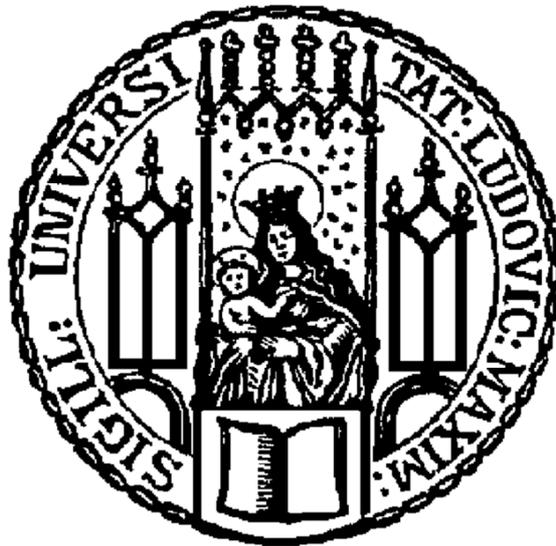


Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie
Leitung: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Klinikum der Universität
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Adjuvantes Interferon zur Optimierung RIG-I-basierter Immuntherapie des Pankreaskarzinoms



Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hannes Leon Hölz
aus Duisburg
2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Max Schnurr

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Axel Kleespies
PD Dr. med. Enrico de Toni

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. rer. biol. hum. Peter Düwell

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 01. Februar 2018





Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Abstract.....</i>	1
1.2	<i>Pathologische und klinische Grundlagen des Pankreaskarzinoms</i>	1
1.2.1	Epidemiologie, Risikofaktoren und Karzinogenese	1
1.2.2	Klinische Aspekte	2
1.2.3	Immunsuppressives Tumormikromilieu.....	3
1.2.4	Konzepte der Tumorimmunologie	4
1.3	<i>Interferone in der Tumorimmuntherapie</i>	5
1.3.1	Die Interferon-Familie und der JAK/STAT-Signalweg	5
1.3.2	Rolle von Interferonen in der Immunüberwachung von Tumoren	8
1.3.3	Klinische Studien zum Einsatz von Interferonen	10
1.4	<i>Zytosolische Helikasen als Zielstrukturen der Tumorimmuntherapie</i>	11
1.4.1	Interferoninduktion durch die Erkennung von Gefahrensignalen.....	11
1.4.2	<i>RIG-I-like-Helikasen (RLH)</i>	11
1.5	<i>Fragestellung und Zielsetzung</i>	14
2	Material und Methoden.....	15
2.1	<i>Geräte und Reagenzien</i>	15
2.1.1	Technische Ausstattung.....	15
2.1.2	Chemikalien, Reagenzien und Pufferlösungen	15
2.1.3	Tierexperimentelle Arbeitsmaterialien	16
2.1.4	Zellkulturmaterialien und -medien	16
2.1.5	Zytokine	16
2.1.6	Verbrauchsmaterialien	17
2.1.7	Lösungen und Puffer	17
2.1.8	Kits	17
2.1.9	Antikörper	18
2.1.10	Software	19
2.2	<i>Zellbiologische Methoden</i>	19
2.2.1	Zelllinien	19
2.2.2	Kultivierung von Zellen.....	19
2.2.3	Bestimmung der Zellzahl mittels Trypanblau-Ausschlussfärbung.....	20
2.2.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	20
2.2.5	Tumorzellaussaat, Vorstimulation und Transfektion.....	20

2.3	<i>In vivo Versuche</i>	21
2.3.1	Versuchstiere und Haltung.....	21
2.3.2	Induktion von subkutanen Pankreastumoren	22
2.3.3	Induktion orthotoper Pankreastumore	22
2.3.4	Tumorthherapie	23
2.3.5	Blutentnahme	23
2.3.6	Herstellung von Tumorlysate für RNA Isolation und Zytokingewinnung .	24
2.4	<i>Funktionelle Analysen</i>	24
2.4.1	Zytokinbestimmung.....	24
2.4.2	Durchflusszytometrie	24
2.5	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	25
2.5.1	RNA-Isolation	25
2.5.2	Reverse Transkription.....	26
2.5.3	Quantitative <i>real-time</i> PCR (qRT-PCR).....	26
2.5.4	Generierung von 5'-Triphosphat-modifizierter RNA.....	26
2.5.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	27
2.5.6	Proteingewinnung und Western blot	27
2.5.7	Immunhistologie.....	27
2.6	<i>Statistische Analysen</i>	28
3	Ergebnisse	29
3.1	<i>Interferon-Signalweg in Pankreaskarzinomzellen</i>	29
3.1.1	Einfluss von diversen Interferonen auf die STAT1-Phosphorylierung...	29
3.1.2	Auswirkung von Interferonen auf die RLH-Expression	30
3.2	<i>Funktionelle Charakterisierung von RIG-I-like-Helikasen in Pankreaskarzinomzellen</i>	35
3.2.1	RLH-Signalweg in humanen und murinen Tumorzelllinien	35
3.2.2	Induktion der STAT1-Phosphorylierung durch die Stimulation von RLH.....	37
3.2.3	RLH-Liganden lösen in Tumorzellen Apoptose aus	38
3.3	<i>Kombination von Interferon mit RIG-I-like-Helikasen-Liganden</i>	40
3.3.1	Effekte der Stimulation mit Interferon auf das RLH- <i>signalling</i>	40
3.3.2	Vorbehandlung mit Interferonen verstärkt die RLH-induzierte Tumorzellapoptose.....	45
3.3.3	Charakterisierung der durch Interferone und RLH-Liganden induzierten Tumorzellapoptose.....	50

3.4	<i>Interferon- und RIG-I-like-Helikasen-basierte Immuntherapie im Panc02-Tumormodell</i>	51
3.4.1	Systemische Applikation von IFN α erhöht die RLH-Expression im Tumor	51
3.4.2	Kombination von IFN α mit ppp-RNA verbessert das RLH-signalling <i>in vivo</i>	52
3.4.3	Einfluss der Kombination von IFN α und poly(I:C) auf das Überleben im orthotopen Panc02-Tumormodell	54
4	Diskussion	56
4.1	<i>RIG-I und MDA5 als molekulare Zielstrukturen einer Tumorummuntherapie</i>	56
4.2	<i>Intaktes Interferon-signalling in Pankreaskarzinomzellen</i>	56
4.3	<i>Funktionelle RIG-I-like-Helikasen-Expression in Pankreaskarzinomzellen</i>	58
4.4	<i>Optimiertes RIG-I-like-Helikasen-signalling durch die Kombination von RIG-I-like-Helikasen-Liganden mit adjuvantem Interferon</i>	59
4.5	<i>Tumorthherapie mit adjuvantem IFNα und ppp-RNA bzw. poly(I:C) in vivo</i>	62
4.6	<i>Einfluss von Regulationsmechanismen auf das Ansprechen der Interferone und RIG-I-like-Helikasen-Liganden</i>	64
4.7	<i>Ausblick</i>	65
5	Zusammenfassung	68
6	Verzeichnis der Abkürzungen	70
7	Literaturverzeichnis	74
8	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	84
9	Danksagung	87
10	Veröffentlichungen	88
11	Eidesstattliche Versicherung	89

1 Einleitung

1.1 Abstract

Das Adenokarzinom des Pankreas hat eine extrem schlechte Prognose, weshalb neue Therapieoptionen dringend erforderlich sind. Die RIG I-like-Helikasen (RLH) *retinoic acid inducible gene 1* (RIG-I) und *melanoma differentiation-associated antigen 5* (MDA5) sind zytoplasmatische Rezeptoren für virale RNA und vermitteln antivirale Immunantworten. In Vorarbeiten konnten wir RIG-I und MDA5 als therapeutische Zielstrukturen im Pankreaskarzinom identifizieren. Eine Behandlung von Tumorzellen mit synthetischen RLH-Liganden induziert die Synthese von Typ-I-Interferon Chemokinen, sowie Apoptose. RLH sind durch Typ I Interferon induzierbar. In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob die Kombination von Typ I Interferon mit synthetischen RLH-Liganden in murinen und humanen Pankreaskarzinomzellen das therapeutische Potential einer RLH-basierten Therapie erhöht.

1.2 Pathologische und klinische Grundlagen des Pankreaskarzinoms

1.2.1 Epidemiologie, Risikofaktoren und Karzinogenese

Das Pankreaskarzinom gehört zu den vier häufigsten tumorbedingten Todesursachen, obwohl es nur 3% aller neu diagnostizierten Tumorerkrankungen ausmacht (Siegel et al., 2016). Für das Jahr 2030 wird prognostiziert, dass das Pankreaskarzinom die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache in den USA darstellen wird (Rahib et al., 2014). Bei Männern liegt das Pankreaskarzinom auf Platz neun und bei Frauen auf Platz sieben der häufigsten Tumorerkrankungen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 71 Jahren für Männer und 75 Jahren für Frauen. In Deutschland versterben jährlich 15.000 Patienten am Pankreaskarzinom (Seufferlein et al., 2014). Seit dem Jahrtausendwechsel steigen die Todesraten bei beiden Geschlechtern leicht an (Malvezzi et al., 2015). Über die letzten 25 Jahre hat sich die Prognose des duktales Pankreaskarzinoms kaum verändert. Die mittlere Überlebensrate beträgt sechs Monate und nur 3 bis 7 % der Patienten leben nach der Diagnosestellung länger als fünf Jahre (Siegel et al., 2016). Hauptprobleme bei der Mortalitätsreduktion des Pankreaskarzinoms stellen die späte Diagnosestellung und fehlende personalisierte Behandlungsstrategien dar (Seufferlein and Mayerle, 2016).

Risikofaktoren für das Pankreaskarzinom sind Rauchen, ein fortgeschrittenes Lebensalter, Diabetes mellitus, Adipositas, fettreiche Ernährung, chronische

Pankreatitis sowie familiäre Tumorerkrankungen (Vincent et al., 2011). Die Letalität ist in einer frühen Metastasierung des Tumors ins lymphatische System sowie in entfernte Organe begründet.

Meist handelt es sich beim Pankreaskarzinom um ein duktales Adenokarzinom (PDAC). Morphologisch ist der Tumor durch eine häufige Lokalisation im Pankreaskopf, duktal glanduläre Tumorstrukturen und eine ausgeprägte desmoplastische Reaktion charakterisiert. Die Progression bis zum invasiven Pankreaskarzinom wird durch Gangveränderungen, sogenannte *pancreatic intraepithelial neoplasia* (PanIN)-Läsionen, beschrieben, für die korrespondierende Genmutationen nachgewiesen werden konnten. Am häufigsten sind im Pankreaskarzinom aktivierende K-ras-Onkogen-Mutationen, als auch die Inaktivierung der Tumorsuppressorgene p16, p53, DPC4/SMAD4 und seltener BRCA2 nachzuweisen (Maitra and Hruban, 2008).

1.2.2 Klinische Aspekte

Die schlechte Prognose von Patienten mit PDAC ist unter anderem auf die erschwerte Diagnosestellung zurückzuführen, da das klinische Erscheinungsbild meist unspezifisch ist und der Tumor über lange Zeit asymptomatisch bleibt. Über 80 % der Patienten werden daher mit einem nicht-resektablen, lokal fortgeschrittenen oder bereits metastasierten Tumor diagnostiziert (Ettrich et al., 2015). Derzeitige Therapieoptionen sind abhängig von dem Tumorstadium, Komorbiditäten und dem Allgemeinbefinden des Patienten. Die einzig kurative Chance für Patienten besteht in einer kompletten operativen Entfernung des Pankreastumors (R0-Resektion). Selbst nach R0-Resektion liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei nur 20 %, was auf bereits vorliegende Mikrometastasen zurückzuführen ist. Daher ist nach kurativ intendierter Resektion meist eine adjuvante Chemotherapie mit Gemcitabin über sechs Monate indiziert (Seufferlein et al., 2013). Liegen bereits klinisch apparente Metastasen vor, wird in der Regel eine palliative Chemotherapie empfohlen, zunehmend werden aber auch intensiviertere Chemotherapie-Protokolle mit dem Ziel der sekundären Resektabilität erprobt. Bei Patienten mit metastasiertem PDAC erwiesen sich für bestimmte Patientengruppen neue Therapieprotokolle als vorteilhaft gegenüber der lange Zeit als Goldstandard geltenden Monotherapie mit Gemcitabin (Burriss et al., 1997). Hierzu gehört die Kombination von Gemcitabin mit dem EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib (Moore et al., 2007). Zum Preis einer gesteigerten Toxizität führt die Polychemotherapie bestehend aus 5-FU, Irinotecan und Oxaliplatin (FOLFIRINOX) sowie die Kombination von Gemcitabin mit an Albumin

gebundenem Nab-Paclitaxel zu einem Überlebensvorteil bei ausgewählten Patienten mit gutem Allgemeinzustand vor Therapiebeginn (Al-Batran et al., 2014; Conroy et al., 2011; Von Hoff et al., 2013). Die ausgeprägte Therapieresistenz des Pankreaskarzinoms und dessen ungünstige Prognose, selbst nach operativer Resektion, Bestrahlung bzw. Polychemotherapie, offenbaren die Dringlichkeit der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze.

1.2.3 Immunsuppressives Tumormikromilieu

In den letzten Jahren ist neben genetischen Faktoren die entscheidende Rolle des Tumorstromas in der Karzinogenese und Therapieresistenz deutlich geworden. Ein dichtes Tumorstroma erschwert durch dessen Barrierefunktion die Zugänglichkeit von Therapeutika und immunsuppressive Faktoren fördern Tumorwachstum über diverse Mechanismen (Neesse et al., 2011). Ein entscheidender Mechanismus ist die Hemmung der Immunüberwachung von maligne transformierten Zellen durch zytotoxische T-Zellen (*cytotoxic T lymphocytes*, CTL). Tumor-infiltrierende CTL gelten bei verschiedenen Tumorentitäten als positiver prognostischer Faktor, so auch beim PDAC (Fukunaga et al., 2004). Allerdings sind diese CTL oft aufgrund des vorherrschenden immunsuppressiven Tumormilieus funktionell beeinträchtigt. Diese Immunsuppression wird durch Zellpopulationen wie myeloide Suppressor-Zellen (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSC), regulatorische T-Zellen (T_{reg}), Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) und Fibroblasten vermittelt, die Lymphozyten mit Effektorfunktion, wie $CD8^+$ T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen), supprimieren. Eine erhöhte Anzahl von MDSC im Tumormilieu ist als unabhängiger negativer prognostischer Faktor bezogen auf das Überleben beim Pankreaskarzinom anzusehen (Gabitass et al., 2011). MDSC können die Entwicklung von T_{reg} *de novo* in der Peripherie induzieren oder T_{reg} aus dem Thymus rekrutieren (Lindau et al., 2013). Hiraoka et al. zeigten, dass während der Tumorprogression von prämaligen Läsionen bis hin zum PDAC vermehrt *Forkhead-Box-Protein P3* ($FoxP3$)⁺ T_{reg} im Tumormilieu zu finden sind (Hiraoka et al., 2006). Eine hohe Zelldichte von T_{reg} im Tumorstroma gilt als negativer prognostischer Faktor (Gallimore and Godkin, 2008). Laklai et al. zeigten anhand von humanen PDAC-Tumorbiopsien einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Überleben der Patienten und der Aktivität von TGF β , der Organisation der extrazellulären Matrix, der Gewebedichte sowie der epithelialen, zellulären Aktin-Myosin-Spannung (Laklai et al., 2016). Bestimmte PDAC-Genotypen, besonders welche mit Mutationen im TGF β -Signalweg, weisen eine erhöhte Zellkontraktilität auf, wodurch Proteine der extrazellulären Matrix beeinflusst werden und ein dichteres Tumorstroma entsteht. Daher könnte eine kombinierte Therapie von Tumor- und

Stromazellen effektiver sein, als ein Therapiekonzept, dass sich nur auf Tumorzellen als therapeutische Zielstrukturen beschränkt (Rath and Olson, 2016). Neue Ansätze der Immuntherapie stehen vor der Herausforderung das Tumor-begünstigende immunsuppressive Stroma in ein immunsupportives Gewebe umzuwandeln, in dem bereits vorhandene Immunzellen aktiviert bzw. *de novo* generiert werden (Neesse et al., 2011).

1.2.4 Konzepte der Tumorimmunologie

Hanahan und Weinberg beschrieben initial sechs charakteristische Eigenschaften von Tumoren (*hallmarks of cancer*), die durch mehrere Schritte erworben werden: 1) Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, 2) Resistenz gegenüber antiproliferativen Signalen, 3) Umgehung von Apoptose, 4) unbegrenztes Wachstumspotential, 5) Förderung der Angiogenese, sowie 6) invasives Wachstum und Tumorzellaussaat (Hanahan and Weinberg, 2000). Ergänzt wurden diese Eigenschaften durch zwei weitere, 7) die metabolische Umprogrammierung, sowie 8) die Immunsuppression. Förderlich für diese Entwicklung ist die genomische Instabilität der Tumorzellen. Diese führt zu Mutationen und Tumor-vermittelten Entzündungsreaktionen, darüber hinaus können entstehende reaktive Sauerstoffspezies weitere Mutationen induzieren. Die vom Tumor rekrutierten Immun- und Bindegewebszellen der *tumor microenvironment* tragen dazu bei, die Tumorzelleigenschaften auszubilden und zu erhalten (Hanahan and Coussens, 2012; Hanahan and Weinberg, 2011).

Entzündungsreaktionen werden vom Immunsystem initiiert, um Pathogene erfolgreich zu eliminieren. Sie können jedoch auch zur Tumorentstehung beitragen (Hagemann et al., 2007). Dieses zweiseitige Schwert spiegelt sich im *cancer immunoediting* wider, einem Konzept das aus drei Schritten besteht: 1) Eliminierung, 2) Equilibrium und 3) Entkommen (Dunn et al., 2004). Im ersten Schritt initiieren Zellen des angeborenen Immunsystems eine Immunantwort, die zur Elimination von Tumorzellen führt und tumorspezifische T-Zellen aktiviert. Während der zweiten Phase, des Equilibriums, unterbindet das Immunsystem weitgehend die Proliferation der Tumorzellen. Der Selektionsdruck, der auf die Tumorzellen ausgeübt wird, führt hierbei zur Entstehung von wenig immunogenen Tumorzellvarianten, die der Immunüberwachung entkommen (*immune escape*). Unter anderem wird als *escape*-Mechanismus beispielsweise MHC-I herunterreguliert, wodurch Tumorzellen weniger leicht von CTL erkannt werden (Matsushita et al., 2012). Es kommt zur Expansion selektierter Tumorzellen, die das intakte Immunsystem nicht abwehren kann. Somit kann trotz eines kompetenten Immunsystems ein Tumor entstehen.

1.3 Interferone in der Tumorimmuntherapie

Interferone (IFN) spielen eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr von Tumorzellen (Abb. 1). Seit Jahrzehnten wird das therapeutische Potenzial von IFN in der Tumortherapie untersucht. Im Folgenden sollen die Biologie der IFN, deren Signaltransduktionswege, die immunologischen Konsequenzen und der bisherige klinische Einsatz kurz zusammengefasst werden.

1.3.1 Die Interferon-Familie und der JAK/STAT-Signalweg

IFN sind wichtige Bestandteile des menschlichen Immunsystems und haben eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung einer Zell-vermittelten Immunreaktion. IFN nehmen einen wichtigen Platz in der Virusabwehr ein. Jedoch beschränkt sich das Wirkspektrum von IFN nicht nur auf ihre antivirale Abwehrfunktion. Vielfältige Aufgaben innerhalb des Immunsystems werden IFN zugeschrieben. So spielen sie eine wichtige Rolle in der Tumorprävention, Zelldifferenzierung, Apoptose und Angiogenese (Borden et al., 2007). Therapeutisch kommen IFN heutzutage beispielsweise bei Hepatitis C-Virusinfektionen, Multipler Sklerose und zahlreichen Tumorerkrankungen zum Einsatz. Wie Abb. 1 zu entnehmen ist, spielen Typ I IFN eine wichtige Rolle als Brücke zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort, worin letztlich ihr vielfältiger therapeutischer Nutzen begründet liegt.

Bislang wurden drei Klassen von IFN anhand ihrer entsprechenden Signalrezeptoren identifiziert und eingeteilt. Die Typ I IFN-Familie besteht aus 16 Vertretern beim Menschen; darunter IFN β und 13 Subtypen von IFN α . Alle Vertreter binden an einem aus zwei Untereinheiten bestehenden transmembranen IFN α/β Rezeptor (IFNAR1 und IFNAR2) (Novick et al., 1994; Uze et al., 1990). Während die meisten Zelltypen IFN β produzieren, sind hämatopoetische Zellen primäre Produzenten von IFN α .

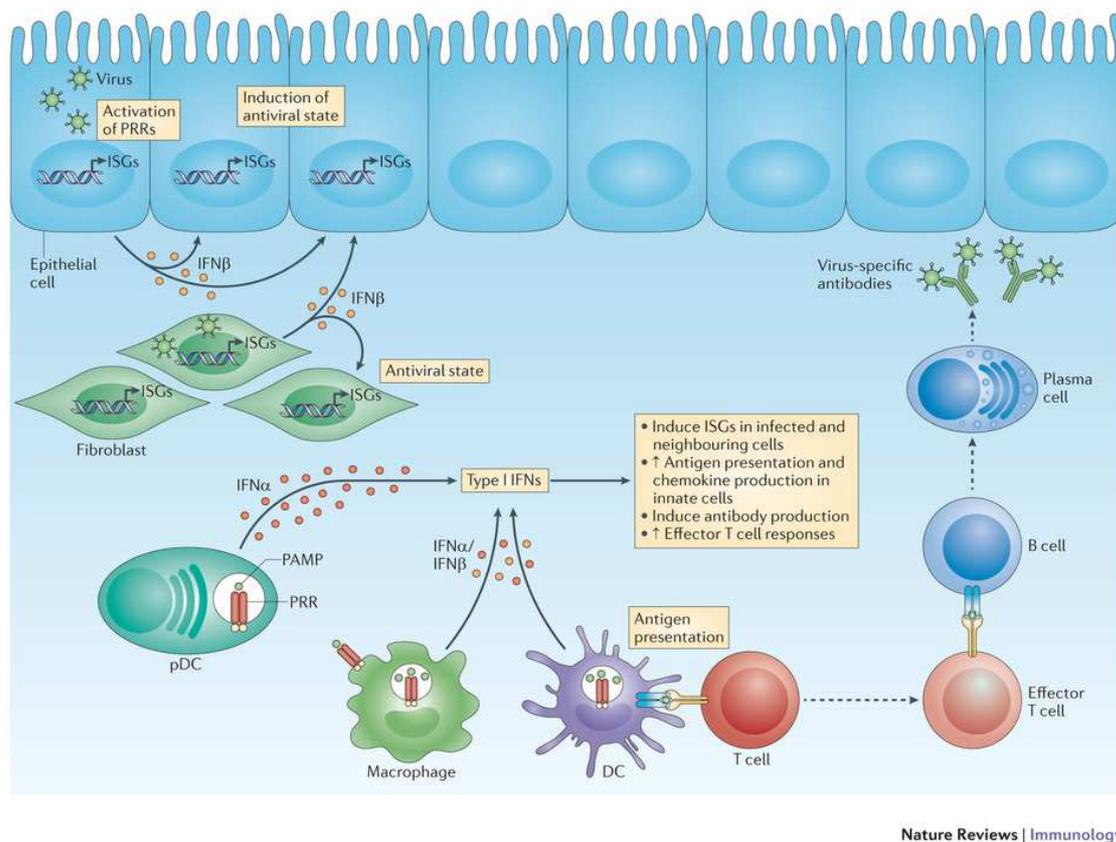


Abb. 1: Typ I IFN in der Immunabwehr (Ivashkiv and Donlin, 2014)

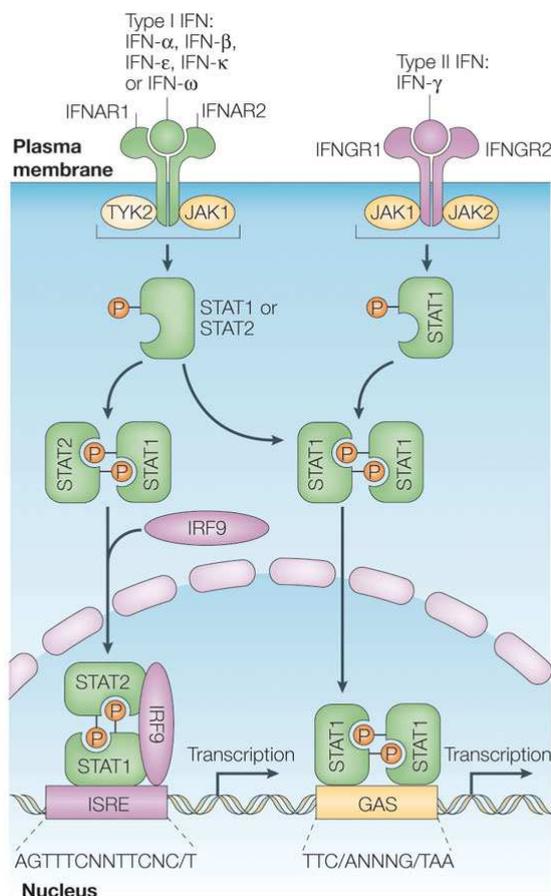
Immunzellen des angeborenen Immunsystems, wie zum Beispiel Makrophagen und professionelle antigenpräsentierende Zellen, sog. dendritische Zellen (DC), produzieren Typ I IFN als Folge der Aktivierung von *pattern recognition* Rezeptoren (PRR), die sich auf der Plasmamembran, in Endosomen oder im Zytosol befinden. Diese Erkennung läuft über bestimmte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP). Weitere Erläuterungen und Abkürzungen finden sich im Fließtext.

IFN γ ist das einzige Typ II IFN und bindet an den IFN γ Rezeptorkomplex (IFNGR). IFN γ vermittelt vielfältige Immunantworten auf nicht-virale Pathogene, die teils synergistisch mit Tumornekrosefaktor- α (TNF α) wirken (Farrar and Schreiber, 1993). Hauptsächlich produzieren T-Helferzellen (T_h) IFN γ nach Stimulation mit Interleukin (IL)-12 zur Initiierung einer T_h1 Antwort.

Anhand von Knockout-Mäusen, denen entweder der Rezeptor für IFN α/β oder der Rezeptor für IFN γ fehlt, wird deutlich, dass sich die Funktionen dieser zwei IFN-Typen nur bedingt überschneiden. Ihre Wirkung unterscheidet sich hinsichtlich der Spezifität in der Pathogenabwehr. Typ I IFN sind hauptverantwortlich für die Immunabwehrreaktionen bei den meisten viralen Infektionen. IFN γ spielt bei der Abwehr intrazellulärer Bakterien und Parasiten eine wichtige Rolle. Es scheint so, als ergänzen sich Typ I und II IFN bei der Immunabwehr, um eine große Breite an infektiösen Erregern abzuwehren (Hwang et al., 1995; van den Broek et al., 1995). Menschen mit Gendefekten in Komponenten der IFN Signalweiterleitung (*Signal transducers and activators of transcription 1* (STAT1), Tyrosin Kinase 2 (Tyk2) oder

Protein unc-93 homolog B1 (UNC93B)) versterben oft an Virusinfektionen. Der Verlust von Typ I IFN scheint hierbei entscheidender als der von Typ II (Casrouge et al., 2006; Dupuis et al., 2003; Minegishi et al., 2006).

IFN regulieren die Expression von über 1000 Genen, die sogenannten *interferon-stimulated genes* (ISG). Diese Genvielfalt deutet auf spezifische Aktivitätsmuster für unterschiedliche Virustypen und Tumorentitäten hin (Dunn et al., 2006). Die Signalübertragung erfolgt über den JAK/STAT-Signalweg (Darnell et al., 1994; Velazquez et al., 1992). Initiiert wird die Signaltransduktion nach Bindung von IFN an ihre Rezeptoren durch die Familie der Januskinasen (JAK) Tyk2 und Jak1, die durch reziproke Transphosphorylierung aktiviert werden (Cohen et al., 1995). Nach Aktivierung der Signalkaskade werden mehrere Tyrosine in der intrazellulären Einheit von IFNAR1 und IFNAR2 phosphoryliert und danach werden Transkriptionsfaktoren, die als STAT bekannt sind, aktiviert. Aktivierte STAT werden wiederum von aktivierten JAK phosphoryliert und translozieren anschließend in den Zellkern, um die Transkription von ISG zu initiieren. Die Signalkaskade der Typ I und II IFN erfolgt im Prinzip zwar konkordant. Es zeigen sich jedoch markante Unterschiede, indem verschiedene Zielgene transkribiert werden (Platanias, 2005). Wie der vereinfachten Abbildung des IFN-Signalwegs zu entnehmen ist, bilden sich zwei unterschiedliche Komplexe zur Gentranskription (Abb. 2). ISG kodieren für zahlreiche Proteine antiviraler, antiproliferativer und immunregulatorischer Immunantworten. Die Spezifität dieser Immunantworten wird durch die unterschiedlichen bevorzugten Bindungsstellen der STAT-Dimere an spezifischen Promotorelementen ermöglicht.



Nature Reviews | Immunology

Die Aktivität der Interferone wird über mehrere Rezeptorkomplexe vermittelt. Typ I IFN binden an IFNAR, wohingegen Typ II IFN an IFNGR bindet. Durch Typ I IFN kommt es zur Rekrutierung und Phosphorylierung von STAT1 und STAT2. Während STAT Heterodimere mit *IFN regulatory factor 9* (IRF9) zum *IFN-stimulated gene factor 3* (ISGF3) Komplex assoziieren, bildet IFN γ mittels STAT Homodimeren den sogenannten *gamma-interferon activation factor* (GAF). Diese Komplexe translokieren in den Zellkern, um dort ISG von *IFN-stimulated regulatory elements* (ISRE) oder *gamma-activated sequence* (GAS) Promotorelementen zu induzieren.

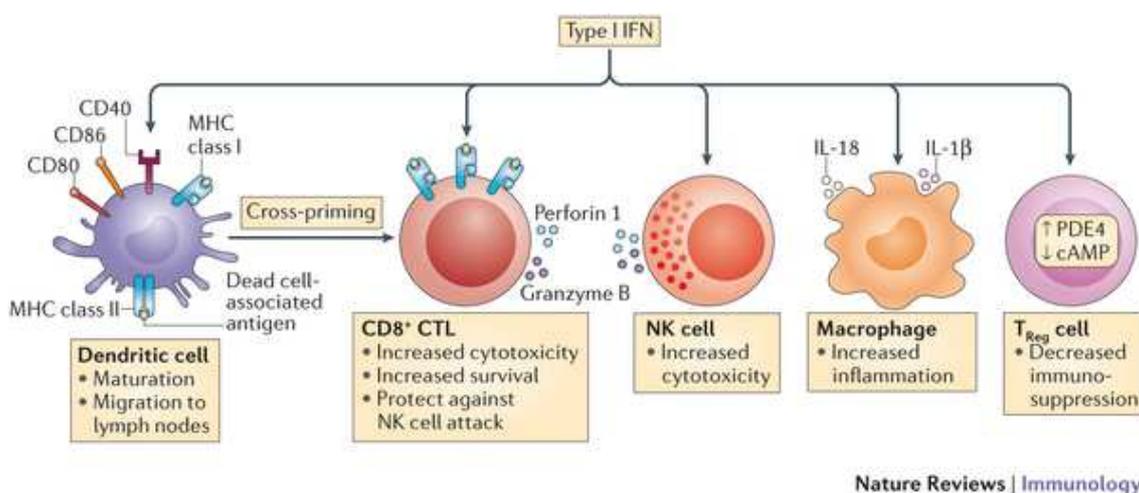
Abb. 2: Die JAK/STAT-Signalkaskaden (Platanias, 2005)

1.3.2 Rolle von Interferonen in der Immunüberwachung von Tumoren

IFN spielen bei allen drei Schritten des *cancer immunoeditings* eine wichtige Rolle. Sie beeinflussen über ISG die Aktivität von NK-Zellen, T-Zellen und DC (Abb. 3). Dabei unterscheiden sich die Rollen von Typ I und II IFN. Typ I IFN unterstützen CTL durch verschiedene Mechanismen: Zunächst werden Typ I IFN von DC bei der Antigen-Kreuzpräsentation benötigt. Typ I IFN stimulieren die Ausreifung von DC, indem sie die Antigenpräsentation verbessern und deren Migration in die Lymphknoten fördern (Papewalis et al., 2008). Im Mausmodell wurde gezeigt, dass in INFAR1-defizienten DC die Antigen-Kreuzpräsentation für CD8⁺-CTL gestört ist (Diamond et al., 2011). *Stimulator of IFN genes protein* (STING) ist ein Hauptregulator der angeborenen Immunabwehr und spielt eine zentrale Rolle bei der Typ I IFN Produktion von DC. DC von STING^{-/-}Mäusen zeigten ebenfalls eine defekte Antigen-Kreuzpräsentation für CD8⁺-CTL (Gajewski et al., 2013). Neben dem *Priming* wird die Effektorfunktion von

CTL durch verstärkte Expression von Perforin und Granzym B durch Typ I IFN gesteigert (Guillot et al., 2005). Darüber hinaus wird das Überleben von CTL Gedächtniszellen durch Typ I IFN gefördert und die Zytokinsekretion durch Makrophagen stimuliert (Ilander et al., 2014; Novikov et al., 2011). Über einen Signalweg, der die Aktivierung von Phosphodiesterase 4 (PDE4) und Depletion von zyklischem AMP (cAMP) umfasst, inaktivieren Typ I IFN die suppressive Funktion von T_{reg} (Bacher et al., 2013; Pace et al., 2010). Für das Pankreaskarzinom wurde gezeigt, dass nach Suppression von T_{reg} der antitumorale Effekt von IFN α gesteigert werden konnte (Aida et al., 2014). Typ I IFN können möglicherweise die Differenzierung und Ausreifung von MDSC in funktionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC) induzieren, wodurch der immunsupprimierende Effekt von MDSC wegfällt. Der stark MDSC-modifizierende Effekt von unmethyliertem Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG) und Polyinosinic:polycytidylic acid (poly(I:C)) ist von Typ I IFN abhängig (Zoglmeier et al., 2011). Typ I IFN können zudem Apoptose auslösen und vermitteln Zellzyklusarrest (Battle and Frank, 2002).

