

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Radiologie

Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny)

**Das Vesikuläre Stomatitis Virus in der onkolytischen
Virotherapie des pankreatischen duktaalen Adenokarzinoms**

Stefan Lemperle

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. O. Ebert

2. Univ.-Prof. Dr. J. H. Kleeff

Die Dissertation wurde am 05.03.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 30.01.2013 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Das Pankreaskarzinom	1
1.2 Innovative Therapien und onkolytische Virotherapie	6
1.3 Das Vesikuläre Stomatitis Virus	9
1.4 Das Vesikuläre Stomatitis Virus in der onkolytischen Virotherapie	12
1.5 Tumormodelle des duktales Pankreaskarzinoms.....	18
1.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Technische Ausrüstung und Geräte	21
2.1.2 Chemikalien, Reagenzien, Lösungen	23
2.1.3 Reaktionssysteme und molekularbiologische Kits	24
2.1.4 Vektoren	24
2.1.5 Zelllinien	25
2.1.6 Zellkulturreagenzien	27
2.1.7 Viren	28
2.1.8 Versuchstiere	28
2.1.9 Software	29
2.2 Zellbiologische Methoden	29

2.2.1 Medien	29
2.2.2 Zellkultivierung und Passagierung	29
2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien	30
2.2.4 Transfektion von Zellen	30
2.2.5 Luciferase-Reporter-Gen-Assay	31
2.3 Virologische Methoden	32
2.3.1 Herstellung eines VSV-Stocks und Virusamplifikation.....	32
2.3.2 Virusaufreinigung	32
2.3.3 Virale Titerbestimmung mit TCID ₅₀ und Plaqueassay	33
2.3.4 VSV-Replikationskinetik	35
2.3.5 Interferon protection Assay	36
2.4 Molekularbiologische Methoden	37
2.4.1 Transformation von kompetenten Bakterien	37
2.4.2 Plasmidamplifikation und Reinigung	37
2.4.3 Messen von Nukleinsäure-Konzentrationen	38
2.4.4 Generierung der Microarray-Daten	38
2.5 Tierversuche	38
2.5.1 Tumorzellimplantation	38
2.5.2 Magnetresonanztomographie	40
2.5.3 VSV-Behandlung	41
2.5.4 VSV-Titerbestimmung aus homogenisierten Tumoren	41
2.6 Histologie und Färbungen	42
2.6.1 Präparation von Tumorgewebe	42
2.6.2 HE-Färbung von Gefrierschnitten	42

2.6.3 β -Galaktosidasefärbung an CK 9801 Zellen	43
2.6.4 β -Galaktosidasefärbung von Gefrierschnitten	43
2.6.5 Kristallviolett färbung	44
3 Ergebnisse	45
3.1 Replikationskinetik von VSV	45
3.2 Interferon Protection Assay	49
3.2.1 Humane Zelllinien	50
3.2.2 Murine CK-Zelllinien	51
3.2.3 Murine CKN2-Zelllinien	52
3.2.4 Vergleich von CK-, CKN2- und humanen Zelllinien	53
3.3 Microarray-Datenvergleich	54
3.4 Luciferase-Reporter-Gen-Assay	55
3.5 ISRE-Promotoraktivierung durch VSV-M51R und Typ 1 Interferon	58
3.6 In vivo-Versuche	60
3.6.1 Intratumorale Virusreplikation in orthotop-implantierten Tumoren	60
3.6.2 Intratumorale Virusreplikation in endogenen CKP-Mäusen	61
3.6.3 Histologie und Färbungen	63
3.6.3.1 β -Galaktosidasefärbung an CK 9801 Zellen	63
3.6.3.2 HE-Färbungen von Tumorpräparaten	63
3.6.3.3 β -Galaktosidasefärbung von Tumorpräparaten	65
4 Diskussion	67
4.1 VSV-Replikationskinetik in pankreatischen Tumorzellen	68
4.2 Interferonsensibilität der pankreatischen Tumorzelllinien	71
4.3 Der Interferonsignalweg in pankreatischen Tumorzellen	77

4.4 ISRE-Promotoraktivierung durch VSV-M51R und exogenes Interferon	80
4.5 In vivo-Ergebnisse	81
4.6 Schlussfolgerung und Ausblick	86
5 Zusammenfassung	90
6 Literaturverzeichnis	92
7 Abbildungsverzeichnis	112
8 Anhang	113
9 Danksagung	116

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection
AV1	attenuated virus 1
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BRCA2	breast cancer 2
CA 19-9	Carbohydrat-Antigen 19-9
ca.	circa (Latein; ungefähr)
CDKN2A	Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitor 2A
CK-Maus	Ptf1a ^{+Cre} ; K-RAS ^{+LSL-G12D} -Maus
CKN2-Maus	Ptf1a ^{+Cre} ; K-RAS ^{+LSL-G12D} ; N2ko-Maus
CKP-Maus	Ptf1a ^{+Cre} ; K-RAS ^{+LSL-G12D} ; p53 ^{fl/fl} -Maus
CMV	Cytomegalievirus
CO2	Kohlenstoffdioxid
CPE	zytopathologischer Effekt
D	Deutschland
DCP4	deleted in pancreatic carcinoma
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige RNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERCP	Endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
et al.	et alia (Latein; und andere)
FCS	fötales Kälberserum
g	Gram
GFP	grünes Fluoreszenzprotein
h	Stunde(n)

Her-2/neu	human epidermal growth factor receptor 2
IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
IFN	Interferon
IFNAR	interferon- α/β receptor
in vitro	Latein; im Glas; außerhalb eines lebenden Organismus
in vivo	Latein; im Lebendigen
IPMN	intraduktale papillöse muzinöse Neoplasie
IRF	interferon regulatory factor
ISG	interferon stimulated gene
ISGF3	interferon-stimulated gene factor 3
ISRE	interferon-stimulated response element
IU	international unit
JAK	Janus-Kinase
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
K-RAS (V-Ki-ras2)	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
l	Liter
lacZ	β -Galaktosidase Gen
log	Logarithmus
luc	Luciferase
m	Milli
M	Molar
MCN	muzinös zystische Neoplasie
MDA-5	melanoma-differentiation-associated gene 5
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MOI	multiplicity of infection
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
mRNA	Messenger RNA
MTD	maximale tolerable Dosis

Mx	Myxovirus resistance protein
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NFkB	nuclear factor kappa B
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Notch2	neurogenic locus notch homolog protein 2
PanIN	pancreatic intraepithelial neoplasia
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma (duktales Adenokarzinom des Pankreas)
PFA	Paraformaldehyd
pfu	plaquebildende Einheiten
PKR	dsRNA dependent protein kinase
Poly I:C	polyriboinosinic-polyribocytidilic acid
Ptf1a	Pancreas specific transcription factor 1a
RIG-I	retinoic-acid-inducible gene-I
RL	Renilla-Luciferase
RLU	raw light unit
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SMAD4	Sma- and Mad- related protein
STAT	signal transducers and activators of transcription
TCID ₅₀	50% tissue culture infective dose
TGF-β	transforming growth factor β
TLR	Toll-like Rezeptor
TUM	Technische Universität München
U	units
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
VSV	Vesikuläre Stomatitis Virus/Viren

1 Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist ein hochmaligner epithelialer Tumor und zählt derzeit zu den fünf häufigsten Ursachen von krebsbedingten Todesfällen in der westlichen Welt. Jedes Jahr erkranken in den USA über 43000 Patienten und annähernd alle von ihnen werden an dieser Erkrankung sterben (Jemal, Siegel et al. 2010). Epidemiologische Daten zeigen 5-Jahres-Überlebsraten für das Gesamtkollektiv der erkrankten Patienten von unter 5 % und ein Langzeitüberleben ist ausgesprochen selten (Bohmig and Rosewicz 2004; Freelove and Walling 2006). Das Pankreaskarzinom tritt selten vor dem 45 Lebensjahr auf, jedoch steigt die Inzidenz danach stark an. Das mediane Alter bei Diagnosestellung liegt zwischen 65 und 70 Jahren (Michaud 2004). Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen, sowie Farbige im Vergleich zu Nicht-Farbigen (Shaib, Davila et al. 2006). Einer der am besten evaluierten Risikofaktoren ist das Zigarettenrauchen und ist nach gegenwärtigen Schätzungen für bis zu 20 % der Erkrankungen verantwortlich (Iodice, Gandini et al. 2008; Lynch, Vrieling et al. 2009). Als weitgehend gesicherte Risikofaktoren gelten unter anderem auch die erbliche Pankreatitis, eine hereditäre Disposition sowie Diabetes mellitus und Übergewicht (Lowenfels, Maisonneuve et al. 1993; Klein, Hruban et al. 2001; Huxley, Ansary-Moghaddam et al. 2005; Stolzenberg-Solomon, Adams et al. 2008). Man geht davon aus, dass etwa 10 % der Pankreaskarzinome im Zusammenhang mit einer genetischen Prädisposition auftreten (Tersmette, Petersen et al. 2001). Bestimmte genetische Syndrome wie beispielweise das Lynch-Syndrom, das Peutz-Jeghers-Syndrom, die Ataxia teleangiectatica und bestimmte Formen des familiären Brustkrebs sind ebenfalls mit einer erhöhten Inzidenz assoziiert (Hruban, Petersen et al. 1998).

Die schlechte Prognose des Pankreaskarzinoms ist bedingt durch die späte Manifestation der Erkrankung, das Fehlen von Frühsymptomen, das aggressive Wachstums- und Metastasierungsverhalten sowie eine erhebliche Resistenz gegenüber chemo- und radiotherapeutischer Behandlung. Zu den möglichen klinischen Symptomen zählen unter anderem Gewichtsverlust, Inappetenz, Leistungsabfall, Übelkeit, in den Rücken ausstrahlende Schmerzen im Oberbauch sowie Ikterus, Pruritus oder Steatorrhoe (Kaiser, Barkin et al. 1985; Bakkevold, Arnesjo et al. 1992). Diese Symptome treten jedoch meist erst spät in einem

fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung auf und können je nach Lokalisation des Tumors variieren. Tumore im Bereich des Pankreaskopfes manifestieren sich häufiger mit Ikterus und Steatorrhoe; hingegen sind Tumore im Korpus und Pankreasschwanz häufiger von einer ausgeprägten Schmerzsymptomatik begleitet. Auch ein neu aufgetretener Diabetes mellitus, eine erhöhte Thromboseneigung und akute Pankreatitiden werden in einigen Fällen beobachtet (Khorana and Fine 2004). Die Diagnose des Pankreaskarzinoms wird in der Regel radiologisch beziehungsweise histologisch gestellt. In der Klinik werden unterschiedliche bildgebende Verfahren zur Diagnosestellung herangezogen. Unter anderem kommen heutzutage standardmäßig neben der Anamnese und der körperlichen Untersuchung die transabdominelle und endoskopische Sonographie, die Computertomographie sowie die Endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) oder die Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie (MRCP) zum Einsatz. Die Labordiagnostik trägt insgesamt nur geringfügig zur Diagnosefindung bei. Erhöhungen der Cholestaseparameter wie der alkalischen Phosphatase, der Gamma-GT und des direkten Bilirubins sind zwar bei bis zu 80 % der Patienten zu beobachten, sind aber relativ unspezifisch. Aussagekräftiger für die Diagnostik und Verlaufsbeurteilung ist hingegen der Tumormarker CA 19-9 (Carbohydrat-Antigen 19-9). Allerdings sind erhöhte Werte nicht zwingend pathognomonisch für das Vorliegen eines Pankreaskarzinoms. Auch bei anderen malignen und benignen gastrointestinalen Erkrankungen kann die Serumkonzentration erhöht sein. Hierzu zählen beispielsweise akute und chronische Pankreatitiden und verschiedene Erkrankungen der Gallenwege und der Leber. Die Verwendung des Tumormarkers CA 19-9 als Screeningverfahren für das Pankreaskarzinom scheint daher nicht sinnvoll zu sein (Locker, Hamilton et al. 2006).

Bis heute stellt die chirurgische Resektion die einzige potentiell kurative Therapie des Pankreaskarzinoms dar. Leider sind aufgrund der späten Manifestation und des fortgeschrittenen Tumorstadiums nur etwa 15-20 % der Betroffenen für eine Operation geeignet. Das operative Standardverfahren von Tumoren des Pankreaskopfes stellt die Duodenopankreatektomie nach Kausch-Whipple dar. Sie beinhaltet die Entfernung des Pankreaskopfes, des Duodenums, der Gallenblase inklusive Ductus hepaticocholedochus und eine partielle Magenresektion mit regionaler Lymphadenektomie. Diese Operationsmethode wird heutzutage zunehmend in leicht modifizierter Form als partielle pyloruserhaltende Variante durchgeführt. Bei Tumoren im Korpus- und Schwanzbereich des Pankreas wird meist

eine distale subtotale Pankreatektomie, in der Regel zusammen mit einer Milzresektion angewandt. Die Prognose ist jedoch auch bei potentiell heilbarer Erkrankung nach wie vor sehr schlecht. Gründe hierfür sind unter anderem die hohen lokalen Rezidivraten sowie okkulte und Mikrometastasierungen (Nakao, Fujii et al. 2006). Analysen von verschiedene Studien zeigten durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensraten von 10-25 % und eine mittlere Überlebenszeit von 10-20 Monaten nach Duodenopankreatektomie (Yeo, Cameron et al. 1997; Benassai, Mastrorilli et al. 2000; Bilimoria, Bentrem et al. 2007). Nach erfolgter Resektion erhalten die Patienten häufig zusätzlich eine adjuvante Chemotherapie beziehungsweise Radiochemotherapie, da sich in einigen Studien ein gewisser Überlebensvorteil nachweisen ließ (Oettle, Post et al. 2007; Van Laethem, Hammel et al. 2010). Jedoch existiert hierzu derzeit noch kein einheitliches Regime und die verschiedenen Therapiemodalitäten werden kontrovers diskutiert (Newman, Simeone et al. 2006). Bei inoperablen Tumoren und palliativer Situation findet heutzutage meist eine Chemotherapie statt. Es finden sich verschiedene Zytostatika und zahlreiche Kombinationen im Einsatz beziehungsweise präklinisch und klinisch in Erprobung. Als eine der Standardtherapien gilt aktuell die Gemcitabine-Monotherapie bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom. Obwohl das Überleben nur moderat verlängert wird, können vor allem auch tumorbezogene Symptome deutlich besser kontrolliert werden und die Lebensqualität signifikant verbessert werden (Burriss, Moore et al. 1997). Neben der chemotherapeutischen Behandlung ist bei palliativer Situation natürlich auch eine adäquate supportive Therapie von großer Bedeutung. Hierzu gehören beispielweise die Behandlung von biliären Obstruktionen, Passagestörungen im Magen-Darm-Trakt, eine ausreichende Schmerztherapie und die Enzym- oder Insulinsubstitution bei exokriner beziehungsweise endokriner Pankreasinsuffizienz. Für die Zukunft ist auch der Einsatz eines neoadjuvanten Behandlungskonzeptes denkbar, mit einer Vorbehandlung durch Chemotherapie und Strahlentherapie gefolgt von einer operativen Tumorresektion.

Histologisch kann man viele unterschiedliche Arten des Pankreaskarzinoms unterscheiden. Man unterscheidet grundsätzlich Karzinome des endokrinen und des exokrinen Pankreas, wobei das Karzinom des exokrinen Pankreas mit einem Anteil von über 95 % den weitaus größten Teil darstellt (Klimstra 2007). Das Adenokarzinom kann man weiter in eine azinäre und ein duktales Form differenzieren. Das pankreatische duktales Adenokarzinom (PDAC) stellt mit über 85 % den weitaus

größten Teil aller exokrinen Karzinome dar (Warshaw and Fernandez-del Castillo 1992; Li, Xie et al. 2004). Diese Arbeit beschränkt sich aus diesem Grund auf das duktales Adenokarzinom des Pankreas und alle durchgeführten Versuche wurden daher mit duktalem Tumorzelllinien durchgeführt. Die Tumorzellen des PDAC zeigen ein aggressives invasives Wachstumsverhalten und teilen wichtige Charakteristika mit Pankreasgangzellen. Daher wurde lange spekuliert differenzierte duktales Zellen seien der Ursprung des PDAC. Aus welchen Zellen das PDAC jedoch wirklich entsteht ist noch nicht vollständig geklärt und wird momentan intensiv erforscht. Es gibt Anhaltspunkte, dass azinäre oder undifferenzierte Stammzellen möglicherweise an der Karzinomentstehung ursächlich beteiligt sind (Maitra and Hruban 2008; Kong, Michalski et al. 2011).

In den letzten Jahren wurde auf Grund von morphologischen Beobachtungen und genetischen Analysen ein Tumorprogressionsmodell für das Pankreaskarzinom entwickelt (Hruban, Goggins et al. 2000). Dieses Modell ist vergleichbar mit der Adenom-Karzinom-Sequenz des Kolonkarzinoms und schlägt bestimmte Vorläuferläsionen als Ausgangspunkt des infiltrativ wachsenden Adenokarzinoms vor. Die am besten untersuchte und häufigste Vorläuferläsion ist die pankreatische intraepitheliale Neoplasie (pancreatic intraepithelial neoplasia, PanIN). Zusätzlich werden in der Literatur auch noch Muzin produzierende Vorläuferläsionen, sogenannte muzinös zystische Neoplasien (MCN) und intraduktales papillöses muzinöses Neoplasien (IPMN), beschrieben (Hezel, Kimmelman et al. 2006). Bereits in den verschiedenen PanIN-Läsionen finden sich genetische Veränderungen, die für das invasive Pankreaskarzinom charakteristisch sind (Hruban, Offerhaus et al. 1998). Die PanIN entsteht meist in kleineren intralobulären Pankreasgängen und ist eine intraduktales nichtinvasive Läsion, die durch Metaplasie und Proliferation aus dem duktalem Epithel hervorgeht (Hruban, Takaori et al. 2004). PanIN-Läsionen werden aufgrund von Dysplasiegrad und zytologischen Kriterien in drei Klassen unterteilt. Man geht davon aus, dass die verschiedenen Stadien der PanIN-1 bis PanIN-3 im Zuge der Karzinomentstehung schrittweise durchlaufen werden und sich im Verlauf immer mehr genetische und morphologische Alternationen anreichern. Das gesunde Pankreasgangepithel verliert während dieser Progression seine charakteristische kuboide Form und Zellpolarität. Zusätzlich kommt es zur vermehrten Akkumulation von Muzin. PanIN-1A-Läsionen weisen eine geringe Zellkörperverlängerung auf, PanIN-1B-Läsionen erscheinen bereits papillös, PanIN-2 haben zusätzlich zelluläre Atypien und PanIN-3-Läsion entsprechen den

histopathologischen Kriterien eines Carcinoma in situ (Hruban, Adsay et al. 2001). Die Häufigkeit der PanINs nimmt im Alter zu. Annähernd die Hälfte aller über 50-Jährigen haben niedriggradige PanIN-Läsionen (PanIN-1A, PanIN-1B) im gesunden intakten Pankreasgewebe (Andea, Sarkar et al. 2003).

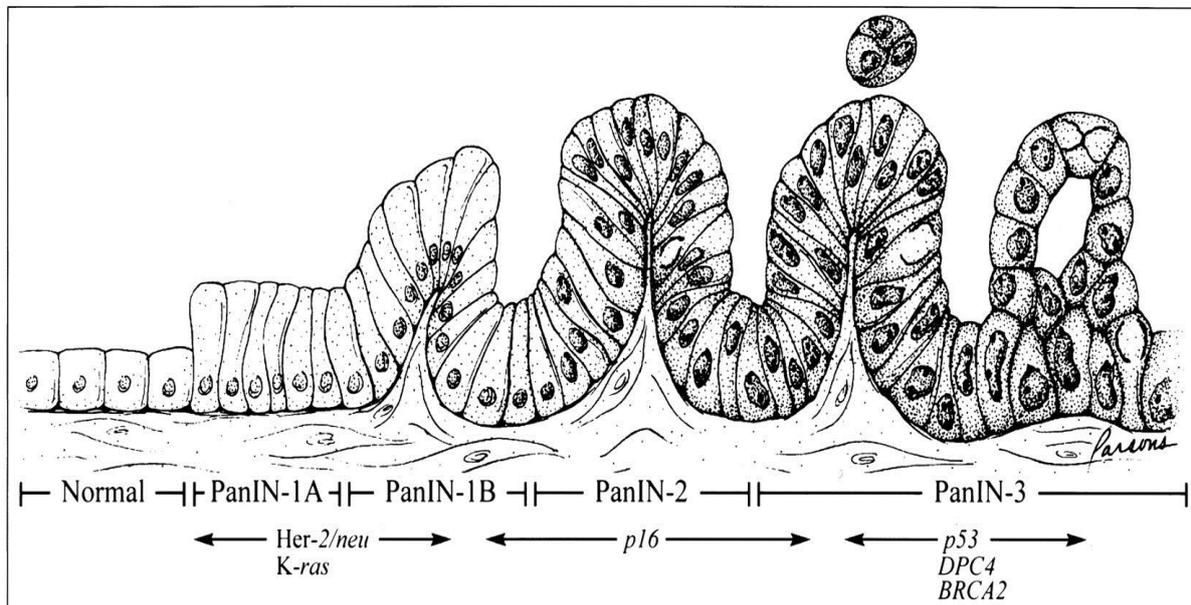


Abb. 1.1 Tumorprogressionsmodell des duktales Pankreaskarzinoms aus (Hruban, Goggins et al. 2000).

Bereits in PanIN-1-Läsionen findet man Mutationen von K-RAS und eine Überexpression von Her-2/neu (human epidermal growth factor receptor 2). Das Onkogen K-RAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) ist eines der häufigsten mutierten Gene und ist in über 90 % der Karzinome zu finden (Jones, Zhang et al. 2008). Aufgrund des häufigen und sehr frühen Auftretens im Zuge der Tumorgenese wird der Mutation von K-RAS eine entscheidende Rolle in der Karzinomentstehung zugeschrieben. K-RAS-Mutationen finden sich meist im Codon 12 auf dem Chromosom 12p und führen zu einer konsekutiven Überexpression des RAS-Proteins (Hruban, van Mansfeld et al. 1993). Das plasmamembrangebundene K-RAS-Protein gehört zur Familie der GTP-bindenden Proteine und hat eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellproliferation und Zellüberleben sowie der Zellmigration (Almoguera, Shibata et al. 1988). Eine weitere häufige Mutation ist die somatische Inaktivierung des Tumorsuppressorgenprodukts $p16^{\text{INK4A}}$ (Caldas, Hahn et al. 1994; Schutte, Hruban et al. 1997). $p16^{\text{INK4A}}$ und $p14^{\text{ARF}}$ sind funktionelle Genprodukte des Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitor 2A (CDKN2A)-Genlokus auf

Chromosom 9p21. CDKN2A-Mutationen finden sich in den nachfolgenden PanIN-2 Läsionen und spielen eine wichtige Rolle im Verlust der Zellzykluskontrolle und der Steuerung der DNA-Replikation (Hahn and Schmiegel 1998). Später im Verlauf der Karzinogenese treten auch noch Mutationen in weiteren Tumorsuppressorgenen wie p53, SMAD4 und BRCA-2 auf. Das p53-Gen repräsentiert eines der am häufigsten veränderten Gene bei Krebserkrankungen des Menschen und Mutationen finden sich in 75-85 % der Pankreaskarzinome (Redston, Caldas et al. 1994). p53 ist funktionell ein Transkriptionsfaktor, der beim Vorliegen von DNA-Schäden aktiviert wird und das Genom vor der Anhäufung genetischer Mutationen schützt. Er spielt eine entscheidende Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus sowie in der Induktion von Apoptose (Moore, Sipos et al. 2001). SMAD4 (Sma- and Mad- related protein, früher DCP4, deleted in pancreatic carcinoma) ist ein weiteres wichtiges Tumorsuppressorgen. Es liegt auf Chromosom 18q21 und ist in etwa 60 % der Pankreaskarzinome inaktiviert (Hahn, Schutte et al. 1996; Jones, Zhang et al. 2008). SMAD4 spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Transforming-growth-factor- β (TGF- β)-Signalwegs und Mutationen scheinen relativ spezifisch für das Pankreaskarzinom zu sein. TGF- β gehört wie TGF- α zu der Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren, die im PDAC häufig überexprimiert sind und wahrscheinlich eine signifikante Rolle im Wachstum und der Entartung von Pankreaskarzinomen spielen (Yamanaka, Friess et al. 1993). Pankreaskarzinome mit einem Verlust der SMAD4-Expression sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert und bilden häufiger Fernmetastasen (Tascilar, Skinner et al. 2001). Ein Verlust des BRCA-2-Gens (breast cancer 2) ist in weniger als 10 % der Pankreaskarzinome zu finden (Goggins, Schutte et al. 1996). Das BRCA-2-Gen spielt eine essentielle Rolle in der Reparatur von DNA-Crosslinks (van der Heijden, Brody et al. 2005). Ebenso wie p53- und SMAD4-Mutationen stellt es ein eher spätes Ereignis in der Karzinomentstehung dar und findet sich in höhergradigen dysplastischen Läsionen wie der PanIN-3. Keimbahnmutationen von BRCA-2 sind die Ursache von hereditären Brust- und Ovarialkarzinomen und sind auch mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung des Pankreaskarzinoms assoziiert (Lal, Liu et al. 2000).

1.2 Innovative Therapien und onkolytische Virotherapie

Aufgrund der weitgehenden Resistenz gegenüber chemo- und radiotherapeutischen Therapieverfahren und der verheerenden Prognose des Pankreaskarzinoms ist man stets auf der Suche nach neuen Behandlungsansätzen. Neben verschiedensten Chemotherapeutika finden sich derzeit auch einige molekularbiologische und gentherapeutische Ansätze, die gezielt an den molekularen Veränderungen der malignen Zellen angreifen sollen, im Einsatz. Es gibt aktuelle Studien zu Impfungen und Farnesyltransferase-Inhibitoren, die das überaktive RAS-Protein in den Tumorzellen gezielt ausschalten sollen (Kubuschok, Schmits et al. 2002; Van Cutsem, van de Velde et al. 2004). Eine weitere, derzeit in klinischer Erprobung befindliche Strategie ist gegen den EGF-Rezeptor (Epidermal growth factor), der häufig auf pankreatischen Tumorzellen überexprimiert wird, gerichtet. Hier kamen der monoklonale Antikörper Cetuximab sowie der Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib in verschiedenen klinischen Studien zum Einsatz (Xiong, Rosenberg et al. 2004). Der Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib zeigte in einer Phase-III-Studie in Kombination mit Gemcitabine einen leichten Überlebensvorteil (Moore, Goldstein et al. 2007). Auch antiangiogenetische Ansätze mit dem monoklonalen Antikörper Bevacizumab, der gegen VEGF (Vascular Derived Groth Factor) gerichtet ist, wurden bereits am Patientenkollektiv getestet, allerdings nur mit mäßigem Erfolg (Kindler, Friberg et al. 2005). Verschiedene hormonelle Behandlungen mit dem selektiven Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen oder dem synthetischen Somatostatin-Analogen Octreotid überzeugten leider in verschiedenen Studien ebenfalls nicht (Huguier, Samama et al. 1992; Taylor, Benson et al. 1993).

In den letzten Jahren sind außerdem einige neue Ansätze mit sogenannten onkolytischen Viren zur Therapie des duktales Adenokarzinoms aufgekommen. Die onkolytische Krebstherapie ist definiert als eine tumorspezifische Replikation und Zellyse von infizierten malignen Zellen mittels eines viralen Agens. Die onkolytische Virotherapie entwickelte sich als innovative alternative Therapieform in den 90er Jahren parallel zu bereits bestehenden Standardtherapien und Gentherapien. Die ersten Hinweise über virale onkolytische Aktivität wurden jedoch bereits Anfang des letzten Jahrhunderts dokumentiert. Im Rahmen einer Influenzainfektion bei einer an myeloischen Leukämie erkrankten Patientin wurde eine signifikante Remission der hämatologischen Erkrankung beobachtet (Dock 1904). Einige Jahre später, im Jahre 1912, berichtete N.G. De Pace von einer Patientin mit großem Cervixkarzinom, die nach einer Tollwutimpfung eine über acht Jahre anhaltende Regression des Tumors

erfuhr (De Pace 1912). Seit diesen ersten Fällen wurde immer wieder über die Koinzidenz von unterschiedlichen viralen Infektionen und Remissionen von malignen hämatologischen und lymphatischen Erkrankungen berichtet.

In der konventionellen Gentherapie kamen bisher hauptsächlich replikationsdefiziente Vektoren zum Einsatz, die bestimmte Transgene in Tumorzellen exprimierten und so durch Stimulation der Immunantwort oder durch sensibilisierende Eigenschaften für andere Therapieformen einen Anti-Tumor-Effekt erzielten. Jedoch war der Therapieerfolg dieser Strategie vor allem durch die relativ geringe Gentransferrate *in vivo* limitiert (Vile, Ando et al. 2002). In der onkolytischen Virotherapie werden hingegen spezielle replikationskompetente Viren eingesetzt, die einen starken zytolytischen Effekt haben, der streng auf Tumorzellen begrenzt ist und dadurch die unerwünschten Nebenwirkungen auf gesundes Gewebe minimiert (Cervantes-Garcia, Ortiz-Lopez et al. 2008). Onkolytische Viren können die infizierten Tumorzellen zum einen direkt über virusinduzierte zytopathologische Effekte zerstören. Zum anderen kann aber auch indirekt durch Stimulation einer Immunreaktion die Anti-Tumor-Immunität verbessert werden und dadurch auch uninfizierte benachbarte Tumorzellen vernichtet werden. Zusätzlich können onkolytische Viren heutzutage durch genetische Modifikationen verschiedenste therapeutisch wertvolle Gene exprimieren und auf diese Weise kann das onkolytische Potential und die Tumorspezifität der Viren noch weiter verbessert werden. Die Onkospezifität ist bei einigen Wildtyp-Viren von Natur aus vorhanden, so zum Beispiel bei einigen Paroviren, Paramyxoviren, Rhabdoviren oder Reoviren. Allerdings können auch Viren ohne diese intrinsische Onkospezifität durch herbeigeführte gentechnische Manipulationen gezielt gegen Tumorzellen eingesetzt werden. Zu dieser Gruppe zählen derzeit insbesondere Viren der Herpes- und Adenoviridae Familie. Viele onkolytische Viren replizieren selektiv in Tumorzellen, da sie zelluläre tumorspezifische Alternationen, wie Interferon bezogene Abwehrmechanismen und konstitutiv aktive Signaltransduktionskaskaden, ausnutzen (Parato, Senger et al. 2005). Die durch eine virale Infektion induzierten zellulären Veränderungen sind häufig auffallend ähnlich zu den zellulären Variationen, die im Prozess der Karzinogenese entstehen. Dazu gehört beispielsweise die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53 und die Verhinderung von Apoptose. In Anbetracht dieser genetischen Veränderungen ist es nicht verwunderlich, dass viele Viren von Natur aus bevorzugt in Tumorzellen replizieren und dass durch gezielte genetische Manipulation eine Tumorselektivität erreicht werden kann. Es gibt heutzutage

verschiedene gentechnische Ansätze eine tumorspezifische Replikation zu erreichen. Zum Beispiel durch Deletionen von funktionalen Genregionen oder sogar ganzen Genen, die notwendig für eine effiziente Replikation in normalen Zellen aber entbehrlich in Tumorzellen sind (Bischoff, Kirn et al. 1996; Heise, Hermiston et al. 2000). Auch das Einfügen von tumor- oder gewebespezifischen Promotoren in das Virusgenom oder die Modifikation der viralen Oberflächenstruktur um eine selektive Aufnahme in die malignen Zellen zu erreichen, sind Möglichkeiten die Tumorselektivität zu erhöhen (Miyatake, Iyer et al. 1997; Curiel 2000).

Das Prinzip der onkolytischen Virotherapie bietet einige Vorteile gegenüber der konventionellen Antitumorthherapie (Parato, Senger et al. 2005). Viren können durch rekombinante DNA-Technologie relativ einfach modifiziert werden, was die rationale Herstellung von neuartigen „Designer-Viren“ ermöglicht. Das Hinzufügen von Genen, die toxisch auf Tumorzellen wirken oder immunstimulierende Eigenschaften besitzen, sowie die natürliche Neigung des Virus eine tumorspezifische Entzündung auszulösen, machen onkolytische Viren zu einer multimodalen Therapieoption. Durch die Fähigkeit der selbstständigen Replikation in Tumorzellen besitzen die onkolytischen Viren einzigartige pharmakokinetische Eigenschaften, die sich deutlich von denen herkömmlicher Chemotherapeutika unterscheiden, bei einem verhältnismäßig nebenwirkungsarmen Wirkungsprofil.

Vor allem verschiedene gentechnisch modifizierte Adenoviren, aber auch Herpes simplex und Reoviren wurden sowohl in vitro als auch an zahlreichen Tiermodellen des duktales Adenokarzinoms des Pankreas getestet und lieferten teilweise erfolgsversprechende Ergebnisse (Himeno, Etoh et al. 2005; Sarinella, Calistri et al. 2006; He, Su et al. 2009). In den letzten Jahren fanden auch vermehrt klinische Phase-I- und Phase-II-Studien statt. Verwendet wurden zum Beispiel das mutierte Herpes-Simplex-Virus HF10 oder das Adenovirus ONYX-015 an Patienten mit inoperablen Pankreastumoren (Hecht, Bedford et al. 2003; Nakao, Kasuya et al. 2011). In dieser Arbeit sollte nun erörtert werden inwiefern das Vesikuläre Stomatitis Virus (VSV), ein weiterer Vertreter in der Gruppe der onkolytischen Viren, für die Therapie des duktales Adenokarzinoms geeignet ist.

1.3 Das Vesikuläre Stomatitis Virus

Das Vesikuläre Stomatitis Virus ist ein behülltes Einzel(-)-Strang-RNA-Virus und gehört zu der Familie der Rhabdoviridae (Barber 2005). Das VSV weist ein sehr

breites Wirtsspektrum auf und kommt hauptsächlich bei Nagetieren und bei landwirtschaftlichen Nutztieren, wie Rindern, Schweinen und Pferden vor. Akute VSV-Infektionen bei diesen Tieren verursachen typischerweise vesikuläre Blasen und Ulzerationen an Mund, Eutern und Hufen, die einer milden Verlaufsform der Maul- und Klauenseuche ähneln (Rodriguez 2002). Eine Übertragung zwischen den Tieren scheint vor allem durch Insekten, wie der Kriebelmücke, stattzufinden (Mead, Ramberg et al. 2000). Infektionen von Menschen kommen selten vor und verlaufen in der Regel asymptomatisch oder mit milder grippeartiger Symptomatik. Intakte Vesikuläre Stomatitis Virione haben eine für die Rhabdoviridae charakteristische patronenartige Form und sind ca. 70 nm x 180 nm groß (siehe Abb. 1.2). Sie bestehen aus fünf verschiedenen viralen Proteinen und einer negativen einzelsträngigen RNA sowie einer von der Wirtszelle erworbenen Lipidhülle. Die negative einzelsträngige RNA kodiert das virale Genom und befindet sich zusammengelagert mit weiteren viralen Proteinen in einem Ribonukleoproteinkomplex, der das Genom vor Nukleasen der Wirtszelle schützt (Harmon, Robinson et al. 1985; Dillon and Gupta 1988). Das kompakte VSV-Genom hat eine Länge von 11161 Nukleotiden und beinhaltet insgesamt fünf Gene mit zusätzlichen regulatorischen Sequenzen, die in folgender Reihenfolge angeordnet sind 3`-Leader-N, P, M, G, L-trailer-5` (Abraham and Banerjee 1976).

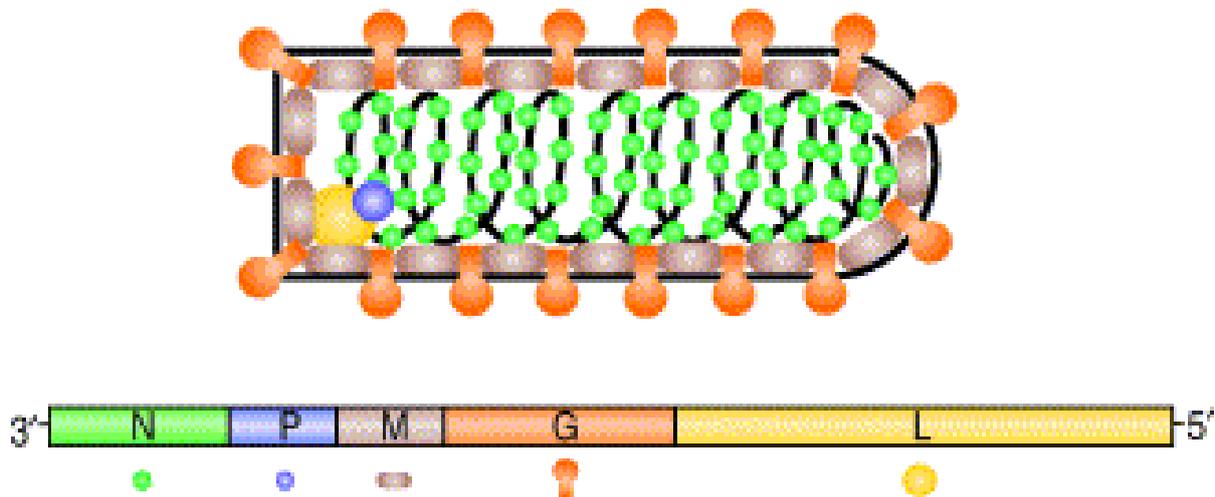


Abb. 1.2 VSV-Genom und Virusstruktur modifiziert aus (Lichty, Power et al. 2004). Die VSV-Virione haben eine Patronenförmige Form und bestehen aus einem einzelnen Molekül nicht-segmentierter negativ-strängigen RNA, dem Nukleoprotein (N), dem Phosphoprotein (P), der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (L), dem Matrix-Protein (M) und dem in der Virushülle befindlichem Glykoprotein (G).

Während des Replikationszyklus, der ausschließlich im Zytoplasma der infizierten Zelle stattfindet, werden fünf unterschiedliche monocistronische mRNAs synthetisiert, die für fünf korrespondierende Proteine kodieren (Rose 1996). Je nach Abstand zum gemeinsamen Promotor werden die verschiedenen mRNA-Produkte unterschiedlich häufig transkribiert. Dadurch entsteht ein Gefälle der hergestellten mRNAs von der 3'-Promotorregion nach dem folgenden Schema: N>P>M>G>L (Villarreal, Breindl et al. 1976). Das virale Nukleoprotein (N), die RNA-Polymerase (L) und das Phosphoprotein (P) sind Bestandteile des Ribonukleoproteinkomplexes (Harmon, Robinson et al. 1985). Zusammen mit dem viralen M-Protein formt der Ribonukleoproteinkomplex eine feste helikal gewundene Struktur, die auch als Skeleton bezeichnet wird. Die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase besteht aus dem L-Protein (large) und dem P-Protein als Kofaktor und ist für die Transkription und Replikation des viralen Genoms verantwortlich (Emerson and Yu 1975). Abhängig vom Zeitpunkt nach erfolgter Infektion kann sie entweder mRNAs produzieren oder als RNA-Replikase arbeiten und ein vollständiges Antigenom synthetisieren. Dieses Antigenom dient schließlich als Matrize für die Duplikation der ursprünglichen negativ-strängigen RNA. Die identischen Kopien des Genoms können entweder zur weiteren Transkription oder für den Einbau in neue infektiöse Viruspartikel verwendet werden (Barr, Whelan et al. 2002). Das Phosphoprotein (P) ist ein essentieller Kofaktor der viralen Polymerase und spielt eine wichtige Rolle in der RNA-Enkapsulierung (Emerson and Yu 1975; Curran, Marq et al. 1995). Das multifunktionale M-Protein hat wichtige und vielfältige Funktionen in der Kontrolle der VSV-Replikation und für den Ablauf der Pathogenese. Es spielt eine entscheidende Rolle im Zusammenbau und Freisetzung neuer Viren. Außerdem reguliert es die Transkription und ist mitverantwortlich für die Unterdrückung der zelleigenen Immunantwort, Hemmung der Apoptose und möglicherweise auch für die Abschwächung der durch die VSV-Infektion verursachten Entzündungsreaktion (Blondel, Harmison et al. 1990; Terstegen, Gatsios et al. 2001). Durch die Inhibition der zellulären Transkription sowie der Blockade des mRNA-Exports aus dem Zellkern, verhindert es effektiv die Produktion zelleigener antiviraler Proteine wie den Interferonen (Carroll and Wagner 1979; Petersen, Her et al. 2000; von Kobbe, van Deursen et al. 2000). Das virale G-Protein ist ein Phosphatidylserinbindendes Transmembranprotein, das sich in der lipidhaltigen Virushülle befindet, und ausschlaggebend für das Anhaften beziehungsweise Eindringen der Viren in neue Wirtszellen ist (Finke and Conzelmann 2005). Phosphatidylserin ist ein universeller

Bestandteil von Plasmamembranen und erklärt dadurch den breiten Zellbeziehungsweise Gewebetropismus von VSV (Carneiro, Bianconi et al. 2002). Nach diesem Anhaftungsprozess werden die viralen Partikel über Endozytose in Zelle aufgenommen. Durch einen Abfall des pH-Wertes in den Endosomen findet eine Konformationsänderung des viralen G-Proteins statt, die zur Fusion der Virushülle mit der endosomalen Membran führt und schließlich die Freisetzung des Ribonukleoproteinkomplexes in das Zytoplasma bewirkt (Florkiewicz and Rose 1984). Die VSV-Infektion von empfänglichen Zellen führt zu einem sogenannten zytopathologischen Effekt, der mit einer Zellabrundung und einem nachfolgenden, der Apoptose ähnelnden Zelltod einhergeht. Ursächlich für diesen Vorgang scheint vordergründig die Blockade der zelleigenen Genexpression durch das virale M-Protein zu sein (Blondel, Harmison et al. 1990; Kopecky, Willingham et al. 2001). Dadurch kommt es über die Aktivierung bestimmter Effektorcaspasen wie Caspase-3 und -7 zur Einleitung spezieller Apoptosevorgänge (Hobbs, Hommel-Berrey et al. 2003).

