

Aus der Klinik und Poliklinik für Radiologie,
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Jens Ricke-Laville

**MR-basiertes Monitoring einer onkolytischen Tumortherapie im
transgenen orthotopen Pankreaskarzinommodell in der Maus**

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

vorgelegt von
Felix Maximilian Kubicka-Hurst
aus Mainz

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Clemens Cyran

Mitberichterstatter: PD Dr. Michael Haas
Prof. Dr. Max Schnurr

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Philipp Kazmierczak

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.07.2022

Teile dieser Promotionsarbeit wurden am 28.02.2019 auf dem European Congress of Radiology/ECR (Vortrag 1) und am 31.05.2019 auf dem Deutschen Röntgenkongress/RöKo (Vortrag 2) veröffentlicht.

(Vortrag 1):

Kubicka, F., Fleischmann-Mundt, B.; Kazmierczak, P.; Schneider, M.; Brooks, J.; Ricke, J.; Kühnel, F.; Cyran, C., MR monitoring of cytolysis and inflammatory tumour microenvironment after oncolytic adenovirus injection in a novel transgenic pancreatic adenocarcinoma mouse model.

(Vortrag 2):

Kubicka, F., Fleischmann-Mundt, B.; Kazmierczak, P.; Schneider, M.; Brooks, J.; Ricke, J.; Kühnel, F.; Cyran, C., Untersuchung des entzündlichen Tumormikromilieus nach onkolytischer Virotherapie in einem neuartigen transgenen Pankreaskarzinom Mausmodell durch MRT ^[156].

	Seiten:
1 Einleitung	6-19
1.1. Duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC).....	6-7
1.2. Labordiagnostik des PDAC.....	7
1.3. Rolle der bildgebenden Diagnostik des PDAC.....	7-10
1.4. Pathologische Diagnostik des PDAC.....	10
1.5. Onkogene und das Tumorsuppressorgen p53.....	10-11
1.6. Chirurgische Therapie des PDAC.....	12
1.7. Neoadjuvante und adjuvante Therapie des PDAC.....	12-13
1.8. Palliative Therapie des PDAC.....	13-14
1.9. Anforderungen an PDAC-Modelle in der präklinisch- radiologischen Forschung.....	14
1.10. Aktuelle PDAC-Mausmodelle im Vergleich.....	14-16
1.11. Onkolytische Virotherapie.....	16
1.12. Adenovirus hTert-Ad.....	17-18
1.13. Monitoring von onkolytischer Virotherapie im klinischen Alltag.....	18-19
2. Zielsetzung und Hypothesen	20
3. Material und Methoden	21-43
3.1. Mausstamm p53 fl/fl.....	21
3.2. Onkogen-Plasmidvektoren (KrasG12V, Akt, Cre (p53del)).....	21-22
3.3. Versuchsaufbau.....	22-23
3.4. Narkose und Onkogenplasmid-Injektion/ in situ Elektroporation.....	23-25
3.5. MRT-Protokoll.....	25-26
3.6. Untersuchungen der Eigenschaften und Komplikationen des EP-PDAC- Mausmodells.....	26-28
3.7. Etablierung einer intratumoralen (IT) Virustherapie mit hTert-Ad und die NaCl-Kontrollgruppe.....	28-29
3.8. Tumorentnahme nach Therapie.....	29-31
3.9. Volumetrische Messungen der MR-Signalveränderungen.....	31
3.10. Histopathologie.....	31-34
3.10.1. Hämalan-Eosin-Färbung (HE-Färbung).....	32
3.10.2. Immunhistochemie (CD45/ H-Färbung.....	32-33
3.10.3. Picro-Siriusrot-Färbung.....	33
3.11. Prozentuale Auswertung der Komplikationen.....	34

4. Ergebnisse.....	35-49
4.1. Tumorwachstum und die MRT-morphologische Darstellung des EP-PDAC im Vergleich mit dem KPC-Model.....	35-36
4.2. Tumorassoziierte Komplikationen.....	37-40
4.3. MR-tomographische Untersuchungen der adenoviralen Therapie des elektroporationsinduzierten Pankreas-Adenokarzinoms.....	40-43
4.3.1. MR-tomographische Untersuchungen 2 Tage nach Therapie.....	40-41
4.3.2. MR-tomographische Untersuchungen 3 Tage nach Therapie.....	41-42
4.3.3. Volumetrische Messungen der posttherapeutischen Signalveränderungen.....	42-43
4.4. Histopathologische Untersuchungen.....	43-47
4.4.1. HE- und immunhistochemische Färbungen.....	43-46
4.4.2. Polarisationsmikroskopische Untersuchung der virusinduzierten Kollagenentwicklung mit Picro-Siriusrot-Färbung.....	46-47
4.5. Auswertung der Therapiegruppen in tabellarischer Form.....	48-49
5. Diskussion.....	50-62
5.1. EP-PDAC-Wachstum und MR-morphologische Darstellung	50-52
5.2. Tumorassoziierte Komplikationen.....	52-54
5.3. Intratumorale therapieinduzierte MR-Signalveränderungen und histologische Validierung.....	54-56
5.4. MR-tomographische Evaluation der Mikromilieuveränderungen.....	56
5.5. Molekulare Bildgebung zur Untersuchung therapieinduzierter Tumormikromilieuveränderungen.....	57
5.6. Gewebeveränderungen nach Virotherapie.....	57-58
5.7. Intratumorale Kollagenentwicklung als mögliche Blockade für die Immunreaktion.....	58-59
5.8. Translation in die Klinik.....	59-60
5.9. Limitationen.....	60-61
5.10. Ausblick.....	62
6. Zusammenfassung.....	63-64
7. Danksagung.....	65
8. Verzeichnisse.....	66-87
8.1. Abbildungsverzeichnis.....	66
8.2. Tabellenverzeichnis.....	67

8.3. Abkürzungsverzeichnis.....	67-72
8.4. Literaturverzeichnis.....	73-86

1. Einleitung

1.1. Duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC)

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (pancreatic ductal adenocarcinoma/PDAC) ist die weltweit siebt- und in den USA zweithäufigste Krebstodesursache ^[1]. Basierend auf Schätzungen des Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) ist Bauchspeicheldrüsenkrebs mit 458.918 Neuerkrankungen und 432.242 Todesfällen im Jahr 2018 die elfthäufigste Krebserkrankung der Welt ^[1, 2]. Der Altersgipfel liegt zwischen dem 6. und 8. Lebensjahrzehnt ^[1]. Die Prognose für Patienten ist durch das aggressiv infiltrierende Wachstum und einer frühen Metastasierung schlecht. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt insgesamt 2- 9 % ^[3], ca. 20% nach erfolgreicher (kurativer) Resektion ^[4] sowie bis zu 37 % nach Resektion im Stadium I ^[5]. Das mittlere Gesamtüberleben im metastasierten Stadium beträgt nur 3-5 Monate mit einer 12-Monats-Überlebensrate von 10 % ^[6].

Die genaue Ätiologie des PDAC ist nicht vollständig bekannt. Die wichtigsten Risikofaktoren sind jedoch hohes Alter, familiäre Belastung, Alkohol- und Nikotinabusus, chronische Pankreatitiden, Diabetes mellitus und Adipositas ^[7, 8]. Seltener auftretende Grunderkrankungen, wie das Lynch-Syndrom, Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP) und das Peutz-Jeghers Syndrom (PJS), stellen ebenfalls Risikofaktoren dar ^[11].

In frühen Tumorstadien verläuft die Erkrankung häufig asymptomatisch. Unspezifische Symptome, wie Oberbauchschmerzen, Verdauungsstörungen, Rückenschmerzen, Übelkeit, Appetit- und Gewichtsverlust, Ikterus, Steatorrhoe, Thrombosen (z.B. Milzvenenthrombosen) und Diabetes mellitus treten häufig erst in metastasierten Stadien auf. Zum Zeitpunkt der Diagnose liegen somit in 57 % der Fälle bereits Metastasen vor, was eine hohe Mortalitätsrate begründet ^[9]. Je fortgeschrittener die Erkrankung, um so höher ist das Risiko für tumorassoziierte Komplikationen, wie ein mechanischer Ileus, intraparenchymale Einblutungen sowie Peritonealkarzinose mit Peritonitis und Aszites. Das PDAC ist mit etwa 95 % aller Neoplasien die häufigste Tumorerkrankung des Pankreas ^[10]. Hierbei betrifft das PDAC mit 60-70 % den Pankreaskopf ^[3] und führt per continuitatem zu einer Infiltration des umliegenden Gewebes, der Gallengänge, Gefäße, Nerven, Darm, Milz, Magen, Lymphgefäße und Peritoneum ^[11]. Zusätzlich treten häufig Metastasen in Leber oder Lunge sowie seltener ossäre Metastasen auf ^[12, 13].

Das Tumormikromilieu besteht bis zu 90 % aus Bindegewebe (Myofibroblasten und Kollagen) [16, 17]. Heute wird angenommen, dass die Zusammensetzung des Tumormikromilieus und der Anteil dichten Bindegewebes Einfluss auf die Therapieresistenz des Tumors haben. Untersuchungen konnten zeigen, dass ein PDAC mit dichterem Stroma aggressiver wächst [18]. Das Bindegewebe erhöht die Chemoresistenz [19, 20] und kann die Infiltration von Immunzellen ins Tumoriinnere erschweren [21]. Aktuell gilt als Referenzstandard für ein erfolgreiches Therapieansprechen in der Bildgebung die CT- oder MR-tomographisch gemessene Tumorgößenregression. Die therapieinduzierte Veränderung der Tumorbinnenstruktur ist bisher kein Referenzstandard der klinischen Routine. Für die präklinisch radiologische Forschung konnten bisher wenige orthotope PDAC-Mausmodelle mit menschenähnlicher Pathophysiologie zur Untersuchung von therapiebedingten Tumorgewebeveränderungen, wie dem Zelluntergang, Immunzellinfiltrationen und Darstellung des Stroma-Kollagenanteils etabliert werden. Ein solches Tumormodell könnte der bildgebenden Darstellung des Therapieansprechens in Abhängigkeit von verschiedenen Tumorgewebe-Zusammensetzungen dienen.

1.2. Labordiagnostik des PDAC

Im Blutserum können Erhöhungen unspezifischer Parameter wie das C-reaktive Protein (CRP) und die Pankreasenzyme (Trypsin, Lipase, Amylase) gefunden werden. Auch eine Erhöhung von Tumormarkern (CEA, Ca 19-9) kann festgestellt werden. Diese Tumormarker dienen aufgrund ihrer niedrigen Sensitivität und Spezifität (jeweils etwa 70%) der Verlaufskontrolle und erhöhen sich bei Tumorprogression [96]. Die direkte Korrelation von Ca 19-9 mit der Größenprogression ermöglicht somit Aussagen zur Prognose. Die Höhe des Ca 19-9 kann nach einer Operation zur Bewertung der Vollständigkeit einer Resektion verwendet werden [182].

1.3. Rolle der bildgebenden Diagnostik des PDAC

Der Ultraschall ist als nichtinvasive und kosteneffiziente Methode zur Initialbildgebung und differenzialdiagnostischen Abklärung bei auffälliger Systemkonstellation mit unklaren Oberbauchschmerzen geeignet [22, 23]. Eine echoarme Raumforderung, eine Erweiterung des Pankreashauptgangs und des Ductus hepaticus communis/DHC (double duct sign) sind

Anzeichen für das Vorhandensein eines Pankreastumors ^[24]. Die externe Sonographie ist jedoch häufig durch Darmgasüberlagerungen und eingeschränkte Eindringtiefe limitiert. Bei unklarem Befund kann eine Feinnadelpunktion über eine endoskopische Ultraschalluntersuchung (EUS) erfolgen. Diese ermöglicht die Gewebetypisierungen mit einer Genauigkeit von 95 % ^[10]. Die externe Sonographie ist mit einer Sensitivität von 88 % und einer Spezifität von 86% für die Detektion von Pankreastumoren der Schnittbildgebung unterlegen ^[24]. Die EUS jedoch ist der Schnittbildgebung bei kleinen Tumoren unter 3 cm überlegen ^[31, 11].

Die Computertomographie (CT) ist mit einer Sensitivität von 89 % und Spezifität von 90% die first-line-Modalität für das bildgebende Tumorstaging ^[25, 26]. Das PDAC stellt sich in arterieller Phase klassischerweise hypodens dar, da es im Vergleich zum umliegenden Pankreasgewebe geringer perfundiert wird. Einige PDAC zeigen sich jedoch auch nach Kontrastmittelgabe CT-morphologisch isodens zum Pankreasgewebe. Hier kann der Verdacht auf Bauchspeicheldrüsenkrebs nur durch sekundäre Zeichen, wie eine (segmentale) Erweiterung des Pankreasgangs oder abrupte Pankreasgangunterbrechung, gestellt werden. Eine Studie konnte zeigen, dass zur Detektion von kleinen, isodensen Pankreastumoren eine verzögerte Kontrastierungsphase 240 s nach KM-Applikation verwendet werden kann ^[27]. In 87,5 % der Fälle wurde dabei ein relatives Hyperenhancement sichtbar ^[27]. Die genaue radiologische Ausbreitungsdiagnostik entscheidet anschließend maßgeblich über die Resektabilität des Tumors. Das CT ist mit einer Genauigkeit zur Detektion des Pankreaskarzinoms von bis zu 86,6 % dem MRT (78,9 %) bei der Beurteilung der Tumorresektabilität überlegen ^[28]. Außerdem können tumorassoziierte Komplikationen wie Aszites, Blutungen und Ileus nachgewiesen werden, bei denen gegebenenfalls sofortige notfall-therapeutische Maßnahmen notwendig sein können. Für uneindeutige Fälle, insbesondere bei kleinen Läsionen oder Pankreastumoren, die in der CT die gleiche Kontrastmittelaufnahme zeigen wie das umgebende Pankreasgewebe, kann als second-line-Modalität die kontrastverstärkte Magnetresonanztomographie (MRT) verwendet werden. Sie zeigt im Vergleich zur CT einen höheren Weichteilkontrast ^[29]. Das PDAC stellt sich in arterieller Phase in der kontrastverstärkten MRT typischerweise hypointens dar. Die Diffusionsbildgebung (diffusion-weighted imaging, DWI) in der MRT misst die Diffusionsbewegung von Wassermolekülen in Gewebe und hat über die letzten Jahre insbesondere zur Unterscheidung maligner und benigner Pankreasraumforderungen an Bedeutung gewonnen ^[32, 34]. Technologische Verbesserungen haben den routinemäßigen Einsatz von DWI bei MRT-Untersuchungen des Abdomens ermöglicht ^[35]. Das Ausmaß der Diffusion wird dabei über den effektiven

Diffusionskoeffizienten (apparent diffusion coefficient, ADC) ermittelt. In der Literatur beträgt der ADC bei gesundem Pankreasgewebe 1,49 bis $1,9 \times 10^{-3}$ mm²/s und für Pankreaskarzinome Werte zwischen 1,24 und $1,46 \times 10^{-3}$ mm²/s [34]. Um Gewebeblutvolumina zu messen, verwendet man bei der Diffusionsbildgebung den f-Wert (perfusion fraction). Dieser beträgt bei gesundem Gewebe etwa 16 % und bei Pankreaskarzinomen ca. 8 % [34].

Die dynamische Perfusions-CT kann die Durchblutung eines Gewebes quantitativ darstellen. Dadurch kann sie differenzialdiagnostisch bei der Beurteilung von Pankreasraumforderungen zusätzliche Informationen liefern. So können neuroendokrine Tumore (NET) mit typischerweise starker Durchblutung vom typischen PDAC mit niedrigerer Durchblutung differenziert werden [95]. Als weitere Modalität für die Detektion des Pankreaskarzinoms und von Fernmetastasen erreicht die Positronenemissionstomographie (PET) mit ¹⁸F-FDG eine Sensitivität von 86-100 % und eine Spezifität von 79-100 % [30].

Die genetische Zusammensetzung eines Tumors kann sich je nach Mutationsverhältnis auf den bildmorphologischen Phänotyp auswirken. In der Literatur versuchen verschiedene klinische Studien durch höherdimensionale quantitative Bildmerkmale in der CT und MRT Rückschlüsse über die Zusammensetzungen der Mutationen und Genexpressionen des Tumorgenoms zu ermöglichen [196]. Dieser Forschungszweig wird als Radiogenomics bezeichnet.

In der Kleintierbildgebung erlaubt die Hochfeld 7 T MRT im Vergleich zu niedrigeren Feldstärken einen höheren Weichteilkontrast und eine höhere Ortsauflösung. Verschiedene präklinische Studien konnten die Eignung der hochauflösenden 7 T MRT für die Untersuchung von orthotopen (syngenem oder xenogenem) Transplantmodellen zeigen. Eine Studie von Partecke et al. zeigte beispielsweise, dass die 7 T MRT zur Detektion eines syngenem Transplant-Modells geeignet ist [193]. Innerhalb besonders großer Tumoren konnten sie mit der 7T MRT zentrale Tumornekrosen darstellen, die durch eine Unterversorgung des Tumorgewebes verursacht wurden.

Der Referenzstandard für das Ansprechen einer Tumorthherapie in der CT oder MRT-Bildgebung ist die Tumorgrößenregression. Bei Immuntherapien sowie bei onkolytischen Virotherapien kann ein Tumor jedoch auch entzündlich anschwellen (Pseudoprogression), obwohl ein Therapieansprechen vorliegt [72, 190]. Die bildgebende Darstellung und Interpretation

intratumoralen Veränderungen sind aktuell jedoch nicht Referenzstandard zur Evaluation des Therapieansprechens in der MRT- oder CT-Diagnostik.

1.4. Pathologische Diagnostik des PDAC

Zur prätherapeutischen Diagnostik (z.B. Feinnadelaspiration) oder nach Tumorresektion können histopathologische Untersuchungen durchgeführt werden. Ein PDAC entwickelt sich aus dysplastischen Epithelien der Pankreasdrüsen. Dabei können sich intraepithelial prä maligne Vorstufen (PanIN-Läsionen/ pancreatic intraepithelial neoplasia) entwickeln, die je nach Zellmorphologie und Mutation histopathologisch das Risiko zur Ausbildung eines PDAC in 3 Stufen klassifizieren. Am stärksten sind epitheliale Zellen in den PanIN3- Läsionen (Carcinoma in situ) verändert ^[14]. Geht eine PanIN3-Läsion in invasives Wachstum über, entsteht ein PDAC. Hat sich ein PDAC manifestiert, können histologisch atypische Drüsenstrukturen und ein umgebendes dichtes Bindegewebe (desmoplastisches Stroma) festgestellt werden. Nach Mitoserate, Entdifferenzierung sowie Zell- und Zellkernmorphologie lassen sich 4 Entartungsgrade einteilen (G1-G4). Je niedriger die Differenzierung in Drüsengewebe, um so maligner verhält sich das Wachstum des Tumors. Histopathologische Untersuchungen des Tumorresektats und der entfernten Lymphknoten ermöglichen zusammen mit der bildgebenden Untersuchung die prognostisch und therapeutisch relevante TNM-Klassifikation des Tumors. Das T-Stadium lässt sich in 4 Kategorien einteilen, T1 (<2cm, limitiert auf das Pankreas), T2 (>2cm, limitiert auf das Pankreas), T3 (pankreasüberschreitendes Wachstum, ohne Beteiligung des Truncus coeliacus oder der V. mesenterica superior) und T4 (Beteiligung des Truncus coeliacus oder der A. mesenterica superior). Wenn regionale Lymphknoten involviert sind, wird ein N1-Stadium definiert, bei fehlender regionaler Lymphknotenbeteiligung N0. Sind Fernmetastasen vorhanden, wird das Tumorstadium mit M1 klassifiziert, bei fehlenden Fernmetastasen ein M0-Stadium.

1.5. Onkogene und das Tumorsupressorgen p53

Jede Neoplasie hat ihre eigene Zusammensetzung mit typischen Mutationen. Bei der Entstehung des PDAC sind Mutationen verschiedener Tumorsuszeptibilitätsgene involviert und regulieren Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Zellinvasion, Angiogenese, Zelladhäsion und

Apoptose [39, 40, 41, 43, 45, 49, 52]. Die Art dieser Mutationen ist charakteristisch für das PDAC. Mutationen des G-Proteins KRAS bestehen beim Adenokarzinom des Pankreas in bis zu 90 % der Fälle [37]. KRAS-Mutationen können bereits in frühen PanIN-Läsionen gefunden werden [38]. Als weiteres Onkogen liegt bei ca. 20 % eine Amplifikation oder Überexpression des Protein Kinase B Gens (Akt2) vor [42, 43]. Mutationen des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor-Gens 2 (Her2/neu) können bei 46 % der PDAC detektiert werden [44]. Deletionen und Punktmutationen des Transkriptionsregulators Mothers against decapentaplegic homolog (SMAD4/=DPC4) treten in 50 % der Fälle auf [47, 48]. Eine Mutation des Myeloblastosis Viral Oncogene Homolog (MYB)-Transkriptionsfaktorgens kann bei 4-6 % gefunden werden [51]. Auch Träger von Mutationen der DNA-Reperaturgene BRCA1/BRCA2 konnten neben einem erhöhten Brustkrebs-Risiko mit einer erhöhten Inzidenz von PDAC in Verbindung gebracht werden [53,54]. p53 reguliert verschiedene tumorsuppressive Zellvorgänge und ist in 50-75 % der PDAC, in der Regel durch eine missense Mutation des einen Allels sowie eine begleitende Deletion des zweiten Allels, inaktiv [55]. In aktiver Form kontrolliert p53 das Zellwachstum, reguliert den Zelluntergang nach DNA-Schäden, hypoxie-induziertem Stress oder Onkogenaktivierung [56]. p53 Mutationen sind die häufigsten genetischen Alterationen in allen Tumoren [57] und spielen auch in der Karzinogenese des PDAC eine fundamentale Rolle [58]. Bereits in PanIN2- und PanIN3-Vorläuferläsionen können sie vorliegen und fördern daher schon oft in der Entstehungsphase eine PDAC-Entwicklung [59]. Das Wissen um die Häufigkeiten verschiedener Mutationen im PDAC stellt eine grundlegende Basis zur Entwicklung genetisch modifizierter Mausmodelle in der präklinischen Forschung dar. Die Nachbildung ähnlicher Mutationsverhältnisse in Versuchstier-Gewebe ermöglicht authentischere Charakteristika des Tumorwachstums.

Onkogenmutationen	
KRAS	90 %
SMAD4/=DPC4.	50 %
Her2/neu	46 %
Akt2	20 %
MYB	4-6 %
Tumorsupressorgeninaktivität	
P53	50-75 %

Tabelle 1: Die wichtigsten Mutationen des PDAC und ihre Häufigkeiten.

1.6. Chirurgische Therapie des PDAC

Die chirurgische Resektion ist das aktuelle einzige kurative Verfahren beim Pankreaskarzinom [61]. Eine alleinige Chemotherapie oder Radiotherapie führt nicht zur Heilung [62]. Ziel der chirurgischen Therapie ist eine Resektion im Gesunden (R0). Die Beurteilung einer R0-Resektabilität durch die CT erfolgt mit einer Genauigkeit von etwa 90 % [63]. Bei uneindeutiger Bildgebung kann ergänzend eine invasive Staging-Laparoskopie durchgeführt werden [64, 65]. PDAC mit Fernmetastasierung sind oft als inoperabel einzustufen, wobei die Beteiligung benachbarter Organe und Lymphknoten eine Resektion nicht ausschließen [11]. Eine Gefäßinfiltration oder -kontakt ist ebenfalls ein wichtiges Resektabilitätskriterium [66]. Die Resektabilitätskriterien werden nach den modifizierten National Comprehensive Cancer Network (NCCN®) Guidelines 2018 bestimmt [67, 68]. Bei Cholestase kann in ausgewählten Fällen eine perioperative endoskopische oder perkutan transhepatische Cholangiodrainage durchgeführt werden. Aufgrund der stentinduzierten Infektionsrate von bis zu 74 % ist eine Empfehlung zur Gallendrainage nach S3-Leitlinien aber nur gegeben, wenn eine Operation nicht zeitnah erfolgen kann oder eine Cholangitis vorliegt [70, 71]. Es stehen derzeit verschiedene chirurgische Verfahren zur Wahl. In 60-70 % der Fälle ist der Pankreaskopf beteiligt [10], sodass eine partielle Duodenopankreatektomie mit oder ohne Pylorusershalt (nach Kausch-Whipple) durchgeführt werden kann. Um Gallengänge zu erhalten, kann auch eine duodenumerhaltende Pankreaskopfresektion durchgeführt werden. Bei Ausdehnungen bis in Korpus und Schwanz erfolgt eine komplette Pankreatektomie. Ist der Pankreasschwanz betroffen, ist die Pankreaslinksresektion die OP der Wahl. Eine subtotale Pankreaslinksresektion ist neben der totalen Pankreatektomie eine alternative Option beim isolierten Befall des Korpus. Für eine aussagekräftige TNM-Klassifikation sollten bei der Resektion des Pankreaskarzinoms immer mindestens 10 Lymphknoten entfernt werden [71].

1.7. Neoadjuvante und adjuvante Therapie des PDAC

Eine neoadjuvante Strahlen-, Radiochemo- oder Chemotherapie mit Folfirinox, Gemcitabine oder Gemcitabine kombiniert mit Cisplatin kann erfolgen, um durch Downstaging eine R0-Resektion zu ermöglichen [94, 77]. Nach Therapie kann somit manchmal die Resektabilität bei lokal nicht weit fortgeschrittenen Tumoren ermöglicht werden (so genannte borderline-resektable PDAC) [77].

Aufgrund der hohen Inzidenz postoperativer Rezidive durch Metastasierungen wird bei R0- und R1-Resektion im UICC-Stadium I–III eine adjuvante Behandlung mit Chemotherapie angeschlossen ^[71]. Die gängigen und häufigsten Chemotherapien der adjuvanten PDAC-Therapie bestehen aus Gemcitabine oder Fluoropyrimidinen (5Fu/Folinsäure, Capecitabine) oder dem intensiveren mFOLFIRINOX-Protokoll (5Fu, Folinsäure, Irinotecan, Oxaliplatin). Eine adjuvante Gemcitabine-Therapie kann das krankheitsfreie Überleben im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe um 6,4 Monate signifikant verlängern ^[74]. Studien konnten zudem zeigen, dass auch die 5-JÜR von ca. 10 % mit alleiniger Chirurgie auf 20 % mit zusätzlicher Gemcitabinetherapie erhöht werden kann ^[75]. Bei Patienten in gutem Allgemeinzustand nach der Pankreasresektion hat die intensive mFOLFIRINOX Kombinationschemotherapie im Vergleich zu Gemcitabine in einer Phase-III-Studie, zu einer signifikanten Verlängerung der mittleren Gesamtüberlebenszeit von 8,8 Monaten geführt ^[79]. Die Therapie dauert jeweils etwa 6 Monate und sollte innerhalb von 1,5 Monaten nach Operation angesetzt werden. Eine Phase-III-Studie konnte zeigen, dass Gemcitabine im Vergleich zu 5Fu/Folinsäure als Bolusgabe (Mayo-Protokoll) eine gleichwertige Wirksamkeit hat, jedoch eine geringere Toxizität aufweist ^[76].

1.8. Palliative Therapie des PDAC

Als Erstlinientherapie bei einem nicht kurativen Befund kann bei älteren Patienten mit Begleiterkrankungen und reduziertem Allgemeinzustand eine gut verträgliche Gemcitabine-Monotherapie angewandt werden oder eine Kombination aus Gemcitabine und Erlotinib ^[78]. Als Mittel der Wahl bei Patienten mit gutem Allgemeinzustand werden die Kombinations-Chemotherapien FOLFIRINOX oder Gemcitabine und Nab-Paclitaxel als Erstlinientherapie verwendet ^[79, 80]. Bei Patienten mit einem Tumorprogress nach der Erstlinientherapie stehen auch aktive Chemotherapien für die Zweitlinientherapie zur Verfügung (NalIri+5Fu/Folinsäure oder Oxaliplatin+5Fu/Folinsäure), die in einer großen Metaanalyse aus 11 Studien eine mediane Überlebenszeit von etwa 6 Monaten zeigten ^[82]. Bei Patienten mit Pankreaskarzinomen auf dem Boden einer Keimbahnmutation von BRCA1/2 führt eine Erhaltungstherapie mit dem Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase-Inhibitor Olaparib (PARP-Inhibitor) nach Therapieansprechen einer platinhaltigen Erstlinientherapie zu einem signifikant verlängerten progressionsfreien Überleben von 3,8 auf 4,7 Monaten ^[83]. Eine palliative

Radiotherapie wird nur bei symptomatischer Metastasierung oder Komplikationen eingeleitet (z.B. Frakturgefahr bei ossärer Metastasierung).

