



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-  
Gesichtschirurgie Klinikum rechts der Isar  
Direktor: Prof. Dr. Dr. Klaus-Dietrich Wolff

## **Die YB-1 basierte onkolytische Virotherapie beim Kopf- Hals-Karzinom und ihr Einfluss auf die Angiogenese**

Dr. med. Selgai Haidari

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

Doktors der Zahnheilkunde

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Herbert Deppe

Prüfende der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Dr. Andreas Kolk
2. apl. Prof. Dr. Per Sonne Holm

Die Dissertation wurde am 28.09.2020 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.03.2021 angenommen

*Für Constantin Leonard und meine Frau Julia*

# I. Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>II.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Kopf-Hals-Karzinome</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.2.1	Epidemiologie und Ätiologie	1
1.2.2	Klassifikation von oralen Plattenepithelkarzinomen	2
1.2.3	Therapie	5
<b>1.3</b>	<b>Y-Box-Protein 1</b>	<b>8</b>
<b>1.4</b>	<b>Onkolytische Virotherapie</b>	<b>9</b>
<b>1.5</b>	<b>Tumorangiogenese</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>Ziele und Fragestellung der Arbeit</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>16</b>
<b>3.1</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>16</b>
<b>3.2</b>	<b>Virale Replikation in eGFP-FaDu Tumorzellen</b>	<b>16</b>
<b>3.3</b>	<b>Potency Assay</b>	<b>17</b>
<b>3.4</b>	<b>Versuchsaufbau der <i>in vivo</i> Versuche</b>	<b>17</b>
<b>3.5</b>	<b>Maus als Versuchstier</b>	<b>18</b>
<b>3.6</b>	<b>Mausnarkose</b>	<b>19</b>
<b>3.7</b>	<b>Injektion der eGFP-FaDu Tumorzellen</b>	<b>20</b>
<b>3.8</b>	<b>Virusinjektion</b>	<b>20</b>
<b>3.9</b>	<b>Immunfluoreszenz</b>	<b>21</b>
3.9.1	Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie	21
<b>3.10</b>	<b>Immunhistologische Färbungen</b>	<b>22</b>
3.10.1	Grundlagen der immunhistologischen Färbungen	22
3.10.2	Entnahme der Organe für die Immunhistologie	22
3.10.3	Durchführung der Immunfluoreszenz	22
<b>3.11</b>	<b>Hämatoxylin-Eosin-Färbung</b>	<b>23</b>
<b>3.12</b>	<b>Auswertung mittels Fluoreszenzkamera</b>	<b>24</b>
<b>3.13</b>	<b>Auswertung der Tumorgröße</b>	<b>24</b>
<b>3.14</b>	<b>Auswertung der Histologie</b>	<b>24</b>
3.14.1	Bestimmung der Microvessel Density	25
<b>3.15</b>	<b>Bestimmung des microvessel Pericyte Coverage Index (mPCI)</b>	<b>26</b>
<b>3.16</b>	<b>Daten &amp; Statistik</b>	<b>26</b>

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>28</b>
4.1	Analyse der Virusreplikation in der Kopf-Hals-Karzinom-Line eGFP-FaDu mittels qPCR .....	28
4.2	Nachweis der Wirksamkeit von XVir-N-31 <i>in vitro</i> .....	29
4.3	Etablierung des Mausmodells.....	30
4.4	<i>In vivo</i> Charakterisierung der eGFP markierten FaDu-Tumorzellen.....	32
4.5	Das Tumorwachstum in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Therapie mit XVir-N-31	35
4.6	Histologische Untersuchung und Vergleich der Therapiegruppe mit der Kontrollgruppe .....	38
4.7	Immunfluoreszenz-Untersuchung und Vergleich der Therapiegruppe mit der Kontrollgruppe .....	42
4.8	Bestimmung der <i>microvessel density</i> mittels Doppelimmunfluoreszenz Färbung des Endothels sowie der Perizyten.....	47
4.9	Bestimmung des <i>microvessel Pericyte Coverage Index</i> mittels Doppelimmunfluoreszenz Färbung des Endothels sowie der Perizyten .....	50
4.10	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	52
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>54</b>
5.1	Die Replikation und onkolytische Kapazität von XVir-N-31 in eGFP <sup>+</sup> FaDU-Zellen	54
5.2	Etablierung eines <i>in vivo</i> Mausmodells zur Untersuchung der Wirksamkeit von XVir-N-31 .....	55
5.3	Die Wirkung von XVir-N-31 auf das Tumorwachstum.....	56
5.4	Der Einfluss der XVir-N-31 Therapie auf die Angiogenese und die Gefäßqualität	58
5.5	Ausblick.....	62
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>66</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>68</b>
<b>10</b>	<b>Veröffentlichungen</b> .....	<b>69</b>
<b>11</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>70</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>80</b>

## II. Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgruppe
$\alpha$ SMA	alpha smooth muscle actin
CD	Cluster of differentiation
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CT	Computertomogramm
DAMP	Damage-associated molecular patterns
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eGFP	enhanced green fluorescent protein
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FBS	Fetales Kälberserum
G	Gage
G-1/2/3	Grading-1 / 2 / 3
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
MIF	Makrophagenmigrationsinhibierender Faktor
min	Minute
mm	Millimeter
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
MOI	Multiplizität der Infektion
mPCI	microvessel Pericyte Coverage Index
MVD	Microvessel Density
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
ROI	Region of Interest
sec	Sekunde
SRBs	Sulforhodamine B
T-Vec)	Talimogen laherparepvec
TCA	Trichloressigsäure
TME	Tumor microenvironment
TNM	Tumor, Node, Metastasis
Tris-	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
UICC	Union for International Cancer Control
YB-1	Y-Box Protein 1
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer

# 1 Einleitung

## 1.1 Kopf-Hals-Karzinome

## 1.2 Einleitung

Das Plattenepithelkarzinom ist die häufigste maligne Erkrankung im Kopf-Halsbereich. Plattenepithelkarzinome gehen in der Regel aus epithelalem Gewebe oder aus Gewebe, welches über die Fähigkeit der Plattenzellmetaplasie verfügt, hervor (Ferlay et al. 2013). Die Gruppe der Plattenepithelkarzinome ist sehr heterogen hinsichtlich des Therapieansprechens, des Krankheitsverlaufs sowie der Prognose (Scully et al. 2009, Troeltzsch et al. 2014) (Jadhav et al. 2013). Die in der Arbeit betrachteten oralen Plattenepithelkarzinome bilden sich aus der oralen Schleimhaut und zeichnen sich durch lokal destruktives Wachstum aus sowie dem häufigen Auftreten von lymphogener Metastasierung (Scully et al. 2009, Troeltzsch et al. 2018). Das Auftreten von Fernmetastasen wird mit 7% relativ selten beobachtet (Neville et al. 2002, Scully et al. 2009) (McDowell 2006) (Kimple et al. 2014).

### 1.2.1 Epidemiologie und Ätiologie

Die Gruppe der Kopf-Hals-Tumore bestehen zu 90% aus Plattenepithelkarzinomen und werden im Englischen als „head and neck squamous cell carcinoma“ (HNSCC) bezeichnet. Diese werden anhand ihrer Lokalisation unterteilt in Karzinome der Lippen, der Mundhöhle, sowie des Naso-, Oro- und Hypopharynx (Bray et al. 2018).

Weltweit traten im Jahre laut „Global Cancer Statistics“ 657.438 maligne Tumore im Kopf-Hals-Bereich (Lippe, der Mundhöhle, des Naso-, Oro-, und Hypopharynx) auf, davon 481.804 Männer und 175.634 Frauen und führten zu 336.360 Todesfällen (Bray et al. 2018).

International ist die Verteilung sehr heterogen, sowohl was das Auftreten in den jeweiligen Ländern betrifft als auch was die Unterschiede der Geschlechter betrifft (Bray et al. 2018).

Vor allem, was die Karzinome der Mundhöhle betrifft, zeigen sich je nach kultureller und geographischer Region massive Unterschiede. So hat das Karzinom der Mundhöhle im südasiatischen Raum (z.B. Indien und Sri Lanka) sowie auf den pazifischen Inseln (Papua-Neuguinea) mit einer Inzidenz 21.2 Erkrankungen pro 100.000 männliche Einwohner eine im Vergleich zu Westeuropa mit 6.9 Erkrankungen pro 100.000 männliche Einwohnern dreifache Inzidenz (Markopoulos 2012) (Ferlay et al. 2013). Die Inzidenz bei der weiblichen Bevölkerung ist sogar um das Vierfache erhöht, hier steht eine Inzidenz von 12 Erkrankungen pro 100.000 Einwohnern einer von 3.2 gegenüber (Bray et al. 2018).

Gemäß den Daten des Statistischen Bundesamtes der Bundesrepublik Deutschland, kam es im Jahre 2013 zu 13.130 Neuerkrankungen davon 3.680 bei Frauen und zu 9.450 bei Männern und führten zu 5.473 Todesfällen. Männer sind 2.5-fach häufiger betroffen als Frauen, was vor allem auf die mit der Erkrankung verbundenen Risikofaktoren zurückzuführen ist. Aber in den letzten Jahren kommt es zu einer Zunahme (1,2%) der weiblichen Neuerkrankungen und einer Abnahme (-0,7%) der männlichen Neuerkrankungen, was vor allem auf den sich ändernden Konsum von Noxen zwischen den Geschlechtern zurückzuführen ist.

## 1.2.2 Klassifikation von oralen Plattenepithelkarzinomen

### 1.2.2.1 TNM-Klassifikation

Die TNM-Klassifikation von malignen Tumoren (TNM) ist ein international etablierter Standard zur Klassifizierung von soliden Krebserkrankungen. Das Klassifikationssystem berücksichtigt die Größe der Tumore sowie die Streuung sowohl lokal als auch fern der malignen Tumore. Neuerdings wird seit der 8. Auflage auch der histologische Parameter der Infiltrationstiefe berücksichtigt (Doescher et al. 2017) (Huang et al. 2017).

Die TNM-Klassifikation wurde von der Union for International Cancer Control (UICC) entwickelt und wird von ihr gepflegt. Beschrieben wird das TNM-System mit der Hilfe von alphanumerischen Codes.

T beschreibt die Größe des ursprünglichen Primärtumors und ob er umliegendes Gewebe infiltriert.

N beschreibt die regional befallenen Lymphknoten

M beschreibt die Fernmetastasierung.

	<b>Abkürzung</b>	<b>Erläuterung</b>
<b>Tumorgröße</b>	Tis	Carcinoma in situ
	T0	Kein Primärtumor
	T1	Primärtumor mit maximaler Ausdehnung von 2cm und 5 mm maximale Invasionstiefe
	T2	Primärtumor <2 cm und >5mm <10 mm Invasionstiefe oder Primärtumor >2cm und <4cm und maximal 10mm Invasionstiefe
	T3	Primärtumor >4 cm oder maximale Invasionstiefe >10mm
	T4a	Primärtumor infiltriert kortikalen Knochen der Maxilla oder Mandibula, äußere Muskulatur der Zunge, Kieferhöhle oder Gesichtshaut
	T4b	Tumor infiltriert Spatium masticatorium, Processus pterygoideus, Schädelbasis oder umschließt die A. carotis interna
	Tx	Primärtumor nicht bestimmbar
<b>Lymphknotenstatus</b>	N0	Keine Lymphknotenmetastasen
	N1	Metastase <3cm in solitärem ipsilateralem Lymphknoten ohne extrakapsuläres Wachstum
	N2a	Metastase >3cm und <6cm in solitärem ipsilateralem Lymphknoten ohne extrakapsuläres Wachstum
	N2b	Metastasen <6cm in multiplen ipsilateralen Lymphknoten ohne extrakapsuläres Wachstum
	N2c	Metastasen <6cm in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten ohne extrakapsuläres Wachstum
	N3a	Metastasen >6cm in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten ohne extrakapsuläres Wachstum
	N3b	Metastasen mit extrakapsulärem Wachstum
	Nx	Regionale Lymphknoten nicht bekannt



Fernmetastasen	M0 M1 Mx	keine Fernmetastasen nachweisbar Fernmetastasen vorhanden Keine Beurteilung hinsichtlich des Vorliegens von Metastasen möglich
----------------	----------------	--

Tabelle 1 - TNM Klassifikation von oralen Plattenepithelkarzinomen nach der 8. Auflage

Mittels der o.g. UICC-Klassifikation lassen sich die oralen Plattenepithelkarzinome in 4 Stadien unterteilen. Idee dieser Stadien ist, die unterschiedlichen TNM Kombinationen 4 Risikogruppen hinsichtlich des Verlaufs und der Prognose zuzuordnen.

Stadium nach UICC	T-Stadium	N-Stadium	M-Stadium
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
Stadium IVa	T4	N0	M0
	T1, T2, T3, T4a	N1 N2	M0
Stadium IVb	T1-T4a	N3	M0
	T4b	N1 – N3	M0
Stadium IVc	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 2 - UICC Stadien

### 1.2.2.2 R-Klassifikation

Die R-Klassifikation spezifiziert den Resektionsstatus und ist essentiell für die post-chirurgische Therapie und Prognose. Vorgenommen wird die R-Klassifikation durch einen Pathologen. Die Klassifikation gliedert sich folgendermaßen:

- R0 beschreibt eine Resektion in sano
- R1 beschreibt eine Resektion, die mikroskopisch nicht in sano ist
- R2 beschreibt eine Resektion, die markoskopisch nicht in sano ist.

### 1.2.2.3 Grading

Orale Plattenepithelkarzinome können noch weiter nach histologischen Kriterien, dem Grading, unterschieden werden. Grundsätzlich kann unterschieden werden zwischen hoch (G1), mäßig (G2) und niedrig (G3) differenzierten Karzinomen.

Hoch differenzierte G1 Karzinome zeigen histologisch Ähnlichkeit mit gesunden Plattenepithelzellen. Die Mitoserate ist im Vergleich zu G2 und G3 deutlich niedriger. Typisch für G1 Karzinome ist häufig eine Verhornung.

Mäßige differenzierte G2 Karzinome weichen deutlicher von gesundem Plattenepithel ab und haben eine deutlich höhere Mitoserate und eine größere Abweichung der Kernform.

Niedrig differenzierte G3 Karzinome weichen deutlich von normalen Plattenepithelzellen ab und haben eine sehr hohe Mitoseaktivität und sind sehr heterogen hinsichtlich der Kernform (Doescher et al. 2017) (Rodrigues et al. 2020).

### 1.2.3 Therapie

Die Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms richtet sich nach dem Tumorstadium unter Berücksichtigung des Allgemeinzustandes der Patienten sowie der Lokalisation des Tumors. Standard ist in den nicht-fernmastasierten Stadien die chirurgische Therapie mit dem Ziel der vollständigen Resektion (R0), einschließlich einem empfohlenen Sicherheitsabstand von mindestens 0,5 cm (Kovacs 2004, Buchakjian et al. 2018).

In der Regel wird im selben Eingriff aufgrund des relativ häufigen Auftretens von okkulten Metastasen (20 – 40%) noch eine Lymphadenektomie der Halslymphknoten durchgeführt (Troeltzsch et al. 2016) (Byers et al. 1998, Coatesworth et al. 2002). Das Ausmaß der Halslymphknotenausräumung ist abhängig von der Lokalisation und Größe des Tumors. Werden zusätzlich intraoperativ Schnellschnitte der Lymphknoten genommen, beeinflussen diese ebenfalls das weitere therapeutische Procedere. Typischerweise werden die submentalen (Level Ia) submandibulären (Level Ib), kranioujugulären (Level II) sowie mediojuguläre (Level III) Lymphknotengruppen gemäß der Einteilung von Robbins entfernt (Robbins et al. 2002, Wolff et al. 2012, Nobis et al. 2017) Die o.g. Drainagestationen sind vorwiegend von Metastasen von oralen Plattenepithelkarzinomen befallen. Die Radikalität der durchgeführten

Halslymphknotenausräumungen hat über die letzten Jahrzehnte deutlich abgenommen. Mittlerweile ist, sofern möglich, der Standard eine selektive Halslymphknotenausräumung, die normalerweise die supraomohyoidale Halslymphknotenausräumung (Level I – III) enthält unter Erhalt der funktionell relevanten Strukturen, wie die Vena jugularis interna, N. accessorius und der M. sternocleidomastoideus (Shah et al. 1990) (Wolff et al. 2012)

Als Teil der chirurgischen Therapie muss auch die anschließende Rekonstruktion des entstandenen Defektes gesehen werden. Die Möglichkeiten der plastischen Rekonstruktion im Kopf-Hals-Bereich entscheiden auch maßgeblich über die mögliche Operabilität. In der Regel wird im selben operativen Eingriff die plastische Rekonstruktion des Operationsgebietes angestrebt (Wolff et al. 2012).

Die Rekonstruktion ist abhängig von der Defektgröße und gliedert sich von kleinen lokalen chirurgischen Maßnahmen, wie Verschiebe- oder Schwenklappen sowie Spalt- oder Vollhauttransplantate über myokutane gestielte Lappenplastiken, wie z.B. ein Pectoralis major Transplantat bis zu mikrovaskulär renastomisierten Transplanten, wie dem osseokutanen Fibulatransplantat oder fasziokutanen Radialistransplantat, um nur einige Beispiele zu nennen (Cho et al. 2016). Mittlerweile rücken vermehrt Perforatorlappen in der Vordergrund der chirurgisch-rekonstruktiven Therapie (Wolff 2015) (Cho et al. 2016).

Zusätzlich ist zur Prognoseverbesserung eine adjuvante Radio- / Radiochemotherapie ab einem T3 Stadium oder bei positivem N-Status indiziert. Außerdem kann adjuvante Therapie indiziert sein, falls eine R0-Resektion nicht erreicht wurde. (Bernier et al. 2004) (Snow et al. 1982) (Wolff et al. 2012).

Alternativ kann bei T1 und T2 Tumoren auch eine primäre Radiotherapie in kurativer Absicht erfolgen (Lefebvre et al. 1994) (Turner et al. 1996).

Bei fortgeschrittenen oder nicht-operablen Stadien bieten nicht-chirurgische Therapieverfahren, wie die Radio-Chemotherapie oder alleinige Chemotherapie nur eine palliative Option (Bernier et al. 2004) (Kramer et al. 1987). Im Falle eines Rezidives kann, sofern keine Radiotherapie mehr durchgeführt werden kann, der EGFR Antikörper Cetuximab in Kombination mit dem Chemotherapeutikum 5-FU zum Einsatz kommen (EXTREME Schema) (Rivera et al. 2009).

Aktuell rücken innovative Therapieverfahren wie die Immuncheckpointblockade (PD-1 Inhibitor), welche bei anderen Entitäten schon sehr gute Ergebnisse zeigen konnte, in den klinischen Fokus. Studien zeigen, dass eine Immuncheckpointblockade dem EXTREME-Schema überlegen ist und ist daher auch seit kurzem zugelassen bei Rezidiven im Kopf-Hals-Bereich (Ferris et al. 2018) (McCusker et al. 2020).

Bei anderen Karzinomen erfolgreiche medikamentöse Therapien, wie z.B. der Angiogenesehemmer Bevacizumab, konnten keine vorteilhafte Wirkung bei Kopf-Hals-Karzinomen zeigen. Obwohl u.a. die Arbeit von Pianka und Troeltzsch et al. eine signifikante Überexpression der VEGF-Rezeptoren bei oralen Plattenepithelkarzinomen und damit die Relevanz der Tumorangiogenese für den Progress des Tumors zeigte (Pianka et al. 2015).

### 1.3 Y-Box-Protein 1

Der als Biomarker für Karzinome bekannte Transkriptionsfaktor Y-Box-Protein 1 (YB-1) gehört strukturell zur Gruppe der Kälteschockproteine. Evolutionär gesehen ist YB-1 ein hochkonserviertes Nukleinsäure bindendes Protein, welches sowohl bei Bakterien als auch bei Menschen vorkommt (Kohno et al. 2003) (Kolk et al. 2011). In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass YB-1 die Transkription und Translation steuert, indem es sich zwischen Zytosol und Nucleus bewegt (Schittek et al. 2007, Yu et al. 2010) (Kosnopfel et al. 2014).

Im Menschen spielt es vor allem in der embryonalen Entwicklung eine Rolle, wohingegen es im adulten Organismus physiologisch nur noch in geringerer Konzentration im Zytosol vorkommt (Kosnopfel et al. 2014). In Tumorzellen wird allerdings YB-1 stark überexprimiert (Kolk et al. 2011) (Chao et al. 2017) (Janz et al. 2002). Dort reguliert es den Zellzyklus, die Zellproliferation sowie die Angiogenese (Jurcrott et al. 2003, Coles et al. 2005). Auch spielt YB-1 eine Rolle bei für Tumorzellen relevanten Signalwegen, wie dem PI3K/Akt/mTOR-Signalweg oder dem Ras/Raf/MAPK-Signalweg (Lasham et al. 2013).

Auch wenn YB-1 physiologisch lediglich in geringer Konzentration im Zytosol vorkommt, kommt es unter genotoxischem Stress, wie z.B. UV-Strahlung, Hypoxie, ionisierender Strahlung oder chemisch DNA-schädigenden Stoffen (z.B. Chemotherapeutika) zu einer Translokation in den Nucleus (Bargou et al. 1997, Lasham et al. 2013). Daher ist davon auszugehen, dass YB-1 zu den unter Stress aktivierten Proteinen gehört. Es konnte gezeigt werden, dass YB-1 die DNA vor toxischen Substanzen schützt und so auch zu einer Chemotherapieresistenz beiträgt (Bargou et al. 1997). Untersuchungen zeigten, dass eine in Tumorzellen erhöhte YB-1 Expression mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemotherapien verbunden ist. Dies konnte gezeigt werden u.a. für Kopf-Hals-Karzinome, Blasenkarzinome und Mammakarzinome (Tay et al. 2009, Kolk et al. 2011, Lichtenegger et al. 2019) (Shiota et al. 2011) (Janz et al. 2002).

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass einer Interaktion zwischen dem Tumorprotein p53, welches ebenfalls nur in Tumorzellen in relevanter Konzentration vorkommt und YB-1 stattfindet (Lasham et al. 2003).

Umfangreiche Untersuchungen u.a. bei Kopf-Hals-Karzinomen konnten zeigen, dass YB-1 im gesunden Gewebe u.a. der Schleimhaut des Mundes nur sehr gering

exprimiert wird, dafür aber in Tumorzellen massiv überexprimiert wird. Kolk et al. zeigten in Ihrer Arbeit in histologischen Untersuchungen von Kopf-Hals-Karzinomen, dass eine Überexpression von YB-1 im Tumorgewebe signifikant mit einem hohen Grading sowie einer prognostisch schlechten 5-Jahres Überlebensrate korreliert. YB-1 ist ein sehr valider histopathologischer prognostischer Marker für den Krankheitsverlauf sowie die Malignität von Kopf-Hals-Karzinomen (Kolk et al. 2011).

#### 1.4 Onkolytische Virotherapie

Die onkolytische Virotherapie basiert auf der Fähigkeit der Viren, Zellen zu infizieren und sich anschließend in der Zelle zu replizieren, um so das Virus zu vermehren und anschließend nach Lyse der infizierten Zelle die umgebenden Zellen zu infizieren (Thorne et al. 2005) (Holm et al. 2016).

Viren befallen Tumorzellen gleichermaßen wie gesunde Zellen. Allerdings herrschen im Tumormicroenvironment (TME) besonders günstige Eigenschaften für die Infektion und Replikation (Koske et al. 2019). Das immunsupprimierende Milieu im TME führt dazu, dass die antivirale Abwehr der Tumorzellen stark reduziert wird und sich das Virus besonders gut replizieren und weitere Tumorzellen infizieren kann (Niemann et al. 2019).

Mit Hilfe der großen Fortschritte in der Gentechnik, konnten die onkolytischen Viren so modifiziert werden, dass ihre Selektivität für Tumorzellen gesteigert wurde (Ungerechts et al. 2017). Dies basiert auf der Eigenschaft von Tumorzellen bestimmte Proteine wie den Transkriptionsfaktor YB-1 zu überexprimieren. Diese konnten anschließend als Ziel für die virale Infektion und Replikation genutzt werden (Mantwill et al. 2006) (Holm et al. 2002) (Glockzin et al. 2006) (Lichtenegger et al. 2019).

An diesem Punkt unterscheidet sich die Virotherapie von herkömmlichen onkologischen Therapien, wie der Radiotherapie oder der Chemotherapie, welche undifferenziert sowohl die Tumorzellen als auch das gesunde Gewebe schädigen. Neben dem gezielten Angriff der Tumorzellen ist ein weiterer Vorteil, dass sich das Virus repliziert und anschließend durch die Lyse der Tumorzellen freigesetzt wird. Die freigesetzten Viren können nun weitere Tumorzellen infizieren. So beschleunigt sich die Onkolyse (Holm et al. 2016).

Die Tumorzellen entziehen sich durch die Expression von Immuncheckpointinhibitoren der Immunantwort des Körpers. Zusätzlich, wie oben beschrieben, setzen sie eine Vielzahl immunsuppressiver Reaktionen in Gang und schaffen so ein TME, welches eine Immunreaktion des Körpers massiv erschwert.

Im Rahmen der Virusinfektion der Tumorzellen kann es zu einer Überexpression von Virusproteinen auf der Oberfläche der Tumorzellen kommen, welche vom Immunsystem erkannt werden. Im Rahmen der Lyse der Tumorzellen werden intrazelluläre Bestandteile, die das Immunsystem aktivieren, freigesetzt, so genannte damage-associated molecular patterns, DAMPs (Takasu et al. 2016). Es handelt sich um intrazelluläre Stoffe, wie ATP, HMGB1, und mitochondriale Bestandteile wie Formylpeptide, welche von Toll-Like-Rezeptoren und T-Zellen des Immunsystems erkannt werden und eine proinflammatorische Antwort erzeugen (Andersson et al. 2000) (Kono et al. 2008). Dieser Vorgang wird als „immunogenic cell death“ bezeichnet (Tesniere et al. 2008).

Neben der Lyse und sich katalysierenden Infektionen der Tumorzellen kommt es außerdem zu einer, auf den Tumorantigenen basierenden, spezifischen Immunantwort im gesamten Körper, die auch nicht-infizierte Zellen angreift.

Verstärkt wurde die immunogene Wirkung der Virustherapie durch gentechnische Veränderungen der Viren, so dass proinflammatorische Transgene wie granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) durch infizierte Zellen gebildet werden. Dies wurde unter anderem bei dem genetisch veränderten Herpes Simplex Virus Talimogen laherparepvec (T-Vec) gemacht, welches für die Behandlung des metastasierten malignen Melanoms zugelassen ist (Johnson et al. 2015). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die onkolytische Virustherapie effektiv Tumorzellen infizieren und zerstören sowie das vorher supprimierte Immunsystem aktivieren kann.

Die Limitation der Virotherapie ist häufig die Beseitigung der therapeutisch applizierten Viren durch das Immunsystem, durch entweder bestehende Antikörper oder neugebildete Antikörper. Trotz des durch das Virus geschaffenen proinflammatorischen Milieus, entziehen sich die Tumorzellen teilweise über die Immuncheckpointblockade der T-Zell-Antwort (Zheng et al. 2019). Eine Hürde, die durch die mittlerweile in Studien eingesetzte Kombination aus Virotherapie und Immuncheckpointblockade teilweise überwunden wird (Conry et al. 2018, Sun et al. 2018).

