

Aus der/dem Klinik und Poliklinik / Institut für Innere Medizin A
(Direktor/in Univ.- Prof. Dr. Ali Alexander Aghdassi)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Thema: Tumorzelllyse des Pankreaskarzinoms nach adoptivem Zelltransfer

Inaugural - Dissertation
zur

Erlangung des akademischen
Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der
Universitätsmedizin
der
Universität Greifswald
2021

vorgelegt von:
Luisa Christina Thomsen
geb. am: 05.03.1992
in: Flensburg

Dekan/in: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter/in: Herr Prof. Dr. Ali Aghdassi

2. Gutachter/in: Herr Prof. Dr. Patrick Michl

(3. Gutachter/in:)

Ort, Raum: Universitätsmedizin Greifswald, Innere Medizin C Raum J0.37

Tag der Disputation: 16.05.2023

Tumorzelllyse des Pankreaskarzinoms nach adoptivem Zelltransfer

| | |
|---|----|
| Abkürzungsverzeichnis | 7 |
| 1. Einleitung..... | 10 |
| 1.1 Epidemiologie | 10 |
| 1.2 Pathogenese..... | 10 |
| 1.3 Konventionelle Therapiemöglichkeiten | 13 |
| 1.4 Die Auswirkung des Pankreaskarzinoms auf das Immunsystem | 13 |
| 1.5 Immuntherapie..... | 16 |
| 1.5.1 NDV als onkolytisches Virus | 17 |
| 2. Material und Methoden..... | 20 |
| 2.1 Material | 20 |
| 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien | 20 |
| 2.1.2 Kits | 20 |
| 2.1.3 Laborgeräte..... | 20 |
| 2.1.4 Medien und Lösungen für die Zellkultur | 21 |
| 2.1.5 Puffer..... | 22 |
| 2.1.6 Programme und Datenbanken | 23 |
| 2.1.7 Verbrauchsmaterialien | 24 |
| 2.1.8 Viren..... | 24 |
| 2.1.9 Zelllinien | 25 |
| 2.2 Methoden..... | 25 |
| 2.2.1 Tierhaltung und Zucht | 25 |
| 2.2.2 Orthotopes Tumormodell | 25 |
| 2.2.3 Adoptiver Zelltransfer nach NDV Stimulation..... | 26 |
| 2.2.4 Explantation von Blut, Organen, Tumor und Herstellung der Zellsuspension | 27 |
| 2.2.5 Zelllinie, Zellkultur und <i>in vitro</i> Infektion | 28 |
| 2.2.6 Durchflusszytometrische Analyse | 28 |
| 2.2.7 Anzucht, Titration und Nachweis von R75/98 | 30 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.2.8 | Statistische Auswertung..... | 31 |
| 3. | Ergebnisse | 32 |
| 3.1 | Adoptiver Zelltransfer nach NDV 75/98 Stimulation | 32 |
| 3.2 | Virusnachweis in Leukozytenkultur..... | 34 |
| 3.3 | Infektion mit NDV 75/98..... | 36 |
| 3.4 | Ergebnisse der Durchflusszytometrie | 37 |
| 3.4.1 | Veränderung der Oberflächenmarker der DT6606PDA Tumorzellen und der Reisolate | 37 |
| 4. | Diskussion | 42 |
| 5. | Ausblick | 46 |
| 6. | Zusammenfassung | 48 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 49 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|---|
| 5-FU | 5- Fluorouracil/ Folinsäure |
| APC | Allophycocyanin |
| APC-Cy7 | Allophycocyanin-Cyanin 7 |
| <i>ATM</i> | <i>Ataxia telangiectasia mutated</i> |
| β-ME | β-Mercaptoethanol |
| BRCA1/2 | Breast cancer 1/2 |
| CCL2 | CC-Chemokinligand 2 |
| CD | <i>Cluster of differentiation</i> |
| <i>CDKN2A</i> | <i>Cyclin- dependent kinase inhibitor 2a gene</i> |
| <i>CEF</i> | <i>Chicken embryonic fibroblasts</i> , Zellsuspension aus embryonierten Hühnereiern |
| <i>CFTR</i> | <i>CF transmembrane conductance regulator</i> |
| <i>CHEK2</i> | <i>Checkpoint kinase 2</i> |
| CPI | cerebraler Pathogenitätsindex |
| <i>CTRC</i> | <i>Chromotrypsin C</i> |
| CTLA-4 | <i>cytotoxic-T- lymphocyte-associated-protein-4</i> |
| CXCL2 | <i>C-X-C motif chemokine 2</i> |
| DC | <i>dendritic cells</i> , Dendritische Zellen |
| DGHO | Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| ELISA | <i>Enzyme-linked-Immunoassay</i> |
| <i>EpCAM</i> | <i>Epithelial cell adhesion molecule</i> |
| FACS | <i>Fluorescence-activated cell sorting</i> |
| FITC | Fluorescein |
| FoxP3 | Forkhead-Box-Protein P3 |
| GM-CSF | <i>Granulocyte-Monocyte Colony-stimulating-factor</i> |
| IDO | Indoleamine 2,3-Desoxygenase |
| IL | Interleukin |
| <i>KRAS</i> | <i>Kirsten rat sarcoma</i> |
| KG | Körpergewicht |
| KIR | <i>Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors</i> |
| HSV | Herpes Simplex Virus |

| | |
|---------------|--|
| MDSC | <i>Myeloid Derived Suppressor Cells</i> |
| MHC I | <i>major histocompatibility complex I</i> |
| MIC A | MHC I verwandtes Protein A |
| MIC B | MHC I verwandtes Protein B |
| MLH1 | <i>mutL homolog 1</i> |
| MOI | <i>Multiplicity of infection</i> |
| <i>MSH2</i> | <i>mutS homolog2</i> |
| <i>MSH6</i> | <i>mutS homolog6</i> |
| <i>NCR</i> | <i>natural cytotoxicity receptors</i> |
| NDV | <i>Newcastle disease virus</i> |
| NFAT | <i>nuclear Factor of activated T cells</i> |
| NFκB | <i>nuclear factor `kappa-light-chain-enhancer` of activated B cells</i> |
| NK | <i>Natural Killer</i> |
| NKG2D | <i>killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1</i> |
| PanIn | <i>pancreatic intraepithelial neoplasia</i> |
| PBMC | <i>peripheral blood monocytic cells</i> |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| PDAC | <i>Pancreatic ductal adenocarcinoma</i> |
| PD-1 | <i>Programmed cell death receptor 1</i> |
| PD-L | <i>Programmed cell death ligand 1</i> |
| PE | Phycoerythrin-Cyanin 7 |
| PerCp-Cy5.5 | Peridin-Chlorophyll Protein-Cyanin 5.5 |
| PFU | <i>Plaque-forming units</i> |
| Rae-1 | Ribonucleic Acid Export-1 |
| RiK | Reisolate-Kontrolle: Tumor-Reisolate der Gruppe, der naive Immunzellen transferiert wurden |
| RiS | Reisolate-stimuliert: Tumor-Reisolate der Gruppe, der stimulierte Immunzellen transferiert wurde |
| <i>POLN</i> | <i>polymerase nu</i> |
| <i>POLQ</i> | <i>polymerase theta</i> |
| <i>PRSS1</i> | <i>Serine protease 1</i> |
| <i>SMAD4</i> | <i>mothers against decapentaplegic homolog 4</i> |
| <i>SPINK1</i> | <i>Serine peptidase Kazal type 1</i> |
| Stav | Streptavidin |

| | |
|------------------|---|
| STK11 | <i>Serine threonine kinase 11</i> |
| TAM | Tumor assoziierte Makrophagen |
| T _{eff} | T-Effektor Lymphozyten |
| TGF-β | <i>Transforming Growth Factor beta</i> |
| TME | <i>Tumor Mircoenvironment</i> |
| T _{reg} | regulatorische T Lymphozyten |
| ULPB | <i>UL-16 binding protein</i> , UL16 Bindungsprotein |
| TP53 | <i>Tumor suppressor 53</i> |
| VSV | Vesikuläres Stomatitis Virus |

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie

Das Pankreaskarzinom ist die vierthäufigste Todesursache aufgrund einer Krebserkrankung und hat von allen Krebsarten die niedrigste Überlebenschancen.

Das Robert-Koch Institut gibt eine jährliche Inzidenz von 18.690 Neuerkrankungen im Jahr 2017 an, die bis 2020 auf 19.900 (Frauen: 9.700, Männer: 10.200) ansteigen soll. Dies wird durch die Globale Statistik zu Krebserkrankungen der WHO bestätigt, die für das Jahr 2018 eine Neuerkrankungsrate von 16.700 (Frauen: 7.400, Männer: 9.300) angibt (1). Das durchschnittliche Erkrankungsalter bei Männern liegt bei ca. 72 und bei Frauen bei ca. 76 Jahren. Die häufig erst spät auftretende Symptomatik sowie ein rasches Tumorwachstum resultieren in einer 5-Jahres-Überlebensrate von 9% bei Männern und 10% bei Frauen (2). Eine vergleichbare Statistik zeigt sich in anderen Industrieländern (3). Die Risikofaktoren sind häufig Genussgifte (Rauchen und Alkoholkonsum), Fehlernährung (Adipositas), sowie Diabetes Mellitus Typ 2 (4–7). Zusätzlich ist eine familiäre Häufung erkennbar, deren Form der Vererbung und Identifikation von verursachenden Mutationen allerdings noch nicht als abgeschlossen bezeichnet werden kann (8–11).

Da sich die epigenetischen Risikofaktoren nicht zügig und endgültig modifizieren lassen, ist es umso wichtiger, eine zuverlässige Therapiemöglichkeit zu finden, die den häufig gänzlich geschädigten Organismus nicht zusätzlich belastet. Die Immuntherapie, mit der sich diese Arbeit beschäftigt, bietet einen solchen Ansatz.

1.2 Pathogenese

Das Pankreaskarzinom entsteht aus unterschiedlichen Vorstufen, deren Feststellung vor dem ersten Auftreten symptomatischer Beschwerden eine Herausforderung darstellt. Durch bildgebende Verfahren wie Magnetresonanztomografie oder Sonografie können lediglich Zysten zuverlässig dargestellt werden, die allerdings nur einen Teil der pankreatischen Raumforderungen ausmachen.

Weitaus häufiger sind pankreatische intraepitheliale Neoplasien (*PanIn lesions*), die sich über Jahre im Gewebe entwickeln. Ein Modell, welches die Hierarchie der Mutationen beschreibt, wurde 2001 von Hruban et al. veröffentlicht und veranschaulicht die Veränderung der pankreatischen duktaalen Zellen bis hin zum pankreatischen duktaalen Adenokarzinom (*pancreatic ductal adenocarcinoma* (PDAC)). Demnach sind die ersten intrazellulären Vorgänge somatische Mutationen, die sich später in morphologischen Veränderungen niederschlagen. Am Beginn steht eine *Kirsten rat sarcoma (kras)* G12D Aktivierungsmutation, die zum Funktionsverlust der GTPase führt, deren Aufgabe die Inaktivierung von K-ras wäre, und so zu einem unkontrollierten Zellwachstum führt. Auf diese gain-of-function Mutation folgen weitere loss-of-function Mutationen in den folgenden Genen: *cyclin dependent kinase inhibitor 2A (cdkn2a)*, *tumorsuppressor 53 (tp53)*, *mothers against decapentaplegic homolog 4 (smad4)* und *breast cancer 2 gene (brca2)* (12). Diesen Genen liegt die Gemeinsamkeit zu Grunde, dass die daraus gebildeten Proteine eine inhibitorische oder regulatorische Funktion auf den Zellzyklus ausüben, die durch die Mutation absinken oder verloren gehen (13). Schlussendlich führt dies zu einer unkontrollierten Teilung der mutierten Zellen, die den Ursprung des Pankreaskarzinoms bilden.

Heute bekannte Keimbahnmutationen sind für ca. 10% der Fälle des PDAC verantwortlich (14) und lassen sich nach ihrem Mechanismus einteilen. Eine direkte Schädigung der Zelle wird verursacht durch verfrühte Aktivierung der *Serine protease 1 (PRSS1)* oder eine *loss-of-function* Mutation des *Serine peptidase inhibitor Kazal type 1 (SPINK1)*, *CF transmembrane conductance regulator (CFTR)* in Kombination mit *Chromotrypsin c (CTRC)* oder SPINK1, sowie eine Störung im Wachstumszyklus durch Mutationen in den Genen *KRAS*, *TP53*, *SMAD4*, *Ataxia telangiectasia mutated (ATM)*, *Checkpoint kinase 2 (CHEK2)*, *CDKN2A* und *Serine/threonin kinase 11 (STK11)*. Eine verminderte DNA Reparatur ist bei Mutationen von BRCA1 und 2 zu erkennen, die auch bei Mamma- und Ovarialkarzinomen als Ursache bekannt sind (15).

Trotz der Kenntnis über die vorhergenannten Mutationen ist es nicht möglich die Wahrscheinlichkeit einer Pankreastumor-Erkrankung bei einer Kombination dieser Mutationen vorherzusagen. Zusätzlich ist ein Screening der Betroffenen dadurch erschwert, dass eine Biopsie von verdächtigen Arealen durch die Lage des Organs

zu schwerwiegenden Komplikationen führen kann und die bildgebenden Verfahren eine schlechte Sensitivität aufweisen.

Hinzu kommt die Komponente der Ernährungs- und Lebensgewohnheiten vieler Patienten die, zusätzlich zu den Veränderungen auf genetischer Ebene zunächst zu einer akuten oder chronischen Pankreatitis führen können, wodurch bereits nach drei Jahren mit einer chronischen Form das Krebsrisiko bedeutend ansteigt (16).

Somit konzentriert sich die Risikobewertung der Patienten momentan auf vorliegende Keimbahnmutationen, Umweltfaktoren und deren Lebensweise, sowie eine vorhergehend chronische Pankreatitis (13).

Von allen Pankreaskarzinomen wachsen ca. 60% im Kopf, 15% im Körper und 5% im Schwanz des Pankreas. Die restlichen 20% verteilen sich diffus im Organ und lassen sich nicht genau zuordnen (17). Der Großteil der Adenokarzinome ist duktal. Seltener finden sich zystische Adenokarzinome oder azinäre Tumore. Charakteristisch für das Wachstum sind eine hohe Mitoserate der Zellen und eine zügige Infiltration in die umliegenden Organe. Das Tumorgewebe ist reich an Fibroblasten und pankreatischen Sternzellen (18), welche für die Architektur des gesunden Pankreas unverzichtbar sind und dessen Struktur erhalten. Schon 2011 haben Neesse et al. beschrieben, dass die Aktivierung dieser Zellen durch einen inflammatorischen Stimulus oder durch die Aktivierungsmutation von KRAS dazu führt, dass Liganden des *hedgehog*-Signalwegs parakrin auf die mesenchymalen Zellen wirken. Es bildet sich daraufhin eine dichte extrazelluläre Matrix um das Adenokarzinom, welche zu einer zunehmenden Kompression der tumorversorgenden Gefäße führt woraus sich eine mögliche chemotherapeutische Resistenz des Tumors ableiten lässt, da verabreichte Medikamente nicht zu ihrem Zielort gelangen (19–21).

1.3 Konventionelle Therapiemöglichkeiten

Die momentane Standardtherapie bei Patienten mit einem Pankreaskarzinom besteht soweit möglich in einer operativen Entfernung des Tumors. Dabei kommt entweder die komplette Pankreatektomie nach Kausch-Whipple (22) oder die heute zunehmende angewandte Pylorus-erhaltende partielle Duodenopankreatektomie nach Transverso-Longmire zum Einsatz. Eine operative Therapie erfolgt allerdings nur, wenn eine R0-Resektion voraussichtlich erreicht werden kann. Dies wird durch das Fehlen von makroskopischen und mikroskopischen Tumorzellen im Resektionsrand des entnommenen Gewebes angezeigt.

Postoperativ wird eine adjuvante Mono- oder Kombinationstherapie aus Chemotherapeutika durchgeführt. Zurzeit wird durch die Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) eine Therapie mit modifiziertem FOLFIRINOX (mFOLFIRINOX), bestehend aus 5-Fluorouracil (5-FU), Irinotecan und Oxaliplatin, empfohlen soweit keine Kontraindikationen bestehen und der Allgemeinzustand des Patienten es zulässt (23, 24). Im anderen Fall sollte eine Monotherapie mit Gemcitabin oder 5-FU erfolgen. Eine neoadjuvante Therapie, bei der die Chemotherapie vor der chirurgischen Intervention eingesetzt wird, um die Tumormasse zu verringern und eine R0-Resektion wahrscheinlicher zu machen, ist derzeit nicht genügend validiert, um als Standardtherapie Einsatz zu finden (25).