1.9. Anforderungen an PDAC-Modelle in der präklinisch-radiologischen Forschung

Für präklinisch-radiologische Untersuchungen des PDAC bestehen verschiedene wichtige Anforderungen für ein ideales Tumormodell. Ein im Vergleich zum humanen PDAC histopathologisch und makroskopisch authentisches Wachstum mit natürlicher Tumorentwicklung sowie mit physiologischen tumorassoziierten Komplikationen ist dabei anzustreben. Für die Radiologie insbesondere wichtig ist eine bildgebend deutliche Abgrenzbarkeit bei unterschiedlichen Tumorgrößen. Um therapieinduzierte Tumorarchitekturveränderungen zu detektieren ist ein bildmorphologisch homogenes Wachstum vorteilhaft. Das PDAC bildet oft erst nach Resektion Metastasen und Rezidive. Um die Metastasierungsmuster postoperativ zu untersuchen, sollte im Mausmodell also ein singulärer, resektabler Primärtumor wachsen. Multifokal wachsende Tumormodelle sind wegen ihrer Irresektabilität dafür ungeeignet. Eine natürliche adaptive Immunreaktion auf entartete Zellen stellt außerdem einen wichtigen Aspekt für die genauere Interpretation von Bilddaten dar, da lymphatische Infiltration, entzündliche Wassereinlagerungen und Fibrosierung den Phänotyp des Tumors beeinflussen. Manche Modelle sind genetisch flexibel, da die Onkogen-Konstellationen aus beispielsweise KRAS, Akt2, Her2/neu und MYB variabel kombinierbar sind. Diese genetische Flexibilität hat den Vorteil, dass die Zusammenhänge zwischen genetischem Mutationsstatus und Phänotyp untersucht werden können (Radiogenomics). Um eine strukturierte Projektplanung zu realisieren, ist auch eine möglichst zeitgleiche Tumorentstehung innerhalb der Versuchsgruppe (Synchronizität) eine grundlegende Voraussetzung.

1.10. Aktuelle PDAC-Mausmodelle im Vergleich

Die zur Verfügung stehenden in situ PDAC Mausmodelle lassen sich in Transplantmodelle (xenogenic transplant PDAC, syngenic transplant PDAC) und in genetisch veränderte Mausmodelle (genetically engineered mouse models, GEMMs) einteilen. Werden einzelne Pankreasadenokarzinomzellen der Maus in das gesunde Pankreas einer anderen Maus

transplantiert, handelt es sich um ein syngenes transplantiertes PDAC-Modell ^[86]. Werden einzelne menschliche Pankreasadenokarzinomzellen in das Pankreas einer gesunden immundefizienten Nacktmaus transplantiert, so handelt es sich um ein xenogenes transplantiertes-PDAC-Modell ^[86]. Diesen immundefizienten Nacktmäusen mit xenogen transplantierten PDAC-Zellen fehlen die T-Zellen des Immunsystems, sodass die ausbleibende Immunreaktion keine immunologischen Analysen erlaubt. Im Gegensatz hierzu weisen syngene-transplantierte Tiermodelle im Vergleich zu natürlich gewachsenen Tumoren eine unnatürlich starke adaptive und angeborene Immunantwort gegen den Tumor auf, was aber für aktuelle Ansätze in der Tumorthherapie oder Bildgebung von Bedeutung sein kann. Um eine natürliche Tumorentstehung bei gleichzeitig natürlicher adaptiver und angeborener Immunantwort zu ermöglichen, wurden die GEMMs entwickelt. Unter ihnen sind die KPC-Modelle (p53 knockout+ KRAS G12D knock in) weit verbreitet, bei denen ein Mausstamm genetisch verändert wird, sodass die Maus von Geburt an eine tumorbildende Prädisposition besitzt. Dabei sitzen die Mutationen jedoch nicht nur in einzelnen Zellen, sondern im gesamten Pankreasgewebe, sodass ein multinoduläres Tumorstadium resultiert ^[87]. KPC-Mäuse entwickeln während einer großen Zeitspanne von 47 bis 355 Tagen immunologisch und histopathologisch sehr authentische und invasiv wachsende Pankreasadenokarzinome ^[87]. Abgesehen von dieser Asynchronizität der Tumorentstehung innerhalb einer Versuchgruppe zeigen bildmorphologische Untersuchungen vergangener Studien, dass das stark multinoduläre Wachstum und die damit einhergehende eingeschränkte Abgrenzbarkeit einzelner Tumore in der Schnittbildgebung ein großes Hindernis für die Interpretation der Bilddaten darstellt ^[88, 89]. Bei KPC-Modellen kann es dadurch schwierig sein, die Wirkung eines Therapeutikums zu beurteilen ^[119]. Eine multifokale Progression entspricht jedoch vor allem nicht der lokalen PDAC-Genese des Menschen. Die Tumoresektion, die eine Standardtherapie des humanen PDAC darstellt, ist bei multifokalem Wachstum ebenfalls nicht möglich.

Ein neuartiges GEMM ist das elektroporationsbasierte (EP-PDAC)-Modell. Bei einer Elektroporation werden Onkogenkombinationen auf DNA-Plasmidvektoren über eine angelegte elektrische Spannung in das pankreatische Genom von gesunden Mäusen integriert. Mit diesem Verfahren ließen sich in einer Studie zuverlässig 21 Tage nach Elektroporation histopathologisch authentische PDAC induzieren ^[90]. Durch diese Zuverlässigkeit ist eine strukturierte Projektplanung für bildgebende Untersuchungen möglich. Der Vorteil gegenüber dem KPC-Modell ist zudem das dem klinischen Bild des PDAC im Menschen ähnliche, solitäre Wachstum des Primärtumors und die damit ermöglichte Resektabilität ^[90]. Die

unterschiedlichen Onkogenkombinationen auf den genutzten Plasmidvektoren sind frei wählbar, sodass das EP-PDAC-Modell eine sehr hohe genetische Flexibilität aufweist. Bisher wurden noch keine schnittbildgebenden Untersuchungen in einem EP-PDAC-Mausmodell durchgeführt.

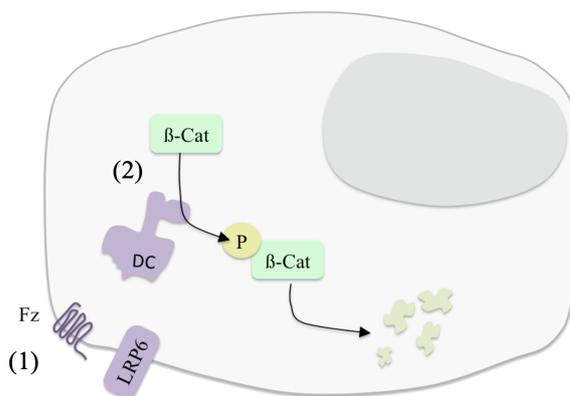
1.11. Onkolytische Virotherapie

Seit dem Jahr 2015 gibt es in den USA und Europa die erste klinische Zulassung eines onkolytisch wirksamen Herpes-Virus (Talimogene laherparepvec/ T-Vec) zur Immuntherapie des metastasierten malignen Melanoms ^[100]. Die Indikation zur Virotherapie kann beim inoperablen malignen Melanom im Stadium III oder IV in Betracht gezogen werden. Die Wirkung des Virus kann das Gesamtüberleben der Patienten von 18,9 auf 23,3 Monate signifikant verlängern ^[101]. Um eine Infektion und Lyse der Tumorzellen zu erreichen, wurden gentechnisch verschiedene Modelle entwickelt. Eine große Rolle spielt dabei die Nutzung tumorspezifisch aktiver Promotoren. Promotoren sind DNA-Abschnitte, die für die Expressionsregulation eines zugehörigen Gens verantwortlich sind. Es ist bekannt, dass manche Gene in Tumorzellen besonders hochreguliert werden und entsprechend tumorspezifische Promotoren besitzen. Dazu gehört beispielsweise der Promotor für die humane Telomerase reverse Transkriptase (hTert) sowie unter anderem das Prostata-spezifische Antigen (PSA), das Alpha-Fetoprotein (AFP) und der Transkriptionsfaktor E2F. Telomere sind wichtige Elemente an Chromosomenenden, die die Integrität der Chromosomen erhalten, indem sie die Chromosomenverkürzung bei Zellteilungen verhindern ^[102, 103]. Da Zellteilungen über die Zeit aber eine Verkürzung der Telomere verursachen, müssen diese bei sich besonders oft teilenden Tumorzellen durch die Telomerase wieder verlängert werden. Aus diesem Grund liegt in den meisten Tumorzellen eine Hochregulation von Telomerase-Promotoren vor, was eine potenzielle Unsterblichkeit durch exzessive Zellteilung ermöglicht ^[104]. Ein Beispiel ist der Promotor des hTert-Gens, der eine katalytische Untereinheit der Telomerase exprimiert. Während der Karzinogenese wird dieser Promoter über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg aktiviert, sodass nur bei Tumorzellen die Telomerase-Untereinheit exprimiert wird ^[105]. Bei den meisten gesunden Körperzellen bleibt der Promotor des hTert-Gens inaktiv und das Protein wird nicht exprimiert ^[106, 107]. Durch die spezifische Aktivierung von Promotoren in Krebszellen entsteht ein geeignetes gentechnisches Werkzeug für die tumorspezifische Expression adenoviraler Gene ^[108].

1.12. Adenovirus hTert-Ad

Der Wnt-Signalweg liegt in adulten, gesunden Zellen inaktiv vor (Abbildung 1 A) und spielt normalerweise nur eine Rolle bei der Embryonalentwicklung und Wundheilung ^[109, 110]. Durch die Inaktivität des Wnt-Signalweges wird β -Catenin phosphoryliert und abgebaut (Abbildung 1 A). In Tumorzellen kann der Wnt-Signalweg jedoch durch den Wachstumsfaktor Wnt wieder aktiviert werden. Wnt bindet dabei an den membranständigen Frizzled-Rezeptor (Fz) und den Co-Rezeptor LRP6, wodurch β -Catenin durch das Enzym destruction complex (DC) nicht mehr phosphoryliert und somit nicht mehr abgebaut wird (Abbildung 1 B). Zudem liegt β -Catenin in Tumorzellen häufig überexprimiert vor ^[111]. Das aktiv vorliegende β -Catenin kann nun durch Translokation in den Zellkern über Interaktion mit Transkriptionsfaktoren (TCF) die für die Zellproliferation wichtigen Promotoren, beispielsweise den hTert-Promotor, aktivieren. Dieser Mechanismus kann bei der gentechnischen Herstellung tumorspezifischer Viren genutzt werden. Für die Initiierung der intrazellulären Virusreplikation ist unter anderem das viruseigene E1A-Gen verantwortlich ^[112]. Um eine tumorspezifische Expression des E1A Gens zu erzielen, wird der virale E1A-Promotor gentechnisch durch einen hTert-Promotor ersetzt. Kommt es zur Infektion einer Tumorzelle, so werden β -Catenin-gesteuert die hTert-Promotoren des Virusgenoms aktiviert. Dadurch kann E1A exprimiert werden und das Virus kann sich tumorspezifisch replizieren. Die onkolytische Therapie durch rekombinante Telomerase-abhängige Adenoviren (hTert-Ad) zeichnet sich somit durch eine hohe Tumorspezifität aus ^[112].

1 A: Gesunde Zelle



1 B: Tumorzelle

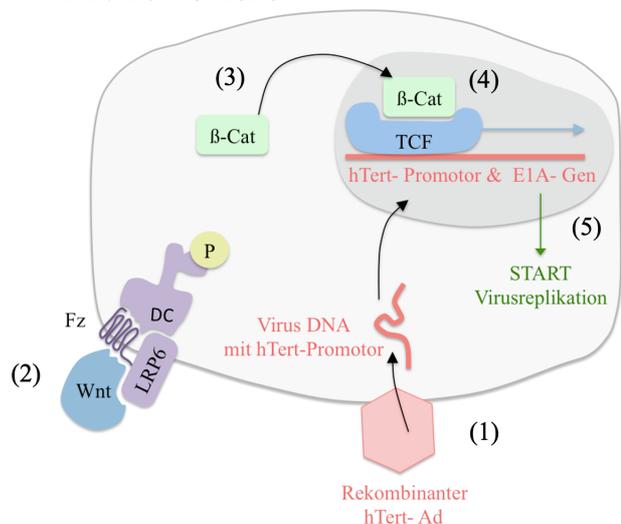


Abbildung 1: Die Rolle des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs für die Tumorspezifische Virusreplikation. **1 A:** Gesunde Zelle: (1) Inaktiver Wnt-Signalweg. (2) β -Catenin wird

phosphoryliert und abgebaut. **1 B:** Tumorzelle: (1) Virale DNA mit dem hTert-Promotor und dem E1A Gen gelangt in den Zellkern der Tumorzelle. (2) Wnt-Wachstumsfaktor bindet Rezeptoren. (3) β -Catenin wird nicht phosphoryliert und bleibt aktiv. (4) β -Catenin unterstützt durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren (TCF) die Expression des viralen E1A-Gens. (5) E1A initiiert die Virusreplikation.

1.13. Monitoring von onkolytischer Virotherapie

Virotherapien des malignen Melanoms im Stadium III oder IV werden in Kombination mit anderen Immuntherapien (z.B. Checkpoint Inhibitoren [183, 179]) oder Chemotherapien [184] verabreicht, da sie die Therapieeffektivität verstärken können [183, 184]. Mit MRT oder CT kann zwar eine morphologische Größenregression dargestellt werden, dadurch kann jedoch das Ansprechen der Virotherapie nicht isoliert betrachtet werden. Bis heute wird als Referenzstandard zur Messung der Therapieeffektivität die Tumor- oder Metastasengröße verwendet, ein Referenzstandard zur Messung der virusinduzierten intratumoralen Veränderungen während der Virotherapie ist jedoch nicht Teil der klinischen Praxis [181]. Das liegt möglicherweise daran, dass onkolytische Virotherapien immer noch neu im klinischen Bereich sind [181]. Ein Referenzstandard zur Quantifizierung von therapieinduzierter T-Zell-Aktivierung kann der Enzyme-Linked Immune Absorbent Spot (ELISpot) mittels Liquid Biopsy des Blutes darstellen [185]. Über die Messung der T-Zell-Aktivierung kann ein indirekter Nachweis auf ein positives Therapieansprechen erreicht werden [185]. Laut Ribas et al. kann die Effektivität einer Virotherapie im klinischen Alltag auch durch Tumorbiopsien durchgeführt werden [150]. Die Ausdehnung der intratumoralen Leukozyteninfiltration gibt dabei Rückschlüsse über den Therapieerfolg [150]. Seltenerer Methoden stellen die Untersuchungen der viralen Pharmakokinetik und Pharmakodynamik dar. Beispielsweise kann nach Tumorbiopsie die Genexpression spezifischer Gene innerhalb des Tumors, die zuvor gentechnisch in das Virus eingeführt wurden, untersucht werden [180]. Letztere Methoden sind jedoch kostenaufwändig und werden daher seltener in der klinischen Praxis verwendet [181]. Nicht-invasive Verfahren zum Monitoring einer Virotherapie sind in der Literatur nur wenig beschrieben [69] und aktuell noch Teil präklinischer und klinischer Studien [181]. Die Erforschung nicht-invasiver radiologischer Methoden zur Erfassung von virotherapie-induzierten Tumorveränderungen in vivo für den klinischen Alltag sind also notwendig.

Um intratumorale Gewebeveränderungen bei einer Virotherapie des Pankreaskarzinoms schnittbildgebend zu untersuchen, braucht ein präklinisches Mausmodell besondere Eigenschaften (Kapitel 1.9.). Die bildgebende Darstellung von Therapieeffekten ist wichtig für die Erforschung der Wirksamkeit innovativer Virotherapieansätze. Bisher wurden keine präklinischen Studien mit hochauflösender 7 Tesla MRT an einem elektroporationsbasierten Pankreaskarzinommodell durchgeführt. Das von Gürlevik et al. etablierte elektroporationsbasierte PDAC-Modell ist ein neues Tumormodell, das erste vielversprechende Wachstumseigenschaften zeigt, die die bildgebende Untersuchung von Gewebeveränderungen mit MRT zulassen könnten ^[90].

2. Zielsetzung und Hypothesen

Ziel der aktuellen Studie ist die Untersuchung eines innovativen elektroporationsbasierten PDAC-Modells der Maus unter lokaler Immuntherapie mit intratumoral injiziertem onkolytischem Adenovirus (hTERT-Ad), um die therapieinduzierten Veränderungen nicht-invasiv und in vivo mit Hochfeld MRT bei 7T darzustellen und invasiv ex vivo histopathologisch zu validieren.

Hypothese 1: Das elektroporationsbasierte PDAC-Mausmodell entwickelt singuläre und umschrieben demarkierte Tumore in situ, die ähnlich der menschlichen Pathophysiologie des PDAC eine intratumorale onkolytische Virustherapie methodisch erlauben.

Hypothese 2: Die lokale Immuntherapie mit dem onkolytischen Virus hTert-Ad führt zu signifikanten therapieinduzierten Veränderungen des PDAC (Zelluntergang, Entzündungsreaktion, Fibrosierung), die nicht-invasiv und in vivo mit Hochfeld MRT bei 7T dargestellt und invasiv ex vivo histopathologisch validiert werden können.

1. Material und Methoden

3.1. Mausstamm p53 fl/fl

Für die Versuche wurden insgesamt $n = 116$, 6-8 Wochen alte B6.129P2-Trp53^{TM1Brn} /J Mäuse eingeschlossen, die aus der Tierzucht des Tierlabors der Medizinischen Hochschule Hannover bezogen wurden. Bei diesem Mausstamm ist das p53-Tumorsuppressorgen upstream und downstream durch Erkennungssequenzen (so genannte loxP-sites) markiert. Kommt es zur Aktivierung einer Cre-Rekombinase, kann diese die loxP-sites erkennen und die p53-Sequenz entfernen. Dies hat den Vorteil, dass p53 erst Cre-induziert zu bestimmten Zeitpunkten ausgeschaltet werden kann^[113]. Das Gewicht der Mäuse betrug ca. 20 g. Die Tiere wurden in Gruppen zu 6 Tieren in Polycarbonat-Käfigen (Typ2-Käfig, Zoonlab, Castrop-Rauxel, Deutschland) auf Weichholzgranulat bei 22 °C und 55 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Fütterung erfolgte durch pelletierte autoklavierte Alleindiät (19 % Protein, 4 % Fett, N-freie Extraktstoffe 50,5 %, umsetzbare Energie 2859 kcal/kg; Altromin, Lage, Deutschland) und steriles Leitungswasser aus Trinkflaschen. Die in dieser Untersuchung durchgeführten Arbeiten erfolgten gemäß dem Tierschutzantrag 16/2376 (Genehmigungsbehörde: Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Derzernat 33/Tierschutz, Oldenburg).

3.2. Onkogen-Plasmidvektoren (KRAS-G12V, Akt, Cre (p53del))

Für die Induktion von Pankreaskarzinomen werden Onkogen-Plasmidvektoren verwendet (Tabelle 2), die über das operative Ansetzen einer elektrischen Spannung (= Elektroporation) in die Zellen des Pankreas integrieren. Hinter einem Promotor enthalten die Plasmide die Onkogene KRAS-G12V, Akt2 oder das Gen für eine Cre-Rekombinase und der Transposase SB13. Wird die Plasmid-Cre-Rekombinase nun exprimiert, kann es die loxP-sites des somatischen Pankreasgenoms erkennen und p53 ausschalten. Die Transposase SB13 ist dafür zuständig, die Plasmid-Onkogensequenzen herauszuschneiden. Dadurch kommt es zu einem Einbau der Onkogene in das Pankreasgenom (Elektroporationsverfahren siehe Kapitel 3.4.)

Plasmid-Bezeichnung	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von:
pT-KRAS-G12V	E. Gürlevik, veröffentlicht in Gürlevik et al., Gastroenterology 2016 ^[90] ; beinhaltet eine KRAS-Mutation
pT-myrAkt2	E. Gürlevik, veröffentlicht in Gürlevik et al., Gastroenterology 2016 ^[90] ; beinhaltet eine Akt2-Mutation
PGK-Cre	K. Rajewsky, Max-Delbrück-Centrum, Berlin; Addgene plasmid 11543; beinhaltet die Gensequenz für die Cre-Rekombinase, um p53 auszuschalten (Kapitel 3.1.)
PGK-SB13	D. A. Largaespada, University of Minnesota; beinhaltet die Gensequenz für die Transposase B13

Tabelle 2: Die Plasmidvektoren. Die Tabelle stellt die für die Elektroporation verwendeten Plasmide und ihre wichtigsten Gene sowie Mutationen dar.

3.3. Versuchsaufbau

Die Wachstumseigenschaften des EP-PDAC-Modells wurden 3 Wochen nach Elektroporation histologisch und makroskopisch überprüft (n=116). Von diesen wurden n=45 im Zuge der vorliegenden Dissertationsarbeit untersucht und die Daten von n= 71 wurden aus Vorversuchen der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Florian Kühnel (Medizinische Hochschule Hannover) bezogen (Abbildung 2). Um die Beurteilung der Modelleigenschaften auch radiologisch zu bewerten, wurden n=30 Mäuse am 21. Tag nach Elektroporation in einem 7-Tesla-Kleintier-MRT (Bruker Biospin, PHS70/16, Billerica, MA) untersucht. Die MRT-morphologischen Eigenschaften der EP-PDAC sollten mit den bildmorphologischen Charakteristika aus Veröffentlichungen zum KPC-Modell verglichen werden. Aus dieser Gruppe wurden zusätzlich insgesamt n=16 Mäuse therapiert. Davon erhielten n=8 Mäuse am 22. Tag nach Elektroporation durch intratumorale Injektion hTert-Ad (Therapiegruppe) und n=8 Mäuse eine intratumorale Injektion von NaCl (Kontrollgruppe). Von den jeweils 8 Mäusen der hTert-Ad und der Kontrollgruppe wurden 5 Mäuse 3 Tage nach Therapie (25 Tage nach Elektroporation) und 3 Mäuse 2 Tage nach Therapie (24 Tage nach Elektroporation) nochmals in einem 7T-Kleintier-MRT untersucht, um bildgebend therapieinduzierte Veränderungen (Zelluntergang, Entzündungsreaktion, Fibrosierung) darzustellen. Die Tumorprogression und das Ausmaß der therapiebedingten intratumoralen Veränderungen wurden durch manuelle MRT-Volumetrie (Horos Version 1.1.7., Hersteller: Horos project, Annapolis, MD) erhoben. Die Ergebnisse wurden ex vivo mit histologischen Untersuchungen von Entzündung (CD45-

Immunhistochemie), Gewebeuntergang (HE) und Fibrose (Pikro-Siriusrot) validiert.

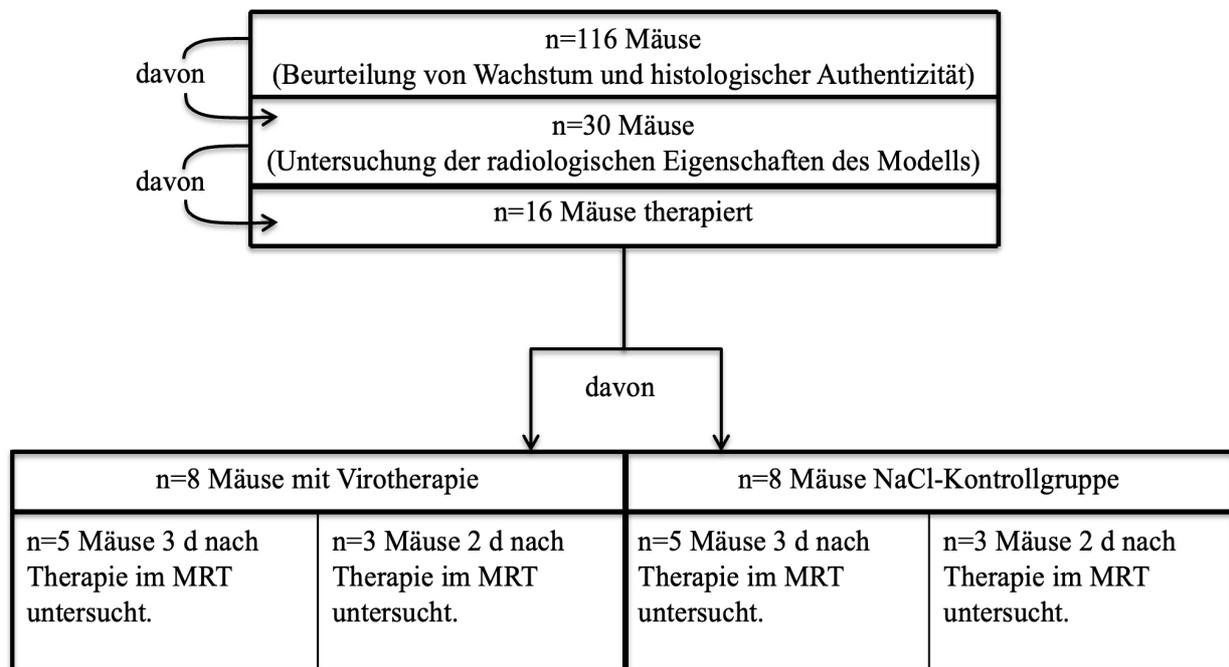


Abbildung 2: Einteilung der Versuchsgruppen. Von n=30 Mäusen, die hinsichtlich ihrer radiologischen Modelleigenschaften untersucht wurden, wurden n=16 in den Therapieversuch eingeschlossen, wobei 8 Mäuse eine Virotherapie und 8 Mäuse eine NaCl-Therapie erhielten (Kontrollgruppe).

3.4. Narkose und Onkogenplasmid-Injektion / in situ Elektroporation

Um ein Tumorwachstum zu induzieren, müssen die in Kapitel 3.2. beschriebenen Onkogenplasmid-Gene in das Pankreasgenom der p53 fl/fl-Mäuse integriert werden. Hierfür müssen die Versuchstiere vorerst narkotisiert werden. Zunächst wurde die Maus mit einer Spritze (Ketamin 100 µg pro kg KGW, Rompun® 10 mg pro kg KGW, in isotonischer NaCl Lösung) intraperitoneal narkotisiert. Bepanthen-Augensalbe wurde auf die Augen aufgetragen, um diese während der Operation vor Austrocknung und Entzündungen zu schützen. Das Versuchstier wurde vorsichtig mit Klebebandstreifen an den Extremitäten auf einem einer OP-Unterlage fixiert. Mit Reflextests an Zehen/Augenlidern und Tasthaaren wurde die Tiefe der Narkose überprüft. Es erfolgte die oberflächliche Desinfektion des Bauches durch ventrales Aufsprühen von Ethanol. Mit der chirurgischen Pinzette wurde die Bauchhaut angehoben. Der

erste oberflächliche Schnitt wurde 1 cm unterhalb des Sternums entlang der Mittellinie des Bauches (linea alba) gesetzt. Mit der stumpfen Präparationsschere wurde die Ober- von der Unterhaut getrennt. Die Ober- und Unterhaut wurde Richtung kranial an der Medianlinie 1 cm aufgeschnitten. Mit zwei Wattestäbchen wurde das Pankreas zusammen mit der Milz vorgelagert. Beim Eröffnen des Bauchraums wurde darauf geachtet, dass der GI-Trakt nicht verletzt wird.

