

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

Abteilung für Gastroenterologie
ehemaliger Leiter: Prof. Dr. med. A. Eigler

**Charakterisierung der Wirkung von Gemcitabin auf die
Immuntherapie mittels dendritischer Zellen in einem
autologen Pankreaskarzinommodell der Maus**

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

Vorgelegt von
Alexander Sterzik
aus München

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Eigler

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Markus Guba
Priv. Doz. Dr. med. Lars H. Lindner
Priv. Doz. Dr. rer. nat. Andreas Herbst

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Christian Bauer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 19.04.2012

*Diese Promotion widme ich meinen
Eltern in Dankbarkeit*

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das Pankreaskarzinom	1
1.1.1. Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2. Pathologie	1
1.1.3. Lokalisation und Metastasierung.....	2
1.1.4. Klinik und Diagnostik	3
1.1.5. Therapieoptionen.....	3
1.2. Gemcitabin	6
1.2.1. Zelluläre Pharmakologie	6
1.2.2. Nebenwirkungen	8
1.2.3. Pharmakokinetische Daten	8
1.3. Dendritische Zellen	9
1.3.1. Immunologische Funktion der dendritischen Zellen	11
1.3.2. Dendritische Zellen in der Immuntherapie	13
1.4. Zielsetzung der vorliegenden Doktorarbeit	16
2. Material und Methoden	17
2.1. Geräte, Chemikalien, Reagenzien	17
2.1.1. Geräte	17
2.1.2. Materialien für tierexperimentelle Arbeiten	17
2.1.3. Materialien für Zellkultur	18
2.1.4. Chemikalien und Reagenziensätze	18
2.1.5. Zytokine, Wachstumsfaktoren und Stimulanzen	19
2.1.6. Zellkulturmedien, Puffer, Lösungen	19
2.1.7. Verwendete Pharmaka	19

2.1.8. Verwendete Zelllinien	20
2.1.9. Peptide	20
2.1.10. Antikörper	20
2.2. Tierhaltung und tierexperimentelle Arbeiten	21
2.2.1. Tierhaltung und Tierversuchsantrag	21
2.2.2. Transgene Tiere	22
2.2.3. Immunisierung mit dendritischen Zellen	22
2.2.4. Dosierung und Gabe von Gemcitabin	22
2.2.5. Isolation von Effektorzellen aus Milz und Lymphknoten	22
2.2.6. Isolation von Blutleukozyten.....	23
2.2.7. Zellvermittelter <i>in vivo</i> -Zytotoxizitätstest.....	23
2.2.8. Nachweis OT-1-Proliferation <i>in vivo/in vitro</i>	24
2.2.9. Tumormodelle	24
2.2.9.1. Subkutaner Tumormodell	24
2.2.9.2. Orthotopes Tumormodell	25
2.2.9.3. Bildgebung mittels Kleintier-CT	25
2.3. Zellulär-immunologische Methoden	26
2.3.1. Zellkultur	26
2.3.2. Bestrahlung von Tumorzellen	26
2.3.3. Isolation und Kultivierung von dendritischen Zellen	26
2.3.4. Antigenbeladung und Reifeinduktion dendritischer Zellen	27
2.3.5. Durchflusszytometrie	27
2.3.5.1. Bestimmung von Oberflächenmolekülen	27
2.3.5.2. Intrazelluläre IFN- γ -Färbung	28
2.3.5.3. MHC-I-Pentamer Färbung	28
2.3.6. Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA)	29

2.3.6.1. Nachweis OVA-spezifischer Antikörper aus dem Serum	29
2.3.7. Zellvermittelter Zytotoxizitätstest (⁵¹ Chrom-Lyse Test)	29
2.4. Statistische Analyse	30
3. Ergebnisse	31
3.1. Etablierung des OVA-Modellantigen-Systems zum Nachweis der induzierten immunologischen Antwort nach DC-Vakzinierung.....	31
3.1.1. Die subkutane Vakzinierung mittels OVA-Protein gepulster dendritischer Zellen führt zu einer nachweisbaren T-Zellantwort <i>in vivo</i>	31
3.1.2. Intraperitoneal und intravenös verabreichte OVA-DC sind effektiver als subkutan applizierte OVA-DC in Bezug auf die induzierte T-Zellantwort.....	32
3.1.3. Mit apoptotischen Panc02-OVA beladene DC induzieren keine mittels IFN- γ - oder Pentamer-Färbung nachweisbare CD8-T-Zellantwort.....	34
3.2. Einfluss von Gemcitabin auf die mittels DC-Vakzine induzierte Immunantwort im tumorfreien System.....	35
3.2.1. Suppression der adaptiven Immunantwort durch Gemcitabin <i>in vivo</i>	36
3.2.2. Gemcitabin nimmt keinen Einfluss auf Antigenpräsentation und T-Zellstimulation der DC-Vakzine <i>in vivo</i>	37
3.2.3. Gemcitabin hemmt die Proliferation von CD8-T-Zellen <i>in vitro</i>	39
3.2.4. Durch Modifikation des Vakzinierungsschemas lässt sich die Gemcitabinvermittelte Reduktion der Immunantwort vermindern.....	40
3.3. DC-Immuntherapie und Gemcitabin im subkutanen Panc02-OVA-Modell.....	42
3.3.1. Synergistischer Effekt im subkutanen Panc02-OVA-Modell trotz Reduktion der adaptiven Immunantwort.....	42
3.3.2. Immunmodulatorische Auswirkungen von Gemcitabin im subkutanen Panc02-OVA-Modell.....	45
3.3.3. Gemcitabin führt zu einer Sensibilisierung von Panc02-OVA gegenüber der CD8-vermittelten Lyse durch OT-1-Zellen im <i>in vitro</i> -Zytotoxizitätstest.....	48
3.3.4. Klinische Unterlegenheit des 2ndGem-Regimes im subkutanen Panc02-OVA-Modell gegenüber dem klassischen OVA-DC+Gem-Therapieschema.....	50
3.4. Erweiterung des Tumormodells auf die orthotope Ebene	52
3.4.1. Kein therapeutischer Effekt der subkutanen Panc02-OVA-DC Vakzine im orthotopen Tumormodell.....	52

3.4.2. Überlegene therapeutische Wirkung der intraperitonealen DC-Vakzinierung im orthotopen Tumormodell.....	54
4. Diskussion	57
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse	57
4.1.1 Ergebnisse der Etablierung der OVA-DC-Vakzinierung	57
4.1.2. Einfluss von Gemcitabin auf die mittels DC-Vakzine induzierte Immunantwort im tumorfreien System	57
4.1.3. Charakterisierung des Einflusses von Gemcitabin im tumortragenden System	58
4.1.4. Übertragung des Tumormodells auf die orthotope Ebene	59
4.2. Diskussion der Ergebnisse vor dem Hintergrund aktueller Literaturdaten	59
4.2.1. Ergebnisse der Etablierung der OVA-DC-Vakzinierung	59
4.2.2. Gemcitabin: mehr als nur ein gewöhnliches Zytostatikum	65
4.2.3. DC-Immuntherapie und Gemcitabin im subkutanen Panc02-OVA-Tumormodell	67
4.2.4. Vorteile der intraperitonealen DC-Vakzinierungsstrategie bei der Therapie intrapankreatischer Tumoren	72
4.3. Ausblick: Immuntherapeutische Ansätze in klinischen Studien des Pankreaskarzinoms	76
5. Zusammenfassung	78
6. Literaturverzeichnis	80
7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme	90
Danksagung	91
Publikationen	92

1. Einleitung:

1.1. Das Pankreaskarzinom

1.1.1. Epidemiologie und Ätiologie

Die Inzidenz des Adenokarzinoms des Pankreas in der Bevölkerung liegt derzeit in Deutschland bei 13 000 Neuerkrankungen pro Jahr, wobei sich in den letzten Jahren eine leichte Zunahme der Erkrankungshäufigkeit – insbesondere bei Frauen – verzeichnen lässt (1). Damit kommt es nach dem Kolon- bzw. dem Magenkarzinom an dritter Stelle in der Gesamthäufigkeitsstatistik aller Tumore des Verdauungstraktes. Aufgrund seiner hohen Mortalitätsrate von über 95 Prozent rangiert es im Verzeichnis aller Krebstodesfälle sogar auf Platz vier in Deutschland (2). Das Pankreaskarzinom ist ein Tumor des höheren Lebensalters und manifestiert sich bei Männern meist um das 67. Lebensjahr, während sein Auftreten bei Frauen durchschnittlich erst nach der siebten Lebensdekade zu beobachten ist. Bemessen an der Geschlechterverteilung ist es bei Letzteren mittlerweile etwas häufiger anzutreffen (2).

Die genaue Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist noch weitgehend unklar. Unter den äußeren Einflüssen konnte nur das Zigarettenrauchen als Risikofaktor sicher nachgewiesen werden (3). Darüber hinaus scheinen Alkoholabusus sowie eine fett-/fleischreiche Ernährung als prädisponierende Faktoren für die Entstehung des Pankreaskarzioms von Bedeutung zu sein (4). Auch weitere Wohlstandserkrankungen wie Adipositas (5) oder Diabetes mellitus (6) finden sich vermehrt bei Patienten mit diesem Tumorleiden. Neben familiär gehäuft auftretenden Formen (7) wird ferner für die hereditäre chronische Pankreatitis (8), die alkoholbedingte chronische Pankreatitis (9), für zystische Neoplasien des Pankreas (10) sowie für die berufliche Exposition gegenüber bestimmten Noxen - wie 2-Naphtylamin, Benzidin oder Benzolderivaten - ein erhöhtes Pankreaskarzinomrisiko diskutiert (11).

1.1.2. Pathologie

Ausgangsort für die Entstehung des Adenokarzinoms des Pankreas ist in 90 Prozent der Fälle das Drüsenepithel der kleinen Pankreasgänge (duktales Pankreasadenokarzinom). Daneben gibt es noch weitere Formen wie das Azinuszellkarzinom, das Zystadenokarzinom sowie das intraduktale papillär-muzinöse Karzinom, auf die sich die verbleibenden 10 Prozent verteilen.

Ähnlich wie bei anderen Tumorentitäten werden auch beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas intraepitheliale Neoplasien (PanIN) als Vorläuferstufen postuliert, welche gemäß ihres Dysplasiegrades in unterschiedliche Stadien – PanIN-1A, -1B, -2 und -3 – unterteilt werden. Genetische Untersuchungen haben dabei mittlerweile eine Reihe von Schlüsselgenen identifiziert (u.a. aktivierende Mutationen der GTPase K-Ras, inaktivierende Mutationen in Tumorsuppressorgenen wie DPC4/Smad4, p53, CDKN2 und BRCA2), die bei der Tumorprogression vom Normalgewebe über präneoplastische Gangläsionen zum duktalem Adenokarzinom führen (11, 1).

1.1.3. Lokalisation und Metastasierung

Das Pankreaskarzinom tritt zu 70 Prozent im Bereich des Pankreaskopfes auf, zu 20 Prozent im Korpus und zu 10 Prozent im Pankreasschwanz. Dabei wird die Prognose ganz wesentlich vom Grad der Tumorzell dissemination bestimmt, welche bei diesem Tumorleiden – neben der direkten lokalen Infiltration benachbarter Strukturen – sehr frühzeitig sowohl lymphogen (13), hämatogen als auch insbesondere neurogen (12) erfolgt. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung hat sich bei mehr als 90 Prozent des Patientenkollektivs das Karzinom über die anatomischen Grenzen der Bauchspeicheldrüse hinaus ausgebreitet, in etwa einem Drittel der Fälle liegen bereits Fernmetastasen vor (15). Die hämatogene Metastasierung geschieht bevorzugt in die Leber bzw. teilweise auch in das Knochenmark. Auch Peritoneum und Lunge sind gehäuft weitere Orte der Tumorabsiedelungen.

Die klinische Stadieneinteilung des Pankreaskarzinoms erfolgt gemäß der TNM-Klassifikation aus dem Jahr 2009. Als entscheidende Prognosefaktoren dienen hierbei Tumorgröße, Lymphknotenbefall sowie Organmetastasierung (16). Die besondere Problematik beim exakten Staging des Pankreaskarzinoms besteht jedoch dabei im Vorhandensein zahlreicher Mikrometastasen, die oftmals nur mittels spezieller immunhistochemischer oder molekularbiologischer Methoden nachgewiesen werden können. So konnten mehrere Studien unter Zuhilfenahme der sensitiven PCR-Technik belegen, dass in 35 bis 70 Prozent der untersuchten Fälle tatsächlich zusätzliche Mikrometastasen in Leber, Peritoneum und Knochenmark vorlagen, die sich der herkömmlichen lichtmikroskopischen Diagnostik entzogen hatten (17, 18). Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich beim Pankreaskarzinom schon recht frühzeitig um eine generalisierte Erkrankung handelt. Ein

Umstand, der sich nicht zuletzt auch in der hohen Rezidivrate nach operativer Entfernung widerspiegelt.

1.1.4. Klinik und Diagnostik

Das größte Problem in der Diagnostik des Pankreaskarzinoms ist das Fehlen von Frühsymptomen. Dadurch wird der Tumor erst in meist inoperablen Spätstadien entdeckt. Typische Symptome, die dann gehäuft im Rahmen eines fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms auftreten, sind Appetitverlust, unspezifische Oberbauchschmerzen, Gewichtsverlust, schmerzloser Ikterus, Steatorrhoe sowie ein plötzlich auftretender Diabetes mellitus. Darüber hinaus gibt es eine Reihe paraneoplastischer Erscheinungen u.a. das vermehrte Auftreten von Thrombosen und Thrombophlebitiden, die mit dieser Erkrankung assoziiert sind (19). Besonders charakteristisch für das fortgeschrittene Pankreaskarzinom sind zudem starke Schmerzen, die bei Tumoren im Bereich des Pankreaskopfes meist ihr punctum maximum im rechten Ober- bzw. bei Korpus-/Schwanztumoren im linken Oberbauch haben. Auch kann sich dieses Tumorleiden ferner durch unspezifische Rückenschmerzen bemerkbar machen. Grundlage für diese z.T. sehr intensive Schmerzsymptomatik bei dieser Erkrankung ist deren charakteristisches, perineurales Infiltrationsmuster.

Die Diagnostik des Pankreaskarzinoms stützt sich vor allem auf bildgebende Verfahren. Zwar existieren Tumormarker wie CA 19-9 und CEA, die gehäuft bei diesem Tumorleiden auftreten und den klinischen Verdacht auf das Vorliegen weiter erhärten können. Diese ermöglichen aber aufgrund ihrer mangelnden Sensitivität und Spezifität keine alleinige Frühdiagnose. Zu Beginn der Abklärung bei Vorhandensein der eingangs geschilderten Symptome wird neben der Abnahme pankreas- und leberspezifischer Laborwerte (wie Lipase bzw. GOT, GPT, LDH, γ -GT, AP, Bilirubin) meist an erster Stelle eine perkutane Oberbauchsonographie durchgeführt (1). Deren diagnostische Treffsicherheit im Nachweis des Pankreaskarzinoms ist jedoch in der Regel nicht ausreichend. Derzeitiger Goldstandard in der Diagnostik des Pankreaskarzinoms sind vielmehr die Multidetektor-Computertomographie (MDCT) oder die Magnetresonanztomographie (MRT) mit Magnetresonanzcholangiopankreatographie (MRCP) (20, 21, 22). Ebenfalls zur weiteren Abklärung geeignet sind die endoskopisch-retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) mit optionaler Bürstenzytologiegewinnung bzw. die Endosonographie (EUS) mit eventueller Feinadelpunktion (1, 23). Der direkte bioptische Nachweis des Pankreaskarzinoms ist vor

geplanter operativer Resektion nur selten notwendig, jedoch zur Diagnosesicherung in palliativer Situation vor Beginn der Chemotherapie obligat (1).

1.1.5. Therapieoptionen

Bei der Therapie des Pankreaskarzinoms stellt immer noch die komplette (R0)-Resektion des Tumors den einzigen erfolgsversprechenden Behandlungsansatz mit kurativer Intention dar. (1). Aufgrund der meist späten Diagnosestellung mangels typischer Frühsymptomatik steht diese leider nur für 10 bis maximal 20 Prozent des Patientenkollektivs als Therapieform zur Verfügung (15). In den verbleibenden 80 bis 90 Prozent ist der Tumor entweder lokal zu weit fortgeschritten oder es bestehen bereits Fernmetastasen in anderen Organsystemen, wodurch hier nur mehr palliative Therapiekonzepte greifen können. Als klassisches operatives Standardverfahren in der chirurgischen Resektion des Pankreaskarzinoms galt lange Zeit die partielle Pankreatikoduodenektomie nach Kausch-Whipple. Diese wird jedoch heute zunehmend weniger radikal als sog. pyloruserhaltende partielle Pankreatikoduodenektomie durchgeführt, die bei gleichen onkologischen Langzeitergebnissen bzw. perioperativer Letalität für den Patienten ungleich schonender ist (1).

Durch die chirurgisch radikale Tumorexstirpation in kurativer Absicht kann leider zumeist nur eine Lebensverlängerung um ein bis drei Jahre sowie eine Verbesserung der Lebensqualität bewirkt werden (24, 25, 26). Die tatsächlichen Heilungschancen nach R0-Resektion liegen bei weniger als 5% (25, 27). Bei einem Großteil der vermeintlichen R0-Resektionen verbleiben tatsächlich lokoregionäre, mikroskopische Tumorzellresiduen, die den Ausgangspunkt für Rezidive sowie für das Auftreten von Organmetastasen bilden.

Die unbefriedigenden Langzeitergebnisse nach kurativer Resektion führten daher zur Etablierung adjuvanter Therapiekonzepte. Als Standardtherapie des resezierten Pankreaskarzinoms wird derzeit eine postoperative Chemotherapie mit Gemcitabin empfohlen, die sich über einen Zeitraum von 6 Monaten erstreckt (1). Alternativ kann eine Behandlung mit 5-Fluorouracil (5-FU) erfolgen. Dadurch lässt sich – wie eine neuere, große Multicenter-Studie von *Oettle et al.* zeigte – das mediane rezidivfreie Intervall nach operativer Tumorentfernung von 6,9 Monaten auf 13,4 Monate steigern (24). Auch das mediane Gesamtüberleben sowie die Drei- bzw. Fünf-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit werden

durch die adjuvante Gemcitabinbehandlung positiv beeinflusst. Die Werte hierfür liegen nach neueren Schätzungen bei 22,8 Monaten (medianes Gesamtüberleben), d.h. 31 bzw. 19,5 Prozent (Drei- bzw. Fünf-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit) (28). Studien zu weiteren adjuvanten Therapiekonzepten wie u.a. der Einsatz einer kombinierten Radiochemotherapie zeigen ebenfalls erste Erfolge (26, 29). Diese haben bisher aber noch keinen festen Platz im Behandlungsalgorithmus des operierten Pankreaskarzinoms. Gleiches gilt für die Durchführung neoadjuvanter radiochemotherapeutischer Ansätze (1).

Beim metastasierten sowie beim lokal fortgeschrittenen, inoperablen Pankreaskarzinom besteht die Indikation für eine palliative Chemotherapie. Leider erwies sich das Pankreaskarzinom bei der Suche nach geeigneten Substanzklassen als äußerst chemotherapierefraktär. Studien zu Anthracyclinen, Streptozocin, Ifosfamid und Taxanen zeigten keinen positiven Effekt. 5-FU, das seit den fünfziger Jahren in vielen Studien getestet wurde war bis in die neunziger Jahre Mittel der Wahl. Seit den Veröffentlichungen von Burris et al. (30) im Jahr 1997 ist Gemcitabin aufgrund seiner Nebenwirkungsarmut zur Standardtherapie in der palliativen Situation geworden (1). Die Einjahres-Überlebenszeiten liegen dabei bei derzeit 18 bis 20 Prozent (31, 32). Als klinischer Parameter zur Beurteilung der Effektivität der Chemotherapie dient neben dem Remissionsverhalten auch der klinische Nutzen – clinical benefit – in Bezug auf die Verringerung der Schmerzsymptomatik sowie einer Gewichtszunahme unter Therapie. Versuche, Gemcitabin mit anderen klassischen Chemotherapeutika wie z.B. platinhaltigen Substanzen zu kombinieren, haben bisher nur geringe Vorteile im Hinblick auf das Gesamtüberleben erbringen können (1, 33). Gleiches gilt für die Verwendung sog. Biologicals („targeted therapy“) wie u.a. dem Einsatz des EGF-Hemmers Erlotinib im Verein mit Gemcitabin (34).

Insgesamt sind die therapeutischen Optionen zur Behandlung von Patienten mit Pankreaskarzinom weiterhin als unzureichend zu werten. Die Untersuchung neuer Therapieansätze unter Studienbedingungen ist daher unverändert wichtig. Ein vielversprechender Ansatz erscheint dabei die Einbeziehung immuntherapeutischer Konzepte als Ergänzung zu den bisherigen klassischen Behandlungsverfahren zu sein.

2. Gemcitabin

2.1. Zelluläre Pharmakologie

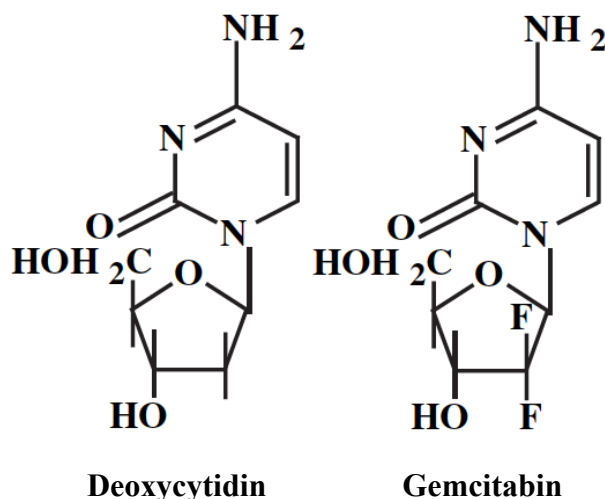


Abbildung 1.1: Gegenüberstellung der Strukturformel von Gemcitabin mit der von Deoxycytidin

Gemcitabin (29,29-Difluoro-2'-Deoxycytidin, dFdC) ist ein Zytostatikum aus der Wirkstoffklasse der Antimetabolite, genauer der Pyrimidinanaloga. Es leitet sich strukturell von dem intrazellulär natürlicherweise vorkommenden Nukleosid Deoxycytidin ab, vom dem es sich lediglich durch Fluoridierungen an Position 2' des Furanose-Ringes unterscheidet (35). Ursprünglich von der Pharmafirma Lilly als antivirales Medikament entwickelt, fand Gemcitabin aufgrund seiner hervorragenden antitumoralen Eigenschaften schnell Einzug als Zytostatikum mit mittlerweile breiten onkologischen Anwendungsmöglichkeiten – entweder als Monotherapie oder in Kombination mit anderen Zytostatika. Zu den wesentlichen Tumorentitäten, bei denen Gemcitabin derzeit einen festen Platz im Behandlungsregime hat, gehören das Mamma-Karzinom (36), das Harnblasenkarzinom (37), das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (38), das Ovarialkarzinom (39) sowie das Pankreaskarzinom (30). Jedoch wird das Behandlungsspektrum von Gemcitabin beständig breiter. So befindet sich die Anwendung von Gemcitabin u.a. in der klinischen Erprobung bei Rezidiven des Non-Hodgkin-Lymphoms (40) sowie bei Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs (41).

Bei Gemcitabin handelt es sich um eine medikamentöse Vorstufe – ein sog. Prodrug –, die erst nach intrazellulärer Aufnahme und Verstoffwechslung in die eigentliche Wirkform umgewandelt wird (42). Der Transport von Gemcitabin in die Zelle ist an das Vorhandensein spezifischer Nukleosidtransporter (hNTs) innerhalb der Zellmembran gebunden, welche in hohem Ausmaß von allen proliferierenden Zellen – u.a. Tumorzellen – exprimiert werden

(43). Im Zytosol angelangt, wird Gemcitabin (dFdC) vor allem von der dortigen Deoxycytidin-Kinase (dCK) zu Gemcitabin-Monophosphat (dFdCMP) phosphoryliert, welches seinerseits anschließend via Gemcitabin-Diphosphat (dFdCDP) in Gemcitabin-Triphosphat (dFdCTP) konvertiert wird (42). Nur ein geringer Anteil der Gemcitabin-Phosphorylierung wird alternativ von der unspezifischeren Thymidin-Kinase 2 (TK 2) vorgenommen (44).

Der Hauptmechanismus der Wirkungsweise von Gemcitabin liegt in der potenten Inhibierung der DNA-Synthese (42, 45, 46). Diese erfolgt einerseits durch die direkte schwache Hemmung der DNA-Polymerase durch dFdCTP, welches mit Deoxycytidin-Triphosphat (dCTP) an der dortigen Bindungsstelle konkurriert (47). Vor allem aber kommt es nach Einbau von Gemcitabin-Triphosphat in den DNA-Strang nach Anhängung eines weiteren Nukleotides zum Abbruch der DNA-Synthese durch Induktion eines Einzelstrangbruches (46, 48). Die Integration des auf diese Weise falschen, maskierten dFdCTP-Nukleotides bleibt von den herkömmlichen DNA-Reperaturmechanismen (Exonukleasen) unentdeckt (49) und führt zur Apoptose der Zelle (50). Darüber hinaus bewirkt Gemcitabin-Triphosphat in ähnlicher Weise eine Hemmung der RNA-Synthese (51).

Ein wichtiger Schritt für die intrinsische Wirkverstärkung von Gemcitabin ist die Inhibierung der Ribonukleotid-Reduktase (RR) durch Gemcitabin-Diphosphat (dFdCDP) (53). Diese führt zu einem Abfall der Deoxycytidin-Triphosphat (dCTP)-Spiegel in der Zelle. Da dCTP im Sinne einer negativen Rückkopplung die Aktivität der Deoxycytidin-Kinase und damit die Phosphorylierung von Gemcitabin beeinflusst, kommt es somit bei steigenden dFdCDP-Konzentrationen zur verstärkten Synthese von Gemcitabin-Monophosphat bzw. letztlich Gemcitabin-Triphosphat. Gemcitabin-Triphosphat wiederum führt seinerseits zur Hemmung der Cytidin-Triphosphat(CTP)-Synthetase, wodurch es direkt zu einer weiteren Verminderung der zellulären CTP und dCTP-Synthese kommt (53). Auf diesen beiden Wegen, der Hemmung der RR sowie der CTP-Synthetase mit konsekutivem Abfall der dCTP-Spiegel bzw. daraus resultierender erhöhter dCK-Aktivität, führt Gemcitabin in selbstpotenzierender Weise zur verstärkten Überführung seines Ausgangsmetabolits in die aktive Wirkform. Infolgedessen kommt es durch die vermehrte Verfügbarkeit von dFdCTP-Nukleotiden gegenüber intrazellulärem dCTP zu deren bevorzugtem Einbau in die DNA mit anschließendem Zelluntergang (53)

Weitere zelluläre Angriffspunkte von Gemcitabin bestehen des Weiteren in der Hemmung der Topoisomerase I (54) sowie in der Aktivierung verschiedener Caspasen (v.a. Caspase 8 und Caspase 3), welche ihrerseits Schlüsselkomponenten innerhalb der zellulären Apoptose-Induktion darstellen (55,56).

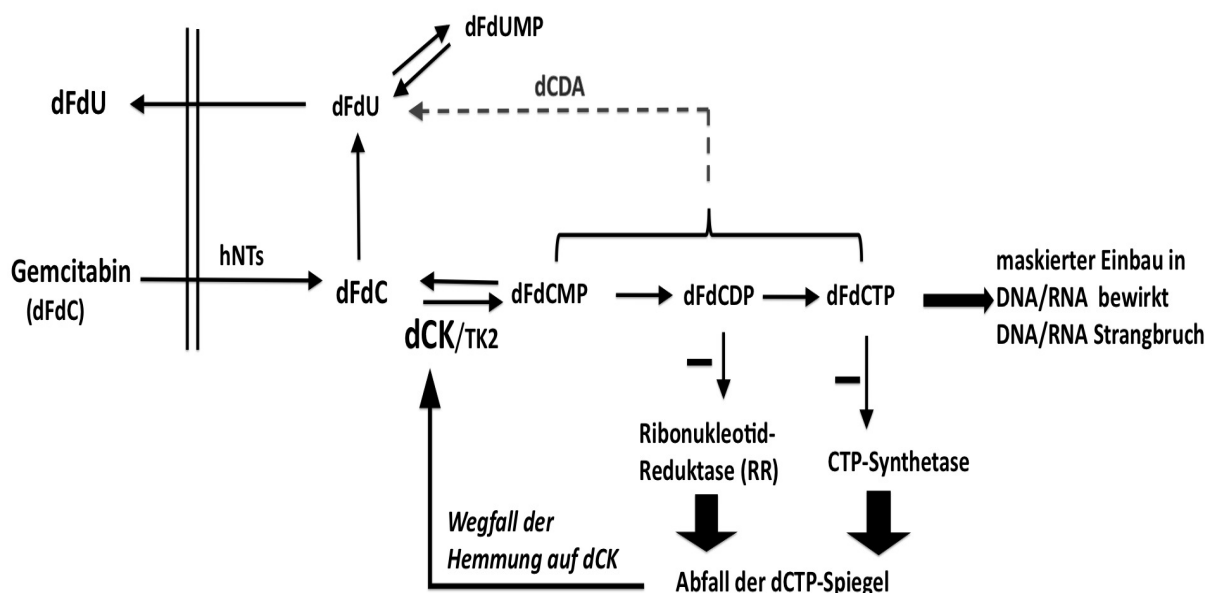


Abb. 1.2: Übersicht über die intrazelluläre Metabolisierung von Gemcitabin: intrazelluläre Aufnahme von Difluoro-Deoxycytidin (*dFdC*) via membranständiger Nucleosidtransporter (*hNTs*); danach erfolgt die Phosphorylierung durch die Deoxycytidinkinase (*dCK*) bzw. geringgradig durch die Thymidinkinase 2 (*TK2*) zu Difluoro-Deoxycytidin-Monophosphat (*dFdCMP*) mit anschließender Umwandlung in Difluoro-Deoxycytidin-Di/Triphosphat (*dFdCDP/dFdCTP*). Dadurch kommt es zur Hemmung (—) der Ribonukleotid-Reduktase bzw. der CTP-Synthetase. Diese führt zum Abfall der intrazellulären Deoxycytidinspiegel (*dCTP*), wodurch die Phosphorylierung von Gemcitabin (*dFdC*) verstärkt wird. Der Abbau von Gemcitabin erfolgt über die Deaminierung durch die Deoxycytidin-Deaminase (*dCDA*) zu Difluoro-Deoxyuridin (*dFdU*); *dFdUMP* = Difluoro-Deoxyuridinmonophosphat

Die intrazelluläre Inaktivierung von Gemcitabin erfolgt im Wesentlichen durch Deaminierung. Entscheidendes Enzym hierfür ist die Deoxycytidin-Deaminase (dCDA), die Gemcitabin in Difluorodeoxyuridin (dFdU) überführt, welches seinerseits nicht weiter metabolisiert aus der Zelle heraustransportiert wird (42).

2.2. Nebenwirkungen

Gemcitabin wird im Allgemeinen sehr gut toleriert (57). Seine häufigsten Nebenwirkungen sind Übelkeit und Erbrechen, Abgeschlagenheit, grippeähnliche Beschwerden sowie das Auftreten generalisierter makulopapulöser Exantheme. Des Weiteren finden sich bei Patienten unter Gemcitabin-Therapie vermehrt Symptome wie Atemnot, periphere Ödembildung und

Diarrhoe. Laborchemisch lässt sich häufig eine Erhöhung der Leberenzyme sowie eine leichte Hämaturie bzw. Proteinurie feststellen (57, 58). Dosislimitierende Nebenwirkung ist im Wesentlichen die hämatologische Toxizität. Insbesondere das Auftreten einer Neutropenie gemäß WHO Stufe III-IV ist mit rund 20 Prozent der Patienten unter Gemcitabin-Behandlung vergleichsweise häufig (57, 59).

2.3. Pharmakokinetische Daten

Das derzeitig empfohlene Dosierungsschema im Rahmen des Pankreaskarzinoms sieht meist die wöchentliche Gabe von Gemcitabin in einer Dosierung von 1000 mg/m² in Form einer 30 minütigen Infusion vor (1). Die dabei ermittelte Plasma-Spitzen-Konzentration, gemessen innerhalb von 5 Minuten nach Ende der Infusion, liegt bei 3,2–45,5 µg/ml (12,1–172,9 µmol/l) (60). Optimierungsversuche die Infusionsdauer bei gleichzeitiger Dosisreduktion zu verlängern, um kontinuierlich hohe Wirkspiegel im Plasma zu erreichen, haben bisher noch keine eindeutige Überlegenheit gegenüber dem Standardschema erbracht (61). Gemcitabin wird zu 98 Prozent zu Difluorodeoxyuridin (dFdU) abgebaut und als zytostatisch unwirksamer Metabolit renal eliminiert (53, 62). Die Halbwertszeit von Gemcitabin beträgt in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht 42 bis 94 Minuten. Bei dem derzeit empfohlenen Dosierungsschema ist die Ausscheidung von Gemcitabin innerhalb von 5 bis 11 Stunden nach Infusionsbeginn nahezu vollständig abgeschlossen (61). Bei einmaliger Gabe pro Woche kommt es somit zu keiner Akkumulation. Die Plasmaproteinbindung ist dabei sehr gering (63).

1.3. Dendritische Zellen

1.3.1. Immunologische Funktion der dendritischen Zellen

Von zentraler Bedeutung bei der Induktion einer adaptiven Immunantwort sind sog. antigenpräsentierende Zellen (APC). Diese zeichnen sich durch die einzigartige Fähigkeit aus, exogene virale/bakterielle Bestandteile aufzunehmen, sie intrazellulär zu prozessieren und anderen Immunzellen zur Erkennung auf ihrer Zelloberfläche zu präsentieren. Zu dieser Gruppe gehören neben Makrophagen und B-Zellen auch die dendritischen Zellen (DC). Vor allem Letztere sind als „professionelle“ APC von entscheidender Bedeutung bei der Induktion

der spezifischen B- und T-Zell-Immunantwort (64, 65); ein Umstand, den man sich in der Tumorummunologie versucht, zunutze zu machen.

Dendritische Zellen finden sich in unterschiedlichem Ausmaß in allen parenchymatösen Organen, jedoch ist ihre Anzahl an den Kontaktflächen des Organismus mit der Außenwelt – den Epithelien der Haut, des Gastrointestinal- bzw. Urogenitaltrakts – sowie innerhalb der lymphatischen Organe bei Weitem am größten. Ihren Namen verdanken sie ihrem charakteristischen lichtmikroskopischen Erscheinungsbild, welches durch eine Vielzahl von kleinen Zellfortsätzen geprägt ist und dadurch an das verzweigte Astwerk eines Baumes (Dendron = griechisch: der Baum) erinnert.

Obwohl sich alle DC hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Antigenpräsentation und T-Zell-Stimulation ähneln, stellen sie sich bei genauerer Betrachtung als eine äußerst heterogene Zellpopulation dar. (66). Sie lassen sich in verschiedenste Subklassen unterteilen, mit jeweils unterschiedlicher präferentieller Gewebelokalisation sowie divergierendem Migrations- und Immunstimulationsverhalten (67). Die grundlegendste Unterscheidung kann dabei durch die Einteilung der DC in sog. plasmazytoide DC (pDC) sowie in die der Reihe der „klassischen“ myeloischen DC (mDC) vorgenommen werden. Beide Formen finden sich sowohl beim Menschen als auch in der Maus (66). Plasmazytoide DC sind mit einem prozentualen Anteil von unter einem Prozent aller DC äußerst rar vertreten und bestechen vor allem durch ihre hohe Produktion von Interferon I bei viralen Infektionen (68, 69). Der Großteil der Gesamt-DC-Population wird jedoch durch das Heer der klassischen mDC gebildet, welche ihrerseits – neben den Makrophagen – das entscheidende Bindeglied zwischen angeborener und spezifischer Immunität darstellen.

Sowohl pDC als auch mDC entwickeln sich aus zirkulierenden Vorläuferzellen, die ihren Ursprung in hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark haben (70). Am Ende ihrer Differenzierungsphase verlassen die DC die Blutbahn, um in naiver, unreifer Form in nahezu alle Gewebe des Körpers einzuwandern (71). Dort angekommen, bilden sie im Verbund ein dichtes Netzwerk, welches seine Umgebung nicht nur ständig auf mögliche pathogen-assoziierte „Gefahrensignale“ hin überprüft, sondern dabei zugleich auch zentral an der Entwicklung der sog. peripheren Immuntoleranz gegen körpereigene Strukturen mitwirkt (72, 73). Grundlage hierfür ist die beständige Aufnahme von Protein- bzw. Zellbestandteilen aus

dem unmittelbaren Umfeld der DC, deren darauffolgender intrazellulärer Prozessierung zu Peptidfragmenten mit anschließender Antigenpräsentation auf der Zelloberfläche der DC via der sog. Major-Histokompatibilitäts (MHC)-Moleküle. Exogenes Material kann dabei von der DC via Phagozytose, Pinozytose oder aber über spezifische Rezeptoren internalisiert werden (74). Darüber hinaus verfügt diese Zellreihe über ein reichhaltiges Sensorium an sog. Toll-Like-Rezeptoren (TLR), die eine Vielzahl hochkonservierter viraler als auch bakterieller Strukturkomponenten – sog. TLR-Liganden wie z.B. das Lipopolysaccharid A gramnegativer Bakterien – erkennen und zur raschen Aktivierung der DC bzw. des Immunsystems führen können (75).