Kommt es zu einem Rezidiv des Tumors, führt dies unweigerlich zu einer finalen Situation und der Einleitung einer palliativen Therapie.

1.4 Die Auswirkung des Pankreaskarzinoms auf das Immunsystem

Das Potenzial des Immunsystems zur Registrierung und Auslöschung von entarteten Zellen wurde bereits vor über hundert Jahren erkannt und im Laufe des Jahrhunderts vielfach durch Studien belegt (26).

Sowohl der zelluläre, als auch der humorale Teil des Immunsystems sind an der anti-Tumor-Antwort des Organismus beteiligt (27). Diverse Immunevasionsmechanismen verhindern jedoch eine effektive Immunantwort gegen die Tumorzelle.

Zuerst sei die eingeschränkte Möglichkeit der Erkennung des Tumors aufgrund verminderter Expression des *major-histocompatibility-complex I* (MHC I) auf der Zelloberfläche zu nennen (28). Des Weiteren führt die Expression von nicht-funktionellen FAS-Rezeptoren (FAS) zu einer Resistenz gegen die durch Bindung des Liganden induzierte Apoptose seitens der zytotoxischen T-Lymphozyten und der *natural killer* Zellen (NK Zellen) (29). Weiterhin inhibiert die vermehrte Expression vom *programmed cell death ligand 1* (PD-L1) die Funktion der T Effektorzellen (T_{eff}) nach Bindung an den *programmed cell death receptor 1* (PD-1) und führt zur Erschöpfung der Zellfunktion (30). Die intrazelluläre Expression von Indoleamin 2,3-Dioxygenase (IDO) verstärkt den Abbau des verfügbaren Tryptophans zu L-Kynurenin. Da der Stoffwechsel der T-Lymphozyten zu einem Teil vom Tryptophan abhängig ist, kommt es so zu einer Unterversorgung der Zellen und damit zu Fehlfunktionen oder zur totalen Zelllyse (31).

Zusätzlich unterstützt das *Tumor Microenvironment* (TME), welches aus einer erhöhten Anzahl von immunsupprimierenden Zellen, wie Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM), myeloiden Suppressorzellen (*Myeloid-derived Suppressor Cells* (MDSCs)) und regulatorischen T-Lymphozyten (T_{reg}) besteht, die Tumorprogression. Diese vermehrte Infiltration von supprimierenden Zellen wird durch die unnatürlich hohe Sekretion von Interleukin-10 (IL-10) und *Tumor Growth Factor β* (TGF- β) durch das PDAC selbst hervorgerufen (32, 33). Ein Unterschied in der Zellzahl von TAM und MDSCs ist bereits in den PanIn Lesions zu erkennen, wohingegen die Zahl der T_{reg} erst in einem späteren Stadium lokal ansteigt (34).

Eine positive Korrelation ist ebenfalls zwischen der Zellzahl der TAMs und Tumorwachstum zu erkennen. Die Makrophagen mit monozytischem Ursprung, verändern ihren Phänotyp und damit ihre Funktionalität je nach den vorherrschenden Faktoren in ihrer Umgebung beziehungsweise dem Gewebe in dem sie sich befinden. So führt die Stimulation des durch die Karzinomzellen sezernierten IL-10 und TGF- β zu einer Differenzierung zum antiinflammatorischen M2-Typ (35). Eine erhöhte Anzahl dieses Subtyps ist wiederum mit einer verstärkten Angiogenese, Remodellierung und Verdichtung der extrazellulären Matrix, verstärktem Tumorwachstum sowie Fernmetastasierung assoziiert (36). Dieses Zusammenspiel mündet in frühen Lokalrezidiven und einer erhöhten Mortalität (37). Zudem konnte ein *in vitro* Experiment zeigen, dass naive Makrophagen nach der Kultivierung mit

dem Zellüberstand von pankreatischen Tumorzellen zu M2 Makrophagen differenzieren (38).

Eine erhöhte Anzahl an M1 Makrophagen (proinflammatorisch wirkend) kann hingegen als positiv prognostischer Faktor angesehen werden (39).

Auch die MDSCs sind in einem erhöhten Maße im TME zu finden. Die MDSCs bewirken unter anderem eine Suppression der CD8⁺ und CD4⁺ T-Lymphozyten. Die Suppression erfolgt durch verschiedene Mechanismen, wie z.B. der präferierte Konsum von L-Arginin, welches Lymphozyten für ihre Proteinsynthese benötigen (40) sowie die Erhöhung des freien Radikals Peroxynitrit, das die Präsentation von Tumormolekülen auf MHC I unterbindet und so eine Immunantwort gänzlich verhindert kann (41).

Die T_{reg} treten vermehrt im TME auf und sind physiologisch für eine Inhibierung der überschießenden Immunantwort bzw. der Protektion vor einer Autoimmunität verantwortlich. Die erhöhte Anzahl von T_{reg} im Tumor oder im Blut ist mit einer negativen Prognose verbunden, wie Hiraoka et al. (42) bereits 2006 darlegten. Das an der Zelloberfläche von T_{reg} vorliegende TGF-β kann bei bestehendem Zellkontakt den aktivierenden *killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1 (NKG2D)*-Rezeptor von NK-Zellen inhibieren und so deren zytotoxische Aktivität vermindern (43). Außerdem wird die zytotoxische Wirkung von CD8⁺ T-Lymphozyten behindert, was durch eine verminderte Expression von Granzyme B und einem Anstieg von PD-1 auf der Zelloberfläche angezeigt wird (44–46). Die allgemeine T-lymphozytäre Aktivierung wird zum einen durch die Konkurrenz mit den T_{reg} um das vorliegende Interleukin-2 (IL-2) inhibiert und zum anderen durch den Entzug vom *nuclear Factor of activated T cells* (NFAT) und *nuclear factor `kappa-light-chain-enhancer` of activated B cells* (NFκB), durch die zelluläre Signalwege supprimiert werden (47, 48). Eine indirekte Blockade der T-Effektorzellen findet weiterhin durch ineffiziente Aktivierung der Antigen-präsentierenden Zellen (APC) statt. Das auf den T_{reg} und T-Helferzellen oberflächlich liegende *cytotoxic-T-lymphocyte-associated-protein-4* (CTLA-4) induziert in einem Komplex mit CD80/CD86 die Proteinkinase-C-epsilon, die wiederum eine Proliferation der T-Lymphozyten vermindert (46).

Das detaillierte Wissen zu den einzelnen Bestandteilen und den Interaktionen des Immunsystems unter dem Einfluss einer neoplastischen Erkrankung hat zur

Aktualität hinsichtlich der therapeutischen Möglichkeiten beigetragen, in deren Bereich auch diese Arbeit fällt.

1.5 Immuntherapie

Die Implementierung von immuntherapeutischen Ansätzen in die Behandlung von Krebspatienten kann sowohl eine Fokussierung auf einzelne Moleküle oder Rezeptoren als auch ein generalisierter Ansatz sein.

Als ein Vorteil im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie ist die hohe Spezifität der Immuntherapie zu nennen, die das Auftreten von unerwünschten Wirkungen minimiert, wenngleich sie diese nicht ausschließt (49, 50). Trotzdem sollte einem Neuauftreten oder einem Rezidiv von Autoimmunerkrankungen während und nach der Therapie besondere Beachtung zukommen (51, 52). Die Erfahrungen dazu sind bisher noch nicht ausreichend, um eine determinierte Aussage bezüglich des Risikos treffen zu können (53, 54). Durchaus vielversprechend sind die Ergebnisse nach Behandlungen mit *immune check point* Inhibitoren zu bewerten, die bisher allerdings nur bei Malignomen anderer Entität zu beobachten sind. Dazu gehört die Behandlung mit Antikörpern gegen die Rezeptoren PD-1 und CTLA-4 als auch deren Liganden (55–57). Die Anwendung beim PDAC ist noch nicht erfolgreich (55). Den Schwerpunkt auf das extrazelluläre Milieu mit der Blockierung von CC-Chemokinligand 2 (CCL2) und *C-X-C motif chemokine 2* (CXCL2) Molekülen zu setzen, die durch karzinom-assoziierte Fibroblasten sezerniert werden und immunsupprimierende Zellen anlocken, zeigt keine Verbesserung (58). Ein Fortschritt ist in der Applikation von autolog aktivierten Lymphozyten als Mono-oder Kombinationstherapie mit Gemcitabin zu erkennen (53).

Ein generalisierter Ansatz wäre, wie auch in der vorgelegten Arbeit beschrieben, die Verwendung von Viren mit onkolytischen Fähigkeiten.

Viren in der Therapie gegen Neoplasien einzusetzen bzw. deren onkolytische Wirkung zu nutzen wurde bereits zu Beginn des vergangenen Jahrhunderts versucht. In den 1950er Jahren wurden die ersten erfolgreichen Versuche, unter anderen mit dem *Newcastle disease Virus* (NDV), beschrieben (26). Bis in die 1980er Jahre wurden mehrere klinische Studien vorgenommen, jedoch wurde dieser Ansatz

danach nicht weiter verfolgt. Onkolytische Viren sind definiert durch ihre zumeist selektive Replikation in Tumorzellen und die Fähigkeit diese zu lysieren, gesundes Gewebe dabei aber zu verschonen (59). Zusätzlich dazu kann die immunstimulierende Wirkung eine Tumorreduktion hervorrufen (60). Im Gegensatz dazu stehen andere Therapieansätze, in denen Viren lediglich als Vektor genutzt werden um Medikamente in das Tumorgewebe zu transportieren, die Viren selbst allerdings nicht replizieren. Aktuelle Studien zur experimentellen Therapie verschiedenster Tumorentitäten nutzen unter anderem das Adenovirus (61, 62), Coxsackievirus (63), Herpes Simplex Virus (HSV) (64–67), Masernvirus (68, 69), *Newcastle disease virus* (NDV) (59, 60), Reoviren (70) und vesikuläre Stomatitis Viren (VSV) (71). Diese können sowohl genetisch verändert als auch natürlich zur Anwendung kommen.

1.5.1 NDV als onkolytisches Virus

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich das NDV verwendet, welches zur Familie der Paramyxoviridae gehört und der Erreger der atypischen Geflügelpest ist. NDV hat ein einzelsträngiges Genom negativer Orientierung und kodiert mit ca. 15.200 Nukleotiden für folgende Proteine: das Nukelokapsidprotein (NP), das Phosphoprotein (P), das Matrixprotein (M), das Fusionsprotein (F), die Hämagglutinin und Neuraminidase (HN) und die RNA-abhängige RNA-Polymerase (L) (58). Die verschiedenen Stämme werden nach ihrem cerebralen Pathogenitätsindex (CPI) in Geflügel als velogen (hoch-virulent), mesogen (moderat-virulent) und lentogen (niedrig bis nicht-virulent) eingeteilt (72). In dieser Arbeit wird ausschließlich der mesogene NDV-Stamm R75/98 verwendet.

Ausschlaggebend für die Pathogenität ist die Aminosäuresequenz des Fusionsproteins, welches als inaktive Vorstufe synthetisiert wird (F_0). Die Aktivierung des Proteins erfolgt durch proteolytische Spaltung zwischen den Aminosäuren an Position 116 und 117, wodurch die Proteine F_1 und F_2 entstehen. Die Konsensussequenz von avirulenten und virulenten Virusstämmen ist ein Glutamin-Rest an Position 114. Die Differenzierung ergibt sich durch die erhöhte Anzahl von basischen Aminosäuren dieser Region, die bei virulenten Stämmen an der Spaltstelle vorkommen und substrat-spezifisch für die intrazelluläre Protease Furin sind.

Avirulente Stämme haben höchstens zwei basische Aminosäuren und dadurch eine verminderte Affinität zu der Protease. Daraus folgt die Begrenzung der Infektion (73, 74). Neben aviären Zellen können auch Säugerzellen mit NDV infiziert werden. Die resultierenden Virusnachkommen sind jedoch auf Grund der inkompatiblen Proteasen nicht in der Lage Nachbarzellen zu infizieren.

Die antivirale Immunantwort im Menschen gegen NDV führt zu einer Eliminierung des Virus im Organismus und dabei lediglich zu leichten lokalen (Konjunktivitis, Erythem und Schwellung) und systemischen (Fieber, Diarrhoe, Müdigkeit und Lymphadenopathie) Symptomen (75–77).

Die selektive Bindung von NDV an pankreatische Tumorzellen kann durch deren Überexpression von sialin-reichen Glykoproteinen auf der Zelloberfläche erklärt werden (78). Diese Überexpression führt normalerweise zu einer verminderten Aufnahme von Chemotherapeutika und einer potenten Metastasierung (79, 80), stellt in diesem Fall aber ebenfalls eine präferierte Bindungsstelle des HN dar, welches eine hohe Affinität zu Sialinsäure besitzt (81). Die Spaltung der Sialinsäure führt nach Rezeptorbindung zusätzlich zu einer Freilegung der Tumorantigene und aktiviert die körpereigene Immunabwehr, allem voran die Apoptoseinduktion (82).

Die Ergebnisse der vorangegangenen Arbeiten von Schwaiger et al. im Mausmodell haben gezeigt, dass die einmalig intravenöse Applikation von 4×10^6 PFU/ml des NDV Stammes R75/98 zu einer vollständigen Rückbildung eines implantierten pankreatischen Adenokarzinoms führt (83). Die systemische Infektion mit NDV führte in den entarteten Pankreaszellen zur vermehrten Expression von MHC I, aktivierenden NK-Liganden und der Expression von HN auf der Oberfläche infizierter Zellen. Wodurch wiederum eine fokussierte Zellyse durch natürliche Killerzellen induziert wurde. Eine erhöhte Aktivität von zytotoxischen T-Lymphozyten und T-Helferzellen wurde sowohl intravaskulär als auch in drainierenden Lymphknoten nachgewiesen (84).

1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit

Basierend auf den bisherigen Erkenntnissen soll die vorliegende Arbeit folgende Fragen beantworten:

1. Ist allein die immunstimulierende Wirkung des NDV ausreichend um eine suffiziente Onkolyse einzuleiten?

Im Modell der vorliegenden Arbeit wurden syngene Tumorzellen (DT6606PDA) in das Pankreas von immunkompetenten Mäusen (C75BL/6J) appliziert. Die Tiere entwickelten einen Pankreastumor, der mit autologen, durch NDV-aktivierten Leukozyten behandelt wurde. Darauf folgte die fokussierte Untersuchung der induzierten Immunantwort nach dem Transfer, mit der Fragestellung ob die transferierten Zellen für die Lyse der Tumorzellen verantwortlich sind oder eine Aktivierung der körpereigenen Zellen. Die Frage nach einer Persistenz des Tumors oder einer eventuellen Remission wurde nach 56 Tagen untersucht.

2. Genügt eine *in vitro* Stimulation der PBMCs, die einem tumortragendem Organismus entnommen wurden, um ein progredientes Tumorwachstum zu verhindern?

Die zweite Frage bezieht sich auf die Möglichkeit der klinischen Anwendung, da die Gewinnung von peripheren Leukozytenpopulationen eine simple und alltägliche Praxis darstellt. Es wurde untersucht, ob eine *ex vivo* Stimulation ausreicht, um nach Transfer eine immunstimulatorische Wirkung zu erzielen. Hier war vor allem interessant zu beurteilen, inwieweit die durch die Implantation des Tumors bereits inhibierten PBMCs *ex vivo* erneut stimuliert werden können, um eine Tumorlyse zu erreichen.