Aktuell wird die Virotherapie in der Regel lokal in den Tumor injiziert, wie z.B. beim malignen Melanom (Conry et al. 2018) (Hamid et al. 2020). Nach Replikation in den Tumorzellen kommt es im Verlauf zu einer systemischen Ausbreitung des Virus, so dass auch Metastasen infiziert werden. Des Weiteren kommt es durch die o.g. immunologischen Prozesse zur einer systemischen anti-tumoralen Immunantwort.

Gängige Viren, die häufig verändert und verwendet werden, sind Adenoviren (u.a. Erkältungsviren), Reoviren, zu denen u.a. die Rotaviren gehören oder die Herpes Simplex Viren (Wennier et al. 2011). Typische Nebenwirkungen der Virotherapie sind Fieber, Übelkeit, Erkältungssymptome und Müdigkeit. Symptome, die häufig mit Viruserkrankungen einhergehen (Andtbacka et al. 2015).

Das in dieser Arbeit verwendete Virus XVir-N-31 ist ein Adenovirus, welches u.a. für die Behandlungen von Glioblastomrezidiven entwickelt wurde. Es wurde zuvor als Ad-Delo3-RGD beschrieben (Holzmüller et al. 2011, Lichtenegger et al. 2019). Es hat eine Deletion in der CR3-Region von E1A, was seine Replikation YB-1 abhängig macht. Darüber hinaus weist es eine Deletion im E1B19k-Gen sowie in der E3-Region auf (Lichtenegger et al. 2019).

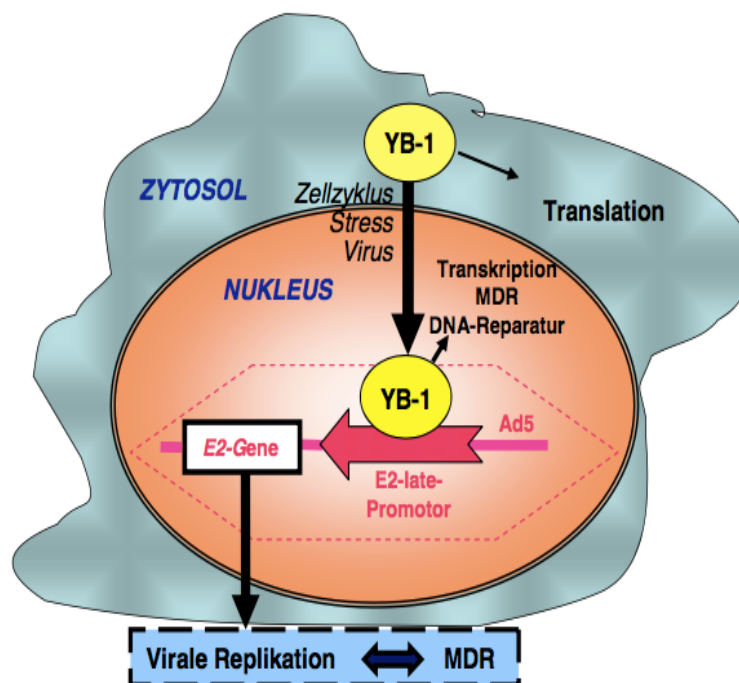


Abbildung 1- Darstellung der intrazellulären Virusreplikation



Die Abbildung zeigt die vereinfachte YB-1 abhängige Virusreplikation. Das im Zytosol von Tumorzellen vorkommende YB-1 wird unter Stress vermehrt in den Zellkern transportiert. Modifiziert nach Holm et al.

Die Replikation beschränkt sich somit auf Zellen, die den o.g. Tumormarker YB-1 aufweisen. Das sehr spezifische Vorkommen von YB-1 in Tumorzellen führt zu einer sehr spezifischen Infektion und Replikation des Virus, so dass gesunde Zellen kaum affiziert werden. Entscheidend für die effektive Infektion ist die Translokation von YB-1 vom Zytosol in den Zellkern (Holm et al. 2016). In Tumorzellen kommt es u.a. durch die erhöhte Aktivität des PI3K- sowie MAPK-Sinalweges zu einer Phosphorylierung und Acetylierung sowie zu einer Kernlokalisierung von YB-1 und so zu einer Transkription des Virus, welches sich nur in YB-1-kernpositiven Tumorzellen repliziert und diese lysiert (Holm et al. 2016). Induziert werden u.a. die o.g. Signalwege durch Zellstress wie Hypoxie oder auch Bestrahlung (Holm et al. 2016) (Holm et al. 2002). XVir-N-31 konnte in experimentellen Untersuchungen bereits seine Wirkung *in vitro* und *in vivo* beim Glioblastom sowie beim Blasenkrebs im Tiermodell zeigen (Holzmuller et al. 2011) (Lichtenegger et al. 2019).

## 1.5 Tumorangiogenese

Die Tumorangiogenese und die Erkenntnis, dass ohne suffiziente Blutversorgung Tumore nicht über eine kritische Größe hinauswachsen können, wurde vor über 100 Jahren erstmalig beschrieben (Goldmann 1908). In den folgenden Jahren wurden die die Angiogenese vermittelnden Moleküle, wie Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), intensiv erforscht (Ferrara et al. 2012) (Carmeliet et al. 2000, Pralhad et al. 2003). Auf Basis dieser Forschung konnten in den letzten Jahren einige neue Therapieansätze für solide Tumoren entwickelt werden. Bevacizumab, ein monoklonaler Antikörper, welcher VEGF blockiert, konnte beim metastasierten Mammakarzinom oder dem metastasierten Colonkarzinom bessere Ergebnisse erzielen als konventionelle Therapien, wie die Chemotherapie (Gray et al. 2009) (Hurwitz et al. 2004). Dennoch blieb diese zielgerichtete Therapie hinter ihren Erwartungen zurück und konnte bei einem Großteil der soliden Karzinome wie den

Kopf-Hals-Karzinomen keine Verbesserung der Prognose erreichen (Argiris et al. 2019).

Einer der Gründe ist sicherlich die Komplexität der Angiogenese. Diese ist ein mehrstufiger Prozess, an welchem u.a. Endothelzellen, Perizyten und eine Vielzahl von Molekülen, wie die verschiedenen VEGFs sowie Angiopoetin-1 und 2, beteiligt sind (Carmeliet et al. 2000). In diesem Prozess werden, u.a. durch Perizyten, diverse Wachstumsfaktoren sezerniert, welche die umliegende extrazelluläre Matrix modifizieren und die Migration von Endothelzellen steuern. Die anschließend migrierten und proliferierten Endothelzellen bilden eine vorläufige Gefäßstruktur, die sich noch in einem unreifen Zustand befindet. Den anschließenden Vorgang nennt man aus dem Englischen übersetzt Gefäßreifung (vessel maturation) (Carmeliet et al. 2011) (Carmeliet et al. 2000) (Goel et al. 2012). Dieser Vorgang beinhaltet die Rekrutierung von Perizyten, welche die Kapillare umgeben und entscheidend sind für das Gefäßremodelling und die Gefäßstabilisierung und -reifung. Die Reifung der Gefäße wird u.a. über die Signalmoleküle Angiopoetin-1/2 und Tie2 sowie PDGF $\beta$ /PDGFR- $\beta$  reguliert (Goel et al. 2012).

Die Tumorangio-genese läuft ähnlich ab. Ebenfalls folgt auf die Sprossung der Endothelzellen, welche ein Vorläufergefäß bilden, die Migration der Perizyten. Allerdings erfolgt diese nur in einem reduzierten Maße, da die oben genannten molekular vermittelten Prozesse gestört ablaufen und so die beschriebene vollständige Reifung der Gefäße nicht erfolgt. Dies führt zu ausgeprägten strukturellen und funktionellen Anomalien der Tumorgefäße (Goel et al. 2012) (Carmeliet et al. 2011).

Tumorgefäße sind stark unregelmäßig geformt, desorganisiert, stark verzweigt und undicht. In extremen Formen sind kaum Endothelzellen und Perizyten vorhanden, stattdessen kleiden Tumorzellen die Gefäße aus, das sogenannte „vasculogenic mimicry“ (Wu et al. 2012). Der Reifegrad der Mikrogefäße wird auch als Parameter für die Aggressivität der Tumore genommen. Bestimmt wird diese einerseits über die Dichte der Mikrogefäße (microvessel density) und die Anzahl der die Gefäße umgebenden Perizyten (microvessel Pericyte Coverage Index) (Yonenaga et al. 2005) (Weidner 2008). Angetrieben wird die Tumorangio-genese und die daraus resultierende Neubildung von Gefäßen durch die permanent im TME vorherrschende Hypoxie (Carmeliet et al. 2000, Weidner 2008, Carmeliet et al. 2011). Hinsichtlich der

Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen ist die Versorgung mittels der Tumorgefäße nachteilig. Dies wirkt sich auf die Wirksamkeit von Chemotherapeutika aus und auch auf die Wirksamkeit von gezielten Therapien.

Untersuchungen haben gezeigt, dass es bei antiangiogener Therapie oder Tumorregress zuerst zu einem Rückgang der unreifen und instabilen Blutgefäße im TME kommt (Winkler et al. 2004). Größere, reife Gefäße bleiben zunächst erhalten. Insgesamt kommt es zu einer Reduktion der Gesamtzahl an Gefäßen, aber die Qualität der Gefäße verbessert sich im Rahmen der oben beschriebenen Negativselektion, so dass die Tumore besser mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden, aber auch besser von Medikamenten erreicht werden (Winkler et al. 2004) (Goel et al. 2012) (Carmeliet et al. 2011).

## 2 Ziele und Fragestellung der Arbeit

Die Prognose von oralen Plattenepithelkarzinomen und von Kopf-Hals-Karzinomen hat sich in den letzten Jahrzehnten kaum verbessert. Gerade bei Rezidiven, R1-Resektionstatus oder beim Vorliegen von Lymphknotenmetastasen mit extrakapsulären Spread ist die Prognose ungünstig. Medikamentöse Therapien wie der EGFR-Antikörper Cetuximab verbessern das Überleben in einer palliativen Situation nur wenige Monate. Aktuell rücken innovative Therapieansätze wie die Immuncheckpointinhibitoren in den Fokus. Wichtig ist, bei der Etablierung von neuen Therapieansätzen, dass diese möglichst synergistisch wirken. Diesbezüglich sind positive Veränderungen hinsichtlich eines physiologischen TMEs entscheidend.

Eine große Chance bietet die onkolytische Virotherapie. Es soll die Möglichkeit des Einsatzes eines YB-1 abhängigen onkolytischen Adenovirus (XVir-N-31) erstmalig beim Kopf-Hals-Karzinom *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass Kopf-Hals-Karzinome YB-1 überexprimieren und dies mit der individuellen Prognose der Patienten korreliert.

1. Es soll *in vitro* überprüft werden, ob sich XVir-N-31 adäquat in der Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinie FaDu repliziert und diese auch lysiert.
2. Ein heterotopes Tumormausmodell in der athymischen Nackmaus soll etabliert werden. Hier zu sollen eGFP-FaDu-Zellen in die Rückenhaut der Maus injiziert und das Wachstum beobachtet werden.
3. Die Wirksamkeit von XVir-N-31 soll im heterotopen Tumormodell in der athymischen Nacktmaus hinsichtlich seiner Wirksamkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe (NaCl-Injektionen) untersucht werden.
4. Der Einfluss von XVir-N-31 auf die Tumorangio-genese soll *in vivo* untersucht werden. Es soll quantifiziert werden, wie sich die Mikrogefäßdichte sowie die Ummantelung mit  $\alpha$ SMA<sup>+</sup> Perizyten im Vergleich zur Kontrollgruppe ändert.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Zellkultur

Die verwendeten FaDu Zellen wurden von der AG Holm (Klinik und Poliklinik für Urologie, Klinikum Rechts der Isar, München, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Zelle wurden in DMEM, 10%FBS, 1% Penicillin Streptomycin bei 37° Grad kultiviert.

### 3.2 Virale Replikation in eGFP-FaDu Tumorzellen

Um die Replikation der viralen DNA nachzuweisen, wird eine qPCR durchgeführt. Dazu werden  $5 \times 10^4$  Zellen eGFP-FaDu Zellen auf einer 6-Well-Platte appliziert. 24 Stunden später erfolgt die Infektion mit der, in den Ergebnissen beschriebenen Multiplizität der Infektion (MOI). 24 und 48 Stunden nach der Infektion werden die Zellen mit PBS gewaschen und die DNA-Lysate für die fiber qPCR vorbereitet.

Dazu werden 5  $\mu$ l of 20 ng/ $\mu$ l gereinigte DNA verwendet. Der PCR- Mix wird mit Hilfe GoTaq Green PCR Master Mix hergestellt. Primer für humanes GAPDH werden in einer Konzentration von 250 nM verwendet. Für jede PCR 10 werden 10  $\mu$ l PCR Master Mix verwendet. Der PCR-Zyklus wird, wie in Tabelle 3, beschrieben durchgeführt.

Schritt	Zeit, Temperatur
Initiale Denaturierung	2 min, 94° C
	15 sec, 94° C
	15 sec, 60° C
Primerhybridisierung	15 sec, 60° C
	15 sec, 72° C
Elongation	15 min, 94° C
	15 min, 94° C
	5 sec, 60° C
Schmelzkurvenanalyse	5 min, 95° C

Tabelle 3 PCR Protokoll

Um die virale DNA zu quantifizieren, wurde die  $\Delta\Delta$ Ct Methode verwendet. GAPDH diente als Referenzgen.

### 3.3 Potency Assay

Zur Bestimmung der onkolytischen Wirkung von Xvir-N-31 sowie eines Adenowildtyp-Virus, wird ein Potency Assay mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt.  $5 \times 10^4$  eGFP FADU-Zellen werden auf einer 12-Well-Platte aufgetragen und 24 Stunden später mit verschiedenen Konzentrationen der o.g. Viren infiziert. Nach einer Inkubationszeit des Virus von 4 Tagen wird das Kulturmedium entfernt und die Kammern anschließend mit PBS gewaschen und mittels  $1^\circ$  kalten TCA über Nacht fixiert. Anschließend werden die Kammern viermal mittels Leitungswasser gewaschen und mit SRB 0,5% für 30 Minuten gefärbt. Um überschüssiges SRB zu entfernen, werden die Kammern fünfmal mit 1% Essigsäure gewaschen. Anschließend werden die Kammern zum Trocknen gelegt. Die Auswertung erfolgt nach Lösung des SRBs in 1ml 10mM Tris-Base und die Absorption wird bei 560 nm mittels multilable plate reader VICTOR X3 bestimmt.

### 3.4 Versuchsaufbau der *in vivo* Versuche

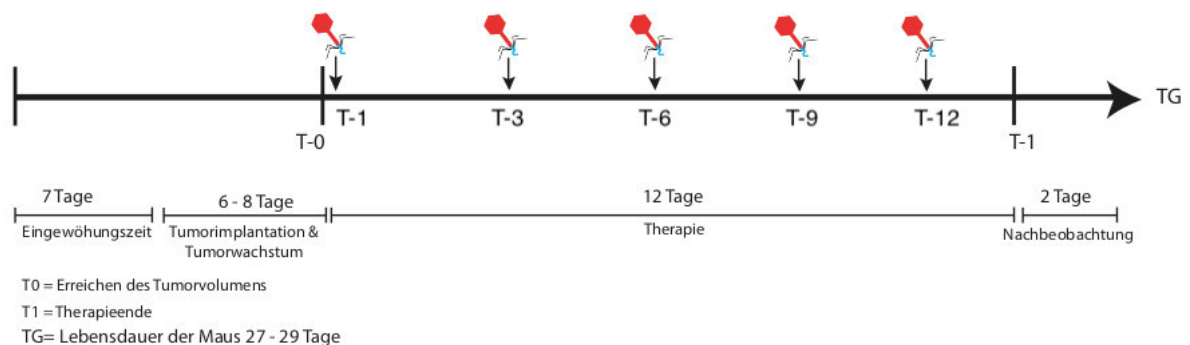


Abbildung 2 – Versuchsaufbau

Ab dem ersten Versuchstag erhalten die Versuchstiere alle 3 Tage die o.g. Injektionen von XVir-N-31 bzw. NaCl.

Der hier vorgestellte Tierversuch wurde von der Regierung von Oberbayern genehmigt und dem entsprechend durchgeführt (Geschäftszeichen und Versuchsnummer: 55.2-1-54-2532-202-2015).

Da es sich in der vorgestellten Arbeit um eine Pilotstudie handelt, setzt sich jede Gruppe aus 7 Versuchstieren zusammen. Die Versuche werden begonnen, wenn entweder die Länge, die Breite oder die Höhe des Tumors 5 mm erreicht haben. Dies entspricht, bei ungefähr symmetrischem Wachstum, in etwa einem Tumolvolumen von ca. 50 mm<sup>3</sup>. Die Tiere erhalten anschließend alle drei Tage entweder die Therapie oder die Kontrolle. Um die Wirkung nach der letzten Gabe noch zu beobachten, wird weitere 2 Tage nachbeobachtet.

### 3.5 Maus als Versuchstier

Die Maus wurde auf Grund Ihrer schnellen Generationszeit, einfachen Aufzucht und kosteneffektiven Haltung als Versuchstier gewählt. Die in den Versuchen verwendeten Mäuse wurden bei Charles River (Sulzfeld) beschafft.

Aufgrund der Größe und der einfachen Handhabung eignet sich die Maus als Versuchstier besonders für wiederholt durchgeführte in vivo Untersuchungen, Behandlungen und Messung. Des Weiteren gibt es eine Vielzahl von etablierten Protokollen, Zellen und Reagenzien für die Durchführung von histologischen Untersuchungen.

Die Haltung der Tiere, maximal 4 pro Käfig, erfolgt in Markolonkäfigen des Typs III mit erhöhter Ausfertigung und individueller Ventilation (Tecniplast-IVC, Hohenpeißenberg). Der Luftaustausch findet 50- bis 70-mal pro Stunde statt, um eine hygienische Abschirmung und möglichst sterile Umgebung zu schaffen. Die Mäuse haben gemäß der Mindestanforderung für ausgewachsene Tiere über 20g eine Grundfläche von 100 cm<sup>2</sup> pro Maus. Die Haltung der Mäuse erfolgt auf speziellem Holzgranulat (Select Fine, Ssniff), welches 2-mal pro Woche gewechselt wird. Als Material für den Nestbau dient autoklavierter Zellstoff sowie sogenannte Nestlets (Bioscape). Außerdem steht ein Maushaus aus rotem Polycarbonat (Bioscaoe) zur Verfügung. Die Tierhaltungsräume werden auf ca. 20 Grad Celsius klimatisiert, wobei die Luftfeuchtigkeit zwischen 45-65% liegt. Die Lichtintensität beträgt 50 bis 100 Lux, wobei ein Hell-Dunkel-Rhythmus mit Dämmerungsphasen von 12 Stunden eingehalten wird. Die Mäuse werden mit Haltungsfutter No. 1323Fort und Zuchtfutter No. 1314Fort (Fa. Altromin) versorgt. Die Mäuse erhalten autoklaviertes Trinkwasser ad libitum.

Das vorliegende Tierversuchsvorhaben wurde von der Regierung Oberbayern gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG. in der Fassung vom 25.05.1998) genehmigt.

Für die Versuche wurden athymische Nacktmäuse mit dem Mausstamm Crl:nu(NCr)-Foxn1<sup>Nu</sup> gewählt. Dieser Stamm zeichnet sich durch einen vollständigen Mangel an T-Zellen aus und ist etabliert für Xenograft-Modelle. Somit ist dieser Mausstamm nicht in der Lage, eine suffiziente Antwort des adaptiven Immunsystems zu erzeugen. Es können keine Antikörper gebildet werden, eine zellvermittelte Immunantwort ist nicht möglich, mit Viren infizierte Zellen können nicht durch das Immunsystem zerstört werden und es findet keine Immunantwort auf Tumorzellen statt. Diese Aspekte sind essentiell, um das Anwachsen der in die Rückenhaut transplantierten humanen PECA-Zellen zu gewährleisten.

Als Versuchstiere werden männliche Mäuse verwendet, da diese keinem hormonellen Zyklus unterliegen und etwaige hormonelle Schwankungen auf das Tumorstadium und die Therapie keinen Einfluss haben.

### 3.6 Mausnarkose

Die Injektion der Tumorzellen benötigt eine tiefe Narkose. Diese wird eingeleitet mittels einer Isofluran 2-3% Inhalationsanästhesie. Dies erfolgt mit Hilfe eines Verdampfers (Ohmeda Isotec 3, Fa. Eickmeyer, Tuttlingen), der das Gas in eine Körperkammer transportiert, in der sich die Maus befindet. Anschließend wird intraperitoneal die Injektionsnarkose verabreicht. Ziel der Injektionsnarkose ist das Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums III.

Die Narkose muss folgende Kriterien erfüllen: Sedierung, Hypnose und Analgesie. Um dies zu gewährleisten, setzt sich die Injektionsnarkose aus drei Inhaltsstoffen zusammen: Midazolam 5,0 mg/kg (Midazolam- ratiopharm®, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe), Medetomidin 0,5mg/kg (Dormitor®, Pfizer GmbH, Karlsruhe) und Fentanyl 0,05mg/kg (Fentanyl-Curamed®, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe). Bepanthen Augen und Nasensalbe (Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) wird in die Augen appliziert, um das Austrocknen zu verhindern.



### 3.7 Injektion der eGFP-FaDu Tumorzellen

Die intradermale Injektion mittels 30G Insulinspritze (Fa. Braun Melsungen, Hessen, Deutschland) von  $10^6$  eGFP-FaDu-Zellen erfolgt unter Anhebung der Rückenhaut mittels anatomischer Pinzette. Das durch die intradermale Quaddel definierte Areal wird anschließend mit einem chirurgischen sterilen Stift markiert. Nach Erwachen der Mäuse werden diese in den Käfig zurückgesetzt.

Anschließend wird unter täglicher Kontrolle das Wachstum der Tumorzellen dokumentiert.

### 3.8 Virusinjektion

Die Virusinjektion erfolgt in oben beschriebener Narkose. Die Injektion wird mit Hilfe einer 30G Insulinspritze durchgeführt (Fa. Braun Melsungen, Hessen, Deutschland). Pro Injektion werden  $3 \times 10^9$  Xvir-N-31 Viren gelöst in 100 $\mu$ l PBS injiziert. Es erfolgen jeweils 4 Einstiche zirkumferent im äußeren Drittel des Tumors. Die Kontrollgruppe erhält das Äquivalent von NaCl (siehe Abbildung 3). Die Häufigkeit der Injektionen wird im o.g. Versuchsaufbau erläutert (Abbildung 2).



Abbildung 3 - Maus in Isoflurannarkose

Die Maus wurde mittels Isoflurannarkose sediziert. Die vier schwarzen Punkte markieren die Einstichstellen. Hier exemplarisch für die Therapiegruppe mit XVir-N-31

### 3.9 Immunfluoreszenz

#### 3.9.1 Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie

Das Phänomen der Fluoreszenz basiert auf der Absorption der durch das Mikroskop emittierten Photonen durch ein Fluoreszenzmolekül, welches angeregt wird und daraufhin ein Fluoreszenzsignal emittiert. Durch die Energie des ankommenden Photons wird ein Elektron auf ein höheres Energieniveau gehoben. Auf diesem Energieniveau verweilt es wenige Nanosekunden und fällt anschließend auf sein ursprüngliches Energieniveau zurück (Sanderson et al. 2014). In diesem Prozess wird ein großer Teil der absorbierten Energie als Photon emittiert. Allerdings ist das emittierte Licht langwelliger als das der Anregung. Diese Differenz bezeichnet man als Stokes-Shift (Sanderson et al. 2014). Das emittierte Licht hat auf Grund seiner längeren Wellenlänge eine andere Farbe. Wird zur Anregung blaues Licht verwendet, entsteht die typische grüne Fluoreszenz.

### 3.10 Immunhistologische Färbungen

#### 3.10.1 Grundlagen der immunhistologischen Färbungen

Immunhistochemische Färbungen basieren auf der Möglichkeit, Antigene auf der Zelloberfläche oder im Zellinneren sichtbar zu machen. Dazu wird ein Primärantikörper, welcher über keinen Farbstoff verfügt, appliziert, der dann anschließend an oder in der Zelle bindet. Anschließend wird der Sekundärantikörper appliziert, welcher fluoreszenzmarkiert ist, an den Primärantikörper bindet und somit das Antigen sichtbar macht. Die Primärantikörper sind spezifisch für das Antigen. Die Sekundärantikörper binden an eine Vielzahl von primären Antikörpern. Dies muss bei den Färbungen und Untersuchungen berücksichtigt werden.

#### 3.10.2 Entnahme der Organe für die Immunhistologie

Für die Entnahme des Tumors mit dem umliegenden Gewebe wird die Maus nach tiefer Isofluran-Narkose mittels cervikaler Dislokation euthanasiert. Anschließend erfolgt die Präparation der Tumore mittels chirurgischem Mikrobesteck. Die gewonnenen Tumore werden anschließend in Formaldehyd eingelegt, bis die Einbettung in Paraffin erfolgt. Anschließend erfolgt das Schneiden am Mikrotom in 4µm Schnitte.

#### 3.10.3 Durchführung der Immunfluoreszenz

Zur Durchführung der Immunfluoreszenz müssen die Objektträger zunächst mindestens 30 Minuten lang im Inkubator bei 60° getrocknet werden. Anschließend werden die Objektträger zwei Mal 5 Minuten in Xylol inkubiert, um das Paraffin zu entfernen. Daraufhin folgt die Waschung in Ethanol 100% für jeweils zwei Mal zwei Minuten und dann jeweils eine Minute in 90%, 80% und 70% Ethanol. Die Objektträger werden dann mit destilliertem Wasser für dreißig Sekunden gewaschen. Anschließend werden die Objektträger in Citratpuffer pH 6,0 für 30 Sekunden bei 125° gelegt. Nach dem Abkühlen erfolgt das Waschen drei Mal in TRIS-Puffer (Zytomed Systems, Berlin,

Deutschland). Anschließend werden die freien unspezifischen Bindungen mittels 5% BSA Lösung geblockt. Nach Abklopfen der Objektträger auf Zellstoff erfolgt das Lösen von 100µl des primären Antikörpers (siehe Tabelle) in Verdünnungspuffer (Zytomed Systems, Berlin, Deutschland). Anschließend erfolgt das Auftragen auf die Objektträger mittels Pipette. Nach Inkubation im Dunkeln erfolgt das Waschen der Objektträger in einer Küvette drei Mal mit TRIS-Puffer (Zytomed Systems, Berlin, Deutschland).

Nun gibt man den sekundären Antikörper (1:200) auf alle Objektträger, einschließlich der Isotypen- und Negativkontrolle. Erneut inkubiert man im Dunkeln für 1 Stunde, gefolgt von dreimaligem Waschen mit PBS + 1% Tween. Zum Schluss erfolgt die Kernfärbung mittels DAPI (1:3000, 4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid, Sigma-Aldrich, Steinheim) für 10 sec. Nachdem wiederum mit PBS + 1% Tween gewaschen wurde, wird je Objektträger ein Tropfen Mounting Medium und anschließend ein Deckgläschen (Waldemar Knittel Glasbearbeitungs- GmbH, Braunschweig) aufgebracht.

Der sekundäre Antikörper (1:200) wird auf alle Objektträger aufgetragen. Nach einer Inkubation im Dunkeln über Nacht werden die Objektträger dreimalig in TRIS-Puffer gewaschen. Abschließend erfolgt die Kernfärbung mittels DAPI (1:3000, 4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid, Sigma-Aldrich, Steinheim) für 10 sek. Nach erneuter Waschung mit TRIS-Puffer wird ein Tropfen Mounting Medium und ein Deckgläschen appliziert.