Durch den Kontakt der zelleigenen TLR mit ihren jeweiligen mikrobiellen Erkennungsdomänen oder durch die Einwirkung proinflammatorischer Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$ oder IL-6 kommt es zur Reifung der dendritischen Zelle. Erst hierdurch entfaltet sie ihr volles antigenpräsentierendes bzw. immunstimulierendes Potential. Zu Beginn der Aktivierung kommt es – nach anfänglich verstärktem Antigen-Uptake – zu einem Stopp der Internalisierung weiterer exogener Proteine. Zudem reifen die internen Prozessierungswege, mit deren Hilfe die DC aufgenommene (Fremd-)Proteine in ihre Peptidbestandteile zerlegen sowie an ihrer Zelloberfläche präsentieren kann, zur vollständigen Funktionalität heran (76, 77). Die Präsentation internalisierter Antigene an der Zelloberfläche erfolgt dabei vorzugsweise via des MHCII-Komplexes, welcher in Verbindung mit dem prozessierten Fremdpeptid vom T-Zell-Rezeptor CD4-positiver T-Zellen erkannt wird. Ein geringer Anteil des aufgenommenen Antigens wird jedoch zudem mit Hilfe der MHCI-Moleküle – welche normalerweise intrinsische Peptide präsentieren, die von der Zelle selbst im Zytosol synthetisiert worden sind – der Erkennung durch CD8-positive T-Zellen zugänglich gemacht. Dieser für dendritische Zelle einmalige Prozess der sog. Kreuzpräsentation (“Cross-Presentation”) von internalisierten, exogenen Proteinen über den MHCI-Weg ist die Grundlage der Generierung einer zytotoxischen CD8-Antwort (78, 79). Die im Rahmen der Aktivierung verstärkte Antigenpräsentation wird dabei gleichzeitig von der Expression einer Vielzahl von kostimulatorischen Signalen zur T-Zellaktivierung begleitet. Am besten charakterisiert ist hierbei die Interaktion der stimulierenden Glykoproteine CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) auf der Oberfläche reifer DC mit dem CD28-Molekül auf Seite der T-Zelle (80). Weitere funktionelle Veränderungen unter Einwirkung eines Reifungsstimulus betreffen die Sekretion einer Reihe proinflammatorischer Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-1 β IL-12p40

durch die aktivierte DC sowie strukturelle Veränderungen des Zytoskeletts, die der DC die Migration in die angrenzenden Lymphknoten ermöglichen (74). Dieser letzter Schritt im Rahmen des Aktivierungsprozesses, die Einwanderung der stimulierten, „reifen“ DC in die lokalen sekundären Lymphorgane, ist für die Initialisierung einer adaptiven Immunantwort essentiell.

Nach Einwanderung der aktivierten DC in die Lymphknoten siedelt sich diese dort bevorzugt in den stark von naiven T-Zellen frequentierten Arealen an. Die dendritischen Fortsätze weichen nun zahlreichen schleierartigen Membranfalten und -ausstülpungen, was eine optimale räumliche Anordnung von MCH-Peptid-Komplexen zusammen mit den notwendigen kostimulatorischen Molekülen zur T-Zellaktivierung ermöglicht (81). Die ankommenden naiven T-Zellen tasten bei ihrem Weg durch den Lymphknoten ständig die Oberflächen der DC mit Hilfe ihres T-Zell-Rezeptors ab. Dieser ist für jede T-Zelle durch somatisches Genrearrangement einzigartig konfiguriert. Kommt es zu einer Übereinstimmung zwischen dem T-Zell-Rezeptor und dem MHC-Peptid-Komplex der antigenpräsentierenden dendritischen Zelle, führt dies im Fall der Kostimulation des CD28-Moleküls der T-Zelle über CD80 und CD86 zur Aktivierung der naiven T-Zelle – dem sog. „T-Cell-Priming“ – an dessen Ende die klonale Expansion und Umwandlung der so selektierten T-Zelle in sog. Effektor-T-Zellen steht (82).

Bemerkenswert dabei ist, dass das erfolgreiche T-Zell-Priming streng an das Vorhandensein geeigneter kostimulatorischer Signale von Seiten der DC gekoppelt ist, die wiederum nur nach Kontakt der DC mit einem geeigneten Reifestimulus bzw. mit einem TLR-Liganden vermittelten, mikrobiellen „Gefahrensignal“ hochreguliert werden (82, 83). Die alleinige Überstimulation von T-Zell-Rezeptor und MCH-Peptid-Komplex reicht zur T-Zellaktivierung nicht aus, sondern führt im Gegenteil zur Anergie bzw. Apoptose der betreffenden T-Zelle bzw. zur Induktion immunsuppressiver regulatorischer T-Zellen (Tregs) (74, 84). Da die Präsentation körpereigener Peptide auf den MHC-Komplexen unreifer DC ohne Kostimuli in Abwesenheit einer Infektion bzw. entsprechender Aktivierungssignale via des TLR-Mechanismus eher die Regel als die Ausnahme ist, kommt es auf diese Weise zu einer wesentlichen Reduktion potentieller autoreaktiver T-Zellen, die sich bis dahin der primären, im Thymus stattfindenden Negativselektion entzogen haben. Durch diesen Mechanismus sind die DC – neben der Induktion der spezifischen Immunantwort gegen Pathogene – auch am

Zustandekommen der sog. peripheren immunologischen Toleranz beteiligt, die verhindert, dass das Immunsystem sich gegen den eigenen Organismus wendet (84, 85).

Im Rahmen der CD4-T-Zellaktivierung moduliert die aktivierte dendritische Zellen durch das Sekretionsprofil der von ihr gebildeten Zytokine zudem entscheidend die Qualität der späteren T-Zellantwort. So kommt es z.B. durch die Freisetzung von v.a. IL-12 (neben TNF- α , IL-18) durch die DC zur Generierung einer TH1-gewichteten Immunantwort. Diese ist durch die Induktion IFN- γ -produzierender CD4-positiver T-Zellen charakterisiert, welche eine Schlüsselstellung bei der Entstehung einer zytotoxischen CD8-T-Zellantwort spielen, wie sie u.a. auch im Rahmen der Tumorummunologie erwünscht ist (86, 87).

Die Interaktion zwischen DC und T-Zelle ist jedoch keine kommunikative Einbahnstrasse. Auch die CD4-T-Zellen selbst nehmen Einfluss auf die antigenpräsentierende DC, die zu ihrer Aktivierung geführt hat. Klassisches Beispiel hierfür ist der CD40-Ligand-CD-40-Rezeptor-Signalweg, welcher einerseits der aktivierten CD4-T-Zelle die klonale Expansion ermöglicht, andererseits die DC vor dem vorzeitigen Zelltod schützt sowie deren Kreuzantigen-Präsentation verstärkt (88). Auch von T-Zellen gebildete Zytokine wie z.B. das IL-10 der regulatorischen T-Zellen modulieren direkt die DC-Funktion (89, 90). Darüber hinaus kommuniziert die aktivierte dendritische Zelle mittels proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1, IL-12, mittels abgeschnürter endosomaler Vesikel (91, 92) – sog. Exosomen – oder durch unmittelbare Zell-Zell-Kontakte permanent direkt oder indirekt mit ihrer Umgebung und wird dadurch zur Schlüsselzelle bei der Generierung einer breitgefächerten Immunantwort.

1.3.2. Dendritische Zellen in der Immuntherapie

Das Immunsystem übernimmt tagtäglich im Rahmen der Selbstkontrolle die Aufgabe, entartete Zellen zu eliminieren. Tut es dies nicht mehr oder nur eingeschränkt, kommt es zum vermehrten Auftreten von Malignomen – wie dies u.a. eindrucksvoll bei Patienten mit der Immunschwäche AIDS zu beobachten ist. Aufgrund ihrer zentralen Rolle an der Entstehung einer Immunantwort, insbesondere an der Induktion einer zytotoxischen T-Zellantwort, erscheinen DC als geradezu ideale Vehikel antitumoraler Immunisierungsstrategien.

Seit der Einführung DC-basierter Vakzinierungskonzepte in die klinische Praxis durch Muehrji et al. (93) im Jahr 1995 sind eine Vielzahl von Studien zu diesem Thema

durchgeführt worden. So wurden u.a. DC-immuntherapeutische Ansätze zur Bekämpfung von B-Zell-Lymphomen (94), dem malignen Melanom (95), dem Prostata-Karzinom (96), dem Nierenzellkarzinom (97), Glioblastomen (98) sowie dem Pankreaskarzinom (99-101) getestet. Grundprinzip in den meisten Studien war dabei die Verwendung autologer *ex vivo* generierter DC, die mit Tumorantigenen beladen und nach anschließender Aktivierung mittels eines Zytokincocktails als reife DC dem Patienten reinjiziert wurden. Etabliert hat sich dabei die Gewinnung dendritischer Zellen aus CD34-positiven Vorläuferzellen bzw. CD14-positiven Monozyten aus dem Blut des Patienten durch Leukaphärese. Diese werden anschließend *in vitro* durch Zytokingabe (meist IL-4 und GM-CSF) vermehrt und zu unreifen DC herangezogen werden. Für die folgende Antigenbeladung der DC bietet sich eine Vielzahl an Möglichkeiten. Am häufigsten zur Anwendung kommt das sog. „Pulsen“ der DC mit definierten HLA- bzw. MHCII-restringierten Tumorantigenpeptiden oder andererseits das Beladen der unreifen DC mit Tumorlysat. Letzteres hat den Vorteil der möglichen Induktion einer Immunantwort bei Tumoren, deren antigenes Repertoire bisher noch nicht näher definiert ist bzw. bietet zudem die Möglichkeit der Induktion einer breitgefächerten Antwort gegen ein ganzes Tumorantigenspektrum. Weitere Optionen sind die Verwendung tumoraler mRNA oder apoptotischer Tumorzellen sowie die Fusion von Tumorzellen und DC (85, 102). Der bisherige „Goldstandard“ zur DC-Aktivierung nach erfolgter Antigenbeladung ist derzeit noch ein Cocktail bestehend aus den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α , IL-1b, IL-6 und Prostaglandin E2. Jedoch zeigt sich *in vitro* bereits eine Überlegenheit mittels TLR-Liganden stimulierter DC, so dass klinische Studien mit diesem Protokoll für die Zukunft zu erwarten sind (103).

Die so generierten und aktivierten DC werden dem Patienten abschließend reinfundiert. Dies geschieht meist intrakutan, vereinzelt auch intravenös. Für das immunologische Monitoring zur Beurteilung des Erfolges der DC-Therapie hinsichtlich der Induktion einer spezifischen T-Zellantwort dient meist der Nachweis einer Hypersensitivitätsreaktion nach subkutaner Tumorlysat- oder Antigen-Injektion bzw. – bei bekannten tumoralen Antigen-Epitopen – die Detektion spezifischer T-Zellen mit Hilfe immunologischer Verfahren wie dem ELISPOT-Assay oder sog. MHCII-Tetramer/Pentamer-Verbindungen (85, 102).

Trotz der Vielzahl an DC-Studien und Protokollen blieben bisher noch durchschlagende Therapieerfolge aus. Insgesamt stellte sich diese Therapieform als äußerst gut verträglich und sicher heraus und war in den meisten Fällen in der Lage, eine nachweisbare T-Zell-vermittelte

Immunantwort zu induzieren. Dennoch zeigte sich nur bei einer geringen Fallzahl der behandelten Patienten ein tatsächlich fassbares klinisches Ansprechen. Die Erklärungsansätze dafür sind mannigfaltig: Sie reichen von der Verwendung suboptimaler DC-Protokolle mit inadäquater DC-Aktivierung und Antigen-Beladung über den Einsatz dieser Therapieform in Patienten mit weit fortgeschrittenen Tumorstadien mit ausgeprägter tumorvermittelter Immunsuppression – u.a. über die Induktion regulatorischer T-Zellen. Die Erforschung der Mechanismen, mit denen Tumore sich einer gegen sie gerichteten Immunabwehr entziehen können, steht jedoch gerade erst am Anfang und auch die Charakterisierung der molekularbiologischen Vorgänge bei der DC-Aktivierung macht beständig Fortschritte. Mittelfristig scheint die Kombination der DC-Vakzinierung mit etablierten Formen der Tumorthherapie, allen voran als Ergänzung zur operativen Tumor- bzw. Chemotherapie, am vielversprechendsten.

1.4. Zielsetzung der vorliegenden Doktorarbeit:

Das Pankreaskarzinom gehört zu den Tumorerkrankungen mit der höchsten Mortalitätsrate überhaupt und gilt gegenüber der Behandlung mit konventionellen Zytostatika als äußerst therapierfraktär. Dies begründet die Suche nach weiteren Therapiemöglichkeiten. Ein aussichtsreicher Ansatz scheint dabei die Einbeziehung der Immuntherapie mittels dendritischer Zellen in das klassische Chemotherapie-Schema mit Gemcitabin zu sein. So zeigten eigene Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe einen synergistischen Effekt zwischen der Kombination von Gemcitabin und DC-Therapie in Hinblick auf das Überleben in einem subkutanen Pankreaskarzinommodell der Maus.

Zielsetzung der vorliegenden Doktorarbeit war es, die Einflussnahme von Gemcitabin auf die DC-Vakzinierung und die dadurch generierte Immunantwort im Tumormodell näher zu untersuchen. Zur besseren Charakterisierung der immunologischen Effekte wurde dabei die mit einem Modellantigen versehene murine Pankreaskarzinomzellreihe Panc02-OVA verwendet, welche durch Transfektion das Hühnerweiß Ovalbumin (OVA) exprimiert. Auch sollten mit Hilfe der Einführung des OVA-Antigens im Rahmen der DC-Vakzine verschiedene Immunisierungsstrategien hinsichtlich ihrer immunologischen Effektivität verglichen werden. Voraussetzung hierfür war die Etablierung der immunologischen Nachweismethoden zum Monitoring der DC-induzierten T- und B-Zellantworten gegen das OVA-Antigen, die ebenfalls Bestandteil dieser Doktorarbeit war. Zuletzt bestand die Aufgabe darin, das Panc02-OVA-Tumormodell um die orthotope Implantation der Tumorzellen zu erweitern und die angesprochenen Fragestellungen in diesem System weiter zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte, Chemikalien und Reagenzien

2.1.1. Geräte

96-Well-Harvester MicroCell-Harvester	Fa. Skatron (Ismaning, D)
Beta Counter Betaplate Liquid	Fa. Wallac Oy (Turku, Finnland)
Scintillation beta-Counter	
Brutschrank B 290	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Eismaschine	Fa. Ziegra (Isernhagen, D)
ELISA-Reader	Fa. Dynatech-Laboratories (Guernsey, GB)
FACSCalibur	Fa. Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
Gamma-Counter 1480 Wizard 3 [™] gamma-Counter	Fa. Wallac Oy (Turku, Finnland)
Inkubationshaube Certomat H	Fa. Sartorius (Göttingen, D)
Kleintier CT „la Theta	Fa. Zinsser Analytic (Frankfurt, D)
LaminAir HB 244 8	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Magnet-Heizplatte IKAMAG RCT	Fa. IKA Labortechnik (Staufen, D)
Mikroskop Nikon Diaphot	Fa. Nikon (Tokyo, Japan)
Omnifuge 2 ORS	Fa. Heraeus (Hanau, D)
pH Meter pH330	Fa. WTW (Weilheim, D)
Pipetierhilfe	Fa. Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, D)
Pipette Multikanal	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
Pipette Multistep	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
Pipetten	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
Schüttler Shaker DOS-10L	Fa. neoLab (Heidelberg, D)
Schüttler Vibrax Serono Shaker	Fa. Serono Diagnostics (Rockland, USA)
Tischschüttler Certomat M	Fa. Sartorius (Göttingen, D)
Trockenschrank	Fa. Heraeus (Hanau, D)
UV Vilber Lourmat	Fa. MWG Biotech (Ebersberg, D)
Vortex-Genie 2	Fa. Bender&Hobein AG (Zürich, Swiss)
Waage (LP 6209)	Fa. Sartorius (Göttingen, D)
Waage (LP6209)	Fa. Sartorius (Göttingen, D)
Waage (SBC 21)	Fa. Scaltec Instruments (Heiligenstadt, D)
Wasser-Deionisierungsmaschine	Fa. SG Reinstwasser-Sys. (Hamburg, D)
Westernblot Kammer	Fa. BIO-RAD (München, D)
Wippe DESAGA DE 24	Fa. Sarstedt (Nümbrecht, D)
Zentrifuge (5417 R)	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
Zentrifuge Multifuge 4 KR	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Zentrifuge Varifuge 20 RS	Fa. Heraeus (Hanau, D)

2.1.2 Materialien für tierexperimentelle Arbeiten

Faden Prolene 5-0	Fa. Ethicon (New Jersey, USA)
Anatomische Pinzetten, sterilisierbar	Fa. RSG (Solingen, D)
Einmalrasierer	Fa. RSG (Solingen, D)
Glaskapillare, heparinisiert	Fa. Hirschmann (Eberstadt, D)
Scheren, sterilisierbar	Fa. RSG (Solingen, D)
Schublehre	Fa. Milian (Genf, CH)
Skalpelle	Fa. PFM (Köln, D)
Splitterpinzetten, sterilisierbar	Fa. RSG (Solingen, D)

2.1.3. Materialien für die Zellkultur

Bovines Serum Albumin (BSA)	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
<i>Dulbecco's modified eagles Medium</i> (DMEM)	Fa. PAA (Linz, A)
EDTA 0,02 % Solution	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Trypsin 10x Solution	Fa. PAA (Linz, A)
Fötales Kälberserum	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
Geneticin g-418 Sulfat	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
L-Glutamin	Fa. PAA (Linz, A)
Neubauer Zählkammer	Optik Labor Frischknecht, Balgach, Germany
Penicillin	Fa. PAA (Linz, A)
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS)	Fa. PAA (Linz, A)
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI) 1640 Medium	Fa. PAA (Linz, A)
Streptomycin	Fa. PAA (Linz, A)
Ovalbumin (aus dem Hühnereiweiss extrahiert)	Fa. Sigma-Aldrich, (Steinheim D)
Zellsieb 100 um	Fa. Falcon(Heidelberg, D)
Zellsieb 40 um	Fa. Falcon(Heidelberg, D)
Zellsieb 70 um	Fa. Falcon(Heidelberg, D)
175cm ² / 75 cm ² Kulturflaschen	Fa Greiner (Frickenhausen, D)
Sterilfilter 0,2 um	Fa. Sartorius (Göttingen, D)
6-/12- 24-/48-/96-Well Zellkulturplatten	Fa Greiner (Frickenhausen, D)
Zellschaber	Fa. Eppendorf Hamburg, D)
Pipettenspitzen	Fa. Sarstedt (Nümbrecht, D)

Weiteres Verbrauchsmaterial für die Zellkultivierung wurde des Weiteren von BectonDickinson (Heidelberg, Germany), Bibby Sterilin (Stone, Staffordshire, Great Britain), Corning (Corning, USA), Eppendorf (Hamburg, Germany), Falcon(Heidelberg,Germany),Greiner (Frickenhausen, Germany), Henke-Sass Wolf (Tuttlingen, Germany) oder Sarstedt (Nümbrecht, Germany) bezogen.

2.1.4. Chemikalien und Reagenziensätze

5,6-carboxyfluorescein diacetate (CFSE)	Fa. Molecular Probes (Leiden, NL))
Brefeldin A	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Ethanol	Fa. Merck (Darmstadt, D)
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
FACSFlow	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
FACSSafe	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Geneticin g-418 Sulfat	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Heparin-Natrium	Fa. Ratiopharm (Ulm, D)
Paraformaldehyd (PFA)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Propidium Iodid	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Trypan-Blau	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

Radioaktive Chemikalien

⁵¹Chrom [Na₂⁵¹CrO₄] (5mCi/ml) Fa. Hartmann Analytic (Braunschweig D)

Reagenziensätze

rh Annexin-PI Kit Fa. Bender-Med-Systems (Wien, A))

2.1.5. Zytokine, Wachstumsfaktoren und Stimulanzen

Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) Fa. PeproTech (London, UK)

Murines Interleukin 4 Fa. PeproTech(London UK)

Lipopolysaccharid LPS (Herkunft: Salmonella typhymurium) Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

2.1.6. Zellkulturmedien, Puffer, Lösungen

Folgende Medien und Puffer wurden für die Zellkultur verwendet

RPMI-1640 Vollmedium (für DC/Tumorzellkultur)

100 IU/ ml Penicillin
100 ug/ ml Streptomycin
1,5 mM L-Glutamin
10 %Vol FCS
in RPMI 1640 Medium

Lysepuffer für die intrazelluläre Färbung:

0,1% Saponin in PBS

Erythrozyten-Lysepuffer:

10%vol BD Pharm Lyse
in dH₂O

Fixierungspuffer:

2% PFA
in PBS

Kryo-Medium:

50 %vol RPMI-1640 Vollmedium
40 %vol FCS
10 %vol DMSO

Binding buffer:

NaCl 140mM
CaCl₂ 2,5 mM
HEPES 10mM
pH 7,4

2.1.7. Verwendete Pharmaka

Gemcitabin (Gemzar®)

Fentanyl (Fentanyl®)

Midazolam (Dormicum®)

Atipamezol (Antisedan®)

Medetomidin (Dormitor®)

Flumazenil (Anexate®)

Naloxon (Naloselect®)

Isofluran (Forene®)

Fa. Lilly (Bad Homburg)

Fa. Janssen-Cilag (Neuss)

Fa. Roche (Basel, Schweiz)

Fa. Orion Corporation (Espoo, Finnland)

Fa. Orion Corporation (Espoo, Finnland)

Fa. Roche (Mannheim)

Fa. Deltaselect (Dreieich)

Fa. Abbott (Illinois, USA)

2.1.8 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
Panc02	Murine Adenokarzinomzelllinie des Pankreas, induziert durch 3-Methylchloranthren in C57BL/6 Mäusen	Ziske, C. (Bonn)
Panc02-OVA	Aus nativer Panc02-Linie durch Transfektion mittels OVA-Plasmid entstanden	Transfektion durch unsere eigene Arbeitsgruppe
B16-OVA	mittels OVA-Plasmid transfizierte, murine Melanomzelllinie B16 mit C57BL/6 Hintergrund	Freundlich zur Verfügung gestellt von AG PD Dr. Schnurr

2.1.9. Peptide

Die verwendeten MCHI- bzw. MHCII-restringierten Peptide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert. Bei SIINFEKL handelt es sich um die Aminosäuresequenz des immundominanten MHCI-OVA₂₅₇₋₂₆₄ Epitops des „chicken egg“ Ovalbumins. Analoges gilt für die Aminosäuresequenz KSPWF_{TTL} (fortan vereinfacht p15E), welches sich aus dem p15E-Protein ableitet, einem Bestandteil des virus-assoziierten MuLV-env-Protein, das vom gp70-Gen codiert wird und sich in einer Reihe von Tumorzellen finden lässt. Auch die Panc02-Zelllinie exprimiert das gp70-Gen und damit konsekutiv das p15E-Protein, wodurch Letzteres damit ein natürlich vorkommendes Antigen dieser Zelllinie darstellt (104). Bei dem MHCI-restringierten Peptid mit der Aminosäuresequenz VYDF_{FFVWL} (fortan vereinfachend TRP-2 bezeichnet) handelt es sich um das immundominante Epitop des Tryosinkinase-related-Proteins-2, einem Melanozyten-Differenzierungsantigen. Es diente in der intrazellulären IFN- γ -Färbung als Kontrollpeptid. Zum Nachweis einer OVA-spezifischen CD4-T-Zellantwort wurde das MHCII-restringierte OVA-Peptid ISQAVHAAHAEINEAGR verwendet. Die Reinheit der Peptide wurde durch HPLC-Analyse validiert und übertraf 90 Prozent. Die lyophilisierten Peptide wurden in DMSO bis zu einer Konzentration von 40 mg/ml angelöst. Die weitere Verdünnung auf die Stockkonzentration von 1 mg/ml erfolgte in PBS. Stocklösungen der Peptide wurden bei -20°C gelagert.

Bezeichnung	Peptid-Sequenz (N→C)
OVA ₂₅₇₋₂₆₄	SIINFEKL
OVA ₃₂₃₋₃₃₉	ISQAVHAAHAEINEAGR
TRP-2 ₁₈₁₋₁₈₈	VYDF _{FFVWL}
p15E ₆₀₄₋₆₁₁	KSPWF _{TTL}

2.1.10. Antikörper:

Bezeichnung	Spezifität	Klon	Konjugat	Herkunft
Anti CD 86	CD 86	B7-2	FITC	BD/Pharmingen
Anti MHC II	MHC II	NIMR-4	PE	Southern Biotech
Anti CD 11b	Rat IgG2b kappa	M1/70	PerCpCy5.5	BD/Pharmingen
Anti CD 11c	Hamster IgG1 lambda	HL3	APC	BD/Pharmingen
Anti CD 8	Rat IgG2a kappa	53-6.7	PerCp	BD/Pharmingen
Anti CD 8	CD 8 alpha	5H10	APC	Caltag
Anti IFN-gamma	IFN-gamma	XMG1.2	Alexa Fluor 488	Caltag
Anti CD 4	Rat IgG2b kappa	GK1.5	APC	BD/Pharmingen
Anti CD 3	Hamster IgG1 kappa	145-2C11	PerCP	BD/Pharmingen
Anti Valpha2	Rat IgG2a lambda	B20.1	FITC	BD/Pharmingen
Anti Vbeta 5.1/5.2	Mouse IgG1 kappa	MR9-4	PE	BD/Pharmingen
Anti-Ly6-G	Rat IgG2b, kappa	1A8	FITC	BD/Pharmingen
Anti Gr-1	Rat IgG2b, kappa	RB6-85C	FITC	BD/Pharmingen
Anti CD 25	Rat IgG2a	PC61.5	APC	eBioscience
Anti FoxP3	Rat IgG2a	FJK-16s	PE	eBioscience
Anti CD4	Rat IgG2a	RM4-5	FITC	eBioscience
Anti NK 1.1	Mouse IgG2a	PK136	FITC	BD/Pharmingen
Isotyp-Kontrollen	divers	divers	divers	BD/Pharmingen/Caltag
Pro5-OVA257-264 - H2Kb	H2Kb OVA257-264-H-2Kb pentamers		PE	Proimmune

Nachweis-Antikörper für murinen Immunglobulin-ELISA

Anti-IgG (polyclonal, goat anti mouse)	Southern Biotech, Birmingham, USA
Anti-IgG1 (polyclonal, goat anti mouse)	Southern Biotech, Birmingham, USA
Anti-IgG2a (KLH/G2a-1-1)	Southern Biotech, Birmingham, USA

2.2 Tierhaltung und tierexperimentelle Arbeiten

2.2.1 Tierhaltung

Für Tierversuche wurden ausschließlich weibliche Mäuse des Stammes C57BL/6 herangezogen. Die Tiere wurden im Alter von 6-8 Wochen von der Firma Harlan Winkelmann (Borchen) bezogen und frühestens eine Woche nach Anlieferung für Versuche eingesetzt. Die Haltung der Tiere erfolgte im geschlossenen Tierstall der Medizinischen Klinik Innenstadt. Der Tierstall entspricht den gängigen Hygienevorschriften; der Tag/Nacht-

Rhythmus wurde mittels Zeitschaltuhr eingehalten. Die Versorgung der Tiere wurde durch examinierte Tierpfleger sichergestellt. Alle durchgeführten Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (*Aktenzeichen 211-2531-58/04*).

2.2.2 Transgene Tiere

Transgene OT-I Tiere besitzen auf ihren CD8-T-Zellen einen T-Zell-Rezeptor, der spezifisch für das „chicken egg“ Ovalbumin OVA₂₅₇₋₂₆₄ Epitop SIINFEKL ist. OT-I Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. med. M. Schnurr (LMU München, Medizinische Klinik Innenstadt) zur Verfügung gestellt.

2.2.3. Immunisierung mittels dendritischer Zellen

Reife dendritische Zellen aus der *in vitro* Kultur wurden mit einem Zellschaber geerntet und zweimal in PBS gewaschen. Im Rahmen der subkutanen Vakzinerung wurden die C57BL/6 Mäuse per Isofluraninhalation narkotisiert und 0,3 - 2 Millionen reife, antigenbeladene DC subkutan in die Flanke bzw. intraperitoneal oder intravenös über die Schwanzvene injiziert. In den Studien zum *in vivo* DC-Nachweis wurden 2×10^6 – zuvor mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE markierte – DC knapp oberhalb der Pfote in den Hinterlauf injiziert.

2.2.4. Dosierung und Gabe von Gemcitabin

Gemcitabin wurde über die Hausapotheke bezogen und in einer Stock-Konzentration von 10 mg/mL in 0,9% NaCl angesetzt. Entsprechend den Versuchsreihen wurde den Versuchstieren gewichtsadaptiert Dosen von 25 µg/mg bzw. 50 µg/mg pro Maus verabreicht. Letztere Menge entspricht umgerechnet der Dosierung wie sie auch bei Patienten unter Gemcitabintherapie zur Anwendung kommt. Die Applikation erfolgte in Form einer intraperitonealen Bolusgabe von 100 µl/Tier an Tag 2 und Tag 5 nach der DC-Gabe. Bei Tieren ohne Gemcitabin-Regime erfolgte die entsprechende Injektion von 0,9% NaCl zu Kontrollzwecken.

2.2.5. Isolation von Effektorzellen aus murinem Milzgewebe und Lymphknoten

Nach Isoflurannarkose und Tötung durch zervikale Dislokation wurden die Mäuse äußerlich gründlich mit 70-prozentigem Ethanol desinfiziert sowie Fell und Peritoneum per Flankenschnitt eröffnet. Die inguinalen bzw. poplitealen Lymphknoten wurden per subkutanem Hautschnitt freigelegt und entnommen. Die exzidierte Milz bzw. die isolierten Lymphknoten wurden in RPMI Vollmedium auf Eis transportiert und unter sterilen

Bedingungen weiterverarbeitet. Nach Zerteilung in mehrere kleine Stücke wurde die Milz bzw. die Lymphknoten durch ein 70 µm Zellsieb gepresst und ausreichend mit RPMI Vollmedium nachgespült. Nach der Zentrifugation (370g, 7min, 4°C) erfolgte die Lyse der Erythrozyten in 5 ml Erylysepuffer für 5 min. Danach wurde mit PBS gewaschen.

2.2.6. Isolation der Blutleukozyten

Die Blutentnahme aus dem retroorbitalen Venenplexus erfolgte am lebenden Tier unter leichter Isoflurannarkose mit Hilfe von heparinisierten Glaskapillaren. Zur Vermeidung der Gerinnung war das 1,5 ml Eppendorf Transportgefäß mit 10 µl Heparin versetzt worden. Nach fünfminütiger Lyse der Erythrozyten und einmaligen Waschen wurden die Leukozyten für die FACS-Färbungen verwendet.

2.2.7. Zellvermittelter *in vivo*-Zytotoxizitätstest

Naive Splenozyten von C57BL/6 Wildtyptieren wurden auf eine Zellkonzentration von 10^7 Zellen/ml in PBS eingestellt und in zwei Hälften aufgeteilt. Der MHCI-Komplex einer Population (Zielpopulation) wurde mit dem Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ SIINFEKL für 1 Stunde bei 37°C mit 2 µg/ml gepulst. Anschließend erfolgte die Färbung mit dem Lebendfarbstoff *Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester* (CFSE) in 20 ml PBS/0,01% BSA für 10 min bei 37°C. Für die Kontrollpopulation ohne Peptidbeladung wurde eine Konzentration von 0,2 µM CFSE verwendet, für die SIINFEKL-gepulste Zielpopulation 2 µM CFSE. Danach wurde zweimal mit PBS gewaschen, die Zellkonzentrationen auf je 5×10^7 Zellen /ml eingestellt und Zielpopulation und Kontrollpopulation im Volumenverhältnis 1:1 gemischt. Das Ergebnis (gleiche Zellzahl pro Population) wurde im FACS kontrolliert und DC-immunisierten Versuchstieren bzw. naiven Kontrolltieren 1×10^7 der markierten Zellen i.v. in die Schwanzvene injiziert. 20 Stunden nach Injektion wurde den Tieren die Milz sowie die inguinalen Lymphknoten entnommen und im FACS separat auf das Verhältnis Zellzahl der Kontrollpopulation ($CFSE_{high}$) zur Zellzahl der Zielpopulation ($CFSE_{low}$) analysiert. Die Lyseraten in den DC-immunisierten Tieren wurden daraufhin nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{spezifische Lyse} = 1 - \frac{\left(CFSE_{high} / CFSE_{low} \right)}{\sum_{n=1}^n [CFSE_{high}^{(Kontroll-)} / CFSE_{low}^{(Kontroll-)}] / n}$$

2.2.8. OT-1 Proliferationsversuche *in vivo/in vitro*

Milz und Lymphknoten transgener OT-1 Mäuse wurden entnommen und zu einer gepoolten Einzelzellsuspension mit einer Zellkonzentration von 10^7 Zellen/ml aufgearbeitet. Es folgte daraufhin die Färbung mit $5 \mu\text{M}$ des Lebendfarbstoffes CFSE in 20 ml PBS/0,01% BSA für 10 Minuten bei 37°C . Danach wurde zweimal mit PBS gewaschen. Für die *in vivo* OT-1 Proliferationsversuche erfolgte die Einstellung auf 5×10^7 Zellen/ml. Eine Woche nach der Vakzinierung mittels 2 Millionen OVA-DC i.p. wurden den Empfängermäusen 1×10^7 CFSE-gelabelte OT-1 Zellen intravenös injiziert. 7 Tage nach adoptivem Transfer erfolgte die Bestimmung der Proliferationsaktivität der übertragenen, CFSE-gelabelten OT-1-Zellen mittels FACS-Analyse unter Gegenfärbung mit einem CD8-Antikörper. Durch die exponentielle Abnahme der CFSE-Intensität mit jeder weiteren Zellteilung konnte dadurch die Proliferation aktivierter, sich klonal expandierender CD8-T-Zellen mit OT-1 Hintergrund gemessen werden. Ein analoges Vorgehen erfolgte bei der Bestimmung der Proliferationsaktivität der OT-1-Zellen *in vitro*. Hierbei wurden die so markierten, CFSE-positiven OT-1 T-Zellen mit 10^5 LPS aktivierten OVA-DC in verschiedenen Verhältnissen für fünf Tage in 12 Well-Platten unter IL-2 (20 ng/mL) Zugabe kokultiviert. Die Hälfte des Kulturmediums wurde alle zwei Tage ausgetauscht. Gemcitabin wurde dabei in 1, 2, 10, 20, 40, 100, 200, 500, 1000 nM Konzentrationen ab Tag 1 der Kokultur hinzugefügt. An Tag 5 der Kokultur erfolgte das Ernten der Zellen und die FACS-Analyse wie oben beschrieben.

2.2.9. Tumormodelle

2.2.9.1 Subkutaner Tumormodell

Im Rahmen der Tumorinokulation wurden den Mäusen unter Isoflurannarkose 1×10^6 vitale Panc02-OVA-Tumorzellen in 100 μl PBS subkutan in die rechte Flanke injiziert. Zur Injektion wurden zu 90 Prozent konfluent wachsende Tumorzellen verwendet, die zuvor mit Hilfe von einem 0,2% EDTA/Trypsin-Gemisch abgelöst und zweimal in PBS gewaschen worden waren, um Serumrückstände komplett zu entfernen. Nach Tumorzellinjektion wurde die Tumorgöße (Länge der Tumoren in mm x Breite der Tumoren in mm) möglichst dreimal pro Woche mit Hilfe einer Schublehre vermessen. Auf eine Tiefenmessung und damit auf die Möglichkeit einer Volumenberechnung wurde verzichtet, da eine Tiefenmessung nur schwer und daher ungenau durchführbar ist. Als Versuchsabbruchkriterium galten Verhaltensauffälligkeiten bei den Tieren oder das Überschreiten einer Tumorfläche von 150 mm^2 .

2.2.9.2. Orthotopes Tumormodell

Die Narkoseeinleitung erfolgte durch die intraperitoneale Injektion der Kombinationsnarkose-Mischung. Nach ca. 10 min war Sedierung und Analgesie ausreichend, so dass mit der Operation begonnen werden konnte. Die linke Flanke wurde mit Hilfe eines Einmalrasierers von der Fellbehaarung befreit und anschließend mit 70-prozentigem Ethanol desinfiziert. Die übrige Fläche wurde steril abgedeckt. Nach einem ca. 1 cm langen Subkostalschnitt erfolgte die Darstellung des Peritoneums durch stumpfe Präparation. Das Peritoneum wurde ebenfalls unter Schonung der darunter liegenden Strukturen eröffnet. Nach Fassen der Milz konnte das daran assoziierte Pankreas samt peripankreatischem Fettgewebe nach extrakorporal luxiert werden. Mit Hilfe einer Insulinspritze wurden 0,25 Millionen Panc02-(OVA) Tumorzellen in 20 µl PBS in das Pankreas bzw. das peripankreatische Fettgewebe injiziert. Es wurde dabei auf eine exakte intrapancreatische Injektion unter Vermeidung einer intraperitonealen Tumorzellverschleppung geachtet. Milz und Pankreas wurden stumpf an ihren ursprünglichen intraperitonealen Lokus zurückgebracht. Peritoneum und Cutaneum wurden separat durch jeweils zwei Stiche mit einem Prolene 5-0 Faden verschlossen. Zur Beendigung der Narkose wurde die Antagonisierungsreagenz subkutan in den Nacken injiziert. Nach Verschluss des OP-Situs und Antagonisierung wurden die Tiere für weitere zwölf Stunden unter einer Rotlichtlampe gehalten, um die Körpertemperatur zu stabilisieren. An Folgen des Eingriffes verstarben weniger als 2% der Tiere.