Für die Plasmidinjektion wurde das Pankreas mit der anatomischen Pinzette vorsichtig angehoben, ohne dass das sensible Pankreasgewebe selbst verletzt wurde. Mit der 1 ml-Injektionsspritze wurde nun 1 mm tief in das Pankreasgewebe eingestochen. Durch die Injektion der Plasmide (50 µl-Ansatz aus Tabelle 3) entstand eine Injektionsblase. Die Elektroporationselektroden wurden nun um die Injektionsblase gelegt und zweimal mit 35 mV und einer Stromstärke von 100-150 mA behandelt. Die Pulsdauer betrug 35 ms und wurde in 4 Zyklen mit jeweils einer Pause von 500 ms appliziert. Die Permeabilität der Zellmembranen wurde dadurch erhöht und die negativ geladene Plasmid-DNA wurde in Kathodenrichtung gezogen. Das Resultat war die Integration der Plasmid-DNA in die Zellen des Pankreas. Wenn mit den Wattestäbchen sichergestellt war, dass durch die Elektroporation im umliegenden Gewebe keine Blutungen aufgetreten waren, wurde der Bauchraum mit destilliertem Wasser zweimal gespült. Das Wasser wurde anschließend mit Zellstofftüchern und Wattestäbchen abgetupft und möglichst vollständig entfernt. Dieser Schritt diente der Vorbeugung einer diffusen Peritonealkarzinose. Die Unterhaut wurde nun mit einer Kürschnernaht und einem dünnen 6/0-Faden verschlossen. Die Oberbauchhaut wurde mit einer U-Heftnaht und einem dickeren 4/0-Faden zugenäht. Die Fäden wurden mit einer überstehenden Länge von 4 mm abgeschnitten. Die Maus wurde schließlich seitlich unter eine Wärmelampe gelegt und bis zum Aufwachen beobachtet. Das Abdomen der Versuchstiere wurde ab der 2. Woche nach Elektroporation etwa jeden zweiten Tag palpiert. Als Zielparameter für das Tumorstadium wurde ein palpabler Tumor des Oberbauchs definiert.

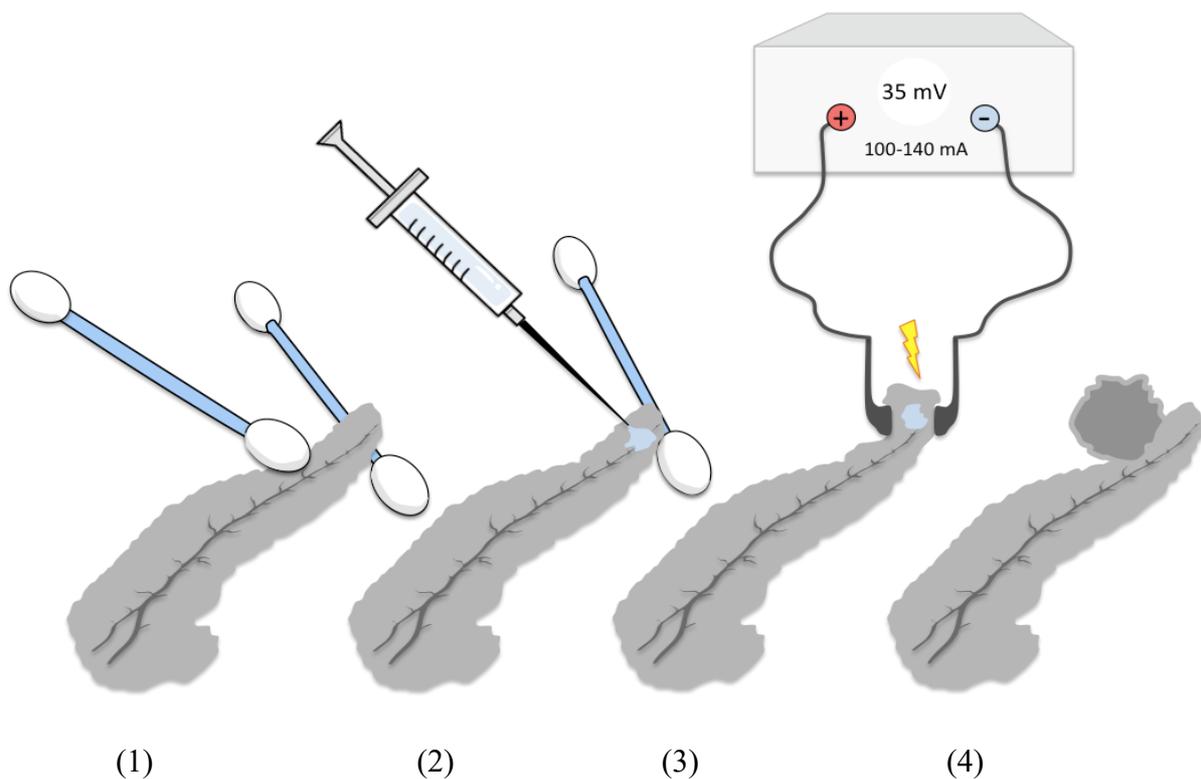


Abbildung 4: Das Elektroporationsverfahren. (1): Vorlagerung des Pankreas mit 2 Wattestäbchen. (2): Stabilisierung des Pankreas mit einem Wattestäbchen und simultane Injektion der Plasmide. (3): Anlegen der Elektroden um die Injektionsblase und Elektroporation des Gewebes. (4): Unilokuläres PDAC nach etwa 3 Wochen.

Menge	Plasmidbezeichnung
8 µg	pT-KRAS-G12D
8 µg	pT-myrAkt2
4 µg	PKG-Cre
4 µg	PKG-SB13
ad 50 µl	TE 8,0

Tabelle 3: Plasmidansatz für die in situ Elektroporation zur PDAC Induktion. Die Plasmide wurden zum oben beschriebenen Verhältnis gemischt. Aus diesem Plasmidansatz wurden für jede Maus 50 µl zur Elektroporation verwendet.

3.5. MRT-Protokoll

Die Untersuchungen wurden in einem 7 Tesla Kleintier MRT (Pharmascan 70/16AS, Bruker Biospin, Ettlingen, Deutschland) durchgeführt. Die Versuchstiere erhielten eine

Inhalationsnarkose mit 1,5–2,0 % Isofluran (Forene, Abbot, Wiesbaden, Deutschland) unter Maskenbeatmung mit O₂ (0,6 l/min) und Überwachung von Respiration und Körpertemperatur (Bio Trig System, Sa Instruments, Inc., Stony Brook, NY). Axiale und koronare T2-gewichtete MSME Sequenzen (TR/TE = 1238/11, FOV = 25,6 × 25,5 mm, 0,5 mm Schichtdicke) wurden 1 Tag vor Therapie mit hTert-Ad oder NaCl und 2 Tage sowie 3 Tage nach Therapie durchgeführt (Abbildung 3).

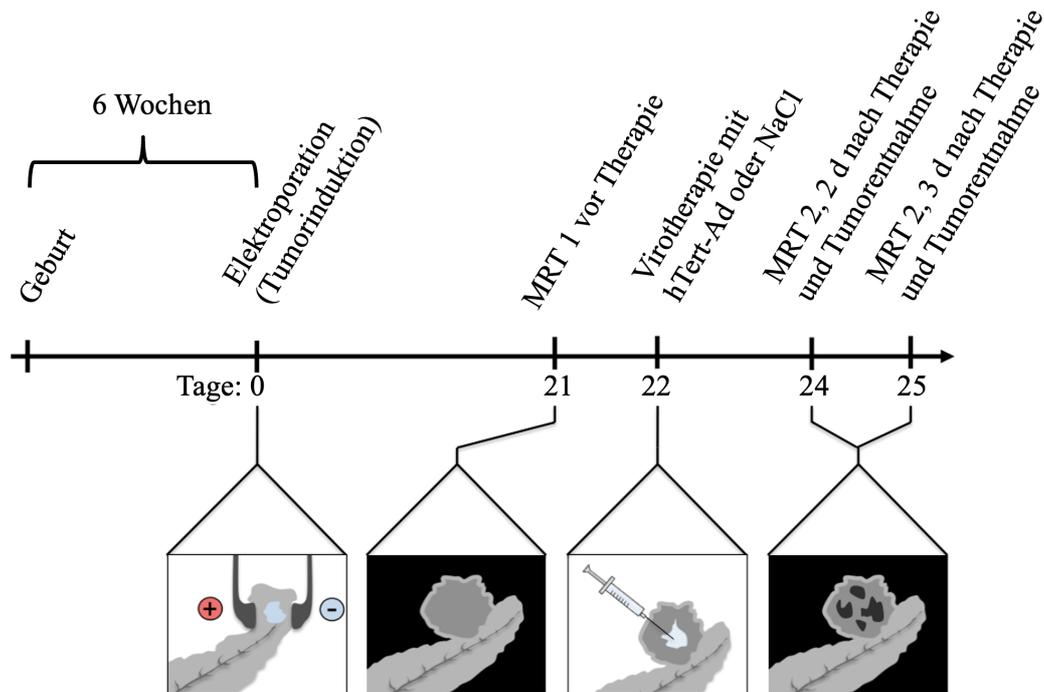


Abbildung 3: Zeitflussdiagramm des Versuchsaufbaus. 21 Tage nach Elektroporation (EP) wurden die Versuchstiere prätherapeutisch im MRT untersucht (MRT 1; n=16). Am 22. Tag erfolgte die Therapie mit hTert-Ad oder NaCl. Die MRT-Untersuchung nach Therapie (MRT 2) erfolgte entweder am 24. Tag post-EP (2 Tage nach Therapie, n=6) oder am 25. Tag post-EP (3 Tage nach Therapie, n=10).

3.6. Untersuchung der Eigenschaften und Komplikationen des EP-PDAC-Mausmodells

Zunächst wurde untersucht, ob das innovative elektroporationsbasierte PDAC-Mausmodell singuläre und umschrieben demarkierte orthotope Tumore entwickelt, die ähnlich der menschlichen Pathophysiologie des PDAC eine intratumorale onkolytische Virustherapie methodisch erlauben. Bei n=116 Mäusen wurde ab der zweiten Woche nach Elektroporation untersucht, ob ein Tumor deutlich palpabel war, um die Synchronizität des EP-PDAC-Modells

zu überprüfen. In T2-gewichteten Sequenzen (n=30) und histopathologisch (n=116) wurde untersucht, ob das EP-PDAC ähnlich zum humanen PDAC unilokulär und histologisch differenziert sowie bildmorphologisch mit homogener Binnenstruktur wächst. Als Zielparame-ter für den Differenzierungsgrad wurde histologisch der intratumorale Nachweis von Drüsenstrukturen definiert. Dabei wurden die Grade in G1 (gut differenziert), G2 (mäßig differenziert), G3 (schlecht differenziert) und G4 (nicht differenziert) unterteilt. Als Zielparame-ter für ein unilokuläres Wachstum wurden ein einzelner Tumorknoten definiert, der makroskopisch nach Explantation festgestellt werden sollte. Als Zielparame-ter für homogenes Wachstum im MRT wurde qualitativ und visuell eine homogene Verteilung von MR-Signalintensitäten festgelegt. Eine visuell fleckige Binnenstruktur wurde qualitativ als inhomogen charakterisiert. Mit T2-gewichteter Hochfeld MRT bei 7T wurde außerdem überprüft, ob sich der Tumor visuell umschrieben demarkiert präsentiert (n=30). Als Zielparame-ter für die Demarkation wurde eine MRT-morphologisch scharfe Darstellung der Tumorränder definiert. Bei infiltrativ wachsenden Tumoren wurde der Tumor als umschrieben demarkiert charakterisiert, wenn er nur an Stelle der Organinfiltration unscharf, und sonst im Wesentlichen scharf abgrenzbar war. Die Untersuchung der Abgrenzbarkeit erfolgte unter Einbeziehung unterschiedlicher Tumorgrößen. Hierfür wurden 4 Größengruppen bestimmt, in die die gesamte Versuchskohorte (n=116) eingeteilt wurde (n=22 mit bis 2 mm, n=30 mit 2-4 mm, n=31 mit 4-6 mm, n=33 mit 6-10 mm). Anschließend wurden die Größen der Tumoren in Relation zur Zeit (in Tage) graphisch festgehalten und eine Wachstumskurve aus den Daten rekonstruiert. Die Zeitpunkte wurden dabei zufällig zwischen dem 19. und dem 35. Tag nach Elektroporation gewählt und die Größen ex vivo (n=100) oder zum Zeitpunkt der Virotherapie (nach Eröffnen des Situs, vor Injektion bei n=16) makroskopisch mit Lineal gemessen und quantifiziert. MRT-morphologische Eigenschaften (Homogenität, unilokuläres Wachstum) der EP-PDAC sollten zudem mit den bildmorphologischen Charakteristika aus Veröffentlichungen zum KPC-Modell verglichen werden. Alle Versuchstiere (n=116) wurden hinsichtlich tumorassoziierter Komplikationen (invasives Wachstum, Ileus, intraparenchymale Blutungen, Peritonitis und Entzündung) in Relation zu genannten Größengruppen mit dem Ziel untersucht, ob das Verteilungsmuster der Komplikationen beim EP-PDAC Modell der humanen Pathophysiologie entspricht. Komplikationen wie Blutungen, Ileus, invasives Wachstum und Peritonitis wurden makroskopisch, histologisch und MRT-morphologisch untersucht. Auf Basis dieser Ergebnisse wurde eine geeignete Tumorgröße definiert, die zwar groß genug für eine injektionsbasierte Virotherapie ist, aber möglichst wenige Komplikationen aufweist, sodass das Versuchstier den Eingriff der Virotherapie möglichst gut toleriert. Im ersten MRT

detektierte Komplikationen wie Blutungen oder Peritonitis wurden daher als Ausschlusskriterium für eine Therapie festgelegt. Zum Zeitpunkt der Euthanasie wurden alle Versuchstiere histologisch und visuell makroskopisch in Bezug auf Metastasierung untersucht. Organe mit derben tumorösen Knötchen wurden histologisch begutachtet. Als Zielparameter für die Metastasierung wurde der histopathologische Nachweis der Metastase definiert.

3.7 Etablierung einer intratumoralen (IT) Virustherapie mit hTert-Ad und die NaCl-Kontrollgruppe

Für die direkte IT-Virotherapie wurde ein geeignetes Operationsverfahren etabliert. Die Narkose, Lagerung und Desinfektion des Operationsbereichs entsprach dem Vorgehen des Elektroporationsverfahrens (Kap. 3.4). Sämtliche Schritte wurden unter Sicherheitsstufe 2 (S2) durchgeführt. Mit der chirurgischen Pinzette wurde die Bauchhaut angehoben. Der erste Schnitt erfolgte entlang der Operationsnarbe der Elektroporation, bei der Ober- als auch Unterhaut vollständig durchtrennt wurden, ohne die vorherige Schnittlänge von 1 cm zu überschreiten. Mit einem Wattestäbchen wurde das Pankreas mit dem Adenokarzinom zusammen mit der Milz vorgelagert.

Für die intratumorale Virusinjektion wurde der Tumor vorsichtig mit einem Wattestäbchen in Position gehalten. Mit der Injektionspritze wurde bis in das Zentrum des Primärtumors eingestochen, in besonders solide, bindegewebshaltige und makroskopisch gräulich-weiße Anteile des Tumors, die geringer perfundiert wurden. Somit konnten Blutungen vermeiden werden. Es wurden intratumoral insgesamt 30 µl hTert-Ad (1×10^8 infectious units/ifu) appliziert (das hTert-Adenovirus wurde freundlicherweise von der AG Kühnel, Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie, Medizinische Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt). Um keine intratumoralen Drucknekrosen zu verursachen, wurde die Injektion mit einer Geschwindigkeit von ca. 10 µl pro Minute durchgeführt, indem die Injektionsinjektionsgeschwindigkeit anhand der in µl angegebenen Beschriftung der Spritze in Abhängigkeit zur Zeit gemessen wurde. Die letzten 10 µl hTert-Ad wurden simultan beim Herausziehen der Nadel in den Stichkanal appliziert. Ein Herausfließen des Virus aus dem Stichkanal wurde verhindert, indem die Punktionsstelle direkt nach Herausziehen der Nadel, für 5 min unter leichtem Druck mit dem Wattestäbchen abgedeckt wurden. Bei der Kontrollgruppe wurde ebenso verfahren wie bei der hTert-Ad-Therapiegruppe, wobei mit einer

Geschwindigkeit von 10 μl pro Minute 30 μl isotope NaCl-Lösung in das Zentrum des Tumors appliziert wurde.

Anschließend konnte mit einem frischen Wattestäbchen sichergestellt werden, dass durch die Operation im umliegenden Gewebe keine Blutungen aufgetreten waren. Die Unter- und Oberhaut wurde nun äquivalent zur Naht des Elektroporationsverfahrens verschlossen und die Maus bis zum Aufwachen unter eine Wärmelampe gelegt.

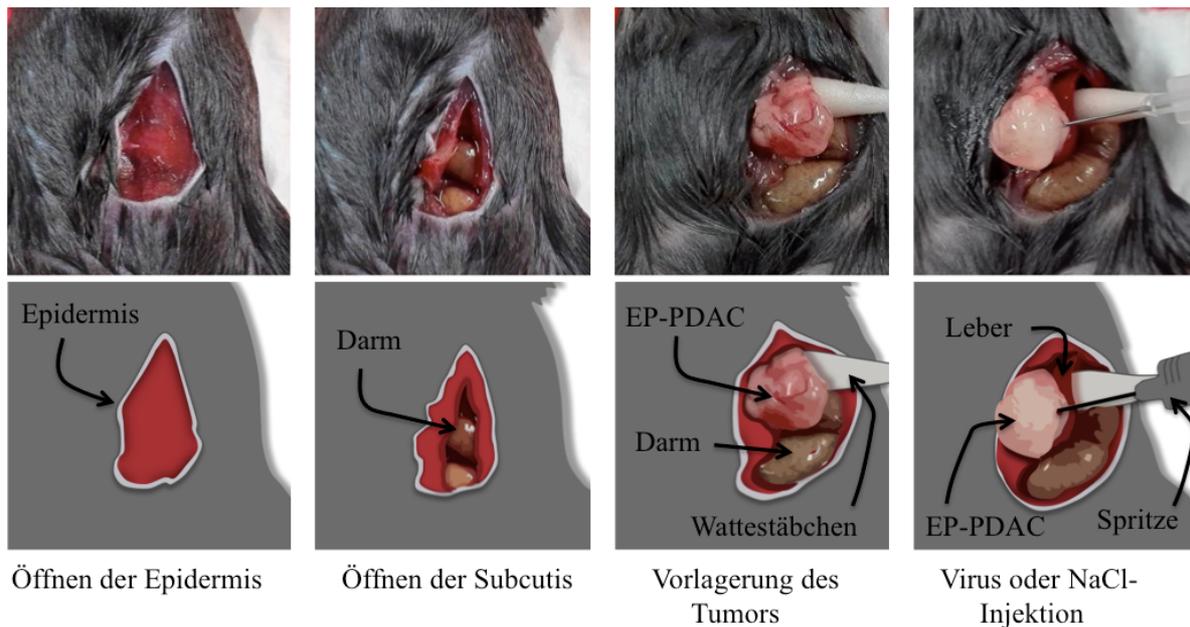


Abbildung 5: Intratumorale Virotherapie. Dargestellt sind die Schritte der intratumoralen Virotherapie. Nach Vorlagerung des EP-PDAC mittels Wattestäbchen wird hTert-Ad (oder NaCl in der Kontrollgruppe) mit einer Spritze injiziert.

3.8. Tumorentnahme nach Therapie

Direkt im Anschluss an die posttherapeutischen MRT-Untersuchungen am 2. bzw 3. Tag nach Therapie wurde die Tumorentnahme durchgeführt. Die Versuchstiere wurden wieder mit einer Spritze intraperitoneal narkotisiert (Ketamin 100 μg pro kg KGW, Rompun $\text{\textcircled{R}}$ 10 mg pro kg KGW, in isotonischer NaCl Lösung). Anschließend wurden die Tiere per zervikaler Dislokation euthanasiert und auf einem Styroporbrett fixiert. Die Unter- und Oberhaut wurde entlang der Narbe geöffnet. Um ein möglichst exaktes Alignment von histologischen und MRT-Schnittbildern zu erreichen, wurden die Körperachsen der Maus als Kreuz mit einem Filzstift

auf dem Tumor markiert. Aufgrund häufiger Verwachsungen mit der Milz wurde der markierte Tumor anschließend gemeinsam mit der Milz entfernt. Später konnte der Tumor dann in Richtung der Körperachse in Paraffin eingebettet werden. Als Zielparameter für ein erfolgreiches Alignment wurde das visuell formgerechte Übereinanderlegen von histopathologischer und MR-morphologischer Schnittfläche definiert (Abbildung 6).

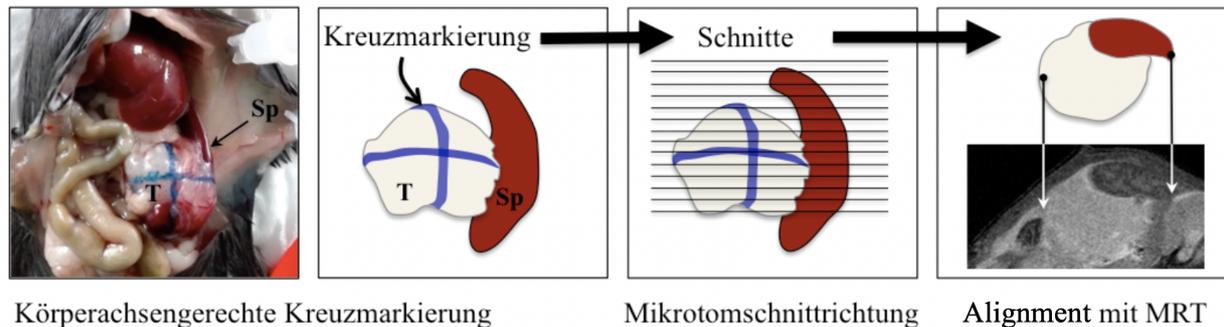


Abbildung 6: Methodik der Tumorentnahme mit Kreuzmarkierungen. Diese ermöglicht eine körperachsengerechte Schnittführung des Mikrotoms und somit ein Alignment mit den MRT Bildern (T = Tumor, Sp = Milz).

Bezeichnung	Hersteller (ggf. Modellnummer); Stadt; Land oder Staat
15 ml Röhrchen	Sarstedt; Nürnbrecht; Deutschland
50 ml Röhrchen	Sarstedt; Nürnbrecht; Deutschland
4/0 Faden	Ethicon Mersilene; Lidingö; Schweden
6/0 Faden	Ethicon Mersilene; Lidingö; Sweden
Anatomische Pinzette	InstrumenteNRW; Erfstadt; Deutschland
Bepanthen-Augensalbe	Bayer Vital GmbH; Leverkusen; Deutschland
Chirurgischen Pinzette	InstrumenteNRW; Erfstadt; Deutschland
Elektroporator	Square Wave Elektroporator (CUY21SC); Nepagene; Chiba; Japan
Elektrokauter	Erbe (ICC 50); Tübingen; Deutschland
Ethanol	J.T. Baker; Philippsburg; NJ
Isotonischer NaCl-Lösung	Braun; Kronberg im Taunus; Deutschland
Ketamin	Albrecht; Aulendorf; Deutschland
Rompun ®	Bayer AG; Leverkusen; Deutschland
Spritze 1ml	Braun; Kronberg im Taunus; Deutschland

Stumpfe Präparationsschere	Reliance Medical; Talke; England
Wattestäbchen	Heinz Herenz Medizinalbedarf; Hamburg; Deutschland
Zellstofftücher	Kimtech; Neenah; WI

Tabelle 4: Materialliste für die Operationen (Elektroporation, Virusinjektion, Tumorentnahme)

3.9. Volumetrische Messungen in der MRT

Virusinduzierte Signalveränderungen der Virotherapiegruppen wurden in T2-gewichteten Sequenzen am 2. Tag und 3. Tag post EP mit manueller MRT-Volumetrie mit dem Programm Horos (Version 1.1.7., Hersteller: Horos project, Annapolis, MD) gemessen. Als Zielparameter für Signalveränderungen wurde eine von den EP-PDAC-Signalwerten abweichende intratumorale Signalintensität in T2-Wichtung definiert, die in jeder Schnittebene manuell im Programm als region-of-interest (ROI) markiert wurden. Aus der Summe der umkreisten ROI konnte das Programm das Volumen der Signalintensitäten errechnen und dreidimensional darstellen. Waren mehrere Regionen innerhalb eines Tumors betroffen, wurden diese einzeln als ROI markiert und die separaten Volumina zum Schluss zusammengerechnet. Die Volumina der signalveränderten Regionen wurden in Relation zum Gesamttumorgewebe gesetzt und mit Hilfe eines Balkendiagrammes dargestellt, um das therapeutische Ansprechen zu bewerten.

3.10. Histopathologie

Histopathologische Aufarbeitungen wurden anschließend durchgeführt. Wie beschrieben wurden durch ein exaktes Alignment die histopathologischen Therapieeffekte den bildmorphologischen MRT-Signalveränderungen zugeordnet. Die Zielparameter von histopathologischen Therapieeffekten waren Zelluntergang und Detrituseinlagerungen (Zelluntergangsüberreste) in der HE-Färbung, Immuzellinfiltration in der immunhistochemischen Färbung und Kollagenentwicklungen in der Picro-Siriusrot-Färbung.

3.10.1. Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

In dieser Färbung wurden die Zellkerne durch die Hämalaun-Lösung blau, das Zytoplasma, Proteine und Kollagen durch die Eosin-Lösung rot gefärbt. Zelluntergang und Detrituseinlagerungen lassen sich in dieser Färbung schwach rot darstellen. Das zu untersuchende Gewebe wurde nach Entnahme bei 4°C für 24 Stunden in 4 % PFA (Paraformaldehyd) inkubiert. Die Körperachsen der Maus wurden zuvor auf die Adenokarzinome gezeichnet. Der Tumor konnte entsprechend der Körperachse in die Paraffin-Einbettkassette gelegt werden. Die eingelegten Gewebe wurden kurz unter destilliertem Wasser gespült und schließlich in Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom wurden Schnitte von 2 µm Dicke angefertigt und auf der Oberfläche eines Wasserbads ausgebreitet. Nachdem das Gewebe aus dem Wasser auf einen Objektträger gezogen wurde, folgte die Entparaffinierung und Entwässerung. Der Objektträger wurde in Xylol, dann in Ethanol und anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 96 %, 70 %, 40 %) entwässert. Die Färbung erfolgte für 30 s in Hämalaun- und 2 min in Eosin-Lösung. Nach den Färbungen wurde der Objektträger jeweils unter lauwarmem, destilliertem Wasser gespült. Die Entwässerung des Gewebeschnitts erfolgte in aufsteigender Alkoholreihe (40 %, 70 %, 96 %, 100 %) sowie für 5 min in Xylol. Nach Entwässerung wurde ein Tropfen Entellan auf das Gewebe geträufelt, um dieses mit einem Deckglas zu fixieren.

3.10.2. Immunhistochemie (CD45/ H-Färbung)

Bei dieser Färbung wurden CD45-positive Zellen (Leukozyten) durch den CD45-Antikörper (CD 45.2) und sekundären Antikörper (biotin anti rat) in Verbindung mit dem DAB-Farbstoff (3,3'-Diaminobenzidin) braun, und alle Zellkerne durch die Hämalaun-Lösung blau gefärbt. Somit konnten Immuneinfiltrationen braun dargestellt werden. Nach den Schritten der Entparaffinierung wurde das Gewebe mit Objektträger für 20 min gekocht (96 °C, pH 6,0 retrieval solution) und anschließend auf 80 °C abgekühlt. Nun wurde der Objektträger aus dem 80°C warmen Wasser entnommen und für 10 min in H₂O₂ -Lösung eingelegt. Der nächste Schritt war das Waschen für 2 x 5 min mit Phosphate- Buffered Saline/Tween (PBST). Über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (CD 45.2) in 5 % donkey serum. Die Isotypkontrolle inkubierte über Nacht ohne Primärantikörper, nur mit 5 % donkey serum. Am nächsten Tag wurde 2 x 5 min mit PBST gespült und der zweite Antkörper (biotin anti rat) für

1 h mit 5 % donkey serum bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde für 30 min in Streptavidin-HRP (Histostain- plus Streptavidin-Peroxidase) eingelegt und abermals 2 x 5 min mit PBST gespült. Nun erfolgte die Färbung mit DAB für 1 min. Der Färbvorgang wurde unter einer H₂O-Spülung gestoppt. Als letzter Färbungsschritt wurde der Objektträger für 30 s in Hämalaun gelegt und schließlich unter lauwarmem destilliertem Wasser gespült. Zur Fixierung wurde Faramount auf das Gewebe getropft und mit einem Menzel-Deckglas abgedeckt.