IFN γ wird von aktivierten Immunzellen in das Tumormilieu sezerniert. Es zeigte sich, dass IFN γ über STAT1 auf pankreatische Sternzellen (PSC) antiproliferativ wirkt (Fitzner et al., 2007; Lange et al., 2011). Zudem inhibieren Typ I und II IFN die Angiogenese, die Voraussetzung für neoplastisches Wachstum ist (Sidky and Borden, 1987). Tumore sind nicht nur auf die Proliferation maligner Zellen angewiesen, sondern benötigen ebenso die kontinuierliche Expansion oder Proliferation vaskulärer Komponenten. Unterbleibt die Ausbildung neuer Gefäße und Kapillaren, stagniert das Tumorwachstum.



Nature Reviews | Immunology

Abb. 3: Einfluss von Typ I IFN auf Immunzellen (Zitvogel et al., 2015)

Typ I IFN unterstützen CTL durch verschiedene Mechanismen: 1) Typ I IFN werden von DC bei der Antigen-Kreuzpräsentation benötigt. Sie stimulieren die Ausreifung von DC, indem sie die Antigenpräsentation verbessern und deren Migration in die Lymphknoten fördern. 2) Durch die gesteigerte Expression von Perforin und Granzym B fördern Typ I IFN die Effekte der CTL. 3)

Das Überleben von CTL Gedächtniszellen wird durch Typ I IFN verbessert. Zudem steigern Typ I IFN die Stimulation der Zytokinsekretion durch Makrophagen und vermindern die suppressive Funktion von T_{reg}.

Die Rolle von IFN γ im Tumor scheint jedoch zweiseitig zu sein. Einerseits zeigte eine der ersten Studien, die den Beitrag der IFN beim *cancer immunoediting* untersuchte, dass IFN γ das immunogene Potential des Tumors fördert, sodass dieser effektiver vom Immunsystem bekämpft werden kann (Kaplan et al., 1998). Es leistet im Zuge der adaptiven Immunantwort einen Beitrag in der Eliminationsphase durch seine direkten zytotoxischen Eigenschaften auf Tumorzellen. Andererseits unterdrückt IFN γ unter bestimmten Umständen T-Helferzellen, sodass Typ II IFN auch eine tumorfördernde Wirkung zugeschrieben werden kann (Zaidi and Merlino, 2011). Auf der anderen Seite zeigten O'Sullivan et al., dass das angeborene Immunsystem sogar in Abwesenheit des adaptiven Immunsystems über NK-Zellen, IFN γ , sowie M1 Makrophagen in der Lage ist Tumorwachstum zu verhindern (O'Sullivan et al., 2012). Mittels eines CD40-agonistischen Antikörpers konnten gegen Tumorzellen gerichtete Makrophagen aktiviert werden. In einem genetischen PDAC-Mausmodell waren CD40-stimulierte Makrophagen in der Lage, unabhängig von T-Zellen Tumorregression herbeizuführen (Beatty et al., 2011).

1.3.3 Klinische Studien zum Einsatz von Interferonen

In der Vergangenheit wurde für IFN- α 2b (IFN α) sowohl ein inhibitorischer Effekt auf das Tumorwachstum, als auch sensibilisierende Eigenschaften bezüglich Radiochemotherapie, Tumorimmunogenität und Immunmodulation beschrieben (Pfeffer et al., 1998). Adjuvantes IFN α in Kombination mit Cisplatin, Fluorouracil (5-FU) und Radiotherapie wurde in klinischen Studien zur Therapie des Pankreaskarzinoms getestet, jedoch zeigte sich in der Phase-III-CapRi-Studie kein signifikant verbessertes Überleben des Studienarms mit Radiochemotherapie und IFN α gegenüber der Kontrollgruppe mit 5-FU und Folsäure (Nukui et al., 2000; Picozzi et al., 2003; Schmidt et al., 2012b). Die Kombination von adjuvantischem IFN α mit Gemcitabin und Radiochemotherapie führt im Vergleich zur Kombination mit 5-FU zu vergleichbarer Überlebensdauer (Linehan et al., 2008). Nach Resektion eines PDAC erscheint adjuvantes IFN α in Kombination mit Cisplatin, Fluorouracil und Radiotherapie in wenigen Fällen ein Langzeitüberleben zu ermöglichen (Rocha et al., 2016). Der neoadjuvante Einsatz von IFN α zeigt ohne anschließende Resektion keinen Überlebensvorteil (Jensen et al., 2014). Die Sicherheit und Effektivität von rekombinantem IFN α 2a und IFN α 2b, entweder als alleinige immunstimulatorische

Intervention oder in Kombination mit anderen Therapieregimen, wird derzeit in über 100 offenen klinischen Studien getestet (Zitvogel et al., 2015).

1.4 Zytosolische Helikasen als Zielstrukturen der Tumorimmuntherapie

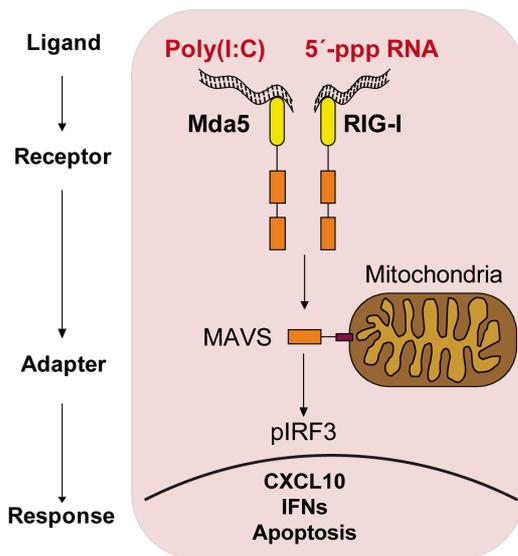
1.4.1 Interferoninduktion durch die Erkennung von Gefahrensignalen

Das Immunsystem ist in der Lage eine Unterscheidung zwischen „Fremd“ und „Selbst“ vorzunehmen. So können Mikroorganismen von körpereigenen Strukturen unterschieden werden. Pathogene Strukturen werden anhand ihrer *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) bzw. *microorganism-associated molecular patterns* (MAMP) und endogene Pathogene mittels der *danger-associated molecular patterns* (DAMP) unterschieden (Schmidt et al., 2012a). Immunzellen des angeborenen Immunsystems, wie DC, Makrophagen und Granulozyten, besitzen PRR, die zur Erkennung dieser Mustererkennungssequenzen dienen. Zu den PRR gehören *Toll-like-Rezeptoren* (TLR), *nucleotide binding and oligomerization domain-like receptors* (NLRs), Dectin-1, Scavenger-Rezeptoren, C-Typ (Calcium-abhängige) *Lectin-like-Rezeptoren* (CLR) und die Familie der *Retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I)-like-Helikasen (RLH) (Bertin et al., 1999; Brown and Gordon, 2001; McGreal et al., 2005; Peiser et al., 2002; Takeda and Akira, 2005; Yoneyama et al., 2004). Einige PAMP, darunter einzelsträngige und doppelsträngige RNA (ss/dsRNA), werden von endosomalen TLR7/8, TLR3 und zytosolischen RLH erkannt (Alexopoulou et al., 2001; Schmidt et al., 2012a; Takeda and Akira, 2005). Nach Pathogenerkennung werden verschiedene Signaltransduktionswege aktiviert, die in der Produktion von Typ I IFN resultieren.

1.4.2 RIG-I-like-Helikasen (RLH)

Retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I), *Melanoma differentiation-associated antigen 5* (MDA5) und *Laboratory of Genetics and Physiology 2* (LGP2) sind Mitglieder der RLH-Familie zytosolischer PRR. RLH erkennen virale RNA und initiieren eine Typ I IFN-basierte antivirale Immunantwort während der Virusreplikation. Sowohl für RIG-I, als auch für MDA5 stehen synthetische Liganden zur Verfügung. Dabei handelt es sich um Liganden wie *in vitro* transkribierte RNA mit einer Triphosphatgruppe am 5' Ende (ppp-RNA) bzw. multimeres Polyinosinic:polycytidylic acid (poly(I:C)) (Gitlin et al., 2006; Hornung et al., 2006; Pichlmair et al., 2006). Liganden und Funktionen für LGP2 sind jedoch bisher wenig charakterisiert worden. Während Pichlmair et al. davon ausgingen, dass Ribonukleinsäure (RNA)-Oligonukleotide mit einer 5'-Triphosphat Gruppe (ppp-RNA) zur maximalen RIG-I Aktivierung nötig seien, zeigte eine neuere

Arbeit, dass auch eine 5'-Diphosphat-ständige RNA zur RIG-I-Aktivierung ausreicht (Goubau et al., 2014).



Modifizierte Abb. (Besch et al., 2009). Durch die Bindung von poly(I:C) an MDA5 bzw. 5'-ppp-RNA an RIG-I kommt es zur Interaktion mit dem auf Mitochondrien lokalisierten Adaptermolekül MAVS. Infolge dessen werden mittels Phosphorylierung der Signaltransduktionsfaktoren IRF3 und IRF7 Typ I IFN Gene induziert. Sezernierte Interferone vermitteln die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Apoptose-induzierenden Genen.

Abb. 4: Immunstimulatorischer Effekt der beiden RLH-Liganden poly(I:C) und 5'-Triphosphat RNA

RIG-I oder MDA5 interagieren nach Aktivierung durch 5'-Triphosphat RNA oder poly(I:C) mit dem auf Mitochondrien lokalisierten Adaptermolekül *mitochondrial antiviral-signalling protein (MAVS; auch bekannt unter IPS-1, Cardif oder VISA)* (Kawai et al., 2005) (Abb. 4). Das Adaptermolekül MAVS ist strukturell aus einer *caspase activation and recruitment domain (CARD)*, einer Prolin-reichen Region und einer transmembranen Domäne, die die intrazelluläre Verankerung gewährleistet, aufgebaut. RLR interagieren mit MAVS über eine homotype CARD-CARD Bindung (Loo and Gale, 2011). Nach Interaktion von RIG-I oder MDA5 mit MAVS erfolgt eine durch IRF3, IRF7 und NFκB vermittelte Immunaktivierung (Paz et al., 2006). Diese führt zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Typ I IFN. Die Assoziation von RIG-I oder MDA5 mit MAVS aktiviert einen Signalweg, der über die E3 Ubiquitin Ligase *tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor-6 (TRAF-6)* und die Serin/Threonin-Kinase *TANK-binding kinase 1 (TBK1)* zur Phosphorylierung von IRF3 führt. IRF3 transloziert in den Nukleus und induziert die Expression von Typ I IFN. Mit Ausnahme von plasmacytoiden DC wird IRF3 in den meisten Zelltypen konstitutiv exprimiert, während die IRF7-Expression niedrig ist, bis es in Gegenwart von IFN in einem positiven Rückkopplungsmechanismus induziert wird (Sato et al., 1998). Neben den IRF aktiviert MAVS NFκB durch die Serin/Threonin-Kinasen IKKα, IKKβ. NFκB führt im Nukleus zur Transkription der Gene für proinflammatorische Zytokine wie TNFα, IL-1β und IL-6 (Schmidt et al., 2012a).

Die Immunabwehr gegenüber Viren und Tumoren weist zentrale Gemeinsamkeiten auf, da sie jeweils Typ-I-IFN-abhängig ist und auf einer zytotoxischen T-Zellantwort beruht. Daher kann eine Virusinfektion durch zielgerichteten Einsatz von PAMP simuliert werden, um im Zuge der daraufhin initiierten Immunantwort den Tumor zu bekämpfen. RIG-I Aktivierung führt einerseits zur selektiven antitumoralen Aktivität durch Apoptoseinduktion und andererseits zu einer starken Typ I IFN Induktion in ppp-RNA-stimulierten Tumorzellen und Immunzellen. Die antitumorale Wirksamkeit basiert unter anderem auf der Zytokinsekretion (IFN α , IFN β und IL-12), der Expression von *major histocompatibility complex I* (MHC-I) auf der Tumorzelloberfläche und der Apoptoseinduktion (Besch et al., 2009; Duewell et al., 2014).

Zwei Phänomene ermöglichen, dass bei systemischer Applikation der synthetischen RLH-Liganden eine tumorspezifische Apoptoseinduktion möglich ist. Erstens wird in Tumorzellen IFN-unabhängig intrinsische Apoptose induziert, während nicht-maligne Zellen durch die Hochregulation von *B-cell lymphoma-extra large* (Bcl-x_L) geschützt sind (Besch et al., 2007; Poeck et al., 2008). Ausgelöst wird der intrinsische Weg durch Aktivierung der *Bcl-2 homology domain 3* (BH3)-only Proteine Puma und Noxa (Besch et al., 2009; Ellermeier et al., 2013). Zweitens beschreibt „*synthetic lethality*“ das Phänomen, dass Tumorzellen mehr auf endogene Todessignale ansprechen, als nicht-maligne Zellen, da zahlreiche Mutationen bei der Tumorgenese mit einer erhöhten Vulnerabilität gegenüber bestimmten apoptotischen Stimuli einhergehen (Hartwell et al., 1997). *In vitro* konnte ferner belegt werden, dass RLH-Liganden über die Hochregulation des Todesrezeptors Fas (CD95) auf der Tumorzellmembran eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Fas-Ligand-induzierter extrinsischer Apoptose induzieren (Duewell et al., 2015; Duewell et al., 2014). Dies könnte einen wesentlichen Beitrag zur Immunzell-vermittelten Tumorabtötung darstellen.

Unsere Arbeitsgruppe zeigte, dass in Pankreaskarzinomzellen nach Behandlung mit RLH-Liganden ein immunogener Tumorzelltod ausgelöst wird. Als einen entscheidenden Faktor konnte Typ I IFN identifiziert werden, welches zur DC-Aktivierung und zur verbesserten Präsentation von Tumorantigen im Kontext von MHC-I-Molekülen führt. Das Ergebnis war eine Expansion und Aktivierung von gegen den Tumor gerichteten T-Zellen (Duewell et al., 2014). Diese Ergebnisse können dahingehend interpretiert werden, dass RLH-induzierte Tumorzellapoptose und verbesserte Antigenpräsentation dazu führen, dass Tumore in Tumorstoffen transformiert werden (van den Boorn and Hartmann, 2013).

Bislang konnte sich noch kein immuntherapeutischer Ansatz in der Therapie des Pankreaskarzinoms etablieren (Seufferlein et al., 2013). Synthetische RLH-Liganden wie ppp-RNA oder poly(I:C) stellen jedoch durch die dargestellten Effekte innovative Therapieansätze in der Tumorimmuntherapie dar, die zumindest der präklinischen Evaluation standhalten. Bevor eine klinische Evaluation in Frage kommt, sollten jedoch noch grundlegende Fragestellungen bearbeitet werden. Neben Aufdeckung einer potenziellen Therapieresistenz sollten Möglichkeiten erforscht werden, wie die Effektivität der RLH-basierten Immuntherapie verbessert werden kann.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

In Vorarbeiten wurden die zytosolischen Helikasen RIG-I und MDA5 als Zielstrukturen für eine Immuntherapie des Pankreaskarzinoms identifiziert. Bei den RLH handelt es sich um IFN-induzierbare Gene. In der vorliegenden Arbeit soll anhand verschiedener muriner und humaner Pankreaskarzinomzelllinien untersucht werden, ob durch die Kombination von Typ I bzw. Typ II IFN mit RLH-Liganden ein additiver Effekt auf die Funktion von RIG-I in Pankreaskarzinomzellen erreichbar ist. Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

1. Welchen Einfluss üben IFN α , IFN β und IFN γ auf die RLH-Expression in humanen und murinen Pankreaskarzinomzellen auf mRNA- und Proteinebene aus?
2. Führt eine IFN-basierte Hochregulation von RIG-I zu einer verbesserten funktionellen RLH-Aktivität?
3. Lässt sich durch Kombination von IFN mit dem RLH-Liganden ein synergistischer Effekt in Bezug auf Tumorapoptose, Zytokinproduktion und Überleben in murinen Pankreaskarzinommodellen erreichen?

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Reagenzien

2.1.1 Technische Ausstattung

<i>Fluorescence activated cell sorting</i> (FACS) Calibur, FACS Canto II	BD, San Jose, USA
Mithras LB940 ELISA-Plattenlesegerät	Berthold, Bad Wildbad, DE
Inverses Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena, DE
Photometer: Ultrospec 3000 pro	GE Healthcare Europe, Freiburg, DE
LightCycler 480 instrument	Roche Diagnostics, Penzberg, DE
Nanodrop ND-2000	NanoDrop, Wilmington, USA
PerfectBlue™ Twin Double Gel Systems	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, DE
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen, DE

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Pufferlösungen

Agarose LE	Biozym, Hess. Oldendorf, DE
<i>Aqua ad injectabilia</i>	Braun AG, Melsungen, DE
Chloroform	Sigma Aldrich, Steinheim, DE
Collagense D	Roche, Mannheim, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Steinheim, DE
DNAse I	Roche, Mannheim, DE
Elisa Substrate Reagent A/B	BD Pharmingen, San Diego, USA
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
FACSFlow, FACSSafe	BD, Heidelberg, DE
Heparin-Natrium 2.500 IE / 5ml	B.Braun AG, Melsungen, DE
Isofluran (Forene®)	Abbott, Wiesbaden, DE
Isopropanol (70 Vol%)	Apotheke Innenstadt, LMU München, DE
Lipofectamine™ RNAiMAX	Invitrogen, Darmstadt, DE
LC 480 Probes Maser Kit	Roche Diagnostics, Penzberg, DE
Natriumchlorid 0,9%	Apotheke Innenstadt, LMU München, DE
<i>In vivo</i> -JetPEI®	Peqlab, Erlangen, DE
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Aldrich, Steinheim, DE
Poly (I:C)-HMW (high molecular weight)	Invivogen, San Diego, USA
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄ , 2N)	Apotheke Innenstadt, LMU München, DE
Tris-Hydroxymethylaminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Tween 20	Roth, Karlsruhe, DE
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Triton® X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Trizol Reagent	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
PageRuler® Plus Prestained Protein	Fermentas, St. Leon-Rot, DE

Ladder	
ECL Substrat	GE Healthcare, München, DE
Vectashield® w/ 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Propidium Iodid (PI)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
7-Aminoactinomycin D	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA

2.1.3 Tierexperimentelle Arbeitsmaterialien

Prolene® 4-0 Nahtmaterial	Ethicon, Norderstedt, DE
U100 - Insulinspritze	BD, Heidelberg, DE
Präparierbesteck, sterilisierbar	RSG, Solingen, DE
Glaskapillare, heparinisiert	Hirschmann, Eberstadt, DE
Skalpelle	PFM, Köln, DE
Schublehre	Milian, Genf, CH

Bestandteile der Narkose

Medetomidin (0,5 mg/kg KG) (Dormitor®, Pfizer, NY, USA)
Midazolam (5 mg/kg KG) (Dormicum®, Ratiopharm, Ulm, DE)

Bestandteile der Antagonisierung

Atipamezol (2,5 mg/kg KG) (Antisedan®, Pfizer, NY, USA)
Flumazenil (0,5 mg/kg KG) (Anexate®, Deltaselect, Dreieich, DE)

2.1.4 Zellkulturmaterialien und -medien

Trypsin (10x)	PAA, Pasching, AT
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), high glucose	Sigma Aldrich, Steinheim, DE
L-Glutamin 200mM	PAA, Pasching, AT
Penicillin / Streptomycin (100x)	PAA, Pasching, AT
HEPES Puffer 1M	Sigma Aldrich, Steinheim, DE
Fötale Kälberserum (FCS)	GibcoBRL, Karlsruhe, DE
MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit	LONZA, Köln, Deutschland
Phosphate-buffered saline (PBS)	PAA, Pasching, Österreich
OptiMEM	GibcoBRL, Karlsruhe, DE

2.1.5 Zytokine

Rekombinantes murines Interferon α	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, DE
Rekombinantes murines Interferon β 1	BioLegend, San Diego, USA
Rekombinantes humanes Interferon β 1a	Immunotools, Friesoythe, DE
Rekombinantes murines Interferon γ	Immunotools, Friesoythe, DE

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Cryo`sTM	Greiner, Frickenhausen, DE
Eppendorfgefäße: Safe-Lock Tubes	Eppendorf, Hamburg, DE
Polystyrene Roundbottom Tubes	Dickinson, San Jose, USA
PCR-Tubes	Biozym, Hess. Oldendorf, DE
Falcon Cell Strainer 40 µm /100 µm	Becton Dickinson, San Jose, USA
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, DE
5ml / 20ml Spritze	Becton Dickinson, San Jose, USA
1ml Einmalspritzen	Norm-Ject Henke Sass Wolf, Tuttlingen, DE
0,4x19mm Nadel	Becton Dickinson, San Jose, USA
Nitrocellulose-Membran	GE Healthcare, München, DE
Zellkulturflaschen 175 cm ³ / 75 cm ³	Greiner, Frickenhausen, DE
6- / 12- / 24- / 48-Well-Flachboden Zellkulturplatte	Becton Dickinson, San Jose, USA
96-Well-Rundboden Zellkulturplatte	Greiner, Frickenhausen, DE

2.1.7 Lösungen und Puffer

Annexin-V Bindungs-Puffer:

PBS + 10 mM HEPES/NaOH (pH 7,4) + 140 mM NaCl + 2,5 mM CaCl₂

SDS-PAGE Gelelektrophorese:

Lämmli-Puffer (5x)

250 mM Tris-HCL (pH 6,8)
40 Vol % Glycerol
5 % (w/v) SDS
10 Vol % Mercaptoethanol
0,05 % (w/v) Bromphenolblau in Aqua dest.

Ladepuffer (5x)

ddH₂O
30% Acrylamid
0,5 M Tris-Cl
10% APS
TEMED

Laufpuffer (10x)

ddH₂O
1 % SDS (Natriumdodecylsulfat)
0,25 M Tris-Cl
2 M Glycin
pH 8,3

TBST-Puffer

50 mM Tris
150 mM NaCl
0.05% Tween 20

2.1.8 Kits

Cytokine ELISA sets

Murines CXCL10	R&D Systems, Wiesbaden, DE
Humanes CXCL10	R&D Systems, Wiesbaden, DE

In vitro Transkription

MEGAscript TM T7 Kit	Ambion [®] , Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
---------------------------------	---

RNA Isolation, reverse Transkription, qRT-PCR

peqGOLD Total RNA Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
RNeasy Mini Kit (50)	QIAGEN Hamburg GmbH, Hamburg, DE
Thermo Scientific RevertAid First Strand	ThermoScientific, Schwerte, DE
Protoscript First Strand DNA synthesis Kit	New England BioLabs, Frankfurt, DE
LightCycler TaqMan Master kit	Roche Diagnostics, Penzberg, DE
Universal Probes Library	Roche Diagnostics, Penzberg, DE

Zellviabilitätsassay

Cell Titer-Blue [®] Cell Viability Assay	Promega, Madison, USA
FLICA [™] Caspase 3, 7, 8, 9 Assay Kits, green	Immunochemistry Technologies, Bloomington, USA
Caspase-9 Activity Detection Kit	Abcam, Cambridge, UK
In Situ Cell Death Detection Kit: <i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i> (TUNEL)-Färbung	Roche, Mannheim, DE

Proteinaufreinigung und -quantifizierung

Bio-Plex Zellysat Kit	BioRad, München, DE
Bradford Assay - Protein Assay Kit	BioRad, München, DE

2.1.9 Antikörper**FACS Antikörper**

APC Annexin V	ImmunoTools GmbH, Friesoythe, DE
FITC anti-mouse H-2 kb	Bio Legend, San Diego, USA
FITC Mouse IgG2a, κ Isotype Control	BD Pharminogen [™] , San Diego, USA
APC Hamster IgG1, λ 1 Isotype Control	BD Pharminogen [™] , San Diego, USA
APC Rat IgG1 κ Isotype Control	eBioscience, Frankfurt / Main, DE

Western Blot Antikörper

Phospho-IRF-3 (Ser396) (4D4G) (#4947)	Cell Signaling, Danvers, USA
Phospho-Stat1 (Tyr701) (#9171)	Cell Signaling, Danvers, USA
Caspase-3 (#9662)	Cell Signaling, Danvers, USA
Caspase-3 Kontrolle Zellysat (#9663)	Cell Signaling, Danvers, USA
Caspase-9, human (#9502)	Cell Signaling, Danvers, USA
Caspase-9 (C9), murin (#9508)	Cell Signaling, Danvers, USA
Cleaved Caspase-3 (Asp175) (#9661)	Cell Signaling, Danvers, USA
Cleaved Caspase-9 (Asp353), murin (#9509)	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-IRF3 Antikörper (ab25950)	Abcam, Cambridge, GB
Anti- β Actin- Ladungskontrolle (ab8227)	Abcam, Cambridge, GB
RIG-I, mAb (Alme-1)	Enzo Life Sciences (ELS), Lausen, CH
MDA5, human, pAb (AT113)	ELS AG, Lausen, CH
goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005	Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA
goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2004	Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA

2.1.10 Software

Adobe Illustrator CS4	Adobe System, San Jose, USA
FACSDiva 7.0	BD Biosciences, San Diego, USA
Light Cycler 4.1	Roche Diagnostics, Penzberg, DE
Endnote X6	Thompson Reuter, Carlsbad, USA
FlowJo 8.7	Tree Star, Ashland, USA
Excel 2011	Microsoft Office, Redmond, USA
Graphpad Prism 5	GraphPad Software, Inc., La Colla, USA
ImageJ 1.48v	National Institutes of Health, USA

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Zelllinien

Durch orthotope Injektion von 3-Methylcholantren wurde in C57BL/6 Mäusen ein Pankreaskarzinom induziert und die Panc02-Zelllinie generiert (Corbett et al., 1984). Herzlichen Dank an Prof. Christiane Bruns (Universitätsklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie Magdeburg) und Prof. Peter Nelson (Medizinische Klinik und Poliklinik IV - LMU München) für die Bereitstellung von Panc02-Zellen. T110299-Zellen wurden aus einem primären Pankreastumor von Ptf1aCre;Kras^{G12D};p53^{fl/R172H} Mäusen etabliert und uns freundlicherweise von Prof. Jens Siveke (Medizinische Klinik und Poliklinik II, TU München) überlassen (Hingorani et al., 2005).

Die humanen Pankreasadenokarzinom-Zelllinien PANC-1, MIAPaCa-2 und BxPC-3 wurden von der „*American Type Culture Collection*“ erworben (ATCC, Manassas, VA, USA) (Lieber et al., 1975; Tan et al., 1986; Yunis et al., 1977). PaTu8988t stammt aus der „*German Collection of Cell Lines*“ (DSMZ, Braunschweig, Deutschland). IMIM-PC-1 wurde freundlicherweise von Prof. Patrick Michl (Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Halle) zur Verfügung gestellt (Vila et al., 1995).

2.2.2 Kultivierung von Zellen

Die Zelllinien wurden in einem Zellkulturschrank (CO₂-Inkubator für Zellkultur, Heraeus) bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%, einem CO₂-Gehalt von 5% und einer Temperatur von 37 °C kultiviert. Für Zellexperimente werden sterile Bedingungen durch eine *Laminar-Air-Flow* sichergestellt. Kultiviert wurden die Tumorzelllinien in 75 cm² Flaschen in DMEM High Glucose Medium mit 10% FCS, 100 U/I Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 2mM L-Glutamin (Vollmedium). Das FCS wurde bei 56 °C für 30 Minuten (min) hitzeinaktiviert. Eine Kontamination mit Mycoplasmen wurde in

regelmäßigen Abständen mit dem MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit (Lonza) ausgeschlossen.

2.2.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Trypanblau-Ausschlussfärbung

In einer 0,4% Trypanblau-Lösung wurden Zellen verdünnt und mittels Neubauer-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop (Axiovert 25, Zeiss) ausgezählt. Der Trypanblau-Exklusionstest ermöglicht die Unterscheidung zwischen toten und vitalen Zellen, da sich tote Zellen bei gestörter Membranintegrität blau anfärben, während vitale Zellen den Farbstoff ausschließen.

2.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Ca. $1-5 \times 10^6$ Zellen wurden vor dem Einfrieren in Kryo-Röhrchen mit 900 µl FBS und 100 µl DMSO überführt. Nach 24h Kühlung bei -80 °C wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff eingelegt. Die Zellen wurden bei Bedarf aus dem Stickstofftank entnommen und schnellstmöglich in temperiertem Kulturmedium (37 °C) resuspendiert. Zur Kultivierung wurden die Zellen gewaschen, gezählt und in frisches Kulturmedium gegeben.

2.2.5 Tumorzellaussaat, Vorstimulation und Transfektion

Eine definierte Anzahl Zellen wurde in Kulturschalen (6-, 12- oder 24-Well) ausplattiert. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert und in Kulturmedium aufgenommen. Bei 400xg wurde die Zellsuspension für 5 min bei $+4\text{ °C}$ zentrifugiert. Nur das Zellpellet am Bodensatz wurde erhalten, in 1 ml Kulturmedium resuspendiert und gezählt. Je nach Versuchsaufbau wurde die gewünschte Zelldichte durch Verdünnung mit Kulturmedium hergestellt. Je nach Plattengröße wurden die einzelnen Wells der Zellkulturplatten mit 0,5 bis 1,5 ml Kulturmedium gefüllt. Mindestens vier Stunden ruhten die Zellen, um adhärent zu sein und etwa 50% Konfluenz zu erreichen.

2.2.5.1 Vorstimulation mit Interferonen

Eine definierte Menge an IFN (Units/ml) wurde in Antibiose-freiem Medium angesetzt und anschließend die gewünschte Menge in das entsprechende Well der Kulturschale pipettiert. Standardmäßig wurden 1000 U/ml verwendet und weitere Verdünnungen erstellt. Vor der Zugabe von IFN, sowie bei alleiniger Transfektion ohne Vorstimulation durch IFN wurde das Antibiose-freie Medium gewechselt.

2.2.5.2 *In vitro* Transfektion

In Vorarbeiten wurde durch Kreuztitrationen das richtige Konzentrationsverhältnis zwischen der zu transfizierenden RNA und dem Transfektionsreagenz ermittelt. Zur Kontrolle diente für die Transfektion immer eine doppelsträngige RNA ohne 5'-Triphosphatmodifikation (OH-RNA). Für die nicht modifizierte OH-RNA wurde folgende unspezifische Sequenz verwendet und von Eurofins (Eberberg, Deutschland) erworben: 5'-GCGCUAUCCAGCUUACGUAdTdT-3'. Die passende 5'-Triphosphat-modifizierte RNA (ppp-RNA) wurde nach Vorlage der korrespondierenden DNA-Matrize umgeschrieben. Folgende DNA-Sequenzen wurden als Matrize für die Transkription der ppp-RNA verwendet: (sense) 5'-TACGTAAGCTGGATAGCGCTATAGTGAGTCG-3' bzw. (antisense) 5'-GCGCTATCCAGCTTACGTATATAGTGAGTCG-3'. Die erwünschte Menge RNA und entsprechende Menge Transfektionsreagenz *LipofectamineTM RNAiMax* wurde zunächst getrennt in gleichem Volumen OptiMEM angesetzt. Die eingesetzte Menge *LipofectamineTM RNAiMax* betrug für die ppp-RNA 1,5 µl pro 3000 ng und für poly(I:C) 2,5 µl pro 1000 ng. Der Unterschied im Verhältnis von *LipofectamineTM RNAiMax* zu ppp-RNA oder poly(I:C) erklärt sich durch die geringere Molekülgröße der ppp-RNA, wodurch weniger Lipidmoleküle zur Komplexbildung ausreichen. Nachdem die Ansätze zusammengemischt wurden, entstand nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) komplexierte RNA.

2.3 *In vivo* Versuche

2.3.1 Versuchstiere und Haltung

Weibliche, sechs Wochen alte C57BL/6 Mäuse (Harlan-Winkelmann, Borcheln, DE) wurden nach mindestens einer Woche Eingewöhnungszeit in der Tierhaltung für Versuche eingesetzt. Die Tierexperimente erfolgten im Rahmen des von der Regierung von Oberbayern genehmigten Tierversuchsantrags Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-143-09. Die Mäuse wurden in einem Tierstall der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der Universität München entsprechend der Hygienevorschriften gehalten. Durch ausgebildete Tierpfleger wurden die Mäuse mit Pelletfutter und Wasser versorgt. Es wurden maximal sechs bis acht Mäuse pro Käfig gehalten. Mittels einer Zeitschaltuhr wurde ein zwölfstündiger hell/dunkel-Rhythmus eingehalten.

2.3.2 Induktion von subkutanen Pankreastumoren

Den Mäusen wurden zur Tumorinduktion $0,5 \times 10^6$ Panc02-Zellen, suspendiert in 100 μ l PBS, subkutan in die rechte Flanke injiziert. Während der Injektion bildete sich eine subkutane Vorwölbung, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Flüssigkeit aus dem Stichkanal zurück trat. Die Tumorgröße wurde dreimal pro Woche ermittelt. Dazu wurde mit einer digitalen Schiebelehre die Tumorgröße nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Tumorquerdurchmesser (mm)} \times \text{Tumurlängsdurchmesser (mm)} = \text{Tumorgröße (mm}^2\text{)}$$

Nach 10-14 Tagen bildete sich bei einer Größe von 25-100 mm^2 ein gut messbarer, palpabler Tumor aus. Sobald die Tumorfläche 100 mm^2 (max. 10 x 10 mm) überschritt, der Tumor ulzerierte oder das Verhalten der Mäuse durch den Tumor beeinflusst wurde, wurden die Mäuse unter Isoflurannarkose per zervikaler Dislokation getötet. In Kaplan-Meier-Kurven wurde das Überleben in Prozent aufgetragen und analysiert.

2.3.3 Induktion orthotoper Pankreastumore

Die Implantation des Tumors im Pankreas erlaubt im Vergleich zur subkutanen Lokalisation die lokale Pathologie, Vaskularisierung, Invasion und Metastasierung des Pankreaskarzinoms im Gastrointestinaltrakt realistischer abzubilden (Qiu and Su, 2013b). Für die Operation wurden pro Maus intraperitoneal (i.p.) 7,5 μ l / 1 g Körpergewicht Narkoseansatz verabreicht (siehe 2.1.3). Nach 5 min bestand in der Regel eine ausreichende Narkosetiefe, was durch abdominelle Hautstimulation überprüft wurde.

Nach Desinfektion wurde in der linken abdominellen Flanke ein 1 cm langer Zugang angelegt, die Bauchhöhle nach Durchtrennung der Muskelschichten eröffnet und das Pankreas zusammen mit der Milz mobilisiert. Per Insulinkanüle wurden 2×10^5 Panc02-Zellen suspendiert in 40 μ l PBS in den Pankreaskopf injiziert. Anschließend wurde das Pankreas und die Milz reponiert, sowie das Abdomen mittels Prolene® 4-0 Faden verschlossen. Die Narkose wurde nach Beendigung der Operation durch 10 μ l / 1 g Körpergewicht eines Antagonisierungs-Cocktails aufgehoben (siehe 2.1.3).