Kombinationsnarkose:

Wirkstoff	Dosierung	Wirkung
Alpha2-Agonist Medetomidin	0,5 mg/kg KG i.p.	Sedierung, Analgesie, Bradykardie, Relaxation
Benzodiazepin Midazolam	5 mg/kg KG i.p.	Anxiolyse, Relaxation, Atemdepression, Amnesie
Morphin Fentanyl	0,05 mg/kg KG i.p.	Starke Analgesie, Atemdepression, mäßige Sedierung, vagale Stimulation, Bradykardie

Antagonisierung der Kombinationsnarkose:

Wirkstoff	Dosierung	Wirkung
Alpha2-Blocker Atipamezol	2,5 mg/kg KG s.c.	Medetomidin-Antagonist
Flumazenil	0,5 mg/kg KG s.c.	Benzodiazepinantagonist
Naloxon	1,2 mg/kg KG	Opioidantagonist, kompetitiv

2.2.9.3. Bildgebung mittels Kleintier-CT

Durch eine Kooperation mit der Firma Zinsser Analytic (Frankfurt, D) konnte in der letzten orthotopen Versuchsreihe ein Kleintier-CT-Gerät der Marke „la Theta“ genutzt werden.

Damit konnten in Multislice-Technik erworbene CT-Abdomen-Aufnahmen der Versuchstiere angefertigt werden. Zur Aufnahme der Bildserien wurden die Versuchstiere an Tag 30 nach Tumorimplantation mit Hilfe des Narkosemixes anästhesiert. Nach intravenöser Kontrastmittelgabe von 200 µl Isovist 300 mit anschließender Platzierung der Mäuse in der Haltevorrichtung des CT-Geräts erfolgte 20 Sekunden nach Bolusgabe die Bildakquisition. Technische Parameter waren dabei 80 kV Röhrenspannung und 500 µA Anodenstrom. Die Schichtdicke betrug 1 mm. Nach Beendigung der CT-Aufnahme erfolgte die Antagonisierung des Narkosemixes. Mit Hilfe der CT-Analysesoftware des Herstellers konnte anschließend aus dem gewonnenen Datensatz das Tumolvolumen zur Darstellung gebracht werden.

2.3. Zellulär-immunologische Methoden

2.3.1. Zellkultur

Die Zellkultur erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei einer Temperatur von 37°C, fünf prozentigem CO₂/Luftgemisch und einer Luftfeuchtigkeit von 95 Prozent. Sämtliche *in vitro* Experimente mit eukaryontischen Zellen wurden ausschließlich unter sterilen Bedingungen in einer *LaminAirFlow* Werkbank durchgeführt. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde eine Trypanblaufärbung (0,25% in PBS) unter Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Die Tumorzelllinien wurden in 75 - 175 ml Kulturflaschen in geeignetem Medium kultiviert. Adhärente Zellen wurden mit 0,02% EDTA/Trypsin für 5 Minuten bei 37°C abgelöst und mit PBS gewaschen. Für die Zelllinien Panc02-OVA und B16-OVA wurde RPMI Vollmedium unter Zusatz von 1 mg/ml Geneticin zur Selektion des OVA-Konstrukt-exprimierender Tumorzellen verwendet. In sämtlichen Zelllinien wurde eine mögliche Kontamination mit Mykoplasmen durch regelmäßige Testung ausgeschlossen.

2.3.2. Bestrahlung von Tumorzellen

Panc02-OVA-Tumorzellen (5 Mio/ml in RPMI Vollmedium) wurden in einer Petrischale in einem UV Radiator (Biotech Ebersberg, D) mit 0,75 J/cm² ultraviolettem Licht bestrahlt. Diese Dosis führte zur Apoptose der Zellen.

2.3.3. Isolation und Kultivierung dendritischer Zellen aus dem Knochenmark

Nach zervikaler Dislokation unter Isoflurannarkose mit äußerlicher Desinfektion der Maus mit 70-prozentigem Ethanol erfolgte die Präparation von Tibia und Femur. Gewebereste wurden mit Hilfe von Zellstoff entfernt. Der makroskopisch saubere Knochen wurde kurz mit

Ethanol abgespült und in ein Zellkulturgefäß mit RPMI Medium auf Eis überführt. Die Weiterverarbeitung des entnommenen Materials erfolgte in einer sterilen Werkbank. Nach nochmaliger, einminütiger Desinfektion des intakten Knochens mit Ethanol und anschließendem Waschen in PBS wurden Femur und Tibia am proximalen und distalen Ende eröffnet. Das Knochenmark wurde mit Hilfe einer 20 ml Spritze mit einer aufgesetzten 25 G Kanüle mit RPMI 1640 Medium über einem 40 µm Zellkulturfilter ausgespült. Nach der Zentrifugation (370g, 7min, 4°C) wurde das Pellet in 1 ml Erylysepuffer für 1 Minute aufgenommen und anschließend in PBS gewaschen. Die DC-Vorläuferzellen bei Kulturbeginn (Tag 0) wurden auf 0,75 Mio/ml eingestellt und in RPMI Vollmedium - supplementiert mit jeweils 20 ng/ml rekombinantem murinen GM-CSF bzw. IL-4 - kultiviert. Am Tag 3 der Kultur wurden 40 Prozent des ursprünglichen Mediumvolumens mit gleicher Zytokinkonzentration hinzugefügt. Durch sechs- bis siebentägige Inkubation in Anwesenheit von GM-CSF und IL-4 ließen sich vordifferenzierte, aber bezüglich ihrer Oberflächenmarker noch unreife DC generieren.

2.3.4. Antigenbeladung und Reifeinduktion dendritischer Zellen mit apoptotischen Tumorzellen bzw. OVA-Protein

Am Tag 6 der DC Kultur wurden die unreifen DC mit einem Zellschaber geerntet und in frischem Kulturmedium für 24 Stunden entweder mit UV-bestrahlten Panc02-OVA Tumorzellen kokultiviert oder alternativ mit 1 mg/ml OVA-Protein gepulst. Dabei betrug die Konzentration der dendritischen Zellen in Kultur 0,75 Mio./ml. Das Verhältnis DC:Tumorzelle wurde 1:5 gewählt. GM-CSF und IL-4 wurden erneut supplementiert. Nach Antigenbeladung erfolgte die DC-Aktivierung durch 300 ng/ml LPS-Zugabe für weitere 24 Stunden. Die adhärennten reifen dendritischen Zellen wurden daraufhin mittels eines Zellscrapers geerntet und abzentrifugiert. Nach zweimaligen Waschvorgängen in jeweils 50 ml PBS wurden die DC in Konzentrationen von 1×10^6 /ml bzw. 1×10^7 /ml angesetzt. Vor jeder Injektion erfolgte die routinemäßige Qualitätskontrolle auf die Expression der Oberflächenmarker CD11c, CD11b, MHCII und CD86 mittels Durchflusszytometrie.

2.3.5. Durchflusszytometrie

2.3.5.1. Bestimmung von Oberflächenmolekülen

Für durchflusszytometrische (FACS) Analysen wurden 1×10^5 – 1×10^6 Zellen in einem FACS-Röhrchen abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen im zurücklaufenden

Tropfen resuspendiert. Zur Färbung wurden die Zellen daraufhin 15 Minuten bei 4°C unter Lichtausschluss mit den Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern inkubiert und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Wenn nötig wurde PI zur Anfärbung der toten Zellen kurz vor der FACS-Analyse hinzugegeben. Die Fluoreszenzintensität der Zellen wurde mit einem FACSCalibur-Gerät gemessen und anschließend mit Hilfe der FloJo Software analysiert.

2.3.5.2. Intrazelluläre IFN- γ -Färbung

Zur Detektion spezifischer CD8-T-Zellen, die bei Antigenkontakt das Effektormolekül IFN- γ produzieren, wurden Splenozyten bzw. aus dem Blut isolierte Leukozyten in RPMI-Standardmedium in 96-Well-Platten ausplattiert. Das gewonnene Probenmaterial wurde dabei zu gleichen Teilen auf zwei Wells verteilt. Zu einer der beiden Probenhälften wurde zur Stimulierung und Aktivierung spezifischer T-Zellen das SIINFEKL- bzw. das p15E-Peptid (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) hinzugefügt. Die andere Probe wurde zu Kontrollzwecken mit dem nicht immunogenen TRP2-Peptid gepulst. Nach 4 Stunden Inkubation bei 37 Grad im Brutschrank wurde der Zellsuspension Brefeldin A in einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zur Inhibierung der Sekretion des intrazellulär produzierten IFN- γ beigemischt. Nach weiteren 4 Stunden Verweildauer im Brutschrank wurden die Platten zentrifugiert und das Zellpellet der eigentlichen intrazellulären Färbung unter der Verwendung IFN- γ - bzw. CD8-spezifischer Antikörper zugeführt. Ein analoges Vorgehen wurde mit Hilfe des MCHII-restringierten OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids ISQAVHAAHAEINEAGR zum Nachweis spezifischer, INF- γ -produzierender CD4-T-Zellen unternommen. Zur durchflusszytometrischen Messung intrazellulärer IFN- γ -Moleküle wurden die Zellen nach der konventionellen Oberflächenfärbung mit dem CD8/CD4 Antikörper mit 100 μl des Paraformaldehyd-haltigen Fixierungspuffers für 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) fixiert und anschließend in PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit 100 μl Saponin-haltiger Lösung (intrazellulärer Lysepuffer) für 15 Minuten permeabilisiert und der IFN- γ -Antikörper für die intrazelluläre Färbung hinzugegeben. Nach einer weiteren Inkubationsphase von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die FACS-Analyse.

2.3.5.3. MCHI-Pentamer Färbung

Pentamer Einheiten – bestehend aus fünf MCHI-Peptid-Komplexen, die zentral über ein Trägermolekül mit gekoppeltem Fluorochrom miteinander verbunden sind – zeigen ein hohes Bindevermögen gegenüber CD8-T-Zellen, deren T-Zell-Rezeptoren für diese MCHI-Peptid-

Kombination spezifisch sind. Die Detektion einer spezifischen CD8-Zellantwort gegen das MCHI-restringierte SIINFEKL-Epitop erfolgte aus dem peripheren Blut. Nach Erythrozytenlyse erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit 4 µl der Pro5-OVA₂₅₇₋₂₆₄-H-2kb-PE Pentamer-Reagenz im Dunkeln. Nach zwei erneuten Waschschrritten wurde die Gegenfärbung mittels CD8-Antikörper sowie die FACS-Analyse durchgeführt.

2.3.6. Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA)

2.3.6.1. Nachweis OVA-spezifischer Antikörper aus dem Serum

Die Serum Antikörpertiter wurden bestimmt, in dem 96-Well-ELISA-Platten über Nacht mit Ovalbumin (10 mg/ml in PBS) bei 4°C beschichtet wurden. Nach einstündigem Blocken mit Binding Buffer sowie dreimaligen Waschschrritten mit dem Waschpuffer wurden 50 µl der vorher 1:100 verdünnten Mausserumproben hinzugefügt. Nach 1 Stunde Inkubation wurden die Platten erneut gewaschen. Zum Nachweis muriner Immunglobuline wurden verschiedene Anti-Maus-Antikörper, die ihrerseits an das Enzym HRP (horse-radish-peroxidase) gekoppelt waren, hinzugefügt und für eine weitere Inkubationsperiode von einer Stunde belassen. Für die Gesamt-IgG sowie für die IgG1-Subklasse-Bestimmung wurden eine Antikörperverdünnungsstufe von 1:4.000 gewählt, für die der IgG2a Subklasse 1:2.000. Im Anschluß an die Inkubation wurden die Ansätze erneut gewaschen. Zur Entwicklung der Nachweisreaktion wurde OPD-Substrattabletten (o-Phenylenediamin Dihydrochlorid und Percarbamid) in Wasser gelöst und zu den Wells hinzugefügt. Nach 10-20 Minuten wurde die chemische Reaktion durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt. Die Auswertung erfolgte mittels eines ELISA-Lesegerätes in einem Spektrumbereich von 490 nm, bei gleichzeitiger Korrektur der erhaltenen Werte um die im 690 nm Wellenlängenbereich gemessenen Datensätze. In allen Versuchen wurden biologische Triplikate angefertigt.

2.3.7. Zellvermittelter Zytotoxizitätstest (⁵¹Chrom-Lyse-Test)

Der ⁵¹Chrom-Lyse-Test stellt einen quantitativen Test dar, mit dem die zytotoxische Aktivität von T-Zellen und NK-Zellen gegenüber mit ⁵¹Chrom-markierten Zielzellen ermittelt wird. Durch Zytolyse chromhaltiger Zielzellen durch zytotoxische T-Zellen wird ⁵¹Chrom in den Überstand freigesetzt und kann in diesem mit Hilfe eines γ-Zählers gemessen werden. Da sich die Menge des freigesetzten ⁵¹Chroms proportional zu der durch Zytolyse der Zielzellen verhält, lässt sich ein Rückschluss auf die zytotoxische Aktivität der Effektorzellen zu. Zur Durchführung des Tests wurden die Zielzellen (Panc02, Panc02-OVA, Mo5-Zellen) in einem

14 ml Zellkultur­röhrchen abzentrifugiert, in 100 µl FCS resuspendiert und mit Na₂⁵¹CrO₄ (100µCi/Zielzellprobe) bei 37°C für 1 Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in RPMI Vollmedium wurden je 5.000 Zielzellen/Well auf einer 96-Well-Platte in RPMI Vollmedium ausplattiert und die vorher ebenfalls gewaschenen, *in vitro* aktivierten OT-1-Effektorzellen – in unterschiedlichen Verhältnissen von Effektorzellen zu Zielzellen (E:T Ratio) – zu einem Gesamtvolumen von 200 µl dazugegeben. Nach 4 Stunden Inkubation bei 37°C, wurden jeweils 50 µl Überstand/Well in Szintillationsröhrchen übertragen. In einem γ-Zähler wurde die Radioaktivität des Überstandes in *counts per minutes* (cpm) gemessen. Für jede markierte Zielzelllinie wurde die Spontanfreisetzung von ⁵¹Chrom-durch alleinige Inkubation mit Medium und die Maximalfreisetzung durch Zugabe des Detergenz Triton-X 100 zu einer Endkonzentration von 2,5 % bestimmt. In allen Versuchen wurden biologische Triplikate angefertigt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Computerprogramms. Dabei wurde die Stärke der Zytotoxizität der Effektorzellen in Prozent spezifische Lyse angegeben. Die spezifische Lyse wurde dabei wie folgt berechnet:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{[\text{Experimenteller } ^{51}\text{Cr-Release(cpm)}] - [\text{Spontaner } ^{51}\text{Cr-Release(cpm)}]}{[\text{Maximaler } ^{51}\text{Cr-Release(cpm)}] - [\text{Spontaner } ^{51}\text{Cr-Release(cpm)}]}$$

2.4. Statistische Analyse

Die Tumorgrößen sind als arithmetisches Mittel angegeben, wobei die Streuung der Werte jeweils als Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of mean*, SEM) angegeben wird. In allen anderen Fällen erfolgte die Darstellung des Mittelwertes mit entsprechender Standardabweichung. Um die statistische Signifikanz der Unterschiede einzelner Ergebnisse zu berechnen, wurde der zweiseitige Student-t-Test für paarige Stichproben parametrischer Verteilungen angewendet. Im orthotopen Tumorsystem wurde zum Vergleich der unterschiedlichen Überlebenszeiten der log-rank-Test durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten < 0,05, < 0,01 bzw. <0,001 angenommen und ist durch Markierung mit einem *, ** bzw. *** angezeigt. Die rechnerische Auswertung erfolgte mittels SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA).

3 Ergebnisse

3.1. Etablierung des OVA-Modellantigen-Systems zum Nachweis der induzierten immunologischen Antwort nach DC-Vakzinierung

Um die Einflussnahme von Gemcitabin auf die durch die Vakzinierung mittels dendritischer Zellen generierte, adaptive Immunantwort näher zu untersuchen, wurde auf das immunologisch gut charakterisierte „chicken egg“ Ovalbumin-Modellantigen (OVA) zurückgegriffen. Hauptziel war es zu Beginn, eine auf DC-basierte Vakzinierungsstrategie zu etablieren, die neben der Induktion spezifischer Antikörper eine möglichst potente CD8-T-Zellantwort in der Maus gegen das OVA-Antigen induziert.

3.1.1. Die subkutane Vakzinierung mit OVA-Protein-gepulsten DC führt zu einer messbaren T-Zellantwort *in vivo*

Aufgrund begrenzter Literaturangaben über die Effektivität OVA-Protein-gepulster BMDC hinsichtlich der Induktion einer OVA-spezifischen T-Zellantwort *in vivo* sollte vorerst deren Wirksamkeit experimentell evaluiert werden. Zu diesem Zweck wurden C57BL/6 Mäuse mit 3×10^5 bzw. 2×10^6 OVA-Protein-gepulsten DC subkutan immunisiert. Ersterer Ansatz entsprach dabei der verwendeten Anzahl in den bisherigen Standardvakzinierungsschemata unserer Arbeitsgruppe mit Antigenbeladung der DC durch apoptotische Tumorzellen.

Es zeigte sich, dass nur durch die Gabe von zwei Millionen OVA-Protein-gepulster DC eine eindeutig nachweisbare OVA-spezifische CD8-T-Zellantwort induziert werden konnte (Abb. 3.1). Der Anteil SIINFEKL-spezifischer T-Zellen am Gesamt-CD8-T-Zellpool in dieser Gruppe lag dabei in der Pentamer-Färbung im Durchschnitt bei 0,75 Prozent bzw. bei 0,42 Prozent im intrazellulären IFN- γ -Nachweis. Im Vergleich dazu kam es unter der Vakzinierung mit 0,3 Millionen OVA-DC lediglich zu einer relativ schwachen T-Zellantwort mit im Mittel 0,04 Prozent, die jedoch nur in der IFN- γ -Färbung eindeutig nachgewiesen werden konnte. In der Pentamer-Färbung war die Detektion dieser niedrigen T-Zellfrequenzen durch das Auftreten unvermeidbarer unspezifischer Interaktionen von CD8-T-Zellen mit den MHCI-Molekülen der Pentamere – die zu falsch positiven Events von rund 0,13 Prozent im T-Zell-Gate auch unbehandelter Kontrolltiere führten – wesentlich erschwert. Diese unspezifischen Interferenzen waren im IFN- γ -Assay vernachlässigbar gering, womit

sich dieser in unseren Händen als ein sensitiveres Instrument zur Detektion geringer spezifischer T-Zellzahlen erwies.

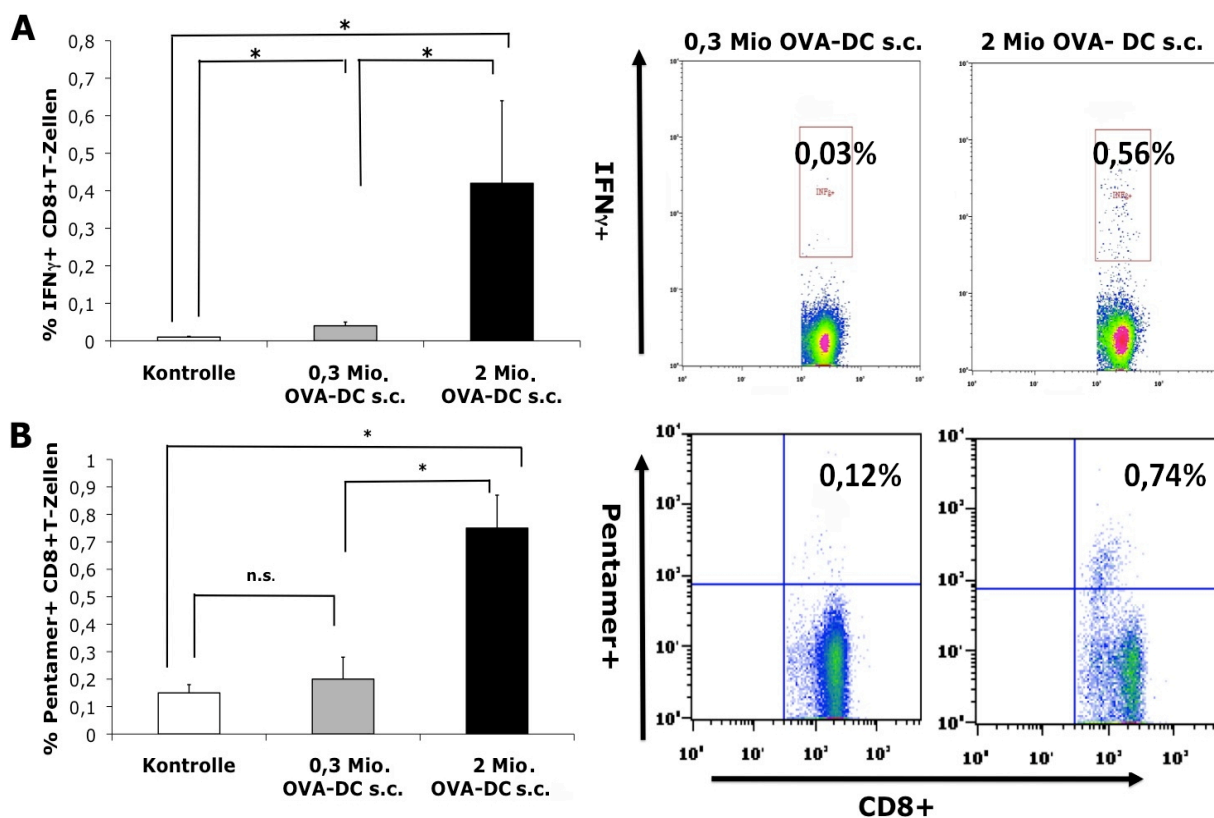


Abb. 3.1: Nur die s.c.-Gabe von 2×10^6 OVA-DC führt zu einer nennenswerten T-Zellantwort. C57BL/6 Mäuse ($n = 4$ pro Gruppe) wurden zweimal in wöchentlichem Abstand subkutan mit 3×10^5 bzw. 2×10^6 OVA-Protein-gepulsten DC immunisiert. Das Immunmonitoring erfolgte an Tag 7 nach der zweiten DC-Gabe aus dem peripheren Blut. Die Prozentangabe bezieht sich auf den Anteil SIINFEKL-spezifischer T-Zellen am Gesamt-CD8-T-Zellpool. **A)** IFN- γ -Assay **B)** Pentamer-Färbung

3.1.2. Intraperitoneal und intravenös verabreichte OVA-DC sind effektiver als subkutan applizierte OVA-DC in Bezug auf die Höhe der T-Zellantwort

Als Nächstes sollte ein systematischer Vergleich verschiedener DC-Vakzinierungsrouten hinsichtlich ihrer Effektivität in der Generierung einer spezifischen Immunantwort gegen das OVA-Modellantigen durchgeführt werden. Dazu wurden die intraperitoneale sowie die intravenöse OVA-DC-Administration mit der subkutanen DC-Gabe verglichen. Ein besonderes Augenmerk galt – vor dem Hintergrund der geplanten Verwendung im orthotopen Tumormodell – der immunologischen Wirksamkeit der intraperitonealen DC-Vakzine. Aufgrund der Ergebnisse des Vorversuches wurden zur Immunisierung jeweils 2×10^6 OVA-DC pro Vakzinierung verwendet. Um unspezifische Stimulierungseffekte des Immunsystems im Rahmen der Applikation dieser hohen DC-Zellzahl abzugrenzen, erfolgte zudem in einer

weiteren Vergleichsgruppe die Gabe unbeladener und nur mit LPS aktivierter DC (ab hier als U-DC bezeichnet). Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abb. 3.2 dargestellt.

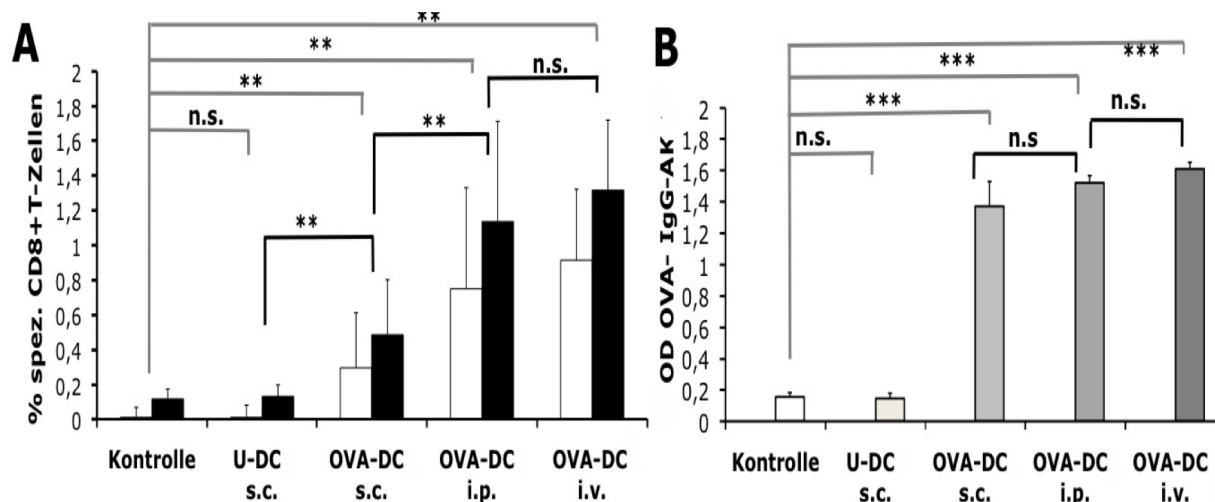


Abb. 3.2: Übersicht über die Effektivität unterschiedlicher Vakzinierungsrouten: i.p./i.v.-OVA-DC führen gegenüber der s.c.-Gabe zu überlegenen T-Zellantworten bei annähernd gleich hohen OVA-spezifischen Antikörpertitern. C57BL/6 Mäuse ($n = 8$ pro Gruppe) wurden zweimal in wöchentlichem Abstand mit 2×10^6 OVA-Protein-gepulsten DC i.p./i.v./s.c. bzw. nur mit LPS-aktivierten DC ohne Antigenzugabe (U-DC) immunisiert. Das Immunonitoring folgte an Tag 7 nach der zweiten DC-Gabe aus dem peripheren Blut. **A)** prozentualer Anteil SIINFEKL-reaktiver T-Zellen in der IFN- γ - (weiße Balken) bzw. Pentamer-Färbung (schwarze Balken) am Gesamt-T-Zellpool **B)** Bestimmung OVA-spezifischer Gesamt-IgG-Antikörper aus Serumproben im ELISA.

Die Höhe der generierten SIINFEKL-spezifischen CD8-Antwort fiel in der subkutanen Vakzinierungsgruppe im Vergleich zum Vorversuch mit durchschnittlich 0,29 Prozent spezifischen T-Zellen in der IFN- γ - bzw. 0,38 Prozent in der Pentamer-Färbung geringer aus. Dabei konnten in drei von acht Tieren in dieser Gruppe trotz der hohen DC-Anzahl nur sehr schwache T-Zellantworten zwischen 0,02 bis 0,04 Prozent in der IFN- γ -Färbung beobachtet werden. Demgegenüber erwies sich die spezifische T-Zellantwort in den Gruppen, in denen die OVA-DC intraperitoneal bzw. intravenös verabreicht worden waren, in beiden Nachweismethoden als deutlich überlegen: Der Mittelwert in der i.p.-Gruppe dafür lag bei 0,76 Prozent für die IFN- γ - bzw. 1,09 Prozent für die Pentamer-Färbung ($p = 0,0016$ bzw. $p = 0,004$ im Vergleich zur subkutanen Vakzinierung). Der niedrigste gemessene Wert im IFN- γ -Assay betrug dabei 0,24 Prozent. Analoges galt für die Gruppe mit intravenöser DC-Gabe. Hier zeigte sich eine noch eindeutiger Überlegenheit gegenüber der s.c.-Vakzinierungsrouten ($p = 0,0014$ in der IFN- γ -, sowie $p = 0,003$ in Pentamer-Färbung). Im direkten Vergleich zwischen der i.p.- und i.v.-Vakzinierung konnte lediglich eine Tendenz ohne Erreichen des

Signifikanzniveaus zugunsten einer höheren Immunantwort in der i.v.-Gruppe beobachtet werden. Der Nachweis spezifischer IFN- γ -produzierender CD4+TH1-T-Zellen unter Verwendung des MHCII-restringierten OVA₃₂₃₋₃₃₉-Epitops bei der Restimulierung der Leukozyten in der intrazellulären IFN- γ -Färbung gelang in allen drei Gruppen jedoch nicht.

In Bezug auf die humorale Antwort konnten in den Sera aller Tiere, die OVA-Protein gepulste DC erhalten hatten, eine deutliche IgG-Antikörperbildung gegen das OVA-Antigen nachgewiesen werden. Die im OVA-ELISA gemessene optische Dichte (OD), die als semiquantitativer Surrogatparameter für die Höhe der OVA-spezifischen Gesamt-IgG-Antikörpertiter herangezogen wurde, war hier überraschenderweise in den i.p.- und i.v.-Gruppen im Vergleich zur s.c.-Gruppe nur marginal erhöht. Interessanterweise war auch in den drei Mäusen der s.c.-Versuchsgruppe mit nur ausgeprägt geringer T-Zellantwort ein hoher Antikörpertiter feststellbar, der sich nicht wesentlich von dem der Tiere mit stärkerer T-Zellantwort unterschied.

Somit zeigten sich klare Unterschiede im Hinblick auf die Höhe der induzierten T-Zellantwort gegen das OVA-Antigen zwischen der subkutanen Vakzinierungsrouten einerseits und der intraperitonealen sowie intravenösen DC-Gabe andererseits. Im Gegensatz dazu verlief die Produktion OVA-spezifischer Antikörper in allen drei Vakzinierungsgruppen annähernd identisch.

3.1.3. Mit apoptotischen Panc02-OVA-beladene DC induzieren keine mittels IFN- γ - oder Pentamer-Färbung nachweisbare CD8-Antwort

In den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe mit dem Panc02-Tumormodell waren DC als Vakzine verwendet worden, die mit UV-bestrahlten, apoptotischen Panc02-Tumorzellen als Antigenquelle kokultiviert und anschließend mit LPS aktiviert worden waren. Dadurch konnte eine schwache spezifische T-Zellantwort gegen das p15E-Protein, welches ein intrinsisches Antigen der nativen Panc02-Tumorzelllinie darstellt, generiert werden. Diese ließ sich aber nur indirekt unter Verwendung eines hochempfindlichen *in vivo*-Zytotoxizitätsassays nachweisen. Die dabei gemessenen Lyseraten p15E-Peptid-beladener, markierter Targetzellen nach adoptivem Transfer in DC-immunisierte Mäuse betragen nur etwa zwölf Prozent (104). Nach erfolgreicher Transfektion der nativen Panc02-Zelllinie mit einem OVA-codierenden Konstrukt exprimierte diese nun zusätzlich zu dem organären p15E-

Antigen das immunologisch starke OVA-Modellantigen (ab hier Panc02-OVA). Im Folgenden wurde daher untersucht, in welchem Umfang DC (fortan als Panc02-OVA-DC bezeichnet), die mit apoptischen Panc02-OVA Tumorzellen beladen und mit LPS-Stimulus aktiviert worden waren, in der Lage sind, eine OVA-spezifische T-Zellantwort zu induzieren. Als Nachweismethoden hierfür sollten wieder die bereits etablierte intrazelluläre IFN- γ - sowie die SIINFEKL-Pentamer-Färbungen dienen.

16 CL57BL/6-Mäuse wurden zweimalig mit 2×10^6 Panc02-OVA-DC entweder s.c. oder i.p. immunisiert. Bei der Messung der T-Zellantwort im peripheren Blut eine Woche nach der letzten DC-Vakzine konnte jedoch weder in der Pentamer- noch in der IFN- γ -Färbung eine SIINFEKL-spezifische Immunantwort detektiert werden. Auch der Nachweis einer CD8-Antwort gegen das bereits in der originären Panc02-Zelllinie vorkommende Tumorantigen p15E konnte per IFN- γ -Assay mit p15E-Peptid als Stimulanz nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Obwohl sich mit den oben genannten Nachweismethoden keine spezifischen T-Zellen detektieren ließen, kam es nach s.c.-Tumor-Challenge mit Injektion von 1×10^6 Panc02-OVA-Zellen in die Flanke – kontralateralseitig zum Ort der s.c. DC-Gabe – in allen vakzinierten Mäusen zu einer kompletten Tumorprotektion. Daraus ließ sich ableiten, dass die Panc02-OVA-DC-Vakzine zwar in der Lage war, eine spezifische T-Zellantwort zu generieren, diese jedoch – trotz der Verwendung des immunologisch starken OVA-Antigens – zu schwach ausfiel, um selbst von der intrazellulären IFN- γ -Färbung detektiert zu werden. Die Nachweisgrenze spezifischer T-Zellfrequenzen des IFN- γ -Assays ist bei etwa 1:30.000 anzusiedeln.

3.2. Einfluss von Gemcitabin auf die mittels DC-Vakzine induzierte Immunantwort im tumorfreien System

Mit der Einführung des OVA-Modellantigens in die Panc02-OVA-Zelllinie sowie der Vakzinierung mit OVA-Protein-gepulsten DC standen nun die geeigneten immunologischen Werkzeuge zur Verfügung, um die Einflussnahme von Gemcitabin auf die DC-induzierte immunologische Antwort zu charakterisieren. Diese sollte vorerst im tumorfreien System – und damit unbeeinflusst von den immunsuppressiven Auswirkungen des Tumors – untersucht werden.

3.2.1. Suppression der adaptiven Immunantwort durch Gemcitabin *in vivo*

Um die Effekte von Gemcitabin auf die DC-vermittelte Generierung einer adaptiven Immunantwort gegen das OVA-Antigen genauer zu untersuchen, wurden 30 C57BL/6-Mäuse zweimal in wöchentlichem Abstand mit 2×10^6 OVA-Protein-gepulsten DC jeweils über die subkutane, intraperitoneale sowie intravenöse Route vakziniert. Die eine Hälfte der Tiere innerhalb jeder Gruppe ($n = 5$) erhielt parallel zu der DC-Vakzinierung insgesamt vier i.p.-Bolusgaben Gemcitabin mit $50 \mu\text{g}/\text{mg}$ pro Tier, jeweils appliziert an Tag zwei und Tag fünf nach jeder DC-Gabe. Diese Dosis entspricht umgerechnet der, die auch bei Patienten unter Gemcitabin-Therapie zur Anwendung kommt.

Im anschließenden Immunmonitoring war in allen drei DC-Vakzinierungsrouten unter Gemcitabin-Gabe eine deutliche Reduktion der OVA-spezifischen Immunantwort feststellbar. Diese betraf sowohl die T-Zell- als auch insbesondere die B-Zellantwort (Abb. 3.3 A/B.) Der Anteil der spezifischen, IFN- γ -produzierenden CD8-T-Zellen am Gesamtpool lag in den Gemcitabin-Gruppen in allen Gruppen bei rund 0,1 Prozent und war damit signifikant niedriger als in den korrespondierenden Gruppen ohne Gemcitabin-Gabe (Vergleich innerhalb der s.c.-Gruppen $p = 0,015$, i.p.-Gruppen $p = 0,021$, i.v.-Gruppen $p = 0,019$). Ein ähnliches Bild ergab sich für die Resultate der Pentamer-Färbung. Ein noch deutlicherer Unterschied zwischen Tieren mit bzw. ohne Gemcitabinexposition war bei der Antikörpertiter-Bestimmung mittels des OVA-ELISA feststellbar. Die Produktion OVA-spezifischer Antikörper wurde unter dem Einfluss von Gemcitabin nahezu komplett unterdrückt.

Analog durchgeführte Studien unter der Verwendung reduzierter Gemcitabindosen mit $25 \mu\text{g}/\text{mg}$ pro Injektion erbrachten vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Damit hatte sich gezeigt, dass Gemcitabin – unabhängig von der verwendeten Dosis und Immunisierungsroute – zu einer wesentlichen Suppression der DC-induzierten Immunantwort führte. Diese betraf die T-Zellreihe in wesentlich geringerem Umfang als die B-Zellen, deren OVA-spezifische Antikörperbildung fast vollständig zum Erliegen kam.