3.10.3. Picro-Siriusrot-Färbung

Bei dieser Färbung wurden Kollagenfasern rot gefärbt, Muskelfasern und Zytoplasma gelb, um unter dem Polarisationsmikroskop mit rotem Filter die Kollagenfasern selektiv darzustellen. Die Entparaffinierung und Entwässerung erfolgte wie bereits beschrieben. Die Färbung erfolgte für 60 min mit Picro-Siriusrot 0,1 % (0,1 g Picro-Siriusrot-Farbstoff in 100 ml Pikrinsäure gelöst). Anschließend wurde mit HCl (0,01 N) gespült und mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (100 %- , 70 %- , 80 %- , 96 %-Ethanol, Xylol) entwässert. Mit Entellan und einem Menzel-Deckglas wurde das gefärbte Gewebe fixiert.

Bezeichnung	Hersteller (ggf. Modellnummer); Stadt; Land
DAB Substrate Kit	Zytomed (DAB530) Berlin; Deutschland
Donkey serum	Jackson Immuno Research; West Grove, PA
Einbetter	Leica (TP1020); Wetzlar; Deutschland
Einbettkassetten	Medite GmbH; Burgdorf; Deutschland
Entellan	Merck; Darmstadt; Deutschland
Eosin-Lösung	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO
Ethanol	J.T. Baker; Phillipsburg; NJ
Faramount	Agilent; Santa Carla, C
H ₂ O ₂	Bernd Kraft; Oberhausen; Deutschland
Hämalaun-Lösung	Merck; Darmstadt; Deutschland
Inkubator	GFL Gesellschaft für Labortechnik (GFL20022); Burgwedel; Deutschland
Lichtmikroskop	Leica (DM4000B); Wetzlar; Deutschland
Menzel-Deckgläser	Thermo Scientific; Waltham, MA
Mikrotom	GMI Inc. (HM335-E); Ramsey, MN
Objektträger	Thermo Scientific; Waltham, MA
Paraffin	Medite GmbH; Burgdorf; Deutschland
PBST (Phosphate-Buffered Saline/Tween)	Sigma-Aldrich; St. Louis; MO

PFA (Paraformaldehyd)	Merck; Darmstadt; Deutschland
Picro-Siriusrot-Farbstoff	Abcam; Cambridge; United Kingdom
1,3% wässrige Pikrinsäure	Sigma-Aldrich; St. Louis; MO
Polarisationsmikroskop	Leica (Aperio CS2); Wetzlar; Deutschland
Primärantikörper: CD 45.2 Ak	Abcam (ab25386); Cambridge; United Kingdom
Retrieval solution pH 6	Dako (1699); Santa Clara; CA
Sekundärantikörper: biotin anti rat	GIBCO life technologies (A10517); Waltham; MA
Streptavidin-HRP	GIBCO life technologies (50420Z); Waltham; MA
Wasserbad (Electrothermal Paraffin Section Mounting Bath)	Bibby Scientific (MH8516); Stone; United Kingdom
Xylol	Merck; Darmstadt; Deutschland
HCl	Merck; Darmstadt; Deutschland

Tabelle 5: Die Materialliste für die histopathologischen Untersuchungen

3.11. Prozentuale Auswertung der Komplikationen

Um für die Therapie eine Tumorgröße zu wählen, die groß genug ist, damit sie eine intratumorale Virusinjektion methodisch zulässt aber möglichst wenig Komplikationen aufweist, wurden die Komplikationen im Zusammenhang mit 4 Größengruppen untersucht (n=22 mit bis 2mm, n=30 mit 2-4mm, n= 31 mit 4-6mm, n= 33 mit 6-10mm). Dafür wurden die Inzidenzen der Komplikationen (Blutungen, Aszites, Ileus, invasives Wachstum) in jeder Größengruppe prozentuell errechnet. Die prozentuale Auswertung erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel (Version 15.52, Microsoft, Redmond, WA). Die Ergebnisse wurden anschließend graphisch in einem Balkendiagramm dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1. Tumorwachstum und die MRT-morphologische Darstellung des EP-PDAC im Vergleich mit dem KPC-Modell

Zwischen dem 19. und 35. Tag nach Elektroporation konnte in allen n=116 Mäusen ein deutlich palpabler Tumor festgestellt werden. Die T2-gewichteten MRT-Untersuchungen (n=30) und die histopathologischen Untersuchung (n=116) zeigten in allen Mäusen das singuläre Wachstum eines Primärtumors mit homogener morphologischer Binnenstruktur. Das Tumorgewebe lässt sich dadurch im EP-PDAC-Modell MR-morphologisch deutlicher vom gesunden Gewebe abgrenzen als es im multifokal-inhomogen wachsenden KPC-Modell möglich ist (Abbildung 7), sodass sich auch die Größenprogression des Primärtumors sehr gut darstellen lässt.

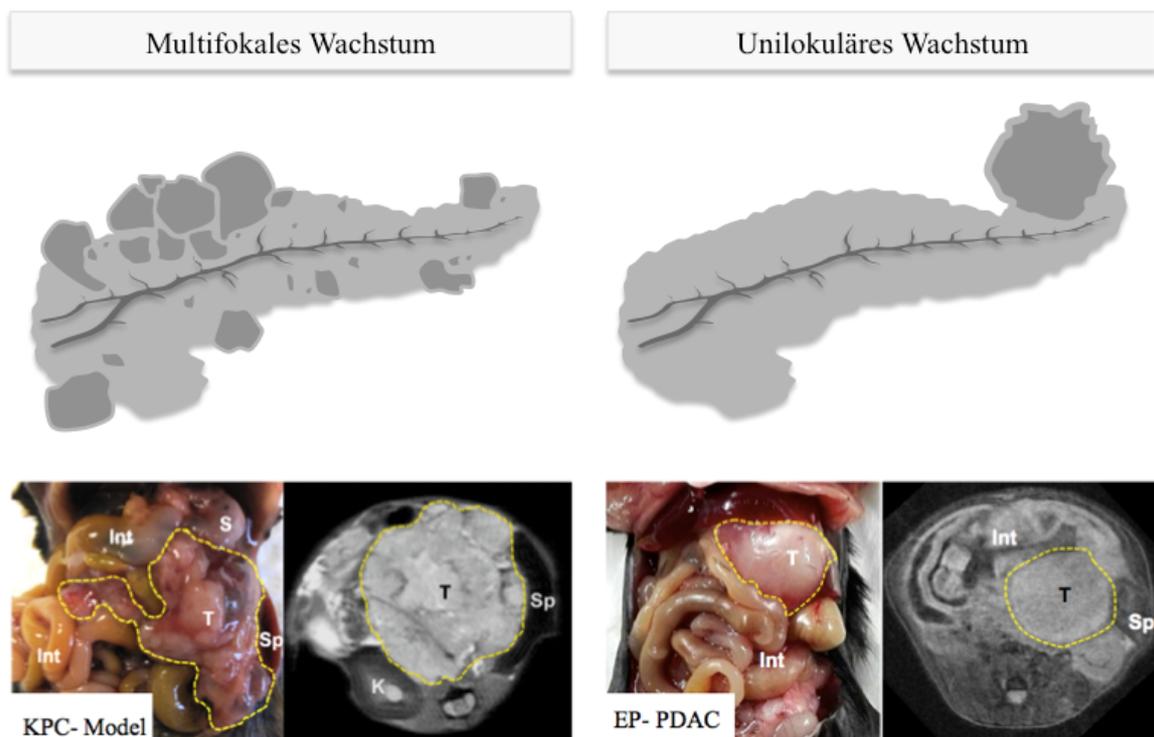


Abbildung 7: KPC vs. EP-PDAC-Modell. Die gelb-gestrichelte Linie markiert den Tumor. Links: Makroskopische und T2-gewichtete MRT-morphologische Darstellung eines KPC-Modells mit multifokal-inhomogenem Wachstum ^[89]. Rechts: Das EP-PDAC mit singulärem, MR-morphologisch homogenem Wachstum (MRT jeweils mit T2w Sequenz).

Die Abgrenzung des EP-PDAC war bereits ab 1 mm Durchmesser bis zu 10 mm möglich, wobei die Binnenstruktur des Tumors bei Progression homogen blieb (Abbildung 8 B). Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Größengruppe und Zeitpunkt ergab ein starkes Wachstum zwischen dem 18. und dem 23. Tag nach Elektroporation. Weiter fortgeschrittene Tumore schienen hingegen langsamer zu wachsen, sodass die Steigung des Graphen in Abbildung 8A im Verlauf abnimmt.

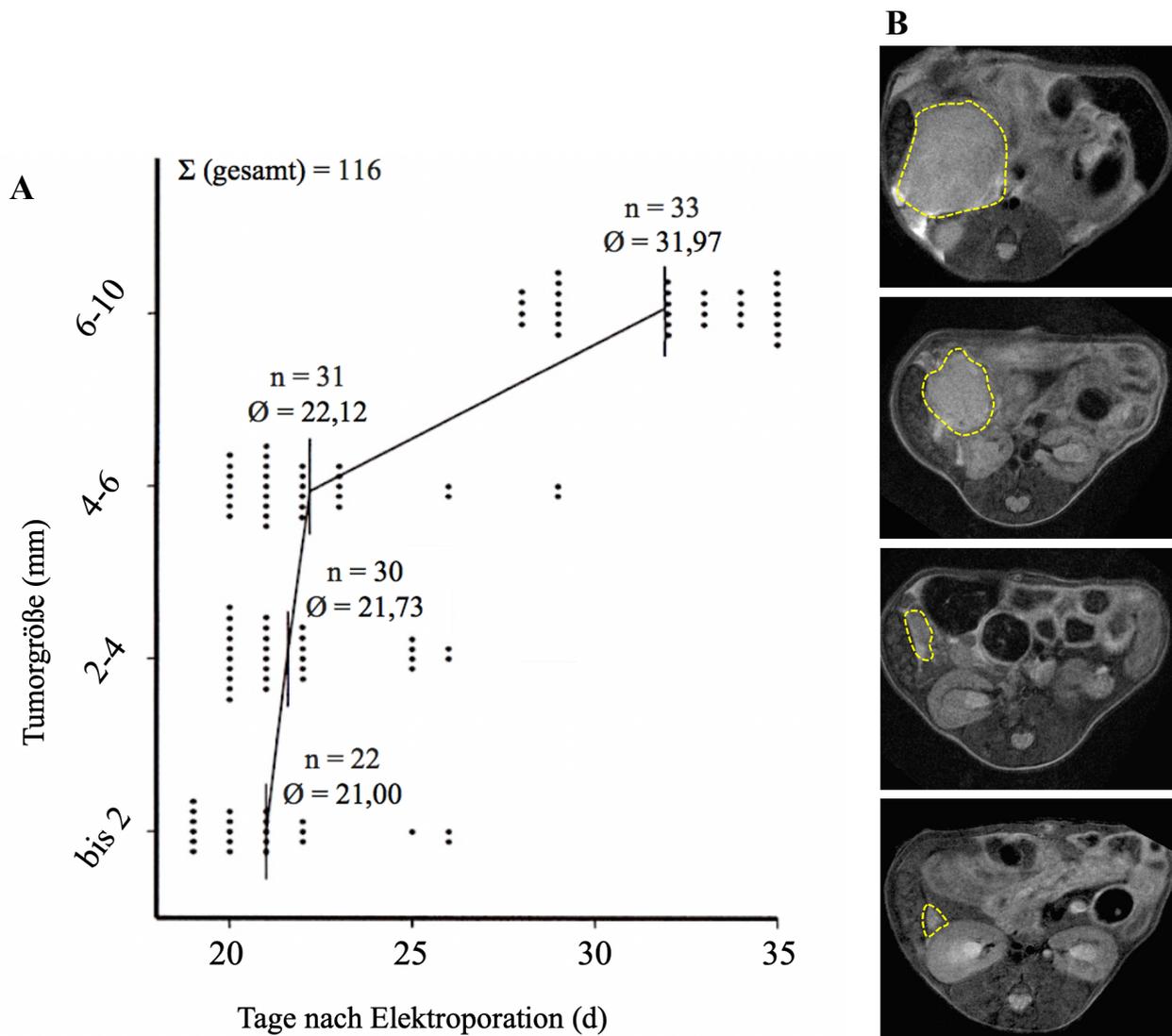


Abbildung 8: A: Die durchschnittlichen Zeitpunkte der 4 Größengruppen wurden graphisch verbunden. Somit konnte eine Wachstumskurve rekonstruiert werden. Das Wachstum wurde langsamer bei größeren Tumoren. Auf der rechten Seite (B) ist für jede Größengruppe beispielhaft ein EP-PDAC in T2-gewichteter Sequenz im MRT abgebildet. Unterschiedliche Tumorgrößen waren gut abgrenzbar.

4.2. Tumorassoziierte Komplikationen

Makroskopische, histologische und bildgebende Untersuchungen des EP-PDAC konnten organ-infiltrierendes Wachstum (n=26/116; 22 %), einen mechanischen Ileus (n=8/116; 7 %), intraparenchymale gedeckte Hämatome (n=44/116; 38 %) sowie Peritonealkarzinose mit Peritonitis und Aszites (n=14/116; 12 %) feststellen. Die MRT-morphologische Darstellung der Tumordinfiltration in Darm, Nieren, Magen, Leber und Milz konnte ex vivo histopathologisch validiert werden (Abbildung 9).

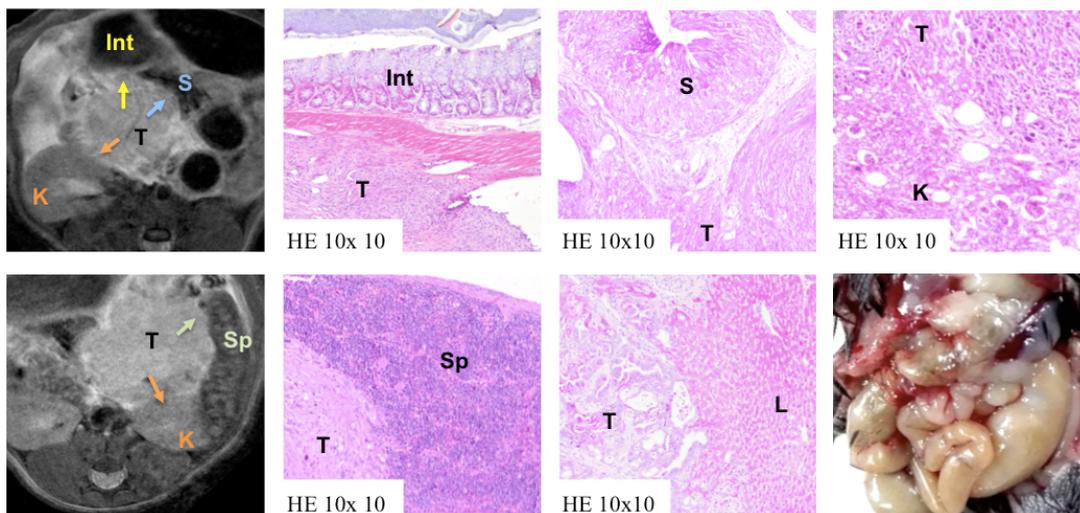


Abbildung 9: Infiltration des Tumors (T) in K= Niere, Int= Darm, L= Leber, Sp= Milz, S= Magen. Unten rechts: Makroskopischer Befund des infiltrativen Wachstums. Links: T2-gewichtete MRT-Sequenzen.

Ein metastatischer Befall des Bauchfells (Peritonealkarzinose) mit Peritonitis sowie intraabdominelle Einblutungen entwickelten bei allen Versuchstieren klinisch einen fulminanten Verlauf. Daher konnte bei Nachweis dieser Komplikationen im MRT (Abbildung 10) keine Virotherapie angeschlossen werden. Die Peritonealkarzinose und Peritonitis konnten bildgebend durch ödematös verdickte Darmschlingen, ein insgesamt T2-hyperintenses Intestinum und Aszites festgestellt werden. Makroskopisch äußerten sie sich durch eine deutliche Erweiterung des abdominalen Umfangs und Organentfärbungen. Hypointense, gedeckte Parenchymeinblutungen bildeten sich überwiegend in der Tumorperipherie. Charakteristischerweise dehnten sich die gedeckten Hämatome dabei zirkulär aus. Stark

geblähte Darmschlingen ergaben den Verdacht auf einen durch invasives Wachstum entstandenen mechanischen Ileus.

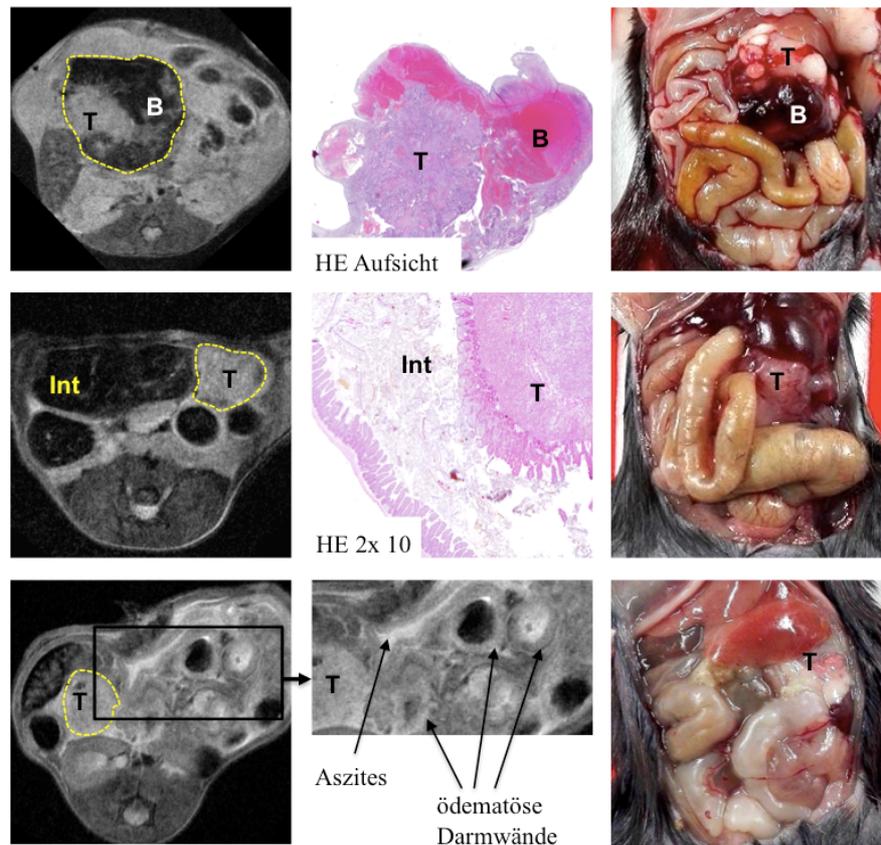


Abbildung 10: Obere Reihe: Zirkulär um den Tumor (T) gedecktes Hämatom (B). Mittlere Reihe: Ileus mit geblähten Darmschlingen (Int); untere Reihe: Peritonitis/Aszites mit makroskopisch ödembedingter Entfärbung der Organe. Links: T2-gewichtete MRT-Sequenzen.

Die Untersuchung der Tumorgöße in Relation zur Komplikationsrate zeigte, dass sich 4-6 mm große EP-PDAC (n=12/31; 38 % komplikationsfrei) für das Projektvorhaben am besten eigneten (Abbildung 11). Große Tumoren mit 6 bis 10 mm Durchmesser waren nur zu 33 % (n=12/33) komplikationsfrei. Tumore mit bis zu 2 mm oder 2-4 mm Durchmesser bedeuteten zwar eine wesentlich höhere Zahl komplikationsfreier Versuchstiere (n=20/22; 90 % respektive n=17/30; 57 %), die Tumorgöße war jedoch zu klein, um die Injektion von 30 µl zu ermöglichen.

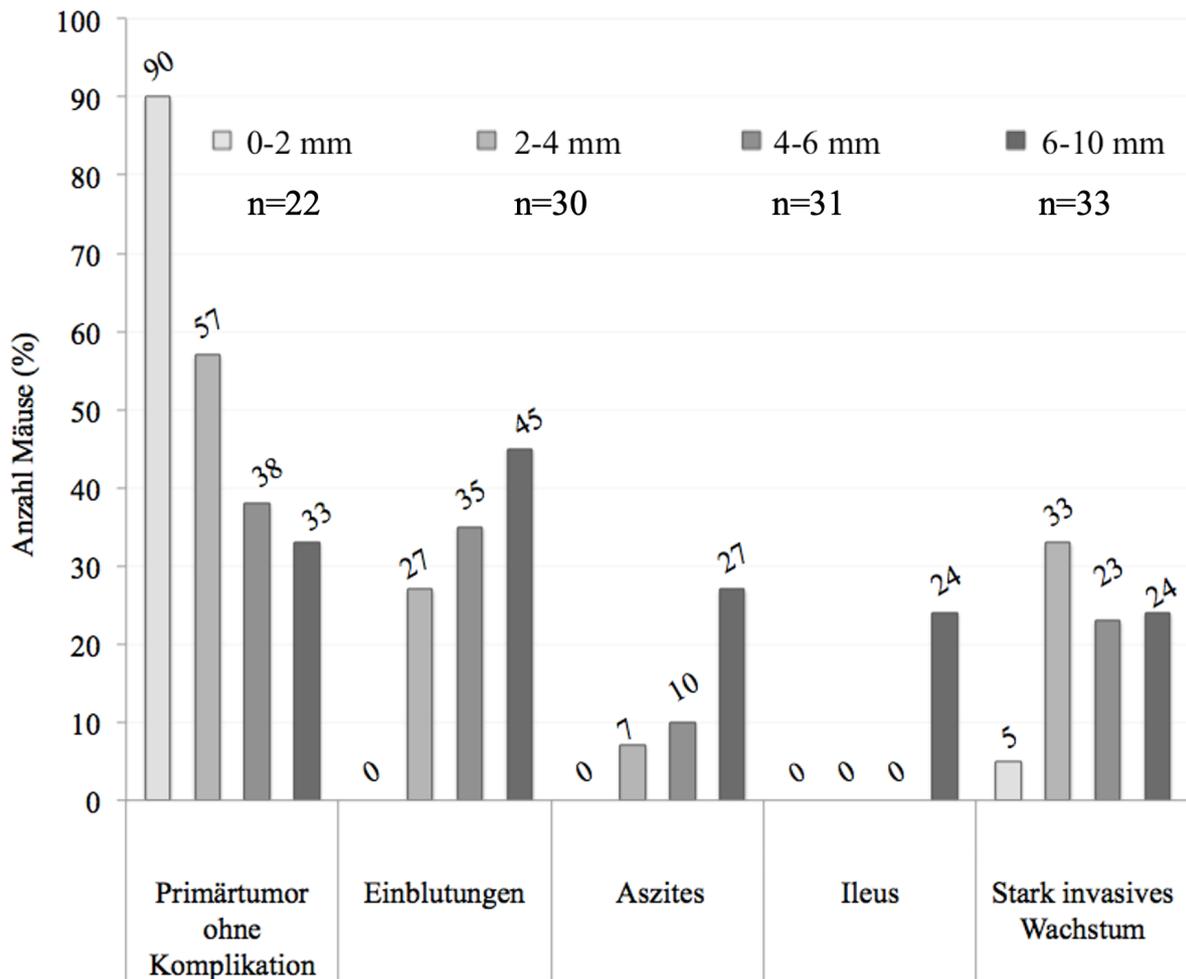


Abbildung 11: Prozentuale Auswertung der tumorabhängigen Komplikationen in Relation zur Tumorgöße. Je größer der Tumor, um so weniger Mäuse waren in der prozentualen Auswertung komplikationsfrei. Bei größeren Tumoren waren die Inzidenzen von Einblutungen, Aszites und Ileus höher. Die höchste Inzidenz invasiven Wachstums zeigte sich jedoch bei 2-4mm großen und nicht bei 6-10mm großen EP-PDAC.

Fernmetastasen konnten histologisch und makroskopisch in Leber, Lunge, Lymphknoten und Peritoneum nachgewiesen werden. Auf Organen mit direktem Tumorkontakt (Leber, Darm, Magen) konnten Kontaktmetastasen gefunden werden.

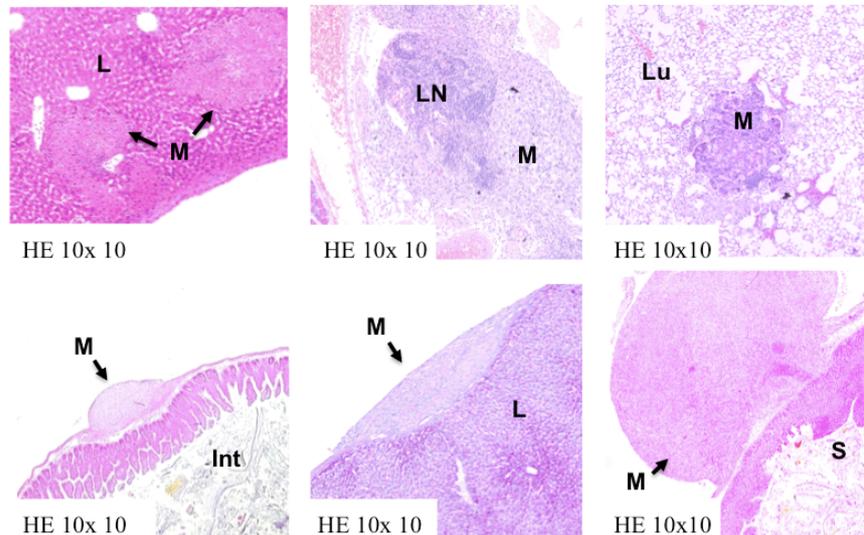


Abbildung 12: Metastasierung (M). Obere Reihe von links nach rechts: Fernmetastasen in der Leber (L), Fernmetastase im Lymphknoten (LN) und in der Lunge (Lu). Untere Reihe: Kontaktmetastase auf dem Darm (Int), auf der Leber (L) und auf dem Magen (S).

4.3. MR-tomographische Untersuchung der adenoviralen Therapie des elektroporationsinduzierten Pankreas-Adenokarzinoms

4.3.1. MR-tomographische Untersuchung der Tumore 2 Tage nach Therapie

2 Tage nach intratumoraler hTert-Adenovirus-Injektion konnten in allen (n=3) EP-PDAC MR-tomographisch mit T2-gewichteten Sequenzen hyperintense Areale im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Diese Areale konnten MR-volumetrisch ausgemessen werden (Abbildung 13A; rotes Areal, volumetrische Auswertung Kapitel 3.4.4.). Um diese Areale stellte sich das intakte Tumorgewebe homogen dar.

Die Kontrollgruppe wurde mit isotoner NaCl-Lösung behandelt. 2 Tage nach NaCl-Injektion konnten keine signifikanten hyperintensiven T2-Signalveränderungen festgestellt werden (n=3).

Die Tumorbinnenstruktur zeigte sich in Vor- und Nachuntersuchungen MR-tomographisch in T2-Wichtung homogen. Die ex vivo histologische Aufarbeitung der hyperintensiven Signalveränderungen wird in Kapitel 4.4. behandelt.