3. Ist eine Übertragung des NDV nach erfolgter intravenöser Applikation potentiell möglich und stellt es ein Risiko dar?

Es wäre anzustreben, eine Behandlungsmethode zu finden, bei der eine möglichst effektive Immunstimulation erfolgt und dabei aber nur ein vertretbares Risiko durch die Infektion entsteht. In der dritten Frage wurde deshalb versucht das mögliche Risiko einer Übertragung des Virus nach Applikation und erfolgter Behandlung einzuschätzen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

| | |
|---------------------------|----------------------|
| Ethanol | Roth, Karlsruhe |
| Fetales Kälberserum | FLI, Riems |
| Isopropanol | Merck, Darmstadt |
| Ketamin (100mg/ml) | Pharmanovo, Hannover |
| Methanol | Roth, Karlsruhe |
| Trypanblau | FLI, Riems |
| Xylazin(Rompun) (20mg/ml) | Bayer, Leverkusen |

2.1.2 Kits

| | |
|--|----------------------------|
| RNeasy Mini Kit | Qiagen, Venlo, Niederlande |
| True-Nuclear Transcription Factor Buffer Set | Biozol, Echingen |

2.1.3 Laborgeräte

| | |
|---------------------------------------|-------------------------------------|
| Autoklav Laboklav 195 | SHP Steriltechnik, Detzel Schloß |
| CO ₂ – Inkubator | Sanyo Instruments, Moriguchi, Japan |
| Digitalwaage EMB 500-I | Kern & Sohn, Balingen Frommern |
| Durchflussszytometeer Canto II | BD, Heidelberg |
| Durchflussszytometer Fortessa | BD, Heidelberg |
| Fluoreszenzmikroskop DIAPHOT 300 | Nikon, Tokio, Japan |
| Hamiltonspritze mit Kanüle (27G) | Hamilton Syringe, Reno, USA |
| Lichtmikroskop B3 Professional Series | Motic, Wetzlar |
| Lichtmikroskop PrimoVert | Carl Zeiss AG, Oberkochen |
| Lichtmikroskop Eclipse TS100 | Nikon, Tokio, Japan |
| Multipipette Plus | Eppendorf, Hamburg |

| | |
|---|--|
| pH-Meter PB-11 | Sartorius, Göttingen |
| Pipetten | Eppendorf, Hamburg |
| Pipetus-akku Jet Pro | BRAND, Wertheim |
| Präparierbesteck (Scheren, Pinzetten, Fadenhalter) | ClinicCare, Bremen |
| Sterilwerkband Hera Safe | Thermo Fischer Science Waltham, USA |
| Ultrazentrifuge Avanti J-26XP | Beckman Coulter, Brea, USA |
| Vortexer: Labdancer | VWR |
| Vortex Genie 2 | Scientific Industries, New York, USA |
| Wasserbad Julabo U3 | Bachofer Laboratoriumsgeräte |
| Zentrifuge: Universal 320R | Hettich, Tuttlingen |
| Rotina 380R | Hettich, Tuttlingen |
| Megafuge 1.OR | Heraeus Instruments, Hanau |
| 5415D | Eppendorf, Hamburg |

2.1.4 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Alle Zellkulturmedien und Lösungen wurden von der Zellbank des Friedrich-Loeffler-Instituts, Riems bezogen.

| Verwendung | Grundmedium/Zusätze | Zusätze bei Verwendung |
|---|--|---|
| ATV (Alsever's Trypsin- Versen-Lösung) | NaCl | 8,5 g |
| | KCl | 0,4 g |
| Ablösung von Zellen | Dextrose | 1,0 g |
| | NaHCO ₃ | 0,58 g |
| | Trypsin | 0,5 g |
| | 1:250 | 0,2 g |
| | EDTA | ad 1L |
| | A. Bideest. | |
| Anzucht für QM-9 | <i>minimum essential medium (MEM)+ Hanks' Salze/MEM+</i> | 10% FKS 1% Penicillin/ Streptomycin |

| | | |
|----------------------------------|--|--|
| | Earles's Salze nicht-essentielle Aminosäuren | |
| Anzucht für Tumorzellen | Ham's F12/Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (1:1) | 20% FKS 1% Penicillin/ Streptomycin |
| Leukozyten-Medium | RPMI-1640 | 10% FKS 1% Penicillin/ Streptomycin 0,1% β -Mercaptoethanol |
| Medium für Tumorzellimplantation | RPMI-1640 | |
| Normalmedium | RPMI-1640 | 10% FKS 1% Penicillin/ Streptomycin |
| Medium für CEF Anzucht | ZB 5 | 10% FKS 1% Penicillin/ Streptomycin |

2.1.5 Puffer

| | | |
|--|--|----------------------------|
| Erythrozytenlyse-Puffer(10x) pH 7,4 | NH ₄ Cl | 8,3 g |
| | KHCO ₃ | 1 g |
| | Na ₄ EDTA | 0,37 g |
| | NaOH | Zur pH-Wert Einstellung |
| | A.dest. | Ad 1L |
| FACS-Blut-Puffer | BSA | 0,1 % |
| | EDTA (0.5 M) | 1 ml |
| | NaN ₃ | 0,1 % |
| | Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -freies PBS | Ad 500ml |
| FACS-Puffer | BSA | 0,1 % |
| | NaN ₃ | 0,1 % |
| | Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -freies PBS | Ad 500ml |

| | | |
|---------------------------------------|---|------------------------------|
| Fluoreszenzerhaltungspuffer pH 8,6 | 1.4-Diazobicyclo[2,2.2]-octan | 2,5 g |
| | (DABCO) | 90 ml |
| | Glycerol | 2 mg |
| | Propidiumiodid | 10 ml |
| | PBS | 100 ml |
| | A.dest. | |
| Narkose | Ketamin (100mg/ml) | 870 µ |
| | Xylazin (20 mg/ml) | 650 µ |
| | Isotone NaCl-Lösung | 4480 µ |
| | Dosierung 5µl/g Körpergewicht (KG) (enstpricht: 87mg/kg KG Ketamin und 13mg/kg KG Xylazin) | |
| PBS (10X) | NaCl | 80 g |
| | KCl | 2 g |
| | Na ₂ HPO ₄ | 14,4 g |
| | KH ₂ PO ₄ | 2,4 g |
| | HCl | Zur pH – Wert Einstellung |
| | A. Dest. | Ad 1L |

2.1.6 Programme und Datenbanken

FACS Diva Software v6.2

GraphPad Prism 7,8,9

NCBI Pubmed/BLAST

BD Bioscience, San Jose, USA

GraphPad Software Inc., La Jolla, USA

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|---|
| 96-Well Mikrotiterplatten, Nunc, Maxisorp Flachboden | Nalge Nunc International, Rochester, USA |
| Chirurgisches Nahtmaterial, (Nadel-Faden-Kombination) | Henry Schein Vet, Hamburg |
| FACS Röhrchen | Sarstedt, Nümbrecht |
| Kanülen | Braun, Melsungen Henry Schein Vet, Hamburg |
| Mikrotiterplatten 6-Well, 12-Well, 24- Well, 48-Well, 96-Well | Costar group Washington, USA |
| Petrischalen | Sarstedt, Nümbrecht |
| Pipettenspitzen | Greiner, Kremsmünster, Österreich Starlab, Hamburg |
| Reaktionsgefäß 0,5 ml; 1,5 ml und 2ml | Eppendorf, Hamburg Sarstedt, Nümbrecht |
| Serologische Pipetten | Costar group, Washington, USA |
| Wattestäbchen | dm, Karlsruhe |
| Zellkulturflaschen T25, T75, T175 | Costar group, Washington, USA |
| Zellsieb 70 µm | Fisher Scientific, Waltham, USA |

2.1.8 Viren

NDV R75/98 zur Verfügung gestellt von Dr. Römer-Oberdörfer, FLI, Insel Riems
Paramyxoviridae, mesogen.

2.1.9 Zelllinien

| | |
|-----------|--|
| DT6606PDA | aus dem pankreatischen Adenokarzinom einer Transgenen C57BL/6J Maus, Träger des KRAS ^{G12D} Alleles |
| QM-9 | Die Sublinie der, aus einem 3-MCA-induzierten Fibrosarkom der japanischen Wachtel stammenden, QM-7-Zelllinie |

2.2 Methoden

2.2.1 Tierhaltung und Zucht

Für alle Tierexperimente wurden Männchen im Alter von sechs bis acht Wochen des C57BL/6J Stammes genutzt. Diese wurden unter SPF-Bedingungen in den Tierställen des Friedrich-Loeffler Instituts, Greifswald-Insel Riems gezüchtet und in einem zwölfstündigen hell/-dunkel Zyklus mit dauerhaftem Zugang zum üblichen Laborfutter und Wasser, entsprechend der europäischen Richtlinien für Labortierhaltung, gehalten.

2.2.2 Orthotopes Tumormodell

Den Mäusen wurde eine einwöchige Eingewöhnungsphase an die neue Umgebung gewährt. Im Anschluss begann der Versuch mit der Implantations-OP. Die orthotope Tumoroperation erfolgte nach dem durch Partecke et al. beschriebenen Verfahren (84). Um die Vergleichbarkeit zu den vorangegangenen Experimenten zu gewährleisten wurde die Operation stets von Frau Dr. Schwaiger durchgeführt (83). Die Mäuse wurden mit einer Kombination aus 87 mg/kg Ketamin Hydrochlorid (Ketanest S[®] Pfizer Pharma, Berlin, Deutschland) und 13 mg/kg Xylometazolin Hydrochlorid (Rompun[®] Bayer HealthCare, Berlin, Deutschland) narkotisiert. Anschließend wurde das Abdomen durch einen Transversalschnitt eröffnet und das Pankreas mit einem Wattestäbchen freipräpariert. Eine Lösung mit einem Gesamtvolumen von 20µL aus 10µL Matrigel (Matrigel[™] Basement Membrane

Matrix, BD Bioscience, San José, CA) und 10 μL der Tumorzellsuspension ($2,5 \times 10^5$ Zellen pro 10 μL) wurde in den Pankreaskopf injiziert. Die Injektionsstelle wurde nach Entfernen der Kanüle für einige Sekunden mit dem Wattestäbchen komprimiert, um das Gel erhärten zu lassen und dadurch ein Auslaufen der Zellsuspension zu vermeiden. Danach wurde das Pankreas wieder im Peritoneum platziert und dieses mit Einzelknoten verschlossen. Es folgte eine durchgängige Naht der Bauchdecke. In der Aufwachphase lagen die Mäuse zum Erhalt der Körpertemperatur unter einer Rotlichtlampe und wurden mit 200 μL NaCl intraperitoneal substituiert. Die Mäuse wurden an allen darauffolgenden Tagen auf Komplikationen kontrolliert.

2.2.3 Adoptiver Zelltransfer nach NDV Stimulation

Sechs Tage nach der OP wurde ein Teil der zuvor operierten Gruppe zunächst mit einer Inhalationsnarkose aus Isofluran narkotisiert und mittels zervikaler Dislokation getötet. Es wurden Blut durch Herzpunktion und die Milz entnommen und daraus Splenozyten bzw. *peripheral blood monocyctic cells* (PBMC) isoliert.

Der Versuchsansatz gliederte sich dann in 4 Teilexperimente:

1. Die Splenozyten wurden für 24h mit NDV R75/98 mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 0.5 oder mit Medium inkubiert und am folgenden Tag zweimal mit PBS gewaschen, um das Virus zu entfernen. Zur Therapie wurden dann 200 μL dieser Suspension (2×10^7 Zellen/ml Medium) in die Schwanzvene der tumortragenden Mäuse injiziert. Der Kontrollgruppe wurden auf die gleiche Art 200 μL nicht-stimulierte Splenozyten (2×10^7 Zellen/ml Medium) verabreicht, um den NDV-unabhängigen Effekt des Zelltransfers abzubilden.
2. In der zweiten Versuchsgruppe wurden PBMCs anstatt Splenozyten auf die oben beschriebene Art mit NDV R75/98 aktiviert und ebenfalls mit der gleichen Konzentration tumortragenden Mäusen i.v. verabreicht. Der Kontrollgruppe wurden auf die gleiche Art 200 μL nicht-stimulierte PBMCs injiziert.
3. Die dritte Versuchsgruppe erhielt eine Injektion aus Splenozyten (2×10^7 Zellen/ml Medium), die nach einer 24-stündigen Inkubation mit NDV R75/98 (MOI 0.5) für weitere 48h bei täglichem Waschen mit PBS in Kultur gehalten wurden.

4. Beim Transfer der Immunzellen in den Experimenten 1 und 2 wurden, mit der Zellsuspension ebenfalls $1,312 \times 10^3$ Viruspartikel pro Tier transferiert. Um den möglichen Effekt dieser Virusmenge (ohne Immunzellen) ebenfalls abzubilden, wurde einer Gruppe tumortragender Mäuse diese Virusmenge in 200 μ l PBS i.v. verabreicht.

2.2.4 Explantation von Blut, Organen, Tumor und Herstellung der Zellsuspension

Die Mäuse wurden mittels Isofluran getötet und anschließend wurde entlang der *linea alba* der Bauchraum eröffnet. Zur Blutgewinnung wurde die rechte Herzkammer punktiert und das Blut in einem EDTA Röhrchen aufgefangen. Anschließend wurden Milz, mesenteriale Lymphknoten und zu entsprechenden Zeitpunkten auch das Pankreaskarzinom entnommen. Die Organe wurden bis zur Weiterverarbeitung in PBS gelagert. Im Labor wurde das Blut mit Erythrozyten-Lysepuffer versetzt und nach Sichtkontrolle (bei ausreichender Lyse) mit PBS verdünnt und bei 14.000g zentrifugiert. Die Milz wurde zusammen mit 5 ml PBS in eine Petrischale gegeben und durch ein Metallsieb (Maschenweite 1mm) gerieben. Die entstandene Suspension wurde, mit weiteren 5 ml PBS zur Spülung des Netzes in ein Falcon überführt. Genauso wurde mit den Lymphknoten verfahren, die durch ein Zellsieb (Maschenweite 70 μ m) gerieben wurde. Die durch Zentrifugation gewonnenen Zellpellets wurden anschließend, je nach Versuch, in Leukozytenmedium zur Kultur, in FACS-Puffer oder in Einfriermedium zur Lagerung im flüssigen Stickstoff aufgenommen.

Die entnommenen Tumore wurden zunächst in ihrer Länge, Breite und Höhe gemessen, um das Volumen zu bestimmen. Bei einer Tumorlast mit mehreren Loci wurde das Volumen einzeln bestimmt und anschließend addiert.

Nach Bestimmung des Volumens wurden die Tumore durch ein Zellsieb gerieben und in ein Falcon aufgenommen. Die eine Hälfte der Zellsuspension wurde mit FACS-Puffer für zehn Minuten bei 300g zentrifugiert und anschließend für die Analyse in der Durchflusszytometrie vorbereitet. Die andere Hälfte wurde in Normalmedium mit 20% FKS, sowie 1% Penicillin und Streptomycin aufgenommen und in einer Zellkulturflasche ausgesät. Bei erfolgreichem Anwachsen wurde das FKS auf 10% reduziert.

2.2.5 Zelllinie, Zellkultur und *in vitro* Infektion

Die verwendeten DT6606PDA Zellen wurden ursprünglich von einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas einer transgenen C57BL/6 Maus mit KRAS^{D12G} Allel²² isoliert. Die Zellen wurden in RPI-1640 Medium mit 10% FKS (fetales Kälberserum) und 1% Antibiotika (Penicillin-Streptomycin) in einem befeuchteten Brutschrank, bei 37°C mit 5% CO₂ kultiviert. Die gleichmäßig wachsenden und adhärenen Zellen wurden zweimalig passagiert, bevor sie in der durchflusszytometrischen Analyse genutzt wurden. Für die Bestimmung der unter 2.2.6 genannten Oberflächenmarker wurden die reisolierten Tumorzellen mit NDV R75/98, mit einer MOI von 0.5 infiziert und für 24h kultiviert. Die Kontrollgruppe wurde unter gleichen Bedingungen im Medium gehalten.

2.2.6 Durchflusszytometrische Analyse

Nach Herstellung einer Zellsuspension aus soliden Organen und Blut (s. Punkt 2.2.4) wurden die Zellen zentrifugiert, in FACS-Puffer aufgenommen und mit Antikörpern gefärbt, die in den folgenden Tabellen aufgeführt werden.

Die reisolierten Tumorzellen aus den Gruppen des adoptiven Zelltransfers von NDV-stimulierten Splenozyten und der Kontrollgruppe (Transfer von unstimulierten Splenozyten) wurden, wie zuvor beschrieben, in Kultur gebracht und mit NDV75/98 stimuliert. Zur Vergleichbarkeit wurden Zellen ohne Stimulation untersucht. 72 Stunden nach der Stimulation wurden die Zellen aus der Kultur entnommen, zentrifugiert und in FACS Puffer resuspendiert. Eine Reaktion der Tumorzellen durch Veränderung der Oberflächenmarker wurde durch folgende fluoreszierende Antikörper nachgewiesen:

Tabelle 1: FACS Färbung der Reisolate

| | Antigen | Host | Konjugat | Verdünnung | Klon | Hersteller |
|---|----------------|-------|----------|------------|-------------------|-------------|
| A | MHC I | mouse | Biotin | 1:100 | 34-1-2S | ebioscience |
| | Rae-1 δ | mouse | PE | 1:1500 | Charlotte d.23 | Biolegend |
| | Streptavidin | | APC | 1:2000 | | dianova |
| B | PD-L | rat | Biotin | 1:300 | 10F.9G2 | Biolegend |
| | PD-1 | rat | PeCy7 | 1:250 | RMP1- 30 | Biolegend |
| | Streptavidin | | APC | 1:2000 | | dianova |

Außerdem wurden die mesenterialen Lymphknoten, die den Mäusen an Tag -1, Tag 7 und Tag 56 entnommen wurden, auf die Veränderung der Frequenz und der Aktivität der vorliegenden Lymphozyten untersucht. Tag -1 ist dabei als der Zeitpunkt vor dem Transfer zu beschreiben, an dem Zellen für die *in vitro* Stimulation entnommen werden. Gleichzeitig können diese den Ausgangspunkt des Immunstatus vor der Behandlung darstellen.

