

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Durchbrechung Tumor-induzierter Immuntoleranz durch Vakzinierung mit
immunstimulatorischen Komplexen (ISCOMs) kombiniert mit CpG-Oligonukleotiden
beim experimentellen Pankreaskarzinom

Dissertation

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

vorgelegt von

Collin Jacobs

aus Göttingen

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Max Schnurr

2. Berichterstatterin: Priv. Doz. Dr. Carole Bourquin

Mitberichtersteller: Priv. Doz. Dr. Claus Schäfer
Prof. Dr. Christiane Bruns

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. hum. biol. Klaus Heckelsmiller

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

Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2011

Meiner lieben Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Immuntherapie des Pankreaskarzinoms	1
1.2 Grundzüge des Immunsystems	2
1.3 Aktivierung des Immunsystems durch Antigen-präsentierende Zellen.....	4
1.4 Aktivierung Antigen-präsentierender Zellen durch <i>Toll-like</i> -Rezeptoren	6
1.5 Immunevasive Strategien von Tumoren	7
1.6 Durchbrechung der Tumor-induzierten Immuntoleranz	8
1.7 ISCOM-basierte Tumorstoffe	10
1.8 CpG-Oligonukleotide	11
1.9 Fragestellung und Hintergrund	13
2. Material und Methoden	15
2.1 Zellkultur	15
2.1.1 Zellkulturmedien	15
2.1.2 Zelllinien	15
2.1.3 Zellmanipulation	15
2.1.4 Zellzählung	15
2.1.5 Kultur der PancOVA- und Panc02-Zellen	16
2.2 Mäuse	16
2.2.1 Haltungsmethoden	16
2.2.2 Entnahme von Blut, Milz und Lymphknoten	17
2.3 Tumormodelle.....	18
2.3.1 Induktion subkutaner Pankreastumoren	18
2.3.2 Induktion orthotoper Pankreastumoren	18
2.4 Vakzinierungstherapie	19
2.4.1 Vakzinierung mit der OVA/ISCOM-Vakzine	19
2.4.2 Kombinationsvakzine mit dem TLR9-Liganden CpG ODN 1826	20
2.5 Evaluierung der Immunantwort.....	20
2.5.1 Leukozytenisolierung	20
2.5.2 Intrazelluläre IFN- γ - und Pentamer-Färbung	21
2.5.3 Färbung von Oberflächenmolekülen	22
2.5.4 Durchflusszytometrie.....	22
2.5.5 <i>In vivo</i> Proliferationsassay	23
2.5.6 <i>In vivo</i> Zytotoxizitätsassay	24
2.5.7 Immunhistologie	24

2.6 Statistik	25
3. Ergebnisse	26
3.1 Prophylaktische Vakzinierung mit der OVA/ISCOM-Vakzine schützt vor nachfolgender Tumorinduktion	26
3.2 Therapeutische Vakzinierung mit der OVA/ISCOM-Vakzine hat keinen Effekt auf bereits etablierte Pankreastumoren.....	27
3.3 Tumor-induzierte Immunsuppression bei Mäusen mit Pankreaskarzinom.....	28
3.4 Kombinationsbehandlung mit der OVA/ISCOM-Vakzine und dem TLR9-Liganden CpG ODN 1826 führt zu Tumorregression und Langzeitüberleben von Mäusen mit subkutanem Pankreaskarzinom	31
3.5 Kombinationsbehandlung mit der OVA/ISCOM-Vakzine und CpG ODN 1826 führt zu Langzeitüberleben von Mäusen mit orthotopem Pankreaskarzinom.....	33
3.6 Die OVA/ISCOM-Vakzine kombiniert mit CpG führt zur Aktivierung antigenspezifischer CD8 ⁺ T-Zellen und durchbricht die Tumor-induzierte Immunsuppression	34
3.7 Die OVA/ISCOM-Vakzine kombiniert mit CpG führt zu einer Th1-Immunantwort und einer Aktivierung von Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems in den Vakzine-drainierenden Lymphknoten	37
3.8 Induktion einer langanhaltenden Tumorprotektion und Nachweis von <i>epitope spreading</i>	39
4. Diskussion	42
4.1 Überblick über die Ergebnisse.....	42
4.2 Methodendiskussion.....	44
4.2.1 Die syngen Panc02- und PancOVA-Mausmodelle für Pankreastumoren.....	44
4.2.2 Diskussion der Vakzinierungsstrategie	46
4.2.2.1 OVA/ISCOM-Vakzine	46
4.2.2.2 Immunstimulation durch CpG ODN 1826	47
4.3 Eigene Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur.....	48
4.3.1 Effekte der prophylaktischen Vakzinierung	48
4.3.2 Therapeutische Vakzinierung im PancOVA-Modell	50
4.3.3 Analyse der Tumor-induzierten Immunsuppression.....	51

4.3.4 Durchbrechung der Immunsuppression durch die Kombination der OVA/ISCOM-Vakzine mit CpG ODN 1826.....	53
4.3.5 Induktion einer langanhaltenden, T-Zell-vermittelten Gedächtnis- antwort und von <i>epitope spreading</i>	54
4.3.6 Klinische Relevanz.....	56
5. Zusammenfassung.....	58
6. Literaturverzeichnis	61
7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme	67
8. Danksagung	69
9. Veröffentlichungen	70
10. Lebenslauf	72

1. Einleitung

1.1 Immuntherapie des Pankreaskarzinoms

Das Pankreaskarzinom stellt in den westlichen Industrienationen die vierthäufigste zum Tode führende maligne Erkrankung dar. Allein im Jahr 2007 starben in den USA 33.370 Patienten am Pankreaskarzinom. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt niedriger als 5% mit einer mittleren Überlebenszeit von 3-6 Monaten. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung liegt nur bei 10 bis 15% der Patienten ein lokal begrenztes Tumorgeschehen vor, welches eine potentiell kurative chirurgische Therapie erlaubt (Jemal et al., 2008). Trotz großer Fortschritte in den letzten 20 Jahren bezüglich der Identifizierung der molekularen Wege bei der Entstehung des Pankreaskarzinoms und der Entwicklung zielgerichteter Therapien bleibt der klinische Nutzen gering.

Die Chemotherapie mit Gemcitabin stellt derzeit die Standardbehandlung bei inoperablen Patienten dar, führt aber gegenüber der Behandlung mit 5-Fluorouracil nur zu einer geringen Steigerung der Überlebensrate. Auch unter der Behandlung mit Gemcitabin leben nur 15 bis 20 % der Patienten länger als 6 Monate (Burriss und Storniolo, 1997). Daher sind neue Behandlungsstrategien für diese gastrointestinale Tumorerkrankung dringend erforderlich. Das zunehmende Verständnis über die Potenz und Spezifität des Immunsystems bei der Bekämpfung maligner Erkrankungen hat zu einem großen Interesse und stark expandierendem Wissen auf dem Gebiet der Immuntherapie von Tumoren geführt (Armstrong et al., 2001).

Tumorzellen exprimieren tumorspezifische Proteine, die nach Präsentation auf MHC-I Molekülen auf der Zelloberfläche durch körpereigene Abwehrzellen erkannt werden können, was daraufhin zu einer Tumorzelllyse durch zytotoxische T-Zellen führt (Boon et al., 1994; Van den Eynde und Boon, 1997; Brossart et al., 2001). Diese Proteine nennt man tumorassoziierte Antigene, Tumorabstoßungsantigene oder auch Tumorantigene (TAA). Durch die Entdeckung von Tumorantigenen ergeben sich erweiterte Strategien zur Therapie maligner Erkrankungen auf immunologischer Basis (Gilboa, 1999; Espinoza-Delgado, 2002), da hiermit neue Zielmoleküle für Therapien zur Verfügung stehen.

Der Einsatz von dendritischen Zellen bei der zellgestützten Immuntherapie von Malignomen liefert vielversprechende Ansätze. Dendritische Zellen sind sehr effiziente Antigen-präsentierende Zellen und spielen eine zentrale Rolle bei der Initiierung spezifischer Immunantworten durch die Stimulation naiver T-Zellen (Banchereau und Steinman, 1998).

Pankreaskarzinomzellen können durch T-Zellen erkannt werden und es wurde nachgewiesen, dass ein T-Zellinfiltrat im Tumorgewebe bei Patienten mit Pankreaskarzinom einen günstigen prognostischen Faktor darstellt (Fukunaga et al., 2004). Weiterhin konnten im Blut von Patienten mit Pankreaskarzinom funktionell aktive, tumorspezifische T-Zellen nachgewiesen werden (Schmitz-Winnenthal et al., 2005).

Pankreaskarzinomzellen verursachen jedoch eine systemische und lokale Immunsuppression (von Bernstorff et al., 2001). Diese besteht aus der Inhibition der T-Zell-Aktivierung, Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen, Störung der Antigenpräsentation und Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen, einer Untergruppe von CD4⁺ T-Zellen, welche die Immunantwort hemmen (Rabinovich et al., 2007; Sakaguchi, 2008). Ebenso zeigten Patienten mit Pankreaskarzinom eine erhöhte Anzahl an regulatorischen T-Zellen im Blut und im Tumor (Liyanage et al., 2002). Curiel und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass die Anwesenheit von regulatorischen T-Zellen einen negativen Einfluss auf die Prognose von Patienten mit malignen Erkrankungen hat (Curiel et al., 2004). Dies gilt auch für diese Patienten mit Pankreaskarzinom (Hiraoka et al., 2006; Fu et al., 2007).

Ein wesentliches Ziel der Immuntherapie muss daher darin bestehen, diese Tumor-induzierte Immunsuppression aufzuheben. Therapieansätze, die so zur Stimulierung der körpereigenen, gegen den Tumor gerichteten Immunantwort führen, erscheinen vielversprechend und könnten entweder als alleinige Therapie oder in Kombination mit Tumorstoffen klinischen Einsatz finden.

1.2. Grundzüge des Immunsystems

Das Immunsystem ist ein hoch komplexes System, welches die Aufgabe besitzt, den Organismus gegen Pathogene zu schützen. Es wird unterteilt in zwei funktionelle

Untereinheiten, das angeborene und das adaptive Immunsystem.

Die angeborene Immunität stellt einen schnellen, „unspezifischen“ Schutz gegen Krankheitserreger dar. Während das angeborene Immunsystem (z.B. dendritische Zellen, Killerzellen, Makrophagen) beim ersten Kontakt mit einem Pathogen sofort reagieren kann, muss das adaptive Immunsystem (B- und T-Lymphozyten) dies zuerst „lernen“. Bei wiederholtem Antigenkontakt haben Gedächtniszellen die Eigenschaft sich sehr schnell zu teilen und sind somit in der Lage, Erreger schnell zu eliminieren. B-Gedächtniszellen sezernieren in kurzer Zeit verschiedene Isotypen von Antikörpern. CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen werden auch als zentrale Effektorgedächtniszellen bezeichnet. Diese beiden Populationen können wesentlich schneller und leichter aktiviert werden als naive T-Zellen und sind nicht unmittelbar auf co-stimulatorische Signale angewiesen (Schmidt und Mescher, 2002). Somit können Tumorzellen, welche keine co-stimulatorischen Signale, aber tumorspezifische Antigene tragen, Gedächtniszellen aktivieren (Beckhove et al., 2004).

Eine adaptive Immunantwort beginnt mit der Aufnahme und Prozessierung eines Antigens durch Antigen-präsentierende Zellen (APC), z. B. durch dendritische Zellen. Diese präsentieren das aufgenommene Antigen in Form von Peptiden auf dem *major histocompatibility complex* (MHC-Komplex). Bei spezifischer Antigenerkennung binden naive T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen (z. B. Lymphknoten, Milz) mit ihrem T-Zell-Rezeptor an diesen MHC-Antigen-Komplex.

Zur vollständigen Aktivierung der T-Zellen ist zusätzlich eine Interaktion zwischen dem Differenzierungscluster (CD) CD28 auf den T-Zellen und den co-stimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 auf den professionellen APCs erforderlich. Nur bei erfolgter Co-Stimulation kommt es zu einer Proliferation und zur Differenzierung der naiven T-Zellen zu Effektorzellen (T-Helferzellen oder zytotoxische T-Zellen). Fehlt ein Signal, können die T-Zellen anerg werden. Die Effektorzellen verlassen die lymphatischen Organe und wandern in periphere Gewebe aus. Kommt es dort zu einer erneuten Antigenerkennung vernichten zytotoxische T-Zellen (CTL) infizierte oder entartete Zellen mittels Perforin, Granzymen und durch die Freisetzung von IFN- γ .

T-Helferzellen stimulieren die Proliferation und Differenzierung der CD8⁺ Zellen zu CTL und der B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen. Die sezernierten Antikörper bewirken eine antigenspezifische Phagozytose durch Makrophagen und

neutrophile Granulozyten sowie eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Aktivierte T-Helferzellen sezernieren Zytokine, welche wiederum NK-Zellen, dendritische Zellen und Makrophagen aktivieren können. So wird das angeborene Immunsystem durch die Aktivierung des adaptiven Immunsystems ebenfalls stimuliert.

1.3 Aktivierung des Immunsystems durch Antigen-präsentierende Zellen

Dendritische Zellen sind die Antigen-präsentierenden Zellen mit dem stärksten Einfluss auf das Immunsystem. Steinmann und Cohn entdeckten sie in murinen Lymphknoten sowie der Milz und beschrieben sie als lang gestreckte Zellen mit Ausläufern (Steinman und Cohn, 1973). Sie sind die Schaltzentrale für adaptive Immunantworten und einzigartig in der Funktion, naive T-Zellen zu stimulieren (Banchereau und Steinman, 1998). Ihren Ursprung haben sie in pluripotenten Vorläuferzellen aus dem Knochenmark und gelangen über das Blut in fast alle Organe (z. B. Haut, Verdauungstrakt, Leber, Lunge, Herz), wo sie als unreife dendritische Zellen residieren. Dort nehmen sie Antigene durch Pinozytose, Phagozytose und Makropinozytose auf und prozessieren diese zu immunogenen Peptiden, die sie auf MHC-I- und MHC-II-Molekülen präsentieren (Filgueira et al., 1996).

Ihre Fähigkeit zur T-Zellstimulation ist jedoch in diesem Stadium noch gering. Nach Aktivierung durch inflammatorische Stimuli wandern die unreifen dendritischen Zellen aus dem Gewebe aus und migrieren über die afferenten Lymphbahnen zu den regionalen Lymphknoten. Hier treten sie mit T-Zellen in Kontakt und lösen als reife dendritische Zellen eine Immunantwort aus (Steinman, 1991). Durch den Reifungsprozess verlieren sie ihre Fähigkeit, Antigene aufzunehmen, regulieren MHC-Moleküle und co-stimulatorische Moleküle hoch und erwerben die Fähigkeit, T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Eine dendritische Zelle ist in der Lage, mehrere tausend T-Zellen zu stimulieren, wobei sich stabile *cluster* zwischen den dendritischen Zellen und den T-Zellen bilden (Banchereau und Steinman, 1998).

Je nach Art des Pathogens werden unterschiedliche Immunantworten initiiert. Antigene von Viren und im Cytosol lebenden Bakterien werden über MHC-I-Moleküle präsentiert und durch die zelluläre Immunität mittels CTL bekämpft. Dagegen werden extrazelluläre Pathogene durch dendritische Zellen phagozytiert und über MHC-II-

Moleküle präsentiert. Diese Pathogene werden durch die humorale Immunität mit Hilfe der TH2-Zellen und durch die daraus resultierende, gesteigerte Antikörperproduktion eliminiert.

Dendritische Zellen können ganze infizierte Zellen oder Tumorzellen aufnehmen und diese als Antigenquelle verwenden (Carbone und Heath, 2003). Zudem haben sie die Fähigkeit, exogene Antigene, welche über eine Rezeptor-vermittelte Endozytose mittels *clathrin-coated vesicles* oder durch Phagozytose aufgenommen wurden, über MHC-I zu präsentieren (Kreuzpräsentation) (Robson et al., 2010; Rodriguez et al., 1999; Steinman et al., 1999). Somit kann eine gegen den Tumor gerichtete CTL-Antwort nach der Aufnahme von bestimmten Tumorzellbestandteilen durch dendritische Zellen induziert werden (**Abb. 1**).

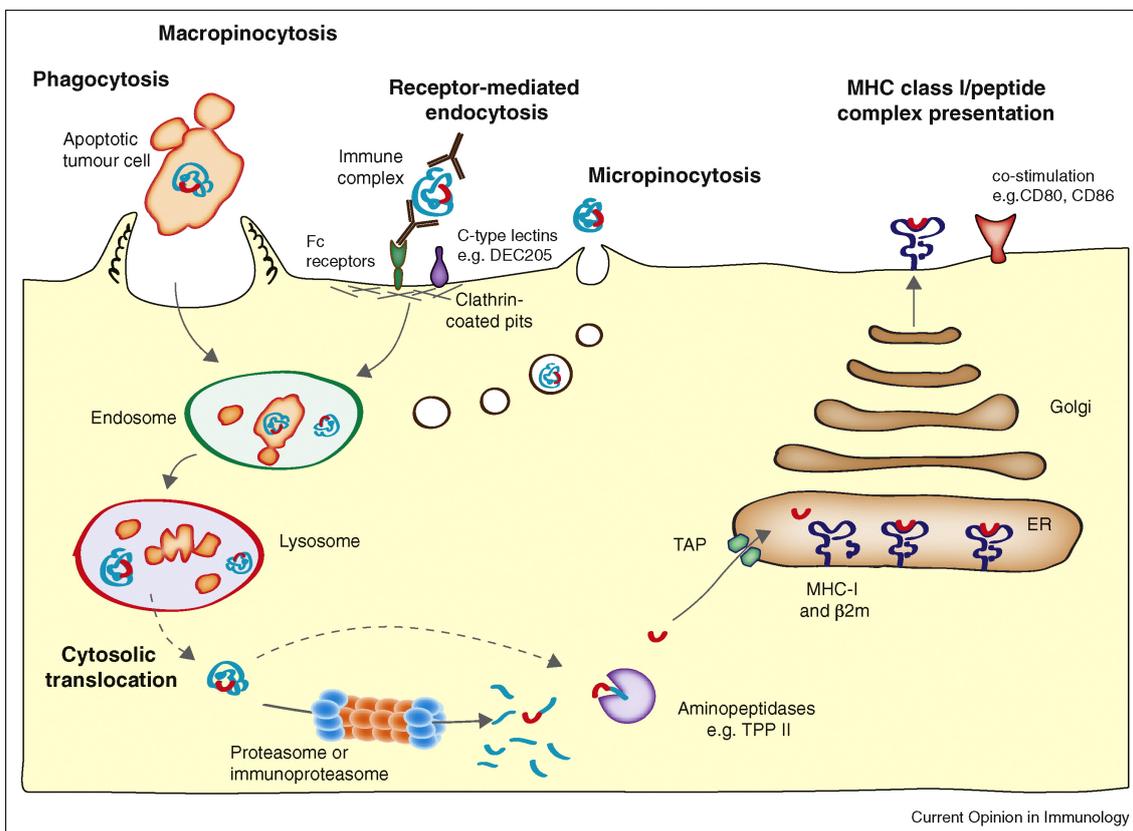


Abb. 1

Aufnahme der Tumorentigene mittels *clathrin-coated vesicles* oder durch Phagozytose und deren Präsentation über MHC-I-Moleküle durch dendritische Zellen. Abkürzungen: b2m, *b-2 microglobulin*; ER, *endoplasmatic reticulum*; MHC, *major histocompatibility complex*; TAP, *transporter associated with Ag-processing*; TPP II, *tripeptidyl peptidase II* (Robson et al., 2010).