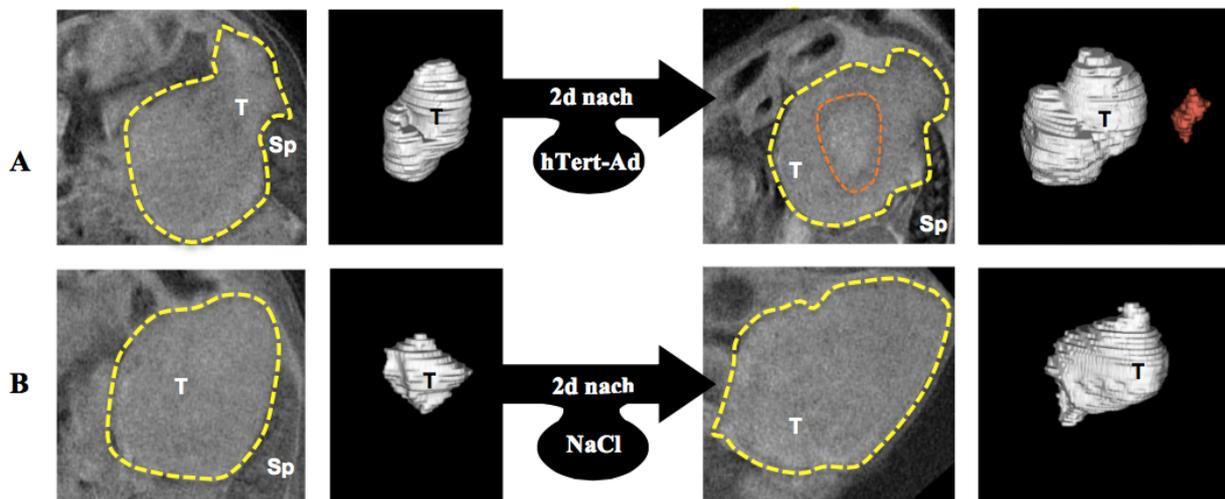


Abbildung 13: Die T2-gewichtete MRT und Volumetrie 1 Tag vor und 2 Tage nach hTert-Ad-Virusinjektion (Reihe A) zeigten im Gegensatz zur NaCl-Injektion (Reihe B) hyperintense Signalveränderungen (rot markiert). Beide Versuchsgruppen präsentierten sich 1 Tag vor Therapie mit homogener Binnenstruktur. Die NaCl-Kontrollgruppe blieb auch 2 Tage nach Therapie mit homogener Binnenstruktur.

4.3.2. MR-tomographische Untersuchungen 3 Tage nach Therapie

3 Tage nach hTert-Ad-Therapie konnten in T2-Wichtung MR-morphologisch hypointense Areale (n=5) festgestellt werden. Die Gesamterscheinung des Tumors war im Vergleich zur Voruntersuchung insgesamt inhomogener mit multiplen, diffus lokalisierten, signalarmen Arealen (Abbildung 14A). 3 Tage nach NaCl-Injektion (n=5) konnten keine signifikanten Signalveränderungen festgestellt werden (Abbildung 14B). Die Tumorbinnenstruktur zeigte sich bei Vor- und Nachuntersuchungen in T2-gewichteter Sequenz MR-tomographisch homogen. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei den in Abbildung 14A dargestellten Veränderungen um injektionsinduzierte Drucknekrosen handelte. Die ex-vivo histologische Aufarbeitung der hypointensen T2- Signalveränderungen werden in Kapitel 4.4. behandelt.

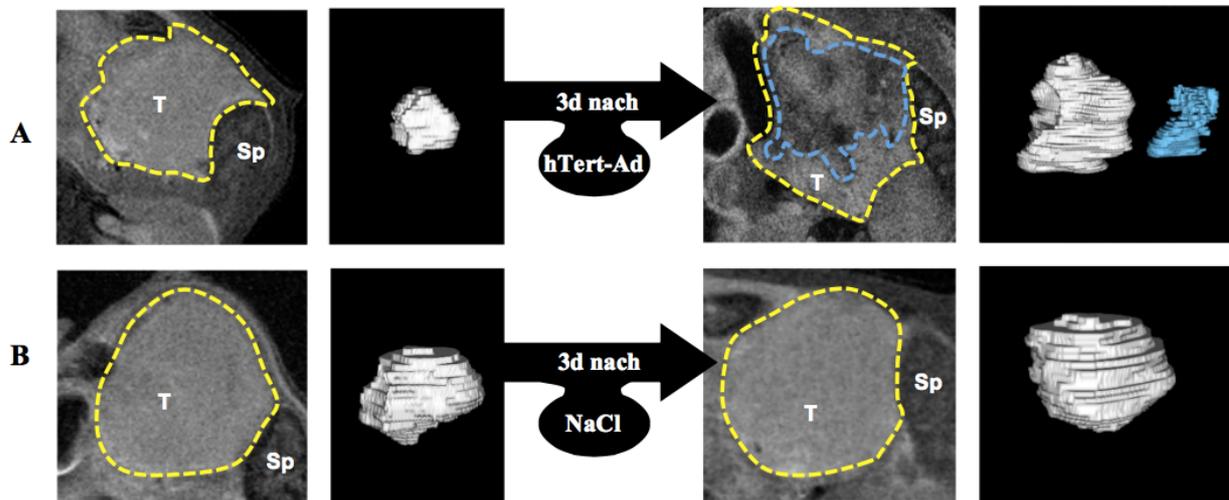


Abbildung 14: T2-gewichtete MRT und Volumetrie 1 Tag vor und 3 Tage nach hTert-Ad-Virusinjektion (Reihe A) mit diffusen hypointensen Arealen und 3 Tage nach NaCl-Injektion (Reihe B) mit homogener Darstellung (blau markiertes Areal= hypointense Signalveränderungen).

4.3.3. Volumetrische Messungen der posttherapeutischen Signalveränderungen

Die T2-gewichteten hyperintensiven Areale 2 Tage nach Virotherapie in n=3 Versuchstieren ergaben einen Gesamtanteil von durchschnittlich 11,6 % des gesamten Tumolvolumens. Die Erfassung der hypointensen Gebiete 3 Tage nach Virotherapie (n=5 Versuchstiere) ergaben einen maximalen Anteil von 25 % (Abbildung 15). Der durchschnittliche Anteil dieser Gebiete betrug 18,4 %.

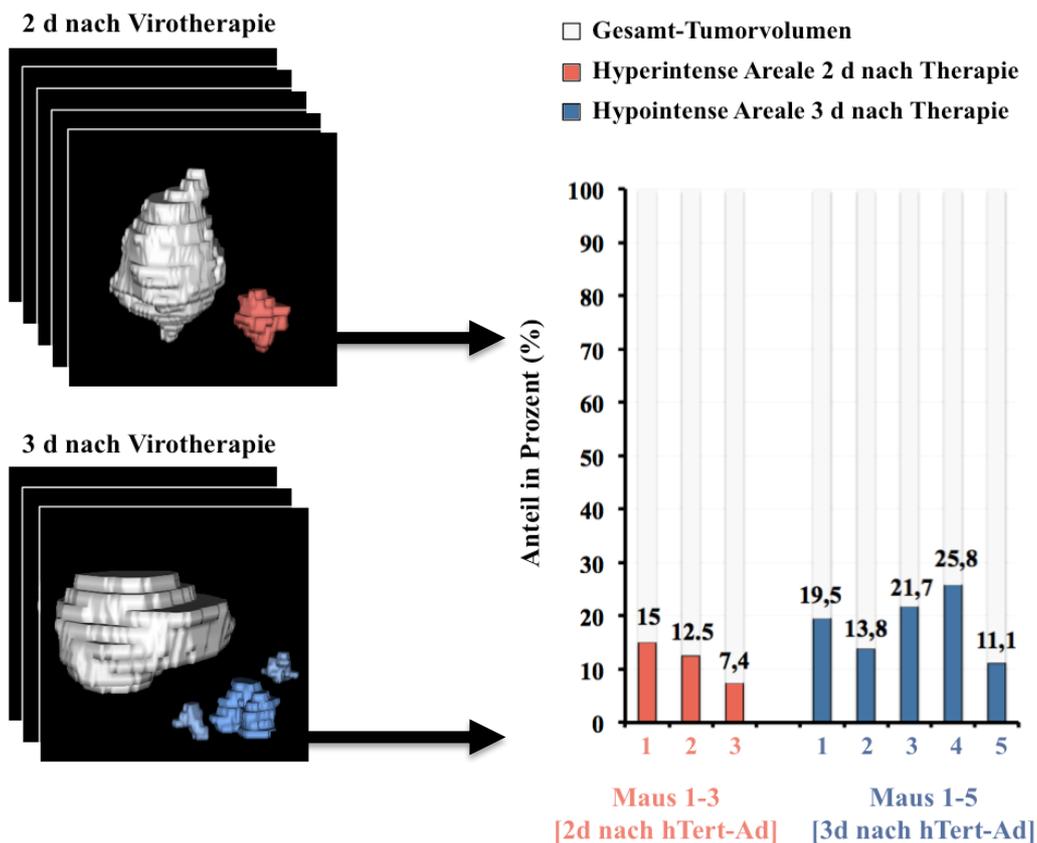


Abbildung 15: Prozentuale Auswertung der T2-gewichteten Signalveränderungen zum noch intakten Tumorgewebe mit manueller Volumetrie. Die roten Balken stellen die rot markierten T2-hyperintensiven Areale 2 Tage nach Therapie (n=3 Versuchstiere) und die blauen die T2-hypointensiven Gebiete 3 Tage nach Therapie (n=5 Versuchstiere) im Verhältnis zum Gesamttumorvolumen dar.

4.4. Histopathologische Untersuchungen

4.4.1. HE- und immunhistochemische Färbungen

Das Alignment T2-gewichtet hyperintensiver Areale mit histopathologischen Schnittbildern ergab 2 Tage nach hTert-Ad Injektion in HE-Färbung eine großflächige, ödematöse Gewebeauflockerung in zentralen Tumorregionen (Abbildung 16 A1: Vergrößerung 2x 10). In höherer Vergrößerung waren jedoch alle Zellen intakt. Zelluntergang oder Detritus konnte nicht dargestellt werden (Abbildung 16 A1: Vergrößerung 10x10). Zugleich zeigten CD45/H-Färbungen in zentralen Regionen sichtbare Immunzellinfiltrationen (Abbildung 16 A2). Die Kontrollgruppe zeigte histopathologisch keine injektionsinduzierten Alterationen 2 Tage nach

NaCl-Injektion. Das EP-PDAC zeigt sich zellulär differenziert und authentisch gegenüber dem humanen PDAC mit vereinzelt Ausführungsgängen mit den Differenzierungsgraden G1-G3 (Tabelle 6) und überwiegend bindegewebigem Stroma (Abbildung 16 B1). Immunhistochemisch konnten keine Immuzellinfiltrationen festgestellt werden. An den Tumorrändern konnten wenige lymphatische Zellen festgestellt werden, die jedoch nicht tief ins Tumoriinnere vordringen konnten (Abbildung 16 B2). In der Kontrollgruppe zeigt sich somit lediglich eine typische periphere adaptive Immunreaktion gegen den Tumor und bei zusätzlicher Virotherapie konnten Immunzellen bis ins Tumoriinnere vordringen.

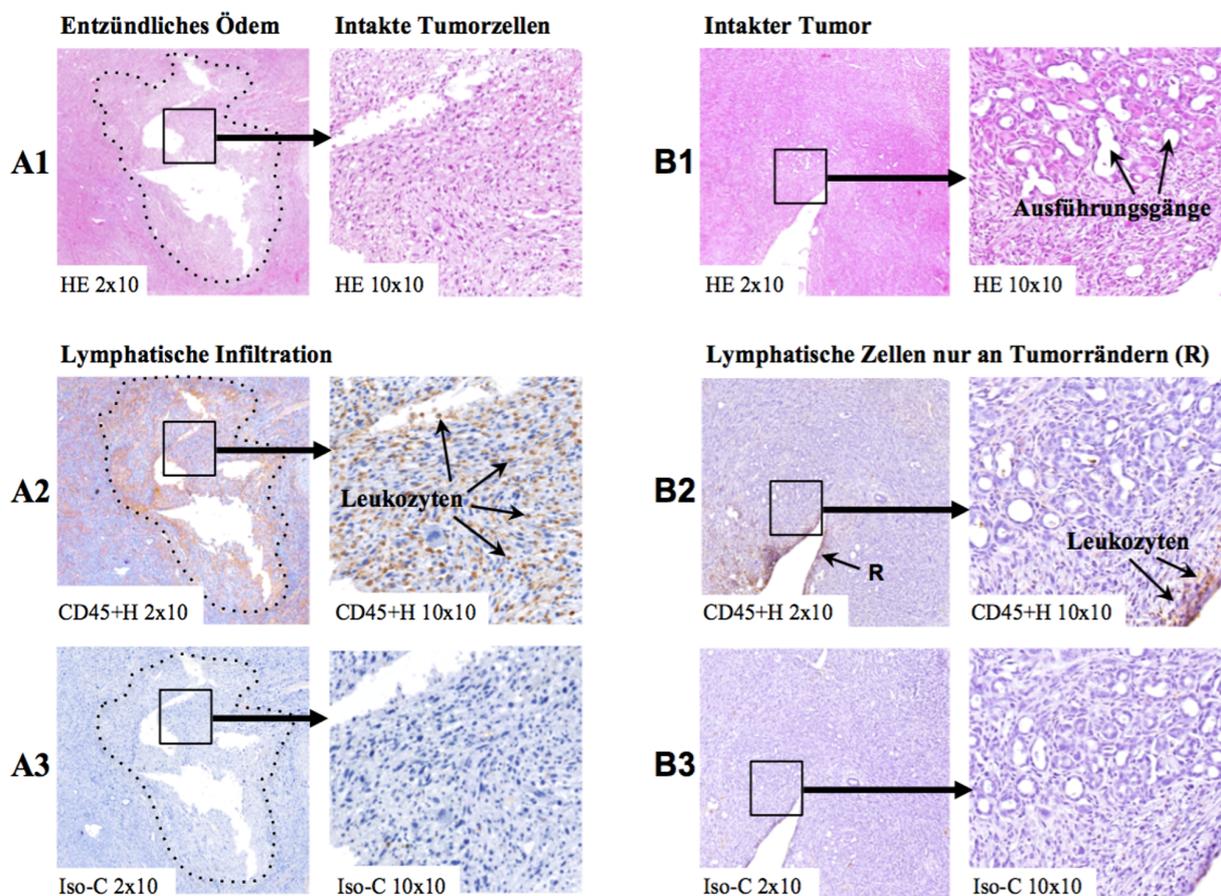


Abbildung 16: Histopathologie der Virus-Therapiegruppe (A) vs. NaCl-Therapiegruppe (B) 2 Tage nach intratumoraler Applikation. Es zeigt sich im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe ein zentral ödematös-aufgelockertes Gewebe (A1) und zentral eine starke Immuzellinfiltration (A2). In der Kontrollgruppe (B) war der Tumor intakt und es konnten nur peripher einzelne Leukozyten gefunden werden (B2). Die Kontrollen ohne Primärantikörper (untere Reihen) validieren die Färbung der Leukozyten in Bild A2 und B2. Bei den HE-Färbungen 3 Tage nach hTert-Ad-Therapie zeigten sich Tumorareale mit lytischem Zelluntergang und zellulären

Zerfallsprodukten (= Detritus, Abbildung 17 A1). Diese Detritus-Areale waren klar abgrenzbar und präsentierten sich diffus verteilt.

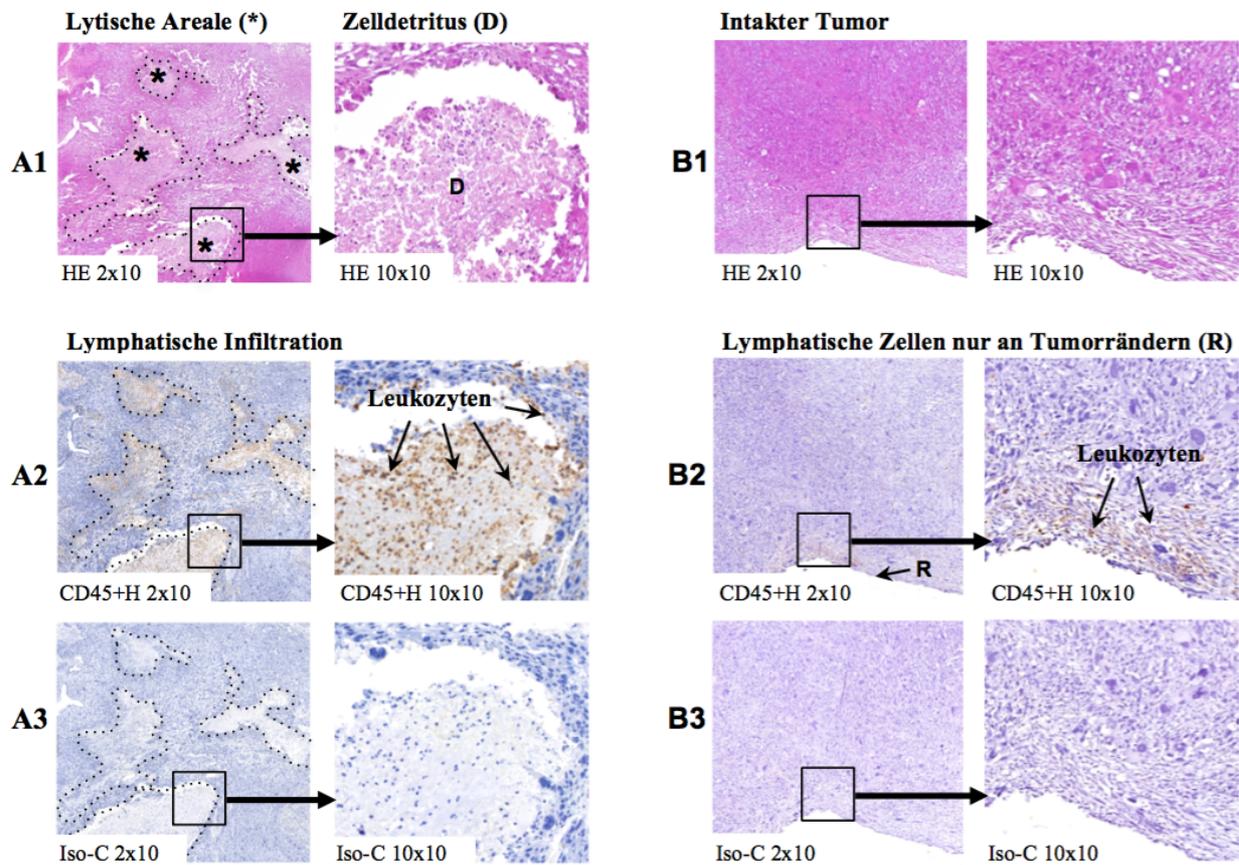


Abbildung 17: Histopathologie der Virus-Therapiegruppe (A) vs. NaCl-Therapiegruppe (B) 3 Tage nach intratumoraler Applikation. 3 Tage nach Virotherapie zeigen sich fleckige Gebiete mit Zelluntergang (Detritus=D: A1). In diesen Gebieten wurden starke Immunzellinfiltrationen festgestellt (A2). In der Kontrollgruppe (B) war der Tumor intakt und es konnten nur peripher einzelne Leukozyten gefunden werden (B2). Die Kontrollen ohne Primärantikörper (untere Reihen) validieren die Färbung der Leukozyten in Bild A2 und B2.

Die Zelluntergangsareale ließen das Tumorgewebe in niedriger Vergrößerung fleckig erscheinen, da sie im Vergleich zum intakten Tumorgewebe nur schwach gefärbt wurden (Abbildung 17 A1: Vergrößerung 2 x 10). Die CD45+H Färbungen dieser lytischen Zentren präsentierten intensive Immunzellinfiltrationen innerhalb der Detritusablagerungen (Abbildung 17 A2). Die starke Akkumulation infiltrierender Immunzellen wird bereits in niedriger Vergrößerung durch die braune Färbung der CD35-positiven Immunzellen sichtbar. Die

lytischen Areale zeigen sich im Vergleich zum umliegenden blau gefärbten Gewebe bräunlich (Abbildung 17 A2: CD45/H 2x 10). In höherer Vergrößerung konnten die einzelnen braun gefärbten Immunzellen identifiziert werden (Abbildung 17 A2: CD45/H 10x 10). Die NaCl-Kontrollgruppe zeigte histopathologisch 3 Tage nach Injektion keine Alterationen. Immunhistochemisch konnten keine Immunzellinfiltrationen festgestellt werden. Ebenso wie in der Kontrollgruppe 2 Tage nach Injektion, zeigte sich das EP-PDAC mit Drüsenstrukturen differenziert mit Differenzierungsgraden G1-G3 (Tabelle 6) und mit umgebend ausgeprägtem Bindegewebe histopathologisch authentisch gegenüber dem humanen PDAC (Abbildung 16 B1 und 17 B1). Auch 3 Tage nach NaCl-Injektion konnten lymphatische Zellen im Bereich der Tumorränder festgestellt werden, die nicht tief ins Tumorrinnere migrieren konnten (Abbildung 17 B2). Die Braunfärbungen der Lymphozyten wurden in allen Versuchsgruppen durch die Isotypkontrollen validiert (Abbildung 16 und 17 A3 und B3).

4.4.2. Polarisationsmikroskopische Untersuchung der virusinduzierten Kollagenentwicklung mit Picro-Siriusrot-Färbung

Um ausschließlich die rot gefärbten Kollagenfasern gefiltert darzustellen, und somit die virusinduzierte Fibrose zu verdeutlichen, wurden die Picro-Siriusrot-gefärbten Schnitte polarisationsmikroskopisch unter rotem Filter untersucht. Kollagenfasern konnten folglich weiß auf schwarzem Hintergrund dargestellt werden.

Untersuchungen des Bindegewebes und der Fibrose mit Picro-Siriusrot-Färbung zeigten weder Kollagenentwicklungen 2 Tage nach Virusinjektion (n=3, Abbildung 18 A1), noch nach NaCl-Injektion (n=3, Abbildung A2). 3 Tage nach hTert-Ad Therapie wurden in allen Versuchstieren (n=5) starke Kollagenfasern detektiert (Abbildung B1), nicht jedoch bei der NaCl-Kontrollgruppe (n=5, Abbildung B2). Diese konnten vermehrt im Zentrum des Tumors und am Rand der lytischen Areale festgestellt werden. Die Tumore aller Versuchsgruppen zeigten einen schmalen Kollagensaum am Tumorrand.

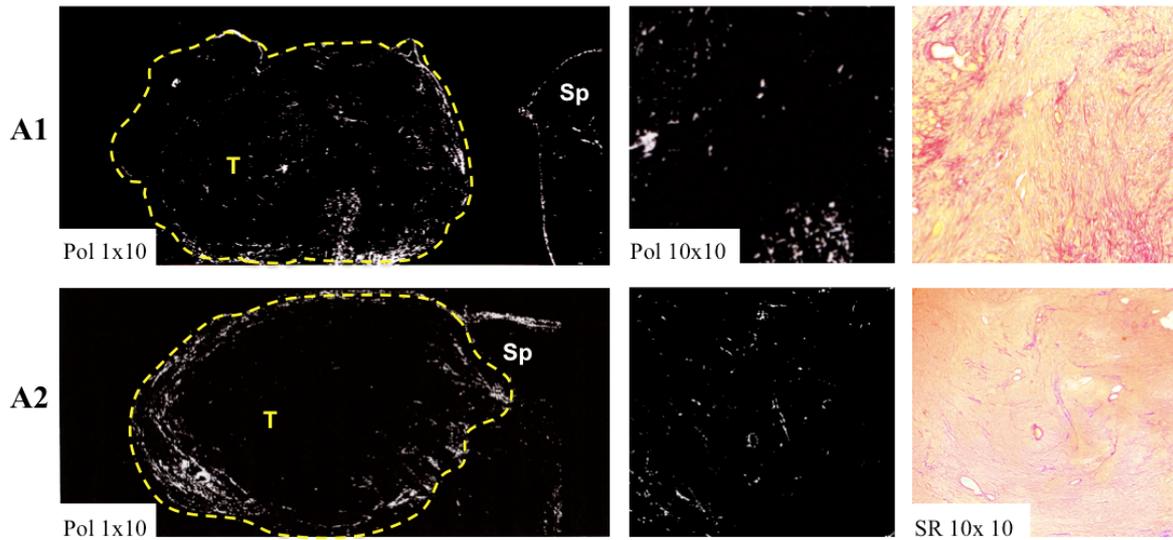


Abbildung 18A: A1: 2d nach hTert-Ad; A2: 2d nach NaCl. Weder in der Kontrollgruppe noch 2 Tage nach hTert-Ad-Therapie waren zentrale starke Kollagenentwicklungen sichtbar (Pol= Polarisationsmikroskopie, SR= Picro-Siriusrot Färbung).

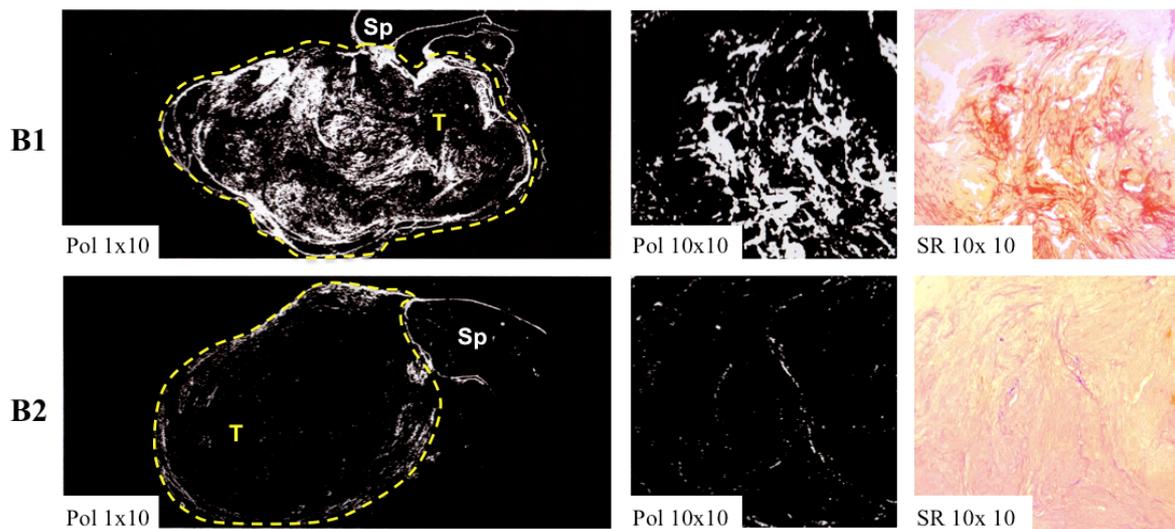


Abbildung 18B: Vermehrte Kollagenentwicklung in der Therapiegruppe. B1: 3d nach hTert-Ad; B2: 3d nach NaCl. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten sich zentral 3 Tage nach Therapie starke Kollagenentwicklungen (A1: polarisationsmikroskopisch weiß, mit SR-Färbung rot dargestellt; Pol= Polarisationsmikroskopie, SR= Picro-Siriusrot Färbung).

4.5. Auswertung der Therapiegruppen in tabellarischer Form

Versuchstier und Behandlung	D	Diff	M	VZ	Inf	Per	II	Inv	B	Fib
Maus 1 3d post hTert-Ad	8mm	G2	Leber	Z 3	Z 3	Ø	Ø	Ø	Ø	Z 3
Maus 2 3d post hTert-Ad	1cm	G2	Leber	Z 3	Z 3 R 1	Ø	Ø	Ø	Ø	Z 3
Maus 3 3d post hTert-Ad	7mm	G1	Ø	Z 2	Z 2 R 1	Ø	Ø	Ø	Ø	Z 2
Maus 4 3d post hTert-Ad	1cm	G2	Magen (Kontakt- metastase)	Z & P 3	Z 3 R 1	Ø	Ø	Ø	Ø	Z 2
Maus 5 3d post hTert-Ad	1cm	G2	Leber Lunge Lymph- knoten	Z 3	Z 3 R 1	Ø	✓	Leber Niere Peritoneum Darm Milz	Ø	Z 3
Maus 1 3d post NaCl	1cm	G2	Leber	Ø	Ø	Ø	✓	Peritoneum Darm	Ø	Ø
Maus 2 3d post NaCl	7mm	G3	Leber (Kontakt- metastase)	Ø	R 1	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Maus 3 3d post NaCl	8mm	G2	Darm (Kontakt- metastase)	Ø	R 1	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Maus 4 3d post NaCl	8mm	G1	Leber	Ø	R 1	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Maus 5 3d post NaCl	1cm	G1	Leber	Ø	R 1	Ø	✓	Ø	Ø	Ø
Maus 1 2d post hTert-Ad	7mm	G2	Leber Lunge Lymph- knoten	keine, ZA	Z 2 R 1	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Maus 2 2d post hTert-Ad	1cm	G1	Leber	keine, ZA	Z 3 R 1	Ø	Ø	Magen Peritoneum	Ø	Ø
Maus 1 2d post NaCl	1cm	G1	Leber (Kontakt- metastase)	keine, ZA	R 1	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Maus 2 2d post NaCl	1cm	G2	Ø	keine, ZA	Ø	Ø	Ø	Leber Darm Milz	Ø	Ø
Maus 3 2d post NaCl	6mm	G1	Ø	keine, ZA	R 1	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

Tabelle 6: Therapiegruppen und ihre Auswertung in tabellarischer Form: D= Durchmesser bei Tumorentnahme, Diff= Differenzierungsgrad, M= Metastasierung, VZ= virusinduzierter Zelluntergang, Inf= Immuzellinfiltration, Per= Peritonitis, I= Ileus, Inv= Invasives Wachstum

in folgende Organe, B= Blutungen (Ausschlusskriterium), Fib= Intratumorale Fibrose, Ø = nicht nachweisbar, ✓ =nachweisbar, Z= zentral, P=peripher, r=Tumorrand 1=gering, 2=moderat, 3=stark, G1= stark differenziert, G2=moderat differenziert, G3= gering differenziert. ZA: Gewebe zentral ödematös aufgelockert. Der Differenzierungsgrad G4 (=nicht differenziert) konnte nicht gefunden werden. Peritonitis und Blutungen sind nicht vorhanden, da diese Komplikationen Ausschlusskriterien für die Therapie waren.