1.4 Das Vesikuläre Stomatitis Virus in der onkolytischen Virotherapie

Im Laufe der Jahre wurde gezeigt, dass das Interferonsystem eine entscheidende Rolle spielt die uneingeschränkte Replikation von verschiedenen Viren zu verhindern (Muller, Steinhoff et al. 1994). Im Jahr 1957 entdeckten Isaacs und Lindenmann erstmals die Interferone, die ein wesentlicher Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind (Isaacs and Lindenmann 1987). Auch das VSV reagiert äußerst sensibel auf die Behandlung mit Typ 1 Interferonen. Eine funktionsfähige VSV-Replikation ist unter anderem von einem defektem Interferon System und einer resultierenden Störung der antiviralen Zellabwehr abhängig (Belkowski and Sen 1987; Stojdl, Lichty et al. 2000). Interferone sind eine Familie von Zytokinen, die antivirale, wachstums- und differenzierungsregulierende und auch vielseitige immunmodulatorische Funktionen besitzen. Eine Interferoninduktion und eine anschließende Sekretion des Proteins kann durch verschiedenste Stimuli, wie virale und bakterielle Infektionen, Wachstumsfaktoren oder auch doppelsträngige RNA-Moleküle, ausgelöst werden. Die molekularen Grundlagen hierzu wurden erst in den letzten Jahren aufgeklärt und besser verstanden (Content 2009). Beim Erkennungsprozess von viralen Nukleinsäuren spielen vor allem die

transmembranären Toll-like Rezeptoren (TLR) und die im Zytoplasma lokalisierten RNA-Helikasen RIG-I (retinoic-acid-inducible gene-I) und MDA-5 (melanoma-differentiation-associated gene 5) der RIG-I-Familie eine entscheidende Rolle (Akira, Uematsu et al. 2006). Toll-like Rezeptoren erkennen virale Nukleinsäuren je nach Unterform an der Zelloberfläche (TLR-3) und an endosomalen Membranen (TLR-3/7/8/9). Durch einen komplizierten Signalmechanismus kommt es über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3, IRF7, NF- κ B und ATF-2/c-Jun zur Induktion von Interferon- β . Die RNA-Helikasen RIG-I und MDA-5 erkennen intrazelluläre virale RNA durch einen Toll-like Rezeptor unabhängigen Mechanismus und führen über die Rekrutierung bestimmter Adaptorproteine ebenfalls zu einer Initialisierung einer Interferonantwort (Matsumiya, Imaizumi et al. 2011).

Die gebildeten Interferone binden an speziesspezifische Zellrezeptoren (IFNAR) und lösen über verschiedene Signalkaskaden, wie den Jak-STAT-Signalweg, eine Hochregulation von zahlreichen antiviralen Genen, den sogenannten Interferon stimulated genes (ISGs) aus (Malmgaard 2004; Tough 2004).

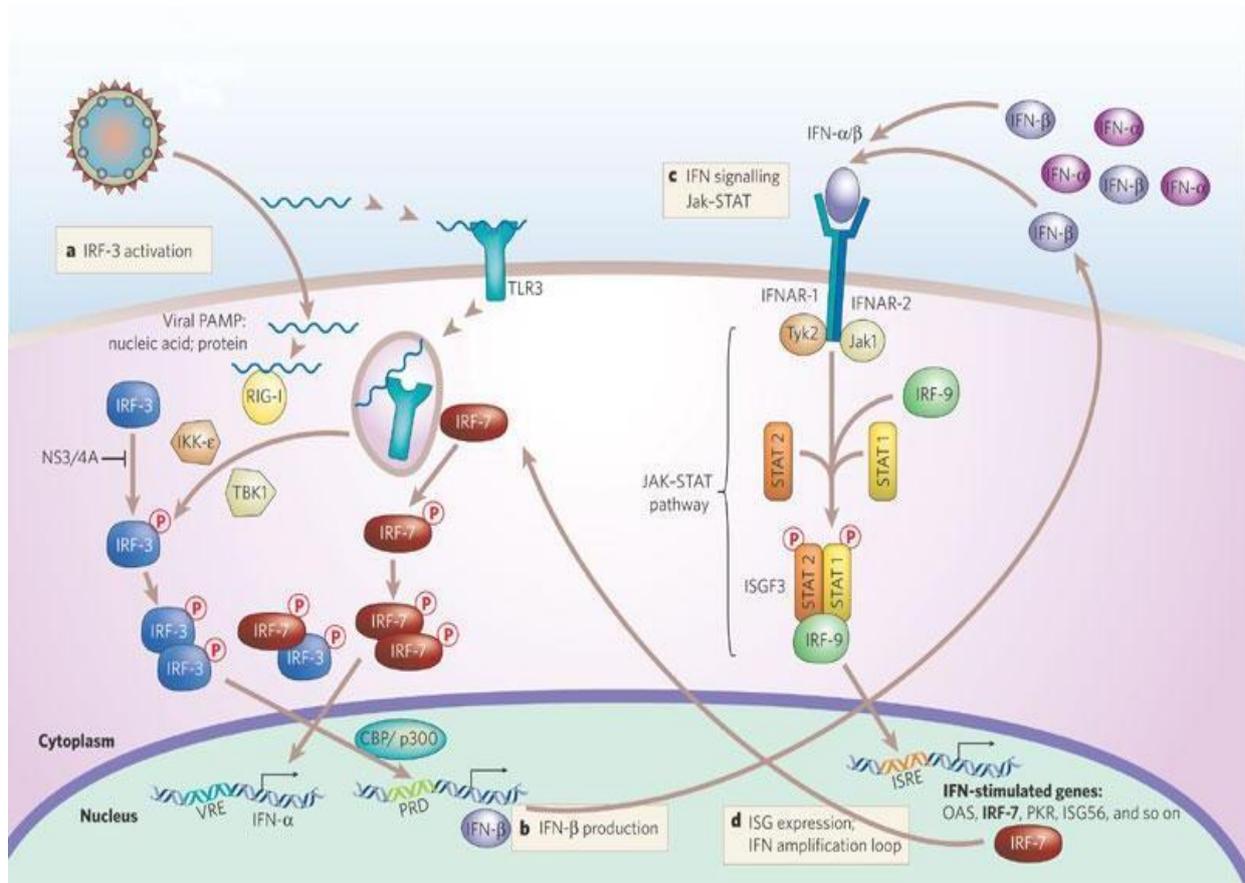


Abb. 1.3 Interferoninduktion und Interferonantwort am Beispiel des Hepatitis C Virus aus (Gale and Foy 2005). Die Abbildung zeigt linksseitig die virusvermittelte Interferoninduktion durch die transmembranären Toll-like Rezeptoren und die zyttoplasmatische RNA-Helikase RIG-I. Die darauffolgenden Signalkaskaden führen zu einer Interferoninduktion und Sekretion. Rechtsseitig werden die molekularen Mechanismen der zellulären Interferonantwort veranschaulicht. Interferon α/β bindet an den IFNAR und aktiviert die Jak-STAT-Signalkaskade, die zur Formierung des ISGF3-Komplexes führt und durch Bindung an den cis acting DNA-Element namens Interferon stimulated response element (ISRE) schließlich zur Expression von Interferon stimulierbaren Genen (ISGs) wie IRF7, PKR, OAS führt. Die neu synthetisierten Genprodukte wirken positiv verstärkend auf die eingeleitete Interferoninduktion und fördern somit die Produktion größerer Interferonmengen.

Man unterscheidet grundsätzlich zwei Gruppen von Interferonen, Typ 1 (IFN α/β) und Typ 2 (IFN γ). Die Gene von Typ 1 Interferonen liegen gruppiert auf dem kurzen Arm von Chromosom 9. Sie bestehen aus mehreren α -Genen und einem β -Gen und werden von den meisten Zellen, wie Fibroblasten und dendritischen Zellen induziert (Stark, Kerr et al. 1998). Typ 2 Interferone hingegen bestehen aus einem einzigen Gen auf Chromosom 12 und werden hauptsächlich von Th1-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen ausgeschüttet (Stark, Kerr et al. 1998). Da Interferone wie

bereits erwähnt auch das Zellwachstum und die Apoptoseeinleitung regulieren ist es nicht verwunderlich, dass sich bei Tumorzellen oft Defekte im Interferonsignalweg nachweisen lassen (Barber 2005). Dadurch haben diese malignen Zellen zwar einen Überlebens- beziehungsweise Wachstumsvorteil, gleichzeitig werden sie aber auch empfänglicher für virale Infektionen (Everts and van der Poel 2005).

Neben dem fehlerhaften Interferonsignalweg scheinen aber auch noch weitere Genmutationen und Signalkaskadendefekte wie beispielsweise Mutationen im p53-, RAS- und Myc-Gen oder eine Funktionseinschränkung der PKR (dsRNA dependent protein kinase) die Effektivität der VSV-Replikation in malignen Zellen zu erhöhen (Stojdl, Abraham et al. 2000; Balachandran, Porosnicu et al. 2001). Der Transkriptionsfaktor p53, der ebenfalls zu den ISGs gerechnet wird, scheint auch eine bedeutsame Rolle in dem durch Interferon-induzierten antiviralen Abwehrmechanismus der Zellen zu spielen (Munoz-Fontela, Macip et al. 2008). Erst vor kurzem wurde gezeigt, dass auch zelluläre Defekte im RAS/Raf1/MEK/ERK-Signalweg eine VSV-vermittelte Onkolyse erleichtern (Noser, Mael et al. 2007). Das RAS-Gen ist wie bereits erwähnt in dem PDAC sehr häufig mutiert und könnte daher die VSV-Replikation in pankreatischen Tumorzellen möglicherweise begünstigen. Da VSV für den Menschen nur eine geringe Pathogenität aufweist und Antikörper gegen VSV in der menschlichen Bevölkerung ausgesprochen selten vorkommen, sind weitere Voraussetzungen für den Einsatz von VSV als therapeutisches Virus erfüllt. Das VSV scheint außerdem weder einer genetischen Rekombination zu unterliegen noch besitzt es transformierende oder integrierende Eigenschaften, was für die Sicherheit des Therapeutikums spricht (Roberts, Buonocore et al. 1999; Vile, Ando et al. 2002). Unvorhersehbare Ereignisse, die durch eine genetische Integration verursacht werden könnten, werden dadurch weitgehend ausgeschlossen. Ein weiterer Vorteil des VSV ist die Möglichkeit der genetischen Modifikation (Schnell, Buonocore et al. 1996). In den letzten Jahren wurde ein sogenanntes „Reverse Genetik“-System entwickelt, das die Herstellung rekombinanter VSV deutlich erleichtert hat (Lawson, Stillman et al. 1995). Im Vergleich zu anderen RNA-Viren scheint das eingefügte genetische Material aufgrund der niedrigen Rekombinationsrate von VSV relativ stabil zu sein. Durch genetische Modifikationen können neue spezifische, effektive und sichere VSV-Vektoren hergestellt werden. In letzter Zeit wurden einige vielversprechende rekombinante VSV generiert, die dem Wildtypvirus in verschiedenen Gesichtspunkten überlegen waren. Beispielsweise wurden rekombinante VSV hergestellt die über modifizierte Hüllproteine verfügen

und so spezifischer an bestimmte Tumorzellen binden (Bergman, Whitaker-Dowling et al. 2003). In weiteren Ansätzen wurden auch Suizidgene wie die Thymidinkinase und Cytosin-Desaminase des Herpesvirus in das VSV-Genom integriert, um dadurch das onkolytische Potential weiter zu verbessern (Fernandez, Porosnicu et al. 2002; Porosnicu, Mian et al. 2003). Genetisch veränderte VSV wurden auch hergestellt, um die therapeutische Sicherheit zu erhöhen. Die meisten Wildtyp-VSV-Stämme haben nur eine gering ausgeprägte Interferoninduktion bedingt durch das virale M-Protein, das die Gentranskription und den nukleären mRNA-Export effektiv blockiert (Ferran and Lucas-Lenard 1997; Marcus, Rodriguez et al. 1998; Petersen, Her et al. 2000). Eine VSV-Mutante namens AV1 (attenuated virus 1), die erstmals durch eine reduzierte Plaquegröße in IFN-kompetenten Zellen entdeckt wurde, besitzt eine einzelne Aminosäuresubstitution (Arginin in Position 51 statt Methionin; VSV-M51R) in dem viralen M-Protein und ist gekennzeichnet durch eine vergleichsweise starke Interferoninduktion in den infizierten Zellen (Stojdl, Lichty et al. 2003). Einen ähnlichen Ansatz verfolgten Obuchi et al., indem sie ein rekombinantes VSV entwickelten, das murines IFN- β exprimiert (Obuchi, Fernandez et al. 2003). Durch den Einsatz von VSV-M51R und rVSV-IFN- β ließ sich durch die starke Interferonsekretion das gesunde umliegende Gewebe besser schützen, wobei die onkolytischen Eigenschaften in vielen getesteten Zelllinien und Tumormodellen erhalten blieben (Stojdl, Lichty et al. 2003). Auch die systemischen Nebenwirkungen wurden durch VSV-M51R signifikant verringert und die maximale tolerable Dosis (MTD) konnte um ein Vielfaches gesteigert werden (Ebert, Harbaran et al. 2005). Nützlich in der VSV-vermittelten Onkolyse ist unter anderem auch der schnelle Replikationszyklus von 8-10 Stunden in infizierten Tumorzellen. Hierdurch ist es möglich eine signifikante Tumordestruktion zu erreichen, bevor eine den Virus neutralisierende patienteninduzierte Immunantwort auftritt (Ebert, Shinozaki et al. 2003).

Neben diesen zahlreichen Vorteilen gibt es auch einige negative Aspekte der onkolytischen Virotherapie mit VSV. Es ist bekannt, dass das VSV in hohen Dosen bei immunkompetenten Ratten und Mäusen zu akuter Neuro- und Hepatotoxizität führen kann (Bi, Barna et al. 1995; Plakhov, Arlund et al. 1995; Ebert, Shinozaki et al. 2003). Die Mechanismen, die zu einer solchen Symptomatik führen und wie sie sich vermeiden lassen, werden derzeit intensiv erforscht. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass diese unerwünschten adversen Effekte teilweise durch eine vorherige prophylaktische Interferon α -Therapie minimiert werden können (Shinozaki, Ebert et

al. 2005). Desweiteren ist bekannt, dass die RNA abhängige RNA-Polymerase von VSV eine hohe Fehlerrate von 10^{-3} bis 10^{-4} Falschinsertionen pro Nukleotid pro Kopierzyklus aufweist (Steinhauer, de la Torre et al. 1989). Diese Fehlerrate zusammen mit der Abwesenheit von Kontrolllesemechanismen könnte zur Entwicklung von verschiedenen eventuell gefährlichen Quasispezies führen (Holland, De La Torre et al. 1992). Ein weiteres Problem vieler onkolytischer Viren ist die Bildung neutralisierender Antikörper durch den Patienten und die darauffolgende Inaktivierung der Viren. Die Anzahl der Behandlungen mit VSV und anderen onkolytischen Viren scheint dadurch unglücklicherweise limitiert zu sein. Diese neutralisierenden Antikörper scheinen vor allem bei einer intravenösen Therapieeinleitung, weniger bei einer intratumoralen Applikation, eine determinierende Rolle zu spielen (Donahue, Mullen et al. 2002). Es wurde gezeigt, dass Retroviren, die das VSV-G-Protein exprimieren, durch menschliches Serum effektiv inaktiviert werden (DePolo, Reed et al. 2000). Dennoch scheint es auch Möglichkeiten zu geben eine virusinaktivierende Immunreaktion durch den Wirt zu vermeiden oder zu umgehen. Eine Strategie scheint die Verwendung spezieller mit onkolytischen Viren beladenen Zellen zu sein. Diese Zellen haben die Aufgabe die Viren vor einer neutralisierenden Immunantwort zu schützen und sie an die gewünschte Lokalisation zu transportieren (Power, Wang et al. 2007; Willmon, Harrington et al. 2009). Eine andere Möglichkeit könnten immunsuppressive Pharmaka wie beispielsweise Cyclophosphamid sein (Ikeda, Ichikawa et al. 1999; Qiao, Wang et al. 2008). Dessen ungeachtet könnte die durch Viren verursachte Immunreaktion aber auch einige vorteilhafte Funktionen in der Tumorthherapie haben. Zum Beispiel präsentieren durch Viren infizierte Tumorzellen virale Antigene auf ihrer Zelloberfläche und können durch CD8-positive zytotoxische T-Zellen selektiv zerstört werden. Außerdem kommt es zur Freisetzung verschiedenster Zytokine, die die ausgelöste Immunreaktion zusätzlich beeinflussen. Diese komplexen Vorgänge verändern möglicherweise die Immuntoleranz gegenüber dem Tumorgewebe und könnten zusätzliche therapeutisch vorteilhafte Langzeiteffekte implizieren (Diaz, Galivo et al. 2007; Tong, Senzer et al. 2011).

Gleichwohl der oben genannten Nachteile scheint das VSV aufgrund der aufgeklärten Biologie, dem breiten Gewebetropismus, dem Fehlen von transformierenden oder integrierenden Eigenschaften sowie einer geringen Pathogenität für den Menschen ein potentes und vielversprechendes therapeutisches Mittel gegen verschiedenste Tumorerkrankungen zu sein.

1.5 Tumormodelle des duktales Pankreaskarzinoms

Es gibt verschiedene Ansätze neue Therapieformen präklinisch zu testen. In vitro werden hierzu oft Zelllinien verwendet. Um präklinische Therapieformen in vivo zu erproben werden jedoch geeignete Tiermodelle benötigt. In den letzten Jahren wurden große Fortschritte in der Etablierung von genetisch manipulierten Maus-Modellen des PDAC erzielt (Leach 2004). Das Ziel ist es ein Tumormodell zu schaffen, das ähnliche morphologische und genetische Veränderungen aufweist wie das humane PDAC und analoge Stadien der Entwicklung über PanINs bis hin zu einer invasiven und metastatischen Erkrankung durchläuft. Von vielen verschiedenen Ansätzen überzeugten vor allem murine Tumormodelle mit einer konditionalen pankreasspezifischen Aktivierung des onkogenen K-RAS^{G12D}-Allels, die das volle Spektrum der Karzinogenese von PanINs bis hin zum invasiven PDAC aufwiesen (Guerra, Mijimolle et al. 2003; Hingorani, Petricoin et al. 2003). Die aktivierende K-RAS-Mutation ist in über 90% der Pankreaskarzinome vorhanden und bereits in Vorläuferläsionen wie den PanINs zu finden. Daher wird ihr auch eine herausragende Rolle in der Einleitung und Progression der Tumorentwicklung zugeschrieben. Im Mausmodell wurde die ubiquitäre Aktivierung des K-RAS^{G12D}-Allels im Organismus durch ein vorgeschaltetes Stoppelement mit zwei flankierenden loxP-Sequenzen (Lox-Stopp-Lox; LSL) verhindert. Das Stoppelement konnte nun pankreasspezifisch durch eine Cre-Rekombinase im p48-Lokus des Ptf1-Gens (Pancreas specific transcription factor 1a) ausgeschaltet werden und ermöglichte auf diese Weise eine auf das Pankreas limitierte Aktivierung des onkogenen K-RAS^{G12D}-Allels. Das Helix-loop-helix-Protein Ptf1-p48 wird in der Differenzierung und Entwicklung aller exokrinen Zellen des Pankreas benötigt (Rodolosse, Chalaux et al. 2004). Da die Tumorentstehung in diesem Modell jedoch relativ lange dauerte und erst im fortgeschrittenem Alter auftritt, wurden von verschiedenen Forschungsgruppen zusätzliche genetische Modifikationen wie beispielsweise Mutationen oder Deletionen der Tumorsuppressorgene p53, p16^{INK4A}, p19^{Arf} oder eine Überexpression des Wachstumsfaktors TGF- α hinzugefügt (Aguirre, Bardeesy et al. 2003; Bardeesy, Aguirre et al. 2006; Siveke, Einwachter et al. 2007). Durch die Kombination der konditionalen pankreasspezifischen Aktivierung des onkogenen K-RAS^{G12D}-Allels mit weiteren für das Pankreaskarzinom typischen genetischen Veränderungen ließ sich der Prozess der Karzinogenese noch wesentlich beschleunigen. Neben der akzelerierten Tumorentstehung veränderte sich interessanterweise abhängig vom Genotyp auch die allgemeine Tumormorphologie.

In dieser Arbeit wurden verschiedene pankreatische Zelllinien verwendet, die aus endogenen Ptf1a^{+Cre}; K-RAS^{+LSL-G12D} (CK) und Ptf1a^{+Cre}; K-RAS^{+LSL-G12D}; N2ko (CKN2) Mäusen hergestellt wurden. Aus einzelnen Tumoren dieser Tiere wurden heterogene Tumorzellgemische isoliert und anschließend permanente Zelllinien etabliert. Die Ptf1a^{+Cre}; K-RAS^{+LSL-G12D}; N2ko (CKN2) Mäuse besitzen neben der Aktivierung von K-RAS eine zusätzliche Deaktivierung des Notch2-Gens (neurogenic locus notch homolog protein 2). Hierzu wurden K-RAS^{+LSL-G12D} -Mäuse mit konditionalen pankreasspezifischen N2ko-Mäusen (Ptf1a^{+Cre(ex1)};Notch2^{fl/fl}) gekreuzt (Mazur, Einwachter et al. 2010). Der Notch2 -Signalweg spielt wie Ptf1-p48 und TGF- α beziehungsweise EGF eine wichtige Rolle in der Regulation einer normalen Pankreasentwicklung und exokrinen Differenzierung (Apelqvist, Li et al. 1999; Cras-Meneur, Elghazi et al. 2001). Zudem scheint das Notch2-Gen eine zentrale Rolle in der PanIN- Progression zu spielen. Die Deletion im Ptf1a^{+Cre}; K-RAS^{+LSL-G12D}; N2ko-Mausmodell führt über eine Aktivierung des Myc-Signalwegs zur Tumorentstehung (Mazur, Einwachter et al. 2010). Die CKN2-Mausmodelle weisen phänotypisch vorwiegend anaplastische Pankreastumore auf mit einem weitgehenden Fehlen von höhergradigen PanIN-Läsionen.

Für einen Teil der in vivo-Versuche wurde zudem ein neuartiges endogenes Mausmodell mit einer klassischen konditionalen Aktivierung des K-RAS^{G12D}-Allels und einer zusätzlichen pankreasspezifischen Deaktivierung des Tumorsuppressorgens p53 eingesetzt. Hierzu wurden K-RAS^{+LSL-G12D}-Mäuse mit konditionalen pankreasspezifischen p53ko-Mäusen (Ptf1a^{+Cre}; p53^{fl/fl}) gekreuzt. Die daraus resultierende Maus mit dem Genotyp Ptf1a^{+Cre}; K-RAS^{+LSL-G12D}; p53^{fl/fl} wird im Folgenden als CKP-Maus bezeichnet. Das Tumorsuppressorgen p53 spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation des Zellzyklus und Apoptoseeinleitung und ist in bis zu 75 % der Pankreaskarzinome mutiert (Redston, Caldas et al. 1994). Das CKP-Mausmodell zeigte ein sehr frühes und aggressives Tumorstadium mit vielen Ähnlichkeiten zum humanen PDAC und bietet daher ein vielversprechendes System für die Erprobung neuer Therapieformen. Schon sechs bis acht Wochen post partum entwickeln sich ausgeprägte, infiltrativ wachsende, heterogene Tumore, an deren Folge die Mäuse ohne Behandlung bereits im Alter von ca. zehn Wochen sterben.

1.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die therapeutischen Optionen des Pankreaskarzinoms sind aufgrund der weitgehenden radio- und chemotherapeutischen Resistenz begrenzt und die Prognose dieser Tumorentität ist trotz intensiver Forschungsbemühungen nach wie vor äußerst schlecht. Aus diesem Grund ist man kontinuierlich auf der Suche nach neuen alternativen Behandlungsstrategien.

Im vergangenen Jahrzehnt wurde das Gebiet der onkolytischen Virotherapie revolutioniert. Im Rahmen von präklinischen Studien wurden auch einige onkolytische Viren *in vitro* und an verschiedenen Tiermodellen des PDAC getestet und sie lieferten teilweise erfolgsversprechende Ergebnisse. Es wurde mehrfach gezeigt, dass das VSV ein potentes Agens gegen eine Vielzahl von unterschiedlichen Tumoren ist. Der therapeutische Erfolg bei dem PDAC wurde allerdings noch nicht überprüft. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, inwiefern sich das VSV für eine Therapie des PDAC eignet.

Um dies herauszufinden wurde die Replikation und das Ausmaß der Zelllyse von Wildtyp-VSV und der Virusmutante VSV-M51R in zahlreichen humanen und murinen pankreatischen Tumorzelllinien untersucht. Da das VSV sehr sensibel auf die Anwesenheit von Interferonen reagiert und die virale Replikation dadurch signifikant abgeschwächt werden kann, wurde auch analysiert in welchem Ausmaß exogenes Interferon die VSV-Replikation in den pankreatischen Tumorzellen beeinflusst. Mit Hilfe eines Luciferase-Reportergen-Assays und einer Microarray-Datenanalyse wurden zusätzlich wichtige Komponenten des pankreatischen Interferonsignalwegs und ihre Veränderungen durch eine VSV-Infektion genauer untersucht.

Abschließend wurde in zwei unterschiedlichen murinen Pankreaskarzinommodellen die VSV-Replikation außerdem *in vivo* erforscht. In einem orthotopen Karzinommodell wurden zwei verschiedene murine PDAC-Zelllinien bei immunkompetenten Mäusen in das Pankreas injiziert und nach vollendetem Tumorwachstum durch intratumorale VSV-Applikation therapiert. An endogenen Ptf1a^{+Cre}; K-RAS^{+/LSL-G12D}; p53^{fl/fl}-Mäusen, die eine konditionale Aktivierung des K-RAS^{G12D}-Allels und eine pankreasspezifischen Deaktivierung des Tumorsuppressorgens p53 aufweisen, wurde nach gesichertem Tumorstatus ebenfalls eine identische intratumorale VSV-Therapie eingeleitet. Die VSV-Replikation wurde im Anschluss quantitativ durch virale Titerbestimmungen und histologisch durch spezifische Färbungen analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Technische Ausrüstung und Geräte

12-channel Pipette (30-300ul)	Eppendorf AG, Hamburg, (D)
Anästhesie-System Vetland Landmark RTA-0011	Vetland Medical Sales, Louisville, USA
Chirurgisches Werkzeug (Schere, Pinzette)	Karl Hammacher GmbH, Solingen, (D)
CO ₂ Begasungsbrutschrank, HERAcell [®] 240	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, (D)
Combitips [®] plus (Biopur [®])	Eppendorf AG, Hamburg, (D)
Cryo 1°C Freezing Container 500 ml	NALGENE [™] , Roskilde, Dänemark
Digitalkamera Powershot A 620	Canon GmbH, Krefeld, (D)
Eppendorf Easypet [®] 4421	Eppendorf AG, Hamburg, (D)
Falkonröhrchen 15 und 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg, (D)
Gefrierschrank, -20 °C	Siemens-Elektrogeräte GmbH, München, (D)
Gefrierschrank, -80°C (Heraeus [®])	Thermo Electron Corporation, Langenselbold, (D)
HAMILTON Spritze 705 CT 50 µl 22S	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Homogenizer DUALL	Kleinfeld Labortechnik GmbH, Gehrden, (D)
Inverses Mikroskop (model IB)	Optech, MS, USA
Kryoröhrchen 2 ml NALGENE [®]	Kleinfeld Labortechnik GmbH, Gehrden, (D)
Kühlschrank (LSTR 13006 GWU)	National Lab GmbH, Mölln, (D)
Luminometer, GloMax [™] 20/20	Promega GmbH, Mannheim, (D)
Magnetresonanztomograph 1,5 Tesla	Philips Healthcare, DA Best, Niederlande

Mikrowelle HF 22024	Siemens-Elektrogeräte GmbH, München, (D)
MVE Cryosystem 6000	Cryodepot, GA, USA
Nadeln (20 G x 1 ½)	B. Braun Medical AG, Emmenbrücke, (D)
Nadeln (29 G x ½), BD Microlance™ 3	Becton Dickson Labware, NJ, USA
Neubauer improved counting chamber	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG "Assistent", Sondheim/Röhn, (D)
Phasenkontrast-/Fluoreszenzmikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss Mikroimaging GmbH, Halbergmoos, (D)
Pipetten, Eppendorf Research® Family	Eppendorf AG, Hamburg, (D)
Pipettentips, Eppendorf ep T.I.P.S.	Eppendorf AG, Hamburg, (D)
Spektrometer SmartSpec™ Plus	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, (D)
Spritzen BD Luer-Lok™ Tip (3, 5, 10 ml)	Becton Dickson Labware, NJ, USA
Sterile Hood, HERAsafe® KS18	Thermo Electron Corporation, Langenselbold, (D)
Tierschermaschine AESCULAP Exacta GT415	B. Braun Vet Care GmbH, Tuttlingen, (D)
Tischzentrifugen 5415R, 5415D, 5702R	Eppendorf AG, Hamburg, (D)
Ultrazentrifuge Flaschen (PC 26.3 ML)	Beckmann Instruments, Inc., CA, USA
Ultrazentrifuge Optima™ XL- 100K	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, (D)
Varioklav® Dampfsterilisator	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, (D)
Wasserbad, GFL® 1008	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, (D)

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Lösungen

Agarose (A 5039-5006)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, (D)
Alkoholische Eosinlösung	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, (D)
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, (D)
destilliertes Wasser	Apotheke, Klinikum r.d.l., München, (D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, (D)
EDTA	Gibco BRL, Karlsruhe, (D)
Ethanol	Merck, Darmstadt, (D)
Formaldehyde (35 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, (D)
Glutardialdehyde 25 %	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, (D)
Isofluran/ Forene®	Abbott AG, Baar, Schweiz
Isopropranol	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, (D)
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, (D)
LB Agar	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, (D)
Mayer Hämalaunlösung	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, (D)
MgCl ₂	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, (D)
Naloxon DeltaSelect	DeltaSelect GmbH, München, (D)
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, (D)
O.C.T. TM Compound	Sakura Tissue-Tek®, Zoeterwoude, Niederlande
Paraformaldehyde (PFA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, (D)
Pertex Synthetisches Eindeckmittel	Medite, Burgdorf, (D)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Poly I:C	InvivoGen, CA, USA
Rimadyl® (Carprofen) ad us.vet. Injektionslösung	Pfizer AG, Zürich, Schweiz
Sucrose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, (D)
Temgesic® (Buprenorphin)	Essex pharma GmbH, München, (D)
Trypanblau Lösung, 0,4 %	Gibco BRL, Karlsruhe, (D)
Universal type I Interferon	PBL Biomedical Laboratories, NJ, USA
Xylol (Histoclear)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, (D)
X-β-Gal	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, (D)

2.1.3 Reaktionssysteme und molekularbiologische Kits

Dual-Luciferase [®] Reporter Assay System	Promega GmbH, Mannheim, (D)
QIAfilter [®] Midi Kit	Qiagen, Hilden, (D)
β -Galaktosidase Staining Kit	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, (D)

2.1.4 Vektoren

pcDNA 3.1 (-): Der Vektor pcDNA 3.1 (-) wurde von Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland erworben.

pISRE-luc: Der pISRE-luc Plasmid kodiert das Firefly Luciferase-Gen, das durch den IFN-stimulated response element (ISRE) Promoter reguliert wird (Clontech Laboratories, Inc., CA, USA).

pIFN- β -luc: Der pIFN- β -luc Plasmid verschlüsselt das Firefly Luciferase-Gen unter der Kontrolle des IFN- β Promoter (Sequenz -125 bis 0) (mit freundlicher Unterstützung von T. Fujita, Universität von Kyoto, Japan).

pIRF3-luc: Der pIRF3-luc Plasmid kodiert das Firefly Luciferase-Gen kontrolliert durch die positive regulatory domain I (PRD I / IRF3- binding site) von dem IFN- β Promotor (mit freundlicher Unterstützung von T. Fujita, Universität von Kyoto, Japan).

pCMV-RL: Der pCMV-RL Plasmid, erworben von Promega GmbH (Mannheim, Deutschland), kodiert das Renilla-Luciferase-Gen unter der Kontrolle des Cytomegalievirus (CMV) Promotors.

pMX-luc: Der pMX-luc Plasmid wurde mit freundlicher Genehmigung von Dr. Sabrina Marozin (Gastroenterologisches Labor, Klinikum rechts der Isar) zur Verfügung gestellt. Das Firefly Luciferase-Gen wird hier durch den MX-Promotor kontrolliert.

pNF- κ B-luc: Der pNF- κ B-luc Plasmid wurde von Clontech Laboratories, Inc., CA, USA kommerziell erworben. Bei dem 5,0 kb großen Plasmid wird das Firefly Luciferase-Gen durch den NF- κ B Promotor kontrolliert.

2.1.5 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden von der American Type Culture Collection (ATCC), V USA erworben.

Bezeichnung	ATCC-Nr.	Organismus	Organ	Morphologie	Krankheit
BHK-21 [C-13]	CCL-10 TM	Syrian Goldhamster	Niere	adhärent, fibroblasten- artig	Keine
A549	CCL-185 TM	Homo sapiens, 58 Jahre, männlich, kaukasisch	Lunge	adhärent, epithelial	Alveoläres Adeno- karzinom
MIA PaCa-2	CRL-1420 TM	Homo sapiens, 65 Jahre, männlich, kaukasisch	Pankreas	adhärent mit losen rundlichen Einzelzellen	PDAC
PANC-1	CRL-1469 TM	Homo sapiens, 56 Jahre, männlich, kaukasisch	Pankreas	adhärent, epithelial	PDAC
Su.86.86	CRL-1837 TM	Homo sapiens, 57 Jahre, weiblich, kaukasisch	Pankreas	adhärent, epithelial	PDAC, aus Leber- meta- stasen

Die folgenden humanen Zelllinien sind nicht kommerziell erhältlich und wurden anderweitig erworben beziehungsweise zur Verfügung gestellt.

Bezeichnung	Bezugsquelle	Organismus	Organ	Morphologie	Krankheit
Huh-7	Dr.Ulrich Lauer, Universität Tübingen	Homo sapiens	Leber	adhärent, epithelial	Hepato- zelluläres Karzinom
DAN-G	Deutsches Krebs- forschungs- zentrum, Heidelberg	Homo sapiens	Pankreas	adhärent, epithelial	PDAC
Colo357	Chirurgische Klinik, TUM	Homo sapiens	Pankreas	adhärent, epithelial	PDAC aus Lymphknoten -metastasen
T3M4	Chirurgische Klinik, TUM	Homo sapiens	Pankreas	adhärent, epithelial	PDAC aus Lymphknoten -metastasen

Die folgenden murinen Zelllinien wurden aus den Pankreastumoren endogener Mausmodelle generiert. Die Zelllinien wurden freundlicherweise von Priv.-Doz. Dr. Jens Siveke aus der II. Medizinischen Klinik, Klinikum rechts der Isar zur Verfügung gestellt.

Klasse	Bezeichnung	Genetik
CK-Zellen	CK 17027	Ptf1a ^{+Cre} ; K-RAS ^{+LSL-G12D}
	CK 2190	Ptf1a ^{+Cre} ; K-RAS ^{+LSL-G12D}
	CK 9801	Ptf1a ^{+Cre} ; K-RAS ^{+LSL-G12D}
CKN2-Zellen	CKN2 1006	PTF1A ^{+Cre} ; K-RAS ^{+LSL-G12D} ; N2ko
	CKN2 1013	PTF1A ^{+Cre} ; K-RAS ^{+LSL-G12D} ; N2ko
	CKN2 3113	PTF1A ^{+Cre} ; K-RAS ^{+LSL-G12D} ; N2ko

2.1.6 Zellkulturreagenzien

DMEM / Ham's F-12 w/o L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Dulbecco's PBS (1x) w Ca & Mg	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Dulbecco's PBS (1x) w/o Ca & Mg	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Dulbeccos modified Eagle Medium (DMEM), high Glucose, w/o L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, (D)
FuGENE® 6	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Glasgow MEM BHK-21	Gibco BRL, Karlsruhe, (D)
L-Glutamin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, (D)
Non Essential Amino Acids (100x) (NEAA)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Opti-MEM® I	Gibco BRL, Karlsruhe, (D)
OptiPRO SFM	Gibco BRL, Karlsruhe, (D)
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Sodium Pyruvate Solution	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Trypsin-EDTA (1x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Tryptose Phosphate Broth (1x)	Gibco BRL, Karlsruhe, (D)

2.1.7 Viren

rVSV-GFP	Ein rekombinantes VSV, zwischen dem viralen G- und L-Genen wurde das Gen eines grün fluoreszierenden Proteins (GFP) als Transgen inseriert (Boritz, Gerlach et al. 1999).
rVSV-lacZ	Ein rekombinantes VSV, dass das Escherichia coli β -Galaktosidase-Gen (lacZ) zwischen den viralen G- und L-Genabschnitten enthält (Shinozaki, Ebert et al. 2004).
VSV-M51R	Eine VSV-Mutante mit einem einzelnen Aminosäureaustausch in Position 51 des M-Protein Gens. Methionin wurde durch Arginin ersetzt (Ebert, Harbaran et al. 2005).

2.1.8 Versuchstiere

Für die orthotopen Tumorimplantationen wurden männliche acht bis zehn Wochen alte und 20-25 g schwere C57 Black Six N Mäuse bei Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) erworben. Die verwendeten endogenen Ptf1a^{+/-Cre}; K-RAS^{+/-LSL-G12D}; p53^{fl/fl}-Mäuse wurden im zentralen Tierstall des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München gezüchtet und freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. Jens Siveke (II. Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar) zur Verfügung gestellt. Sie hatten einen gemischten genetischen Hintergrund (C57Bl/6, 129/SV) und es wurden sowohl männliche und weibliche etwa sieben bis zehn Wochen alte Tiere zur Injektion der intratumoralen VSV-Therapie verwendet.

Alle Tiere wurden in speziellen Käfigen zur Haltung von Mäusen (Maxi-Meiser-System/Thoren-Caging-System oder Tecniplast-IVC) auf entkeimtem Weichholzgranulat mit isolierter Luftzufuhr gehalten. Es wurden jeweils vier bis sechs Mäuse in einem Käfig gehalten (Grundfläche: 16 x 37 cm). Die Raumtemperatur der Tierhaltungsräume betrug 20-25°C und die Luftfeuchtigkeit 60-70 %. Die speziell als Tierhaltungsräume konzipierten Räume mit Klimatisierung und Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden, unterliegen einer personenlimitierter Zutrittskontrolle. Die Pflege erfolgte durch ausgebildete Versuchstierpfleger. Ernährt wurden die Tiere mit Alleinfutter-Pellets (Autoklaviertes Mäusefutter Fa. Altromin) und Leitungswasser (autoklaviertes Trinkwasser bei zweimaligem Flaschenwechsel pro Woche) aus Nippeltränken ad libitum. Das Hygienemanagement erfolgt gemäß den

Empfehlungen der FELASA und basiert auf der regelmäßigen Untersuchung von Sentinel-Tieren. Die Haltung der Tiere erfolgt in Umsetzung der in der EU-Richtlinie 86/609 festgelegten Bedingungen.

2.1.9 Software

Alle in dieser Arbeit eigenständig entworfenen Abbildungen und Tabellen wurden mit Microsoft Paint und Microsoft Excel erstellt und bearbeitet.

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Medien

BHK-21 (baby hamster kidney) Zellen wurden in Glasgow MEM BHK-21 (Gibco BRL) Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS, Biochrom AG), 1 % Tryptosephosphat (Gibco BRL) und 1 % Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH) kultiviert. Für die Kultivierung der A549 Zellen wurde folgendes Medium verwendet: DMEM, high Glucose (PAA Laboratories GmbH) ergänzt mit 10 % FCS und 1 % L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH). Alle verwendeten humane und murine pankreatischen Zelllinien (MIA PaCa-2, PANC-1, Su.86.86, DAN-G, Colo357, T3M4, CK 17027, CK 2190, CK 9801, CKN2 1013, CKN2 3113, CKN2 1006) wurden in DMEM/Ham's F-12 (PAA Laboratories GmbH) mit 10 % FCS, 1 % L-Glutamin und 1 % nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA, PAA Laboratories GmbH) gezüchtet. Für HuH-7 Zellen wurde DMEM, high Glucose mit folgenden Zusätzen verwendet: 10 % FCS, 1 % L-Glutamin, 1 % NEAA, 1 % Natrium Pyruvate Solution (PAA Laboratories GmbH).

2.2.2 Zellkultivierung und Passagierung

Alle Zelllinien wurden bei 37°C, 5 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre in einem CO₂-Begasungsbrutschrank von HERAcell[®] kultiviert. Gebrauchsfertige Medien wurden bei 4°C aufbewahrt und vor Behandlung der Zellen ca. 30 min bei Raumtemperatur vorgewärmt. Die Langzeitlagerung von Trypsin-EDTA und hitzeinaktiviertem FCS erfolgte bei -20°C. Alle zellbiologischen Versuche wurden unter aseptischen Bedingungen unter einem sterilen Hood (HERAsafe[®] KS18)

durchgeführt. Die Zelllinien wurden regelmäßig auf Mykoplasmen durch PCR-Nachweis überprüft.