1.4 Aktivierung Antigen-präsentierender Zellen durch *Toll-like*-Rezeptoren (TLR)

Die Aktivierung der Antigen-präsentierenden Zellen erfolgt durch Gefahrensignale (Matzinger, 1994). Diese Gefahrensignale (z.B. TNF- α , IL-1 β oder CD40-Ligand) werden von Zellen unter Stressbedingungen oder bei Infektionen und Nekrosen freigesetzt, bzw. hochreguliert. Aktivierende Signale können auch von so genannten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) ausgehen. Diese sind unter anderem Bestandteile von Bakterien oder Viren und werden vom angeborenen Immunsystem als „fremd“ erkannt (Medzhitov, 2001). PAMP aktivieren bestimmte Immunrezeptoren, so genannte *pattern-recognition receptors* (PRR) (Janeway, 1989). Diese PRR lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Eine Gruppe der PRR vermittelt Phagozytose, die andere Gruppe leitet die Produktion proinflammatorischer und regulatorischer Zytokine ein und ist für die Induktion co-stimulatorischer Moleküle verantwortlich. Zu den Mitgliedern der zweiten Gruppe gehören vor allem die sogenannten *Toll-like*-Rezeptoren (TLR).

TLR aktivieren verschiedene Stufen der inflammatorischen Reaktion, die für die Eliminierung des eindringenden Pathogens verantwortlich sind, wodurch die systemische Abwehr koordiniert wird. Sie werden hauptsächlich von Antigen-präsentierenden Zellen, wie Makrophagen und dendritischen Zellen, exprimiert (Zarembek und Godowski, 2002).

Eine Stimulation dieser Rezeptoren aktiviert Antigen-präsentierende Zellen; dadurch wird neben dem angeborenen Immunsystem auch das adaptive Immunsystem eingeschaltet. Jeder TLR vermittelt spezifische Effekte, wie die Induktion inflammatorischer Zytokine, die Hochregulation co-stimulatorischer Moleküle sowie die Typ-I-Interferon-Produktion. Es kann zwischen intra- und extrazellulären Rezeptoren unterschieden werden, welche auf der äußeren Zellmembran oder in den Membranen endosomaler Vesikel lokalisiert sind. Zu den extrazellulären Rezeptoren zählen TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6. Die intrazellulären Rezeptoren bilden TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9. Wird ein TLR aktiviert, beginnt die Signalkaskade mit der TIR-Domäne. Sie enthält Adapterproteine wie MyD88, TIRAP, TRIF und TRAM, die den TLR-vermittelten Signalweg regulieren. MyD88, das bei allen TLR-vermittelten Signalwegen – außer bei TLR3 – eine Rolle spielt, führt zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen.

Es sind elf verschiedene TLR bekannt, jedoch sind nicht zu allen TLR die Liganden identifiziert worden. Die in dieser Arbeit eingesetzte Vakzinekombination beinhaltet

einen Liganden des TLR9, das synthetische CpG-Oligonukleotid 1826. Hierbei handelt es sich um einzelsträngige Oligonukleotide mit einem unmethylierten CpG-Motiv. Die Arbeitsgruppe von Krieg entschlüsselte 1995 das aktivierende Prinzip für die immunstimulatorische Wirkung der Cytosin-Guanin Dinukleotide, welches in dem gehäuften Vorkommen bei Invertebraten verglichen mit Vertebraten und dem Vorliegen des meist unmethylierten Cytosins liegt (Krieg et al., 1995). Diese unmethylierten CpG-Motive von bakterieller DNA werden vom TLR9 erkannt (Hemmi et al., 2000; Zhang et al., 2004). Plasmazytoide dendritische Zellen exprimieren TLR7 und TLR9 (Hornung et al., 2002) und sind Subpopulationen dendritischer Zellen, die sich im peripheren Blut und in lymphatischen Organen finden. Sie produzieren bei viralen Infektionen hohe Mengen an Typ-I-Interferon (IFN- α/β). Sie hemmen damit die virale Replikation und fördern eine adaptive Immunantwort (McKenna et al., 2005).

Weitere Vertreter der Antigen-präsentierenden Zellen sind Makrophagen und Monozyten. Humane Monozyten und Makrophagen sind nicht CpG ODN responsiv. Dies wird auf die Tatsache zurückgeführt, dass sie den CpG Rezeptor TLR9 nicht exprimieren (Bauer et al., 2001). Murine Monozyten und Makrophagen hingegen werden durch CpG ODN aktiviert, was eine effektivere Antigenpräsentation zur Folge hat (Lipford et al., 2000).

Die beschriebenen Effekte von Oligonukleotiden auf dendritische Zellen, Makrophagen und Monozyten bewirken also eine vermehrte Fähigkeit zur Co-Stimulation und eine gesteigerte Zytokinproduktion, wodurch der Boden für eine nachgeschaltete Aktivierung von Effektorzellen bereitet wird.

1.5 Immunevasive Strategien von Tumoren

Maligne Tumoren verfügen über zahlreiche Strategien, um der Immunabwehr zu entkommen, so genannte *tumor escape* Mechanismen. Durch ausbleibende oder unzureichende Antigenpräsentation können die Tumorantigene für das Immunsystem unsichtbar bleiben. Sie können stimulierende Moleküle (z.B. CD28, B7, CD40) hemmen, so dass das relevante zweite Signal zur Aktivierung der T-Zelle fehlt und somit eine Toleranz induziert wird (Fenton und Longo, 1997; Alexandroff et al., 2000). Zusätzlich können Tumorzellen die MHC-I-Moleküle herunterregulieren und dadurch die Präsentation der Tumorantigene verhindern (Costello et al., 1999). Manche

Tumoren blockieren die Produktion des T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2 und verhindern so die Signaltransduktion von IL-2-Rezeptoren auf den T-Zellen (Rayman et al., 2000). Weiterhin bilden Tumorzellen auch immunsuppressive Faktoren wie VEGF, TGF- β , Prostaglandine und IL-10, die die Proliferation und Funktionen der Antigen-präsentierenden Zellen und der T-Zellen blockieren und somit das Immunsystem hemmen (Kim et al., 1995; Gabrilovich et al., 1996; Radoja und Frey, 2000).

Die Tumor-induzierte Immunsuppression ist beim Pankreaskarzinom besonders ausgeprägt. Pankreaskarzinomzellen verursachen eine systemische und lokale Immunsuppression (von Bernstorff et al., 2001). Sie inhibieren die T-Zell-Aktivierung, bewirken die Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen und hemmen die Antigenpräsentation (Rabinovich et al., 2007). Eine weitere Eigenschaft des Pankreaskarzinoms ist die Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen, einer Untergruppe von CD4⁺ T-Zellen, welche T-Zellen effektiv hemmen (Sakaguchi, 2008). In klinischen Studien konnte eine erhöhte Anzahl an regulatorischen T-Zellen bei Patienten mit Pankreaskarzinom im Blut und in der Tumorumgebung nachgewiesen werden (Liyanage et al., 2002). Es wurde gezeigt, dass eine erhöhte Anzahl regulatorischer T-Zellen mit einer schlechten Prognose bei Patienten mit Pankreaskarzinomen und anderen malignen Erkrankungen korreliert (Curiel et al., 2004; Hiraoka et al., 2006; Fu et al., 2007).

1.6 Durchbrechung der Tumor-induzierten Immuntoleranz

Aufgrund der Vielfalt immunsuppressiver Strategien der Tumoren sind Behandlungsansätze gefragt, die diese Mechanismen durchbrechen und eine effiziente, dauerhafte Immunantwort gegen den Tumor induzieren können. Ein Versuch, dies zu schaffen, führt über die Entwicklung von sogenannten Tumorstoffen, die zwei wesentliche Aufgaben erfüllen sollen: 1. Die Induktion einer Tumorantigen-spezifischen CTL-Antwort und 2. eine Immunaktivierung zur Durchbrechung der Tumor-induzierten Immunsuppression.

Die Strategie hierbei ist die Initiierung einer Immunantwort durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen. Tumorstoffe stimulieren T-Zellen und helfen ihnen, die Tumorzellen zu erkennen und zu töten. Voraussetzung hierfür ist die Kreuzpräsentation des Tumorantigens auf MHC-I-Molekülen der dendritischen Zellen.

Dendritische Zellen sind die potentesten Antigen-präsentierenden Zellen mit der einzigartigen Fähigkeit, naive T-Zellen zu aktivieren und damit die Zerstörung der Tumorzellen einzuleiten (Banchereau und Steinman, 1998; Brossart et al., 2001), was sie zu einem wertvollen „natürlichen“ Adjuvans in der Entwicklung von Vakzinierungstherapien maligner Erkrankungen macht (Celluzzi et al., 1996; Brossart et al., 2000). Zudem aktivieren dendritische Zellen nicht nur CD8⁺ T-Zellen, sondern sie können ebenfalls MHC-II-vermittelt CD4⁺ T-Helferzellen aktivieren, so dass sich in der Bekämpfung der Tumorzellen ein weiterer Ansatz ergibt (Brossart und Bevan, 1997; Schuler-Thurner et al., 2002). Außerdem wurde gezeigt, dass die Präsenz von dendritischen Zellen in soliden Tumoren mit einer besseren Prognose und längerem Überleben bei einigen Malignomen assoziiert ist (Becker, 1992), was auf die Bedeutung der dendritischen Zellen in der immunologischen Kontrolle von Tumoren hinweist.

Es wurde gezeigt, dass dendritische Zellen eine CD8⁺ T-Zell-getragene Immunantwort gegen Pankreastumorzellen induzieren können, wenn sie vorher mit Tumorzelllysat oder apoptotischen Tumorzellen inkubiert wurden (Schnurr et al., 2001; Schnurr et al., 2002). Eine weitere Studie zeigte, dass mittels einer Vakzinierung von dendritischen Zellen kombiniert mit einer Gemcitabin-basierten Chemotherapie eine verlängerte Überlebenszeit bei Mäusen mit orthotopem Pankreaskarzinom erreicht werden konnte (Bauer et al., 2007). Andere Arbeitsgruppen injizierten intratumoral dendritische Zellen, die vorher mit Tumor-RNA oder Alpha-galactosylceramid stimuliert wurden und erreichten damit eine Tumormunität beim Pankreaskarzinom im Tiermodell (Schmidt et al., 2003; Nagaraj et al., 2006).

Die Produktion von dendritischen Zellen im Labor ist jedoch zeitintensiv und mit hohen Kosten verbunden, weshalb nach alternativen Strategien gesucht wird. Hierzu zählen Ansätze, bei denen dendritische Zellen *in vivo* mit Tumorantigenen beladen und aktiviert werden. Eine Vakzinierung dieser Art hat sich als vielversprechend erwiesen. Die Arbeitsgruppe von Steinmann et al. hat Ovalbumin mit einem monoklonalen Antikörper gegen den auf dendritischen Zellen vorhandenen DEC-205-Rezeptor gekoppelt und damit stärkere und länger anhaltende CD4⁺- und CD8⁺ T-Zell-vermittelte Immunreaktionen erwirkt als mit konventionellen Methoden. Die erreichten Immunreaktionen erzielten sowohl einen prophylaktischen Tumorschutz gegen nachfolgend induzierte OVA-exprimierende Melanome als auch einen therapeutischen Effekt auf bereits etablierte Melanome im Mausmodell (Bonifaz et al., 2004). Auch die

Formulierung von Tumorantigenen mit monoklonalen Antikörpern als Immunkomplexe führte zu einer deutlich verbesserten Antigenpräsentation auf MHC-I- und MHC-II-Molekülen durch dendritische Zellen (Schnurr et al., 2005).

1.7 ISCOM-basierte Tumorstoffe

Die Entwicklung zellfreier Stoffe bietet diverse Vorteile. Die Generierung von „*off-the-shelf*“-Stoffen erlaubt es, größere Patientenzahlen zu behandeln und in multizentrischen Studien zu evaluieren, wodurch Kosten und Zeitaufwand für zellbasierte Stoffe gespart werden.

Eine vielversprechende Strategie stellen Stoffe dar, welche dendritische Zellen *in vivo* stimulieren. Tumorantigene in Form vollständiger rekombinant hergestellter Proteine enthalten oft T-Zell-Epitope, die sowohl von T-Helferzellen als auch von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden können. Um T-Zellantworten gegen Proteinantigene zu optimieren, hat sich deren Formulierung mit „immunstimulatorischen Komplexen“ (ISCOM) bewährt. Bei ISCOM handelt es sich um eine Mischung aus Saponin, Phospholipiden und Cholesterin, die käfigartige Nanostrukturen von ca. 40-50 nm Durchmesser bildet und zwei wesentliche Funktionen erfüllt. Stoffe auf der Basis von ISCOM, wie das bereits in klinischen Studien untersuchte ISCOMATRIX[®], kombinieren ein Antigen-Deliverysystem, welches mit Tumorantigenen gekoppelt werden kann, mit der immunstimulierenden Wirkung von Saponin und sind in der Lage, dendritische Zellen *in vivo* zu stimulieren und eine humorale und zelluläre Immunantwort auszulösen (Drane et al., 2007). ISCOM-Stoffe werden effektiv durch dendritische Zellen aufgenommen und induzieren eine Kreuzpräsentation vom Tumorantigen (Schnurr et al., 2005; Schnurr et al., 2009). Zusätzlich übt das Saponin einen potenten immunstimulatorischen Effekt aus. ISCOM-Stoffe haben sich bei der Induktion von T-Zellantworten in klinischen Studien bei Tumorstoffen als geeignet erwiesen (Davis et al., 2004).

Wie zuvor erwähnt, schützen sich Tumoren durch eine Vielzahl von Mechanismen vor einer Immunattacke, so dass die Induktion einer Immunantwort bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren erschwert ist. Da viele dieser Mechanismen auf der Hemmung der dendritischen Zellen basiert, haben wir in dieser Arbeit eine Kombinationsstoffung aus ISCOM und dem TLR9-Liganden CpG-ODN 1826

untersucht, um die dendritischen Zellen zusätzlich zu stimulieren und dadurch möglicherweise die Tumor-induzierte Immunsuppression aufzuheben.

1.8 CpG-Oligonukleotide

CpG-Oligodesoxynukleotide (ODN, kurz Oligonukleotide) sind kurze, ca. 20 Basen lange einzelsträngige Nukleinsäureketten, die dem Immunsystem die Anwesenheit bakterieller DNA signalisieren. Sie stellen aufgrund ihrer immunstimulierenden Wirkung interessante Substanzen für die Generierung neuer Impfstoffe dar (Krieg, 2007).

Arthur Krieg konnte zeigen, dass unmethylierte CG-Dinukleotide in einem bestimmten Basenkontext, sogenannte CpG-Motive, verantwortlich für den immunstimulatorischen Effekt von bakterieller und synthetischer DNA sind. DNA von Vertebraten und von Bakterien unterscheidet sich in einigen wesentlichen Punkten: Cytosin-Guanin-Dinukleotide (CG-Dinukleotide) treten in bakterieller DNA mit einer Häufigkeit von 1/16 auf, wohingegen sie bei Vertebraten-DNA nur mit einer Häufigkeit von 1/60 vorkommen. 70 % der Cytosin-Moleküle in CG-Dinukleotiden der Vertebraten-DNA sind an der 5'-Position methyliert. Im Gegensatz dazu sind alle Cytosin-Moleküle in CG-Dinukleotiden bakterieller DNA unmethyliert. Der Regulationsmechanismus, der der Supprimierung der CG-Dinukleotide in Vertebraten zu Grunde liegt, ist noch weitestgehend unbekannt und beruht u.a. auf der gezielten Mutation von methylierten Cytosin-Molekülen. Bei der oxidativen Desaminierung z.B. wird ein methyliertes Cytosin in ein Thymin umgewandelt. Durch den unterschiedlichen molekularen Aufbau der Vertebraten-DNA und der bakteriellen DNA wird dem humanen Immunsystem die Erkennung potenzieller Pathogene ermöglicht (Krieg et al., 1995).

Synthetische Oligonukleotide, die diese CpG-Motive enthalten, werden als CpG ODN bezeichnet. Die Erkennung der CpG ODN erfolgt über den *Toll-like-Rezeptor 9* (TLR9) (Hemmi et al., 2000). Dieser wird von dendritischen Zellen und B-Zellen exprimiert. TLR9 erkennt diese unmethylierten DNA-Sequenzen als *pathogen-associated molecular pattern* und es kommt zur Maturierung der dendritischen Zelle. CpG ODN haben ihre immunstimulatorische Effektivität als Adjuvans sowohl in antiinfektiösen wie antitumoralen Impfungen vielfach unter Beweis gestellt (Higgins et al., 2007).

Im Laufe der Entwicklung wurden pharmakologisch zwei CpG ODN-Klassen definiert, die sich in ihrer Sequenz und in ihrer Wirkung wesentlich unterscheiden. Der Prototyp der CpG ODN-Klasse A ist das CpG ODN 2216 (CpG-A). Die Sequenz von CpG-A zeichnet sich durch Poly-G-Motive (Poly-Guanin-Motive) aus, ein Palindrom im Zentrum und ein gefensteretes Rückgrat (an den Enden Phosphothioat-Bindungen, im Zentrum Phosphodiester-Bindungen). Der Prototyp der CpG ODN-Klasse B ist das CpG ODN 2006 (CpG-B), welches keine Poly-G-Motive und kein Palindrom aufweist. Alle Bindungen von CpG-B sind Phosphothioatbindungen. Die beiden CpG ODN-Klassen unterscheiden sich wesentlich in ihrer Wirkung (Krug et al., 2001). CpG ODN A führen zu einer starken Aktivierung der NK-Zellen, einer IFN- γ -Sekretion durch Splenozyten und einer IFN- α -Sekretion durch plasmazytoide dendritische Zellen. CpG ODN B aktivieren B-Zellen und TH1-Zellen.

In diesen Versuchen wurde das CpG ODN 1826 (5' TCCATGACGTTCCCTGACGTT 3'), ein Oligonukleotid der Klasse B, verwendet. Aufgrund ihrer negativen Ladung können Oligonukleotide Zellmembranen nur schlecht passieren. Hierdurch wird ihre zelluläre Aufnahme limitiert. Unter den verschiedenen Lymphozytenpopulationen gibt es große Unterschiede in der Fähigkeit, Oligonukleotide aufzunehmen. Für CpG ODN ist lediglich die Aufnahme in B-Zellen und plasmazytoiden dendritischen Zellen von Bedeutung. B-Zellen weisen eine vergleichsweise hohe Aufnahmerate auf (Krieg, 2002). Die ODN-Aufnahme ist ein aktiver Prozess, der temperaturabhängig und in der Regel sequenzunabhängig ist. Guanin-reiche Oligonukleotide werden durch Scavenger-Rezeptoren auf den Zellen erkannt und daher besser als andere Oligonukleotide in die Zellen aufgenommen (Kimura et al., 1994). Die Rezeptor-vermittelte Endozytose stellt den Hauptmechanismus bei der Aufnahme von CpG ODN in niedrigen Konzentrationen dar (Beltinger et al., 1995).

Nach der Aufnahme gelangen die Oligonukleotide in Endosomen. Die endosomale Azidifizierung ist ein wichtiger Prozess für die weitere Wirkung der CpG ODN. Chloroquin, ein Inhibitor der endosomalen Azidifizierung, hemmt die Wirkung von CpG ODN (Macfarlane et al., 1997). Erst nach einer Azidifizierung des Milieus im endosomalen Kompartiment bindet CpG-DNA an TLR9. Im Gegensatz zu anderen TLR wird TLR9 kaum auf der Zelloberfläche exprimiert. Es wird angenommen, dass dieser über eine Transmembran-Domäne verfügende TLR9 in der endosomalen Membran lokalisiert ist (Hemmi et al., 2000). Die Aktivierung von TLR9 führt zu der Rekrutierung des zytosolischen Adapterproteins MyD88 (Myeloid differentiation marker 88), welches

die IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase (IRAK) aktiviert. IRAK aktiviert nun den TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF6). Über noch nicht geklärte Signalwege werden letztendlich die Stresskinasen c-Jun-N-terminale Kinase (JNK), extrazelluläre Rezeptorkinase (ERK), p38 MAPK (Mitogen-activated protein kinase) und der IKB-Kinase-Komplex (IKK) aktiviert. IKK setzt aus IKB den Transkriptionsfaktor NFkB frei (Wagner, 2002).