Zielzelle	primärer Antikörper	sekundärer Antikörper / Fluoreszenzfarbstoff
Endothelzellen CD31 (PECAM-1)	PECAM-1 (M-20): sc-1506 (Santa Cruz Biotech., Cal., USA)	Alexa Fluor 568 (Thermo Fischer, Waltham, MA., USA)
Perizyten αSMA	α-Smooth Muscle antibody, A5228, Sigma Aldrich (St. Louis, MO., USA)	Alexa Fluor 647 (Thermo Fischer, Waltham, MA., USA)

Tabelle 4 - Immunfluoreszenz primäre und sekundäre Antikörper

### 3.11 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Objektträger werden zwei Mal 5 min. in Xylol inkubiert, um das Paraffin zu entfernen. Anschließend folgt die Waschung in 100%, 90%, und 80% Ethanol für

jeweils eine min. Die Objektträger werden dann mit destilliertem Wasser für drei min. gewaschen. Anschließend erfolgt das Aufbringen des Hämatoxylins für 5 min. und das Eintauchen in 4% Salzsäure. Daraufhin erfolgt das applizieren des Eosins für 4 min. mit anschließender Spülung mit destilliertem Wasser. Abschließend erfolgt die Waschung in einer aufsteigenden Alkoholreihe 80%, 90% und 100%. Abschließend erfolgt das Eintauchen in Xylol und nach Trocknung die Fixierung des Deckglases.

### 3.12 Auswertung mittels Fluoreszenzkamera

Die Tumore werden nach Entfernung in Formaldehyd 80% eingelegt und mittels Petrischale unter eine Fluoreszenzkamera (Zeiss, Jena, Deutschland) gelegt, um die eGFP Expression der resezierten Tumore zu dokumentieren. Die Fotodokumentation erfolgt sowohl mittels Auflicht und als auch im Fluoreszenzmodus mit Hilfe eines Zeiss-Stereomikroskops (Zeiss, Jena, Deutschland).

### 3.13 Auswertung der Tumorgroße

Die Mäuse werden, wie beschrieben, mittels Isofluran in Narkose gelegt. Anschließend erfolgt die Vermessung der Tumore mittels Schieblehre sowohl in Länge, Breite als auch Höhe. Im Rahmen der Etablierung des Modells wurden Untersuchungen mittels Mikro-CT durchgeführt. Diese zeigten, dass die recht einfache Methode mittels Schieblehre zuverlässige Ergebnisse liefert. Von täglichen Kontrollen mittels Mikro-CT wurde auf Grund der Strahlendosis und dem damit verbunden Einfluss auf das Tumorwachstum abgesehen. Die Berechnung des Volumens erfolgt durch folgende Formel und orientiert sich an der Volumenberechnung von Lymphknoten  $V = a(\text{Länge}) \times b(\text{Tiefe}) \times c(\text{Breite}) \times 0,59$

### 3.14 Auswertung der Histologie

Die Auswertung der Immunfluoreszenzschnitte wird mittels eines Zeiss Axio imager Mikroskops (Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. Dieses computergesteuerte

Fluoreszenzmikroskop ermöglicht das Scannen eines gesamten Präparates in bis zu 200x Vergrößerung. Die Grenzen des Präparates werden vorher in einer Übersicht festgelegt und anschließend fotografiert das Mikroskop sämtliche innerhalb der ROI festgelegten „fields-of-view“ (siehe Abbildung 4). Mit Hilfe dieser Aufnahmetechnik werden anschließend die Bilder an einem Computer mit der Software Zeiss Zen (Zeiss, Jena, Deutschland) ausgewertet.

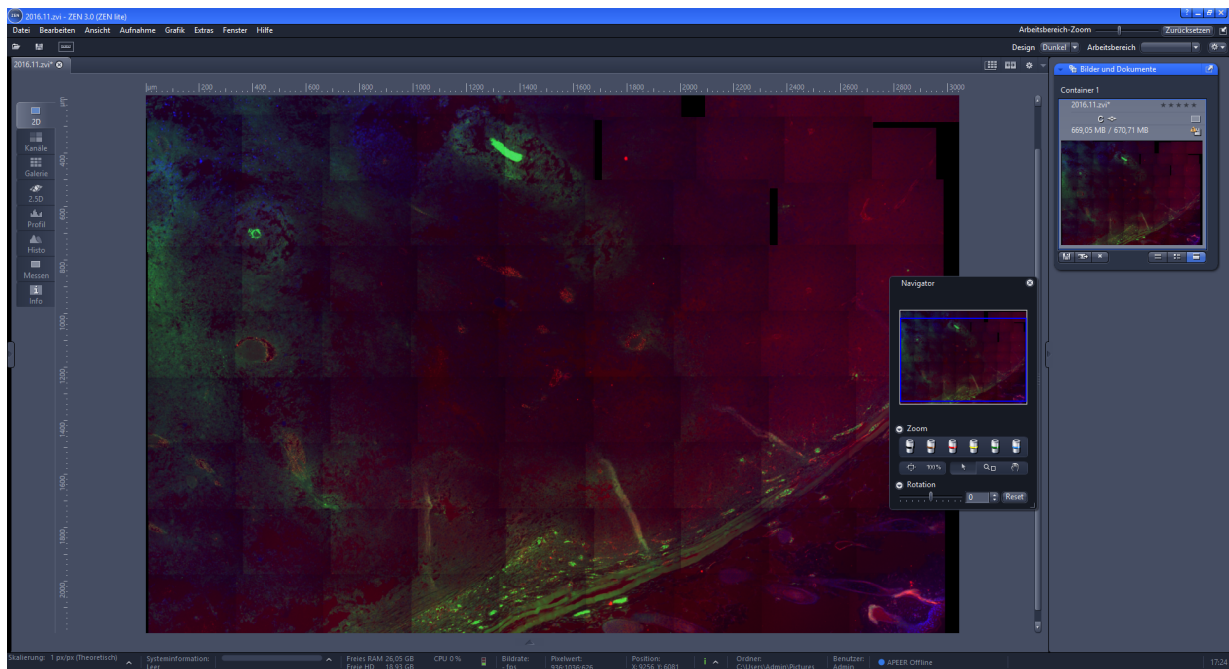


Abbildung 4 - Screenshot der Zeiss Mikroskopsoftware Zen

Die Übersichtsaufnahme Zeiss Zen zeigt das gesamte gescannte Areal. Die einzelnen fields-of-view lassen sich an der Kachelstruktur erkennen, die sich in der Übersicht abzeichnet. Mittels des Navigators lässt sich entweder stufenlos Vergrößern oder mittels Objektivfunktion fest definierte Vergrößerungen auswählen.

Die Auswertung der HE-Schnitte erfolgt an einem Olympus BX 60 Auflicht Mikroskop (Olympus, Japan). Dort wird das Präparat mittels geringer Vergrößerung (40x) betrachtet und dann die relevanten Areale mittels 200x Vergrößerung abfotografiert.

### 3.14.1 Bestimmung der Microvessel Density

Die Erhebung und Auswertung der microvessel density erfolgt nach der von Weidner et al. beschriebenen Hotspotmethode (Weidner 2008).

Zunächst werden in der Übersicht des Präparates sogenannte „hot spots“ definiert. Das sind Bereiche, in welchen eine besonders hohe Mikrogefäßdichte vorliegt. Weidner et al. beschreiben, dass vor allem im Invasionsbereich des Tumors und dort, wo eine besonders starke intratumorale Hypoxie vorliegt, eine hohe Gefäßdichte vorliegt (Weidner 2008).

Die Bereiche des Tumors mit der höchsten Neovaskularisierung werden durch das Betrachten von Übersichtsaufnahmen (40x und 100x Gesamtvergrößerung) der Tumore detektiert. Als „hot spots“ werden Bereiche definiert, in denen visuell die höchste Dichte an CD31<sup>+</sup> Mikrogefäßen gefunden wird. Dieser Bereich wird dann mit einer Vergrößerung von 200x (20 Objektiv und 10 Okular) ausgewertet. Pro Maus wurden jeweils 5 „hot spots“ ausgewertet.

### 3.15 Bestimmung des microvessel Pericyte Coverage Index (mPCI)

Der mPCI wurde in den oben beschriebenen „hot spots“ ausgewertet. Wie beschrieben, variiert die Zahl der Perizyten im Rahmen der Tumorangio-genese. Während physiologisch eine dichte Ummantelung der Mikrogefäße mit Perizyten vorliegt, nimmt diese im Rahmen der unreifen Gefäßbildung in Tumoren deutlich ab. Als eine positive Ummantelung mit Perizyten wird wie in Abbildung 17 dargestellt, eine dichte Umschließung mit Perizyten gewertet. Wenn lediglich einzelne Perizyten vorliegen, wird dies als negativ gewertet. Da Mikrogefäße keine glatte Muskulatur haben, können die Perizyten als  $\alpha$ SMA<sup>+</sup> und mit Endothelzellen colocalisierende Zellen definiert werden (O'Keeffe et al. 2008) (Yonenaga et al. 2005).

Der mPCI wird berechnet, indem die Anzahl der Mikrogefäße in einem „hot spot“, die mit  $\alpha$ SMA<sup>+</sup> umschlossen sind, durch die Gesamtzahl der Mikrogefäße pro „hot spot“ geteilt wird.

### 3.16 Daten & Statistik

Die statistischen Auswertungen der Versuche in dieser Arbeit wurden mit unterschiedlichen Programmen durchgeführt, die im Folgenden genannt werden. Es wurde Prism (Graphpad, San Diego, California USA) und Microsoft Excel (Seattle,

Washington, USA) zur Bestimmung der Werte verwendet. Die so bestimmten Werte wurden als Mittelwerte  $\pm$  SD graphisch dargestellt. Sofern es sich um normal verteilte Werte handelte, wurde der p-Wert mittels T-Test bestimmt. Wenn es sich um nicht normal verteilte Werte handelte, wurde bei zwei Gruppen der Mann-Whitney-U-Test verwendet, bei mehr als zwei Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Für die statistische Signifikanz gilt ein p-Wert von  $<0,05$ .



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Analyse der Virusreplikation in der Kopf-Hals-Karzinom-Line eGFP-FaDu mittels qPCR

Nachdem in unserer Arbeitsgruppe Kolk et al. bereits der Nachweis der YB-1 Expression in FaDu Zellen erbracht wurde, wurde auf eine Wiederholung des YB-1 Nachweises verzichtet (Kolk et al. 2011).

Um zu verifizieren, ob sich Xvir-N-31 in der eGFP-FaDu-Zelllinie repliziert, wurde die virale Replikation analysiert. Als Kontrolle zu Xvir-N-31 dient das Wildtyp-Adenovirus „human serotype 5 adenovirus“. Als Referenzgen dient GAPDH (siehe Abbildung 5). Die Replikation von XVir-N-31 ist um mehr als den Faktor 200 niedriger als die Replikation des Wildtypvirus und nach 48 Stunden immer noch um mehr als den Faktor 100.

Dennoch zeigt sich nach 24 Stunden eine deutliche Replikation von XVir-N-31, welche sich über einen Zeitraum von 48 Stunden noch signifikant steigert. Insgesamt konnten so die erfolgreiche Infektion und Replikation der eGFP-FaDu-Zellen gezeigt werden. Da für eine erfolgreiche onkolytische Therapie neben der intratumoralen Virusreplikation auch die Lyse der Tumorzellen entscheidend ist, sollte dies anhand von aufsteigenden MOIs im nächsten Schritt untersucht werden.

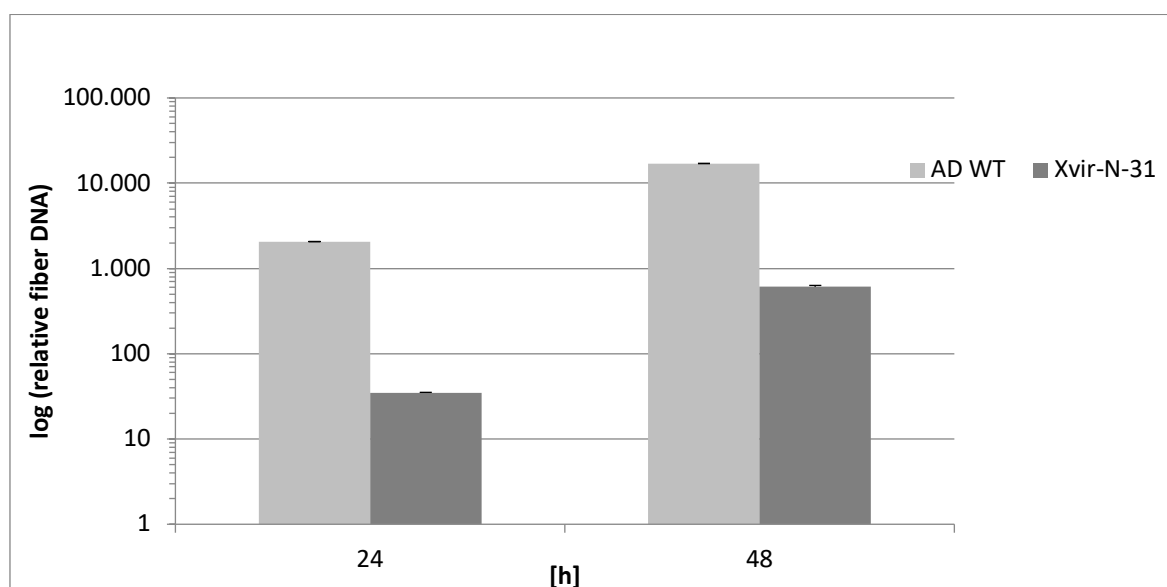


Abbildung 5- Virale Replikation von XVir-N-31 in eGFP-FaDu-Zellen

Die Zellen wurden mit 20 MOI des Virus XVir-N-31 infiziert. 24 und 48 Stunden nach Infektion wurden die Zellen lysiert und die DNA des Virus isoliert. Die DNA wurde mittels qPCR quantifiziert. Humanes GAPDH diente als Referenzgen. Unterschiede zwischen WT und XVir-N-31 sind jeweils signifikant  $p < 0.05$ .

#### 4.2 Nachweis der Wirksamkeit von XVir-N-31 *in vitro*

Um die lytische Kapazität von XVir-N-31 zu prüfen, wurde ein SRB-Assay, wie in den Methoden beschrieben, durchgeführt. Als Kontrolle diente das Wildtyp-Adenovirus „human serotype 5 adenovirus“.

In den SRB-Assay (Abbildung 6) zeigt sich, dass bereits ab 20 MOI XVir-NR-31 eine lytische Wirkung erkennbar ist und somit von einer Infektion, Replikation und Lyse der Zellen durch das Virus auszugehen ist. Das Wildtypvirus zeigt zwar insgesamt eine höhere Infektions- und Lyserate, aber ab 70 MOI wird eine Eliminierung von 90% der Tumorzellen durch XVir-N-31 *in vitro* erreicht. Bei 150 und 200 MOI ist weniger von einer Wirkung des Virus als von einer insgesamt toxischen Konzentration auszugehen. Nachdem sowohl die Replikation als auch die lytische Kapazität von XVir-N-31 gezeigt wurde, soll im nächsten Schritt die Wirksamkeit von Xvir-N-31 *in vivo* in der Rückenhaut der athymischen Nacktmaus untersucht werden. Dazu soll zunächst ein heterotopes Tiermodell etabliert werden.

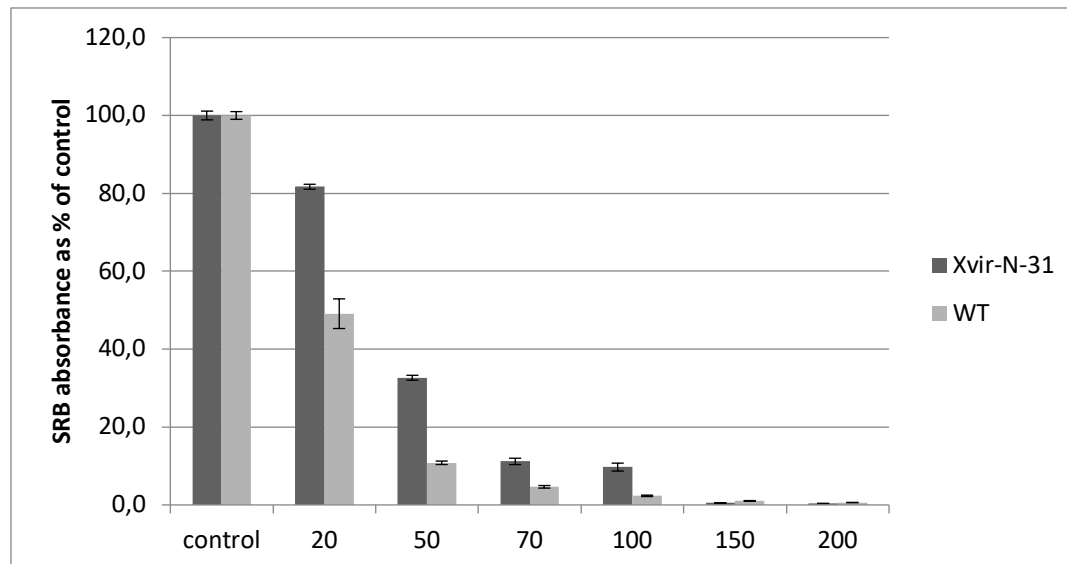


Abbildung 6 - SRB Assay zur Bestimmung des onkolytischen Kapazität von XVir-N-31 in eGFP-FaDu-Zellen.

Um die lytische Kapazität zu bestimmen, wurden die Zellen mit unterschiedlichen MOIs infiziert. Nach 96 Stunden wurden die Zellen fixiert und mittels SRB Färbung ausgewertet. Die Unterschiede zwischen den einzelnen MOIs (außer 150 und 200) sind jeweils signifikant  $p < 0.05$

### 4.3 Etablierung des Mausmodells

Ziel ist es, ein reproduzierbares Tiermodell für die Injektion von humanen Tumorzellen zu etablieren. Dazu wurden die Mäuse mittels Isoflurannarkose in Kurznarkose versetzt. Anschließend erfolgte unter Anhebung der Rückenhaut, mittels anatomischer Pinzette, die intradermale Injektion von  $10^6$  eGFP-FaDu-Zellen. Das Areal wurde anschließend mit einem chirurgischen sterilen Stift markiert. Nach Erwachen der Mäuse wurden diese in den Käfig zurückgesetzt.

Anschließend wurde unter täglicher Kontrolle das Wachstum der Tumorzellen dokumentiert.

Ab dem dritten Tag nach Injektion ließ sich eine Raumforderung feststellen. Nachdem der Tumor die Zielgröße erreicht hatte, wurde das Tier geopfert. Im nächsten Schritt soll verifiziert werden, ob es sich bei der entstandenen Raumforderung im Bereich der Rückenhaut um die injizierten eGFP-FaDu-Zellen handelt und eine narbige oder bindegewebige Reaktion ausgeschlossen werden.

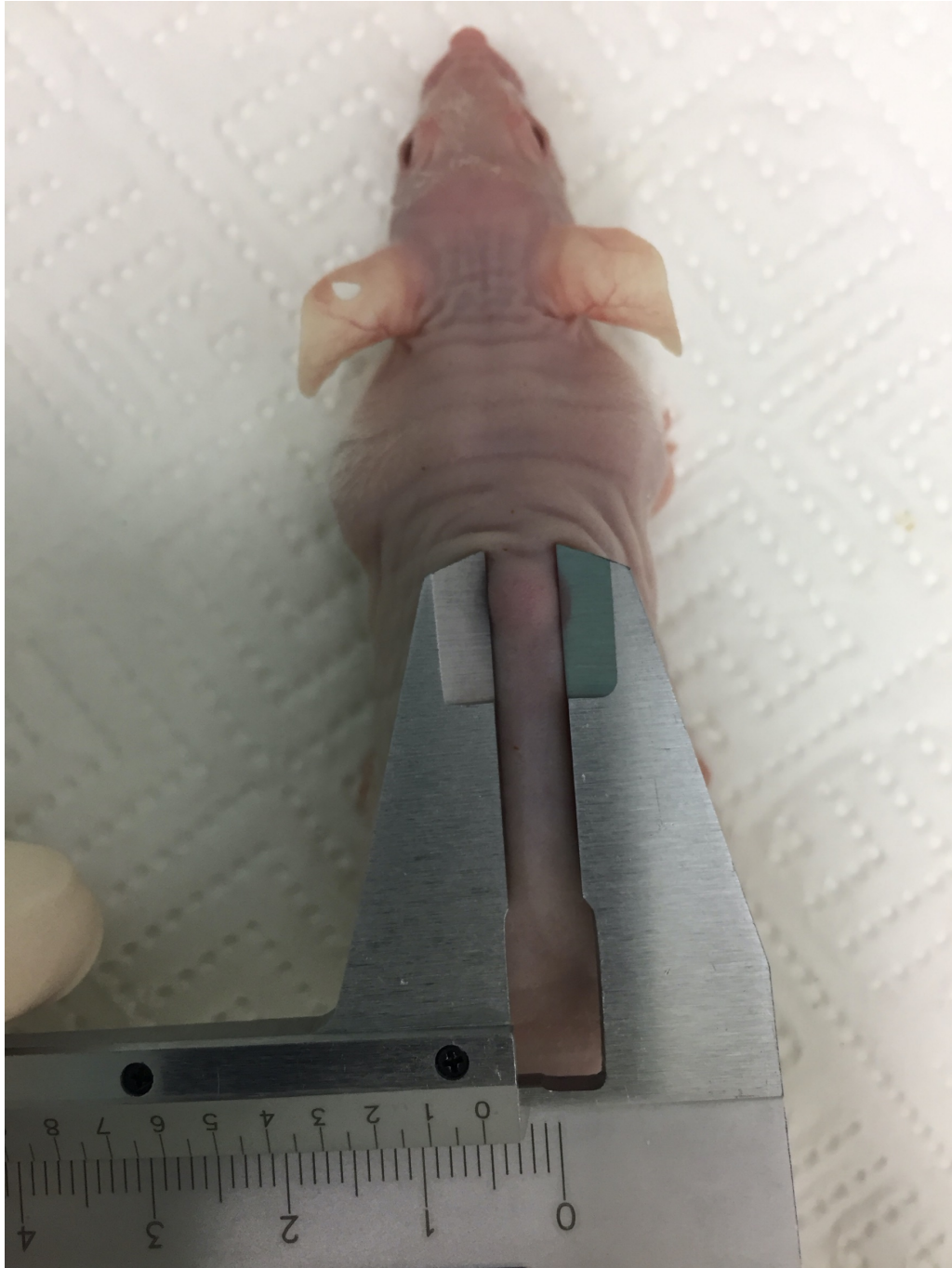


Abbildung 7 - Messung der Tumorgöße in Isoflurannarkose

Die Messung der Tumorgöße erfolgt wie beschrieben mittels Schieblehre. Hier exemplarisch in der Therapiegruppe, dargestellt am sechsten Tag nach Therapiebeginn mit XVir-N-31

#### 4.4 *In vivo* Charakterisierung der eGFP markierten FaDu-Tumorzellen

Um sicherzustellen, dass die Tumorzellen nach Injektion in die Rückenhaut wie geplant gewachsen sind und es sich nicht um eine Reaktion der Nacktmaus im Sinne einer Narben- oder Bindegewebebildung handelt, wurden die Mäuse nach Opferung wie in den Methoden beschrieben, mittels eines Stereofluoreszenzmikroskops untersucht (siehe Abbildung 8 und Abbildung 9).

Der Tumor wurde zunächst *in situ* mikroskopiert und anschließend chirurgisch entfernt und erneut mikroskopiert (siehe Abbildung 10 und Abbildung 11).

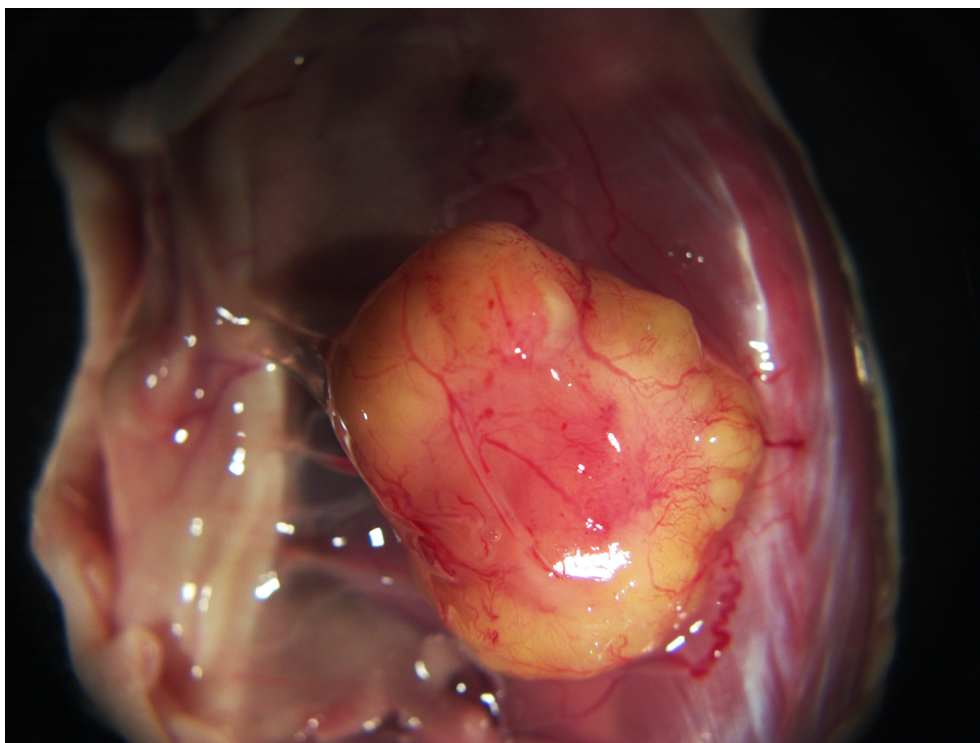


Abbildung 8- *In situ* befindlicher Tumor 10x Vergrößerung

Es zeigt sich in Abbildung 8 ein hypervaskularisierter Tumor, welcher aus dem Bereich der Haut sowie der Rückenmuskulatur seine Blutversorgung erhält. In Abbildung 9 zeigt sich im Randbereich des Tumors ein deutliches grün fluoreszierendes GFP-Signal, welches sich deutlich vom umliegenden Gewebe abhebt. Zentral zeigt sich lediglich ein schwaches Signal, welches am ehesten auf die starke Vaskularisierung des Tumors sowie eine zentrale Nekrose des Tumors zurückzuführen ist.