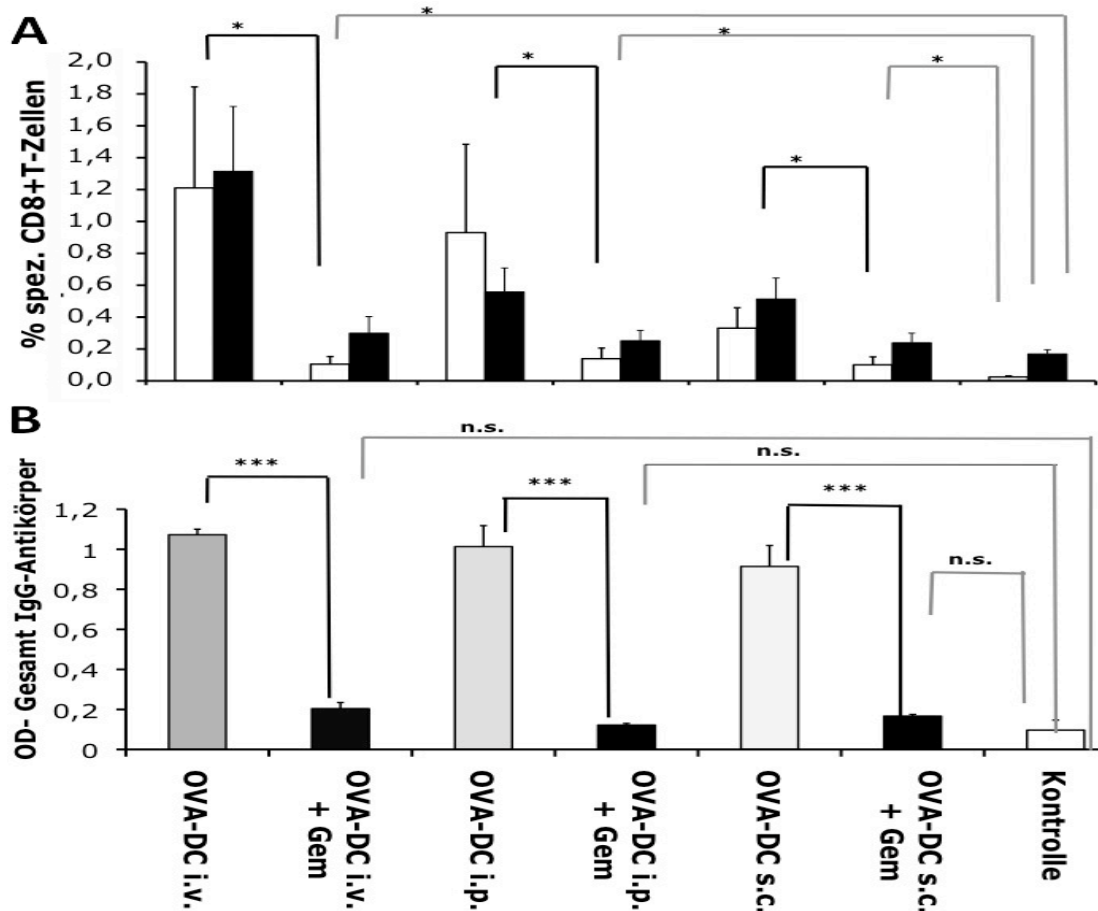


Abb. 3.3: Gemcitabin führt zu einer Reduktion der durch die DC-Vakzine induzierten adaptiven Immunantwort: Ergebnisse des Immunmonitorings an Tag 7 nach der zweiten DC-Gabe **A**) Verminderung des prozentualen Anteils SIINFEKL-spez. CD8-T-Zellen in der *IFN-γ*- (weiße Balken) bzw. *Pentamer*-Messung (schwarze Balken) in allen Gemcitabin Gruppen. **B**) Im ELISA der Serumproben zeigte sich eine nahezu vollständige Unterdrückung der OVA-spezifischen Gesamt-IgG-Antikörperproduktion durch Gemcitabin.

3.2.2. Gemcitabin nimmt keinen Einfluss auf Antigenpräsentation und T-Zellstimulation der DC *in vivo*

Um auszuschließen, dass dem Phänomen der Gemcitabin-induzierten Immunsuppression ein direkter Effekt des Chemotherapeutikums auf die DC-Vakzine selbst zugrunde lag, wurde das Überleben sowie die T-Zellstimulationsfähigkeit der verabreichten DC *in vivo* näher untersucht. In einer ersten Studie wurden dazu 2×10^6 CFSE-gelabelte, unbeladene DC subkutan in den Hinterlauf von C57BL/6-Mäusen injiziert ($n = 5$ pro Gruppe). Die Gemcitabin-Gabe erfolgte in der entsprechenden Gruppe an Tag zwei und fünf in der Standarddosierung $50 \mu\text{g}/\text{mg}$. Am siebten Tag erfolgte die Tötung der Mäuse mit gleichzeitiger Entnahme der poplitealen Lymphknoten mit weiterführender FACS-Analyse.

Es zeigte sich, dass die Gesamtzellzahl in den Popliteallymphknoten DC-behandelter Tiere ohne Gemcitabinexposition fast doppelt so hoch ausfiel wie die der DC-vakzinierten Tiere

unter Gemcitabin-Gabe (Abb. 3.4A). Jedoch war der Anteil migrierter, CFSE-positiver $CD11c^{pos}CD11b^{pos}$ -Zellen an der Gesamtzellpopulation in der Gemcitabin-Gruppe mit 0,05 Prozent knapp zweifach über dem der Gruppe mit alleiniger DC-Gabe. Daraus errechnete sich letztendlich annähernd dieselbe absolute Anzahl CFSE-positiver DC in beiden Gruppen. Das Überleben der injizierten bzw. in die Lymphknoten migrierten DC *in vivo* schien damit nachweislich nicht durch Gemcitabin negativ beeinflusst worden zu sein (Abb. 3.4B/C).

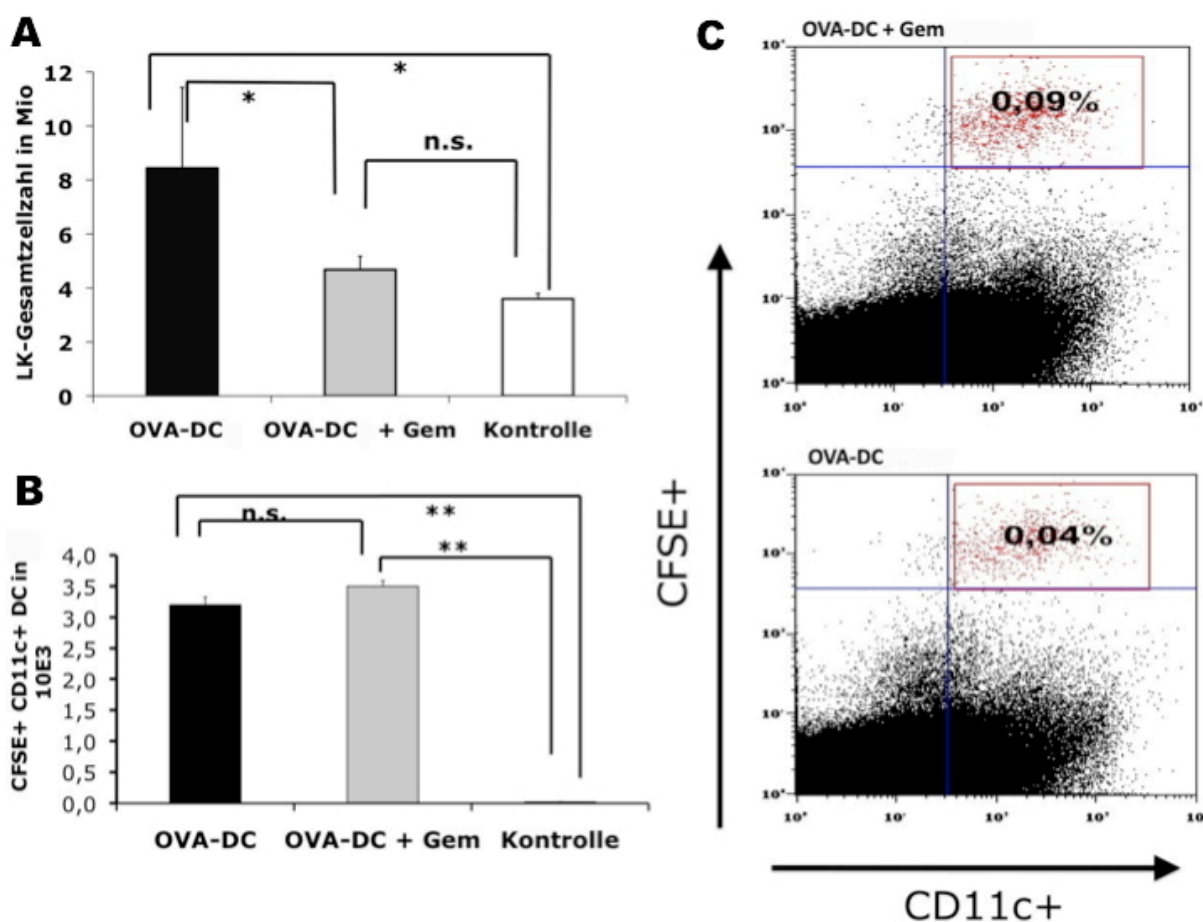


Abb. 3.4: Die Anzahl und das Überleben der migrierten DC in den Lymphknoten wird durch die Gemcitabingabe nicht verringert. A) Zunahme der Gesamtzellzahl im Lymphknoten nach DC-Gabe, die unter begleitender Gemcitabingabe nahezu ausbleibt. B) Die Gesamtzahl eingewanderter CFSE+ $CD11c+$ und $CD11b+$ DC in den poplitealen Lymphknoten an Tag 7 ist nach DC-Gabe in beiden Gruppen fast identisch. C) Darstellung des prozentualen Anteils $CD11c+$ und CFSE+ DC an der Gesamtzellzahl der poplitealen Lymphknoten in der FACS-Analyse.

Um zu demonstrieren, dass es auch keine funktionellen Unterschiede im Hinblick auf die Fähigkeit zur Antigenpräsentation und T-Zellaktivierung zwischen den DC unter dem Gemcitabin-Regime und denen der Kontrollgruppe gab, wurde der Versuch in modifizierter Form erneut durchgeführt. Anstatt unbeladener, CFSE-gelabelter DC wurden nun OVA-

Protein-gepulste DC intraperitoneal injiziert. Unter Anwendung des üblichen Gemcitabin-Schemas erfolgte eine Woche nach DC-Gabe der adoptive Transfer von CFSE-gelabelten Immunzellen transgener OT-1 Mäuse, die ihrerseits den für das SIINFEKL-Epitop spezifischen CD8-T-Zell-Rezeptor konstitutiv exprimieren. Drei Tage nach dem Transfer wurde das Proliferationsverhalten dieser CFSE-gelabelten, CD8-positiven OT-1-Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht. In beiden Gruppen konnte eine unterschiedslose Teilungsaktivität der CSFE-markierten T-Zellklone festgestellt werden (Abb. 3.5). Dies bestätigte, dass auch die immunologische Kapazität der DC-Vakzine zur T-Zell-Stimulation durch die parallel stattfindende Gemcitabingabe nicht negativ beeinträchtigt wurde.

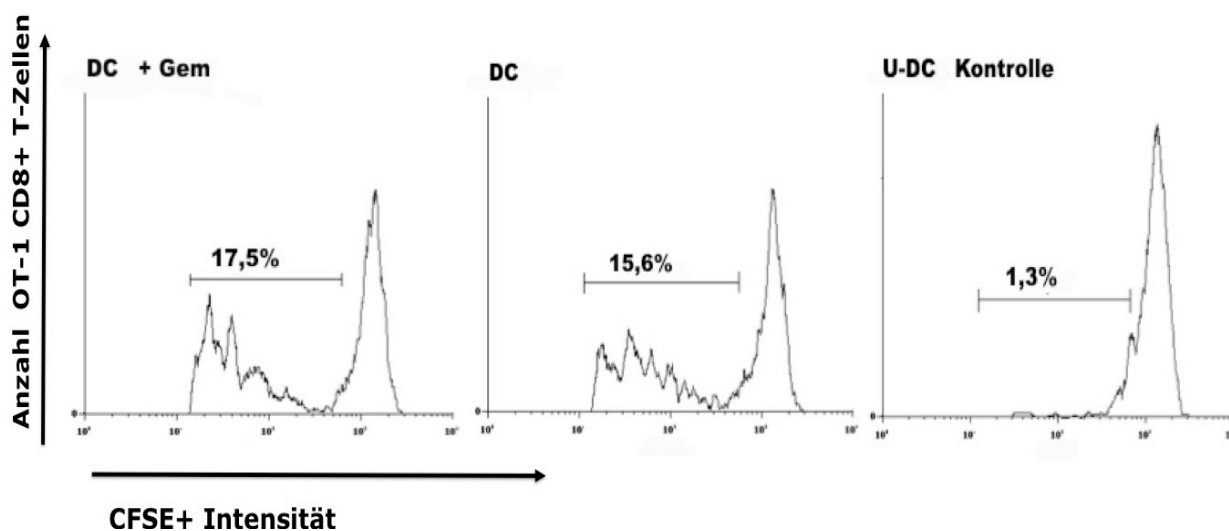


Abb. 3.5: Antigenpräsentation und T-Zellstimulierung der DC-Vakzine wird durch Gemcitabin nicht negativ beeinflusst. Versuchstieren ($n=5$ pro Gruppe) wurden 2×10^6 OVA-Protein gepulste bzw. LPS-aktivierte, unbeladene DC (in der U-DC Kontrollgruppe) intraperitoneal verabreicht. Es folgte in der Kombinations-Gruppe die Gabe von $50 \mu\text{g}/\text{mg}$ Gemcitabin an Tag 2 und Tag 5. An Tag 7 wurden 1×10^7 Mio. zuvor mit CFSE-gelabelte OT-1 CD8-T-Zellen intravenös transferiert. An Tag 10 erfolgte die Quantifizierung der Proliferationsaktivität mittels FACS-Analyse aus dem peripheren Blut. Die Histogramme zeigen eine unterschiedslose Abnahme des CFSE-Peaks zwischen der OVA-DC bzw. OVA-DC+Gem-Gruppe sowie eine Verschiebung der Fluoreszenzaktivität als Anzeichen für eine stattgefundenen Teilungsaktivität spezifischer OT-1 CD8-T-Zellen. Jeder neue Peak steht für einen weiteren T-Zellteilungszyklus. In der U-DC-Kontrollgruppe blieb die Proliferation der OT-1 CD8-T-Zellen hingegen aus.

3.2.3. Gemcitabin hemmt die Proliferation von CD8-T-Zellen *in vitro*

Nachdem belegt worden war, dass sich die beobachtete Immunsuppression von Gemcitabin nicht auf DC-Ebene abspielte, lag nahe, die Erklärung in der direkten Hemmung der Zellteilung aktivierter T-Zellen zu suchen. Eine Studie von Nowak et al. hatte bereits die direkte antiproliferative Wirkung von Gemcitabin auf die klonale Expansion von T/B-Zellen

in vitro demonstriert, die unspezifisch mittels CD3- bzw. LPS-Stimulus aktiviert worden waren (105). Ein von uns durchgeführter *in vitro* Proliferationsassay, in dem CFSE-markierte OT-1-Zellen mit OVA-beladenen, LPS-aktivierten DC in den Verhältnissen 1:1 bzw. 5:1 und 10:1 für drei Tage unter dem Einfluss verschiedener Gemcitabinkonzentrationen kokultiviert wurden, zeigte in der FACS-Analyse ebenfalls, dass Gemcitabin ab Konzentrationen von 20 nM zu einer kompletten Proliferationsinhibierung der SIINFEKL-spezifischen OT-1 CD8⁺ T-Zellen führte (ohne Abbildung).

3.2.4. Durch Modifikation des Vakzinierungsschemas lässt sich die Gemcitabin-vermittelte Reduktion der Immunantwort vermindern

Es hatte sich gezeigt, dass T-Zellen vor allem während ihrer exponentiellen Teilungsphase vulnerabel gegenüber der antiproliferativen Wirkung von Gemcitabin sind. Daher sollte untersucht werden, ob sich durch Modifikation der Abfolge im DC-Gemcitabin-Schema eine Verbesserung der T-Zellantwort unter Chemotherapie-Exposition erzielen lassen könnte. Es sollte dabei die Strategie verfolgt werden zuerst mittels zwei DC-Vakzinierungen ohne Gemcitabin-Einfluss eine robuste, stabile T-Zellantwort zu generieren, die dann später auf die parallel zur weiteren DC-Gabe stattfindende Gemcitabin-Gaben weniger empfindlich reagieren sollte. Der Ablauf dieses Vakzinierungsschemas mit sekundärer Gemcitabin-Gabe (ab hier OVA-DC+2ndGem oder kurz „2ndGem“) sowie ein Überblick über die weiteren Versuchsgruppen ist in Abbildung 3.6A skizziert.

Eine Woche nach der vierten DC-Vakzinierung erfolgten die zweiten IFN- γ - und Pentamer-Messungen zur Quantifizierung der DC-Vakzine-induzierten Immunantwort. Hierin zeigte sich, dass durch den zeitversetzten Start des Gemcitabin-Regimes die Reduktion der T-Zellantwort im Vergleich zur Gemcitabin-Gabe von Beginn an (OVA-DC+Gem) deutlich verringert werden konnte, wobei in der 2ndGem-Gruppe annähernd die T-Zellfrequenzen der chemotherapiefreien Gruppe erreicht wurden (Abb. 3.6B). Sowohl in der OVA-DC- als auch in der OVA-DC+2ndGem-Gruppe lag die gemessene T-Zellantwort statistisch signifikant über der OVA-DC+Gem-Gruppe. Zwar war die Immunantwort in der OVA-DC+2ndGem-Gruppe mit 0,27 Prozent (IFN- γ -Messung) bzw. 0,41 Prozent (Pentamer-Messung) geringer als in der OVA-DC-Gruppe mit 0,45 Prozent bzw. 0,55 Prozent, jedoch war der Abfall moderat. Das Signifikanzniveau wurde dabei nur knapp verfehlt.

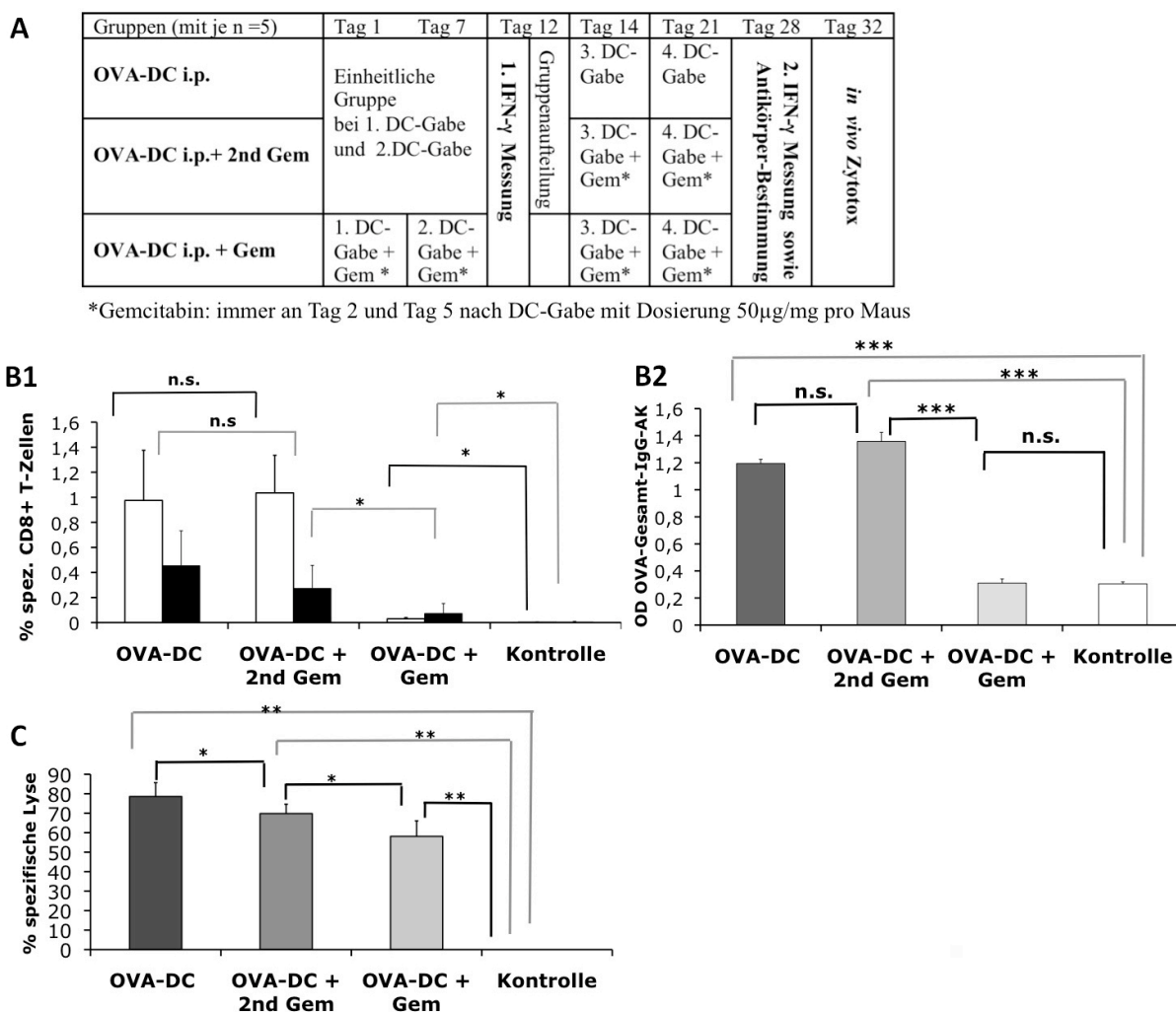


Abb. 3.6: Durch den zeitversetzten Start der Gemcitabingabe lässt sich die Reduktion der induzierten Immunantwort verringern. *A)* Skizierung des Versuchsschemas: Anhand der Ergebnisse der ersten IFN- γ -Messung an Tag 12 erfolgte das Poolen des ursprünglich mittels OVA-DC vakzinieren Gesamtkollektivs in zwei möglichst homogene Untergruppen: OVA-DC i.p. und OVA-DC i.p.+2ndGem. In Letzterer begann ab Tag 16 die zusätzliche Gabe von Gemcitabin. *B)* Verringerte Immunsuppression unter OVA-DC i.p.+2ndGem im Immunmonitoring gegenüber der OVA-DC+Gem-Gruppe **B1)** T-Zellantwort gemessen an Tag 12 (weiße Balken) sowie an Tag 28 (schwarze Balken) in der IFN- γ -Färbung. **B2)** Gesamt-IgG-Antikörper im ELISA **C)** Ergebnisse des *in vivo* Zytotoxizitätsassays an Tag 32 nach i.v. Injektion von 1×10^7 CFSE-markierter und mit SIINFEKL-Peptid beladener Splenozyten als Targetzellen.

Um letztendlich genauere Aussagen über den funktionellen Status der induzierten T-Zellantwort zwischen den verschiedenen Immunisierungsansätzen dieses Versuchsaufbaus treffen zu können, wurde abschließend deren zytotoxische Kapazität in einem *in vivo*-Zytotoxizitätsassays näher evaluiert. Als Targetzellen dienten hierbei CFSE-markierte, SIINFEKL-Peptid beladene Splenozyten unbehandelter Mäuse, die den zuvor immunisierten Versuchstieren sowie naiven Kontrolltieren intravenös verabreicht wurden. Anders als bei der Messung der T-Zellfrequenz waren bei der Analyse der Daten aus dem *in vivo*

Zytotoxizitätsassays signifikante Unterschiede zwischen allen drei Vakzinierungs-Schemata nachweisbar, wobei die Fähigkeit der OVA-spezifischen T-Zellen zur Lyse der Targetzellen in der OVA-DC-Gruppe am stärksten war. Anders als bei der direkten Quantifizierung der T-Zellantwort war die Lysekapazität innerhalb des OVA-DC+2ndGem-Schemas im Vergleich zur OVA-DC Vakzinierung ohne Gemcitabineinfluss signifikant reduziert ($p = 0,023$). Jedoch waren beide Gruppen der OVA-DC+Gem-Gruppe diesbezüglich weiter überlegen ($p = 0,018$ für OVA-DC+2ndGem zu OVA-DC+Gem bzw. $p = 0,028$ für OVA-DC zu OVA-DC+Gem). Interessanterweise waren die absoluten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsschemata jedoch relativ gering und auch in der OVA-DC+Gem-Gruppe wurde trotz niedriger T-Zellzahlen ein hoher Prozentsatz der Targetzellen lysiert. Bei der Bestimmung der OVA-spezifischen-Antikörpertiter zeigte sich in der OVA-DC+2ndGem und in der OVA-DC-Gruppe eine deutliche, etwa gleich stark ausgeprägte Nachweisreaktion im ELISA. In der OVA-DC+Gem-Gruppe blieb die humorale Immunantwort nahezu aus (Abb. 3.6 C). Somit war mit dem OVA-DC+2ndGem-Konzept ein Protokoll gefunden worden, dass die Gemcitabin-induzierte Immunsuppression auf die DC-Vakzine erheblich umgehen konnte.

3.3. Immuntherapie und Gemcitabin im subkutanen Panc02-OVA-Modell

3.3.1. Synergistischer Effekt im subkutanen Panc02-OVA-Modell trotz Reduktion der adaptiven Immunantwort

Aus Vorversuchen war bekannt, dass im subkutanen Panc02-Modell ein synergistischer therapeutischer Effekt in der Kombination von DC-basierter Immuntherapie mit gleichzeitiger Gemcitabinbehandlung bestand, der im Vergleich zu den jeweiligen Monotherapie-Armen das Überleben signifikant verlängerte (103). Unklar blieb bisher die immunologische Vermittlung dieses Effekts. Nun sollte an Hand des OVA-Modellantigen-Systems geklärt werden, inwieweit der therapeutische Erfolg der Kombinationstherapie tatsächlich an das Vorhandensein einer DC-induzierten, tumorspezifischen Immunantwort gebunden war. Darüber hinaus sollte die Einflussnahme von Gemcitabin auf die adaptive Immunantwort im tumortragenden System näher charakterisiert werden. Es wurden 36 C57BL/6-Mäusen 1×10^6 Panc02-OVA-Tumorzellen subkutan in die rechte Flanke injiziert. Eine Woche nach der Inokulation hatte sich in allen Tieren ein deutlich palpabler Tumorknoten von etwa $2 \times 2 \text{ mm}^2$ gebildet. Daraufhin wurde in den Versuchsgruppen mit der Gabe von intraperitonealen OVA-DC bzw. unbeladenen, LPS-aktivierten U-DC mit/ohne begleitender Gemcitabingabe

begonnen. Mäuse, deren Tumor ein Volumen von 150mm^2 erreicht hatte, wurden euthanasiert. Eine Woche nach der vierten DC-Vakzine wurde allen Tieren Blut entnommen und auf das Vorhandensein einer spezifischen T-Zellantwort gegen das SIINFEKL-Epitop sowie gegen das p15E-Epitop der nativen Panc02-Tumorzelllinie mit Hilfe des IFN- γ -Assays getestet. Auf eine Quantifizierung mittels Pentamer-Färbung wurde aufgrund des begrenzten Probenmaterials verzichtet.

Erwartungsgemäß zeigte sich eine deutliche Überlegenheit des OVA-DC+Gem-Regimes im Vergleich zu den jeweiligen Einzeltherapiearmen. Zwar fand sich für die OVA-DC vakzinierten Tiere bzw. denen unter Gemcitabingabe in Bezug auf die Tumorlast ein statistisch signifikanter Unterschied zur unbehandelten Tumorkontrollgruppe ab Tag 26 ($p = 0,043$) bzw. Tag 12 ($p = 0,031$), jedoch war der positive Effekt in der Kombinationsgruppe noch um ein Vielfaches ausgeprägter: So wurde dort das kritische Tumolvolumen von 150mm^2 erst 120 Tage nach Tumordinokulation erreicht während dies in den OVA-DC bzw. in der Gem-Gruppe bereits um Tag 70 der Fall war. Der U-DC+Gem-Therapiearm unterschied sich in Bezug auf die Tumorprogression nicht von der Gem-Gruppe. Für die U-DC Gruppe allein konnte lediglich eine tendenzielle Verzögerung des Tumorwachstums beobachtet werden (Abb. 3.7).

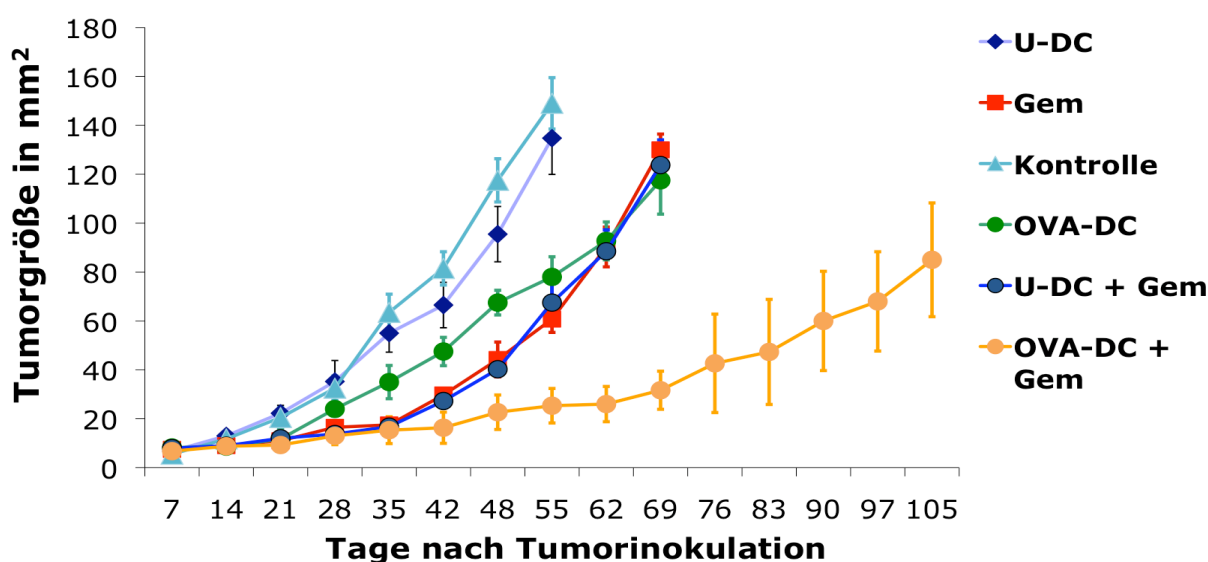


Abb. 3.7: Therapeutischer Synergismus der Kombinationstherapie im subkutanen Panc02-OVA Tumormodell. Die Abbildung zeigt die durchschnittliche Entwicklung der Tumorlast in mm^2 . 7 Tage nach Tumordinokulation wurde in den DC-Gruppen mit der ersten der 6 DC-Vakzinierungen begonnen. Die Gemcitabin-Gabe erfolgte in einer Dosis von $50\mu\text{g}/\text{mg}$ pro Maus an Tag 2 und Tag 5 jeder Behandlungswoche durchgehend bis zum Erreichen des finalen Tumolvolumens.

Bei der Analyse der spezifischen T-Zellfrequenz gegen das SIINFEKL-Epitop konnte eine robuste Immunantwort von 0,55 Prozent in der OVA-DC-Gruppe gemessen werden. Auch der wesentlich schwächere Nachweis von p15E-reaktiven T-Zellen, die sich sekundär im Rahmen des sog. „Epitope-Spreadings“ durch die immunogene Präsentation apoptotischer Panc02-OVA-Tumorzellen bzw. deren p15E-Antigen durch DC im tumordrainierenden Lymphknoten gebildet hatten, gelang in dieser Gruppe in allen Tieren. Ihr Anteil jedoch fiel mit durchschnittlich 0,053 Prozent wesentlich niedriger aus. Demgegenüber zeigte sich in der OVA-DC+Gem-Kombinationsgruppe erneut eine Reduktion der DC-generierten, SIINFEKL-spezifischen Immunantwort auf 0,061 Prozent. Der sehr schwache Nachweis von p15E-spezifischen T-Zellen konnte dabei nur vereinzelt in zwei von sechs Fällen erbracht werden und lag signifikant unter der Antwort in der OVA-DC-Gruppe ($p = 0,04$). In allen übrigen Gruppen konnte keine antitumorale T-Zellantwort gegen eines der beiden Tumor-Epitope im IFN- γ -Assay detektiert werden (Abb. 3.8).

Zusammenschauend fand sich der überragende therapeutische Effekt der Kombinationstherapie – trotz dortiger erheblicher Suppression der induzierten T-Zellantwort – nicht allein in der zusätzlichen immunstimulatorischen Kapazität der DC-Vakzine per se begründet, sondern zeigte sich an das Vorhandensein einer adaptiven, antitumoralen Immunantwort gebunden.

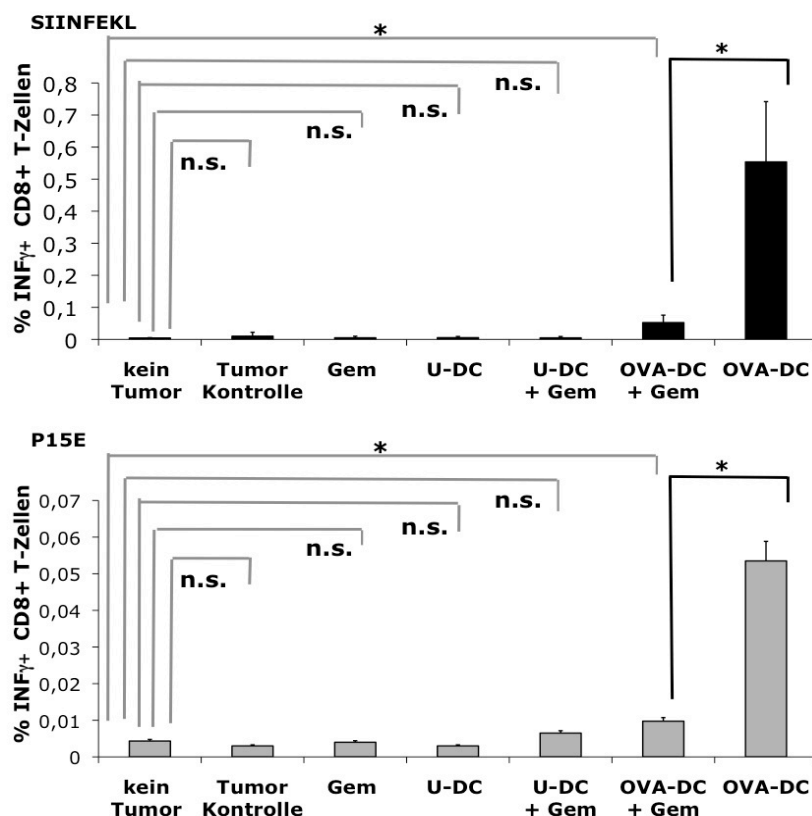


Abb. 3.8:
Klinische Überlegenheit der Kombinationstherapie trotz reduzierter T-Zellantwort.

Ergebnisse des IFN- γ -Assays an Tag 35 nach Tumorsetzung. Neben der Immunantwort gegen das SIINFEKL-Peptid wurde der Nachweis p15E-Peptid-reaktiver T-Zellen, die sich sekundär im Rahmen des sog. Epitope-Spreadings gebildet hatten, aus dem peripheren Blut verfolgt. Es zeigte sich ein verringerter prozentualer Anteil spezifischer T-Zellen für beide Epitope unter paralleler Gemcitabingabe.

3.3.2 Immunmodulatorische Auswirkungen von Gemcitabin im subkutanen Panc02-OVA-Modell

Trotz erheblicher Reduktion der OVA-DC-induzierten, antitumoralen T-Zellantwort hatte sich erneut deutlich die verbesserte Wirksamkeit der kombinierten Therapie von Gemcitabin und Immuntherapie gegenüber den jeweiligen Einzeltherapieformen bestätigt. Dies legte den Schluss nahe, dass die Höhe der antitumoralen Immunantwort allein nicht entscheidend für den beobachteten therapeutischen Effekt sein könne. In einer Reihe von Studien fanden sich Belege, die zeigten, dass Gemcitabin – neben der direkten antiproliferativen und apoptotischen Wirkung auf den Tumor selbst – auch positive immunmodulatorische Effekte besitzt, die die Tumorabwehr weiter begünstigen (106, 107).

Um die Auswirkungen von Gemcitabin auf verschiedene Immunzellreihen im vorliegenden Pankreaskarzinommodell näher zu charakterisieren, sollte in einer weiteren Versuchsreihe das Verteilungsmuster mehrerer Immunzelllinien in Milz, tumordrainierendem Lymphknoten sowie dem Tumor selbst untersucht werden. Dazu wurden C57BL/6-Mäusen subkutan erneut Panc02-OVA-Tumore gesetzt. Um in allen Therapiegruppen ein annähernd einheitliches Tumolvolumen zum Zeitpunkt des Versuchsabbruchs vorzufinden, jedoch in den Gemcitabin-Gruppen mit einer Verzögerung des Tumorwachstums zu rechnen war, erfolgte in diesen die Tumorinokulation bereits zehn Tage früher. Zum Zeitpunkt des eigentlichen Versuchsbeginns sieben (Kontrolle und OVA-DC-Gruppe) bzw. 17 Tage (Gem und OVA-DC+Gem-Gruppe) nach Injektion der Tumorzellen betrug das durchschnittliche Tumolvolumen dadurch in den Gruppen mit späterer Gemcitabinbehandlung ungefähr 25 mm², das in denen ohne Zytostatikagabe 5 mm². Fünf Wochen nach Versuchsstart durch die erste von vier DC-Gaben wurden alle Mäuse getötet und Milz, Lymphknoten und Tumor entnommen, aufbereitet und mittels FACS-Analyse untersucht. Das durchschnittliche Tumolvolumen betrug dabei in allen Gruppen etwa 40-60mm².