Während der Aufwachphase der Tiere diente eine Wärmelampe zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur. Allgemeinzustand und Gewicht der Mäuse wurden initial zweistündlich, nach Stabilisierung täglich bzw. nach Bedarf überwacht. Zur

postoperativen Schmerztherapie wurde Buprenorphin über zwei Tage verabreicht (Tagesdosis: 300 µg/Maus, verteilt auf 3-4 Einzelgaben). Als Abbruchkriterien wurden blutige Stühle, klinisch manifeste funktionelle Störungen, verminderte Reaktion der Tiere auf Umweltreize und ein Gewichtsverlust um mehr als 20% des Ausgangsgewichts definiert.

2.3.4 Tumorthherapie

Mit der Therapie wurde aufgrund der Erfahrung aus früheren Versuchen sieben Tage nach Tumorinduktion begonnen. Zur Therapie mit rekombinantem IFN α wurden 5×10^4 IU/ml intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Nach 18 h und 72 h erfolgte die i.p. RNA-Injektion mit OH-RNA bzw. ppp-RNA oder poly(I:C). Die Ansätze für ppp-RNA und poly(I:C) können der Tabelle 1 und Tabelle 2 entnommen werden. Nach getrenntem RNA- und jetPEI-Ansatz gemäß Herstellerprotokoll wurde das Transfektionsreagenz der RNA zugegeben, durchmischt und für 15 min komplexiert. Serum wurde 6 h nach der ersten RNA-Injektion für Zytokinanalysen abgenommen.

Tabelle 1: Tumorbehandlung mit ppp-RNA

100 µl RNA Ansatz	100 µl jetPEI Ansatz
50 µl Glucose 10%	50 µl Glucose 10%
50 µg ppp-RNA	6 µl jetPEI (N/P-Ratio 6)
Ad 100 µl steriles H ₂ O	44 µl steriles H ₂ O

Tabelle 2: Tumorbehandlung mit poly(I:C)

25 µl RNA Ansatz	25 µl jetPEI Ansatz
25 µl Glucose 10%	25 µl Glucose 10%
25 µg Poly(I:C)	6 µl jetPEI (N/P-Ratio 6)
Ad 50 µl steriles H ₂ O	19 µl steriles H ₂ O

2.3.5 Blutentnahme

Zur Gewinnung von Vollblut wurden die Mäuse mit Isofluran (Forene[®]) narkotisiert. Die Narkose wurde nur zur Blutentnahme für wenige Sekunden aufrecht erhalten, so war keine Antagonisierung des Narkotikums nötig war. Die Narkose verhindert eine Verletzung der Tiere durch Abwehrbewegungen. Die Blutentnahme erfolgte entweder aus dem retroorbitalen Venenplexus oder der Schwanzvene mithilfe einer heparinisierten Mikrokapillare. Zur Gewinnung von 50 µl Serum wurde das gesammelte

Blut auf Eis transportiert und bei 1000 g für 10 min zentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde bei -20 °C gelagert.

2.3.6 Herstellung von Tumorlysat für RNA Isolation und Zytokingewinnung

Der entnommene Tumor wurde in zwei etwa gleich große Hälften zertrennt. Aus einer Hälfte wurden Kryoschnitte angefertigt. Die andere Hälfte wurde nochmals halbiert und zu gleichen Teilen für die RNA Isolation und die Herstellung von Tumorzelllysat zur Proteingewinnung in flüssigem Stickstoff gefroren und gekühlt. Gefrorenes Tumorgewebe wurde zur Herstellung von Tumorlysat im Stickstoffbad mittels Mörtel zerstampft und homogenisiert. Das entstandene feine Pulver wurde in 100-250 µl Lyse-Puffer (bio-Plex Cell Lysis Kit, BioRad, München, DE) lysiert und mindestens 30 Sekunden lang gevortext, bis sich eine zähe Masse ausbildete. Das Lysat wurde auf Eis gelagert und bei 0 °C und 12.000 g für 15 min zentrifugiert. Nachdem das Pellet verworfen wurde, konnte die Proteinkonzentration der Überstände anhand eines Bradford Assays (BioRad) quantifiziert und die Proteinkonzentration angepasst werden. Für den Western Blot wurde eine Proteinmenge von 50 µg zunächst in 10-20 µl 5 x Lämmli-Puffer erhitzt (95 °C) und dann auf das Gel aufgetragen. Für die RNA Isolation wurden max. 30 mg Tumorgewebe mittels Homogenisator in 600 µl Puffer des RNeasy Mini Kits (Qiagen) zerkleinert. Die RNA wurde gemäß des Herstellerprotokolls isoliert.

2.4 Funktionelle Analysen

2.4.1 Zytokinbestimmung

Nach Stimulation von Tumorzellen mit immunaktiver RNA wurde nach 24 und 48 h Überstand aus den Kulturen abgenommen und bei -20°C für Zytokinbestimmungen mittels Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) aufbewahrt. Bei *in vivo* Versuchen wurde vor und nach therapeutischer Intervention Serum für Zytokinmessungen gewonnen. Zum Nachweis der IFN-Induktion wurde die Konzentration von murinem bzw. humanem *interferon gamma-induced protein 10* (IP-10; auch CXCL10) bestimmt. Nach Verdünnung des Überstands bzw. Serums im Verhältnis von 1:5 wurde der ELISA analog des Herstellerprotokolls durchgeführt.

2.4.2 Durchflusszytometrie

In dieser Arbeit wurde für durchflusszytometrische Analysen das FACSCanto II genutzt. Gemessen und analysiert wurden die Daten mit der Software *FACSDiva* (Version 7.0) und *FlowJo* (Version 8.7).

2.4.2.1 Apoptose-Bestimmung mittels Annexin V und Propidiumjodid

Um Apoptose nach den *in vitro* Behandlungen zu quantifizieren, wurde eine Doppelfärbung basierend auf Annexin V und Propidiumjodid (PI) verwendet. Das Annexin V (AV) bindet an Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellmembran von frühapoptotischen Zellen, während PI in Zellen mit gestörter Membranintegrität diffundiert und dort an DNA bindet. Vitale Zellen sind Annexin V und PI negativ. Zu Beginn erscheinen apoptotische Zellen ausschließlich Annexin V positiv, während sich die Zellen in einer späten Phase der Apoptose bzw. bei Nekrose zusätzlich mit PI anfärben (Martin et al., 1995; Reutelingsperger and van Heerde, 1997). Unter Verwendung des *AV-Binding-Buffers*, der ein Calcium-reiches Milieu für die Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin ermöglicht, wurden die Zellen mit 3 µl APC-konjugiertem Annexin V auf 100 µl Zellsuspension angefärbt und bei +4 °C inkubiert. Unmittelbar vor der Messung wurde PI in einer Konzentration von 1 µg/ml zugegeben.

2.4.2.2 Bestimmung der MHC-I Expression

Major histocompatibility complex I (MHC-I)-Proteinkomplexe finden sich auf der Oberfläche nahezu aller (kernhaltiger) Zellen des Organismus. Sie dienen der Antigenpräsentation für zytotoxische T-Zellen. Folgt man der *Missing-self*-Hypothese, dient dieser Prozess auch dem Schutz gesunder Zellen vor einer Zerstörung durch natürliche Killerzellen (Ljunggren and Karre, 1990). MHC-I wird als Zeichen der Immunaktivierung verstärkt exprimiert und kann mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden. Zur Anfärbung wurden die Zellen für 15-30 min lichtgeschützt bei + 4 °C mit einem FITC-markierten anti-MHC-I murinen Antikörper (Ak) inkubiert und anschließend einmal mit PBS gewaschen.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 RNA-Isolation

Zur Isolation der RNA wurde das peqGOLD Total RNA Kit (peqlab) benutzt. Nach 12 h Kultivierung von 5×10^5 Tumorzellen pro Well im 6-Well-Format unter variablen Bedingungen wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und 350 µl Lysepuffer in jedes Well pipettiert. Die lysierten Zellen wurden in Filtertubes überführt und RNA gemäß dem Herstellerprotokoll isoliert. Die RNA wurde in 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst und die Konzentration im NanoDrop[®] gemessen. Für zukünftige Analysen wurde die RNA bei - 80 °C aufbewahrt. Die RNA-Isolation aus Gewebe erfolgte mit dem

RNeasy Kit (Quiagen). Hierzu wurden bis zu 30 mg Tumorgewebe in 600 µl Buffer RLT gemäß Herstellerprotokoll homogenisiert und anschließend die RNA isoliert.

2.5.2 Reverse Transkription

RNA muss für die Quantifizierung zunächst mittels reverser Transkription in *copy*-DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Hierfür wurde das *Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (ThermoScientific) verwendet. Es wurde 1 µg RNA mit RNase freiem Wasser auf 12 µl Volumen gebracht und 0,5 µg *anchored-oligo(dT)18* Primer hinzugefügt. Im Thermocycler wurde die RNA nach Herstellerprotokoll über 5 min bei 70 °C denaturiert und über 60 min bei 42 °C in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die reverse Transkriptase für 10 min bei 80 °C inaktiviert, die cDNA mit nukleasefreiem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2.5.3 Quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR)

Diese Methode folgt generell dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Bezeichnend ist, dass die amplifizierte DNA nach jedem Zyklus quantifiziert wird. Für diese Versuche wurde die Anzahl gemessener Kopien in der Probe anhand derer des Refernzgens Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase (HPRT) oder β -actin normiert. Alle qRT-PCR-Assays wurden mittels *LightCycler 480 Probes Master Kit* (Roche) mit Sonden des *Universal ProbeLibrary Set* durchgeführt. Primer wurden passend zum *Universal ProbeLibrary Assay Design Center* hergestellt. Sofort nach der Vorbereitung, wurden die Proben mit dem Light Cycler 480 Instrument und der LightCycler Software 4.1 in einem Kühlblock bei 4 °C analysiert.

Wichtige PCR Parameter wurden wie folgt programmiert:

Zyklen	Schritt	Zieltemperatur	Dauer
1	Prä-Inkubation	90°C	10 min
45	Denaturierung	95°C	10 s
	Hybridisierung	60°C	30 s
	DNA-Synthese	72°C	1 s
1	Kühlung	40°C	30 s

2.5.4 Generierung von 5'-Triphosphat-modifizierter RNA

Die ppp-RNA wurde mit dem *MEGashortscriptTM T7 Kit* (Ambion, Austin, Texas) wie in Besch et al. und Poeck et al. beschrieben hergestellt (Besch et al., 2009; Poeck et al., 2008). Die gewünschte Sequenz wird durch eine T7-RNA-Polymerase anhand eines DNA-Templates amplifiziert. Im nächsten Schritt wurde die RNA mittels Phenol oder Chloroform aufgereinigt, durch Zugabe von Ethanol ausgefällt und

anschließend mittels *mini Quick Spin Oligo Columns* (Roche) isoliert und die Konzentration bestimmt (NanoDrop®). Um das neu generierte Transkriptionsprodukt zu testen, wurden Panc02- oder IMIM-PC-1-Zellen mit der ppp-RNA transfiziert. Nach 48 h wurde einerseits die verstärkte MHC-I Expression auf der Zelloberfläche und andererseits durch Annexin V/PI-Färbung die Zellviabilität und Apoptoseinduktion durchflusszytometrisch bestimmt.

2.5.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Mittels des Bio-Rad Protein Assays wurde die Proteinkonzentration kolorimetrisch gemessen. Organlysate wurden 1:100 mit PBS verdünnt und als Duplikate in eine 96-Well Platte pipettiert. Aus Verdünnungen einer bovinen Serum-Albumin (BSA)-Lösung bekannter Konzentrationen wurde eine Standardreihe hergestellt und aufgetragen und die Reagenzien nach Protokoll hinzugefügt. Die Absorption wurde mit einem Mithras Plattenleser bei 750 nm gemessen.

2.5.6 Proteingewinnung und Western blot

Für Western Blots wurden 150.000 Zellen pro Well mit 50 µl 5 x Lämmli-Puffer aus 12- oder 24-Well-Platten lysiert. Vor der Gel-Elektrophorese wurden die Proben für 5 min auf 90 °C erhitzt. Die Zellysate wurden mittels einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Als Proteinstandard wurden pro Gel 5 µl des *PageRuler® Plus Prestained Protein Ladders* (Fermentas) verwendet. Für die Gel-Elektrophorese wurde eine Spannung von 100 Volt für 90-120 min angelegt. Bei dem *Wet-Transfer* wurde eine Nitrocellulose Membran (GE Healthcare) verwendet. Dabei betrug die Stromstärke konstant über eine Stunde 360 Milliampere. In der Regel wurde die Membran in 3% Milch oder in 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20 (TBST) geblockt. Für phosphorylierte Proteine wurde 5 % BSA in TBST verwendet. Primäre Ak wurden in 5 ml 3 oder 5 % BSA in TBST und 0,05 % Natriumazid-Lösung 1:1000 verdünnt. Für sekundäre Ak wurde auf Natriumazid verzichtet. Die Blots wurden mittels ECL Substrat (GE Healthcare) visualisiert.

2.5.7 Immunhistologie

Tumore wurden nach Entnahme in Einbettmedium (*Tissue freezing medium*®) eingebettet, mittels Flüssigstickstoff gefroren und bei - 80 °C bis zum Anfertigen der Kryoschnitte gelagert. Es wurden mit einem Kryotom 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger übertragen, um anschließend eine TUNEL-Färbung durchzuführen. Dazu wurde das *In Situ Cell Death Detection Kit*

(Roche, Mannheim, DE) verwendet. Die Kryoschnitte wurden anschließend mit *Mounting*-Medium inklusive DAPI für die Zellkernfärbung abgedeckt. Gefärbte Schnitte wurden mittels konfokalem Fluoreszenzmikroskop (Leica TCS SP5, Wetzlar, DE) ausgewertet.

2.6 Statistische Analysen

Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD (Standardabweichung) für *in vitro* Daten oder SEM (Standardfehler) für *in vivo* Daten. Um die Ergebnisse auf Signifikanz zu prüfen, wurde die *One-way* oder *Two-way* ANOVA (Varianzanalyse) inklusive Bonferroni-Korrektur angewendet. Zum Vergleich der Überlebenszeiten im orthotopen Tumormodell wurde der Mantel-Cox-Test eingesetzt. Ein p-Wert $< 0,05$, $< 0,01$ bzw. $< 0,001$ wurde mit *, ** bzw. *** markiert und als statistisch signifikant angenommen. Die statistischen Analysen wurden mithilfe der Software GraphPad Prism 5.0b durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Interferon-Signalweg in Pankreaskarzinomzellen

3.1.1 Einfluss von diversen Interferonen auf die STAT1-Phosphorylierung

Getestet wurden zunächst die murine T110299 und humane IMIM-PC-1 und PANC-1 Tumorzelllinien. Die Zellen wurden mit Typ I IFN (IFN α , IFN β) bzw. Typ II IFN (IFN γ) behandelt und die Phosphorylierung von STAT1 (pSTAT1) mittels Western Blot analysiert (Abb. 5). Um die Sensitivität der Zellen gegenüber IFN zu testen, wurde IFN in T110299 und IMIM-PC-1 titriert und nach einer Stunde pSTAT1 analysiert. Während bei IMIM-PC-1 mit 1000 IU/ml für Typ I und II IFN STAT1 Phosphorylierung nachweisbar war, ließ sich bei T110299 nur für Typ I IFN pSTAT1 nachweisen. Die Ergebnisse zeigen, dass beide Zelllinien in Hinblick auf pSTAT1 gegenüber IFN α am sensitivsten reagierten. Für IFN α zeigte sich bei T110299 im Gegensatz zu IFN β auch bei 100 IU/ml eine STAT1 Phosphorylierung. Bei IMIM-PC-1 zeigte sich, dass bereits ab 1 IU/ml IFN α eine leichte STAT1-Phosphorylierung stattfindet, eine solide Phosphorylierung durch Typ I und II IFN jedoch höhere Konzentrationen benötigt (Abb. 5 A).

Als nächstes wurde eine Kinetik erstellt, um zu klären, wie schnell die Phosphorylierung von STAT1 mit Typ I und II IFN (jeweils 1000 IU/ml) erfolgt (Abb. 5 B). In PANC-1 Zellen konnte bereits nach 30 min eine Phosphorylierung von STAT1 nachgewiesen werden, die für IFN β am stärksten ausgeprägt war. Zu späteren Zeitpunkten war jedoch IFN γ den Typ I IFN überlegen.

Diese Befunde zeigen, dass der IFN-Signalweg in den Tumorzellen intakt ist. Es bestehen bezüglich deren Sensitivität auf die verschiedenen Typ I und Typ II IFN Spezies- und Zelllinien-spezifische Unterschiede.

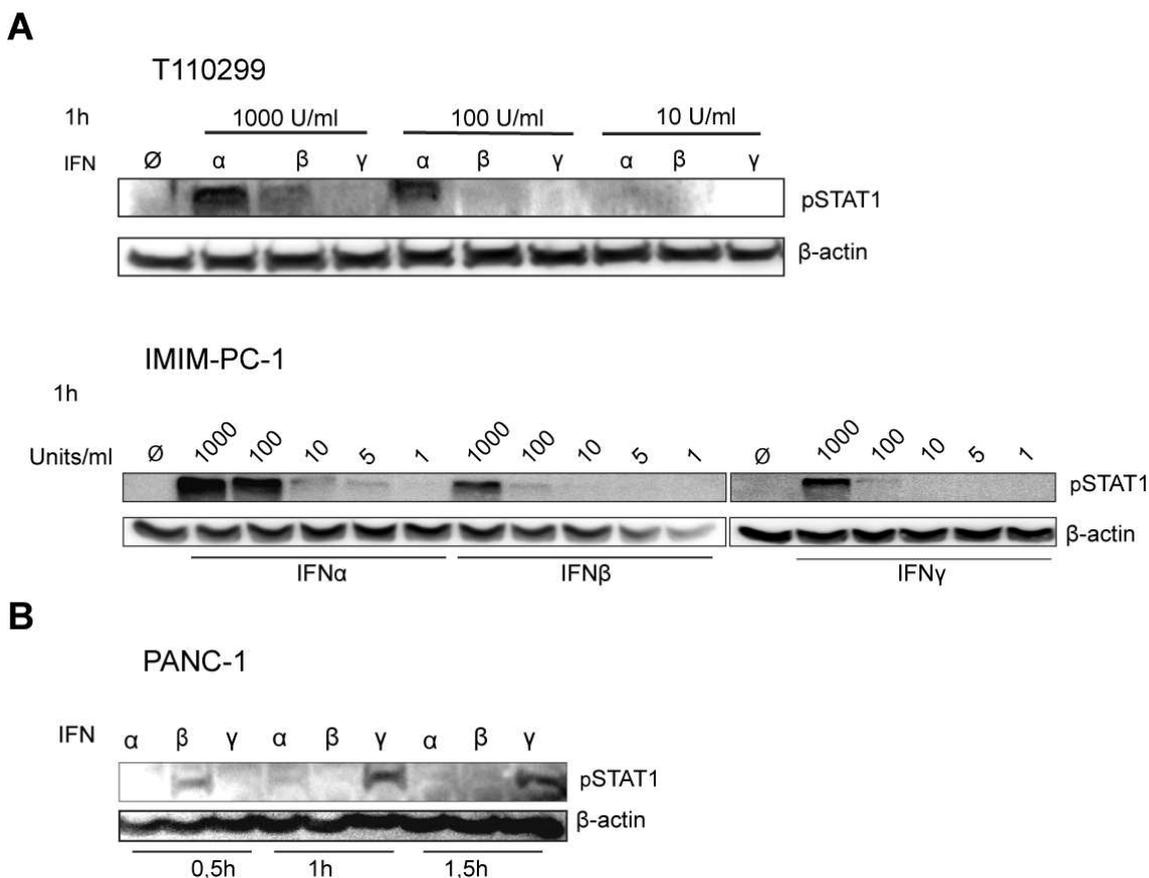


Abb. 5: Stimulation mit Typ I und II Interferonen führt zur STAT1 Phosphorylierung.

Analyse von pSTAT1 nach Stimulation mit murinem oder humanem IFN α , β oder γ mittels Western Blot. (A) Mit T110299 und IMIM-PC1 Zellen wurde für 1 h eine Titration mit unterschiedlichen IFN-Konzentrationen durchgeführt. (B) Humane PANC-1 Zellen wurden mit 1000 IU/ml IFN stimuliert und die STAT1 Phosphorylierung nach 0,5, 1,0 bzw. 1,5 h gemessen. Als Ladekontrolle diente das *house keeping* Gen β -actin. Die Abbildungen zeigen repräsentative Blots aus zwei (A) bzw. drei (B) unabhängigen Versuchen.

3.1.2 Auswirkung von Interferonen auf die RLH-Expression

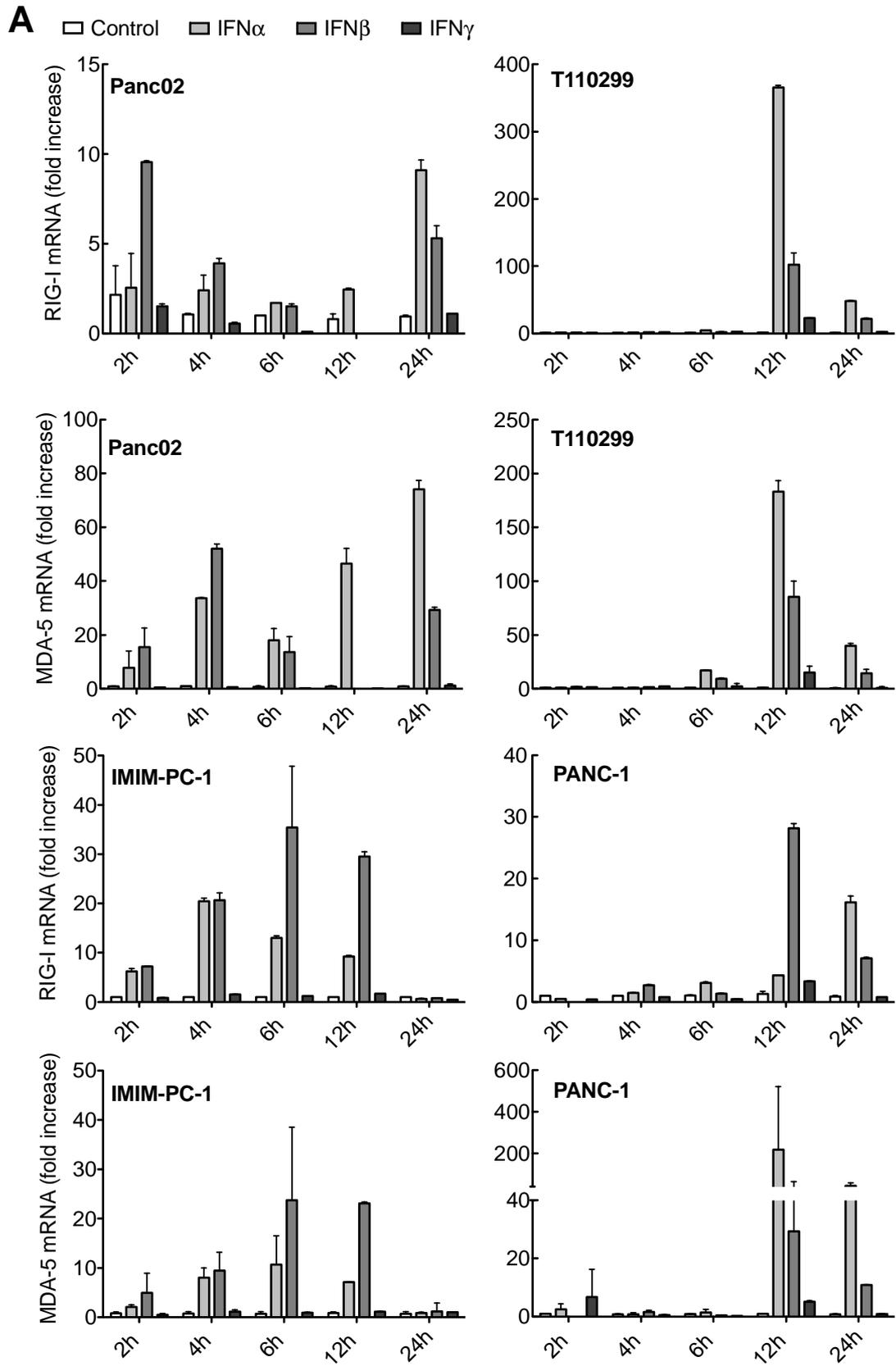
Eine Voraussetzung für die Effektivität einer Tumorthherapie mit RLH-Liganden ist eine ausreichende basale Expression und Induzierbarkeit von RIG-I bzw. MDA5 in den Tumorzellen. In unserer Arbeitsgruppe konnten wir bereits zeigen, dass eine IFN-Behandlung in einigen Zelllinien zur Hochregulation der RLH-Expression führt (Ellermeier et al., 2013). Die basale Expression von RLH in humanen und murinen Pankreaskarzinomzellen unterliegt einer großen Variation, die auf unterschiedliche Rezeptorkinetiken von Typ I wie Typ II IFN zurückzuführen sein könnten (Ellermeier et al., 2013).

Zunächst wurde eine Kinetik der RLH Expression nach Stimulation mit Typ I und II IFN erstellt. Die Signalkaskade nach Rezeptor-Liganden-Interaktion bis hin zur Transkription der mRNA findet binnen der ersten 24 h statt. Es wurden jeweils zwei

humane und murine Pankreaskarzinom-Zelllinien mit IFN stimuliert und nach definierten Zeitpunkten eine qRT-PCR zur Analyse der RLH-Expression durchgeführt (Abb. 6 A).

Für murine T110299 und humane PANC-1 Zellen war bei 12 h die Induktion von RIG-I und MDA5 besonders ausgeprägt, während für Panc02 und IMIM-PC-1 Zellen schon nach 2 bis 6 h eine deutliche Induktion festzustellen war. Für IMIM-PC1 steigerte sich im zeitlichen Verlauf innerhalb von 6 h die Expression durch Typ I IFN. Nach 24 h ließ sich bei IMIM-PC-1 fast keine RLH mRNA mehr nachweisen, wohingegen bei Panc02, T110299 und PANC-1 zu diesem Zeitpunkt weiterhin eine erhöhte mRNA-Expression vorhanden war. Obwohl, mit Ausnahme von Panc02, ein gemeinsames Muster bezüglich des Zeitpunktes der RLH-Hochregulation zu beobachten war, zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede in Bezug auf Induzierbarkeit durch den IFN-Typ sowie der RLH-Expressionsstärke. Im Falle von murinen T110299 war IFN α für die stärkste RLH-Hochregulation verantwortlich. Für Panc02 lässt sich nicht eindeutig schlussfolgern, welches Typ I IFN die größte Induktion hervorruft. Noch interessanter gestaltete sich dieser Zusammenhang in der humanen PANC-1 Zelllinie. Hier scheint primär IFN α für MDA5 bzw. IFN β für die Regulation von RIG-I verantwortlich zu sein. Bei IMIM-PC-1 verursacht IFN β die stärkste Hochregulation für RIG-I und MDA5.

Für humane Zelllinien zeigt sich im Vergleich der Induktion von RLH durch IFN nach 24 h bei MIAPaCa-2 und IMIM-PC-1 durch IFN β die stärkste Hochregulation für RIG-I und MDA5. Für PANC-1 fand sich hier im Gegensatz zur Kinetik überraschenderweise kaum eine Induktion durch Typ I IFN. Auch für BxPC-3 und SUIT2-007 führen die IFN nur zu einer geringen Induktion von RLH und MDA5 (Abb. 6. B).



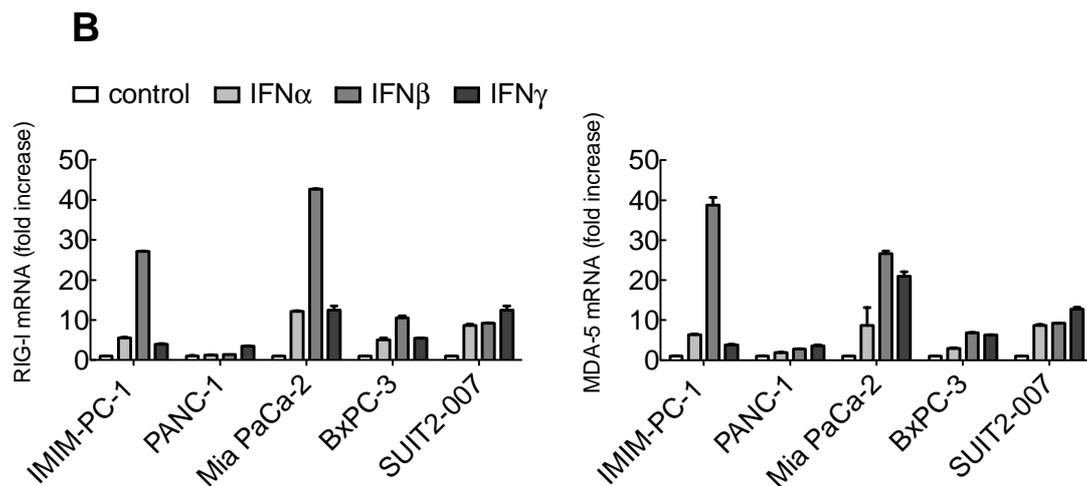


Abb. 6: Kinetik der RIG-I und MDA5 mRNA Expression nach IFN Stimulation.

(A) Relative Expression von RIG-I und MDA5 auf mRNA-Ebene nach Stimulation mit 1000 IU/ml murinem bzw. humanem IFN α , β oder γ nach 2-24 h. Für Panc02 fehlt der 12 h Wert und für PANC-1 der 2 h Wert für IFN β . (B) Vergleich der RLH Expression fünf humaner Pankreaskarzinom-Zelllinien mit einer IFN-Dosis von 1000 IU/ml nach 24 h. Gezeigt sind Mittelwerte und SD von Duplikaten eines repräsentativen Experiments aus einem bzw. zwei unabhängigen Versuchen.

Anhand einer Titration zeigte sich, dass für eine effektive RLH-Induktion, analog zu den STAT1-Phosphorylierungsversuchen, eine 1000 IU/ml IFN-Dosis optimal ist (Abb. 7).

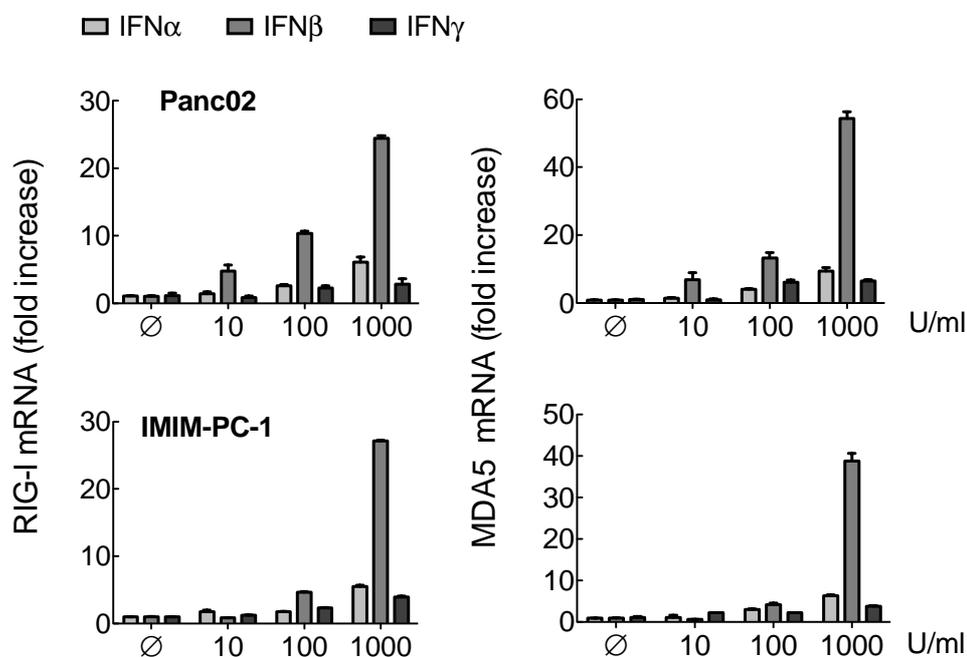


Abb. 7: Regulation der RIG-I- und MDA5-mRNA-Expression in murinen und humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien durch IFN.

Relative Expression von RIG-I und MDA5 mRNA nach 24 h Stimulation mit 10, 100 bzw. 1000 IU/ml murinem bzw. humanem IFN α , β oder γ . Gezeigt sind Mittelwerte und SD aus Duplikaten eines repräsentativen Experiments zweier unabhängiger Versuche.

Da sich in Abhängigkeit des gewählten Zeitpunktes und IFN sehr unterschiedliche RLH mRNA Expressionsprofile der Tumorzellen zeigten, wurde als nächstes die RLH-Expression auf Proteinebene bestimmt, da diese – in Abhängigkeit von dem Proteinumsatz der Zelle – weniger starken zeitlichen Schwankungen ausgesetzt sein sollte. Dafür wurden eine Auswahl von sechs humanen Pankreaskarzinomzelllinien mit verschiedenen IFN stimuliert und die Expression von RIG-I bzw. MDA5 mittels Western Blot analysiert (Abb. 8). Bei jeder der Zelllinien wurde RIG-I- und MDA5 durch IFN gesteigert exprimiert. Typ I IFN führten sowohl für RIG-I als auch für MDA5 zu einer deutlich stärkeren Hochregulation als Typ II IFN (IFN γ). Bei PaTu8988t und IMIM-PC-1 führte IFN β zu einer stärkeren RLH-Expression als IFN α . Bei PANC-1 kam es hingegen durch IFN α zu einer stärkeren RLH-Hochregulation. Für MIAPaCa-2, SUI007 und BxPC-3 hatten beide Typ I IFN ähnlich starke Effekte. IFN γ zeigte kaum einen Effekt bei MIAPaCa-2, BxPC-3 und IMIM-PC-1. PANC-1 zeigte auch ohne IFN-Stimulation bereits eine basale RIG-I-Expression.