Zur Passagierung und Aussaat adhärenter Zellen, wurden diese mit sterilem PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin-EDTA-Fertiglösung (PAA Laboratories GmbH) inkubiert bis sich einzelne Zellen von dem Flaschenboden zu lösen begannen. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium abgewaschen um das Trypsin zu inaktivieren und bei 4°C und 1200 rpm für 5 min abzentrifugiert. Die Pellets wurden in den entsprechenden Medien resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung wieder in neue Kulturflaschen umgesetzt. Die Zellen wurden meist in 75 cm²-Zellkulturflaschen (BD Biosciences) kultiviert und in einem Verhältnis von 1:5 – 1:10 alle 2-3 Tage passagiert. Zur Bestimmung von Zellzahlen wurden Neubauerzählkammern verwendet und die Zellen mit Trypanblau (Gibco BRL) angefärbt. Für die Durchführung von VSV-Infektionen an Zellen sowie zu deren Weiterbehandlung wurde ein separates S2-Hood und ein getrennter CO₂-Begasungsbrutschrank verwendet.

2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Zum Einfrieren wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA vom Flaschenboden abgelöst. In frischem Medium wurden die Zellen anschließend abzentrifugiert (5 min; 4°C; 1200 rpm). Die Pellets wurden in FCS mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und in 2 ml-Kryoröhrchen (NALGENE[®]) abgefüllt. Die Kryoröhrchen wurden über 24h zuerst bei -80°C in speziellen Behältern (Cryo 1°C Freezing Container 500 ml, NALGENE[™]) aufbewahrt, bevor sie dann in flüssigen Stickstoff bei -196°C zur langfristigen Lagerung überführt wurden.

Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und der Inhalt in 10 ml vorgewärmtes Medium gelöst. Danach wurde die Zellsuspension zentrifugiert (5 min; 4°C; 1200 rpm) und der DMSO enthaltende Überstand komplett entfernt. Die Pellets wurden nun wieder in dem entsprechenden Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen für die weitere Kultivierung abgefüllt.

2.2.4 Transfektion von Zellen

Alle durchgeführten Transfektionen wurden entweder mit Lipofectamine[™] 2000 (Invitrogen) oder FuGENE[®] 6 Transfection Reagent (Roche) durchgeführt.

Ausschließlich für die Transfektion von synthetischer doppelsträngiger RNA (Poly I:C) wurde FuGENE[®] 6 Transfection Reagent benutzt. Für die Transfektion der eingesetzten Reporterplasmide (pIFN- β -luc, pNF- κ B-luc, pIRF3-luc, pISRE-luc, pMX-luc) wurde Lipofectamine[™] 2000 verwendet. Die Transfektion wurde nach den jeweiligen Herstellerangaben in 24-Schalen-Platten durchgeführt. Es wurden 0,6 μ g Nukleinsäure pro Well verwendet, in einem Verhältnis von Nukleinsäure:Lipofectamine[™] beziehungsweise FuGENE[®] von 1 : 2,5. Die Transfektion erfolgte bei 37°C für vier Stunden, danach wurde das Transfektionsgemisch entfernt und durch frisches Medium ersetzt.

2.2.5 Luciferase-Reportergen-Assay

Für die Luciferase Reportergen Assays wurden 90 % konfluente 24-Well-Platten (ca. 10^5 Zellen/Well) in antibiotikumfreiem Medium hergestellt. Die Zellen wurden mit zwei verschiedenen Luciferase Plasmiden kotransfiziert. Es wurde jeweils der pCMV-RL-Plasmid mit einem anderen Reporter-Plasmid (pMX-luc, pNF- κ B-luc, pIRF3-luc, pIFN- β -luc, pISRE-luc, siehe Kapitel 2.1.4) kombiniert. Durch die Verwendung des pCMV-RL-Plasmids (Promega) konnte die gemessene Luciferase-Aktivität gegen die Transfektionseffizienz relativiert werden. Um eine Gesamtmenge von 0,6 μ g DNA pro Well zu erreichen wurde der Transfektionsmischung zusätzlich der leere Vektor pcDNA3.1 (Invitrogen) hinzugefügt. Die Menge der verwendeten Nukleinsäuren entsprach folgendem Schema:

0,6 μ g/Well = 0,1 μ g (Reporter-Plasmid) + 0,01 μ g (pCMV-RL) + 0,5 μ g (pcDNA3.1)

24 Stunden nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen je nach Versuchsreihe entweder mit VSV-M51R und einem MOI von 1 infiziert, mit Poly I:C, einem synthetisch hergestellten doppelsträngiger RNA-Analoga, mittels FuGENE[®] 6 nochmals transfiziert oder mit exogenem universalem Typ 1 Interferon inkubiert. Nach weiteren 20 Stunden wurde die Zellen mit 100 μ l Lysis Buffer pro Well (Promega) lysiert und die Luciferase-Aktivität in raw light units (RLUs) mit dem GloMax[™] 20/20 Luminometer (Promega) gemessen. Die Reportergeninduktion wurde nach dem Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega) nach Herstellerangaben bestimmt und die Firefly-Luciferaseaktivität wurde jeweils gegen die entsprechende Aktivität der Renilla-Luciferase normalisiert.

2.3 Virologische Methoden

2.3.1 Herstellung eines VSV-Stocks und Virusamplifikation

Für die Amplifikation der verschiedenen VSV wurden BHK-21 Zellen verwendet. Diese Zellen lassen sich erfahrungsgemäß gut mit VSV infizieren und gewährleisten eine erträgliche Vervielfältigung der Viren. Die Replikation der Viren hat eine Zelllyse zur Folge. Die Zellen runden sich ab, zeigen mikroskopisch eine verstärkte Lichtbrechung und lösen sich von dem Flaschenboden. Dieses Phänomen wird auch als zytopathologischer Effekt (CPE) bezeichnet. Zur Herstellung eines VSV-Vorrats für in vitro-Experimente wurden konfluente BHK-21 Zellen in 15 cm-Platten mit einem MOI von 0,001 mit dem gewünschten rekombinanten VSV infiziert. Das Virus wurde dazu in PBS verdünnt und dem Medium der BHK-21 Zellen zugefügt. Die Zellen wurden 48h bei 37°C bis ein kompletter zytopathologischer Effekt sichtbar war mit dem Virus inkubiert. Der Überstand wurde mit 2000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert um die enthaltenen Zellbestandteile zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand in der gewünschten Menge aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Anwendung gelagert.

2.3.2 Virusaufreinigung

Zur Herstellung eines größeren aufgereinigten VSV-Vorrats für in vivo-Versuche wurden zehn 90 % konfluente 15 cm-Platten mit BHK-21 Zellen vorbereitet. Die Zellen wurden mit VSV und einem MOI von 0,001 in 20ml OptiPRO SFM (Gibco BRL) je Schale infiziert. Nach etwa 48 Stunden oder sobald vollständiger CPE sichtbar war, wurde der Überstand in 50 ml-Falconröhrchen abgefüllt und bei 1500 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert um den Zelldetritus zu entfernen. Der Überstand wurde nun entweder bei -80°C gelagert oder direkt im Rahmen der Virusaufreinigung weiterverarbeitet. Um ausschließlich qualitativ hochwertige Viruspartikel zu isolieren musste nun das Amplifikationsprodukt gereinigt werden. Der Überstand wurde in Ultrazentrifugenflaschen abgefüllt (25 ml/Flasche) und bei 25000 rpm für 1 h bei 4°C zentrifugiert, um die Viren zu pelletieren. Vor der Zentrifugation wurden die Ultrazentrifugenröhrchen abgewogen und das Gegengewicht dementsprechend angepasst. Nach erfolgter Zentrifugation wurden die Pellets nacheinander jeweils in 500 µl kaltem PBS aufgelöst und in ein gemeinsames 15 ml-Falconröhrchen vereint. Um eine weitere Isolation der viralen Partikel zu erzielen wurde ein Sucrose-Gradient

in der Ultrazentrifugenflasche erstellt. Der hergestellte Gradient enthielt 7 ml sechzigprozentige, 6 ml dreißigprozentige und 3 ml zehnpromtente sterilfiltrierte Sucrose. Der in PBS gelöste Virus wurde vorsichtig auf die oberste zehnpromtente Sucroseschicht pipettiert und anschließend bei 2500 rpm bei 4°C eine Stunde lang zentrifugiert (siehe Abb. 2.1). Nach der Zentrifugation war eine milchig-gräuliche Schicht zwischen der dreißigprozentigen und sechzigprozentigen Sucrose sichtbar. Diese Schicht enthielt den aufgereinigten Virus und wurde mit einer 5ml-Spritze und einer 20 G x 1 ½ Nadel behutsam entfernt und in der gewünschten Menge in Eppendorfgefäße aliquotiert. Die Lagerung der Eppendorfgefäße erfolgte bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch.

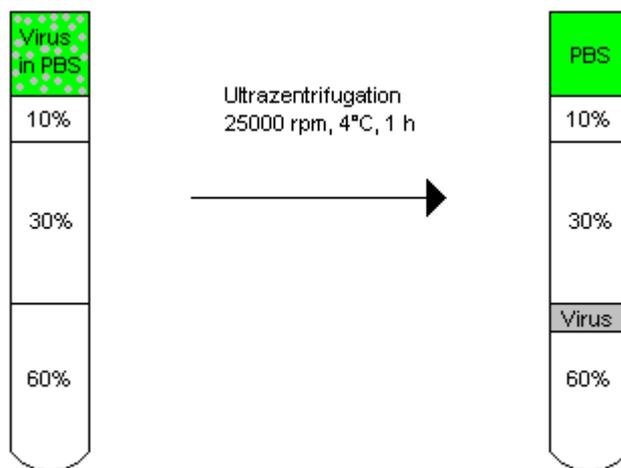


Abb. 2.1 Virusaufreinigung mittels Ultrazentrifugation und Sucrose-Gradient. Es wurde ein Sucrose-Gradient mit 7 ml sechzigprozentiger, 6 ml dreißigprozentiger und 3 ml zehnpromtente sterilfiltrierter Sucrose hergestellt. Der in PBS gelöste Virus wurde vorsichtig auf die Oberfläche hinzugegeben. Nach Ultrazentrifugation bei 25000 rpm bei 4°C für eine Stunde war der konzentrierte Virus zwischen der sechzigprozentigen und dreißigprozentigen Sucrose-Schicht als milchig-gräuliche Bande sichtbar.

2.3.3 Virale Titerbestimmung mit TCID₅₀ und Plaqueassay

Die meisten viralen Titerbestimmungen wurden mit Hilfe des 50 % Tissue Culture Infective Dose Assays (TCID₅₀) durchgeführt. Der TCID₅₀ Assay ist ein statistisches Auswertungsverfahren um die Viruslast zu quantifizieren. Zur Durchführung wurden konfluente 96-Schalen-Platten mit BHK-21 Zellen und je 100 µl Medium/Well verwendet. Für jede zu untersuchende Probe wurde eine dekadische

Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-9} in OptiPRO SFM mit 1 % L-Glutamin erstellt. Es wurden jeweils 100 μ l/Well von jeder Verdünnungsstufe auf vier Wells der 96-Schalen-Platten übertragen. Es war wichtig nach jeder Verdünnungsstufe die Pipettenspitze zu wechseln um eine getrennte Bewertung der Verdünnungsstufen zu gewährleisten. Nach 48-72 h wurden die Platten unter dem Lichtmikroskop begutachtet. Der virale Titer wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{TCID}_{50}/\text{ml} = 1/10^D \quad \text{mit} \quad D = A - (B/100 - 0,5) \times C$$

A:	dekadischer Logarithmus der letzten Verdünnung, bei der 100 % der Näpfe einen zytopathologischen Effekt (CPE) zeigen
B:	Summe der prozentual positiven Näpfe ($B = 100 \% + \text{Prozent der positiven Näpfe in der nächsthöheren Verdünnungsstufe}$)
C:	dekadischer Logarithmus der verwendeten Verdünnungsstufe ($C = 1$ für zehnfache Verdünnung)
D:	negativer dekadischer Logarithmus der TCID_{50} pro verwendetem Volumen (100 μ l)

Die Titerbestimmung des VSV-Stocks wurde mit Hilfe des Plaque Assays durchgeführt. Bei dem Paquetest wurden BHK-21-Monolayer mit verschiedenen Verdünnungsstufen des Virusstocks infiziert und anschließend mit einem halbfesten Agarosemedium beschichtet. Durch das visköse Agarosemedium breitet sich das Virus nur unmittelbar um die lysierten Zelle aus und es entstehen einzelne Löcher (=Plaques) im konfluenten Zellrasen. Für den Plaque Assay wurden konfluente 6-Schalen-Platten mit BHK-21 Zellen vorbereitet (ca. 10^6 Zellen/Well). Aus den Virusproben wurde eine dekadische Verdünnungsreihe von 10^{-2} bis 10^{-9} in OptiPRO SFM mit 1 % L-Glutamin hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden jeweils 1 ml pro Well auf drei verschiedene Näpfe hinzugefügt. Das Inokulum wurde 1 h bei 37°C auf den 6-Schalen-Platten belassen und alle 15 min leicht geschwenkt. Darauf folgend wurde der Überstand entfernt und die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen. Es wurde nun ein Gemisch aus 25 ml einprozentiger handwarmer Agarose und 25 ml vorgewärmtes BHK-21-Medium auf die Wells verteilt (2 ml/Well). Die Platten wurden unter dem Hood bei Raumtemperatur belassen bis sich das Agarosegel selbständig verfestigt hatte. Nach zwei Tagen im Inkubator wurde die

Agarose vorsichtig mit einem Spatel entfernt und die Zellen mit Kristallviolett (0,5 % Kristallviolett; 5 % Formaldehyde; 0,8 % NaCl und 50 % Ethanol) für 10-30 min angefärbt wie in Kapitel 2.6.5 detailliert beschrieben. Die Plaques repräsentierten Zonen mit lysierten Zellen und stellten sich durchsichtig als Löcher (= Plaques) im Zellrasen dar, wohingegen sich die intakten Zellen violett anfärben. Der resultierende Virustiter wurde nach folgender Formel berechnet und in der Einheit plaque forming units pro ml (pfu/ml) angegeben:

Titer [pfu/ml] = (1/Verdünnungsfaktor) x Anzahl der Plaques in dieser Verdünnungsstufe

Der endgültige Titer wird durch die Berechnung des Durchschnitts von den Titern aller zählbaren Näpfe ermittelt.

2.3.4 VSV-Replikationskinetik

Um den zeitlichen Replikationsverlauf von rVSV-GFP und VSV-M51R in verschiedenen pankreatischen Zelllinien zu demonstrieren wurden virale Wachstumskurven erstellt. Hierzu wurden konfluente 6-Schalen-Platten (ca. 10^6 Zellen/Well) der jeweiligen Zelllinie verwendet. Es wurden jeweils zwei Näpfe mit einer Multiplicity of infection (MOI) von 1 und zwei Näpfe mit einem MOI von 0,001 mit Virus infiziert. Der virologische Begriff „MOI“ beschreibt das zahlenmäßige Verhältnis von Viruspartikeln zu deren Zielzellen. Die beiden übrigen Kavitäten dienten als Negativkontrolle und es wurde PBS anstatt VSV zur Kontrollinfektion verwendet.

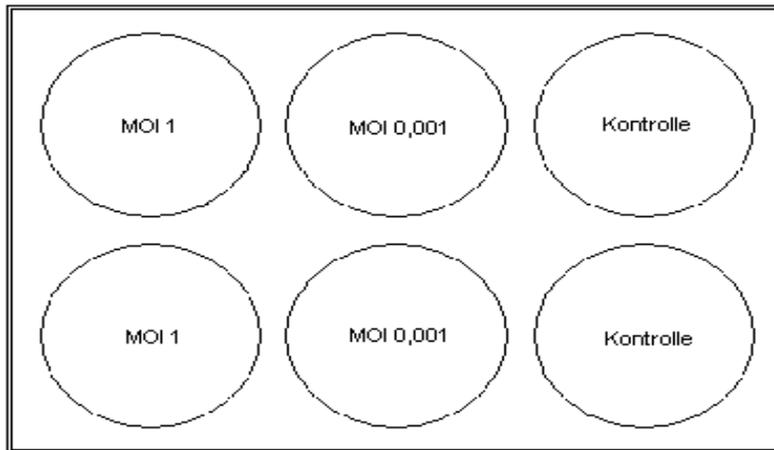


Abb. 2.2 Versuchsaufbau für Replikationskinetik. Jeweils zwei 90 % konfluente Wells der zu untersuchenden Zelllinie wurden mit einem MOI von 1 und einem MOI von 0,001 für 30 min mit VSV infiziert. Zwei Wells dienten als Negativkontrolle. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden jeweils 100 µl des Überstandes abgenommen und die viralen Titer mittels TCID₅₀ Assay bestimmt.

Vor der Infektion mit VSV wurden die Zellen 2-3 Mal mit PBS mit Ca/Mg gewaschen. Das Virus wurde je nach MOI in PBS mit Ca/Mg verdünnt. Es wurden jedem Napf 500 µl der Verdünnung hinzugefügt. Das Inokulum wurde für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Zell-Monolayer belassen. Alle 2 min wurden die Platten vorsichtig geschwenkt um das Inokulum möglichst gleichmäßig zu verteilen und eine Benetzung des kompletten Zellrasens zu erreichen. Nach 30 min wurde das Inokulum entfernt und die Zellen erneut drei Mal mit PBS gewaschen. Danach wurde neues Medium zugegeben und die Zellen wieder bei 37°C und 5 % CO₂ in den Begasungsbrutschrank inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (4, 8, 12, 16, 24) Stunden nach Infektion wurden nun jeweils 100 µl des Überstandes bei -80°C eingefroren. Die Virustiter der Überstände wurden mittels TCID₅₀ Assay ermittelt.

2.3.5 Interferon Protection Assay

Dieser Versuch wurde in 24-Schalen-Platten in Duplikaten durchgeführt. Es wurden ca. 2×10^5 Zellen pro Kavität ausgesät. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (10, 100, 1000 IU/ml) von universalem Typ 1 Interferon (PBL Biomedical Laboratories) in zellspezifischem Medium (500µl/Well) vorbehandelt. Nach 12 h Inkubation wurden die Zellen dreimalig mit PBS gewaschen und anschließend

mit einem MOI von 1 mit rVSV-GFP infiziert. Eine halbe Stunde nach der Infektion wurden die Zellen wiederum drei Mal mit PBS gewaschen und darauffolgend neues Medium hinzugefügt. Es wurden 100 µl-Überstände, unmittelbar nach der Infektion, sowie 24 h danach, bei -80°C eingefroren und der Titer mittels TCID₅₀ Assay bestimmt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Transformation von kompetenten Bakterien

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transformationen erfolgten unter Verwendung speziell geeigneter *Escherichia coli* Stämme (Library Efficiency[®] DH5α[™], Invitrogen) nach dem angegebenen Herstellerprotokoll. Bakterien wurden bei -80°C gelagert und zur Nutzung langsam auf Eis aufgetaut. Es wurde jeweils 1 µg Plasmid-DNA zu 50 µl chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen hinzugefügt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakterienzellen wurden nun einem Hitzeschock bei 42°C für 45 s ausgesetzt. Nach dem Abkühlen der Zellen auf Eis für weitere 2 min wurde jedem Ansatz 900 µl raumtemperiertes LB-Medium hinzugefügt. Die Proben wurden im Brutschrank bei 37°C für 1 h und leichtem Schütteln inkubiert und anschließend auf vorgewärmte ampicillinhaltige LB-Agarplatten (100 µg/ml) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt. Durch das Antibiotikum wurde gewährleistet, dass nur diejenigen Bakterien Kolonien ausbildeten, in die das Plasmid mit dem spezifischen Resistenzgen erfolgreich hineinkloniert wurde.

2.4.2 Plasmidamplifikation und Reinigung

Zur Herstellung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde das QIAfilter[®] Midi Kit (Qiagen) verwendet. Die einzelnen Schritte wurden gemäß dem Herstellerprotokoll ausgeführt. Die Bakterienkolonien wurden mit einer Pipettenspitze von LB_{amp}-Agarplatten selektiert und in 100 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin-Zusatz über Nacht unter leichtem Schütteln bei 37°C gezüchtet.

2.4.3 Messen von Nukleinsäure-Konzentrationen

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde das SmartSpec™ Plus Spektrophotometer (Bio-Rad) verwendet. Die Absorption wurde bei UV-Licht mit einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Vor der Messung der Proben erfolgte die Leerwertbestimmung mit 100 µl reinem destilliertem Wasser. Um die Reinheit der Proben zu bestimmen wurde der Quotient der Absorption von 260 nm zu 280 nm bestimmt. Proben mit einem Absorptionsverhältnis (A_{260}/A_{280}) von 1,7-2,0 wurden als ausreichend rein angesehen. Die Plasmid-DNA wurde für die Messung 1:50 mit ultrareinem Wasser verdünnt.

2.4.4 Generierung der Microarray-Daten

Die Microarray-Daten wurden freundlicher Weise von Priv.-Doz. Dr. Jens Siveke zur Verfügung gestellt. Zur Akquirierung und Analyse der Microarray-Daten wurden Affymetrix Genships eingesetzt. Für die Analyse wurden sechs murine Zelllinien mit niedriger Passagenzahl (unter acht Passagen), die aus den Pankreastumoren von konditionalen endogenen $Ptf1a^{+/Cre}; K-RAS^{+/LSL-G12D}$ und $Ptf1a^{+/Cre}; K-RAS^{+/LSL-G12D}; N2ko$ -Mausmodellen generiert wurden, verwendet. 1-5 µg markierte RNA wurde gemäß den Herstellerangaben mit dem Maus Expressions Gen Chip Array hybridisiert (Affymetrix Mouse Genome 430A 2.0 Array). Die Gen Chips wurden unter Benutzung der Affymetrix Microarray Suite 5.0 Software (MAS 5.0) gescannt und analysiert, wie bereits zuvor beschrieben (Siveke, Einwachter et al. 2007).

2.5 Tierversuche

2.5.1 Tumorzellimplantation

Die Tumorumplantation erfolgte unter sterilen Kautelen. Während der Operation wurden die Mäuse mit einer intraperitoneal applizierten Kombinationsnarkose aus Medetomidin ($\alpha 2$ -Adrenorezeptor-Agonist) 0,5 mg/kg; Midazolam (Benzodiazepin) 5 mg/kg und Fentanyl (Opioid) 0,05 mg/kg anästhesiert. Die Tiere bekamen Bepanthen-Augensalbe aufgetragen und Ohrmarkierungen gestochen, um eine sichere Identifizierung zu gewährleisten. Die Tiere wurden auf die rechte Seite gelagert und das Operationsgebiet mit einer speziellen elektrischen

Tierschermaschine (AESCULAP Exacta GT415) rasiert. Nach erfolgter Rasur wurde der Schnittbereich großzügig mit einer alkoholhaltigen antiseptischen Lösung desinfiziert. Zur Eröffnung der linksseitigen Bauchhöhle wurde die Haut mit einer Pinzette gefasst und ein kleiner subkostaler Hautschnitt gesetzt, der dann mit der Schere auf eine Länge von ca. 10 mm erweitert wurde. Vorsichtig wurde anschließend die seitliche Bauchmuskulatur durchtrennt und das Peritoneum eröffnet. Mit einem in isotonischer Kochsalzlösung getauchten Tupferstäbchen wurde die Milz mit den angrenzenden Pankreasanteilen aufgesucht, mobilisiert und behutsam aus der Peritonealhöhle luxiert (siehe Abb. 2.3).

Die in der gewünschten Konzentration vorbereiteten auf Eis gelagerten Zellsuspensionen wurden vor der Injektion nochmals aufschüttelt. Mit einer HAMILTON Spritze (705 CT 50 µl 22S, Hamilton Bonadoz AG) wurden jeweils 5×10^5 - 1×10^6 Zellen in 20 µl PBS über eine 29 G Kanüle unter Sichtkontrolle in den Pankreasschwanz injiziert (siehe Abb. 2.3). Während der Injektion war eine leichte Blasenbildung und Aufhellung im Injektionsareal sichtbar. Nach dem Herausziehen der Kanüle wurde sofort ein Tupferstäbchen über die Einstichstelle gehalten, um eine vermeintliche Blutung zu stoppen. Das Tupferstäbchen wurde anschließend vorsichtig zur Seite abgerollt. Die Verwendung eines elektronischen Kauters war nicht notwendig. Nach Ausschluss einer Blutungsquelle wurde das Pankreas und die Milz vorsichtig mit feuchten Tupferstäbchen in den Bauchraum zurückverlagert und mit etwas Kochsalzlösung befeuchtet. Der Verschluss der Bauchhöhle erfolgte mit einem 6-0er Vicrylfaden. Zunächst wurde das Peritoneum mit der angrenzenden Bauchmuskulatur und anschließend die Haut jeweils fortlaufend verschlossen. Nach Beendigung der Hautnaht wurde die Narkose mit einer Kombinationsinjektion aus Atipamezol (α 2-Adrenorezeptor-Antagonist) 2,5 mg/kg; Flumazenil (Benzodiazepin-Antagonist) 0,5 mg/kg, Naloxon (Opioidantagonist) 1,2 mg/kg subkutan antagonisiert und das Tier auf eine Wärmematte platziert. Erst wenn das Tier sich selbstständig bewegte und wach erschien wurde es in den Käfig zurückgesetzt.

Zur Schmerztherapie wurden den Tieren Buprenorphin (Temgesic®) 0,05 mg/kg und Carprofen (Rimadyl®) 4 mg/kg subkutan gespritzt. Die analgetische Therapie wurde am Folgetag nach 24 Stunden wiederholt und bei deutlichen Schmerzzeichen auch länger fortgesetzt.

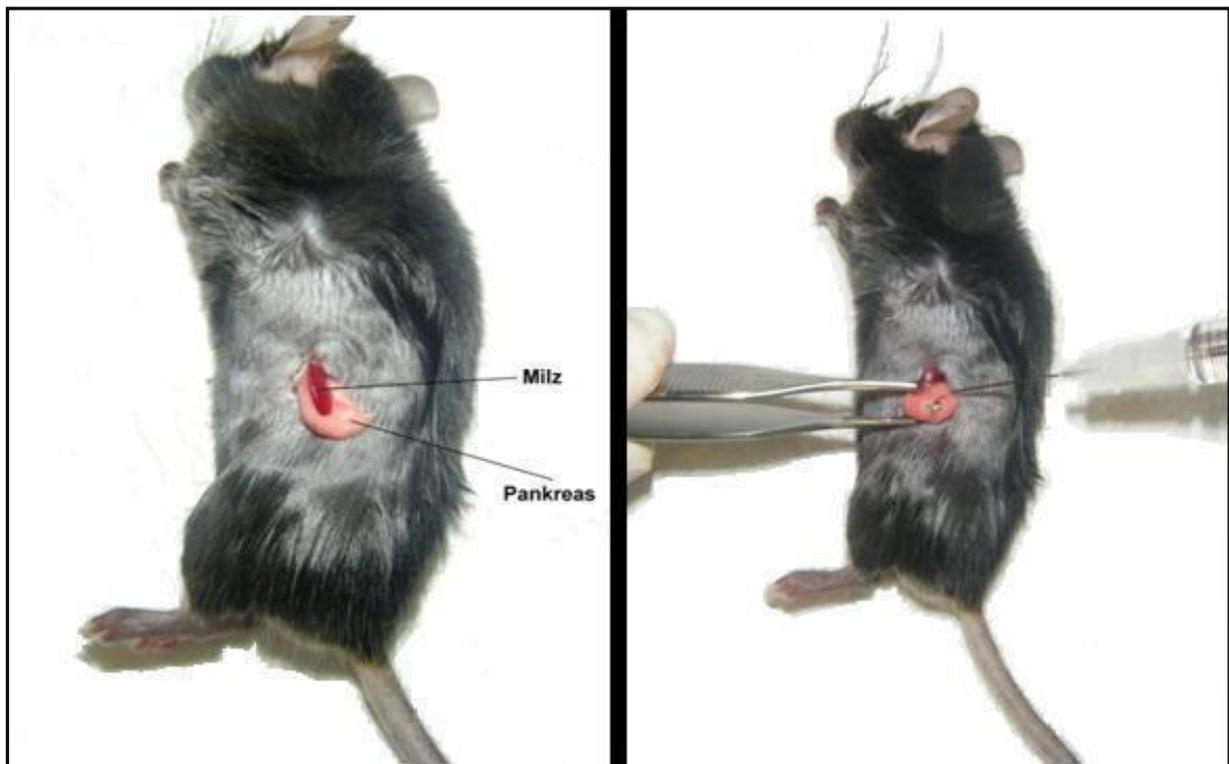


Abb. 2.3 orthotope Tumorzellimplantation. Linksseitig Operationssitus. Rechtsseitig Injektion von jeweils $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ Zellen in $20 \mu\text{l}$ PBS in das Pankreas.

2.5.2 Magnetresonanztomographie

Um sicherzustellen, dass alle Mäuse Tumore in ausreichender Größe entwickelt haben, wurden T2-gewichtete MRT-Aufnahmen des Abdomens angefertigt. Bei den orthotop-implantierten Mäusen erfolgte der Scanvorgang etwa zwei Wochen nach der Tumorzellimplantation und bei den endogenen CKP-Mäusen ca. sechs Wochen postpartum. Es wurde ein klinischer 1,5 Tesla Magnetresonanztomograph von Philips verwendet. Die Versuchstiere wurden hierzu mit Isofluran anästhesiert. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit einem fünfprozentigen Isofluran-Sauerstoffgemisch in einer isolierten Kammer. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde der Isofluranasanteil auf 2 % reduziert. Um ein Absinken der Körpertemperatur während des Scanvorgangs zu vermeiden wurden die Mäuse auf einen mit warmem Wasser gefüllten Gummihandschuh platziert.

2.5.3 VSV-Behandlung

Etwa drei bis vier Wochen nach Tumorzellimplantation beziehungsweise durch MRT-Kontrolle gesichertem Tumorwachstum wurde die VSV-Therapie eingeleitet. rVSV-lacZ- oder rVSV-GFP-Suspensionen wurden intratumoral in die orthotopen und endogenen Pankreastumore injiziert. Jedes Tier erhielt $3,3 \times 10^6$ pfu in 100 μ l PBS. Hierzu wurde das Abdomen der Maus durch die zuvor beschriebene Prozedur (Kapitel 2.5.1) wieder eröffnet und die Virussuspension mittels einer 30G x $\frac{1}{2}$ Nadel unter Sichtkontrolle intratumoral in die orthotopen beziehungsweise endogenen Tumore appliziert. Eine Kauterisation war dabei nicht notwendig. Die Anästhesie und Schmerztherapie erfolgte auf gleiche Weise wie bei der Tumorzellimplantation. 30 min und 24 h nach VSV-Injektion wurden die Mäuse geopfert. Für die VSV-Titerbestimmungen wurde das Tumorgewebe in Kryoröhrchen überführt, auf Trockeneis eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Das Tumorgewebe für die histologische Begutachtung wurde wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben weiterverarbeitet.

2.5.4 VSV-Titerbestimmung aus homogenisierten Tumoren

Um die Virusreplikation in den Tumoren quantitativ zu untersuchen mussten Virustiter zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten (30 min und 24 h nach VSV-Therapie) bestimmt werden. Für die virale Titerbestimmung war es notwendig den explantierten Tumor mit Hilfe eines manuellen Glashomogenisators (Kleinfeld Labortechnik GmbH) mechanisch zu homogenisieren. Vor der Homogenisierung wurde das bei -80°C gelagerte Tumorgewebe zuerst gewogen und 10 μ l PBS pro mg Tumorgewebe hinzugefügt. Anschließend wurden die Tumore einzeln mit separaten Glashomogenisatoren auf Eis zerkleinert und die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 1500 rpm bei 4°C 10 min abzentrifugiert. Die Virustiter des Homogenisats wurden schließlich mittels TCID_{50} Assay bestimmt, wie in Kapitel 2.3.3. beschrieben.

2.6 Histologie und Färbungen

2.6.1 Präparation von Tumorgewebe

Das explantierte Tumorgewebe wurde mittels einer Standard-HE-Färbungen und einer speziellen β -Galaktosidasefärbungen angefärbt. Die Färbungen erfolgten ausschließlich an Gefrierschnitten. Zur Herstellung der Gefrierschnitte wurde das explantierte Tumorgewebe, 24 h nach Virusinjektion, teilweise vorübergehend für 1-2 h mit vierprozentigem PFA inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe in Plastikschaalen gebettet und O.C.T.TM (Sakura Tissue-Tek[®]) hinzugegeben. Auf Trockeneis wurden die Präparate eingefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Am Kryostatmikrotom wurden bei -20°C, 5 μ m dicke Schnitte angefertigt und auf einen unbeschichteten raumtemperierten Objektträger platziert. Die fertigen Gefrierschnitte wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert und vor dem Färbvorgang mindestens zwei Stunden luftgetrocknet.

2.6.2 HE-Färbung von Gefrierschnitten

Die HE-Färbung an Gefrierschnitten wurde nach dem folgenden Standardprotokoll durchgeführt:

1. Fixierung mit PFA 4% 15 min
2. Waschen mit PBS zwei Mal
3. destilliertes Wasser 5 min
4. Mayer's Hämatoxylin 30 s
5. mit fließendem Leitungswasser 10 min waschen
6. 0,33% alkoholische Eosinlösung 5 min
7. 96% Ethanol 25 s
8. Isopropanol 25 s
9. Xylol (Histoclear) 1,5 min
10. Deckglas plazieren mit tropfenweise Pertex

2.6.3 β -Galaktosidasefärbung an CK 9801 Zellen

Zur Etablierung der β -Galaktosidasefärbung an Tumorgewebe wurden vorerst CK 9801 Zellen nach rVSV-lacZ-Infektion mit Hilfe des β -Galaktosidase Staining Kits (Roche Diagnostics GmbH) nach Herstellerprotokoll angefärbt. Hierzu wurden CK 9801 Zellen in 24 Lochplatten vereinzelt (5×10^4 Zellen/Well) und mit einem MOI von 1 mit rVSV-lacZ infiziert. Nach 6-10 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit vierprozentiger PFA-Lösung für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach erfolgter Fixierung wurden die Zellen nochmals drei Mal mit PBS gewaschen. Nun wurde die Färbung mit dem β -Galaktosidase Staining Kit durchgeführt. Hierzu wurde die Färbelösung nach Herstellerprotokoll vorbereitet und 500 μ l davon zu jedem Napf hinzugegeben. Die Zellen wurden bei 37°C für 0,5-3 h inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet.

2.6.4 β -Galaktosidasefärbung von Gefrierschnitten

Nach erfolgreicher Etablierung der β -Galaktosidasefärbung in vitro sollten nun auch die histologischen Präparate gefärbt werden. Die β -Galaktosidasefärbung an Tumorgewebe erfolgte an Gefrierschnitten nach einem sehr sensitiven Protokoll, dass bereits geringste Mengen β -Galaktosidaseaktivität detektiert. Im Gegensatz zu einer Standard- β -Galaktosidasefärbung stellen sich bei diesem Protokoll positiv gefärbte Zellen oder Gewebsareale nicht hellblau sondern charakteristischerweise eher dunkelblau bis violett dar.

Die 5 μ m dicken Gefrierschnitte wurden zuvor mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Anschließend wurden die Kryoschnitte 10 min in einem Fixationspuffer (2 ml EDTA (0,5M) + 2 ml $MgCl_2$ (1M) + 0,2 ml Glutaraldehyd (25 %) + 200 ml PBS) fixiert. Nach abgeschlossener Fixation wurden die Schnitte dreimalig mit 10 ml PBS + 0,2 ml $MgCl_2$ (1M) gewaschen und anschließend mit der Färbelösung (100 μ l NBT (50mg/ml) + 200 μ l X-gal (20 mg/ml in DMSO) + 40 μ l $MgCl$ (1M) + 20 ml PBS) 12-20 Stunden bei 37°C in einen CO_2 -freien Brutschrank bei vollkommender Dunkelheit inkubiert. Darauffolgend wurden die Präparate dreimalig jeweils 4 min mit PBS gewaschen. Ein Teil der Schnitte wurde zusätzlich mit einer alkoholischen Eosinlösung für 3 min gegengefärbt. Die Dehydrierung (96% Ethanol 25 s, Isopropanol 25 s) und abschließende Klärung mit dem organischen Lösemittel Xylol (HistoClear 1,5 min) erfolgte dann bei allen Schnitten analog zu der

bereits beschriebenen HE-Färbung. Nach Abschluss des Färbevorgangs wurde auf die Objektträger tropfenweise Pertex hinzugegeben und ein Deckglas auf die gefärbten Gewebeschnitte plaziert.

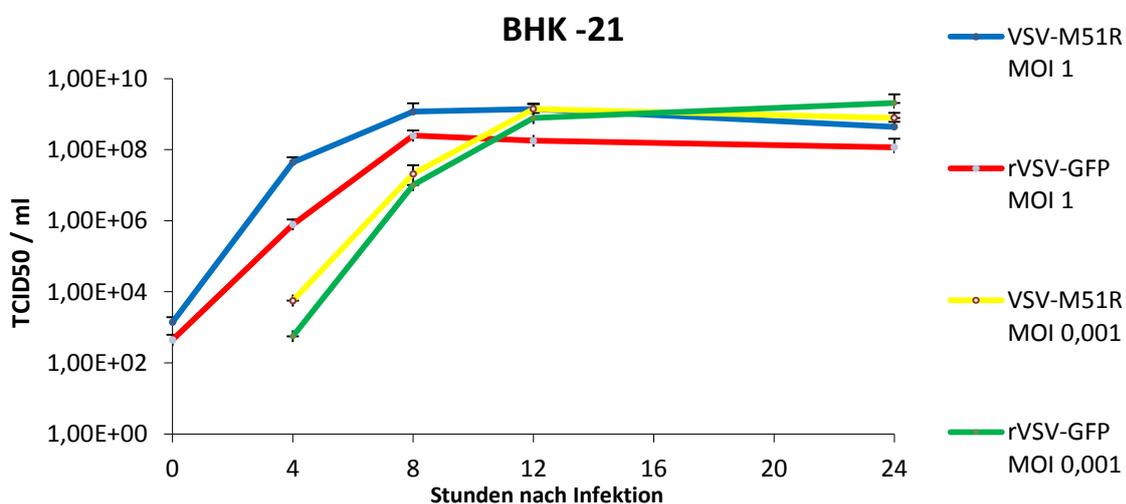
2.6.5 Kristallviolett-färbung

Die Kristallviolett-färbung wurde benötigt um die mit dem Plaque Assay durchgeführten viralen Titerbestimmungen zu analysieren. Dazu wurden konfluente 6-Schalen-Platten mit BHK-21 Zellen auf die in Kapitel 2.3.3 beschriebene Weise mit der jeweiligen Verdünnungsstufe des VSV-Stocks infiziert und anschließend mit einem Gemisch aus 25 ml einprozentiger handwarmer Agarose und 25 ml vorgewärmtem BHK-21-Medium beschichtet. 48 Stunden nach Infektion wurden die Agaroseschicht entfernt und die überlebenden Zellen mit einer Kristallviolettlösung (0,5 % Kristallviolett; 5 % Formaldehyde; 0,8 % NaCl und 50 % Ethanol) angefärbt. Hierzu wurde jeder Napf mit 1-2 ml Kristallviolettlösung versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde die Kristallviolettlösung mit einer 10ml-Pipette entfernt und in einem Sonderabfall entsorgt. Die verbleibenden Farbreste wurden mit Leistungswasser abgespült und die Platten bei Raumtemperatur getrocknet.

