

Theresa Elise Schäfer
Dr. med.

Molecular stratification for the optimization of oncolytic virotherapy in pancreatic ductal adenocarcinoma

Einrichtung: DKFZ

Doktormutter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Christine E. Engeland

Als onkolytische Viren werden Viren bezeichnet, die einen natürlichen Tropismus für Krebszellen aufweisen. Ihr antineoplastischer Effekt beruht hauptsächlich auf zwei Mechanismen: zum einen führt eine Infektion der maligne veränderten Zellen mit dem Virus zum direkten Zelltod durch virale Onkolyse, zum anderen führt die intratumorale virale Replikation zu einer Aktivierung der endogenen, patienteneigenen Immunantwort, welche dann gegen die Krebszellen aktiv wird. Die Therapie mit onkolytischen Viren befindet sich aktuell noch in der (prä-)klinischen Erforschung, einige wenige onkolytische Viren haben bereits die klinische Zulassung erlangt. Zahlreiche Viren aus verschiedensten Virusfamilien werden derzeit zu onkolytischen Viren entwickelt. Allerdings fehlen systematische Vergleiche zwischen den Viren und prädiktive Faktoren, die das Ansprechen auf eine Therapie mit onkolytischen Viren vorhersagen und so Hinweise geben, welche Patienten von dieser Therapie profitieren könnten.

Das Pankreaskarzinom geht mit einer äußerst schlechter Prognose einher und ist eine der Tumorentitäten mit den niedrigsten Fünf-Jahres-Überlebensraten. Behandlungsoptionen sind häufig limitiert, daher werden onkolytische Viren als neuer Therapieansatz erforscht. Eine kurative Behandlung durch chirurgische Resektion ist bei vielen Patienten nicht möglich, da die Diagnose oft erst zu einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium der Erkrankung gestellt wird. Dies verdeutlicht den großen Bedarf an neuen Therapieoptionen in der medizinischen Behandlung des Pankreaskarzinoms.

In diesem Projekt wurden onkolytische Viren aus fünf verschiedenen Virusfamilien eingesetzt, die sich gerade in der Entwicklung befinden: ein Adenovirus, ein Parvovirus, ein Masernvirus, ein Reovirus und ein Herpes-Simplex-Virus. Diese wurden in einem *in vitro* Modell des Pankreaskarzinoms verglichen. Das gewählte Modell aus vierzehn patientenabgeleiteten Kulturen des Pankreaskarzinoms soll die große inter- und intratumorale Heterogenität dieser Krebsentität abbilden. Um die unterschiedlichen Infektionskinetiken der fünf Viren in den Kulturen zu berücksichtigen, wurden in Vorbereitung auf den eigentlichen Screen mit allen Viren vorab Test-Screens an zwei bis drei der Kulturen durchgeführt, in denen die optimalen Zeitpunkte und Virusdosierungen für die einzelnen Experimente evaluiert wurden. Im Screen mit allen Kulturen wurden Daten erhoben, die den viralen Replikationszyklus reflektieren. So wurden morphologische Veränderungen nach Infektion über lichtmikroskopische Bilder dokumentiert, virale Gen- bzw. Genomexpression wurde mittels qPCR quantifiziert, der zytotoxische Effekt wurde mittels LDH-Freisetzung evaluiert, die Zellviabilität nach Infektion wurde mit dem metabolischen XTT-Assay bestimmt und die Freisetzung viraler Nachkommenpartikel aus den PDAC-Kulturen mittels Titration quantifiziert. Außerdem wurde die Infektion kontinuierlich mit Hilfe der IncuCyte- und xCELLigence-Systeme überwacht. Die Ergebnisse dieses Screens bilden einen großen Datensatz, welcher das unterschiedliche Ansprechen der Pankreaskarzinom-Kulturen auf eine Behandlung mit den verschiedenen

onkolytischen Viren veranschaulicht. Als primären Endpunkt, der als Surrogatparameter für das Ansprechen der Kulturen und somit als Referenz für nachfolgende Analysen diente, wurde die z-score normalisierte Reduktion der Zellviabilität nach Infektion gewählt.