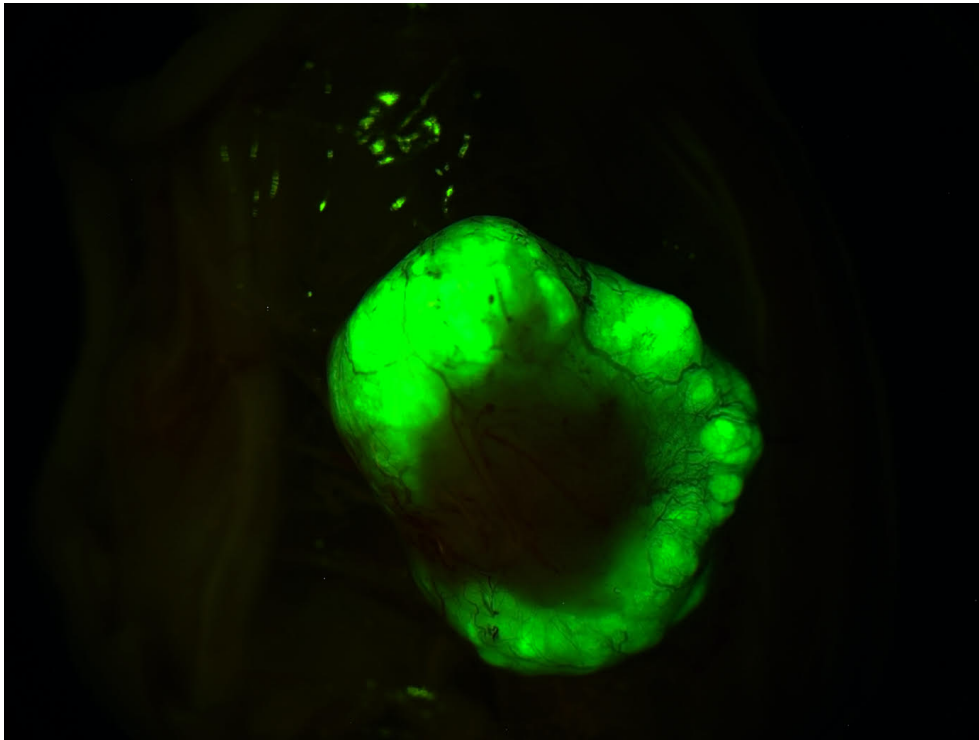


Abbildung 9- Fluoreszenzansicht von Abbildung 8

In der Rückansicht (siehe Abbildung 10) des präparierten Tumors aus Abbildung 8 zeigt sich ebenfalls eine starke Vaskularisierung des Tumors. Die Fluoreszenzansicht weist ebenfalls das GFP-Signal der Tumorzellen nach (siehe Abbildung 11). Die hier exemplarisch dargestellte Mikroskopie wurde für alle Tumore durchgeführt.

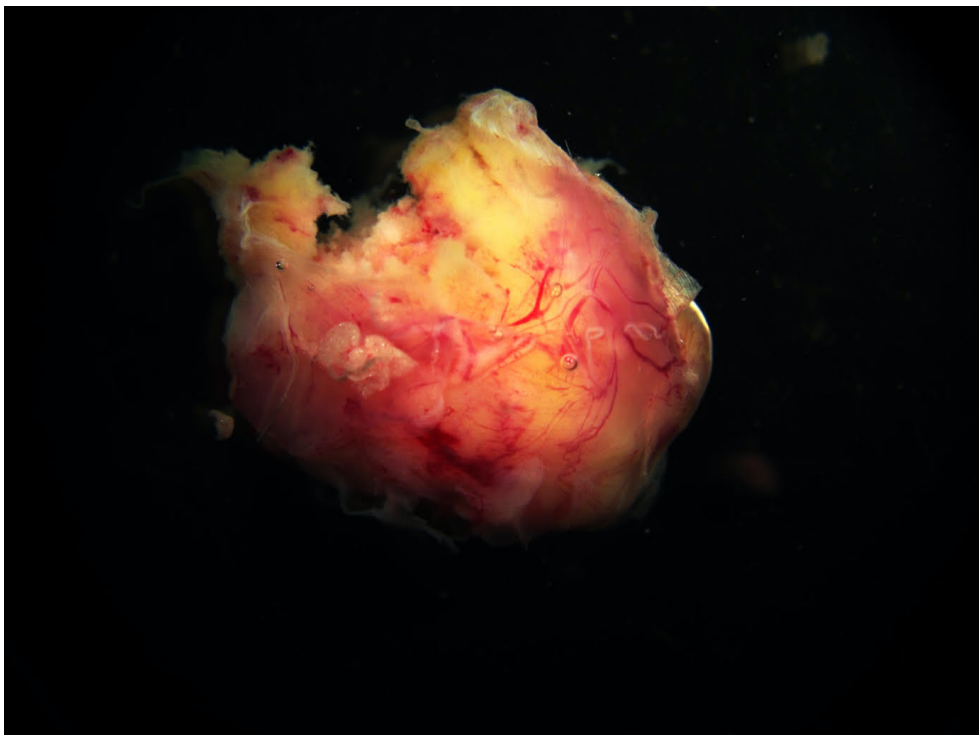


Abbildung 10- Entfernter Tumor

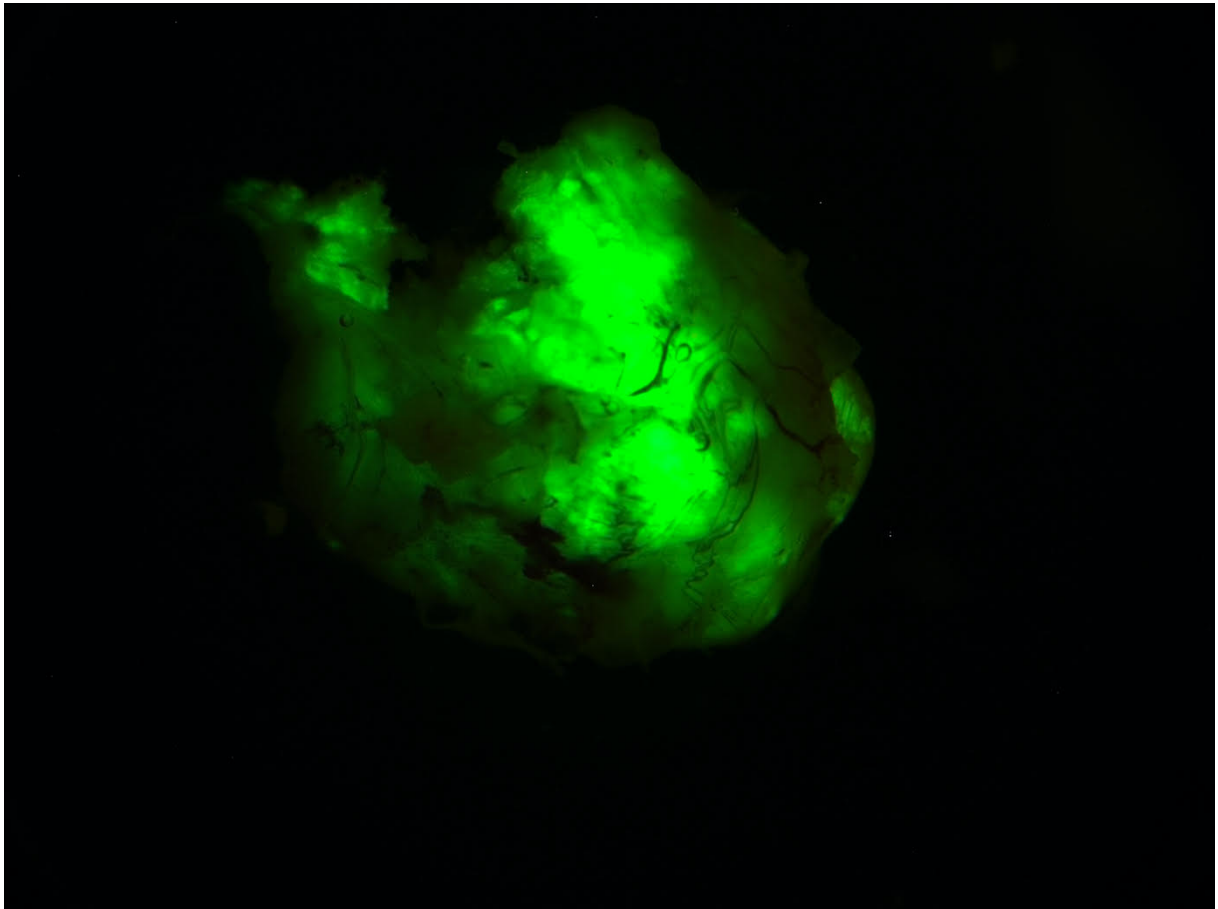


Abbildung 11 – Fluoreszenzansicht des oben dargestellten Tumors

#### 4.5 Das Tumorwachstum in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Therapie mit XVir-N-31

Wie in den Methoden beschrieben, begann die Therapie mit XVir-N-31 gelöst in 100  $\mu$ l PBS bzw. die Injektion von 100  $\mu$ l NaCl ab einer Tumorgröße von ca. 50 mm<sup>3</sup>. Anschließend erhielten die Versuchstiere in der Kontrollgruppe alle drei Tage Injektionen von XVir-N-31 bzw. NaCl. Die Behandlung fand, wie beschrieben, in Isoflurannarkose statt. Die Größe wurde mittels Schieblehre, wie in den Methoden beschrieben, erhoben. Da es sich um eine Pilotstudie handelt, hat jede Gruppe 7 Versuchstiere.



Abbildung 12- Maus aus der Kontrollgruppe am 12 Versuchstag



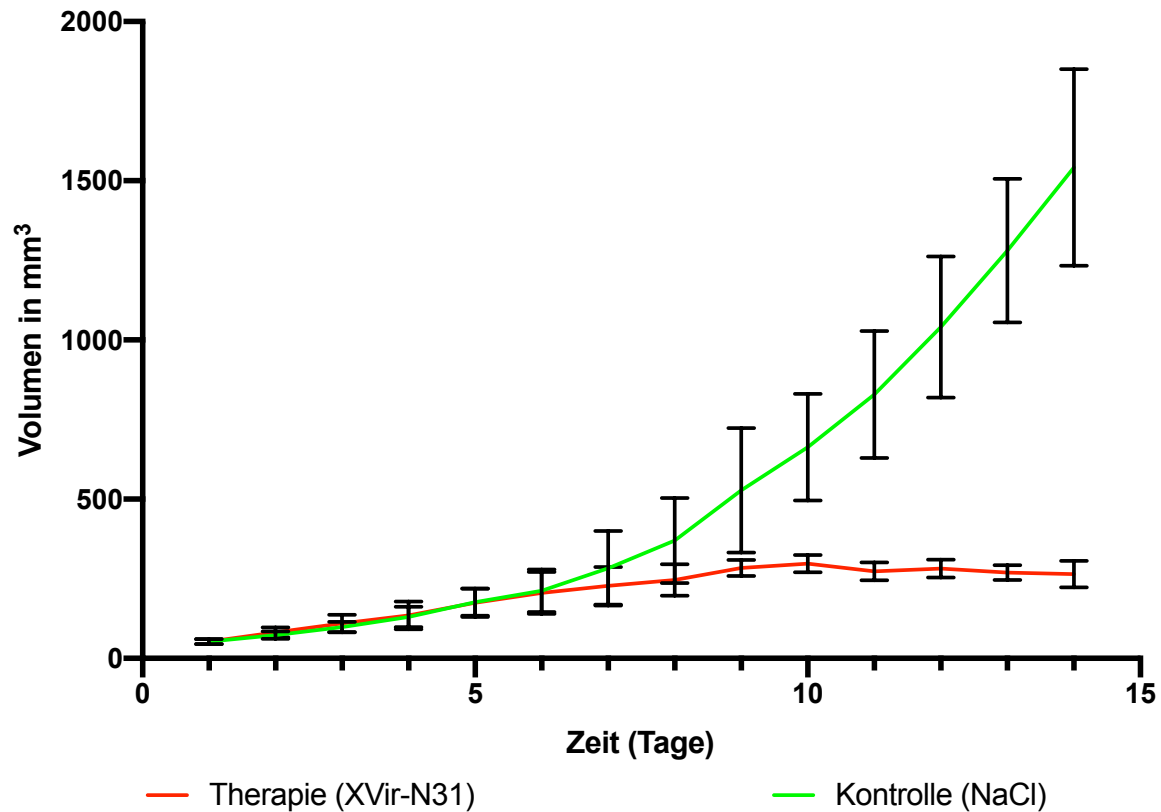


Abbildung 13 Tumorwachstum; grün kennzeichnet die Kontrolle und rot die Therapiegruppe; je Gruppe n=7. Vertikale Balken kennzeichnen Standardabweichung

Tage	Kontrolle (NaCl)		Therapie (XVir-N-31)	
	Mittelwert Volumen mm <sup>3</sup>	SD	Mittelwert Volumen mm <sup>3</sup>	SD
1	52,4678571	8,34	52,8892857	8,0550204
2	73,2021429	11,91	81,5464286	15,250727
3	98,2771429	16,66	109,891714	27,6171863
4	130,263571	32,14	134,563407	44,330166
5	176,873571	43,19	174,576786	44,172565
6	212,147143	66,91	205,905786	66,4485534
7	282,588929	117,55	227,866429	58,5500953
8	370,52	133,96	246,514643	49,3560886
9	527,797143	195,64	283,526607	25,7156657
10	663,67625	167,94	297,95	27,6512018
11	828,36	199,22	273,591429	28,1942985
12	1040,59143	221,4	282,146429	28,1493781
13	1280,99536	225,81	269,103214	23,4832256
14	1541,75429	308,48	264,533454	41,3609199

Tabelle 5 - Rohdaten der Tumorgröße in mm<sup>3</sup> mit SD

Die Tabelle 5 zeigt die korrespondierenden Mittelwerte mit Standardabweichung, die dargestellt sind in Abbildung 13. Kontrolle und Therapiegruppe unterscheiden sich mit einem  $p < 0.05$  ab 8. Tag. Pro Gruppe  $n=7$

Bis zum siebten Tag nach Therapiebeginn verläuft das Wachstum zwischen Therapie- und Kontrollgruppe in etwa analog. Ab dem achten Tag kommt es zu einem unterschiedlichen Wachstum in den beiden Gruppen, welches sich ab diesem Zeitpunkt mit  $p < 0.05$  signifikant unterscheidet.

Unter Therapie mit XVir-N-31 kommt es bis Tag 10 zu einer Volumenzunahme, wobei das Wachstum ab Tag 7 kontinuierlich abnimmt. Die durchschnittliche maximale Tumorgöße ist  $297,5 \text{ mm}^3$  in der Therapiegruppe mit XVir-N-31. Zu diesem Zeitpunkt haben die Tumore der Kontrollgruppe ein durchschnittliches Volumen von  $663,67 \text{ mm}^3$ .

Anschließend stagniert das Wachstum und es zeigen sich keine relevanten Größenänderungen bis durchschnittlich Tag 11. Ab Tag 11 nimmt die Tumorgöße wieder leicht ab in der Therapiegruppe. Es zeigt sich insgesamt zum Versuchsende in der Therapiegruppe eine Größenreduktion des Tumorumfanges ausgehend vom Maximum an Tag 10 um durchschnittlich  $33,47 \text{ mm}^3$ . Die Größenänderung ist auf Grund der relativ niedrigen Tieranzahl ( $n=7$ ) jedoch nicht signifikant.

Unter NaCl Injektion zeigt sich ab dem achten Versuchstag ein Übergang von einem eher linearen Wachstum in ein exponentielles (Abbildung 13). Die maximale Größe des Tumors in der Kontrollgruppe zeigt sich mit durchschnittlich  $1541,75 \text{ mm}^3$  bei allen Tieren am letzten Versuchstag. Ab Tag 8 unterscheidet sich die Tumorgöße zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe signifikant ( $p < 0.05$ ). Alle weiteren Differenzen hinsichtlich der Tumorgöße sind ebenfalls signifikant.

Klinisch gab es keinen Anhalt für größere Hämatome oder Wundinfektionen im Bereich des Tumors nach Injektion der Kontrolle bzw. des Virus. Anhand der Wachstumskurve zeigt sich hinsichtlich der kontinuierlichen Größenzunahme in der Kontrollgruppe kein Anhalt für eine Selbstlimitation des Wachstums, durch z.B. insuffiziente Blutversorgung. Daraus lässt sich ableiten, dass die Tumorangio-genese suffizient abläuft, um ein stetiges Wachsen des Tumors zu ermöglichen. Unter ausreichender Versorgung mit Nahrung kam es im Rahmen der Versuche zu keiner Kachexie o.ä. der Mäuse.

Außerdem gibt es anhand des Tumorwachstums der Kontrollgruppe keinen Anhalt dafür, dass das durch die Injektionen verursachte Trauma sowie der entstehende interstitielle Druck einen deutlichen negativen Einfluss auf das Tumorwachstum haben. Im Rahmen der Therapie mit XVir-N-31 zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe keine offensichtlichen Nebenwirkungen im Sinne eines Exanthems, Abgeschlagenheit oder übermäßigen Gewichtsverlusts.

Nachdem die Wirkung von XVir-N-31 auf die makroskopische Tumorgroße gezeigt wurde, sollte im nächsten Schritt die unterschiedliche Größe zwischen Therapie- und Kontrollgruppe mikroskopisch untersucht werden.

#### 4.6 Histologische Untersuchung und Vergleich der Therapiegruppe mit der Kontrollgruppe

Im nächsten Schritt erfolgte die histologische Aufarbeitung der Präparate, wie in den Methoden beschrieben.

In den HE Färbungen der Kontrollgruppe zeigt sich stets eine ausgeprägte zentrale Nekrose mit partiellen Einblutungen in das Interstitium (siehe Abbildung 14.) Die zentralen Nekrosen und Einblutungen in der Kontrollgruppe passen zu dem dargestellten exponentiellen Wachstum.



Abbildung 14 - HE-Färbung eines Tumors der Kontrollgruppe dargestellt mittels HE-Färbung

Die HE-Färbung in 10x Vergrößerung zeigt einen Tumor der Kontrollgruppe, wo zentral eine ausgeprägte Nekrose mit diversen Einblutungen sichtbar ist.

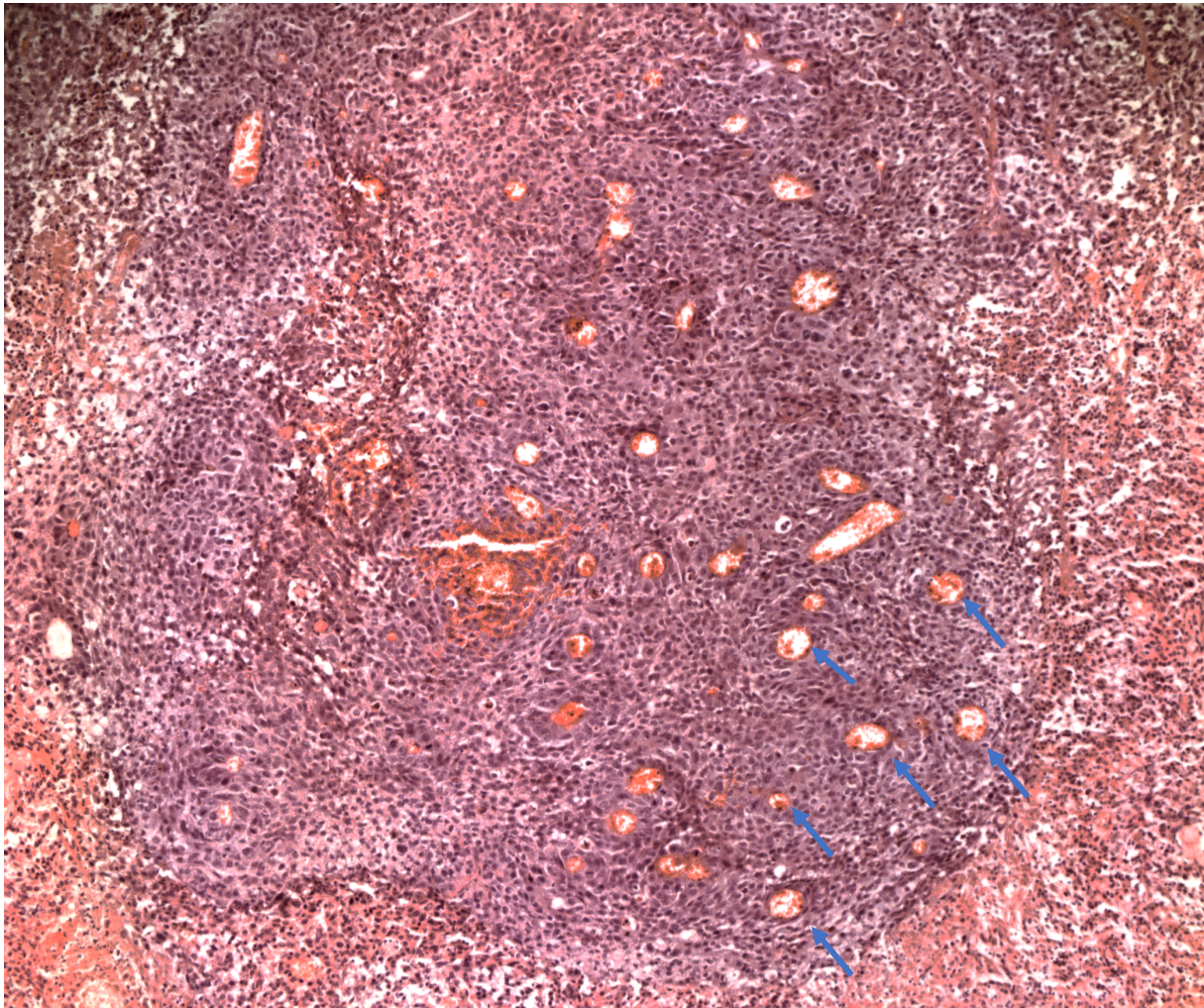


Abbildung 15 - HE-Färbung eines Tumors der Kontrollgruppe im Bereich der Invasionsfront

Es zeigt sich in der HE-Färbung eine hohe Dichte an mikrovaskulären Blutgefäßen. Exemplarisch mittels Pfeil gekennzeichnet. Dargestellt mittels 10x Vergrößerung-

Im Randbereich des Tumors zeigt sich im HE-Schnitt eine hohe angiogenetische Aktivität mit einer hohen Dichte an kleinen und sehr kleinen Blutgefäßen (siehe Abbildung 15).

Im Vergleich hierzu zeigt sich in der Therapiegruppe mit XVir-N-31 ein anderes Bild. Es zeigen sich im Tumor multiple fibrosierte Areale im Sinne einer Narbenbildung (siehe Abbildung 16). Diffuse Einblutungen und zentrale Nekrosen zeigen sich in den HE-Färbungen der Therapiegruppe kaum. Im Rahmen der onkoviralen Therapie scheint es eher zu einem Umbau von Tumorgewebe in Bindegewebe zu kommen und somit zu einer kontrollierten Regredienz der Tumormasse.

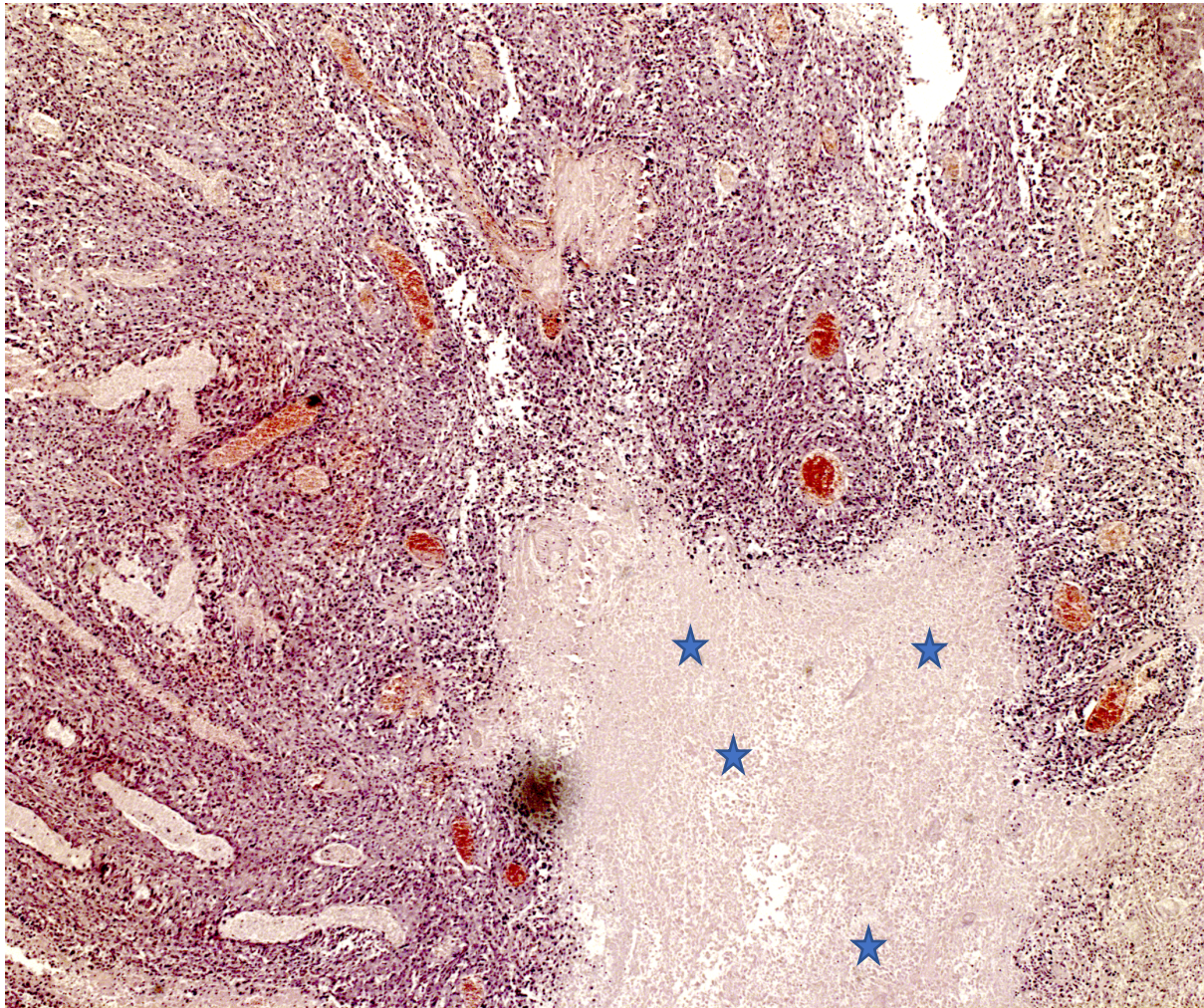


Abbildung 16 - HE Färbung eines Tumors der Therapiegruppe

In der HE-Färbung zeigt sich eine zentrale Fibrosierung des Tumors mit \* gekennzeichnet. Im Randbereich zeigen sich mittelgroße Blutgefäße der Mikrozirkulation. Dargestellt mittels 10x Vergrößerung.

Es zeigt sich deskriptiv, dass ein Teil der Tumore unter der Virotherapie, vor allem zentral, vernarbt. Somit findet ein kontrollierter Umbau des Tumors in Bindegewebe statt. Im Vergleich zur vorher dargestellten makroskopischen Größenkonstanz unter Therapie, zeigt sich somit in der histologischen Aufarbeitung ein Rückgang der Tumormasse, da, wie dargestellt, Teile des Tumors in Narbengewebe übergegangen sind.

In wie weit sich die Gefäße zwischen der Therapie und der Kontrollgruppe unterscheiden, ließ sich, abgesehen von der Anzahl und Größe, nur unzureichend in der HE-Färbung analysieren.

#### 4.7 Immunfluoreszenz-Untersuchung und Vergleich der Therapiegruppe mit der Kontrollgruppe

Um eine bessere Gefäßdarstellung zu erreichen, wurden, wie in den Methoden detailliert beschrieben, Doppelimmunfluoreszenzfärbungen durchgeführt, welche sowohl das Endothel als auch die das Endothel umgebenden Perizyten darstellen (siehe Abbildung 17).