Sowohl in den tumortragenden Kontrolltieren (TU-Kontrolle) als auch in der OVA-DC-i.p.-Gruppe konnte eine deutliche vermehrte Zellzahl der Milz im Vergleich zu den tumorfreien Kontrollmäusen festgestellt werden. In den Tieren mit Gemcitabin zeigte sich eine leicht reduzierte Splenozytenanzahl (Daten nicht gezeigt). Bei der weiteren Analyse der Immunzellpopulationen stellte sich eine deutliche sowohl prozentuale als auch absolute Reduktion der Frequenz von B220+ und CD19+ B- bzw. CD4+/CD8+ und CD3e+ T-Zellen

innerhalb aller mit Gemcitabin behandelten Mäuse gegenüber den TU-Kontroll-Tieren heraus (Abb. 3.9A und B). In der direkten Gegenüberstellung zwischen den Tieren mit alleiniger OVA-DC-Vakzinierung und denen mit Erhalt der Kombinationstherapie war dieser Effekt ebenfalls nachweisbar. Auch der Anteil CD3e-, NK1.1.+ NK-Zellen war in der OVA-DC-i.p.+Gem-Gruppe im Vergleich zur OVA-DC-i.p.-Gruppe reduziert. Der prozentuale Anteil CD4+ Foxp3+ regulatorischer T-Zellen bezogen auf die Gesamtheit aller CD4+ CD3e+ T-Zellen war in allen tumortragenden Tieren im Vergleich zu tumorfreien Mäusen deutlich erhöht. Dabei konnten jedoch zwischen den einzelnen tumortragenden Gruppen mit oder ohne DC/Gem-Therapie keine statistisch signifikanten Unterschiede diesbezüglich gefunden werden (Abb. 3.9C). Im Gegensatz dazu gab es keine Veränderung im prozentualen Anteil von Zellen mit den Oberflächenmarkern CD11b+ und Gr-1+ zwischen tumortragenden Tieren und Tieren ohne Tumorlast. Die Kombination der Oberflächenmarker CD11b+ und Gr-1+ wird häufig verwendet, um myeloide Suppressorzellen (MSDC) phänotypisch zu identifizieren. Die in der FACS-Analyse vorgefundene vermehrte Granularität deutete jedoch darauf hin, dass es sich bei der beobachteten CD11b+ Gr-1+ Zellpopulation am ehesten um neutrophile Granulozyten gehandelt haben dürfte, die ebenfalls den Gr-1 Marker exprimieren (nicht dargestellt).

Es zeigte sich im Vergleich zu naiven Versuchstieren in den tumordrainierenden inguinalen Lymphknoten eine geringfügige Erhöhung der Gesamtzellzahl in allen Gruppen (ohne Abbildung). Bezogen auf den prozentualen Anteil CD4- und CD8-T-Zellen am Gesamtzellbestand konnte in den Lymphknoten mit Gemcitabin behandelte Tiere diesmal jedoch keine Reduktion dieser Zellpopulationen ermittelt werden (Abb. 3.10A). Für die B-Zellreihe konnte insgesamt eine prozentuale Verringerung in unterschiedlicher Ausprägung in allen tumortragenden Tieren gefunden werden. Ähnlich wie in der Milz war der Anteil an Tregs im tumordrainierenden Lymphknoten einheitlich in allen tumortragenden Tieren erhöht. Keine Veränderungen gegenüber der tumorfreien Kontrolle fanden sich in allen Gruppen mit Tumorlast im prozentualen Anteil von NK- /NKT-Zellen sowie DC an der Gesamtzellzahl der untersuchten Lymphknoten (Daten nicht gezeigt).

Die durchflusszytometrische Charakterisierung der intratumoralen Immunzellverteilung konnte gegenüber den TU-Kontrollen einen deutlich erhöhten Influx von CD8-T-Zellen in allen mit OVA-DC vakzinierten Tieren feststellen. Gleiches zeigte sich in Bezug auf den

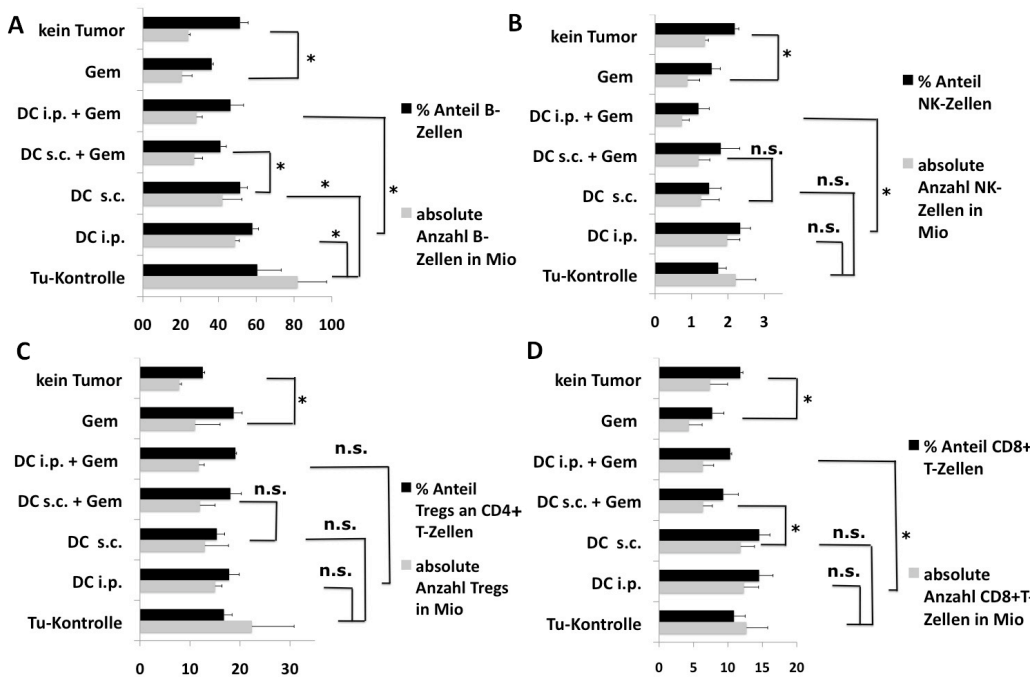


Abb. 3.9: Gemcitabin verringert die Immunzellpopulationen in der Milz. Versuchsabbruch mit Milzentnahme und Aufbereitung der Splenozyten an Tag 42 (TU-Kontrolle/OVA-DC-Gruppen) bzw. Tag 52 (Gem/OVA-DC+Gem) nach Tumorinokulation. Bis dahin erfolgte in den Therapiegruppen die viermalige wöchentliche OVA-DC-Gabe +/- adjuvanter Gemcitabingabe mit 50µg/mg (4 Zyklen mit jeweils Gabe an Tag 2 und Tag 5). **A)** Deutliche Reduktion der relativen bzw. absoluten Anzahl B220+ CD19+ B-Zellen unter Gemcitabin **B)** Bei den NK-Zellen waren die Unterschiede nur zwischen Gem und naiven Tieren bzw. OVA-DC i.p. und OVA-DC i.p.+Gem signifikant **C)** Erhöhter Anteil FoxP3+ CD4+ Treg-Zellen in allen Tumortieren gegenüber naiven Mäusen. Gemcitabin nimmt keinen Einfluss auf das Verhältnis Tregs : CD4+T-Zellen. **D)** Reduktion der relativen sowie absoluten CD8-T-Zellfrequenzen.

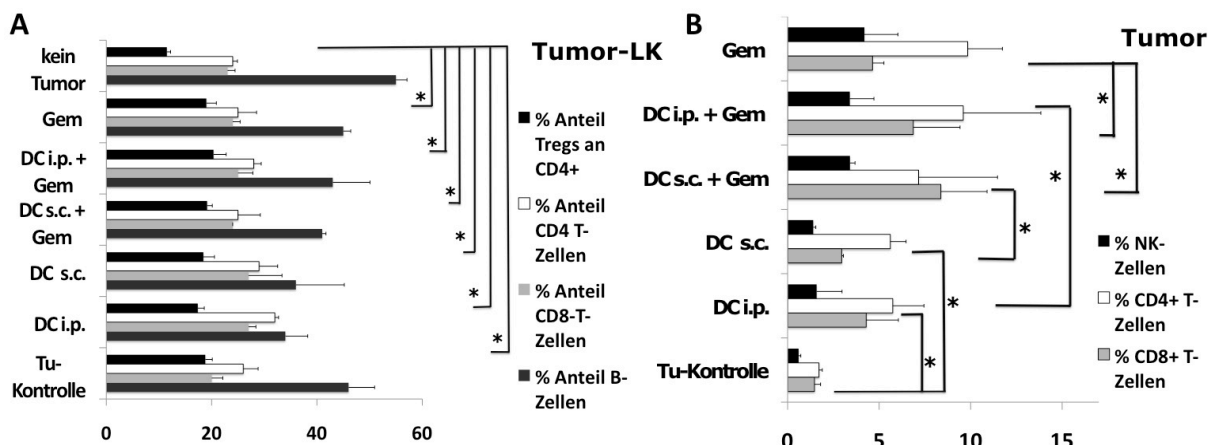


Abb. 3.10: Gemcitabin erhöht den intratumoralen Einstrom von Immunzellen. **A)** Übersicht: Anteil der Immunzellpopulationen in den tumordrainierenden Lymphknoten: vermehrter Anteil regulatorischer T-Zellen in allen tumortragenden Tieren. **B)** Übersicht: prozentualer Anteil von Immunzellen an der Gesamtzellzahl aus der Tumorzellsuspension: durchschnittliches Tumolvolumen betrug durch den verzögerten Therapiebeginn in den Gemcitabin-Gruppen in allen Versuchstieren etwa 40-60mm² bei Versuchsabbruch. Vermehrter Gehalt an CD8, CD4-T-Zellen bzw. NK-Zellen in allen Gemcitabin behandelten Gruppen. Des Weiteren signifikant erhöhter Influx intratumoraler CD8-T-Zellen in den Kombinationsgruppen im Vergleich zur Gem-Gruppe.

intratumoralen CD4-T-Zellanteil. Auch in den Kombinationsgruppen OVA-DC+Gem s.c./i.p. war die T-Zellfrequenz innerhalb des Tumors deutlich erhöht.

Es konnte dabei in der Kombinationsgruppe im direkten Vergleich mit den OVA-DC-Gruppen ohne Gemcitabin eine deutlich verbesserte T-Zellmigration für beide T-Zellreihen festgestellt werden, die sich auch als statistisch signifikant erwies. Gegenüber der Gem-Gruppe ließen sich dabei eine noch weiter verstärkte intratumorale Einwanderung CD8-T-Zellen beobachten. Der intratumorale Anteil CD4-T-Zellen bzw. NK-Zellen war innerhalb aller mit Gemcitabin-behandelten Gruppen annähernd identisch und lag insgesamt deutlich über den gemessenen Frequenzen für diese Zelllinien in den OVA-DC-vakzinierten Versuchstieren ohne Gemcitabinexposition.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die immunsuppressive Wirkung von Gemcitabin, die bisher für die adaptive Immunabwehr gezeigt werden konnte, ihr entsprechendes Korrelat in der Reduktion der absoluten wie auch relativen Anzahl der B- bzw. T-Zellpopulationen innerhalb der Milz – jedoch nur bedingt in der Lymphknoten – hatte. Eine präferentielle negative Wirkung von Gemcitabin auf immunsuppressive Tregs konnte dabei nicht festgestellt werden. Ihr Anteil war in allen tumortragenden Tieren unterschiedslos erhöht. Hingegen kam es unter dem Einfluss des Zytostatikums zu einer verbesserten Migration von T- wie auch NK-Zellen in den Tumor, was eine antitumorale Immunantwort begünstigt haben könnte. MSDC scheinen im Panc02-OVA Tumormodell keine Bedeutung zu haben.

3.3.3 Gemcitabin führt zu einer Sensibilisierung von Panc02-OVA gegenüber der CD8-vermittelten Lyse durch OT-1-Zellen im *in vitro*-Zytotoxizitätstest

In einer *in vitro*-Studie mit verschiedenen humanen Pankreaskarzinomzelllinien konnte durch unsere Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, dass es nach vorangegangener Gemcitabinexposition in einigen Zellreihen zu einer verbesserten T-Zell-vermittelten Lyse der Tumorzellen kommt (108). Da sich *in vivo* gezeigt hatte, dass Gemcitabin die intratumorale Migration von T-Zellen erheblich – insbesondere die der CD8-Reihe – verbessert, sollte nun der Frage nachgegangen werden, inwieweit Gemcitabin die T-Zell-vermittelte Lyse auch im Panc02-OVA-Modell in ähnlicher Weise begünstigt. Hierzu wurden Tumorzellen der Panc02-OVA- bzw. der OVA-exprimierende murinen B16-Melanomzelllinie (Mo5) für 24 Stunden in ⁵¹Cr-haltigem Medium unter Zusatz von Gemcitabin in

Konzentrationen von 10 bzw. 100 nM kultiviert. Die so vorbehandelten Tumorzellen wurden daraufhin in einem *in vitro* Chrom-Release-Assay angesetzt, wobei durch OVA-DC Kokultur aktivierte OT-1-Zellen als Effektor-T-Zellen verwendet wurden. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abb. 3.11 dargestellt.

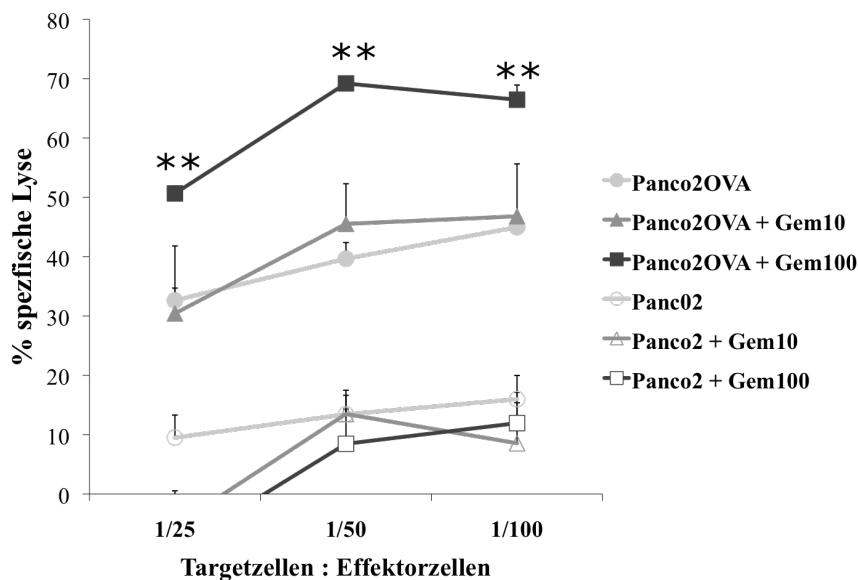


Abb. 3.11: Gemcitabin erhöht die Empfindlichkeit der Panc02-OVA-Zelllinie gegenüber der T-Zell-Lyse *in vitro*. Die Zelllinien Panc02-OVA, die native Panc02 bzw. die Melanomzelllinie B16-OVA (Mo5) wurden für 24 Stunden in ^{51}Cr Medium mit bzw. ohne Gemcitabin-Konzentrationen von 10 bzw. 100 nM inkubiert. Die verwendete Gemcitabindosis lag dabei unter der ermittelten zytotoxischen Dosis dieser Zelllinien. Daraufhin wurden die ^{51}Cr -markierten Tumorzellen für 4 Stunden in einem klassischen *in vitro* Zytotoxizitätsassay mit aktivierten OT-1 T-Zellen als Effektorzellen in unterschiedlichen Verhältnissen angesetzt. Die dargestellten Lyseraten beziehen sich auf das Verhältnis zu dem durch Triton X-Zugabe ermittelten Maximal- ^{51}Cr -Release. Es zeigt sich eine deutlich verbesserte Zelllyse nach 100 nM Gemcitabin Vorbehandlung von Panc02-OVA im Vergleich zu unbehandelten Panc02-OVA bzw. zur nativen Panc02-Zelllinie.

Es konnte – analog zu den Ergebnissen mit den humanen Pankreaskarzinomzelllinien – eine verstärkte Suszeptibilität der mit 100 nM Gemcitabin vorbehandelten Panc02-OVA-Tumorzellen gegenüber der T-Zell-vermittelten Lyse festgestellt werden. Die Lyseraten lagen in dieser Gruppe etwa 30 Prozent höher als die der nativen bzw. mit 10 nM Gemcitabin behandelten Panc02-OVA-Zellen ($p = 0,01$). Dass dieser Effekt T-Zell-vermittelt und nicht allein auf die erhöhte Gemcitabindosierung zurückzuführen war, zeigte der Vergleich mit dem ^{51}Cr -Release der parentalen Panc02-Zelllinie, der unter den gewählten Gemcitabin-Konzentrationen nahezu unbeeinflusst gering geblieben war. Aufgrund des für den Zytotoxizitätsassay gewählten 4-Stunden-Zeitfensters lässt sich spekulieren, dass der zytotoxische Effekt am ehesten durch eine Verstärkung des Granzym-/Perforin-vermittelten Zelltod-Pathways zustande kam. Jedoch zeigten weiterführende Versuche unter Verwendung

eines aktivierenden CD95-Antikörpers, dass auch die Fas-Ligand vermittelte Apoptoseinduktion in den Tumorzellen durch die Gemcitabinexposition weiter verstärkt wird (ohne Abbildung). Beide Wege – Granenzym/Perforin sowie Fas-Ligand – sind typische zytolytische Mechanismen aktivierter Effektor-CD8-T-Zellen. Insgesamt lässt sich feststellen, dass Gemcitabin die Sensitivität von Panc02-OVA-Tumorzellen gegenüber der zytotoxischen T-Zelllyse erhöht.

3.3.4. Klinische Unterlegenheit des 2ndGem-Regimes im subkutanen Panc02-OVA-Modell gegenüber dem klassischen OVA-DC + Gem-Schema

Durch den zeitversetzten Beginn von DC-Therapie und Gemcitabin-Gabe konnte in Vorversuchen die immunsuppressive Wirkung von Gemcitabin auf die Induktion einer robusten adaptiven Immunantwort umgangen werden. Im Folgenden sollte im subkutanen Panc02-OVA-Tumormodell die therapeutische Effektivität dieses vorbeschriebenen 2ndGem-Therapieansatzes untersucht werden. Eine Woche nach subkutaner Tumorinokulation wurde mit der Gabe von Gemcitabin bzw. OVA-DC begonnen. In der OVA-DC+2ndGem-Reihe erfolgte der Beginn der begleitenden Gemcitabin-Gabe erst mit zweiwöchiger Verzögerung nach zuvor begonnener OVA-DC-Vakzinierung. Die bereits mehrfach beobachtete Überlegenheit der kontinuierlichen OVA-DC+Gem-Therapie gegenüber der Monotherapie mit Gemcitabin bestätigte sich erneut. Wiederum kam es in dieser Gruppe zu einer deutlichen Verzögerung des Tumorwachstums (Abb.3.12).

Demgegenüber ließ sich in der OVA-DC+2ndGem-Gruppe zwar mit Beginn des Startes der Gemcitabin-Gabe nach anfänglicher Tumorregression eine Verlangsamung des Tumorwachstums feststellen, jedoch blieb der therapeutische Nutzen weit hinter der der OVA-DC+Gem-Kombinationsgruppe zurück. So lag das durchschnittliche Tumolvolumen in der 2ndGem-Gruppe zum Zeitpunkt des Versuchsabbruchs an Tag 51 bei etwa 45mm². Das entsprechende Tumolvolumen der OVA-DC+Gem-Gruppe betrug zu diesem Zeitpunkt dagegen nur etwa 10mm². Tiere, die nur Gemcitabin erhalten hatten, zeigten Tumore, die etwa so groß waren wie die in der 2ndGem-Gruppe.

Zum Zeitpunkt des Versuchsabbruchs an Tag 51 wurde bei allen Tieren eine abschließende IFN- γ -Messung durchgeführt. In Analogie zu den Ergebnissen aus den tumorfreien Versuchen zeigte sich im IFN- γ -Nachweis innerhalb der 2ndGem-Gruppe gegenüber den Versuchstieren

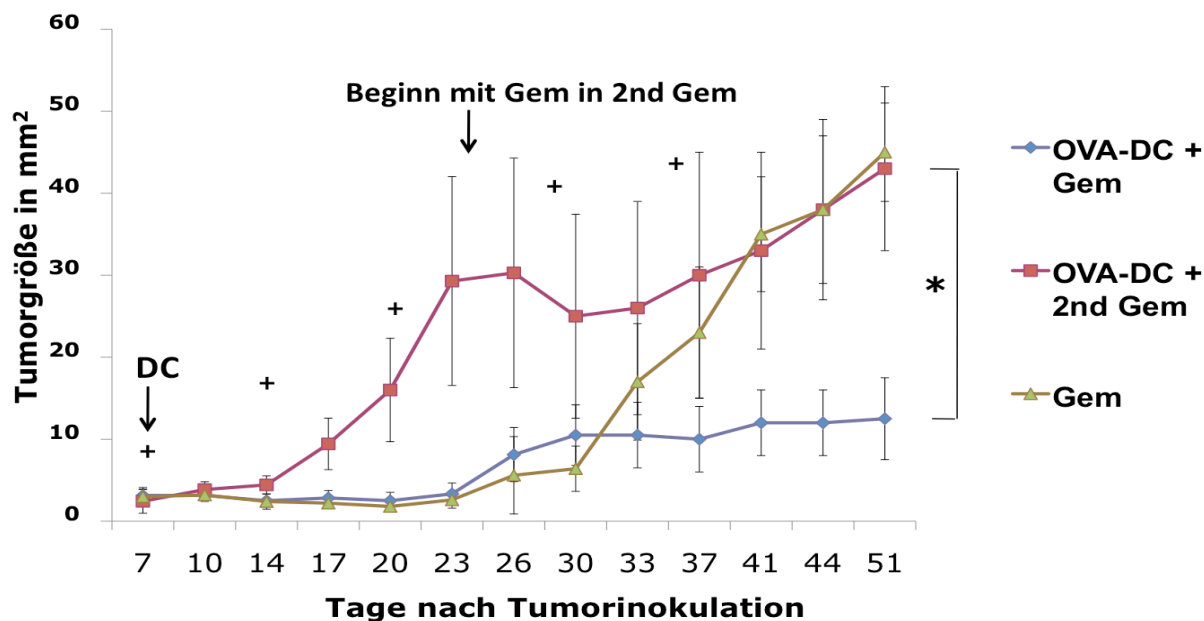


Abb. 3.12: Therapeutische Unterlegenheit des OVA-DC+2ndGem-Regimes gegenüber OVA-DC+Gem: 24 Versuchstiere wurden mit 1×10^6 Panc02-OVA in die rechte Flanke inokuliert. Der Therapiebeginn erfolgte 7 Tage nach Tumorsetzung in Form der ersten von fünf OVA-DC-Vakzinierungen. Dem schlossen sich in der OVA-DC+Gem- bzw. Gem-Gruppe der unmittelbare Beginn der Gemcitabin-Gabe ($50 \mu\text{g}/\text{mg}/\text{Maus}$ mit 7 Zyklen jeweils d2 und d5) an. In der OVA-DC+2ndGem-Gruppe erfolgte der Start des Gemcitabin-Schemas erst parallel zur dritten DC Gabe. Deutlicher Unterschied in Bezug auf das Tumolvolumen zwischen OVA-DC+Gem und OVA-DC+2ndGem an Tag 51 des Versuchsabbruchs ($p = 0,022$).

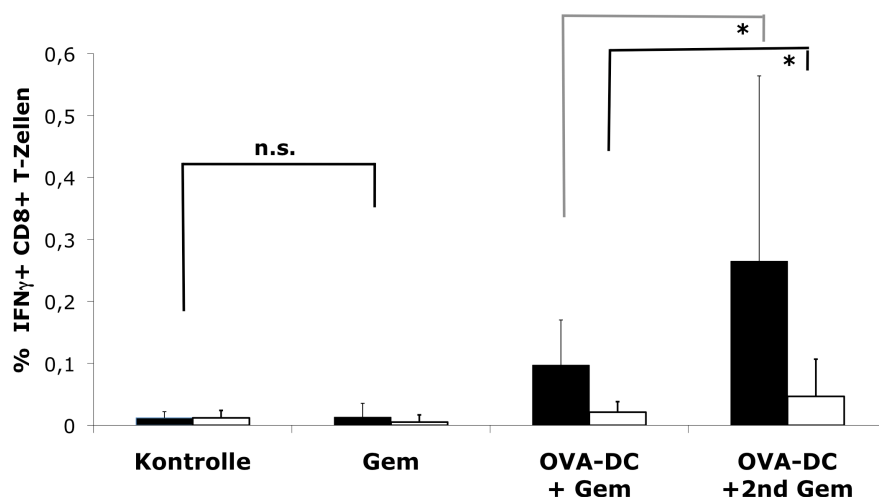


Abb. 3.13: Verbesserte T-Zellantwort unter 2ndGem-Regime auch im Tumormodell: Das Immunmonitoring an Tag 41 nach Tumorinokulation zeigt eine signifikant überlegene T-Zellantwort des 2ndGem-Schemas gegenüber dem OVA-DC+Gem-Regime gegen das SIINFEKL (schwarze Balken) bzw. p15E Epitop (weiße Balken) ($p = 0,02$).

des OVA-DC+Gem-Schemas eine knapp dreifach höhere Anzahl SIINFEKL- bzw. p15E-spezifischer CD8-T-Zellen. Die alleinige Gemcitabin-Gabe war auch in dieser Versuchsreihe nicht in der Lage, eine nachweisbare T-Zellantwort zu generieren (Abb. 3.13).

3.4. Ausweitung des Panc02-OVA-Modells auf die orthotope Ebene

Das immunologische Verhalten wie auch das Wachstum von Tumorzelllinien ist ganz erheblich vom Ort der Tumorimplantation abhängig. So gilt die Kutis aufgrund ihrer physiologischen Barrierefunktion gegen das Eindringen pathogener Erreger und ihrer Vielzahl an natürlicherweise dort vorkommenden Abwehrzellen als immunologisch besonders privilegiert. Subkutan injizierte Tumorzellen erfahren daher recht früh eine Auseinandersetzung mit dem Immunsystem des Wirtes. Anders verhält es sich hingegen mit dem Pankreas. Durch seine primäre exokrine wie endokrine Funktion besitzt es zwar ein reichhaltiges Netzwerk an Blut- und Lymphgefäßen, jedoch finden sich dort im Gegensatz zur Haut nur sehr wenige immunologischen Strukturen, die für die Induktion einer potenten Immunantwort ausgerichtet sind. Darüber hinaus produziert das Pankreas eine Vielzahl an Hormonen und Zytokinen, wie Insulin und TGF- β , welche das Tumorstadium begünstigen. Tatsächlich konnte bereits in einer Studie unter der Verwendung der Panc02-Zelllinie gezeigt werden, dass – im Vergleich zur subkutanen Tumordinokulation – orthotop in das Pankreas implantierte Panc02-Zellen ein wesentlich aggressiveres Wachstumsverhalten aufweisen (109).

Vor diesem Hintergrund sollten daher abschließend das bisherige subkutanen Panc02-OVA-Modell auf die orthotope Ebene erweitert werden. Dazu wurde in einer Reihe von Vorversuchen die Implantation von Panc02-OVA-Zellen in das Pankreas von C57BL/6 Mäusen etabliert. Dabei stellte sich die Injektion von 200.000 Panc02-OVA-Tumorzellen in das Pankreas für die geplanten Versuchszwecke als ideal heraus. Es konnte dadurch in allen Tieren sieben Tage nach Tumordinokulation eine homogene Tumorbildung von 2x2 mm² erreicht werden.

3.4.1. Kein therapeutischer Effekt der subkutanen Panc02-OVA-DC Vakzine im orthotopen Tumormodell

In einer ersten Vorversuchsreihe kam es nach prophylaktischer, präoperativer dreimaliger s.c. Panc02-OVA-DC-Gabe zu einem erfolgreichen Impfschutz gegen einen nachfolgenden intrapankreatischen Tumorchallenge mit einem schwachen Nachweis einer SIINFEKL-spezifischen Immunantwort von im Mittel 0,015% – gemessen 4 Wochen nach der orthotopen Tumorsetzung (Daten nicht gezeigt). Daher wurde als Nächstes die therapeutische Effektivität subkutan injizierter Panc02-OVA-DC ohne bzw. mit begleitender Gemcitabingabe im

orthotopen Tumormodell getestet. Da die messtechnische Evaluation des Tumorzvolumens aufgrund der intraabdominellen Lokalisation nicht möglich war bzw. entsprechende Surrogatparameter wie Gewichtszunahme sich in Vorversuchen als wenig verlässlich erwiesen hatten, wurde das Überleben der Tiere als Endpunkt verwendet. Das Immunmonitoring aus dem peripheren Blut erfolgte in Woche fünf nach der ersten DC-Gabe.

Im Gegensatz zum nativen s.c.-Panc02-Tumormodell, in dem sich ein klarer Überlebensvorteil in der Kombinationsgruppe von Panc02-DC-Therapie mit Gemcitabin gezeigt hatte (103), kam es im orthotopen Modell zu keinem additiven Effekt der beiden Behandlungsmodalitäten (Abb. 3.14). Wie in der Monotherapie-Gruppe mit Gemcitabin verstarben auch unter Kombinationstherapie alle Tiere innerhalb von knapp 100 Tagen nach Tumorinokulation. Die s.c. Panc02-DC-Therapie für sich allein war wirkungslos. Gleichwohl konnte hier im Gegensatz zur entsprechenden Kombinationsgruppe mit Gemcitabin in fünf von acht Mäusen ein äußerst schwacher, jedoch eindeutiger Nachweis SIINFEKL-spezifischer T-Zellen von knapp 0,02 Prozent geführt werden (Abb. 3.15).

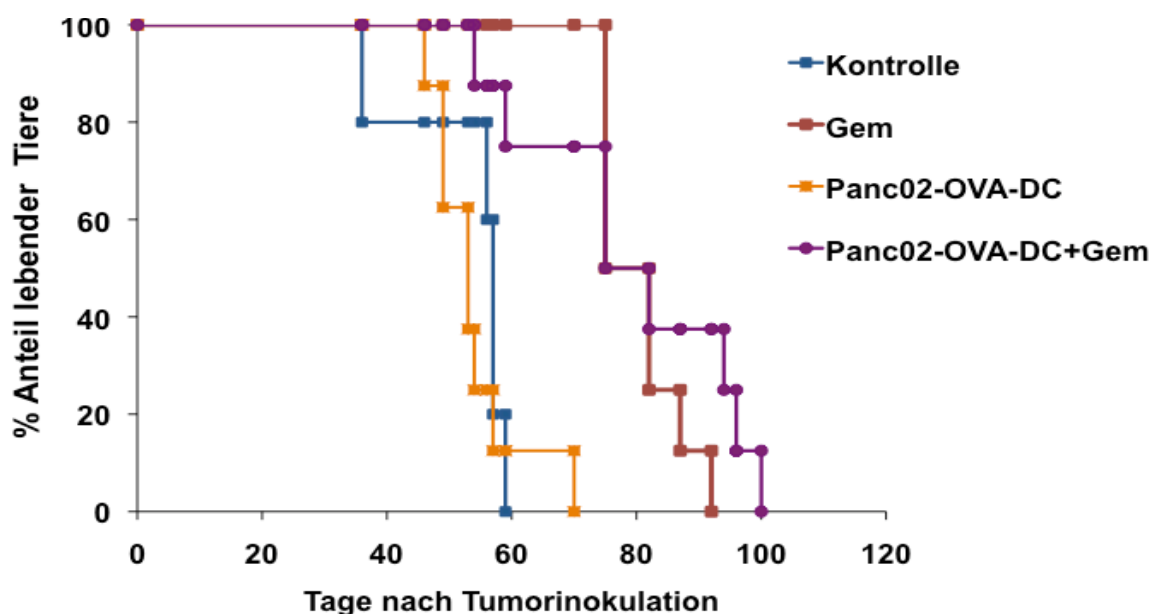


Abb. 3.14: Therapeutische Wirkungslosigkeit der subkutanen Panc02-OVA-DC-Vakzinierung im orthotopen Tumormodell. Eine Woche nach orthotoper Tumorimplantation mit 2×10^5 Panc02-OVA-Zellen erfolgte der Therapie-Beginn. Die Versuchstiere wurden sechsmal subkutan mit 2×10^6 Panc02-OVA-beladenen DC in wöchentlichem Abstand immunisiert. Die Gemcitabingabe erfolgte mit $50 \mu\text{g}/\text{mg}$ pro Maus an Tag 2 und Tag 5 bis zum Versuchsende. Die subkutane Panc02-OVA-DC-Vakzine hat keinen therapeutischen Einfluss, weder für sich allein genommen noch im Zusammenspiel mit Gemcitabin.

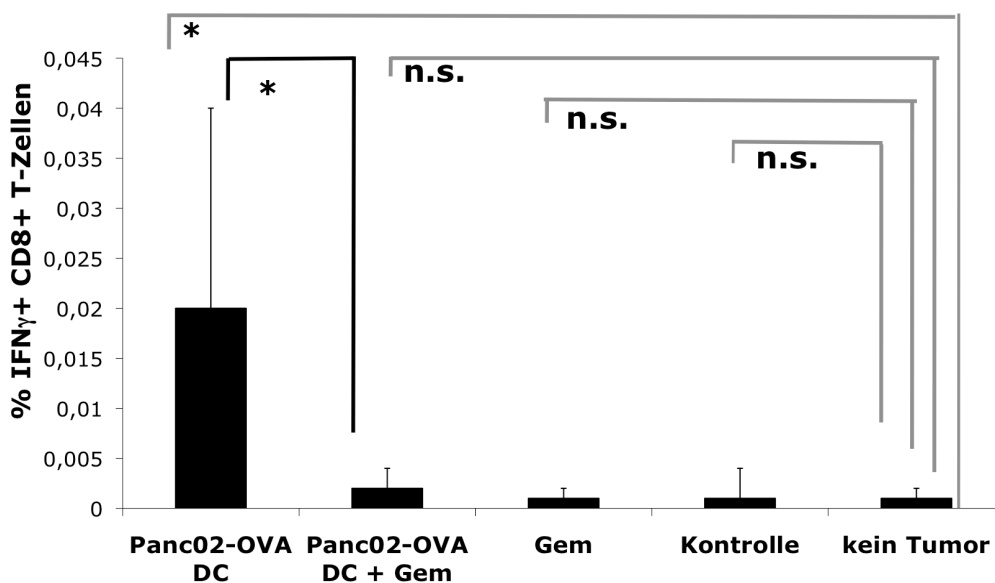


Abb. 3.15: Nur schwacher Nachweis SIINFEKL-spezifischer T-Zellen nach subkutaner Panc02-OVA-DC-Vakzinierung. Dargestellt sind die Ergebnisse des IFN- γ -Assays an Tag 35 nach Tumorinokulation unter Stimulation mit SIINFEKL. Der Nachweis einer T-Zellantwort gegen das p15E-Epitop gelang in keiner der Gruppen.

3.4.2. Überlegene Wirkung der intraperitonealen DC-Vakzinierung im orthotopen Tumormodell

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass die subkutane Gabe von Panc02-OVA-DC im orthotopen Tumormodell – anders als im subkutanen Modell – wirkungslos geblieben war, sollte die therapeutische Effektivität der intraperitonealen DC-Gabe in diesem charakterisiert werden. Interessant hierbei war, dass sich bis dahin bei einer Literaturrecherche keine Berichte über die intraperitoneale DC-Applikation in einem orthotopen Tumormodell des Pankreaskarzinoms gefunden hatten. Lediglich in einer Studie war die direkte, jedoch hierbei intratumorale DC-Gabe nach intrapancreatischer Tumorsetzung erprobt worden (110).

C57BL/6 Mäuse wurden einer operativen Tumorumplantation unterzogen. Da durch die intraabdominale Applikation der intraperitonealen DC-Vakzine mit erheblichen peritumoralen immunmodulatorischen Effekten zu rechnen war, wurde auch eine Gruppe eingeschlossen, die unbeladene DC (U-DC) intraperitoneal erhielt. In der OVA-DC-i.p.-Gruppe wurde bei einer Hälfte der Tiere wieder eine parallele Behandlung mit Gemcitabin durchgeführt. Endpunkt war das Überleben der Versuchstiere. Dabei stellte sich zwischen dem sechzigsten und dem hundertsten Tag nach Tumorumplantation die therapeutische Wirksamkeit dieser Vakzinierungsstrategie eindrucksvoll unter Beweis (vergleiche Abb. 3.16). Fünf von sieben

Tieren der OVA-DC-i.p.-Gruppe blieben dauerhaft tumorfrei. In der Kombinationsgruppe mit Gemcitabin und intraperitoneal OVA-DC-vakzinierten Tieren war dieser Anteil sogar noch etwas höher. Hier überlebten sechs von sieben Tieren. Jedoch wurde keine statistische Signifikanz zur OVA-DC-Gruppe erreicht. Demgegenüber zeigte sich bei den Tieren mit i.p.-U-DC-Gabe zwar ein erheblicher Überlebensvorteil gegenüber der Kontroll- bzw. der GEM-Gruppe, jedoch verstarben hier letztendlich alle der sieben Tiere.

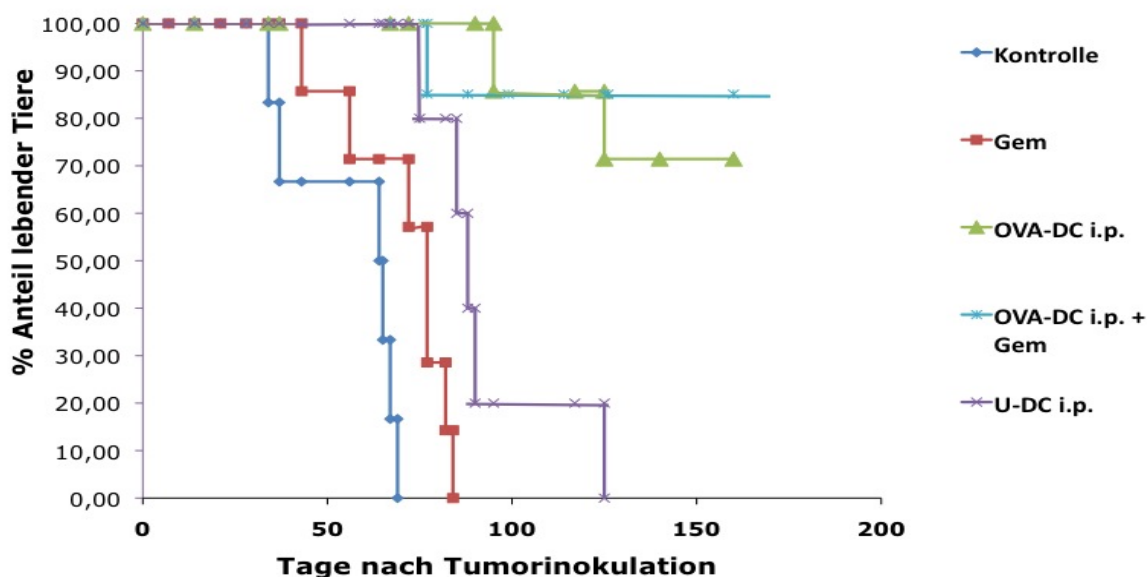


Abb. 3.16: Eindrucksvolle therapeutische Effektivität der i.p.-OVA-DC-Vakzinierung: C57BL/6 Mäuse (pro Gruppe $n = 7$) wurden 2×10^5 Panc02-OVA-Zellen operativ in das Pankreas injiziert. Eine Woche nach Tumordinokulation erfolgte der Therapiebeginn mit der sechsmaligen intraperitonealen Gabe von jeweils 2×10^6 OVA-DC i.p. bzw. U-DC i.p. (nur LPS aktiviert ohne OVA-Antigen). Gemcitabin wurde nach dem Standardschema in einer Dosis von $50 \mu\text{g}/\text{mg}/\text{Maus}$ an d2 und d5 bis zum Ende gegeben. In der OVA-DC-Gruppe blieben 5 von 7 Tieren dauerhaft tumorfrei, in der OVA-DC+Gem-Gruppe sogar 6 von 7 Tieren. Auch U-DC führten im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einem signifikanten Überlebensvorteil.