5. Diskussion

In der Studie wurde untersucht, ob das elektroporationsbasierte PDAC-Mausmodell singuläre und umschrieben demarkierte orthotope Tumore entwickelt, die ähnlich der menschlichen Pathophysiologie des PDAC eine intratumorale onkolytische Virustherapie methodisch erlauben (Hypothese 1). Zudem wurde untersucht, ob eine lokale Immuntherapie mit dem onkolytischen Virus hTert-Ad zu signifikanten therapieinduzierten Veränderungen des PDAC führt (Zelluntergang, Entzündungsreaktion, Fibrosierung), die nicht-invasiv und in vivo mit Hochfeld MRT bei 7T dargestellt und invasiv ex vivo histopathologisch validiert werden können (Hypothese 2).

Alle Tiere zeigten einen nach 19 bis 35 Tagen gewachsenen homogenen Primärtumor, der zunächst bereits ab 2 mm Durchmesser und im späteren Verlauf bis 10 mm umschrieben in der MRT bei 7 T dargestellt werden konnte. Sowohl histopathologisch als auch bildgebend zeigte sich das Wachstum äquivalent zur solitären Entwicklung menschlicher PDAC. Es konnte somit gezeigt werden, dass sich das EP-PDAC als repräsentatives Modell für präklinische Untersuchungen eignen kann. Weitere Untersuchungen ergaben die typischen tumorassoziierten Komplikationen wie Ileus, Aszites, Einblutungen, invasives Wachstum und Metastasierungen der Lunge, Leber und Lymphknoten sowie des Peritoneums, Darms und Magens. Das klinische Gesamtbild ähnelte somit dem des menschlichen Pankreaskarzinoms. Anhand der onkolytischen Virotherapie konnte gezeigt werden, dass das EP-PDAC-Modell durch seine klare Abgrenzbarkeit und dem solitär-homogenen Wachstum für das Monitoring neuer Therapieansätze verwendet werden kann. T2-Signalveränderungen, wie ödematöse Entzündungsreaktion und onkolytischer Zelluntergang, waren MR-morphologisch gut detektierbar und mit manueller Volumetrie quantitativ zu erfassen. Die Ergebnisse unserer Studie unterstützen die formulierten Hypothesen somit, jedoch konnten Fibrosierungen nur histologisch nachgewiesen werden.

5.1. EP-PDAC-Wachstum und MR-morphologische Darstellung

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist durch frühe Metastasierung ^[116], aggressiv-invasives Wachstum ^[117, 118] und durch die limitierten therapeutischen Möglichkeiten mit einer

hohen Mortalität verbunden. Für die präklinische Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze sind authentische Mausmodelle von Nutzen.

Das EP-PDAC wurde im Jahr 2016 von Gürlevik et al. etabliert ^[90]. Ziel der Arbeit war aus pankreaseigenen Zellen ein möglichst natürlich entstehendes PDAC-Modell zu entwickeln, das ein singuläres, menschenähnliches Wachstum zeigt und potentiell resektabel ist. Nach Resektion konnte Gürlevik et al. unter anderem zeigen, dass mit einer Gemcitabin-Therapie zwar ein Lokalrezidiv des EP-PDAC, jedoch keine Fernmetastasierung verhindert werden konnte ^[90]. Die Darstellung des EP-PDAC und der Metastasen in vivo wurde mit auf Luziferin-basierender Biolumineszenzbildgebung durchgeführt ^[90]. Mit diesem Bildgebungsverfahren waren die Lokalisationen, nicht jedoch Aussagen über therapeutische Effekte auf die Tumorbinnenstruktur möglich. Die vorliegende Dissertationsarbeit untersuchte daher die durch eine lokale onkolytische Virotherapie induzierten Effekte auf das elektroporationsbasierte Pankreasadenokarzinommodell der Maus mit Hochfeld MRT bei 7 Tesla und immunhistochemischer Validierung. Dabei konnte gezeigt werden, dass in der Virotherapiegruppe 2 Tage nach Virusinjektion T2-hyperintense entzündliche Ödeme, und 3 Tage nach Therapie T2-hypointense Gewebeuntergänge dargestellt werden konnten, während in der Kontrollgruppe keine Signalveränderungen detektierbar waren. Da diese Studie zeigen konnte, dass die 7 Tesla MRT am EP-PDAC Modell auch intratumorale Gewebeveränderungen detektieren kann, bieten diese Ergebnisse damit eine Grundlage zur präklinischen Untersuchung neuer Therapieansätze.

Grimm et al. zeigten in einer experimentellen Studie, dass die Darstellung von Pankreaskarzinomen bei Mäusen mit MRT-Schnittbildgebung bei 7T eine besondere Herausforderung darstellt, da sich das Pankreas bei der Maus bei insgesamt sehr engem Situs als membrandünne Struktur darstellt, mit unmittelbarem Lagebezug zu Darmschlingen ^[91]. Die Ergebnisse unserer EP-PDAC-Studie zeigten jedoch zuverlässig 19 bis 35 Tage nach Elektroporation einen MR-morphologisch homogen wachsenden Primärtumor, der bereits ab 2 mm Durchmesser und im späteren Verlauf bis 10 mm in der nativen MRT bei 7 T umschrieben abzugrenzen war. Die Wachstumskurve (Abbildung 8A) zeigt ein charakteristisches Wachstumsmuster von Karzinomen, die der für Tumore typischen Gompertz-Kinetik ähnelt (mathematische Funktion, deren Graph sich einem Maximalwert annähert/Sättigungsfunktion). ^[115]. Pathophysiologisch ist die Sättigungsfunktion bei großen Tumoren durch Limitationen der für das Wachstum benötigten Nährstoffe begründet, die Steigung des Graphen nimmt

infolgedessen ab ^[115]. Das Wachstumsmuster des untersuchten EP-PDAC zeigte sich in der Kinetik, histopathologisch und MR-morphologisch ähnlich zur solitären Entwicklung menschlicher PDAC mit analogen tumorassoziierten Komplikationen.

5.2. Tumorassoziierte Komplikationen

Für die Etablierung eines PDAC-Mausmodells für präklinische Studien ist die Untersuchung von tumorassoziierten Komplikationen wichtig, um das klinische Bild der Erkrankung beurteilen zu können. Darüber hinaus kann eine artifizielle Häufung von Komplikationen die Nichteignung eines Tumormodells für präklinische Studien bedeuten, während ein Modell ohne die natürlichen Folgekomplikationen eines Pankreaskarzinoms keine menschenähnliche Pathophysiologie darstellt. Das Pankreas hat eine sehr dünne Organkapsel und der exokrine Anteil ist für die Sekretion von Verdauungsenzymen (Amylase, Lipase, Chymotrypsin) zuständig mit hoher Vulnerabilität des Organs. Bei Traumata oder durch Tumore können Obstruktionen der exokrinen Ausführungsgänge entstehen ^[120], die zu Entzündungen und zum Eigenverdau des Parenchyms führen. Auch im EP-PDAC-Modell konnten entzündliche Prozesse nachgewiesen werden (n=14/116; 12%). Blutungen bei Patienten mit PDAC sind häufig ^[121, 122], da es aufgrund von invasivem Wachstum zur Ausbildung von intraparenchymalen Einblutungen kommt ^[121]. Auch im EP-PDAC-Modell konnten in 44 von 116 Mäusen (38%) gedeckte Hämatome gefunden werden, die nach Ruptur in der Regel zu einem kritischen Blutverlust führten. Allerdings zeigte sich histopathologisch ein wesentlich geringerer Anteil mit invasivem Charakter im Vergleich zur relativ hohen Inzidenz von Einblutungen. Es ist also auch anzunehmen, dass Mikroverletzungen im Rahmen des Elektroporationsverfahrens oder konsekutive narbige Veränderungen ein zusätzlicher Grund für die hohe Blutungsinzidenz darstellen könnten. Eine weitere Erklärung könnte auch die stärkere Genexpression der KRAS-Mutation und die damit verbundene schnellere Tumorentwicklung im Vergleich zum menschlichen Pankreaskarzinom sein, die im Rahmen der hohen Wachstumskinetik Einblutung fördern könnte. Es konnte in Studien gezeigt werden, dass auch die Anzahl der KRAS-Mutation die Aggressivität des Pankreaskarzinoms beeinflusst ^[123]. Durch das Elektroporationsverfahren werden sehr viele Onkogene in die Zellen gebracht, während eine natürliche Genamplifikation des Hauptteiler-Onkogens KRAS beim menschlichen Pankreaskarzinom nur selten und eher als Punktmutation vorliegt ^[124].

Aufgrund des aggressiven Wachstums und des unmittelbaren Lagebezugs zu Nachbarorganen und abdominalen Gefäße, kommt es beim humanen PDAC schnell zur Organinvasion und zur systemischen Streuung. Das invasive Wachstum kann in sehr seltenen Fällen und in der Regel eher bei weit fortgeschrittenen Tumorstadien mit ausgeprägter Metastasierung zur Obstruktion des Verdauungstraktes führen [125, 126, 127]. Die im Versuchstier entstandenen Ileus-Komplikationen (n=8/116; 7 %) wurden ebenfalls durch das aggressiv-infiltrativ wachsende EP-PDAC und Peritonealkarzinosen verursacht, wie histologisch validiert werden konnte.

Aszites konnte in 14 von 116 untersuchten Mäusen (12 %) beobachtet werden. In einer 2015 durchgeführten Studie konnte bei 73 von 494 (15 %) Patienten mit Bauchspeicheldrüsenkrebs maligner Aszites festgestellt werden [128]. Da in unserem Tiermodell keine laborchemischen, mikrobiologischen oder histopathologischen Untersuchungen der Aszitesflüssigkeit durchgeführt wurden, kann die Ursache des Aszites sowohl malignen als auch entzündlichen Ursprungs sein. Da alle 14 Mäuse makroskopisch sichtbare Peritonealkarzinosen aufwiesen, ist der maligne Aszites ebenso wahrscheinlich. Einblutungen, invasives Wachstum, Ileus und Aszites waren durch native MRT-Untersuchungen sehr gut darstellbar. Abgesehen vom invasiven Wachstum erhöhte sich die Inzidenz dieser Komplikationen prozentuell mit der Tumorgröße. Ein Grund dafür könnte sein, dass das invasive Wachstum von PDACs definitionsgemäß direkt nach high-grade-PanIN3-Läsionen entsteht [129] und demzufolge bereits in kleinsten Tumoren nachweisbar ist.

In einer 2017 durchgeführten Studie über das Metastasierungsmuster von n=13.233 Pankreaskarzinom-Patienten im Stadium IV zeigten 76 % der Patienten Lebermetastasen, 19,9 % Lungenmetastasen, 9,4% Lymphknotenmetastasen und 6,8 % Knochenmetastasen [130]. In unserer Studie konnten nur durch mikroskopische Untersuchungen sehr kleine Fernmetastasen in Leber, Lunge und Lymphknoten gefunden werden. Die diagnostische Genauigkeit der MRT ohne Kontrastmittel reichte nicht aus, um sehr kleine hepatische, pulmonale und lymphatische Metastasen bildgebend nachzuweisen. Das aggressive Wachstum des Primärtumors im EP-PDAC-Modell führt zum Tod der Tiere, bevor die Fernmetastasen groß genug waren, um sie in der MRT-Bildgebung darstellen zu können. Zur bildgebenden Darstellung der Fernmetastasen müsste daher eine potenziell kurative Resektion des Primärtumors erfolgen oder es müssten andere Onkogen-Kombinationen zur Tumorinduktion gewählt werden, die eine langsamere Progression des Primarius zur Folge hätten. Zusammenfassend kann festgestellt

werden, dass die tumorassoziierten Komplikationen des EP-PDAC-Modells den klinischen Verlauf des menschlichen Pankreaskarzinoms widerspiegeln.

Die Untersuchung der Komplikationen in Abhängigkeit zur Tumorgröße zeigte außerdem, welche Tumorgröße geeignet für eine Virotherapie ist. Je größer der Tumor, um so häufiger zeigten sich Komplikationen wie Blutungen, Ileus, Peritonitis und Aszites. Obwohl sich große Tumore besser für die bildgebende Darstellung von Gewebeveränderungen eignen, wurden besonders große PDAC (6-10 mm vor Therapie) nicht in die Therapiegruppe eingeschlossen, aufgrund der hohen Wahrscheinlichkeit letaler Komplikationen vor Versuchsende. In unserem Tumormodell eigneten sich besonders mittelgroße PDAC mit einer Größe von 4-6 mm aufgrund der niedrigeren Komplikationsrate bei gleichzeitig für die MRT akzeptabler Tumorgröße.

5.3. Intratumorale therapieinduzierte MR-Signalveränderungen und histologische Validierung

Das bildgebende Monitoring onkolytischer Virotherapien ist aus verschiedenen Aspekten herausfordernd. CT-morphologisch können sich entzündungsbedingte Schwellungen des Tumorgewebes als Pseudoprogression darstellen, obwohl der Tumor im Verlauf auf die Therapie anspricht [72]. Bei der onkolytischen Therapie des malignen Melanoms mit T-Vec konnten in einer klinischen Studie von Adtbacka et al. in der CT Pseudoprogressionen bei 48 % der Patienten detektiert werden [190]. Die Limitationen der rein morphologischen CT-Bildgebung für das Monitoring onkolytischer Virotherapien bieten einen möglichen Ansatzpunkt für funktionelle oder molekulare Imaging-Biomarker, die eine genauere Charakterisierung der Tumorpathophysiologie unter onkolytischen Virotherapien ermöglichen könnten [72, 191]. Eine Studie von Koski et al. zeigte, dass ¹⁸F-FDG PET eine vielversprechende Ergänzung zur CT sein kann, um das Therapieansprechen auf der Basis von Glukosemetabolismus statt alleiniger Tumorgröße zu beurteilen [191]. Auch die MRT zeigt vielversprechende Ergebnisse zur Darstellung von Tumorgewebeveränderungen. In einer von Hemminki et al. durchgeführten Studie an Hamstern wurden nach Virotherapie von syngenem Pankreas- und Leyomyosarkommodellen in T2-gewichteten Sequenzen an einem 7T-MRT Ödeme festgestellt [72]. Dabei wurde das extrazelluläre Ödem von den Autoren als erstes Zeichen des Therapieansprechens gewertet, wobei der Tumorumfang zunächst entzündlich

zunahm ^[72]. Die Kontrollgruppe wurde mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) therapiert und zeigte keine Ödeme nach Therapie. Auch in unserem EP-PDAC-Modell konnten im Injektionsareal 2 Tage nach Therapie hyperintense Areale dargestellt werden. Obwohl anzunehmen ist, dass bei einer orthotopen Injektion eines in Flüssigkeit befindlichen Virus, die hyperintensiven Signalveränderungen 2 Tage nach Therapie, durch die möglicherweise noch nicht resorbierte Flüssigkeit entstehen kann, waren in den mit NaCl-Lösung behandelten Kontrollgruppen keine hyperintensiven Areale sichtbar. Durch die histopathologischen Untersuchungen konnte die ödematös entzündliche Gewebeauflockerung im Injektionsareal der Therapiegruppe mit starker Immunreaktion in der immunhistochemischen Färbung validiert werden. Darüber hinaus konnten Hemminki et al. im weiteren Verlauf durch MRT-Untersuchungen bis zum 21. Tag nach Virotherapie zunehmend hypointense Areale in der T2-gewichteten Sequenz darstellen, die als Zeichen eines virotherapeutischen Ansprechens interpretiert und als Nekrosen immunhistochemisch validiert wurden ^[72]. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Hemminki et al. konnten wir in unserer Studie 3 Tage nach Virotherapie in der T2-gewichteten MRT diffuse hypointense Areale im Injektionsgebiet dokumentieren. Differentialdiagnostisch sind für die Ätiologie der hypointensen intratumoralen Areale der Therapiegruppe injektionsbedingte Drucknekrosen zu diskutieren. Jedoch wurden in keinen der n=5 Kontrollmäuse 3 Tage nach NaCl-Injektion hypointense Areale in T2-Wichtung festgestellt. Histopathologisch wurden diese Ergebnisse validiert, indem nur bei mit Virus behandelten Versuchstieren große nekrotische Areale mit Detrituseinlagerungen und starker Immunzellinfiltration identifiziert werden konnten. Unsere Ergebnisse stützen somit die Hypothese, dass in unserem Modellaufbau die onkolytische hTert-Virotherapie in dem EP-PDAC Modell therapeutisch induzierte Nekrose verursachte und die Effekte MRT-tomographisch nicht-invasiv und in vivo detektiert werden können.

Die Studie von Hemminki et al. zeigte in einigen Versuchstieren, dass intratumorale Areale mit ausgedehntem Gewebeuntergang durch Flüssigkeit ersetzt wurden ^[72]. In diesen Fällen waren die Areale mit Zelluntergang ebenfalls T2-hyperintens, und wurden als virusinduzierte liquide Nekrosen bezeichnet ^[72]. Die Hamster dieser Studie wurden bis zu 3 Wochen nach Therapie in regelmäßigen Abständen nachuntersucht ^[72]. In unserer Studie waren die von Hemminki et al. beschriebenen T2-hyperintensiven Areale mit Zelluntergang bis Tag 3 nicht nachweisbar. Gegebenenfalls waren die betroffenen Gebiete noch nicht groß genug. Spätere Follow-up-Kontrollen könnten zeigen, ob sich auch liquide Nekrose ausbildet und darstellen lässt.

Unsere Ergebnisse entsprechen in verschiedenen Aspekten der Studie von Hemminki et al. unter analoger Methodik mit T2-gewichteten Sequenzen in der Hochfeld MRT bei 7T und unterstützen die Beobachtungen und Ergebnisse der onkolytischen Virotherapiestudie am syngenem Pankreas- und Leyomyosarkommodell des Hamsters. Allerdings basiert die Studie von Hemminki et al. methodisch auf subkutanen heterotopen Transplantmodellen mit einer modellierten Pathogenese, wobei das von uns untersuchte orthotope EP-PDAC-Modell mit physiologischerer Pathogenese aus pankreaseigenen Zellen und Immunreaktionen ein authentischeres translationales Potential der Ergebnisse bietet.

5.4. MR-tomographische Evaluation der Mikromileuveränderungen

Die Tumorarchitektur aus Tumor-, Stroma- und Immunzellen ist nicht statisch, sondern wird kontinuierlich umgestaltet und beeinflusst wesentlich die Therapieergebnisse ^[131]. Die nicht-invasive Darstellung von Gewebestruktur-Veränderungen innerhalb von Tumoren kann Rückschlüsse über die Mechanismen und Effekte von innovativen Therapieansätzen in vivo ermöglichen. Die CT stellt eine klinisch etablierte Bildgebung zur Detektion von Pankreaskarzinomen mit akzeptabler Sensitivität und Spezifität dar, hat aber im Vergleich zur MRT einen niedrigeren Weichteilkontrast. Die hochauflösende Hochfeld-MRT bei 7T erlaubt bei höherem Weichteilkontrast im Vergleich zur CT eine höhere räumliche Auflösung gegenüber klinischen 1,5 Tesla und 3 Tesla MRT Scannern ^[15]. Das Potential der 7 Tesla MRT für die Evaluation von Gewebeveränderungen im Kleintier konnte in verschiedenen Studien dokumentiert werden ^[33, 186, 178, 193]. Herausforderungen der Hochfeld-MRT bei 7T umfassen sehr hohe Anschaffungs- und Betriebskosten, physiologische Auswirkungen des starken Magnetfeldes auf den Körper sowie teils ausgeprägte und komplexe Bildartefakte ^[15]. Trotzdem bietet die Hochfeld-MRT bei 7T gerade im Kleintiermodell im Vergleich zu niedrigeren Feldstärken besondere Vorteile bezüglich höherer Auflösung und optimiertem Weichteilkontrast. So zeigte eine Studie von Paredes et al., dass sich die Hochfeld-MRT bei 7T gut für manuelle Messung von Pankreas-Gewebevolumina in Mäusen eignet und insbesondere die nicht-invasive Quantifizierung von Veränderungen der Bauchspeicheldrüse im Mausmodell verbessern kann ^[33].

5.5. Molekulare Bildgebung zur Untersuchung therapieinduzierter Tumormikromilieuveränderungen

Methoden der molekularen Bildgebung erlauben die nicht-invasive Charakterisierung zellulärer Vorgänge in vivo. Insbesondere die PET mit verschiedenen funktionellen und molekularen Radiotracern ermöglicht präklinisch und klinisch als Hybridbildgebung PET/CT oder PET/MRT die komplementäre morphologische, funktionelle und molekulare Charakterisierung der Tumorpathophysiologie unter Therapie. So untersuchten Kasten et al. die Effekte einer onkolytischen Virotherapie im Gliommodell der Maus mit ^{89}Zr -anti-CD8 Cys-diabody PET und zeigten dabei eine signifikant stärkere Radiotracer-Aufnahme in den therapierten Mäusen [194]. Sie gingen davon aus, dass durch diese Methode Responder von Non-Respondern unterschieden werden könnten [194]. In Bezug auf unsere Studie könnte eine ähnliche Methodik dazu beitragen, dass die Immunezellinfiltration des EP-PDAC nach hTert-Ad-Therapie bildgebend nicht invasiv quantifiziert werden könnte. Eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung des Therapieerfolgs könnte die molekulare Bildgebung von Reportergenen sein, die zuvor in das Virusgenom eingebaut wurden [195]. Concilio et al. fassen in ihrer Übersichtsarbeit eine Vielzahl von Radiotracern für die SPECT- und PET-Bildgebung potenzieller viraler Reportergene zusammen [195]. Ein solches Verfahren könnte die intratumorale Virusreplikation von hTert-Ad und somit den Therapiefortschritt indirekt und nicht-invasiv quantifizieren.

5.6. Gewebeveränderungen nach Virotherapie

Wenner et al. beschreiben, dass die niedrige Durchblutung und das dichte Stroma von Bauchspeicheldrüsenkrebs Determinanten darstellen, die die Wirksamkeit systemisch verabreichter Therapien limitieren [36]. Ein Vorteil von onkolytischen Therapien gegenüber systemischen Chemotherapien ist, dass durch eine genetische Modulation der Tumorspezifität ein präzises Wirksamkeitsprofil gegen den betreffenden Krebs erreicht werden kann [36]. Obwohl eine Vielzahl von Viren für die Therapie des Pankreaskarzinoms erfolgreich getestet wurden [36], ist die Charakterisierung der lokalen Mikromilieuveränderungen im Tumor durch in den Bauchspeicheldrüsenkrebs injizierte Viren noch unvollständig. Studien konnten zeigen, dass bei onkolytischen Virotherapien am Pankreas neben der viralen Onkolyse auch die Virus-induzierte Immunantwort ein wesentlicher Mechanismus der Tumorzerstörung ist [36]. Auch bei

hTert-Ad konnte in unserer Arbeit histopathologisch bereits 2 Tage nach Virotherapie eine starke Immunzellinfiltration festgestellt werden. 3 Tage nach Therapie war zentral im Bereich der Immunzellinfiltration ein diffuser Gewebeuntergang sichtbar. Ob es sich bei dem Zelluntergang um replikationsbedingte Onkolyse oder primär immunzellinduzierten Gewebsuntergang handelt, war weder in der MRT noch histologisch zu differenzieren.

5.7. Intratumorale Kollagenentwicklung als mögliche Blockade für die Immunreaktion

Entzündungen können durch die Aktivierung von Fibroblasten eine lokale Fibrosierung induzieren. Die Aktivierung der Fibroblasten und Ausbildung von Kollagen wird durch eine Reihe von Entzündungsmediatoren beeinflusst. Fibrose-induzierend wirken Zytokine (IL-13, IL-21, TGF- β 1), Chemokine (MCP-1, MIP-1 β), proangiogene Faktoren (VEGF), Wachstumsfaktoren (PDGF), Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs), Akutphasenproteine (SAP) und Caspasen ^[151].

Sowohl in den Kontrollgruppen als auch in den Therapiegruppen 2 Tage und 3 Tage nach Therapie wurde ein schmaler Kollagensaum am Tumorrand festgestellt, dieser wurde als Tumorkapsel interpretiert. 3 Tage nach hTert-Ad-Therapie konnte histologisch (n=5) eine starke zentrale Kollagenentwicklung im PDAC aller Mäuse festgestellt werden. MR-tomographisch war die Kollagenentwicklung jedoch nicht detektierbar. Gegebenenfalls könnten hier alternative Modalitäten der Bildgebung nützlicher sein. Polasek et al. beschreibt in einer Studie zur MRT-basierten Darstellung von Kollagenveränderungen mit einem peptidbasierten gadoliniumhaltigen Kontrastmittel (EP-3533) im xenogen transplantierten PDAC, dass Kollagen in soliden Tumoren ein mögliches Angriffsziel in modernen Krebstherapien darstellt, jedoch die Methoden fehlen, dieses nicht-invasiv zu quantifizieren ^[92]. Neben der molekularen MR-Bildgebung könnten auch PET-Untersuchungen Kollagen im Bereich des Pankreas darstellen. So zeigten beispielsweise Rosestedt et al. in einer präklinischen Studie, dass der Radiotracer ⁶⁸Ga-DOTA-PEG2-LRELHLNNN ein vielversprechendes Werkzeug für die PET-Bildgebung von Fibrose sein kann ^[188].

In unserer Studie zeigte sich die mit Picro-Siriusrot-Färbung dargestellte Kollagenentwicklung überwiegend als Randfibrose um die Areale mit Zelluntergang. Diese könnte die lytischen Areale abkapseln und als potenzielle Barriere für Immunzellinfiltration dienen ^[153]. Zudem

zeigte sich histologisch innerhalb der eingekapselten lytischen Areale eine wesentlich höhere Dichte an Immunzellen. Teng et al. beschrieben den Pathomechanismus der T-Immunzellinfiltration über kleine intratumorale Blutgefäße ^[189]. Dieser Prozess wird als Diapedese bezeichnet. Kleine Blutgefäße im EP-PDAC könnten nach Virusinjektion die Diapedese von Leukozyten ermöglicht haben, sodass sich zentrale Leukozyten-Infiltrationsareale ausbildeten, die über Mediatoren eine fibrotische Umgebungsreaktion induzierten.

Bisher wurden die Mäuse nur 2 und 3 Tage nach Therapie mittels MRT untersucht. Weitere follow-up-Zeitpunkte könnten längerfristige dynamische Veränderungen der Tumorarchitektur und der metastatischen Ausbreitung dokumentieren. Die Auswirkung der intratumoralen hTert-Ad-Therapie auf das Gesamtüberleben des Organismus wurde bisher noch nicht untersucht. Zwar ließ das Mausmodell die volumetrische Ausmessung des Gewebeuntergangs zu, was das Abschätzen des therapeutischen Erfolges ermöglichen kann, jedoch könnte ein biologischer Nutzen des Therapieansatzes durch Überlebenskurven validiert werden. Es sollte daher zukünftig untersucht werden, ob die volumetrischen Messungen des Zelluntergangs prädiktive Faktoren für onkolytische Immuntherapien etablieren können.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich das EP-PDAC Modell für die 7 Tesla MRT-Untersuchungen von virusinduzierter ödematöser Entzündungsreaktion und Zelluntergang gut eignen kann, wie durch histopathologische Untersuchungen validiert wurde. Perspektivisch könnte eine noch detailliertere Charakterisierung von Tumormikromilieu-Veränderungen mit molekularer Bildgebung in PET-Untersuchungen möglich sein.