Tabelle 2: FACS Färbung der mesenterialen Lymphknoten

| Antigen | Host | Konjugat | Verdünnung | Klon | Hersteller |
|--------------|-------|-------------|-----------------|---------|-------------|
| PD-L1 | rat | Biotin | 1:300 | 10F.9G2 | Biolegend |
| Streptavidin | | BV510 | 1:1000 | | Biolegend |
| CD4 | rat | APCFluor780 | 1:100 | GK1.5 | ebioscience |
| CD8 | mouse | BV421 | 1:100 | 53-6.7 | ebioscience |
| NK1.1 | mouse | PE | 1:100 | PK136 | ebioscience |
| PD-1 | rat | PeCy7 | 1:100 | RMP1-30 | Biolegend |
| FoxP3 | rat | APCFluor647 | 2 μ l/ test | MF-14 | Biolegend |

2.2.7 Anzucht, Titration und Nachweis von R75/98

Zunächst wurde eine Suspension aus *Chicken Embryonic Fibroblasts* (CEF), zur Verfügung gestellt von Dr. El-Sayed M. Abd El-Whab, in T175 Zellflaschen bei einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml in ZB 5 mit 10% FKS und 1% P/S ausgesäht und für 24h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen bei Adhärenz mit NDV R75/98 mit einer MOI von 0.1 beimpft. Nach 40-minütiger Absorptionszeit, bei 37°C und 5% CO₂, mit PBS einmalig gewaschen und erneut mit ZB 5 Medium beschichtet. Die Inkubation zur Anzucht des Virus betrug 48h bei 37°C und 5% CO₂. Zur Virusernte wurden die Überstände in 50ml Falcons gegeben und für 5 Minuten bei 2.500g zentrifugiert. Die geklärten Überstände wurden in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und diese zur Gewinnung der Virionen bei 32.000g für 10 Minuten zentrifugiert. Die Sedimente wurden in PBS aufgenommen und gepoolt, zusätzlich wurden zur Erfolgskontrolle Proben aus Überstand und Sediment für einen Hämagglutinationstest genommen.

Die Titration des gewonnenen Virus erfolgte auf QM-9 Zellen, welche in 96-Well Mikrotitrationsplatten (F-Form) bei einer Zellzahl von 7×10^5 Zellen/ml in ZB28 Medium mit 5% FKS und 1% P/S ausgesäht wurden. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde die Virussuspension nach Entfernen des Mediums mit einem Logarithmus von 10 in die Verdünnungsreihen aufgetragen. Die Titrationsplatten wurden zur Analyse zuerst mit einem Aceton-Methanol-Gemisch (1:1) fixiert, darauf folgend mit einem primären monoklonalen Antikörper gegen NP und einem sekundären Antikörper (Konjugat: Dylight, Host: goat, Molekül: mouse IgG, Verdünnung 1:800, von danova) gefärbt und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Dieser Färbevorgang wurde auch zum Nachweis der Viruslast der *in vitro* stimulierten Splenozyten genutzt.

Die Berechnung des Virusgehaltes erfolgte nach dem Verfahren von *Spearmann/Kerber* über die Berechnung der KID₅₀/ 100µl (85).

Tabelle 3: Zellkulturansätze zur Testung der Persistenz von Viruspartikeln in einer Splenozytensuspension

| | | |
|----|--|---|
| 1. | Inkubation von Splenozyten mit NDV für 24h, darauffolgend Waschen mit PBS | jeweils 4x8 Kavitäten mit Probenverarbeitung nach: 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h, 168h, 192h |
| 2. | Inkubation von Splenozyten mit NDV für 24h, ohne folgendes Waschen mit PBS | |
| 3. | Inkubation von Splenozyten mit NDV für 24h, danach tägliches waschen mit PBS | |
| 4. | Inkubation von Splenozyten und DT660PDA Zellen mit NDV für 24h, darauffolgend waschen mit PBS und Rückführung zu den adhärennten Tumorzellen | |

Zu jedem Zeitpunkt wurden die Zellsuspension mittels Zentrifugation in Überstand und Zellpellet getrennt und zur späteren Weiterverarbeitung getrennt eingefroren.

Nachdem alle Proben gesammelt waren, wurden sie nach 10 Gefrier-Tau Zyklen sowohl auf DT6606PDA als auch auf QM9-Zellen titriert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen nach dem oben genannten Protokoll gefärbt und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

2.2.8 Statistische Auswertung

Zu Analyse der Statistik von Versuchen und deren Darstellung, sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* wurde GraphPad Prism (Version 6.0 und 9.0) verwendet. Aus Tierversuchen gewonnene Daten wurden als einzelne Dotplots dargestellt, wobei der Mittelwert der jeweiligen Gruppen als horizontale Linie gekennzeichnet ist.

3. Ergebnisse

3.1 Adoptiver Zelltransfer nach NDV 75/98 Stimulation

Es wurde untersucht, ob die Immunzellen von tumortragenden Mäusen nach einer *ex vivo* NDV-Stimulation und Re-Transfer Pankreastumorzellen *in vivo* eliminieren. Dafür wurde ein orthotopes Tumormodell in der Maus verwendet (Abbildung 1).

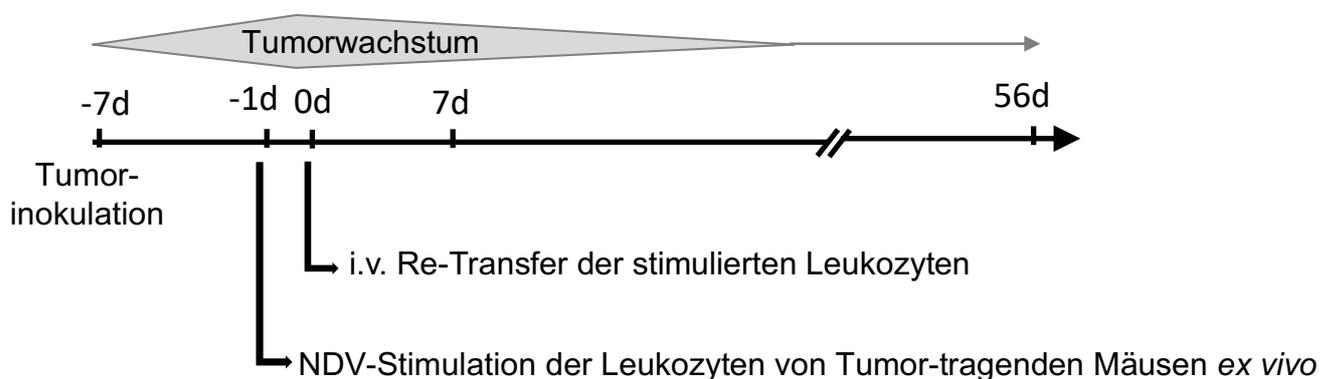


Abbildung 1: Der schematisch dargestellte Versuchsaufbau. Tag -7 wurden die DT6606PDA Tumorzellen intrapankreatisch appliziert. An Tag -1 wurden tumortragenden Mäusen Leukozyten entnommen und mit NDV *in vitro* stimuliert. Am Folgetag 0 wurden diese stimulierten Leukozyten den tumortragenden Mäusen erneut appliziert. Sektion der Tiere an Tag 7 und Tag 56.

Bereits sieben Tage nach Transfer der NDV-stimulierten Immunzellen war ein Unterschied in der Tumormasse im Vergleich zu den Kontrollierten, die naive Splenozyten erhielten, festzustellen. Die Behandlung der Mäuse mit stimulierten peripheren Leukozyten hatte dabei einen marginal stärkeren Effekt als die Behandlung mit stimulierten Splenozyten (Abbildung 2). Nach 56 Tagen war in nahezu allen Mäusen, denen NDV-stimulierte Leukozyten transferiert wurden, makroskopisch ein kompletter Rückgang der Tumormasse zu detektieren. Die Tumorumfänge der Kontrollgruppe waren zwar variabel, jedoch stets deutlich größer.

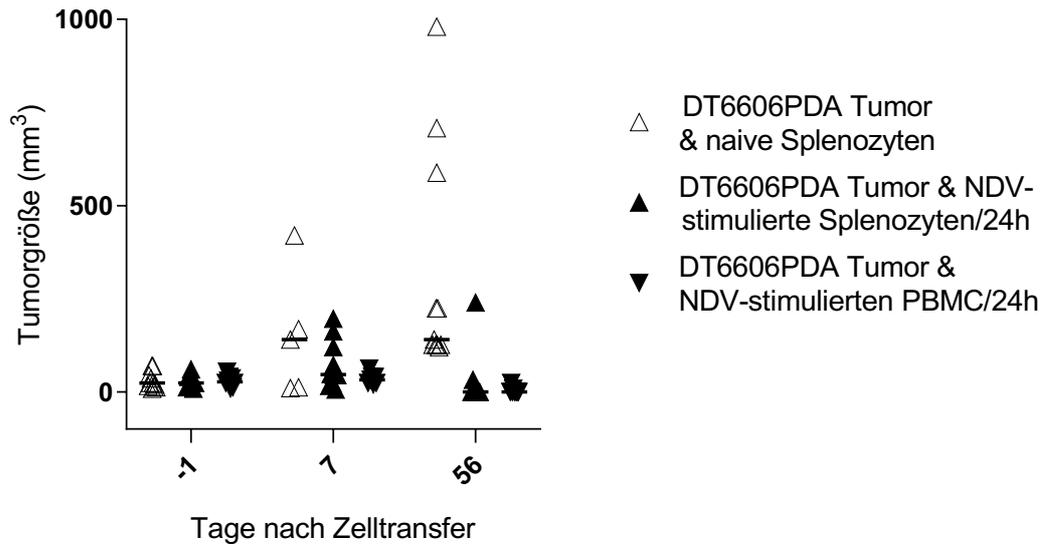


Abbildung 2: Tumorzellen nach Transfer von naiven oder NDV-stimulierten Splenozyten. Sieben Tage nach Tumorimplantation wurden Immuzellen transferiert: 1) naive Splenozyten (weiße Dreiecke); 2) NDV-stimulierte Splenozyten/24h (schwarze Dreiecke) und 3) NDV-stimulierte PBMCs/24h (schwarze Dreiecke, gedreht um 180°). Sieben und 56 Tage nach Zelltransfer wurden 4-8 Tiere pro Gruppe euthanasiert und das Tumorzellen nach Ermittlung der Länge, Breite und Höhe des Tumor errechnet. Angegeben ist das Tumorzellen in mm³.

Um zu klären, ob eine veränderte Inokulationszeit der Leukozyten weiterhin eine effektive Stimulation und folglich auch Onkolyse nach sich zieht, wurde das Versuchsprotokoll abgeändert. Hinsichtlich der Praktikabilität im klinischen Alltag ist ein etwas größeres Zeitfenster häufig von Vorteil. Eine Ausdehnung der Kulturzeit von 24 auf 72 Stunden zeigte weiterhin eine Aktivität der Leukozyten sowie Regression des Tumorzellen

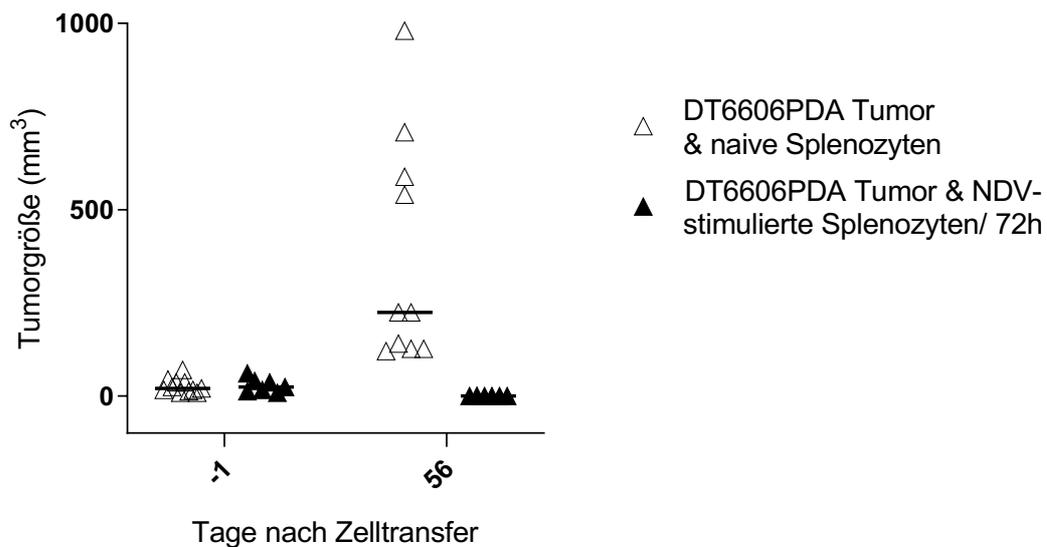


Abbildung 3: Tumorzellen nach Transfer von naiven oder NDV-stimulierten Splenozyten mit verlängerter Kulturhaltung nach Inkubation. Sieben Tage nach Tumorimplantation wurde zwei Gruppen Immuzellen transferiert: 1) naive Splenozyten (zusammengefasst in Kontrolle, weiße Dreiecke), 2) 72- stündige NDV-Stimulation von Splenozyten (schwarze Dreiecke). 56 Tage nach Zelltransfer wurden 4-8 Tiere pro Gruppe euthanasiert und das Tumorzellen nach Ermittlung der Länge, Breite und Höhe des Tumor errechnet. Angegeben ist das Tumorzellen in mm³.

3.2 Virusnachweis in Leukozytenkultur

Die Behandlung eines Patienten mit einem mesogenen Virusstamm wäre mit einer strengen räumlichen Isolation und thermischer Aufbereitung jeglicher Ausscheidungen verbunden. Für eine Simplifizierung der Therapie und um ausschließen zu können, dass übertragene Viruspartikel die Onkolyse hervorriefen, wurde die applizierte Leukozytensuspension analysiert. Diese Suspension wurde sowohl auf der Tumorzelllinie wie auch auf einer aviären Zelllinie (QM9) getestet. Dadurch konnte dargestellt werden, zu welchem Zeitpunkt die Viruspartikel noch ein Fusionsprotein enthalten, um sich damit in den Wirtszellen nicht nur einzunisten, sondern auch zu reproduzieren.

Mit den vier folgenden Ansätzen wurden verschiedene Möglichkeiten der Inokulation nachempfunden.

Tabelle 4: Persistenz der Reproduktionsfähigkeit von NDV in Tumorzellen und QM9: Die Ansätze sind nach der Zusammensetzung der Zellen im Medium, sowie der Anzahl und der Wiederholung der Waschschrte sortiert. Dem wurden die Ergebnisse der Titration, die die Menge des replizierfähigem Virus zeigt, zugeteilt und nach Wirtszelle und vergangener Zeit nach der Inokulation aufgetragen. Die Titrationsergebnisse sind nach der Auswertung im Durchschnitt bestimmt worden, da eine wiederholte Durchführung des Experiments stattgefunden hat. N.a. entspricht hier nicht nachweisbarer Synzytien.

| | Virusinokulation in Kultur: | Waschschrte | | Intrazellulärer Nachweis von replizierendem Virus durch Titration | | | | |
|---|--|-------------|-----------|---|-------------|------------|-------------|------------|
| | | Anzahl | Intervall | | 24h | 48h | 72h | 144h |
| 1 | Splenozyten-suspension | 1 | - | DT6606 | $10^{1,75}$ | $10^{0,5}$ | n.a. | n.a. |
| | | | | PDA | $10^{2,25}$ | 10^2 | $10^{1,75}$ | 10^1 |
| 2 | Splenozyten-suspension | 0 | - | DT6606 | $10^{2,75}$ | $10^{2,6}$ | $10^{2,5}$ | $10^{1,5}$ |
| | | | | PDA | $10^{3,75}$ | $10^{3,6}$ | $10^{3,75}$ | $10^{2,5}$ |
| 3 | Splenozyten-suspension | 1-6 | täglich | DT6606 | $10^{0,5}$ | $10^{1,5}$ | $10^{0,5}$ | $10^{0,5}$ |
| | | | | PDA | 10^1 | $10^{1,5}$ | 10^2 | 10^1 |
| 4 | Splenozyten-suspension auf adhärenen Tumorzellen | 1 | - | DT6606 | $10^{1,6}$ | $10^{2,1}$ | $10^{1,5}$ | 10^2 |
| | | | | PDA | $10^{2,9}$ | $10^{2,8}$ | $10^{2,5}$ | $10^{2,3}$ |

In der Tabelle 4 ist an der Position 1 die Splenozytensuspension eingetragen, die nach der Virusinokulation lediglich einmal gewaschen wurde. Ein intrazellulärer Nachweis von NDV erfolgte in den DT6606PDA Tumorzellen nach 24, sowie 48 Stunden und konnte nach 72 Stunden auch nach mehrfacher Wiederholung nicht mehr nachgewiesen werden. Die Menge der nachweisbaren Viruspartikel verringerte sich ebenso auf dem aviären QM9 Zellen, persistierte allerdings auch nach 144 Stunden. An der Position 2 ist die Splenozytensuspension aufgetragen, die nach der Inokulation mit NDV ohne einen zusätzlichen Waschschrift in Kultur gehalten wurde. Eine Persistenz der intrazellulären Viruspartikel ist sowohl auf Tumorzellen als auch auf aviären Zellen zu erkennen gewesen, in diesem Ansatz fand die geringste Verminderung der Viruspartikel statt. Die Splenozytensuspension an der Position 3 ist täglich gewaschen worden und auch hier zeigt sich eine Persistenz der nachweisbaren Viruspartikel sowohl auf den Tumorzellen als auch auf der aviären Zelllinie, die im Gegensatz zur zweiten Position jedoch die Hälfte bis ein Viertel dessen ausmacht. An Position 4 sind die Titrationsergebnisse der Splenozytensuspension, die mit adhärennten Tumorzellen in Kokultur gehalten wurde. Es wurde ebenso wie bei der Ersten lediglich ein Waschschrift vorgenommen, trotzdem kam es zu einer Persistenz des Virus. In diesem Ansatz sind die Titrationsergebnisse bis 144h nach der Inokulation relativ stabil und nur geringen Schwankungen unterworfen. Da der Ansatz an Position 1 nach mehrfacher Wiederholung zeigte, dass kein Befall der murinen Zellen nach 72h und 144h stattfand, wurde der Versuch nicht darüber hinaus fortgeführt.