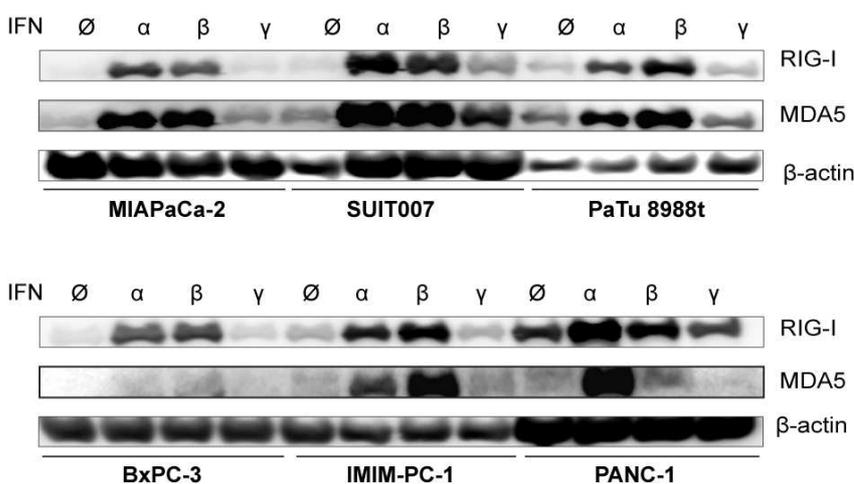


Abb. 8: IFN-induzierte Proteinexpression von RIG-I und MDA5 in humanen Pankreaskarzinomzellen.

Die Expression von MDA5 (140 kDa) und RIG-I (120 kDa) wurde nach 24 h Stimulation mit 1000 IU/ml IFN α , β bzw. γ mittels Western Blot analysiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot von zwei unabhängigen Experimenten.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass für eine kombinierte Therapie von IFN und RLH-Liganden sowohl der Zeitpunkt, als auch die Wahl des IFN und des RLH-Liganden (ppp-RNA für RIG-I; poly(I:C) für MDA5) für ein optimales Therapieregime von Bedeutung sein dürften.

3.2 Funktionelle Charakterisierung von RIG-I-like-Helikasen in Pankreaskarzinomzellen

3.2.1 RLH-Signalweg in humanen und murinen Tumorzelllinien

Die Vorversuche hatten gezeigt, dass die beiden RLH RIG-I und MDA5 in den für diese Arbeit zur Verfügung stehenden Tumorzelllinien exprimiert werden und durch Typ I IFN induzierbar sind. Nun kam es im nächsten Schritt darauf an zu überprüfen, ob das RIG-I-*signalling* intakt ist. Der Transkriptionsfaktor IRF3 vermittelt die Promotor-Aktivierung des *interferon-stimulated regulatory elements* (ISRE). Durch Phosphorylierung von IRF3 (pIRF3) wird dessen Translokation in den Zellkern ermöglicht, sowie anschließend die Transkription von Genen unter Kontrolle von ISRE. Nach Stimulation mit ppp-RNA bzw. poly(I:C) wurde das RIG-I- bzw. MDA5-*signalling* in jeweils zwei murinen und humanen Tumorzelllinien mittels pIRF3 Western Blot analysiert (Abb. 9). In allen Zelllinien konnte eine verstärkte Phosphorylierung von IRF3 nach RLH-Aktivierung nachgewiesen werden.

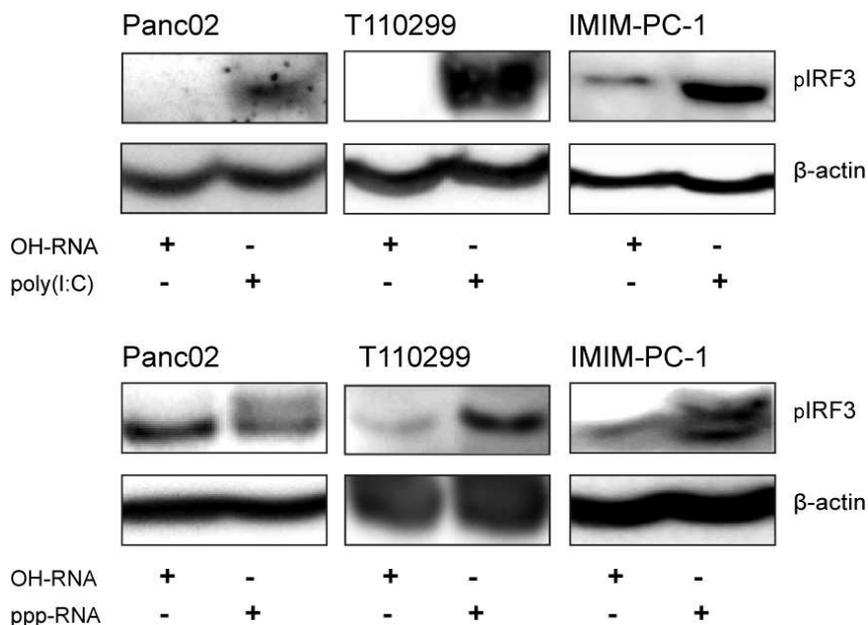


Abb. 9: Phosphorylierung von IRF3 durch Transfektion mit RLH-Liganden.

Murine (T110299, Panc02) und humane (IMIM-PC-1) Tumorzellen wurden für 2 h mit 0,5 µg/ml poly(I:C), 3 µg/ml ppp-RNA oder entsprechenden Konzentrationen einer OH-RNA stimuliert. Die Phosphorylierung von IRF3 (50kDa) wurde mittels Western Blot überprüft. Gezeigt sind repräsentative Western Blots aus zwei unabhängigen Versuchen.

Zudem führte die RLH-Stimulation mittels ppp-RNA bzw. poly(I:C) in allen untersuchten Zelllinien zur Sekretion von CXCL10. Dies kann als indirekter Hinweis auf die Induktion von Typ I IFN in den Tumorzellen angesehen werden (Abb. 10). CXCL10 wird auch als IFN γ -induziertes Protein (IP-10) bezeichnet, da dessen Sekretion von IFN γ abhängig

ist (Luster and Ravetch, 1987). Die Transkription von CXCL10 wird durch eine Reihe von Stimuli des angeborenen und adaptiven Immunsystems induziert, die zur Produktion von Typ I und II IFN führen. Der CXCL10-Promoter enthält unter anderem *response elements* für IRF1, NFκB und STAT1 (Liu et al., 2011). RLH-Liganden führen über die Aktivierung von IRF und NFκB neben der Produktion von Typ I IFN auch zur Produktion von Chemokinen wie CXCL10 (Besch et al., 2009). Die Ergebnisse belegen ein intaktes RLH-*signalling* sowohl in humanen als auch murinen Tumorzelllinien, allerdings in unterschiedlicher Intensität.

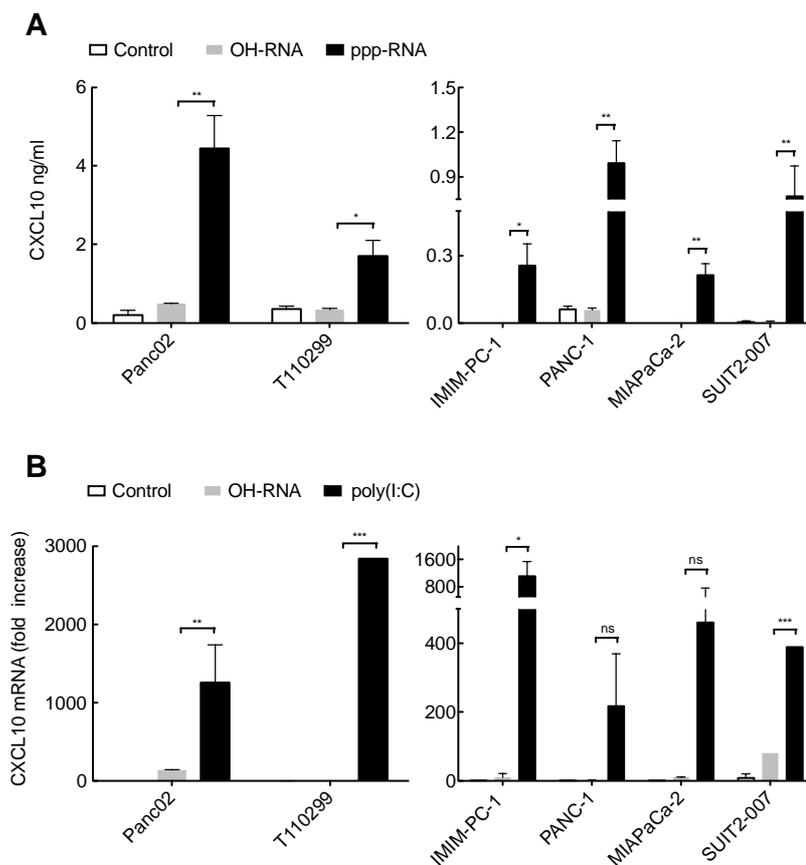


Abb. 10: RLH-Liganden induzieren die Expression von CXCL10.

(A) Die Sekretion von CXCL10 von humanen oder murinen Pankreaskarzinomzellen wurde 24 h nach Stimulation mit 3 µg/ml ppp-RNA bzw. OH-RNA mittels ELISA aus Zellkulturüberstand bestimmt. (B) Relative mRNA Expression von CXCL10 6 h nach Transfektion mit 0,5 µg/ml poly(I:C) oder OH-RNA. Gezeigt sind Mittelwerte und SD aus Duplikaten eines repräsentativen Experiments von zwei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede wurden mit einseitiger ANOVA inklusive Bonferroni-Korrektur analysiert.

In der Tumormimmuntherapie ist es hoch bedeutsam, dass Tumorantigene auf der Tumorzelloberfläche im Komplex mit MHC-I Molekülen durch CTL erkannt werden. Als nächstes wurde daher der Einfluss der RLH-Liganden ppp-RNA bzw. poly(I:C) auf die Anzahl der MHC-I Moleküle auf der Tumorzelloberfläche durchflusszytometrisch untersucht. Es zeigte sich eine MHC-I Hochregulation, wobei dieser Effekt bei Panc02

deutlicher als bei T110299 ausgeprägt war und ppp-RNA im Vergleich dem poly(I:C) überlegen war. Ein ähnliches Phänomen zeigte sich auch für humane Pankreaskarzinomzellen (Abb. 11).

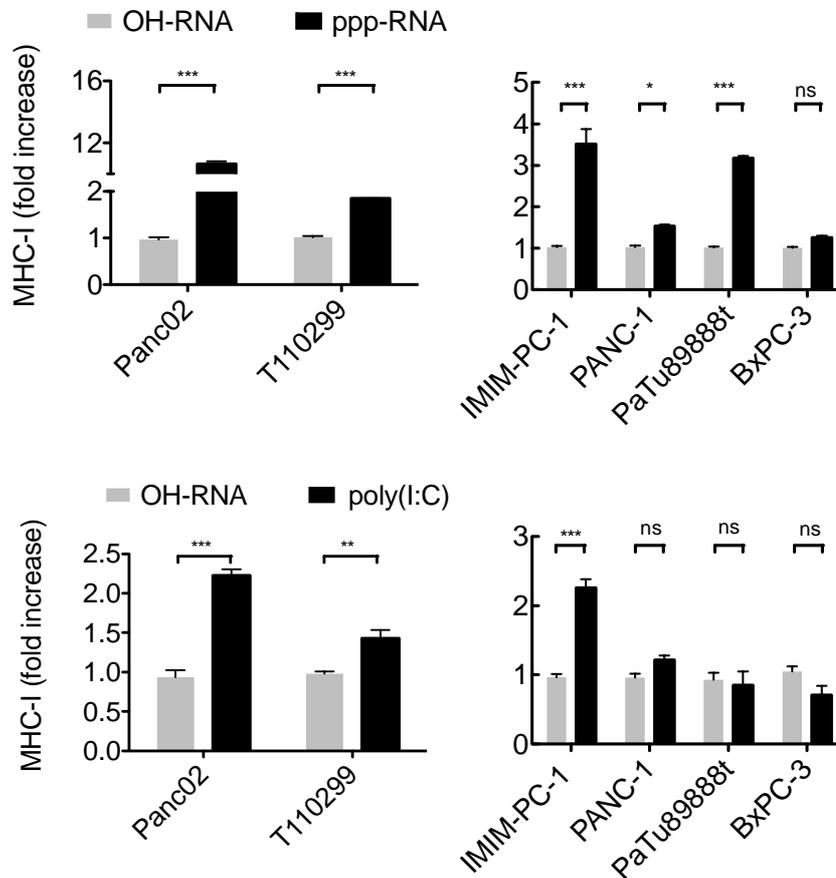


Abb. 11: RLH-Liganden führen zur Hochregulation der Oberflächenexpression von MHC-I.

Die MHC-I-Expression wurde 48 h nach Transfektion mit 3 µg/ml (murin) bzw. 1,5 µg/ml (human) ppp-RNA sowie nach Transfektion mit 0,5 µg/ml (murin) bzw. 0,125 µg/ml (human) poly(I:C) durchflusszytometrisch analysiert. Für die Kontrollen wurde eine OH-RNA in der entsprechenden Konzentration eingesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte und SD aus Duplikaten eines repräsentativen Experiments von drei unabhängigen Versuchen. Normalisiert wurde auf den ersten der zwei Werte für OH-RNA. Signifikante Unterschiede wurden mit ein- oder zweiseitiger ANOVA inklusive Bonferroni-Korrektur analysiert.

3.2.2 Induktion der STAT1-Phosphorylierung durch die Stimulation von RLH

Stimulation mit Typ I und II IFN führte zu einer Phosphorylierung von STAT1 in murinen und humanen Pankreaskarzinomzellen (s. Abb. 5). Nachdem RLH-Aktivierung zur IFN-Antwort in den Tumorzellen führt, sollte als nächstes analysiert werden, inwiefern die RLH-Liganden poly(I:C) und ppp-RNA auch ohne exogenem IFN eine STAT1-Aktivierung induzieren. Dies konnte sowohl für murine als auch humane Tumorzellen aufgezeigt werden, was auf einen intakten IFN *feedback loop* hinweist (Abb. 12).

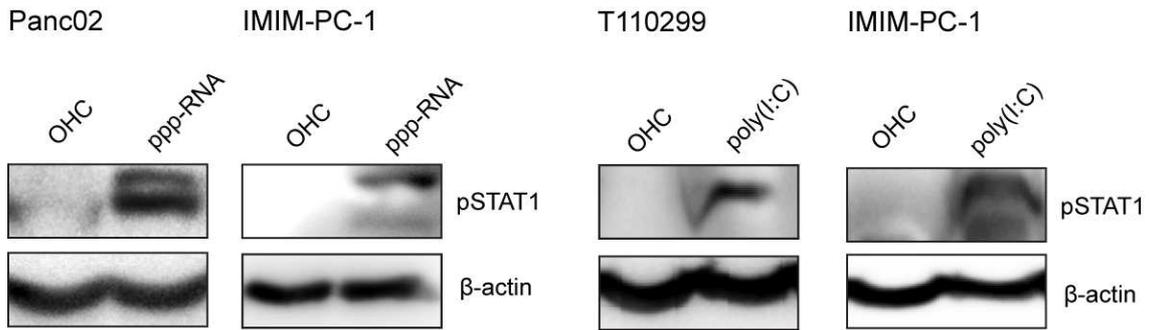


Abb. 12: Transfektion mit poly(I:C) bzw. ppp-RNA führt zur STAT1-Aktivierung.

Die Proteinexpression von pSTAT1 (84, 91 kDa) wurde nach 2 h Stimulation mit 0,25 µg/ml poly(I:C) oder OH-RNA bzw. 3 µg/ml ppp-RNA oder OH-RNA in murinen Panc02 und T110299, sowie humanen IMIM-PC-1 Pankreaskarzinomzellen mittels Western Blot bestimmt. Gezeigt sind repräsentative Daten aus zwei unabhängigen Experimenten.

3.2.3 RLH-Liganden lösen in Tumorzellen Apoptose aus

Um zu überprüfen, ob durch RLH-Liganden, wie bereits vorbeschrieben, Apoptose in Pankreaskarzinomzellen induziert werden kann, wurde die Apoptoserate anhand einer Annexin V/PI-Färbung 48 h nach Stimulation mit RLH-Liganden durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 13 A, B). Bei IMIM-PC-1 sank der Anteil vitaler Zellen nach Stimulation mit 3 µg/ml ppp-RNA von 90% auf 52% (Abb. 13 A). Bei dieser hohen RNA-Konzentration zeigte sich jedoch eine unspezifische Toxizität durch die OH-RNA Transfektion (Vitalität 75%). Nach Dosishalbierung kam es zu einer Reduktion der unspezifischen Toxizität, allerdings nahm auch der ppp-RNA Effekt ab (Abb. 13 B). Sehr wirksam und der ppp-RNA deutlich überlegen erwies sich die Stimulation mit poly(I:C) bei murinen (Panc02) und auch humanen Tumorzelllinien. T110299 Zellen waren gegenüber poly(I:C) in der gewählten Konzentration weitgehend resistent. Die Spezifität von ppp-RNA bzw. poly(I:C) für ihre Rezeptoren RIG-I bzw. MDA5 wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten anhand von RNA-Interferenz Studien gezeigt (Ellermeier et al., 2013).

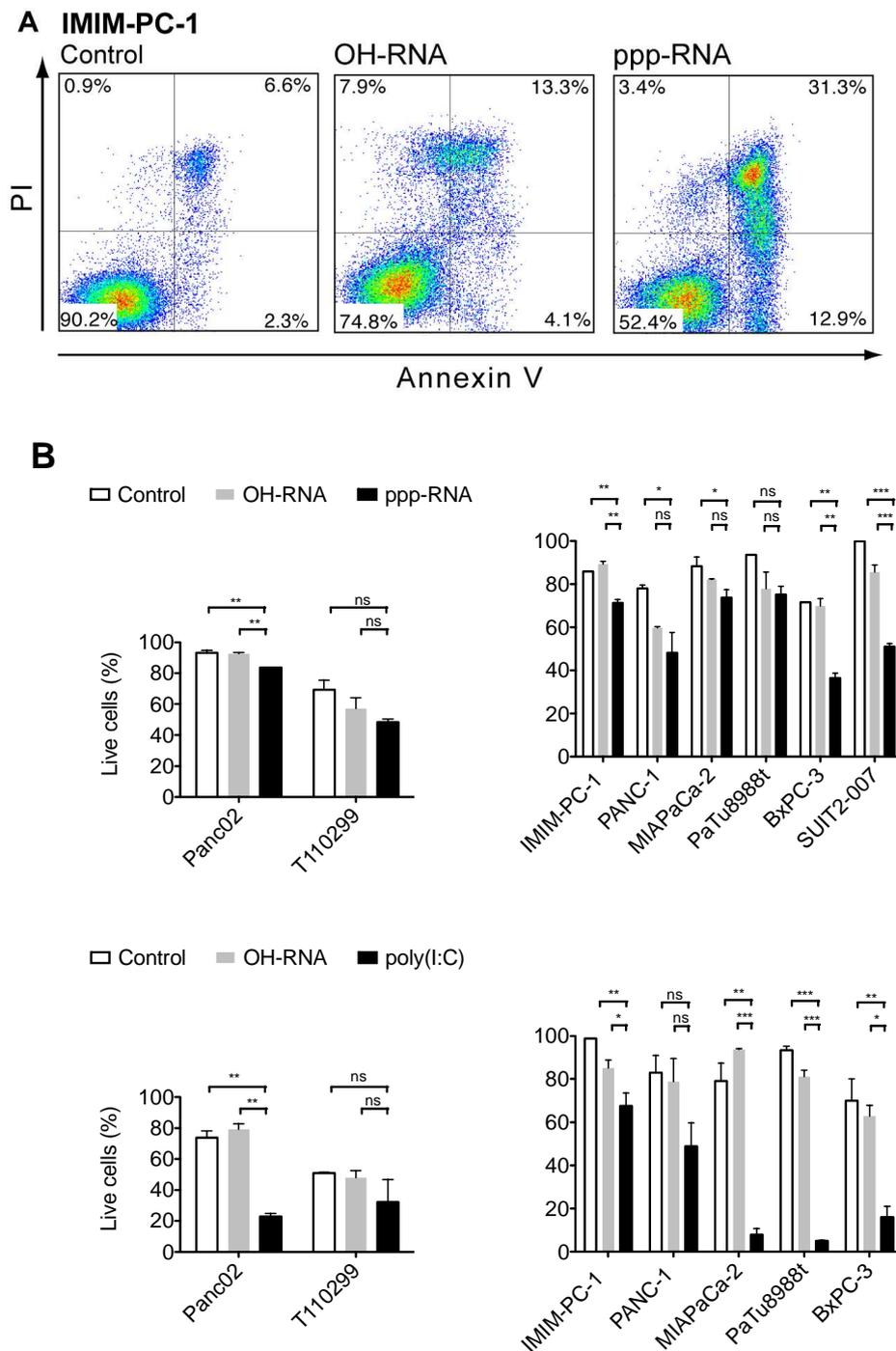


Abb. 13: RLH-Liganden induzieren Tumorzellapoptose.

Analyse der Apoptoserate durch Annexin V/PI-Färbung mittels Durchflusszytometrie 48 h nach RNA-Transfektion. (A) Humane IMIM-PC-1 Zellen wurden mit 3 µg/ml OH-RNA oder ppp-RNA transfiziert. (B) Murine bzw. humane Pankreastumorzellen wurden mit 1,5 µg/ml OH-RNA oder ppp-RNA bzw. mit 0,5 µg/ml (murin) oder 0,125 µg/ml (human) OH-RNA oder poly(I:C) stimuliert. Gezeigt sind Mittelwerte und SD aus Duplikaten eines repräsentativen Experiments von zwei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede wurden mit einseitiger ANOVA inklusive Bonferroni-Korrektur analysiert.

3.3 Kombination von Interferon mit RIG-I-like-Helikasen-Liganden

3.3.1 Effekte der Stimulation mit Interferon auf das RLH-signalling

Nachdem gezeigt wurde, dass murine und humane Pankreaskarzinomzellen ein intaktes IFN-signalling aufweisen und funktionelle RLH exprimieren, sollte in einem weiteren Schritt untersucht werden, ob sich durch Vorstimulation mit IFN die Sensitivität gegenüber der RLH-basierten Therapie erhöht. Hierzu wurde zunächst die Phosphorylierung von STAT1 durch poly(I:C) in Ab- bzw. Anwesenheit von IFN mittels Western Blot quantifiziert. Wie bereits gezeigt, führte die Behandlung mit IFN zur Phosphorylierung von STAT1 in Tumorzellen. Die anschließende Behandlung mit RLH-Liganden hatte im Vergleich zu einer Kontroll OH-RNA einen moderaten additiven Einfluss auf pSTAT1 (Abb. 14).

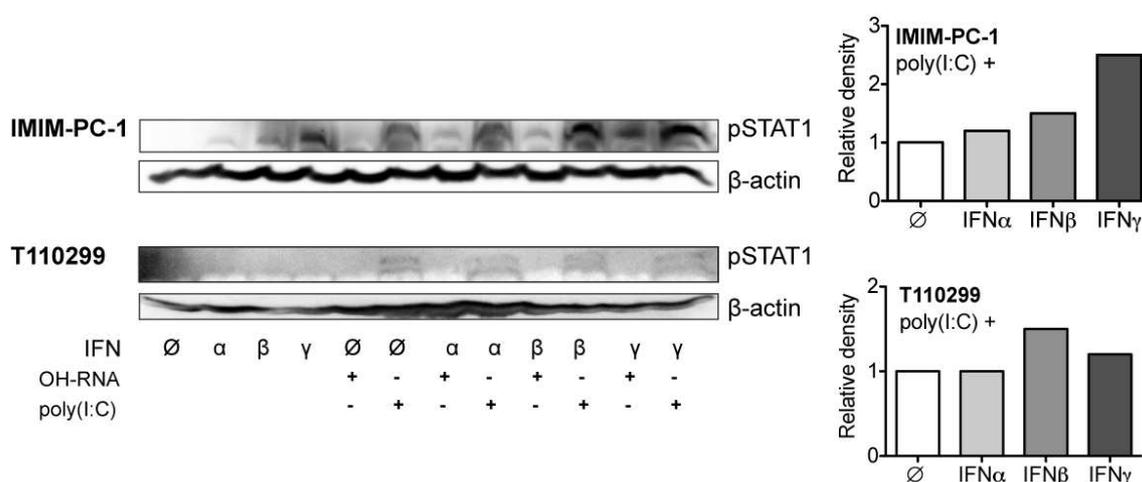


Abb. 14: STAT1-Phosphorylierung durch Kombination von IFN mit RLH-Liganden.

Bestimmung der Phosphorylierung von STAT1 (84, 91 kDa) 24 h nach Stimulation mit 100 IU/ml murinem oder 1000 IU/ml humanem IFN α , β oder γ und anschließender Transfektion mit 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ poly(I:C) oder OH-RNA für 24 h mittels Western Blot. Gezeigt sind repräsentative Blots von zwei unabhängigen Versuchen. Die Auswertung der relativen Dichte der Banden erfolgte mithilfe der Image J Software.

Mit Blick auf die Expression von RIG-I bzw. MDA5 zeigte sich eine Überlegenheit der kombinierten Behandlung. Wie bereits im Abschnitt 3.1.2. gezeigt, erhöht vor allem Typ I IFN die Expression von RIG-I und MDA5. Durch Kombination mit ppp-RNA ließ sich die RLH-Expression in IMIM-PC-1 Zellen nochmals steigern (Abb. 15). Auch gegenüber der alleinigen Stimulation mit ppp-RNA führte die Kombination mit IFN zu einer gesteigerten RIG-I Expression.

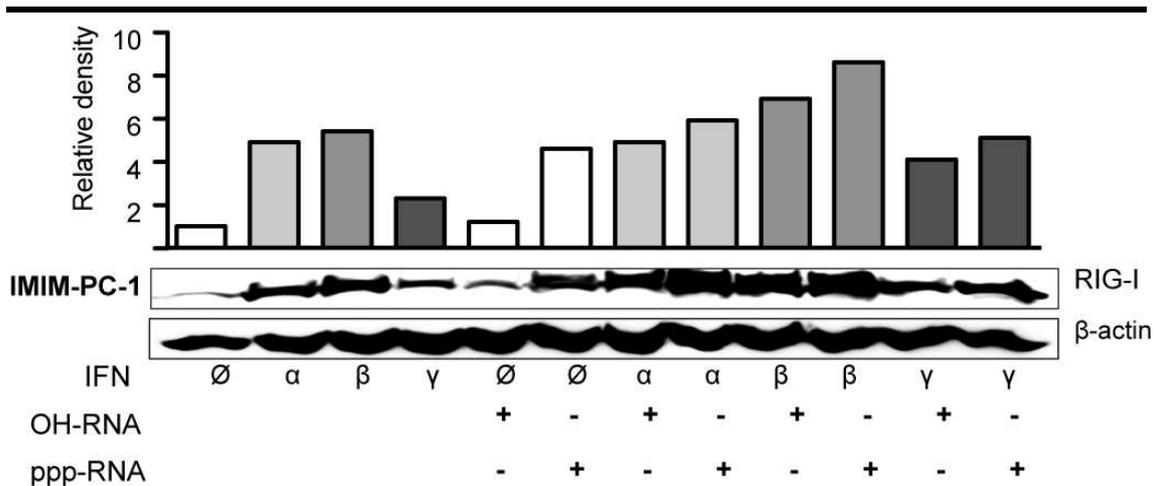


Abb. 15: Kombination von IFN mit RLH-Liganden steigert die RIG-I-Expression.

IMIM-PC-1 wurden für 24 h mit 10 IU/ml IFN α , β oder γ kultiviert. Anschließend erfolgte die Transfektion mit 3 μ g/ml ppp-RNA für 6 h. Die Proteinexpression von RIG-I (120 kDA) wurde mittels Western Blot analysiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot von zwei unabhängigen Versuchen. Die Auswertung der relativen Dichte der Banden erfolgte mithilfe der Image J Software.

Um den Einfluss der IFN-Vorbehandlung auf die RLH-Aktivierung nach Stimulation mit den jeweiligen RLH-Liganden zu überprüfen, wurde der Effekt der Kombinationsbehandlung auf die IRF3-Phosphorylierung im Western Blot analysiert (Abb. 16). Vor allem Typ I IFN führte zu einer gesteigerten Phosphorylierung von IRF3 in den murinen und humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien. Während unter den gewählten Bedingungen ppp-RNA und poly(I:C) alleine nur zu einer geringen Phosphorylierung von IRF3 führte, ließ sich diese durch die Vorbehandlung mit Typ IFN deutlich steigern.

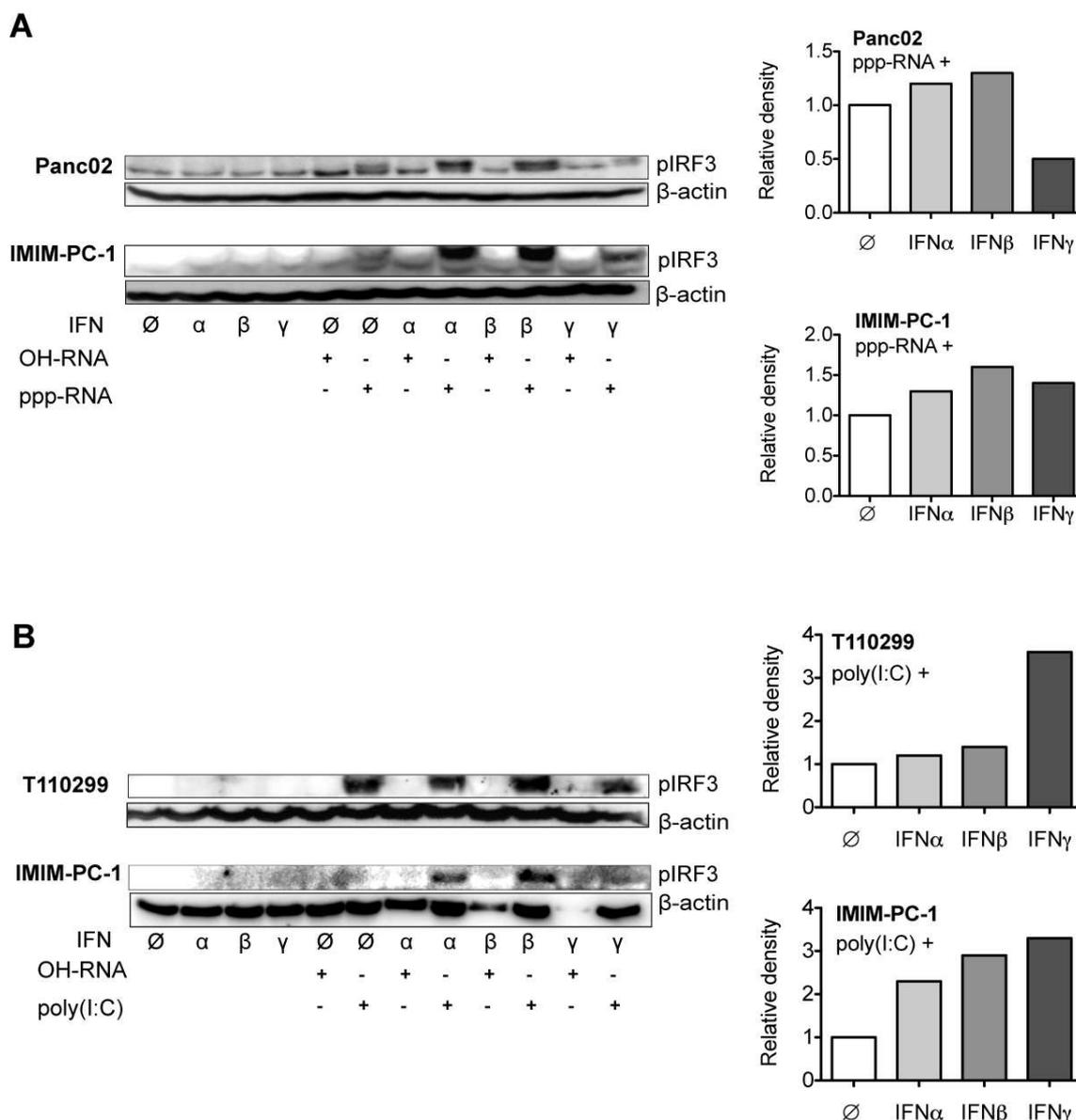


Abb. 16: Kombination von Typ I bzw. II IFN mit RLH-Liganden steigert die Phosphorylierung von IRF3.

Analyse der IRF3-Phosphorylierung (50 kDa) mittels Western Blot. Murine Panc02 und T110299 sowie humane IMIM-PC-1 Pankreaskarzinomzellen wurden für 24 h mit oder ohne 1000 IU/ml IFN kultiviert. Anschließend wurden die Zellen entweder mit jeweils 3 µg/ml ppp-RNA (A), 0,5 µg/ml poly(I:C) (B) oder OH-RNA für 3 h stimuliert. Gezeigt sind repräsentative Blots aus zwei unabhängigen Versuchen. Die Auswertung der relativen Dichte der Banden erfolgte mithilfe der Image J Software.

Im nächsten Schritt wurde ein potenziell additiver Effekt von IFN in Kombination mit RLH-Liganden auf die CXCL10-Sekretion als Surrogat-Marker für die Typ I IFN-Produktion untersucht. Wiederum wurden die Zelllinien mit IFN vorstimuliert und anschließend mit RLH-Liganden behandelt. Eine IFN-Vorstimulation führte teils zu einer vermehrten CXCL10-Sekretion in murinen (Abb. 17) und humanen (Abb. 18) Pankreaskarzinomzelllinien. Für murine Panc02-Zellen war keine konstant vermehrte CXCL10-Sekretion nach IFN-Vorstimulation zu beobachten. Dagegen zeigten

T110299-Zellen bei höherer ppp-RNA-Dosis eine stärkere CXCL10-Sekretion als ohne IFN-Vorbehandlung. In humanen Zellen steigerte Typ I IFN die Freisetzung von CXCL10 vor allem bei Stimulation mit hohen Dosen von ppp-RNA. Interessanterweise führte die Vorbehandlung mit IFN γ ebenfalls zu einer deutlichen Verbesserung der CXCL10-Sekretion (Abb. 17 u. Abb. 18, unten).