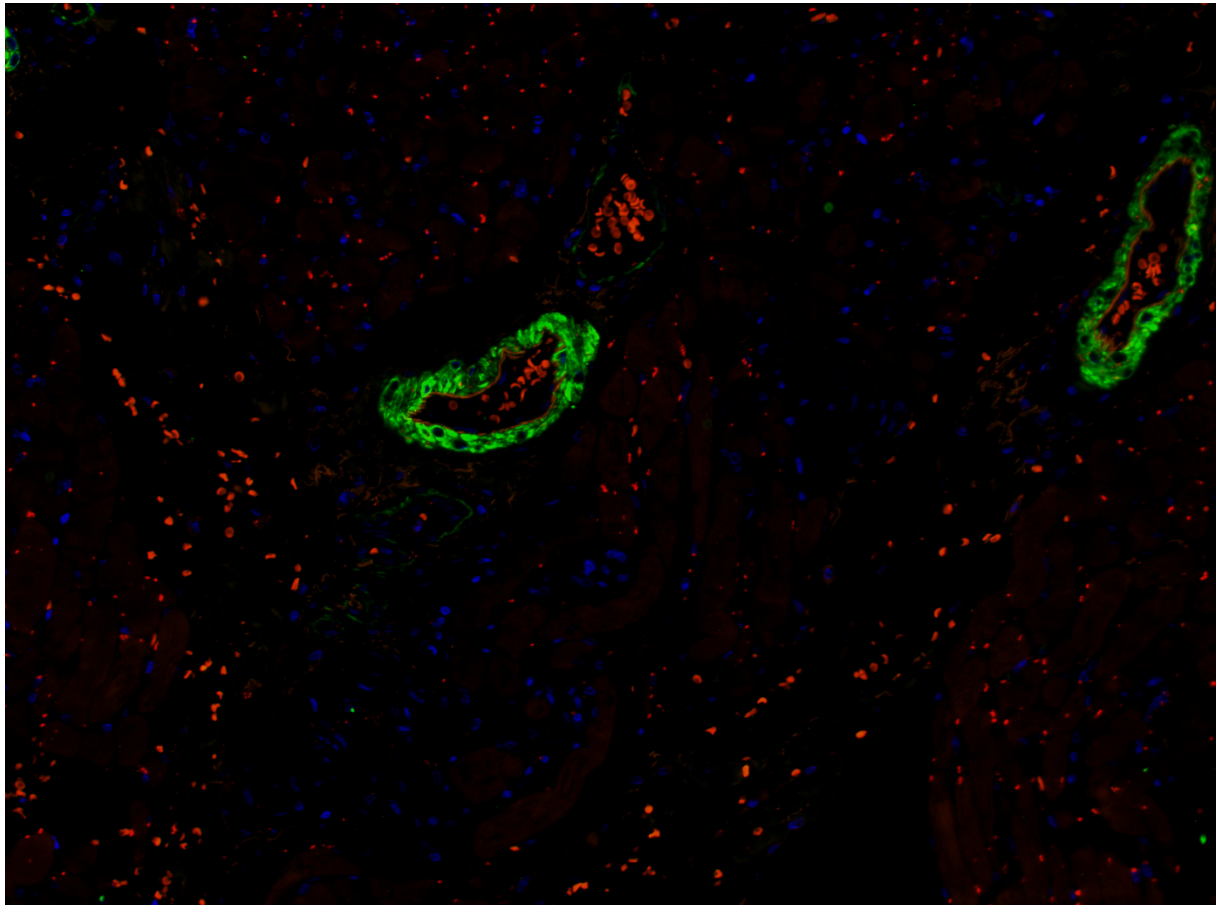


Abbildung 17 Doppelimmunfluoreszenz Färbung eines Tumors der Therapiegruppe

Darstellung zweier Blutgefäße mittels Doppelimmunfluoreszenz Färbung. In grün dargestellt die  $\alpha$ SMA<sup>+</sup> Perizyten. Die rote Linie stellt das mittels CD31 gefärbte Endothel dar. Aufnahme mittels 40x Vergrößerung.

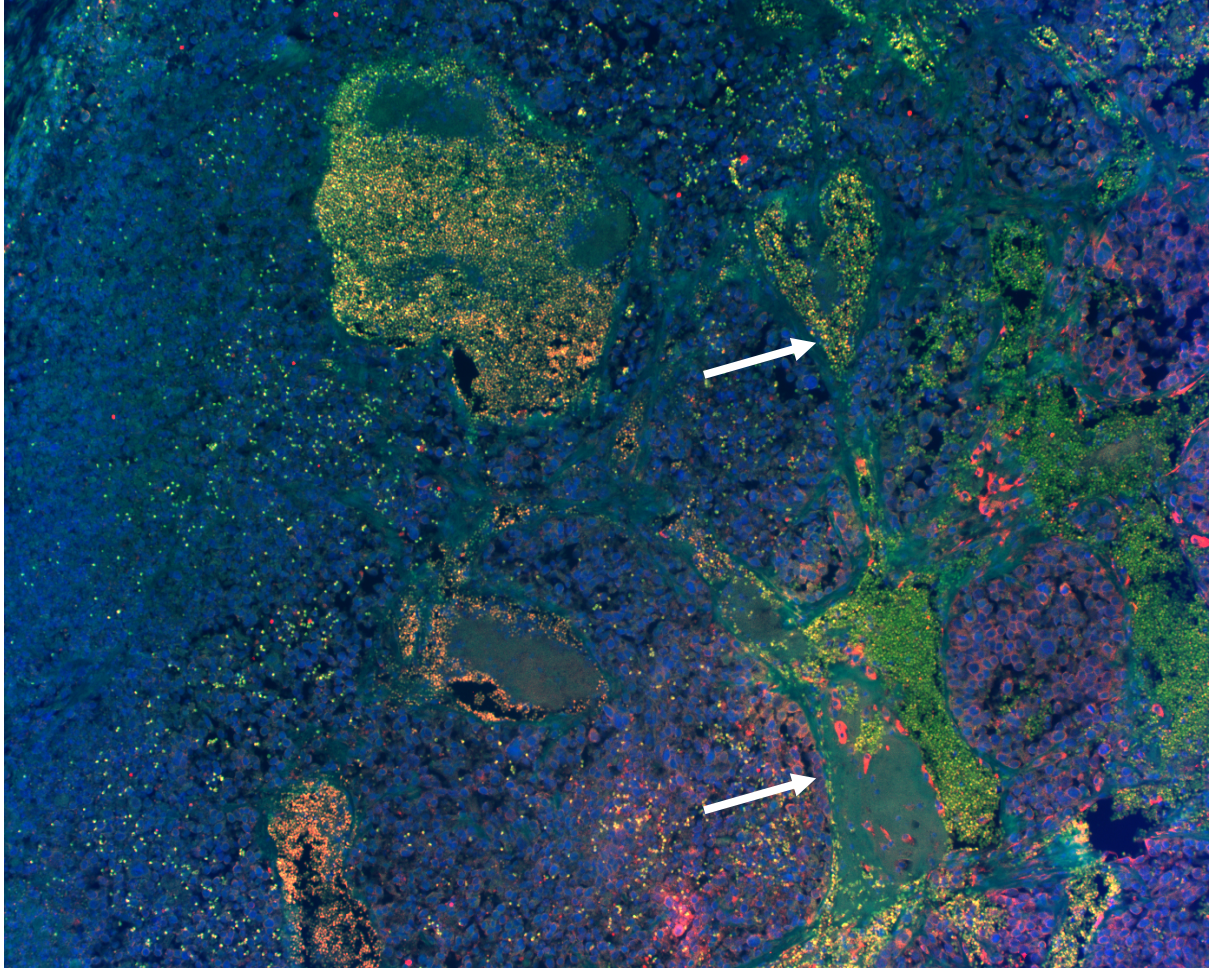


Abbildung 18 Kontrollgruppe Fluoreszenzfärbung eines Tumors der Kontrollgruppe

Zentral zeigen sich große Blutgefäße, mittels Pfeilen gekennzeichnet. Die eingebluteten Erythrozyten stellen sich grün-gelb auf Grund ihrer Autofluoreszenz dar. DAPI Färbung blau dargestellt. CD31 Färbung rot dargestellt. Darstellung in 10x Vergrößerung.

In der Kontrolle zeigt sich zentral, wie in den HE-Färbungen, eine ausgeprägte Nekrose mit diffusen Einblutungen (siehe Abbildung 14 und Abbildung 18). Hier zeigen sich ansonsten vor allem größere Arteriolen.



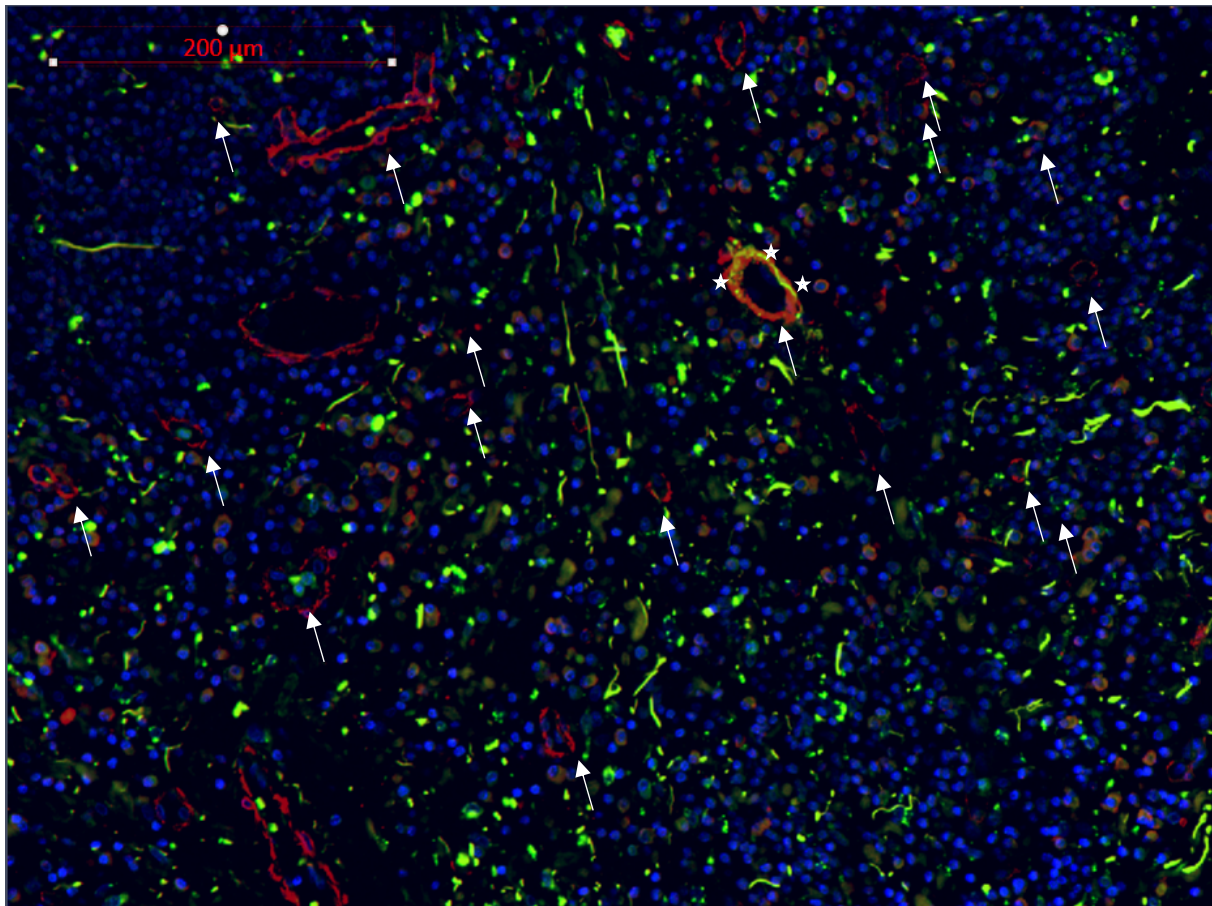
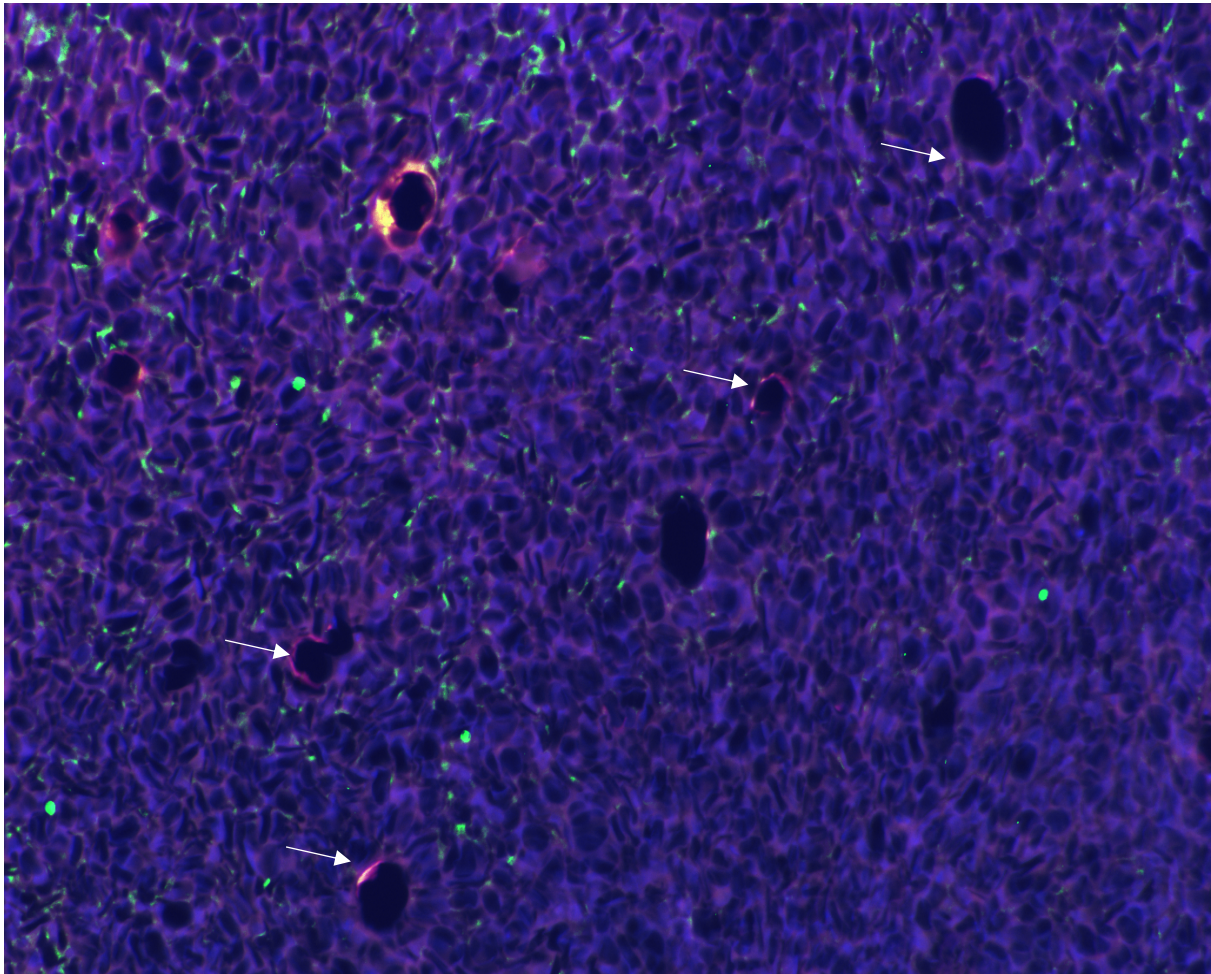


Abbildung 19 - Immunfluoreszenzdarstellung des Randbereiches eines Tumors der Kontrollgruppe

In der Doppelimmunfluoreszenzfärbung zeigen sich eine hohe Dichte an Blutgefäßen der Mikrozirkulation, wobei das Endothel mittels CD31 nur schwach angefärbt ist. Markiert mittels Pfeilen. Es zeigt sich außerdem eine geringe Dichte an Perizyten. Markiert mittels \*. DAPI Färbung blau dargestellt.



Am

*Abbildung 20 - Immunfluoreszenzdarstellung des Tumorrandbereiches eines Tumors der Kontrollgruppe mit vasculogenic mimicry*

Es zeigen sich in der Immunfluoreszenzfärbung keine  $\alpha$ SMA+ Perizyten. Außerdem nur vereinzelt anfärbbare Endothelzellen. Ansonsten scheinen die Blutgefäße von Tumorzellen ausgekleidet zu sein. Pfeile kennzeichnen die Blutgefäße. Diffuse Einblutungen zeigen sich hier in Grün auf Grund der starken Autofluoreszenz der Erythrozyten. Darstellung in 40x Vergrößerung.

Im Randbereich des Tumors zeigt sich korrespondierend zu den HE-Färbungen eine sehr hohe Dichte an kleinen Blutgefäßen (siehe Abbildung 19). Schaut man sich diese nun genauer an, zeigt sich eine sehr spärliche Endothelauskleidung sowie eine sehr geringe Dichte an Perizyten, welche die Gefäße umkleiden. Ein erheblicher Teil der Blutgefäße ist von Tumorzellen ausgekleidet, sogenannte vasculogenic mimicry (siehe Abbildung 20).

In der Therapiegruppe mit XVir-n-31 zeigt sich ebenfalls eine hohe Gefäßdichte im Randbereich (siehe Abbildung 21). Allerdings zeigen die Gefäße größtenteils eine physiologischer Auskleidung mit Endothel sowie eine deutlich höhere Dichte an Perizyten. Zentral zeigen sich, wie in den HE-Färbungen, multiple narbig veränderte Areale, welche keine GFP-Expression in der Immunfluoreszenz zeigen.

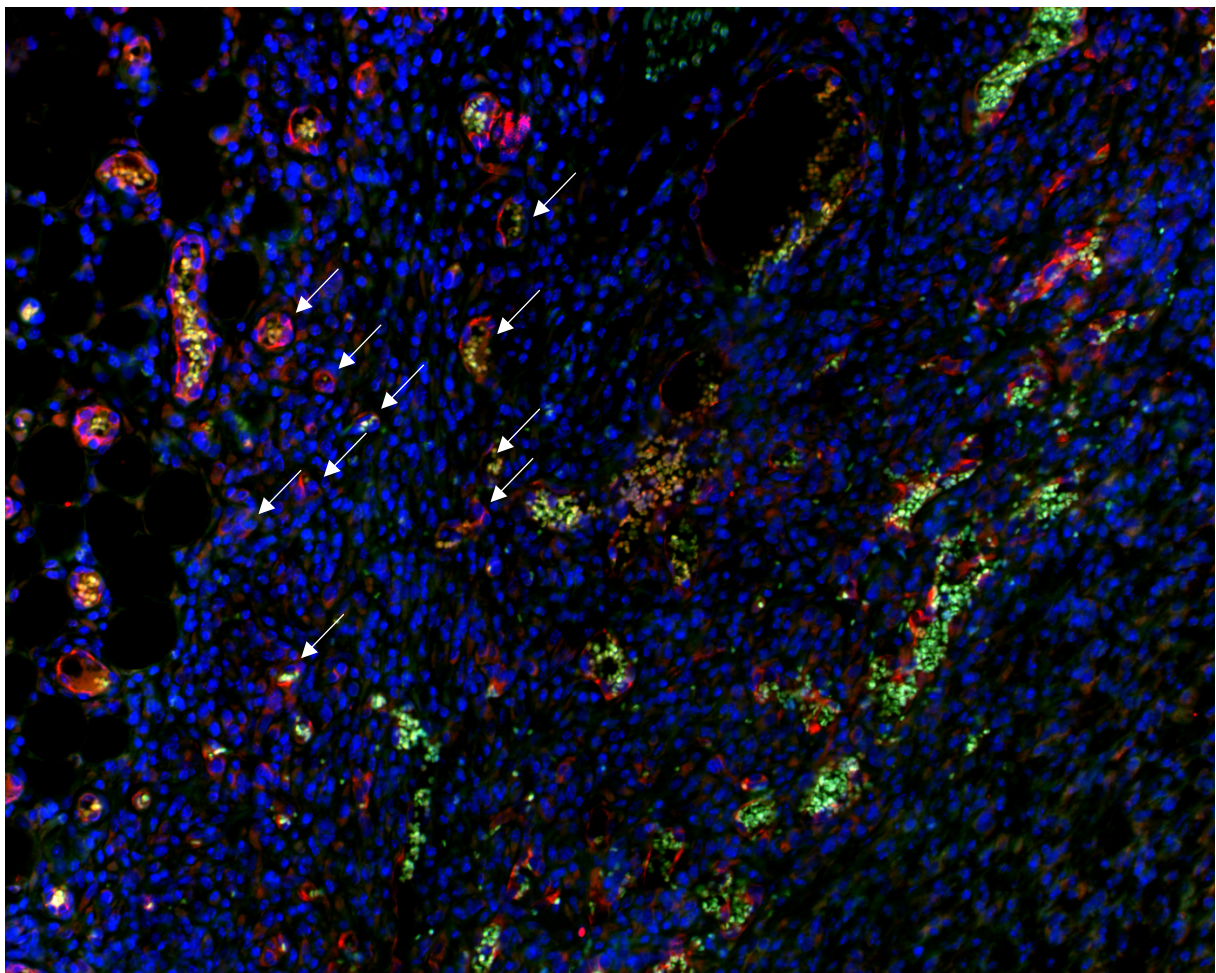


Abbildung 21- Immunfluoreszenzdarstellung des Tumorrandbereiches eines Tumors der Therapiegruppe

In der Immunfluoreszenzfärbung zeigen sich eine mittlere bis hohe Dichte an Blutgefäßen der Mikrozirkulation, wobei das Endothel mittels CD31 gut angefärbt ist. Markiert mittels Pfeilen. DAPI Färbung blau dargestellt.

Nachdem sich deskriptiv Unterschiede hinsichtlich der Angiogenese sowie der Beschaffenheit der Gefäße zwischen der Kontroll- und der Versuchsgruppe zeigen, soll im nächsten Schritt die Angiogenese und sowie die Beschaffenheit der Gefäße quantifiziert werden.

#### 4.8 Bestimmung der microvessel density mittels Doppelimmunfluoreszenz Färbung des Endothels sowie der Perizyten

Die Bestimmung der microvessel density (MVD) erfolgte, wie in den Methoden beschrieben, mittels Hotspot Methode nach Weidner im Tumorrandbereich. Es wurden pro Tier jeweils 5 Hotspots untersucht. Dargestellt wurden die Gefäße mittels Immunfluoreszenzfärbung, wie in den Methoden beschrieben.

Die Kontrollgruppe zeigt eine MVD von 71 Mikrogefäßen per field-of-view. Die Versuchsgruppe zeigt eine MVD von 59 Mikrogefäßen per field-of-view. Der Unterschied ist signifikant mit einem  $p < 0.01$  (Abbildung 22).

Beides spricht für einen erheblichen Sauer- und Nährstoff bedarf, wobei dieser in der Kontrollgruppe deutlich zu sein scheint. Dies unterstützt das histologische Bild in den HE-Färbungen. Eine besonders hohe MVD ist exemplarisch in Abbildung 23 dargestellt.

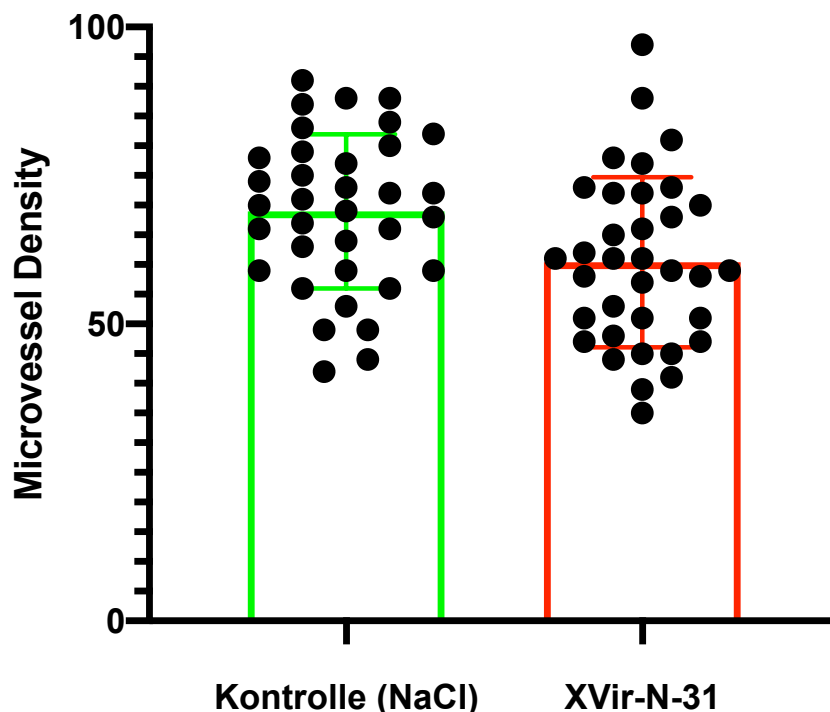


Abbildung 22 - MVD (Kontrolle vs Therapie)

Grün kennzeichnet die Kontrollgruppe und rot kennzeichnet die Versuchsgruppe. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung;  $p < 0.01$

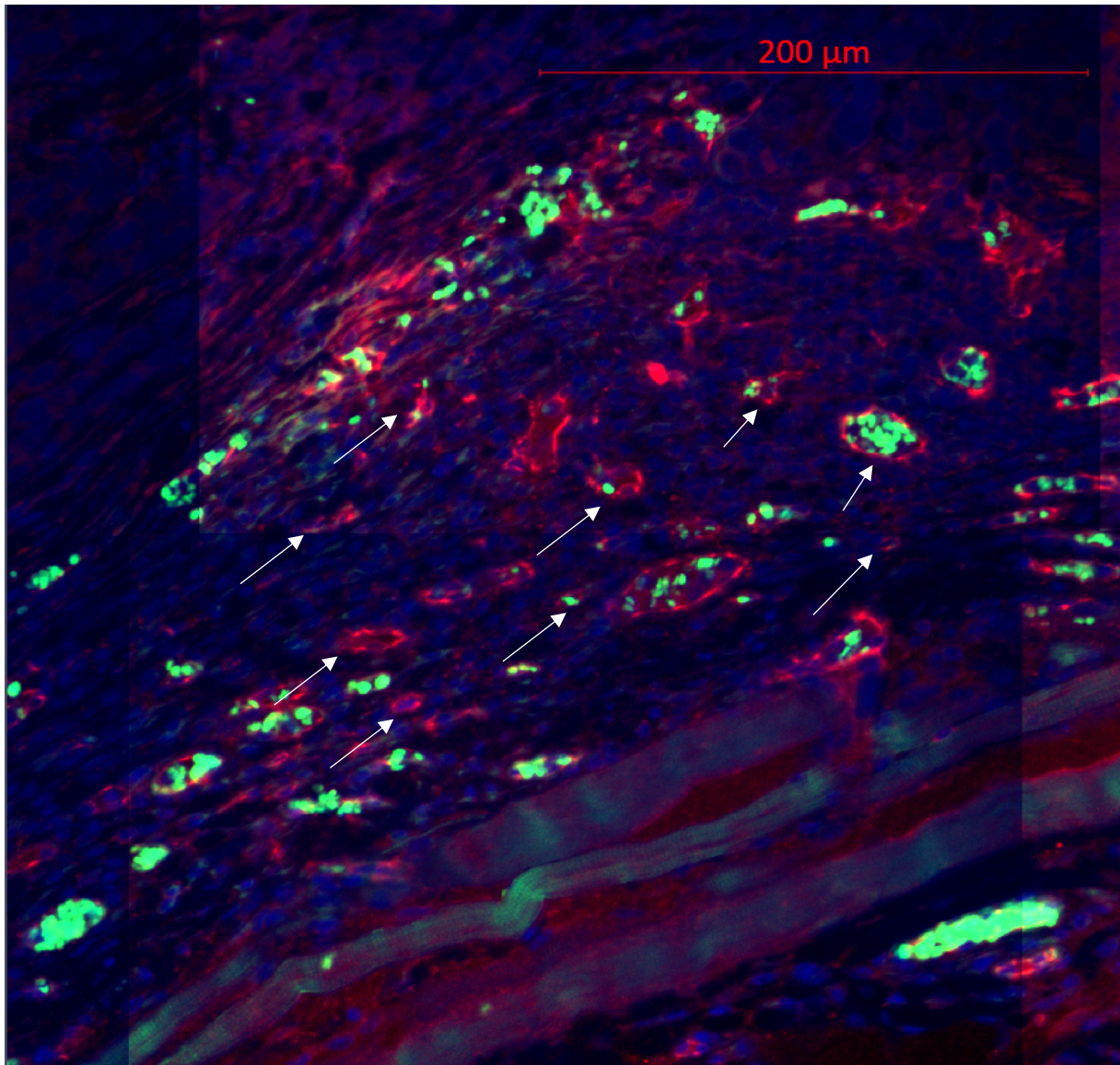


Abbildung 23 - Immunfluoreszenzdarstellung der Mikrogefäße im Tumorrandbereich in der Kontrollgruppe

In der Immunfluoreszenzfärbung zeigt sich eine hohe Dichte an Mikrogefäßen, hier im Bereich eines überlappenden field-of-view dargestellt. Mikrogefäße exemplarisch mittels Pfeil markiert. Endothelfärbung mittels CD31, hier rot dargestellt. Im unteren Bildabschnitt zeigt sich die Rückenmuskulatur, in die der Tumor infiltriert.