5.8. Translation in die Klinik

Die erstmalige Idee, Viren als therapeutisches Mittel gegen Krebs zu verwenden, hat ihren Ursprung in den 1950er Jahren ^[140]. Bis heute gibt es jedoch in den USA und Europa nur eine einzige seit 2015 zugelassene Virotherapie für das maligne Melanom mit dem Herpes Virus T-Vec. Eine mögliche Erklärung dafür sind die Herausforderungen der biologischen Sicherheit, sowie unklare Langzeitnebenwirkungen und Herausforderungen der Risikominimierung von Studienteilnehmern ^[141]. Das größte Risiko wäre eine unkontrollierte Replikation und Übertragung auf andere Patienten oder Mitarbeiter des Gesundheitssystems ^[142]. Darüber

hinaus gibt es häufig keine weltweit vereinheitlichten Richtlinien für die Verabreichung der Viren, da die Verabreichungswege (intratumoral, intravenös oder intraperitoneal) der onkolytischen Virotherapie an Patienten in bestehenden Studien je nach Tumorlokalisation und Studienziel variieren ^[143]. Die Erforschung der Wirksamkeit von onkolytischen Viren bei Lungen-, Brust-, Blasen-, Prostata, Eierstock- und Bauchspeicheldrüsen-Krebs sowie des Glioms ist Teil aktueller klinischer Studien ^[144]. Neueste Studien zur Therapie des Glioblastoms ^[145, 146], und der Peritonealkarzinose ^[147] geben Aussicht auf weitere Erfolge der onkolytischen Virotherapie. Das in unserer Studie durchgeführte MRT-basierte Verfahren zur volumetrischen Quantifizierung des intratumoralen Gewebeuntergangs als Imaging Biomarker des Therapieansprechens könnte möglicherweise zukünftig das Monitoring des Therapieansprechens auf Virotherapien auch in der klinischen Routine erlauben.

5.9. Limitationen

Die vorliegende Arbeit hatte verschiedene Limitationen. Um die Wachstumsdynamik des Tumormodells zu beurteilen, wurden die Größe der EP-PDAC von n=116 Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen dem 19. Tag und dem 35. Tag nach Elektroporation gemessen. Aus diesen Daten konnte anschließend annäherungsweise eine Wachstumskurve erstellt werden. Für eine genauere Darstellung der Wachstumsgeschwindigkeit wäre eine Versuchsgruppe mit regelmäßigen Tumorgrößenmessungen in MRT-Folgeuntersuchungen notwendig gewesen. Eine weitere Limitation des Versuchsaufbaus stellt die Belastung der Versuchstiere durch tumorassoziierte Komplikationen dar. In unserem Versuch wurden daher Peritonitis mit Aszites oder intrapankreatische Blutungen als Ausschlusskriterien für die Therapie definiert, da diese die Abbruchkriterien der Tierschutzvorlagen erfüllten. Komplikationen, wie Ileus oder invasives Wachstum, stellten keine Kontraindikation dar, da die Versuchstiere einen guten Allgemeinzustand zeigten und für eine Virotherapie geeignet waren. Ein weniger invasiver Therapieansatz durch eine systemische Virus- Applikation oder intraperitoneale Gabe könnte langfristig ein interessanter Ansatz sein. So konnten beispielsweise Woo et al. im Jahr 2020 zeigen, dass der virusinduzierte PDAC-Zelluntergang eines xenogenen subkutanen PDAC-Transplantmodells sowohl durch intravenöse Applikation eines genetisch modifizierten Orthopoxvirus, als auch durch intraperitoneale Applikation erreicht werden konnte ^[85]. Darüber hinaus zeigte die intraperitoneale Gabe ein effektiveres Therapieergebnis ^[85]. Allerdings ist es wahrscheinlich, dass das Ausmaß onkolytischer

Reaktionen bei intratumoraler, im Vergleich zur systemischen Gabe, größer sein könnte. Um eine Tumorgöße zu bestimmen, die sowohl wenige Komplikationen zur Folge hat als auch methodisch eine Virotherapie zulässt, wurden die EP-PDAC in 4 Größengruppen unterteilt. Aufgrund der Unterteilung in Gruppen liegt kein kontinuierlicher Datensatz vor, sodass keine Korrelation zwischen Tumorgöße und Komplikation errechnet werden konnte. Allerdings lässt die prozentuale Auswertung und graphische Darstellung annehmen, dass ein Zusammenhang zwischen Tumorgöße und Inzidenz von intratumoralen Hämatomen, Ileus und Aszites besteht. Die virotherapeutischen Abschnitte der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen einer Pilot-Studie durchgeführt, um die Qualifikation des Tumormodells für präklinische Therapiestudien zu evaluieren. Die therapeutischen Ergebnisse und deren Reproduzierbarkeit müssen in größeren Versuchsgruppen validiert werden. Innerhalb der Versuchsgruppen waren zwar histologisch und in der T2-gewichteten MRT die gleichen therapeutischen Effekte sichtbar, jedoch kann eine so geringe Versuchstierzahl nur wenig repräsentative Daten für die Evaluation einer Virotherapie liefern. Die Messung der entzündlich-ödematösen Areale 2d nach Therapie und der onkolytischen Areale 3d nach Therapie erfolgte manuell anhand der T2-gewichteten Sequenzen. Es ist anzunehmen, dass eine manuelle Messung eine geringere Reproduzierbarkeit aufweist als eine automatisierte. Quantitative Parameter, die als Grenzwert dienen könnten, wären hilfreich, um eine automatisierte und reproduzierbare Auswertung zu ermöglichen. Ein solcher Grenzwert könnte in einer Studie mit größerer Kohorte ermittelt werden.

Eine Vielzahl von Untersuchungen an implantierten PDAC-Modellen wurde bereits durchgeführt, wobei Gadolinium als Kontrastmittel zur Evaluation des Tumors verwendet wurde ^[91]. Die Gadolinium-unterstützte MRT bietet Ansatzpunkte zur exakteren morphologischen Charakterisierung der Tumore, jedoch konnten in unseren nativen MRT-Untersuchungen alle PDAC bildmorphologisch eindeutig abgegrenzt werden. Methoden der molekularen Bildgebung, wie die PET mit spezifischen Radiotracer zur Darstellung von Immunzellinfiltration, Zelluntergang oder der Virusreplikation über Reportergene, bieten Perspektiven zur noch genaueren Charakterisierung der Effekte einer hTert-Virotherapie in vivo. Zwar konnte Gewebeuntergang in T2-Wichtung 3 Tage nach Therapie dargestellt werden, jedoch ist es durch die MRT nicht möglich festzustellen, ob es sich dabei um primär replikationsbedingten onkolytischen oder immunzellinduzierten Zelluntergang handelt.

5.10. Ausblick

Heute werden 20-25% der PDAC in einem resektablen Stadium diagnostiziert. Die Resektion ist bisher der einzige potenziell kurative Ansatz zur Therapie des PDAC. Aufgrund weiterentwickelter diagnostischer Verfahren und erweiterter Möglichkeiten zur Frühdetektion könnte der Anteil resektabler PDAC weiter steigen ^[93]. Antitumorale Immuntherapien stellen in aktuellen Studien ein vielversprechendes Forschungsfeld dar. Die präklinische Entwicklung antitumoraler Immuntherapien erfordert die Evaluation des jeweiligen Therapieansprechens. Durch die in dieser Arbeit beschriebenen besonderen Eigenschaften des EP-PDAC könnte sich das Modell für genaue Messungen des therapeutischen Erfolgs innovativer Therapien und insbesondere Krebsimmuntherapien mithilfe bildgebender Verfahren eignen, und dabei sogar Untersuchungen des Tumormikromilieus zuzulassen. Zudem ermöglichen die Modelleigenschaften MR-volumetrische Messungen der intratumoralen therapieinduzierten Signalveränderungen. Großes therapeutisches Potential für die Behandlung solider Tumore liegt in der Kombination aus Immun-Checkpoint-Inhibitoren und anderen Immuntherapien wie adoptiven T-Zell-Therapien, bispezifischen Antikörpern, Chimeric antigen receptor (CAR)-Therapien oder Tumor-Impfungen ^[148, 149]. Eine große Hürde für alle etablierten Immuntherapien bei soliden Tumoren stellt das immunsuppressive Tumormikromilieu dar. Unsere Arbeit konnte zeigen, dass eine im Vergleich zur Kontrollgruppe stärkere Immunzellinfiltration durch intratumorale Virusinjektion verursacht werden konnte. Es besteht daher die Hoffnung, dass eine tumorspezifische virale Replikation diese Immunsuppression durchbrechen kann ^[150] und die Tumore somit sensitiver für etablierte Immuntherapien werden. Die Eigenschaften des Tumormodells könnten somit neue Forschungsmöglichkeiten für die radiologische Evaluation neuer immuntherapeutischer Ansätze bieten.

6. Zusammenfassung

Zielsetzung: In der Studie wurde untersucht, ob sich das elektroporationsbasierte PDAC-Mausmodell (EP-PDAC) ähnlich der menschlichen Pathophysiologie entwickelt und eine intratumorale onkolytische Virustherapie methodisch erlaubt (Hypothese 1). Zudem wurde untersucht, ob eine lokale Immuntherapie mit dem onkolytischen Virus hTert-Ad zu signifikanten therapieinduzierten Veränderungen des PDAC führt (Zelluntergang, Entzündungsreaktion, Fibrosierung), die in vivo mit 7 T MRT dargestellt und ex vivo histopathologisch validiert werden können (Hypothese 2).

Material und Methoden: 3 Wochen nach der Pankreas-Elektroporation (EP) mit Onkogenen (KRAS-G12V, Akt2, Cre-p53 fl/fl) in n=116 Mäusen wurde das Tumorstadium nach Explantation histologisch beurteilt. Tumorbedingte Komplikationen (Ileus, Aszites, Blutungen, invasives Wachstum) wurden im Bezug zur Tumorstadium untersucht. Organe wurden makroskopisch und mikroskopisch auf Metastasierung untersucht. Tumorstadium und Komplikationen wurden zudem mit T2-gewichteter MSME-Sequenz (TR/TE = 1238/11, FOV = 25,6×25,5 mm) in einem 7T-Kleintier-MRT untersucht (n = 30). Davon wurden 8 Mäuse (Tag 22 nach EP) durch 30 µl intratumorale hTert-Adenovirus-Injektion (1x10⁸ infectious units) oder NaCl-Lösung (n = 8, Kontrolle) behandelt und erneut mit MRT untersucht (jeweils n = 3 am Tag 24 post-EP, n = 5 am Tag 25 post-EP). Posttherapeutische T2-Signalveränderungen wurden mit MRT-Volumetrie quantitativ erfasst. Die Ergebnisse wurden histologisch im Hinblick auf Entzündung (CD45), Virus-induziertem Gewebeuntergang (HE) und Fibrose (Pikro-Siriusrot) validiert.

Ergebnisse: 116 Mäuse entwickelten bis zur 3. Woche solitäre Pankreastumore (Durchmesser 1,3-10 mm), die histologisch und MR-tomographisch (n = 30) im Hinblick auf ein solitäres Wachstumsmuster authentisch gegenüber dem humanen PDAC waren. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe wurden in allen virusbehandelten Mäusen T2-hyperintense Areale am Tag 2 post-EP detektiert, die histologisch ödematös-entzündlichem Gewebe entsprachen. Am Tag 3 post-EP wurden in allen therapierten Versuchstieren diffus verteilte, T2-hypointense Areale erfasst, die histologisch (HE und CD45) Nekrose entsprachen. Das Volumenverhältnis zwischen nekrotischem und vitalem Tumorgewebe erreichte ein Maximum von 1 zu 3. Im Injektionsgebiet gelegene Randfibrosen waren histologisch in allen virusbehandelten Mäusen nachweisbar. MRT und Histopathologie zeigten mit zunehmender Tumorstadium höhere Inzidenzen PDAC-typischer Komplikationen (Ileus, Aszites, Blutungen), mit Ausnahme des

invasiven Wachstums. Eine dem humanen Ausbreitungsmuster ähnliche Metastasierung in Leber, Lunge, Milz, Lymphknoten und Darm sowie des Peritoneums war histologisch oder makroskopisch nachweisbar.

Schlußfolgerungen: Das EP-PDAC entwickelt sich ähnlich zur menschlichen Pathophysiologie und erlaubt methodisch eine intratumorale onkolytische Virustherapie. Zudem verursachte die Therapie mit hTert-Ad einen signifikanten therapieinduzierten Zelluntergang, der mit 7 T MRT dargestellt und ex vivo histopathologisch validiert werden konnte. Die Immunzellinfiltration und Fibrosierung konnte nur histologisch nachgewiesen werden.

(Teile dieser Zusammenfassung wurden am 28.02.2019 auf dem European Congress of Radiology und am 31.05.2019 auf dem Deutschen Röntgenkongress ^[161] veröffentlicht)

7. Danksagung

Zuerst möchte ich meiner Familie für die Ermöglichung des Medizinstudiums und für ihren Glauben an mich danken.

Insbesondere Herrn Prof. Dr. med. Clemens C. Cyran und Herrn PD Dr. med. Philipp Kazmierczak möchte ich für die Möglichkeit der Durchführung der Dissertationsarbeit, die Bereitschaft zur Forschungs Kooperation mit der MHH sowie für die hilfreiche Betreuung danken.

Ich bedanke mich bei den Direktoren der Klinik für Radiologie der LMU, Prof. Dr. Jens Ricke und Prof. Dr. Dr. h.c. Maximilian Reiser (Direktor des Instituts bis 2017) für die Möglichkeit der Durchführung meiner Dissertationsarbeit an ihrer Klinik.

Für die Betreuung bei tierexperimentellen Abschnitten an der MHH möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Florian Kühnel bedanken. Mein Dank gilt auch Frau Dr. med. vet. Bettina Fleischmann-Mundt für die Einarbeitung in operative Verfahren an der Maus und die praktische Einführung in Narkosetechniken und in die Versuchstierhaltung.

Bei Frau Dr. rer. nat. Julia Niemann und Frau Dr. rer. nat. Jennifer Brooks möchte ich mich für die labortechnischen Ratschläge und die Unterstützung während operativer Vorgänge an Versuchstieren bedanken. Herrn Dr. rer. nat. Martin Meier danke ich für die Bereitschaft zur Durchführung von Maus-MRT-Untersuchungen.

Zuletzt möchte ich nochmals den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen der Klinik und Poliklinik für Radiologie an der LMU München und der Gastroenterologie und Hepatologie der MHH für die vertrauensvolle Aufnahme, Unterstützung und die lehrreiche, schöne Zeit bedanken.

8. Verzeichnisse

8.1. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Die Rolle des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs für die Tumorspezifische Virusreplikation
- Abb. 2:** Einteilung der Versuchsgruppen
- Abb. 3:** Das Elektroporationsverfahren
- Abb. 4:** Zeitflussdiagramm des Versuchsaufbaus
- Abb. 5:** Die intratumorale Virotherapie
- Abb. 6:** Methodik der Tumorentnahme
- Abb. 7:** Darstellung des KPC vs. EP-PDAC-Modells (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von dem Verlag PLoS ONE ^[89])
- Abb. 8:** Wachstumskurve und MRT der Größengruppen
- Abb. 9:** Infiltratives Wachstum
- Abb. 10:** Blutungen, Ileus, Peritonitis/Aszitis
- Abb. 11:** Prozentuale Auswertung der tumorabhängigen Komplikationen in Relation zur TumorgroÙe
- Abb. 12:** Metastasierung
- Abb. 13:** MRT und Volumetrie 2 Tage nach hTert-Ad-Virusinjektion und 2 Tage nach NaCl-Injektion
- Abb. 14:** MRT und Volumetrie 3 Tage nach hTert-Ad-Virusinjektion und 3 Tage nach NaCl-Injektion
- Abb. 15:** Prozentuale Auswertung der Mikromilieuveränderungen zum noch intakten Tumorgewebe mittels manueller Volumetrie
- Abb. 16:** Histopathologie der Virus-Therapiegruppe vs. NaCl-Therapiegruppe 2 Tage nach intratumoraler Applikation
- Abb. 17:** Histopathologie der Virus-Therapiegruppe vs. NaCl-Therapiegruppe 3 Tage nach intratumoraler Applikation
- Abb. 18:** Die therapieinduzierte Kollagenentwicklung

8.2. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1:** Die wichtigsten Mutationen des PDAC und ihre Häufigkeiten.
Tabelle 2: Plasmidvektoren
Tabelle 3: Plasmidansatz für die in situ Elektroporation zur PDAC Induktion
Tabelle 4: Materialliste für die Operationen (Elektroporation, Virusinjektion, Tumorresektion)
Tabelle 5: Die Materialliste für die histopathologischen Untersuchungen
Tabelle 6: Die Auswertung der Therapiegruppen

8.3. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
AFP	Alpha-Fetoprotein
AG	Arbeitsgemeinschaft
Akt2	Protein Kinase B Gen
Annexin V-PS	Annexin 5 Phosphatidylserin
Anti-PD1	Anti-programmed death-ligand 1
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
BDG	Bindegewebe
BRCA	Breast Cancer Gen
CAR	Chimeric antigen receptor
CD 45.2 Ak	Cluster of differentiation 45.2. Antikörper
CD45/H	Cluster of differentiation 45-Hämatoxylin Färbung
cm	Einheit: Centimeter
Cre	Cyclization recombination Oncogene
CT	Computertomographie
D	Detritus
d	Einheit: Tage
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAMPs	Damage-associated molecular patterns

DC	Destruktionskomplex
DCE	Dynamic contrast-enhanced
del	Deletion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPC	Synonym für SMAD
DSF	Disease free survival
Duc	Duktus = Ausführungsgang
DW	Diffusion-weighted
E1A	Edenovirus early region 1A Gen
E2F	E2 Transcription factor
EP	Elektroporation
EP-PDAC	Elektroporationsbasiertes Pankreas Duktales Adenokarzinom
ERC-Drainage	Endoskopisch-retrograde Cholangiographie-Drainage
ERCP	Endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
et al.	et alia
EUS	Endoskopischer Ultraschall
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
fl/fl	Floxed = flanked by Locus of cross-over in P1
FOLFIRINOX	Folinsäure + Flururacil + Irinotecan + Oxaliplatin
FOV	Field of view
FS	Folinsäure
FU	Flururacil
Fz	Frizzled Rezeptor
g	Einheit: Gramm
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
G12V	Aminosäureposition 12, Glycin durch Valin ersetzt
GEMMs	Genetisch verändertes Mausmodell
GFL	Gesellschaft für Labortechnik
GI	Gastrointestinal
GIBCO	Grand Island Biological Company
GLOBOCAN	The Global Cancer Observatory
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Einheit: Stunden

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxyd
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin Eosin
Her2/neu	Humanes epidermales Wachstumsfaktor Rezeptor Gen 2
HSV	Herpes-Simpex-Virus
hTert	Humane Telomerase riverse Transkriptase
hTert-Ad	Humane Telomerase riverse Transkriptase Adenovirus
IFN- γ	Interferon gamma
Ifu	Einheit: Infektiöse Partikel
IL	Interleukin
Int	Intestinal
IPMN	Intraduktal papillär-muzinösen Neoplasien
IT	Intratumoral
itRECIST	Response criteria for intratumoral immunotherapy in solid tumors
IVIS	In vivo-imaging Spektrometrie
K	Niere
K-ras	Kirsten rat sarcoma Onkogen
Kap.	Kapitel
kcal	Einheit: Kilokalorien
kg	Einheit: Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KM	Kontrastmittel
KPC	KRAS + p53 + Cre
l	Einheit: Liter
L	Leber
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
loxP	Locus of cross-over in P1
LRP6	Low-density lipoprotein receptor-related protein 6
LyInf	Lymphatische Infiltration
mA	Einheit: Milliampere
MA	Maligne Aszites
MCN	Muzinös zystische Neoplasie
MCP	Monocyte chemoattractant protein

MDCT	Multi-detektor computed tomography
mFOLFIRINOX	Modifiziertes FOLFIRINOX Therapieschema (s. FOLFIRINOX) mit den gleichen Therapeutika, jedoch ohne eine Bolusgabe von 5Fu und mit einer reduzierten Irinotecan-Dosis
mg	Einheit: Miligramm
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
min	Einheit: Minuten
MIP	Macrophage inflammatory protein
ml	Einheit: Mililiter
mm	Einheit: Milimeter
MR	Magnetresonanz
MRI	Magnetic resonance imaging
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Einheit: Milisekunden
MsIh	Mikrosatelliteninstabilität
MSME	Multi-Spin-Multi-Echo
mV	Einheit: Milivolt
MV	Masernvirus
MYB	Myeloblastosis Viral Oncogene Homolog
n	Anzahl
N	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NalIri	Liposomal verkapseltes Irinotecan
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NF-PNET	Nicht funktionaler pankreatischer neuroendokriner Tumor
NRW	Nordrhein Westfalen
O ₂	Sauerstoff
P	Phosphat
P53	Tumor Supressor Gen mit 53 kilodalton Molekularmasse
PaCa	Pankreaskarzinom
PanIN	Pankreatisch intraepitheliale Neoplasie
PARB	Poly ADP Ribose Polymerase Inhibitor

PBST	Phosphate-Buffered Saline/Tween
PDAC	Pankreas Duktales Adenokarzinom
PDGF	Platelet-derived growth factor
PET	Positronen Emmissionstomographie
PFA	Paraformaldehyd
pH	Maßeinheit: Potential of hydrogen
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PI3K-PTEN-Akt	Phosphoinositide 3 kinase-phosphatase and tensin homolog-protein kinase B
PJS	Peutz-Jeghers Syndrom
PKB	Proteinkinase B
PKBa	Proteinkinase Ba
PKBb	Proteinkinase Bb
PKBy	Proteinkinase By
PKG	Proteinkinase G
PPARs	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
pT	Plasmid type
PTCD	Perkutan transhepatische Cholangiodrainage
R0	Resektion des Tumors im Gesunden
R1	Resektion makroskopisch vollständig, mikroskopisch unvollständig mit Tumorzellen am Resektionrand
RAF-MEK-MAPK	Rapidly accelerated fibrosarcoma oder rat fibrosarcoma-mitogen activated protein kinase
RöKo	Röntgenkongress
s	Einheit: Sekunden
S	Magen
S2	Sicherheitsstufe 2
S3-Leitlinie	Leitlinie mit Entwicklungsstufe 3
SAP	Serum Amyloid P
SB13	Sleeping beauty Transposase 13
SMAD	Mothers against decapentaplegic homolog
Sp	Milz
Streptavidin-HRP	Histostain-plus Streptavidin-Peroxidase

T	Tumor
T-Vec	Talimogene laherparepvec
T-Vec	Talimogene laherparepvec Virus
TCF	Transkriptionsfaktoren
TE	TRIS-EDTA Puffer
TGF	Transforming growth factor
TGFβ	Transforming growth factor beta
TNM	Tumorstaging Klassifikation, T= Tumor, N= Lymphknoten, M= Metastasen
TR/TE	Repetition time/ Echo time
UICC	Union for International Cancer Control
USA	United States of America
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VV	Vaccinia Viren
Wnt	Wingless/Integrated Signalprotein
β-Cat	Beta Catenin
μg	Einheit: Mycrogram
μl	Einheit: Mycroliter
ρ	Rho, Pearson Korrelationskoeffizient
¹⁸ F-FLT	3'-deoxy-3'-[¹⁸ F]fluorothymidine
¹⁸ F-SFB	N-succinimidyl-4-[¹⁸ F]fluorobenzoate
%	Einheit: Prozent
°C	Einheit: Grad Celsius
¹⁸ F-FDG	(¹⁸ F)-Fluordesoxyglucose
3D	Dreidimensional
7T	7 Tesla
^{99m} Tc	Technetium-99m

8.4. Literaturverzeichnis

- 1 Rawla, P., et al., Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. World J Oncol. 2019 Feb; **10**(1): p. 10-27.
- 2 Bray, F., et al., Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018 Nov; **68**(6): p. 394-424.
- 3 McGuigan, A., et al., Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. World J Gastroenterol. 2018 Nov 21; **24**(43): p. 4846-4861.
- 4 Conlon, K.C., et al., Long-term survival after curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. Clinicopathologic analysis of 5-year survivors. Ann Surg. 1996 Mar; **223**(3): p. 273-9.
- 5 Tsuchiya, R., et al., Collective review of small carcinomas of the pancreas. Ann Surg. 1986 Jan; **203**(1): p. 77-81.
- 6 Spinelli, G., et al., Long-term survival in metastatic pancreatic cancer. A case report and review of the literature. JOP. 2006 Sep 10; **7**(5): p. 486-91.
- 7 Maisonneuve, P. and Lowenfels, A.B., Epidemiology of pancreatic cancer: an update. Dig Dis. 2010; **28**(4-5): p. 645-56.
- 8 Rawla, P., et al., Pancreatic cancer and obesity: epidemiology, mechanism, and preventive strategies. Clin J Gastroenterol. 2019 Aug; **12**(4): p. 285-291.
- 9 Saad, A.M., et al., Trends in pancreatic adenocarcinoma incidence and mortality in the United States in the last four decades; a SEER-based study. BMC Cancer. 2018 Jun 25; **18**(1): p. 688.
- 10 Ducreux, M., et al., ESMO Guidelines Committee. Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2015 Sep; **26** Suppl 5: p. 56-68.
- 11 Cannistrà, M., et al., Metastases of pancreatic adenocarcinoma: A systematic review of literature and a new functional concept. Int J Surg. 2015 Sep; **21** Suppl 1: p. 15-21.
- 12 Warshaw, A.L. and Castillo, C., Pancreatic carcinoma. N Engl J Med. 1992 Feb 13; **326**(7): p. 455-65.
- 13 Borad M.J., et al., Skeletal metastases in pancreatic cancer: a retrospective study and review of the literature. Yale J Biol Med. 2009 Mar; **82**(1): p. 1-6.

- 14 Basturk, O., et al., Baltimore Consensus Meeting. A Revised Classification System and Recommendations From the Baltimore Consensus Meeting for Neoplastic Precursor Lesions in the Pancreas. Am J Surg Pathol. 2015 Dec; **39**(12): p. 1730-41.
- 15 Laader A., et al., 1.5 versus 3 versus 7 Tesla in abdominal MRI: A comparative study. PLoS One. 2017 Nov 10; **12**(11):e0187528.
- 16 Neesse, A., et al., Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. Gut. 2011 Jun; **60**(6): p. 861-8.
- 17 Neesse, A., et al., Stromal biology and therapy in pancreatic cancer: a changing paradigm. Gut. 2015 Sep; **64**(9): p. 1476-84.
- 18 Waghray, M., et al., Deciphering the role of stroma in pancreatic cancer. Curr Opin Gastroenterol. 2013 Sep; **29**(5): p. 537-43.
- 19 Mürköster, S., et al., Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta. Cancer Res. 2004 Feb 15; **64**(4): p. 1331-7.
- 20 Schober, M., et al., Desmoplasia and chemoresistance in pancreatic cancer. Cancers (Basel). 2014 Oct 21; **6**(4): p. 2137-54.
- 21 Anderson, K. G., et al., Obstacles Posed by the Tumor Microenvironment to T cell Activity: A Case for Synergistic Therapies. Cancer Cell. 2017 Mar 13; **31**(3): p. 311-325.
- 22 Ashida, R., et al., The Role of Transabdominal Ultrasound in the Diagnosis of Early Stage Pancreatic Cancer: Review and Single-Center Experience. Diagnostics (Basel). 2018 Dec 26; **9**(1): p. 2.
- 23 Brimienė, V., et al., Differential diagnosis between chronic pancreatitis and pancreatic cancer: a prospective study of 156 patients. Medicina (Kaunas). 2011; **47**(3): p. 154-62.
- 24 Miura, F., et al., Diagnosis of pancreatic cancer. HPB (Oxford). 2006; **8**(5): p. 337-42.
- 25 Zhang, L., et al., Challenges in diagnosis of pancreatic cancer. World J Gastroenterol. 2018 May 21; **24**(19): p. 2047-2060
- 26 Al-Hawary, M.M. et al., Pancreatic ductal adenocarcinoma radiology reporting template: consensus statement of the Society of Abdominal Radiology and the American Pancreatic Association. Radiology. 2014 Jan; **270**(1): p. 248-60.