1.9 Fragestellung und Hintergrund

Die Immuntherapie von malignen Tumoren ist ein erfolgversprechendes Forschungsgebiet, das noch detaillierter Untersuchung bezüglich der exakten Wirkungsmechanismen an möglichst kliniknahen Modellen bedarf. Von einem verbesserten Verständnis der Mechanismen und einer Optimierung in präklinischen Modellen wird der erfolgreiche Einsatz beim Patienten abhängen.

Ziel dieser Arbeit ist es, eine Strategie zu entwickeln, die Tumor-induzierte Immuntoleranz durch eine Kombination einer ISCOM-Vakzine mit CpG-Oligonukleotiden (ODN) im Mausmodell des Pankreaskarzinoms zu durchbrechen. Zunächst sollte prophylaktisch vakziniert werden und die Aktivierung des Immunsystems und der möglicherweise resultierende Schutz gegen nachfolgende Tumorinduktion untersucht werden. Weiterhin sollte die durch das Pankreaskarzinom induzierte Immunsuppression analysiert werden. Die hierdurch gewonnenen Informationen sollten helfen, eine therapeutisch effektive Vakzinierung bei bereits etablierten Pankreaskarzinomen zu entwickeln. Als Tumormodell dienen anfangs subkutan induzierte Tumoren aus murinen Pankreaskarzinomzelllinien. Die Effekte der Immuntherapie sollten dann auf ein orthotopes Modell übertragen werden, welches die Situation des humanen Pankreaskarzinoms besser abbildet, mit dem Ziel, eine potente Immuntherapie gegen etablierte Pankreaskarzinome zu entwickeln.

Untersucht werden sollten folgende Fragestellungen:

- 1) Schützt eine prophylaktische Impfung mit einer OVA/ISCOM-Vakzine vor einer späteren Tumorinduktion von Pankreastumoren, die das Modellantigen Ovalbumin (OVA) exprimieren?
- 2) Hat die OVA/ISCOM-Vakzine auch einen therapeutischen Effekt auf bereits etablierte Pankreaskarzinomen?

- 3) Welche Art der Immunsuppression wird durch das Pankreaskarzinom verursacht? Welche Zellen sind dafür verantwortlich?
- 4) Welche Aktivierung des Immunsystems löst die Kombinationsbehandlung mit der OVA/ISCOM-Vakzine und CpG ODN 1826 aus und kann hierdurch die Tumor-induzierte Immunsuppression durchbrochen werden?
- 5) In welchem Teil der Immunkette wird die Immunsuppression durchbrochen?
- 6) Vermittelt die Vakzinierung einen T-Zell-vermittelten Langzeitschutz (T-Zellgedächtnis)?

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zellkulturmedien

Als Kulturmedien wurden Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) für Tumorzelllinien sowie RPMI 1640 Medium (Biochrom, Berlin, D) zur Kultivierung von T-Zellen und dendritischen Zellen verwendet. Die Kulturmedien wurden mit 1% L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin (alle PAA, Linz, A) sowie 10% (v/v) fetalem Kälberserum (FCS) (Gibco BRL, Paisley, GB) supplementiert. Zur Vermeidung unspezifischer Stimulation wurden ausschließlich endotoxinarme Medien und Substanzen eingesetzt. Um die Komplementfaktoren zu inaktivieren, wurde das verwendete FCS bei 56°C für 30 min hitzebehandelt.

2.1.2 Zelllinien

Die Panc02-Zelllinie wurde aus Methylcholantren-induzierten Pankreaskarzinomen von C57-BL/6 Mäusen gewonnen und freundlicherweise von PD Dr. Christiane Bruns (Chirurgische Klinik und Poliklinik-Klinikum Großhadern, LMU München) zur Verfügung gestellt. Die Panc02-Zellen wurden mit Ovalbumin-Plasmid transfiziert (pAC-Neo-OVA, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. T. Brocker, Institut für Immunologie, LMU München).

2.1.3 Zellmanipulation

Sämtliche Manipulationen außer der Antikörperfärbung unmittelbar vor durchflusszytometrischer Messung wurden unter sterilen Kautelen in einem Laminar-Air-Flow durchgeführt.

2.1.4 Zellzählung

Die Zählung von Zellen wurde nach Trypanblauausschlusstest (Trypan-Blau, Sigma-Aldrich, Steinheim, D) in einer Neubauer-Zählkammer (Optik Labor Frischknecht,

Balgach, D) durchgeführt. Hierbei wurden nur Zellen gezählt, die keinen Farbstoff aufnahmen und somit vital waren.

2.1.5 Kultur der PancOVA- und Panc02-Zellen

Die Tumorzellen wurden im DMEM-Medium mit Zusatz von 10% FCS im Brutschrank (Heraeus, Hanau, D) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte unter sterilen Bedingungen kultiviert. Das Medium der PancOVA-Tumorzellen enthielt als Selektionsmedium zusätzlich 0,4 mg/ml G418 (Neomycin, PAA, Pasching, A). Eine Kontamination mit Mykoplasmen wurde mittels regelmäßig durchgeführter Tests (MycoAlert®, Lonza, Köln, D) ausgeschlossen. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde das Medium inklusive etwaiger nicht-adhärenter Zellen abgeschüttet und die Kulturflasche mit PBS (PAA, Pasching, A) ausgewaschen. Danach wurden 3 ml Trypsinlösung (PAA, Pasching, A) für fünf Minuten zu den Zellen gegeben. Durch vorsichtiges Schwenken konnte so der Zellrasen schonend vom Untergrund abgelöst und die Zellen nach einem Waschvorgang auf etwa fünf neue Kulturflaschen verteilt werden.

2.2 Mäuse

2.2.1 Haltungsmethoden

Für die Versuche wurden weibliche C57BL/6 Mäuse verwendet. Im Alter von sechs bis zwölf Wochen wurden die Tiere von der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen, D) bezogen und frühestens nach einer einwöchigen Akklimatisierung für die Versuche herangezogen. Die OT-1-Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Brocker (Institut für Immunologie, LMU München) zur Verfügung gestellt. Die Haltung erfolgte in einem geschlossenen, den Hygieneanforderungen entsprechendem Tierstall der Medizinischen Klinik-Innenstadt, LMU München. Die Betreuung inklusive Fütterung mit Pelletfutter und Wasser ad libidum erfolgte durch ausgebildete Tierpfleger. In der Regel wurden maximal sechs Mäuse pro Käfig gehalten. Der zwölfstündige hell/dunkel-Rhythmus wurde mittels einer Zeitschaltuhr geregelt und soweit möglich wurden Versuche nur tagsüber durchgeführt.

Alle durchgeführten Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Antragsnummer; 55.2-1-54-2531-103-06).

2.2.2 Entnahme von Blut, Milz und Lymphknoten

Die Entnahme von Blut erfolgte bei den Tieren unter Isofluran-Narkose. Es wurde Forene[®], ein den Wirkstoff Isofluran (1-Chlor-2,2,2-trifluorethyl-difluormethylether) enthaltendes Inhalationsnarkotikum der Firma Abbott (Wiesbaden, D) verwendet. Isofluran wirkt ausreichend analgetisch und stark muskelrelaxierend. Die Tiere wurden nur kurzzeitig mit Isofluran betäubt und erwachten in der Regel bereits einige Sekunden nach Entnahme aus der Narkose, so dass eine Antagonisierung des Narkotikums nicht erforderlich war. Die Inhalationsnarkose erfolgte, um eine Verletzung der Tiere durch Abwehrbewegungen zu vermeiden. Während der Narkose konnte den Mäusen mittels einer Mikrokapillare retrobulbär die erforderliche Menge Blut abgenommen werden (etwa 50 μ l). Das Blut wurde in Eppendorf[®] Safe-Lock Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg, D), in denen bereits ein Tropfen Heparin-Natrium vorgelegt war, gesammelt und auf Eis transportiert.

Für die Milzentnahme wurden die Mäuse unter Isofluran-Narkose getötet. Die Tötung erfolgte durch zervikale Dislokation. Die Maus wurde nun mit Ethanol desinfiziert, die Milz nach Inzision der Bauchwand von der linken Seite entnommen und in PBS auf eisgekühltem Wasser gelagert.

Zur Entnahme der Lymphknoten wurden die Mäuse ebenfalls unter Isofluran-Narkose getötet und über ihre Läufe auf dem Rücken fixiert. Nach Desinfektion mit Ethanol konnte die Brusthaut mittig aufgeschnitten und aufgeklappt werden. Die Hautlappen wurden fixiert. Die inguinalen Lymphknoten konnten nun vorsichtig mit dem Skalpellrücken herausgedrückt werden. Die entnommenen Lymphknoten wurden in PBS auf eisgekühltem Wasser zur weiteren Verarbeitung gelagert.

2.3 Tumormodelle

2.3.1 Induktion subkutaner Pankreastumoren

Für die Induktion von experimentellen Tumoren wurden den Mäusen unter Kurzzeitbetäubung mit Isofluran 5×10^5 Tumorzellen suspendiert in $100 \mu\text{l}$ PBS subkutan in die Flanke injiziert. Die Nadel wurde in einem flachen Winkel gerade so weit unter die Haut des Versuchstieres platziert, dass nach der Injektion eine Vorwölbung entstand und keine Flüssigkeit aus dem Stichkanal zurück trat.

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass sich die OVA-transfizierten Panc02-Zellen bei der subkutanen Tumorentstehung analog zu den nativen Tumorzellen verhalten. Die Entwicklung der Tumorgroße wurde täglich vermessen. Als Maß für die Tumorgroße diente die Querschnittsfläche des Tumors, die über das Produkt aus größtem Querdurchmesser (mm) multipliziert mit dem darauf senkrechten Durchmesser (mm) bestimmt wurde. Die Tumorgroße wurde 3x/Woche ermittelt. Nach 5-7 Tagen bildete sich ein gut messbarer, palpabler Tumor aus (Größe: 5 bis 10 mm^2). Nach ca. 30 Tagen erreichten die Tumoren eine Größe von ca. 120 mm^2 . Die Tiere wurden getötet (Isoflurannarkose und zervikale Dislokation), sobald die Tumorfläche 225 mm^2 (max. $15 \times 15 \text{ mm}$) überschritt oder die Vitalität der Mäuse durch den Tumor beeinflusst wurde.

Zielgrößen der Therapie waren Tumorgroße und Mortalität (aufgetragen als Kaplan-Meier-Kurve). Mäuse, bei denen es unter Therapie zu einer vollständigen Tumorrückbildung kam, wurden über mindestens zwölf weitere Wochen auf Tumorfreiheit kontrolliert.

2.3.2 Induktion orthotoper Pankreastumoren

Die orthotope Transplantation von Tumorzellen syngener Mäuse in das Pankreas führte zur Entwicklung experimenteller Tumoren, welche genauer als subkutan induzierte Tumoren die Metastasierung und Ausbreitung des Pankreaskarzinoms im Gastrointestinaltrakt widerspiegeln (Bruns et al., 1999).

Die Mäuse wurden mit 150 μ l Narkosemix bestehend aus 1 ml Medetomidin (1 mg/ml) (Dormitor[®], Pfizer, NY, USA), 10 ml Midazolam (5 mg/ml) (Dormicum[®], Ratiopharm, Ulm/Donautal, D) und 2 ml Fentanyl 0,1 mg/ml (Fentanyl[®], Hexal, Holzkirchen, D) narkotisiert. Etwa 5 min nach Injektion war eine ausreichende Narkosetiefe erreicht.

In den linken Oberbauch wurde ein 1 cm langer Schnitt angelegt und das Pankreas mobilisiert. 2×10^5 PancOVA-Zellen suspendiert in 40 μ l PBS wurden mittels eines Applikators in den Pankreaskorpus injiziert. Danach erfolgte die Reposition des Pankreas und der Verschluss des Abdomens mit Prolene[®] 4-0 Nahtmaterial (Ethicon, Norderstedt, D). Zumal die volle Narkosezeit von 1,5 bis 3 Stunden nicht benötigt wurde, wurde den Tieren noch in Narkose 200 μ l eines Antagonisierungscocktails bestehend aus 0,5 ml Atipamezol (5 mg/ml) (Antisedan[®], Pfizer, NY, USA), 5 ml Flumazenil (0,1 mg/ml) (Anexate[®], Deltaselect, Dreieich, D) und 3 ml Naloxon (0,4 mg/ml) (Naloselect[®], Deltaselect, Dreieich, D) verabreicht.

Während der Aufwachphase wurden die Tiere zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur unter einer Wärmelampe platziert. Nach der Aufwachphase wurden die Tiere zunächst 2-stündlich, später bei stabilem Zustand täglich bzw. nach Bedarf kontrolliert (Tiergewicht, Allgemeinbefinden) und in regelmäßigen Abständen durch Palpation auf unerwartet starkes Tumorwachstum untersucht. Die therapeutische Vakzinierung begann an Tag 10-14 nach der Tumorinduktion. Beim Auftreten blutiger Stühle, klinisch manifesten funktionellen Störungen oder verminderter Reaktion der Tiere auf Umweltreize wurden die Tiere getötet. Im orthotopen Modell kam es bei unbehandelten Tieren ähnlich der Situation beim Menschen zu einer ausgeprägten Peritonealkarzinose.

2.4. Vakzinierungstherapie

2.4.1 Vakzinierung mit der OVA/ISCOM-Vakzine

ISCOMATRIX adjuvant und die OVA/ISCOM-Vakzine wurden von der Firma CSL Limited (Melbourne, AUS) zur Verfügung gestellt. OVA/ISCOM wurde hergestellt durch die Verbindung von palmityliertem OVA (A7461, Sigma-Aldrich, Steinheim, D) mit ISCOMATRIX bestehend aus ISCOPREP Saponin, Phospholipiden und Cholesterol (Schnurr et al., 2009).

Den Mäusen wurde in wöchentlichen Intervallen die Vakzine in einer Dosis von 20 μ l pro Injektion (entspricht 0,3 μ g OVA-Protein und 5 μ g ISCOM) subkutan in die hintere Flanke injiziert.

2.4.2 Kombinationsvakzine mit dem TLR9-Liganden CpG ODN 1826

In einigen Versuchen wurde zusätzlich zu der OVA/ISCOM-Vakzine CpG ODN 1826 injiziert. CpG ODN 1826 wurde von Coley Pharmaceuticals (Langenfeld, D) bezogen. Es wurden zwei Konzentrationen für therapeutische Ansätze verwendet, 6 μ g und 100 μ g pro Injektion. Die entsprechende Menge wurde aus der Stocklösung entnommen und mit der üblichen Dosis der OVA/ISCOM-Vakzine (5 μ g ISCOM pro Injektion) in ein Eppendorf® Safe-Lock Reaktionsgefäß gegeben. Die Kombinationsvakzine wurde mit PBS auf ein Endvolumen von 100 μ l pro Injektion eingestellt.

2.5 Evaluierung der Immunantwort

2.5.1 Leukozytenisolierung

Für die Präparation von Leukozyten wurde die Milz bzw. Lymphknoten von Fettgewebe befreit, in eine Petrischale überführt, mit einem Skalpell zerkleinert und die Zellsuspension mit 20 ml PBS durch ein 70 μ m Zellsieb (Falcon, Heidelberg, D) gespült. Die Zellsuspension wurde mit 400 x rcf bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Aus dem Zellpellet wurden die Erythrozyten durch Lyse entfernt. Dazu

wurde das Zellpellet in einer Erylyse-Lösung (160 mM NH₄Cl, 170 mM Tris pH 7,6; 9:1) vorsichtig resuspendiert, für 3 min auf Eis belassen und anschließend wurde die Erylyse mit 10 ml Dulbecco's PBS abgestoppt. Die Zellen wurden gezählt und danach für die durchflusszytometrische Analyse verwendet.

2.5.2 Intrazelluläre IFN- γ - und Pentamer-Färbung

Um die Frequenz antigenspezifischer, zytotoxischer T-Zellen zu bestimmen, wurde die intrazelluläre IFN- γ -Produktion in CD8⁺ T-Zellen nach Peptidrestimulation gemessen. Die Restimulation der Zellen erfolgte durch das MHC-I-restringierte OVA-Epitop SIINFEKL, welches in einer Konzentration von 0,3 μ g/ml eingesetzt wurde. Der Ansatz wurde mit Medium für eine Stunde im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Um eine Sekretion der gebildeten Zytokine zu verhindern, wurde zu allen Proben Brefeldin A (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) in der Konzentration von 1 μ g/ml gegeben. Brefeldin A ist ein Macrolid-Antibiotikum aus *Penicillium brefeldianum*. Es unterbindet spezifisch die Translokation von Proteinen vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat, was zu deren intrazellulären Akkumulation führt. Der Ansatz wurde für vier Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Es folgte die spezifische Färbung mit den Fluorchrom-markierten Anti-Maus-Antikörpern für die Durchflusszytometrie.

In diesem Fall wurde ein CD8-Antikörper mit einem APC-Marker in der Konzentration 0,5 μ g/ml eingesetzt und 15 min dunkel und auf Eis inkubiert. Anschließend wurde abzentrifugiert und gewaschen, um die restlichen – nicht gebundenen – Antikörper zu entfernen und eine mögliche Quervernetzung zu verhindern. Die Proben wurden in 100 μ l Paraformaldehyd 2% resuspendiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die fixierten Zellen mit der intrazellulären Färbung versehen. Hierzu wurde ein mit FITC markierter IFN- γ -Antikörper (clone XMG1.2, Caltag Laboratories) in einer 0,5%igen Saponin-Lösung in der Konzentration von 1 μ l/ml gelöst. Saponin ist ein Detergenz, das die Zellmembran permeabilisiert, so dass die gegen die Zytokine gerichteten Fluorchrom-markierten Antikörper in die Zelle eindringen konnten. Die so resuspendierten Proben wurden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und in 100 μ l PBS resuspendiert. In einigen Versuchen wurde die Frequenz antigenspezifischer CD8⁺ T-

Zellen mittels MHC-I-Peptid-Pentamer-Färbemethode quantifiziert Die Pentamer-Färbung wurde mit H-2Kb OVA₂₅₇₋₂₆₄ Allophycocyanin-Pentamer durchgeführt (ProImmune Ltd., Oxford, UK), entsprechend den Herstellerangaben.

2.5.3 Färbung von Oberflächenmolekülen

Die Antikörper der Oberflächenmoleküle CD3e-APC (clone 145-2C11), CD4-PE (clone GK1.5), CD8a-PerCP (clone 53-6.7), CD11c-APC (clone HL3), CD19-PE (clone 1D3), CD86-FITC (clone GL1), NK1.1-PerCP (clone PK 136) stammten von der Firma BD Biosciences (NJ, USA), der Antikörper CD69-FITC (clone H1.2F3) von Caltag Laboratories (Carlsbad, CA). Die Färbung erfolgte bis zum Wasch-Schritt nach Brefeldin A-Zugabe analog der Intrazellulärfärbung. Danach wurden die entsprechenden Antikörper in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zu den Proben gegeben und die Zellen resuspendiert. Die gefärbten Zellen wurden 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach 10 min wurden die Proben erneut gewaschen und in 100 µl PBS resuspendiert.