Bemerkenswert dabei war die deutliche T-Zellantwort in der U-DC-Gruppe, die vor allem gegen das SIINFEKL-Epitop mit 0,16 Prozent sowie auch schwach gegen das p15E-Antigen im IFN- γ -Assay mit 0,02 Prozent nachweisbar war (vgl. Abb. 3.17) und die durch die immunogene Präsentation apoptotischer Panc02-OVA-Zellen infolge der i.p.-DC-Gabe entstanden war. Innerhalb der OVA-DC+Gem-Gruppe konnte wieder eine Reduktion der T-Zellantwort gegen beide tumorale Antigenstrukturen beobachtet werden. Zusammenfassend war im orthotopen Tumormodell die intraperitoneale DC-Gabe der subkutanen Vakzinierungsrouten klar überlegen. Zu beobachten war vor allem ein eindrucksvolles, lokales immunstimulatorisches Potential der i.p.-DC-Therapie, das in der Lage war das tumorvermittelte immunsuppressive Milieu zu durchbrechen.

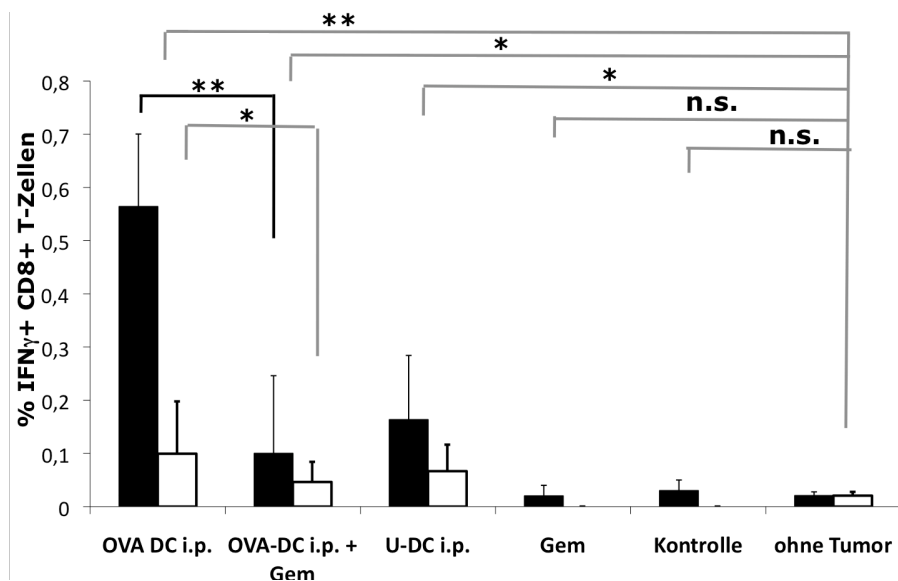


Abb. 3.17: Ergebnisse des Immunmonitorings der intraperitonealen DC-Vakzinierung: Prozentualer Anteil $\text{IFN-}\gamma$ -produzierender CD8-T-Zellen für das SIINFEKL- (schwarze Balken) bzw. das p15E-Epitop (weiße Balken). Die Messung erfolgte an Tag 35 nach Tumorinokulation. Unter anderem deutlicher Nachweis einer dualen antitumoralen T-Zellantwort gegen beide Tumorepitope in der Gruppe der U-DC, welche im Gegensatz dazu in der Gem- bzw. Kontroll-Gruppe nicht detektierbar war.

Ein für zukünftige orthotope Modellversuche interessanter Aspekt ergab sich durch eine Kooperation mit der Firma Zinsser Analytics, die unserer Arbeitsgruppe zu Testzwecken ein Kleintier-CT-Gerät zur Verfügung stellte. Hierdurch konnten nach intravenöser Gabe von jodhaltigem Kontrastmittel der orthotope Tumor *in vivo* exzellent zur Darstellung gebracht werden (Abb.3.18).

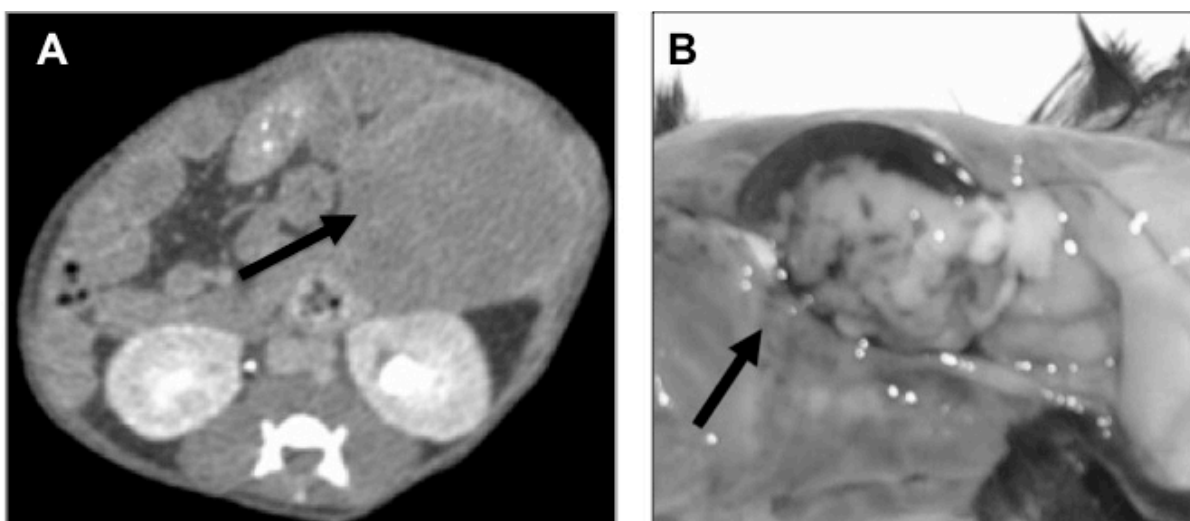


Abb.3.18: Exzellente Darstellung des orthotopen Tumorgeschehens mittels des Kleintier-CT-Gerätes „la Theta“, Zinsser Analytics: A) Linke Bildhälfte zeigt eine große Raumforderung mit peripherer Kontrastmittelanreicherung ventral der linken Niere, die dem Tumor entspricht. B) Rechts im Bild tatsächlicher Autopsiebefund.

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

4.1.1. Etablierung der OVA-Vakzinierung

Durch die Vakzinierung mit OVA-Protein gepulsten dendritischen Zellen (OVA-DC) ließ sich sowohl eine potente humorale als auch eine CD8-T-Zell-vermittelte Immunantwort gegen das OVA-Modellantigen generieren. Hierbei ergab sich ein proportionaler Zusammenhang zwischen der Menge der verabreichten DC und der daraus resultierenden T-Zellantwort. Die Gabe von zwei Millionen DC stellte sich gegenüber der Administration von 300.000 OVA-DC als klar überlegen dar. Im direkten Vergleich der Applikationsrouten war die subkutane DC-Gabe gegenüber der intraperitonealen und der intravenösen Darreichungsform in Bezug auf die Höhe der induzierten CD8-T-Zellantwort gegen das SIINFEKL-Epitop des OVA-Antigens deutlich unterlegen. Jedoch zeigte sie sich annähernd gleichwertig, was die Generierung OVA-spezifischer Antikörper anbelangte. Demgegenüber führte die zweimalige Vakzinierung mit dendritischen Zellen, die mit apoptotischen Panc02-OVA Tumorzellen beladen worden waren, zwar zu einem protektiven Immunschutz gegen einen nachfolgenden subkutanen Panc02-OVA-Challenge, jedoch war die induzierte T-Zellantwort zu gering, um sie mit Hilfe der gewählten Nachweismethoden direkt quantifizieren zu können.

4.1.2. Einfluss von Gemcitabin auf die mittels DC-Vakzine induzierte Immunantwort im tumorfreien System

Gemcitabin führte zu einer deutlichen Suppression der durch die OVA-DC-Vakzine induzierten Immunantwort. Diese betraf in wesentlich stärkerem Umfang die B-Zell-Antwort, die fast komplett unterdrückt wurde. Auch die Frequenz der induzierten antigenspezifischen CD8-T-Zellen wurde durch die begleitende Gemcitabin-Gabe signifikant reduziert. Jedoch erzielte die verbliebene T-Zellantwort in Tieren unter OVA-DC-Vakzinierung mit paralleler Gemcitabinbehandlung im *in vivo*-Zytotoxizitätsassay immer noch ausreichend hohe Lyseraten. Die Suppression durch Gemcitabin war systemisch und betraf alle Vakzinierungsrouten in gleichem Umfang. Verringerungen der Gemcitabindosis hatten bei gleichem Applikationsintervall keinen Einfluss auf die Höhe der Reduktion der induzierten Immunantwort. Grund für die Immunsuppression war dabei die direkt antiproliferative

Wirkung von Gemcitabin auf die T-Zellproliferation. Die Antigenpräsentation sowie das T-Zell-Priming der injizierten OVA-DC selbst wurden durch Gemcitabin nicht gestört. Durch zeitliche Verzögerung der Gemcitabingabe auf einen Zeitpunkt nach Induktion einer stabilen Immunantwort durch die DC-Gabe im Rahmen des 2ndGem-Regimes konnte die Chemotherapie-vermittelte Suppression des immunologisch messbaren Vakzinierungserfolgs wesentlich reduziert werden.

4.1.3. Charakterisierung des Einflusses von Gemcitabin im tumortragenden System

Trotz der deutlichen Reduktion der OVA-spezifischen CD8-T-Zellantwort sowie der im Rahmen des Epitope-Spreadings entstandenen antitumoralen Antwort gegen das organische p15E-Antigen der Panc02-Zelllinie, fand sich im subkutanen Panc02-OVA-Modell ein synergistischer Effekt von OVA-DC-Vakzine und Gemcitabin unter kontinuierlicher, paralleler Gabe. Hierbei konnte das Tumorwachstum deutlich verlangsamt werden. Der Therapiesynergismus war dabei an die Induktion einer spezifischen Immunantwort gebunden und nicht allein in der immunmodulierenden Wirkung durch die DC-Administration per se begründet. Therapeutisch war das zuvor etablierte 2ndGem-Regime dem ursprünglichen Behandlungsansatz – bestehend aus der kombinierten Chemotherapie und DC-Vakzine von Beginn ab – unterlegen. Tiere der 2ndGem-Gruppe hatten trotz höherer antitumoraler T-Zellfrequenzen ein schlechteres klinisches Outcome als Tiere des klassisch durchgeführten Kombinationsschemas.

Durch Gemcitabin kam es im subkutanen Tumormodell in allen behandelten Gruppen zu einer Reduktion der B-/T-Zellzahl in der Milz. Die Zellzahlen in den tumordrainierenden Lymphknoten wurden dagegen weniger beeinflusst. Dabei war in allen tumortragenden Tieren im Vergleich zu tumorfreien Tieren eine deutliche Erhöhung des Anteils regulatorischer T-Zellen am CD4-Gesamtpool zu beobachten. Dieser blieb unter Gemcitabinbehandlung konstant. Myeloide Suppressorzellen, wie sie in anderen Tumormodellen beschrieben worden sind, scheinen im Panc02-Pankreaskarzinommodell keine wesentliche Rolle zu spielen. Gemcitabin führte zu einem erhöhten Influx an Immunzellen in den Tumor selbst. Insbesondere die intratumorale Migration von CD8-T-Zellen zeigte sich in den Kombinationsgruppen OVA-DC+Gem deutlich verstärkt. Darüber hinaus erhöht Gemcitabin die Sensitivität der Panc02-OVA-Zellen gegenüber der CD8-T-Zell-vermittelten Zellyse.

4.1.4. Übertragung des Tumormodells auf die orthotope Ebene

Die subkutane Vakzinierung mit Panc02-OVA-DC war auf orthotoper Ebene nach intrapankreatischer Tumorsetzung in prophylaktischem Versuchssetting erfolgreich, versagte aber therapeutisch und zeigte dabei auch im Zusammenspiel mit der adjuvanten Gemcitabinbehandlung keinen zusätzlichen Nutzen. Demgegenüber führte die intraperitoneale Gabe von OVA-DC bei einem hohen Prozentsatz der Versuchstiere zu einer kompletten Tumorabstoßung. Durch zusätzliche Gemcitabingabe ließ sich die Gesamtüberlebensrate nur noch geringfügig verbessern. Auch hierbei war der Erfolg der DC-Therapie an das Vorhandensein tumorantigenbeladener DC geknüpft. LPS-aktivierte DC ohne Antigenzufuhr führten nach ihrer intraperitonealen Administration nur zu einer Verlängerung der Überlebenszeit, jedoch zu keinem Heilungserfolg.

4.2. Diskussion der Ergebnisse vor dem Hintergrund aktueller Literaturdaten

4.2.1. Ergebnisse der Etablierung der OVA-DC-Vakzinierung

Grundlage unserer Versuchsreihen zur Charakterisierung und Quantifizierung der im Rahmen der DC-Vakzinierung generierten spezifischen Immunantwort war die Verwendung eines starken exogenen Antigens, des „chicken egg“ Ovalbumins. Als immunologische Nachweismethoden dienten hierbei der IgG-ELISA, die intrazelluläre-IFN- γ -Färbung sowie das Pentamer-Staining zum Nachweis OVA-spezifischer Antikörper respektive spezifischer CD8-T-Zellen. Mit Hilfe dieses immunologischen Modellsystems konnten wir in unserem Labor erstmalig verschiedene DC-Immunisierungsstrategien auf ihre Effektivität untersuchen. Es sollen im Folgenden die eigenen Ergebnisse mit publizierten Daten verglichen werden.

Dass dendritische Zellen in der Lage sind, eine potente T-Zellantwort gegen das SIINFEKL-Epitop des Ovalbumins *in vivo* zu generieren, hatte sich in einer Reihe von Studien in der Maus gezeigt, bei der SIINFEKL-Peptid gepulste DC zum Einsatz gekommen waren (111, 112). Auch gab es den Nachweis in einigen *in vitro*-Versuchsreihen, dass mit OVA-Protein gepulste DC, transgene SIINFEKL-spezifische OT-1-T-Zell-Klone effizient zur Aktivierung und Teilung anregen können (76, 112, 113). Weniger gut untersucht war die Effektivität OVA-Protein gepulster DC hinsichtlich des Ausmaßes einer DC-induzierten SIINFEKL-spezifischen T-Zellantwort *in vivo*. Eine Pubmed-Literatur-Recherche zu Beginn der Doktorarbeit im Jahr 2006 erbrachte lediglich drei Studien in denen OVA-Protein gepulste BMDC mit anschließender Quantifizierung der T-Zellantwort zur Anwendung gekommen

waren (112, 114, 115). Daten hinsichtlich des Vergleiches der Höhe (OVA-)DC-induzierter spezifischer Antikörper in den verschiedenen Immunisierungsrouten sind hingegen bis jetzt überraschenderweise noch nicht veröffentlicht worden.

In unseren Händen gelang es durch die zweimalige subkutane OVA-DC-Vakzinierung in die Flanke, SIINFEKL-spezifische T-Zellfrequenzen von im Durchschnitt 0,2 - 0,3 Prozent am Gesamt-CD8-T-Zellpool zu induzieren. Der Nachweis einer T-Zellantwort nach nur einmaliger Immunisierung war dagegen mit den von uns gewählten Nachweismethoden nicht möglich. Dies erschien für ein so starkes Antigen wie dem Ovalbumin vergleichsweise schwach, zumal He et al. berichteten, bereits nach einmaliger subkutaner OVA-DC-Gabe SIINFEKL-spezifische T-Zellen von über 0,4 Prozent generieren zu können (114). Hier ist aber zu beachten, dass in dem dortigen Protokoll die DC nicht nur mit dem OVA-Protein, sondern auch zusätzlich mit 10 µg/ml SIINFEKL-Peptid gepulst und zudem intradermal in die Pfote injiziert worden waren. Beides führt zu einer beträchtlichen Verstärkung der resultierenden T-Zellantwort. Hingegen scheinen sich unsere Ergebnisse vielmehr mit denen von Met et al. zu decken, denen der Nachweis SIINFEKL-spezifischer T-Zellen im ELISPOT-Assay nach einmaliger subkutaner Gabe von zwei Millionen OVA-DC ebenfalls erst nach erneuter, zweiter DC-Antigen-Restimulierungsrunde *in vitro* gelang (112). Auch in einer neueren Arbeit von Wurzenberger et al. aus dem Jahr 2009 zeigte sich eine vergleichsweise schwache T-Zellantwort durch die subkutane OVA-DC-Vakzinierung. So konnten dort nach zweimaliger Immunisierung mit 0,2 Millionen OVA-DC Lyseraten von nur 30 Prozent im *in vivo*-Zytotoxizitätsassay erzielt werden (116). Eine direkte Bestimmung der T-Zellfrequenz mit Hilfe der IFN- γ -Pentamer-Färbung war dabei jedoch nicht durchgeführt worden, dürfte sich aber anhand unserer eigenen Erfahrungen in der von uns gemessenen Größenordnung von 0,01-0,03 Prozent spezifischer T-Zellen für diesen Immunisierungsansatz bewegt haben. Demgegenüber konnten Hao et al. nach intravenöser OVA-DC-Gabe T-Zellfrequenzen von etwa drei Prozent generieren, die damit etwa doppelt so hoch wie die von uns gemessenen Antworten ausfielen (115). Dem anzumerken ist, dass jedoch hierbei FCS-freies Kulturmedium für die DC-Kultur verwendet wurde, was die ausschließliche Internalisierung des OVA-Proteins – ohne interferierende FCS-Komponenten – ermöglichte und dadurch die OVA-Antigenpräsentation entscheidend verstärkt haben dürfte; ein Ansatz der uns aufgrund von Kostengründen nicht möglich war.

In vielen Studien hatte sich die subkutane Immunisierung der intravenösen bzw. intraperitonealen als mindestens ebenbürtig, wenn nicht sogar als überlegen erwiesen (117-120). In den Versuchsreihen dieser Arbeit ergab sich ein anderes Bild. Zwar lag die durchschnittliche T-Zellantwort zwischen 0,2 Prozent bis 0,3 Prozent, jedoch gab es bei etwa 10 bis 20 Prozent der Versuchstiere in der subkutanen Gruppe Non-Responder, bei denen die induzierte T-Zellantwort an oder unter der Nachweisgrenzen der gewählten Detektionsmethoden lag. In keinem der Experimente war die subkutane Vakzinierungsrouten der intraperitonealen oder intravenösen Administration annähernd ebenbürtig. Die i.p.- und i.v.-Vakzinierungen erbrachten Antworten von durchschnittlich 0,8 bis 1,4 Prozent spezifischer CD8-T-Zellen. Demgegenüber waren die Unterschiede in Bezug auf die Höhe der induzierten OVA-spezifischen IgG-Antikörper zwischen den verschiedenen Vakzinierungsrouten nur marginal. Interessanterweise waren auch in den Tieren der s.c.-Gruppe mit geringer T-Zellantwort hohe OVA-Antikörpertiter messbar. Die Gründe hierfür sind spekulativ.

Zwar ließen sich in den i.p.- und i.v.-Gruppen im Gegensatz zur subkutanen DC-Gruppe vermehrte IgG2a-Antikörpertiter nachweisen (Daten nicht gezeigt). Da der Switch zur Antikörperproduktion der Subklasse IgG2a an das Vorhandensein IFN- γ -produzierender CD4-T-Zellen gebunden ist, könnte deren Existenz als ein Indiz für eine verstärkte Induktion dieser CD4-T-Zellreihe in diesen beiden Gruppen hindeuten. Inwieweit jedoch die beobachteten Unterschiede in den CD8-T-Zellfrequenzen tatsächlich auf eine verbesserte TH1-Polarisierung in den i.p./i.v.-DC-Armen zurückzuführen sind, erscheint vor dem mangelnden direkten Nachweis IFN- γ -produzierender CD4-T-Zellen – der in keiner der Vakzinierungsgruppen gelang – ungewiss.

Die Höhe der induzierten zytotoxischen CD8-Antwort ist jedoch nicht allein abhängig vom Ausmaß der sie begleitenden TH1-Antwort. CD8-T-Zellen können prinzipiell auch ohne CD4-Hilfe erfolgreich geprimt werden (121, 122). Ein anderer, wesentlicher Aspekt, der über die Höhe der Immunantwort entscheidet, ist die Verfügbarkeit bzw. die Menge des Antigenes, insbesondere bei Erstkontakt der naiven CD8-T-Zelle mit diesem (123,124). Auch die Stärke inflammatorischer Prozesse in der Umgebung des T-Zellprimings sind von Bedeutung (125). In unserem Modell ist dies gleichbedeutend mit der Anzahl der in die Lymphknoten eingewanderten OVA-DC bzw. der dortigen Verfügbarkeit des OVA-Antigenes . Eine

bekannte Limitation der DC-Vakzinierung ist, dass nur ein Bruchteil der injizierten DC am Ende tatsächlich in die sekundären lymphatischen Organe gelangen. Insbesondere bei der subkutanen Vakzinierung ist dieser Zusammenhang sehr gut belegt. So beträgt der DC-Anteil, der nach subkutaner Vakzinierung in den drainierenden Lymphknoten nachweisbar ist, weniger als fünf Prozent (126), in unseren eigenen Migrationsversuchsreihen sogar nur drei Prozent (Daten nicht gezeigt). Die restlichen 95 Prozent verbleiben am Injektionsort und werden dort abgebaut (127).

Weniger gut untersucht ist dies für i.v.- bzw. i.p.-Vakzinierungsstrategien. Grund hierfür ist das wesentlich breitere Verteilungsmuster der so applizierten DC in verschiedenen Organsystemen, was eine genaue Zellzahlbestimmung erschwert. So gelangen nach intravenöser Gabe DC vor allem in Milz und Lunge, zum Teil auch in geringerer Anzahl in andere parenchymatöse Organe wie u.a. der Leber (128, 129). Im Rahmen der intraperitonealen Vakzinierung lassen sich DC in Milz sowie in den intraabdominellen und inguinalen Lymphknoten auffinden (128-130). Vor dem Hintergrund der nur relativ begrenzten Migrationsraten in den eigenen Versuchsreihen könnte dem weitläufigeren Verteilungsmuster der DC mit entsprechend erhöhter Antigenverfügbarkeit in den i.p./i.v.-Immunisierungswegen im Vergleich zur subkutanen Route eine entscheidende Rolle zugekommen sein. Dies erklärt sich zum einen dadurch, dass DC nach i.p.- oder i.v.-Gabe verstärkt direkt über den Blutstrom in die Milz gelangen, ein Vorgang der vom lymphatischen Migrationspotential unabhängig ist (128). Zum anderen kommt es von Seiten der LPS-aktivierten (OVA-)DC via Exosomen zur Weitergabe von internalisierten Antigenen an ortsständige DC in den sekundären Lymphorganen, die dadurch ihrerseits das exosomal-vermittelte (OVA-)Antigen selbst immunogen präsentieren können, ohne mit der ursprünglichen Antigenquelle in unmittelbarem Kontakt getreten zu sein. Dieser exosomale Weg der Antigenverteilung ist ebenfalls nicht zwingend auf eine direkte Einwanderung der aktivierten (OVA-)DC mit stattgehabtem Antigenkontakt in die Lymphkompartimente als Orte des T-Zellprimings angewiesen, sondern kann auch über den Transport, der von dieser DC abgeschnürten Exosomen/Antigenkomplexe durch Lymphflüssigkeit sowie Blutstrom in die sekundären Lymphorgane erfolgen. Auf diese Weise kommt es zu einer äußerst potenten Verstärkung der Antigenpräsentation sowie der T-Zellaktivierung (115, 131).

Die insgesamt verstärkte OVA-Antigenpräsentation in den i.p./i.v.-Gruppen infolge der erweiterten DC-Verteilungsmuster mit begleitender, breitflächigerer exosomaler Antigenweitergabe würde die Wahrscheinlichkeit und Effizienz des Primings naiver, SIINFEKL-reaktiver CD8-T-Zellen steigern und könnte die deutlichen quantitativen Unterschiede zur subkutanen DC-Vakzine erklären. Die ebenfalls beobachtete relative Indifferenz in Bezug auf die Höhe der gebildeten Antikörper ließe sich dabei als Ausdruck der annähernd maximalen Rekrutierung und Aktivierung des natürlicherweise vorhandenen OVA-spezifischen B-Zell-Repertoires bereits im subkutanen Modell interpretieren. Ein Anhaltspunkt für diese Argumentation liefert die Beobachtung, dass sich durch die kombinierte zweimalige i.v.-Gabe von 1 mg OVA-Protein/Maus zusammen mit LPS nicht wesentlich höhere Gesamt-IgG-Antikörpertiter erzielen ließen als in den OVA-DC-Immunisierungsversuchen selbst.

In bisherige Arbeiten zum Vergleich der verschiedenen Immunisierungsrouten kamen vorwiegend Peptid gepulste DC zum Einsatz, wobei sehr oft indirekte Parameter wie das Anwachsen von Tumorzellen als immunologische Readouts zur Beurteilung der Effektivität der induzierten T-Zellantwort dienten (117-119). Zwar verwendeten Okada et al. in ihrer Vergleichsstudie ebenfalls OVA-Protein gepulste DC mit anschließender indirekter Quantifizierung der resultierenden CD8-Antwort mit Hilfe eines *in vitro*-Zytotoxizitätsassays. Jedoch wurde dabei der in Kultur sich selbst vermehrende DC-Klon „DC 2.4“ verwendet, der vor Injektion mit Mitomycin in seiner Proliferationsfähigkeit gehemmt werden musste (117). Darüber hinaus wurde – wie in vielen anderen Studien zu diesem Thema – auf eine effektive Aktivierung der DC durch TLR-Liganden wie beispielsweise LPS verzichtet, welche unabdingbar für die immunogene Antigenpräsentation insbesondere auch mittels des exosomalen Weges ist.

Inwieweit die unter diesen Studienbedingungen berichtete Überlegenheit der subkutanen Vakzinierung tatsächlich auf LPS-aktivierte, OVA-Protein gepulste BMDC zu übertragen ist, erscheint insbesondere vor dem Hintergrund der in diesen Protokollen wohl nur gering induzierten Antigenverteilung via Exosomen eher fraglich. In Analogie zu unseren Ergebnissen konnte in einer neueren Arbeit von Schleicher et al. zur immunologischen Wirksamkeit der unterschiedlichen Administrationsrouten ebenfalls eine deutliche Überlegenheit der intravenösen DC-Gabe gegenüber der subkutanen Injektion bezüglich der

Höhe der generierten OVA-spezifischen CD8-Antwort gezeigt werden (128). Dabei waren adenoviral-transfizierte DC verwendet worden, die dadurch das OVA-Antigen selbst exprimierten und dieses aufgrund ihrer intrinsischen Aktivierung infolge der viralen Transfektion via des exosomalen Weges frei immunogen distribuieren konnten.

Trotz hinreichender Belege für die überlegene Wirksamkeit peptidbeladener DC (112) entschieden wir uns für die Verwendung OVA-Protein gepulster DC. Zum einen gab es so die Möglichkeit des Nachweises OVA-spezifischer Antikörper, welche im Rahmen SIINFEKL-Peptid beladener DC-Vakzinestrategien weniger zu erwarten sind. Zum anderen entsprach die damit verbundene Antigenprozessierung des kompletten OVA-Proteins durch die DC und den damit verbundenen T-Zellinteraktionen der bisherigen DC-Beladung mit apoptotischen Tumorzellen eher. Letztere hatte sich unter Verwendung apoptotischer Panc02-OVA-Tumorzellen in unseren Händen als deutlich weniger effizient als die Beladung der DC mit OVA-Protein bei der Induktion SIINFEKL-spezifischer T-Zellfrequenzen herausgestellt. Andere Gruppen berichteten in ihren Modellen über bessere Ergebnisse bei der Verwendung von apoptotischen Zellen als Antigenquelle im Vergleich zum Pulsen mit löslichem Antigenprotein aufgrund der Rezeptor-vermittelten Aufnahme von apoptotischen Zellen mit dadurch verstärkter Kreuzpräsentation (132, 133).

Die Ursache dafür könnte in unserem Modell – retrospektiv betrachtet – in der Abschwächung der immunologischen Wirksamkeit der DC-Vakzine durch Kokultur der unreifen DC mit den apoptotischen Panc02-OVA-Tumorzellen im Rahmen der Antigenbeladung begründet liegen. Die Panc02-Zelllinie zeichnet sich gegenüber anderen Tumorzelllinien durch die Sekretion großer Mengen der immunsuppressiven Zytokine TGF- β und IL-10 aus (134), welche höchstwahrscheinlich u.a. im Rahmen des apoptotischen Zellunterganges von intrazellulär verstärkt freigesetzt wurden und die dadurch die mitkultivierten DC direkt negativ beeinflusst haben könnten. Belege für diese Hypothese finden sich in einer neueren Studie von Bellone et al. (135). Hier konnte gezeigt werden, dass *ex vivo* generierte unreife humane DC, die mit Überständen der Kulturmedien diverser Pankreaskarzinomzelllinien kultiviert worden waren, nach Aktivierung durch IFN- γ und CD40-Liganden nur noch eingeschränkt zur IL-12p70-Produktion in der Lage waren. IL-12p70 ist dabei eines der Schlüsselzytokine in der Entstehung einer IFN- γ gewichteten, zytotoxischen T-Zellantwort. Stattdessen sezernierten die so vorbehandelten DC verstärkt IL-

10, welches die Entstehung immunsuppressiver regulatorischer T-Zellen begünstigt (95, 136). Agens für diese tolerogene Umdifferenzierung der kultivierten DC waren im Wesentlichen das von den Pankreaskarzinomzellen sezernierte TGF- β und IL-10. Zum anderen verdichten sich die Hinweise, dass sog. „apoptotic bodies“, welche sich im Rahmen des Zellunterganges apoptotischer Tumorzellen bilden, zur direkten Abschwächung einer antitumoralen zytotoxischen T-Zellantwort *in vivo* führen (137). Auch in unseren Versuchen wurde im Rahmen der Panc02-OVA-DC-Vakzinierung zeitgleich eine gewisse Anzahl apoptotischer Tumorzellen in die Maus miteingebracht, was – neben der möglichen Beeinflussung der DC in der Panc02-OVA-Kokultur – zu einer weiteren Wirkabschwächung der DC-Vakzine auf T-Zellebene geführt haben dürfte. Strategien wie das Abzentrifugieren des apoptotischen Tumorzellmaterials mittels eines Ficoll-Gradient-Systems oder das Hinzufügen von Anti-TGF- β /IL-10-Antikörpern zur Kokultur könnten eventuell die Effektivität der Panc02-OVA-DC-Vakzine steigern. Insgesamt führte nur die Beladung der DC mit OVA-Protein zu robusten, direkt quantifizierbaren T-Zellantworten, weswegen für die Versuche zur kombinierten Gemcitabin-Therapie vorrangig dieses Protokoll verwendet wurde.

4.2.2. Gemcitabin: mehr als nur ein gewöhnliches Zytostatikum

Lange galt die Ansicht, dass sich die Kombination aus immuntherapeutischen Ansätzen mit klassischer Chemotherapie als wenig effektiv erweisen würde, da man davon ausging, dass die durch Zytostatika bedingte Immunsuppression der therapeutischen Wirksamkeit der Immuntherapie entgegenstehen würde. Mittlerweile hat sich jedoch gezeigt, dass einige klassische Zytostatika wie Taxane, Doxorubicin, Cyclophosphamid, Bleomycin und andere neben ihrer intrinsischen zytotoxischen Aktivität eine Reihe immunmodulatorischer Eigenschaften besitzen, die sich in Kombination mit immuntherapeutischen Ansätzen als vorteilhaft erweisen könnten (137-139). Eine Vielzahl der zugrundeliegenden Mechanismen sind auf immunologischer Ebene mittlerweile genauer untersucht. Hierzu gehören direkt sensitivierende Effekte auf Tumorzellen gegenüber der zytotoxischen Wirkung von NK- und CD8-Zellen durch die Heraufregulierung des Fas-Rezeptors in den Tumorzellen (108, 141), die verstärkte antitumorale Wirkung von (murinen) Makrophagen durch die vermehrte Produktion von Stickstoffmonoxid (142) bzw. die Chemotherapie-induzierte Reduktion der tumoralen TGF- β -Produktion (143). Darüber hinaus mehren sich die Belege für die gezielt hemmende Wirkung einzelner Zytostatika auf die Funktion bestimmter immunsuppressiver Immunzellreihen (114, 144) zu deren bekannteste Vertreter die CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺

regulatorischen T-Zellen(Tregs), die NK-T-Zellen sowie die sog. myeloiden Suppressorzellen (MSDC) gehören (145-147).

Wie neuere Studien vor allem in Mausmodellen belegen, erweist sich dabei auch Gemcitabin durch sein immunmodulierendes Profil als besonders geeignet, um in Kombination mit immuntherapeutischen Verfahren angewendet zu werden (105-107). Wesentliche Erkenntnisse auf diesem Gebiet sind den Forschungsarbeiten von Nowak et al. zu verdanken, die als Erste die immunmodulatorischen Effekte von Gemcitabin im tierexperimentellen Tumorsystem näher untersuchten. In einem murinen Mesotheliom-Modell konnten sie dabei zeigen, dass Gemcitabin mit seinen immunsuppressiven Eigenschaften die Generierung einer antitumoralen B- und T-Zellantwort unterschiedlich stark beeinflusste. Hierbei kam es – in Anlehnung zu unseren Ergebnissen – zu einer kompletten Inhibierung der Produktion Tumorantigen-spezifischer Antikörper, während die Induktion einer antitumoralen T-Zellantwort eher begünstigt wurde (105). Grundlage hierfür war einerseits eine im Vergleich zur T-Zellreihe höhere Empfindlichkeit proliferierender B-Zellen gegenüber der Gemcitabinexposition (105). Andererseits führte die proapoptotische Wirkung des Zystostatikums auf die Tumorzellen zur vermehrten Kreuzpräsentation tumoraler Antigene durch DC in den tumordrainierenden Lymphknoten, welche ihrerseits die Induktion einer antitumoralen T-Zellantwort ermöglichte (148). Dieser Effekt konnte durch eine andere Studie in einer Reihe weiterer muriner Tumorzelllinien bestätigt werden (149).

Durch die Kombination von Gemcitabin mit immuntherapeutischen Verfahren wie der Gabe CD40-Rezeptor aktivierender Antikörper bzw. IFN- β -sezernierender Adenoviren sind des Weiteren beachtliche Therapieerfolge – insbesondere bei kleinen Tumorumfängen – beschrieben worden (106, 107). Dabei scheint die u.a. von Suzuki et al. entdeckte selektive Gemcitabin-vermittelte Elimination CD11b+GR-1+ myeloider Suppressorzellen, die in hoher Anzahl in der Milz von Tieren insbesondere mit großer Tumorlast nachgewiesen werden konnten, eine entscheidende Rolle zu spielen (107). Die von dieser Zellreihe ausgeübte Suppression auf die zytolytische Fähigkeit von CD8- bzw. NK-Zellen ist einer der vielen Mechanismen, mit deren Hilfe sich Tumore wirkungsvoll einer gegen sie gerichteten Immunantwort entziehen können. Darüber hinaus konnten Studien von Dauer et al. für Gemcitabin eine direkte Sensitivierung humaner Pankreaskarzinomzellen gegenüber der T-Zell-vermittelten Lyse nachweisen (108). Zudem ist Gemcitabin in der Lage –

möglicherweise durch Aktivierung des NF κ B-Signalwegs in Tumormakrophagen und Tumorendothelzellen –, lokale inflammatorische Prozesse innerhalb des Tumors zu induzieren, die zu einer erhöhten Migration von Immunzellen in den Tumor selbst führen (106). Vermittelt wird dies unter anderem durch die vermehrte Expression des Zelladhäsionsmolekül ICAM-1 auf den Tumorendothelzellen. Wie Suzuki et al. demonstrierten, ist dieser Effekt tumorzellspezifisch und daher nicht bei jeder Tumorzelllinie gegeben (149). Damit waren insgesamt eine Reihe wichtiger Belege für die immunmodulatorischen Eigenschaften von Gemcitabin gefunden.