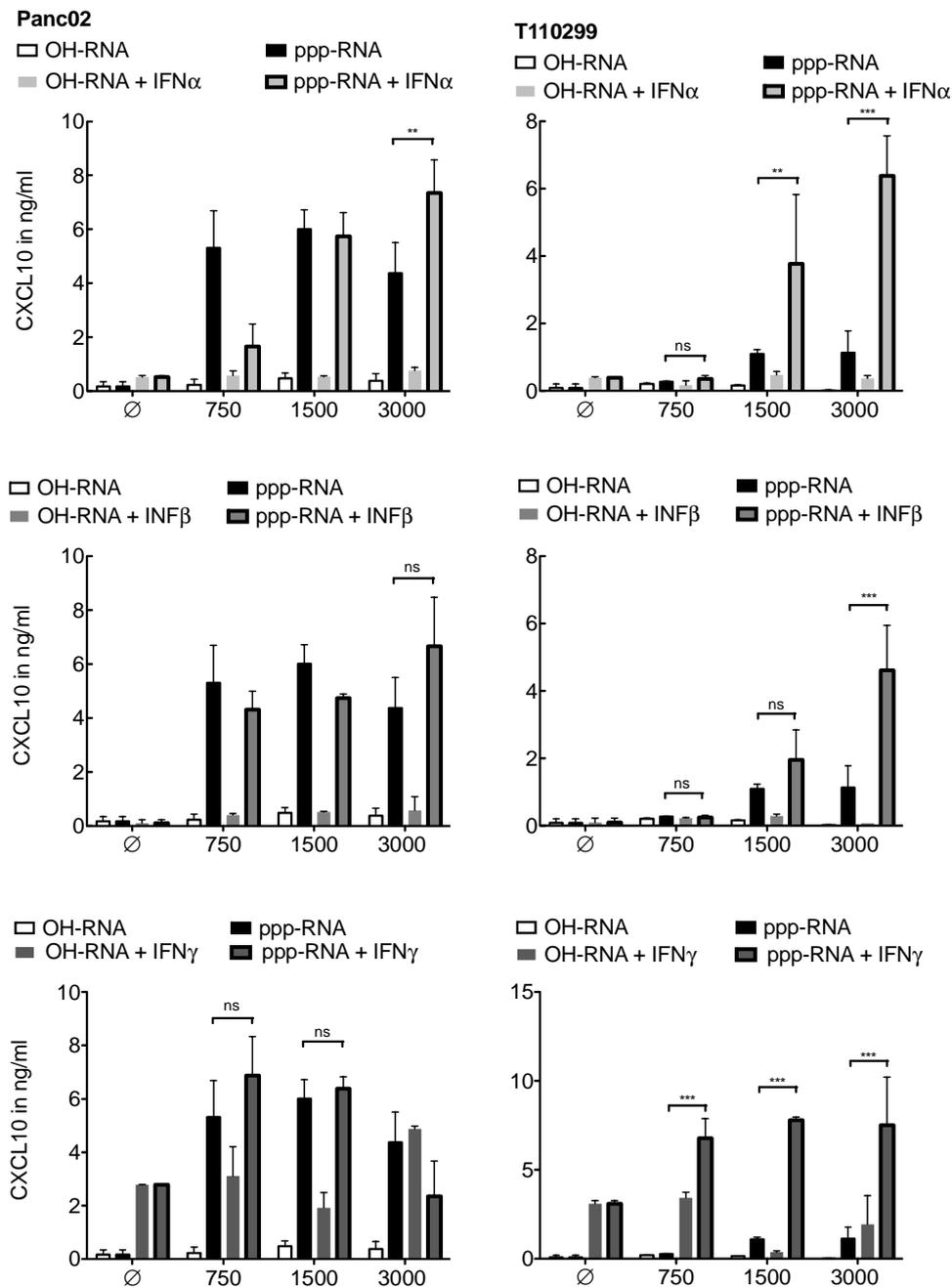


Abb. 17: Einfluss der Kombination von IFN α , β oder γ mit ppp-RNA auf die CXCL10 Sekretion in murinen Pankreaskarzinomzellen.

Die Sekretion von CXCL10 wurde 24 h nach Transfektion von 3, 1,5 bzw. 0,75 μ g/ml ppp-RNA oder OH-RNA mittels ELISA bestimmt. Die Vorstimulation erfolgte mit jeweils 1000 IU/ml IFN α , β oder γ über 24 h. Die Grafik bildet Mittelwerte und SD aus Duplikaten eines repräsentativen Experiments von vier unabhängigen Versuchen ab. Signifikante Unterschiede wurden mit zweiseitiger ANOVA inklusive Bonferroni-Korrektur analysiert.

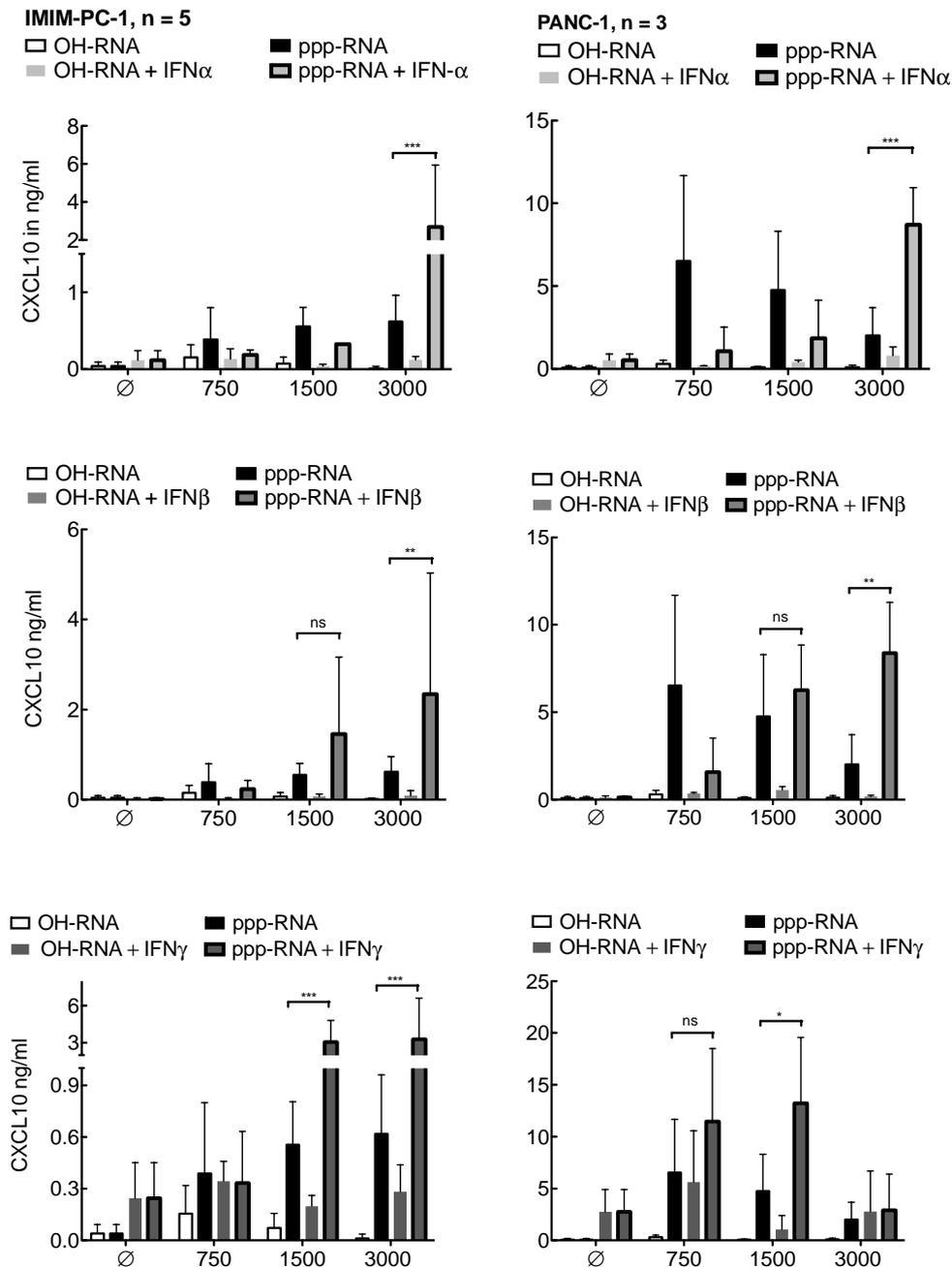


Abb. 18: Einfluss der Kombination von IFN α , β oder γ mit ppp-RNA auf die CXCL10 Sekretion in humanen Pankreaskarzinomzellen.

Die Sekretion von CXCL10 wurde 24 h nach Transfektion von 3, 1,5 bzw. 0,75 μ g/ml ppp-RNA oder OH-RNA mittels ELISA bestimmt. Die Vorstimulation erfolgte mit jeweils 1000 IU/ml IFN α , β oder γ über 24 h. Gezeigt sind Mittelwerte und SD von Duplikaten aus drei (PANC-1) oder fünf (IMIM-PC-1) repräsentativen unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mit zweiseitiger ANOVA inklusive Bonferroni-Korrektur analysiert.

Die Expression von MHC-I Molekülen auf den Tumorzellen wurde in einem weiteren Untersuchungsschritt durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 19). Hierbei zeigte sich für die murinen Panc02 und T110299 Zelllinien keine Zunahme der MHC-I Expression durch die IFN-Vorstimulation. Bei IMIM-PC-1 fand sich für IFN γ ein additiver Effekt.

Bei der PANC-1 Zelllinie war sowohl für Typ I als auch für Typ II IFN eine tendenzielle Zunahme der MHC-I Expression zu beobachten.

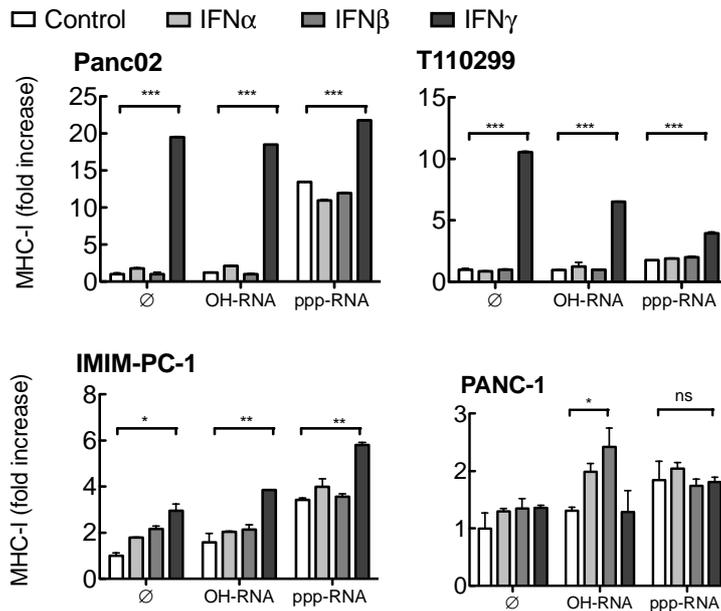


Abb. 19: Einfluss der Kombination von IFN α , β oder γ mit ppp-RNA auf die MHC-I Expression.

Die MHC-I Expression wurde 48 h nach Transfektion mit 3 μ g/ml ppp-RNA oder OH-RNA durchflusszytometrisch bestimmt. Die Vorstimulation der entsprechenden Proben mit jeweils 1000 IU/ml IFN α , β oder γ erfolgte über 24 h. Abgebildet sind Mittelwerte und SD aus Duplikaten eines repräsentativen Experiments von drei unabhängigen Versuchen. Normalisiert wurde auf den Mittelwert der Kontrollen. Signifikante Unterschiede wurden mit zweiseitiger ANOVA inklusive Bonferroni-Korrektur analysiert.

3.3.2 Vorbehandlung mit Interferonen verstärkt die RLH-induzierte Tumorzellapoptose

Um den Effekt der IFN-Vorbehandlung auf die Apoptoserate von Tumorzellen zu analysieren, wurde eine suboptimale Konzentration der RLH-Liganden gewählt. Wie in Abb. 20 anhand einer Annexin V/PI-Färbung für die humanen MIAPaCa-2-Zellen in der Durchflusszytometrie erkennbar, sank die Anzahl der lebendenden Zellen von 96% auf 88% bzw. 81% in den mit IFN α bzw. ppp-RNA behandelten Tumorzellen nach 48 h. Die Vorbehandlung mit IFN reduzierte den Anteil der lebenden Zellen auf <8%, was auf einen deutlichen synergistischen Effekt hinweist (Abb. 20).

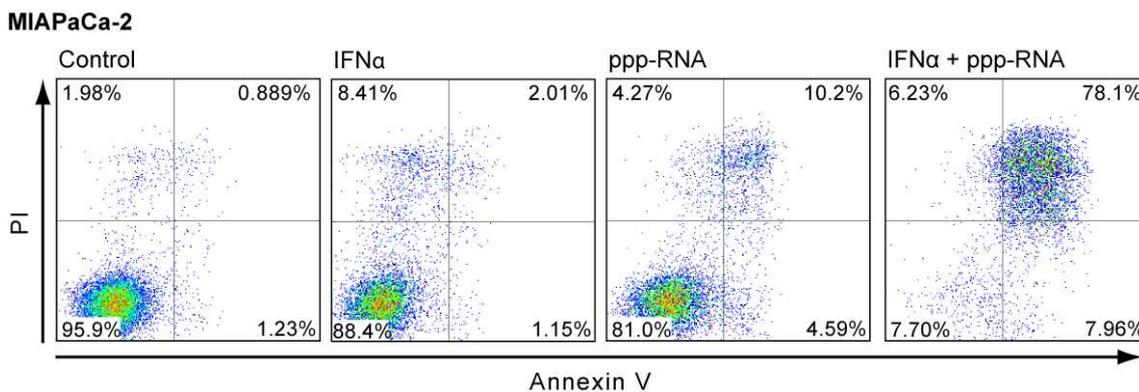


Abb. 20: Synergismus von IFN α und ppp-RNA auf die Induktion von Tumorzellapoptose.

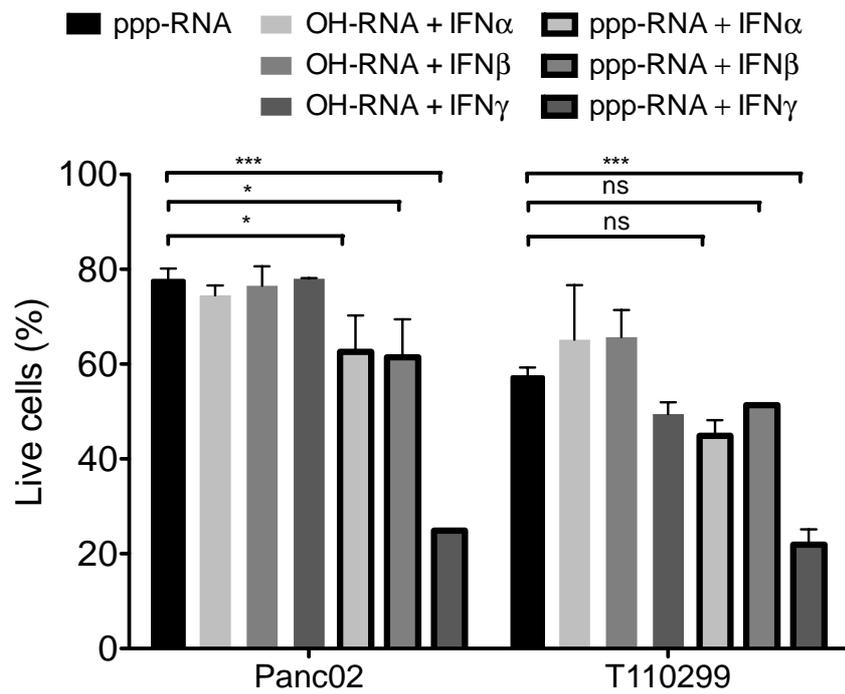
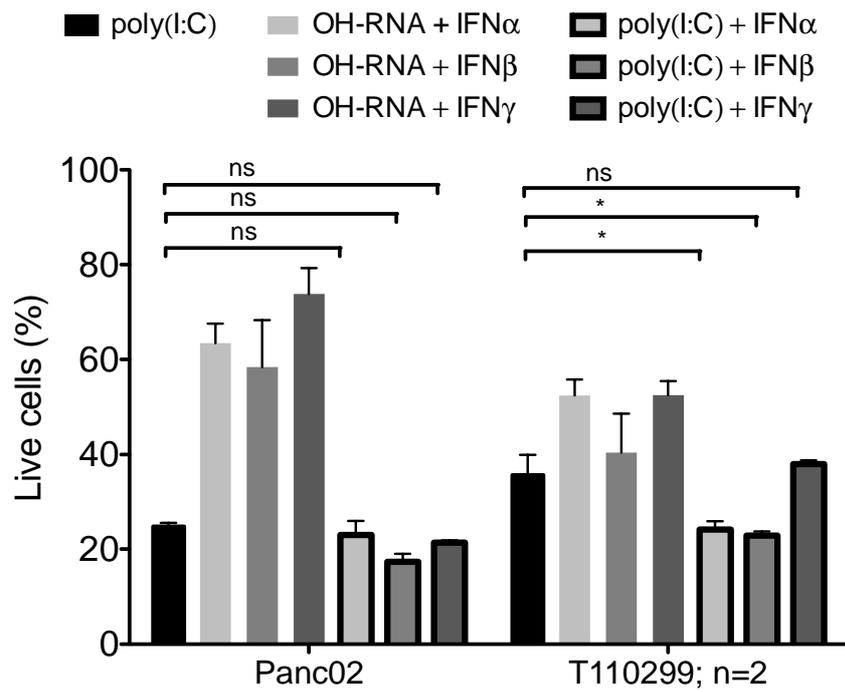
Humane MIAPaCa-2 Zellen wurden für 24 h in Ab- bzw. Anwesenheit von 100 IU/ml IFN α kultiviert und anschließend, wo angezeigt, mit 1 μ g/ml ppp-RNA transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Analyse der Apoptoserate anhand einer Annexin V/PI-Färbung mittels Durchflusszytometrie. Lebende Zellen sind Annexin V und PI negativ (linker unterer Quadrant). Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Dieser Apoptose-fördernde Effekt ließ sich für ppp-RNA und Typ I IFN für alle humanen Pankreaskarzinomzellen nachweisen. Für poly(I:C) zeigte sich dieser Effekt nur für einige Zelllinien, oft war jedoch der poly(I:C)-induzierte Zelltod so ausgeprägt, dass kein Synergismus zu erwarten war. Für Typ II IFN (IFN γ) zeigte sich der Apoptose-fördernde Effekt nur bei wenigen Zelllinien, wie IMIM-PC-1 und MIAPaCa-2 (Abb. 21 B).

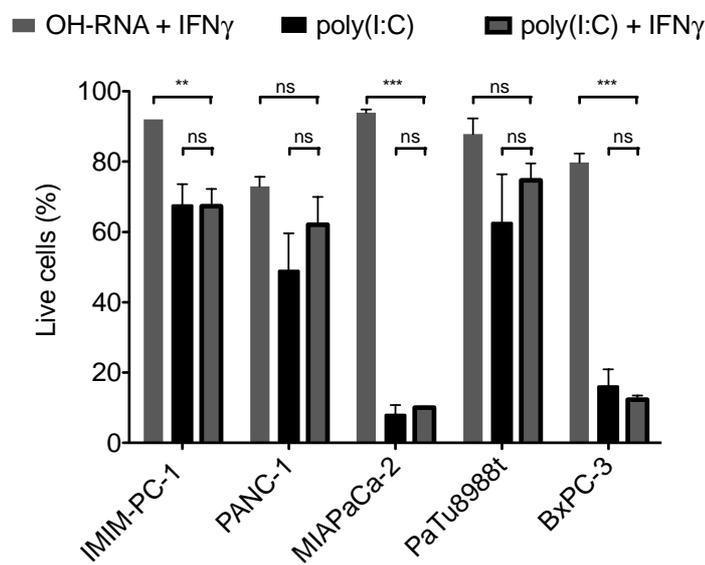
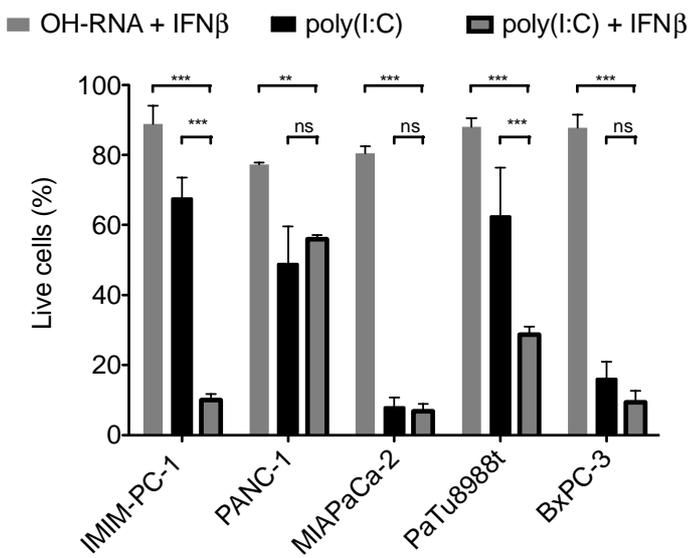
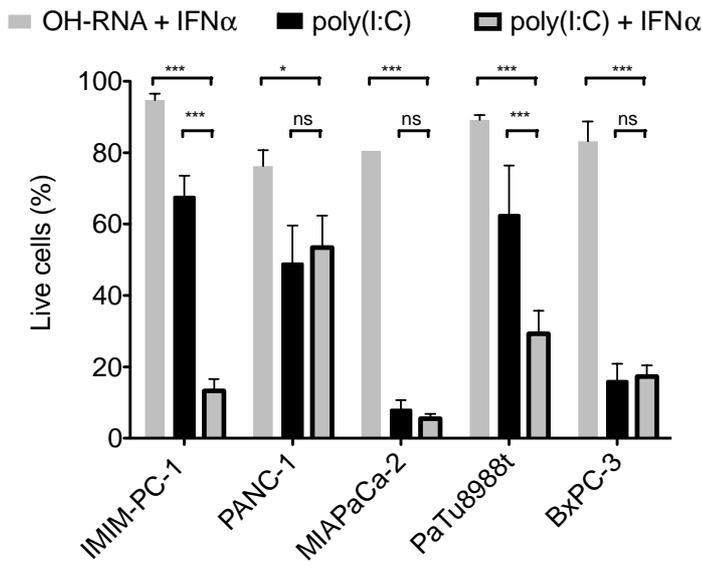
Bei den murinen Zelllinien zeigte sich durch Behandlung mit IFN kein konstanter Apoptose-fördernder Effekt (Abb. 21 A). Bei den Panc02-Zellen war die Apoptoserate nach Vorbehandlung mit IFN gegenüber der Monotherapie mit poly(I:C) nicht statistisch signifikant erhöht. In der Kombination von IFN mit ppp-RNA zeigte sich jedoch verstärkt Apoptose, wobei IFN γ den größten additiven Effekt zeigte. Bei den T110299 Zellen stellte sich für die Kombination von ppp-RNA und IFN γ ein verstärkter Apoptose-Effekt heraus. Dieser ist vor dem Hintergrund der für diese Zelllinie ausgeprägten Apoptoseresistenz besonders markant.

Diese Ergebnisse weisen teilweise in Bezug auf die Apoptoserate eindrückliche synergistische Effekte durch die IFN-Vorbehandlung auf. Diese Effekte sind jedoch sowohl von der Spezies (Mensch versus Maus), des RLH-Liganden (ppp-RNA versus poly(I:C)), als auch vom IFN-Typ (Typ I versus Typ II IFN) abhängig.

A



B



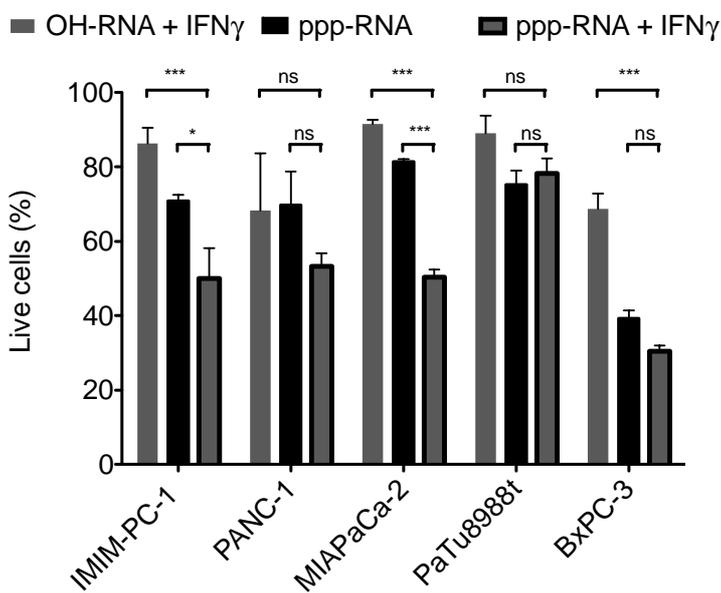
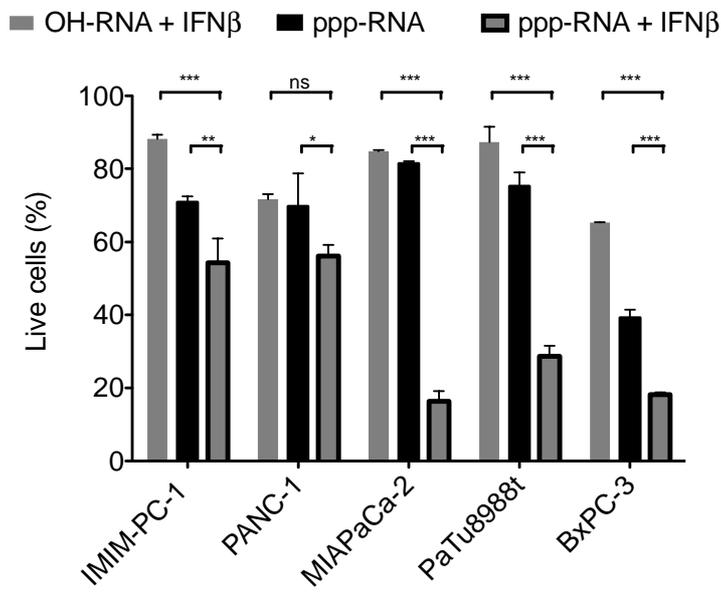
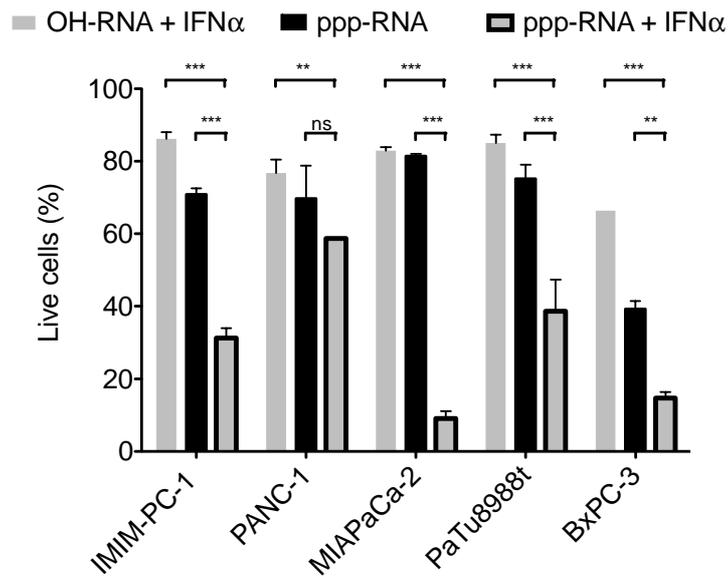


Abb. 21: Kombination von Typ I und II IFN mit RLH-Liganden führt zu gesteigertem Tumorzelltod.

(A) Murine Pankreaskarzinomzellen wurden für 24 h mit 1000 IU/ml IFN α , β oder γ kultiviert und anschließend mit 0,25 μ g/ml poly(I:C) (oben) oder 1,5 μ g/ml ppp-RNA (unten) bzw. OH-RNA in der entsprechenden Konzentration für 48 h transfiziert. (B) Humane Pankreaskarzinomzellen wurden für 24 h mit 100 IU/ml IFN α , β oder γ kultiviert und anschließend mit 0,125 μ g/ml poly(I:C) (oben) oder 1,5 μ g/ml ppp-RNA (unten) bzw. OH-RNA in der entsprechenden Konzentration für 48 h transfiziert. Zelltod wurde mittels Annexin V/PI-Färbung durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte und SD aus Duplikaten eines repräsentativen Experiments (Ausnahme unter A rechts oben: Daten von T110299 mit poly(I:C) wurden aus zwei Experimenten vereint) von mindestens zwei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede wurden mit zweiseitiger ANOVA inklusive Bonferroni-Korrektur analysiert.

3.3.3 Charakterisierung der durch Interferone und RLH-Liganden induzierten Tumorzellapoptose

Es wurde bereits gezeigt, dass RIG-I-*signalling* in verschiedenen Tumoren über den intrinsischen, Caspase-9-abhängigen Signalweg Apoptose induziert. Der Mechanismus beruht auf einer vermehrten Expression von Proteinen der pro-apoptotischen BCL-2-Familie (Besch et al., 2009; Duewell et al., 2014; Ellermeier et al., 2013; Poeck et al., 2008). Das entstehende Apoptosom aktiviert die Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6 und -7) und initiiert Zellapoptose. Basierend auf vorherigen Apoptose-Daten liegt die Vermutung nahe, dass die Kombination aus IFN- und RLH-Aktivierung vermehrt zur Aktivierung von Caspasen führt. Im Zuge der Kombinationstherapie aus adjuvantem IFN und RLH-Liganden wurde die Aktivierung von Caspase-9 und -3 mittels Western Blot überprüft. Poly(I:C) alleine erzielte zum gewählten Zeitpunkt bei MIAPaCa-2 Zellen noch keinen merklichen Effekt bezüglich der Aktivierung von Caspase-3 und -9. Nach Vorstimulation mit Typ I bzw. Typ II IFN zeigte sich eine deutliche Aktivierung von Caspase-3 und -9 (Abb. 22). Diese Daten belegen, dass die IFN-Vorbehandlung die Tumorzellen in Bezug auf die RLH-induzierte intrinsische Apoptose sensibilisiert.

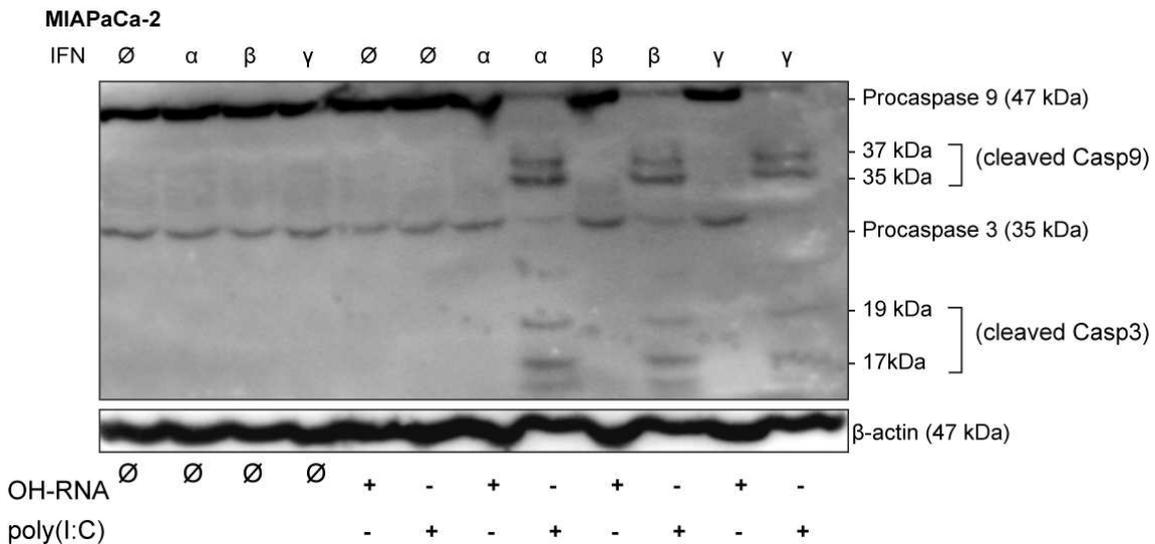


Abb. 22: Proteolytische Spaltung von Procaspase-3 und -9 nach Vorbehandlung mit IFN α , β oder γ und Stimulation mit poly(I:C).

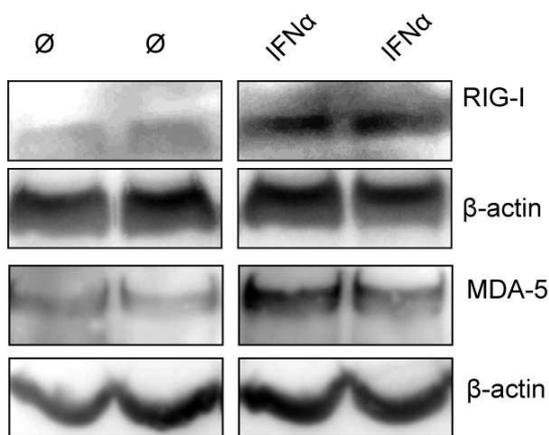
MIAPaCa-2 Zellen wurden für 24 h mit 1000 IU/ml IFN α , β oder γ inkubiert und anschließend mit 0,5 μ g/ml poly(I:C) oder Kontroll-RNA (OH-RNA) für 24 h stimuliert. Aktivierte Procaspase-3 und -9 wurden mittels Western Blot analysiert. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

3.4 Interferon- und RIG-I-like-Helikasen-basierte Immuntherapie im Panc02-Tumormodell

Die zuvor beschriebenen *in vitro* Experimente haben belegt, dass das RIG-I-*signalling* in Panc02-Tumorzellen durch Kombination mit Typ I IFN verbessert werden kann. Ein Ziel dieser Arbeit war es, diese Erkenntnisse als Grundlage für eine kombinierte Tumormimmuntherapie auf ein *in vivo* Modell zu übertragen. Hierfür eignet sich das Panc02-Tumormodell, welches als subkutan und als orthotopes Modell in unserer Arbeitsgruppe fest etabliert ist. Da die *in vitro* Daten eine Überlegenheit von Typ I IFN gegenüber Typ II IFN für diese Zelllinie erbrachten, wurde in den folgenden *in vivo* Versuchen IFN α verwendet. Als RLH-Liganden dienten sowohl ppp-RNA als auch poly(I:C).

3.4.1 Systemische Applikation von IFN α erhöht die RLH-Expression im Tumor

Im ersten Schritt wurde überprüft, ob sich durch systemische IFN α Behandlung eine Induktion von RLH im Tumorgewebe im subkutanen Panc02-Pankreaskarzinommodell in C57BL/6 Mäusen findet. Es zeigte sich, dass sich durch zweimalige intraperitoneale Injektion von 50.000 IU IFN α *in vivo* die Expression von RIG-I und MDA5 im Tumorgewebe induzieren lässt (Abb. 23).