2.5.4 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie fließen die im Messröhrchen enthaltenen Zellen im FACSCalibur-GerätTM (fluorescence-activated cell sorting, Becton Dickinson, Heidelberg) in einem dünnen Strahl an mehreren Farblasern (Anregungswellenlänge 488 nm und 635 nm) vorbei. Dabei kann aus der Streuung der Laserstrahlen sowohl die Größe als auch die Granularität der Zellen erschlossen werden.

Zusätzlich werden die Zellen je nach Bedarf durch Antikörper markiert, die Fluoreszenzfarbstoffe tragen. Das Exzitationsspektrum dieser Farbstoffe liegt im Bereich der Wellenlänge der Farblaser plus einem zusätzlichen längerwelligen Emissionsspektrum, welches wiederum vom FACS-Gerät gemessen werden kann. Durch die verschiedenen Spektren können verschiedene Antikörper mit mehreren Farbstoffen gleichzeitig verwendet werden und verschiedene Informationen gleichzeitig über ein und dieselbe Zelle gewonnen werden. Zum Ausschluss unspezifischer Antikörperbindung (z. B. am Fc-Teil) wurde bei jeder Färbung eine Kontrolle mit ebenfalls fluoreszierenden Antikörpern des gleichen Isotyps durchgeführt, deren

Spezifität jedoch keine Bindung in den untersuchten Zellen erwarten lässt (Isotypenkontrolle).

Die Daten wurden mit der FlowJo Software (Version 7.2.1, Tree Star Inc., OR) analysiert (**Abb. 2**).

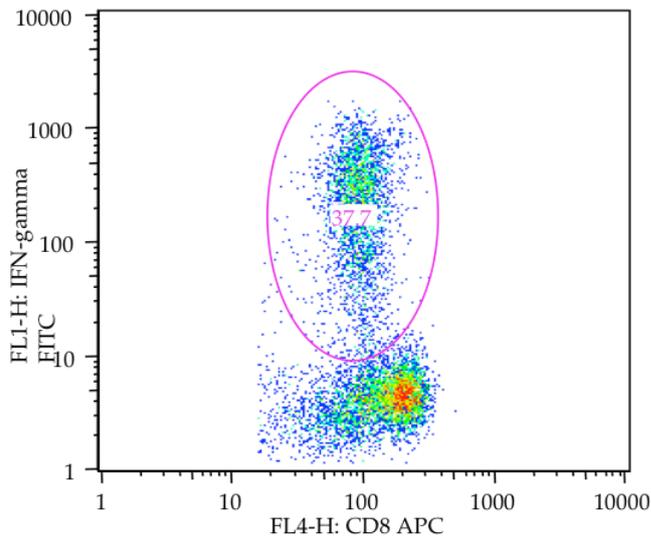


Abb. 2

Originalabbildung einer IFN- γ -Intrazellulärfärbung von CD8⁺ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie und Auswertung durch FlowJo Software.

2.5.5 *In vivo* Proliferationsassay

CD8⁺ T-Zellen, die von OT-1-Mäusen stammten und das H2-Kb restrigierte OVA-Epitop SIINFEKL erkennen, wurden zu 5×10^7 Zellen/ml in PBS mit 0,1% BSA und 10 μ M mit dem Farbstoff 5-(6-)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE) für 10 min bei 37°C inkubiert. 2×10^6 CFSE-gefärbte OT-1-T-Zellen in 200 μ l PBS wurden den tumortragenden Mäusen intravenös injiziert, nachdem diese einmal mit der OVA/ISCOM-Vakzine am gleichen Tag vakziniert worden waren. Nach 36 Stunden wurde den Mäusen peripheres Blut abgenommen und die OT-1 T-Zell-Proliferation mittels FACS-Messung analysiert. Die Intensität der Fluoreszenz in der Durchflusszytometrie hängt von der intrazellulären Konzentration des Farbstoffs ab. Bei einer Zellteilung wird das Zytoplasma und damit das CFSE auf die beiden Tochterzellen verteilt, wodurch die Signalintensität auf etwa die Hälfte abfällt. So wird eine Aussage darüber möglich, wie viele der transferierten Zellen sich geteilt haben.

2.5.6 *In vivo* Zytotoxassay

Splenozyten von C57BL/6 Mäusen wurden mit 1 oder 10 μ M CFSE gefärbt und die eine Gruppe mit dem OVA-Peptid SIINFEKL (1 μ g/ml) beladen, die andere ohne Peptid belassen. Die so generierten Zellen (1×10^6) von jeder Gruppe wurden vermischt und vakzinierten Mäusen und Kontrollmäusen intravenös injiziert. 16 Stunden später wurde den Mäusen Blut abgenommen und die CFSE-markierten Zielzellen mittels FACS-Messung analysiert. Das Verhältnis von Zielpopulation, die mit OVA-Peptid beladen wurde, zur Kontrollpopulation ohne Peptid wurde bestimmt und der Prozentsatz der getöteten Zellen errechnet (= % tote OVA-gepulste Zellen/Zellen bei der behandelten Gruppe, % tote OVA-gepulste Zellen/Zellen bei der Kontrollgruppe).

2.5.7 Immunhistologie

Von den jeweiligen Tumoren wurden Kryoschnitte angefertigt, diese wurden über Nacht luftgetrocknet und zehn Minuten in eiskaltem Aceton fixiert. Für die Visualisierung von infiltrierenden CD8⁺ T-Zellen wurden die Schnitte mit anti-Maus CD8 (1:50, Ratte) inkubiert, gefolgt von einem Biotin-SP-konjugiertem anti-Ratte Sekundärantikörper (beide BD Pharmingen, San Diego, USA). Für die Fluoreszenzdetektion wurden sie anschließend mit einem CyTM2-konjugiertem anti-Ratte Streptavidin (1:500, Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, UK) inkubiert.

Zur Bestimmung von regulatorischen T-Zellen wurden die Gewebe mit anti-Maus Foxp3 (Ratte, 1:50, eBioscience, San Diego, USA) und anti-Maus CD3 (Syrischer Hamster, 1:50, BD Pharmingen, San Diego, USA) inkubiert, gefolgt von CyTM3-konjugiertem anti-Syrischer Hamster IgG (Ziege, 1:400, H+L) zusammen mit Biotin-SP-konjugiertem anti-Ratte IgG (Esel, 1:500, Jackson ImmunoResearch Europe). Anschließend wurde mit einem CyTM2-konjugiertem Streptavidin (1:500, Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, UK) inkubiert. Die Schnitte wurden mit Mounting-Medium (Vector Laboratories, Kalifornien) inklusive DAPI für die Zellkernfärbung abgedeckt. Die Proben wurden mit einem Carl Zeiss Axiophot Mikroskop digital aufgezeichnet (DMC 2 digital camera, Polaroid, Zeiss, Jena, D).

2.6 Statistik

Die Berechnung der statistischen Signifikanz zweier Werte erfolgte durch ungepaarten, zweiseitigen Student t-test, korrigiert nach Bonferroni für multiple Vergleiche. Zur Analysierung der Tumorgröße wurde der Mann-Whitney U-Test verwendet, um die Durchschnittswerte zweier Gruppen zu vergleichen. Kaplan-Meier-Überlebenskurven wurden mit dem *Cox proportional hazards model* analysiert. Die statistische Analyse wurde mit dem SPSS-Programm (Version 16.0) durchgeführt. P-Werte $< 0,05$ galten als signifikant.

3. Ergebnisse

3.1 Prophylaktische Vakzinierung mit der OVA/ISCOM-Vakzine schützt vor nachfolgender Tumorinduktion

Die prophylaktische Vakzinierung der Mäuse bestand aus der zweimaligen subkutanen Injektion mit 5 μg ISCOM, welches 0,3 μg OVA-Protein enthielt, im Abstand von einer Woche. Den Kontrollmäusen wurde PBS subkutan gespritzt. Sieben Tage nach der zweiten Vakzinierung erfolgte die subkutane Tumorinduktion mit 5×10^5 PancOVA-Zellen. Während die Kontrollmäuse ohne Vakzinierung (PBS) alle einen Tumor entwickelten und bis Tag 40 starben, verhinderte die prophylaktische Vakzinierung bei allen Mäusen das Anwachsen des Tumors und führte zu einer 100% Überlebensrate über einen Beobachtungszeitraum von 100 Tagen (**Abb. 3**).

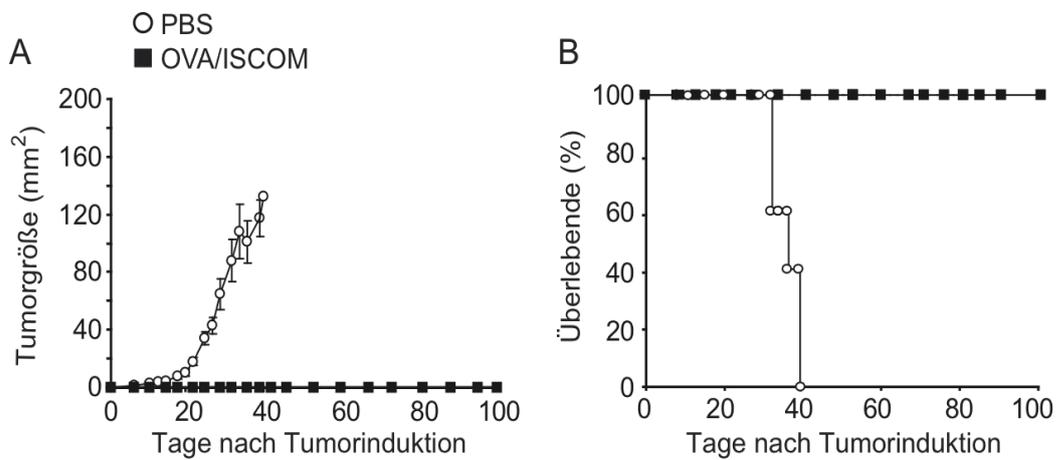


Abb. 3

A) Tumorgößen der subkutanen Pankreastumoren der Kontrollmäuse, denen PBS gespritzt wurde, und der prophylaktisch mit der OVA/ISCOM-Vakzine behandelten Mäuse (Mittelwerte \pm SEM, $n = 6-8$ Mäuse pro Gruppe). B) Kaplan-Meier-Kurve der Überlebensrate der vakzinierten und nicht vakzinierten Mäuse.

3.2 Therapeutische Vakzinierung mit der OVA/ISCOM-Vakzine hat keinen Effekt auf bereits etablierte Pankreastumoren

Die therapeutische Vakzinierung sollte zeigen, ob die Vakzine auch einen Effekt auf bereits etablierte, subkutane Pankreastumoren hatte. Die Vakzinierung der Mäuse erfolgte 14 Tage nach Tumorinduktion bei Tieren mit nachweislich angewachsenem Tumor (durchschnittliche Größe 6 mm^2) in einem Intervall von einer Woche und bestand aus zwei Injektionen der Vakzine, während die Kontrollgruppe PBS erhielt. Die Tumorverlaufskontrolle durch regelmäßige Größenmessung der subkutanen Tumoren zeigte, dass die Vakzinierung verglichen mit der Kontrollgruppe weder einen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Tumorwachstums noch auf die Endgröße des Tumors ausübte. Auch bei der Überlebensrate der Mäuse konnte kein signifikanter Effekt durch die Vakzinierung beobachtet werden (**Abb. 4**).

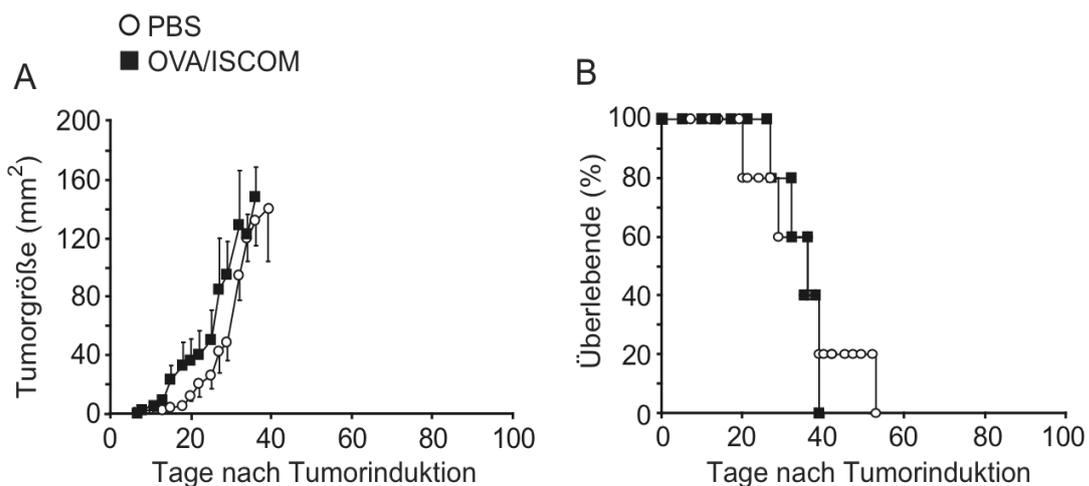


Abb. 4

A) Tumorgößen der subkutanen Pankreastumoren der Kontrollmäuse, denen PBS gespritzt wurde, und der therapeutisch mit der OVA/ISCOM-Vakzine behandelten Mäuse (Mittelwerte \pm SEM, $n = 6-8$ Mäuse pro Gruppe). B) Kaplan-Meier-Kurve der Überlebensrate der vakzinierten und nicht vakzinierten Mäuse.

3.3 Tumor-induzierte Immunsuppression bei Mäusen mit Pankreaskarzinom

Der Grund für die Diskrepanz der Effektivität zwischen prophylaktischer und therapeutischer Vakzinierung könnte in einer durch den Tumor induzierten Immunsuppression liegen. Daher wurde die Anzahl antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen im Blut tumortragender Tiere verglichen mit deren Anzahl im Blut von Kontrolltieren ohne Tumor, bzw. mit Panc02-Wildtyp-Tumor, jeweils nach zweifacher Vakzinierung mittels MHC-I-Pentamer-Färbung sowie intrazellulärer IFN- γ -Färbung.

Die Vakzinierung induzierte die Bildung einer großen Population an OVA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (6-7 % der gesamten CD8⁺ T-Zellen) in tumorfreien Tieren und Tieren mit dem Panc02 (Wildtyp)-Tumor. Im Gegensatz dazu zeigten Tiere mit PancOVA-Tumoren eine signifikant reduzierte Anzahl der CD8⁺ T-Zellen nach Vakzinierung (1,4% vs. 6,2 % der CD8⁺ T-Zellen bei intrazellulärer IFN- γ -Färbung, $p < 0,01$) (**Abb. 5**).

Dies bedeutet, dass PancOVA-Tumoren die Vakzine-induzierte Expansion von CD8⁺ T-Zellen antigenspezifisch unterdrücken.

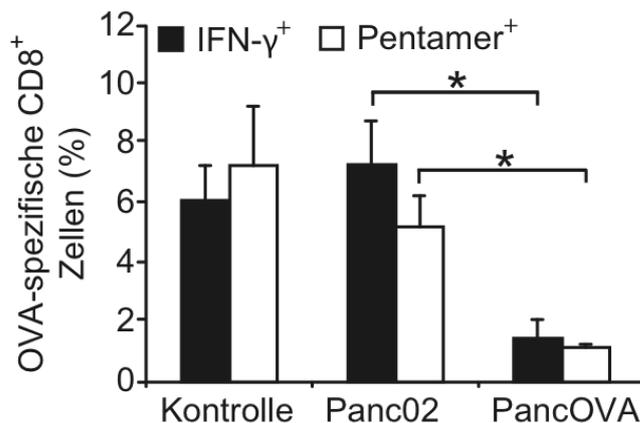


Abb. 5

Kontrollmäuse und Mäuse mit Panc02 (Wildtyp)- oder PancOVA-Tumoren wurden mit OVA/ISCOM vakziniert. Die Anzahl der OVA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurde 7 Tage nach der zweiten Vakzinierung durchflusszytometrisch mittels MHC-I-Pentamerfärbung sowie *ex vivo* Peptidstimulation und intrazellulärer IFN- γ -Färbung bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM mit 5-8 Mäusen pro Gruppe.

Dendritische Zellen spielen eine Schlüsselrolle für die antigenspezifische T-Zell-Antwort. Es gibt Hinweise, dass Tumoren die Funktion der dendritischen Zellen negativ

beeinflussen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden CD8⁺ T-Zellen, die von OT-1-Mäusen stammten und das H2-Kb-restrigierte OVA-Epitop SIINFEKL erkennen, mit CFSE markiert und den Mäusen intravenös injiziert (adaptiver T-Zelltransfer). Die Mäuse wurden anschließend mit der ISCOM-Vakzine vakziniert und die T-Zellproliferation im peripheren Blut 36 Stunden später mittels FACS-Analyse anhand der CFSE- Verdünnung gemessen. PancOVA-Tumoren hatten keinen Einfluss auf die OT-1 T-Zell-Proliferation. Folglich werden die Antigenpräsentation der dendritischen Zellen auf MHC-I-Molekülen (Kreuzpräsentation) und die Fähigkeit zur T-Zell-Stimulation durch den PancOVA-Tumor nicht beeinflusst (**Abb. 6A**).

Um die Funktion der CD8⁺ T-Zellen in tumortragenden Tieren zu testen, wurden den Mäusen CFSE-markierte und mit OVA-Peptid beladene Splenozyten intravenös injiziert und die zytotoxische Aktivität der CD8⁺ T-Zellen *in vivo* 18 Stunden später mittels FACS-Analyse gemessen. Die zytotoxische Aktivität der tumortragenden Mäuse war signifikant geringer als die der Kontrollmäuse, korrelierte jedoch mit der geringeren Anzahl spezifischer CD8⁺ T-Zellen in tumortragenden Mäusen (**Abb. 5**). Mäuse mit Wildtyp-Panc02-Tumor zeigten hinsichtlich der lytischen Aktivität keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollmäusen (**Abb. 6B**).

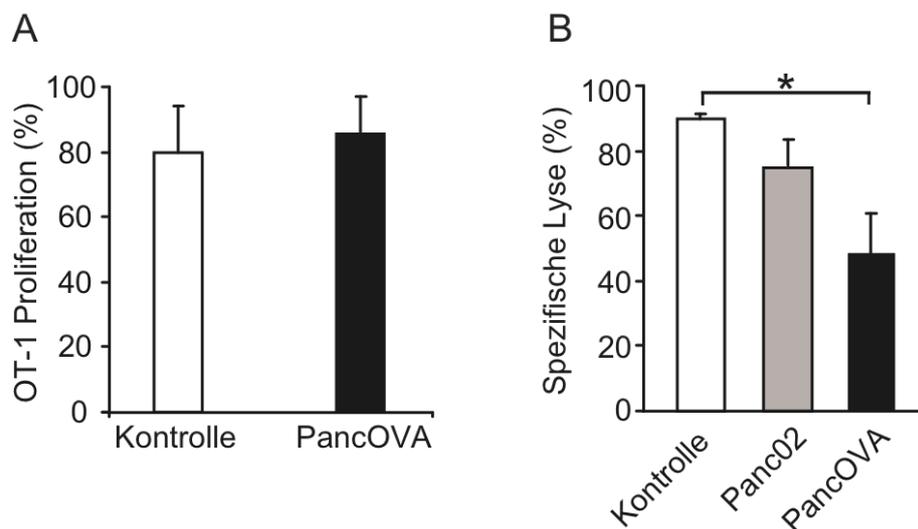


Abb. 6

A) Mäuse mit und ohne PancOVA-Tumoren wurden vakziniert. Anschließend wurden ihnen CFSE-markierte OT-1-T-Zellen in die Schwanzvene injiziert und die CD8⁺ T-Zellproliferation 36 Stunden später mittels FACS-Analyse bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte ± SEM mit 5-8 Mäusen pro Gruppe. B) Kontrollmäuse und Mäuse mit Panc02- (Wildtyp) oder PancOVA-Tumoren wurden mit OVA/ISCOM vakziniert und

CFSE-markierte, mit OVA-Peptid beladene Splenozyten i.v. injiziert. Die zytotoxische Aktivität wurde nach 18 Stunden mittels FACS-Analyse ermittelt. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM mit 5-8 Mäusen pro Gruppe.