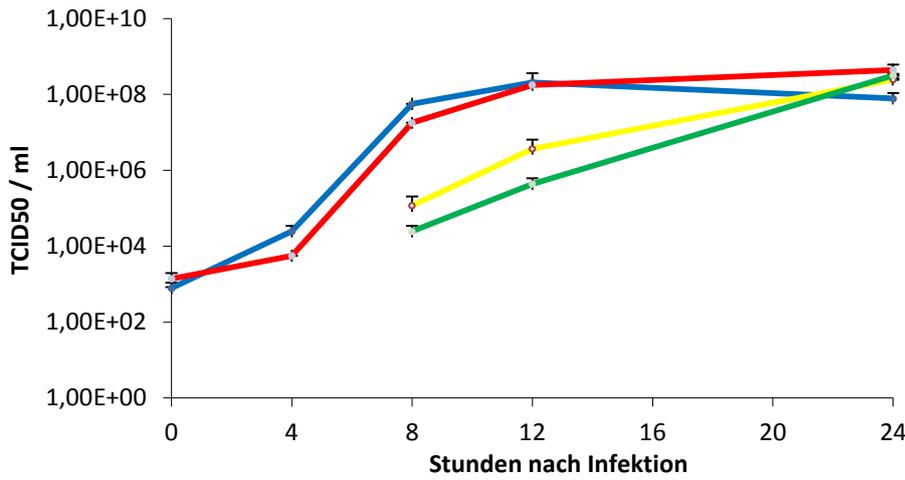
3 Ergebnisse

3.1 Replikationskinetik von VSV

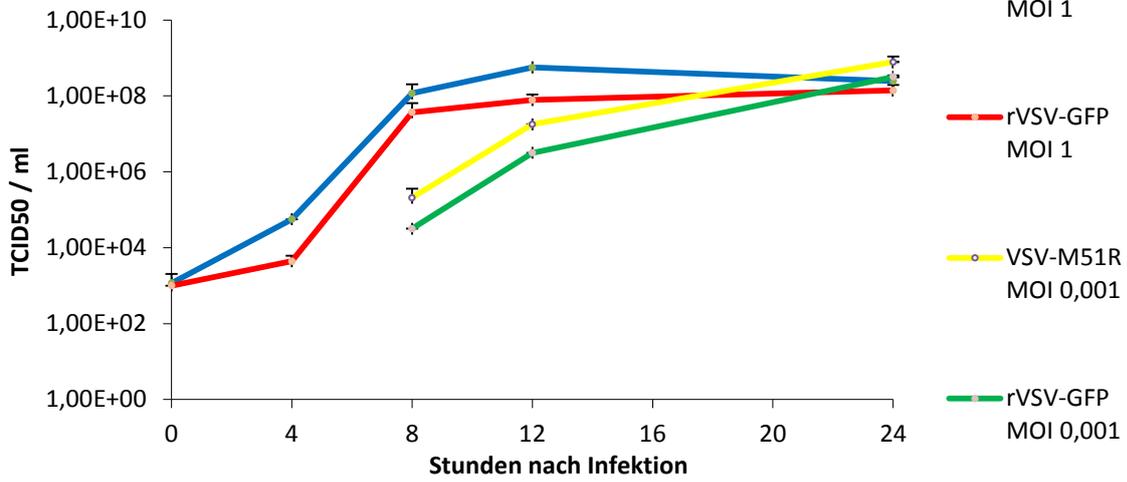
Ziel dieses Versuches war es die VSV-Replikation in pankreatischen Tumorzellen zu untersuchen. Hierzu wurden verschiedene humane (Panc-1, MIA PaCa-2) und murine (CK 17027, CK 2190, CK 9801, CKN2 1013, CKN2 3113, CKN2 1006) pankreatische Tumorzelllinien in separaten Versuchen mit rVSV-GFP oder VSV-M51R mit einem MOI von 1 oder 0,001 infiziert. Anschließend wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0, 4, 8, 12, 24 Stunden nach Infektion) Überstände abgenommen und die viralen Titer mittels TCID₅₀ Assay bestimmt. Als Kontrollzelllinie wurden BHK-21 Zellen verwendet, in denen rVSV-GFP und VSV-M51R erfahrungsgemäß sehr effizient replizieren. Die in Abbildung 3.1 dargestellten zeitlichen Verläufe der viralen Titer zeigen eine potente und relativ einheitliche Virusreplikation in allen untersuchten Zelllinien. Nach 24 Stunden wurden maximale Titer von 10⁷-10⁹ TCID₅₀/ml in sämtlichen Zelllinien unabhängig von der initialen Infektionsdosis gemessen. Der Ausgangstiter unmittelbar (0 h) nach Infektion lag bei der höheren Infektionsdosis (MOI 1) zwei bis drei log-Stufen höher als bei der niedrigeren Infektionsdosis (MOI 0,001). Dementsprechend erreichten MOI 1-infizierte Zelllinien bereits nach 8-12 Stunden eine Plateauphase. Die mit einem MOI von 0,001 infizierten Zellen erreichten diese Plateauphase etwas verzögert und je nach Zelllinie zwischen 10 und 24 Stunden nach Infektion. Im Replikationsverlauf zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen rVSV-GFP und der Virusmutante VSV-M51R. Beide Virusvarianten zeigten vergleichbare Kurvenverläufe und erreichten annähernd gleichhohe Virustiter 24 Stunden nach Infektion.



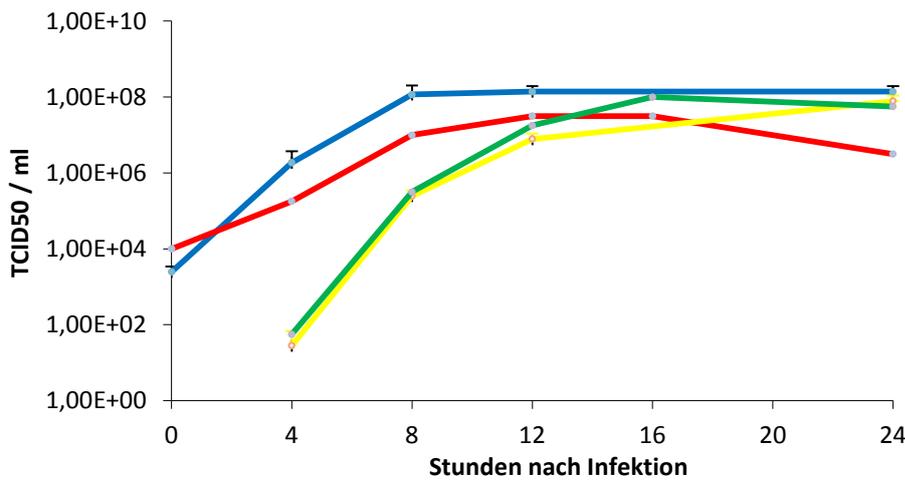
PANC-1



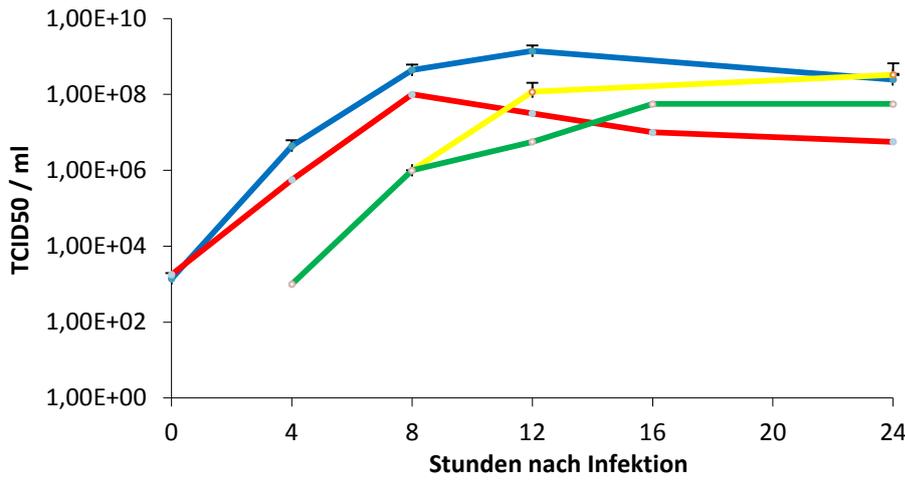
MIA PaCa-2



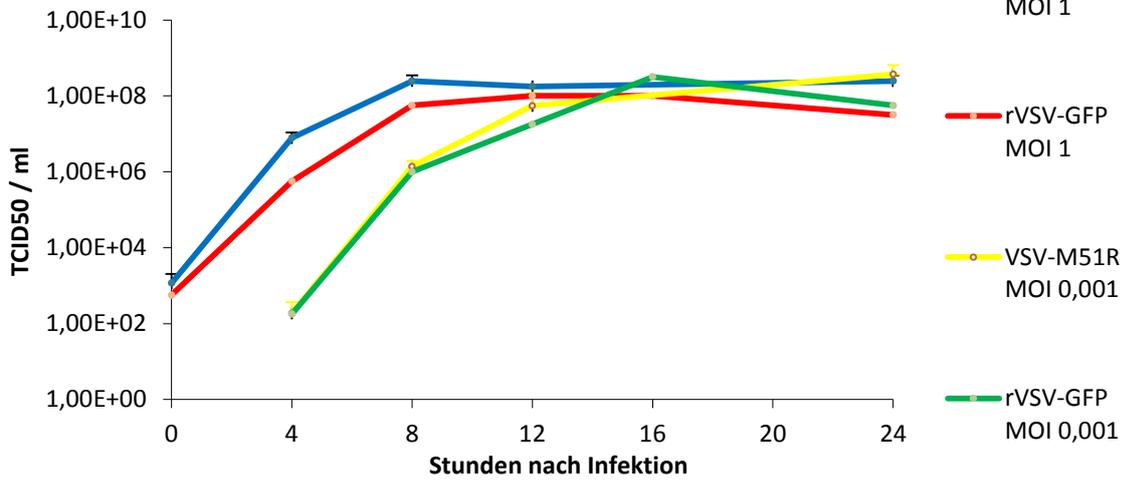
CK 17027



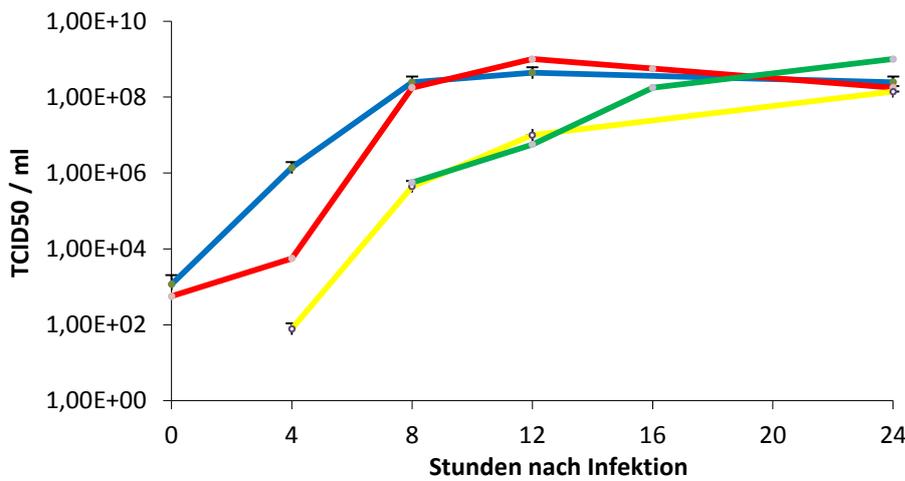
CK 2190



CK 9801



CKN2 1006



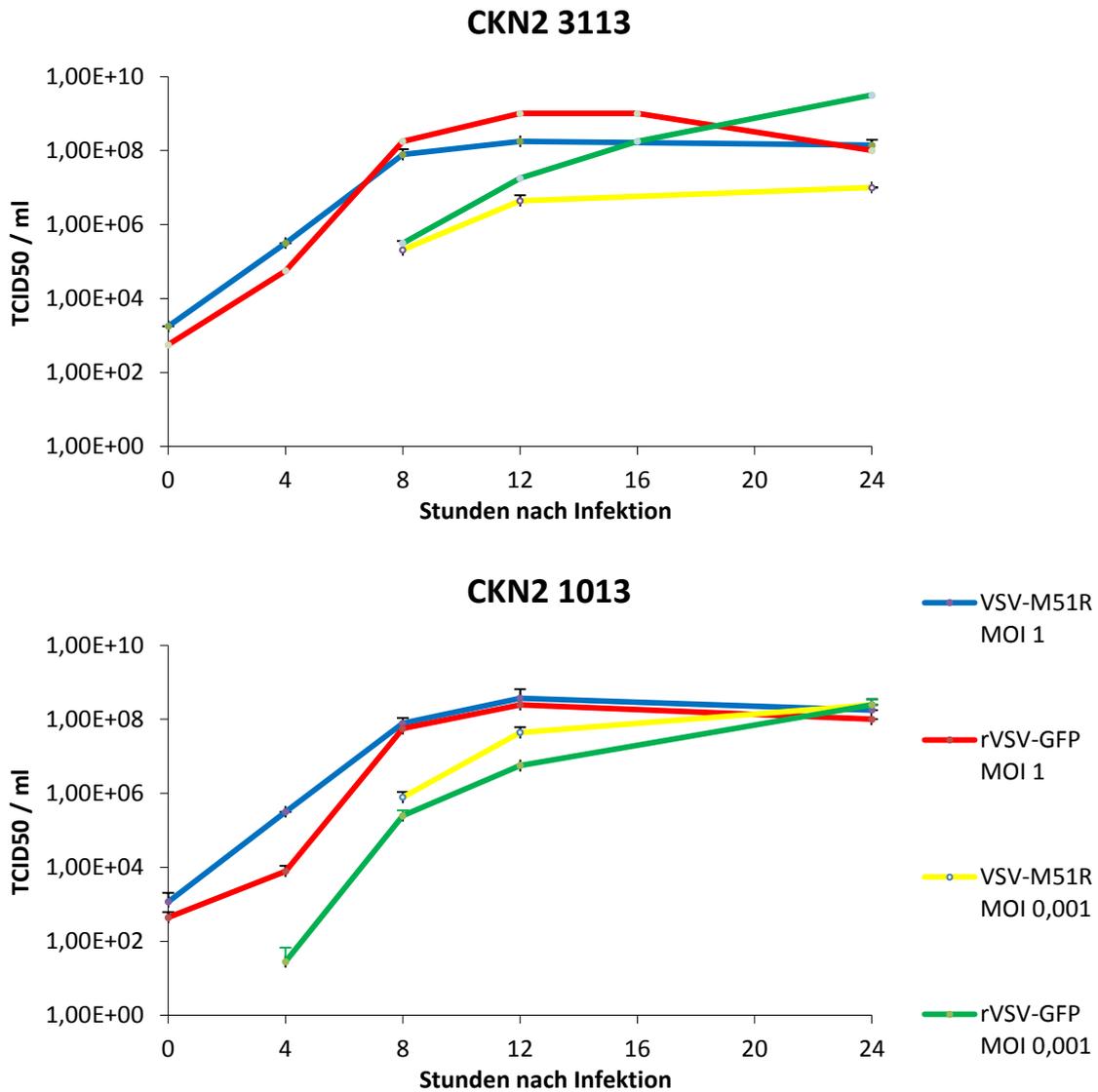


Abb. 3.1 Replikationskinetik von rVSV-GFP und VSV-M51R in pankreatischen Tumorzelllinien. Verschiedene Zelllinien wurden mit rVSV-GFP und VSV-M51R mit unterschiedlichen Infektionsdosen (MOI 1 oder MOI 0,001) infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion wurden Überstände von 100 μ l abgenommen und der Virustiter mittels TCID₅₀ Assay bestimmt. Die Versuche wurden in Duplikaten durchgeführt und zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen.

3.2 Interferon Protection Assay

Es ist bekannt, dass Interferone einen starken antiviralen Effekt besitzen und die VSV-Replikation in gesunden Zellen dadurch effektiv supprimiert werden kann. Um den Einfluss von Typ 1 Interferon auf die virale Replikation in den unterschiedlichen pankreatischen Tumorzellen zu untersuchen wurde der folgende Versuch durchgeführt. Der Interferon Protection Assay ist eine unkomplizierte Methode die Sensitivität der verschiedenen Zelllinien auf exogenes Interferon zu überprüfen und nachzuweisen in welchem Ausmaß die virale Replikation durch die Anwesenheit von Interferonen abgeschwächt werden kann. Es wurden, wie in Kapitel 2.3.5 bereits detaillierter beschrieben, verschiedene Zelllinien mit unterschiedlichen Konzentrationen an universalem Typ 1 Interferon (0, 10, 100, 1000 IU/ml) vorbehandelt und nach ca. 12 h mit rVSV-GFP mit einer MOI von 1 infiziert. Die viralen Titer wurden nach 0 h und 24 h mittels TCID₅₀ Assays bestimmt. Als Kontrollzelllinie wurden A549 Zellen benutzt, die bereits in Vorversuchen und in der Literatur eine dosisabhängige Abschwächung der viralen Replikation gezeigt haben (Basu, Maitra et al. 2006).

Die Ausgangsvirustiter kurz (0 h) nach VSV-Infektion lagen in allen Versuchen und Zelllinien zwischen 10²-10³ TCID₅₀/ml. In den Versuchen zeigte sich nach 24 Stunden eine sehr unterschiedliche Sensitivität der verschiedenen Zelllinien gegenüber exogenem Typ 1 Interferon.

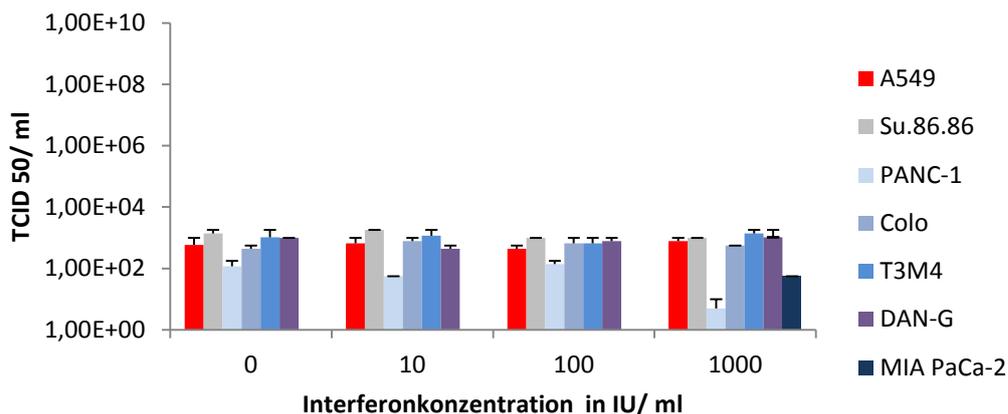
Bei den untersuchten humanen Zelllinien zeigten die beiden Zelllinien PANC-1 und Su.86.86 fast keine Reduktion der Virustiter, auch bei sehr hohen Interferonspiegeln bis 1000 IU/ml. Die anderen humanen Zelllinien (DAN-G, MIA PaCa-2, Colo, T3M4) hingegen zeigten eine gewisse Abschwächung der viralen Replikation bei ansteigenden Interferonkonzentrationen. Die hohen Titer von 10⁷-10⁹ TCID₅₀/ml bei keinerlei exogenem zugeführtem Interferon wurden teilweise bis auf 10⁴ TCID₅₀/ml bei einer Konzentration von 1000 IU/ml Interferon reduziert.

Die murinen Zelllinien zeigten im Vergleich zu den analysierten humanen Zellen ein eher einheitliches Bild. In allen untersuchten murinen Zelllinien war eine konzentrationsabhängige Abschwächung der viralen Replikation zu beobachten, die teilweise sogar stärker ausgeprägt war als in den verwendeten Kontrollzellen (A549). Auffällig war, dass die CKN2-Zelllinien, die aus endogenen Ptf1a^{+Cre}; K-RAS^{+LSL-G12D}; N2ko-Mäusen generiert wurden, deutlich empfindlicher auf exogenes Typ 1 Interferon reagierten als die humanen Zelllinien und die murinen CK-Zellen. Diese Unterschiede wurden in Abbildung 3.2.2 in Kapitel 3.2.4 graphisch veranschaulicht.

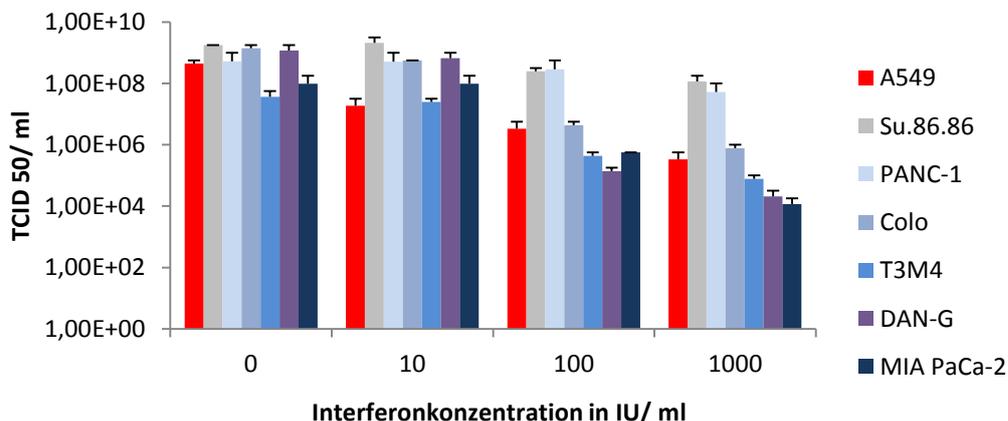
Hier wurden jeweils die Mittelwerte der Interferon-abhängigen Virustiter aus drei CK-Zelllinien (CK 17027, CK 2190, CK 9801) und drei CKN2-Zelllinien (CKN2 1006, CKN2 3113, CKN2 1013) sowie den sechs humanen Zelllinien berechnet und in einer Graphik gegenübergestellt. Hier zeigte sich eindrücklich, dass die humanen Zelllinien am wenigsten sensibel auf exogenes Interferon reagierten, wohingegen die CKN2-Zelllinien am sensibelsten waren und die VSV-Replikation am stärksten abgeschwächt wurde. Die CK-Zellen nahmen einen Platz dazwischen ein. Zu beobachten war auch, dass diese Unterschiede zwischen den drei Zellklassen vor allem bei höheren Interferonkonzentrationen (> 10 IU/ml) stärker ausgeprägt waren.

3.2.1 Humane Zelllinien

0 Stunden nach Infektion

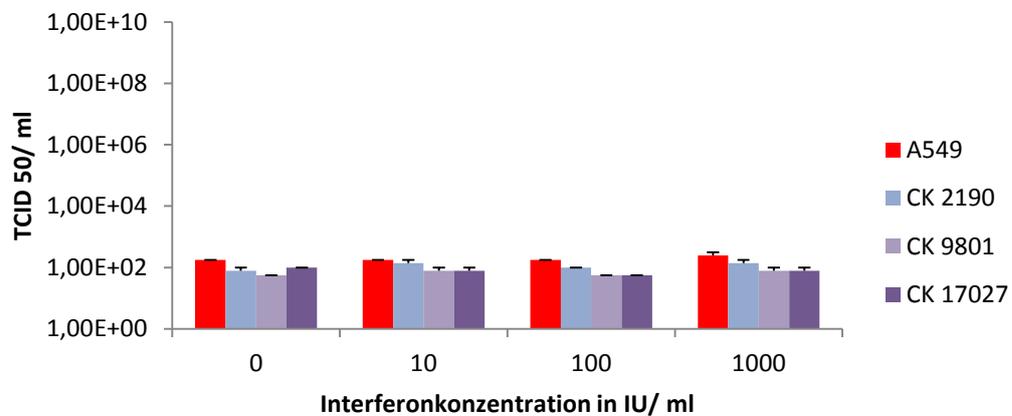


24 Stunden nach Infektion

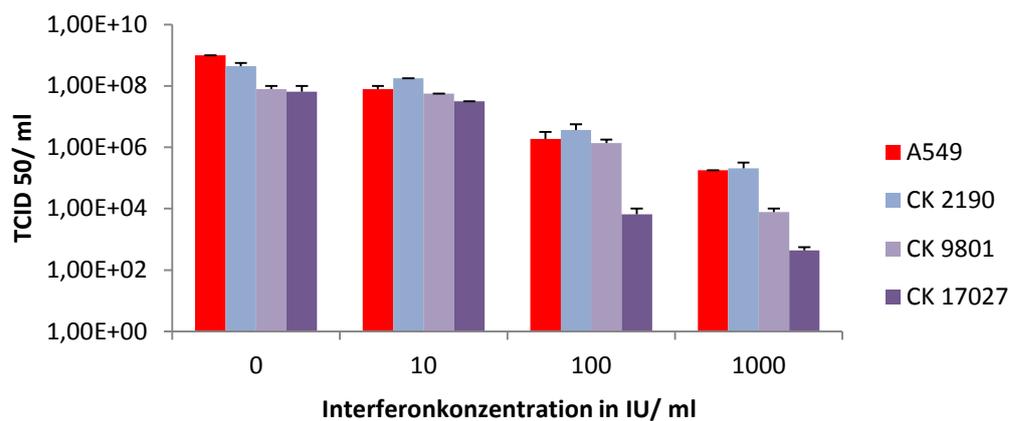


3.2.2 Murine CK-Zelllinien

0 Stunden nach Infektion



24 Stunden nach Infektion



3.2.3 Murine CKN2-Zelllinien

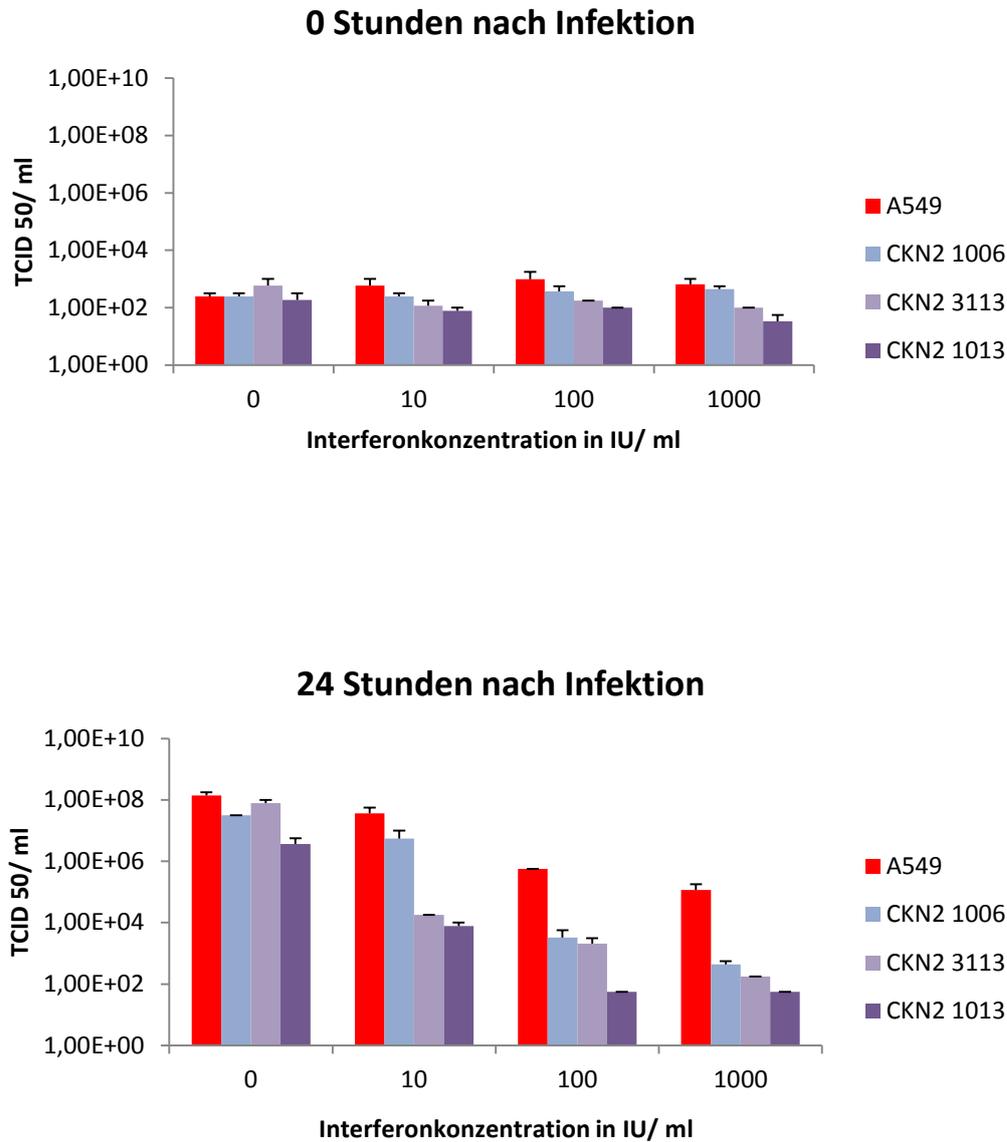


Abb. 3.2 Interferon Protection Assays mit rVSV-GFP. Die Zelllinien wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Typ 1 Interferon (0, 10, 100, 1000 IU/ml) für 8-12 h inkubiert und anschließend mit rVSV-GFP mit einer MOI von 1 infiziert. Nach 0 und 24 h wurden die viralen Titer mittels TCID₅₀ Assay bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.

3.2.4 Vergleich von CK-, CKN2- und humanen Zelllinien

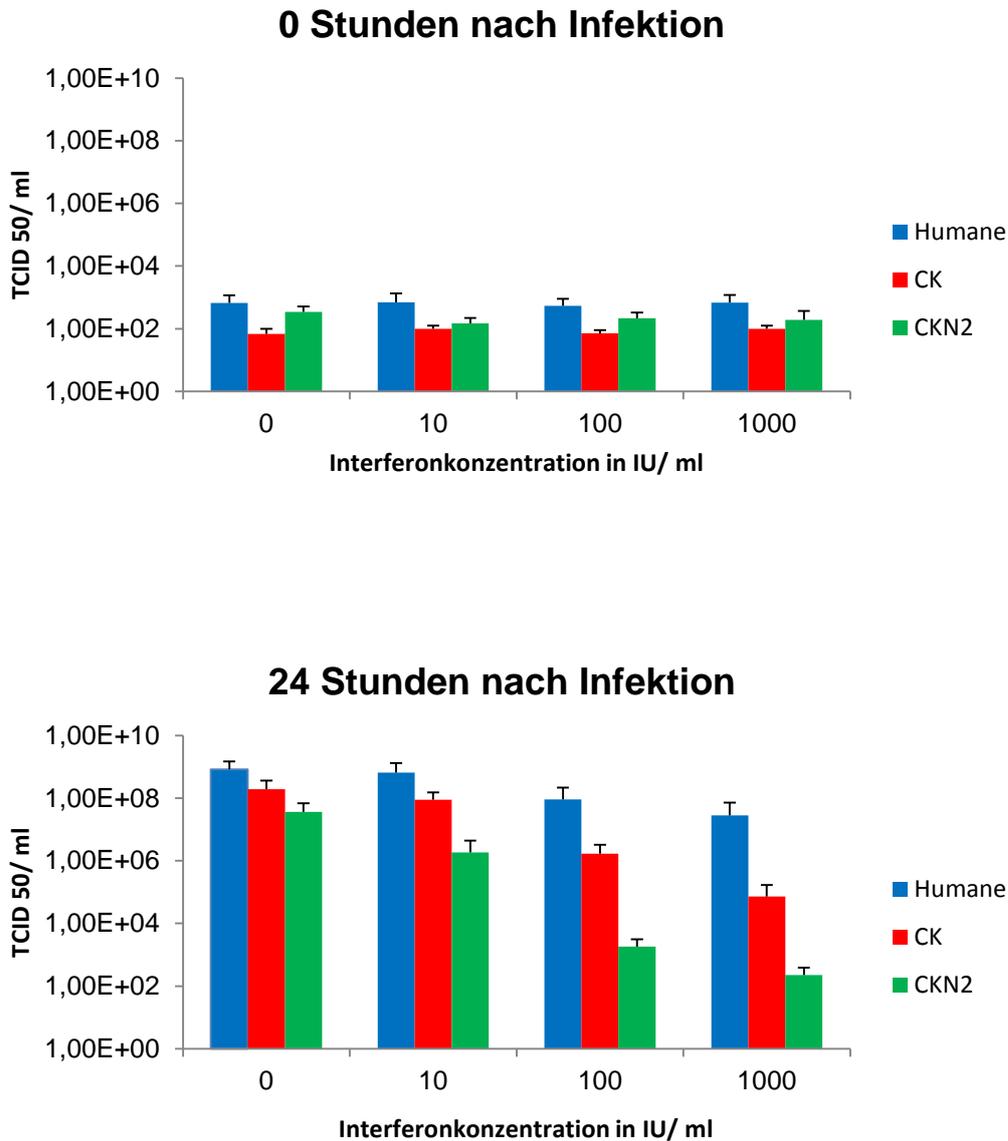


Abb. 3.3 Interferon Protection Assay mit rVSV-GFP. Vergleich der drei verschiedenen Zellklassen. Die Zelllinien wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Typ 1 Interferon (0, 10, 100, 1000 IU/ml) für 8-12 h inkubiert und anschließend mit rVSV-GFP mit einer MOI von 1 infiziert. Nach 0 und 24 h wurden die viralen Titer mittels TCID₅₀ Assay bestimmt. In dieser Graphik wurden die Daten der oben dargestellten Schaubilder (Kapitel 3.2.1- 3.2.3) zusammengefasst. Es wurden jeweils die Mittelwerte und Standardabweichung aus drei CK-Zelllinien (CK 17027, CK 2190, CK 9801) und drei CKN2-Zelllinien (CKN2 1006, CKN2 3113, CKN2 1013) sowie den sechs humanen Zelllinien berechnet und gegenübergestellt.

3.3 Microarray-Datenvergleich

Die beiden murinen pankreatischen Zellklassen (CK und CKN2) unterschieden sich bezüglich der Interferonsensibilität erheblich voneinander. Im Interferon Protection Assay zeigte sich in den CKN2-Zellen eine deutlich stärkere Attenuierung der viralen Replikation durch die Stimulation mit exogenem Typ 1 Interferon. Um mögliche genetische Ursachen für das unterschiedliche Ansprechen zu identifizieren wurden jeweils die Microarray-Profile von den drei verwendeten CK- (CK 17027, CK 2190, CK 9801) und den drei untersuchten CKN2-Zelllinien (CKN2 1013, CKN2 3113, CKN2 1006) miteinander verglichen. Aus dem Microarray-Datenpool wurden insgesamt 105 in den Interferonstoffwechsel involvierte beziehungsweise durch Interferon beeinflusste Gene ausgewählt. Es wurden jeweils die Mittelwerte der gemessenen Genexpression von drei CK- und drei CKN2-Zellen gebildet und in ein Verhältnis gesetzt (CKN2/CK). In der folgenden Graphik (Abb. 3.3) sind die Quotienten (CKN2/CK) der entsprechend nummerierten Gene abgebildet. Eine detaillierte Auflistung und Nummerierung der untersuchten Gene befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

Insgesamt zeigte sich bezüglich der untersuchten Gene ein sehr ähnliches Expressionsmuster. Im direkten Vergleich vielen vor allem die Gene für folgende Proteine durch eine deutlich höhere Expression in CKN2-Zellen auf (in der Graphik rot markiert): 2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2, interferon induced transmembrane protein 1, interferon induced transmembrane protein 3, interferon-induced protein 44, interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1, interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3. Auffällig war vor allem die Genexpression des interferon induced transmembrane protein 3. Es zeigte sich eine rund achtzigfach höhere Expression in den CKN2-Zellen. Die übrigen fünf Gene zeigten eine zehn- bis vierzigfache erhöhte Expression in den CKN2-Zelllinien.

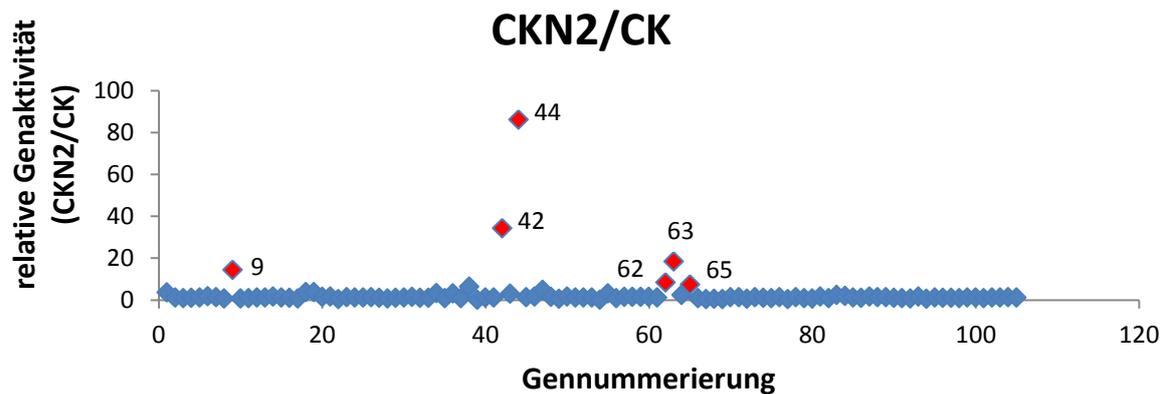


Abb. 3.4 Microarray-Datenvergleich von CKN2- und CK-Zelllinien. Es wurden die Microarray-Profile von jeweils drei CK- und drei CKN2-Zelllinien miteinander verglichen. Untersucht wurden 105 Interferon-abhängige beziehungsweise in den Interferonstoffwechsel involvierte Gene. Die graphisch veranschaulichten Werte zeigen den Quotient aus der gemittelten Genaktivität von jeweils drei CKN2- und drei CK-Zelllinien der analysierten Gene. Im Anhang findet sich eine detaillierte Auflistung und Nummerierung der analysierten Gene. Die signifikant erhöhten Werte wurden rot markiert und mit der entsprechenden Gennummerierung gekennzeichnet:

- 9 2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2
- 42 interferon induced transmembrane protein 1
- 44 interferon induced transmembrane protein 3
- 62 interferon-induced protein 44
- 63 interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
- 65 interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3

3.4 Luciferase-Reportergen-Assay

Um herauszufinden, inwiefern VSV-Infektionen eine Interferonantwort in den verwendeten pankreatischen Tumorzellen induzieren, wurde ein Luciferase-Reportergen-Assay durchgeführt. Es wurden für das Luciferase-Gen kodierende Plasmide verwendet, die durch an der Interferoninduktion beziehungsweise Interferonantwort beteiligte Promotoren kontrolliert wurden. Hierzu wurden die Zellen mit einem für die Renilla-Luciferase kodierenden Plasmid (pCMV-RL, Promega) zur Kontrolle der Transfektionseffizienz und verschiedenen Firefly-Luciferase exprimierenden Plasmiden (pIFN- β -luc, pNF- κ B-luc, pIRF3-luc, pISRE-luc, pMX-luc) kotransfiziert. Die Plasmide pIFN- β -luc, pNF- κ B-luc, pIRF3-luc geben Auskunft über den Interferoninduktions-Signalweg, wohingegen die beiden Konstrukte pISRE-luc und pMX-luc Einblicke in die Interferonantwort gewähren sollen. 24 h nach erfolgter

Transfektion, wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben, wurden die Zellen mit VSV-M51R mit einem MOI von 1 infiziert oder mit Poly I:C stimuliert. Nach weiteren 20 h wurden die Zellen schließlich lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen. Das Ausmaß der Induktion wurde als Vielfaches der Grundaktivität berechnet, indem die Aktivität der stimulierten Zellen durch die Basisaktivität der mock-behandelten Zellen dividiert wurde. Die gemessene Firefly-Luciferaseaktivität wurde gegen die korrespondierende Aktivität der Renilla-Luciferase normalisiert. Auf diese Weise wurde die gemessene Aktivität gegen die Transfektionseffizienz relativiert. Als Positivkontrolle wurden A549 Zellen benutzt, da sie bekanntlich eine funktionsfähige, durch VSV induzierbare Interferoninduktion aufweisen (Basu, Maitra et al. 2006).

Die gemessenen plasmidabhängigen Luciferaseaktivitäten variierten deutlich zwischen den verschiedenen Zelllinien. Im Vergleich zu den verwendeten Kontrollzellen (A549) bestand allerdings eine deutlich schwächere Interferoninduktion durch VSV-M51R. Die A549 Zellen zeigten eine sechzig- bis siebzigfache Induktion des IFN- β - und eine rund zwanzigfache Induktion des IRF3-Promotors. Die pankreatischen Zelllinien hingegen wiesen eine maximal zehnfache Induktion des IFN- β -Promotors auf und zeigten eine insgesamt eher schwach ausgeprägte Induktion der übrigen Reporterplasmide.

Die Stimulation mit Poly I:C zeigte im Vergleich zur Virusinfektion ein deutlich niedrigeres Induktionsausmaß. Das dem Medium zugesetzte Poly I:C zeigte in keiner verwendeten Zelllinie eine signifikante Induktion der verwendeten Reporterplasmide. Insgesamt hatte das transfektierte Poly I:C gegenüber dem zum Medium hinzugefügten Poly I:C eine höhere Induktion in den untersuchten Zelllinien ausgelöst, bei den verwendeten Kontrollzelllinien (A549) sogar eine über zehnfache Induktion des IFN- β -Promotors.