4.2.3. DC-Immuntherapie und Gemcitabin im subkutanen Panc02-OVA-Modell

Auch in unseren eigenen Studien unter der Verwendung der murinen Pankreaskarzinomzelllinie Panc02-OVA konnten wir den positiven Effekt von Gemcitabin auf die Wirksamkeit einer DC-basierten antitumoralen Immuntherapie bestätigen. Wie bereits von Nowak et al. (106) gezeigt, ist auch in unserem Tumormodell der therapeutische Synergismus an das Vorhandensein einer spezifischen T-Zellantwort gebunden. Unbeladene DC entfaltet im subkutanen System in Kombination mit Gemcitabin keinerlei zusätzliche therapeutische Wirkung, was alleinige unspezifische immunstimulatorische Effekte durch die DC-Gabe als Grundlage des Therapieerfolges ausschließt. Trotz erheblicher Gemcitabin-vermittelter Reduktion der DC-induzierten, antitumoralen CD8-T-Zellantwort erwies sich die OVA-DC+Gem-Gruppe gegenüber den jeweiligen Einzeltherapieformen in Bezug auf die lokale Tumorkontrolle als klar überlegen. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Nowak et al. und Suzuki et al. konnte im Panc02-OVA-Tumormodell im Behandlungsarm mit Gemcitabin jedoch keinerlei Induktion einer nennenswerten antitumoralen T-Zellantwort beobachtet werden. Das Ausmaß der festgestellten Unterdrückung der Immunantwort war bei kontinuierlichem Applikationsintervall des Zytostatikums alle drei Tage parallel zur DC-Gabe unabhängig von der Höhe der verwendeten Gemcitabinosis. Sowohl 25 μ g/mg Gemcitabin pro Tier als auch 50 μ g/mg pro Tier führten zu einer annähernd kompletten Inhibierung der B-Zellantwort sowie zu einer Reduktion der SIINFEKL-spezifischen T-Zellfrequenz auf nahezu identische 0,1 Prozent. Mechanistisch konnte für die Reduktion der T-Zellantwort die Inhibition der T-Zellproliferation durch Gemcitabin als Hauptursache bestätigt werden, welche bereits ab einer Gemcitabinkonzentration von 20 nM *in vitro* festzustellen war. Hingegen wurden die Anzahl der verabreichten DC sowie deren Kapazität zur T-Zellaktivierung durch Gemcitabin nicht negativ beeinflusst. Das Ausmaß der Reduktion der

induzierten Immunantwort war wesentlich vom Zeitpunkt der Gemcitabinwirkung abhängig. Durch den zeitversetzten Beginn der Gemcitabin-Gabe innerhalb des 2ndGem-Regimes mit Start des Chemotherapeutikums in einem Zeitfenster nach der maximalen klonalen Expansionsphase der aktivierten Lymphozyten – welche sich in unseren Experimenten im Rahmen der ersten beiden DC-Vakzinierungen abspielte – kam es zu einer wesentlichen Umgehung der Gemcitabin-vermittelten Immunsuppression. Dies betraf nicht nur die CD8-T-Zellreihe, sondern insbesondere auch die humorale B-Zellantwort.

Generell ist die optimale Abfolge der Kombination von Gemcitabin und Immuntherapie auch hinsichtlich des Therapieerfolges noch nicht abschließend geklärt. Sowohl Nowak et al. als auch Suzuki et al. demonstrierten in ihren Studien eine therapeutische Überlegenheit der Sequenz Gemcitabingabe gefolgt von Immuntherapie gegenüber dem Schema in umgekehrter Reihenfolge (106, 107) bzw. dem mit synchronen Ablauf der beiden Therapiemodalitäten (106). Dabei ist jedoch zu bedenken, dass in beiden Arbeitsgruppen relativ unspezifische Formen der Immuntherapie angewendet wurden, die sich auf die primäre Aktivierung dendritischer Zellen mittels eines CD40-Antikörpers (106) bzw. die allgemeine Stimulierung des Immunsystems durch IFN- β (107) stützten und somit für die Generierung einer spezifischen zytotoxischen Immunantwort auf das primäre Vorhandensein apoptotischer Tumorzellen angewiesen war. Diese wurde durch die proapoptische Wirkung der vorgezogenen Gemcitabintherapie auf die Tumorzellen mit anschließender tumoraler Antigenpräsentation durch DC in den tumordrainierenden Lymphknoten wesentlich erleichtert. Zeitgleich wurde durch die nachweisbare Elimination myeloider Suppressorzellen in den dortigen Tumormodellen die Effektivität der sekundär durchgeführten unspezifischen Immuntherapie entscheidend verstärkt.

Auch die synchrone Kombination von Gemcitabin zusammen mit dem aktivierenden CD40-Antikörper erwies sich bei Nowak et al. dem oben genannten Schema als unterlegen – wenn auch viel weniger stark als die Sequenz Immuntherapie gefolgt von Gemcitabin (106). Jedoch war die Aussagekraft aufgrund der auftretenden hohen Toxizität in diesem Therapiearm, der immerhin 60 Prozent der Versuchstiere erlagen, sehr stark eingeschränkt. Neben unseren eigenen Versuchsreihen bestätigt auch eine aktuelle Arbeit von Le et al. den therapeutischen Synergismus einer parallel durchgeführten Kombinationstherapie von

Gemcitabin und Immuntherapie mittels Poly I:C (150). Es bedarf jedoch weiterer Studien, um diesen Sachverhalt abschließend beurteilen zu können.

Trotz der Mehrheit der Belege, die für eine Überlegenheit einer primären Gemcitabingabe vor Beginn der Immuntherapie sprachen, entschieden wir uns dennoch die umgekehrte Sequenz – in leicht modifizierter Art in Form des 2ndGem-Regimes – auf ihre therapeutische Wirksamkeit in unserem Tumormodell zu evaluieren. Grundlage hierfür war zum einen die Beobachtung des Erhalts der Immunantwort durch den zeitversetzten Gemcitabin-Beginn im Rahmen der tumorfreien DC-Vakzinierung sowie die im Hinblick auf die evtl. spätere klinische Anwendung einfachere Integration dieses Schemas in bereits bestehende Therapiekonzepte des Pankreaskarzinoms. Darüber hinaus sollte durch die anschließende kontinuierliche erfolgende Gemcitabin-Gabe parallel zur DC-Vakzinierung in unserem 2ndGem-Therapiekonzept der Einfluss möglicher tumoraler immunsuppressiver Mechanismen unterdrückt werden und damit gleichzeitig einige Limitationen der bisher zu diesem Ansatz erfolgten Studien überwunden werden.

Es zeigte sich dabei jedoch eine therapeutische Unterlegenheit des 2ndGem-Ansatzes gegenüber der Kombinationstherapie von Beginn an. Zwar lag die gemessene T-Zellfrequenz für beide Epitope – SIINFEKL und p15E – etwa drei bis vier Mal höher als die in der OVA-DC+Gem-Gruppe. Dennoch konnte nur in Letzterer das Tumorwachstum deutlich verzögert werden.

Der Grund für das bessere klinische Outcome der OVA-DC+Gem-Gruppe im Vergleich zur OVA-DC+2ndGem-Gruppe trotz geringerer Frequenz an tumorspezifischen T-Zellen ist noch nicht endgültig geklärt. In unseren *in vivo*-Zytotoxizitätsmessungen zeigte sich ungeachtet einer im Schnitt bis zu fünffach höheren Frequenz spezifischer CD8-T-Zellen in der OVA-DC+2ndGem-Gruppe eine im Vergleich zur OVA-DC+Gem-Gruppe geringe Differenz in der Lyse SIINFEKL-beladener Splenozyten von weniger als 14 Prozent. Die Anzahl der spezifischen T-Zellen allein scheint somit kein ausreichender Prädiktor für den therapeutischen Erfolg sowie für die zytotoxische Potenz des induzierten T-Zellpools zu sein. Vielmehr scheint bereits eine geringe Anzahl tumorspezifischer T-Zellen unter geeigneten Bedingungen zur wirkungsvollen Lyse der Zielzellen auszureichen.

Unter Umständen könnte das Vorhandensein einer starken tumorantigenspezifischen B-Zellantwort, wie sie im Rahmen der OVA-DC bzw. 2ndGem-Vakzinierung induziert wurde, direkt die zytotoxische Wirksamkeit einer antitumoralen CD8-Antwort reduziert haben. Eine Arbeit von *Hellstrom et al.* zeigte, dass Immunsere mit antitumoralen Antikörpern das Tumorstadium fördern und zwar im Wesentlichen durch die Blockierung des Zugriffs der T-Zellen auf die MCHI-Antigen-Komplexe der Tumorzellen durch die daran angelagerten Antikörper (151). Vor diesem Hintergrund könnte die Gemcitabin-vermittelte komplette Inhibierung hoher OVA-spezifischer Antikörpertiter die Divergenz zwischen den deutlichen quantitativen Unterschieden der gemessenen induzierten T-Zellen und den nur marginalen Differenzen der Lyseraten im *in vivo* Zytotoxizitätsassay bzw. der geringeren Wirksamkeit des 2ndGem-Ansatzes im Tumormodell teilweise vermittelt haben.

Der Hauptgrund für die therapeutische Unterlegenheit des 2ndGem-Regimes im Vergleich zum OVA-DC+Gem-Schema dürfte aber letztendlich in der mangelnden Tumorkontrolle in der Induktionsphase der T-Zellantwort in den ersten zwei Wochen der OVA-DC-Therapiephase begründet liegen. Die im Rahmen der OVA-DC-Vakzinierung beobachtete Verzögerung des Tumorstadiums im subkutanen Modell trat erst mit einer Latenz nach der zweiten DC-Gabe ein – also ab dem Zeitpunkt der maximal gemessenen T-Zellantwort. Bis dahin verlief das Tumorstadium nahezu unterschiedslos zu unbehandelten Tumorkontrolltieren. In dem daraus resultierenden Unterschied in den Tumorstadiumen – 35 mm² in OVA-DC+2ndGem versus 5 mm² in OVA-DC+Gem – bei Start der sekundären Gemcitabin-Behandlung dürfte im Wesentlichen die Grundlage für den Behandlungsmisserfolg des 2ndGem-Regimes sowie auch für den der alleinigen OVA-DC-Vakzine liegen.

Größere Tumore sind generell schwerer für immunologische Therapiekonzepte zugänglich, da das dortige Tumormilieu eine Vielzahl an Möglichkeiten bietet, eine antitumorale CD8-T-Antwort zu inaktivieren. Dies reicht über die Sekretion antiinflammatorischer Zytokine wie TGF- β , IL-10, IP-10, welche die Expression von Perforin, Granzym A und B, Fas-Ligand und IFN- γ der T-Zellen (152) unterdrücken, über die Rekrutierung von immunsuppressiven Tregs (153) und MSDC (107) bis zu physikalischen Barrieren durch das in großen Mengen induzierte Tumorstroma-Gewebe.

Trotz der therapeutischen Limitationen des OVA-DC+2ndGem Ansatzes in unserem Modell gilt zu bedenken, dass dieser gerade im Rahmen einer adjuvanten Vakzinierung von Pankreaskarzinompatienten ideal erscheint, da nach einer ausgedehnten Operation stets einige Wochen bis zum Start der Chemotherapie vergehen. Die Tatsache, dass die 2ndGem-Gruppe trotz zweiwöchiger Verzögerung im Beginn der Gemcitabinbehandlung ein ähnliches klinisches Outcome wie die Gem-Gruppe (also Gemcitabin ab Tag 0) erreichte, ist insofern sehr ermutigend.

Mittelfristig ist für den klinischen Einsatz der DC-Vakzine wohl meist nur eine Kombination mit einer Chemotherapie praktikabel. Dies erscheint im Falle von Gemcitabin besonders auch immunologisch zielführend. Für die von uns verwendete Panc02-OVA-Zelllinie konnten wir im subkutanen Modell den Nachweis eines deutlich vermehrten Influxes von T-Zellen sowie NK-Zellen in den Gemcitabin-behandelten Gruppen (sowie in geringerem Umfang auch in der OVA-DC-Gruppe) erbringen. Hierbei zeigte sich im Vergleich zum Monotherapie-Arm mit Gemcitabin in der Kombinationsgruppe eine signifikante erhöhte Einwanderung von CD8-T-Zellen in den Tumor. Auch Nowak et al. hatten in ihrem Tumormodell ähnliche Beobachtungen gemacht (107). Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit eine sensitivierende Wirkung von Gemcitabin auf die CD8-vermittelte Lyse der Panc02-OVA-Tumorzellen nachgewiesen werden. Diese beiden Mechanismen könnten die Effektivität der DC-induzierten antitumoralen T-Zellantwort – neben den direkten antiproliferativen Eigenschaften auf das Tumorstadium – *in vivo* noch weiter unterstützt haben. Welche Faktoren die führende Rolle bei der Entstehung des von uns beobachteten synergistischen Effekts im subkutanen Tumormodell übernehmen, ist bisher noch nicht eindeutig geklärt.

Trotz erheblicher Verlangsamung des subkutanen Tumorstadiums durch das OVA-DC+Gem-Regime konnte bei keinem der damit behandelten Versuchstiere ein vollständiger Heilungserfolg erzielt werden. Daher muss die Panc02-Tumorzelllinie über potente Tumor-Escape-Mechanismen verfügen, die ihrerseits durch die Gemcitabin-Exposition im Wesentlichen unbeeinflusst bleiben. Die Rolle von myeloiden Suppressorzellen scheint im Panc02-Tumormodell vernachlässigbar zu sein. Im Gegensatz zu Suzuki et al. fanden sich sowohl systemisch als auch intratumoral nur geringe Zahlen CD11b+Gr-1+ Zellen, bei denen es sich aufgrund ihrer durchflusszytometrischen Charakteristika am ehesten um neutrophile Granulozyten gehandelt haben dürfte. Einen größeren Beitrag zur Limitation des

Therapieerfolges der DC-Immuntherapie könnte hingegen die Induktion regulatorischer T-Zellen durch das von den Panc02-OVA-Tumorzellen in großen Mengen produzierte TGF- β gespielt haben. Ihre absolute Anzahl sowie ihr prozentualer Anteil am CD4-T-Zellpool war in allen tumortragenden Tieren im Gegensatz zu Tieren ohne Tumorlast signifikant erhöht. Tregs können durch die Sekretion von TGF- β und IL-10 CD8-T-Zellen in ihrer lytischen Funktion einschränken sowie via Expression des Fas-Liganden spezifische T-Zellen und DC direkt abtöten (153, 154). Die verstärkte Präsenz regulatorischer T-Zellen in allen tumortragenden Tieren – die auch durch die begleitende Gemcitabingabe nicht nennenswert beeinflusst wurde – dürfte die durch die DC-Gabe induzierte antitumorale Antwort wesentlich abgeschwächt haben. Belege für die herausragende Bedeutung der durch diese Zellreihe ausübten Immunsuppression im Panc02-OVA-Modell konnte in einer aktuellen Arbeit von Jacobs et al. demonstriert werden (134).

4.2.4. Vorteile der intraperitonealen DC-Vakzinierungsstrategie bei der Therapie intrapankreatischer Tumoren

Verschiedene Studien hatten bereits über das divergierende immunologische Verhalten und Ansprechen intrapankreatisch implantierter Tumorzellen gegenüber solchen, die subkutan gesetzt wurden, berichtet (109,156). Grundlage hierfür ist nicht zuletzt das eher immunologisch tolerogene Milieu innerhalb des GI-Traktes, insbesondere im Bereich des Pankreas. Hinzu kommt aus immuntherapeutischer Sicht, dass Effektor-T-Zellen für die Einwanderung in den GI-Trakt bzw. in das Pankreas mit einem speziellen Repertoire an endothelialen Zelladhäsionsmolekülen ausgestattet sein müssen, das sich wesentlich von dem, welches für die Einwanderung von Effektorzellen in die Haut notwendig ist, unterscheidet. Durch den Wechsel in das orthotope Modell musste auch die Injektionsroute der DC neu evaluiert werden. Es zeigte sich, dass die Wahl des Immunisierungsweges im Panc02-Tumormodell Einfluss auf die therapeutische Wirksamkeit der DC-Vakzine nimmt.

Bekannteste Vertreter der Zelladhäsionsmoleküle, die am sog. „T-Zell-Homing“ in den GI-Trakt entscheidend beteiligt sind, sind das $\alpha_4\beta_7$ -Integrin sowie der Chemokin-Rezeptor CCR-9 auf Seiten der T-Zellen bzw. das MadCam-1 Molekül auf Seiten des Gefäßendothels (157,158). Wie Studien im Mausmodell sowie im humanen System zeigen, bedarf es auch für die effektive Einwanderung der T-Zellen in das Pankreas der Expression und Interaktion dieser Oberflächenmoleküle (158, 159). T-Zellen mit Zielorgan Haut sind dagegen durch die

Expression von CLA (cutaneous lymphocyte antigen), E/P-Selektin-Liganden sowie CCR4/10 auf ihrer Zelloberfläche gekennzeichnet (157, 160). Das spätere Homing-Verhalten der generierten Effektor-T-Zellen ist ganz wesentlich davon geprägt, in welchem sekundären Lymphorgankompartiment die Aktivierung der naiven T-Zellen erfolgte. T-Zellen die durch APC aus GI-Trakt-assoziierten Lymphknoten geprimt wurden, zeigen eine Heraufregulierung der GI-affinen Marker $\alpha\beta$, und CCR9, die die mit solchen aus subkutanen, inguinalen Lymphknoten in Kontakt gekommen sind, entsprechend die Kombination von CLA + E/P-Selektin-Ligand (158, 160). Generell ist dieses sog. „Imprinting“ bezüglich des präferentiellen Homing-Verhaltens der T-Zellantwort reversibel und richtet sich im Wesentlichen nach dem Ort des zuletzt stattgefundenen Antigenkontakts (160). Eine Vielzahl von Studien belegte bereits vor Entdeckung der genauen Imprinting-Mechanismen empirisch das unterschiedliche Ansprechen bei Tumorchallenge-Versuchen nach erfolgter i.v./s.c-DC-Vakzinierung (117-119). Letztendlich gelang es Sheasley et al. die direkte Abhängigkeit des Homing-Integrin-Expressionsmuster der induzierten T-Zellen von der Art der DC-Immunisierungsroute nachzuweisen (130).

In unserem orthotopen Tumormodell konnte sich die s.c.-Vakzinierung mittels Panc02-OVA-DC in einem prophylaktischen Versuchsaufbau erfolgreich bewähren und führte zu einem vollständigen Schutz vor späterem intrapankreatischem Panc02-OVA-Tumor-Challenge. Dies bestärkte uns in dem Vorhaben – trotz der damit generierten, geringen T-Zellfrequenzen –, diesen Immunisierungsansatz im orthotopen Setting primär weiterzuverfolgen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus Vorarbeiten mit der parentalen Panc02-Zelllinien im subkutanen Tumormodell (104) zeigte die Panc02-OVA-DC-Vakzine im orthotopen System in Kombination mit Gemcitabin keinerlei additive therapeutische Effekte. Sowohl in der Panc02-OVA-DC- wie auch in der Panc02-OVA-DC+Gem-Gruppe erlagen die Versuchstiere ihrem Tumorleiden ohne Unterschied zu den Kontrolltieren bzw. Tieren der Gemcitabin-Gruppe. Verantwortlich hierfür ist wohl zum einen das aggressivere lokale Tumormilieu im Pankreas sowie die primär geringe Immunantwort nach Vakzinierung mit Panc02-OVA-Tumorzellen-beladenen DC. Jedoch könnten zudem auch komplexe Imprinting-Phänomene am Therapiemisserfolg der subkutanen DC-Vakzinierung im orthotopen Tumormodell beteiligt gewesen sein.

Chang et al. berichteten bereits, dass ein subkutaner Tumorzellvaksinierungsansatz in einem orthotopen murinen Lebertumormodell therapeutisch komplett wirkungslos blieb, wohl aber T-Zellen induzierte, die bei der Bekämpfung subkutan implantierter Tumorzellen äußerst effektiv waren und ein entsprechendes präferentielles kutanes Migrationsverhalten aufwiesen (161). Demgegenüber führte die intrahepatische Immunisierung zu überlegenen Ergebnissen sowohl in Bezug auf die orthotope Tumorkontrolle als auch in Hinblick auf das intrahepatische Homing-Verhalten der induzierten T-Zellantwort. Vor diesem Hintergrund sowie der Reversibilität des T-Zellimprintings wäre es vorstellbar, dass es mit jeder erneuten subkutanen Panc02-OVA-DC-Injektion zu einer weiteren Polarisierung der induzierten T-Effektorzellen in Richtung der Haut als Zielorgan – mit entsprechendem, kutanem Expressionsmuster der T-Zell-Homing-Rezeptoren – gekommen sein könnte. Demnach wären die ursprünglich im Rahmen der DC-Vaksinierung entstandenen T-Zellen, die zum Impfschutz gegen den intrapankreatischen Tumorchallenge geführt hatten, mit jeder weiteren subkutanen DC-Gabe eher vom orthotopen Tumorgeschehen weggelenkt worden, als sich gegen Letzteres zu richten. Weiterführende Versuchsreihen, die dieser Theorie nachgehen, wären durchaus lohnenswert.

Im Gegensatz zur subkutanen DC-Vakzine konnte die i.p.-Gabe von OVA-DC in über 70 Prozent der Tiere eine komplette Tumorremission bewirken. Durch die zusätzliche Gemcitabin-Gabe konnte diese Rate sogar auf über 80 Prozent gesteigert werden. Dabei zeigte sich im Immunmonitoring ein zum subkutanen Modell analoges Bild mit Reduktion der T-Zellantwort bei gleichzeitiger – wenn auch nur geringer – therapeutischer Überlegenheit der Kombinationstherapie. Auch die i.p.-Vaksinierung mit unbeladenen, LPS-aktivierten DC führte zu einer erheblichen Verlängerung der Überlebenszeit, war jedoch trotz der Induktion einer OVA-spezifischen Immunantwort nicht in der Lage, eine komplette Tumorfreiheit zu bewirken. Insgesamt zeigte sich eine sehr gute therapeutische Wirksamkeit der intraperitonealen DC-Vakzine im orthotopen Tumormodell. Diese dürfte in einer Reihe von immunologischen Eigenschaften begründet liegen, die die intraperitoneale DC-Vaksinierung geradezu prädestiniert für die Bekämpfung gastrointestinaler Tumore – insbesondere des Pankreaskarzinoms – erscheinen lassen.

Wie Sheasley et al. im Mausmodell belegen konnten, ist die intraperitoneale Gabe von antigenbeladenen DC die einzige der klassischen Vakzinierungsrouten, die wirkungsvoll in

der Lage ist, Effektor-T-Zellen zu generieren, die mit den T-Zell-Homing-Rezeptoren für den GI-Trakt $\alpha\beta$, und CCR 9 - ausgestattet sind (130). Entscheidend hierbei ist das Mikromilieu der Lymphknoten, in die die DC nach der Vakzinierung einwandern. Da dies bei der i.p.-DC-Gabe im Wesentlichen mesenteriale und peripankreatische Lymphknoten sowie die Payer Plaques sind, in denen T-Zellen physiologischerweise mit Antigenen aus dem GI-Trakt in Kontakt kommen, ist ein effektives Homing der dort geprimten Immunantwort von Natur aus gegeben. Da die Expression der entsprechenden Liganden von $\alpha\beta$, und CCR 9 auf Seiten des Gefäßendothels, namhaft MadCam1, insbesondere im Pankreaskarzinom selbst noch weiter verstärkt ist (162), erscheinen vor diesem Hintergrund intraperitoneale DC-Vakzinestrategien in der Therapie dieses Tumorleidens besonders geeignet. Weiterführende Versuchsreihen, die diese im Wesentlichen in Mausmodellen gemachten Beobachtungen in Bezug auf das Homing-Verhalten nach intraperitonealer DC-Gabe insbesondere auch im humanen System verifizieren, erscheinen vor dem Hintergrund der Häufigkeit gastrointestinaler Tumore durchaus lohnenswert.

Auch im subkutanen Tumormodell war die intraperitoneale Vakzinierung in der Lage, das Tumorwachstum zu verzögern bzw. führte – ebenso wie die subkutane DC-Vakzinierung – zu einer vermehrten intratumoralen T-Zellinfiltration. Diese Beobachtung lässt schließen, dass im Rahmen der i.p. DC-Gabe neben der Ausbildung von T-Zellen mit Homing-Rezeptoren in den GI-Trakt ebenfalls T-Zellen mit kutanem Migrationspotential erfolgreich geprimt worden sind. Dies ist nicht gänzlich unerwartet, da nach i.p.-DC-Gabe in unterschiedlich hoher Anzahl DC in die subkutanen inguinalen Lymphknoten gelangen (130), wo sie T-Zellen eine entsprechende Programmierung hinsichtlich ihres kutanen Migrationsverhaltens mitgeben können.

Zum vorteilhaften Migrationsverhalten der generierten T-Zellantwort durch die i.p.-DC-Vakzine im orthotopen Tumormodell gesellt sich zudem deren nicht zu vernachlässigende lokale unspezifische Immunstimulation. Durch die von den aktivierten DC in großen Mengen sezernierten proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-12p40 und IL-12p70 wird die Aktivierung und Einwanderung antitumoraler T-Zellen und NK-Zellen erheblich gesteigert. Zudem kann dadurch das immunsuppressive Milieu insbesondere in den tumordrainierenden Lymphknoten teilweise überwunden und infolge der immunogenen Antigenpräsentation von anfallenden apoptotischen Tumorzellen eine effiziente antitumorale Immunantwort

ermöglicht werden. Der Therapieerfolg der intraperitonealen, unbeladenen DC-Gabe – die im Gegensatz zu den unbehandelten Kontrolltieren sowohl zur Induktion einer OVA-spezifischen T-Zellantwort als auch zur einer erheblichen Verzögerung der Tumorprogression führten – belegen eindrucksvoll das große immunstimulatorische Potential dieser Vakzinierungsrouten. Aufgrund der meist disseminiert vorliegenden Mikrometastasen, die der Grund für die immer noch hohe Mortalitätsrate beim Pankreaskarzinom auch nach chirurgischer Intervention sind, erscheint das breite Verteilungsmuster mit entsprechender lokaler antitumoraler Wirkung der i.p.-applizierten DC eine der größten Stärken dieses immuntherapeutischen Ansatzes zu sein. Überraschenderweise ist dieser im Rahmen der Behandlung gastrointestinaler Tumore in der immunologischen Literatur weitestgehend unbeachtet geblieben.

Ausblick: Immuntherapeutische Ansätze in klinischen Studien des Pankreaskarzinoms

Aufgrund der immer noch unbefriedigenden Behandlungsmöglichkeiten des Pankreaskarzinoms sowie der weiterhin ausgesprochen hohen Mortalitätsrate erscheint die Suche nach therapeutischen Alternativen und Ergänzungen zu den bisher etablierten Standardverfahren, im Wesentlichen der operativen Tumorexstirpation sowie der Chemotherapie mit Gemcitabin oder 5-FU, zwingend notwendig. Neben der Strahlentherapie und der Verwendung neuer zielgerichteter Chemotherapeutika sind immuntherapeutische Ansätze vielversprechende neue Strategien in der Therapie des Pankreaskarzinoms. Einige dieser immuntherapeutischen Verfahren haben dabei – meist in Kombination mit Gemcitabin oder anderen Chemotherapeutika – den Sprung von der erfolgreichen Testung im Tiermodell in klinische Phase I-III-Studien geschafft, teils mit vielversprechenden Ergebnissen. Darunter befinden sich Ansätze wie Peptid-Vakzinierungen u.a. gegen den Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) (163) und k-ras (164), die Verabreichung GM-CSF-sezernierender allogener Pankreaskarzinomzellen (165) sowie die Verwendung monoklonaler Antikörper gegen EGFR oder VEGF (166, 167).

Auch die Vakzinierung mittels autologer dendritischer Zellen ist erfolgreich in einer Reihe von klinischen Studien bei dieser Erkrankung zur Anwendung gekommen (100, 101, 168, 169). Dabei erwies sich dieses Behandlungsverfahren als sehr gut verträglich und war in der Lage, eine antitumorale Immunantwort zu generieren. Jedoch blieben wie bei anderen Tumorentitäten die großen Erfolge unter der DC-Therapie aus. So konnte im Durchschnitt

meist nur eine Verlängerung der Überlebenszeit im Bereich von wenigen Monaten erreicht werden. Dabei gilt es jedoch zu bedenken, dass es sich im Patientengut der DC-Studien weitestgehend um Patienten in weit fortgeschrittenen Tumorstadien handelte, bei denen immuntherapeutische Ansätze aufgrund der zuvor beschriebenen tumoralen Immunsuppression nur begrenzt wirksam sein können. Zudem ist nach neueren immunologischen Gesichtspunkten, die in diesen Studien erfolgte Aktivierung der DC mittels des klassischen Zytokincocktails nicht optimal gewesen, was die Qualität der induzierten T-Zellantwort herabsetzte. Ungeachtet dieser Widrigkeiten fanden sich in fast allen DC-Studien Patienten die u.a. mehrere Jahre mit ihrem Tumorleiden überlebten.

Im Gegensatz dazu erscheint jedoch ein derzeit in Studien der Phase-III getesteter, multimodaler Ansatz als womöglich wegweisend in der zukünftigen Behandlung des Pankreaskarzinoms. Unter dem sog CapRI-Schema, hinterdessen Akronym sich die Kombination Cisplatin sowie 5-FU-haltiger Chemotherapie mit adjuvanter immuntherapeutischer IFN- α -Gabe und externer Radiatio verbirgt, konnten bereits in mehreren bestehenden Phase II-Trials eine durchschnittliche 3-Jahresüberlebenszeit von bis zu 55% bei Patienten mit onkologischer R0/R1-Resektion nachgewiesen werden (29, 169, 170). Limitierend hierin ist jedoch das unter diesem Regime gehäufte Auftreten schwerer gastrointestinaler und hämatologischer Nebenwirkungen.

Vor dem Hintergrund des letztendlichen Scheiterns der Anti-EGFR- und Anti-VEGF-Antikörper-Therapie in Phase-III-Studien der jüngsten Vergangenheit erscheint es dennoch sinnvoll, die begonnenen immuntherapeutischen Vakzinestrategien mittels dendritischer Zellen auch im Rahmen des Pankreaskarzinoms konsequent weiterzuverfolgen. Wie sich unter anderem an den Ergebnissen in unserem orthotopen Mausmodell erkennen läßt, ist deren therapeutisches Potential – insbesondere im Verbund mit anderen Modalitäten - noch längst nicht in vollem Umfang ausgenutzt. Vielleicht gelingt es zukünftigen DC-Studien mit neuen, optimierten Ansätzen und Protokollen, insbesondere in Patienten mit weniger weit fortgeschrittenem Tumorleiden als dies bisher der Fall war, dieses Potential nutzbar zu machen.

5. Zusammenfassung

Die Therapieerfolge bei der Behandlung von Patienten mit Pankreaskarzinom sind trotz immenser Fortschritte und Erkenntnisse auf dem Gebiet der Tumorforschung immer noch unbefriedigend. Ursache hierfür ist neben der späten Diagnostik aufgrund unspezifischer Symptomatik die diffuse lokale Infiltration des Tumors sowie dessen frühzeitige Metastasierung. Die adjuvante Chemotherapie mit Gemcitabin bei Patienten mit diesem Tumorleiden mit operativer R0/R1-Resektion zeigt nur marginal lebensverlängernde Vorteile. Aufgrund der intrinsischen Fähigkeit des Immunsystems infizierte oder entartete Körperzellen zu erkennen und wirkungsvoll zu eliminieren, erscheinen immuntherapeutische Ansätze mit dem Ziel der Induktion einer antitumoralen Immunantwort in der Behandlung des Pankreaskarzinoms aussichtsreich. Eines der prominentesten immuntherapeutischen Verfahren ist die Vakzinierung mit Tumorantigen beladenen DC. Wie Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe zeigen konnten, erwies sich dabei die Kombination von Gemcitabin mit einer DC-basierten Immuntherapie in einem subkutanen murinen Pankreaskarzinommodell mit der Tumorzelllinie Panc02 als synergistisch in Bezug auf das Überleben.

Auf dieser Beobachtung aufbauend, bestand ein Teil der Zielsetzung dieser Doktorarbeit in der näheren Charakterisierung der Einflussnahme von Gemcitabin auf die DC-Vakzine selbst bzw. die durch sie induzierte Immunantwort. Unter Einführung des Ovalbumins (OVA) als immunogenem Modellantigen und nach Etablierung immunologischer Nachweismethoden, konnten zunächst verschiedene DC-Protokolle und Vakzinierungsrouten hinsichtlich ihrer Effektivität in der Generierung einer adaptiven Immunantwort getestet und systematisch miteinander verglichen werden. Von besonderem Interesse war dabei vor allem in Hinblick auf die Verwendung im späteren orthotopen Tumormodell die Effektivität der intraperitonealen DC-Gabe, die letztendlich gegenüber der s.c.-Vakzinierung deutlich höhere spezifische T-Zellantworten induzierte. In weiterführenden Studien mit paralleler Gemcitabingabe stellte sich eine deutliche Suppression der DC-vermittelten Immunantwort gegen das OVA-Antigen heraus. Diese betraf in verstärktem Ausmaß die B-Zellreihe, deren Produktion OVA-spezifischer Antikörper nahezu komplett unterdrückt wurde. Auch die induzierte T-Zellantwort war deutlich reduziert. Diese zeigte jedoch immer noch eine ausgeprägte lytische Aktivität von Surrogat-Target-Zellen in einem *in vivo*-Zytotoxizitätstest. Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der immunsuppressive Effekt von Gemcitabin maßgeblich auf die direkte antiproliferative Wirkung von Gemcitabin

zurückzuführen ist. Die T-Zellstimulationskapazität der DC-Vakzine wurde *in vivo* durch Gemcitabin hingegen nicht negativ beeinflusst. Das Ausmaß der beobachteten Immunsuppression war zudem stark vom Zeitpunkt des Beginns der Gemcitabingabe abhängig. Trotz deutlicher Reduktion der Immunantwort erwies sich im subkutanen Tumormodell mit transfizierten Panc02-OVA-Zellen die Kombinationstherapie von OVA-Protein-gepulsten DC und Gemcitabin von Beginn an gegenüber einem modifizierten Protokoll mit verspäteter Gemcitabin-Gabe parallel zur DC-Vakzine als therapeutisch überlegen. Der Synergismuseffekt war an das Vorhandensein einer spezifischen T-Zellantwort gebunden. Ferner konnte in dem verwendeten murinen Pankreaskarzinommodell die verbesserte Migration von Immunzellen - v.a. der CD8-T-Zellreihe - sowie die Verbesserung der T-Zell-vermittelten Tumorzelllyse unter Gemcitabinexposition nachgewiesen werden.

Bei der Erweiterung des Tumormodells auf die orthotope Ebene zeigt sich die subkutane Vakzinierung mittels DC, die mit apoptotischen Panc02-OVA-Tumorzellen als Antigenquelle beladen worden waren, nur in der Lage, einen prophylaktischen Impfschutz gegen den nachfolgenden intrapancreatischen Tumorchallenge zu induzieren. Sie versagte jedoch komplett in der Therapie etablierter intrapancreatischer Tumore. Demgegenüber konnten durch die Verwendung intraperitoneal verabreichter, OVA-Protein-gepulster DC – sowie in begrenztem Umfang auch durch die i.p.-Gabe LPS-aktivierter, ungepulster DC ohne Antigenbeladung – beachtliche Therapieerfolge erzielt werden.

Durch die vorliegende Arbeit gelang es erstmalig grundlegende Erkenntnisse über das Zusammenspiel von DC-Immuntherapie und dabei begleitend durchgeführter Gemcitabinbehandlung im murinen Panc02-OVA-System zu sammeln. Es konnten zudem eine Reihe zuvor beschriebener immunmodulatorischer Eigenschaften von Gemcitabin auch im Panc02-OVA-Tumormodell bestätigt werden.

Mit der im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Etablierung des orthotopen Pankreaskarzinommodells steht nun zudem ein System zur Verfügung, welches sich wesentlich näher an der klinischen Situation bewegt. Daran konnten neue, evtl. wegweisende Anwendungen der DC-Therapie – namhaft in Form der intraperitonealen DC-Gabe – bei diesem Tumorleiden erfolgreich getestet werden, die weiterführende klinische Studien rechtfertigen könnten.