Panc02 *in vivo*

RIG-I- und MDA5-Expression wurde auf Proteinebene im Tumorlysat per Western Blot evaluiert. Vier Mäusen wurden subkutan Panc02-Tumore gesetzt. Konsekutiv 48 h und 24 h vor Versuchsabbruch wurde zwei Mäusen 50.000 IU IFN α in 50 μ l PBS intraperitoneal gespritzt. Als Kontrolle dienten zwei Mäuse, denen 50 μ l PBS gespritzt wurde. Die Tumore wurden operativ entfernt, das Gewebe lysiert (siehe 2.3.6) und anhand eines Bradford Assays die erforderliche Lysatmenge für 50 ng Protein ermittelt.

Abb. 23: Systemische Applikation von IFN α steigert die Expression von RIG-I und MDA5 in Panc02-Tumoren *in vivo*.

3.4.2 Kombination von IFN α mit ppp-RNA verbessert das RLH-signalling *in vivo*

Im nächsten Schritt wurde die kombinierte Immuntherapie sowohl im subkutanen als auch im orthotopen Panc02-Tumormodell untersucht. Dabei wurden den Tieren Tumorzellen implantiert und diese nach sieben Tagen randomisiert in drei Gruppen unterteilt. Eine Gruppe wurde mit IFN α intraperitoneal vorbehandelt und erhielt eine Kontroll-RNA (OH-RNA) intravenös über die Schwanzvene. Die zweite Gruppe wurde lediglich mit ppp-RNA behandelt und die dritte Gruppe erhielt die kombinierte Therapie bestehend aus IFN α und ppp-RNA (Abb. 24 A). Im Abbruchversuch 96 h nach Therapiebeginn wurde die Induktion von IFN β (qRT-PCR), sowie Tumorzelltod (TUNEL Färbung) im Tumorgewebe bestimmt. Wie aus Abb. 24 B zu entnehmen ist, führte die Behandlung mit ppp-RNA bereits zu einer Hochregulation von IFN β im Tumorgewebe. Konsistent zu den *in vitro* Daten führte die Vorbehandlung mit IFN α zu einem additiven Effekt auf die IFN β Expression. Dieser Effekt spiegelte sich auch in der Induktion von Tumorzellapoptose wider. Apoptotische Tumorareale waren in der Therapiegruppe mit ppp-RNA im Vergleich zu IFN α alleine deutlich vermehrt erkennbar. Die kombinierte Immuntherapie führte zu einer drastischen Zunahme der TUNEL-positiven Areale im Tumor (Abb. 24 C).

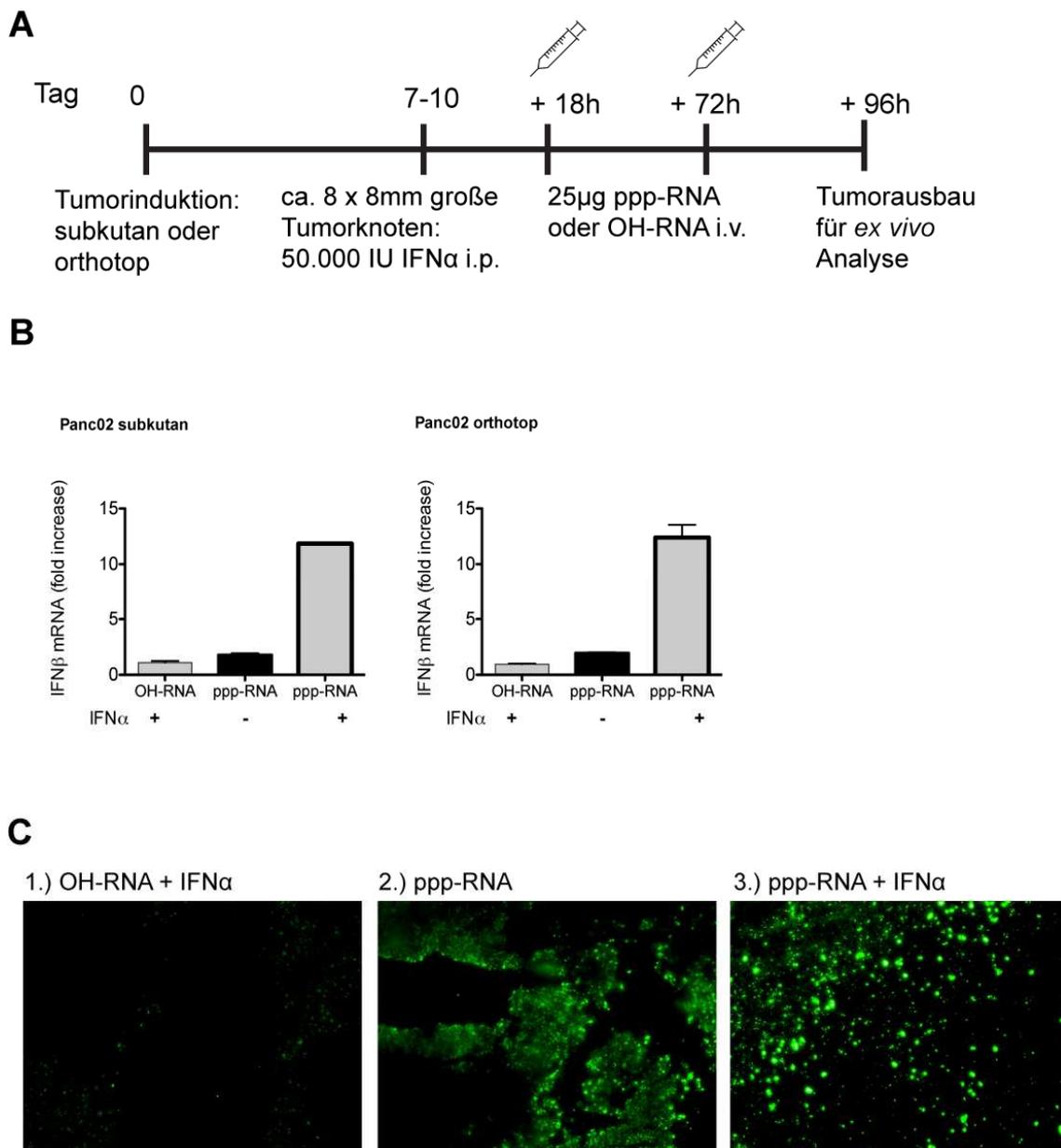


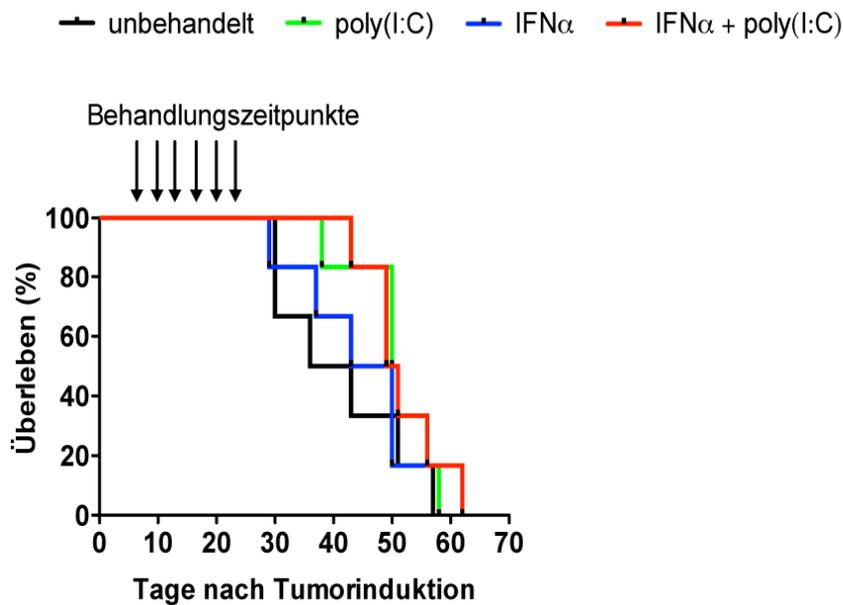
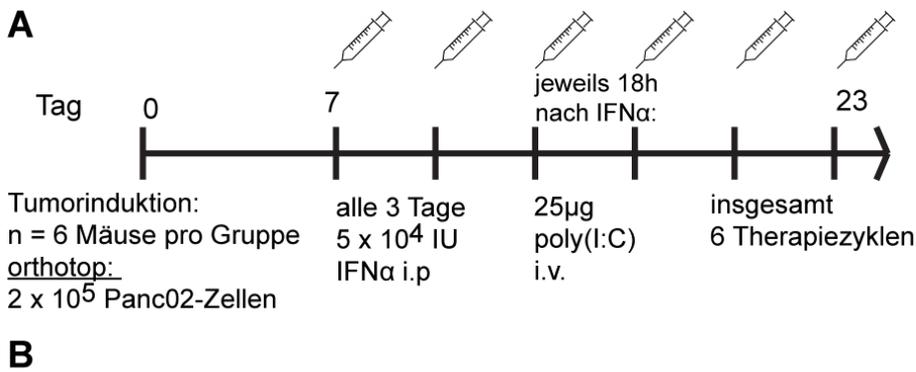
Abb. 24: IFN α führt in Kombination mit ppp-RNA zu optimierter IFN-Produktion im Tumor und Tumorzellapoptose *in vivo*.

(A) Versuchsplan für orthotope und subkutane Abbruchversuche im Panc02-Tumormodell. Für orthotope Tumore wurden 2×10^5 und für subkutane Tumore 5×10^5 Panc02-Zellen implantiert (B) Aus Tumorlysate wurde RNA isoliert und die IFN β mRNA-Expression mittels qRT-PCR bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte und SEM aus Duplikaten eines repräsentativen Experiments von jeder Therapiegruppe bestehend aus jeweils zwei bis drei Mäusen. (C) In Gewebeschnitten wurde nach TUNEL-Färbung der Zelltod (grün) in subkutanen Panc02-Tumoren bestimmt. Gezeigt sind repräsentative Schnitte von jeder Therapiegruppe bestehend aus jeweils drei Mäusen.

3.4.3 Einfluss der Kombination von IFN α und poly(I:C) auf das Überleben im orthotopen Panc02-Tumormodell

Abschließend wurde *in vivo* der Einfluss der kombinierten Therapie aus IFN α und dem RLH-Liganden poly(I:C) auf das Überleben der Tiere untersucht. Dazu wurden den Mäusen Panc02-Tumorzellen orthotop ins Pankreas implantiert und nach sieben Tagen mit der Therapie begonnen. Nach Randomisierung wurden die Tiere in vier Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe erhielt keine Therapie und diente als Kontrolle für das Tumorwachstum. Die Gruppen zwei und drei erhielten jeweils die Monotherapie, bestehend aus entweder IFN α oder poly(I:C). Die vierte Gruppe wurde mit der Kombinationstherapie aus IFN α und poly(I:C) behandelt (Abb. 25 A).

Sowohl die Monotherapie mit poly(I:C) als auch die Kombinationstherapie aus IFN α und poly(I:C) zeigten bis etwa Tag 40 eine geringere Mortalität gegenüber den beiden anderen Versuchsgruppen. Nach 50 Tagen fanden sich hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen (Abb. 25 B). Das mittlere Überleben betrug für unbehandelte Tiere 39,5 Tage, bei Therapie mit IFN α 46,5 Tage, bei Therapie mit poly(I:C) bei 50,5 Tagen und bei der Kombinationstherapie 50 Tage. Im Vergleich zu den Einzeltherapien zeigte sich durch die Kombination kein signifikanter Unterschied im Überleben im orthotopen Tumormodell.



p-Werte:

- poly(I:C) vs unbehandelt: $p = 0,2684$
- poly(I:C) vs IFN α : $p = 0,2535$
- IFN α vs IFN α + poly(I:C): $p = 0,3332$
- poly(I:C) vs IFN α + poly(I:C): $p = 0,8731$

Abb. 25: Einfluss der Kombination aus IFN α und poly(I:C) auf das Überleben im orthotopen Panc02-Tumormodell.

(A) Versuchsplan. Den Mäusen wurden 2 x 10⁵ Panc02-Tumorzellen orthotop ins Pankreas implantiert. Die Therapie startete an Tag 7 nach Tumorinduktion und endete nach 23 Tagen (n = 6 Mäuse pro Therapiegruppe). Nach Randomisierung wurden die Tiere in vier Gruppen eingeteilt: **1**) Kontrolle, **2**) IFN α , **3**) poly(I:C) und **4**) IFN α und poly(I:C). Alle drei Tage wurde den Mäusen der Gruppe **2**) und **4**) 5 x 10⁴ IU IFN α *i.p.* injiziert. Im Abstand von 18 h zur IFN-Injektion erfolgte jeweils bei den Gruppen **3**) und **4**) die Injektion von 25 μ g poly(I:C) *i.v.* Insgesamt wurden sechs Therapiezyklen durchgeführt. (B) Gezeigt ist das Überleben der vier Vergleichsgruppen. Die Analyse der Überlebenszeiten erfolgte mit dem log-rank (Mantel-Cox)-Test.

4 Diskussion

4.1 *RIG-I und MDA5 als molekulare Zielstrukturen einer Tumorimmuntherapie*

In vorausgegangenen Arbeiten konnte unsere Arbeitsgruppe immunhistochemisch die Expression von RIG-I und MDA5 bei allen der untersuchten humanen PanIN Läsionen, primären Pankreasadenokarzinomen und Metastasen zeigen (Duewell et al., 2015; Ellermeier et al., 2013). Die Funktionalität des RIG-I- und MDA5-Signalwegs wurde in der vorliegenden Arbeit *in vitro* und *in vivo* für diverse murine und humane Pankreaskarzinomzelllinien demonstriert. Durch die funktionelle RLH-Expression qualifiziert sich das Pankreaskarzinom für eine RLH-basierte Immuntherapie. In einem anderen Projekt wurde die RLH-basierte Immuntherapie modifiziert, indem zusätzlich zur ppp-RNA-vermittelten RIG-I-Stimulation eine siRNA-vermittelte Genexpressionshemmung mittels einer bifunktionellen ppp-siRNA zur Anwendung kam. Durch Kombination von RIG-I-Aktivierung mit RNA-Interferenz, gerichtet gegen das anti-apoptotische Protein Bcl-2, das Enzym Glutaminase oder gegen das immunsuppressive Zytokin TGF β , konnte die antitumorale Wirksamkeit der RLH-basierten Immuntherapie erweitert werden (Ellermeier et al., 2013; Meng et al., 2014; Poeck et al., 2008). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die antitumorale Effektivität einer RLH-basierten Immuntherapie durch die adjuvante Gabe von Typ I bzw. II IFN zu optimieren. Um den adjuvanten Effekt der Kombinationstherapie zu überprüfen, wurden mit Panc02 und T110299 zwei murine, sowie eine Reihe von humanen Pankreaskarzinomzelllinien eingesetzt, um die potenzielle Wirksamkeit der Strategie in den klinischen Kontext zu stellen.

4.2 *Intaktes Interferon-signalling in Pankreaskarzinomzellen*

Grundlage für eine Optimierung der RLH-basierten Immuntherapie mit adjuvantischem IFN ist ein funktionelles IFN-*signalling* der Pankreaskarzinomzellen. In allen untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien konnte eine STAT1-Phosphorylierung nach IFN-Stimulation nachgewiesen werden. Es fanden sich jedoch nicht nur Unterschiede in Bezug zu den verschiedenen Interferonen (IFN α und IFN β), sondern auch zeitlich bedingte, sowie konzentrationsabhängige Unterschiede bei den verschiedenen Zelllinien (Abb. 5). Dies lässt auf eine gewisse Heterogenität des IFN-*signallings* bei Pankreaskarzinomzelllinien schließen. Prinzipiell zeigte sich jedoch, dass besonders die humanen Zelllinien sensitiv für Typ I IFN waren.

Bereits während der ersten 15-30 min nach IFN-Stimulation war eine IRF3-Phosphorylierung zu beobachten. Die Induktion von ISG, wie RIG-I und MDA5, hatten ihr mRNA-Expressionsmaximum nach ca. 12 h (Abb. 6). Die entsprechende Proteintranslation war 24-48 h nach IFN-Stimulation nachweisbar (Abb. 7 u. Abb. 8). Somit scheint ein zeitlicher Abstand von ca. 24 h zwischen IFN-Vorstimulation und RLH-Aktivierung sinnvoll. Allerdings fand sich, wie bereits oben erwähnt, eine deutliche Heterogenität bei den unterschiedlichen Zelllinien.

Publizierte Studien haben ergeben, dass in Gewebeschnitten des Pankreaskarzinoms die Rezeptorexpression von IFNAR-1 bei ca. 90 % und von IFNAR-2c bei ca. 70 % liegt (Booy et al., 2014a). In Tumorbiopsien wurde die Expressionsrate von STAT1 und p21 überprüft, sowie hinsichtlich der Prognoserelevanz analysiert (Sun et al., 2014). P21 ist ein auf p53-ansprechendes Gen der Zellzyklusregulation und vermittelt gegen Tumore gerichtete STAT1 Aktivität. Die Expression von STAT1 war in 88 % und p21 in 82 % nachzuweisen. Der Verlust von STAT1 und p21 korrelierte mit schlechter Tumordifferenzierung, fortgeschrittenen klinischen Stadien, Lymphknotenmetastasen, sowie einer schlechteren Prognose für die Patienten. Die vorliegenden Daten zur Prognoserelevanz der STAT1-Expression im Pankreaskarzinom sprechen dafür, dass IFN-vermittelte Effekte die Tumorprogression einzudämmen vermögen.

Es ist bekannt, dass Typ I IFN das Zellwachstum hemmen und Apoptose in Tumorzellen induzieren können. Diese Effekte sind aber nicht für jede Tumorzelllinie gleichermaßen zu beobachten und werden oft erst bei extrem hohen Konzentrationen erkennbar (Hu et al., 1999; Murata et al., 2006). Alleinige IFN-Stimulation mit Konzentrationen bis 1000 U/ml führte in den hier untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien nicht zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität (Abb. 21). Der genaue direkte antitumorale Wirkmechanismus von Typ I IFN auf Tumorzellen ist unbekannt und oft nicht von den indirekten Effekten zu trennen. *In vitro* Studien mit Pankreaskarzinomzelllinien weisen darauf hin, dass IFN α mittels IFNAR-2c einen antiproliferativen und eventuell zytostatischen Effekt auf Tumorzellen ausübt (Wagner et al., 2004). Während für diesen Effekt jedoch sehr hohe Konzentrationen von IFN α benötigt wurden, entfaltete IFN β schon bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen eine Wirkung (Chen et al., 1996). IFN β bindet für eine längere Zeit als IFN α an IFNAR, wodurch eine unterschiedliche Signalstärke ermöglicht wird (Jaitin et al., 2006). Zudem bindet IFN β (aber nicht IFN α) möglicherweise an IFNAR-1 Homodimere und induziert somit spezielle Signale unabhängig von IFNAR-2, JAK1

und STAT1 (de Weerd et al., 2013). Das könnte die biologischen Unterschiede zwischen IFN α und IFN β bei einigen der Tumorzelllinien erklären.

4.3 Funktionelle RIG-I-like-Helikasen-Expression in Pankreaskarzinomzellen

Ein potenziell limitierender Faktor in der RLH-basierten Immuntherapie stellt eine geringe RLH-Expression in den Tumorzellen dar, wobei ein vollständiger Verlust nicht beschrieben und in eigenen Arbeiten nicht beobachtet wurde. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass RIG-I und MDA5 in einer Vielzahl an Tumorzelllinien, inklusive Pankreaskarzinomen, funktionell aktiv sind (Düewell et al., 2015; Düewell et al., 2014; Ellermeier et al., 2013; Meng et al., 2014). So führte eine Stimulation der Tumorzellen mit RLH-Liganden zu einer dosisabhängigen Typ I IFN-Synthese, Hochregulation von MHC-I-Molekülen und Fas-Rezeptoren auf der Zelloberfläche, Sekretion von Chemokinen und Tumorzellapoptose. RT-PCR- und Western Blot-Analysen dieser Arbeit weisen darauf hin, dass bei diversen murinen und humanen Pankreaskarzinomzellen die basale RIG-I-Expression gering ist, jedoch durch IFN gut induzierbar ist (Abb. 6 - Abb. 8). Dies steht in Einklang mit einer vorausgegangenen Arbeit, in der die Inkubation diverser Pankreaskarzinomzelllinien mit IFN α ebenfalls zu einer Hochregulation von RIG-I führte (Ellermeier et al., 2013). Zusätzlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch Typ II IFN die Expression von RIG-I und MDA5 steigern kann. Dabei erwies sich Typ I IFN bei den untersuchten Zelllinien in der Regel jedoch als potenter im Vergleich zu IFN γ (Abb. 6 - Abb. 8). In der Zusammenschau zeigt sich eine starke IFN-abhängige Induktion sowohl von RIG-I als auch MDA5 in den untersuchten Zelllinien, was eine solide Grundlage für eine kombinierte IFN- und RLH-basierte Immuntherapie darstellt.

CXCL10 fördert als Chemokin die Migration von anti-tumoralen T-Lymphozyten, was sich förderlich auf die Tumorregression auswirken dürfte (Verbeke et al., 2012). Für das Pankreaskarzinom konnte bereits im Mausmodell eine Korrelation zwischen erhöhten CXCL10-Serumspiegeln und einer gesteigerten Tumordinfiltration von CD8⁺T-Zellen hergestellt werden (Ellermeier et al., 2013). Expression von MHC-I Molekülen auf der Oberfläche der Tumorzellen ermöglicht zudem eine CD8⁺T-Zell-vermittelte Erkennung und Eliminierung. Wie auch in dieser Arbeit gezeigt, führt die Behandlung muriner und humaner Zelllinien mit RLH-Liganden zur vermehrten Expression von MHC-I Oberflächenmolekülen und Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (CXCL10) sowie Typ I IFN (Abb. 10 u. Abb. 11). Unsere Arbeitsgruppe wies bereits nach, dass es durch RIG-I-Aktivierung zur Sekretion

von Typ I IFN in Pankreaskarzinomzellen kommt (Ellermeier et al., 2013). Einzig für die Zelllinie MIAPaCa-2 konnte in Übereinstimmung mit dem beobachteten Gendefekt auf Chromosom 9, der zum Verlust des IFN β -Gens führt, keine Induktion von IFN β beobachtet werden (Chen et al., 1996). Allerdings konnte die MIAPaCa-2 Zelllinie mittels Typ I IFN zur Expression von ISG, wie RIG-I und MDA5, angeregt werden, was auf einen intakten IFNAR-Signalweg hindeutet (Abb. 8).

4.4 Optimiertes RIG-I-like-Helikasen-signalling durch die Kombination von RIG-I-like-Helikasen-Liganden mit adjuvantem Interferon

Die grundlegende Hypothese dieser Arbeit war die IFN-basierte Sensitivierung von Tumorzellen, um ein verbessertes Ansprechen der Zellen auf eine RLH-basierte Therapie zu erzielen. In ersten Experimenten zeigte sich durch die Kombination von Typ I bzw. Typ II IFN mit poly(I:C) eine geringfügig gesteigerte STAT1-Phosphorylierung (Abb. 14). Ein eher geringer zusätzlicher Effekt war zu erwarten, da bereits die alleinige IFN-Gabe eine starke Induktion von pSTAT1 hervorrief (Abb. 5), die dann durch RLH-Aktivierung nur noch leicht gesteigert werden konnte. Ein Grund hierfür könnte eine zeitversetzte IFN-Freisetzung durch RLH-Stimulation bei bereits abklingender Wirkung des exogen zugeführten IFN sein. Auch RIG-I Expression und IRF3-Phosphorylierung ließen sich durch die Kombination von Typ I bzw. II IFN mit RLH-Liganden steigern (Abb. 15 u. Abb. 16). Zudem führte die IFN Vorstimulation zu einer dosisabhängigen Steigerung der CXCL10-Sekretion, sowie der MHC-I-Expression (Abb. 17 - Abb. 19). Allerdings gab es auch hier zwischen den Zelllinien deutliche Unterschiede im Ansprechen auf eine RLH-Aktivierung. Murine T110299 zeigten im Gegensatz zu Panc02 und den humanen Zelllinien keine MHCI-Hochregulation durch RLH-Aktivierung. In Einklang dazu zeigte sich nach alleiniger Stimulation mit ppp-RNA zwar eine IRF3-Phosphorylierung, jedoch nur eine geringe CXCL10-Sekretion und Apoptoseinduktion (Abb. 21 A). Die Kombination von Typ II IFN und RLH-Aktivierung konnte jedoch auch bei dieser relativ therapieresistenten Zelllinie, die aus Tumoren des genetischen KPC-Mausmodells stammt (gezielte Mutation in den Kras und p53 Genen), zu einem effektiven Zelltod führen.

Die Elimination von Tumorzellen ist notwendiger Bestandteil des *cancer immunoediting*. Durch eine inaktivierende Mutation von p53 sind Pankreaskarzinomzellen weniger sensitiv für pro-apoptotische Signale, wodurch die Zellen leichter in die *escape*-Phase des *cancer immunoediting* eintreten und der Kontrolle des Immunsystems entgehen können (Scarpa et al., 1993). Daher sind neue

Behandlungsstrategien gefragt, die unabhängig von p53 Apoptose auslösen. In Melanomzellen wurde durch RIG-I p53-unabhängig Apoptose induziert (Besch et al., 2009). Unsere Arbeitsgruppe konnte diese Beobachtung in humanen Pankreaskarzinomzellen bestätigen, da unabhängig vom p53-Mutationsstatus (BxPC-3, PANC-1 und MIAPaCa-2 verfügen über eine p53-Mutation) Apoptose ausgelöst wurde (Ellermeier et al., 2013). Wie unsere Arbeitsgruppe bereits in Vorarbeiten zeigte, wird durch synthetische RLH-Liganden eine immunogene Art des Zelltodes in Pankreaskarzinomzellen induziert (Abb. 26) (Duewell et al., 2015; Duewell et al., 2014; Ellermeier et al., 2013). Ein entscheidender Faktor hierfür war von Tumorzellen ausgehendes IFN, welches zur Aktivierung von DC mit verbesserter Kreuzpräsentation von Tumorantigenen führte. Dies wiederum induzierte die Expansion tumorreaktiver T-Zellen. Dieses Phänomen wurde begleitet von der Expression sogenannter „eat-me“ Signale (Calreticulin, HMGB1, Hsp90) auf Seiten der Tumorzellen und erhöhter Expression von Fas mit Sensitivierung gegenüber FasL-vermittelter Zellyse (Duewell et al., 2014).

Während die Versuche dieser Arbeit bestätigen konnten, dass die alleinige Applikation von ppp-RNA bzw. poly(I:C) zu einer verringerten Zellviabilität führt (Abb. 13), konnte die Apoptoserate durch Vorstimulation mit Typ I und II IFN meist deutlich gesteigert werden (Abb. 20 u. Abb. 21). Im Vergleich zu einer Behandlung mit ppp-RNA, in der erst vergleichsweise hohe Dosen zu einer gesteigerten Apoptoserate führten, reagierten die Tumorzellen sensitiver auf poly(I:C) (Abb. 13 A). Bereits bei einer Konzentration von 0,125 µg/ml nahm die Viabilität humaner Pankreaskarzinomzellen um 30 bis 60 % ab (Abb. 13 B). Dieses Phänomen beruht wahrscheinlich weniger auf der vermehrten Expression von MDA5, als vielmehr auf der zelltodinduzierenden Potenz von poly(I:C) und dem MDA5-vermittelten Signalweg (Cheng and Xu, 2010). Auch könnte die Größe der poly(I:C)-Moleküle zu einer längeren Halbwertszeit und somit verstärkten RLH-Signalintensität führen. Ferner könnten durch poly(I:C) weitere, RLH-unabhängige Signalwege aktiviert werden, wie z.B. TLR3 oder PKR, die zum Zelltod der Tumorzelle führen (Cheng and Xu, 2010; Jiang et al., 2003). Diese RLH-unabhängigen Signalwege könnten auch die hohe Toxizität einer poly(I:C)-basierten Therapie im Vergleich zu einer ppp-RNA-basierten Therapie bedingen (Coch et al., 2013; Galluzzi et al., 2012; Schlee et al., 2006). Die geringere Toxizität bei guter IFN-Induktion veranlasste die Entwicklung ppp-RNA-basierter Medikamente, die sich derzeit in präklinischer Entwicklung befinden (Rigontec GmbH) (Junt and Barchet, 2015).

In Analogie zu Unterschieden im RLH-*signalling* zwischen den Zelllinien ließen sich auch hinsichtlich des Ansprechens auf Vorbehandlung mit Typ I und II IFN Unterschiede in der Steigerung der Apoptoserate feststellen. Während sich bei den humanen MIAPaCa-2- und IMIM-PC-1-Zellen für IFN α und IFN β die stärksten Effekte feststellen ließen, erwies sich IFN γ bei den murinen Panc02- und T110299-Zellen am potentesten hinsichtlich der Apoptoseinduktion. Keiner der drei IFN-Typen zeigte sich gegenüber den anderen Vertretern für alle Pankreaskarzinomzelllinien konsistent als vorteilhafter (Abb. 21).

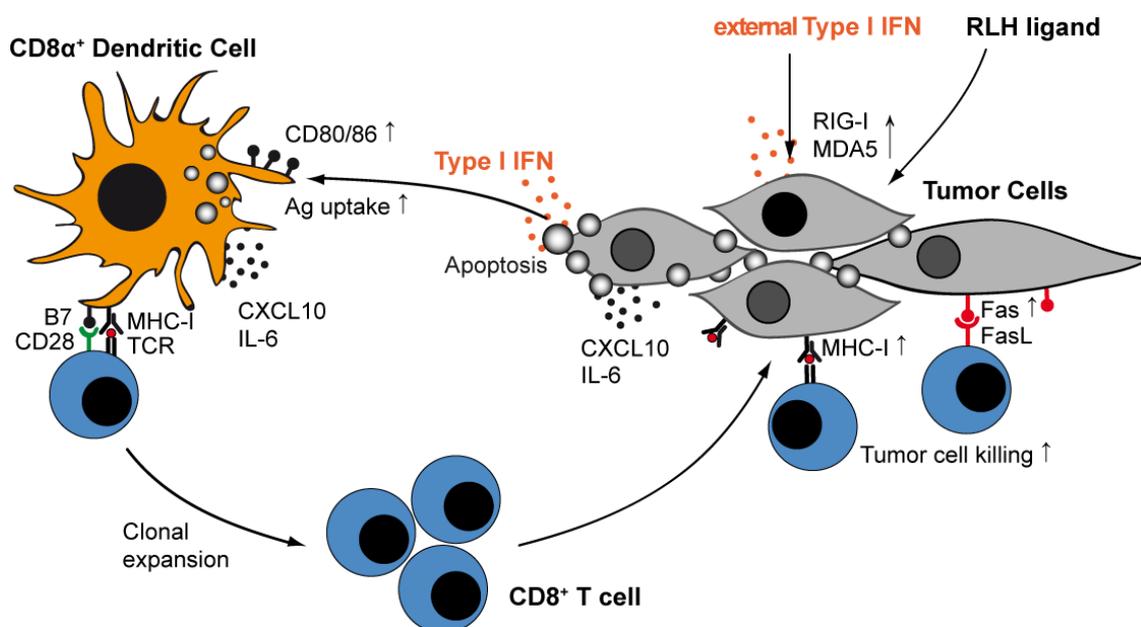


Abb. 26: Schema zur Optimierung einer RLH-basierten Immuntherapie durch adjuvantes Typ I IFN.

Extern zugeführtes Typ I IFN führt zu einer Hochregulation von RIG-I und MDA5 in den Tumorzellen und optimiertem RLH-*signalling* nach Applikation von synthetischen RLH-Liganden, wie ppp-RNA oder poly(I:C). RLH-basierte Immuntherapie führt zu MHC-I-Hochregulation auf der Tumorzelloberfläche, Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Tumorzellapoptose. Der RLH-induzierte, immunogene Zelltod sensibilisiert Pankreaskarzinomzellen für eine effiziente CD8 $^+$ T-Zell-Antwort. Modifiziert nach (Duewell et al., 2014).

Bislang konnte bezüglich der antitumoralen IFN-Wirkung kein signifikanter Zusammenhang zwischen Typ I IFN-Rezeptorexpression und klinisch-pathologischen Faktoren, sowie dem Überleben nachgewiesen werden. IFN β zeigte im Vergleich zu IFN α schon in sehr viel niedrigeren Konzentrationen antitumorale Effekte (Booy et al., 2014b). Wir konnten nicht bestätigen, dass IFN β in humanen Pankreaskarzinomzellen effektiver Apoptose induziert als IFN α . Diese unterschiedlichen Beobachtungen könnten darin begründet liegen, dass Booy et al. die Zellen über sieben Tage mit Typ I IFN inkubierten, während wir die Zellen bei gleicher Konzentration von IFN

lediglich über zwei Tage in Kultur hielten. Weitere Studien sind notwendig, um zu evaluieren welcher IFN-Typ in der Therapie für humane Pankreaskarzinomzellen am potentesten ist und worin die unterschiedliche Potenz begründet liegt.

Für Pankreaskarzinomzellen wurde in Arbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass RLH-vermittelte Tumorzellapoptose unabhängig von p53 über den intrinsischen Apoptoseweg vermittelt wird. Es fand sich nach RNAi-vermittelter Hemmung der Puma-Expression eine signifikante Inhibition der Apoptoseinduktion, was auf den intrinsischen Apoptoseweg hindeutet (Ellermeier et al., 2013). Des Weiteren wiesen Versuche mit IFNAR-blockierenden Antikörpern und IFNAR-defizienten Mäusen darauf hin, dass Typ I IFN maßgeblich für die Aktivierung von DC verantwortlich ist. Somit spielt Typ I IFN eine Schlüsselrolle bei der Initiierung eines durch RLH-Liganden vermittelten immunogenen Zelltods (Duewell et al., 2014). In Übereinstimmung damit wies die vorliegende Untersuchung nach, dass der intrinsische Apoptoseweg, der durch RLH-Liganden in Pankreastumorzellen aktiviert wird, durch IFN-Vorstimulation verstärkt abläuft. So wurde für humane MIAPaCa-2 Pankreaskarzinomzellen demonstriert, dass eine alleinige Therapie mit poly(I:C) in der gewählten Konzentration noch nicht zu nachweisbarer Caspase-Aktivität führte, wohingegen nach Vorstimulation mit Typ I bzw. II IFN eine proteolytische Aktivierung von Caspase-9 und -3 nachweisbar war (Abb. 22). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte eine schnellere Zelltodinduktion nach IFN-Vorstimulation im Vergleich zur Monotherapie mit synthetischen RLH-Liganden darstellen. Während zu gewähltem Zeitpunkt die proteolytische Aktivierung der Caspasen nach IFN-Vorstimulation bereits sichtbar war, könnte nach alleiniger Stimulation mit poly(I:C) diese eventuell erst zu einem späteren Zeitpunkt nachweisbar sein. Die Zelltod-fördernde Wirkung von IFN könnte klinisch von Nutzen sein, insbesondere wenn nur suboptimale Konzentrationen der RLH-Liganden im Tumorgewebe durch eine systemische Therapie erzielt werden können. Da sowohl IFN α als auch IFN γ bereits für bestimmte klinische Indikationen zugelassen sind, wäre auch aus regulatorischer Hinsicht eine Kombinationstherapie mit den neu entwickelten, synthetisch hergestellten RLH-Liganden gut realisierbar.