Das pleiotrope Zytokin TGF- β stellt einen potenten Hemmer der T-Zell-Funktion dar und man findet bekannterweise erhöhte Serumspiegel bei Patienten mit Pankreaskarzinom. Auch wir konnten signifikant erhöhte Serumspiegel von TGF- β bei Mäusen mit Pankreaskarzinom beobachten (79 vs. 1515 pg/ml, $p < 0.01$) (**Abb. 7A**).

Da die antigenspezifische Suppression der T-Zell-Antwort eine Hauptaufgabe der regulatorischen T-Zellen ist, untersuchten wir durchflusszytometrisch die Populationen der regulatorischen T-Zellen im Blut, in den Lymphknoten, in der Milz und im Tumor bei tumortragenden Mäusen anhand der Expression der Marker CD4 und Foxp3. Wir fanden 21 Tage nach Tumorinduktion eine signifikant erhöhte Anzahl regulatorischer T-Zellen im Blut, in den Lymphknoten und in der Milz bei Mäusen mit Pankreastumor verglichen mit der Kontrollgruppe ohne Tumor. Im Tumorgewebe waren etwa 40% aller CD4⁺ T-Zellen regulatorische T-Zellen (**Abb. 7B**).

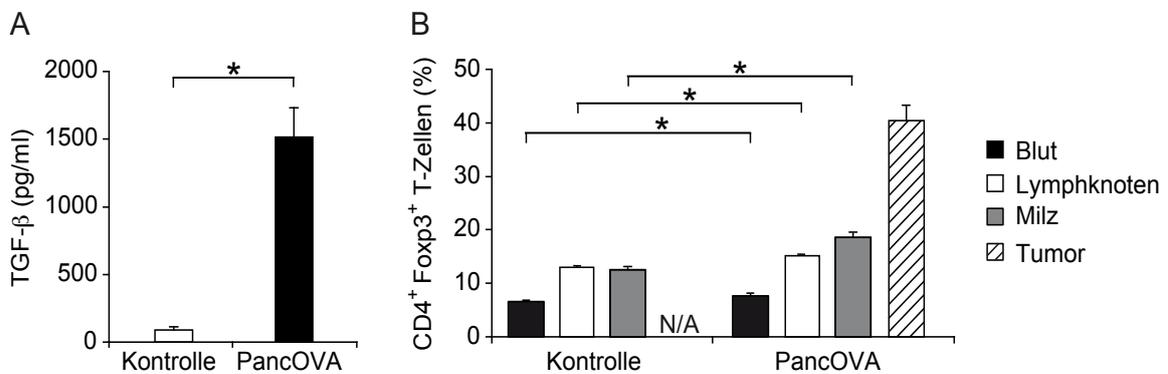


Abb. 7

A) Serumspiegel von TGF- β in Mäusen mit und ohne PancOVA-Tumoren mittels ELISA gemessen. B) CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen im Blut, in den Lymphknoten, in der Milz und im Tumor 21 Tage nach Tumorinduktion. Die Zellen wurden mittels FACS analysiert. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM mit 5-8 Mäusen pro Gruppe.

3.4. Kombinationsbehandlung mit der OVA/ISCOM-Vakzine und dem TLR9-Liganden CpG ODN 1826 führt zu Tumorregression und Langzeitüberleben von Mäusen mit subkutanem Pankreaskarzinom

TLR-Liganden induzieren eine Immunaktivierung und stellen somit interessante Substanzen für die Tumormimmuntherapie dar. CpG ODN sind TLR9-Liganden und haben schon in klinischen Studien entweder allein oder in Kombination mit Chemotherapeutika oder Vakzinen Erfolge gezeigt.

Um herauszufinden, ob CpG ODN die Vakzine-induzierte Immunantwort gegen das Pankreaskarzinom verstärken kann, wurden Mäuse mit subkutanen Pankreastumoren 14 Tage nach Tumorinduktion mit der OVA/ISCOM-Vakzine, CpG ODN 1826 oder der Kombination aus beiden vakziniert. Die Kontrollgruppe erhielt PBS. Die Vakzinierung bestand aus zwei Injektionen im wöchentlichen Intervall. CpG ODN 1826 wurde in einer niedrigen Dosierung von 6 μg pro Maus verabreicht.

Weder CpG ODN 1826 noch die ISCOM-Vakzine allein beeinflussten das Tumorstadium oder die Überlebensrate der Mäuse mit etabliertem, subkutanem Pankreaskarzinom. Die Kombination aus beiden führte jedoch zur Regression bereits relativ großer Tumoren. Sieben Mäuse blieben über einen Beobachtungszeitraum von 90 Tagen tumorfrei und zwei von zehn Mäusen zeigten ein verlangsamtes Tumorstadium (Abb. 8A und B).

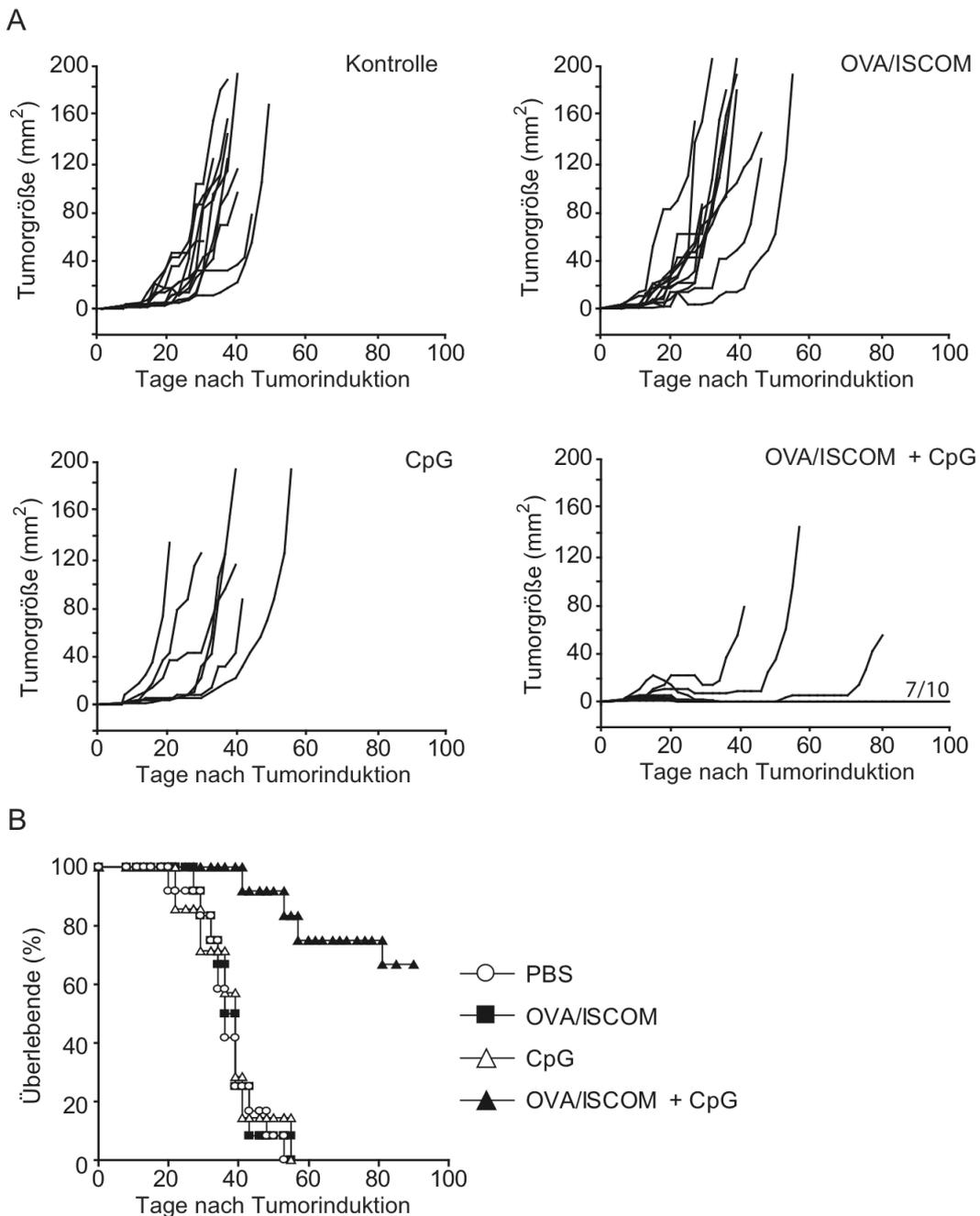


Abb. 8

Vakzinierung mit der OVA/ISCOM-Vakzine und CpG ODN 1826 in Kombination führt zu Tumorregression und Langzeitüberleben bei Mäusen mit subkutanem Pankreaskarzinom. Den Mäusen wurden subkutan PancOVA-Tumoren induziert und 14 Tage später wurden ihnen zweimal im wöchentlichen Intervall PBS, die ISCOM-Vakzine, CpG ODN 1826 oder die Kombination aus beiden injiziert. A) Die Daten zeigen die Tumorgößen von 7-10 Einzeltieren pro Gruppe. B) Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt die Überlebensrate in den verschiedenen Behandlungsgruppen.

3.5. Kombinationsbehandlung mit der OVA/ISCOM-Vakzine und CpG ODN 1826 führt zu Langzeitüberleben von Mäusen mit orthotopem Pankreaskarzinom

Als nächstes untersuchten wir die Wirkung der Tumorstimmulierung bei Mäusen mit chirurgisch implantierten, orthotopen Pankreastumoren (**Abb. 9**).

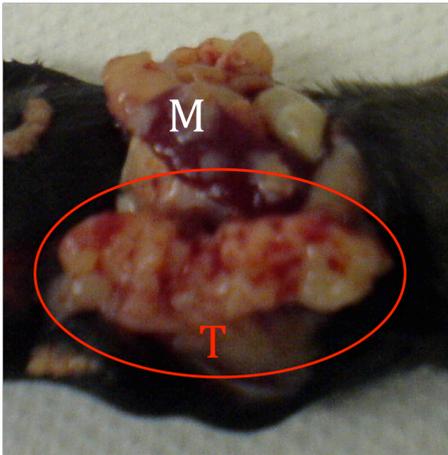


Abb. 9

Die Abbildung zeigt den Blick auf die eröffnete Bauchhöhle einer C57BL/6 Maus. Man sieht neben der Milz (M) das orthotope Pankreaskarzinom (T) 35 Tage nach Tumorinduktion umgeben von lokalen Metastasen.

Die Vakzinierung begann auch bei diesem Modell 14 Tage nach der Tumorinduktion. Die Mäuse, die mit OVA/ISCOM oder CpG ODN 1826 allein vakziniert wurden, entwickelten große Pankreastumoren und verstarben alle zwischen Tag 35 und 40. Von der Gruppe der Kombinationsvakzinierung aus der OVA/ISCOM-Vakzine und CpG ODN 1826 blieben acht von zehn Mäusen bis zum Ende der Beobachtungsperiode am Tag 90 tumorfrei (**Abb. 10**).

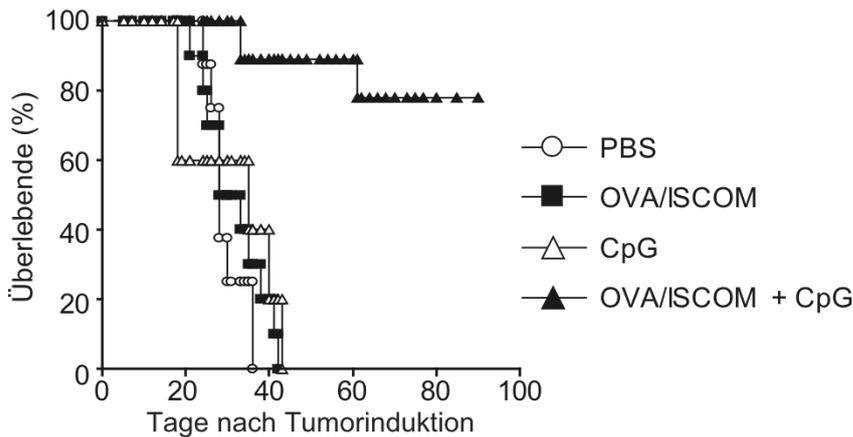


Abb. 10

Vakzinierung mit OVA/ISCOM und CpG ODN 1826 in Kombination führt zu Tumorregression und Langzeitüberleben bei Mäusen mit orthotopem Pankreaskarzinom. Den Mäusen wurden orthotop in das Pankreas PancOVA-Zellen gespritzt und 14 Tage später wurden ihnen viermal im wöchentlichen Intervall PBS, OVA/ISCOM, CpG ODN 1826 oder OVA/ISCOM kombiniert mit CpG ODN 1826 injiziert. Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt die Überlebensrate der verschiedenen Behandlungsgruppen.

3.6 Die OVA/ISCOM-Vakzine kombiniert mit CpG ODN 1826 führt zu einer hoch effektiven Aktivierung antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen und durchbricht die Tumor-induzierte Immunsuppression

Um die Effekte der kombinierten Vakzine aus OVA/ISCOM und CpG ODN 1826 auf die Immunantwort zu charakterisieren, wurde untersucht, ob die Vakzinierung in tumorfreien und in Mäusen mit PancOVA-Tumoren zu einer messbaren Induktion von OVA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen führt.

Die Zugabe von *low-dose* CpG (6 µg pro Maus) zur OVA/ISCOM-Vakzine führte zu einer signifikanten Erhöhung der OVA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in vakzinieren Mäusen ohne Tumor (8,48 ± 2,93 % vs. 25,38 ± 9,58 %) (**Abb. 11A**). Im Gegensatz dazu war *high-dose* CpG (100 µg pro Maus) in diesem Aspekt weniger effektiv (Daten sind nicht aufgeführt). Wie schon zuvor gezeigt war die Frequenz der CD8⁺ T-Zellen in Mäusen mit PancOVA-Tumor, die nur die OVA/ISCOM-Vakzine erhielten, signifikant reduziert (kein Tumor 8,48 ± 2,93 %, PancOVA 1,44 ± 1,02 %). Die Zugabe von *low-*

dose CpG führte zu einer kompletten Aufhebung der Tumor-induzierten Immunsuppression mit einer OVA-spezifischen CD8⁺ T-Zellzahl, die identisch mit der tumorfreier Mäuse war (kein Tumor 25,38 ± 9,58 %, PancOVA 26,34 ± 11,78 %) (**Abb. 11A**).

Bei den Mäusen konnte nach der Vakzinierung ein Anstieg der CD8⁺ T-Zellen im Tumorgewebe mittels Immunhistochemie beobachtet werden (**Abb. 11B**). Interessanterweise war dies sowohl in der Gruppe mit OVA/ISCOM als auch bei der Kombinationsgruppe mit CpG ODN 1826 zu sehen. Zudem war die Frequenz der regulatorischen CD4⁺ Foxp3⁺ T-Zellen im Blut bei Mäusen, die die Kombinationsvakzinierung erhielten, signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe und in der Gruppe, die nur die OVA/ISCOM-Vakzine erhielt (**Abb. 11C**). Im Tumorgewebe verringerte sowohl die Vakzinierung mit OVA/ISCOM als auch die Kombinationsvakzinierung die Anzahl der regulatorischen T-Zellen signifikant verglichen mit der Kontrollgruppe (**Abb. 11D**).

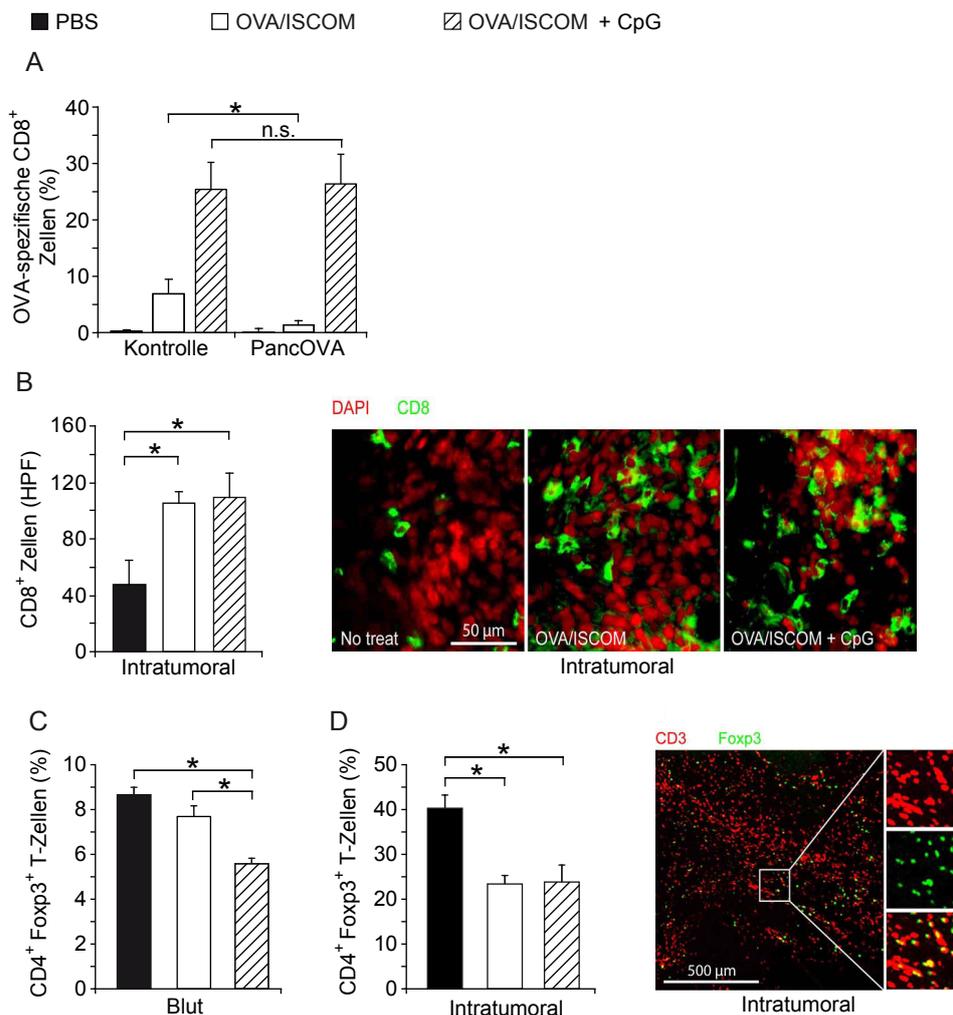


Abb. 11

Die OVA/ISCOM-Vakzine kombiniert mit CpG ODN 1826 führt zu einer hoch effektiven Aktivierung antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen und durchbricht die Tumor-induzierte Immunsuppression. Mäuse mit und ohne PancOVA-Pankreaskarzinom wurden mit der OVA/ISCOM-Vakzine allein oder kombiniert mit CpG ODN 1826 vakziniert. Sieben Tage nach der zweiten Vakzinierung wurde die Anzahl der OVA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Blut mittels Intrazellulärfärbung für IFN- γ nach *ex vivo* Peptidstimulation bestimmt (A). Die Anzahl von CD8⁺ T-Zellen im Tumorgewebe wurde mittels Immunhistochemie analysiert (B). Die prozentuale Anzahl der CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen im Blut verringerte sich durch die Kombinationsvakzinierung signifikant verglichen mit der Kontrollgruppe und der OVA/ISCOM-Gruppe (C). Im Tumorgewebe verringerte sowohl die Vakzinierung mit OVA/ISCOM als auch die Kombinationsvakzinierung die Anzahl der regulatorischen T-Zellen signifikant (D). Die Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM von 5 Mäusen pro Gruppe und Originalabbildungen der Immunhistochemie.

Da TLR9-Liganden sowohl CD8⁺ T-Zellen als auch NK-Zellen aktivieren, untersuchten wir im nächsten Schritt, welche dieser T-Zellpopulationen für das Töten der Tumorzellen verantwortlich ist. Vor der Vakzinierung wurden die CD8⁺ T-Zellen oder die NK-Zellen mittels monoklonaler Antikörper gegen CD8 oder NK1.1 depletiert. Mäuse die mit PBS oder OVA/ISCOM allein vakziniert wurden, entwickelten große Pankreaskarzinome, wohingegen alle Mäuse mit der Kombinationsvakzinierung aus OVA/ISCOM und CpG die Tumoren abstießen. Die Depletion der NK-Zellen hatte keinen Einfluss auf das Tumorwachstum oder das Überleben der Mäuse.

Die Depletion der CD8⁺ T-Zellen jedoch verhinderte nicht nur die Vakzine-induzierte Tumorregression, sondern führte sogar zu einem beschleunigten Tumorwachstum. Dies gibt einen Hinweis auf die entscheidende Rolle der CD8⁺ T-Zellen in der Tumorkontrolle (**Abb. 12**).

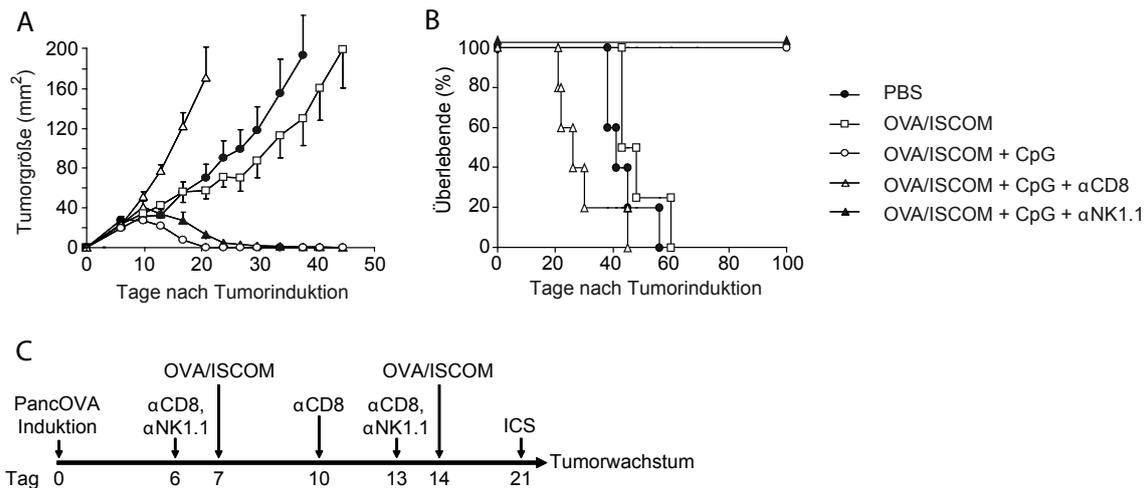


Abb. 12

Die Depletion von CD8⁺ T-Zellen verhindert die Vakzine-induzierte Tumorregression und führt zu einem beschleunigten Tumorwachstum. C57BL/6 Mäusen wurden subkutan PancOVA-Zellen gespritzt und 7 Tage später wurden ihnen zweimal im wöchentlichen Intervall PBS, die OVA/ISCOM-Vakzine allein oder in Kombination mit CpG ODN 1826 injiziert. Zuvor wurden die CD8⁺ T-Zellen oder die NK-Zellen durch die i.p. Injektion monoklonaler Antikörper gegen CD8 oder NK1.1 depletiert (Behandlungsprotokoll in (C)). Die Daten zeigen die Mittelwerte der Tumorgrößen von 5 Einzeltieren pro Gruppe ± SEM (A). Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt die Überlebensrate in den verschiedenen Behandlungsgruppen (B).

3.7 Die OVA/ISCOM-Vakzine kombiniert mit CpG ODN 1826 führt zu einer Th1-Immunantwort und einer Aktivierung von Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems in den Vakzine-drainierenden Lymphknoten

Um die Effekte der Kombinationsvakzinierung aus OVA/ISCOM und CpG ODN 1826 auf die Qualität der Immunantwort zu untersuchen, isolierten wir auf der Seite der Vakzinierung die drainierenden Lymphknoten sechs Stunden nach Vakzinierung, um die Zytokine zu messen und 24 Stunden nach Vakzinierung, um die Aktivierung der Leukozytenpopulationen zu untersuchen. Die Kombinationsvakzinierung induzierte ein effektives Th1-geprägtes Zytokinprofil mit hohen Konzentrationen von IFN- γ und IL-12p70 (**Abb. 13A**).

Die intrazelluläre Zytokinmessung der verschiedenen Leukozytenpopulationen im Lymphknoten zeigte eine IL-12p40/p70-Produktion durch CD11⁺CD8 α ⁺ dendritische Zellen (**Abb. 13B**). Die FACS-Analyse zeigte eine Aktivierung der B-Zellen, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, NK-Zellen, NKT-Zellen und der CD8 α ⁺ dendritischen Zellen in der Gruppe der Kombinationsvakzinierung (**Abb. 13C**). Im Gegensatz zum *high-dose* verabreichten CpG konnten wir keine signifikanten Veränderungen der Aktivierungsmarker in den kontralateralen Lymphknoten oder der Milz finden (Daten nicht aufgeführt).

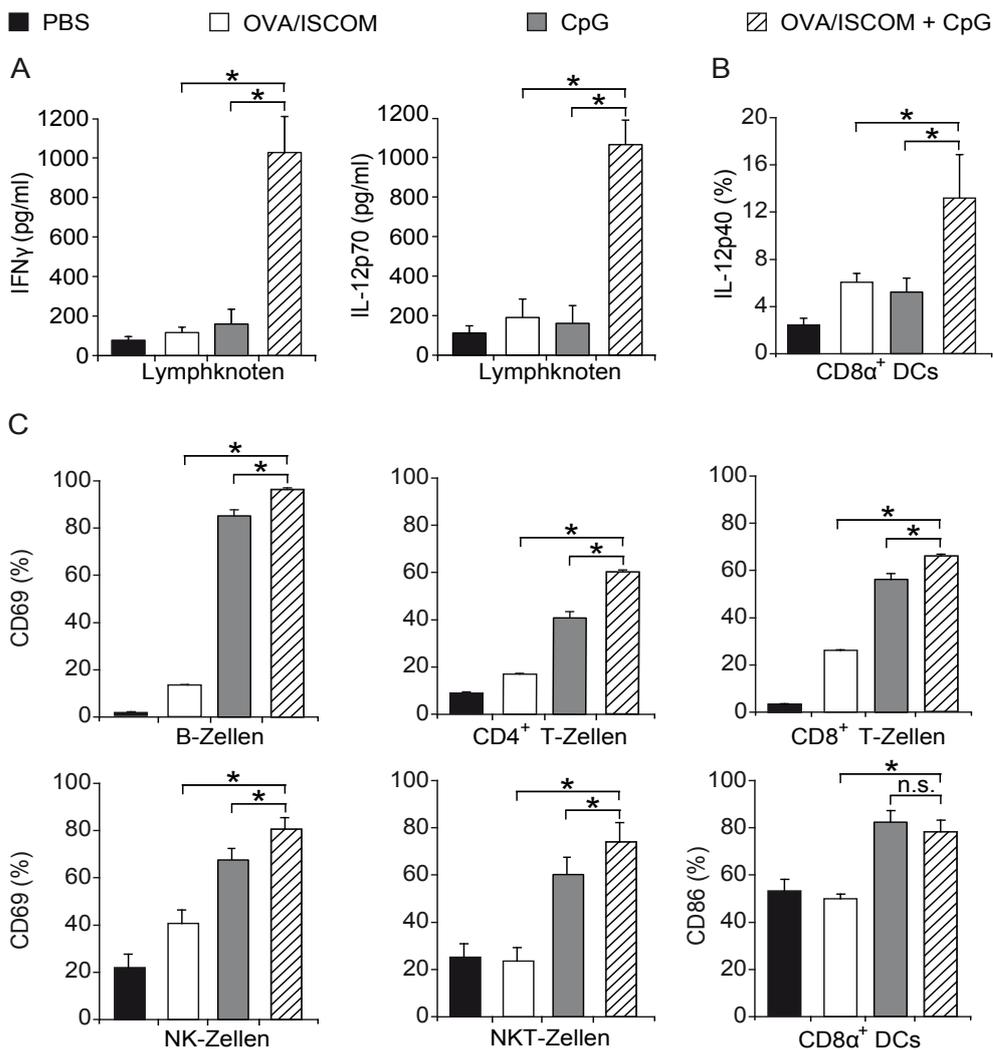


Abb. 13

Die Kombination der OVA/ISCOM-Vakzine mit CpG ODN 1826 führt zu einer Th1-Immunantwort und Aktivierung von Zellen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems im Vakzine-drainierenden Lymphknoten. (A) Mäuse mit PancOVA-Tumoren wurden wie angezeigt vakziniert und das Zytokinprofil im Vakzine-drainierenden Lymphknoten 6 Stunden danach mittels ELISA gemessen. (B) Die

intrazelluläre Zytokinmessung der verschiedenen Leukozytenpopulationen im Lymphknoten für die IL-12p40/70-Produktion durch CD11⁺CD8 α ⁺ dendritische Zellen nach 24 Stunden. (C) FACS-Analyse der CD19⁺ B-Zellen, CD3⁺CD4⁺ und CD3⁺CD8⁺ T-Zellen, NK1.1⁺ NK-Zellen, NK1.1⁺CD3⁺ NKT-Zellen und der CD11⁺CD8 α ⁺ dendritischen Zellen. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM der gepoolten Lymphknoten von 3 Mäusen pro Gruppe eines Versuches, welcher zweimal wiederholt wurde.

3.8 Induktion einer langanhaltenden Tumorprotektion und Nachweis von *epitope spreading*

Mäusen, die aufgrund der Kombinationsvakzinierung die Pankreaskarzinome abgestoßen hatten und 90 Tage tumorfrei blieben, wurden erneut Tumorzellen injiziert. Sie bekamen eine subkutane Injektion von PancOVA-Tumoren auf der linken Seite und von Wildtyp-Panc02-Tumoren auf der rechten Seite. Hiermit wurde untersucht, ob durch die Vakzinierung eine langanhaltende, immunvermittelte Tumorprotektion erreicht wurde.

Im Gegensatz zur Kontrollgruppe der naiven Mäuse, die zum ersten Mal Tumorzellen gespritzt bekamen und alle einen Tumor entwickelten, wurden in der Gruppe der Langzeitüberlebenden alle PancOVA-Tumoren abgestoßen (0 vs. 100 %), was einen Hinweis auf das Vorliegen einer immunologischen Gedächtnis-T-Zellantwort darstellt (**Abb. 14A**). In der Tat ließen sich nach erneuter Injektion von PancOVA-Tumorzellen OVA-spezifische T-Zellen im peripheren Blut nachweisen (2,20 % \pm 1,95 %) (**Abb. 14B**). Interessanterweise stießen vier von zehn Langzeit-Überlebenden auch die Panc02-Tumoren vom Wildtyp ab und zwei weitere Mäuse dieser Gruppe zeigten ein im Vergleich mit der Kontrollgruppe verlangsamtes Tumorstadium. Dies zeigt eine vakzineunabhängige Tumormunität bei 60% der Mäuse.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Eliminierung der Tumorzellen durch die vakzinespezifischen T-Zellen die Aktivierung weiterer CD8⁺ T-Zellen auslöst, die andere Tumorantigene erkennen. Dieses Phänomen wird auch als *epitope spreading* bezeichnet. Um diese Hypothese zu bestätigen, untersuchten wir die CD8⁺ T-Zellantwort gegen das Epitop p15E des Tumorantigens gp70, welches sowohl von den Tumorzellen des Wildtyps als auch von PancOVA-Zellen exprimiert wird. In Mäusen ohne Tumor und in nicht vakzinierten Mäusen mit PancOVA-Tumoren konnten

keine p15E-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut detektiert werden. In Mäusen, die zur Gruppe der Langzeitüberlebenden gehörten, ließen sich hingegen p15E-spezifische CD8⁺ T-Zellen nachweisen (0,96 % ± 0,68 %). Als Negativkontrolle diente ein Peptiditop von TRP2, einem Differenzierungsantigen spezifisch für Melanozyten, welches keine Reaktion hervorrief (**Abb. 14B**).

Diese Ergebnisse und die Anwesenheit von OVA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen mehr als drei Monate nach der Vakzinierung unterstreichen das Vorhandensein eines T-Zell-vermittelten immunologischen Gedächtnisses sowie von *epitope spreading* bei Langzeitüberlebenden aus der Gruppe der Mäuse, die mit der Kombinationsvakzinierung behandelt wurden.

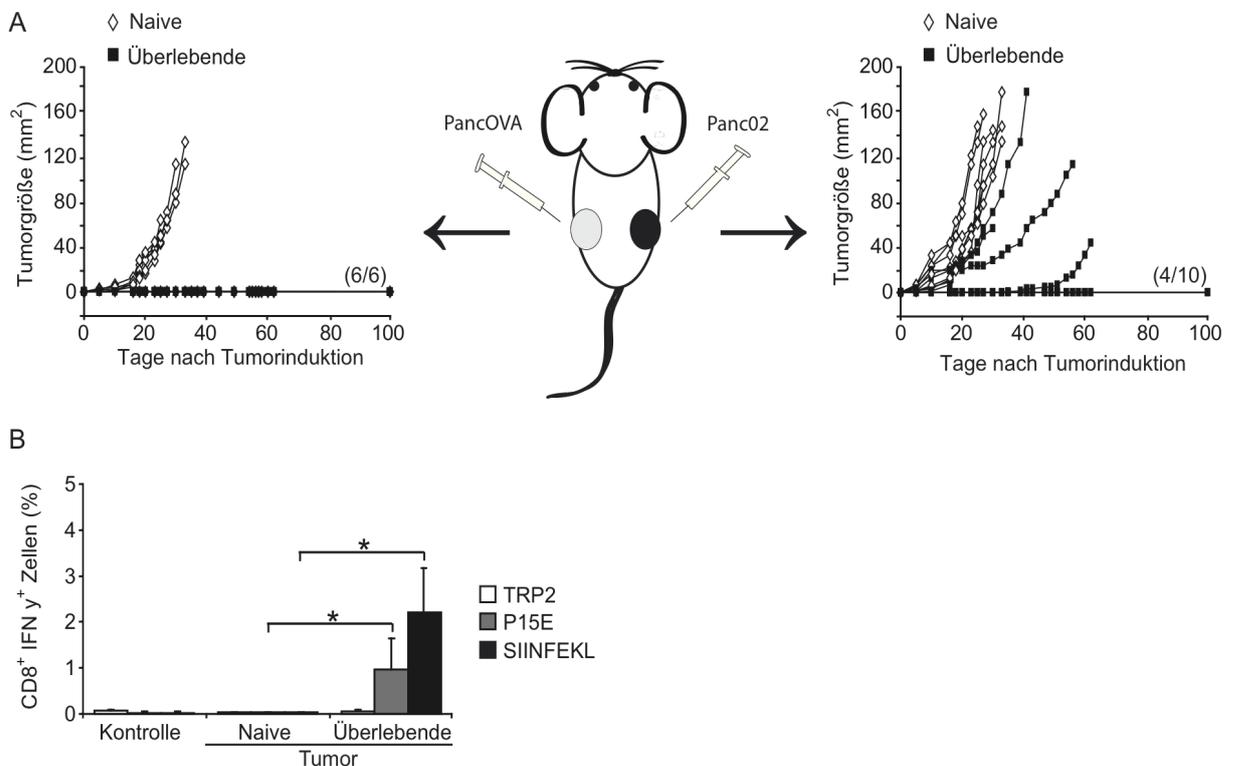


Abb. 14

Mäuse mit Vakzine-induzierter Tumorregression (Überlebende) zeigen eine Tumorspezifische Immunreaktion gegen PancOVA- und Wildtyp Panc02-Tumoren. A) Mäusen aus der kombinierten Vakzinierungsgruppe, welche ihre Tumoren abgestoßen hatten und 3 Monate tumorfrei blieben, und gleichaltrigen Kontrollmäusen wurden subkutan PancOVA-Tumorzellen (linke Flanke) und Panc02-Tumorzellen (rechte Flanke) injiziert. Die Daten zeigen den Verlauf der einzelnen Tumorgößen von 6-10 Mäusen pro Gruppe. B) Sieben Tage nach erneuter Tumorinduktion wurde den

Mäusen Blut abgenommen und die Anzahl antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen nach *ex vivo*-Stimulation mit H2-Kb-restringierten Peptiden von TRP2 (Differenzierungsantigen von Melanozyten, ohne Bezug), gp70 (p15E) (Tumor-assoziiertes Antigen, exprimiert von Panc02 und Panc OVA) und OVA (SIINFEKL, exprimiert in PancOVA) gemessen. Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM von 4-8 Mäusen pro Gruppe

4. Diskussion

4.1 Überblick über die Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Tumor-induzierten Immunsuppression bei Mäusen mit experimentellen Pankreaskarzinomen und der Versuch, diese durch eine Vakzinierungskombination aus immunstimulatorischen Komplexen (ISCOMs) und einem TLR9-Liganden (CpG ODN 1826) zu durchbrechen. Durchgeführt wurde diese Arbeit am Mausmodell mit OVA-transfizierten Panc02-Pankreaskarzinomen (PancOVA) und Wildtyptumoren (Panc02).

Eine prophylaktische Therapie mit einer OVA/ISCOM-Vakzine induzierte eine vollständige Protektion gegen anschließend injizierte PancOVA-Pankreaskarzinomzellen.

Die therapeutische Gabe derselben Vakzine bei bereits etablierten PancOVA-Pankreaskarzinomen blieb jedoch wirkungslos. Die Ursache hierfür fand sich in einer vom Tumor ausgehenden Immunsuppression, welche die Induktion einer effektiven T-Zellantwort durch die Vakzinierung verhinderte. Es fand sich eine drastisch reduzierte Anzahl OVA-spezifischer CD8⁺ T-Zellen im Blut der PancOVA-tragenden Mäuse. Um zu überprüfen, ob der Tumor die Antigenpräsentation von dendritischen Zellen beeinflusste, wurden CD8⁺ T-Zellen, die von OT-1-Mäusen stammten und das H2-Kb-restringierte OVA-Epitop SIINFEKL erkennen, mit CFSE markiert und den Mäusen intravenös injiziert. Anschließend wurden diese mit der OVA/ISCOM-Vakzine therapiert. PancOVA-Tumoren hatten keinen Einfluss auf die OT-1 T-Zell-Proliferation *in vivo*. Folglich werden die Antigenpräsentation der dendritischen Zellen und die damit verbundene CD8⁺ T-Zell-Stimulation durch den PancOVA-Tumor nicht beeinflusst.