3.3 Infektion mit NDV 75/98

Dadurch dass eine Übertragung von Virus gemeinsam mit der Leukozytensuspension festgestellt werden konnte, stellte sich die Frage ob diese Virusmenge ausreichend für eine Virolyse war. Deshalb wurde eine weitere Behandlung der tumortragenden Mäuse mit einer Virusmenge von $1,312 \times 10^3$ PFU/Maus zur Kontrolle vorgenommen, die sich aus der Titration der übertragenen Leukozytensuspension errechnen ließ.

In Abbildung 4 ist zu erkennen, dass bei der Gruppe, die stimulierte Splenozyten 72 Stunden nach der NDV Inokulation erhielt, eine pankreatische Tumormasse makroskopisch nicht vorlag. Im Vergleich dazu, konnte die applizierte Virusmenge von $1,312 \times 10^3$ PFU in den jeweiligen Tieren die lokale Ausbreitung des Tumors nicht verhindern.

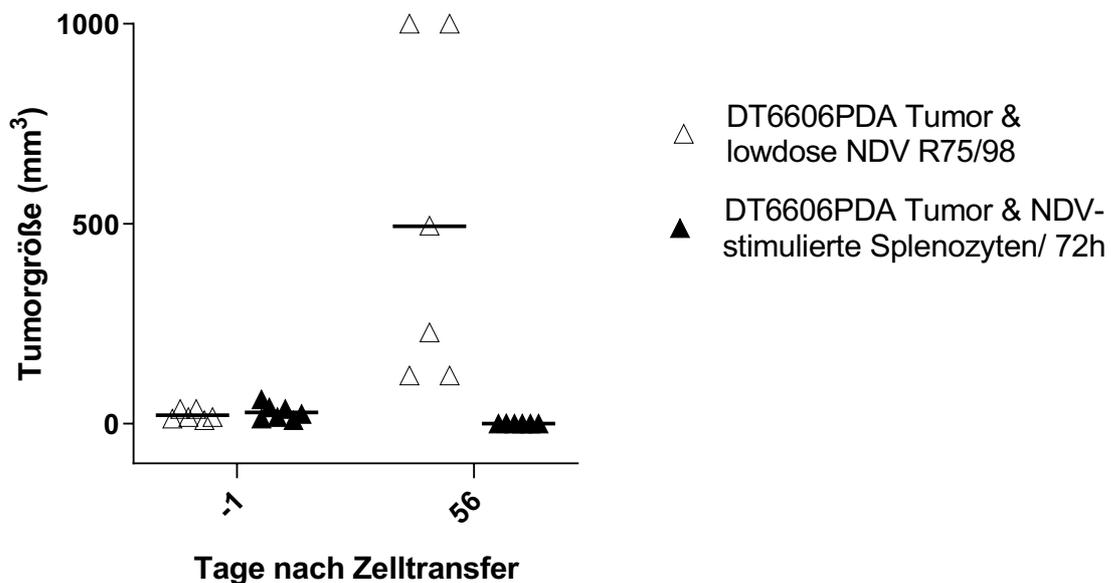


Abbildung 4: Tumorzellen nach direkter Virusinjektion und Splenozytentransfer. Sieben Tage nach Tumorimplantation wurden entweder Viruspartikel oder Immunzellen transferiert: 1) $1,312 \times 10^3$ PFU NDV (weiße Dreiecke), 2) 72- stündige NDV-Stimulation von Splenozyten (schwarze Dreiecke). 56 Tage nach Zelltransfer wurden 4-8 Tiere pro Gruppe euthanasiert und das Tumorzellen nach Ermittlung der Länge, Breite und Höhe des Tumors errechnet. Angegeben ist das Tumorzellen in mm^3 .

3.4 Ergebnisse der Durchflusszytometrie

Nach abgeschlossener Behandlung und erfolgreichem Rückgang der Tumormasse bleibt die Frage einer möglichen Restaktivität des Residualtumors. Diese muss hinsichtlich einer potenziellen Anschlussbehandlung und Abschätzung der Überlebensprognose diskutiert werden.

3.4.1 Veränderung der Oberflächenmarker der DT6606PDA Tumorzellen und der Reisolat

Um die Mechanismen, die nach einer Behandlung zu einem Tumorrückgang führen, besser nachzuvollziehen, wurden die originalen DT6606PDA Zellen in Bezug auf ihre Oberflächenmarker mit den reisolierten Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie verglichen. In der Tabelle 5 sind die Volumina der Residualtumoren den reisolierten Tumorzelllinien zugeordnet.

Tabelle 5 Tumorzellvolumen bei Explantation von verschiedenen Mäusen. Nach der Tumorimplantation wurden drei Gruppen Immunzellen transferiert, diese waren entweder naive PBMC oder Splenozyten oder NDV-stimulierte Splenozyten oder PBMC. Sieben und 56 Tage nach Zelltransfer wurden 4-8 Tiere pro Gruppe euthanasiert und der Tumor explantiert. Angegeben ist das Tumorzellvolumen in mm³. Aus diesen Tumoren wurde in vitro erfolgreich eine Kultur etabliert. RiS: Reisolat-stimuliert; Tumor-Reisolat der Gruppe, der stimulierte Immunzellen transferiert wurde, RiK: Reisolat-Kontrolle; Tumor-Reisolat der Gruppe, der naive Immunzellen transferiert wurde. Nummeriert wurden die Tumore bei Entnahme nach der Versuchstiernummer.

| | |
|-------|---------------------|
| RiS 1 | 540 mm ³ |
| RiS 3 | 240 mm ³ |
| RiS 4 | 32 mm ³ |
| RiS 6 | 12 mm ³ |
| RiK 1 | 710 mm ³ |

Der PD-Ligand ist in den Tumorzellen der Kontrollgruppe (RiK) mit 12,5% fünfmal erhöht im Vergleich mit den Tumorzellen, die aus den Mäusen isoliert wurden, die mit Splenozyten behandelt wurden (RiS 1,3,4 und 6), bei denen durchschnittlich 2,6% positiv waren (RiS 1:3,4%; RiS 3:5,3%; RiS 4:1,6%; RiS 6:0,1%).

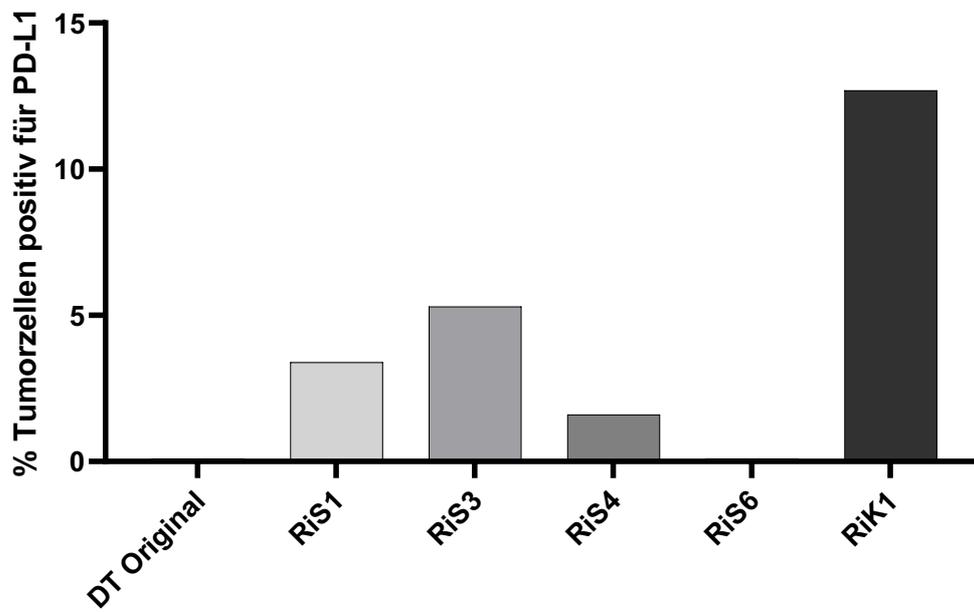


Abbildung 5: Expression von PD-L1 auf der Zelloberfläche. *Sieben Tage nach Tumorimplantation wurden drei Gruppen Immunzellen transferiert: 1) naive PBMC oder Splenozyten, 2) NDV-stimulierte Splenozyten und 3) NDV-stimulierte PBMC. Sieben und 56 Tage nach Zelltransfer wurden 4-8 Tiere pro Gruppe euthanasiert, der Tumor explantiert, vereinzelt und durchflusszytometrisch analysiert. Angegeben ist die Frequenz der Zellen mit PD-L1 auf der Zelloberfläche in Prozent.*

Ebenso wurde die Expression von MHC I auf der Oberfläche untersucht (Abbildung 6), da bekannt ist, dass sich diese auch nach der Infektion mit NDV verändert. Die Expression des MHC I Rezeptor stieg bei den Reisolaten RiS 1 auf 16,4%, bei RiS 4 auf 21,5% und bei RiS3 auf 56,9% an. Bei RiS6 und RiK, mit jeweils 0,1%, ist eine Abnahme der Frequenz MHC I positiver Zellen gegenüber der Originalpopulation mit 3,1% zu erkennen.

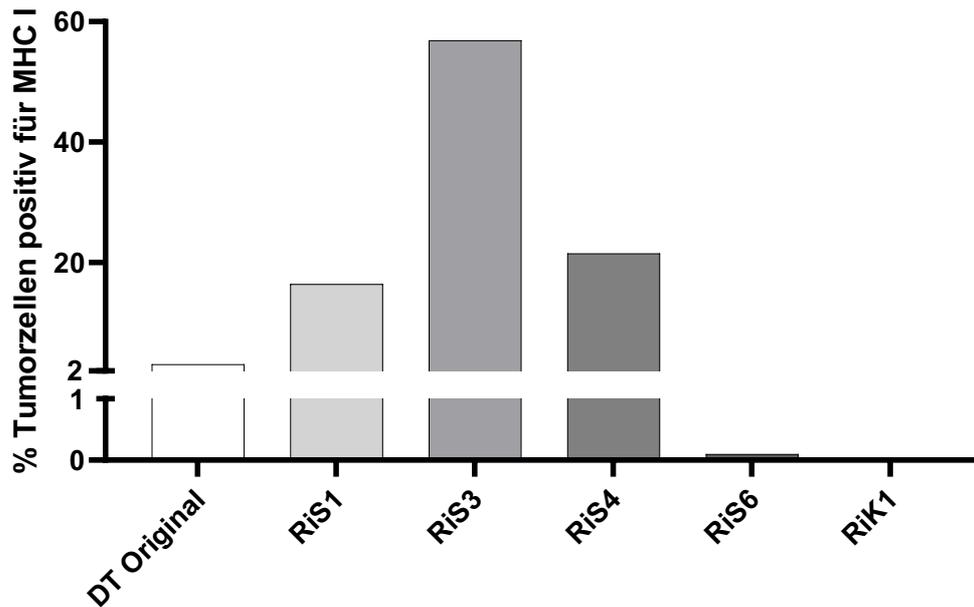


Abbildung 6: Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche. Sieben Tage nach Tumorimplantation wurden drei Gruppen Immunzellen transferiert: 1) naive PBMC oder Splenozyten, 2) NDV-stimulierte Splenozyten. 56 Tage nach Zelltransfer wurden 4-8 Tiere pro Gruppe euthanasiert, der Tumor explantiert, vereinzelt und durchflusszytometrisch analysiert. Angegeben ist die Frequenz der Zellen, die MHC I auf der Oberfläche der reisolierten Tumorzellen exprimieren in Prozent.

3.4.2 Analyse der Lymphknoten nach Entnahme an Tag-1, 7 und Tag 56

Neben der Aufarbeitung der Tumorzellen ist es zusätzlich interessant die Qualität der Immunstimulation im Empfänger zu beurteilen. Dafür wurden die mesenterialen Lymphknoten von Tag -1, Tag 7 und Tag 56 der zwei Versuchgruppen durchflusszytometrisch untersucht und auch mit der Zellaktivität der vorliegenden Leukozyten in den mesenterialen Lymphknoten von naiven Mäusen verglichen.

Von der Abbildung 7 ist abzulesen, dass die Streuung der Frequenz der T-Lymphozyten innerhalb der Gruppen über die Beobachtungsdauer nach der Behandlung mit NDV-stimulierten Leukozyten größer wird und tendenziell in den mesenterialen Lymphknoten zunehmend eine Halbierung der Frequenz abzulesen ist. Unterschiede zwischen den Gruppen sind nicht zu detektieren.

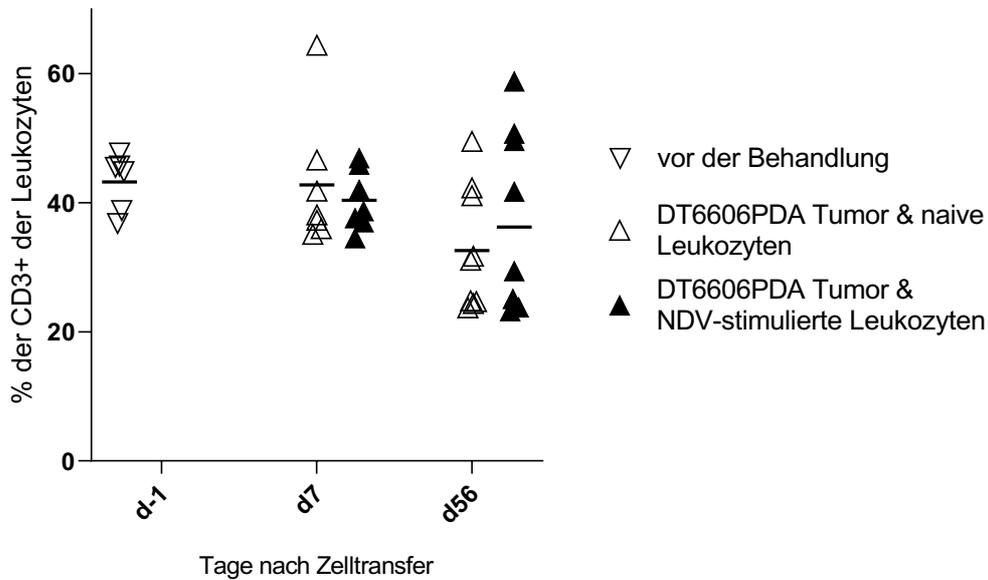


Abbildung 7: Prozentualer Anteil von CD3 positiven Leukozyten im mesenterialen Lymphknoten. Sieben Tage nach Tumorimplantation wurden drei Gruppen Immunzellen transferiert: 1) naive PBMC oder Splenozyten (weiße Dreiecke) oder 2) NDV-stimulierte Splenozyten oder PBMC (schwarze Dreiecke). Sieben und 56 Tage nach Zelltransfer wurden 4-8 Tiere pro Gruppe euthanasiert. Die mesenterialen Lymphknoten wurden explantiert, vereinzelt und durchflusszytometrisch untersucht. Angegeben ist die Frequenz CD3 positiven Leukozyten, die dadurch als T-Lymphozyten erkennbar sind.