4.5 Tumorthherapie mit adjuvantem IFN α und ppp-RNA bzw. poly(I:C) *in vivo*

Nachdem *in vitro* Ergebnisse vor allem für Typ I IFN eine Hochregulation von RIG-I belegten (Abb. 6 - Abb. 8, Abb. 15), ließ sich auch im Panc02-Tumormodell nach Stimulation mit IFN α eine gesteigerte RIG-I und MDA5 Expression auf Proteinebene nachvollziehen (Abb. 23). Auf Basis dieser Beobachtung wurden Tumor-tragende

Mäuse nach Vorstimulation mit IFN α systemisch (i.v.) mit dem RIG-I-Liganden ppp-RNA therapiert. Diese *in vivo* Studien bestätigten die *in vitro* Ergebnisse. Es zeigte sich im Vergleich zu einer Monotherapie mit ppp-RNA eine Zunahme der Typ I IFN-Produktion, sowie der Tumorzellapoptose (Abb. 24). In einem sich anschließenden *Survival*-Versuch, führte die adjuvante IFN-Therapie, die allerdings mit dem MDA5-Liganden poly(I:C) durchgeführt wurde, nicht zu einer Verbesserung des Überlebens der Tiere mit orthotopen Panc02-Tumoren. Zwar zeigte sich ein Trend für ein längeres Überleben in der RLH-Ligand Therapiegruppe, allerdings konnte durch die IFN-Therapie kein zusätzlicher Effekt erzielt werden. TumortheraPIeversuche mit dem RIG-I-Liganden ppp-RNA zusammen mit IFN sind noch ausstehend, da funktionell aktive ppp-RNA zum Zeitpunkt der Arbeit aufgrund eines Lieferengpasses nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stand.

Folgende Strategien könnten in zukünftigen Untersuchungen verfolgt werden:

1. Zeitpunkt der IFN α -Vorbehandlung: Anhand der vorliegenden Daten zur Expression von MDA5 und RIG-I auf mRNA Ebene (Abb. 6) könnte es vielversprechend sein, das Zeitintervall zwischen IFN- und RLH-Gabe von 18 h auf 6-12 h zu verkürzen.

2. Dosierung von IFN α : Bezüglich der IFN-Dosierung erfolgte eine Orientierung an vorangegangene Studien in unserem Labor (Zoglmeier et al., 2011). In anderen Studien wurde für die Therapie von orthotopen Panc02-Tumoren mit IFN α vergleichbare Dosierungen eingesetzt (Hoffmann et al., 2008). Möglicherweise sind in diesem Kontext jedoch höhere Dosen erforderlich.

3. Wahl des Interferons: Die *in vitro* Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass IFN γ bei Panc02-Zellen im Vergleich mit Typ I IFN zu einer weniger starken pIRF3-Expression führt (Abb. 16). Andererseits zeigte sich für IFN γ eine stärkere Apoptoseinduktion in Kombination mit ppp-RNA als für Typ I IFN (Abb. 21 A). Die vorliegenden Daten lassen keine Entscheidung zu, ob mit IFN β im Vergleich zu IFN α ein besseres Therapieansprechen *in vivo* zu erzielen wäre. Zudem könnten mit pegyliertem IFN, das eine wesentlich längere Halbwertszeit *in vivo* aufweist, konstantere IFN-Spiegel erreicht werden.

4. Wahl des RLH-Liganden: Aufgrund von Syntheseengpässen wurde in dieser Arbeit bei den *in vivo* Versuchen der synthetische MDA5-Ligand poly(I:C) verwendet. Überlebensversuche in der Kombination von IFN mit ppp-RNA sind noch ausstehend.

Ein weiteres Problem könnte sein, dass aufgrund der ausgeprägten desmoplastischen Reaktion beim PDAC systemisch applizierte Therapeutika schlechter wirksam sind

(Killion et al., 1998; Michl and Gress, 2012; Qiu and Su, 2013a). Nach IFN-Injektion steigt die Serumkonzentration schnell an, jedoch ist es schon nach kurzer Zeit kaum mehr nachweisbar. Ob das IFN daher in ausreichender Konzentration im schlecht vaskularisierten Tumorgewebe akkumuliert ist unklar. Hier könnte einerseits ein pegyliertes IFN mit längerer Halbwertszeit und mit konstanteren Serumspiegeln ein Lösungsansatz sein (Agarwala, 2012; Lee et al., 2013). Andererseits könnte durch spezielle Formulierung oder virale Vektoren versucht werden, mithilfe von Zielstrukturen des Tumorgewebes die lokale Konzentration von IFN in den Tumorzellen zu erhöhen (Armstrong et al., 2012; LaRocca et al., 2015). Beispielsweise konstruierten Armstrong et al. einen Adenovirus der sich bei Cyclooxygenase-2-Überexpression, wie sie für das Pankreaskarzinom bekannt ist, vermehrt repliziert und somit als viraler Vektor die spezifische Anreicherung im Tumorgewebe ermöglicht (Yamamoto et al., 2003).

Eine weitere Optimierung könnte erreicht werden, indem die immunaktive RNA direkt in den Tumor appliziert wird. Fortschritte können zudem von der Entwicklung neuer Transportsysteme für den selektiven Transport therapeutischer RNA in den Tumor ausgehen, wodurch sich nicht nur die intratumorale RNA-Konzentration erhöhen, sondern auch die systemische Toxizität limitieren ließe (Ali et al., 2012; Kumar et al., 2014).

4.6 Einfluss von Regulationsmechanismen auf das Ansprechen der Interferone und RIG-I-like-Helikasen-Liganden

Der therapeutische Einsatz von IFN und RLH-Liganden als IFN-Induktoren in der Tumorthherapie bedarf einer feinen Regulation der IFN-Antwort auf zellulärer Ebene, um einerseits den Tumor in Schach zu halten, andererseits jedoch Gewebeschädigung durch überschießende Zytokinfreisetzung zu vermeiden. Mechanismen, die die Typ I IFN-vermittelte Immunantwort regulieren, finden sich auf jeder einzelnen Stufe, angefangen von Stimulationsmechanismen für IFN-Produktion bis hin zur Signaltransduktion in Zielzellen. Negative Regulationen umfassen unter anderem die Herunterregulation der Expression des IFNAR-Oberflächenzellrezeptors und die Induktion von Regulatoren, die inhibitorisch auf den Jak-STAT-Signalweg wirken. Tumorzellen machen sich diese Regulationsmechanismen zunutze, um der IFN-Wirkung zu entkommen (Bhattacharya et al., 2013; Mostafa et al., 2014; Osborn and Greer, 2015).

Neben physiologischen Regulationsmechanismen verfügen Tumorzellen über weitere Mechanismen der Eindämmung einer Typ I IFN-Antwort. Mutationen, die beispielsweise die Typ I IFN-Gene, STAT1- oder STAT2-Gene, ISGF3-Komponenten oder MHC-I-induzierende Gene betreffen, führen häufig zur Inaktivität des IFN-Systems, wodurch die Proliferation der Tumorzellen und ein Schutz vor Apoptose ermöglicht werden (Abril et al., 1996; Colamonici et al., 1992; Stojdl et al., 2000; Sun et al., 1998; Wong et al., 1997; Xu et al., 1994). Zudem kann eine Zytokinproduktion durch epigenetische Modifikationen inhibiert werden (Yasmin et al., 2015). Selektiv im Tumor akkumulierende T_{reg} schwächen die antitumorale Typ I T-Zell-Antwort ab und inhibieren die IFN γ -Produktion (Redjimi et al., 2012). Für die humane Pankreaskarzinomzelllinie MIAPaCa-2 ist bekannt, dass ein Verlust des IFN β -Gens vorliegt (Chen et al., 1996). Um zu klären, ob das unterschiedliche Ansprechen der Pankreaskarzinomzelllinien auf IFN und RLH-Liganden auf Mechanismen der Gegenregulation zurückzuführen ist oder durch spezifische Mutationen verursacht wird, bedarf es weiterer Studien.

Bestimmte ppp-RNA-Moleküle führen über einen *off-target* Effekt zur Aktivierung von TLR7 in DC (Ellermeier et al., 2013). Das könnte ein weiterer Faktor sein, der das unterschiedliche Ansprechen auf RLH-Liganden erklären könnte. Autoren von *Pfizer Vaccine Research* berichteten, dass durch TLR7-*small molecule* Agonisten die RIG-I-vermittelte IFN-Antwort inhibiert werde (Forsbach et al., 2012). Infolge der Blockade von pSTAT2 werde die Bildung des heterotrimeren Komplexes aus STAT1, pSTAT2 und IRF9 (genannt *IFN-stimulated gene factor 3*, ISGF3) verhindert. Möglicherweise tritt diese beobachtete Inhibition auch bei der *off-target* Aktivierung von TLR7 durch ppp-RNA auf, wodurch sich das variable Ausmaß der IFN-Antwort der Tumorzellen auf bestimmte ppp-RNA-Moleküle erklären ließe. Auch wenn die beobachteten Effekte zwischen den Zelllinien in ihrem Ausmaß variieren, so zeigen die Daten dieser und vorheriger Arbeiten doch, dass sowohl das IFN- als auch das RLH-*signalling* in Pankreaskarzinomzellen intakt ist. Dieses stellt eine wichtige Grundlage für die Kombinationstherapie dar (Duell et al., 2015; Duell et al., 2014; Ellermeier et al., 2013; Hoffmann et al., 2008; Khallouf et al., 2012; Meng et al., 2014).

4.7 Ausblick

Solange die exakten Mechanismen der antitumoralen Aktivität der Interferone nicht vollständig aufgeklärt sind, bleibt der therapeutische Nutzen eingeschränkt. Wie bei vielen Zytokinen sind die IFN-Eigenschaften zweischneidig. Eine überschießende IFN-Reaktion ist toxisch (Linossi et al., 2013). Bei therapeutischer Applikation, z.B. im

Rahmen der Hepatitis-Therapie, wird nach Injektion des Öfteren für einige Stunden Übelkeit, Fieber und Schüttelfrost beobachtet; nach Mehrfachinjektion tritt eine Tachyphylaxie auf, wodurch die Wirksamkeit limitiert wird (Gauci, 1987). Dosislimitierend ist meist bei chronischer Anwendung eine ätiologisch unklare Fatigue und Anorexie (Jonasch and Haluska, 2001). Diesbezüglich haben pegylierte IFN ein günstigeres Nebenwirkungsprofil. Sie erzielen weniger hohe Spitzenkonzentrationen, dafür aber über längere Zeit konstante Plasmaspiegel. Hier genügen in der Regel wöchentliche Injektionen (Patel and Walko, 2012). Die klinischen Nebenwirkungen einer RLH-basierten Therapie sind unbekannt, da sich diese neuen Immuntherapeutika erst in präklinischer Entwicklung befinden. Aufgrund der potenten IFN-Induktion kann ein ähnliches Nebenwirkungsprofil vermutet werden, wie bei der IFN-Therapie. Unsere Arbeitsgruppe evaluierte die toxische Wirkung einer ppp-RNA-Behandlung im Mausmodell. Hierbei wurden Veränderungen des Blutbildes und Serumspiegels von Kreatinin und Harnstoff (Nierenfunktion), LDH und ALT (Lebertoxizität) gemessen. Außer einer innerhalb von 48 h reversiblen Leukopenie wurden keine relevanten toxischen Effekte festgestellt. Auch in der postinterventionellen Histopathologie diverser Organe konnte keine relevante, die Therapie limitierende Toxizität nachgewiesen werden (Ellermeier et al., 2013). Weniger gut verträglich war hingegen eine Therapie mit komplexiertem poly(I:C) als MDA5-Liganden, möglicherweise aufgrund von *off target*-Effekten der synthetischen RNA, die zugleich einen potenten Aktivator von TLR3 und PKR darstellt (Nicodemus and Berek, 2010).

Trotz der Toxizität von IFN, die zumindest in der Therapie der chronischen Virushepatitis C gut kontrollierbar ist und klinisch daher in der Tumorthherapie nur ein geringes Hindernis darstellen dürfte, könnte die lokale Therapie von resektablen Pankreastumoren mit adjuvanten IFN und RLH-Liganden einen vielversprechenden Ansatz darstellen, um den Erfolg eines chirurgischen Eingriffs zu steigern. Eine lokale RNA-Applikation in den Tumor ist mit potenziell weniger Nebenwirkungen behaftet, die überwiegend systemisch bedingt sind. Zudem können dadurch lokal hohe Wirkspiegel im Tumorgewebe erzielt werden, wodurch der Apoptose-auslösende Effekt verstärkt wird (Duell et al., 2015). Klinisch könnte dies durch endosonographisch kontrollierte Feinnadelpunktion des Tumorgewebes technisch einfach und wenig invasiv realisiert werden. Ziel einer solchen präoperativen Immuntherapie wäre es, durch die Induktion von immunogenem Zelltod, welcher für adaptive Immunantworten essentiell ist, eine protektive Immunantwort zu induzieren, um nach operativer Entfernung des Primärtumors eine immunvermittelte Kontrolle residualer Tumorzellen (z.B. nach

R1-Resektion) oder klinisch latenter Fernmetastasen zu erzielen (Düwell et al., 2014; van den Boorn and Hartmann, 2013).

Da sich in den *in vitro* Ergebnissen dieser Arbeit der therapeutische Effekt sowohl der Interferone als auch der RLH-Liganden zwischen humanen Pankreaskarzinomzellen zum Teil deutlich unterschied, ist anzunehmen, dass Tumore in der klinischen Praxis ebenfalls nicht gleichermaßen gut auf die Therapie ansprechen. Daher wären im Sinne einer personalisierten Medizin *in vivo* potentiell Versuche in sogenannten humanisierten Mäusen hilfreich, also Tieren die menschliche Gene, Zellen oder Zellverbände in sich tragen. Bei Operationen oder Biopsien gewonnenes Gewebe aus Pankreastumoren könnte diesen Mäusen implantiert werden, um die Effektivität einer Immuntherapie im Vorfeld auszutesten. Hier könnte patientenindividuell die Wahl des Interferons bzw. des RLH-Liganden experimentell festgelegt werden, um die Therapieeffektivität zu optimieren.

5 Zusammenfassung

Die sehr schlechte Prognose der Patienten, die an einem Pankreaskarzinom erkranken, hat sich über die letzten 25 Jahre mit einer mittleren Überlebensrate von lediglich sechs Monaten kaum verändert. Dies erfordert die Entwicklung neuer Therapien. Die Immuntherapie hat in den letzten Jahren bei einigen soliden Tumorentitäten, wie dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, Prostatakarzinom und Melanom – allesamt Tumorentitäten mit eingeschränkten therapeutischen Möglichkeiten – überraschende Therapieergebnisse erzielt, die einen gewissen Optimismus auch für andere Tumorentitäten rechtfertigen.

In Vorarbeiten identifizierte unsere Arbeitsgruppe *RIG-I-like*-Helikasen (RLH), zytoplasmatische Rezeptoren für virale RNA, als interessante Zielstrukturen für die Immuntherapie des Pankreaskarzinoms. Einerseits lösen RLH eine Typ I IFN-vermittelte Immunantwort aus, andererseits induzieren sie eine immunogene Form von Tumorzelltod. Eine RLH-basierte Immuntherapie führte in murinen Pankreaskarzinom-Modellen zu einem signifikant längeren Überleben. Da RLH unter basalen Bedingungen von Tumorzellen nur gering exprimiert werden, jedoch IFN-induzierbar sind, wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass sich durch die adjuvante IFN-Gabe die Effektivität einer RLH-basierten Immuntherapie steigern lässt.

Folgende Fragen waren zu beantworten:

1. Welchen Einfluss üben IFN α , IFN β und IFN γ auf die RIG-I-Expression in humanen und murinen Pankreaskarzinomzellen aus?
2. Führt eine IFN-basierte Hochregulation von RIG-I zu einer verbesserten funktionellen RLH-Aktivität?
3. Lässt sich durch Kombination von IFN mit RLH-Liganden ein synergistischer Effekt in Bezug auf Tumorapoptose, Zytokinproduktion und Überleben in murinen Pankreaskarzinommodellen erreichen?

Für murine und humane Pankreaskarzinomzelllinien konnte *in vitro* anhand der Phosphorylierung von STAT1 gezeigt werden, dass deren IFN-Signalweg intakt ist. Vorbehandlung mit Typ I und II IFN verstärkte nicht nur die Expression der RLH, sondern verbesserte auch das Ansprechen auf eine konsekutive Stimulation mit RLH-Liganden. Hieraus resultierte eine verstärkte Phosphorylierung von IRF3, Sekretion von Typ I IFN und CXCL10, Hochregulation von MHC-I-Molekülen auf der

Tumorzellmembran, sowie ein ausgeprägter Zelltod. Hierbei zeigten sich bei den untersuchten murinen und humanen Tumorzelllinien allerdings zum Teil erhebliche Unterschiede bezüglich des Ansprechens auf unterschiedliche Interferone bzw. RLH-Liganden.

In vivo konnten diese Beobachtungen verifiziert werden. In subkutanen und orthotopen Panc02-Tumormodellen führte eine Vorstimulation mit IFN α zu einer verstärkten RLH-Expression im Tumorgewebe. Darüber hinaus führte die konsekutive Injektion von ppp-RNA zu einer gesteigerten CXCL10- und IFN-Synthese im Tumorgewebe sowie zu einem verstärkten Zelltod in histologischen Untersuchungen. Ein Überlebensvorteil der Kombinationstherapie konnte im Mausmodell mit dem MDA5-Liganden poly(I:C) nicht gezeigt werden. Allerdings stehen Versuche mit ppp-RNA noch aus.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern somit die Grundlage einer adjuvanten IFN-Therapie bei einer RLH-basierten Immuntherapie des Pankreaskarzinoms. Weitere Studien sind erforderlich, um diese Strategie weiterzuentwickeln. Hierzu gehören Verfahren zur Erhöhung der lokalen RLH- und IFN-Konzentrationen im Tumorgewebe, z.B. mittels sonographisch-gesteuerter Feinnadelpunktion, sowie *ex vivo* Untersuchungen von Tumormaterial von Patienten, um prätherapeutisch individuelle Unterschiede bezüglich des Ansprechens auf Interferone und RLH-Liganden erfassen und die Therapie individualisiert gestalten zu können.

6 Verzeichnis der Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
Ak	Antikörper (S. 25)
APC	Antigen-präsentierende Zelle (S. 9)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (S. 19)
AV	Annexin V (S. 25)
Bcl-x _L	<i>B-cell lymphoma-extra large</i> (S. 13)
BH3	<i>Bcl-2 homology domain 3</i> (S. 13)
BSA	Bovines Serum-Albumin (S. 27)
cAMP	Zyklisches AMP (S. 9)
CARD	<i>caspase activation and recruitment domain</i> (S. 12)
Cardif	<i>CARD adapter inducing interferon beta</i> (S. 10)
cDNA	<i>Copy-Desoxyribonukleinsäure</i> (S. 26)
CD95	Todesrezeptor Fas (S. 13)
CLR	Calcium-abhängige Lectin- <i>like</i> -Rezeptoren (S. 11)
CpG	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid (S. 9)
CTL	Zytotoxische T-Zelle (S. 3)
CXCL10	<i>C-X-C motif chemokine 10</i> , IP-10 (S. 24)
DAMP	<i>Danger-associated molecular pattern</i> (S. 10)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol (S. 16)
DC	Dendritische Zelle (S. 6)
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (S. 16)
DMSO	Dimethylsulfoxid (S. 15)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (S. 16)
DSMZ	<i>German Collection of Cell Lines</i> (S. 19)
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (S. 15)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (S. 24)
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i> (S. 15)
FCS	Fötale Kälberserum (S. 16)
FITC	Fluorescein-Isocyanat (S. 18)
FOLFIRINOX	5-FU, Irinotecan und Oxaliplatin (S. 2)
FoxP3	<i>Forkhead-box rotein P3</i> (S. 3)
GAF	<i>Gamma-interferon activation factor</i> (S. 8)
GAS	<i>Gamma activated sequence</i> (S. 8)
HMGB1	<i>High mobility group protein B1</i> (S. 60)
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (S. 26)

Hsp90	Hitzeschockprotein 90 (S. 60)
H ₂ SO ₄ , 2N	Schwefelsäure (S. 15)
IFN	Interferon (S. 1)
IFN α	IFN α 2b (S. 10)
IFNAR	IFN α -Rezeptor (S. 5)
IFNGR	IFN γ -Rezeptor (S. 6)
IL	Interleukin (S. 6)
IPS-1	<i>Interferon · promoter stimulator 1</i> (S. 10)
IP-10	<i>Interferon gamma-induced protein10</i> (S. 24)
i.p.	Intraperitoneal (S. 22)
IRF3	<i>IFN regulatory factor 3</i> (S. 10)
IRF7	<i>IFN regulatory factor 7</i> (S. 10)
IRF9	<i>IFN regulatory factor 9</i> (S. 8)
ISG	<i>IFN-stimulated gene</i> (S. 7)
ISGF3	<i>IFN-stimulated gene factor 3</i> (S. 8)
Isofluran	1-Chlor-2,2,2-trifluorethyl-difluormethylether (S. 13)
ISRE	<i>IFN-stimulated regulatory element</i> (S. 8)
JAK	Januskinasen (S. 7)
Tyk	Tyrosinkinasen (S. 6)
LGP2	<i>Laboratory of Genetics and Physiology 2</i> (S. 11)
MAMP	<i>Microorganism-associated molecular pattern</i> (S. 10)
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral-signaling protein</i> (S. 12)
MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated antigen 5</i> (S. 1)
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cell</i> (S. 3)
MHC-I	<i>Major histocompatibility complex I</i> (S. 13)
Min	Minute(n) (S. 17)
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (S. 13)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen (S. 2)
NLR	<i>nucleotide binding and oligomerization domain-like receptor</i> (S. 11)
OH-RNA	doppelsträngige Kontroll-RNA (S. 21)
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i> (S. 10)
PanIN	<i>Pancreatic intraepithelial neoplasia</i> (S. 2)
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (S. 16)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (S. 26)
PDAC	Duktales Adenokarzinom des Pankreas (S. 2)
PDE4	Phosphodiesterase 4 (S. 9)

PFA	Paraformaldehyd (S. 15)
PI	Propidiumiodid (S. 16)
pIRF3	Phosphoryliertes IRF3 (S. 35)
poly(I:C)	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i> (S. 9)
Poly (I:C)-HMW	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid - high molecular weight</i> (S. 15)
ppp-RNA	5'-Triphosphat modifizierte RNA (S. 11)
PRR	<i>Pattern-recognition-Rezeptor</i> (S. 6)
PSC	Pankreatische Sternzellen (S. 9)
qRT-PCR	Quantitative real-time PCR (S. 26)
RIG-I	<i>Retinoic acid inducible gene I</i> (S. 1)
RLH	<i>RIG-I-like-Helikasen</i> (S. 1)
RNA	Ribonukleinsäure (S. 11)
RT	Raumtemperatur (S. 21)
SDS	Natriumdodecylsulfat (S. 17)
ss/dsRNA	Ein-/doppelsträngige RNA (S. 11)
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i> (S. 6)
pSTAT1	Phosphoryliertes STAT1 (S. 29)
STING	<i>Stimulator of IFN genes protein</i> (S. 8)
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen (S. 2)
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i> (S. 12)
TBST	50mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20 (S. 17)
TdT	Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase <i>Terminal desoxynucleotidyl transferase</i> (S. 16)
TEMED	Tetramethylethylendiamin (S. 15)
T _h	T-Helferzelle (S. 6)
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i> (S. 10)
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor- α (S. 6)
TRAF-6	<i>TNF receptor-associated factor-6</i> (S. 12)
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen (S. 3)
TRIS	Tris-Hydroxymethylaminomethan (S. 15)
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i> (S.18)
Tyk	Tyrosin-Kinase (S. 6)
Typ I IFN	IFN α , IFN β (S. 5)
Typ II IFN	IFN γ (S. 6)
UNC93B	Protein unc-93 homolog B1 (S. 7)

VISA	<i>Virus-induced signaling adapter</i> (S. 12)
5-FU	5-Fluorouracil (S. 10)

7 Literaturverzeichnis

- Abril, E., R.E. Mendez, A. Garcia, A. Serrano, T. Cabrera, F. Garrido, and F. Ruiz-Cabello. 1996. Characterization of a gastric tumor cell line defective in MHC class I inducibility by both alpha- and gamma-interferon. *Tissue antigens* 47:391-398.
- Agarwala, S.S. 2012. An update on pegylated IFN-alpha2b for the adjuvant treatment of melanoma. *Expert review of anticancer therapy* 12:1449-1459.
- Aida, K., R. Miyakawa, K. Suzuki, K. Narumi, T. Udagawa, Y. Yamamoto, T. Chikaraishi, T. Yoshida, and K. Aoki. 2014. Suppression of Tregs by anti-glucocorticoid induced TNF receptor antibody enhances the antitumor immunity of interferon-alpha gene therapy for pancreatic cancer. *Cancer science* 105:159-167.
- Al-Batran, S.E., M. Geissler, T. Seufferlein, and H. Oettle. 2014. Nab-paclitaxel for metastatic pancreatic cancer: clinical outcomes and potential mechanisms of action. *Oncology research and treatment* 37:128-134.
- Alexopoulou, L., A.C. Holt, R. Medzhitov, and R.A. Flavell. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732-738.
- Ali, H.M., G. Urbinati, M. Raouane, and L. Massaad-Massade. 2012. Significance and applications of nanoparticles in siRNA delivery for cancer therapy. *Expert review of clinical pharmacology* 5:403-412.
- Armstrong, L., J. Davydova, E. Brown, J. Han, M. Yamamoto, and S.M. Vickers. 2012. Delivery of interferon alpha using a novel Cox2-controlled adenovirus for pancreatic cancer therapy. *Surgery* 152:114-122.
- Bacher, N., V. Raker, C. Hofmann, E. Graulich, M. Schwenk, R. Baumgrass, T. Bopp, U. Zechner, L. Merten, C. Becker, and K. Steinbrink. 2013. Interferon-alpha suppresses cAMP to disarm human regulatory T cells. *Cancer research* 73:5647-5656.
- Battle, T.E., and D.A. Frank. 2002. The role of STATs in apoptosis. *Current molecular medicine* 2:381-392.
- Beatty, G.L., E.G. Chiorean, M.P. Fishman, B. Saboury, U.R. Teitelbaum, W. Sun, R.D. Huhn, W. Song, D. Li, L.L. Sharp, D.A. Torigian, P.J. O'Dwyer, and R.H. Vonderheide. 2011. CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. *Science* 331:1612-1616.
- Bertin, J., W.J. Nir, C.M. Fischer, O.V. Tayber, P.R. Errada, J.R. Grant, J.J. Keilty, M.L. Gosselin, K.E. Robison, G.H. Wong, M.A. Glucksmann, and P.S. DiStefano. 1999. Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *The Journal of biological chemistry* 274:12955-12958.
- Besch, R., C. Berking, C. Kammerbauer, and K. Degitz. 2007. Inhibition of urokinase-type plasminogen activator receptor induces apoptosis in melanoma cells by activation of p53. *Cell death and differentiation* 14:818-829.
- Besch, R., H. Poeck, T. Hohenauer, D. Senft, G. Hacker, C. Berking, V. Hornung, S. Endres, T. Ruzicka, S. Rothenfusser, and G. Hartmann. 2009. Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *The Journal of clinical investigation* 119:2399-2411.
- Bhattacharya, S., W.C. HuangFu, G. Dong, J. Qian, D.P. Baker, J. Karar, C. Koumenis, J.A. Diehl, and S.Y. Fuchs. 2013. Anti-tumorigenic effects of Type 1 interferon are subdued by integrated stress responses. *Oncogene* 32:4214-4221.
- Booy, S., L.J. Hofland, A.M. Waaijers, E. Croze, P.M. van Koetsveld, L. de Vogel, K. Biermann, and C.H. van Eijck. 2014a. Type I interferon receptor expression in human pancreatic and periampullary cancer tissue. *Pancreas* 44:99-105.

- Booy, S., C.H. van Eijck, F. Dogan, P.M. van Koetsveld, and L.J. Hofland. 2014b. Influence of type-I Interferon receptor expression level on the response to type-I Interferons in human pancreatic cancer cells. *Journal of cellular and molecular medicine* 18:492-502.
- Borden, E.C., G.C. Sen, G. Uze, R.H. Silverman, R.M. Ransohoff, G.R. Foster, and G.R. Stark. 2007. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nature reviews. Drug discovery* 6:975-990.
- Brown, G.D., and S. Gordon. 2001. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* 413:36-37.
- Burris, H.A., 3rd, M.J. Moore, J. Andersen, M.R. Green, M.L. Rothenberg, M.R. Modiano, M.C. Cripps, R.K. Portenoy, A.M. Storniolo, P. Tarassoff, R. Nelson, F.A. Dorr, C.D. Stephens, and D.D. Von Hoff. 1997. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 15:2403-2413.
- Casrouge, A., S.Y. Zhang, C. Eidschenk, E. Jouanguy, A. Puel, K. Yang, A. Alcais, C. Picard, N. Mahfoufi, N. Nicolas, L. Lorenzo, S. Plancoulaine, B. Senechal, F. Geissmann, K. Tabeta, K. Hoebe, X. Du, R.L. Miller, B. Heron, C. Mignot, T.B. de Villemeur, P. Lebon, O. Dulac, F. Rozenberg, B. Beutler, M. Tardieu, L. Abel, and J.L. Casanova. 2006. Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science* 314:308-312.
- Chen, Z.H., H. Zhang, and T.M. Savarese. 1996. Gene deletion chemoselectivity: codeletion of the genes for p16(INK4), methylthioadenosine phosphorylase, and the alpha- and beta-interferons in human pancreatic cell carcinoma lines and its implications for chemotherapy. *Cancer research* 56:1083-1090.
- Cheng, Y.S., and F. Xu. 2010. Anticancer function of polyinosinic-polycytidylic acid. *Cancer biology & therapy* 10:1219-1223.
- Coch, C., C. Luck, A. Schwickart, B. Putschli, M. Renn, T. Holler, W. Barchet, G. Hartmann, and M. Schlee. 2013. A human in vitro whole blood assay to predict the systemic cytokine response to therapeutic oligonucleotides including siRNA. *PloS one* 8:e71057.
- Cohen, B., D. Novick, S. Barak, and M. Rubinstein. 1995. Ligand-induced association of the type I interferon receptor components. *Molecular and cellular biology* 15:4208-4214.
- Colamonici, O.R., P. Domanski, L.C. Plataniias, and M.O. Diaz. 1992. Correlation between interferon (IFN) alpha resistance and deletion of the IFN alpha/beta genes in acute leukemia cell lines suggests selection against the IFN system. *Blood* 80:744-749.
- Conroy, T., F. Desseigne, M. Ychou, O. Bouche, R. Guimbaud, Y. Becouarn, A. Adenis, J.L. Raoul, S. Gourgou-Bourgade, C. de la Fouchardiere, J. Bennouna, J.B. Bachet, F. Khemissa-Akouz, D. Pere-Verge, C. Delbaldo, E. Assenat, B. Chauffert, P. Michel, C. Montoto-Grillot, M. Ducreux, U. Groupe Tumeurs Digestives of, and P. Intergroup. 2011. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England journal of medicine* 364:1817-1825.
- Corbett, T.H., B.J. Roberts, W.R. Leopold, J.C. Peckham, L.J. Wilkoff, D.P. Griswold, Jr., and F.M. Schabel, Jr. 1984. Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice. *Cancer research* 44:717-726.
- Darnell, J.E., Jr., I.M. Kerr, and G.R. Stark. 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264:1415-1421.
- de Weerd, N.A., J.P. Vivian, T.K. Nguyen, N.E. Mangan, J.A. Gould, S.J. Braniff, L. Zaker-Tabrizi, K.Y. Fung, S.C. Forster, T. Beddoe, H.H. Reid, J. Rossjohn, and P.J. Hertzog. 2013. Structural basis of a unique interferon-beta signaling axis mediated via the receptor IFNAR1. *Nature immunology* 14:901-907.