Mittels RNA-Microarray wurde das Genexpressionsprofil der vierzehn Kulturen in einem nicht-infizierten Zustand analysiert. In einem nächsten Schritt wurde dieses mit den experimentellen Viabilitätsdaten korreliert, um Faktoren und Muster zu identifizieren, die das Ansprechen vorhersagen können.

Dazu wurden, in Kooperation mit Dr. Lisanne Knol, NCT Dresden, zwei verschiedene Ansätze entwickelt. Im ersten Ansatz wurden, ausgehend von den Transkriptom-Daten, zwei Cluster identifiziert, welchen sechs bzw. sieben der Kulturen zugeordnet werden konnten. Eine Analyse der Expressionsprofile dieser beiden Cluster ergab jeweils eine Assoziation mit zwei unterschiedlichen, in der Literatur beschriebenen Subtypen des Pankreaskarzinoms, dem "klassischen Subtyp" und dem "quasimesenchymalen" Subtyp. Für drei der fünf Viren wurde ein besseres Ansprechen der Kulturen des "quasimesenchymalen" Subtyps beobachtet. Im zweiten Ansatz wurde, ausgehend von den experimentellen Daten zur Sensitivität, für jedes Virus separat nach Genen gesucht, deren Expression mit der Reduktion der Zellviabilität korrelierten. Eine erste, unvoreingenommene Korrelation resultierte in einer Rangliste von Genen, welche zunächst als Input für eine Pathway-Analyse genutzt wurde. In dieser konnten einige Pathways identifiziert werden, die möglicherweise in Sensitivitäts- oder Resistenzmechanismen gegenüber onkolytischen Viren impliziert sind. Anschließend wurden in einer Literaturrecherche bereits bekannte Wirtsfaktoren gesucht, von denen einige in der hier vorliegenden Analyse wiedergefunden werden konnten.

Eine Kernaussage der experimentellen Ergebnisse ist die Heterogenität des Ansprechens patientenabgeleiteter Tumoren auf die Behandlung mit verschiedenen onkolytischen Viren. Dies verdeutlicht den dringenden Bedarf einer Patientenstratifizierung vor klinischen Studien sowie in der klinischen Praxis im Rahmen einer Hinwendung zu einer stärker personalisierten Tumorthherapie. Für drei der fünf Viren, und zwar für Parvo-, Reo- und Herpes Simplex Virus, wurde ein Zusammenhang zwischen molekularem Subtyp und Ansprechen auf die Therapie beobachtet. Auch konnten in der Literatur vorbeschriebene Wirtsfaktoren in diesem Ansatz wiedergefunden werden, beispielsweise die Interferon-Sensitivität des Masernvirus. So konnte der hier gewählte Ansatz indirekt validiert werden. Die Ergebnisse des hier beschriebenen Screens sind primär deskriptiver Natur und erfordern eine weitergehende Validierung *in vitro* und *in vivo*. Der gewählte Ansatz erlaubte ausschließlich die Erforschung von Faktoren der direkten Virus-Tumorzell-Interaktion. Es sind weitergehende Experimente und Studien nötig, um die hier beschriebenen Korrelationen beispielsweise in größeren Kollektiven zu bestätigen, um die Resistenz- und Sensitivitätsmechanismen genauer zu explorieren und den Aspekt der komplexen Immunaktivierung durch onkolytische Viren zu berücksichtigen, der mutmaßlich eine wichtige Rolle in der Therapieeffektivität von onkolytischen Viren spielt.

Zusammenfassend liefert diese Studie einen großen Datensatz zur Sensitivität von vierzehn patientenabgeleiteten Pankreaskarzinom-Kulturen gegenüber fünf onkolytischen Viren und kann als Grundlage für weitergehende Forschung dienen, um die Anwendung von onkolytischen Viren für Krebspatienten zu optimieren.