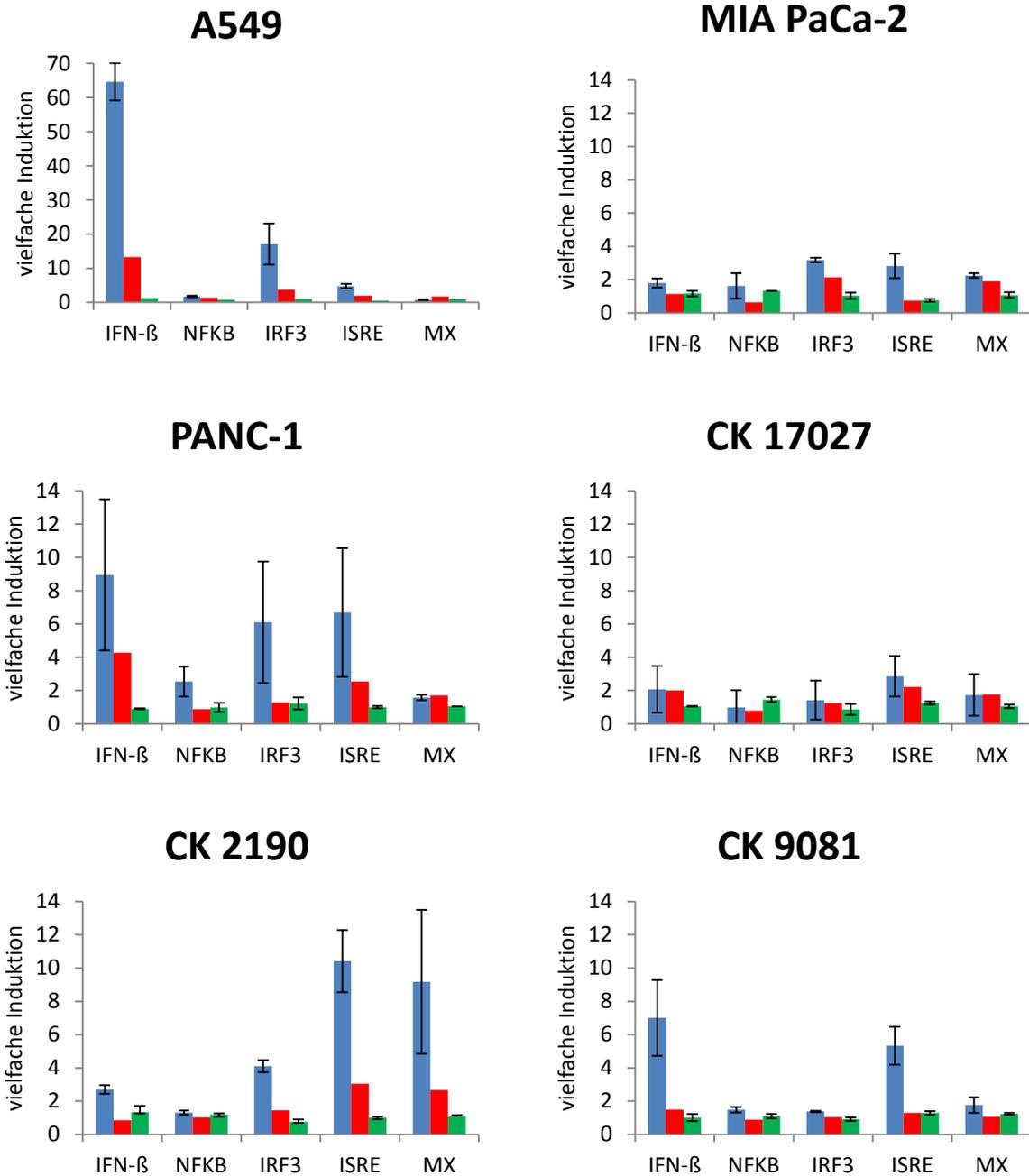


Abb. 3.5 Luciferase-Reportergen-Assay. Die Abbildung zeigt die Promotoraktivierung durch VSV-M51R und Poly I:C. Die Zellen wurden mit pCMV-RL und einer der folgenden für die Firefly-Luciferase kodierenden Plasmiden (*pIFN-β-luc*, *pNF-κB-luc*, *pIRF3-luc*, *pISRE-luc*, *pMX-luc*) kotransfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit VSV-M51R mit einem MOI von 1 infiziert oder mit Poly I:C stimuliert. Nach weiteren 20 h wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen. Das Ausmaß der Induktion wurde als Vielfaches der Grundaktivität berechnet, indem die Aktivität der stimulierten Zellen durch die Basisaktivität der mock-behandelten Zellen dividiert wurde. Die Firefly-Luciferaseaktivität wurde gegen die entsprechende Aktivität der Renilla-Luciferase normalisiert. Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängig durchgeführten Versuchen. --- VSV-M51R --- Poly I:C transfiziert --- Poly I:C zum Medium hinzugegeben

3.5 ISRE-Promotoraktivierung durch VSV-M51R und Typ 1 Interferon

Um die Interferonantwort noch differenzierter zu analysieren wurde in einem weiteren Versuch nochmals isoliert die ISRE-Promotoraktivierung durch VSV-M51R und exogenes Interferon untersucht. Hierzu wurden die Zellen wiederum mit pCMV-RL und pISRE-luc kotransfiziert und nach 24 h entweder mit VSV-M51R mit einem MOI von 1 infiziert oder mit exogenem Typ 1 Interferon stimuliert. Nach weiteren 20 h wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen. Die Renilla-Luciferaseaktivität diente als Transfektionskontrolle und die gemessene Aktivität der Firefly-Luciferase wurde gegen die entsprechende Aktivität der Renilla-Luciferase normalisiert.

Es zeigte sich eine insgesamt recht gering ausgeprägt ISRE-Induktion. Im Vergleich zu der verwendeten Kontrollzelllinie HuH-7, die durch exogenes Interferon eine über hundertfache ISRE-Induktion aufwies, war in den pankreatischen Zelllinien lediglich eine ein- bis achtfache Induktion des pISRE-luc Plasmids zu beobachten. Die durch VSV-M51R stimulierte Induktion von ISRE fiel in den meisten pankreatischen Tumorzelllinien etwas stärker aus als die durch Interferonstimulation erzielte Induktion. Ausschließlich in den MIA PaCa-2 Zellen und in den verwendeten HuH-7 Kontrollzellen löste das exogene Interferon eine höhere Induktion aus.

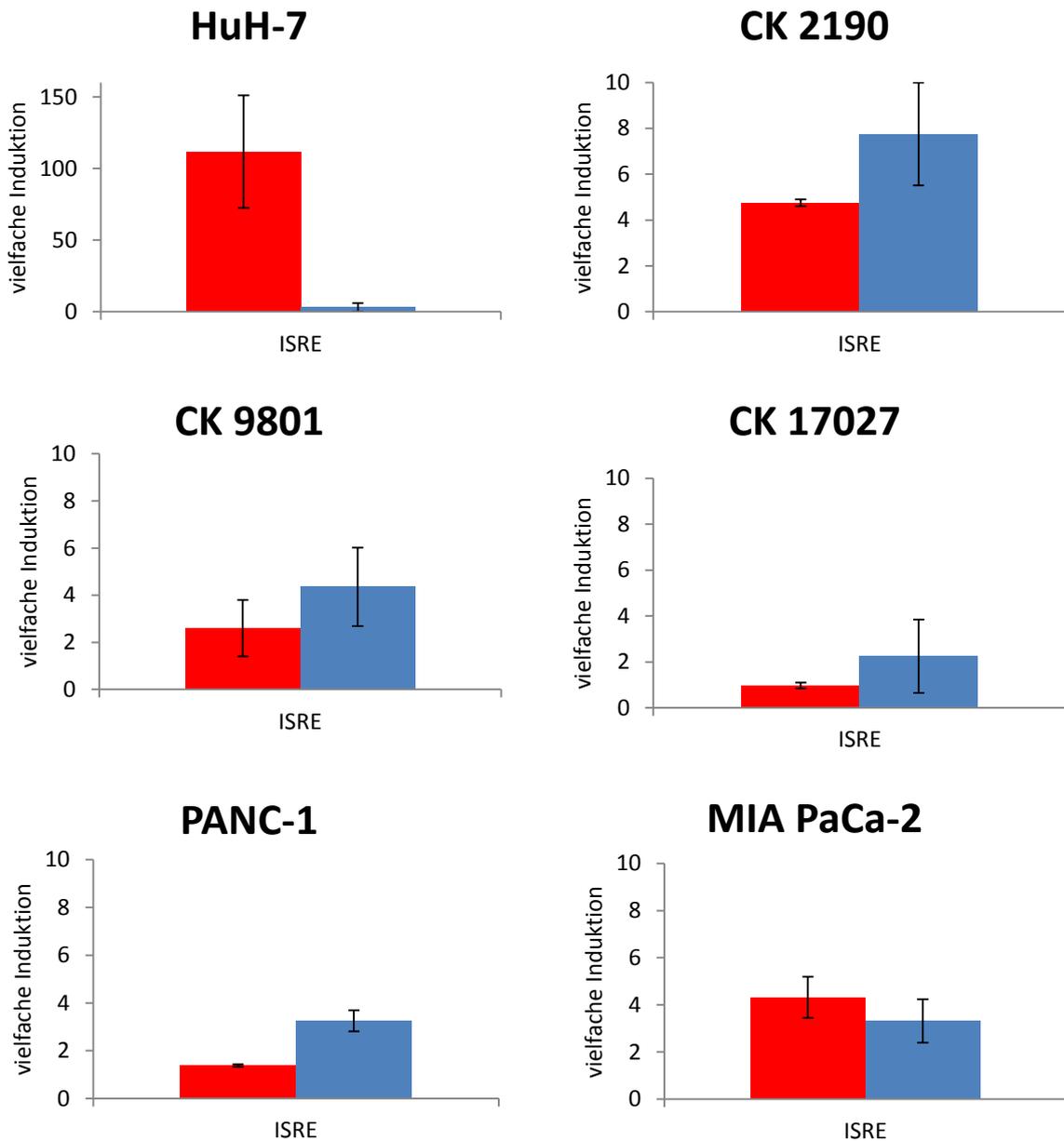


Abb. 3.6 ISRE-Promotoraktivierung durch VSV-M51R und exogenes Interferon. Verschiedene Zelllinien wurden mit dem pCMV-RL und dem pISRE-luc Plasmid kotransfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen entweder mit VSV-M51R oder mit exogenem universalem Typ 1 Interferon inkubiert. Nach weiteren 20 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen. Das Ausmaß der Induktion wurde als Vielfaches der Grundaktivität berechnet indem die Aktivität der stimulierten Zellen durch die Basisaktivität der mock-behandelten Zellen dividiert wurde. ISRE-Luciferaseaktivität wurde gegen die entsprechende Aktivität der Renilla-Luciferase normalisiert. Die Versuche wurden dreimalig unabhängig voneinander durchgeführt. Gezeigt werden die Mittelwerte sowie die berechnete Standardabweichung. --- VSV-M51R --- exogenes Typ 1 Interferon

3.6 In vivo-Versuche

3.6.1 Intratumorale Virusreplikation in orthotop-implantierten Tumoren

Um die VSV-Replikation auch in vivo zu analysieren wurden orthotop-implantierte Pankreastumoren der CK-Zelllinien CK 17027 und CK 9801 mit intratumoraler Injektion von rVSV-GFP ($3,3 \times 10^6$ pfu in 100 μ l PBS) behandelt. Die Tumore wurden durch Injektion von 5×10^5 – 1×10^6 Zellen der entsprechenden Zelllinie in 20 μ l PBS in den Pankreasschwanz generiert. Es wurden pro Zelllinie jeweils drei bis fünf Versuchstiere nach 30 min und 24 h nach Infektion geopfert und die Virustiter der homogenisierten Tumore mittels TCID₅₀ Assay bestimmt. Das genaue Vorgehen der Tumorzellimplantation und der VSV-Behandlung wurde in Kapitel 2.5.1 und 2.5.3 detailliert beschrieben.

Es zeigten sich 30 min nach Infektion mit gereinigtem rVSV-GFP Initialtiter von 10^2 - 10^4 TCID₅₀/mg Tumorgewebe. Die Titer in den durch CK 9801 induzierten Tumoren waren geringfügig niedriger als in den Tumoren der Zelllinie CK 17027. 24 h nach Virusapplikation war ein ähnlicher Titer in den explantierten Tumoren festzustellen. Ein signifikanter Titeranstieg oder -abfall nach 24 h im Vergleich zum Ausgangstiter nach 30 min war in beiden untersuchten Zelllinien nicht festzustellen.

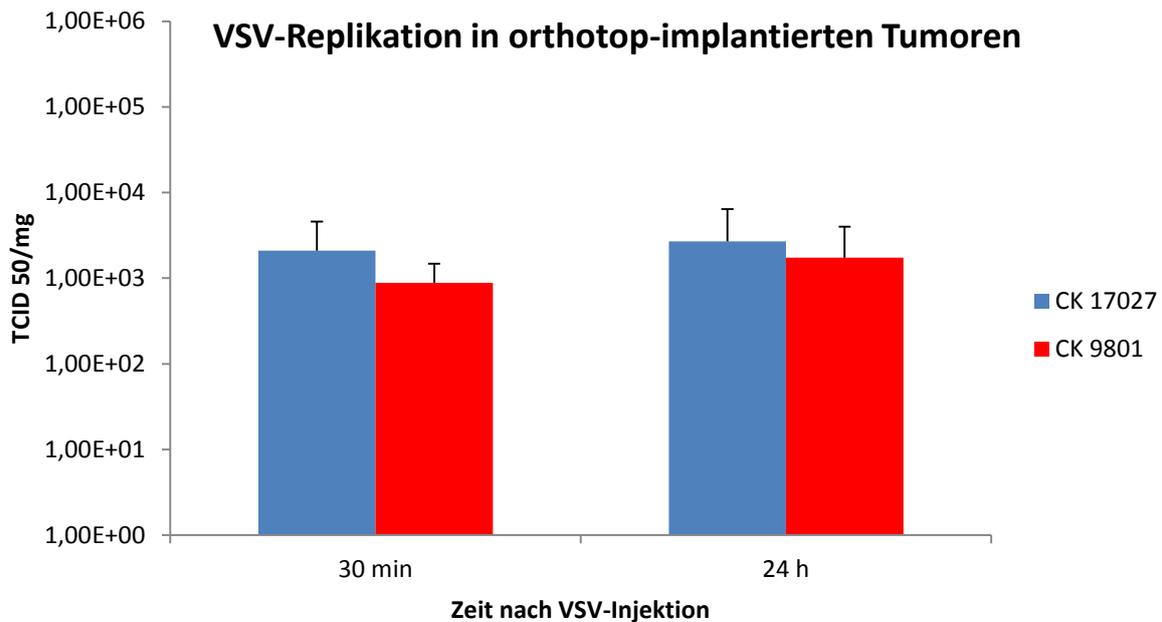


Abb. 3.7 VSV-Replikation in vivo in orthotop-implantierten Pankreastumoren. Jeweils $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ Zellen in $20 \mu\text{l}$ PBS wurden in Pankreasschwanz injiziert um orthotope PDAC zu generieren. Nach 3-4 Wochen wurden die Tumore von insgesamt 16 Tieren mittels intratumoraler Applikation von rVSV-GFP ($3,3 \times 10^6$ pfu in $100 \mu\text{l}$ PBS) behandelt. Die Abbildung zeigt die intratumoralen Virustiter 30 min und 24 h nach VSV-Injektion von zwei verschiedenen orthotop-implantierten Tumorzelllinien (CK 17027 und CK 9801). Die Virustiter wurden mittels TCID_{50} pro mg Tumorgewicht logarithmisch dargestellt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardabweichung von jeweils drei bis fünf Tieren pro Zeitpunkt und Zelllinie.

3.6.2 Intratumorale Virusreplikation in endogenen CKP-Mäusen

Neben den orthotop-implantierte Pankreastumoren wurde die VSV-Replikation auch in endogenen CKP-Mäusen untersucht. Die endogenen CKP-Mäuse weisen zusätzlich zu einer konditionalen K-RAS-Mutation eine pankreasspezifische Deletion des Tumorsuppressorgens p53 auf. Gezüchtet wurden diese Tiere auf die in Kapitel 2.1.8 beschriebene Weise. Verwendet wurden männliche und weibliche Tiere. Die intratumoraler Injektion von rVSV-lacZ ($3,3 \times 10^6$ pfu in $100 \mu\text{l}$ PBS) erfolgte auf gleicher Weise wie im zuvor beschriebenen orthotopen Tumormodell und ist in Kapitel 2.5.1 und 2.5.3 bereits detailliert beschrieben worden. 30 min und 24 h nach Virusapplikation wurden jeweils mindestens drei Tiere geopfert und die Virustiter der homogenisierten Tumore mittels TCID_{50} Assay bestimmt.

Es zeigten sich 30 min nach Infektion mit rVSV-lacZ Initialtiter von 10^3 - 10^4 TCID₅₀/mg Tumorgewebe. Wie bei den orthotop-implantierten Tumoren waren auch 24 h nach Virusapplikation nur eine geringe Abweichung zu den gemessenen Initialtitern zu erkennen. Ein signifikanter Titeranstieg oder -abfall nach 24 h im Vergleich zum Ausgangstiter nach 30 min war nicht festzustellen. Die dargestellten Titerverläufe waren insgesamt sehr ähnlich zu den im orthotopen Tumormodell bestimmten Werten.

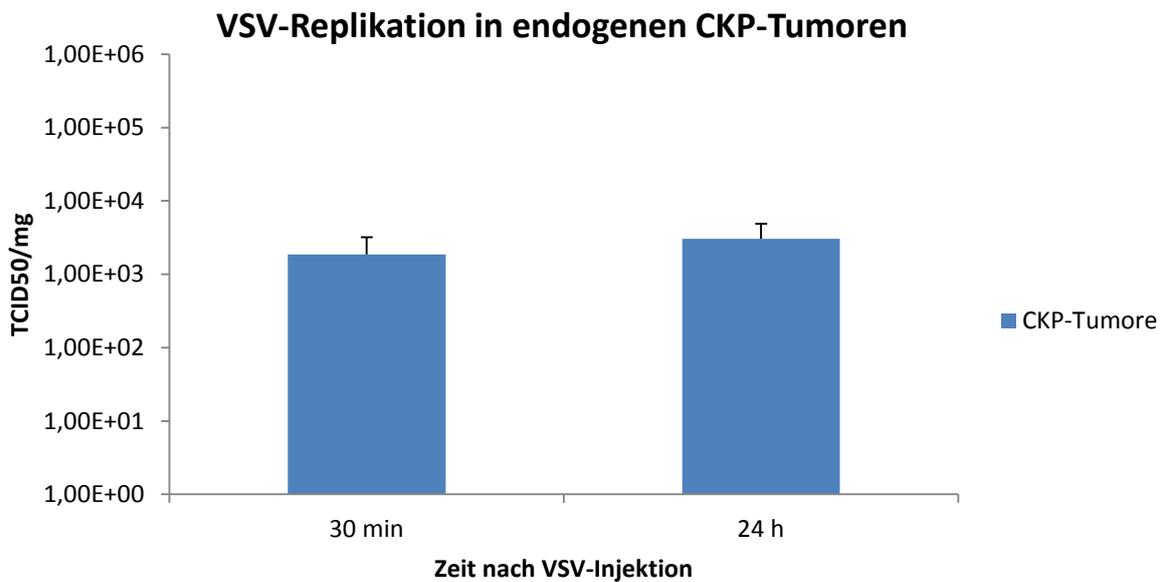


Abb. 3.8 VSV-Replikation in vivo in endogenen CKP-Pankreastumoren. Die endogenen CKP-Mäuse wurden nach durch Bildgebung gesichertem Tumorstatus mittels intratumoraler Applikation von rVSV-lacZ ($3,3 \times 10^6$ pfu in 100 μ l PBS) behandelt. Die Abbildung zeigt die intratumoralen Virustiter 30 min und 24 h nach VSV-Injektion. Die Virustiter wurden mittels TCID₅₀ pro mg Tumorgewicht logarithmisch dargestellt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardabweichung von jeweils mindestens drei Tieren pro Zeitpunkt.

3.6.3 Histologie und Färbungen

3.6.3.1 β -Galaktosidasefärbung an CK 9801 Zellen

Als Vorversuch für den gewünschten histologischen Nachweis einer rVSV-LacZ-Infektion und -Replikation in murinem Tumorgewebe wurde vorerst eine β -Galaktosidasefärbung an murinen pankreatischen Tumorzellen etabliert. Hierzu wurden CK 9801 Zellen vereinzelt und mit rVSV-lacZ mit einem MOI von 1 infiziert. Nach 6 Stunden wurden die Zellen fixiert und nach dem in Kapitel 2.6.3 angegebenen Protokoll angefärbt. Die folgende Abbildung zeigt vier β -Galaktosidase exprimierende, blau gefärbte Zellen sechs Stunden nach der Infektion mit rVSV-lacZ.



Abb. 3.9 β -Galaktosidasefärbung sechs Stunden nach rVSV-lacZ Infektion an CK 9801 Zellen. CK 9801 Zellen wurden vereinzelt und mit rVSV-lacZ mit einem MOI von 1 infiziert. Nach 6-10 h erfolgte die Fixierung mit 4 % PFA und die β -Galaktosidasefärbung mit dem β -Galaktosidase Staining Kit (Roche Diagnostics GmbH) nach Herstellerangaben. Dargestellt sind vier β -Galaktosidase exprimierende, blau gefärbte Zellen sechs Stunden nach der Infektion mit rVSV-lacZ.

3.6.3.2 HE-Färbung von Tumorpräparaten

Die HE-Färbung erfolgte an Gefrierschnitten nach dem in Kapitel 2.6.2 angegebenen Protokoll. Ziel der Färbung war es vor allem die allgemeine Tumormorphologie der orthotopen und endogenen Pankreaskarzinome darzustellen. Es zeigte sich ein für das PDAC typischer Aufbau mit teils nekrotischen und fibrotischen Arealen. Die

normale zytomorphologische Achitektur des Pankreas war in den Tumorbereichen vollkommen aufgehoben. Bei den orthotop-implantierten Tumoren waren die Tumore eher einheitlich aufgebaut und es war auch intaktes unverändertes Pankreasgewebe vorhanden. Die endogenen CKP-Tumore waren insgesamt heterogener mit teilweise prämaligen Läsionen wie PanINs. Normales Pankreasgewebe war in den endogenen Tumoren nicht mehr zu finden.

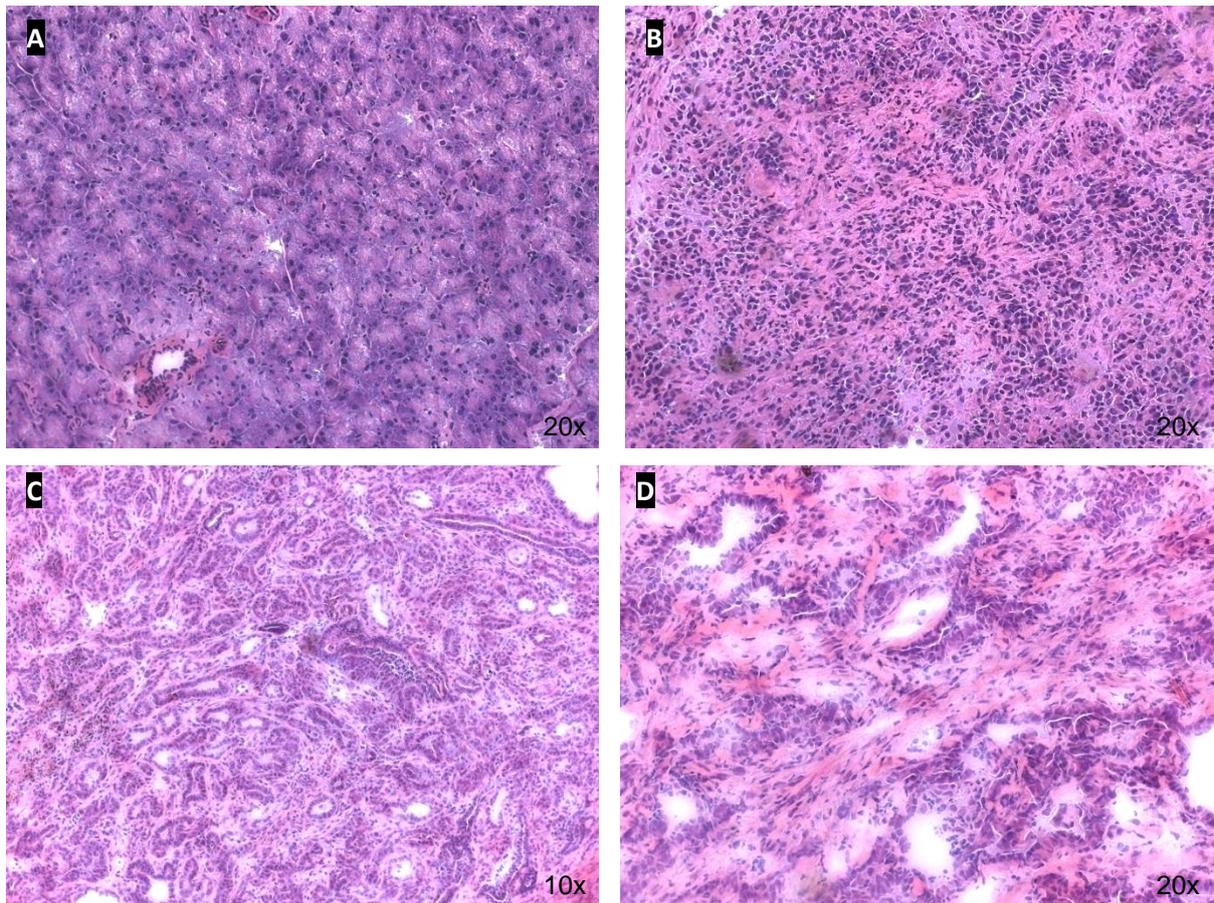


Abb. 3.10 HE-Färbung der Pankreaspräparate. Die HE-Färbung erfolgte an Gefrierschnitten nach dem in Kapitel 2.6.2 angegebenen Protokoll. Ausschnitt A und B zeigen die Histologie von orthotop-implantierten Tumoren, Ausschnitt C und D die Histologie von endogenen CKP-Tumoren. In Bildausschnitt A ist gesundes murines Pankreasgewebe mit zahlreichen Azini dargestellt. In Ausschnitt B ist zellreiches anaplastisch wachsendes teils fibrotisches Tumorgewebe der orthotop-implantierten Tumore abgebildet. Bildabschnitt C zeigt die Übersicht eines endogenen CKP-Tumors. In D ist das heterogene Tumorgewebe der endogenen CKP-Tumore bei zwanzigfacher Vergrößerung zu sehen.

3.6.3.3 β -Galaktosidasefärbungen von Tumorpräparaten

Die β -Galaktosidasefärbung erfolgte an Gefrierschnitten nach dem in Kapitel 2.6.3 angegebenen Protokoll. Das Konzept dieser Färbung war es die replikationsaktiven Tumoreareale selektiv darzustellen. Die Verwendung eines speziellen rekombinanten VSV, das das Escherichia coli β -Galaktosidase-Gen (*lacZ*) zwischen den viralen G- und L-Genabschnitten enthält, ermöglichte es durch β -Galaktosidasefärbung spezifisch die replikationsaktiven Tumorateile zu markieren.

Die gefärbten Gefrierschnitte der mit rVSV-*lacZ* therapierten endogenen CKP-Tumore zeigten vereinzelte dunkelbläulich angefärbte Tumoreareale. Die prominenten Zonen wiesen die für das verwendete β -Galaktosidase-Färbeprotokoll charakteristische Kolorierung auf. Diese *lacZ*-positiven, replikationsaktiven Zonen waren unscharf begrenzt und disseminiert über das Tumorgewebe verteilt. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Tumorpräparate auf gleiche Weise angefärbt. Im Gegensatz zu den therapierten Tumoren waren hier keine *lacZ*-positiven Tumoreareale zu beobachten.

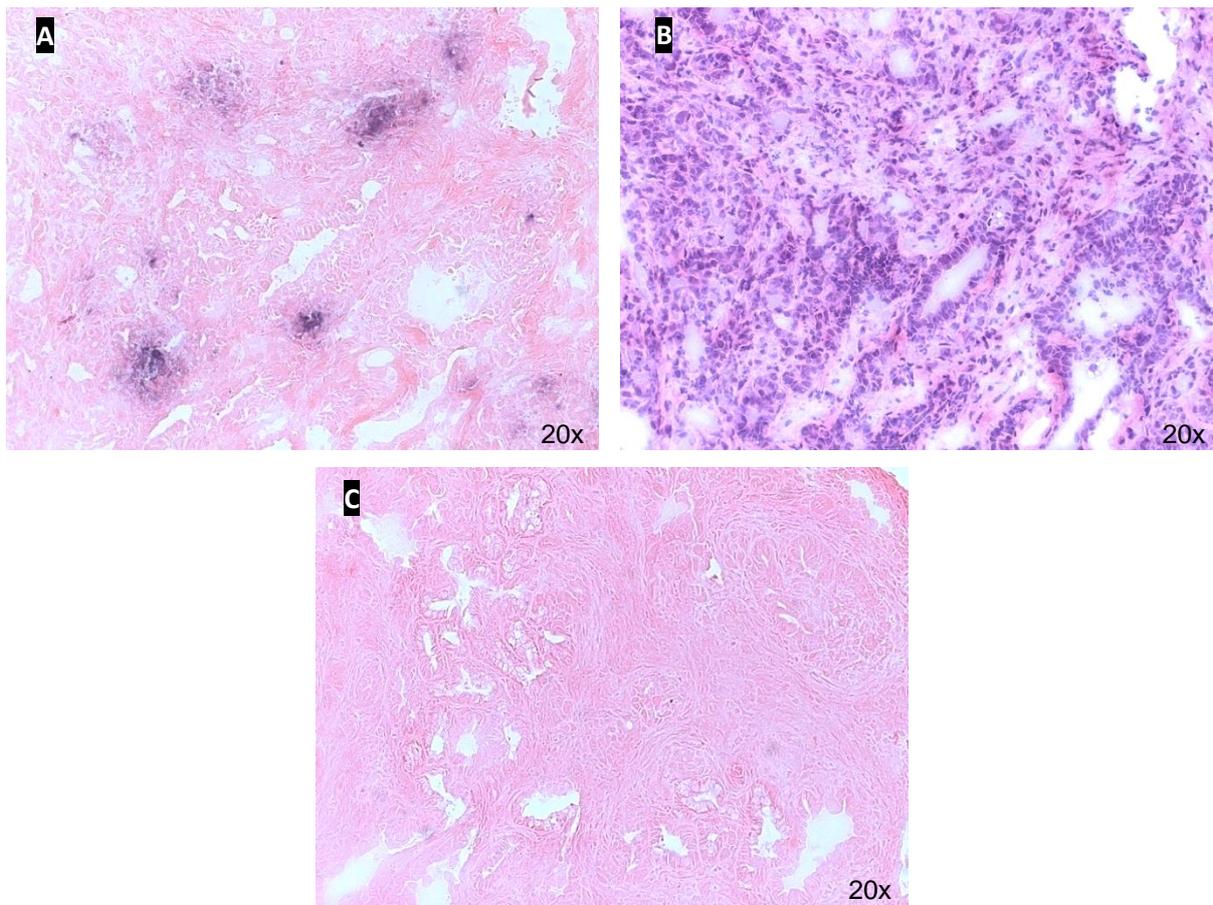


Abb. 3.11 β -Galaktosidasefärbung von endogenen CKP-Tumoren 24 h nach rVSV-lacZ-Therapie. Die Abbildung zeigt Ausschnitte von CKP-Tumoren in zwanzigfacher Vergrößerung. Ausschnitt A und C zeigen jeweils eine β -Galaktosidasefärbung mit einer Eosin-Gegenfärbung. Ausschnitt B zeigt eine Standard-HE-Färbung des korrespondierenden in Ausschnitt A dargestellten Tumorbereichs. Die dunkelblauen, lacZ-positiven Areale entsprechen den rVSV-lacZ-infizierten und replikationsaktiven Tumoranteilen. Bildausschnitt C zeigt eine unbehandelte Negativkontrolle.

4 Diskussion

Das Pankreaskarzinom hat nach wie vor eine äußerst schlechte Prognose (Jemal, Siegel et al. 2010). Trotz großer Fortschritte in Diagnostik und Therapie hat sich diese Tatsache in den vergangenen drei Jahrzehnten kaum verändert (Schneider, Siveke et al. 2005). Das duktales Adenokarzinom des Pankreas gilt als wenig sensibel gegenüber chemo- und radiotherapeutischer Behandlung und ist daher nur schwer therapierbar. Nach wie vor stellt die vollständige chirurgische Resektion die einzige verfügbare kurative Therapieform dar. Jedoch ist aufgrund der lokal fortgeschrittenen Tumorausdehnung und der systemischen Metastasierung eine operative und potentiell kurative Therapie nur bei rund 15-20 % der Patienten möglich (Wray, Ahmad et al. 2005). Aufgrund der schlechten Prognose und den eingeschränkten Therapiemaßnahmen ist man ständig auf der Suche nach neuen innovativen Behandlungsansätzen.

Das therapeutische Feld der viralen Onkolyse hat in den letzten Jahren einen enormen Aufschwung erlebt. Vor allem die Entdeckung der rekombinanten DNA-Technologie sowie die fortschreitende Aufklärung der Tumor- und Virusbiologie haben dazu beigetragen (Donahue, Mullen et al. 2002). Die onkolytischen Viren replizieren spezifisch in neoplastischem Gewebe und zerstören es dabei selektiv. Der Tumor selbst wird dabei zur Produktionsstätte von neuen Viren, die weitere maligne Zellen infizieren und lysieren können. In einem atemberaubendem Tempo wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl neuer gentechnischer Vektoren hergestellt und in verschiedenen Studien auf ihre Wirksamkeit getestet. Derzeit laufen mehr als fünfzig klinische Phase I, Phase II oder Phase III Studien mit verschiedenen onkolytischen Viren, wie Adenoviren (Phase III), Reoviren, Herpes-simplex-Viren und Masernviren (Parato, Senger et al. 2005). In China wurde im November 2005 das genetisch modifizierte Adenovirus H101, als erstes onkolytisches Virus weltweit, zur Kombinationstherapie mit etablierten Chemotherapeutika in der Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren zugelassen (Garber 2006). Derzeit läuft auch eine vielversprechende klinische Phase-III-Studie mit dem rekombinanten Herpes Simplex Virus „Oncovex GM-CSF“ in der Behandlung von malignen Melanomen, die vielleicht schon in absehbarer Zeit eine Zulassung der Therapieform in der westlichen Welt bewirkt (Kaufman and Bines 2010). Das therapeutische Ansprechen des PDAC wurde ebenfalls durch verschiedene

onkolytische Viren überprüft. Zum Einsatz kamen beispielsweise Reoviren in einem subkutanem murinem Xenograftmodell (Etoh, Himeno et al. 2003). Auch Adenoviren und Herpesviren wurden bereits *in vitro*, an Tiermodellen und auch in einzelnen klinischen Studien an Patienten mit inoperablen Pankreastumoren getestet (Hecht, Bedford et al. 2003; Sarinella, Calistri et al. 2006; He, Su et al. 2009; Nakao, Kasuya et al. 2011). Teilweise wurden die onkolytische Viren auch in Kombination mit etablierten Chemotherapeutika eingesetzt um so noch bessere synergistische Anti-Tumor-Effekt zu erreichen (Nelson, Davydova et al. 2009).

Das Vesikuläre Stomatitis Virus ist ein innovatives und vielversprechendes onkolytisches Agens, das in dieser Arbeit erstmals an dem PDAC erprobt wurde. Tumorzellen verschiedenster Arten können durch VSV infiziert und zerstört werden. Viele maligne Zellen gewährleisten eine effektive Replikation und produzieren generell mehr Viren als gesunde Zellen (Bell, Garson et al. 2002). In den letzten Jahren hat VSV sich in mehreren Studien als potentes und erfolgreiches onkolytisches Therapeutikum präsentiert. Ebert et al. zeigten beispielsweise eine signifikante Tumordestruktion von hepatozellulären und kolorektalen Tumoren in immunkompetenten Ratten- und Mausmodellen (Ebert, Shinozaki et al. 2003; Huang, Ebert et al. 2003). Auch andere Krebserkrankungen wie Brustkrebs, Melanome, Glioblastome und Blasenkrebs wurden bereits in diversen Modellen durch VSV therapiert (Fernandez, Porosnicu et al. 2002; Hadaschik, Zhang et al. 2008; Ozduman, Wollmann et al. 2008). Die Effektivität von VSV als mögliches Therapeutikum für das duktales Adenokarzinom des Pankreas wurde allerdings noch nicht untersucht und ist Gegenstand dieser Arbeit. Unter anderem wurde in dieser Arbeit die Replikationskinetik von VSV an verschiedensten humanen und murinen pankreatischen Zelllinien *in vitro* untersucht. Zusätzlich wurden durch verschiedene methodische Ansätze das Ansprechen des antiviral wirkenden exogenen Typ 1 Interferons auf pankreatische Tumorzelllinien untersucht und die zugrundeliegenden molekularen Signalmechanismen analysiert. In immunkompetenten orthotopen und konditionalen endogenen Mausmodellen wurde abschließend die VSV-Replikation zusätzlich *in vivo* untersucht.

4.1 VSV-Replikationskinetik in pankreatischen Tumorzellen

Im Vergleich mit anderen onkolytischen Viren hat das VSV einen sehr schnellen Replikationszyklus von nur 8-10 Stunden. Diese Eigenschaft ist für eine onkolytische

Virotherapie äußerst vorteilhaft, da so eine effektive Tumordestruktion erreicht werden kann, bevor durch den Wirt eine neutralisierende Immunantwort ausgelöst wird (Ebert, Shinozaki et al. 2003). Um die VSV-Replikation in pankreatischen Tumorzelllinien zu analysieren wurden verschiedene humane und murine pankreatische Zelllinien mit rVSV-GFP oder VSV-M51R infiziert und die viralen Titerveränderungen im zeitlichen Verlauf genau analysiert. Die Zellen wurden jeweils mit zwei unterschiedlichen Infektionsdosen (MOI 1 und MOI 0,001) inkubiert um zu untersuchen, inwiefern sich der zeitliche Replikationsverlauf und die Titerhöhe aufgrund der verschiedenen viralen Ausgangsdosen verändert.

Die meisten Wildtyp-VSV-Stämme lösen bekanntlich nur eine sehr geringe Interferoninduktion aus (Marcus, Rodriguez et al. 1998; Ahmed, McKenzie et al. 2003). Die Virusmutante VSV-M51R wurde in die Analyse miteinbezogen, da sie im Vergleich zum Wildtyp-Virus bekanntlich eine um ein Vielfaches erhöhte Interferoninduktion auslösen kann. Dies ist begründet durch das mutierte M-Protein, das normalerweise eine virusinduzierte Interferonexpression effektiv verhindert (Stojdl, Lichty et al. 2003; Connor and Lyles 2005). Es wurde bereits demonstriert, dass die Anwesenheit von IFN- α den therapeutischen Index von VSV bei einigen Tumorarten sowohl in vitro als auch in vivo signifikant erhöht (Bell, Garson et al. 2002). Durch die Stimulierung des intakten Interferonsignalwegs gesunder Zellen wird die unerwünschte Replikation im normalen Gewebe unterdrückt, wobei sie in vielen Tumoren aufgrund eines mutierten beziehungsweise herunterregulierten Interferonsystems erhalten bleibt. Eine potente Interferoninduktion und deren starke antivirale Wirkung kann so das gesunde Gewebe besser schützen und mögliche Nebenwirkungen wie Neuro- und Hepatotoxizität effektiv reduziert werden (Stojdl, Lichty et al. 2003). Sogar die maximale tolerable Dosis (MTD) kann bei intravenöser Applikation von VSV-M51R im Tiermodell bis zu hundertfach gegenüber dem Wildtypvirus erhöht werden (Ebert, Harbaran et al. 2005). Das Ausmaß der virusinduzierten Onkolyse ist stark abhängig von der verwendeten Ausgangsdosis und könnte eventuell durch den Einsatz von VSV-M51R gesteigert werden. Durch eine effektive Interferoninduktion und -sekretion könnte jedoch auch in Interferonsensiblen pankreatischen Tumorzellen die VSV-Replikation signifikant abgeschwächt werden. Eine starke Einschränkung der Replikation in VSV-M51R infizierten Tumorzellen ist allerdings nicht gewünscht und würde daher gegen den therapeutischen Einsatz dieser Virusmutante sprechen. Um eine Abschwächung bei der isolierten Betrachtung von pankreatischen Tumorzellen auszuschließen wurden

die verschiedenen Zelllinien in unterschiedlichen Versuchsreihen sowohl mit dem Wildtypvirus als auch der Virusmutante VSV-M51R infiziert.

In den durchgeführten Versuchen zeigte sich das VSV in allen untersuchten pankreatischen Zelllinien effektiv repliziert. Die These, dass VSV viele malignen Zellen infizieren kann und sich potent repliziert wurde hiermit nachdrücklich gestützt (Stojdl, Lichty et al. 2000). Es bestätigte sich auch die äußerst kurze Replikationsdauer von VSV. Bereits nach 8-12 Stunden wurden virale Titer von bis zu 10^9 TCID₅₀/ml erreicht (Huang, Ebert et al. 2003). Zwischen den beiden Virusvarianten rVSV-GFP und VSV-M51R war bezüglich des Replikationsverlaufs kein wesentlicher Unterschied festzustellen. Beide zeigten einen ähnlichen Replikationsverlauf und erreichten gleichhohe maximale Titer. Nach ca. 8-12 Stunden erreichten die Titer der mit einem MOI von 1 infizierten Zellen ein Plateau. Die mit einer niedrigeren MOI infizierten Zellen erreichten diese Plateauphase etwas verzögert, was am wahrscheinlichsten durch die geringere Ausgangsinfektionsdosis zu erklären ist. Dies ist auch an den um 2-3 log-Stufen höheren Ausgangstiter der mit einem MOI von 1 infizierten Zellen zu beobachten. Obwohl das Inokulum nach dreißigminütiger Inkubation wieder entfernt wurde und durch dreimaliges Waschen mit PBS versucht wurde die verbleibenden Viruspartikel zu entfernen, zeigten sich trotzdem unterschiedliche Ausgangstiter kurz nach der Infektion. Vermutlich ist es trotz dieses Waschvorgangs nicht möglich die Gesamtheit der Viruspartikel im Zellmedium zu beseitigen. Die maximal erreichten Titer variierten je nach Zelllinie zwischen 10^7 - 10^9 TCID₅₀/ml und sind damit vergleichbar mit den viralen Titer, die in anderen Tumorzelllinien durch VSV-Infektionen erzielt wurden (Balachandran and Barber 2000). Noch zu klären bleibt inwieweit VSV auch in humanen und murinen pankreatischen Primärzellen replizieren.

In den letzten Jahren wurde sogenannten Tumorstammzellen eine zunehmenden Bedeutung im Prozess der Karzinogenese, Tumorprogression und Therapieresistenz des Pankreaskarzinoms zugeschrieben (Kim and Simeone 2011). Das Tumorstammzellkonzept ist ein hierarchisches Modell, das davon ausgeht, dass Tumore aus einer Untergruppe von Tumorzellen mit stammzellähnlichen Charakter entstehen und diese maßgeblich an der Heterogenität des Tumoraufbaus beteiligt sind. Aus diesem Grund wäre es auch interessant zu prüfen, ob VSV auch in einer solchen Subpopulation von potentiellen pankreatischen Tumorstammzellen effizient repliziert. Es gibt bereits erste Hinweise, dass onkolytische Adenoviren auch

pankreatische Tumorstammzellen effizient zerstören können (Wong, Schulman et al. 2011).

4.2 Interferonsensibilität der pankreatischen Tumorzelllinien

Das Vesikuläre Stomatitis Virus reagiert äußerst sensibel auf die Anwesenheit von Interferonen. Durch Typ 1 Interferone kann die VSV-Replikation in Interferon-kompetenten Zellen bekanntlich erheblich abgeschwächt werden. Verantwortlich für diese antiviralen Effekte sind hauptsächlich Interferoninduzierte Genprodukte, wie die sogenannten Interferon stimulated Genes (ISGs). ISGs kodieren für Mediatoren der antiviralen Immunantwort und limitieren das Ausmaß der Virusproduktion durch verschiedene zell- und immunregulatorische Mechanismen. Ein Teil dieser Signalmoleküle reguliert den Zellzyklus und die Apoptoseeinleitung, weitere interagieren direkt mit der Virusreplikation oder haben immunmodulatorische Aufgaben (Kunzi and Pitha 2003). Zu den ISG-kodierten Proteinen gehören beispielsweise die Mx-Proteine (Myxovirus resistance protein), das OAS/RNase L System (2'-5'-Oligoadenylatsynthetase/RNase L System) und die doppelsträngige RNA-abhängige Proteinkinase PKR (Stark, Kerr et al. 1998). Stojdl et al. zeigten, dass Fibroblasten von PKR^{-/-}-Mäusen deutlich empfänglicher für VSV-Infektionen sind als Wildtyp-Fibroblasten und beschreiben die PKR als den Hauptverursacher der Interferon induzierten Resistenz gegenüber VSV-Infektionen (Stojdl, Abraham et al. 2000). Nach erfolgter Aktivierung durch doppelsträngige RNA inhibiert die Serin/Threonin-Kinase die Proteintranslation durch Phosphorylierung des eukaryotischer Initiationsfaktors 2 α (eIF2 α) (Sen and Ransohoff 1993). Interessanterweise haben Studien gezeigt, dass die Expression von aktiviertem RAS die PKR inaktiviert, obwohl die Mechanismen, die dazu führen, noch nicht vollständig geklärt sind (Mundschau and Faller 1992; Battcock, Collier et al. 2006). Coffey et al. nutzen diese Observation und zeigten, dass das Reovirus vorzugsweise in RAS-transformierten Zellen repliziert (Coffey, Strong et al. 1998). Auch das Newcastle-Disease-Virus scheint bevorzugt in Tumoren mit überaktiven RAS-Proteinen zu replizieren (Lorence, Katubig et al. 1994). Da Pankreaskarzinome in über 90 % Mutationen im RAS-Onkogen besitzen, könnte dies vorteilhaft für eine onkolytische Virotherapie mit VSV sein und möglicherweise mitverantwortlich für die in dieser Arbeit dargestellte effektive VSV-Replikation in vitro sein. Neben einer Funktionseinschränkung der PKR erhöhen auch noch andere defekte zelluläre

Signalwege die Empfänglichkeit von VSV-Infektionen (Obuchi, Fernandez et al. 2003). Beispielsweise scheinen auch eine Überexpression von Myc, Bcl-2 sowie Defekte im Tumorsuppressorgen p53 und Beeinträchtigungen im RAS/Raf1/MEK/ERK-Signalweg eine VSV-vermittelte Onkolyse zu erleichtern (Balachandran and Barber 2000; Noser, Mael et al. 2007). Solche genetischen Defekte kommen in bis zu 90 % aller bekannten Tumoren vor und begünstigen dadurch den Einsatz von VSV in einem breiten Spektrum von Malignomen (Weinberg 1995).

Voraussetzung für eine Attenuierung der VSV-Replikation ist vordergründlich eine intakte Interferonantwort der infizierten Zellen. Die Interferonsignalkaskade besitzt neben antiviralen und immunmodulatorischen Effekten auch zahlreiche wachstumsregulierende Eigenschaften und spielt eine wichtige Rolle in der Apoptoseeinleitung. Diese antiproliferativen und apoptotischen Effekte sind auch Kernansatzpunkte der therapeutischen systemischen Interferonapplikation bei verschiedenen soliden und hämatologischen Neoplasien (Bracarda, Eggermont et al. 2009). Dysfunktionen des Interferonstoffwechsels treten bei der Entstehung von vielen Krebserkrankungen auf (Linge, Gewert et al. 1995; Wong, Krauer et al. 1997; Sun, Pabon et al. 1998). Daher sprechen auch lediglich eine begrenzte Anzahl von Tumoren auf eine Interferontherapie an (Stojdl, Lichty et al. 2000). Durch Defekte in der Interferonsignalkaskade verschaffen sich Tumorzellen möglicherweise Überlebens- und Wachstumsvorteile, werden aber gleichzeitig auch anfälliger für virale Infektionen (Everts and van der Poel 2005). Diese Begleiterscheinung der Tumorentstehung ist eine der grundlegenden Ansatzpunkte für die VSV-vermittelte Onkolyse.

Um dieses Phänomen an verschiedenen pankreatischen Zelllinien zu erforschen wurde ein sogenannter „Interferon Protection Assay“ durchgeführt. Ziel war es zu untersuchen, inwiefern sich die VSV-Replikation in den pankreatischen Tumorzelllinien durch eine exogene Interferonzufuhr dosisabhängig abschwächen lässt. Die pankreatischen Tumorzellen wurden hierzu für zwölf Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen (10, 100, 1000 IU/ml) von universalem Typ 1 Interferon inkubiert und anschließend mit einem MOI von 1 mit rVSV-GFP infiziert. Die viralen Titer wurden kurz nach der Infektion und 24 Stunden später mittels TCID₅₀ Assays bestimmt. Es zeigten sich in allen Versuchsreihen geringe Ausgangstiter von 10²-10³ TCID₅₀/ml kurz nach Infektion. So wurde bewiesen, dass die Virustiter nach 24 Stunden ausschließlich durch die VSV-Replikation in den

verschiedenen Zelllinien zu erklären ist und nicht durch die Anfangsinfektionsdosis bedingt war. Erstaunlicherweise zeigte sich in diesem Versuch ein deutlicher Unterschied zwischen den humanen und den murinen pankreatischen Zelllinien. Unter den sechs geprüften humanen Zelllinien fanden sich zwei Zelllinien (PANC-1 und Su.86.86), die nicht auf eine exogene Interferonstimulation reagierten. Auch bei sehr hohen Interferonkonzentrationen von 1000 IU/ml zeigte sich kaum eine Abschwächung der Virusreplikation. Zu begründen ist diese Insensibilität der PANC-1 Zellen möglicherweise durch eine sehr geringen Expression des Typ 1 Interferonrezeptors (Saidi, Williams et al. 2006; Vitale, van Eijck et al. 2007). Alle α - und β -Interferone interagieren mit dem gleichen homologen Rezeptorkomplex, dem Interferon- α/β -Rezeptor (IFNAR), der aus den zwei Untereinheiten IFNAR-1 und IFNAR-2 zusammengesetzt wird (Taniguchi and Takaoka 2001). Es gibt Hinweise, dass auch die Zelllinie Su.86.86 nur eine schwache Expression des Interferonrezeptors aufweist (Jöst 2009). Diese Vermutung könnte beispielsweise durch eine immunhistochemische Färbung weiter verifiziert werden. Nicht auszuschließen sind jedoch auch Defekte in den nachfolgenden Signalkaskaden. Die humane Zelllinie MiaPaCa-2 reagierte am sensibelsten gegenüber der exogenen Interferonstimulation und besitzt im Gegensatz zu PANC-1 nachgewiesenerweise eine deutlich höhere Interferon-Rezeptor-Expression (Vitale, van Eijck et al. 2007). Auch in anderen Tumorentitäten wie beispielsweise dem Blasenkrebs scheinen Defekte beziehungsweise Herunterregulationen des Interferonrezeptors die VSV-vermittelte Onkolyse entscheidend zu beeinflussen (Zhang, Matsui et al. 2009). Möglicherweise übt das exogene Typ 1 Interferon aber auch noch unbekanntes IFNAR-unabhängige Funktionen aus, die die VSV-Replikation inhibieren. Nicht auszuschließen sind natürlich auch Defekte in den dem Interferonrezeptor nachgeschalteten Signalkaskaden wie beispielweise dem JAK-STAT-Signalweg. Es wurde schon berichtet, dass in vielen Tumoren und Tumorzelllinien solche Interferonsignalmoleküle in deutlich geringerem Maß als in normalen Zellen vorhanden sind und die Zellen daher nur schwach auf eine exogene Interferonstimulation reagieren (Matikainen, Ronni et al. 1997; Wong, Hatzinisiriou et al. 1998; Melen, Keskinen et al. 2000). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass bis zu 75 % der humanen PDAC eine nur sehr schwache bis gar keine Expression des Interferon α/β -Rezeptors haben (Ota, Nagano et al. 2006; Saidi, Williams et al. 2006). Es ist daher erstaunlich, dass in den getesteten Zelllinien nur zwei von insgesamt sechs humanen Zelllinien keinerlei Abschwächung der VSV-

Replikation bei ansteigenden Interferonspiegeln zeigten. Jedoch scheint das Expressionsmuster des Interferonrezeptors auf der Zelloberfläche von humanen Tumorzellen nicht zwangsweise mit den vielfältigen Wirkungen von Interferonen auf die Zielzellen korrelieren (Yano, Iemura et al. 1999).

Die anderen humanen Zelllinien zeigten allesamt eine konzentrationsabhängige Abschwächung der VSV-Replikation. Bei Interferonkonzentrationen von 100 IU/ml war bereits eine Titerreduktion von 1-3 log-Stufen zu verzeichnen. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die antivirale Interferonantwort in diesen Zellen zumindest teilweise funktionsfähig ist. Bei Interferonspiegel über 100 IU/ml scheint daher eine VSV-Therapie für humane Interferon-sensible PDAC nur bedingt geeignet zu sein. Eventuell wäre es aufgrund der Diversität der humanen pankreatischen Tumorzellen sinnvoll vor Therapieeinleitung mit VSV eine Bestimmung des Interferon-Rezeptorstatus durchzuführen, um das prospektive Therapieansprechen besser vorhersagen zu können.

Die murinen Zelllinien zeigten bezüglich der Interferon-abhängigen VSV-Replikation ein eher einheitliches Bild. Jedoch war zwischen den beiden genetisch determinierten Zellklassen (CK und CKN2) auch ein signifikanter Unterschied festzustellen. Alle murinen Zelllinien zeigten sich sensibel auf exogen-zugeführtes Interferon, wobei das Ausmaß zwischen den Zelllinien variierte. Bei sehr hohen Konzentrationen von 1000 IU/ml waren durchschnittliche Titerreduktionen von 3-5 log-Stufen zu beobachten.

Diese Ergebnisse deuten eventuell auf einen Unterschied zwischen dem Interferonsystem in PDAC von Mäusen und Menschen hin. Es wurde bereits gezeigt, dass selbst unterschiedliche Mausarten teilweise erhebliche Unterschiede in der Sensitivität gegenüber VSV-Infektionen aufweisen. Die Ursachen hierfür sind nicht eindeutig geklärt. Es wurde vermutet, dass der Interferonsignalweg in den verschiedenen Rassen unterschiedlich effektiv ist oder Mutationen in einigen wichtigen ISGs vorliegen (Obuchi, Fernandez et al. 2003). Gegebenenfalls ist auch die Tatsache, dass die murinen Zelllinien aus endogenen Mausmodellen generiert wurden ursächlich für ein anderes Interferonansprechen, da die Karzinogenese im endogenen Mausmodell deutlich schneller abläuft und Mutationen im Interferonsystem möglicherweise erst zeitlich verzögert im Verlauf der Karzinogenese auftreten. Auffällig war, dass zwischen den beiden murinen Zellklassen CK und CKN2 auch ein eindeutiger Unterschied der Interferonsensibilität zu verzeichnen war. Warum die CKN2-Zellen empfindlicher als die CK-Zellen auf die

Stimulation mit exogenem Typ 1 Interferon ansprechen, war unklar. Unter Umständen hat der zusätzliche Notch-2-Knockout einen Einfluss auf das Interferonansprechen.

Um diese Beobachtung genauer zu untersuchen und mögliche zugrundeliegenden genetische Ursachen abzuklären wurden zusätzlich die Microarray-Daten dieser beiden Zellklassen miteinander verglichen. Die Microarray-Daten wurden aus unstimulierten Zellen ohne vorherige Interferoninkubation generiert. Aus dem Microarray-Profil der Zelllinien wurden 105 für den Interferonstoffwechsel relevante Gene ausgewählt. Es wurden jeweils die Mittelwerte der Genexpression von drei CK-Zellen (CK 17027, CK 2190, CK 9801) und CKN2-Zellen (CKN2 1006, CKN2 3113, CKN2 1013) berechnet und in ein Verhältnis gesetzt (CKN2/CK). Eine erhöhte Expression in den CKN2-Zelllinien fand sich vor allem in den folgenden sechs Genen: interferon-induced protein 44, interferon induced transmembrane protein 3, interferon induced transmembrane protein 1, interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3, interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1, 2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2. All diese Gene sind durch die Stimulation mit Interferon α/β induzierbar. Das interferon-induced protein 44 (auch p44) gehört zu der Familie der Interferon stimulierbaren Genen und besitzt eine entfernte Verwandtschaft zu den Ras-GTPasen. Es scheint antivirale Eigenschaften zu besitzen, die vor allem bei Hepatitis C Virus Infektionen bereits nachgewiesen wurden (Kitamura, Takahashi et al. 1994).

Die interferon induced transmembrane proteine 1 und 3 sind Interferon induzierbare Membranproteine, deren Expression durch das ISRE kontrolliert wird. Sie scheinen eine Rolle in der Embryonalentwicklung beziehungsweise Adhäsion, Bewegung und Differenzierung der Keimzellen zu spielen (Tanaka, Yamaguchi et al. 2005). Außerdem scheinen ihnen zusätzlich regulatorische Funktionen in der Zellproliferation zuzukommen (Deblandre, Marinx et al. 1995). Da das NOTCH2-Gen, das in den CKN2-Zellen inaktiviert ist, auch eine entscheidende Rolle in der embryonalen Entwicklung einnimmt, gibt es hier womöglich gewisse kausale Zusammenhänge, die eine solche Hochregulation dieser Gene erklären könnten.

Das interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 (IFIT1, auch ISG56) gehört wie das IFIT3 ebenfalls zu den erst entdeckten interferon stimulated genes (Wathelet, Moutschen et al. 1986). Es wurde berichtet, dass ISG56 mit dem Translationsinitiationsfaktor eIF-3 interagiert und dadurch die Translationsinitiation und die Proteinsynthese supprimiert (Terenzi, Hui et al. 2006). Obwohl Typ 1

Interferone vorrangig in die antiviralen Abwehrmechanismen des Wirts involviert sind, muss die Produktion dieser Zytokine präzise reguliert werden um eine exzessive und potentiell gefährliche Immunantwort zu verhindern. Von Li et al. wird angenommen, dass das interferon stimulated gene 56 (ISG56) als ein Mediator der negativen Feedback Regulation einer Virus induzierten antiviralen zellulärer Antwort fungiert (Li, Li et al. 2009). Es wurde gezeigt, dass die Überexpression von ISG56, die durch zytoplasmatisches Poly I:C induzierte Inhibition der VSV-Replikation wiederaufhebt und ein Knockdown von ISG56 ebenfalls die VSV-Replikation behindert.

Das Gen für die 2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2 zeigte ebenfalls eine erhöhte Expression in den CKN2-Zelllinien. Das 2',5'-oligoadenylate Synthetase (OAS)/RNase L System ist ein Signalweg des angeborenen Immunsystems, der auf bestimmte Struktur motive, sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster, reagiert und die virale Replikation durch Degradation von viraler oder zellulärer RNA blockiert (Silverman 2007). Im Falle einer viralen Infektion sind diese Pathogen-assoziierten molekularen Muster doppelsträngige RNA (dsRNA), die während der Infektion mit RNA- und auch DNA-Viren produziert werden.

Möglicherweise hat die erhöhte Expression der angegebenen Gene in den CKN2-Zellen Einflüsse auf die nachgewiesene ausgeprägte Interferonsensibilität. Unklar bleibt jedoch, warum trotz dieser erhöhten Expression, der zum Teil auch antiviral wirkenden Genen, der Replikationsverlauf von VSV in den CKN2-Zelllinien nicht wesentlich von den CK-Zelllinien abweicht, da die erhöhte Expression der genannten Gene bereits im unstimulierten Zustand, das heißt ohne vorherige Interferonzugabe, nachgewiesen wurde. Vielleicht spielt die Überexpression von ISG56, das in einen negativen Feedbackmechanismus der antiviralen Zellantwort involviert ist, hierbei eine Rolle. Um die möglichen Ursachen genauer abzuklären wäre es wünschenswert die analysierten Microarray-Daten mit dem Expressionsmuster der untersuchten Zelllinien nach Stimulation mit Interferon beziehungsweise nach VSV-Infektion zu vergleichen.

Zusammenfassend zeigten sich die humanen Zelllinien am resistantesten gegenüber exogenem Interferon und die murinen CKN2-Zellen am sensibelsten. Dieser Versuch deutete bereits auch mögliche Schwierigkeiten einer VSV-Therapie an immunkompetenten Mausmodellen mit diesen Zelllinien an, da sie alle in gewissem Ausmaß sensibel auf höhere Interferonkonzentrationen reagierten. Die Replikation in vivo könnte daher durch die Serum-Interferonspiegel der Maus eventuell bedeutend abgeschwächt werden.

4.3 Der Interferonsignalweg in pankreatischen Tumorzellen

In dem durchgeführten Interferon Protection Assay zeigte sich, dass einige der getesteten Zellen auf exogenes Interferon sensibel reagierten und sich die virale Replikation dadurch konzentrationsabhängig supprimieren ließ. Bei der Analyse der Replikationskinetik von rVSV-GFP und VSV-M51R in den untersuchten Tumorzellen fielen jedoch eine potente Vervielfältigung der beiden Virusvarianten und eine starke Zytolyse der Tumorzellen bei mikroskopischer Betrachtung auf. Es stellte sich daher die Frage, inwiefern die Zelllinien selbst in der Lage sind eine schützende antiviral wirkende Interferoninduktion zu initiieren. Um dies herauszufinden wurde ein Luciferase-Reportergen-Assay mit verschiedenen Reporterplasmiden durchgeführt. Die Induktion der Interferone während viraler Infektionen wird durch die koordinierte Aktivierung von multiplen zellulären Transkriptionsfaktoren, wie IRF, NF- κ B, und c-Jun/ATF-2 vermittelt (Doly, Civas et al. 1998; Wathelet, Lin et al. 1998). Die Reporterexpression in dem durchgeführten Luciferase-Reportergen-Assay wurde je nach Versuchsreihe durch den IFN- β -, NF- κ B-, IRF3-, ISRE- oder Mx-Promotor kontrolliert. Die in die Interferoninduktion involvierten Faktoren NF- κ B, IRF3 lösen die Induktion von IFN- β aus, das über die Aktivierung von ISRE schließlich die Produktion des antiviralen Mx-Proteins bewirkt. Mx-Proteine gehören zu den Interferon-induzierbaren großen GTPasen, die den Replikationszyklus der Viren in einer frühen Phase blockieren (Haller, Stertz et al. 2007). Als Positivkontrolle wurden in diesem Experiment wiederum A549 Zellen verwendet, die bereits in Vorversuchen einen funktionsfähigen Interferonsignalweg aufwiesen und die virale Replikation signifikant abschwächten (Choudhary, Gao et al. 2001; Basu, Maitra et al. 2006).

Eine Interferoninduktion kann in eukaryotischen Zellen durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden. Hierzu gehören Viren, aber auch Bakterien, doppelsträngige RNA oder Wachstumsfaktoren (Content 2009). In dem Luciferase-Reportergen-Assay wurden die untersuchten Zelllinien zum einen durch eine virale Infektion durch VSV-M51R und auch durch das synthetisch hergestellte dsRNA-Analoga (Poly I:C), das einmal zum Medium hinzugefügt und in einem zweiten Versuch transfektiert wurde, stimuliert. VSV-M51R löst im Gegensatz zum Wildtyp-VSV eine wesentlich höhere Interferoninduktion aus und war daher besser geeignet für dieses Experiment. In dem durchgeführten Versuch zeigte sich in den Kontrollzelllinien (A549) eine deutliche Induktion des IFN- β - und des IRF3-Promotors durch eine Infektion mit VSV-M51R. Die IFN- β -Induktion stieg auf das über sechzigfache des Ausgangswertes. In den pankreatischen Tumorzellen zeigte sich lediglich eine

geringe Erhöhung der Luciferaseaktivität mit einer maximal zehnfachen Induktion des IFN- β -Promotors in PANC-1 Zellen. Die Induktion der anderen Promotoren variierte zwischen den unterschiedlichen pankreatischen Zelllinien, blieb aber auch generell eher gering ausgeprägt. Das zum Medium hinzugefügte Poly I:C zeigte in keiner Zelllinie eine signifikante Induktion der transfektierten Reporterplasmide. Auch das transfektierte Poly I:C hatte insgesamt eine eher niedrige Induktion der Plasmide zu Folge, dennoch war in den Kontrollzelllinien (A549) eine rund zehnfache Induktion und in den pankreatischen Zelllinien eine zwei- bis vierfache Induktion des IFN- β -Promotors durch das transfektierte Poly I:C zu beobachten. Diese Beobachtungen deuten daraufhin, dass die untersuchten Zelllinien wahrscheinlich einen Verlust der Toll-like Rezeptor 3 (TLR-3) abhängigen Identifizierung von doppelsträngiger RNA (Poly I:C) aufweisen. Das zum Medium hinzugefügte Poly I:C wird durch Endozytose in die Zellen aufgenommen und in den Endosomen durch den dortigen transmembranären TLR-3 erkannt (Akira and Takeda 2004). Durch den TLR-3 wird eine Signalkaskade eingeleitet, die über verschiedene Zwischenschritte zu einer Aktivierung von IRF3 und IRF7 führt und letztendlich in einer Induktion des IFN- β -Gen-Promotors resultiert (Honda and Taniguchi 2006). Eine Herunterregulation und Defekte in dieser doppelsträngigen RNA-induzierten antiviralen Signalkaskade in Tumorzellen wurde bereits durch verschiedene Autoren vorbeschrieben (Lanford, Guerra et al. 2003; Li, Sun et al. 2005; Dansako, Ikeda et al. 2007). Wo genau der Defekt in der TLR-3-abhängigen Signalkette in den verwendeten Zelllinien lokalisiert ist bleibt jedoch unklar und bedarf weiteren Untersuchungen. Die zytosolische Erkennung von doppelsträngiger RNA scheint hingegen zumindest teilweise funktionsfähig zu sein. Transfektiertes Poly I:C ähnelt während einer Virusinfektion gebildeten doppelsträngigen RNA und wird durch TLR-unabhängige Mechanismen erkannt. Hier spielen vor allem die beiden RNA-Helikasen RIG-I und MDA-5 eine entscheidende Rolle (Seth, Sun et al. 2006). Sie führen durch mehrere Zwischenschritte zu einer Aktivierung von NF- κ B, IRF3 und IRF7. Eine Beeinträchtigung dieser zytoplasmatischen Erkennung ist aufgrund der nur gering ausgeprägten Induktion der Promotoren jedoch nicht sicher auszuschließen. Ursachen einer solchen Funktionsminderung könnten Defekte im Jak-STAT-Signalweg oder eine herabgesetzte Aktivität der Interferon regulatorischen Faktoren (IRFs) sein (Keskinen, Nyqvist et al. 1999). Der Jak-STAT-Signalweg ist wohl der prominenteste und am meisten untersuchte antivirale Signalweg, der durch die Bindung von Interferon an die oberflächlichen Zellrezeptoren IFNAR1 und IFNAR2

aktiviert wird. Die Bindung von Interferon an seinem Rezeptor führt zu einer Aktivierung von Jak1 und Tyk2 durch Tyrosinphosphorylierung, welche wiederum die Phosphorylierung der STATs fördern. Anschließend dimerisieren die phosphorylierten STAT1 und STAT2 und formieren zusammen mit IRF9 den ISGF3-Komplex. Der im Zytoplasma gebildete ISGF3-Komplex wird durch nukleäre Translokation in den Zellkern transportiert und bindet dort das IFN-stimulated responsive element (ISRE), was schließlich zur Expression verschiedener antiviraler Proteine führt. Es zeigte sich in verschiedenen Studien, dass Mäuse die keine funktionalen IFNAR1- oder STAT1-Gene besitzen sehr viel empfänglicher für tödliche virale Infektionen sind (Muller, Steinhoff et al. 1994; Durbin, Hackenmiller et al. 1996; Meraz, White et al. 1996). Aufgrund der großen Bedeutung dieses Signalwegs haben auch einige Viren Resistenzmechanismen entwickelt um diesen wichtigen antiviralen Signalweg zu blockieren und auf diese Weise eine Attenuierung der Replikation zu vermeiden. Verschiedene Flaviviren blockieren zum Beispiel die Phosphorylierung von den Signalmediatoren Jak1, Tyk2, STAT1 und STAT2 und wirken so der durch Interferon induzierten Jak-STAT-Signalkette entgegen (Lin, Chang et al. 2006).

Veränderungen im Jak-STAT-Signalweg sind in Tumorzellen keine Seltenheit. Insbesondere das überaktive phosphorylierte Protein STAT3 scheint im Transformations- und Metastasierungsprozess des PDAC eine wichtige Rolle zu spielen (Huang, Yang et al. 2010). Ursächlich für diese Überaktivierung ist möglicherweise eine Stimulation mit Interleukin-6 aufgrund eines chronischen Entzündungsprozesses, der in der Tumorgenese und -progression des PDAC eine essentielle Rolle zu spielen scheint (Liu, Liu et al. 2011). Dieser überaktive STAT3-Signalweg könnte daher einen neuen innovativen Ansatzpunkt für molekulare Therapieformen darstellen. Inwiefern eine VSV-Therapie diesen Tumor-initiiierenden Entzündungsreiz beziehungsweise den überaktiven STAT3-Signalweg positiv beeinflussen kann bleibt noch zu klären. Es wurde bereits berichtet, dass Wildtyp-VSV-Stämme in der Lage sind durch das viruseigene M-Protein bestimmte zelluläre Signalkaskaden wie den STAT-Signalweg zu inhibieren und dadurch die Interleukin-6 induzierte Entzündungsreaktion abzuschwächen (Terstegen, Gatsios et al. 2001).

4.4 ISRE-Promotoraktivierung durch VSV-M51R und exogenes Interferon

Die Ergebnisse des Interferon Protection Assays zeigten, dass in einigen pankreatischen Zelllinien die VSV-Replikation durch die Zufuhr von exogenem Interferon erheblich reduziert werden kann. Die pankreatischen Zelllinien scheinen jedoch nicht selbständig eine effektive Interferonantwort induzieren zu können und sind daher auf externes Interferon angewiesen. Diese fehlende beziehungsweise sehr schwach ausgeprägte Interferoninduktion wurde bereits durch ein Luciferase Reporter Assay demonstriert. Ursachen für eine solche reduzierte Interferoninduktion könnten unter anderem Defekte im Jak-STAT-Signalweg sein. Um diese mögliche Ursache weiter abzuklären wurde in folgendem Versuch das Ansprechen des ISRE-Promotors durch eine exogene Interferonstimulation beziehungsweise VSV-Infektion untersucht. Das Interferon Response Element (ISRE) ist ein cis-acting-DNA-Element und ist in der Promotorregion vieler durch Interferon- α/β -regulierter Gene vorhanden. ISRE ist neben GAS (Interferon-Gamma Activated Sequence), einem weiteren cis-acting DNA-Element, eines der Hauptziele der IRF- und STAT-Transkriptionsfaktoren und großteils für die Regulation der Promotoraktivität von Interferon-induzierbaren Genen verantwortlich. ISRE ist die Bindungsstelle von dem Interferon stimulierten Gen Faktor 3 (ISGF-3) und einigen IRFs und moduliert so die Expression der durch Typ 1 Interferon-induzierbaren Genen (Darnell 1997; Leonard and O'Shea 1998).

In diesem Versuch zeigte sich, dass ausschließlich die Kontrollzelllinie Huh-7 eine starke rund hundertfache ISRE-Induktion durch externe Interferonstimulation aufwies. Eine andere Gruppe demonstrierte bereits, dass in den verwendeten Huh-7 Zellen eine Interferonbehandlung die ISRE-abhängige Expression der Firefly-Luciferase auslösen kann, was auf einen funktionsfähigen Jak-STAT-Signalweg dieser Zelllinie deutete (Pai, Prabhu et al. 2005). Es ist auch bekannt, dass sich in den Huh-7 Zellen durch exogenes Interferon eine vielfach höhere Induktion des ISRE-Promotors erreichen lässt als durch eine Infektion mit VSV-M51R. Dieses Phänomen zeigte sich auch in diesem Versuch. Ursächlich wird angenommen, dass die hepatozelluläre Karzinom Zelllinie Huh-7 eine dysfunktionale Variante des Transkriptionsfaktors IRF3 aufweist und dadurch die Integrität des Interferonsignalwegs beeinträchtigt wird (Marozin, Altomonte et al. 2008).

Alle untersuchten pankreatischen Zelllinien zeigten hingegen nur eine geringe oder gar keine Antwort des ISRE-Promotors durch das hinzugefügte universale Typ 1 Interferon. Diese Beobachtungen deuten auf einen möglichen Defekt im Jak-STAT-

Signalweg hin und unterstützen somit die zuvor geäußerte These. Warum die pankreatischen Tumorzellen trotz dieses möglichen Defekts in dem Jak-STAT-Signalweg auf exogenes Interferon teilweise sensibel reagierten, wie im Interferon Protection Assay demonstriert wurde, bleibt unklar. Möglicherweise übernehmen andere alternative Signalkaskaden die Funktion des Jak-STAT-Signalwegs. Da Viren im Lauf der Evolution einen erheblichen Selektionsdruck auf Organismen aller Art ausgeübt haben, gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher antiviraler Signalkaskaden. Der zuerst entdeckte, durch Interferon aktivierte Signalweg, war der Jak-STAT-Signalweg. Jedoch wurde schnell klar, dass dieser allein nicht ausreicht um die vielfältigen biologischen Funktionen der Interferone zu erklären. In den letzten Jahren gab es immer mehr Hinweise, dass eine Vielzahl verschiedener Signalmoleküle und Kaskaden benötigt werden um eine funktionsfähige Interferonantwort zu gewährleisten. Beispielsweise scheinen die Januskinasen nach Interferonbindung weitere nachgeschaltete Signalkaskaden direkt oder indirekt zu beeinflussen (Platanias 2005). Einige von ihnen interagieren mit den STATs auf der Ebene der Transkriptionsregulation, andere operieren jedoch auch unabhängig vom Jak-STAT-Signalweg. Sowohl Typ1 als auch Typ 2 Interferone aktivieren auch Mitglieder der CRK-Familie, wie beispielsweise das Adaptorprotein CRKL, das ebenfalls die Interferon-Signaltransduktion über den C3G/Rap1-Signalweg reguliert (Platanias 2005). Gezeigt wurde auch das IRF7 und andere ISGs unabhängig vom Interferon getriggerten Jak-STAT-Signalweg induziert werden können (Ning, Huye et al. 2005). In den letzten Jahren wurden immer mehr dieser vom Jak-STAT-Signalweg unabhängigen Kinasen und Transkriptionsfaktoren entdeckt. Die Komplexität der Interferonantwort ist also noch lange nicht vollständig verstanden und scheint auch je nach Zelllinie und Virenart erheblich zu variieren (Stark 2007; Touzot, Soumelis et al. 2011).

4.5 In vivo-Ergebnisse

Nachdem die VSV-Replikation *in vitro* an pankreatischen Tumorzelllinien getestet und auch die Funktionsfähigkeit und der Einfluss des Interferonsystems auf die Replikation analysiert wurde, sollte abschließend die VSV-Replikation zusätzlich *in vivo* untersucht werden. Dazu wurden zwei verschiedenartige immunkompetente murine Tumormodelle ausgewählt. Durch die Injektion von jeweils $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ Zellen in 20 μ l PBS in das Pankreas von männlichen C57 Black Six N Mäusen

wurden orthotope Pankreaskarzinome generiert. Neben diesem orthotopen Karzinommodell wurde die VSV-Replikation auch noch in einem konditionalen endogenen Mausmodell mit genetisch manipulierten CKP-Mäusen ($Ptf1a^{+/Cre}$; $K-RAS^{+/LSL-G12D}$; $p53^{fl/fl}$) analysiert. Die Therapieeinleitung erfolgte nach gesichertem Tumorstatus an beiden Modellen durch intratumorale VSV-Injektion. Die in vivo-Replikation von VSV wurde histologisch nachgewiesen und auch quantitativ untersucht. Es wurde einerseits die rVSV-lacZ-Replikation durch eine β -Galaktosidase-Färbung an Gefrierschnitten des Tumorgewebes nachgewiesen. Andererseits wurde die quantitative Virusreplikation untersucht, indem 30 min und 24 Stunden nach VSV-Therapie aus dem explantierten homogenisierten Tumorgewebe mittels $TCID_{50}$ Assay virale Titerbestimmungen durchgeführt wurden. Durch die histologische Begutachtung war es zusätzlich möglich die morphologische Aspekte, wie Nekrose, Fibrose und Gefäßversorgung der Tumore zu begutachten.

Wie in Kapitel 3.6.1 und 3.6.2 bereits beschrieben, war in der quantitativen Analyse der VSV-Replikation kein signifikanter Titeranstieg oder -abfall 24 Stunden nach Virusinjektion im Vergleich zur Ausgangsviruslast nach 30 min zu verzeichnen. Auch die beiden verschiedenartigen murinen Tumormodelle unterschieden sich bezüglich des zeitlichen Titerverlaufs nur geringfügig voneinander. Etwas eingeschränkt wird die Aussagekraft des endogenen CKP-Mausmodells dadurch, dass sowohl männliche als auch weibliche Tiere eingesetzt wurden. Allerdings war bezüglich des Geschlechts kein signifikanter Unterschied in den ermittelten Titerverläufen feststellbar.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den in vitro erhobenen Daten, die eine effektive Virusreplikation in den pankreatischen Tumorzelllinien belegten. Über die Gründe dieser Abweichung kann lediglich spekuliert werden. Wahrscheinlich ist die in vieler Hinsicht komplexere Umgebung der murinen Pankreastumore in vivo maßgeblich verantwortlich für die fehlende oder eingeschränkte Replikation. Obwohl Viren sich schnell auf Monolayern in der Zellkultur ausbreiten können, stellt die virale Ausbreitung und homogene Verteilung in einem soliden Tumor eine weitaus größere Herausforderung dar (Heise, Williams et al. 1999). Potentielle physikalische Barrieren der viralen Expansion sind beispielweise Fibrose, normale gesunde Zellen, Basalmembranen, Zellkontakte und nekrotische Areale. Das Ausmaß der Fibrose könnte beispielsweise die Virusausbreitung im Tumorgewebe erheblich beeinflussen. Insbesondere beim PDAC scheint die Mikroumgebung des Tumors, die aufgrund der kollagenreichen Stromakomponente auch als Tumordesmoplasie bezeichnet wird,

eine herausragende Rolle in der Karzinogenese und Progression der Erkrankung einzunehmen. Sie kann bis zu 80% des gesamten Tumolvolumens ausmachen und scheint mitverantwortlich für das schlechte Therapieansprechen vieler Chemotherapeutika zu sein (Erkan, Reiser-Erkan et al. 2010). Sogar die Prognose von Patienten mit PDAC scheint direkt abhängig vom Ausmaß der aktivierten Stromakomponente zu sein (Erkan, Michalski et al. 2008). Die Präsenz von Tumor assoziierten Stromazellen kann erwiesenerweise das Ausmaß der viralen Onkolyse signifikant verändern (Lopez, Viale et al. 2009). Für die onkolytische Virotherapie stellt diese ausgeprägte Tumordesmoplasie daher eine große Herausforderung dar. Es gibt jedoch erste Hinweise, dass das VSV im hepatozellulären Kzinom das Ausmaß der Fibrose günstig beeinflussen kann (Altomonte, Marozin et al. 2011). Ob diese Feststellung auch auf andere Tumorentitäten übertragen werden kann, bleibt noch zu klären.

Auch die Anwesenheit von Fibroblasten oder Immunzellen könnte mit einer erhöhten Interferonproduktion einhergehen und auf diese Weise die Replikation von VSV in interferonkompetenten Zellen signifikant reduzieren. Daher spielt auch die Interferonsensibilität der Tumorzellen in dieser komplexen Umgebung eine herausragende Rolle. Da sich im durchgeführten Interferon Protection Assay zeigte, dass auch die beiden orthotop-implantierten Zelllinien (CK 17027 und CK 9801), in gewissem Ausmaß interferonsensibel sind, könnte dies ebenfalls mitverantwortlich für die abgeschwächte Replikation sein. Da der Virustiter nach 24 Stunden jedoch auf konstantem Niveau persistiert, kein Titerabfall zu verzeichnen ist und sich auch histologisch replikationsaktive Areale darstellen lassen, erscheint es wahrscheinlich, dass trotzdem eine gewisse virale Replikation in vivo stattfindet.

Die Tumorzellen scheinen nach den in vitro erhobenen Daten nur in eingeschränktem Ausmaß selbstständig antiviral wirkendes Interferon induzieren zu können. In der komplexen in vivo Situation können diese Aufgabe allerdings andere Zellen, wie beispielsweise plasmoid dendritische Zellen, in der Tumorumgebung übernehmen und so die Virusvervielfältigung einschränken. Interferone haben, wie bereits zuvor erwähnt, neben den antiviralen Effekten auch antiproliferative- und antiangiogenetische Effekte und beeinflussen die körpereigene Immunreaktion auf Tumorgewebe. Durch die Sekretion von Interferonen werden natürliche Killerzellen und CD8-positive T-Zellen aktiviert und dendritische Zellen in ihrer antigenpräsentierenden Funktion unterstützt (Kadowaki, Antonenko et al. 2000). Außerdem werden vermehrt proinflammatorische Zytokine, freigesetzt, die

chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und weitere Immunzellen wirken. Breitbach et al. zeigten, dass eine starke Infiltration des Tumorgewebes mit neutrophilen Granulozyten zu einer Drosselung der Blutversorgung des Tumors führt und dadurch selbst in uninanzierten Zellen aufgrund des Sauerstoffmangels zur Apoptose führt (Breitbach, Paterson et al. 2007). Selbst ohne eine potente Replikation in vivo könnte das VSV also durch seine immunstimulierenden Eigenschaften eine positive Anti-Tumorwirkung entfalten. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass die immunstimulierenden und proinflammatorischen Eigenschaften von VSV in bestimmten Tumormodellen für den Therapieerfolg sogar wichtiger sind als das eigentliche Replikationsausmaß in den Tumorzellen (Galivo, Diaz et al. 2010). Um das Entzündungsgeschehen beim PDAC besser zu quantifizieren wäre es sinnvoll die Tumorumgebung im Verlauf der VSV-Therapie histologisch zu kontrollieren und mittels speziellen immunhistochemischen Färbungen darzustellen.

In neueren Studien werden aufgrund der komplexen Tumorarchitektur und der zunehmenden Bedeutung der Tumor-Stroma-Interaktion vermehrt gentechnische manipulierte Viren untersucht, die die Mikroumgebung des Tumors positiv beeinflussen können (Kaur, Cripe et al. 2009). Diese onkolytischen Viren sind beispielweise mit zusätzlichen Genen bewaffnet, die für angiostatische Faktoren, inflammatorische Zytokine oder Proteasen kodieren und so die Vaskularisierung, die Immunantwort und die virale Ausbreitung in einem soliden Tumor regulieren können (Wojton and Kaur 2010). In Zukunft wird die tumorspezifische Mikroumgebung mit ihrer Stromakomponente wahrscheinlich eine äußerst wichtige Rolle in der gesamten Tumorthherapie spielen (Marx 2008). Lange wurde das Tumorstroma nur als passives Begleitprodukt des Malignoms angesehen, in den letzten Jahren wurde jedoch zunehmend klar, dass diese Stromakomponente einen aktiven Bestandteil des Tumors darstellt, direkt in Tumorentstehung und -progression involviert ist und entscheidend zur Therapieresistenz beiträgt (Sebens and Schafer 2011). Für die onkolytische Virotherapie stellt diese Mikroumgebung eine neue und anspruchsvolle Herausforderung dar. Onkolytische Viren haben die Möglichkeit diese Mikroumgebung im positiven Sinne zu beeinflussen und dadurch Anti-Tumor-Effekte zusätzlich zu verstärken (De Silva, Atkins et al. 2010).

Bereits in den MRT-Untersuchungen, die zur Verifizierung der Tumorentwicklung in den untersuchten Mausmodellen durchgeführt wurden, zeigte sich ein relativ heterogenes Tumorwachstum in beiden Tumormodellen. Dies bestätigte sich auch

bei der intratumoralen Applikation der VSV-Therapie. Die Tumore waren uneinheitlich bezüglich der Tumorgöße und -ausdehnung. Teilweise infiltrierten die Tumore bereits die Milz. Auch der Tumoraufbau variierte, sodass einige Tumoren große Zysten aufwiesen, andere bereits nekrotische Areale. Dadurch war die intratumorale Virusinjektion teilweise schwierig zu applizieren. Die histologische Untersuchung des Tumorgewebes bestätigte die makroskopischen Beobachtungen und zeigte nekrotische und fibrotische Tumorareale unterschiedlichen Ausmaßes. In der β -Galaktosidase-Färbung waren die VSV-infizierten und replikationsaktiven Areale als vereinzelte dunkelbläuliche Zonen sichtbar, die relativ diffus und fleckförmig über das Tumorgewebe verteilt waren. Warum sich histologisch replikationsaktive Areale mit einer β -Galaktosidase-Färbung nachweisen ließen, jedoch kein signifikanter Titeranstieg in den homogenisierten Tumoren zu verzeichnen war, liegt möglicherweise an der äußerst sensitiven Nachweismethode. Eine geringe Replikationsaktivität könnte vorhanden sein, auch wenn ein signifikanter Titeranstieg im explantierten Gewebe noch nicht nachweisbar ist. Hierfür spricht auch, dass die Virustiter nach 24 h nicht abfallen, sondern auf konstantem Niveau persistieren. Eine andere mögliche Ursache könnte die starke Heterogenität der Tumoren sein, die die quantitative Virusbestimmung und den Replikationsnachweis erschwert. Es konnten lediglich die durchschnittlichen Gesamtvirustiter der explantierten Tumore bestimmt werden. Eine regionale Differenzierung bezüglich der verschiedenen Tumorareale war nicht möglich.

Weiter zu untersuchen wären in Zukunft auch unterschiedliche Applikationsverfahren für eine VSV-Therapie am PDAC. Durch die intratumorale Virusapplikation können zwar höhere virale Titer im Tumorgewebe erzielt werden, da das Pankreaskarzinom jedoch meist in bereits metastasierten Stadien diagnostiziert wird ist diese Applikationsform gegebenenfalls nicht ausreichend um eine solche systemische Erkrankung zu therapieren. In vielen Studien mit intratumoralen Virusinjektionen wurden Zeichen von Effektivität, wie Zustandsstabilisierung, ein partielles Ansprechen oder sogar teilweise komplette Remissionen bei Patienten mit Melanomen oder Gliomen beobachtet (Shah, Benos et al. 2003; Kaufman, Deraffe et al. 2005). Dennoch war diesen Studien gemeinsam, dass nur wenig oder gar keine Verbreitung der Viren von dem primären Applikationsort statt fand. Die Effektivität von einer intratumoralen Applikation ist daher äußerst fraglich bei einer bereits disseminierten Erkrankung (Khuri, Nemunaitis et al. 2000). Eine intravenöse Administration sollte bei einer solchen Situation bevorzugt werden (Huang, Ebert et

al. 2003). Im Gegensatz zu einer lokalen Anwendung muss hier jedoch mit häufigeren und schwerwiegenderen Nebenwirkungen gerechnet werden. Bei VSV ist vor allem die akute Hepatotoxizität und Neurotoxizität gefürchtet. Die akute Hepatotoxizität scheint vorwiegend durch die akute Freisetzung systemisch wirkender inflammatorischer Zytokine bedingt zu sein und nicht durch direkte hepatogene Virusreplikation verursacht (Shinozaki, Ebert et al. 2005). Die Mechanismen, die zu der meist erst verzögert auftretenden Neurotoxizität führen, sind jedoch nicht vollständig geklärt und bedürfen weiterer Forschung (Bi, Barna et al. 1995; Plakhov, Arlund et al. 1995). Möglicherweise ist eine, im Vergleich zu anderen Organen, zeitlich verzögert auftretende Interferonantwort im Gehirn mitverantwortlich für dieses Phänomen (Trottier, Lyles et al. 2007). Es wurde gezeigt, dass diese unerwünschten adversen Effekte teilweise durch eine vorherige prophylaktische Interferon α -Therapie minimiert werden können (Shinozaki, Ebert et al. 2005). In den letzten Jahren wurden auch Fortschritte bezüglich der Neurotoxizität und der seltenen VSV-induzierten Enzephalitis gemacht. Durch Verwendung spezieller mit Mikro-RNA beladenen VSV-Varianten konnte die unerwünschte Neurotoxizität signifikant reduziert werden (Kelly, Nace et al. 2010). Um die Häufigkeit dieser unerwünschten Nebenwirkungen und den möglichen Überlebensvorteil einer VSV-Therapie am murinen PDAC abschätzen zu können, wäre in diesem Zusammenhang eine Survival- und Toxizitätsstudie wünschenswert.

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Nach wie vor hat das Pankreaskarzinom eine verheerende Prognose. Trotz des medizinischen Fortschritts in vielen Bereichen der Onkologie sind die heutzutage verfügbaren therapeutischen Mittel begrenzt und nur unzureichend wirksam. Die Suche nach neuen alternativen therapeutischen Ansätzen und Strategien ist daher unerlässlich. Eine neue innovative Therapieform könnte die Behandlung mit dem onkolytischen VSV sein. In dieser Arbeit wurden an präklinischen Modellen grundlegende Voraussetzungen der VSV-Therapie am PDAC untersucht.

Die in vitro erhobenen Daten demonstrierten eine potente VSV-Replikation in allen untersuchten pankreatischen Tumorzelllinien. Sowohl in humanen als auch in verschiedenen murinen Zellenlinien zeigten sich ähnliche zeitliche Titerverläufe nach vorausgegangener VSV-Infektion. Auch geringe Ausgangsinfektionsdosen mit einem

MOI von 0,001 reichten aus um bereits nach 12-24 Stunden hohe maximale Viruslasten von bis zu 10^7 - 10^9 TCID₅₀/ml zu erzielen.

Bezüglich der Interferonsensibilität, die für eine ergiebige VSV-Replikation eine wesentliche Rolle spielt, unterschieden sich die analysierten Zelllinien jedoch erheblich. Die humanen pankreatischen Zelllinien waren insgesamt am wenigsten sensibel gegenüber einer exogenen Interferonstimulation mit universalem Typ 1 Interferon. Die beiden humanen Zelllinien PANC-1 und Su.86.86 zeigten keinerlei Antwort auf die Interferonstimulation, was möglicherweise auf eine eingeschränkte Expression der zugehörigen Interferonrezeptoruntereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 zurückzuführen ist (Saidi, Williams et al. 2006). Die murinen Zelllinien zeigten sich im Vergleich zu den humanen Zellen deutlich sensibler auf die exogene Interferonstimulation. Jedoch waren auch zwischen den einzelnen Zelllinien und den beiden murinen Zellklassen (CK und CKN2) noch teilweise erhebliche Unterschiede im Ausmaß der Interferon-abhängigen Attenuierung der VSV-Replikation zu verzeichnen. Beispielweise zeigten die murinen CKN2-Zelllinien, die neben der endogenen K-RAS Mutation ein zusätzliches deaktiviertes Notch2-Gen besitzen, eine stärkere Abschwächung der Virusreplikation im Gegensatz zu den murinen CK-Zellen. Auffällig war vor allem die murine Zelllinie CKN2 1013, die sehr sensibel auf das exogene Interferon reagierte und die VSV-Replikation dadurch erheblich einschränkte. Warum die CKN2-Zelllinien insgesamt sensibler reagierten als die CK-Zellen, bleibt unklar und sollte durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Um diese Fragestellung weiter zu beantworten wurden außerdem die genetischen Profile der drei CK- und CKN2-Zelllinien miteinander verglichen. Aus den akquirierten Microarray-Daten wurden hierzu insgesamt 105 in den Interferonstoffwechsel involvierte Gene untersucht. Es wurden jeweils Mittelwerte aus den drei Zelllinien der beiden Zellklassen erstellt und miteinander verglichen. Es zeigte sich hierbei, dass einige Gene in den CKN2-Zelllinien eine erhöhte Aktivität aufwiesen. Bei diesen Genen handelte es sich um sogenannte ISGs (interferon stimulated genes), die alle durch Typ 1 Interferon induzierbar sind. Auffällig war vor allem das Interferon induced transmembrane protein 3, das in den CKN2-Zellen bis zu achtzigfach gegenüber den CK-Zelllinien erhöht war. Inwieweit diese erhöhte Genexpression für die stärker ausgeprägte Interferonsensibilität verantwortlich ist, bleibt jedoch ungewiss.

Da die VSV-Replikation und die virusvermittelte Onkolyse erheblich von der Interferonantwort der Tumorzellen abhängt und die getesteten Zelllinien signifikante Unterschiede bezüglich der Interferonsensibilität und deren antiviralen Wirkung

aufwiesen, wurde der Interferonsignalweg in diesen Zelllinien noch weiter untersucht. In den durchgeführten Luciferase-Reporter-Gen-Assays war lediglich eine sehr schwache Induktion der verwendeten Reporterplasmide durch VSV-Infektion und durch Stimulation mit dem dsRNA-Analoga Poly I:C in den pankreatischen Tumorzelllinien zu verzeichnen. Lediglich die Kontrollzelllinien (A549) zeigten eine deutliche positive Reaktion. Die pankreatischen Tumorzellen scheinen einen Defekt in der Toll-like Rezeptor 3 (TLR-3) abhängigen Identifizierung von dsRNA zu besitzen, da das zum Medium hinzugefügte Poly I:C in keiner Zelllinie eine Induktion der Reporterplasmide auslöste. Weiterhin zu klären gilt es die genaue Lokalisation des Defektes im fehlerhaften TLR-3-abhängigen Erkennungsmechanismus. Die zytosolische Erkennung von dsRNA scheint hingegen teilweise intakt zu sein, da das transfizierte Poly I:C in einigen Zelllinien eine positive Induktion auslöste. Zusätzlich zu diesen Defekten im Interferon-Induktions-Signalweg zeigten sich auch in der Interferonantwort der pankreatischen Tumorzellen Veränderungen. Betroffen scheint hier vor allem der Jak-STAT-Signalweg zu sein, was eine fehlende ISRE-Promotoraktivierung durch exogenes Interferon gezeigt hat. Wo genau in diesem wichtigen Signalweg der Defekt lokalisiert ist und warum die Zellen trotzdem teilweise sensibel auf exogenes Interferon reagierten, bleibt weiterhin unklar. Da Interferone sehr viele unterschiedliche zelluläre Signalkaskaden beeinflussen, wird die durch Interferon getriggerte antivirale Wirkung möglicherweise durch andere vom Jak-STAT-Signalweg unabhängige Mechanismen gewährleistet.

Die Replikationsanalyse in vivo zeigte keine signifikante VSV-Replikation in den behandelten orthotopen und endogenen Pankreastumoren. Die Titer nach 24 h waren nicht signifikant erhöht gegenüber den Ausgangstitern nach 30 min. Aufgrund des nicht nachweisbaren Titerabfalls nach 24 h und den histologisch nachgewiesenen replikationsaktiven Tumorbereichen, ist es jedoch wahrscheinlich, dass trotzdem eine geringe Replikationsaktivität vorliegt.

Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu den in vitro ermittelten Daten. Mögliche Ursachen für die deutlich schwächere Replikation in vivo sind wahrscheinlich hauptsächlich in der in vieler Hinsicht komplexeren Tumorarchitektur und -Umgebung unter in vivo-Bedingungen zu suchen. Die Virusausbreitung und Replikation stellt in vivo eine weitaus größere Herausforderung dar als in der Zellkultur. Auch die Rolle der Interferone, die Produktion und die Mechanismen der antiviralen Wirkung sind in dieser multizellulären Umgebung erheblich komplexer. Möglicherweise stellt die

nachgewiesene Interferonsensibilität der murinen Pankreaskarzinome ein entscheidendes Hindernis für eine effektive VSV-Replikation in vivo dar.

In Zukunft gilt es einerseits die Ursachen der mangelnden VSV-Replikation in vivo zu erforschen und gleichzeitig Strategien zu erarbeiten, die das Replikationsausmaß von VSV in vivo verbessern. Andererseits sollten mögliche besser geeignete Tumormodelle und alternative Applikationsverfahren für die VSV-Therapie am PDAC entwickelt und untersucht werden. Durch genetische Modifikationen ist es möglich das VSV zu verändern und dadurch eine potentere Replikation und Tumordestruktion zu erzielen sowie das Mikromilieu des Tumors positiv zu beeinflussen. Eine Möglichkeit die onkolytische Potenz von Viren zu steigern wäre beispielsweise die Insertion von therapeutischen Genen in das viruseigene Genom. Gentechnisch modifizierte Viren, die für die HSV-Thymidinkinase oder besondere hyperfusogene Proteine kodieren, zeigten nachweislich eine verbesserte onkolytische Aktivität in vivo (Fernandez, Porosnicu et al. 2002; Ebert, Shinozaki et al. 2004). Die Tumormikroumgebung und extrazelluläre Matrix könnten durch intratumorale Koadministration von Hyaluronidasen oder durch modifizierte Metalloproteinase-exprimierende Viren beeinflusst werden und so eine bessere Ausbreitung und effektivere Replikation der Viren ermöglichen (Cheng, Sauthoff et al. 2007; Ganesh, Gonzalez-Edick et al. 2008).

Auch die Kombination von onkolytischen Viren mit anderen konventionellen therapeutischen Mitteln wie Bestrahlung und Chemotherapie gewinnt durch die synergistischen Antitumor-Effekte zunehmend an Bedeutung (Nelson, Davydova et al. 2009). Neuere klinische Studien an Patienten nach Pankreatektomie mit einer Kombination aus systemischer Interferongabe und Radiochemotherapie zeigten einen vielversprechenden Überlebensvorteil jedoch eine sehr hohe Begleittoxizität (Picozzi, Kozarek et al. 2003; Picozzi, Abrams et al. 2011). Es wurde festgestellt, dass Typ I Interferone in der Lage sind die Radiosensitivität des Pankreaskarzinoms zu erhöhen (Morak, van Koetsveld et al. 2011). Durch den Interferoninduzierenden Effekt bestimmter VSV-Formen könnte möglicherweise ebenfalls eine solche strahlensensibilisierende Wirkung erzielt werden.

5 Zusammenfassung

Das Feld der viralen Onkolyse wurde in den letzten Jahren revolutioniert. Das Vesikuläre Stomatitis Virus (VSV) erwies sich in den letzten Jahren als potentes onkolytisches Therapeutikum für eine Reihe unterschiedlicher Tumorentitäten. Vor allem seine einzigartigen genetischen und molekularbiologischen Eigenschaften machen es zu einem erfolgreichen Kandidaten in der onkolytischen Virotherapie. Ursächlich für eine effektive Replikation in einem weitreichenden Spektrum maligner Zellen sind vor allem Mutationen und Veränderungen im Interferon vermittelten zellulären Abwehrmechanismus der entarteten Zellen.

In dieser Arbeit wurde erstmalig in der Literatur die Anwendung des onkolytischen Vesikulären Stomatitis Virus an dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas untersucht. Das pankreatische duktales Adenokarzinom hat seit Jahren eine infauste Prognose und ist durch eine weitgehende Resistenz gegenüber konventionellen Therapiemaßnahmen gekennzeichnet. Folglich ist man stets auf der Suche nach neuen innovativen therapeutischen Optionen. Ziel dieser Arbeit war es, anhand verschiedener in vitro-Versuche und zwei unterschiedlichen murinen Tumormodellen, zu untersuchen inwiefern sich das Vesikuläre Stomatitis Virus als Therapieform für das pankreatische duktales Adenokarzinom eignet. Hierzu wurde die VSV-Replikation sowohl in vitro als auch in vivo analysiert. Durch eine genauere Charakterisierung von verschiedenen humanen und murinen pankreatischen Tumorzelllinien sollten zusätzlich mögliche Unterschiede in der zellulären Interferonantwort und -induktion erfasst werden.

Die in vitro-Versuche an pankreatischen Tumorzelllinien demonstrierten eine potente Virusreplikation in allen untersuchten Zelllinien. Es zeigten sich kaum Unterschiede im Replikationsverlauf der verschiedenen Zelllinien und den verwendeten VSV-Formen. Bereits kleine Infektionsdosen reichten aus um innerhalb von 12-24 h hohe Virustiter zu erzielen.

Bezüglich der Interferonsensibilität, die für eine erfolgreiche VSV-Therapie eine entscheidende Rolle spielt, zeigten die Zelllinien in verschiedenen vergleichenden Versuchen teilweise erhebliche Unterschiede. Am wenigsten sensibel zeigten sich die humanen Zelllinien und am sensibelsten die murinen CKN2-Zellen. Mitverantwortlich für die schlechte Ansprache auf die exogene Interferonstimulation

in einem Teil der humanen Zelllinien scheint wahrscheinlich das Fehlen der zugehörigen Interferonrezeptoruntereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 zu sein.

Durch den Vergleich von Microarray-Daten und Durchführung verschiedener Luciferase Assays ließen sich zusätzlich mögliche Veränderungen im Interferonsignalweg eruieren. Die pankreatischen Tumorzelllinien scheinen einen Defekt in der Toll-like Rezeptor 3 abhängigen Identifizierung von doppelsträngiger RNA zu besitzen und es gibt Anzeichen für Funktionseinschränkungen im Jak-STAT-Signalweg in einigen untersuchten Zelllinien.

Die in vivo-Experimente implizieren eine äußerst geringe Replikation von VSV in den orthotop-implantierten und endogenen murinen pankreatischen Tumoren. Diese Beobachtungen standen im Gegensatz zu den in vitro erhobenen Daten und sind wahrscheinlich vor allem durch die vielfach komplexere Tumorbilogie der multizellulären Organismen bedingt. Die genauen Ursachen des geringen Replikationsausmaßes bleiben ungewiss und bedürfen weiterer Klärung. Die Vervielfältigung und Verbreitung der Viren stellt in vivo eine weitaus größere Herausforderung dar als in der Zellkultur. Auch die Rolle der Interferone, deren Produktion und die Mechanismen der interzellulären Interaktion sind in dieser multizellulären uneinheitlichen Umgebung erheblich komplexer. Die nachgewiesene Interferonsensibilität von murinen Tumorzellen könnte maßgeblich an der geringen in vivo-Replikation des VSV beteiligt sein. Inwiefern das VSV trotz der geringen Replikationsaktivität in vivo durch seine Immunstimulierende Eigenschaften, dennoch einen therapeutischen Effekt auf das duktales Pankreaskarzinom hat, sollte weiter überprüft werden. Die in vivo-Resultate offenbarten die möglichen Probleme beim Einsatz von VSV in präklinischen Tiermodellen des duktales Pankreaskarzinoms ungeachtet der vielversprechenden Replikation in vitro.

6 Literaturverzeichnis

- Abraham, G. and A. K. Banerjee (1976). Sequential transcription of the genes of vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73: 1504-1508.
- Aguirre, A. J., N. Bardeesy, M. Sinha, L. Lopez, D. A. Tuveson, J. Horner, M. S. Redston and R. A. DePinho (2003). Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 17: 3112-3126.
- Ahmed, M., M. O. McKenzie, S. Puckett, M. Hojnacki, L. Poliquin and D. S. Lyles (2003). Ability of the matrix protein of vesicular stomatitis virus to suppress beta interferon gene expression is genetically correlated with the inhibition of host RNA and protein synthesis. *J Virol* 77: 4646-4657.
- Akira, S. and K. Takeda (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4: 499-511.
- Akira, S., S. Uematsu and O. Takeuchi (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783-801.
- Almoguera, C., D. Shibata, K. Forrester, J. Martin, N. Arnheim and M. Perucho (1988). Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 53: 549-554.
- Altomonte, J., S. Marozin, E. DeToni, A. Rizzani, I. Esposito, A. Feuchtinger, C. Hellerbrand, R. M. Schmid and O. Ebert (2011). Antifibrotic properties of transarterial VSV oncolytic therapy for hepatocellular carcinoma in rats with thioacetamide-induced liver fibrosis. *The Liver Meeting® 2011 Educational Webcast of Selected Sessions & ePosters*. .
- Andea, A., F. Sarkar and V. N. Adsay (2003). Clinicopathological correlates of pancreatic intraepithelial neoplasia: a comparative analysis of 82 cases with and 152 cases without pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mod Pathol* 16: 996-1006.
- Apelqvist, A., H. Li, L. Sommer, P. Beatus, D. J. Anderson, T. Honjo, M. Hrabe de Angelis, U. Lendahl and H. Edlund (1999). Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 400: 877-881.
- Bakkevold, K. E., B. Arnesjo and B. Kambestad (1992). Carcinoma of the pancreas and papilla of Vater: presenting symptoms, signs, and diagnosis related to stage and tumour site. A prospective multicentre trial in 472 patients. *Norwegian Pancreatic Cancer Trial. Scand J Gastroenterol* 27: 317-325.
- Balachandran, S. and G. N. Barber (2000). Vesicular stomatitis virus (VSV) therapy of tumors. *IUBMB Life* 50: 135-138.

- Balachandran, S., M. Porosnicu and G. N. Barber (2001). Oncolytic activity of vesicular stomatitis virus is effective against tumors exhibiting aberrant p53, Ras, or myc function and involves the induction of apoptosis. *J Virol* 75: 3474-3479.
- Barber, G. N. (2005). VSV-tumor selective replication and protein translation. *Oncogene* 24: 7710-7719.
- Bardeesy, N., A. J. Aguirre, G. C. Chu, K. H. Cheng, L. V. Lopez, A. F. Hezel, B. Feng, C. Brennan, R. Weissleder, U. Mahmood, D. Hanahan, M. S. Redston, L. Chin and R. A. Depinho (2006). Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 5947-5952.
- Barr, J. N., S. P. Whelan and G. W. Wertz (2002). Transcriptional control of the RNA-dependent RNA polymerase of vesicular stomatitis virus. *Biochim Biophys Acta* 1577: 337-353.
- Basu, M., R. K. Maitra, Y. Xiang, X. Meng, A. K. Banerjee and S. Bose (2006). Inhibition of vesicular stomatitis virus infection in epithelial cells by alpha interferon-induced soluble secreted proteins. *J Gen Virol* 87: 2653-2662.
- Battcock, S. M., T. W. Collier, D. Zu and K. Hirasawa (2006). Negative regulation of the alpha interferon-induced antiviral response by the Ras/Raf/MEK pathway. *J Virol* 80: 4422-4430.
- Belkowsky, L. S. and G. C. Sen (1987). Inhibition of vesicular stomatitis viral mRNA synthesis by interferons. *J Virol* 61: 653-660.
- Bell, J. C., K. A. Garson, B. D. Lichty and D. F. Stojdl (2002). Oncolytic viruses: programmable tumour hunters. *Curr Gene Ther* 2: 243-254.
- Benassai, G., M. Mastroilli, G. Quarto, A. Cappiello, U. Giani and G. Mosella (2000). Survival after pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the head of the pancreas. *Chir Ital* 52: 263-270.
- Bergman, I., P. Whitaker-Dowling, Y. Gao, J. A. Griffin and S. C. Watkins (2003). Vesicular stomatitis virus expressing a chimeric Sindbis glycoprotein containing an Fc antibody binding domain targets to Her2/neu overexpressing breast cancer cells. *Virology* 316: 337-347.
- Bi, Z., M. Barna, T. Komatsu and C. S. Reiss (1995). Vesicular stomatitis virus infection of the central nervous system activates both innate and acquired immunity. *J Virol* 69: 6466-6472.
- Bilimoria, K. Y., D. J. Bentrem, C. Y. Ko, J. Ritchey, A. K. Stewart, D. P. Winchester and M. S. Talamonti (2007). Validation of the 6th edition AJCC Pancreatic Cancer Staging System: report from the National Cancer Database. *Cancer* 110: 738-744.
- Bischoff, J. R., D. H. Kirn, A. Williams, C. Heise, S. Horn, M. Muna, L. Ng, J. A. Nye, A. Sampson-Johannes, A. Fattaey and F. McCormick (1996). An adenovirus

- mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 274: 373-376.
- Blondel, D., G. G. Harmison and M. Schubert (1990). Role of matrix protein in cytopathogenesis of vesicular stomatitis virus. *J Virol* 64: 1716-1725.
- Bohmig, M. and S. Rosewicz (2004). [Pancreatic carcinoma]. *Z Gastroenterol* 42: 261-268.
- Boritz, E., J. Gerlach, J. E. Johnson and J. K. Rose (1999). Replication-competent rhabdoviruses with human immunodeficiency virus type 1 coats and green fluorescent protein: entry by a pH-independent pathway. *J Virol* 73: 6937-6945.
- Bracarda, S., A. M. Eggermont and J. Samuelsson (2009). Redefining the role of interferon in the treatment of malignant diseases. *Eur J Cancer*.
- Breitbach, C. J., J. M. Paterson, C. G. Lemay, T. J. Falls, A. McGuire, K. A. Parato, D. F. Stojdl, M. Daneshmand, K. Speth, D. Kirn, J. A. McCart, H. Atkins and J. C. Bell (2007). Targeted inflammation during oncolytic virus therapy severely compromises tumor blood flow. *Mol Ther* 15: 1686-1693.
- Burris, H. A., 3rd, M. J. Moore, J. Andersen, M. R. Green, M. L. Rothenberg, M. R. Modiano, M. C. Cripps, R. K. Portenoy, A. M. Storniolo, P. Tarassoff, R. Nelson, F. A. Dorr, C. D. Stephens and D. D. Von Hoff (1997). Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 15: 2403-2413.
- Caldas, C., S. A. Hahn, L. T. da Costa, M. S. Redston, M. Schutte, A. B. Seymour, C. L. Weinstein, R. H. Hruban, C. J. Yeo and S. E. Kern (1994). Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 8: 27-32.
- Carneiro, F. A., M. L. Bianconi, G. Weissmuller, F. Stauffer and A. T. Da Poian (2002). Membrane recognition by vesicular stomatitis virus involves enthalpy-driven protein-lipid interactions. *J Virol* 76: 3756-3764.
- Carroll, A. R. and R. R. Wagner (1979). Role of the membrane (M) protein in endogenous inhibition of in vitro transcription by vesicular stomatitis virus. *J Virol* 29: 134-142.
- Cervantes-Garcia, D., R. Ortiz-Lopez, N. Mayek-Perez and A. Rojas-Martinez (2008). Oncolytic virotherapy. *Ann Hepatol* 7: 34-45.
- Cheng, J., H. Sauthoff, Y. Huang, D. I. Kutler, S. Bajwa, W. N. Rom and J. G. Hay (2007). Human matrix metalloproteinase-8 gene delivery increases the oncolytic activity of a replicating adenovirus. *Mol Ther* 15: 1982-1990.
- Choudhary, S., J. Gao, D. W. Leaman and B. P. De (2001). Interferon action against human parainfluenza virus type 3: involvement of a novel antiviral pathway in the inhibition of transcription. *J Virol* 75: 4823-4831.

- Coffey, M. C., J. E. Strong, P. A. Forsyth and P. W. Lee (1998). Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science* 282: 1332-1334.
- Connor, J. H. and D. S. Lyles (2005). Inhibition of host and viral translation during vesicular stomatitis virus infection. eIF2 is responsible for the inhibition of viral but not host translation. *J Biol Chem* 280: 13512-13519.
- Content, J. (2009). Mechanisms of induction and action of interferons. *Verh K Acad Geneeskd Belg* 71: 51-71.
- Cras-Meneur, C., L. Elghazi, P. Czernichow and R. Scharfmann (2001). Epidermal growth factor increases undifferentiated pancreatic embryonic cells in vitro: a balance between proliferation and differentiation. *Diabetes* 50: 1571-1579.
- Curiel, D. T. (2000). The development of conditionally replicative adenoviruses for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 6: 3395-3399.
- Curran, J., J. B. Marq and D. Kolakofsky (1995). An N-terminal domain of the Sendai paramyxovirus P protein acts as a chaperone for the NP protein during the nascent chain assembly step of genome replication. *J Virol* 69: 849-855.
- Dansako, H., M. Ikeda and N. Kato (2007). Limited suppression of the interferon-beta production by hepatitis C virus serine protease in cultured human hepatocytes. *Febs J* 274: 4161-4176.
- Darnell, J. E., Jr. (1997). STATs and gene regulation. *Science* 277: 1630-1635.
- De Pace, N. G. (1912). Sulla scomparsa di un enorme cancro vegetante del collo dell'utero senza cura chirurgica. *Ginecologia* 9: 82-88.
- De Silva, N., H. Atkins, D. H. Kirn, J. C. Bell and C. J. Breitbach (2010). Double trouble for tumours: exploiting the tumour microenvironment to enhance anticancer effect of oncolytic viruses. *Cytokine Growth Factor Rev* 21: 135-141.
- Deblandre, G. A., O. P. Marinx, S. S. Evans, S. Majjaj, O. Leo, D. Caput, G. A. Huez and M. G. Wathelet (1995). Expression cloning of an interferon-inducible 17-kDa membrane protein implicated in the control of cell growth. *J Biol Chem* 270: 23860-23866.
- DePolo, N. J., J. D. Reed, P. L. Sheridan, K. Townsend, S. L. Sauter, D. J. Jolly and T. W. Dubensky, Jr. (2000). VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum. *Mol Ther* 2: 218-222.
- Diaz, R. M., F. Galivo, T. Kottke, P. Wongthida, J. Qiao, J. Thompson, M. Valdes, G. Barber and R. G. Vile (2007). Oncolytic immunovirotherapy for melanoma using vesicular stomatitis virus. *Cancer Res* 67: 2840-2848.
- Dillon, P. J. and K. C. Gupta (1988). Early steps in the assembly of vesicular stomatitis virus nucleocapsids in infected cells. *J Virol* 62: 1582-1589.

- Dock, G. (1904). The influence of complicating diseases upon leukaemia. *American Journal of the Medical Sciences* 127: 563-592.
- Doly, J., A. Civas, S. Navarro and G. Uze (1998). Type I interferons: expression and signalization. *Cell Mol Life Sci* 54: 1109-1121.
- Donahue, J. M., J. T. Mullen and K. K. Tanabe (2002). Viral oncolysis. *Surg Oncol Clin N Am* 11: 661-680.
- Durbin, J. E., R. Hackenmiller, M. C. Simon and D. E. Levy (1996). Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* 84: 443-450.
- Ebert, O., S. Harbaran, K. Shinozaki and S. L. Woo (2005). Systemic therapy of experimental breast cancer metastases by mutant vesicular stomatitis virus in immune-competent mice. *Cancer Gene Ther* 12: 350-358.
- Ebert, O., K. Shinozaki, T. G. Huang, M. J. Savontaus, A. Garcia-Sastre and S. L. Woo (2003). Oncolytic vesicular stomatitis virus for treatment of orthotopic hepatocellular carcinoma in immune-competent rats. *Cancer Res* 63: 3605-3611.
- Ebert, O., K. Shinozaki, C. Kournioti, M. S. Park, A. Garcia-Sastre and S. L. Woo (2004). Syncytia induction enhances the oncolytic potential of vesicular stomatitis virus in virotherapy for cancer. *Cancer Res* 64: 3265-3270.
- Emerson, S. U. and Y. Yu (1975). Both NS and L proteins are required for in vitro RNA synthesis by vesicular stomatitis virus. *J Virol* 15: 1348-1356.
- Erkan, M., C. W. Michalski, S. Rieder, C. Reiser-Erkan, I. Abiatari, A. Kolb, N. A. Giese, I. Esposito, H. Friess and J. Kleeff (2008). The activated stroma index is a novel and independent prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 6: 1155-1161.
- Erkan, M., C. Reiser-Erkan, C. W. Michalski and J. Kleeff (2010). Tumor microenvironment and progression of pancreatic cancer. *Exp Oncol* 32: 128-131.
- Etoh, T., Y. Himeno, T. Matsumoto, M. Aramaki, K. Kawano, A. Nishizono and S. Kitano (2003). Oncolytic viral therapy for human pancreatic cancer cells by reovirus. *Clin Cancer Res* 9: 1218-1223.
- Everts, B. and H. G. van der Poel (2005). Replication-selective oncolytic viruses in the treatment of cancer. *Cancer Gene Ther* 12: 141-161.
- Fernandez, M., M. Porosnicu, D. Markovic and G. N. Barber (2002). Genetically engineered vesicular stomatitis virus in gene therapy: application for treatment of malignant disease. *J Virol* 76: 895-904.

- Ferran, M. C. and J. M. Lucas-Lenard (1997). The vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits transcription from the human beta interferon promoter. *J Virol* 71: 371-377.
- Finke, S. and K. K. Conzelmann (2005). Replication strategies of rabies virus. *Virus Res* 111: 120-131.
- Florkiewicz, R. Z. and J. K. Rose (1984). A cell line expressing vesicular stomatitis virus glycoprotein fuses at low pH. *Science* 225: 721-723.
- Freelove, R. and A. D. Walling (2006). Pancreatic cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician* 73: 485-492.
- Gale, M., Jr. and E. M. Foy (2005). Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* 436: 939-945.
- Galivo, F., R. M. Diaz, P. Wongthida, J. Thompson, T. Kottke, G. Barber, A. Melcher and R. Vile (2010). Single-cycle viral gene expression, rather than progressive replication and oncolysis, is required for VSV therapy of B16 melanoma. *Gene Ther* 17: 158-170.
- Ganesh, S., M. Gonzalez-Edick, D. Gibbons, M. Van Roey and K. Jooss (2008). Intratumoral coadministration of hyaluronidase enzyme and oncolytic adenoviruses enhances virus potency in metastatic tumor models. *Clin Cancer Res* 14: 3933-3941.
- Garber, K. (2006). China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 98: 298-300.
- Goggins, M., M. Schutte, J. Lu, C. A. Moskaluk, C. L. Weinstein, G. M. Petersen, C. J. Yeo, C. E. Jackson, H. T. Lynch, R. H. Hruban and S. E. Kern (1996). Germline BRCA2 gene mutations in patients with apparently sporadic pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 56: 5360-5364.
- Guerra, C., N. Mijimolle, A. Dhawahir, P. Dubus, M. Barradas, M. Serrano, V. Campuzano and M. Barbacid (2003). Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell* 4: 111-120.
- Hadaschik, B. A., K. Zhang, A. I. So, J. C. Bell, J. W. Thuroff, P. S. Rennie and M. E. Gleave (2008). [Oncolytic vesicular stomatitis viruses as intravesical agents against non-muscle-invasive bladder cancer]. *Urologe A* 47: 1145-1151.
- Hahn, S. A. and W. H. Schmiegel (1998). Recent discoveries in cancer genetics of exocrine pancreatic neoplasia. *Digestion* 59: 493-501.
- Hahn, S. A., M. Schutte, A. T. Hoque, C. A. Moskaluk, L. T. da Costa, E. Rozenblum, C. L. Weinstein, A. Fischer, C. J. Yeo, R. H. Hruban and S. E. Kern (1996). DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271: 350-353.
- Haller, O., S. Stertz and G. Kochs (2007). The Mx GTPase family of interferon-induced antiviral proteins. *Microbes Infect* 9: 1636-1643.

- Harmon, S. A., E. N. Robinson, Jr. and D. F. Summers (1985). Ultrastructural localization of L and NS enzyme subunits on vesicular stomatitis virus RNPs using gold sphere-staphylococcal protein A-monospecific IgG conjugates. *Virology* 142: 406-410.
- He, X. P., C. Q. Su, X. H. Wang, X. Pan, Z. X. Tu, Y. F. Gong, J. Gao, Z. Liao, J. Jin, H. Y. Wu, X. H. Man and Z. S. Li (2009). E1B-55kD-deleted oncolytic adenovirus armed with canstatin gene yields an enhanced anti-tumor efficacy on pancreatic cancer. *Cancer Lett* 285: 89-98.
- Hecht, J. R., R. Bedford, J. L. Abbruzzese, S. Lahoti, T. R. Reid, R. M. Soetikno, D. H. Kirn and S. M. Freeman (2003). A phase I/II trial of intratumoral endoscopic ultrasound injection of ONYX-015 with intravenous gemcitabine in unresectable pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 9: 555-561.
- Heise, C., T. Hermiston, L. Johnson, G. Brooks, A. Sampson-Johannes, A. Williams, L. Hawkins and D. Kirn (2000). An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nat Med* 6: 1134-1139.
- Heise, C. C., A. Williams, J. Olesch and D. H. Kirn (1999). Efficacy of a replication-competent adenovirus (ONYX-015) following intratumoral injection: intratumoral spread and distribution effects. *Cancer Gene Ther* 6: 499-504.
- Hezel, A. F., A. C. Kimmelman, B. Z. Stanger, N. Bardeesy and R. A. Depinho (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 20: 1218-1249.
- Himeno, Y., T. Etoh, T. Matsumoto, M. Ohta, A. Nishizono and S. Kitano (2005). Efficacy of oncolytic reovirus against liver metastasis from pancreatic cancer in immunocompetent models. *Int J Oncol* 27: 901-906.
- Hingorani, S. R., E. F. Petricoin, A. Maitra, V. Rajapakse, C. King, M. A. Jacobetz, S. Ross, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, B. A. Hitt, Y. Kawaguchi, D. Johann, L. A. Liotta, H. C. Crawford, M. E. Putt, T. Jacks, C. V. Wright, R. H. Hruban, A. M. Lowy and D. A. Tuveson (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4: 437-450.
- Hobbs, J. A., G. Hommel-Berrey and Z. Brahmi (2003). Requirement of caspase-3 for efficient apoptosis induction and caspase-7 activation but not viral replication or cell rounding in cells infected with vesicular stomatitis virus. *Hum Immunol* 64: 82-92.
- Holland, J. J., J. C. De La Torre and D. A. Steinhauer (1992). RNA virus populations as quasispecies. *Curr Top Microbiol Immunol* 176: 1-20.
- Honda, K. and T. Taniguchi (2006). IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 6: 644-658.

- Hruban, R. H., N. V. Adsay, J. Albores-Saavedra, C. Compton, E. S. Garrett, S. N. Goodman, S. E. Kern, D. S. Klimstra, G. Kloppel, D. S. Longnecker, J. Luttges and G. J. Offerhaus (2001). Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* 25: 579-586.
- Hruban, R. H., M. Goggins, J. Parsons and S. E. Kern (2000). Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 6: 2969-2972.
- Hruban, R. H., G. J. Offerhaus, S. E. Kern, M. Goggins, R. E. Wilentz and C. J. Yeo (1998). Tumor-suppressor genes in pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 5: 383-391.
- Hruban, R. H., G. M. Petersen, P. K. Ha and S. E. Kern (1998). Genetics of pancreatic cancer. From genes to families. *Surg Oncol Clin N Am* 7: 1-23.
- Hruban, R. H., K. Takaori, D. S. Klimstra, N. V. Adsay, J. Albores-Saavedra, A. V. Biankin, S. A. Biankin, C. Compton, N. Fukushima, T. Furukawa, M. Goggins, Y. Kato, G. Kloppel, D. S. Longnecker, J. Luttges, A. Maitra, G. J. Offerhaus, M. Shimizu and S. Yonezawa (2004). An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol* 28: 977-987.
- Hruban, R. H., A. D. van Mansfeld, G. J. Offerhaus, D. H. van Weering, D. C. Allison, S. N. Goodman, T. W. Kensler, K. K. Bose, J. L. Cameron and J. L. Bos (1993). K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol* 143: 545-554.
- Huang, C., G. Yang, T. Jiang, K. Huang, J. Cao and Z. Qiu (2010). Effects of IL-6 and AG490 on regulation of Stat3 signaling pathway and invasion of human pancreatic cancer cells in vitro. *J Exp Clin Cancer Res* 29: 51.
- Huang, T. G., O. Ebert, K. Shinozaki, A. Garcia-Sastre and S. L. Woo (2003). Oncolysis of hepatic metastasis of colorectal cancer by recombinant vesicular stomatitis virus in immune-competent mice. *Mol Ther* 8: 434-440.
- Huguier, M., G. Samama, J. Testart, S. Mauban, A. Fingerhut, J. Nassar, S. Houry, D. Jaeck, P. De Mestier, J. P. Favre and et al. (1992). Treatment of adenocarcinoma of the pancreas with somatostatin and gonadoliberein (luteinizing hormone-releasing hormone). The French Associations for Surgical Research. *Am J Surg* 164: 348-353.
- Huxley, R., A. Ansary-Moghaddam, A. Berrington de Gonzalez, F. Barzi and M. Woodward (2005). Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *Br J Cancer* 92: 2076-2083.
- Ikeda, K., T. Ichikawa, H. Wakimoto, J. S. Silver, T. S. Deisboeck, D. Finkelstein, G. R. t. Harsh, D. N. Louis, R. T. Bartus, F. H. Hochberg and E. A. Chiocca (1999). Oncolytic virus therapy of multiple tumors in the brain requires suppression of innate and elicited antiviral responses. *Nat Med* 5: 881-887.