Um die Funktion der zytotoxischen T-Zellen in tumortragenden Tieren zu testen, wurden den Mäusen CFSE-markierte und mit OVA-Peptid beladene Splenozyten als Zielzellen für die T-Zell-vermittelte Zellyse intravenös injiziert und die zytotoxische Aktivität der CD8⁺ T-Zellen *in vivo* gemessen. Die zytotoxische Aktivität der PancOVA-tragenden Mäuse war signifikant geringer als die der Kontrollmäuse, was jedoch mit der oben erwähnten geringeren Anzahl OVA-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in tumortragenden Mäusen korrelierte. Somit waren die CD8⁺ T-Zellen in den tumortragenden Tieren zwar in ihrer Anzahl reduziert, jedoch noch funktionsfähig.

Interessanterweise fanden sich bei Mäusen mit Pankreaskarzinom signifikant erhöhte Serumspiegel des immunsuppressiven Zytokins TGF- β .

Da die antigenspezifische Suppression der T-Zell-Antwort eine Eigenschaft von regulatorischen T-Zellen ist, die einerseits TGF- β produzieren und andererseits durch TGF- β induziert werden, untersuchten wir die Anwesenheit von regulatorischen T-Zellen im Blut, in den Lymphknoten, in der Milz sowie im Tumor bei tumortragenden Mäusen. Wir fanden in Korrelation zu den erhöhten TGF- β -Serumspiegeln eine signifikant erhöhte Anzahl regulatorischer T-Zellen bei Mäusen mit PancOVA-Pankreaskarzinomen. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch bei Patienten mit Pankreaskarzinomen gemacht und konnte als negativer Einfluss auf die Prognose des Krankheitsverlaufes bewertet werden (Liyanage et al., 2002; Hiraoka et al., 2006).

Da TLR-Liganden in der Lage sind, die hemmende Funktion von regulatorischen T-Zellen aufzuheben, wurde eine Kombination der OVA/ISCOM-Vakzine mit dem TLR9-Liganden CpG ODN 1826 untersucht. Weder CpG noch die OVA/ISCOM-Vakzine allein beeinflussten das Tumorwachstum oder die Überlebensrate der Mäuse mit etabliertem, subkutanem PancOVA-Pankreaskarzinom. Die Kombination aus beiden jedoch führte zur einer signifikanten antitumoralen Immunantwort mit Regression bereits relativ großer Tumoren.

Im nächsten Schritt wurde der therapeutische Effekt der kombinierten Vakzine bei Mäusen mit chirurgisch implantierten orthotopen Pankreastumoren untersucht. Die Mäuse, die mit der OVA/ISCOM-Vakzine oder CpG ODN 1826 allein behandelt wurden, starben ebenso wie die unbehandelten Tiere zwischen Tag 35 und 40. Im Gegensatz dazu blieben in der Gruppe der Kombinationsbehandlung 8 von 10 Mäusen über einen Beobachtungszeitraum von 90 Tagen tumorfrei.

Als Erklärung für den therapeutischen Effekt wurde die T-Zellantwort in den verschiedenen Gruppen analysiert. Die Kombinationsvakzine führte zu einer kompletten Aufhebung der Tumor-induzierten Immunsuppression mit einer Frequenz von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen, die identisch mit der tumorfreier Mäuse ohne Immunsuppression war. Weiterhin konnten wir eine Zunahme der OVA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Tumorgewebe beobachten. Zusätzlich war die Frequenz der regulatorischen T-Zellen im Blut bei Mäusen, die die Kombinationsvakzinierung

erhielten, signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe und in der Gruppe, die nur die OVA/ISCOM-Vakzine erhielt.

Mäuse, die aufgrund der Kombinationsvakzinierung die PancOVA-Tumoren abgestoßen hatten und für 90 Tage tumorfrei blieben, wurden subkutan erneut mit PancOVA-Tumoren auf der linken Seite und Wildtyp-Panc02-Tumoren auf der rechten Seite injiziert. Die erfolgreich therapierten Tiere stießen die PancOVA-Tumoren erneut ab, was einen Hinweis auf das Vorliegen einer langanhaltenden, T-Zell-vermittelten Gedächtnisimmunantwort darstellt.

Interessanterweise stießen auch einige Tiere die Panc02-Tumoren vom Wildtyp ab, was auf eine vakzineunabhängige Tumormunität hinweist. Bei Mäusen, die den Tumor erfolgreich abgestoßen hatten, fanden sich p15E-spezifische CD8⁺ T-Zellen. Diese Zellen erkennen gp70, ein Tumorantigen, welches sowohl von PancOVA als auch von den Tumorzellen des Wildtyps exprimiert wird, in gesunden Zellen jedoch nicht vorkommt. Diese Ergebnisse unterstreichen das Vorhandensein eines sogenannten *epitope spreading*, was die Induktion einer Tumorantigen-spezifischen T-Zellantwort gegen Antigene, welche nicht in der Vakzine vorkommen, bezeichnet. Somit erfüllt die Tumorkvakzine folgende, für eine effektive antitumorale Immunantwort wichtige Eigenschaften: a) Potente Induktion antigenspezifischer CTL, b) Durchbrechung Tumor-induzierter Immunsuppression, c) Induktion einer langanhaltenden T-Zell-Gedächtnisantwort und d) eines *epitope spreadings*.

4.2 Methodendiskussion

4.2.1 Die syngen Panc02- und PancOVA-Mausmodelle für Pankreastumoren

In dieser Arbeit wurde das Zusammenspiel von Tumor und Vakzine-induzierter Immunantwort am aggressiv wachsenden Panc02-Mausmodell untersucht. Um die klinische Situation noch näher zu imitieren, wurde zusätzlich zum subkutanen Modell ein orthotopes Pankreaskarzinommodell verwendet, bei dem die Tumorzellen orthotop in das Pankreas injiziert wurden.

Wir haben sowohl im subkutanen wie auch im orthotopen Modell immunsuppressive Phänomene gefunden, die auch klinisch von Bedeutung sind, wie beispielsweise

erhöhte Serumspiegel des immunsuppressiven Zytokins TGF- β (Lin et al., 2006) und eine erhöhte Anzahl von regulatorischen T-Zellen im Blut und im Tumor (Liyanage et al., 2002). Somit reflektiert das Panc02-Tumormodell Schlüsselphänomene des Pankreaskarzinoms beim Menschen und eignet sich für die präklinische Forschung.

In dieser Arbeit wurden sowohl Pankreaskarzinomzellen vom Wildtyp Panc02 als auch mit Ovalbumin (OVA) transfizierte PancOVA-Tumorzellen verwendet. Die Transfektion von Tumorzellen mit einem Antigen, wie in dieser Arbeit Ovalbumin, ist sinnvoll, um die Effektivität einer spezifisch gegen das Antigen gerichteten Immunantwort zu untersuchen. Diese spezifische Immunantwort wurde induziert, indem die Tiere mit einer OVA/ISCOM-Vakzine prophylaktisch oder therapeutisch behandelt wurden. Die dadurch aktivierten T-Zellen können auf ihre Spezifität überprüft werden und zusätzlich kann die Antigen-unabhängige Wirkung der induzierten Immunantwort gegen Wildtypumoren überprüft werden. Die Arbeitsgruppe von Maraskovsky vakzinierete Mäuse mit einer das Protein NY-ESO-1 enthaltenden ISCOM-Vakzine und konnten eine spezifische humorale und T-Zell-vermittelte Immunantwort gegen NY-ESO-1 nachweisen. Eine prophylaktische Vakzinierung mit der NY-ESO-1/ISCOM-Vakzine schützte die Mäuse vor nachfolgend induzierten Melanomen, die NY-ESO-1 exprimierten (Maraskovsky et al., 2004).

Kritikpunkte der subkutanen Tumormodelle bestehen aus dem tumorfremden und immunogenen Milieu des subkutanen Gewebes und der Technik der traumatischen Tumorinduktion. Schreiber et al. konnten zeigen, dass die subkutane Implantation von Tumorzellen zu einer Koagulationsnekrose führt und eine entzündliche Reaktion hervorruft (Schreiber et al., 2006). Diese entstehende Entzündung ist nicht physiologisch und könnte das Anwachsen des Tumors und die Immunantwort gegen den Tumor beeinflussen.

Um die Situation beim Menschen besser abzubilden, wurden in dieser Arbeit zudem orthotop implantierte Pankreaskarzinome untersucht. Diese führten zu einem expansiven Wachstum mit Metastasierung in das Peritoneum, die Milz und Leber. Bauer et al. untersuchten die Wirksamkeit der Vakzinierung mit dendritischen Zellen kombiniert mit Gemcitabin am Mausmodell mit subkutanen und orthotopen Pankreaskarzinomen. Diese Kombinationsvakzinierung führte zu einer Tumorspezifischen Immunantwort, reduzierte bei subkutan induzierten Tumoren das Tumorstadium und führte zu einer verlängerten Überlebenszeit. Als prophylaktische

Vakzinierung schützte die subkutane Gabe der Kombination aus dendritischen Zellen und Gemcitabin auch gegen nachfolgend induzierte orthotope Pankreaskarzinome (Bauer et al., 2007). Dies zeigte, dass die durch subkutane Vakzinierung induzierte systemische Immunantwort in der Lage ist, auch intraperitoneal das lokale Tumorwachstum zu hemmen.

Auch wir vakzinieren in dem orthotopen Modell subkutan und erreichten eine systemische Immunantwort, die sowohl prophylaktisch gegen nachfolgende Tumorinduktion effizient war als auch therapeutisch zur Ausheilung etablierter intraperitonealer Tumoren führte.

Das orthotope Modell reflektiert näher als das subkutane Modell die systemische Wirksamkeit einer durch subkutane Vakzinierung induzierten Immunantwort.

4.2.2 Diskussion der Vakzinierungsstrategie

4.2.2.1 OVA/ISCOM-Vakzine

Vakzine auf der Basis von immunstimulierenden Komplexen (ISCOMs), wie das bereits in vielen Studien untersuchte ISCOMATRIX[®], kombinieren ein Antigen-Deliverysystem mit der immunstimulierenden Wirkung von Saponin und sind in der Lage, dendritische Zellen *in vivo* zu stimulieren und eine humorale und zelluläre Immunantwort auszulösen (Drane et al., 2007). In dieser Arbeit wurde Ovalbumin als Antigen verwendet und mit ISCOMATRIX gekoppelt. Auch Robson et al. verwendeten eine ISCOM-basierte Vakzine mit OVA als Antigen und untersuchten die Immunantwort in gesunden Mäusen. Diese und weitere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass ISCOM-Vakzine hoch immunogen sind und in der Lage sind, durch effektive Ag-Präsentation durch dendritische Zellen T-Zellantworten zu stimulieren. Hierzu zählen die Induktion der MHC-I-restringierten, zytotoxischen T-Zell-Aktivität, die T-Zell-Proliferation, die Antikörperproduktion und Sekretion von Zytokinen durch Th1- und Th2-Zellen (Jager et al., 1998; Romero et al., 2001; Dutoit et al., 2002; Gnjatic et al., 2002).

Ein potenzielles Problem von ISCOM-Vakzinen ist deren Toxizität, welche durch das Saponin ausgelöst wird. Robson et al. untersuchten mittels Durchflusszytometrie die Vitalität von dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen, die mit einer ISCOM-

Vakzine kultiviert wurden. In den ersten zwei Stunden der Kultivierung konnten sie bei keiner Zellpopulation eine erhöhte Zelltoxizität feststellen. Nach sechs Stunden beobachteten sie eine konzentrationsabhängige Zelltoxizität bei Makrophagen und dendritischen Zellen. B-Zellen zeigten erst nach 24 Stunden eine konzentrationsabhängige Zelltoxizität durch die ISCOM-Vakzine. Dies zeigt, dass die Aktivierung von OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen durch dendritische Zellen nicht durch ein Vakzine-induziertes Absterben von Makrophagen oder B-Zellen bedingt ist. Sie konnten *in vitro* und *in vivo* nachweisen, dass lediglich die dendritischen Zellen für die Präsentation des Antigens und die Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen verantwortlich sind (Robson et al., 2003).

Die Induktion der CD4⁺ T-Zellantwort ist auf co-stimulierende Moleküle der dendritischen Zellen angewiesen, was die Reifung der dendritischen Zellen voraussetzt. Dies ist ein Hinweis, dass die ISCOM-Vakzine nicht nur die MHC-II-vermittelte Immunantwort induziert, sondern auch die Reifung der dendritischen Zellen stimuliert. Sallusto et al. konnten Antigen-beladene, stimulierte dendritische Zellen unmittelbar nach Vakzinierung aus dem drainierenden Lymphknoten isolieren. Für die Migration der Antigen-beladenen dendritischen Zellen aus der Haut in die Lymphknoten ist ein Reifungs-induzierter Wechsel der Zytokin-Rezeptoren auf den dendritischen Zellen notwendig (Sallusto et al., 1998). Dies unterstützt die Hypothese, dass ISCOM die Fähigkeit besitzt, die Reifung der dendritischen Zellen zu fördern.

4.2.2.2 Immunstimulation durch CpG ODN 1826

In diesen Versuchen wurde das CpG ODN 1826, ein Oligonukleotid der Klasse B, verwendet. CpG ODN der Klasse B weisen im Gegensatz zu CpG ODN der Klasse A keine Poly-G-Motive und kein Palindrom auf. Alle Bindungen von CpG ODN der Klasse B sind Phosphothioatbindungen. Die beiden CpG ODN-Klassen unterscheiden sich wesentlich in ihrer Wirkung (Krug et al., 2001). CpG ODN A führen zu einer starken Aktivierung der NK-Zellen, einer IFN- γ -Sekretion durch Splenozyten und einer IFN- α -Sekretion durch plasmazytoide dendritische Zellen. CpG ODN B aktivieren B-Zellen und TH1-Zellen. CpG-Oligonukleotide zeigen therapeutische Wirksamkeit bei Infektionskrankheiten, Tumoren und allergischen Erkrankungen. Die therapeutischen Ansätze basieren auf den folgenden Strategien:

Die Aktivierung Antigen-präsentierender Zellen und die Förderung der Antikörperproduktion macht CpG ODN zu einem geeigneten Adjuvans bei prophylaktischen und therapeutischen Vakzinen. Der Einsatz von CpG ODN als Vakzineadjuvans führt in Kombination mit herkömmlichen Vakzinen zu einem schnelleren und effektiveren Impfschutz (Krieg, 2006; Kanzler et al., 2007).

CpG ODN können zusätzlich die Immuntoleranz brechen und eine Immunreaktion gegen eigene Antigene hervorrufen. Dadurch sind sie als Immuntherapie für Tumoren und Adjuvansien für Tumorstoffe geeignet. Die Stimulation des angeborenen Immunsystems durch CpG ODN kann zur Therapie von Tumoren eingesetzt werden. CpG ODN und weitere TLR9-Agonisten befinden sich in der klinischen Untersuchung in Phase I, II und III-Studien für Lungenkarzinome, Non-Hodgkin-Lymphome, Nierenzellkarzinome und Colonkarzinome (Krieg, 2006).

Ein Kritikpunkt für den Einsatz von CpG ODN im murinen Modell stellt die Tatsache dar, dass TLR9-Liganden, die in Mäusen hochaktiv sind, in Menschen eine untergeordnete Rolle spielen könnten, bedingt durch die unterschiedliche Expressionsweise von TLR9 der dendritischen Zellen von Menschen und Mäusen (Krieg, 2007). In laufenden Studien untersucht unsere Arbeitsgruppe Kombinationen der ISCOM-Vakzine mit Liganden von TLR3, TLR4 und TLR7 und konnte auch für diese Liganden erhöhte CD8⁺ T-Zell-Immunantworten und Antitumor-Effekte beobachten (Daten nicht in dieser Arbeit gezeigt).

Folglich stellt die Aktivierung der dendritischen Zellen über TLR einen generalisierten Mechanismus dar, um die Tumor-induzierte Immunsuppression zu durchbrechen (Pasare und Medzhitov, 2003).

4.3 Eigene Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur

4.3.1 Effekte der prophylaktischen Vakzinierung

Die prophylaktische Vakzinierung mit der OVA/ISCOM-Vakzine bestand aus einer zweimaligen subkutanen Injektion im wöchentlichen Intervall. Hiermit konnte in dieser Arbeit eine potente CD8⁺ T-Zellantwort induziert werden und es bestand für die vakzinieren Mäuse ein vollständiger Schutz gegen eine nachfolgende Tumorinduktion

mit PancOVA Tumoren. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die die Effektivität von ISCOM-Vakzinen in prophylaktischen Tumormodellen untersuchten. Beacock-Sharp und Kollegen untersuchten die Effektivität einer ISCOM-Vakzine ebenfalls mit dem Modellantigen OVA an gesunden Mäusen und konnten eine Aktivierung sowohl der CD4⁺ T-Zellen als auch der CD8⁺ T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten beobachten. Auch nach Depletierung der CD4⁺ T-Zellen konnten sie eine Proliferation der CD8⁺ T-Zellen beobachten, welche somit als unabhängig von der CD4⁺ T-Zellantwort zu sehen ist. Nach Restimulierung dieser Zellen *in vitro* proliferierten diese und sezernierten IFN- γ (Beacock-Sharp et al., 2003).

Das Ziel von Robson und der Arbeitsgruppe von Prof. Moxat war es nun herauszufinden, welche Antigen-präsentierende Zelle für die resultierende T-Zellantwort nach Vakzinierung verantwortlich war. Daher untersuchten sie die dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen bei Mäusen nach der Injektion der OVA/ISCOM-Vakzine und konnten *in vitro* und *in vivo* zeigen, dass nur die dendritischen Zellen verantwortlich sind für die induzierte T-Zellantwort. Weder Makrophagen, noch B-Zellen waren verantwortlich für die Aufnahme und Präsentation des ISCOM-gebundenen Antigens OVA. Um eine vergleichbare Immunantwort mit OVA-Protein alleine ohne ISCOM zu erreichen, musste eine 30 bis 40 Mal höhere Menge an OVA-Protein verwendet werden (Robson et al., 2003).

Die Arbeitsgruppe von Prof. Maraskovsky generierte eine ISCOM-Vakzine mit dem Tumorantigen NY-ESO-1, welches unter anderem von malignen Melanomen exprimiert wird und konnte mit *in vitro* Versuchen zeigen, dass NY-ESO-1 von menschlichen dendritischen Zellen aufgenommen wird, was zu einer effektiven CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantwort führt (Schnurr et al., 2005). Mäuse, die mit der NY-ESO-1-Vakzine behandelt wurden, entwickelten eine antigenspezifische T-Zellantwort, die einen Schutz gegen eine spätere Tumorinduktion mit NY-ESO-1-exprimierenden Tumoren in HLA-A2-transgenen Mäusen bewirkte (Maraskovsky et al., 2004).

Stewart et al. kombinierten ISCOM mit den Virusantigenen E6 und E7, welche in Zusammenhang mit dem humanen Papillomavirus Typ 16 (HPV16) eine Assoziation mit der Entwicklung des Cervixkarzinoms vorweisen. Mäuse, die mit dieser Vakzine behandelt wurden, entwickelten eine effektive CD8⁺ T-Zellantwort und einen Schutz gegen nachfolgende subkutane Tumorinduktion (Stewart et al., 2004).

ISCOM-Vakzine sind somit in der Lage, in tumorfreien Mäusen über eine Antigenpräsentation durch dendritische Zellen eine hocheffektive CD8⁺ T-Zellantwort zu induzieren, was zu einem Schutz vor nachfolgender Tumorinduktion führt.