6. Literaturverzeichnis:

1. Seufferlein, T. and G. Adler (2009). "[The S3 guideline exocrine pancreatic cancer]." *Med Klin (Munich)* 104(11): 869-74.
2. Bertz J., Hentschel S., Hundsdoerfer G et al. : Krebs in Deutschland. 7. Überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. *Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland/Robert-Koch-Institut. Saarbrücken 2010.*
3. Muscat J, Stellman S, Hoffmann D et al.: Smoking and pancreatic cancer in men and women. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 1997; 6: 15–9
4. Thiébaud AC, Jiao L, Silverman DT, et al. (2009). "Dietary fatty acids and pancreatic cancer in the NIH-AARP diet and health study." *J Natl Cancer Inst* 101(14): 1001-11.
5. Michand de Gonzalez A, Sweetland S, Spencer E: A meta-analysis of obesity and risk of pancreatic cancer. *JAMA* 2001; 286: 921–9.
6. Everhart, J., Wright, D.: (1995). "Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer: a meta-analysis." *JAMA* 273: 1605-1609.
7. Bartsch, D., Rothmund, M.: Das familiäre exokrine Pankreaskarzinom. *Dtsch.Med. Wschr.* 1997; 122: 378-382
8. Whitcomb D: Hereditary chronic pancreatitis. The Pancreas 2e, Eds. Beger HG, et al. *Oxford: Blackwell Publisher, 2008 (in press)*
9. Beger HG, Schlosser W, Friess HM et al. Duodenum-preserving head resection in chronic pancreatitis changes the natural course of the disease: a single-center 26-year experience. *Ann Surg* 1999; 230: 512–9.
10. Tanaka M, Chari S, Adsay V, Fernandez-del Castillo C et al.: International consensus guidelines for management of intraductal papillary mucinous neoplasms and mucinous cystic neoplasms of the pancreas. *Pancreatol* 2006; 6: 17–32.
11. Warshaw, A.L., Fernandez-del Castillo, C.: Pancreatic carcinoma. *N. Engl. J.Med.* 1992; 326: 455-465
12. Jones S, Zhang X, Parsons DW, et al. : Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 2008;321: 1801–6.
13. Hermanek P: Staging of exocrine pancreatic carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 1991; 17: 167–72
14. Takahashi T, Ishikara H, Kato H et al.: Intra-pancreatic, extratumoral perineural invasion. *Acta Pathol Jpn* 1992; 42: 99–103.
15. Beger, Hans G.; Rau, B. Bauchspeicheldrüsenkrebs – Heilungschancen minimal *Dtsch Arztebl* 2008; 105(14): 255-62 DOI: 10.3238/arztebl.2008.0255
16. Wittekind Ch, Meyer HJ, Baetz E (eds.): TNM-Klassifikation maligner Tumoren (International Union against Cancer-UICC) *Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag* 2009; 86–8.
17. Inoue S, Nakao A, Kasai Y et al.: Detection of hepatic micrometastasis in pancreatic adenocarcinoma patients by two-stage polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism analysis. *Jpn. J Cancer Res* 1995; 86: 626–30.
18. Wolfrum F, Vogel I, Fändrich F, Kalthoff H: Detection and clinical implications of minimal residual disease in gastro-intestinal cancer. *LAS* 2005; 390: 430–41.
19. Brand, R.E., Tempero, M.A.: Pancreatic cancer. *Current Opinion in Oncology* 1998; 10: 362-366
20. Wintersperger BJ, Nikolaou K, Becker CR: Multidetector-row-CT-angiography of the aorta and visceral arteries. *Semin Ultrasound CT MR* 2004; 25: 25–40.

21. Richard KR, Semelka RC, Hyslop WB et al.: Suspected pancreatic cancer: evaluation by dynamic gadolinium enhanced 3-D-gradientecho MRI. *AJR Am J Roentgenol* 2005; 185: 700–3.
22. Chicoskie C, Tello R: Gadolinium-enhanced MDCT-angiography of the abdomen: feasibility and limitations. *Am J Roentgenol* 2005; 184: 1821–8.
23. Schembre D: The role of EUS for diagnosis and differential diagnosis of neoplastic lesions. In: Beger HG et al. eds.: *The Pancreas*. Oxford: Blackwell Publisher 2008 (in press).
24. Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellendorf K et al.: Adjuvant chemotherapy with Gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer. *JAMA* 2007; 297: 267–77
25. Beger HG, Rau B, Gansauge F, Poch B, Link KH: Treatment of pancreatic cancer: challenge of facts. *World J Surg* 2003; 27: 1075–84
26. Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H et al.: A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 1200–10
27. Gudjonsson B: Survival statistics gone awry. pancreatic cancer, a case in point. *J Clin Gastroenterol* 2002; Aug;35(2):180-4.
28. Neuhaus P, et al.: CONKO-001: Final results of the randomized, prospective, multicenter phase III trial of adjuvant chemotherapy with gemcitabine versus observation in patients with resected pancreatic cancer (PC). *J Clin Oncol* 2008;26(suppl): abstr LBA4504.
29. Picozzi J, Abrams R, Traverso L et al.: Report on a multicenter, phase II trial for adjuvant therapy of resected pancreatic cancer using cisplatin, 5-FU, and alpha-interferon. ASCO: 2008; Chicago: *J Clin Oncol* 2008, 26:.
30. Burris HA, Moore MJ, Andersen J et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: A randomized trial. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2403–2413.
31. Richards DA, Kindler HL, Oettle H et al.: A randomized phase III study comparing gemcitabine + pemetrexed versus gemcitabine in patients with locally advanced and metastatic pancreas. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2004;
32. Moore MJ, Hamm J, Dancey J et al.: Comparison of gemcitabine versus the matrix metalloproteinase inhibitor BAY 12-9566 in patients with advanced or metastatic adenocarcinoma of the pancreas: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3296–3302
33. Heinemann V, Boeck S, Hinke A, et al. Meta-analysis of randomized trials: evaluation of benefit from gemcitabine-based combination chemotherapy applied in advanced pancreatic cancer. *BMC Cancer* 2008; 8: 82.
34. Moore MJ, Goldstein D, Hamm 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; 25: 1960–6.
35. Hertel LW, Kroin JS, Misner JW, Tustin JM. Synthesis of 2-deoxy-2,9-difluoro-D-ribose and 2-deoxy-2,9-difluoro-D-ribofuranosyl nucleosides. *J Org Chem* 1988; 53: 2406–2409.
36. Albain KS, Nag S, Calderillo-Ruiz G et al. Global phase III study of gemcitabine plus paclitaxel (GT) vs. paclitaxel (T) as frontline therapy for metastatic breast cancer (MBC): First report of overall survival. *Proc. ASCO* 22, No 14S (July 15 Supplement), 2004: 510.

37. von der Maase H, Hansen SW, Roberts JT et al. Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3068–3077.
38. Sandler AB, Nemunaitis J, Denham C et al. Phase III trial of gemcitabine plus cisplatin vs. cisplatin alone in patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 122–130.
39. Garcia AA, O'Meara A, Bahador A et al. Phase II study of gemcitabine and weekly paclitaxel in recurrent platinum resistant ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2004; 93: 493–8.
40. Corazzelli G, Russo F, Capobianco G et al. Gemcitabine, ifosfamide, oxaliplatin and rituximab (R-GIFOX), a new effective cytoreductive/mobilizing salvage regimen for relapsed and refractory aggressive non-Hodgkin's lymphoma: results of a pilot study. *Ann Oncol*. 2006 May;17 Suppl 4:iv18-24.
41. Speenier PM, Van den Weyngaert D, Van Laer C et al. Phase II feasibility study of concurrent radiotherapy and gemcitabine in chemo-naïve patients with squamous cell carcinoma of the head and neck: long-term follow up data. *Ann Oncol*. 2007 Nov;18(11):1856-60. Epub 2007 Sep 6.
42. Heinemann V, Hertel LW, Grindey GB et al. Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 29,29-difluorodeoxycytidine and 1-beta-Darabinofuranosylcytosine. *Cancer Res* 1988; 48: 4024–4031.
43. Mackey JR, Mani RS, Selner M et al. Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Res* 1998; 58: 4349–4357.
44. Wang L, Munch-Petersen B, Herrstrom Sjoberg A et al. Human thymidine kinase 2: molecular cloning and characterisation of the enzyme activity with antiviral and cytostatic nucleoside substrates. *FEBS Lett* 1999; 443: 170–174.
45. Hertel LW, Boder GB, Kroin JS et al. Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine (29,29-difluoro-29-deoxycytidine). *Cancer Res* 1990; 50:4417–4422.
46. Huang P, Chubb S, Hertel LW et al. Action of 29,29-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res* 1991; 51: 6110–6117.
47. Gandhi V, Plunkett W. Modulatory activity of 29,29-difluorodeoxycytidine on the phosphorylation and cytotoxicity of arabinosyl nucleosides. *Cancer Res* 1990; 50: 3675–3680.
48. Ross DD, Cuddy DP. Molecular effects of 29,29-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) on DNA replication in intact HL-60 cells. *Biochem Pharmacol* 1994; 48: 1619–1630.
49. Gandhi V, Legha J, Chen F et al. Excision of 29,29-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) monophosphate residues from DNA. *Cancer Res* 1996; 56: 4453–4459.
50. Huang P, Plunkett W. Induction of apoptosis by gemcitabine. *Semin Oncol* 1995; 22 (4 Suppl 11): 19–25.
51. Ruiz van Haperen VW, Veerman G, Vermorken JB, Peters 29,29-Difluorodeoxycytidine (gemcitabine) incorporation into RNA and DNA of tumour cell lines. *Biochem Pharmacol*. 1993; 46: 762–766.
53. Heinemann V, Xu YZ, Chubb S et al. Inhibition of ribonucleotide reduction in CCRF-CEM cells by 29,29-difluorodeoxycytidine. *Mol Pharmacol* 1990; 38:567–572.
54. Pourquier P, Gioffre C, Kohlhagen G et al. Gemcitabine (29,29-difluoro-29 deoxycytidine), an antimetabolite that poisons topoisomerase I. *Clin Cancer Res*2002; 8: 2499–2504.

-
55. Ferreira CG, Span SW, Peters GJ et al. Chemotherapy triggers apoptosis in a caspase-8-dependent and mitochondria-controlled manner in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460. *Cancer Res* 2000; 60: 7133–7141.
 56. Chandler NM, Canete JJ, Callery MP. Caspase-3 drives apoptosis in pancreatic cancer cells after treatment with gemcitabine. *J Gastrointest Surg* 2004; 8: 1072–1078.
 57. Kaye SB Gemcitabine: Current status of Phase I and II Trials. *Journal of Clinical Oncology* 12: 1527-1531 (1994)
 58. Arktorius, Förstermann, Starke, Hoffmann: Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie Elsevier, München; Auflage: 10. Auflage. (9. März 2009) ISBN-10: 3437425226
 59. Green MR Gemcitabine safety overview. *Semin Oncol* 23, 5 Suppl 10: 32-35 (1996)
 60. Data sheet “Gemzar” Eli Lilly Company, Indianapolis, IN
 61. L. Cattel, M. Airoidi², L. Delprino¹, R. Passera et al. Pharmacokinetic evaluation of gemcitabine and 29,29-difluorodeoxycytidine-59-triphosphate after prolonged infusion in patients affected by different solid tumors *Ann Oncol.* 2006 May;17 Suppl 5:v142-7.
 62. Abbruzzese JL, Grunewald R, Weeks EA et al. A phase I clinical, plasma, and cellular pharmacology study of gemcitabine. *J Clin Oncol.* 1991 Mar;9(3):491-8.
 63. Plunkett W, Huang P and Gandhi V Gemcitabine: Preclinical Pharmacology and Mechanisms of Action. *Seminars in Oncology* 23, 5 Suppl 10: 3-15 (1996)
 64. Delemarre F. G., Kors N., van Rooijen N. (1990) "The in situ immune response in popliteal lymph nodes of mice after macrophage depletion. Differential effects of macrophages on thymus-dependent and thymus-independent immune responses." *Immunobiology* 180: pp. 395-404
 65. Jung S., Unutmaz D., Wong P., Sano G. et al. (2002): "In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens." *Immunity* 17: pp. 211-220
 66. Shortman, K. & Liu, Y. J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Rev. Immunol.* 2, 151–161 (2002)
 67. Colonna M, Pulendran B, Iwasaki A. Dendritic cells at the host-pathogen interface. *Nat Immunol.* 2006 Feb;7(2):117-20.
 68. Liu, Y. J. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 275–306 (2005).
 69. O’Keeffe M, Hochrein H, Vremec D, et al. Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8+ dendritic cells only after microbial stimulus. *J. Exp. Med.* 196, 1307–1319 (2002).
 70. Fogg DK, Sibon C, Miled C A et al. Clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 311, 83–87 (2006).
 71. Trombetta E. S. and Mellman I. (2005): "Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo." *Annu Rev Immunol* 23: pp. 975-1028
 72. Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J. Exp. Med.* 194, 769–780 (2001).
 73. Probst, H. C., McCoy, K., Okazaki, T. et al. Resting dendritic cells induce peripheral CD81 T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nature Immunol.* 6, 280–286 (2005).
 74. Rossi, M., and J.W. Young. 2005. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol.* 175:1373-81.
 75. Re F, Strominger JL. Heterogeneity of TLR-induced responses in dendritic cells: from innate to adaptive immunity. *Immunobiology* 209 (2004) 191–198

-
76. Delamarre L., Holcombe H. and Mellman I. (2003): "Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation." *J Exp Med* 198: pp. 111-122
 77. Inaba K., Turley S., Iyoda T. et al. (2000): "The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli". *J Exp Med* 191: pp. 927-936
 78. Gil-Torregrosa B. C., Lennon-Duménil A. M., Kessler B. et al. (2004): "Control of cross-presentation during dendritic cell maturation." *Eur J Immunol* 34: pp. 398-407
 79. Groothuis, T.A., and J. Neefjes. 2005. The many roads to cross-presentation. *J Exp Med.* 202:1313-8.
 80. Janeway, C. 2005. Immunobiology : the immune system in health and disease. Garland Science, New York
 81. West MA, Wallin RP, Matthews SP, Svensson HG. et al. Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science.* 2004 Aug 20;305(5687):1153-7.
 82. Bousso, P. & Robey, E. Dynamics of CD81 T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nature Immunol.* 4, 579–585 (2003).
 83. Reis e Sousa C. (2006): Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 6: pp. 476-483
 84. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells *Annu Rev Immunol.* 2003;21:685-711. Epub 2001 Dec 19
 85. Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol.* 2005 Apr;5(4):296-306
 86. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol.* 1995 May 15;154(10):5071-
 87. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003 Feb;3(2):133-46
 88. van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol.* 2000 Jan;67(1):2-17
 89. Steinbrink K, Wolf M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 1997;47:72–80.
 90. Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J, Enk AH. CD4+ and CD8+ anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* 2002;99:2468
 91. Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HF, Stoorvogel W, Geuze HJ. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci* 2000; 113:3365–74
 92. Hao S, Bai O, Li F, Yuan J, Laferte S, Xiang J. Mature dendritic cells pulsed with exosomes stimulate efficient cytotoxic T-lymphocyte responses and antitumour immunity. *Immunology.* 2007 Jan;120(1):90-102. Epub 2006 Oct 31.
 93. Mukherji, B., N.G. Chakraborty, S. Yamasaki, T. et al. (1995). Induction of antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:8078-82.
 94. Timmerman. J.M. , Czerwinski D.K., Davis T.A. et al., Idiotype -pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients, *Blood* 99 (2002), pp. 1517–1526
 95. Lesterhuis WJ, Aarntzen EH, De Vries IJ et al. Dendritic cell vaccines in melanoma: from promise to proof? *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008 May;66(2):118-34. Epub 2008 Feb 8.

-
96. Thomas-Kaskel AK, Waller CF, Schultze-Seemann W, Veelken H. Immunotherapy with dendritic cells for prostate cancer. *Int J Cancer*. 2007 Aug 1;121(3):467-73.
 97. Schendel DJ. Dendritic cell vaccine strategies for renal cell carcinoma. *Expert Opin Biol Ther*. 2007 Feb;7(2):221-32.
 98. Luptrawan A, Liu G, Yu JS. Dendritic cell immunotherapy for malignant gliomas. *Rev Recent Clin Trials*. 2008 Jan;3(1):10-21.
 99. Lepisto AJ, Moser AJ, Zeh H, et al. A phase I/II study of a MUC1 peptide pulsed autologous dendritic cell vaccine as adjuvant therapy in patients with resected pancreatic and biliary tumors. *Cancer Ther* 2008;6:955-64.
 100. Hirooka Y, Itoh A, Kawashima H. et al. A combination therapy of gemcitabine with immunotherapy for patients with inoperable locally advanced pancreatic cancer. *Pancreas*. 2009 Apr;38(3):e69-74.
 101. Bauer C, Dauer M, Saraji SF et al. Dendritic cell-based vaccination of patients with advanced pancreatic carcinoma: results of a phase-II pilot study (submitted for publication)
 102. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*. 2007 Sep 27;449(7161):419-26.
 103. Boullart AC, Aarntzen EH, Verdijk P et al. Maturation of monocyte-derived dendritic cells with Toll-like receptor 3 and 7/8 ligands combined with prostaglandin E2 results in high interleukin-12 production and cell migration. *Cancer Immunol Immunother*. 2008 Nov;57(11):1589-97. Epub 2008 Mar 6.
 104. Bauer C, Bauernfeind F, Sterzik A et al. Dendritic cell-based vaccination combined with gemcitabine increases survival in a murine pancreatic carcinoma model. *Gut*. 2007 Sep;56(9):1275-82. Epub 2007 Mar 29.
 105. Nowak AK, Robinson BW, Lake RA. Gemcitabine exerts a selective effect on the humoral immune response: implications for combination chemo-immunotherapy. *Cancer Res*. 2002 Apr 15;62(8):2353-8
 106. Nowak AK, Robinson BW, Lake RA. Synergy between chemotherapy and immunotherapy in the treatment of established murine solid tumors. *Cancer Res*. 2003 Aug 1;63(15):4490-6
 107. Suzuki E, Kapoor V, Jassar AS, Kaiser LR, Albelda SM. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1⁺/CD11b⁺ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin Cancer Res*. 2005 Sep 15;11(18):6713-21
 108. Dauer M, Herten J, Bauer C, Renner F et al. Chemosensitization of pancreatic carcinoma cells to enhance T cell-mediated cytotoxicity induced by tumor lysate-pulsed dendritic cells. *J Immunother*. 2005 Jul-Aug;28(4):332-42.
 109. Morikane K, Tempero RM, Sivinski CL et al. Organ-specific pancreatic tumor growth properties and tumor immunity. *Cancer Immunol Immunother*. 1999 Jan;47(5):287-96.
 110. Schmidt T, Ziske C, Märten A et al. Intratumoral immunization with tumor RNA-pulsed dendritic cells confers antitumor immunity in a C57BL/6 pancreatic murine tumor model. *Cancer Res*. 2003 Dec 15;63(24):8962-7.
 111. Porgador A, Snyder D, Gilboa E. Induction of antitumor immunity using bone marrow-generated dendritic cells. *J Immunol*. 1996 Apr 15;156(8):2918-26.
 112. Met O, Buus S, Claesson MH. Peptide-loaded dendritic cells prime and activate MHC-class I-restricted T cells more efficiently than protein-loaded cross-presenting DC. *Cell Immunol*. 2003 Apr;222(2):126-33.
 113. Hotta C, Fujimaki H, Yoshinari M, Nakazawa M, Minami M. The delivery of an antigen from the endocytic compartment into the cytosol for cross-presentation is restricted to early immature dendritic cells. *Immunology*. 2006 Jan;117(1):97-107.

-
114. He Y, Zhang J, Mi Z, Robbins P, Falo LD Jr. Immunization with lentiviral vector-transduced dendritic cells induces strong and long-lasting T cell responses and therapeutic immunity. *J Immunol.* 2005 Mar 15;174(6):3808-17.
 115. Hao S, Bai O, Li F, Yuan J, Laferte S, Xiang J. Mature dendritic cells pulsed with exosomes stimulate efficient cytotoxic T-lymphocyte responses and antitumour immunity. *Immunology.* 2007 Jan;120(1):90-102. Epub 2006 Oct 31.
 116. Wurzenberger C, Koelzer VH, Schreiber S et al. Short-term activation induces multifunctional dendritic cells that generate potent antitumor T-cell responses in vivo. *Cancer Immunol Immunother.* 2009 Jun;58(6):901-13. Epub 2008 Oct 25.
 117. Okada N, Tsujino M, Hagiwara Y et al. Administration route-dependent vaccine efficiency of murine dendritic cells pulsed with antigens. *Br J Cancer.* 2001 Jun 1;84(11):1564-70.
 118. Eggert AA, Schreurs MW, Boerman OC, et al. Biodistribution and vaccine efficiency of murine dendritic cells are dependent on the route of administration. *Cancer Res.* 1999 Jul 15;59(14):3340-5.
 119. Mullins D.W., Sheasley S.L., Ream R.M. et al. Route of Immunization with Peptide-pulsed Dendritic Cells Controls the Distribution of Memory and Effector T Cells in Lymphoid Tissues and Determines the Pattern of Regional Tumor Control *J. Exp. Med.*, October 6, 2003; 198(7): 1023 - 1034.
 120. Huck SP, Tang SC, Andrew KA, Yang J, Harper JL, Ronchese F. Activation and route of administration both determine the ability of bone marrow-derived dendritic cells to accumulate in secondary lymphoid organs and prime CD8+ T cells against tumors. *Cancer Immunol Immunother.* 2008 Jan;57(1):63-71. Epub 2007 Jul 3.
 121. Lanzavecchia, A., and F. Sallusto. 2002. Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 982–987.
 122. Janssen EM, Droin NM, Lemmens EE et al. CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* 2005, 434:88-93.
 123. Prlic M, Williams MA, Bevan MJ. Requirements for CD8 T-cell priming, memory generation and maintenance. *Curr Opin Immunol.* 2007 Jun;19(3):315-9. Epub 2007 Apr 12.
 124. Prlic M, Hernandez-Hoyos G, Bevan MJ. Duration of the initial TCR stimulus controls the magnitude but not functionality of the CD8+ T cell response. *J Exp Med.* 2006 Sep 4;203(9):2135-43. Epub 2006 Aug 14.
 125. Badovinac VP, Porter BB, Harty JT. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol.* 2002 Jul;3(7):619-26. Epub 2002 Jun 3
 126. Martin-Fontecha A, Sebastiani S, Höpken UE et al. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *Exp Med.* 2003 Aug 18;198(4):615-21.
 127. Hermans IF, Ritchie DS, Yang J, Roberts JM, Ronchese F CD8+ T cell-dependent elimination of dendritic cells in vivo limits the induction of antitumor immunity. *J Immunol.* 2000 Mar 15;164(6):3095-101.
 128. Schweichel D, Steitz J, Tormo D, Gaffal E et al. Evaluation of DNA vaccination with recombinant adenoviruses using bioluminescence imaging of antigen expression: impact of application routes and delivery with dendritic cells. *J Gene Med.* 2006 Oct;8(10):1243-50
 129. Creusot RJ, Yaghoubi SS, Chang P et al. Lymphoid-tissue-specific homing of bone-marrow-derived dendritic cells. *Blood.* 2009 Jun 25;113(26):6638-47. Epub 2009 Apr 10.

130. Sheasley-O'Neill SL, Brinkman CC, Ferguson AR et al. Dendritic cell immunization route determines integrin expression and lymphoid and nonlymphoid tissue distribution of CD8 T cells. *J Immunol.* 2007 Feb 1;178(3):1512-22.
131. André F, Chaput N, Scharz NE, Flament C et al. Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. I. Dendritic cell-derived exosomes transfer functional MHC class I/peptide complexes to dendritic cells. *J Immunol.* 2004 Feb 15;172(4):2126-36.
132. Hoffmann T. K., Meidenbauer N., Dworacki G., Kanaya H., Whiteside T. L. Generation of tumor-specific T-lymphocytes by cross-priming with human dendritic cells ingesting apoptotic tumor cells. *Cancer Res.*, 60: 3542-3549, 2000
133. Schnurr M, Scholz C, Rothenfusser S et al. Apoptotic pancreatic tumor cells are superior to cell lysates in promoting cross-priming of cytotoxic T cells and activate NK and gammadelta T cells. *Cancer Res.* 2002 Apr 15;62(8):2347-52
134. Jacobs C, Duedell P, Heckelsmiller K et al. An ISCOM vaccine combined with a TLR9 agonist breaks immune evasion mediated by regulatory T cells in an orthotopic model of pancreatic carcinoma. *Int J Cancer.* 2010 Apr 19. [Epub ahead of print]
135. Bellone G, Carbone A, Smirne C et al. Cooperative induction of a tolerogenic dendritic cell phenotype by cytokines secreted by pancreatic carcinoma cells. *J Immunol.* 2006 Sep 1;177(5):3448-60.
136. Rutella S, Danese S, Leone G. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood.* 2006 Sep 1;108(5):1435-40. Epub 2006 May 9
137. Xie Y, Bai O, Yuan J, Chibbar R et al. Tumor apoptotic bodies inhibit CTL responses and antitumor immunity via membrane-bound transforming growth factor-beta1 inducing CD8+ T-cell anergy and CD4+ Tr1 cell responses. *Cancer Res.* 2009 Oct 1;69(19):7756-66. Epub 2009 Sep 29.
138. Yuan L, Kuramitsu Y, Li Y, Kobayashi M, Hosokawa M. Restoration of interleukin-2 production in tumor-bearing rats through reducing tumor-derived transforming growth factor beta by treatment with bleomycin. *Cancer Immunol Immunother* 1995; 41:355-62.
139. Machiels JP, Reilly RT, Emens LA et al. Cyclophosphamide, doxorubicin, and paclitaxel enhance the antitumor immune response of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor-secreting whole-cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice. *Cancer Res* 2001; 61:3689-97.
140. Proietti E, Greco G, Garrone B et al. Importance of cyclophosphamide-induced bystander effect on T cells for a successful tumor eradication in response to adoptive immunotherapy in mice. *J Clin Invest* 1998; 101:429-41.
141. Matsuzaki I, Suzuki H, Kitamura M et al. Cisplatin induces fas expression in esophageal cancer cell lines and enhanced cytotoxicity in combination with LAK cells. *Oncology* 2000; 59:336-43.
142. Mullins DW, Burger CJ, Elgert KD. Paclitaxel enhances macrophage IL-12 production in tumor-bearing hosts through nitric oxide. *J Immunol* 1999; 162:6811-8.
143. Ujhazy P, Zaleskis G, Mihich E, Ehrke MJ, Berleth ES. Doxorubicin induces specific immune functions and cytokine expression in peritoneal cells. *Cancer Immunol Immunother* 2003; 52:463-72.
144. Hoover SK, Barrett SK, Turk TM, Lee TC, Bear HD. Cyclophosphamide and abrogation of tumor-induced suppressor T cell activity. *Cancer Immunol Immunother* 1990; 31:121-7.
145. McHugh RS, Shevach EM. The role of suppressor T cells in regulation of immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:693-702.
146. Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: Immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest* 2004; 114:1379-88.

-
147. Serafini P, De Santo C, Marigo I et al. Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53:64-72
 148. Nowak AK, Lake RA, Marzo A et al. Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells. *J Immunol*. 2003 May15;170(10):4905-13.
 149. Suzuki E, Sun J, Kapoor V, Jassar AS, Albelda SM. Gemcitabine has significant immunomodulatory activity in murine tumor models independent of its cytotoxic effects. *Cancer Biol Ther*. 2007 Jun;6(6):880-5. Epub 2007 Mar 1.
 150. Le UM, Yanasarn N, Löhr CV, Fischer KA, Cui Z. Tumor chemo-immunotherapy using gemcitabine and a synthetic dsRNA. *Cancer Biol Ther*. 2008 Mar;7(3):440-7. Epub 2007 Dec 13.
 151. Hellstrom, K. E., and Hellstrom, I. Lymphocyte-mediated cytotoxicity and blocking serum activity to tumor antigens. *Adv. Immunol.*, 18: 209–277, 1974.
 152. Thomas D. A. and Massagué J. (2005): "TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance.". *Cancer Cell* 8: pp. 369-380
 153. Huehn J, Hamann A. Homing to suppress: address codes for Treg migration. *Trends Immunol*. 2005 Dec;26(12):632-6. Epub 2005 Oct 21
 154. Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol*. 2008 Mar;9(3):239-44.
 155. Chen ML, Pittet MJ, Gorelik L, et al. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:419-424
 156. Morikane K, Tempero R, Sivinski CL et al. Influence of organ site and tumor cell type on MUC1-specific tumor immunity. *Int Immunol*. 2001 Feb;13(2):233-40.
 157. von Andrian U.H., and Mackay C.R. . (2000) T-cell function and migration.Two sides of the same coin. *N. Engl. J. Med*. 343:1020–1034.
 158. Mora J. R., Bono M. R., Manjunath N. et al. (2003): "Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells.". *Nature* 424: pp. 88-93
 159. Hanninen A, Jaakkola I, Jalkanen S (1998) Mucosal addressin is required for the development of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 160:6018–6025
 160. Mora J. R., Cheng G., Picarella D. et al. (2005):"Reciprocal and dynamic control of CD8 T cell homing by dendritic cells from skin and gut-associated lymphoid tissues". *J Exp Med* 201: pp. 303-316
 161. Chang, C.-J., Tai, K.-F., Roffler, S., Hwang, L.-H. (2004). The Immunization Site of Cytokine-Secreting Tumor Cell Vaccines Influences the Trafficking of Tumor-Specific T Lymphocytes and Antitumor Efficacy against Regional Tumors. *J. Immunol*. 173: 6025-6032
 162. Nummer D, Suri-Payer E, Schmitz-Winnenthal H et al. Role of tumor endothelium in CD4+ CD25+ regulatory T cell infiltration of human pancreatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2007 Aug 1;99(15):1188-99. Epub 2007 Jul 24
 163. Miyazawa M, Ohsawa R, Tsunoda T et al. Phase I clinical trial using peptide vaccine for human vascular endothelial growth factor receptor 2 in combination with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer Sci*. 2010 Feb;101(2):433-9. Epub 2009 Oct 27
 164. Toubaji A, Achta M, Provenzano M et al. Pilot study of mutant ras peptide-based vaccine as an adjuvant treatment in pancreatic and colorectal cancers.*Cancer Immunol Immunother*. 2008 Sep;57(9):1413-20. Epub 2008 Feb 23.
 165. Laheru D, Lutz E, Burke J et al. Allogeneic granulocyte macrophage colony-stimulating actor-secreting tumor immunotherapy alone or in sequence with cyclophosphamide

-
- for metastatic pancreatic cancer: a pilot study of safety, feasibility, and immune activation. *Clin Cancer Res.* 2008 Mar 1;14(5):1455-63.
166. Kindler HL, Friberg G, et al. Phase II trial of bevacizumab plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol.* 2005 Nov 1;23(31):8033-40
167. Krempien R, Muentner MW, Huber PE et al. Randomized phase II--study evaluating EGFR targeting therapy with cetuximab in combination with radiotherapy and chemotherapy for patients with locally advanced pancreatic cancer--PARC: study protocol [ISRCTN56652283]. *BMC Cancer.* 2005 Oct 11;5:131.
168. Hirooka Y, Itoh A, Kawashima H, Hara K et al. A combination therapy of gemcitabine with immunotherapy for patients with inoperable locally advanced pancreatic cancer. *Pancreas.* 2009 Apr;38(3):e69-74.
169. Nakamura M, Wada J, Suzuki H, Tanaka M, Katano M, Morisaki T. Long-term outcome of immunotherapy for patients with refractory pancreatic cancer. *Anticancer Res.* 2009 Mar;29(3):831-6.
170. Picozzi VJ, Kozarek RA, Traverso LW: Interferon-based adjuvant chemoradiation therapy after pancreaticoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma. *Am J Surg* 2003, 185(5):476-480.
171. Linehan DC, Tan MC, Strasberg SM et al.: Adjuvant interferon-based chemoradiation followed by gemcitabine for resected pancreatic adenocarcinoma: a single-institution phase II study. *Ann Surg* 2008, 248(2):145-15

7. Verzeichnis der Akronyme und verwendeten Abkürzungen

APCs	Antigenpräsentierende Zellen
BMDCs	Bone Marrow DCs: DCs, die aus dem Knochenmark gewonnen wurden
C57BL/6	C57 Black 6, eine häufig verwendete Mauslinie
CCR4/5	Chemocine Receptor 4/5
CD8/4/11b/11c	Cluster of Differentiation 8/4 T-Zellen; 11b/11c auf DCs, Granulozyten
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidyl-ester, eine Zellfärbereagenz
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT	Enzyme Linked Immuno Spot Technique: T-Zellnachweisverfahren
5-FU	5-Fluoruracil
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FoXp3	Forkheadbox P3; regulatorischer T-Zellmarker
HLA	human leukocyte antigen
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
ICAM	Inter-Cellular Adhesion Molecule
IgG	Immunglobulin der Subklasse G
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN- γ	Interferon gamma
IL-10/12	Interleukin 10/12
IP-10	IFN- γ inducible protein-10
L-Selektin	lymphocyte-Selektin: Zelladhäsionsmolekül
LPS	Lipopolysaccharid A
MadCam	mucosal addressin cell adhesion molecule-1
MHCI/II	Major Histocompatibility Complex I/II
MSDC	Myeloid Suppressor DC
NK	Natürliche Killerzelle
OD	Optische Dichte
OT-1	Transgener Mausstamm mit SIINFEKL spez. CD8-T-Zellen
OVA	Ovalbumin
p15E	virales Protein und Antigen, das in Panc02-Zellen synthetisiert wird
P-Selektin	platelet selectin: Zelladhäsionsmolekül
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd
s.c.	subkutan
SIINFEKL	immundominantes MHCI-Epitop des Ovalbumin-Proteins
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TH1	CD4+ T-Helferzellen Typ 1: vorwiegend IFN- γ Produktion
TH2	CD4+ T-Helferzellen Typ 2 mit IL-4/IL-5 Produktion
TLR	Toll-Like-Receptor
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha
Tregs	regulatorische CD4+ FoXp3+ T-Zellen
TRP-2	Trypsin-related-Peptid 2
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die an der Entstehung dieser Doktorarbeit mitgewirkt haben. Allen voran dem Team der Arbeitsgruppe für gastroenterologische Immuntherapie. Herrn Prof. Dr. med. Andreas Eigler möchte ich dabei ganz herzlich für die Überlassung des Promotionsthemas sowie für seine Unterstützung in allen Belangen danken. Herrn Dr. med. Marc Dauer gilt mein Dank für seine Anregungen bei meinen Projekten. Ein großes Lob zollen möchte an dieser Stelle ebenso Herrn Dr. med. Christian Bauer für seine exzellente Betreuung sowie seine Hilfe bei der Versuchsdurchführung bzw. Korrektur dieses Manuskripts. Von unschätzbarem Wert war auch die Hilfe von Frau Rosemarie Kiefl, die stets eine Quelle wertvoller praktischer Ratschläge war und die mich bei der Durchführung der *in vitro* Zytotox-Reihen tatkräftig unterstützt hat.

Ferner gilt ein großes Dankeschön Herrn Prof. Dr. med. Stefan Endres als auch der Arbeitsgruppe um Herrn PD Dr. med. Max Schnurr für die herzliche Aufnahme in ihr Labor sowie für die Möglichkeit der dortigen Versuchsdurchführungen – vor und nach dem Umzug. Es war mir ein großes Privileg, meine Doktorarbeit in einem Labor durchführen, dessen Klima von so hohem wissenschaftlichem Anspruch und hoher Kollegialität geprägt ist.

Bei Herrn Peter Düwell, Herrn Collin Jacobs sowie Herrn Dr. biol. Klaus Heckelsmiller möchte ich mich herzlich bedanken für ihre Unterstützung und all die unterhaltsamen Stunden im bzw. jenseits des Labors.

Abschließend möchte ich noch meiner Familie danken, insbesondere meinem Vater, der mich auf meinen privaten als auch beruflichen Werdegang stets unterstützt hat und ohne dem das Alles nicht möglich gewesen wäre.

Publikationen:**1) Originalarbeiten**

1. Bauer C, Bauernfeind F, **Sterzik A**, Orban M, Schnurr M, Lehr HA, Endres S, Eigler A, Dauer M. Dendritic cell-based vaccination combined with gemcitabine increases survival in a murine pancreatic carcinoma model. *Gut*. 2007 Sep;56(9):1275-82. Epub 2007 Mar 29.
2. Huda W, **Sterzik A**, Tipnis S. X-ray beam filtration, dosimetry phantom size and CT patient dose conversion factors *Phys Med Biol*. 2010 Jan 21;55(2):551-61. Epub 2009 Dec 21.
3. Huda W, **Sterzik A**, Tipnis S, Schoepf UJ. Organ doses to adult patients for chest CT *Med Phys*. 2010 Feb;37(2):842-7.
4. Huda W, Tipnis S, **Sterzik A**, Schoepf UJ: Computing effective dose in cardiac CT *Phys Med Biol*. 2010 Jul 7;55(13):3675-84. Epub 2010 Jun 9
5. Bauer C, Dauer M, Saraji S, Schnurr M, Bauernfeind F, **Sterzik A**, Junkmann J, Jakl V, Kiefl R, Oduncu F, Emmerich B, Mussack Th, Bruns C, Ruettinger D, Conrad C, Jauch K, Endres S, Eigler A. Dendritic cell-based vaccination of patients with advanced pancreatic carcinoma: results of a phase-II pilot study. *Cancer Immunol Immunother*. 2011 Aug;60(8):1097-107. Epub 2011 May 6

2) Vorträge:

Sterzik A, Abro J, Schoepf UJ, Huda W: Effective patient radiation doses and skin organ doses at coronary CT angiography and invasive coronary angiography European Congress of Radiology (ECR) 2009 in Wien

3) Poster:

1. **Sterzik A**, Bauer C, Bauernfeind F, Schnurr M, Endres S, Eigler A, Dauer M. Immunologische Charakterisierung des synergistischen Effekts von Chemotherapie und DC-Vakzinetherapie in einem OVA-Transfektionsmodell des murinen Pankreaskarzinoms. 62. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Bochum, 12. – 15. September 2007. *Z Gastroenterol* 2007; 45:748. P017
2. **Sterzik A**, Bauer C, Bauernfeind F, Schnurr M, Endres S, Eigler A, Dauer M: Kombination einer dendritischen Zellvakzine mit Gemcitabin im murinen Pankreaskarzinom: Charakterisierung der Immunantwort im OVA-Transfektionsmodell. 35. Kongress der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern e.V., Nürnberg, Oktober 2007. *Z Gastroenterol* 2007; 45:1092.
3. Dauer M, **Sterzik A**, M, Bauer C, Schnurr M, Endres S, Eigler A.: Kombination einer dendritischen Zellvakzine mit Gemcitabin im murinen Pankreaskarzinom: Charakterisierung der Immunantwort und Wirksamkeit, DGIM 2008.
4. Dauer M., **Sterzik A.**, Bauer C., Schnurr M., Endres S., Eigler A.: Epitope spreading nach dendritischer Zellvakzinierung ist mit Langzeitüberleben im murinen Pankreaskarzinommodell assoziiert. DGVS 2008.