- Iodice, S., S. Gandini, P. Maisonneuve and A. B. Lowenfels (2008). Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbecks Arch Surg* 393: 535-545.
- Isaacs, A. and J. Lindenmann (1987). Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957. *J Interferon Res* 7: 429-438.
- Jemal, A., R. Siegel, J. Xu and E. Ward (2010). Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 60: 277-300.
- Jones, S., X. Zhang, D. W. Parsons, J. C. Lin, R. J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, H. Kamiyama, A. Jimeno, S. M. Hong, B. Fu, M. T. Lin, E. S. Calhoun, M. Kamiyama, K. Walter, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, J. Hartigan, D. R. Smith, M. Hidalgo, S. D. Leach, A. P. Klein, E. M. Jaffee, M. Goggins, A. Maitra, C. Iacobuzio-Donahue, J. R. Eshleman, S. E. Kern, R. H. Hruban, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V. E. Velculescu and K. W. Kinzler (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 321: 1801-1806.
- Jöst, E. (2009). Modulation der Strahlen- und Chemosensitivität menschlicher Tumorzellen durch Interferon. Fachbereich Biologie, Mainz
- Kadowaki, N., S. Antonenko, J. Y. Lau and Y. J. Liu (2000). Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 192: 219-226.
- Kalser, M. H., J. Barkin and J. M. MacIntyre (1985). Pancreatic cancer. Assessment of prognosis by clinical presentation. *Cancer* 56: 397-402.
- Kaufman, H. L. and S. D. Bines (2010). OPTIM trial: a Phase III trial of an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF for unresectable stage III or IV melanoma. *Future Oncol* 6: 941-949.
- Kaufman, H. L., G. Deraffe, J. Mitcham, D. Moroziewicz, S. M. Cohen, K. S. Hurst-Wicker, K. Cheung, D. S. Lee, J. Divito, M. Voulo, J. Donovan, K. Dolan, K. Manson, D. Panicali, E. Wang, H. Horig and F. M. Marincola (2005). Targeting the local tumor microenvironment with vaccinia virus expressing B7.1 for the treatment of melanoma. *J Clin Invest* 115: 1903-1912.
- Kaur, B., T. P. Cripe and E. A. Chiocca (2009). "Buy one get one free": armed viruses for the treatment of cancer cells and their microenvironment. *Curr Gene Ther* 9: 341-355.
- Kelly, E. J., R. Nace, G. N. Barber and S. J. Russell (2010). Attenuation of vesicular stomatitis virus encephalitis through microRNA targeting. *J Virol* 84: 1550-1562.
- Keskinen, P., M. Nyqvist, T. Sareneva, J. Pirhonen, K. Melen and I. Julkunen (1999). Impaired antiviral response in human hepatoma cells. *Virology* 263: 364-375.

- Khorana, A. A. and R. L. Fine (2004). Pancreatic cancer and thromboembolic disease. *Lancet Oncol* 5: 655-663.
- Khuri, F. R., J. Nemunaitis, I. Ganly, J. Arseneau, I. F. Tannock, L. Romel, M. Gore, J. Ironside, R. H. MacDougall, C. Heise, B. Randlev, A. M. Gillenwater, P. Bruso, S. B. Kaye, W. K. Hong and D. H. Kirn (2000). a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat Med* 6: 879-885.
- Kim, E. J. and D. M. Simeone (2011). Advances in pancreatic cancer. *Curr Opin Gastroenterol*.
- Kindler, H. L., G. Friberg, D. A. Singh, G. Locker, S. Nattam, M. Kozloff, D. A. Taber, T. Karrison, A. Dachman, W. M. Stadler and E. E. Vokes (2005). Phase II trial of bevacizumab plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 23: 8033-8040.
- Kitamura, A., K. Takahashi, A. Okajima and N. Kitamura (1994). Induction of the human gene for p44, a hepatitis-C-associated microtubular aggregate protein, by interferon-alpha/beta. *Eur J Biochem* 224: 877-883.
- Klein, A. P., R. H. Hruban, K. A. Brune, G. M. Petersen and M. Goggins (2001). Familial pancreatic cancer. *Cancer J* 7: 266-273.
- Klimstra, D. S. (2007). Noductal neoplasms of the pancreas. *Mod Pathol* 20 Suppl 1: S94-112.
- Kong, B., C. W. Michalski, M. Erkan, H. Friess and J. Kleeff (2011). From tissue turnover to the cell of origin for pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*.
- Kopecky, S. A., M. C. Willingham and D. S. Lyles (2001). Matrix protein and another viral component contribute to induction of apoptosis in cells infected with vesicular stomatitis virus. *J Virol* 75: 12169-12181.
- Kubuschok, B., R. Schmits, F. Hartmann, C. Cochlovius, R. Breit, J. Konig, G. Pistorius, M. Schilling, C. Renner and M. Pfreundschuh (2002). Use of spontaneous Epstein-Barr virus-lymphoblastoid cell lines genetically modified to express tumor antigen as cancer vaccines: mutated p21 ras oncogene in pancreatic carcinoma as a model. *Hum Gene Ther* 13: 815-827.
- Kunzi, M. S. and P. M. Pitha (2003). Interferon targeted genes in host defense. *Autoimmunity* 36: 457-461.
- Lal, G., G. Liu, B. Schmocker, P. Kaurah, H. Ozcelik, S. A. Narod, M. Redston and S. Gallinger (2000). Inherited predisposition to pancreatic adenocarcinoma: role of family history and germ-line p16, BRCA1, and BRCA2 mutations. *Cancer Res* 60: 409-416.
- Lanford, R. E., B. Guerra, H. Lee, D. R. Averett, B. Pfeiffer, D. Chavez, L. Notvall and C. Bigger (2003). Antiviral effect and virus-host interactions in response to

- alpha interferon, gamma interferon, poly(i)-poly(c), tumor necrosis factor alpha, and ribavirin in hepatitis C virus subgenomic replicons. *J Virol* 77: 1092-1104.
- Lawson, N. D., E. A. Stillman, M. A. Whitt and J. K. Rose (1995). Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 4477-4481.
- Leach, S. D. (2004). Mouse models of pancreatic cancer: the fur is finally flying! *Cancer Cell* 5: 7-11.
- Leonard, W. J. and J. J. O'Shea (1998). Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 16: 293-322.
- Li, D., K. Xie, R. Wolff and J. L. Abbruzzese (2004). Pancreatic cancer. *Lancet* 363: 1049-1057.
- Li, X. D., L. Sun, R. B. Seth, G. Pineda and Z. J. Chen (2005). Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 17717-17722.
- Li, Y., C. Li, P. Xue, B. Zhong, A. P. Mao, Y. Ran, H. Chen, Y. Y. Wang, F. Yang and H. B. Shu (2009). ISG56 is a negative-feedback regulator of virus-triggered signaling and cellular antiviral response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 7945-7950.
- Lichty, B. D., A. T. Power, D. F. Stojdl and J. C. Bell (2004). Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *Trends Mol Med* 10: 210-216.
- Lin, R. J., B. L. Chang, H. P. Yu, C. L. Liao and Y. L. Lin (2006). Blocking of interferon-induced Jak-Stat signaling by Japanese encephalitis virus NS5 through a protein tyrosine phosphatase-mediated mechanism. *J Virol* 80: 5908-5918.
- Linge, C., D. Gewert, C. Rossmann, J. A. Bishop and J. S. Crowe (1995). Interferon system defects in human malignant melanoma. *Cancer Res* 55: 4099-4104.
- Liu, A., Y. Liu, P. K. Li, C. Li and J. Lin (2011). LLL12 Inhibits Endogenous and Exogenous Interleukin-6-induced STAT3 Phosphorylation in Human Pancreatic Cancer Cells. *Anticancer Res* 31: 2029-2035.
- Locker, G. Y., S. Hamilton, J. Harris, J. M. Jessup, N. Kemeny, J. S. Macdonald, M. R. Somerfield, D. F. Hayes and R. C. Bast, Jr. (2006). ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol* 24: 5313-5327.
- Lopez, M. V., D. L. Viale, E. G. Cafferata, A. I. Bravo, C. Carbone, D. Gould, Y. Chernajovsky and O. L. Podhajcer (2009). Tumor associated stromal cells play a critical role on the outcome of the oncolytic efficacy of conditionally replicative adenoviruses. *PLoS One* 4: e5119.

- Lorence, R. M., B. B. Katubig, K. W. Reichard, H. M. Reyes, A. Phuangsab, M. D. Sasseti, R. J. Walter and M. E. Peeples (1994). Complete regression of human fibrosarcoma xenografts after local Newcastle disease virus therapy. *Cancer Res* 54: 6017-6021.
- Lowenfels, A. B., P. Maisonneuve, G. Cavallini, R. W. Ammann, P. G. Lankisch, J. R. Andersen, E. P. Dimagno, A. Andren-Sandberg and L. Domellof (1993). Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N Engl J Med* 328: 1433-1437.
- Lynch, S. M., A. Vrieling, J. H. Lubin, P. Kraft, J. B. Mendelsohn, P. Hartge, F. Canzian, E. Steplowski, A. A. Arslan, M. Gross, K. Helzlsouer, E. J. Jacobs, A. LaCroix, G. Petersen, W. Zheng, D. Albanes, L. Amundadottir, S. A. Bingham, P. Boffetta, M. C. Boutron-Ruault, S. J. Chanock, S. Clipp, R. N. Hoover, K. Jacobs, K. C. Johnson, C. Kooperberg, J. Luo, C. Messina, D. Palli, A. V. Patel, E. Riboli, X. O. Shu, L. Rodriguez Suarez, G. Thomas, A. Tjonneland, G. S. Tobias, E. Tong, D. Trichopoulos, J. Virtamo, W. Ye, K. Yu, A. Zeleniuch-Jacquette, H. B. Bueno-de-Mesquita and R. Z. Stolzenberg-Solomon (2009). Cigarette smoking and pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium. *Am J Epidemiol* 170: 403-413.
- Maitra, A. and R. H. Hruban (2008). Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol* 3: 157-188.
- Malmgaard, L. (2004). Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J Interferon Cytokine Res* 24: 439-454.
- Marcus, P. I., L. L. Rodriguez and M. J. Sekellick (1998). Interferon induction as a quasispecies marker of vesicular stomatitis virus populations. *J Virol* 72: 542-549.
- Marozin, S., J. Altomonte, F. Stadler, W. E. Thasler, R. M. Schmid and O. Ebert (2008). Inhibition of the IFN-beta response in hepatocellular carcinoma by alternative spliced isoform of IFN regulatory factor-3. *Mol Ther* 16: 1789-1797.
- Marx, J. (2008). Cancer biology. All in the stroma: cancer's Cosa Nostra. *Science* 320: 38-41.
- Matikainen, S., T. Ronni, A. Lehtonen, T. Sareneva, K. Melen, S. Nordling, D. E. Levy and I. Julkunen (1997). Retinoic acid induces signal transducer and activator of transcription (STAT) 1, STAT2, and p48 expression in myeloid leukemia cells and enhances their responsiveness to interferons. *Cell Growth Differ* 8: 687-698.
- Matsumiya, T., T. Imaizumi, H. Yoshida and K. Satoh (2011). Antiviral signaling through retinoic acid-inducible gene-I-like receptors. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 59: 41-48.
- Mazur, P. K., H. Einwachter, M. Lee, B. Sipos, H. Nakhai, R. Rad, U. Zimmer-Strobl, L. J. Strobl, F. Radtke, G. Kloppel, R. M. Schmid and J. T. Siveke (2010). Notch2 is required for progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 13438-13443.

- Mead, D. G., F. B. Ramberg, D. G. Besselsen and C. J. Mare (2000). Transmission of vesicular stomatitis virus from infected to noninfected black flies co-feeding on nonviremic deer mice. *Science* 287: 485-487.
- Melen, K., P. Keskinen, A. Lehtonen and I. Julkunen (2000). Interferon-induced gene expression and signaling in human hepatoma cell lines. *J Hepatol* 33: 764-772.
- Meraz, M. A., J. M. White, K. C. Sheehan, E. A. Bach, S. J. Rodig, A. S. Dighe, D. H. Kaplan, J. K. Riley, A. C. Greenlund, D. Campbell, K. Carver-Moore, R. N. DuBois, R. Clark, M. Aguet and R. D. Schreiber (1996). Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 84: 431-442.
- Michaud, D. S. (2004). Epidemiology of pancreatic cancer. *Minerva Chir* 59: 99-111.
- Miyatake, S., A. Iyer, R. L. Martuza and S. D. Rabkin (1997). Transcriptional targeting of herpes simplex virus for cell-specific replication. *J Virol* 71: 5124-5132.
- Moore, M. J., D. Goldstein, J. Hamm, A. Figer, J. R. Hecht, S. Gallinger, H. J. Au, P. Murawa, D. Walde, R. A. Wolff, D. Campos, R. Lim, K. Ding, G. Clark, T. Voskoglou-Nomikos, M. Ptasynski and W. Parulekar (2007). Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 25: 1960-1966.
- Moore, P. S., B. Sipos, S. Orlandini, C. Sorio, F. X. Real, N. R. Lemoine, T. Gress, C. Bassi, G. Kloppel, H. Kalthoff, H. Ungefroren, M. Lohr and A. Scarpa (2001). Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Arch* 439: 798-802.
- Morak, M. J., P. M. van Koetsveld, R. Kanaar, L. J. Hofland and C. H. van Eijck (2011). Type I interferons as radiosensitisers for pancreatic cancer. *Eur J Cancer*.
- Muller, U., U. Steinhoff, L. F. Reis, S. Hemmi, J. Pavlovic, R. M. Zinkernagel and M. Aguet (1994). Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264: 1918-1921.
- Mundschau, L. J. and D. V. Faller (1992). Oncogenic ras induces an inhibitor of double-stranded RNA-dependent eukaryotic initiation factor 2 alpha-kinase activation. *J Biol Chem* 267: 23092-23098.
- Munoz-Fontela, C., S. Macip, L. Martinez-Sobrido, L. Brown, J. Ashour, A. Garcia-Sastre, S. W. Lee and S. A. Aaronson (2008). Transcriptional role of p53 in interferon-mediated antiviral immunity. *J Exp Med* 205: 1929-1938.
- Nakao, A., T. Fujii, H. Sugimoto, N. Kanazumi, S. Nomoto, Y. Kodera, S. Inoue and S. Takeda (2006). Oncological problems in pancreatic cancer surgery. *World J Gastroenterol* 12: 4466-4472.

- Nakao, A., H. Kasuya, T. T. Sahin, N. Nomura, A. Kanzaki, M. Misawa, T. Shiota, S. Yamada, T. Fujii, H. Sugimoto, T. Shikano, S. Nomoto, S. Takeda, Y. Kodaera and Y. Nishiyama (2011). A phase I dose-escalation clinical trial of intraoperative direct intratumoral injection of HF10 oncolytic virus in non-resectable patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer Gene Ther* 18: 167-175.
- Nelson, A. R., J. Davydova, D. T. Curiel and M. Yamamoto (2009). Combination of conditionally replicative adenovirus and standard chemotherapies shows synergistic antitumor effect in pancreatic cancer. *Cancer Sci* 100: 2181-2187.
- Newman, E. A., D. M. Simeone and M. W. Mulholland (2006). Adjuvant treatment strategies for pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg* 10: 916-926.
- Ning, S., L. E. Huye and J. S. Pagano (2005). Regulation of the transcriptional activity of the IRF7 promoter by a pathway independent of interferon signaling. *J Biol Chem* 280: 12262-12270.
- Noser, J. A., A. A. Mael, R. Sakuma, S. Ohmine, P. Marcato, P. W. Lee and Y. Ikeda (2007). The RAS/Raf1/MEK/ERK signaling pathway facilitates VSV-mediated oncolysis: implication for the defective interferon response in cancer cells. *Mol Ther* 15: 1531-1536.
- Obuchi, M., M. Fernandez and G. N. Barber (2003). Development of recombinant vesicular stomatitis viruses that exploit defects in host defense to augment specific oncolytic activity. *J Virol* 77: 8843-8856.
- Oettle, H., S. Post, P. Neuhaus, K. Gellert, J. Langrehr, K. Ridwelski, H. Schramm, J. Fahlke, C. Zuelke, C. Burkart, K. Gutberlet, E. Kettner, H. Schmalenberg, K. Weigang-Koehler, W. O. Bechstein, M. Niedergethmann, I. Schmidt-Wolf, L. Roll, B. Doerken and H. Riess (2007). Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *Jama* 297: 267-277.
- Ota, H., H. Nagano, Y. Doki, M. Sekimoto, M. Kondo, H. Wada, M. Nakamura, T. Noda, B. Damdinsuren, S. Marubashi, A. Miyamoto, Y. Takeda, K. Dono, K. Umeshita, S. Nakamori, K. Wakasa, M. Sakon and M. Monden (2006). Expression of type I interferon receptor as a predictor of clinical response to interferon-alpha therapy of gastrointestinal cancers. *Oncol Rep* 16: 249-255.
- Ozduman, K., G. Wollmann, J. M. Piepmeier and A. N. van den Pol (2008). Systemic vesicular stomatitis virus selectively destroys multifocal glioma and metastatic carcinoma in brain. *J Neurosci* 28: 1882-1893.
- Pai, M., R. Prabhu, A. Panebra, S. Nangle, S. Haque, F. Bastian, R. Garry, K. Agrawal, S. Goodbourn and S. Dash (2005). Activation of interferon-stimulated response element in huh-7 cells replicating hepatitis C virus subgenomic RNA. *Intervirology* 48: 301-311.
- Parato, K. A., D. Senger, P. A. Forsyth and J. C. Bell (2005). Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat Rev Cancer* 5: 965-976.

- Petersen, J. M., L. S. Her, V. Varvel, E. Lund and J. E. Dahlberg (2000). The matrix protein of vesicular stomatitis virus inhibits nucleocytoplasmic transport when it is in the nucleus and associated with nuclear pore complexes. *Mol Cell Biol* 20: 8590-8601.
- Picozzi, V. J., R. A. Abrams, P. A. Decker, W. Traverso, E. M. O'Reilly, E. Greeno, R. C. Martin, L. S. Wilfong, M. L. Rothenberg, M. C. Posner and P. W. Pisters (2011). Multicenter phase II trial of adjuvant therapy for resected pancreatic cancer using cisplatin, 5-fluorouracil, and interferon-alfa-2b-based chemoradiation: ACOSOG Trial Z05031. *Ann Oncol* 22: 348-354.
- Picozzi, V. J., R. A. Kozarek and L. W. Traverso (2003). Interferon-based adjuvant chemoradiation therapy after pancreaticoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma. *Am J Surg* 185: 476-480.
- Plakhov, I. V., E. E. Arlund, C. Aoki and C. S. Reiss (1995). The earliest events in vesicular stomatitis virus infection of the murine olfactory neuroepithelium and entry of the central nervous system. *Virology* 209: 257-262.
- Platanias, L. C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5: 375-386.
- Porosnicu, M., A. Mian and G. N. Barber (2003). The oncolytic effect of recombinant vesicular stomatitis virus is enhanced by expression of the fusion cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase suicide gene. *Cancer Res* 63: 8366-8376.
- Power, A. T., J. Wang, T. J. Falls, J. M. Paterson, K. A. Parato, B. D. Lichty, D. F. Stojdl, P. A. Forsyth, H. Atkins and J. C. Bell (2007). Carrier cell-based delivery of an oncolytic virus circumvents antiviral immunity. *Mol Ther* 15: 123-130.
- Qiao, J., H. Wang, T. Kottke, C. White, K. Twigger, R. M. Diaz, J. Thompson, P. Selby, J. de Bono, A. Melcher, H. Pandha, M. Coffey, R. Vile and K. Harrington (2008). Cyclophosphamide facilitates antitumor efficacy against subcutaneous tumors following intravenous delivery of reovirus. *Clin Cancer Res* 14: 259-269.
- Redston, M. S., C. Caldas, A. B. Seymour, R. H. Hruban, L. da Costa, C. J. Yeo and S. E. Kern (1994). p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. *Cancer Res* 54: 3025-3033.
- Roberts, A., L. Buonocore, R. Price, J. Forman and J. K. Rose (1999). Attenuated vesicular stomatitis viruses as vaccine vectors. *J Virol* 73: 3723-3732.
- Rodolosse, A., E. Chalaux, T. Adell, H. Hagege, A. Skoudy and F. X. Real (2004). PTF1alpha/p48 transcription factor couples proliferation and differentiation in the exocrine pancreas [corrected]. *Gastroenterology* 127: 937-949.

- Rodriguez, L. L. (2002). Emergence and re-emergence of vesicular stomatitis in the United States. *Virus Res* 85: 211-219.
- Rose, R. R. W. a. J. K. (1996). *Rhabdoviridae: the viruses and their replication*. B.N. Fields and D.M. Knipe, Editors, *Fields Virology*, Lippincott-Raven pp. 1121-1136.
- Saidi, R. F., F. Williams, J. Ng, G. Danquah, V. K. Mittal, S. G. ReMine and M. J. Jacobs (2006). Interferon receptors and the caspase cascade regulate the antitumor effects of interferons on human pancreatic cancer cell lines. *Am J Surg* 191: 358-363.
- Saidi, R. F., F. Williams, B. Silberberg, V. K. Mittal, S. G. ReMine and M. J. Jacobs (2006). Expression of interferon receptors in pancreatic cancer: identification of a novel prognostic factor. *Surgery* 139: 743-748.
- Sarinella, F., A. Calistri, P. Sette, G. Palu and C. Parolin (2006). Oncolysis of pancreatic tumour cells by a gamma34.5-deleted HSV-1 does not rely upon Ras-activation, but on the PI 3-kinase pathway. *Gene Ther* 13: 1080-1087.
- Schneider, G., J. T. Siveke, F. Eckel and R. M. Schmid (2005). Pancreatic cancer: basic and clinical aspects. *Gastroenterology* 128: 1606-1625.
- Schnell, M. J., L. Buonocore, M. A. Whitt and J. K. Rose (1996). The minimal conserved transcription stop-start signal promotes stable expression of a foreign gene in vesicular stomatitis virus. *J Virol* 70: 2318-2323.
- Schutte, M., R. H. Hruban, J. Geradts, R. Maynard, W. Hilgers, S. K. Rabindran, C. A. Moskaluk, S. A. Hahn, I. Schwarte-Waldhoff, W. Schmiegel, S. B. Baylin, S. E. Kern and J. G. Herman (1997). Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 57: 3126-3130.
- Sebens, S. and H. Schafer (2011). The Tumor Stroma as Mediator of Drug Resistance - A Potential Target to Improve Cancer Therapy? *Curr Pharm Biotechnol*.
- Sen, G. C. and R. M. Ransohoff (1993). Interferon-induced antiviral actions and their regulation. *Adv Virus Res* 42: 57-102.
- Seth, R. B., L. Sun and Z. J. Chen (2006). Antiviral innate immunity pathways. *Cell Res* 16: 141-147.
- Shah, A. C., D. Benos, G. Y. Gillespie and J. M. Markert (2003). Oncolytic viruses: clinical applications as vectors for the treatment of malignant gliomas. *J Neurooncol* 65: 203-226.
- Shaib, Y. H., J. A. Davila and H. B. El-Serag (2006). The epidemiology of pancreatic cancer in the United States: changes below the surface. *Aliment Pharmacol Ther* 24: 87-94.

- Shinozaki, K., O. Ebert, C. Kournioti, Y. S. Tai and S. L. Woo (2004). Oncolysis of multifocal hepatocellular carcinoma in the rat liver by hepatic artery infusion of vesicular stomatitis virus. *Mol Ther* 9: 368-376.
- Shinozaki, K., O. Ebert, A. Suriawinata, S. N. Thung and S. L. Woo (2005). Prophylactic alpha interferon treatment increases the therapeutic index of oncolytic vesicular stomatitis virus virotherapy for advanced hepatocellular carcinoma in immune-competent rats. *J Virol* 79: 13705-13713.
- Silverman, R. H. (2007). Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *J Virol* 81: 12720-12729.
- Siveke, J. T., H. Einwachter, B. Sipos, C. Lubeseder-Martellato, G. Kloppel and R. M. Schmid (2007). Concomitant pancreatic activation of Kras(G12D) and Tgfa results in cystic papillary neoplasms reminiscent of human IPMN. *Cancer Cell* 12: 266-279.
- Stark, G. R. (2007). How cells respond to interferons revisited: from early history to current complexity. *Cytokine Growth Factor Rev* 18: 419-423.
- Stark, G. R., I. M. Kerr, B. R. Williams, R. H. Silverman and R. D. Schreiber (1998). How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67: 227-264.
- Steinhauer, D. A., J. C. de la Torre, E. Meier and J. J. Holland (1989). Extreme heterogeneity in populations of vesicular stomatitis virus. *J Virol* 63: 2072-2080.
- Stojdl, D. F., N. Abraham, S. Knowles, R. Marius, A. Brasey, B. D. Lichty, E. G. Brown, N. Sonenberg and J. C. Bell (2000). The murine double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR is required for resistance to vesicular stomatitis virus. *J Virol* 74: 9580-9585.
- Stojdl, D. F., B. Lichty, S. Knowles, R. Marius, H. Atkins, N. Sonenberg and J. C. Bell (2000). Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat Med* 6: 821-825.
- Stojdl, D. F., B. D. Lichty, B. R. tenOever, J. M. Paterson, A. T. Power, S. Knowles, R. Marius, J. Reynard, L. Poliquin, H. Atkins, E. G. Brown, R. K. Durbin, J. E. Durbin, J. Hiscott and J. C. Bell (2003). VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* 4: 263-275.
- Stolzenberg-Solomon, R. Z., K. Adams, M. Leitzmann, C. Schairer, D. S. Michaud, A. Hollenbeck, A. Schatzkin and D. T. Silverman (2008). Adiposity, physical activity, and pancreatic cancer in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Cohort. *Am J Epidemiol* 167: 586-597.
- Sun, W. H., C. Pabon, Y. Alsayed, P. P. Huang, S. Jandeska, S. Uddin, L. C. Plataniias and S. T. Rosen (1998). Interferon-alpha resistance in a cutaneous T-cell lymphoma cell line is associated with lack of STAT1 expression. *Blood* 91: 570-576.

- Tanaka, S. S., Y. L. Yamaguchi, B. Tsoi, H. Lickert and P. P. Tam (2005). IFITM/Mil/fragilis family proteins IFITM1 and IFITM3 play distinct roles in mouse primordial germ cell homing and repulsion. *Dev Cell* 9: 745-756.
- Taniguchi, T. and A. Takaoka (2001). A weak signal for strong responses: interferon-alpha/beta revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 378-386.
- Tascilar, M., H. G. Skinner, C. Rosty, T. Sohn, R. E. Wilentz, G. J. Offerhaus, V. Adsay, R. A. Abrams, J. L. Cameron, S. E. Kern, C. J. Yeo, R. H. Hruban and M. Goggins (2001). The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 7: 4115-4121.
- Taylor, O. M., E. A. Benson and M. J. McMahon (1993). Clinical trial of tamoxifen in patients with irresectable pancreatic adenocarcinoma. The Yorkshire Gastrointestinal Tumour Group. *Br J Surg* 80: 384-386.
- Terenzi, F., D. J. Hui, W. C. Merrick and G. C. Sen (2006). Distinct induction patterns and functions of two closely related interferon-inducible human genes, ISG54 and ISG56. *J Biol Chem* 281: 34064-34071.
- Tersmette, A. C., G. M. Petersen, G. J. Offerhaus, F. C. Falatko, K. A. Brune, M. Goggins, E. Rozenblum, R. E. Wilentz, C. J. Yeo, J. L. Cameron, S. E. Kern and R. H. Hruban (2001). Increased risk of incident pancreatic cancer among first-degree relatives of patients with familial pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 7: 738-744.
- Terstegen, L., P. Gatsios, S. Ludwig, S. Pleschka, W. Jahnen-Dechent, P. C. Heinrich and L. Graeve (2001). The vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits glycoprotein 130-dependent STAT activation. *J Immunol* 167: 5209-5216.
- Tong, A. W., N. Senzer, V. Cerullo, N. S. Templeton, A. Hemminki and J. Nemunaitis (2011). Oncolytic Viruses for Induction, of Anti-Tumor Immunity. *Curr Pharm Biotechnol*.
- Tough, D. F. (2004). Type I interferon as a link between innate and adaptive immunity through dendritic cell stimulation. *Leuk Lymphoma* 45: 257-264.
- Touzot, M., V. Soumelis and T. Asselah (2011). A dive into the complexity of type I interferon antiviral functions. *J Hepatol*.
- Trottier, M. D., D. S. Lyles and C. S. Reiss (2007). Peripheral, but not central nervous system, type I interferon expression in mice in response to intranasal vesicular stomatitis virus infection. *J Neurovirol* 13: 433-445.
- Van Cutsem, E., H. van de Velde, P. Karasek, H. Oettle, W. L. Vervenne, A. Szawlowski, P. Schoffski, S. Post, C. Verslype, H. Neumann, H. Safran, Y. Humblet, J. Perez Ruixo, Y. Ma and D. Von Hoff (2004). Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 22: 1430-1438.

- van der Heijden, M. S., J. R. Brody, D. A. Dezentje, E. Gallmeier, S. C. Cunningham, M. J. Swartz, A. M. DeMarzo, G. J. Offerhaus, W. H. Isacoff, R. H. Hruban and S. E. Kern (2005). In vivo therapeutic responses contingent on Fanconi anemia/BRCA2 status of the tumor. *Clin Cancer Res* 11: 7508-7515.
- Van Laethem, J. L., P. Hammel, F. Mornex, D. Azria, G. Van Tienhoven, P. Vergauwe, M. Peeters, M. Polus, M. Praet, M. Mauer, L. Collette, V. Budach, M. Lutz, E. Van Cutsem and K. Haustermans (2010). Adjuvant gemcitabine alone versus gemcitabine-based chemoradiotherapy after curative resection for pancreatic cancer: a randomized EORTC-40013-22012/FFCD-9203/GERCOR phase II study. *J Clin Oncol* 28: 4450-4456.
- Vile, R., D. Ando and D. Kirn (2002). The oncolytic virotherapy treatment platform for cancer: unique biological and biosafety points to consider. *Cancer Gene Ther* 9: 1062-1067.
- Villarreal, L. P., M. Breindl and J. J. Holland (1976). Determination of molar ratios of vesicular stomatitis virus induced RNA species in BHK21 cells. *Biochemistry* 15: 1663-1667.
- Vitale, G., C. H. van Eijck, P. M. van Koetsveld Ing, J. I. Erdmann, E. J. Speel, K. van der Wansem Ing, D. M. Mooij, A. Colao, G. Lombardi, E. Croze, S. W. Lamberts and L. J. Hofland (2007). Type I interferons in the treatment of pancreatic cancer: mechanisms of action and role of related receptors. *Ann Surg* 246: 259-268.
- von Kobbe, C., J. M. van Deursen, J. P. Rodrigues, D. Sitterlin, A. Bachi, X. Wu, M. Wilm, M. Carmo-Fonseca and E. Izaurralde (2000). Vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits host cell gene expression by targeting the nucleoporin Nup98. *Mol Cell* 6: 1243-1252.
- Warshaw, A. L. and C. Fernandez-del Castillo (1992). Pancreatic carcinoma. *N Engl J Med* 326: 455-465.
- Wathelet, M., S. Moutschen, P. Defilippi, A. Cravador, M. Collet, G. Huez and J. Content (1986). Molecular cloning, full-length sequence and preliminary characterization of a 56-kDa protein induced by human interferons. *Eur J Biochem* 155: 11-17.
- Wathelet, M. G., C. H. Lin, B. S. Parekh, L. V. Ronco, P. M. Howley and T. Maniatis (1998). Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo. *Mol Cell* 1: 507-518.
- Weinberg, R. A. (1995). The molecular basis of oncogenes and tumor suppressor genes. *Ann N Y Acad Sci* 758: 331-338.
- Willmon, C., K. Harrington, T. Kottke, R. Prestwich, A. Melcher and R. Vile (2009). Cell carriers for oncolytic viruses: Fed Ex for cancer therapy. *Mol Ther* 17: 1667-1676.
- Wojton, J. and B. Kaur (2010). Impact of tumor microenvironment on oncolytic viral therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 21: 127-134.

- Wong, J., A. Schulman, A. Mitra and Y. Fong (2011). Oncolytic Viruses Effectively Target and Kill Pancreatic Cancer Stem Cells. SSAT Abstract, Digestive Disease Week®.
- Wong, L. H., I. Hatzinisiriou, R. J. Devenish and S. J. Ralph (1998). IFN-gamma priming up-regulates IFN-stimulated gene factor 3 (ISGF3) components, augmenting responsiveness of IFN-resistant melanoma cells to type I IFNs. *J Immunol* 160: 5475-5484.
- Wong, L. H., K. G. Krauer, I. Hatzinisiriou, M. J. Estcourt, P. Hersey, N. D. Tam, S. Edmondson, R. J. Devenish and S. J. Ralph (1997). Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF3 components, STAT1, STAT2, and p48-ISGF3gamma. *J Biol Chem* 272: 28779-28785.
- Wray, C. J., S. A. Ahmad, J. B. Matthews and A. M. Lowy (2005). Surgery for pancreatic cancer: recent controversies and current practice. *Gastroenterology* 128: 1626-1641.
- Xiong, H. Q., A. Rosenberg, A. LoBuglio, W. Schmidt, R. A. Wolff, J. Deutsch, M. Needle and J. L. Abbruzzese (2004). Cetuximab, a monoclonal antibody targeting the epidermal growth factor receptor, in combination with gemcitabine for advanced pancreatic cancer: a multicenter phase II Trial. *J Clin Oncol* 22: 2610-2616.
- Yamanaka, Y., H. Friess, M. S. Kobrin, M. Buchler, H. G. Beger and M. Korc (1993). Coexpression of epidermal growth factor receptor and ligands in human pancreatic cancer is associated with enhanced tumor aggressiveness. *Anticancer Res* 13: 565-569.
- Yano, H., A. Iemura, M. Haramaki, S. Ogasawara, A. Takayama, J. Akiba and M. Kojiro (1999). Interferon alfa receptor expression and growth inhibition by interferon alfa in human liver cancer cell lines. *Hepatology* 29: 1708-1717.
- Yeo, C. J., J. L. Cameron, T. A. Sohn, K. D. Lillemoe, H. A. Pitt, M. A. Talamini, R. H. Hruban, S. E. Ord, P. K. Sauter, J. Coleman, M. L. Zahurak, L. B. Grochow and R. A. Abrams (1997). Six hundred fifty consecutive pancreaticoduodenectomies in the 1990s: pathology, complications, and outcomes. *Ann Surg* 226: 248-257; discussion 257-260.
- Zhang, K. X., Y. Matsui, B. A. Hadaschik, C. Lee, W. Jia, J. C. Bell, L. Fazli, A. I. So and P. S. Rennie (2009). Down-regulation of type I interferon receptor sensitizes bladder cancer cells to vesicular stomatitis virus-induced cell death. *Int J Cancer*.

7 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1** Tumorprogressionsmodell des duktales Pankreaskarzinoms aus (Hruban, Goggins et al. 2000).
- Abb. 1.2** VSV-Genom und Virusstruktur modifiziert aus (Lichty, Power et al. 2004).
- Abb. 1.3** Interferoninduktion und Interferonantwort am Beispiel des Hepatitis C Virus aus (Gale and Foy 2005).
- Abb. 2.1** Virusaufreinigung mittels Ultrazentrifugation und Sucrose-Gradient.
- Abb. 2.2** Versuchsaufbau für Replikationskinetik.
- Abb. 2.3** orthotope Tumorzellimplantation.
- Abb. 3.1** Replikationskinetik von rVSV-GFP und VSV-M51R in pankreatischen Tumorzelllinien.
- Abb. 3.2** Interferon Protection Assay mit rVSV-GFP.
- Abb. 3.3** Interferon Protection Assay mit rVSV-GFP. Vergleich der drei verschiedenen Zellklassen.
- Abb. 3.4** Microarray-Datenvergleich CKN2- und CK-Zelllinien.
- Abb. 3.5** Luciferase-Reportergen-Assay.
- Abb. 3.6** ISRE-Promotoraktivierung durch VSV-M51R und exogenes Interferon.
- Abb. 3.7** VSV-Replikation in vivo in orthotop-implantierten Pankreastumoren.
- Abb. 3.8** VSV-Replikation in vivo in endogenen CKP-Pankreastumoren.
- Abb. 3.9** β -Galaktosidasefärbung sechs Stunden nach rVSV-lacZ Infektion an CK 9801 Zellen.
- Abb. 3.10** HE-Färbung der Pankreaspräparate.
- Abb. 3.11** β -Galaktosidasefärbung von endogenen CKP-Tumoren 24 h nach rVSV-lacZ-Therapie.

8 Anhang

Liste der Untersuchten Gene bei der Microarray-Datenanalyse

Nummer	Gen Bezeichnung
1	2'-5' oligoadenylate synthetase 1A
2	2'-5' oligoadenylate synthetase 1C
3	2'-5' oligoadenylate synthetase 1D /// 2'-5' oligoadenylate synthetase 1E
4	2'-5' oligoadenylate synthetase 1E
5	2'-5' oligoadenylate synthetase 1H
6	2'-5' oligoadenylate synthetase 2
7	2'-5' oligoadenylate synthetase 3
8	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1
9	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2
10	activating transcription factor 2
11	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
12	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2
13	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2
14	insulin-like 3 /// Janus kinase 3
15	interferon (alpha and beta) receptor 1
16	interferon (alpha and beta) receptor 2
17	interferon (alpha and beta) receptor 2
18	interferon activated gene 202B
19	interferon activated gene 203
20	interferon activated gene 203 /// 204 /// 205 /// 205
21	interferon activated gene 204
22	interferon activated gene 205 /// myeloid cell nuclear differentiation antigen
23	interferon alpha 1
24	interferon alpha 1 /// 2 /// 4 /// 5 /// 6 /// 7 /// 9 /// alpha B /// 12 /// 14
25	interferon alpha 11
26	interferon alpha 2
27	interferon alpha 4
28	interferon alpha 5
29	interferon alpha 6
30	interferon alpha 9
31	interferon alpha B
32	interferon alpha responsive gene
33	interferon beta 1, fibroblast
34	interferon dependent positive acting transcription factor 3 gamma
35	interferon gamma
36	interferon gamma induced GTPase
37	interferon gamma inducible protein 30
38	interferon gamma inducible protein 47
39	interferon gamma receptor 1

40	interferon gamma receptor 2
41	interferon gamma receptor 2
42	interferon induced transmembrane protein 1
43	interferon induced transmembrane protein 2
44	interferon induced transmembrane protein 3
45	interferon induced with helicase C domain 1
46	interferon inducible GTPase 1
47	interferon inducible GTPase 2
48	interferon regulatory factor 1
49	interferon regulatory factor 2
50	interferon regulatory factor 2 binding protein 1
51	interferon regulatory factor 3
52	interferon regulatory factor 4
53	interferon regulatory factor 5
54	interferon regulatory factor 6
55	interferon regulatory factor 7
56	interferon regulatory factor 8
57	interferon stimulated exonuclease gene 20-like 1
58	interferon zeta
59	interferon zeta /// und andere
60	interferon, alpha-inducible protein 27
61	interferon-induced protein 35
62	interferon-induced protein 44
63	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
64	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2
65	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
66	interferon-inducible GTPase-like
67	interferon-related developmental regulator 1
68	interferon-related developmental regulator 2
69	interferon-stimulated protein
70	interleukin-1 receptor-associated kinase 1 binding protein 1
71	Janus kinase 1
72	Janus kinase 2
73	Janus kinase 3
74	myeloid differentiation primary response gene 88
75	myxovirus (influenza virus) resistance 1
76	myxovirus (influenza virus) resistance 2
77	protein kinase, interferon inducible double stranded RNA dependent activator
78	protein-kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent inhibitor
79	retinoic acid induced 1
80	retinoic acid induced 12
81	retinoic acid induced 14
82	retinoic acid induced 2
83	signal transducer and activator of transcription 1
84	signal transducer and activator of transcription 2
85	signal transducer and activator of transcription 3
86	signal transducer and activator of transcription 4
87	signal transducer and activator of transcription 5A

88	signal transducer and activator of transcription 5B
89	signal transducer and activator of transcription 6
90	signal transducer and activator of transcription interacting protein 1
91	TANK-binding kinase 1
92	Tnf receptor-associated factor 6
93	toll interacting protein
94	toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain-containing adaptor protein
95	toll-like receptor 1
96	toll-like receptor 2
97	toll-like receptor 3
98	toll-like receptor 4
99	toll-like receptor 5
100	toll-like receptor 6
101	toll-like receptor 7
102	toll-like receptor 8
103	toll-like receptor 9
104	transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
105	tyrosine kinase 2

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny, Direktor des Institut für Radiologie der Technischen Universität München, für die Übernahme dieser Doktorarbeit und die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Rickmer Braren und Herrn Priv.-Doz. Dr. Oliver Ebert für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Themas.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. J. Kleeff bedanke ich mich herzlich für seine Bereitschaft als Zweitgutachter zu fungieren.

Meinem Betreuer Herrn Dr. Rickmer Braren möchte ich für die ausgezeichnete Betreuung und fortwährende Unterstützung bei der Verwirklichung dieser Dissertation sehr herzlich danken. Ich möchte mich auch bei der gesamten Arbeitsgruppe Ebert für die ständige Unterstützung und Hilfsbereitschaft sowie die konstruktive Kritik bedanken. Ein besonderes Dankeschön gilt hier vor allem Jennifer Altomonte, Sabrina Marozin und Barbara Lindner, die immer für Fragen offen waren und mit ihrer freundlichen Art zum guten Arbeitsklima beigetragen haben.

Ein besonderes Dankeschön gilt auch Iryna Skuratovska für die großartige Unterstützung und die fortwährende harmonisch Zusammenarbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Yvonne Kosanke für die technische und fachliche Unterstützung bei den Tumorzell-Implantationen.

Ebenso ein Dankeschön an die Arbeitsgruppe von Herrn Priv.-Doz. Dr. Jens Siveke, die immer bereit war mir bei offenen Fragen weiterzuhelfen. Bedanken möchte ich mich vor allem bei Irina Heid, Marija Trajkovic-Arsic und Pawel Mazur.

Außerdem möchte ich die Gelegenheit nutzen meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglichten und mich in jeglichen Situationen ununterbrochen unterstützen, herzlich zu danken.