Die Frequenz der natürlichen Killer Zellen nimmt in beiden Versuchsgruppen nach Behandlung geringfügig zu, übersteigt jedoch nicht den Wert von 1% und zeigt auch keine Unterschiede zwischen den Behandlungen.

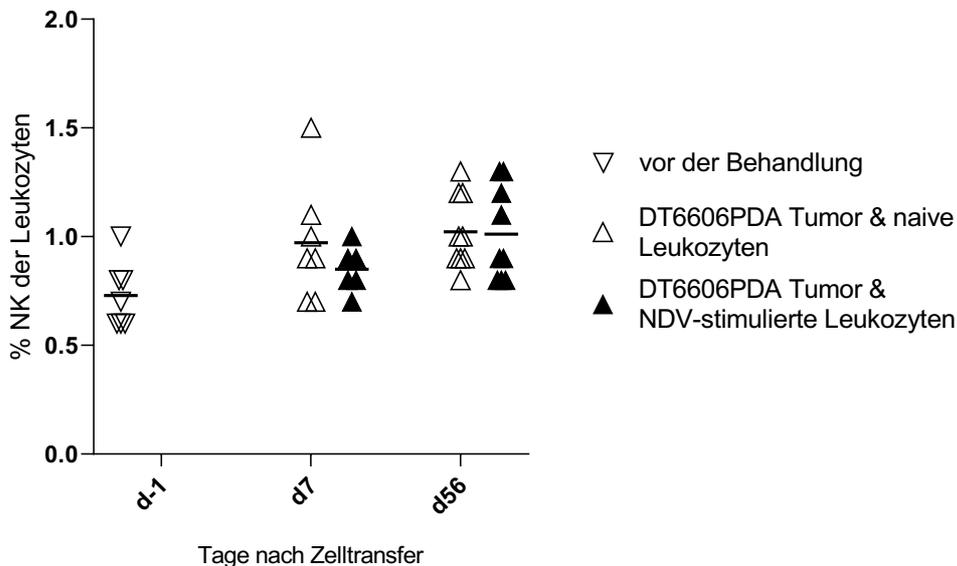


Abbildung 8: Prozentualer Anteil NK Zellen der Leukozyten im Lymphknoten. Sieben Tage nach Tumorimplantation wurde drei Gruppen Immunzellen transferiert: 1) naive PBMC oder Splenozyten (weiße Dreiecke) oder 2) NDV-stimulierte Splenozyten oder PBMC (schwarze Dreiecke). Sieben und 56 Tage nach Zelltransfer wurden 4-8 Tiere pro Gruppe euthanasiert. Die mesenterialen Lymphknoten wurden explantiert, vereinzelt und durchflusszytometrisch untersucht. Angegeben ist die Frequenz der NK-Zellen.

In Abbildung 9 ist zu erkennen, dass die Frequenz FoxP3 exprimierender T-Lymphozyten an Tag -1, welcher nach der einwöchigen Tumorentwicklung gesetzt ist, in der Analyse den größten Umfang hat (Mittel: 27,93), aber auch bis 59.1% ansteigen kann. Nach dem Transfer von stimulierten Splenozyten vermindert sich die Heterogenität innerhalb der Gruppen hinsichtlich der Frequenz der FoxP3-positiven T-Lymphozyten und sinkt durch die Behandlung mit naiven Leukozyten auf 11,2 % ($\pm 4,47$) bzw. 9,35% ($\pm 3,05$) nach Transfer der NDV-stimulierten Leukozyten ab. Bis zum Tag 56 findet eine weitere Abnahme in der Varianz der Frequenzen statt, wobei sich die Mittel nicht mehr verändern.

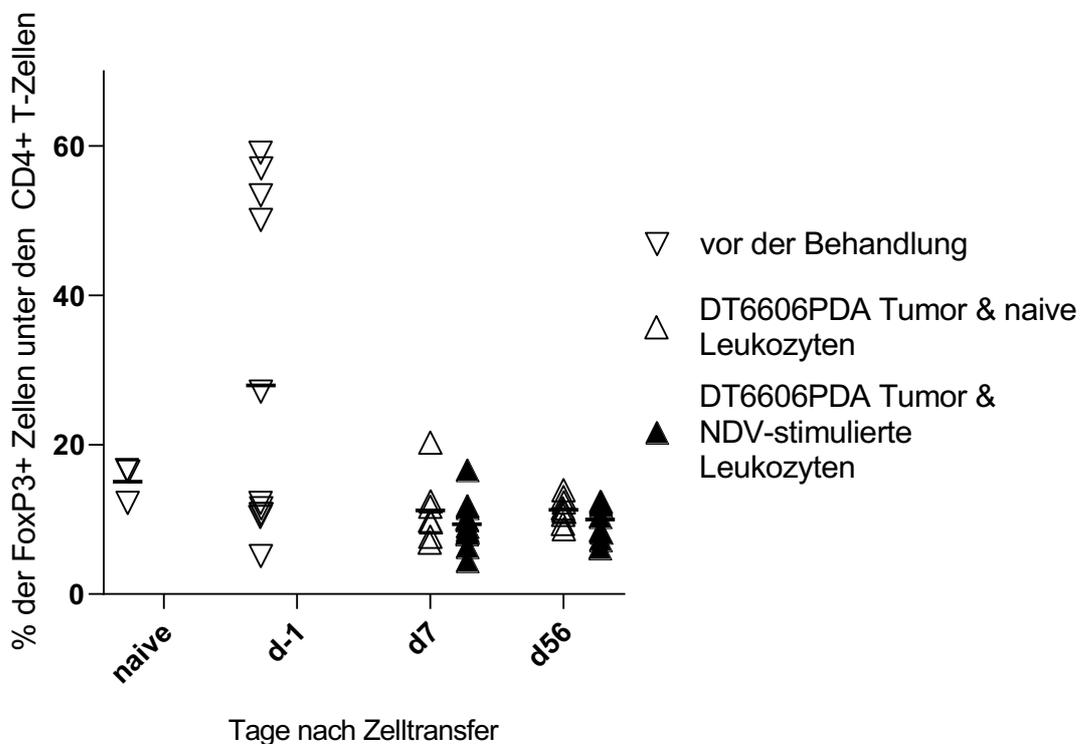


Abbildung 9: prozentualer Anteil von FoxP3 positiven CD3+/CD4+ Leukozyten. *Sieben Tage nach Tumorentimplantation wurde drei Gruppen Immunzellen transferiert: 1) naive PBMC oder Splenozyten (weiße Dreiecke) oder 2) NDV-stimulierte Splenozyten oder PBMC (schwarze Dreiecke). Sieben und 56 Tage nach Zelltransfer wurden 4-8 Tiere pro Gruppe euthanasiert und der Tumor explantiert. Die mesenterialen Lymphknoten wurden nachträglich durchflusszytometrisch untersucht. Angegeben ist die Frequenz der Treg, erkennbar am positiven FoxP3-Signal innerhalb der CD3+/CD4+ Zellen.*

4. Diskussion

Das Pankreaskarzinom gehört zu den fünf Krebserkrankungen mit der geringsten Lebenserwartung, denn durch die späte Symptomentwicklung und die frühe Metastasierung ist eine kurative Therapie häufig nicht möglich. Im Bereich der Chemotherapeutika oder bisherigen Immuntherapie ist außerdem noch kein Ansatz gefunden, der eine zufriedenstellende Senkung der Morbidität oder Mortalität erreicht. Daher wurde in der vorliegenden Studie die Möglichkeit untersucht, die schon mehrfach erprobte Methode der Immuntherapie mittels eines Virus (siehe Absatz 1.6 (59–71) moderner und sicherer zu machen. Zum einen war die Überlegung hinter dem Ansatz des adaptiven Transfers von NDV-stimulierten Leukozyten den mit einem Pankreaskarzinom belasteten Organismus nicht direkt mit einem Pathogen zu konfrontieren und zum anderen die Verwendung eines als S2-klassifizierten Virus in einem Krankenhaus zu minimieren.

Ein weiterer Vorteil dieser Herangehensweise wäre zweifellos, dass die eventuelle Neutralisation der Viruspartikel durch zelluläre oder humorale Bestandteile des angeborenen Immunsystems bei einer Zweitbehandlung hier nicht berücksichtigt werden müssen. Denn diese Mechanismen sollten bei intravenös applizierten Viren in der Tumorthherapie berücksichtigt und wiederum medikamentös behandelt werden, um eine suffiziente Behandlung zu ermöglichen (85, 86). Auch Antikörper, die aus einer der Standardimpfungen oder einem früheren Kontakt resultieren könnten, sollten bei einer Therapie mit intravenös oder intratumoral applizierten onkolytischen Viren nicht vernachlässigt werden. Eine verminderte Wirkung oder gar Ineffektivität wäre nicht ausgeschlossen (66–69, 87). Derlei Komplikationen sind bei dieser Methode nicht zu erwarten, da eventuell vorhandene Antikörper des Empfängers nicht direkt mit dem Virus in Kontakt kämen und keine Neutralisationsreaktion auslösten.

Um die Übertragbarkeit in die klinischen Anwendung herzustellen, wurden sowohl Splenozyten als auch PBMCs zu zwei verschiedenen Zeitpunkten transferiert, um einen Unterschied, der sich aus der abweichenden Frequenz der jeweiligen Leukozytensubtypen ergeben könnte, abzudecken. Wobei die Größe eines Tumors nicht ausschlaggebend für das Ansprechen auf die Therapie zu sein scheint.

Die verschiedenen Zeitpunkte des Transfers (24 und 72 Stunden) wurden gewählt, um einen größeren Zeitrahmen für die Behandlung zu ermöglichen. Bei der Durchführung des letzten Tierexperiments zeigte sich, dass ein Kompromiss zur Wahl des späteren Zeitpunkts nötig ist. Die Ergebnisse der Versuchsansätze zeigten, dass der erste Ansatz mit 24-stündiger Inokulation, darauf folgend einmaligem Waschen und Ruhen für 72h die Abwesenheit von Viruspartikeln, mit gespaltenem Fusionsprotein, garantiert. Das Fusionsprotein, welches für den Eintritt in die Säugerzelle essentiell ist liegt zunächst als inaktive Vorstufe vor (F0) und muss für den Eintritt in eine neue Wirtszelle zunächst gespalten werden (F1 und F2) (74, 88, 89). Dies findet in aviären Zellen auf dem Weg zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum und der Zellmembran statt, in murinen Zellen liegt dieses Enzym allerdings nicht vor um die Spaltung vorzunehmen.

Die durchflusszytometrische Analyse der Tumorzellen nach Reisolation hat gezeigt, dass die Hochregulation von MHC I und gleichzeitig verminderte Expression von PD-L1 auf der Oberfläche der Karzinomzellen durch den Transfer NDV-stimulierter Leukozyten stärker induziert wird als durch unstimulierte Zellen (Abbildung 5 und Abbildung 6). Die Tumorzellen werden dadurch für das Immunsystem erkennbar und zeigen sich weniger inhibitorisch, wodurch die Wahrscheinlichkeit der Tumorzellyse ansteigt (28). Diese Lyse wird neben den zytotoxischen T-Lymphozyten auch durch NK-Zellen und T-Helferzellen übernommen, wobei die Frequenz der NK-Zellen im Blut nicht übermäßig anstieg (Daten nicht gezeigt). Zu einer möglichen Erhöhung der Frequenz im Tumorgewebe selbst kann zu diesem Zeitpunkt keine Aussage getroffen werden, da die Messungen in den Lymphknoten keinen Rückschluss auf die Situation im dichten TME zulassen. Ein direkter Eintritt des Virus in die Zellen, die damit einhergehende Präsentation der HN auf der Zelloberfläche und damit eine Aktivierung der NK Zellen, ist hier im Gegensatz zu früheren Arbeiten auszuschließen (90, 91). Dies legt nahe, dass die Onkolyse teilweise anhand der veränderten Expression der MHC I und PD-L1 Proteine und damit der Leukozyten direkt nachvollzogen werden konnte.

Des Weiteren hat die Analyse der mesenterialen Lymphknoten der Mäuse an Tag -1, Tag 7 und Tag 56 gezeigt, dass die Immunsuppression, die ein Wachstum des Tumors begünstigt, durch den Transfer von NDV-aktivierten Leukozyten nachhaltig abgeschwächt werden kann. Dies wurde durch die verminderte Frequenz der FoxP3-

positiven regulatorischen T-Lymphozyten angezeigt, wobei der Transfer von naiven Leukozyten eine vergleichbare Dynamik hinsichtlich der FoxP3-positiven T_{reg} abbildet (34, 48, 92–94). Daraus ergibt sich die Frage, ob die Verminderung durch die NDV-Stimulation oder durch den allgemeinen Transfer von nicht-supprimierten Leukozyten zu diesem Trend führt. Die Stabilität der Expression von FoxP3 in T_{reg} ist *in vitro* abhängig von dem vorliegenden TGF- β und kann in frühen Stadien der Zelldifferenzierung zu einem Wechsel zur T-Helferzelle führen, obwohl diese frühen Stadien der T_{reg} nur gering zu dem immunsuppressiven Milieu beitragen (48). Deshalb wäre an dieser Stelle eine Subtypisierung der regulatorischen T-Lymphozyten anzuschließen, um festzustellen, ob lediglich die Menge der noch nicht aktiv supprimierenden T_{reg} sinkt oder tatsächlich die Subpopulation, die das Tumorstadium begünstigen, da darauf mit einer größeren Wahrscheinlichkeit keine Reaktivierung folgen würde (95).

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich die Onkolyse der Tumorzellen teilweise nachvollziehen, wobei weiter zu klären ist, welche Wirkung die NDV-Stimulation auf die Leukozyten hat. Eine Abnahme in der Frequenz der FoxP3-Expression von regulatorischen T-Lymphozyten ist in beiden Populationen zu beobachten, die sich allerdings nicht direkt auf die Rückbildung der Tumormasse übertragen lässt und so nur einen Teil der Immunreaktion ausmacht.

Zusätzlich wurde eine Analyse aktivierter Splenozyten nach einer Kokultur mit den originalen Tumorzellen DT660PDA und den Reisolaten vorgenommen, nachdem eine NDV-Stimulation stattgefunden hatte. Dieses Experiment hatte zum Ziel einen weiteren Aufschluss darüber zu bekommen, ob myeloide Subpopulationen wie die MDSCs oder M2 Makrophagen zu der Aufrechterhaltung des immunsuppressiven Milieus beitragen und deren Anzahl, sowie Aktivierungsstatus infolge der NDV-Stimulation sinken würde. Allerdings waren die ersten Auswertungen nicht in dem Maße zielführend, dass eine Aussage dazu getroffen werden konnte. Eine Wiederholung mit den eingesetzten Reisolaten und eine Erweiterung reisolierter Tumore aus weiteren Organismen wäre eine Möglichkeit um die Hypothese zu stützen.

Des Weiteren ergibt sich die Frage, ob sich dieses bisher erfolgreiche Tierversuchsmodell auch auf eine humane Anwendung übertragen lässt und dort eine vergleichbare Dynamik zu erwarten ist.