- 27 Ishigami, K., et al., Diagnostic value of the delayed phase image for iso-attenuating pancreatic carcinomas in the pancreatic parenchymal phase on multidetector computed tomography. Eur J Radiol. 2009 Jan; **69**(1): p. 139-46.
- 28 Chu, L.C., et al., Diagnosis and Detection of Pancreatic Cancer. Cancer J. 2017 Nov/Dec; **23**(6): p. 333-342.
- 29 Schima, W., MRI of the pancreas: tumours and tumour-simulating processes. Cancer Imaging. 2006 Dec 20; **6**(1): p. 199-203.
- 30 Calabrò D, et al., Role of PET/CT and Therapy Management of Pancreatic Neuroendocrine Tumors. Diagnostics (Basel). 2020 Dec 7;**10**(12): p. 1059.
- 31 Müller, M.F., et al., Pancreatic tumors: evaluation with endoscopic US, CT, and MR imaging. Radiology. 1994 Mar; **190**(3):p. 745-51.
- 32 Aslan, S., et al., Efficacy of perfusion CT in differentiating of pancreatic ductal adenocarcinoma from mass-forming chronic pancreatitis and characterization of isoattenuating pancreatic lesions. Abdom Radiol (NY). 2019 Feb; **44**(2): p. 593-603.
- 33 Paredes JL., et al., A non-invasive method of quantifying pancreatic volume in mice using micro-MRI. PLoS One. 2014 Mar 18;**9**(3):e92263.
- 34 Grünberg, K., et al.. Diffusionsbildgebung des Pankreas. Radiologe 2011 Feb; **51**: p. 186–194
- 35 De Robertis R., et al., Diffusion-weighted imaging of pancreatic cancer. World J Radiol. 2015 Oct 28;**7**(10): p. 319-28.
- 36 Wennier S., et al., Oncolytic virotherapy for pancreatic cancer. Expert Rev Mol Med. 2011 May 18; **13**:e18.
- 37 Bos, J.L., ras oncogenes in human cancer: a review. Cancer Res. 1989 Sep 1; **49**(17): p. 4682-9. Erratum in: Cancer Res. 1990 Feb 15; **50**(4): p. 1352.
- 38 Kanda, M., et al., Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. Gastroenterology. 2012 Apr; **142**(4): p. 730-733.e9.
- 39 McCubrey, J.A., et al., Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. Biochim Biophys Acta. 2007 Aug; **1773**(8): p. 1263-84. .
- 40 McCormick, F., K-Ras protein as a drug target. J Mol Med (Berl). 2016 Mar; **94**(3): p. 253-8.
- 41 Castellano, E. and Downward, J., RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. Genes Cancer. 2011 Mar; **2**(3): 261-74.

- 42 Ruggieri, B. A., et al., Amplification and overexpression of the AKT2 oncogene in a subset of human pancreatic ductal adenocarcinomas. Mol Carcinog. 1998 Feb; **21**(2): p. 81-6.
- 43 Yamamoto, S., et al., Prognostic significance of activated Akt expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. Clin Cancer Res. 2004 Apr 15; **10**(8): p. 2846-50.
- 44 Liang, Z.Y., et al., Topoisomerase IIalpha and HER2/neu gene alterations and their correlation in pancreatic ductal adenocarcinomas. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi. 2007 Feb; **36**(2): p. 102-6.
- 45 Li, X., et al., Prognostic role of HER2 amplification based on fluorescence in situ hybridization (FISH) in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC): a meta-analysis. World J Surg Oncol. 2016 Feb 20; **14**(1): p. 38.
- 46 Doran, Emma (2020) *Development of abdominal MRI at 7 Tesla*. PhD thesis, University of Nottingham.
- 47 Hahn, S.A., et al., DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. Science. 1996 Jan 19; **271**(5247): p. 350-3.
- 48 Ahmed, S., et al., The TGF- β /Smad4 Signaling Pathway in Pancreatic Carcinogenesis and Its Clinical Significance. J Clin Med. 2017 Jan 5; **6**(1): p. 5.
- 49 Massagué, J., How cells read TGF-beta signals. Nat Rev Mol Cell Biol. 2000 Dec; **1**(3): p. 169-78.
- 50 Kraff O, et al., MRI at 7 Tesla and above: demonstrated and potential capabilities. J Magn Reson Imaging. 2015 Jan; **41**(1): p. 13-33.
- 51 Sikdar, N., et al., Genetic Alterations of Periapillary and Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: An Overview. Curr Genomics. 2018 Sep; **19**(6): p. 444-463.
- 52 Srivastava, S.K., et al., MYB is a novel regulator of pancreatic tumour growth and metastasis. Br J Cancer. 2015 Dec 22; **113**(12): p. 1694-703.
- 53 Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. J Natl Cancer Inst. 1999 Aug 4; **91**(15): p. 1310-6.
- 54 Thompson, D., et al., Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. J Natl Cancer Inst. 2002 Sep 18; **94**(18): p. 1358-65.
- 55 Morton, J.P., et al., Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jan 5; **107**(1): p. 246-51.

- 56 Lane, D.P., Cancer. p53, guardian of the genome. Nature. 1992 Jul 2; **358**(6381):
p. 15-6.
- 57 Duffy, M.J., et al., Mutant p53 as a target for cancer treatment. Eur J Cancer.
2017 Sep; **83**: p. 258-265.
- 58 Lu, L. and Zeng, J., Evaluation of K-ras and p53 expression in pancreatic
adenocarcinoma using the cancer genome atlas. PLoS One. 2017 Jul 25; **12**(7):
e0181532.
- 59 Murphy, S.J., et al., Genetic alterations associated with progression from
pancreatic intraepithelial neoplasia to invasive pancreatic tumor.
Gastroenterology. 2013 Nov; **145**(5): p. 1098-1109.e1.
- 60 Hoff MN., et al., Safety Considerations of 7-T MRI in Clinical Practice.
Radiology. 2019 Sep; **292**(3): p. 509-518.
- 61 Brunner, M., et al., Current Clinical Strategies of Pancreatic Cancer Treatment
and Open Molecular Questions. Int J Mol Sci. 2019 Sep 13; **20**(18): p. 4543.
- 62 Doi, R., et al., Surgery versus radiochemotherapy for resectable locally invasive
pancreatic cancer: final results of a randomized multi-institutional trial. Surg
Today. 2008; **38**(11): p. 1021-8.
- 63 Grieser, C., et al., Preoperative multidetector row computed tomography for
evaluation and assessment of resection criteria in patients with pancreatic
masses. Acta Radiol. 2010 Dec; **51**(10): p. 1067-77.
- 64 Schachter, P.P., et al., The impact of laparoscopy and laparoscopic
ultrasonography on the management of pancreatic cancer. Arch Surg. 2000 Nov;
135(11): p. 1303-7.
- 65 Vollmer, C.M., et al., Utility of staging laparoscopy in subsets of peripancreatic
and biliary malignancies. Ann Surg. 2002 Jan; **235**(1): p. 1-7.
- 66 Tamburrino, D., et al., Selection criteria in resectable pancreatic cancer: a
biological and morphological approach. World J Gastroenterol. 2014 Aug 28;
20(32): p. 11210-5.
- 67 Noda, Y., et al., Modified National Comprehensive Cancer Network Criteria for
Assessing Resectability of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. AJR Am J
Roentgenol. 2018 Jun; **210**(6): p. 1252-1258.
- 68 Boggi, U., et al., Prognostic implications of tumor invasion or adhesion to
peripancreatic vessels in resected pancreatic cancer. Surgery. 2009 Nov; **146**(5):
p. 869-81.

- 69 Weibel S., et al., Imaging of intratumoral inflammation during oncolytic virotherapy of tumors by ¹⁹F-magnetic resonance imaging (MRI). PLoS One. 2013; **8**(2): e56317.
- 70 van der Gaag, N.A., et al., Preoperative biliary drainage for cancer of the head of the pancreas. N Engl J Med. 2010 Jan 14; **362**(2): p. 129-37.
- 71 Seufferlein, T., et al., Guidelines Programme Oncology AWMF; German Cancer Society eV; German Cancer Aid. S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom [S3-guideline exocrine pancreatic cancer]. Z Gastroenterol. 2013 Dec; **51**(12): p. 1395-440.
- 72 Hemminki O., et al., In vivo magnetic resonance imaging and spectroscopy identifies oncolytic adenovirus responders. Int J Cancer. 2014 Jun 15; **134**(12): p. 2878-90.
- 73 Kurokawa C., et al., Constitutive Interferon Pathway Activation in Tumors as an Efficacy Determinant Following Oncolytic Virotherapy. J Natl Cancer Inst. 2018 Oct 1;**110**(10): p. 1123-1132.
- 74 Ueno, H., et al., A randomised phase III trial comparing gemcitabine with surgery-only in patients with resected pancreatic cancer: Japanese Study Group of Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. Br J Cancer. 2009 Sep 15; **101**(6): p. 908-15.
- 75 Oettle, H., et al., Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. JAMA. 2007 Jan 17; **297**(3): p. 267-77.
- 76 Neoptolemos, J.P., et al., Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. JAMA. 2010 Sep 8; **304**(10): p. 1073-81.
- 77 Assifi, M.M., et al., Neoadjuvant therapy in pancreatic adenocarcinoma: a meta-analysis of phase II trials. Surgery. 2011 Sep; **150**(3): p. 466-73.
- 78 Moore, M.J., et al., Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. J Clin Oncol. 2007 May 20; **25**(15): p. 1960-6.
- 79 Conroy T., et al., Canadian Cancer Trials Group and the Unicancer-GI-PRODIGE Group. FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. N Engl J Med. 2018 Dec 20; **379**(25): p. 2395-2406.

- 80 Von Hoff, D.D., et al., Increased survival in pancreatic cancer with nab-
paclitaxel plus gemcitabine. N Engl J Med. 2013 Oct 31; **369**(18): p. 1691-703.
- 81 Heo J., et al., Sequential therapy with JX-594, a targeted oncolytic poxvirus,
followed by sorafenib in hepatocellular carcinoma: preclinical and clinical
demonstration of combination efficacy. Mol Ther 2011;**19**: p. 1170–9.
- 82 Wainberg, Z.A., et al., Meta-analysis examining overall survival in patients with
pancreatic cancer treated with second-line 5-fluorouracil and oxaliplatin-based
therapy after failing first-line gemcitabine-containing therapy: effect of
performance status and comparison with other regimens. BMC Cancer. 2020 Jul
8; **20**(1): p. 633.
- 83 Golan, T., et al., Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic
Pancreatic Cancer. N Engl J Med. 2019 Jul 25; **381**(4): p. 317-327.
- 84 Liu TC., et al., The targeted oncolytic poxvirus JX-594 demonstrates
antitumoral, antivascular, and anti-HBV activities in patients with
hepatocellular carcinoma. Mol Ther 2008; **16**: p. 1637–42.
- 85 Woo Y., et al., Novel Chimeric Immuno-Oncolytic Virus CF33-hNIS-
antiPDL1 for the Treatment of Pancreatic Cancer. J Am Coll Surg. 2020 Apr;
230(4): p. 709-717.
- 86 Krempley, B.D. and Yu, K.H., Preclinical models of pancreatic ductal
adenocarcinoma. Chin Clin Oncol. 2017 Jun; **6**(3): p. 25.
- 87 Hingorani, S.R., et al., Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote
chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal
adenocarcinoma in mice. Cancer Cell. 2005 May; **7**(5): p. 469-83.
- 88 Schmohl, K.A., et al., Imaging and targeted therapy of pancreatic ductal
adenocarcinoma using the theranostic sodium iodide symporter (NIS) gene.
Oncotarget. 2017 May 16; **8**(20): p. 33393-33404.
- 89 Collins, M.A., et al., Metastatic Pancreatic Cancer Is Dependent on Oncogenic
Kras in Mice. PLoS ONE. 2012; **7**(12): e49707.
- 90 Gürlevik, E., et al., Administration of Gemcitabine After Pancreatic Tumor
Resection in Mice Induces an Antitumor Immune Response Mediated by Natural
Killer Cells. Gastroenterology. 2016 Aug; **151**(2): p. 338-350.e7.
- 91 Grimm J., et al., Magnetic resonance imaging of the pancreas and pancreatic
tumors in a mouse orthotopic model of human cancer. Int J Cancer. 2003 Sep
20; **106**(5): p. 806-11.

- 92 Polasek M., et al., Molecular MR imaging of fibrosis in a mouse model of pancreatic cancer. Sci Rep. 2017 Aug 14; **7**(1): p. 8114.
- 93 Rahib L, et al., Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. Cancer Res. 2014 Jun 1; **74**(11): p. 2913-21.
- 94 Nurmi A., et al., Neoadjuvant therapy offers longer survival than upfront surgery for poorly differentiated and higher stage pancreatic cancer. Acta Oncol. Jun. 2018; **57**(6): p. 799-806.
- 95 Grözinger G et al. Die Rolle des Volumenperfusions-CT in der Diagnostik von Pankreopathologika. Fortschr Röntgenstr 2014; **186**: p. 1082–1093
- 96 Winter JM., et al., Diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in pancreatic cancer. J Surg Oncol. Jan 2013, **107**(1): p. 15-22.
- 97 Park, B.H., et al., Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: a phase I trial. Lancet Oncol. 2008 Jun; **9**(6): p. 533-42.
- 98 Galanis, E., et al., Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer. Cancer Res. 2010 Feb 1; **70**(3): p. 875-82.
- 99 Deng, L., et al., An Oncolytic Vaccinia Virus Armed with GM-CSF and IL-24 Double Genes for Cancer Targeted Therapy. Onco Targets Ther. 2020 Apr 28; **13**: p. 3535-3544.
- 100 Bilsland, A.E., et al., Virotherapy: cancer gene therapy at last? F1000Res. 2016 Aug 30; **5**: F1000 Faculty Rev-2105.
- 101 Andtbacka, R.H., et al., Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. J Clin Oncol. 2015 Sep 1; **33**(25): p. 2780-8.
- 102 Blasco, M.A., et al., Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. Cell. 1997 Oct 3; **91**(1): p. 25-34.
- 103 Greider, C.W., Telomere length regulation. Annu Rev Biochem. 1996; **65**: p. 337-65.
- 104 Shay, J.W. and Bacchetti, S., A survey of telomerase activity in human cancer. Eur J Cancer. 1997 Apr; **33**(5): p. 787-91.

- 105 Zhang, Y., et al., Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is a novel target of the Wnt/ β -catenin pathway in human cancer. J Biol Chem. 2012 Sep 21; **287**(39): p. 32494-511.
- 106 Weinrich, S.L., et al., Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. Nat Genet. 1997 Dec; **17**(4): p. 498-502.
- 107 Vaziri, H. and Benchimol, S., Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. Curr Biol. 1998 Feb 26; **8**(5): p. 279-82.
- 108 Kirn, D., et al., Replication-selective virotherapy for cancer: Biological principles, risk management and future directions. Nat Med. 2001 Jul; **7**(7): p. 781-7.
- 109 Clevers, H., Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. Cell. 2006 Nov 3; **127**(3): p. 469-80.
- 110 Houschyar, K.S., et al., Wnt signaling induces epithelial differentiation during cutaneous wound healing. Organogenesis. 2015; **11**(3): p. 95-104. Erratum in: Organogenesis. 2015; **11**(4): p. 210.
- 111 Morin, P.J., beta-catenin signaling and cancer. Bioessays. 1999 Dec; **21**(12): p. 1021-30.
- 112 Wirth T., et al., A telomerase-dependent conditionally replicating adenovirus for selective treatment of cancer. Cancer Res. 2003 Jun 15; **63**(12): p. 3181-8. Erratum in: Cancer Res. 2018 Oct 15; **78**(20): p. 6027.
- 113 Kim, H., et al., Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. Lab Anim Res. 2018 Dec; **34**(4): p. 147-159.
- 114 Niknafs, N., et al., Characterization of genetic subclonal evolution in pancreatic cancer mouse models. Nat Commun. 2019 Nov 28; **10**(1): p. 5435.
- 115 Laird, A.K., DYNAMICS OF TUMOR GROWTH. Br J Cancer. 1964 Sep; **13**(3): p. 490-502.
- 116 Ayres Pereira M., Metastasis in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current Standing and Methodologies. Genes (Basel). 2019 Dec 19; **11**(1): p. 6.
- 117 Chatterjee, D., et al., Tumor invasion of muscular vessels predicts poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma who have received neoadjuvant therapy and pancreaticoduodenectomy. Am J Surg Pathol. 2012 Apr; **36**(4): p. 552-9.

- 118 Lee S.J. ,et al., Comprehensive histological evaluation with clinical analysis of venous invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma: From histology to clinical implications. Pancreatology. 2020 Oct; **20**(7): p. 1486-1494.
- 119 Olive, K.P. and Tuveson, D.A., The use of targeted mouse models for preclinical testing of novel cancer therapeutics. Clin Cancer Res. 2006 Sep 15; **12**(18): p. 5277-87.
- 120 Fox, N.M.Jr., et al., PSEUDOCYST CO-EXISTENT WITH PANCREATIC CARCINOMA. Ann Surg. 1963 Dec; **158**(6): p. 971-4.
- 121 Aguilera Munoz L, et al. Gastrointestinal bleeding in patients with pancreatic cancer: Causes and haemostatic treatments. United European Gastroenterol J. 2020 Nov; **8**(9): p. 1106-1114.
- 122 Takada R., et al., Duodenal Hemorrhage from Pancreatic Cancer Infiltration Controlled through Combination Therapy with Gemcitabine and S-1. Case Rep Gastroenterol. 2014 Jun 14; **8**(2): p. 221-6.
- 123 Mueller, S., et al., Evolutionary routes and KRAS dosage define pancreatic cancer phenotypes. Nature. 2018 Feb 1; **554**(7690): p. 62-68.
- 124 Qian, Y., et al., Molecular alterations and targeted therapy in pancreatic ductal adenocarcinoma. J Hematol Oncol. 2020 Oct 2; **13**(1): p. 130.
- 125 Bang-Nielsen, A., et al., Large Bowel Obstruction due to Pancreatic Cancer - A Case Series. SM J Clin Med. 2018; **4**(1): p. 1033.
- 126 Griffin, R., et al., Carcinoma of the tail of the pancreas presenting as acute abdomen. JOP. 2012 Jan 10; **13**(1): p. 58-60.
- 127 Kelley, K.M., et al., Malignant Large Bowel Obstruction: A Rare Presentation of Metastatic Pancreatic Cancer. Am Surg. 2016 Aug; **82**(8): p. 206-8.
- 128 Takahara, N., et al., Pancreatic cancer with malignant ascites: clinical features and outcomes. Pancreas. 2015 Apr; **44**(3): p. 380-5.
- 129 Distler, M., et al., Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN. Biomed Res Int. 2014; 2014: 474905.
- 130 Oweira, H., et al., Prognostic value of site-specific metastases in pancreatic adenocarcinoma: A Surveillance Epidemiology and End Results database analysis. World J Gastroenterol. 2017 Mar 14; **23**(10): p. 1872-1880.
- 131 Del Vecchio, S., et al., Molecular imaging of tumor microenvironment: challenges and perspectives. Q J Nucl Med Mol Imaging. 2010 Jun; **54**(3): p. 249-58.

- 132 Rodallec, A., et al., Turning cold tumors into hot tumors: harnessing the potential of tumor immunity using nanoparticles. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2018 Nov; **14**(11): p. 1139-1147.
- 133 Krekorian, M., et al., Imaging of T-cells and their responses during anti-cancer immunotherapy. Theranostics. 2019 Oct 16; **9**(25): p. 7924-7947.
- 134 Claus, C., et al., Tumor-targeted 4-1BB agonists for combination with T cell bispecific antibodies as off-the-shelf therapy. Sci Transl Med. 2019 Jun 12; **11**(496): eaav5989.
- 135 Larimer, B.M., et al., Granzyme B PET Imaging as a Predictive Biomarker of Immunotherapy Response. Cancer Res. 2017 May 1; **77**(9): p. 2318-2327.
- 136 Larimer, B.M., et al., The Effectiveness of Checkpoint Inhibitor Combinations and Administration Timing Can Be Measured by Granzyme B PET Imaging. Clin Cancer Res. 2019 Feb 15; **25**(4): p. 1196-1205.
- 137 Gibson, H.M., et al., IFN γ PET Imaging as a Predictive Tool for Monitoring Response to Tumor Immunotherapy. Cancer Res. 2018 Oct 1; **78**(19): p. 5706-5717.
- 138 Belhocine, T.Z., et al., (99m)Tc-Annexin A5 quantification of apoptotic tumor response: a systematic review and meta-analysis of clinical imaging trials. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2015 Dec; **42**(13): p. 2083-97.
- 139 Yagle, K.J., et al., Evaluation of 18F-annexin V as a PET imaging agent in an animal model of apoptosis. J Nucl Med. 2005 Apr; **46**(4): p. 658-66.
- 140 Kelly, E. and Russell, S. J., History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. Mol Ther. 2007 Apr; **15**(4): p. 651-9.
- 141 Engeland, C.E. and Ungerechts, G., Immuntherapie mit onkolytischen Viren: Wenn Tumorzellen zum „Platzen“ bringen. Dtsch Arztebl. 2019; **116**(23-24): p. 10.
- 142 Robilotti, E.V., et al., Viral oncolytic immunotherapy in the war on cancer: Infection control considerations. Infect Control Hosp Epidemiol. 2019 Mar; **40**(3): p. 350-354.
- 143 Li, L., et al., Delivery and Biosafety of Oncolytic Virotherapy. Front Oncol. 2020 Apr 16; **10**: p. 475.
- 144 Russell, S.J., et al., Oncolytic virotherapy. Nat Biotechnol. 2012 Jul 10; **30**(7): p. 658-70.

- 145 Stepanenko, A.A. and Chekhonin, V. P., Recent Advances in Oncolytic Virotherapy and Immunotherapy for Glioblastoma: A Glimmer of Hope in the Search for an Effective Therapy? Cancers (Basel). 2018 Dec 5; **10**(12): p. 492.
- 146 Martikainen, M. and Essand, M., Virus-Based Immunotherapy of Glioblastoma. Cancers (Basel). 2019 Feb 5; **11**(2): p. 186.
- 147 Lauer, U.M., et al., Phase I Study of Oncolytic Vaccinia Virus GL-ONC1 in Patients with Peritoneal Carcinomatosis. Clin Cancer Res. 2018 Sep 15; **24**(18): p. 4388-4398.
- 148 Twumasi-Boateng, K., et al., Oncolytic viruses as engineering platforms for combination immunotherapy. Nat Rev Cancer. 2018 Jul; **18**(7): p. 419-432.
- 149 Bommareddy, P.K., et al., Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy. Nat Rev Immunol. 2018 Aug; **18**(8): p. 498-513.
- 150 Ribas, A, et al., Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy. Cell. 2017 Sep 7; **170**(6): p. 1109-1119.
- 151 Wynn, T.A., Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. J Pathol. 2008 Jan; **214**(2):p. 199-210.
- 152 Yeh, R., et al., The Role of 18F-FDG PET/CT and PET/MRI in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Abdom Radiol (NY). 2018 Feb; **43**(2): p. 415-434.
- 153 Jiang, H., et al., Tumor-associated fibrosis as a regulator of tumor immunity and response to immunotherapy. Cancer Immunol Immunother. 2017 Aug; **66**(8): p. 1037-1048.
- 154 Rosewell Shaw, A. und Suzuki, M., Recent advances in oncolytic adenovirus therapies for cancer. Curr Opin Virol. 2016 Dec; **21**: p. 9-15.
- 155 Goldmacher, G.V., et al., Response Criteria for Intratumoral Immunotherapy in Solid Tumors: itRECIST. J Clin Oncol. 2020 Aug 10; **38**(23): p. 2667-2676.
- 156 Kubicka, F., et al., Untersuchung des entzündlichen Tumormikromilieus nach onkolytischer Virotherapie in einem neuartigen transgenen Pankreaskarzinom-Mausmodell durch MRT. Rofo. 2019; **191**(S 01): p. 9-10.
- 157 Wissler H.L., et al., Site-Specific Immuno-PET Tracer to Image PD-L1. Mol Pharm. 2019 May 6; **16**(5): p. 2028-2036.
- 178 Hettich M., et al., High-Resolution PET Imaging with Therapeutic Antibody-based PD-1/PD-L1 Checkpoint Tracers. Theranostics. 2016 Jun 18; **6**(10): p. 1629-40.

- 179 Lawler SE., et al., Oncolytic Viruses in Cancer Treatment: A Review. JAMA Oncol. 2017 Jun 1; **3**(6): p. 841-849.
- 180 Ansel A., et al., Monitoring the Efficacy of Oncolytic Viruses *via* Gene Expression. Front Oncol. 2017 Nov **6**;7: p. 264.
- 181 Pelin A., et al., The importance of imaging strategies for pre-clinical and clinical in vivo distribution of oncolytic viruses. Oncolytic Virother. 2018 Mar **28**;7: p. 25-35.
- 182 Bauer TM., et al., Carbohydrate antigen 19-9 is a prognostic and predictive biomarker in patients with advanced pancreatic cancer who receive gemcitabine-containing chemotherapy: a pooled analysis of 6 prospective trials. Cancer 2013; **119**: p. 285–292
- 183 Zou P., etv al., Oncolytic virotherapy, alone or in combination with immune checkpoint inhibitors, for advanced melanoma: A systematic review and meta-analysis. Int Immunopharmacol. 2020 Jan; **78**: p. 106050.
- 184 Wennier ST., et al., Bugs and drugs: oncolytic virotherapy in combination with chemotherapy. Curr Pharm Biotechnol. 2012 Jul; **13**(9): p. 1817-33.
- 185 Lim KP and Zainal NS. Monitoring T Cells Responses Mounted by Therapeutic Cancer Vaccines. Front Mol Biosci. 2021 Apr 15; **8**: p. 623475.
- 186 Wiesmann F., et al., High-resolution MRI with cardiac and respiratory gating allows for accurate in vivo atherosclerotic plaque visualization in the murine aortic arch. Magn Reson Med. 2003 Jul; **50**(1): p. 69-74.
- 187 Zhang F., et al., 7.0 tesla high resolution MRI study on intracerebral migration of magnet-labeled neural stem cells in a mouse model of Alzheimer's disease. Magn Reson Imaging. 2018 Dec; **54**: p. 58-62.
- 188 Rosestedt M., et al., Radiolabelling and positron emission tomography imaging of a high-affinity peptide binder to collagen type 1. Nucl Med Biol. 2021 Feb; **93**: p. 54-62.
- 189 Teng MW., et al., Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. Cancer Res. 2015 Jun 1; **75**(11): p. 2139-45.
- 190 Andtbacka RH., et al., Patterns of Clinical Response with Talimogene Laherparepvec (T-VEC) in Patients with Melanoma Treated in the OPTiM Phase III Clinical Trial. Ann Surg Oncol. 2016 Dec; **23**(13): p. 4169-4177.

- 191 Koski A., et al., [F18]-FDG-PET Versus CT for Evaluation of Oncolytic Virus Treatment in Advanced Cancer Patients. Molecular Therapy. 2012 May 2; Volume 20, Supplement 1, p. 48.
- 192 Taylor R., Interpretation of the Correlation Coefficient: A Basic Review, JDMS 1990 Jan ; **1**: p. 35-39
- 193 Partecke IL., et al., In vivo imaging of pancreatic tumours and liver metastases using 7 Tesla MRI in a murine orthotopic pancreatic cancer model and a liver metastases model. BMC Cancer. 2011 Jan 28;**11**: p. 40.
- 194 Kasten BB., et al., Positron emission tomography imaging with ⁸⁹Zr-labeled anti-CD8 cys-diabody reveals CD8⁺ cell infiltration during oncolytic virus therapy in a glioma murine model. Sci Rep. 2021 Jul 28; **11**(1): p. 15384.
- 195 Concilio SC, et al., A brief review of reporter gene imaging in oncolytic virotherapy and gene therapy. Mol Ther Oncolytics. 2021 Mar 10; **21**: p. 98-109.
- 196 Bodalal Z, et al., Radiogenomics: bridging imaging and genomics. Abdom Radiol (NY). 2019 Jun; **44**(6): p. 1960-1984.



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

selbständig 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.

Felix Maximilian Kubicka-Hurst

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand