharmaceutical treatment of advanced urinary bladder cancer: new developments in 2014]. *Urologe A*, *53*(10), 1535-1542.
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*, *75*(2), 163-189.
- Seifried, L. A., Talluri, S., Cecchini, M., Julian, L. M., Mymryk, J. S., & Dick, F. A. (2008). pRB-E2F1 complexes are resistant to adenovirus E1A-mediated disruption. *J Virol*, *82*(9), 4511-4520.
- Shin, S. P., Seo, H. H., Shin, J. H., Park, H. B., Lim, D. P., Eom, H. S., Bae, Y. S., Kim, I. H., Choi, K., & Lee, S. J. (2013). Adenovirus expressing both thymidine kinase and soluble PD1 enhances antitumor immunity by strengthening CD8 T-cell response. *Mol Ther*, *21*(3), 688-695.
- Shiota, M., Izumi, H., Onitsuka, T., Miyamoto, N., Kashiwagi, E., Kidani, A., Yokomizo, A., Naito, S., & Kohno, K. (2008). Twist promotes tumor cell growth through YB-1 expression. *Cancer Res*, *68*(1), 98-105.
- Shiota, M., Yokomizo, A., Itsumi, M., Uchiumi, T., Tada, Y., Song, Y., Kashiwagi, E., Masubuchi, D., & Naito, S. (2011). Twist1 and Y-box-binding protein-1 promote malignant potential in bladder cancer cells. *BJU Int*, *108*(2 Pt 2), E142-149.

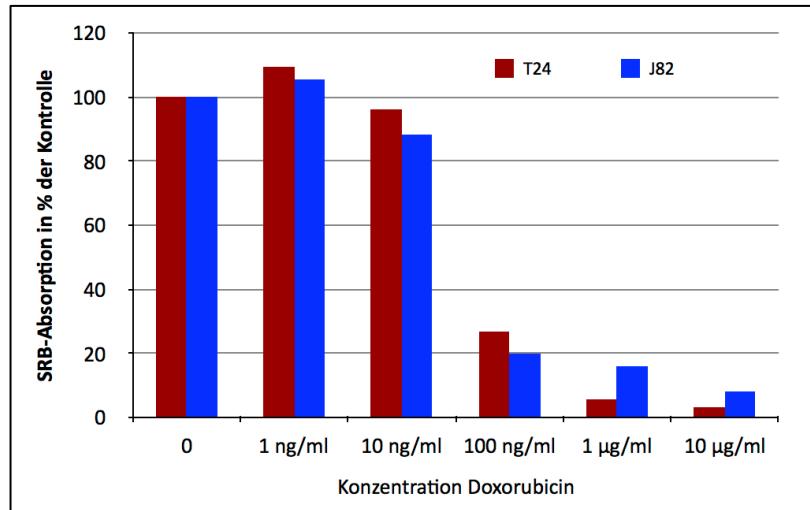
- Showalter, A., Limaye, A., Oyer, J. L., Igarashi, R., Kittipatarin, C., Copik, A. J., & Khaled, A. R. (2017). Cytokines in immunogenic cell death: Applications for cancer immunotherapy. *Cytokine, 97*, 123-132.
- Sievert, K. D., Amend, B., Nagele, U., Schilling, D., Bedke, J., Horstmann, M., Hennenlotter, J., Kruck, S., & Stenzl, A. (2009). Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? *World J Urol, 27*(3), 295-300.
- Simon, M. C., Kitchener, K., Kao, H. T., Hickey, E., Weber, L., Voellmy, R., Heintz, N., & Nevins, J. R. (1987). Selective induction of human heat shock gene transcription by the adenovirus E1A gene products, including the 12S E1A product. *Mol Cell Biol, 7*(8), 2884-2890.
- Sobol, P. T., Boudreau, J. E., Stephenson, K., Wan, Y., Lichty, B. D., & Mossman, K. L. (2011). Adaptive antiviral immunity is a determinant of the therapeutic success of oncolytic virotherapy. *Mol Ther, 19*(2), 335-344.
- Song, Y. H., Shiota, M., Yokomizo, A., Uchiyama, T., Kiyoshima, K., Kuroiwa, K., Oda, Y., & Naito, S. (2014). Twist1 and Y-box-binding protein-1 are potential prognostic factors in bladder cancer. *Urol Oncol, 32*(1), 31 e31-37.
- Sonpavde, G., Sternberg, C. N., Rosenberg, J. E., Hahn, N. M., Galsky, M. D., & Vogelzang, N. J. (2010). Second-line systemic therapy and emerging drugs for metastatic transitional-cell carcinoma of the urothelium. *Lancet Oncol, 11*(9), 861-870.
- Stein, J. P., Lieskovsky, G., Cote, R., Groshen, S., Feng, A. C., Boyd, S., Skinner, E., Bochner, B., Thangathurai, D., Mikhail, M., Raghavan, D., & Skinner, D. G. (2001). Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J Clin Oncol, 19*(3), 666-675.
- Sternberg, C. N., Yagoda, A., Scher, H. I., Watson, R. C., Geller, N., Herr, H. W., Morse, M. J., Sogani, P. C., Vaughan, E. D., Bander, N., & et al. (1989). Methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin for advanced transitional cell carcinoma of the urothelium. Efficacy and patterns of response and relapse. *Cancer, 64*(12), 2448-2458.
- Sudarshan, S., Holman, D. H., Hyer, M. L., Voelkel-Johnson, C., Dong, J. Y., & Norris, J. S. (2005). In vitro efficacy of Fas ligand gene therapy for the treatment of bladder cancer. *Cancer Gene Ther, 12*(1), 12-18.
- Swaike, A., Hammond, W. A., & Joseph, R. W. (2015). Current state of anti-PD-L1 and anti-PD-1 agents in cancer therapy. *Mol Immunol, 67*(2 Pt A), 4-17.
- Swaminathan, S., & Thimmapaya, B. (1995). Regulation of adenovirus E2 transcription unit. *Curr Top Microbiol Immunol, 199* (Pt 3), 177-194.
- Sylvester, R. J., Oosterlinck, W., Holmang, S., Sydes, M. R., Birtle, A., Gudjonsson, S., De Nunzio, C., Okamura, K., Kaasinen, E., Solsona, E., Ali-El-Dein, B., Tatar, C. A., Inman, B. A., N'Dow, J., Oddens, J. R., & Babjuk, M. (2016). Systematic Review and Individual Patient Data Meta-analysis of Randomized Trials Comparing a Single Immediate Instillation of Chemotherapy After Transurethral Resection with Transurethral Resection Alone in Patients with Stage pTa-pT1 Urothelial Carcinoma of the Bladder: Which Patients Benefit from the Instillation? *Eur Urol, 69*(2), 231-244.

- Sylvester, R. J., van der Meijden, A. P., Oosterlinck, W., Witjes, J. A., Bouffouix, C., Denis, L., Newling, D. W., & Kurth, K. (2006). Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol*, *49*(3), 466-477.
- Tacke, F., Galm, O., Kanig, N., Yagmur, E., Brandt, S., Lindquist, J. A., Eberhardt, C. S., Raffetseder, U., & Mertens, P. R. (2014). High prevalence of Y-box protein-1/p18 fragment in plasma of patients with malignancies of different origin. *BMC Cancer*, *14*(1), 33.
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2009). Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev*, *227*(1), 75-86.
- Tanaka, T., Ohashi, S., & Kobayashi, S. (2014). Roles of YB-1 under arsenite-induced stress: translational activation of HSP70 mRNA and control of the number of stress granules. *Biochim Biophys Acta*, *1840*(3), 985-992.
- Tazawa, H., Kuroda, S., Hasei, J., Kagawa, S., & Fujiwara, T. (2017). Impact of Autophagy in Oncolytic Adenoviral Therapy for Cancer. *Int J Mol Sci*, *18*(7).
- Thery, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 3, Unit 3 22.
- Thery, C., Ostrowski, M., & Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*, *9*(8), 581-593.
- Toth, K., Dhar, D., & Wold, W. S. (2010). Oncolytic (replication-competent) adenoviruses as anticancer agents. *Expert Opin Biol Ther*, *10*(3), 353-368.
- Vale, C. L. (2005). Neoadjuvant Chemotherapy in Invasive Bladder Cancer: Update of a Systematic Review and Meta-analysis of Individual Patient Data: Advanced Bladder Cancer (ABC) Meta-analysis Collaboration. *Eur Urol*, *48*(2), 202-206.
- Varkarakis, M. J., Gaeta, J., Moore, R. H., & Murphy, G. P. (1974). Superficial bladder tumor. Aspects of clinical progression. *Urology*, *4*(4), 414-420.
- Vega, V. L., Rodriguez-Silva, M., Frey, T., Gehrmann, M., Diaz, J. C., Steinem, C., Multhoff, G., Arispe, N., & De Maio, A. (2008). Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages. *J Immunol*, *180*(6), 4299-4307.
- Vlaanderen, J., Straif, K., Ruder, A., Blair, A., Hansen, J., Lynge, E., Charbotel, B., Loomis, D., Kauppinen, T., Kyyronen, P., Pukkala, E., Weiderpass, E., & Guha, N. (2014). Tetrachloroethylene exposure and bladder cancer risk: a meta-analysis of dry-cleaning-worker studies. *Environ Health Perspect*, *122*(7), 661-666.
- von der Maase, H., Hansen, S. W., Roberts, J. T., Dogliotti, L., Oliver, T., Moore, M. J., Bodrogi, I., Albers, P., Knuth, A., Lippert, C. M., Kerbrat, P., Sanchez Rovira, P., Wersall, P., Cleall, S. P., Roychowdhury, D. F., Tomlin, I., Visseren-Grul, C. M., & Conte, P. F. (2000). Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *J Clin Oncol*, *18*(17), 3068-3077.

- von der Maase, H., Sengelov, L., Roberts, J. T., Ricci, S., Dogliotti, L., Oliver, T., Moore, M. J., Zimmermann, A., & Arning, M. (2005). Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol*, *23*(21), 4602-4608.
- Wang, J., Sun, X., Zhao, J., Yang, Y., Cai, X., Xu, J., & Cao, P. (2017). Exosomes: A Novel Strategy for Treatment and Prevention of Diseases. *Front Pharmacol*, *8*, 300.
- Wickham, T. J., Mathias, P., Cheresch, D. A., & Nemerow, G. R. (1993). Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*, *73*(2), 309-319.
- Wirth, T., Zender, L., Schulte, B., Mundt, B., Plentz, R., Rudolph, K. L., Manns, M., Kubicka, S., & Kuhnel, F. (2003). A telomerase-dependent conditionally replicating adenovirus for selective treatment of cancer. *Cancer Res*, *63*(12), 3181-3188.
- Witjes, J. A., Lebrecht, T., Comperat, E. M., Cowan, N. C., De Santis, M., Bruins, H. M., Hernandez, V., Espinos, E. L., Dunn, J., Rouanne, M., Neuzillet, Y., Veskimäe, E., van der Heijden, A. G., Gakis, G., & Ribal, M. J. (2017). Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. *Eur Urol*, *71*(3), 462-475.
- Wold, W. S., Doronin, K., Toth, K., Kuppuswamy, M., Lichtenstein, D. L., & Tollefson, A. E. (1999). Immune responses to adenoviruses: viral evasion mechanisms and their implications for the clinic. *Curr Opin Immunol*, *11*(4), 380-386.
- Wolffe, A. P. (1994). STRUCTURAL AND FUNCTIONAL-PROPERTIES OF THE EVOLUTIONARILY ANCIENT Y-BOX FAMILY OF NUCLEIC-ACID BINDING-PROTEINS. *Bioessays*, *16*(4), 245-251.
- Woller, N., Knocke, S., Mundt, B., Gurlevik, E., Struver, N., Kloos, A., Boozari, B., Schache, P., Manns, M. P., Malek, N. P., Sparwasser, T., Zender, L., Wirth, T. C., Kubicka, S., & Kuhnel, F. (2011). Virus-induced tumor inflammation facilitates effective DC cancer immunotherapy in a Treg-dependent manner in mice. *J Clin Invest*, *121*(7), 2570-2582.
- Woolley, A. G., Algie, M., Samuel, W., Harfoot, R., Wiles, A., Hung, N. A., Tan, P. H., Hains, P., Valova, V. A., Huschtscha, L., Royds, J. A., Perez, D., Yoon, H. S., Cohen, S. B., Robinson, P. J., Bay, B. H., Lasham, A., & Braithwaite, A. W. (2011). Prognostic association of YB-1 expression in breast cancers: a matter of antibody. *PLoS One*, *6*(6), e20603.
- Yafi, F. A., Brimo, F., Steinberg, J., Aprikian, A. G., Tanguay, S., & Kassouf, W. (2015). Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer. *Urol Oncol*, *33*(2), 66.e25-31.
- Yamashita, T., Higashi, M., Momose, S., Morozumi, M., & Tamaru, J. I. (2017). Nuclear expression of Y box binding-1 is important for resistance to chemotherapy including gemcitabine in TP53-mutated bladder cancer. *Int J Oncol*, *51*(2), 579-586.
- Yee, A. S., Reichel, R., Kovessdi, I., & Nevins, J. R. (1987). Promoter interaction of the E1A-inducible factor E2F and its potential role in the formation of a multi-component complex. *EMBO J*, *6*(7), 2061-2068.
- Zaidi, M. R., & Merlino, G. (2011). The two faces of interferon-gamma in cancer. *Clin Cancer Res*, *17*(19), 6118-6124.

- Zamarin, D., Holmgaard, R. B., Subudhi, S. K., Park, J. S., Mansour, M., Palese, P., Merghoub, T., Wolchok, J. D., & Allison, J. P. (2014). Localized oncolytic virotherapy overcomes systemic tumor resistance to immune checkpoint blockade immunotherapy. *Sci Transl Med*, 6(226), 226ra232.
- Zhao, Y., Li, Y., Wang, Q., Wang, L., Yang, H., & Li, M. (2011). Increased antitumor capability of fiber-modified adenoviral vector armed with TRAIL against bladder cancers. *Mol Cell Biochem*, 353(1-2), 93-99.
- Zheng, J., Jing, W., & Orentas, R. J. (2009). Discovery of YB-1 as a new immunological target in neuroblastoma by vaccination in the context of regulatory T cell blockade. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 41(12), 980-990.
- Zheng, J., Liu, P., & Yang, X. (2012). YB-1 immunization combined with regulatory T-cell depletion induces specific T-cell responses that protect against neuroblastoma in the early stage. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 44(12), 1006-1014.

## 8 Anhang



**Abbildung 8. 1: SRB-Assay zur Ermittlung der tödlichen Konzentration von Doxorubicin auf T24- und J82-Zellen**

Bei den Versuchen zur HSP70- und HMGB-1-Freisetzung wurden bei der Kombination aus Virotherapie und Doxorubicin eine Konzentration von 50 ng/ml Doxorubicin verwendet.

## 9 Danksagungen

Ich möchte Herrn Professor Dr. med. Jürgen E. Gschwend, Direktor der Urologischen Klinik am Klinikum rechts der Isar in München für die Möglichkeit danken, in seiner Klinik promovieren und arbeiten zu dürfen.