Die zuvor diskutierten Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Aktivierung des supprimierten Immunsystems zur Onkolyse des PDAC führt, die auf den Transfer von Leukozyten zurückzuführen ist. Wobei ein Anhalt für den Vorteil der NDV-Stimulation im Gegensatz zu naiven Leukozyten bisher nur durch die Veränderung der Oberflächenmarker MHC I und PD-L1, in Abbildung 5 und Abbildung 6, zu finden ist. *In vitro* kann das Virus zunächst einige der Zellen in Kultur infizieren und die auf der Zelloberfläche präsentierte HN führt zur Aktivierung der NK Zellen, sowie zytotoxischen T-Lymphozyten (90, 91). Außerdem sind in der Zellkultur keine supprimierenden Zytokine vorhanden, die *in vivo* dauerhaft durch die proliferierende Tumormasse produziert werden. So werden die aktivierten Leukozyten in den durch den Tumor geschwächten, Organismus übertragen. Sobald sie in die Nähe des Tumors migrieren, können sie vor Ort ihre lytische Wirkung entfalten bzw. das anti-inflammatorische TME beeinflussen. Auch wenn eine Übertragung der humoralen Anteile aufgrund mehrerer Waschschriffe vor der Applikation (Zentrifugation 300g für 5min) unwahrscheinlich ist und die applizierte Zellsuspension bisher nur immunhistochemisch auf Rückstände des Virus und mikroskopisch nach Leukozytenzahl gesichtet wurde, kann dazu nur eine detailliertere Untersuchung Aufschluss geben. Da die geringe Menge nachgewiesenenen Virus in der Zellsuspension allein nicht zur Tumorabstoßung führte, ist anzunehmen, dass die transferierten Zellen alleine für die Initiation der Onkolyse verantwortlich sind und in Zusammenarbeit mit den residenten, supprimierten Leukozyten eine Lyse des Tumors initiieren. Eine histologische Bewertung von Tumoren könnte dazu noch einen genaueren Einblick bieten. Ob die Immunsuppression auch direkt im TME vermindert wird, könnte ein *Enzyme-linked-Immunoassay* (ELISA) für TGF- β zeigen. Zusätzlich könnte zu dem späten Zeitpunkt (d56) eine Analyse des Serums Aufschluss darüber geben, in welchem Zustand sich das Immunsystem befindet. Insbesondere darüber ob die Leukozyten noch aktiv verbleibende Tumorzellen bekämpfen, dieser Vorgang tatsächlich abgeschlossen ist oder ob bereits wieder eine Suppression durch maligne Zellen produziert wird, die ein Rezidiv ankündigen könnte. Dies könnte ebenfalls durch ein ELISA erfolgen, dass zum Nachweis von TGF- β , sowie IL-2 und IL-10 führt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *ex vivo* Stimulation von Leukozyten mit NDV ausreicht, um eine suffiziente Onkolyse *in vivo* einzuleiten. Auch die beiden Zellpopulationen der Splenozyten und der PBMCs wurde verglichen und

die Ergebnisse zeigen keine signifikanten Unterschiede in ihren Resultaten. Ob eine Übertragung des NDV nach erfolgter intravenöser Applikation der Zellsuspension potentiell über Ausscheidungen der Individuen möglich ist, wäre noch weiter zu ergründen. Ein Transfer nach 72-stündiger Inkubation der Zellen mit Medium nach NDV-Stimulation führte zu keiner Übertragung von Virus, dass murine Zellen befallen könnte. Trotzdem wäre die stetige Kontrolle des Patienten und folglich der Ausscheidungen nötig um einer eventuellen Ausbreitung vorzugreifen.

5. Ausblick

Die im Laufe der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse haben gezeigt, dass das Newcastle Disease Virus nicht in den Organismus gelangen muss, sondern eine Aktivierung der körpereigenen Leukozyten genügt, um nach dem Transfer eine Onkolyse auszulösen. Dabei besteht sogar die Möglichkeit, diese Art der Behandlung mehrfach zu wiederholen, da nicht mit der Bildung von Antikörpern gerechnet werden muss. Der Vergleich von Splenozyten und PBMCs hat gezeigt, dass eine bestimmte Menge peripher gewonnenen Vollbluts ausreicht, um die Menge an Leukozyten zu isolieren, die nach NDV-Stimulation, eine vollständige Onkolyse induzieren kann. Im Bezug auf den Organismus einer Maus sind 4×10^6 Zellen appliziert worden, die im Vergleich zwischen 13 und 30% der Gesamtmenge an Leukozyten einer Maus ausmachen (96). Zunächst sollte im Hinblick auf eine klinische Anwendung der Stimulationserfolg durch das Newcastle Disease Virus durch *in vitro* Experimente nachgewiesen werden. Dafür würde eine periphere Blutentnahme eines Patienten mit einem früh-diagnostizierten Pankreaskarzinom ausreichen, um dieses nach der Stimulation mit NDV mittels Durchflusszytometrie zu analysieren. Des Weiteren wäre eine Isolation von humanen Karzinomzellen eines entnommenen Tumors anzustreben, eine Veränderung der Oberflächenmarker könnte im Vergleich von naiven und stimulierten Tumorzellen entstehen.

Sollte es zu einer vergleichbare Dynamik in den Experimenten kommen, wäre unter anderem eine Titration der zu applizierenden Menge vorzunehmend, da die Erhöhung des Hämatokrits und damit die Veränderung der Hämorrhologie eine Zunahme der unerwünschten Wirkungen wie die Veränderung der Mikrozirkulation

vermuten lassen. Die noch ausstehenden Analysen der zellulären und humoralen Faktoren, die diese Reaktion hervorrufen, wie die der applizierten Zellsuspension, der Lymphknoten und des Serums nach der Behandlung, könnten weitere Erkenntnisse bringen, welche Mechanismen stattfinden und so eine Prognose über einen möglichen Erfolg abgeben.

Das Pankreaskarzinom zählt zu den fünf häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland, die durch eine spät einsetzende Symptomatik und ein schnelles Wachstum zum Zeitpunkt der Diagnose eine minimale Aussicht auf Heilungserfolg hat. Ziel dieser Arbeit war es, die onkolytische Therapie des Pankreaskarzinoms sicherer zu machen und eine bessere Implementierung in den klinischen Alltag zu erreichen.

In vorherigen Tierversuchen dieser Arbeitsgruppe wurde das Virus im aktiven oder inaktiven Zustand intravenös appliziert und so eine *in vivo* Stimulation von Spendermäusen vorgenommen. Nach adoptivem Zelltransfer dieser stimulierten Splenozyten in tumortragenden Mäusen konnte eine Onkolyse beobachtet werden, jedoch war die Versuchsdurchführung hinsichtlich der klinischen Anwendung noch zu fern. Aus diesen vorangegangenen Versuchen entwickelte sich das in dieser Arbeit besprochene Modell in dem die Stimulation von entnommenen Splenozyten oder Blutleukozyten *in vitro* erfolgt. Zusätzlich wurde überprüft, ob nach der Behandlung des Organismus eine weitere Virusübertragung stattfinden kann.

Der Transfer in tumortragende Mäuse wurde zu zwei Zeitpunkten (24h und 72h nach *in vitro* Stimulation) vorgenommen. Die Onkolyse war zu beiden Zeitpunkten und mit beiden Leukozytengruppen erfolgreich, sodass die Tumore makroskopisch nicht mehr zu erkennen waren oder 10% des Volumens der Kontrollgruppen maßen. Darüberhinaus wurden die reisolierten Tumorzellen der Versuchstiere hinsichtlich der Veränderung ihrer Oberflächenproteine sowie die mesenteriale Lymphknoten auf die Veränderung der Leukozytenpopulationen analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Anzahl regulatorischer T-Lymphozyten, deren Rolle die Immunsuppression sowohl im physiologischen als auch im pathologischen Milieu ist, nach dem Transfer von stimulierten Leukozyten deutlich abnimmt. Die Analyse der reisolierten Tumorzellen hat gezeigt, dass die Menge von MHC I ansteigt und die des PD-L1 sinkt, wodurch die Tumorzellen anfälliger für den zytotoxischen Angriff durch T-Lymphozyten sind. Diese Ergebnisse liefern den deutlichen Hinweis, dass der Rückgang der Tumormasse nicht auf das aktive Virus im Organismus, sondern auf die Aufhebung der Immunsuppression und die Erhöhung der Immunogenität des Tumors zurückzuführen ist.

7. Literaturverzeichnis

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68(6):394–424. doi: 10.3322/caac.21492.
2. Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland I 2013/2014 I Bauchspeicheldrüse C25; 2013. Verfügbar unter: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Bauchspeicheldruesenkrebs/bauchspeicheldruesenkrebs_node.html.
3. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65(2):87–108. doi: 10.3322/caac.21262.
4. Korc M, Jeon CY, Edderkaoui M, Pandol SJ, Petrov MS. Tobacco and alcohol as risk factors for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2017; 31(5):529–36. doi: 10.1016/j.bpg.2017.09.001.
5. Gapstur SM, Jacobs EJ, Deka A, McCullough ML, Patel AV, Thun MJ. Association of alcohol intake with pancreatic cancer mortality in never smokers. *Arch Intern Med* 2011; 171(5):444–51. doi: 10.1001/archinternmed.2010.536.
6. Nakamura K, Nagata C, Wada K, Tamai Y, Tsuji M, Takatsuka N et al. Cigarette smoking and other lifestyle factors in relation to the risk of pancreatic cancer death: a prospective cohort study in Japan. *Jpn J Clin Oncol* 2011; 41(2):225–31. doi: 10.1093/jjco/hyq185.
7. Andersson G, Wennersten C, Borgquist S, Jirstrom K. Pancreatic cancer risk in relation to sex, lifestyle factors, and pre-diagnostic anthropometry in the Malmö Diet and Cancer Study. *Biol Sex Differ* 2016; 7:66. doi: 10.1186/s13293-016-0120-8.
8. Hu C, Hart SN, Polley EC, Gnanaolivu R, Shimelis H, Lee KY et al. Association Between Inherited Germline Mutations in Cancer Predisposition Genes and Risk of Pancreatic Cancer. *JAMA* 2018; 319(23):2401–9. doi: 10.1001/jama.2018.6228.
9. Canto MI, Harinck F, Hruban RH, Offerhaus GJ, Poley J-W, Kamel I et al. International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium summit on the management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer. *Gut* 2013; 62(3):339–47. doi: 10.1136/gutjnl-2012-303108.
10. Shindo K, Yu J, Suenaga M, Fesharakizadeh S, Cho C, Macgregor-Das A et al. Deleterious Germline Mutations in Patients With Apparently Sporadic Pancreatic Adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2017; 35(30):3382–90. doi: 10.1200/JCO.2017.72.3502.
11. Shi C, Hruban RH, Klein AP. Familial pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133(3):365–74. doi: 10.1043/1543-2165-133.3.365.
12. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* 2001; 25(5):579–86. doi: 10.1097/00000478-200105000-00003.

13. Whitcomb DC, Shelton CA, Brand RE. Genetics and Genetic Testing in Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* 2015; 149(5):1252-1264.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2015.07.057.
14. Solomon S, Das S, Brand R, Whitcomb DC. Inherited pancreatic cancer syndromes. *Cancer J* 2012; 18(6):485–91. doi: 10.1097/PPO.0b013e318278c4a6.
15. Zhan W, Shelton CA, Greer PJ, Brand RE, Whitcomb DC. Germline Variants and Risk for Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Emerging Concepts. *Pancreas* 2018; 47(8):924–36. doi: 10.1097/MPA.0000000000001136.
16. Löhr M, Klöppel G, Maisonneuve P, Lowenfels AB, Lüttges J. Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia* 2005; 7(1):17–23. doi: 10.1593/neo.04445.
17. Vinay Kumar, Abul K. Abbas, Jon C. Aster, Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Robbins SL, editors. *Robbins basic pathology*. Philadelphia, PA, USA: Elsevier Saunders; 2013.
18. Bynigeri RR, Jakkampudi A, Jangala R, Subramanyam C, Sasikala M, Rao GV et al. Pancreatic stellate cell: Pandora's box for pancreatic disease biology. *World J Gastroenterol* 2017; 23(3):382–405. doi: 10.3748/wjg.v23.i3.382.
19. Neesse A, Bauer CA, Öhlund D, Lauth M, Buchholz M, Michl P et al. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer: ready for clinical translation? *Gut* 2019; 68(1):159–71. doi: 10.1136/gutjnl-2018-316451.
20. Neesse A, Michl P, Frese KK, Feig C, Cook N, Jacobetz MA et al. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut* 2011; 60(6):861–8. doi: 10.1136/gut.2010.226092.
21. Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D et al. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 2009; 324(5933):1457–61. doi: 10.1126/science.1171362.
22. Jones L, Russell C, Mosca F, Boggi U, Sutton R, Slavin J et al. Standard Kausch-Whipple pancreatoduodenectomy. *Dig Surg* 1999; 16(4):297–304. doi: 10.1159/000018739.
23. Helmut Oettle, Thomas Bauernhofer, Markus Borner, Gerhard Faber, Rainer Fietkau, Volker Heinemann, Ulf Peter Neumann, Ron Pritzkeleit, Marianne Sinn, Dirk Thomas Waldschmidt, Bernhard Wörmann. *Onkopedia Leitlinien zum Pankreaskarzinom*; 2018. Verfügbar unter: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/pankreaskarzinom/@>.
24. Ozaka M, Ishii H, Sato T, Ueno M, Ikeda M, Uesugi K et al. A phase II study of modified FOLFIRINOX for chemotherapy-naïve patients with metastatic pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2018; 81(6):1017–23. doi: 10.1007/s00280-018-3577-9.
25. Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten. *S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom*; 2013. Verfügbar unter: https://www.dgvs.de/wp-content/uploads/2016/11/LL_Pankreas_OL_Langversion.pdf.

26. Mullen JT, Tanabe KK. Viral oncolysis. *Oncologist* 2002; 7(2):106–19. doi: 10.1634/theoncologist.7-2-106.
27. Nummer D, Suri-Payer E, Schmitz-Winnenthal H, Bonertz A, Galindo L, Antolovich D et al. Role of tumor endothelium in CD4+ CD25+ regulatory T cell infiltration of human pancreatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99(15):1188–99. doi: 10.1093/jnci/djm064.
28. Ryschich E, Nötzel T, Hinz U, Autschbach F, Ferguson J, Simon I et al. Control of T-cell-mediated immune response by HLA class I in human pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11(2 Pt 1):498–504.
29. Bernstorff W von, Spanjaard RA, Chan AK, Lockhart DC, Sadanaga N, Wood I et al. Pancreatic cancer cells can evade immune surveillance via nonfunctional Fas (APO-1/CD95) receptors and aberrant expression of functional Fas ligand. *Surgery* 1999; 125(1):73–84. doi: 10.1067/msy.2099.93570.
30. Basso D, Fogar P, Falconi M, Fadi E, Sperti C, Frasson C et al. Pancreatic tumors and immature immunosuppressive myeloid cells in blood and spleen: role of inhibitory co-stimulatory molecules PDL1 and CTLA4. An in vivo and in vitro study. *PLoS One* 2013; 8(1):e54824. doi: 10.1371/journal.pone.0054824.
31. Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 2003; 9(10):1269–74. doi: 10.1038/nm934.
32. Bellone G, Turletti A, Artusio E, Mareschi K, Carbone A, Tibaudi D et al. Tumor-Associated Transforming Growth Factor- β and Interleukin-10 Contribute to a Systemic Th2 Immune Phenotype in Pancreatic Carcinoma Patients. *The American Journal of Pathology* 1999; 155(2):537–47. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65149-8.
33. Moo-Young TA, Larson JW, Belt BA, Tan MC, Hawkins WG, Eberlein TJ et al. Tumor-derived TGF-beta mediates conversion of CD4+Foxp3+ regulatory T cells in a murine model of pancreas cancer. *J Immunother* 2009; 32(1):12–21. doi: 10.1097/CJI.0b013e318189f13c.
34. Clark CE, Hingorani SR, Mick R, Combs C, Tuveson DA, Vonderheide RH. Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion. *Cancer Res* 2007; 67(19):9518–27. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0175.
35. Karnevi E, Andersson R, Rosendahl AH. Tumour-educated macrophages display a mixed polarisation and enhance pancreatic cancer cell invasion. *Immunol Cell Biol* 2014; 92(6):543–52. doi: 10.1038/icb.2014.22.
36. Zhukova OV, Kovaleva TF, Arkhipova EV, Ryabov SA, Mukhina IV. Tumor-associated macrophages: Role in the pathological process of tumorigenesis and prospective therapeutic use (Review). *Biomed Rep* 2020; 13(5):47. doi: 10.3892/br.2020.1354.
37. Menen RS, Hassanein MK, Momiyama M, Suetsugu A, Moossa AR, Hoffman RM et al. Tumor-educated macrophages promote tumor growth and peritoneal metastasis in an orthotopic nude mouse model of human pancreatic cancer. *In Vivo* 2012; 26(4):565–9.
38. Partecke LI, Günther C, Hagemann S, Jacobi C, Merkel M, Sendler M et al. Induction of M2-macrophages by tumour cells and tumour growth promotion by

- M2-macrophages: a quid pro quo in pancreatic cancer. *Pancreatology* 2013; 13(5):508–16. doi: 10.1016/j.pan.2013.06.010.
39. Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Shimada K, Iwasaki M, Kosuge T, Kanai Y et al. Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2013; 108(4):914–23. doi: 10.1038/bjc.2013.32.
 40. Hanson EM, Clements VK, Sinha P, Ilkovitch D, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 2009; 183(2):937–44. doi: 10.4049/jimmunol.0804253.
 41. Lu T, Ramakrishnan R, Altioek S, Youn J-I, Cheng P, Celis E et al. Tumor-infiltrating myeloid cells induce tumor cell resistance to cytotoxic T cells in mice. *J Clin Invest* 2011; 121(10):4015–29. doi: 10.1172/JCI45862.
 42. Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res* 2006; 12(18):5423–34. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0369.
 43. Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, Vitale M, Marcenaro E, Conte R et al. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(7):4120–5. doi: 10.1073/pnas.0730640100.
 44. Ghiringhelli F, Ménard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* 2005; 202(8):1075–85. doi: 10.1084/jem.20051511.
 45. Chen M-L, Pittet MJ, Gorelik L, Flavell RA, Weissleder R, Boehmer H von et al. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(2):419–24. doi: 10.1073/pnas.0408197102.
 46. Budhu S, Schaer DA, Li Y, Toledo-Crow R, Panageas K, Yang X et al. Blockade of surface-bound TGF-β on regulatory T cells abrogates suppression of effector T cell function in the tumor microenvironment. *Sci Signal* 2017; 10(494). doi: 10.1126/scisignal.aak9702.
 47. Wan YY. Regulatory T cells: immune suppression and beyond. *Cell Mol Immunol* 2010; 7(3):204–10. doi: 10.1038/cmi.2010.20.
 48. Schmidt A, Oberle N, Krammer PH. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front Immunol* 2012; 3:51. doi: 10.3389/fimmu.2012.00051.
 49. Kondo H, Hazama S, Kawaoka T, Yoshino S, Yoshida S, Tokuno K et al. Adoptive immunotherapy for pancreatic cancer using MUC1 peptide-pulsed dendritic cells and activated T lymphocytes. *Anticancer Res* 2008; 28(1B):379–87.
 50. Cohen Tervaert J-W, Ye C, Yacyshyn E. Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *N Engl J Med* 2018; 378(12):1164–5. doi: 10.1056/NEJMc1801663.
 51. Ceeraz S, Nowak EC, Burns CM, Noelle RJ. Immune checkpoint receptors in regulating immune reactivity in rheumatic disease. *Arthritis Res Ther* 2014; 16(5):469. doi: 10.1186/s13075-014-0469-1.