- Diamond, M.S., M. Kinder, H. Matsushita, M. Mashayekhi, G.P. Dunn, J.M. Archambault, H. Lee, C.D. Arthur, J.M. White, U. Kalinke, K.M. Murphy, and R.D. Schreiber. 2011. Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *The Journal of experimental medicine* 208:1989-2003.
- Duewelling, P., E. Beller, S.V. Kirchleitner, T. Adunka, H. Bourhis, J. Siveke, D. Mayr, S. Kobold, S. Endres, and M. Schnurr. 2015. Targeted activation of melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) for immunotherapy of pancreatic carcinoma. *Oncoimmunology* 4:e1029698.
- Duewelling, P., A. Steger, H. Lohr, H. Bourhis, H. Hoelz, S.V. Kirchleitner, M.R. Stieg, S. Grassmann, S. Kobold, J.T. Siveke, S. Endres, and M. Schnurr. 2014. RIG-I-like helicases induce immunogenic cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8 T cells. *Cell death and differentiation* 21:1825-1837.
- Dunn, G.P., C.M. Koebel, and R.D. Schreiber. 2006. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature reviews. Immunology* 6:836-848.
- Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber. 2004. The three Es of cancer immunoediting. *Annual review of immunology* 22:329-360.
- Dupuis, S., E. Jouanguy, S. Al-Hajjar, C. Fieschi, I.Z. Al-Mohsen, S. Al-Jumaah, K. Yang, A. Chapgier, C. Eidenschenk, P. Eid, A. Al Ghonaium, H. Tufenkeji, H. Frayha, S. Al-Gazlan, H. Al-Rayes, R.D. Schreiber, I. Gresser, and J.L. Casanova. 2003. Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nature genetics* 33:388-391.
- Ellermeier, J., J. Wei, P. Duewelling, S. Hoves, M.R. Stieg, T. Adunka, D. Noerenberg, H.J. Anders, D. Mayr, H. Poeck, G. Hartmann, S. Endres, and M. Schnurr. 2013. Therapeutic efficacy of bifunctional siRNA combining TGF-beta1 silencing with RIG-I activation in pancreatic cancer. *Cancer research* 73:1709-1720.
- Ettrich, T.J., L. Perkhofer, and T. Seufferlein. 2015. [Therapy in pancreatic cancer - and still it moves along!]. *Dtsch Med Wochenschr* 140:508-511.
- Farrar, M.A., and R.D. Schreiber. 1993. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annual review of immunology* 11:571-611.
- Fitzner, B., P. Brock, H. Nechutova, A. Glass, T. Karopka, D. Koczan, H.J. Thiesen, G. Sparmann, J. Emrich, S. Liebe, and R. Jaster. 2007. Inhibitory effects of interferon-gamma on activation of rat pancreatic stellate cells are mediated by STAT1 and involve down-regulation of CTGF expression. *Cellular signalling* 19:782-790.
- Forsbach, A., C. Muller, C. Montino, A. Kritzler, T. Nguyen, R. Weeratna, M. Jurk, and J. Vollmer. 2012. Negative regulation of the type I interferon signaling pathway by synthetic Toll-like receptor 7 ligands. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 32:254-268.
- Fukunaga, A., M. Miyamoto, Y. Cho, S. Murakami, Y. Kawarada, T. Oshikiri, K. Kato, T. Kurokawa, M. Suzuoki, Y. Nakakubo, K. Hiraoka, T. Itoh, T. Morikawa, S. Okushiba, S. Kondo, and H. Katoh. 2004. CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 28:e26-31.
- Gabittas, R.F., N.E. Annels, D.D. Stocken, H.A. Pandha, and G.W. Middleton. 2011. Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 60:1419-1430.
- Gajewski, T.F., H. Schreiber, and Y.X. Fu. 2013. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature immunology* 14:1014-1022.
- Gallimore, A., and A. Godkin. 2008. Regulatory T cells and tumour immunity - observations in mice and men. *Immunology* 123:157-163.

- Galluzzi, L., E. Vacchelli, A. Eggermont, W.H. Fridman, J. Galon, C. Sautes-Fridman, E. Tartour, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2012. Trial Watch: Experimental Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology* 1:699-716.
- Gauci, L. 1987. Management of cancer patients receiving interferon alfa-2a. *International journal of cancer. Supplement = Journal international du cancer. Supplement* 1:21-30.
- Gitlin, L., W. Barchet, S. Gilfillan, M. Cella, B. Beutler, R.A. Flavell, M.S. Diamond, and M. Colonna. 2006. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:8459-8464.
- Goubau, D., M. Schlee, S. Deddouche, A.J. Pruijssers, T. Zillinger, M. Goldeck, C. Schuberth, A.G. Van der Veen, T. Fujimura, J. Rehwinkel, J.A. Iskarpatyoti, W. Barchet, J. Ludwig, T.S. Dermody, G. Hartmann, and C.R. Sousa. 2014. Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates. *Nature* 514:372-375.
- Guillot, B., P. Portales, A.D. Thanh, S. Merlet, O. Dereure, J. Clot, and P. Corbeau. 2005. The expression of cytotoxic mediators is altered in mononuclear cells of patients with melanoma and increased by interferon-alpha treatment. *The British journal of dermatology* 152:690-696.
- Hagemann, T., F. Balkwill, and T. Lawrence. 2007. Inflammation and cancer: a double-edged sword. *Cancer cell* 12:300-301.
- Hanahan, D., and L.M. Coussens. 2012. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer cell* 21:309-322.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674.
- Hartwell, L.H., P. Szankasi, C.J. Roberts, A.W. Murray, and S.H. Friend. 1997. Integrating genetic approaches into the discovery of anticancer drugs. *Science* 278:1064-1068.
- Hingorani, S.R., L. Wang, A.S. Multani, C. Combs, T.B. Deramaudt, R.H. Hruban, A.K. Rustgi, S. Chang, and D.A. Tuveson. 2005. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer cell* 7:469-483.
- Hiraoka, N., K. Onozato, T. Kosuge, and S. Hirohashi. 2006. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12:5423-5434.
- Hoffmann, K., S. Mehrle, J. Schmidt, M.W. Buchler, and A. Marten. 2008. Interferon-alpha restitutes the chemosensitivity in pancreatic cancer. *Anticancer research* 28:1499-1507.
- Hornung, V., J. Ellegast, S. Kim, K. Brzozka, A. Jung, H. Kato, H. Poeck, S. Akira, K.K. Conzelmann, M. Schlee, S. Endres, and G. Hartmann. 2006. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314:994-997.
- Hu, R., J. Bekisz, M. Hayes, S. Audet, J. Beeler, E. Petricoin, and K. Zoon. 1999. Divergence of binding, signaling, and biological responses to recombinant human hybrid IFN. *J Immunol* 163:854-860.
- Hwang, S.Y., P.J. Hertzog, K.A. Holland, S.H. Sumarsono, M.J. Tymms, J.A. Hamilton, G. Whitty, I. Bertoncello, and I. Kola. 1995. A null mutation in the gene encoding a type I interferon receptor component eliminates antiproliferative and antiviral responses to interferons alpha and beta and alters macrophage responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:11284-11288.
- Ilander, M., A. Kreutzman, P. Rohon, T. Melo, E. Faber, K. Porkka, J. Vakkila, and S. Mustjoki. 2014. Enlarged memory T-cell pool and enhanced Th1-type

- responses in chronic myeloid leukemia patients who have successfully discontinued IFN-alpha monotherapy. *PLoS one* 9:e87794.
- Ivashkiv, L.B., and L.T. Donlin. 2014. Regulation of type I interferon responses. *Nature reviews. Immunology* 14:36-49.
- Jaitin, D.A., L.C. Roisman, E. Jaks, M. Gavutis, J. Piehler, J. Van der Heyden, G. Uze, and G. Schreiber. 2006. Inquiring into the differential action of interferons (IFNs): an IFN-alpha2 mutant with enhanced affinity to IFNAR1 is functionally similar to IFN-beta. *Molecular and cellular biology* 26:1888-1897.
- Jensen, E.H., L. Armstrong, C. Lee, T.M. Tuttle, S.M. Vickers, T. Sielaff, and E.W. Greeno. 2014. Neoadjuvant interferon-based chemoradiation for borderline resectable and locally advanced pancreas cancer: a Phase II pilot study. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 16:131-139.
- Jiang, Z., M. Zamanian-Daryoush, H. Nie, A.M. Silva, B.R. Williams, and X. Li. 2003. Poly(I-C)-induced Toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NFkappa B and MAP kinase is through an interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-independent pathway employing the signaling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR. *The Journal of biological chemistry* 278:16713-16719.
- Jonasch, E., and F.G. Haluska. 2001. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *The oncologist* 6:34-55.
- Junt, T., and W. Barchet. 2015. Translating nucleic acid-sensing pathways into therapies. *Nature reviews. Immunology* 15:529-544.
- Kaplan, D.H., V. Shankaran, A.S. Dighe, E. Stockert, M. Aguet, L.J. Old, and R.D. Schreiber. 1998. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:7556-7561.
- Kawai, T., K. Takahashi, S. Sato, C. Coban, H. Kumar, H. Kato, K.J. Ishii, O. Takeuchi, and S. Akira. 2005. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nature immunology* 6:981-988.
- Khallouf, H., A. Marten, S. Serba, V. Teichgraber, M.W. Buchler, D. Jager, and J. Schmidt. 2012. 5-Fluorouracil and interferon-alpha immunochemotherapy enhances immunogenicity of murine pancreatic cancer through upregulation of NKG2D ligands and MHC class I. *J Immunother* 35:245-253.
- Killion, J.J., R. Radinsky, and I.J. Fidler. 1998. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer metastasis reviews* 17:279-284.
- Kumar, V., J. Qin, Y. Jiang, R.G. Duncan, B. Brigham, S. Fishman, J.K. Nair, A. Akinc, S.A. Barros, and P.V. Kasperkovitz. 2014. Shielding of Lipid Nanoparticles for siRNA Delivery: Impact on Physicochemical Properties, Cytokine Induction, and Efficacy. *Molecular therapy. Nucleic acids* 3:e210.
- Laklai, H., Y.A. Miroshnikova, M.W. Pickup, E.A. Collisson, G.E. Kim, A.S. Barrett, R.C. Hill, J.N. Lakins, D.D. Schlaepfer, J.K. Mouw, V.S. LeBleu, N. Roy, S.V. Novitskiy, J.S. Johansen, V. Poli, R. Kalluri, C.A. Iacobuzio-Donahue, L.D. Wood, M. Hebrok, K. Hansen, H.L. Moses, and V.M. Weaver. 2016. Genotype tunes pancreatic ductal adenocarcinoma tissue tension to induce extracellular matrix fibrosis and tumor progression. *Nature medicine* 22:497-505.
- Lange, F., K. Rateitschak, B. Fitzner, R. Pohland, O. Wolkenhauer, and R. Jaster. 2011. Studies on mechanisms of interferon-gamma action in pancreatic cancer using a data-driven and model-based approach. *Molecular cancer* 10:13.
- LaRocca, C.J., J. Han, T. Gavrikova, L. Armstrong, A.R. Oliveira, R. Shanley, S.M. Vickers, M. Yamamoto, and J. Davydova. 2015. Oncolytic adenovirus expressing interferon alpha in a syngeneic Syrian hamster model for the treatment of pancreatic cancer. *Surgery* 157:888-898.
- Lee, J.I., S.P. Eisenberg, M.S. Rosendahl, E.A. Chlipala, J.D. Brown, D.H. Doherty, and G.N. Cox. 2013. Site-specific PEGylation enhances the pharmacokinetic properties and antitumor activity of interferon beta-1b. *Journal of interferon &*

- cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 33:769-777.
- Lieber, M., J. Mazzetta, W. Nelson-Rees, M. Kaplan, and G. Todaro. 1975. Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 15:741-747.
- Lindau, D., P. Gielen, M. Kroesen, P. Wesseling, and G.J. Adema. 2013. The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology* 138:105-115.
- Linehan, D.C., M.C. Tan, S.M. Strasberg, J.A. Drebin, W.G. Hawkins, J. Picus, R.J. Myerson, R.S. Malyapa, M. Hull, K. Trinkaus, and B.R. Tan, Jr. 2008. Adjuvant interferon-based chemoradiation followed by gemcitabine for resected pancreatic adenocarcinoma: a single-institution phase II study. *Annals of surgery* 248:145-151.
- Linossi, E.M., J.J. Babon, D.J. Hilton, and S.E. Nicholson. 2013. Suppression of cytokine signaling: the SOCS perspective. *Cytokine & growth factor reviews* 24:241-248.
- Liu, M., S. Guo, J.M. Hibbert, V. Jain, N. Singh, N.O. Wilson, and J.K. Stiles. 2011. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine & growth factor reviews* 22:121-130.
- Ljunggren, H.G., and K. Karre. 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology today* 11:237-244.
- Loo, Y.M., and M. Gale, Jr. 2011. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 34:680-692.
- Luster, A.D., and J.V. Ravetch. 1987. Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *The Journal of experimental medicine* 166:1084-1097.
- Maitra, A., and R.H. Hruban. 2008. Pancreatic cancer. *Annual review of pathology* 3:157-188.
- Malvezzi, M., P. Bertuccio, T. Rosso, M. Rota, F. Levi, C. La Vecchia, and E. Negri. 2015. European cancer mortality predictions for the year 2015: does lung cancer have the highest death rate in EU women? *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 26:779-786.
- Martin, S.J., C.P. Reutelingsperger, A.J. McGahon, J.A. Rader, R.C. van Schie, D.M. LaFace, and D.R. Green. 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *The Journal of experimental medicine* 182:1545-1556.
- Matsushita, H., M.D. Vesely, D.C. Koboldt, C.G. Rickert, R. Uppaluri, V.J. Magrini, C.D. Arthur, J.M. White, Y.S. Chen, L.K. Shea, J. Hundal, M.C. Wendl, R. Demeter, T. Wylie, J.P. Allison, M.J. Smyth, L.J. Old, E.R. Mardis, and R.D. Schreiber. 2012. Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature* 482:400-404.
- McGreal, E.P., J.L. Miller, and S. Gordon. 2005. Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Current opinion in immunology* 17:18-24.
- Meng, G., M. Xia, C. Xu, D. Yuan, M. Schnurr, and J. Wei. 2014. Multifunctional antitumor molecule 5'-triphosphate siRNA combining glutaminase silencing and RIG-I activation. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 134:1958-1971.
- Michl, P., and T.M. Gress. 2012. Improving drug delivery to pancreatic cancer: breaching the stromal fortress by targeting hyaluronic acid. *Gut* 61:1377-1379.
- Minegishi, Y., M. Saito, T. Morio, K. Watanabe, K. Agematsu, S. Tsuchiya, H. Takada, T. Hara, N. Kawamura, T. Ariga, H. Kaneko, N. Kondo, I. Tsuge, A. Yachie, Y. Sakiyama, T. Iwata, F. Bessho, T. Ohishi, K. Joh, K. Imai, K. Kogawa, M. Shinohara, M. Fujieda, H. Wakiguchi, S. Pasic, M. Abinun, H.D. Ochs, E.D. Renner, A. Jansson, B.H. Belohradsky, A. Metin, N. Shimizu, S. Mizutani, T.

- Miyawaki, S. Nonoyama, and H. Karasuyama. 2006. Human tyrosine kinase 2 deficiency reveals its requisite roles in multiple cytokine signals involved in innate and acquired immunity. *Immunity* 25:745-755.
- Moore, M.J., D. Goldstein, J. Hamm, A. Figer, J.R. Hecht, S. Gallinger, H.J. Au, P. Murawa, D. Walde, R.A. Wolff, D. Campos, R. Lim, K. Ding, G. Clark, T. Voskoglou-Nomikos, M. Ptasynski, W. Parulekar, and G. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials. 2007. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25:1960-1966.
- Mostafa, A.A., D. Codner, K. Hirasawa, Y. Komatsu, M.N. Young, V. Steimle, and S. Drover. 2014. Activation of ERalpha signaling differentially modulates IFN-gamma induced HLA-class II expression in breast cancer cells. *PloS one* 9:e87377.
- Murata, M., S. Nabeshima, K. Kikuchi, K. Yamaji, N. Furusyo, and J. Hayashi. 2006. A comparison of the antitumor effects of interferon-alpha and beta on human hepatocellular carcinoma cell lines. *Cytokine* 33:121-128.
- Neesse, A., P. Michl, K.K. Frese, C. Feig, N. Cook, M.A. Jacobetz, M.P. Lolkema, M. Buchholz, K.P. Olive, T.M. Gress, and D.A. Tuveson. 2011. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut* 60:861-868.
- Nicodemus, C.F., and J.S. Berek. 2010. TLR3 agonists as immunotherapeutic agents. *Immunotherapy* 2:137-140.
- Novick, D., B. Cohen, and M. Rubinstein. 1994. The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* 77:391-400.
- Novikov, A., M. Cardone, R. Thompson, K. Shenderov, K.D. Kirschman, K.D. Mayer-Barber, T.G. Myers, R.L. Rabin, G. Trinchieri, A. Sher, and C.G. Feng. 2011. Mycobacterium tuberculosis triggers host type I IFN signaling to regulate IL-1beta production in human macrophages. *J Immunol* 187:2540-2547.
- Nukui, Y., V.J. Picozzi, and L.W. Traverso. 2000. Interferon-based adjuvant chemoradiation therapy improves survival after pancreaticoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma. *American journal of surgery* 179:367-371.
- O'Sullivan, T., R. Saddawi-Konefka, W. Vermi, C.M. Koebel, C. Arthur, J.M. White, R. Uppaluri, D.M. Andrews, S.F. Ngiew, M.W. Teng, M.J. Smyth, R.D. Schreiber, and J.D. Bui. 2012. Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity. *The Journal of experimental medicine* 209:1869-1882.
- Osborn, J.L., and S.F. Greer. 2015. Metastatic melanoma cells evade immune detection by silencing STAT1. *International journal of molecular sciences* 16:4343-4361.
- Pace, L., S. Vitale, B. Dettori, C. Palombi, V. La Sorsa, F. Belardelli, E. Proietti, and G. Doria. 2010. APC activation by IFN-alpha decreases regulatory T cell and enhances Th cell functions. *J Immunol* 184:5969-5979.
- Papewalis, C., B. Jacobs, M. Wuttke, E. Ullrich, T. Baehring, R. Fenk, H.S. Willenberg, S. Schinner, M. Cohnen, J. Seissler, K. Zacharowski, W.A. Scherbaum, and M. Schott. 2008. IFN-alpha skews monocytes into CD56+-expressing dendritic cells with potent functional activities in vitro and in vivo. *J Immunol* 180:1462-1470.
- Patel, J.N., and C.M. Walko. 2012. Sylatron: a pegylated interferon for use in melanoma. *The Annals of pharmacotherapy* 46:830-838.
- Paz, S., Q. Sun, P. Nakhaei, R. Romieu-Mourez, D. Goubau, I. Julkunen, R. Lin, and J. Hiscott. 2006. Induction of IRF-3 and IRF-7 phosphorylation following activation of the RIG-I pathway. *Cellular and molecular biology* 52:17-28.
- Peiser, L., S. Mukhopadhyay, and S. Gordon. 2002. Scavenger receptors in innate immunity. *Current opinion in immunology* 14:123-128.

- Pfeffer, L.M., C.A. Dinarello, R.B. Herberman, B.R. Williams, E.C. Borden, R. Borden, M.R. Walter, T.L. Nagabhushan, P.P. Trotta, and S. Pestka. 1998. Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons. *Cancer research* 58:2489-2499.
- Pichlmair, A., O. Schulz, C.P. Tan, T.I. Naslund, P. Liljestrom, F. Weber, and C. Reis e Sousa. 2006. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 314:997-1001.
- Picozzi, V.J., R.A. Kozarek, and L.W. Traverso. 2003. Interferon-based adjuvant chemoradiation therapy after pancreaticoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma. *American journal of surgery* 185:476-480.
- Platanias, L.C. 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature reviews. Immunology* 5:375-386.
- Poock, H., R. Besch, C. Maihoefer, M. Renn, D. Tormo, S.S. Morskaya, S. Kirschnek, E. Gaffal, J. Landsberg, J. Hellmuth, A. Schmidt, D. Anz, M. Bscheider, T. Schwerd, C. Berking, C. Bourquin, U. Kalinke, E. Kremmer, H. Kato, S. Akira, R. Meyers, G. Hacker, M. Neuenhahn, D. Busch, J. Ruland, S. Rothenfusser, M. Prinz, V. Hornung, S. Endres, T. Tuting, and G. Hartmann. 2008. 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma. *Nature medicine* 14:1256-1263.
- Qiu, W., and G.H. Su. 2013a. Challenges and advances in mouse modeling for human pancreatic tumorigenesis and metastasis. *Cancer metastasis reviews* 32:83-107.
- Qiu, W., and G.H. Su. 2013b. Development of orthotopic pancreatic tumor mouse models. *Methods Mol Biol* 980:215-223.
- Rahib, L., B.D. Smith, R. Aizenberg, A.B. Rosenzweig, J.M. Fleshman, and L.M. Matrisian. 2014. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer research* 74:2913-2921.
- Rath, N., and M.F. Olson. 2016. Regulation of pancreatic cancer aggressiveness by stromal stiffening. *Nature medicine* 22:462-463.
- Redjimi, N., C. Raffin, I. Raimbaud, P. Pignon, J. Matsuzaki, K. Odunsi, D. Valmori, and M. Ayyoub. 2012. CXCR3+ T regulatory cells selectively accumulate in human ovarian carcinomas to limit type I immunity. *Cancer research* 72:4351-4360.
- Reutelingsperger, C.P., and W.L. van Heerde. 1997. Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 53:527-532.
- Rocha, F.G., Y. Hashimoto, L.W. Traverso, R. Dorer, R. Kozarek, W.S. Helton, and V.J. Picozzi. 2016. Interferon-based Adjuvant Chemoradiation for Resected Pancreatic Head Cancer: Long-term Follow-up of the Virginia Mason Protocol. *Annals of surgery* 263:376-384.
- Sato, M., N. Hata, M. Asagiri, T. Nakaya, T. Taniguchi, and N. Tanaka. 1998. Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS letters* 441:106-110.
- Scarpa, A., P. Capelli, K. Mukai, G. Zamboni, T. Oda, C. Iacono, and S. Hirohashi. 1993. Pancreatic adenocarcinomas frequently show p53 gene mutations. *The American journal of pathology* 142:1534-1543.
- Schlee, M., V. Hornung, and G. Hartmann. 2006. siRNA and isRNA: two edges of one sword. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 14:463-470.
- Schmidt, A., S. Rothenfusser, and K.P. Hopfner. 2012a. Sensing of viral nucleic acids by RIG-I: from translocation to translation. *European journal of cell biology* 91:78-85.
- Schmidt, J., U. Abel, J. Debus, S. Harig, K. Hoffmann, T. Herrmann, D. Bartsch, J. Klein, U. Mansmann, D. Jager, L. Capussotti, R. Kunz, and M.W. Buchler. 2012b. Open-label, multicenter, randomized phase III trial of adjuvant

- chemoradiation plus interferon Alfa-2b versus fluorouracil and folinic acid for patients with resected pancreatic adenocarcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30:4077-4083.
- Seufferlein, T., and J. Mayerle. 2016. Pancreatic cancer in 2015: Precision medicine in pancreatic cancer--fact or fiction? *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 13:74-75.
- Seufferlein, T., M. Porzner, T. Becker, V. Budach, G. Ceyhan, I. Esposito, R. Fietkau, M. Follmann, H. Friess, P. Galle, M. Geissler, M. Glanemann, T. Gress, V. Heinemann, W. Hohenberger, U. Hopt, J. Izbicki, E. Klar, J. Kleeff, I. Kopp, F. Kullmann, T. Langer, J. Langrehr, M. Lerch, M. Lohr, J. Luttges, M. Lutz, J. Mayerle, P. Michl, P. Moller, M. Molls, M. Munter, M. Nothacker, H. Oettle, S. Post, A. Reinacher-Schick, C. Rocken, E. Roeb, H. Saeger, R. Schmid, W. Schmiegel, M. Schoenberg, J. Siveke, M. Stuschke, A. Tannapfel, W. Uhl, S. Unverzagt, B. van Oorschot, Y. Vashist, J. Werner, E. Yekebas, A. Guidelines Programme Oncology, V. German Cancer Society e, and A. German Cancer. 2013. [S3-guideline exocrine pancreatic cancer]. *Zeitschrift fur Gastroenterologie* 51:1395-1440.
- Seufferlein, T., M. Porzner, V. Heinemann, A. Tannapfel, M. Stuschke, and W. Uhl. 2014. Ductal pancreatic adenocarcinoma. *Deutsches Arzteblatt international* 111:396-402.
- Sidky, Y.A., and E.C. Borden. 1987. Inhibition of angiogenesis by interferons: effects on tumor- and lymphocyte-induced vascular responses. *Cancer research* 47:5155-5161.
- Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal. 2016. Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians* 66:7-30.
- Stojdl, D.F., B. Lichty, S. Knowles, R. Marius, H. Atkins, N. Sonenberg, and J.C. Bell. 2000. Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nature medicine* 6:821-825.
- Sun, W.H., C. Pabon, Y. Alsayed, P.P. Huang, S. Jandeska, S. Uddin, L.C. Plataniias, and S.T. Rosen. 1998. Interferon-alpha resistance in a cutaneous T-cell lymphoma cell line is associated with lack of STAT1 expression. *Blood* 91:570-576.
- Sun, Y., S. Yang, N. Sun, and J. Chen. 2014. Differential expression of STAT1 and p21 proteins predicts pancreatic cancer progression and prognosis. *Pancreas* 43:619-623.
- Takeda, K., and S. Akira. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology* 17:1-14.
- Tan, M.H., N.J. Nowak, R. Loo, H. Ochi, A.A. Sandberg, C. Lopez, J.W. Pickren, R. Berjian, H.O. Douglass, Jr., and T.M. Chu. 1986. Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer investigation* 4:15-23.
- Uze, G., G. Lutfalla, and I. Gresser. 1990. Genetic transfer of a functional human interferon alpha receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA. *Cell* 60:225-234.
- van den Boorn, J.G., and G. Hartmann. 2013. Turning tumors into vaccines: co-opting the innate immune system. *Immunity* 39:27-37.
- van den Broek, M.F., U. Muller, S. Huang, R.M. Zinkernagel, and M. Aguet. 1995. Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors. *Immunol Rev* 148:5-18.
- Velazquez, L., M. Fellous, G.R. Stark, and S. Pellegrini. 1992. A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway. *Cell* 70:313-322.
- Verbeke, H., K. Geboes, J. Van Damme, and S. Struyf. 2012. The role of CXC chemokines in the transition of chronic inflammation to esophageal and gastric cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1825:117-129.
- Vila, M.R., J. Lloreta, M.H. Schussler, G. Berrozpe, S. Welt, and F.X. Real. 1995. New pancreas cancers cell lines that represent distinct stages of ductal

- differentiation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 72:395-404.
- Vincent, A., J. Herman, R. Schulick, R.H. Hruban, and M. Goggins. 2011. Pancreatic cancer. *Lancet* 378:607-620.
- Von Hoff, D.D., T. Ervin, F.P. Arena, E.G. Chiorean, J. Infante, M. Moore, T. Seay, S.A. Tjulandin, W.W. Ma, M.N. Saleh, M. Harris, M. Reni, S. Dowden, D. Laheru, N. Bahary, R.K. Ramanathan, J. Tabernero, M. Hidalgo, D. Goldstein, E. Van Cutsem, X. Wei, J. Iglesias, and M.F. Renschler. 2013. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *The New England journal of medicine* 369:1691-1703.
- Wagner, T.C., S. Velichko, S.K. Chesney, S. Biroc, D. Harde, D. Vogel, and E. Croze. 2004. Interferon receptor expression regulates the antiproliferative effects of interferons on cancer cells and solid tumors. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 111:32-42.
- Wong, L.H., K.G. Krauer, I. Hatzinisiriou, M.J. Estcourt, P. Hersey, N.D. Tam, S. Edmondson, R.J. Devenish, and S.J. Ralph. 1997. Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF3 components, STAT1, STAT2, and p48-ISGF3gamma. *The Journal of biological chemistry* 272:28779-28785.
- Xu, B., D. Grandeur, O. Sangfelt, and S. Einhorn. 1994. Primary leukemia cells resistant to alpha-interferon in vitro are defective in the activation of the DNA-binding factor interferon-stimulated gene factor 3. *Blood* 84:1942-1949.
- Yamamoto, M., J. Davydova, M. Wang, G.P. Siegal, V. Krasnykh, S.M. Vickers, and D.T. Curiel. 2003. Infectivity enhanced, cyclooxygenase-2 promoter-based conditionally replicative adenovirus for pancreatic cancer. *Gastroenterology* 125:1203-1218.
- Yasmin, R., S. Siraj, A. Hassan, A.R. Khan, R. Abbasi, and N. Ahmad. 2015. Epigenetic regulation of inflammatory cytokines and associated genes in human malignancies. *Mediators of inflammation* 2015:201703.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira, and T. Fujita. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature immunology* 5:730-737.
- Yunis, A.A., G.K. Arimura, and D.J. Russin. 1977. Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 19:128-135.
- Zaidi, M.R., and G. Merlino. 2011. The two faces of interferon-gamma in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17:6118-6124.
- Zitvogel, L., L. Galluzzi, O. Kepp, M.J. Smyth, and G. Kroemer. 2015. Type I interferons in anticancer immunity. *Nature reviews. Immunology* 15:405-414.
- Zoglmeier, C., H. Bauer, D. Norenberg, G. Wedekind, P. Bittner, N. Sandholzer, M. Rapp, D. Anz, S. Endres, and C. Bourquin. 2011. CpG blocks immunosuppression by myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17:1765-1775.

8 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1: Typ I IFN in der Immunabwehr (Ivashkiv and Donlin, 2014).....	6
Abb. 2: Die JAK/STAT-Signalkaskaden (Platanias, 2005).....	8
Abb. 3: Einfluss von Typ I IFN auf Immunzellen (Zitvogel et al., 2015).....	9
Abb. 4: Immunstimulatorischer Effekt der beiden RLH-Liganden poly(I:C) und 5'- Triphosphat RNA.....	12
Abb. 5: Stimulation mit Typ I und II Interferonen führt zur STAT1 Phosphorylierung... 30	
Abb. 6: Kinetik der RIG-I und MDA5 mRNA Expression nach IFN Stimulation.	33
Abb. 7: Regulation der RIG-I- und MDA5-mRNA-Expression in murinen und humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien durch IFN.	33
Abb. 8: IFN-induzierte Proteinexpression von RIG-I und MDA5 in humanen Pankreaskarzinomzellen.....	34
Abb. 9: Phosphorylierung von IRF3 durch Transfektion mit RLH-Liganden.....	35
Abb. 10: RLH-Liganden induzieren die Expression von CXCL10.....	36
Abb. 11: RLH-Liganden führen zur Hochregulation der Oberflächenexpression von MHC-I.....	37
Abb. 12: Transfektion mit poly(I:C) bzw. ppp-RNA führt zur STAT1-Aktivierung.....	38
Abb. 13: RLH-Liganden induzieren Tumorzellapoptose.	39
Abb. 14: STAT1-Phosphorylierung durch Kombination von IFN mit RLH-Liganden.	40
Abb. 15: Kombination von IFN mit RLH-Liganden steigert die RIG-I-Expression.....	41
Abb. 16: Kombination von Typ I bzw. II IFN mit RLH-Liganden steigert die Phosphorylierung von IRF3.....	42
Abb. 17: Einfluss der Kombination von IFN α , β oder γ mit ppp-RNA auf die CXCL10 Sekretion in murinen Pankreaskarzinomzellen.....	43
Abb. 18: Einfluss der Kombination von IFN α , β oder γ mit ppp-RNA auf die CXCL10 Sekretion in humanen Pankreaskarzinomzellen.....	44
Abb. 19: Einfluss der Kombination von IFN α , β oder γ mit ppp-RNA auf die MHC-I Expression.....	45
Abb. 20: Synergismus von IFN α und ppp-RNA auf die Induktion von Tumorzellapoptose.	46
Abb. 21: Kombination von Typ I und II IFN mit RLH-Liganden führt zu gesteigertem Tumorzelltod.....	50

Abb. 22: Proteolytische Spaltung von Procaspase-3 und -9 nach Vorbehandlung mit IFN α , β oder γ und Stimulation mit poly(I:C).....	51
Abb. 23: Systemische Applikation von IFN α steigert die Expression von RIG-I und MDA5 in Panc02-Tumoren <i>in vivo</i>	52
Abb. 24: IFN α führt in Kombination mit ppp-RNA zu optimierter IFN-Produktion im Tumor und Tumorzellapoptose <i>in vivo</i>	53
Abb. 25: Einfluss der Kombination aus IFN α und poly(I:C) auf das Überleben im orthotopen Panc02-Tumormodell.....	55
Abb. 26: Schema zur Optimierung einer RLH-basierten Immuntherapie durch adjuvantes Typ I IFN.....	61

Tabelle 1: Tumorbehandlung mit ppp-RNA	23
Tabelle 2: Tumorbehandlung mit poly(I:C)	23

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Stefan Endres, Leiter der Abteilung für Klinische Pharmakologie, danke ich für die Möglichkeit in seiner Abteilung zu promovieren. Seine engagierte und fürsorgliche Grundhaltung bildete die Basis der angenehmen Arbeitsatmosphäre im Labor. Für die stetige Unterstützung und fundierten Ratschläge während des Forschungsprozesses bin ich sehr dankbar.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Max Schnurr danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas, das mir entgegengebrachte Vertrauen und die kontinuierliche herausragende Betreuung. Die ausführliche Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten trug entscheidend zum Gelingen der Arbeit bei. Auch die vielfältigen Erfahrungen außerhalb des Labors werden mir in dankbarer Erinnerung bleiben.

Ich danke ganz herzlich meinem Mitbetreuer Dr. rer. biol. hum. Peter Düwell für die methodische Einarbeitung und verlässliche Unterstützung bei der Ausarbeitung dieser Arbeit. Die Einführung in das eigenständige wissenschaftliche Arbeiten und die praktische und theoretische Wissensvermittlung waren für mich sehr lehrreich. Bei Dr. rer. nat. Lars König möchte ich mich für das sorgfältige Korrekturlesen der Arbeit und die zahlreichen Anregungen bedanken.

Für die gute Zusammenarbeit danke ich den Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere Tina Adunka, Ebba Beller, Hélène Bourhis, Hannah Lohr, Anja Funk, Igor Lasic, Sabrina Kirchleitner und Daniel Beß, die sich stets hilfsbereit und solidarisch zeigten. Ich bedanke mich bei allen Mitdoktoranden, Post-Docs und Mitarbeitern in der Abteilung für den konstruktiven wissenschaftlichen Austausch.

Für die ideelle Förderung und materielle Unterstützung im Rahmen des Promotionsstudienprogramms „Förderung für Forschung und Lehre“ unter Leitung von Prof. Dr. Dr. Heesemann, sowie des DFG Graduiertenkollegs 1202 „Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie“ unter Leitung von Prof. Stefan Endres bin ich sehr dankbar.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für die stetige Unterstützung im Studium und die geduldige Anteilnahme. Der konstruktive fachliche Austausch und das Korrekturlesen waren für mich sehr hilfreich.

10 Veröffentlichungen

I. Abstract und Vorträge

Hoelz H, Beller E, Duewell P, Schnurr M.

Type I and II interferons sensitize pancreatic cancer cells for robust RIG-I-like helicase signaling.

a) 11. International Conference “*Cancer Immunotherapy*” (CIMT), Mainz, 2013

b) 33. Jahrestagung des „Deutschen Pankreasclubs“, Leipzig, 2012

II. Originalarbeit

Duewell, P., A. Steger, H. Lohr, H. Bourhis, **H. Hoelz**, S.V. Kirchleitner, M.R.

Stieg, S. Grassmann, S. Kobold, J.T. Siveke, S. Endres, and M. Schnurr.

RIG-I- like helicases induce immunogenic cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8 T cells.

Cell Death and Differentiation 2014;21:1825

11 Eidesstattliche Versicherung

Hölz, Hannes Leon

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Adjuvantes Interferon zur Optimierung RIG-I-basierter Immuntherapie des
Pankreaskarzinoms**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 06. Januar 2017