Die MVD in der Therapiegruppe mit XVir-N-31 ist im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant niedriger. Außerdem zeigt sich im Tumorrandbereich ein gemischteres Bild aus größeren und kleineren Gefäßen der Mikrozirkulation (siehe Abbildung 24). Wohingegen es in der Kontrollgruppe vor allem kleine Mikrogefäße gibt (siehe Abbildung 23).

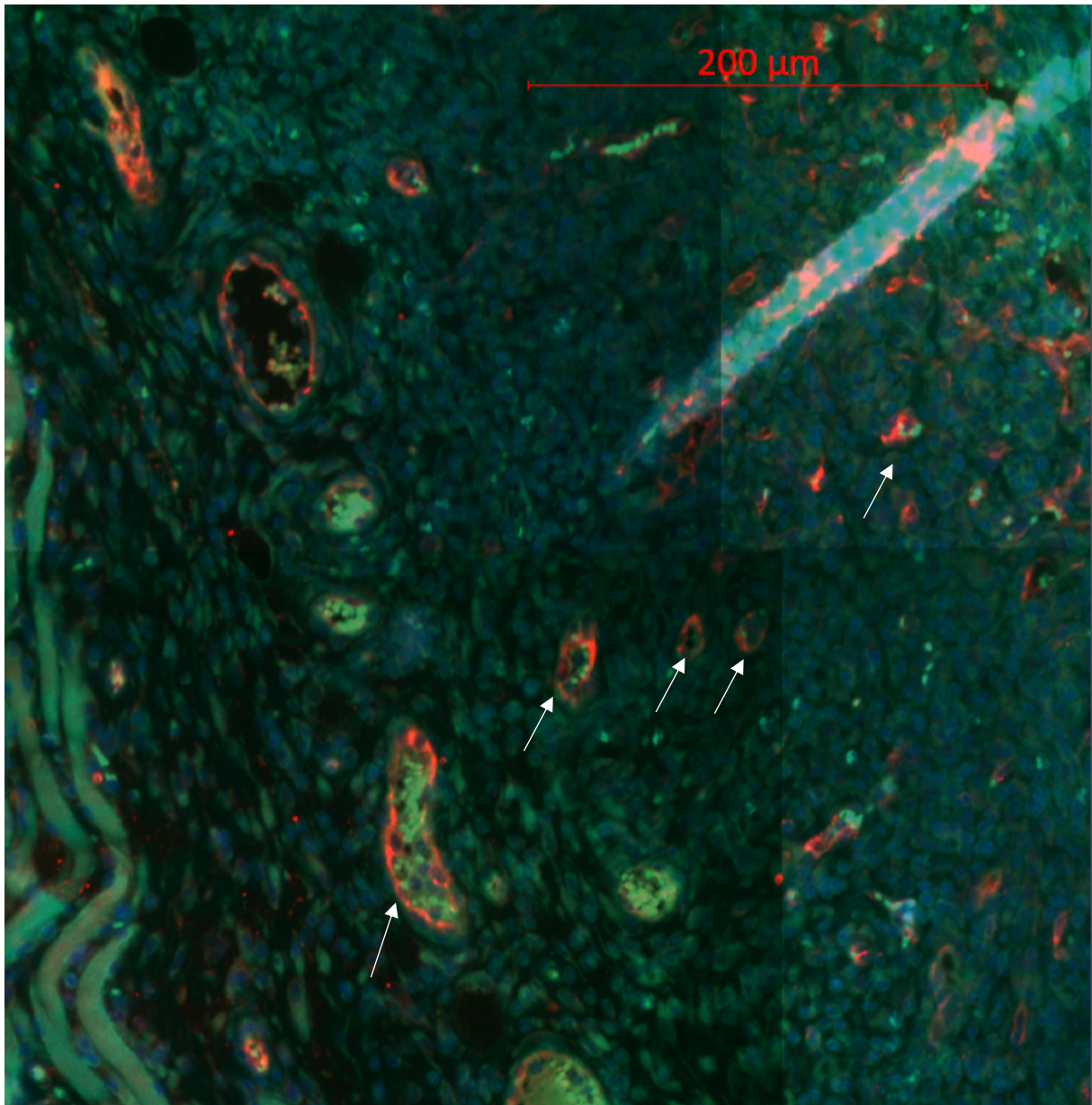


Abbildung 24- Immunfluoreszenzdarstellung der Mikrogefäße im Tumorrandbereich in der Therapiegruppe

In der Doppelimmunfluoreszenzfärbung zeigt sich eine mittlere Dichte an Mikrogefäßen, hier im Bereich eines überlappenden field-of-view dargestellt. Mikrogefäße exemplarisch mittels Pfeil markiert. Endothelfärbung mittels CD31, hier rot dargestellt.

Die hier dargestellte hohe MVD in der Kontrollgruppe spricht für einen sehr hohen Sauer- sowie Nährstoffbedarf sowie eine sehr hohe tumorangiogenetische Aktivität. Insgesamt spricht dies für unreife Gefäße mit einer niedrigen physiologischen Gefäßqualität. Um die Gefäßqualität weiter zu eruieren, soll im nächsten Schritt der microvessel Pericyte Coverage Index (mPCI) bestimmt werden.

#### 4.9 Bestimmung des microvessel Pericyte Coverage Index mittels Doppelimmunfluoreszenz Färbung des Endothels sowie der Perizyten

Um den microvessel Pericyte Coverage Index (mPCI) zu bestimmen, wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen durchgeführt, um die Dichte der Ummantelung der Gefäße der Mikrozirkulation durch Perizyten darzustellen.

In der Kontrollgruppe zeigt sich lediglich ein mPCI von 29%, wohin gegen die Versuchsgruppe einen mPCI von 38% aufweist und dieser somit signifikant höher ist (Abbildung 25).

In der Kontrollgruppe zeigen sich teilweise Areale, in welchen keine Ummantelung mehr mit Perizyten erkennbar ist (siehe Abbildung 20 und Abbildung 26).

In der Therapiegruppe zeigt sich ein etwas heterogeneres Bild mit Mikrogefäßen mit einer deutlichen Perizyten-dichte, aber auch Gefäße, welche nur wenig Perizyten aufweisen (siehe Abbildung 27).

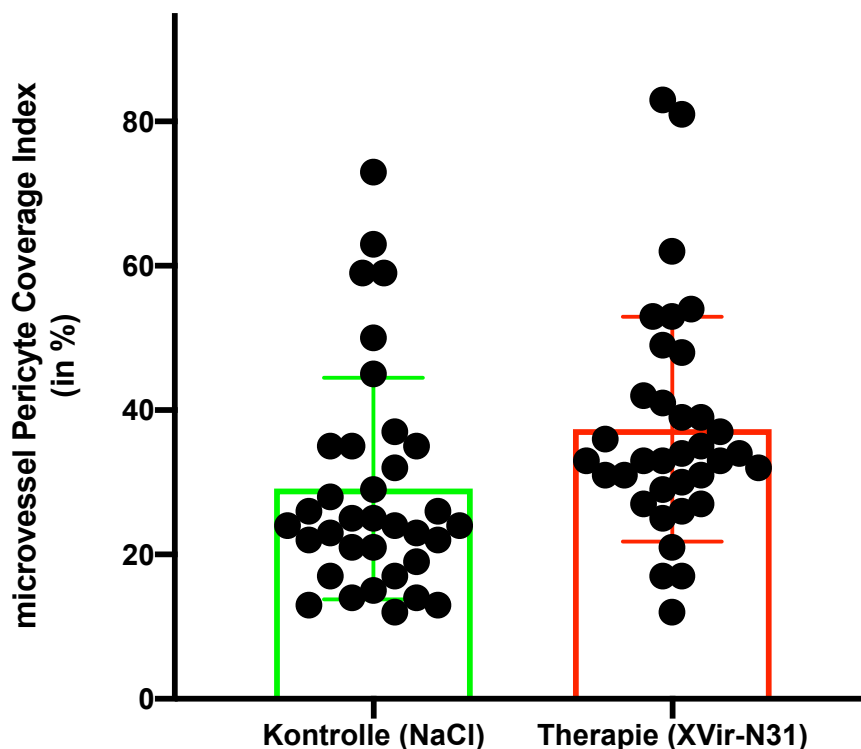


Abbildung 25 - microvessel Pericyte Coverage Index

Grün kennzeichnet die Kontrollgruppe und rot kennzeichnet die Versuchsgruppe. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung;  $p < 0.01$

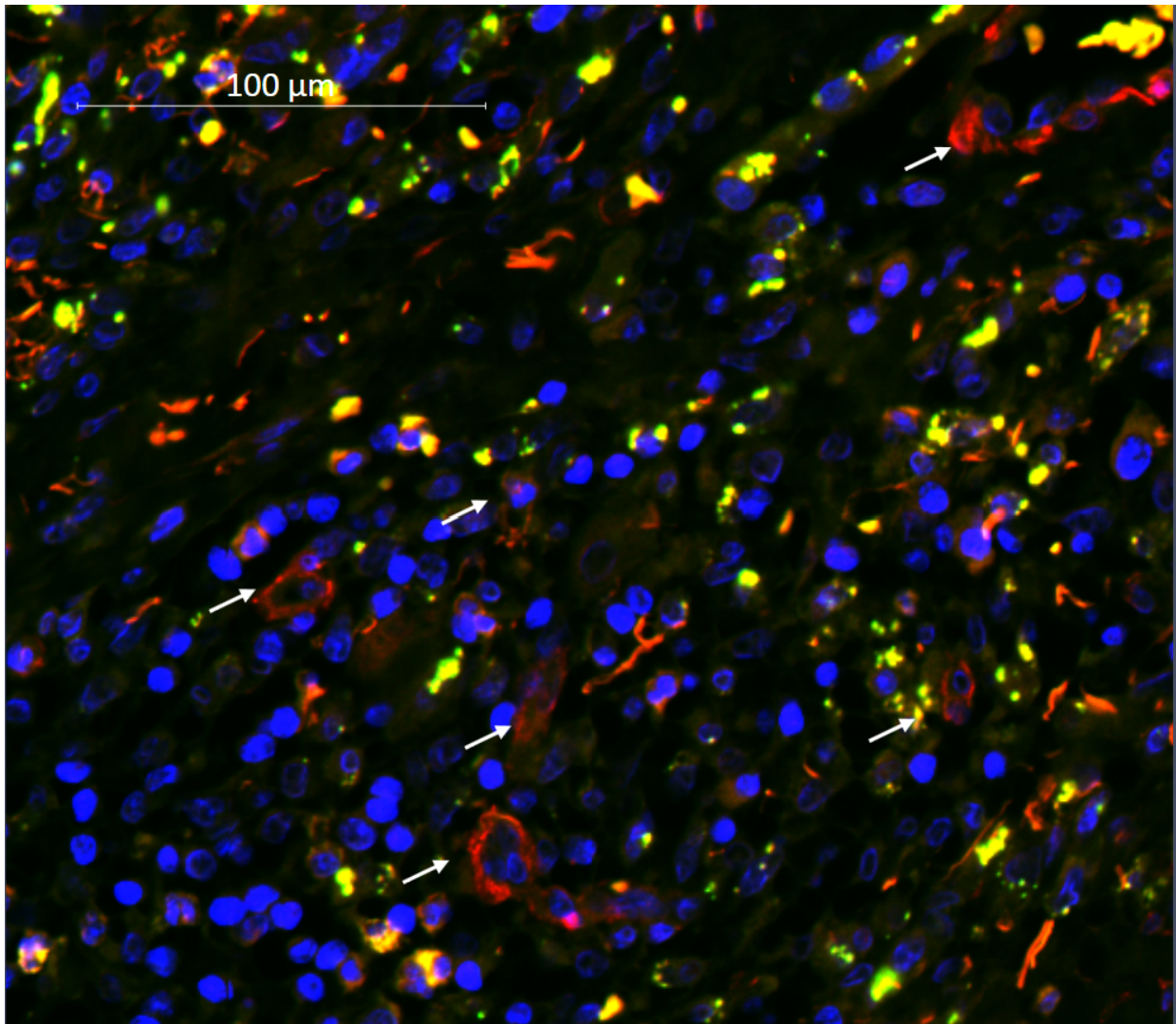


Abbildung 26 - Doppelimmunfluoreszenzfärbung von  $\alpha$ SMA<sup>+</sup> Perizyten und CD31<sup>+</sup> Endothelzellen im Tumorrandbereich in der Kontrollgruppe

In der Doppelimmunfluoreszenzfärbung zeigt sich eine hohe Dichte an Mikrogefäßen hier im Bereich eines field-of-view dargestellt. Mikrogefäße exemplarisch mittels Pfeil markiert. Endothelfärbung mittels CD31, hier rot dargestellt. Die mittels Färbung markierten  $\alpha$ SMA<sup>+</sup> Perizyten lassen sich hier kaum darstellen.



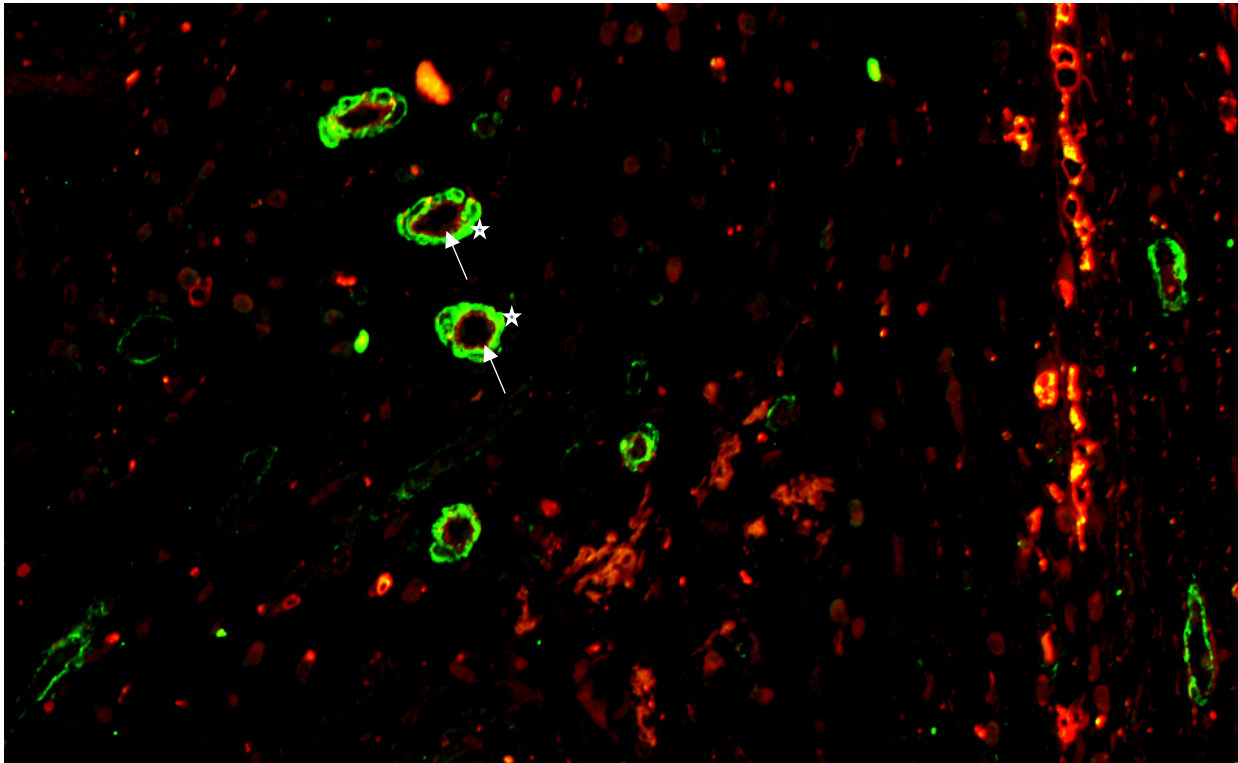


Abbildung 27 - Doppelimmunfluoreszenzfärbung von  $\alpha$ SMA<sup>+</sup> Perizyten (grün) und CD31<sup>+</sup> Endothelzellen im Tumorrandbereich in der Therapiegruppe

In der Doppelimmunfluoreszenzfärbung zeigt sich eine mittlere Dichte an Mikrogefäßen, hier im Bereich eines field-of-view dargestellt. Mikrogefäße exemplarisch mittels Pfeil markiert. Endothelfärbung mittels CD31, hier rot dargestellt. Die mittels Färbung markierten  $\alpha$ SMA<sup>+</sup> Perizyten, hier grün dargestellt und mittels \* markiert.

Unter Berücksichtigung der vorher bestimmten MVD, zeigen die Gefäße der Kontrollgruppe somit einen deutlich niedrigeren Reifegrad der Gefäße sowie eine deutlich ausgeprägtere angiogenetische Aktivität. Die Untersuchungen fanden im Randbereich des Tumors statt, wo die vorher beschriebenen Hot-Spot-Methode.

#### 4.10 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zunächst konnte gezeigt werden, dass sich XVir-N-31 in der Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinie-FaDu repliziert und diese ab Konzentration von 20 MOI lysiert. Nachdem der Nachweis der Wirksamkeit von XVir-N-31 erbracht wurde, wurde ein heterotopes Tumormodell in einer athymischen Nacktmaus etabliert. Nach Injektion von eGFP<sup>+</sup>FaDu Zellen, vermehrten diese sich und erreichten nach 6-8 Tagen ein

Volumen von ca. 50 mm<sup>3</sup>, woraufhin mit den Injektionen von XVir-N-31 respektive NaCl begonnen wurde. Mittels Fluoreszenzkamera konnte nachgewiesen werden, vor Beginn der eigentlichen Versuche, dass die injizierten Zellen in der Rückenhaut der Maus angewachsen waren.

Es zeigt sich in den durchgeführten Therapieversuchen, dass XVir-N-31 auf der makroskopischen Ebene das Tumorwachstum hemmt. Betrachtet man dies auf einer mikroskopischen Ebene, zeigt sich nicht nur ein Arrest des Wachstums, sondern unter Berücksichtigung der vorhandenen Fibrosierung und Narbenbildung eine Reduktion der Tumormasse unter der Therapie.

Außerdem zeigt sich eine Abnahme der Mikrogefäße im Tumorrandbereich unter Therapie mit XVir-N-31 und eine Zunahme der  $\alpha$ SMA<sup>+</sup> Perizyten im Tumorrandbereich. Somit hat XVir-N-31 nicht nur einen Einfluss auf die Tumorgöße, sondern auch auf die Tumorangiogenese.

## 5 Diskussion

### 5.1 Die Replikation und onkolytische Kapazität von XVir-N-31 in eGFP<sup>+</sup> FaDU-Zellen

Die onkolytische Virustherapie ist vor allem durch die Erfolge beim malignen Melanom in den letzten Jahren vermehrt in den Fokus gerückt (Conry et al. 2018). Onkolytische Viren müssen einerseits ein so hohes infektiöses Potential haben, dass sie im hohen Maße Tumorzellen infizieren und sich in diesen replizieren, so dass dieser Vorgang katalysiert (Ungerechts et al. 2017) (Shilpa et al. 2014). Andererseits müssen sie so selektiv sein, dass sie sich nicht im, häufig bereits durch die Erkrankung geschwächten, Organismus verteilen und dort massive Schäden anrichten (Shilpa et al. 2014). Ein Spagat, in dem sich fast alle onkologischen Therapien befinden.

Um eine Selektivität zu gewährleisten, benötigt jedes onkolytische Virus ein für Tumorzellen möglich spezifisches Protein, über welches sich die Virusreplikation auf die Tumorzellen beschränkt. Hier konnte durch Vorarbeiten von Kolk und Holm et al. das Protein YB-1 in FaDU-Zellen identifiziert werden, welches außerdem noch mit dem Grading und der Prognose von Kopf-Hals-Karzinomen korreliert (Kolk et al. 2011). Die YB-1 abhängige Replikation des Virus, auf welchem XVir-N-31 basiert, reduziert die Kapazität des Virus sich zu replizieren (Holzmuller et al. 2011). Hier konnte der Nachweis mittels qPCR (siehe Abbildung 5) erbracht werden, dass sich das Virus suffizient in den FaDU-Zellen repliziert. Zwar ist die virale Kapazität des Wildtyp-Virus deutlich höher, was aber auch den Beschreibungen in der Literatur entspricht (Lichtenegger et al. 2019).

Nicht nur die Replikation des Virus sondern auch seine lytische Kapazität der Tumorzellen ist entscheidend für die Eignung als Therapie (Zheng et al. 2019). Hier konnte im SRB-Assay (siehe Abbildung 6) gezeigt werden, dass XVir-N-31 zuverlässig ab einer Dosis von 50 MOI über die Hälfte der FaDu-Zellen lysiert. Die niedrigere Onkolyse im Vergleich zum WT-Adenovirus ist am ehesten auf die ADP Deletion in XVir-N-31 zurückzuführen, welche zu einer langsameren Lyse von Tumorzellen führt (Tollefson et al. 1996).

## 5.2 Etablierung eines *in vivo* Mausmodells zur Untersuchung der Wirksamkeit von XVir-N-31

Die Wahl des Maustyps fiel auf die athymische Nacktmaus, da diese sich gut auf Grund ihrer Haarlosigkeit für subkutane Injektion von Tumorzellen eignet und sich grundsätzlich transkutan fluoreszierende Zellen darstellen lassen (Ireson et al. 2019) (Richmond et al. 2008). Das Fehlen des Fells ermöglicht es außerdem, ohne Manipulation im Bereich des gerade noch zu Beginn sehr kleinen Tumors die Größe zu dokumentieren (Kelland 2004) (Richmond et al. 2008). Auf Grund Ihrer immunologischen Restaktivität bei vorliegenden B-Zellen und NK-Zellen eignen sich diese vor allem für schnellwachsende Tumorzellen, eine Eigenschaft, die in der Literatur für FaDU-Zellen beschrieben wurde (Harris et al. 2011). Nachteilig ist grundsätzlich bei immuninkompetenten Tieren, dass hinsichtlich des Immunsystems nicht physiologische Tumormicroenvironment und die inkomplette Interaktion zwischen Organismus und wachsendem Tumor (Ireson et al. 2019). Ein Aspekt, der bei der Virustherapie von erheblicher Bedeutung ist (Berkey et al. 2017).

Eine Alternative bieten hier humanisierte Mäuse, welche mittels Transplantation humaner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes, T-Zellen, B-Zellen, natürliche Killerzellen sowie Monozyten erhalten. Dieses sehr aufwendige und komplexe Modell ist eine der Möglichkeiten, humane Tumorzellen in einer möglichst physiologischen Umgebung in Mäusen zu untersuchen (Ireson et al. 2019).

Die erfolgreiche heterotope Injektion von Tumorzellen (siehe Abbildung 7) erfolgte auf Grund seiner guten Zugänglichkeit und einfachen Untersuchbarkeit. Orthotope Modelle bieten natürlicherweise eine physiologische Umgebung, sind allerdings gerade bei Kopf-Hals-Karzinomen schwer zugänglich und benötigen so häufig sehr aufwendige apparative Untersuchungen, um zuverlässig Größenänderungen zu untersuchen. Zusätzlich führt, wie die ebenfalls in Studien verwendete, Startgröße von 5 mm zu keiner grundlegenden Belastung der Tiere.

Die fluoreszierenden Tumorzellen ermöglichten es vor allem zu Beginn der Experimente sicher zu stellen, dass es sich bei entstehenden Raumforderungen um die Tumorzellen handelte und nicht um eine bindegewebige Reaktion auf die Injektionen z.B. im Sinne einer Narbenbildung (Burgos et al. 2003). Insgesamt konnte ein effizient zu erzeugendes Tiermodell etabliert werden, welches ein gutes Tumorwachstum und gleichzeitig eine minimal invasive Beobachtung ermöglicht. Mit

Hilfe dieses Modells ist es möglich, die Eignung von XVir-N-31 für Kopf-Hals-Karzinome zu untersuchen.

Im nächsten Schritt, bei Nachweis der Effektivität des Virus, sind komplexere Modelle entweder mit immunkompetenten Tieren oder induzierten Tumoren z.B. mit 4NQO in der Mundhöhle indiziert. Mit Hilfe dieser ließe sich genauer die Interaktion zwischen den Tumorzellen, dem Tumormicroenvironment sowie dem Virus untersuchen.

### 5.3 Die Wirkung von XVir-N-31 auf das Tumorwachstum

Nachdem die Wirkung von unterschiedlichen Entwicklungsstadien von XVir-N-31 bereits *in vivo* im Tiermodell bei Glioblastomzellen sowie im orthotopen Blasenkrebsmodell nachgewiesen wurde, konnte hier ebenfalls die onkolytische Wirkung gezeigt werden (Lichtenegger et al. 2019) (Holzmüller et al. 2011).

Wie bei den o.g. anderen Entitäten kommt es zu einem Arrest des Tumorwachstums mit einem anschließenden Regress (Abbildung 13). Auch andere onkolytische Virusstämme konnten in ähnlichen Versuchsaufbauten ihre Wirkung nachweisen. Meistens kam es jedoch zu einer Abflachung der Wachstumskurve, aber nicht zu einem Arrest des Wachstums oder Regress der Tumorgröße (Liu et al. 2013).

Die sehr unterschiedlichen intrazellulären Ziele sowie die sehr heterogenen verwendeten Zelllinien machen jedoch einen objektiven Vergleich zwischen den unterschiedlichen Studien und unseren Ergebnissen schwer. Auch die Tumorgröße, bei welcher die Therapie begonnen wird, hat sicherlich einen Einfluss auf den Erfolg der Therapie.