Mein herzlicher und aufrichtiger Dank gilt PD Dr. Per Sonne Holm, meinem Betreuer und Doktorvater. Er ermöglichte mir die Arbeit an diesem faszinierenden Thema. Seine Worte und Ideen förderten immer wieder meine Motivation zur Arbeit im Labor. Er führte mich engagiert und verständnisvoll in die Theorie und Praxis des wissenschaftlichen Arbeitens ein und gemeinsam entwickelten und diskutierten wir Ideen, Methoden und Ergebnisse. Seine ruhige und geduldige Art trug maßgeblich zur angenehmen Arbeitsatmosphäre bei. Ich danke ihm für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die exzellente Betreuung – die Anfertigung meiner Promotion unter seiner Aufsicht hat mich in vielerlei Hinsicht bereichert.

Ich danke PD Dr. Roman Nawroth für die Unterstützung sowie für die vielen kritischen Denkanstöße zur Methodik und zum wissenschaftlichen Schreiben.

Mein Dank gilt außerdem Haissi Ciu für die Unterstützung bei der Exosomenisolation und Florian Praetorius für die elektronenmikroskopische Analyse der Exosomen.

Für die technische Unterstützung und kritischen Anmerkungen zu Methoden und Ergebnissen möchte ich besonders Klaus Mantwill sowie Monika Moissl danken. Vielen Dank an alle Mitarbeiter des urologischen Forschungslabors, die stets hilfsbereit waren und für die angenehme Arbeitsatmosphäre sorgten. Namentlich seien hier Anuja Sathe, Sebastian Schmid und Eva Lichtenegger erwähnt, die mich bei der Arbeit sehr unterstützten und mir im Labor mit Rat und Tat zur Seite standen.

Unendliche Dankbarkeit möchte ich meinen Eltern und meinem Bruder aussprechen, die mich bei diesem sowie bei jedem anderen Vorhaben bedingungslos und mit voller Kraft unterstützen. Mein Dank gilt ihnen sowie meiner Freundin für die geduldige Unterstützung und Beratung während meiner Promotionsarbeit.

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Florestan Johannes Koll  
Geburtsort/ -datum Hamburg, Deutschland | 23. November 1990  
E-Mail florestan.koll@tum.de

### Bildung

Ab März 2014 Experimentelle Doktorarbeit und Mitglied der TUM Graduate School  
*Untersuchung immunologischer Aspekte der YB-1 basierten Virotherapie in Harnblasenkarzinomzelllinien*  
AG Holm, Urologische Klinik, Klinikum rechts der Isar, TU München

April 2013-Juni 2017 Studium der Humanmedizin an der Technische Universität München  
3. Staatsexamen Mai 2017  
2. Staatsexamen April 2016

Okt 2010-April 2013 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München  
1. Staatsexamen Februar 2013

Aug 2009-Aug 2010 Freiwilliges Soziales Jahr in Quito, Ecuador

Aug 2001-Juli 2009 Gymnasium Hochrad, Hamburg

### Beruf

Seit Oktober 2017 Assistenzarzt in der Urologischen Klinik und Poliklinik der TUM, Klinikum rechts der Isar

Juni 2017 Approbation als Arzt

Mai 2016-April 2017 Praktisches Jahr

1. Tertian: Urologie am Universitätsspital Zürich
2. Tertian: Chirurgie am Tygerberg Hospital der University of Stellenbosch, Südafrika (Stipendium von TUM International)
3. Tertian: Innere Medizin am Klinikum rechts der Isar und am Deutschen Herzzentrum, München

### Publikationen und Auszeichnungen

Sep 2015 Stipendium zur Teilnahme am Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie in Hamburg

März 2015 „Best poster“ in seiner Session beim Kongress der EAU in Madrid  
*Treatment of bladder cancer with YB-1 dependent oncolytic adenovirus: Preliminary in vitro studies*  
Koll, F.J. et al.; *European Urology Supplements*, Volume 14, Issue 2, e32