52. Mellati M, Eaton KD, Brooks-Worrell BM, Hagopian WA, Martins R, Palmer JP et al. Anti-PD-1 and Anti-PDL-1 Monoclonal Antibodies Causing Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 2015; 38(9):e137-8. doi: 10.2337/dc15-0889.
53. Zhang B, Dong Y, Liu J, Lian Z, Liang L, Chen W et al. Immunotherapy for patients with advanced pancreatic carcinoma: a promising treatment. *Oncotarget* 2017; 8(4):5703–16. doi: 10.18632/oncotarget.13968.
54. Postow MA, Sidlow R, Hellmann MD. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *N Engl J Med* 2018; 378(2):158–68. doi: 10.1056/NEJMra1703481.
55. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 2012; 24(2):207–12. doi: 10.1016/j.coi.2011.12.009.
56. Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood* 2018; 131(1):58–67. doi: 10.1182/blood-2017-06-741033.
57. Pham T, Pereira L, Roth S, Galletta L, Link E, Akhurst T et al. First-in-human phase I clinical trial of a combined immune modulatory approach using TetMYB vaccine and Anti-PD-1 antibody in patients with advanced solid cancer including colorectal or adenoid cystic carcinoma: The MYPHISMO study protocol (NCT03287427). *Contemp Clin Trials Commun* 2019; 16:100409. doi: 10.1016/j.conctc.2019.100409.
58. Dougan SK. The Pancreatic Cancer Microenvironment. *Cancer J* 2017; 23(6):321–5. doi: 10.1097/PPO.0000000000000288.
59. Cuadrado-Castano S, Sanchez-Aparicio MT, García-Sastre A, Villar E. The therapeutic effect of death: Newcastle disease virus and its antitumor potential. *Virus Res* 2015; 209:56–66. doi: 10.1016/j.virusres.2015.07.001.
60. Zamarin D, Palese P. Oncolytic Newcastle disease virus for cancer therapy: old challenges and new directions. *Future Microbiol* 2012; 7(3):347–67. doi: 10.2217/fmb.12.4.
61. Dobbelstein M. Replicating adenoviruses in cancer therapy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004; 273:291–334. doi: 10.1007/978-3-662-05599-1_9.
62. Ma J, Ramachandran M, Jin C, Quijano-Rubio C, Martikainen M, Di Yu et al. Characterization of virus-mediated immunogenic cancer cell death and the consequences for oncolytic virus-based immunotherapy of cancer. *Cell Death Dis* 2020; 11(1):48. doi: 10.1038/s41419-020-2236-3.
63. Pryshliak M, Hazini A, Knoch K, Dieringer B, Tolksdorf B, Solimena M et al. MiR-375-mediated suppression of engineered coxsackievirus B3 in pancreatic cells. *FEBS Lett* 2020; 594(4):763–75. doi: 10.1002/1873-3468.13647.
64. Fukuhara H, Ino Y, Todo T. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci* 2016; 107(10):1373–9. doi: 10.1111/cas.13027.
65. Kemeny N, Brown K, Covey A, Kim T, Bhargava A, Brody L et al. Phase I, open-label, dose-escalating study of a genetically engineered herpes simplex virus, NV1020, in subjects with metastatic colorectal carcinoma to the liver. *Hum Gene Ther* 2006; 17(12):1214–24. doi: 10.1089/hum.2006.17.1214.
66. Gutermann A, Mayer E, Dehn-Rothfelfer K von, Breidenstein C, Weber M, Muench M et al. Efficacy of oncolytic herpesvirus NV1020 can be enhanced by

- combination with chemotherapeutics in colon carcinoma cells. *Hum Gene Ther* 2006; 17(12):1241–53. doi: 10.1089/hum.2006.17.1241.
67. Cozzi PJ, Malhotra S, McAuliffe P, Kooby DA, Federoff HJ, Huryk B et al. Intravesical oncolytic viral therapy using attenuated, replication-competent herpes simplex viruses G207 and Nv1020 is effective in the treatment of bladder cancer in an orthotopic syngeneic model. *FASEB J* 2001; 15(7):1306–8. doi: 10.1096/fj.00-0533fje.
 68. Myers R, Greiner S, Harvey M, Soeffker D, Frenzke M, Abraham K et al. Oncolytic activities of approved mumps and measles vaccines for therapy of ovarian cancer. *Cancer Gene Ther* 2005; 12(7):593–9. doi: 10.1038/sj.cgt.7700823.
 69. Galanis E, Hartmann LC, Cliby WA, Long HJ, Peethambaram PP, Barrette BA et al. Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer. *Cancer Res* 2010; 70(3):875–82. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2762.
 70. Kemp V, Hoeben RC, van den Wollenberg DJM. Exploring Reovirus Plasticity for Improving Its Use as Oncolytic Virus. *Viruses* 2015; 8(1). doi: 10.3390/v8010004.
 71. Kimpel J, Urbiola C, Koske I, Tober R, Banki Z, Wollmann G et al. The Oncolytic Virus VSV-GP Is Effective against Malignant Melanoma. *Viruses* 2018; 10(3). doi: 10.3390/v10030108.
 72. Alexander DJ. Newcastle disease in the European Union 2000 to 2009. *Avian Pathol* 2011; 40(6):547–58. doi: 10.1080/03079457.2011.618823.
 73. Jaganathan S, Ooi PT, Phang LY, Allaudin ZNB, Yip LS, Choo PY et al. Observation of risk factors, clinical manifestations and genetic characterization of recent Newcastle Disease Virus outbreak in West Malaysia. *BMC Vet Res* 2015; 11:219. doi: 10.1186/s12917-015-0537-z.
 74. Samal S, Kumar S, Khattar SK, Samal SK. A single amino acid change, Q114R, in the cleavage-site sequence of Newcastle disease virus fusion protein attenuates viral replication and pathogenicity. *J Gen Virol* 2011; 92(Pt 10):2333–8. doi: 10.1099/vir.0.033399-0.
 75. Ockert D, Schirmacher V, Beck N, Stoelben E, Ahlert T, Flechtenmacher J et al. Newcastle disease virus-infected intact autologous tumor cell vaccine for adjuvant active specific immunotherapy of resected colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 1996; 2(1):21–8.
 76. Schulze T, Kemmner W, Weitz J, Wernecke K-D, Schirmacher V, Schlag PM. Efficiency of adjuvant active specific immunization with Newcastle disease virus modified tumor cells in colorectal cancer patients following resection of liver metastases: results of a prospective randomized trial. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58(1):61–9. doi: 10.1007/s00262-008-0526-1.
 77. NELSON CB, POMEROY BS, SCHRALL K, PARK WE, LINDEMAN RJ. An outbreak of conjunctivitis due to Newcastle disease virus (NDV) occurring in poultry workers. *Am J Public Health Nations Health* 1952; 42(6):672–8. doi: 10.2105/ajph.42.6.672.
 78. Pérez-Garay M, Arteta B, Llop E, Cobler L, Pagès L, Ortiz R et al. α 2,3-Sialyltransferase ST3Gal IV promotes migration and metastasis in pancreatic adenocarcinoma cells and tends to be highly expressed in pancreatic

- adenocarcinoma tissues. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 45(8):1748–57. doi: 10.1016/j.biocel.2013.05.015.
79. Xu H, Inagaki Y, Seyama Y, Du G, Wang F, Kokudo N et al. Expression of KL-6/MUC1 in pancreatic cancer tissues and its potential involvement in tumor metastasis. *Oncol Rep* 2011; 26(2):371–6. doi: 10.3892/or.2011.1315.
80. Kalra AV, Campbell RB. Mucin overexpression limits the effectiveness of 5-FU by reducing intracellular drug uptake and antineoplastic drug effects in pancreatic tumours. *Eur J Cancer* 2009; 45(1):164–73. doi: 10.1016/j.ejca.2008.10.008.
81. Li Q, Wei D, Feng F, Wang X-L, Li C, Chen Z-N et al. α 2,6-linked sialic acid serves as a high-affinity receptor for cancer oncolytic virotherapy with Newcastle disease virus. *J Cancer Res Clin Oncol* 2017; 143(11):2171–81. doi: 10.1007/s00432-017-2470-y.
82. Powell LD, Bause E, Legler G, Molyneux RJ, Hart GW. Influence of asparagine-linked oligosaccharides on tumor cell recognition in the mixed lymphocyte reaction. *J Immunol* 1985; 135(1):714–24.
83. Schwaiger T, Knittler MR, Grund C, Roemer-Oberdoerfer A, Kapp J-F, Lerch MM et al. Newcastle disease virus mediates pancreatic tumor rejection via NK cell activation and prevents cancer relapse by prompting adaptive immunity. *Int J Cancer* 2017; 141(12):2505–16. doi: 10.1002/ijc.31026.
84. Partecke LI, Sendler M, Kaeding A, Weiss FU, Mayerle J, Dummer A et al. A syngeneic orthotopic murine model of pancreatic adenocarcinoma in the C57/BL6 mouse using the Panc02 and 6606PDA cell lines. *Eur Surg Res* 2011; 47(2):98–107. doi: 10.1159/000329413.
85. Ikeda K, Ichikawa T, Wakimoto H, Silver JS, Deisboeck TS, Finkelstein D et al. Oncolytic virus therapy of multiple tumors in the brain requires suppression of innate and elicited antiviral responses. *Nat Med* 1999; 5(8):881–7. doi: 10.1038/11320.
86. Havunen R, Siurala M, Sorsa S, Grönberg-Vähä-Koskela S, Behr M, Tähtinen S et al. Oncolytic Adenoviruses Armed with Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin-2 Enable Successful Adoptive Cell Therapy. *Mol Ther Oncolytics* 2017; 4:77–86. doi: 10.1016/j.omto.2016.12.004.
87. Hung C-F, Tsai Y-C, He L, Coukos G, Fodor I, Qin L et al. Vaccinia virus preferentially infects and controls human and murine ovarian tumors in mice. *Gene Ther* 2007; 14(1):20–9. doi: 10.1038/sj.gt.3302840.
88. Afonso CL. Virulence during Newcastle Disease Viruses Cross Species Adaptation. *Viruses* 2021; 13(1). doi: 10.3390/v13010110.
89. Nagai Y, Klenk HD, Rott R. Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology* 1976; 72(2):494–508. doi: 10.1016/0042-6822(76)90178-1.
90. Arnon TI, Lev M, Katz G, Chernobrov Y, Porgador A, Mandelboim O. Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur J Immunol* 2001; 31(9):2680–9. doi: 10.1002/1521-4141(200109)31:9<2680::aid-immu2680>3.0.co;2-a.

91. Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, Paul L, Arnon TI, Bushkin Y et al. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 2001; 409(6823):1055–60. doi: 10.1038/35059110.
92. Imai D, Yoshizumi T, Okano S, Uchiyama H, Ikegami T, Harimoto N et al. The prognostic impact of programmed cell death ligand 1 and human leukocyte antigen class I in pancreatic cancer. *Cancer Med* 2017; 6(7):1614–26. doi: 10.1002/cam4.1087.
93. Stromnes IM, Hulbert A, Pierce RH, Greenberg PD, Hingorani SR. T-cell Localization, Activation, and Clonal Expansion in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Immunol Res* 2017; 5(11):978–91. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0322.
94. Jang J-E, Hajdu CH, Liot C, Miller G, Dustin ML, Bar-Sagi D. Crosstalk between Regulatory T Cells and Tumor-Associated Dendritic Cells Negates Anti-tumor Immunity in Pancreatic Cancer. *Cell Rep* 2017; 20(3):558–71. doi: 10.1016/j.celrep.2017.06.062.
95. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 2009; 30(6):899–911. doi: 10.1016/j.immuni.2009.03.019.
96. Stabstelle Arbeitssicherheit und; Nachhaltigkeit. Verfügbar unter: https://www.sicherheitswesen.verwaltung.uni-muenchen.de/downloadbereich/tierschutz/normalwerte_maus.pdf.

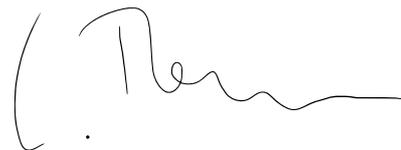
Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

02.06.2023
Datum

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized initial 'P' followed by a series of connected, wavy lines that trail off to the right.

Unterschrift

Danksagung

Diese Arbeit wäre durch die Unterstützung vieler Menschen nicht möglich geworden. Ein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med Ali Aghdassi, der mich als mein Doktorvater sehr unterstützt hat. Außerdem Herrn Prof. Dr. med Markus M. Lerch, der mich auch nach seiner Berufung an die Ludwig-Maximilian-Universität in München förderte. Ich möchte mich bei Frau Dr. Ulrike Blohm bedanken, dass ich als Praktikantin in ihrem Labor meine Experimente durchführen durfte und dafür, dass sie über die Zeit und den Rahmen meines Praktikums hinaus eine bedeutende Unterstützung war. Ihr Team aus MTAs und Doktoranden hat mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden und ohne Silke Rehbein und Stefanie Knöffel hätte ich mehr als einmal, zweimal oder auch dreimal wieder von vorne beginnen müssen. Die Hilfe und Teilnahme habe ich immer sehr willkommen geheißen und noch weitaus mehr geschätzt. Und auch ein besonderer Dank an Jane, die mir mehr als einmal in einer aussichtslosen Situation geholfen hat. Doch ohne eine Person wäre es nie dazu gekommen, dass ich auch nur auf die Idee gekommen wäre 2018 mit meiner Promotion zu beginnen. Theresa Schwaiger hat mir einen Weg und eine neue Perspektive gezeigt, als der Wechsel der Universitäten mir auf unbestimmte Zeit erstmal eine Pause beschert hatte. Obwohl die Zeit im Labor natürlich auch aus zahlreichen, neuen Herausforderung für mich bestand, haben Spaß und Freude immer überwogen und mir gezeigt wie wertvoll unsere Freundschaft ist. Und nicht zu vergessen, das wunderbare Team aus Tierpflegern und Tierärzten, die mich in dem neuen, unbekanntem Terrain unterstützten und mir stets mit Verständnis begegneten, ganz besonders an Thomas, Lukas und Bärbel. Ein weiterer Dank geht an den Förderverein des Friedrich-Loeffler Instituts, der mich über die gesamte Zeit finanziell unterstützt hat.

Dazu ein großes, großes Dankeschön an meine Eltern, Rosemarie und Thomas, die in jeder Hinsicht eine Stütze sind und die Basis dafür, dass ich mich so unbeschwert auf mein Studium und meine Promotion konzentrieren kann, wie es mir in diesem Moment wo alles dem Ende entgegen geht erst bewusst wird. Ein ebenso großes Dankeschön an Laura und Michael, die mich in den Pausen aufgebaut oder abgelenkt haben und mich nicht vergessen lassen, was neben dem Studium zählt.

Und dir, Ghait, kann ich gar nicht genug danken, für deine Geduld, dein Verständnis und dafür alles mitzutragen, wenn es bei mir ein bisschen viel wird.

Danke!