XVir-N-31 zeigt insgesamt in der Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinie FaDu eine gute Wirksamkeit. Allerdings gibt es auch hier Verbesserungspotential. Zwar wird ein leichter Regress der Tumorgröße erreicht, allerdings kommt es innerhalb des Therapiezeitraums nicht zu einer Eliminierung der Tumore. Ein Aspekt, warum dies nicht im verwendeten Versuchsaufbau gelingt, mag das Fehlen eines suffizienten Immunsystems sein, welche die onkolytische Wirkung noch unterstützt. Vor allem wirken sich die in der athymischen Nacktmaus fehlenden T-Zellen negativ auf das onkolytische Potential von XVir-N-31 aus (Kelland 2004). Des Weiteren könnte es notwendig sein, dass, wie auch bei anderen onkolytischen Viren, wie Talimogene laherparepvec, welches sich bereits im klinischen Einsatz befindet, zusätzlich

Immuncheckpointinhibitoren gegeben werden, um den Wirkungsgrad noch zu erhöhen (Sun et al. 2018). Dies erfordert jedoch immunkompetente Mäuse.

Die HE-Färbung unterstützt die Messwerte der Tumorgröße, da es dort vor allem in der Therapiegruppe deutlich weniger zentrale Einblutungen und Nekrosen gibt, welches einerseits für langsames bzw. sistierendes Wachstum spricht, andererseits für einen Umbau des Tumors in Narben- und Bindegewebe. Ob ein partieller bindegewebiger Umbau des Tumors die Malignität senkt, ist allerdings in der Literatur umstritten. Je nach Quelle wird angenommen, dass dieses physiologischere Umfeld auch das Tumorwachstum unterstützen könnte (Chandler et al. 2019).

In der deskriptiven Auswertung HE-Färbung zeigt sich, dass die Kontrollgruppe eine deutlich höhere angiogenetische Aktivität hat. Auffällig ist hier die besonders hohe Dichte an Mikrogefäßen in einem field-of-view. Die geringe Anzahl von Mikrogefäßen in der Therapiegruppe spricht für eine Art „down grading“ des Tumors, da eine hohe Mikrogefäßdichte typischerweise mit einer höheren Malignität des Tumors assoziiert ist (Weidner 2008) (Zhu et al. 2017).

In der hier vorgestellten Arbeit konnte erstmalig der Nachweis erbracht werden, dass das onkolytische Adenovirus XVir-N-31 Zellen der Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinie FaDU im heterotopen Tiermodell infiziert und lysiert. Es zeigt sich ein signifikanter Therapieerfolg im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der HE-Färbung zeigen sich keine Veränderungen, Narbenbildung oder vermehrten Immunzellen im umliegenden gesunden Gewebe. Es ist somit davon auszugehen, dass das XVir-N-31 lediglich YB-1 spezifisch die FaDu-Tumorzellen infiziert. Wobei kritisch angemerkt werden muss, dass es sich auch um ein humanes Virus handelt. Dennoch ist es grundsätzlich in einem Gebiet, wie dem Kopf-Hals-Bereich mit seinen vielen relevanten Strukturen von äußerster Relevanz, dass umliegendes gesundes Gewebe möglichst geschont wird. Hier unterscheidet sich die Virustherapie z.B. von sonst im Kopf-Hals-Bereich relativ erfolgreichen Therapien, wie der Radiotherapie, welche zwar gute Ergebnisse erzielt, aber das umliegende Gewebe schädigt (Bots et al. 2017, Owosho et al. 2017).

Inwieweit sich XVir-N-31 auch systemisch einsetzbar ist, lässt sich mit den hier durchgeführten Untersuchungen nicht sagen. Grundsätzlich werden, bis dato, onkolytische Viren vor allem lokal eingesetzt. Dies setzt voraus, dass die Tumore gut erreichbar sind, was häufig im Kopf-Hals-Bereich gegeben ist. Unklar ist jedoch, inwiefern und ob sich überhaupt eine lokale Therapie mittels Injektion z.B. auf okkulte Mikrometastasen auswirkt. Gerade diese sind in der Therapie von Kopf-Hals-

Karzinomen eine große Herausforderung. Hier besteht die Hoffnung, dass die Lyse der Tumorzellen und die damit verbundene Freisetzung der Tumorproteine es dem Immunsystem ermöglicht, metastasierte Zellen zu detektieren und zu zerstören (Berkey et al. 2017).

Weitere Untersuchungen mit Therapien als Kontrollgruppen sind jedoch notwendig, um die Wirksamkeit von XVir-N-31 besser einzuordnen. Hier empfehlen sich als kritische Vergleichsgruppen die Radio- und Chemotherapie.

#### 5.4 Der Einfluss der XVir-N-31 Therapie auf die Angiogenese und die Gefäßqualität

Neben der deskriptiven Untersuchung der Gefäßdichte in der HE-Färbung wurde diese auch mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbung quantifiziert, um den Einfluss von XVir-N-31 auf die Tumorangiogenese zu untersuchen.

Hier konnte hinsichtlich der MVD ein signifikanter Unterschied zwischen der Therapie- und Kontrollgruppe gezeigt werden. Unter Therapie mit XVir-N-31 nimmt die MVD signifikant ab. Die MVD dient in diversen soliden Karzinomen als histopathologischer Parameter für die Malignität, die Aktivität der Tumorangiogenese auch als Indikator für die im TME vorliegende Hypoxie (Carmeliet et al. 2011) (Weidner 2008) (Tynninen et al. 2002, Uzzan et al. 2004, Ingaleshwar et al. 2016).

Der Einfluss der Therapie mit XVir-N-31 auf die MVD resultiert sicher zum Teil aus dem Arrest des Wachstums unter Therapie. Aber es ist davon auszugehen, dass XVir-N-31 in den Arealen des Tumors besonders effektiv die Tumorzellen infiziert und lysiert, in denen einer hoher MVD vorliegt. Zurückzuführen ist dies auf den Zusammenhang, dass die Hypoxie im TME einer der Motoren der Tumorangiogenese ist (Carmeliet et al. 2011). Hypoxie stellt außerdem eine Form von Stress für die Tumorzellen dar (El-Naggar et al. 2015). Dies resultiert in einer höheren intrazellulären Konzentration von YB-1 und einer vermehrten Translokation von YB-1 in den Zellkern (Somasekharan et al. 2015) (El-Naggar et al. 2015). Es konnte in Untersuchungen nachgewiesen werden, dass in Sarkomen Areale, welche besonders hypoxisch sind, besonders hohe Konzentrationen an YB-1 intranukleär vorliegen (El-Naggar et al. 2015).

Ein höheres Vorkommen von YB-1 sowie die Translokation von YB-1 in den Zellkern macht, wie in der Literatur beschrieben, Tumorzellen empfindlicher für die Infektion und Replikation von XVir-N-31 (Holzmüller et al. 2011).

Zusammenfassend kann somit gesagt werden, dass der Rückgang der MVD nicht nur eine Folge des reduzierten bzw. sistierten Wachstums ist, sondern vermutlich XVir-N-31 in diesen Arealen des Tumors besonders effizient die Tumorzellen infiziert und lysiert.

Relevant ist dieser Effekt von XVir-N-31, da nicht jedes Areal des Tumors das gleiche maligne Potential hat. Die für die Untersuchung der MVD definierten „hot spots“ befinden sich, wie in der Literatur beschrieben, im Bereich der Invasionsfront des Tumors (Kasper et al. 2001) (Koukourakis et al. 2000) (Weidner 2008). Unter Therapie mit XVir-N-31 nehmen somit vor allem die Mikrogefäße im Bereich der Invasionsfront ab. Somit ändert sich auch das TME in diesem entscheidenden Bereich.

Anhand der Invasionsfront lassen sich maßgebliche prognostische Informationen des Tumors ableiten. Ursächlich ist dies u.a., da sie einen geringen Differenzierungsgrad und einen höheren Anteil an eher stammzellartigen Tumorzellen verglichen mit dem Tumorzentrum aufweist. Bezeichnend für die Invasionsfront ist ein Verlust von zellulären Adhäsionsmolekülen, verstärkter Zellproliferation, epitheliale-mesenchymale-Transition sowie die Induktion der Tumorangiogenese (Boxberg et al. 2018). Vorgänge, die zur Therapieresistenz führen hinsichtlich Radio- und Chemotherapie und mit der Expression YB-1 assoziiert sind (Kosnopfel et al. 2018) und damit potentielle Ziele für XVir-N-31 darstellen und die Wichtigkeit der Wirkung von XVir-N-31 im Bereich der Invasionsfront unterstreichen.

Nicht nur die Anzahl der Tumorgefäße ist entscheidend, sondern auch ihre strukturelle Beschaffenheit. Die durch den Tumor induzierten Gefäße sind strukturell und funktionell abnormal, sie weisen ein defektes Endothel, eine durchlässige Basalmembran sowie insuffiziente Umhüllung mit Perizyten auf (Yonenaga et al. 2005) (Carmeliet et al. 2000).

Normalerweise weisen physiologische Blutgefäße intravasal einen hohen Druck auf, wohingegen der interstitielle Druck im Interstitium deutlich niedriger ist (Winkler et al. 2004). Dieser Gradient ermöglicht u.a. einen suffizienten Austausch von Sauer- und Nährstoffen. Tumorgefäße sind, wie beschrieben, unreifer und deutlich durchlässiger,



so dass im TME ein abnorm hoher interstitieller Druck vorliegt und der Druckgradient stark abnimmt, was u.a. zu einem Mangel an Sauerstoff führt (Winkler et al. 2004).

Die Ummantelung mit Perizyten wird häufig als Indikator für den Reifegrad der Gefäße genommen, da diese im Rahmen der physiologischen Neoangiogenese die durch Endothelzellen neu gebildeten Gefäße stabilisieren und regulieren (Teichert et al. 2017).

Die Kombination aus MVD und mPCI ermöglicht es, eine Aussage bezüglich der Aktivität der Tumorangiogenese sowie bezüglich des Reifegrades der Mikrogefäße zu treffen.

Hier konnte in der Kontrollgruppe ein signifikant niedrigerer mPCI mit einer signifikant höheren MVD nachgewiesen werden. Eine Kombination, die eher für einen aggressiveren Tumor spricht und so auch beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom sowie bei Metastasen des kolorektalen Karzinoms beschrieben wurden (Yonenaga et al. 2005, Pieterse et al. 2019). Eine Kombination, welche bei diversen soliden Tumoren mit einem höheren Risiko für Fernmetastasen einhergeht (Yonenaga et al. 2005) (Cao et al. 2013) (Ribeiro et al. 2015). Unter Therapie mit XVir-N-31 nimmt die Perizyten-dichte zu (höherer mPCI) und die Dichte der Mikrogefäße ab (niedrigerer MVD). Die bei der MVD aufgeführten Ergebnisse bestätigen, dass es auf Ebene der Tumorangiogenese zu einer Gefäßnormalisierung und einem „down grading“ des Tumors kommt.

Trotz der im Vergleich mit der Literatur plausiblen Ergebnisse hinsichtlich der Perizyten-dichte, muss diese auch kritisch betrachtet werden.

Es gibt keinen einheitlichen histologischen Marker für Perizyten. Nicht alle Perizyten exprimieren unbedingt  $\alpha$ SMA, auch wenn dies der gängigste Marker ist. In Tumoren konnte gezeigt werden, dass gerade durch die Tumorzellen beeinflusste und veränderte Perizyten auch Desmin oder hochmolekulares Melanom-assoziiertes Antigen exprimieren. Ein weiterer gängiger Marker für Perizyten ist NG2+. Somit kann auf Grund der in den Untersuchungen verwendeten Marker  $\alpha$ SMA nicht ausgeschlossen werden, dass in der Kontrollgruppe weiterhin  $\alpha$ SMA negative Perizyten in relevanter Dichte vorlagen (Allt et al. 2001). Die Ergebnisse zeigen jedoch trotz dieser Schwächen eindeutig, dass sich sicher die Art und höchstwahrscheinlich auch die Dichte zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe unterscheiden.

Welche Relevanz diese durch XVir-N-31 erzeugte Gefäßnormalisierung für Tumortherapien hat, soll im Folgenden diskutiert werden.

Es ist in der Literatur unumstritten, dass multimodale Therapieansätze die Zukunft der onkologischen Therapie sind. Ein gutes Beispiel hierfür ist die Kombination aus Immuntherapie und onkolytischer Virotherapie beim malignen Melanom (Sun et al. 2018). Aber auch die von Holm et al. beschriebene Möglichkeit XVir-N-31 mit Chemotherapie zu kombinieren (Holm et al. 2016), könnte vielversprechend sein. Welche Relevanz die Therapie von XVir-N-31 und die daraus resultierende Gefäßnormalisierung für mögliche multimodale Therapieansätze hat, wird deutlich, wenn man sich die Relevanz der Gefäßnormalisierung in der Literatur anschaut.

Eine z.B. erfolgreiche Chemo- oder auch Immuntherapie benötigt eine suffiziente und möglichst homogene Perfusion des Tumors, so dass die Moleküle in möglichst hoher Dosis ihr Ziel erreichen (Carmeliet et al. 2011) (Goel et al. 2012). Gerade die oben angesprochene Invasionsfront mit einem, hier in der Arbeit dargestellten, hohen MVD sowie geringem mPCI wird häufig nicht adäquat von medikamentösen Therapien erreicht. Untersuchungen konnten zeigen, dass eine Normalisierung der Gefäße, wie sie auch durch XVir-N-31 induziert wird, zu einem besseren Ansprechen der Tumore auf Chemotherapie führt (Carmeliet et al. 2011). Die Chemotherapie stellt jedoch bei Kopf-Hals-Karzinomen bisher lediglich eine palliative Therapieoption dar.

Deutlich bessere Ergebnisse zeigt bei Kopf-Hals-Karzinomen die Radiotherapie und ist, nach der chirurgischen Therapie, die zweite Wahl zur Behandlung. Für die Radiotherapie konnte in Untersuchungen nachgewiesen werden, dass eine Gefäßnormalisierung zu einer Erhöhung des Sauerstoffgehalts im TME führt und sich positiv auf die Effizienz der Bestrahlung auswirkt (Winkler et al. 2004).

Von entscheidender Bedeutung ist, dass diese Gefäßnormalisierung unter XVir-N-31 Therapie im Bereich der Invasionsfront des Tumors auftrat, ein Areal was sich nicht nur auf Grund seiner Gefäßarchitektur, sondern auch wegen seiner stammzell-ähnlichen Tumorzellen sich Therapien, wie der Radiotherapie, teilweise entzieht (Steinbichler et al. 2018). Hier besteht die Hoffnung, dass durch XVir-N-31 diese Areale einerseits durch das Virus besser bekämpft werden, andererseits das Virus die Effektivität von anderen Therapien in diesen Bereichen erhöht.

Wie auch klinisch beim malignen Melanom gezeigt wurde, liegt grundsätzlich die größte Chance der onkolytischen Virustherapie in Kombination mit Immuntherapien. Die Checkpointinhibition mittels PD-L1 hat seit kurzem auch eine Zulassung beim

Kopf-Hals-Karzinom erhalten und zeigt bessere Ergebnisse als die palliative Therapie nach dem EXTREME-Schema (Ferris et al. 2018, McCusker et al. 2020).

Hinsichtlich der Immuntherapie sind mehrere Effekte, die XVir-N-31 in dieser Arbeit gezeigt hat, entscheidend. Zunächst hat die Gefäßnormalisierung einen positiven Effekt auf die Rekrutierung und die Extravasation der Immunzellen in das TME (McDowell et al. 2019). Die Rekrutierung und Extravasation findet in einer komplexen Interaktion zwischen Immunzellen, Endothelzellen und Perizyten statt (Rudziak et al. 2019) (McDowell et al. 2019). Damit dieser Vorgang effizient stattfinden kann, benötigt es ein möglichst physiologisches Gefäßnetzwerk (McDowell et al. 2019).

Des Weiteren kommt es auf Grund der Lyse der Tumorzellen durch XVir-N-31 zu einer Freisetzung von DAMPs, welche das Immunsystem aktivieren und eine Immunreaktion provozieren (Kono et al. 2008). Die hier hinsichtlich ihrer Dichte untersuchten Perizyten, sind nicht nur relevant als Indikator für den Reifegrad der Gefäße, sondern es konnte auch gezeigt werden, dass diese eine Immunantwort mitinitiieren.

Perizyten detektieren mittels Toll-Like-Rezeptoren Freisetzung von DAMPs und steuern über das Chemokin MIF die Rekrutierung und Migration von Zellen des angeborenen Immunsystems in das Interstitium (Stark et al. 2013). Daher ist davon auszugehen, dass sich die hier gezeigte höhere Perizyten-dichte positiv auf die Immunantwort gegen die Tumorzellen auswirkt.

## 5.5 Ausblick

Es konnte mittels der hier vorgestellten Untersuchungen nachgewiesen werden, dass das YB-1 abhängige onkolytische Adenovirus XVir-N-31 sowohl in vitro als auch in vivo die Tumorzellen gezielt infiziert sowie lysiert und das Tumormicroenvironment hinsichtlich seiner Gefäßstruktur in einen physiologischen Zustand überführt.

Nachdem die onkolytische Wirkung gezeigt wurde, muss diese kritisch im Vergleich zu etablierten Therapien wie der Radio und Chemotherapie, im Tiermodell getestet und verglichen werden. Des Weiteren stellt sich die Frage, inwiefern sich Synergismen der o.g. Therapien mit XVir-N-31 ergeben. Einerseits muss geklärt werden, inwiefern es auf Grund des durch die o.g. Therapien induzierten Zellstressses zur Induktion von YB-1 in den Zellen kommt und wie sich dies auf die Therapie auswirkt, andererseits sollte

untersucht werden, wie sich die Gefäßnormalisierung auf die Wirksamkeit dieser Therapien auswirkt.

Interessant wäre hinsichtlich dieses Aspekts auch zu untersuchen, wie sich die Gefäßarchitektur unter singulärer Radio- oder Chemotherapie verändert. Abschließend ergibt sich natürlich aus den hier vorgestellten Daten und auch dem Tiermodell die Frage, wie XVir-N-31 im immunkompetenten Tier wirkt und dort auch im Zusammenspiel mit z.B. Immuncheckpointinhibitoren.

## 6 Zusammenfassung

Diese Arbeit zeigt, dass das YB-1 abhängige Adenovirus XVir-N-31 *in vitro* und *in vivo* sich in der Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinie FaDU repliziert und diese lysiert. So konnte gezeigt werden, dass sich XVir-N-31 gegebenenfalls für die Therapie von Kopf-Hals-Karzinomen eignet. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass das XVir-N-31 einen hemmenden Einfluss auf die Tumorangio-genese hat und so zu einer Normalisierung der Gefäße der Mikrozirkulation führt.

Nachdem *in vitro* mittels qPCR nachgewiesen wurde, dass sich XVir-N-31 in FaDu-Tumorzellen repliziert, konnte anschließend mittels SRB-Assay nachgewiesen werden, dass XVir-N-31 ab einer MOI von 20 FaDu-Zellen auch lysiert. Nachdem der *in vitro* Nachweis der Wirksamkeit erbracht wurde, wurde in der Rücken-haut ein heterotopes Tumormodell in der immuninkompetenten athymischen Nacktmaus etabliert. Mittels eGFP-Markierung konnten initial das Wachstum der Tumorzellen überwacht werden und so ein Anwachsen des Tumors sichergestellt werden.

In den *in vivo* Untersuchungen zeigt sich, dass nach 8 Tagen onkolytischer Therapie mit XVir-N-31 das Tumorstadium vollständig sistiert und es im Verlauf zu einem leichten Regress der Tumorstadium kommt, während es in der Kontrollgruppe mit NaCl zu einem exponentiellen Tumorstadium kam. Mittels histologischer Untersuchung konnte nachgewiesen werden, dass es unter Virotherapie mit XVir-N-31 zu multiplen Vernarbungen im Tumor kam und somit sich das Gesamtvolumen reduziert hat. Im weiteren Verlauf konnte mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen nachgewiesen werden, dass sich nach Therapie mit XVir-N-31 die Mikrogefäßdichte im Bereich der Invasionsfront des Tumors signifikant reduziert. Anschließend konnte mittels Bestimmung der microvessel density und des microvessel Pericyte Coverage Index nachgewiesen werden, dass es unter Therapie mit XVir-N-31 zu einer Reduktion der Aktivität der Tumorangio-genese und konsekutiv zu einer Reifung und Normalisierung im Sinne einer physiologischeren Gefäßstruktur kam.

Zusammenfassend weist diese Arbeit die antitumorale Wirksamkeit des onkolytischen Virus XVir-N-31 in der Kopf-Hals-karzinom-Zelllinie FaDu nach. Des Weiteren zeigt sie, dass XVir-N-31 die Gefäße und damit auch das Tumormicroenvironment im Sinne einer Gefäßreifung und Normalisierung positiv modifiziert.

## 7 Summary

This thesis shows that the YB-1 dependent adenovirus XVir-N-31 replicates in vitro and in vivo in the head and neck cancer cell line FaDU and lyses it. Thus, it could be shown that XVir-N-31 is potentially suitable for the therapy of head and neck carcinomas. It was also shown that XVir-N-31 has an inhibitory effect on tumor angiogenesis and consequently leads to a normalization of the microvessels.

Then it was demonstrated in vitro by qPCR that XVir-N-31 replicates in FaDu tumor cells, it was subsequently shown by SRB assay that XVir-N-31 also lyses FaDu cells. After the in vitro proof of efficacy was provided, a heterotopic tumor model was established in the dorsal skin of the immunodeficient athymic nude mouse. By means of eGFP-labelling, the growth of the tumor cells could be monitored initially, thus ensuring the growth of the tumor.

The in vivo studies show that after 8 days of oncolytic therapy with XVir-N-31, tumor growth stops completely and there is a slight regression of tumor size, whereas in the control group with NaCl exponential tumor growth occurred. With the help of histological examination, it could be shown that under virotherapy with XVir-N-31 multiple scarring of the tumor occurred and thus the total volume of the tumor was reduced. In addition, immunofluorescence studies showed that after therapy with XVir-N-31, the microvascular density in the area of the invasive front of the tumor was significantly reduced. Subsequently, by determining the microvessel density and the microvessel pericyte coverage index, it could be shown that therapy with XVir-N-31 led to a reduction in the activity of tumor angiogenesis and a maturation and normalization of the microvessels.

In summary, this work demonstrates the antitumoral efficacy of the oncolytic virus XVir-N-31 in the head and neck carcinoma cell line FaDu. Furthermore, it shows that XVir-N-31 positively modifies the microvessels and thus also the tumormicroenvironment in the sense of vascular maturation and normalization.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1- Darstellung der intrazellulären Virusreplikation .....	11
Abbildung 2 – Versuchsaufbau.....	17
Abbildung 3 - Maus in Isoflurannarkose .....	21
Abbildung 4 - Screenshot der Zeiss Mikroskopsoftware Zen .....	25
Abbildung 5- Virale Replikation von XVir-N-31 in eGFP-FaDu-Zellen.....	28
Abbildung 6 - SRB Assay zur Bestimmung des onkolytisches Kapazität von XVir-N-31 in eGFP-FaDu-Zellen. ....	30
Abbildung 7 - Messung der TumorgroÙe in Isoflurannarkose .....	31
Abbildung 8- In situ befindlicher Tumor 10x Vergrößerung .....	32
Abbildung 9- Fluoreszenzansicht von Abbildung 8.....	33
Abbildung 10- Entfernter Tumor .....	33
Abbildung 11 – Fluoreszenzansicht des oben dargestellten Tumors .....	34
Abbildung 12- Maus aus der Kontrollgruppe am 12 Versuchstag .....	35
Abbildung 13 Tumorwachstum; grün kennzeichnet die Kontrolle und rot die Therapiegruppe; je Gruppe n=7. Vertikale Balken kennzeichnen Standardabweichung .....	36
Abbildung 14 - HE-Färbung eines Tumors der Kontrollgruppe dargestellt mittels HE- Färbung .....	39
Abbildung 15 - HE-Färbung eines Tumors der Kontrollgruppe im Bereich der Invasionsfront .....	40
Abbildung 16 - HE Färbung eines Tumors der Therapiegruppe.....	41
Abbildung 17 Doppelimmunfluoreszenz Färbung eines Tumors der Therapiegruppe .....	42
Abbildung 18 Kontrollgruppe Fluoreszenzfärbung eines Tumors der Kontrollgruppe	43
Abbildung 19 - Immunfluoreszenzdarstellung des Randbereiches eines Tumors der Kontrollgruppe .....	44
Abbildung 20 - Immunfluoreszenzdarstellung des Tumorrandbereiches eines Tumors der Kontrollgruppe mit vasculogenic mimicry .....	45
Abbildung 21- Immunfluoreszenzdarstellung des Tumorrandbereiches eines Tumors der Therapiegruppe .....	46
Abbildung 22 - MVD (Kontrolle vs Therapie).....	47
Abbildung 23 - Immunfluoreszenzdarstellung der MikrogefäÙe im Tumorrandbereich in der Kontrollgruppe .....	48

---

Abbildung 24- Immunfluoreszenzdarstellung der Mikrogefäße im Tumorrandbereich in der Therapiegruppe .....	49
Abbildung 25 - microvessel Pericyte Coverage Index .....	50
Abbildung 26 - Doppelimmunfluoreszenzfärbung von $\alpha$ SMA <sup>+</sup> Perizyten und CD31+ Endothelzellen im Tumorrandbereich in der Kontrollgruppe .....	51
Abbildung 27 - Doppelimmunfluoreszenzfärbung von $\alpha$ SMA <sup>+</sup> Perizyten (grün) und CD31+ Endothelzellen im Tumorrandbereich in der Therapiegruppe .....	52



## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - TNM Klassifikation von oralen Plattenepithelkarzinomen nach der 8. Auflage .....	4
Tabelle 2 - UICC Stadien.....	4
Tabelle 3 PCR Protokoll .....	16
Tabelle 4 - Immunfluoreszenz primäre und sekundäre Antikörper.....	23
Tabelle 5 - Rohdaten der Tumorgroße in mm <sup>3</sup> mit SD .....	36

## 10 Veröffentlichungen

Teile der hier vorgestellten Arbeit wurden am 07.06.2018 auf dem „68. Kongress & Praxisführungsseminar der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie“ im Rahmen eines Vortrages vorgestellt.

Des Weiteren wurden Teile der Ergebnisse am 19.09.2018 auf dem „EACMFS 2018 24th Congress of the European Association for Cranio Maxillo Facial Surgery“ als Vortrag präsentiert.

Aktuell wird ein Manuskript, basierend auf dieser Arbeit, vorbereitet, um es im „British Journal of Cancer“ zu publizieren.

## 11 Literaturverzeichnis

Allt, G., Lawrenson, J. G. Pericytes: cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs* 169 (2001) 1-11

Andersson, U., Wang, H., Palmblad, K., Aveberger, A. C., Bloom, O., Erlandsson-Harris, H., Janson, A., Kokkola, R., Zhang, M., Yang, H., Tracey, K. J. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med* 192 (2000) 565-570

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. Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol* 33 (2015) 2780-2788

Argiris, A., Li, S., Savvides, P., Ohr, J. P., Gilbert, J., Levine, M. A., Chakravarti, A., Hagentz, M., Jr., Saba, N. F., Ikpeazu, C. V., Schneider, C. J., Pinto, H. A., Forastiere, A. A., Burtneess, B. Phase III Randomized Trial of Chemotherapy With or Without Bevacizumab in Patients With Recurrent or Metastatic Head and Neck Cancer. *J Clin Oncol* 37 (2019) 3266-3274

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. 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 (1997) 447-450

Berkey, S. E., Thorne, S. H., Bartlett, D. L. Oncolytic Virotherapy and the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* 1036 (2017) 157-172

Bernier, J., Dometge, C., Ozsahin, M., Matuszewska, K., Lefebvre, J. L., Greiner, R. H., Giralt, J., Maingon, P., Rolland, F., Bolla, M., Cognetti, F., Bourhis, J., Kirkpatrick, A., van Glabbeke, M., European Organization for, R., Treatment of Cancer, T. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med* 350 (2004) 1945-1952

Bots, W. T. C., van den Bosch, S., Zwijnenburg, E. M., Dijkema, T., van den Broek, G. B., Weijs, W. L. J., Verhoef, L. C. G., Kaanders, J. Reirradiation of head and neck cancer: Long-term disease control and toxicity. *Head Neck* 39 (2017) 1122-1130

Boxberg, M., Gotz, C., Haidari, S., Dorfner, C., Jesinghaus, M., Drecoll, E., Boskov, M., Wolff, K. D., Weichert, W., Haller, B., Kolk, A. Immunohistochemical expression of CD44 in oral squamous cell carcinoma in relation to histomorphological parameters and clinicopathological factors. *Histopathology* 73 (2018) 559-572

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68 (2018) 394-424

- Buchakjian, M. R., Ginader, T., Tasche, K. K., Pagedar, N. A., Smith, B. J., Sperry, S. M. Independent Predictors of Prognosis Based on Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma Surgical Margins. *Otolaryngol Head Neck Surg* 159 (2018) 675-682
- Burgos, J. S., Rosol, M., Moats, R. A., Khankaldyyan, V., Kohn, D. B., Nelson, M. D., Jr., Laug, W. E. Time course of bioluminescent signal in orthotopic and heterotopic brain tumors in nude mice. *Biotechniques* 34 (2003) 1184-1188
- Byers, R. M., El-Naggar, A. K., Lee, Y. Y., Rao, B., Fornage, B., Terry, N. H., Sample, D., Hankins, P., Smith, T. L., Wolf, P. J. Can we detect or predict the presence of occult nodal metastases in patients with squamous carcinoma of the oral tongue? *Head Neck* 20 (1998) 138-144
- Cao, Y., Zhang, Z. L., Zhou, M., Elson, P., Rini, B., Aydin, H., Feenstra, K., Tan, M. H., Berghuis, B., Tabbey, R., Resau, J. H., Zhou, F. J., Teh, B. T., Qian, C. N. Pericyte coverage of differentiated vessels inside tumor vasculature is an independent unfavorable prognostic factor for patients with clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 119 (2013) 313-324
- Carmeliet, P., Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407 (2000) 249-257
- Carmeliet, P., Jain, R. K. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 10 (2011) 417-427
- Chandler, C., Liu, T., Buckanovich, R., Coffman, L. G. The double edge sword of fibrosis in cancer. *Transl Res* 209 (2019) 55-67
- Chao, H. M., Huang, H. X., Chang, P. H., Tseng, K. C., Miyajima, A., Chern, E. Y-box binding protein-1 promotes hepatocellular carcinoma-initiating cell progression and tumorigenesis via Wnt/beta-catenin pathway. *Oncotarget* 8 (2017) 2604-2616
- Cho, A., Hall, F. T. Review of perforator flaps in head and neck cancer surgery. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 24 (2016) 440-446
- Coatesworth, A. P., MacLennan, K. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: the prevalence of microscopic extracapsular spread and soft tissue deposits in the clinically N0 neck. *Head Neck* 24 (2002) 258-261
- Coles, L. S., Lambrusco, L., Burrows, J., Hunter, J., Diamond, P., Bert, A. G., Vadas, M. A., Goodall, G. J. Phosphorylation of cold shock domain/Y-box proteins by ERK2 and GSK3beta and repression of the human VEGF promoter. *FEBS Lett* 579 (2005) 5372-5378
- Conry, R. M., Westbrook, B., McKee, S., Norwood, T. G. Talimogene laherparepvec: First in class oncolytic virotherapy. *Hum Vaccin Immunother* 14 (2018) 839-846
- Doescher, J., Veit, J. A., Hoffmann, T. K. [The 8th edition of the AJCC Cancer Staging Manual : Updates in otorhinolaryngology, head and neck surgery]. *HNO* 65 (2017) 956-961

- El-Naggar, A. M., Veinotte, C. J., Cheng, H., Grunewald, T. G., Negri, G. L., Somasekharan, S. P., Corkery, D. P., Tirode, F., Mathers, J., Khan, D., Kyle, A. H., Baker, J. H., LePard, N. E., McKinney, S., Hajee, S., Bosiljcic, M., Leprivier, G., Tognon, C. E., Minchinton, A. I., Bennewith, K. L., Delattre, O., Wang, Y., Dellaire, G., Berman, J. N., Sorensen, P. H. Translational Activation of HIF1alpha by YB-1 Promotes Sarcoma Metastasis. *Cancer Cell* 27 (2015) 682-697
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W., Comber, H., Forman, D., Bray, F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 49 (2013) 1374-1403
- Ferrara, N., Henzel, W. J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. 1989. *Biochem Biophys Res Commun* 425 (2012) 540-547
- Ferris, R. L., Blumenschein, G., Jr., Fayette, J., Guigay, J., Colevas, A. D., Licitra, L., Harrington, K. J., Kasper, S., Vokes, E. E., Even, C., Worden, F., Saba, N. F., Docampo, L. C. I., Haddad, R., Rordorf, T., Kiyota, N., Tahara, M., Lynch, M., Jayaprakash, V., Li, L., Gillison, M. L. Nivolumab vs investigator's choice in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: 2-year long-term survival update of CheckMate 141 with analyses by tumor PD-L1 expression. *Oral Oncol* 81 (2018) 45-51
- Glockzin, G., Mantwill, K., Jurchott, K., Bernshausen, A., Ladhoff, A., Royer, H. D., Gansbacher, B., Holm, P. S. Characterization of the recombinant adenovirus vector AdYB-1: implications for oncolytic vector development. *J Virol* 80 (2006) 3904-3911
- Goel, S., Wong, A. H., Jain, R. K. Vascular normalization as a therapeutic strategy for malignant and nonmalignant disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2 (2012) a006486
- Goldmann, E. The Growth of Malignant Disease in Man and the Lower Animals, with special reference to the Vascular System. *Proc R Soc Med* 1 (1908) 1-13
- Gray, R., Bhattacharya, S., Bowden, C., Miller, K., Comis, R. L. Independent review of E2100: a phase III trial of bevacizumab plus paclitaxel versus paclitaxel in women with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 27 (2009) 4966-4972
- Hamid, O., Ismail, R., Puzanov, I. Intratumoral Immunotherapy-Update 2019. *Oncologist* 25 (2020) e423-e438
- Harris, M., Wang, X. G., Jiang, Z., Goldberg, G. L., Casadevall, A., Dadachova, E. Radioimmunotherapy of experimental head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) with E6-specific antibody using a novel HPV-16 positive HNSCC cell line. *Head Neck Oncol* 3 (2011) 9
- 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. 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 (2002) 10427-10434

Holm, P. S., Retz, M., Gschwend, J. E., Nawroth, R. [YB-1-based virotherapy: A new therapeutic intervention for transitional cell carcinoma of the bladder?]. *Urologe A* 55 (2016) 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. YB-1 dependent virotherapy in combination with temozolomide as a multimodal therapy approach to eradicate malignant glioma. *Int J Cancer* 129 (2011) 1265-1276

Huang, S. H., O'Sullivan, B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol* 18 (2017) 40

Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., Ferrara, N., Fyfe, G., Rogers, B., Ross, R., Kabbinavar, F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350 (2004) 2335-2342

Ingaleswar, P. S., Pandit, S., Desai, D., Redder, C. P., Shetty, A. S., Mithun, K. M. Immunohistochemical analysis of angiogenesis by CD34 and mast cells by toluidine blue in different grades of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol* 20 (2016) 467-473

Ireson, C. R., Alavijeh, M. S., Palmer, A. M., Fowler, E. R., Jones, H. J. The role of mouse tumour models in the discovery and development of anticancer drugs. *Br J Cancer* 121 (2019) 101-108

Jadhav, K. B., Gupta, N. Clinicopathological prognostic indicators of oral squamous cell carcinoma: need to understand and revise. *N Am J Med Sci* 5 (2013) 671-679

Janz, M., Harbeck, N., Dettmar, P., Berger, U., Schmidt, A., Jurchott, K., Schmitt, M., Royer, H. D. 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 (2002) 278-282

Johnson, D. B., Puzanov, I., Kelley, M. C. Talimogene laherparepvec (T-VEC) for the treatment of advanced melanoma. *Immunotherapy* 7 (2015) 611-619

Jurchott, K., Bergmann, S., Stein, U., Walther, W., Janz, M., Manni, I., Piaggio, G., Fietze, E., Dietel, M., Royer, H. D. YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression. *J Biol Chem* 278 (2003) 27988-27996

Kasper, H. U., Ebert, M., Malfertheiner, P., Roessner, A., Kirkpatrick, C. J., Wolf, H. K. Expression of thrombospondin-1 in pancreatic carcinoma: correlation with microvessel density. *Virchows Arch* 438 (2001) 116-120

Kelland, L. R. Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *Eur J Cancer* 40 (2004) 827-836

- Kimple, A. J., Welch, C. M., Zevallos, J. P., Patel, S. N. Oral cavity squamous cell carcinoma--an overview. *Oral Health Dent Manag* 13 (2014) 877-882
- Kohno, K., Izumi, H., Uchiumi, T., Ashizuka, M., Kuwano, M. The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bioessays* 25 (2003) 691-698
- Kolk, A., Jubitz, N., Mengele, K., Mantwill, K., Bissinger, O., Schmitt, M., Kremer, M., Holm, P. S. 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 (2011) 1864-1873
- Kono, H., Rock, K. L. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 8 (2008) 279-289
- Koske, I., Rossler, A., Pipperger, L., Petersson, M., Barnstorf, I., Kimpel, J., Tripp, C. H., Stoitzner, P., Banki, Z., von Laer, D. Oncolytic virotherapy enhances the efficacy of a cancer vaccine by modulating the tumor microenvironment. *Int J Cancer* 145 (2019) 1958-1969
- Kosnopfel, C., Sinnberg, T., Sauer, B., Busch, C., Niessner, H., Schmitt, A., Forchhammer, S., Grimmel, C., Mertens, P. R., Hailfinger, S., Dunn, S. E., Garbe, C., Schittek, B. YB-1 Expression and Phosphorylation Regulate Tumorigenicity and Invasiveness in Melanoma by Influencing EMT. *Mol Cancer Res* 16 (2018) 1149-1160
- Kosnopfel, C., Sinnberg, T., Schittek, B. Y-box binding protein 1--a prognostic marker and target in tumour therapy. *Eur J Cell Biol* 93 (2014) 61-70
- Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Thorpe, P. E., Brekken, R. A., Sivridis, E., Kakolyris, S., Georgoulas, V., Gatter, K. C., Harris, A. L. Vascular endothelial growth factor/KDR activated microvessel density versus CD31 standard microvessel density in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 60 (2000) 3088-3095
- Kovacs, A. F. Relevance of positive margins in case of adjuvant therapy of oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33 (2004) 447-453
- Kramer, S., Gelber, R. D., Snow, J. B., Marcial, V. A., Lowry, L. D., Davis, L. W., Chandler, R. Combined radiation therapy and surgery in the management of advanced head and neck cancer: final report of study 73-03 of the Radiation Therapy Oncology Group. *Head Neck Surg* 10 (1987) 19-30
- Lasham, A., Moloney, S., Hale, T., Homer, C., Zhang, Y. F., Murison, J. G., Braithwaite, A. W., Watson, J. The Y-box-binding protein, YB1, is a potential negative regulator of the p53 tumor suppressor. *J Biol Chem* 278 (2003) 35516-35523
- Lasham, A., Print, C. G., Woolley, A. G., Dunn, S. E., Braithwaite, A. W. YB-1: oncoprotein, prognostic marker and therapeutic target? *Biochem J* 449 (2013) 11-23
- Lefebvre, J. L., Coche-Dequeant, B., Buisset, E., Mirabel, X., Van, J. T., Prevost, B. Management of early oral cavity cancer. Experience of Centre Oscar Lambret. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 30B (1994) 216-220

- Lichtenegger, E., Koll, F., Haas, H., Mantwill, K., Janssen, K. P., Laschinger, M., Gschwend, J., Steiger, K., Black, P. C., Moskalev, I., Nawroth, R., Holm, P. S. The Oncolytic Adenovirus XVir-N-31 as a Novel Therapy in Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Hum Gene Ther* 30 (2019) 44-56
- Liu, R. Y., Zhou, L., Zhang, Y. L., Huang, B. J., Ke, M. L., Chen, J. M., Li, L. X., Fu, X., Wu, J. X., Huang, W. An oncolytic adenovirus enhances antiangiogenic and antitumoral effects of a replication-deficient adenovirus encoding endostatin by rescuing its selective replication in nasopharyngeal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 442 (2013) 171-176
- 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. 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 (2006) 7195-7202
- Markopoulos, A. K. Current aspects on oral squamous cell carcinoma. *Open Dent J* 6 (2012) 126-130
- McCusker, M. G., Orkoulas-Razis, D., Mehra, R. Potential of Pembrolizumab in Metastatic or Recurrent Head and Neck Cancer: Evidence to Date. *Onco Targets Ther* 13 (2020) 3047-3059
- McDowell, J. D. An overview of epidemiology and common risk factors for oral squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Clin North Am* 39 (2006) 277-294
- McDowell, S. A. C., Quail, D. F. Immunological Regulation of Vascular Inflammation During Cancer Metastasis. *Front Immunol* 10 (2019) 1984
- Neville, B. W., Day, T. A. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 52 (2002) 195-215
- Niemann, J., Woller, N., Brooks, J., Fleischmann-Mundt, B., Martin, N. T., Kloos, A., Knocke, S., Ernst, A. M., Manns, M. P., Kubicka, S., Wirth, T. C., Gerardy-Schahn, R., Kuhnel, F. Molecular retargeting of antibodies converts immune defense against oncolytic viruses into cancer immunotherapy. *Nat Commun* 10 (2019) 3236
- Nobis, C. P., Otto, S., Grigorieva, T., Alnaqbi, M., Troeltzsch, M., Schope, J., Wagenpfeil, S., Ehrenfeld, M., Wolff, K. D., Kesting, M. R. Elective neck dissection in unilateral carcinomas of the tongue: Unilateral versus bilateral approach. *J Craniomaxillofac Surg* 45 (2017) 579-584
- O'Keeffe, M. B., Devlin, A. H., Burns, A. J., Gardiner, T. A., Logan, I. D., Hirst, D. G., McKeown, S. R. Investigation of pericytes, hypoxia, and vascularity in bladder tumors: association with clinical outcomes. *Oncol Res* 17 (2008) 93-101
- Owosho, A. A., Tsai, C. J., Lee, R. S., Freymiller, H., Kadempour, A., Varthis, S., Sax, A. Z., Rosen, E. B., Yom, S. K., Randazzo, J., Drill, E., Riedel, E., Patel, S., Lee, N. Y., Huryn, J. M., Estilo, C. L. The prevalence and risk factors associated with



osteoradionecrosis of the jaw in oral and oropharyngeal cancer patients treated with intensity-modulated radiation therapy (IMRT): The Memorial Sloan Kettering Cancer Center experience. *Oral Oncol* 64 (2017) 44-51

Pianka, A., Knosel, T., Probst, F. A., Troeltzsch, M., Woodlock, T., Otto, S., Ehrenfeld, M., Troeltzsch, M. Vascular endothelial growth factor receptor isoforms: are they present in oral squamous cell carcinoma? *J Oral Maxillofac Surg* 73 (2015) 897-904

Pieterse, Z., Sinha, D., Kaur, P. Pericytes in Metastasis. *Adv Exp Med Biol* 1147 (2019) 125-135

Pralhad, T., Madhusudan, S., Rajendrakumar, K. Concept, mechanisms and therapeutics of angiogenesis in cancer and other diseases. *J Pharm Pharmacol* 55 (2003) 1045-1053

Ribeiro, A. L., Okamoto, O. K. Combined effects of pericytes in the tumor microenvironment. *Stem Cells Int* 2015 (2015) 868475

Richmond, A., Su, Y. Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. *Dis Model Mech* 1 (2008) 78-82

Rivera, F., Garcia-Castano, A., Vega, N., Vega-Villegas, M. E., Gutierrez-Sanz, L. Cetuximab in metastatic or recurrent head and neck cancer: the EXTREME trial. *Expert Rev Anticancer Ther* 9 (2009) 1421-1428

Robbins, K. T., Clayman, G., Levine, P. A., Medina, J., Sessions, R., Shaha, A., Som, P., Wolf, G. T., American, H., Neck, S., American Academy of, O.-H., Neck, S. Neck dissection classification update: revisions proposed by the American Head and Neck Society and the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 128 (2002) 751-758

Rodrigues, R. M., Bernardo, V. G., Da Silva, S. D., Camisasca, D. R., Faria, P. A. S., Dias, F. L., Pinto, L. F. R., Albano, R. M., Bergmann, A., Lourenco, S. Q. C. How pathological criteria can impact prognosis of tongue and floor of the mouth squamous cell carcinoma. *J Appl Oral Sci* 28 (2020) e20190198

Rudziak, P., Ellis, C. G., Kowalewska, P. M. Role and Molecular Mechanisms of Pericytes in Regulation of Leukocyte Diapedesis in Inflamed Tissues. *Mediators Inflamm* 2019 (2019) 4123605

Sanderson, M. J., Smith, I., Parker, I., Bootman, M. D. Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harb Protoc* 2014 (2014) pdb top071795

Schittek, B., Psenner, K., Sauer, B., Meier, F., Iftner, T., Garbe, C. The increased expression of Y box-binding protein 1 in melanoma stimulates proliferation and tumor invasion, antagonizes apoptosis and enhances chemoresistance. *Int J Cancer* 120 (2007) 2110-2118

Scully, C., Bagan, J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol* 45 (2009) 301-308

Scully, C., Bagan, J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis* 15 (2009) 388-399

Shah, J. P., Candela, F. C., Poddar, A. K. The patterns of cervical lymph node metastases from squamous carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 66 (1990) 109-113

Shilpa, P., Kaul, R., Bhat, S., Sultana, N., Pandeshwar, P. Oncolytic viruses in head and neck cancer: a new ray of hope in the management protocol. *Ann Med Health Sci Res* 4 (2014) S178-184

Shiota, M., Yokomizo, A., Itsumi, M., Uchiumi, T., Tada, Y., Song, Y., Kashiwagi, E., Masubuchi, D., Naito, S. Twist1 and Y-box-binding protein-1 promote malignant potential in bladder cancer cells. *BJU Int* 108 (2011) E142-149

Snow, G. B., Annyas, A. A., van Slooten, E. A., Bartelink, H., Hart, A. A. Prognostic factors of neck node metastasis. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 7 (1982) 185-192

Somasekharan, S. P., El-Naggar, A., Leprivier, G., Cheng, H., Hajee, S., Grunewald, T. G., Zhang, F., Ng, T., Delattre, O., Evdokimova, V., Wang, Y., Gleave, M., Sorensen, P. H. YB-1 regulates stress granule formation and tumor progression by translationally activating G3BP1. *J Cell Biol* 208 (2015) 913-929

Stark, K., Eckart, A., Haidari, S., Tirniceriu, A., Lorenz, M., von Bruhl, M. L., Gartner, F., Khandoga, A. G., Legate, K. R., Pless, R., Hepper, I., Lauber, K., Walzog, B., Massberg, S. Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and 'instruct' them with pattern-recognition and motility programs. *Nat Immunol* 14 (2013) 41-51

Steinbichler, T. B., Alshaimaa, A., Maria, M. V., Daniel, D., Herbert, R., Jozsef, D., Ira-Ida, S. Epithelial-mesenchymal crosstalk induces radioresistance in HNSCC cells. *Oncotarget* 9 (2018) 3641-3652

Sun, L., Funchain, P., Song, J. M., Rayman, P., Tannenbaum, C., Ko, J., McNamara, M., Marcela Diaz-Montero, C., Gastman, B. Talimogene Laherparepvec combined with anti-PD-1 based immunotherapy for unresectable stage III-IV melanoma: a case series. *J Immunother Cancer* 6 (2018) 36

Takasu, A., Masui, A., Hamada, M., Imai, T., Iwai, S., Yura, Y. Immunogenic cell death by oncolytic herpes simplex virus type 1 in squamous cell carcinoma cells. *Cancer Gene Ther* 23 (2016) 107-113

Tay, W. L., Yip, G. W., Tan, P. H., Matsumoto, K., Yeo, R., Ng, T. P., Kumar, S. D., Tsujimoto, M., Bay, B. H. Y-Box-binding protein-1 is a promising predictive marker of radioresistance and chemoradioresistance in nasopharyngeal cancer. *Mod Pathol* 22 (2009) 282-290

Teichert, M., Milde, L., Holm, A., Stanicek, L., Gengenbacher, N., Savant, S., Ruckdeschel, T., Hasanov, Z., Srivastava, K., Hu, J., Hertel, S., Bartol, A., Schlereth, K., Augustin, H. G. Pericyte-expressed Tie2 controls angiogenesis and vessel maturation. *Nat Commun* 8 (2017) 16106

- Tesniere, A., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Joza, N., Panaretakis, T., Kepp, O., Schlemmer, F., Zitvogel, L., Kroemer, G. Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm. *Curr Opin Immunol* 20 (2008) 504-511
- Thorne, S. H., Hermiston, T., Kim, D. Oncolytic virotherapy: approaches to tumor targeting and enhancing antitumor effects. *Semin Oncol* 32 (2005) 537-548
- Tollefson, A. E., Scaria, A., Hermiston, T. W., Ryerse, J. S., Wold, L. J., Wold, W. S. The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *J Virol* 70 (1996) 2296-2306
- Troeltzsch, M., Haidari, S., Boser, S., Troeltzsch, M., Probst, F. A., Ehrenfeld, M., Otto, S. What Factors Are Associated With Regional Recurrence After Operative Treatment of Oral Squamous Cell Carcinoma? *J Oral Maxillofac Surg* 76 (2018) 2650-2659
- Troeltzsch, M., Knosel, T., Eichinger, C., Probst, F., Troeltzsch, M., Woodlock, T., Mast, G., Ehrenfeld, M., Otto, S. Clinicopathologic features of oral squamous cell carcinoma: do they vary in different age groups? *J Oral Maxillofac Surg* 72 (2014) 1291-1300
- Troeltzsch, M., Knosel, T., Woodlock, T., Troeltzsch, M., Pianka, A., Probst, F. A., Mast, G., Ehrenfeld, M., Otto, S. Are There Clinical or Pathological Parameters of Maxillary Oral Squamous Cell Carcinoma With an Influence on the Occurrence of Neck Node Metastasis? An Appraisal of 92 Patients. *J Oral Maxillofac Surg* 74 (2016) 79-86
- Turner, S. L., Slevin, N. J., Gupta, N. K., Swindell, R. Radical external beam radiotherapy for 333 squamous carcinomas of the oral cavity--evaluation of late morbidity and a watch policy for the clinically negative neck. *Radiother Oncol* 41 (1996) 21-29
- Tynninen, O., Sjostrom, J., von Boguslawski, K., Bengtsson, N. O., Heikkila, R., Malmstrom, P., Ostenstad, B., Wist, E., Valvere, V., Saksela, E., Paavonen, T., Blomqvist, C. Tumour microvessel density as predictor of chemotherapy response in breast cancer patients. *Br J Cancer* 86 (2002) 1905-1908
- Ungerechts, G., Engeland, C. E., Buchholz, C. J., Eberle, J., Fechner, H., Geletneky, K., Holm, P. S., Kreppel, F., Kuhnel, F., Lang, K. S., Leber, M. F., Marchini, A., Moehler, M., Muhlebach, M. D., Rommelaere, J., Springfield, C., Lauer, U. M., Nettelbeck, D. M. Virotherapy Research in Germany: From Engineering to Translation. *Hum Gene Ther* 28 (2017) 800-819
- Uzzan, B., Nicolas, P., Cucherat, M., Perret, G. Y. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res* 64 (2004) 2941-2955
- Weidner, N. Measuring intratumoral microvessel density. *Methods Enzymol* 444 (2008) 305-323
- Wennier, S., Li, S., McFadden, G. Oncolytic virotherapy for pancreatic cancer. *Expert Rev Mol Med* 13 (2011) e18

Winkler, F., Kozin, S. V., Tong, R. T., Chae, S. S., Booth, M. F., Garkavtsev, I., Xu, L., Hicklin, D. J., Fukumura, D., di Tomaso, E., Munn, L. L., Jain, R. K. Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell* 6 (2004) 553-563

Wolff, K. D. Perforator flaps: the next step in the reconstructive ladder? *Br J Oral Maxillofac Surg* 53 (2015) 787-795

Wolff, K. D., Follmann, M., Nast, A. The diagnosis and treatment of oral cavity cancer. *Dtsch Arztebl Int* 109 (2012) 829-835

Wu, S., Yu, L., Wang, D., Zhou, L., Cheng, Z., Chai, D., Ma, L., Tao, Y. Aberrant expression of CD133 in non-small cell lung cancer and its relationship to vasculogenic mimicry. *BMC Cancer* 12 (2012) 535

Yonenaga, Y., Mori, A., Onodera, H., Yasuda, S., Oe, H., Fujimoto, A., Tachibana, T., Imamura, M. Absence of smooth muscle actin-positive pericyte coverage of tumor vessels correlates with hematogenous metastasis and prognosis of colorectal cancer patients. *Oncology* 69 (2005) 159-166

Yu, Y. N., Yip, G. W., Tan, P. H., Thike, A. A., Matsumoto, K., Tsujimoto, M., Bay, B. H. Y-box binding protein 1 is up-regulated in proliferative breast cancer and its inhibition deregulates the cell cycle. *Int J Oncol* 37 (2010) 483-492

Zheng, M., Huang, J., Tong, A., Yang, H. Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Barriers and Recent Advances. *Mol Ther Oncolytics* 15 (2019) 234-247

Zhu, B., Zhou, L., Yu, L., Wu, S., Song, W., Gong, X., Wang, D. Evaluation of the correlation of vasculogenic mimicry, ALDH1, KAI1 and microvessel density in the prediction of metastasis and prognosis in colorectal carcinoma. *BMC Surg* 17 (2017) 47

## 12 Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Univ. Prof. Dr. Dr. Andreas Kolk dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat diese Arbeit durchzuführen.

Außerdem möchte ich mich für die Hilfestellungen, die Motivation sowie das Engagement beim Erstellen dieser Arbeit bedanken

Ebenfalls möchte ich mich bei Univ. Prof. Dr. Dr. K. D. Wolff bedanken, dass ich in seiner Klinik diese Doktorarbeit durchführen konnte.

Herzlichst möchte ich mich bei meinem Kollegen und guten Freund Marko Boskov bedanken, mit dem ich zusammen die Finanzierung für dieses Projekt beantragt habe.

Mein Dank gilt ebenfalls PD. Dr. P.S. Holm für die Bereitstellung des Virus XVir-N-31 und seine Empfehlungen zur Durchführung dieses Projekts.

Ich möchte meiner Familie, speziell meinen Eltern danken, die mir das Zweitstudium und die Promotion ermöglicht haben und mich stets gefördert und unterstützt haben. Auch bei meiner Frau Julia möchte ich mich bedanken, die mich immer wieder motiviert und unterstützt hat.