4.3.2 Therapeutische Vakzinierung im PancOVA-Modell

Die Vakzinierung mit der OVA/ISCOM-Vakzine bei bereits etablierten Pankreastumoren war im Gegensatz zur prophylaktischen Vakzinierung in unseren Experimenten ineffektiv und konnte weder das Tumorwachstum noch die Überlebenszeit der Mäuse beeinflussen. Dieser fehlende Therapieeffekt ist am ehesten auf die Tumor-induzierte Immunsuppression zurückzuführen. Dies spiegelte sich in den immunologischen Untersuchungen dieser Arbeit wider, die zeigten, dass Mäuse mit etablierten Tumoren im Vergleich zur Kontrollgruppe nach der Vakzinierung eine signifikant verringerte Anzahl OVA-spezifischer CD8⁺ T-Zellen im Blut vorwiesen.

Unsere Untersuchungen korrelieren mit zwei klinischen Studien einer australischen Arbeitsgruppe, in denen NY-ESO-1/ISCOM-Vakzine zuerst bei Patienten nach Entfernung des Tumors und in einer Folgestudie bei fortgeschrittenen, malignen Melanomen eingesetzt wurden. In der Studie von Davis et al. wurden 46 Patienten vakziniert, bei denen ein NY-ESO-1-exprimierender Tumor reseziert worden war. Bei den meisten Patienten handelte es sich hierbei um maligne Melanome. Das Vakzinierungsprotokoll bestand aus dreimaliger, intramuskulärer Gabe der Vakzine im monatlichen Intervall. Während die alleinige Gabe des NY-ESO-1 Proteins zu keiner nennenswerten Immunantwort führte, konnte die Therapie mit der NY-ESO-1/ISCOM-Vakzine die Immunantwort bei allen Patienten signifikant verstärken, was zu einer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Immunantwort gegen NY-ESO-1 führte. Eine *post hoc*-Analyse ergab, dass die Wahrscheinlichkeit der Entstehung eines Tumorezidivs bei diesen Patienten herabgesetzt wurde. Einschränkend muss gesagt werden, dass die Gruppengröße jedoch für diese Fragestellung zu klein gewählt wurde (Davis et al., 2004).

Nicholaou et al. benutzten dieselbe NY-ESO-1/ISCOM-Vakzine, vakzinierten jedoch 27 Patienten mit inoperablen malignen Melanomen im fortgeschrittenen Stadium III und IV. Die Vakzinierung bestand aus drei intramuskulären Injektionen im monatlichen Intervall. Bei nicht progressivem Tumorwachstum, erhielten die Patienten zusätzlich

einen zweiten Zyklus mit drei Injektionen. Dennoch konnte lediglich bei einem Patienten eine Stagnation des Tumorwachstums erreicht werden. Die Frequenz der spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gegen das NY-ESO-1-Antigen war sehr gering und bei den meisten Patienten schon vor der Vakzinierung vorhanden (Nicholaou et al., 2009).

Die Ursache hierfür lag nach Meinung der Autoren in der Tumor-induzierten Immunsuppression. Um diese genauer zu charakterisieren, untersuchten sie die Anzahl der regulatorischen T-Zellen der Tumorpatienten verglichen mit deren Anzahl in der Kontrollgruppe. Patienten im fortgeschrittenen Tumorstadium hatten eine signifikant erhöhte Anzahl an regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut. Auch Patienten mit kleinen Tumorbefunden wiesen eine leicht erhöhte Anzahl an regulatorischen T-Zellen auf. Die Anzahl der regulatorischen T-Zellen war vor und nach Vakzinierung gleich, so dass die Vakzinierung keinen Einfluss auf die Anzahl der regulatorischen Zellen hatte. Somit korreliert ein fortgeschrittenes Tumorstadium mit der Anzahl der regulatorischen T-Zellen, was möglicherweise eine Hemmung der Effektivität der ISCOM-Vakzinierung bewirkt. Diese Hemmung scheint auch nicht durch eine gesteigerte Vakzinierungsfrequenz aufgehoben werden zu können.

4.3.3 Analyse der Tumor-induzierten Immunsuppression

Eine pathologische Interaktion zwischen Tumorzellen und den eigenen Immunzellen in der Tumorumgebung schafft eine immunsuppressive Situation, welche ein Tumorwachstum unterstützt, den Tumor vor Immunattacken schützt und die Effizienz von immuntherapeutischen Ansätzen vermindern kann. Tumorzellen entwickeln Mechanismen, mit welchen sie einer Immunerkennung entkommen können (Rabinovich et al., 2007).

Die Hemmung des Immunsystems mit der Folge der insuffizienten T-Zellantwort kann auf verschiedenen Ebenen beeinflusst werden: Einschränkung der Fähigkeit zur Antigenpräsentation durch dendritische Zellen, Verringerung der Anzahl aktivierter T-Zellen, Verlust der T-Zell-Funktion oder Inhibition der T-Zellfunktion und Proliferation regulatorischer T-Zellen.

Nach adoptivem Transfer von OT-1-T-Zellen in tumortragende Mäuse konnten wir eine normale T-Zell-Proliferation nach Vakzinierung beobachten, was gegen eine defekte Antigenpräsentation durch die dendritischen Zellen spricht. Weiterhin war trotz Reduktion der Anzahl von spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Blut deren Zytotoxizität effektiv, was auf eine intakte Funktion der T-Zellen trotz Anwesenheit des Tumors rückschließen lässt.

Hohe Serumspiegel von TGF- β und eine durch dieses Zytokin vermittelte Zunahme von regulatorischen T-Zellen scheinen eine ausschlaggebende Rolle in der Immunsuppression durch das Pankreaskarzinom einzunehmen. Es konnte gezeigt werden, dass TGF- β sowohl in der Lage ist, T-Helferzellen in einen anergischen Zustand zu versetzen, als auch deren Umwandlung in regulatorische T-Zellen zu fördern (Chen et al., 2003). Auch im Panc02-Modell fanden sich signifikant erhöhte Serumspiegel von TGF- β bei Mäusen mit Pankreaskarzinom.

Bei der Untersuchung der Frequenz von regulatorischen T-Zellen fanden wir eine signifikant erhöhte Anzahl regulatorischer T-Zellen im Blut, in Lymphknoten und in der Milz, sowie eine dichte Infiltration im Tumor selbst bei Mäusen mit Pankreaskarzinom. Besonders die dichte Infiltration von regulatorischen T-Zellen im Tumor könnte eine kritische Rolle für die T-Zell-Regulation und die Effektivität der Immunantwort spielen. Dies bestätigte auch eine aktuelle Studie, die zeigte, dass die Invasion von regulatorischen T-Zellen in Panc02-Tumoren über den CCR5-Signalweg gesteuert wird. Regulatorische T-Zellen exprimieren den Chemokinrezeptor CCR5 und Pankreaskarzinomzellen produzieren große Mengen an Liganden für CCR5. Sowohl die Blockierung der Ausschüttung der Liganden als auch die Blockierung von CCR5 auf den regulatorischen Zellen führte zu einer Hemmung des Tumorwachstums (Tan et al., 2009). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass durch eine Depletion der regulatorischen T-Zellen mittels anti-CD25-Antikörper vor der OVA/ISCOM-Vakzinierung die Induktion einer CD8⁺ T-Zell-vermittelten Immunantwort über CD8⁺ T-Zellen bei tumortragenden Mäusen verbessert werden konnte, was zu einem längeren Überleben der Mäuse führte (Jacobs et al., 2010).

Folglich spielen regulatorische T-Zellen eine entscheidende Rolle in der Immunsuppression durch das Pankreaskarzinom beim Menschen als auch im Panc02-Tumormodell, so dass dies einen Fokus weiterer Untersuchungen darstellt. Mögliche Strategien, die Funktion von regulatorischen T-Zellen zu hemmen, sind deren Depletion

mit CD25-mAK mit und ohne Toxinkopplung (Imai et al., 2007; Leao et al., 2008), Chemotherapeutika wie niedrig-dosiertes Cyclophosphamid sowie TLR-Liganden (Conroy et al., 2008). Ein weiterer interessanter Ansatz besteht in der Hemmung von CTLA-4 mit spezifischen Antikörpern, wodurch eine immunologische „Bremse“ gelöst wird und die Wirkung der regulatorischen T-Zellen aufgehoben wird (Tarhini und Iqbal, 2010).

4.3.4 Durchbrechung der Immunsuppression durch die Kombination der OVA/ISCOM-Vakzine mit CpG ODN 1826

Eine vielversprechende Strategie, die über die regulatorischen T-Zellen vermittelte Immunsuppression zu durchbrechen, liegt in der Aktivierung von dendritischen Zellen über den MyD88-vermittelten Signaltransduktionsweg, welcher durch TLR-Liganden induziert wird (Pasare und Medzhitov, 2003). Mehrere TLR-Liganden befinden sich in der klinischen Erprobung. Diesbezüglich sind CpG ODN, welche den TLR9 aktivieren, am weitesten fortgeschritten und wurden bereits in klinischen Phase II und III Studien untersucht (Krieg, 2007).

In dieser Arbeit wurde die OVA/ISCOM-Vakzine mit CpG ODN 1826 in niedriger Dosis kombiniert und es konnte eine signifikant verstärkte Induktion der CD8⁺ T-Zellantwort sowohl in tumorfreien, als auch in tumortragenden Tieren festgestellt werden. Die niedrig dosierten CpG ODN induzierten eine potente Aktivierung der angeborenen und erworbenen Effektorzellen in den Vakzine-drainierenden Lymphknoten, sowie eine Aktivierung einer Th1-Immunantwort mit hohen Konzentrationen von IL-12p70 und IFN- γ in der Kombinationsvakzine. Systemische Nebenwirkungen wie Splenomegalie oder Destruktion der Lymphfollikel konnten wir nicht feststellen. Eine Splenomegalie trat lediglich bei der Vakzinierung mit hochdosierten CpG ODN auf (Daten nicht abgebildet), was mit den Ergebnissen einer weiteren Arbeit korreliert, in der ebenfalls bei Verwendung von hochdosierten CpG ODN systemische Nebeneffekte auftraten (Heikenwalder et al., 2004).

Die Frequenz antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen war bei der Vakzinierung mit niedrigdosierten CpG ODN höher als bei der Verwendung von hochdosierten CpG ODN, somit scheint die Dosierung einen wichtigen Einfluss auf die optimale Immunstimulation zu haben. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in der reduzierten

Antigenaufnahme durch dendritische Zellen bei systemischer Immunaktivierung liegen (eigene Daten, hier nicht aufgeführt).

Die Kombination der OVA/ISCOM-Vakzine mit niedrigdosiertem CpG ODN 1826 war in der Lage, die Tumor-induzierte Immunsuppression vollständig aufzuheben und führte trotz der Anwesenheit zum Teil großer Tumoren zu 1.) einer effektiven antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellinduktion, 2.) einer CD8⁺ T-Zellmigration in das Tumorgewebe, 3.) einer Reduktion der regulatorischen T-Zellen im Blut und im Tumor und 4.) einem effektiven Abtöten von Tumorzellen vermittelt durch CD8⁺ T-Zellen.

Ob andere TLR-Liganden vergleichbare Effekte erzielen, ist Gegenstand aktueller Studien unserer Arbeitsgruppe.

4.3.5 Induktion einer langanhaltenden, T-Zell-vermittelten Gedächtnisantwort und von *epitope spreading*

Eine wichtige Aufgabe des erworbenen Immunsystems ist die Generierung einer immunologischen Gedächtnisantwort, durch welche das Immunsystem in der Lage ist, schnell und effektiv auf bekannte Antigene bei erneuter Exposition zu reagieren. Mäuse, die das Pankreaskarzinom durch die Vakzinierung mit der ISCOM-Vakzine und CpG ODN 1826 abgestoßen hatten, waren gegen eine erneute Tumorinduktion geschützt. Dies liefert einen wichtigen Hinweis auf das Vorliegen eines immunologischen Gedächtnisses. Dies korrelierte mit der Anwesenheit von OVA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen noch 3 Monate nach erfolgter Tumorabstoßung.

Die Arbeitsgruppe von Tross et al. beobachteten nach Vakzinierung mit Anthrax Vakzine (AVA) und CpG ODN ebenfalls einen deutlich länger anhaltenden Antikörperspiegel als nach der Vakzinierung mit AVA alleine. Und auch nach über einem Jahr bestand bei Mäusen, die mit Antigen und CpG ODN vakziniert wurden, ein anhaltender Impfschutz trotz abfallender Antikörpertiter. Ihre Untersuchungen ergaben, dass diese Immunität durch einen Pool von hochaffinen Gedächtnis-B-Zellen gebildet wird, die in der Lage sind, unmittelbar bei erneutem Antigenkontakt protektive Antikörper zu bilden. Mäuse, die mit AVA und CpG ODN vakziniert wurden, hatten signifikant mehr und höher affine Gedächtnis-B-Zellen als Mäuse, die nur mit AVA vakziniert wurden (Tross und Klinman, 2008).

Die durch CpG ODN induzierten Effekte auf das Immunsystem wie Aktivierung des angeborenen Immunsystems, Induktion von Th1-Zytokinen und Reifung der dendritischen Zellen scheinen als multifaktorielles Geschehen für diese Gedächtnisantwort verantwortlich zu sein.

Zusätzlich entwickelten in unseren Untersuchungen 60 Prozent der erfolgreich therapierten Mäuse auch eine protektive Immunantwort gegen den Wildtyp Panc02-Tumor, dessen Zellen das OVA-Antigen nicht exprimieren. Diese Ergebnisse lassen die Spekulation zu, dass die erfolgreiche Immuntherapie eine Aktivierung von tumorreaktiven CD8⁺ T-Zellen induziert, die auch Vakzine-unabhängige Tumorantigene erkennen. Dieses Phänomen wird allgemein als *epitope spreading* bezeichnet. Ribas et al. ordnen dem *epitope spreading* eine Schlüsselrolle in der Tumorthherapie zu. Hierbei lösen Antigene, die nicht Bestandteil der Vakzine sind, eine Immunantwort aus. Entstehen kann dies unter anderem durch die Kreuz-Präsentation von Tumorantigenen aus getöteten Tumorzellen durch dendritische Zellen in den Tumor-drainierenden Lymphknoten. Sie analysierten fünf klinischen Studien und konnten zeigen, dass die Frequenz der antigenspezifischen Immunantwort, die durch die Vakzinierung induziert wurde, nicht mit dem klinischen Erfolg, wie Tumorregression und Überlebensrate, korrelierte (Ribas et al., 2003).

Andere Faktoren, wie z.B. das *epitope spreading*, scheinen diesbezüglich eine wichtigere Rolle zu spielen. Drei andere Studien untersuchten Patienten, bei denen es durch die Vakzinierung zu einer Tumorregression gekommen war, hinsichtlich des *epitope spreadings* und konnten bei allen Patienten Hinweise auf ein *epitope spreading* feststellen (Brossart et al., 2000; Ranieri et al., 2000; Lally et al., 2001).

Eine weitere Studie konnte nach Vakzinierung von Patienten mit malignen Melanomen auf Basis von dendritischen Zellen bei denjenigen Patienten, die einen klinischen Erfolg zeigten, eine Immunreaktion gegen Antigene nachweisen, die nicht zu der Vakzinierung gehörten. Bei den Patienten, die keine Tumorregression entwickelten, konnte lediglich eine Vakzine-spezifische Immunantwort nachgewiesen werden (Butterfield et al., 2003).

Diese Daten unterstreichen die klinische Relevanz dieses immunologischen Phänomens. Auch wir konnten eine erhöhte Frequenz an p15E-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in Mäusen nachweisen, die den Tumor erfolgreich abgestoßen hatten. Diese T-

Zellen fehlten in tumortragenden Mäusen, die nicht vakziniert wurden. Das Epitop p15E wird durch Zellen des Wildtyp Panc02-Tumors exprimiert (Bauer et al., 2007) und war nicht Bestandteil der Vakzinierung.

Folglich ist die OVA/ISCOM-Vakzine in der Lage, ein *epitope spreading* zu induzieren und damit die CD8⁺ T-Zellimmunantwort gegen verschiedene Tumorenantigene zu streuen, die nicht in der Vakzinierung enthalten sind. Wie diese T-Zellen induziert werden, ist bislang unklar. Ribas et al. sehen den Ursprung des *epitope spreadings* in der Kreuzpräsentation des Vakzine-Antigens durch dendritische Zellen und einem damit verbundenen *cross-priming* von T-Zellen gegen Determinanten des Tumors, die nicht Bestandteil der Vakzinierung waren (Ribas et al., 2003).

Eine weitere Erklärung könnte die Aktivierung bereits vorhandener antitumoraler T-Zellen durch die Vakzinierung sein. Diese T-Zellen waren möglicherweise durch die Tumor-induzierte Immunsuppression anerg geworden und sind nach Aufhebung der suppressiven Mechanismen durch die Vakzinierung als „*bystander*“ wieder aktiviert worden. Auch Dunn et al. beschreiben in ihrer „*Cancer immunoediting*“-Hypothese eine Phase (*Equilibrium*), in der sich Lymphozyten im Tumorareal befinden, aber durch die Tumor-induzierte Immunsuppression nicht aktiv genug sind, um den Tumor zu bekämpfen (Dunn et al., 2002). Da dieser Phase ohne effektive Vakzinierung die Phase des *Tumor escapes* folgt, könnte das Vorhandensein des *epitope spreadings* ausschlaggebend sein, ob eine Vakzinierung klinisch erfolgreich ist oder nicht.

4.3.6 Klinische Relevanz

Die Entwicklung von „*off the shelf*“-Vakzinen mit immunstimulierenden Komplexen (ISCOM) gekoppelt an verschiedene Antigene stellt einen neuen Ansatz in der Therapie von Infektionen und malignen Erkrankungen dar. Diese Vakzine verstärken die immunstimulierende Wirkung von Antigenen, die meist nur niedrig immunogen sind und ohne die Vakzine in vielfach höherer Dosis injiziert werden müssten. Auch das mühsame und kostspielige Generieren von dendritischen Zellen, die in klinischen Studien in Kombination mit Tumorantigenen verwendet werden, um eine Immunantwort zu induzieren, wird durch die ISCOM-Vakzine hinfällig.

Die bisherigen ISCOM-Vakzine mit rekombinant hergestellten Antigenen wie NY-ESO-1, E6E7 (HPV), bzw. Ovalbumin induzierten neben einer starken Antikörperproduktion auch effektive T-Zell-Antworten, die in Tumormodellen einen protektiven Schutz gegen eine nachfolgende Tumorinduktion vermittelten.

Das Problem der Vakzinierung liegt bei malignen Erkrankungen in der Tumor-induzierten Immunsuppression, die das Auslösen einer effektiven Immunantwort erschwert und somit die klinischen Erfolge der Vakzinierung verhindert. Die Überwindung dieser Tumor-induzierten Immunsuppression gelingt durch die zusätzliche Gabe von TLR-Liganden, die in der Lage sind, die Immunsuppression aufzuheben und in Kombination mit ISCOM-Vakzinen eine effektive Immunaktivierung auszulösen.

Durch die Verwendung von ISCOM-Vakzinen ist es möglich, die dendritischen Zellen direkt *in vivo* mit dem Antigen zu beladen ohne eine *ex vivo* Manipulation mit *in vitro* generierten dendritischen Zellen durchführen zu müssen. Hierdurch wird eine effektive Kreuzpräsentation des Antigens erzielt und eine Induktion von zytotoxischen T-Zellen erreicht.

Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass in diesem Vakzinierungskonzept vollständige Proteine verwendet werden, so dass eine HLA-Restriktion wie bei Peptiden entfällt. Die so mögliche Induktion von CD4⁺ T-Zellen ist entscheidend für das Erlangen eines Gedächtniseffektes, der notwendig ist, um eine lang anhaltende Tumorprotektion zu erreichen.

Die optimalen Anwendungsbereiche für dieses Vakzinierungskonzept liegen wahrscheinlich im Bereich von Infektionserkrankungen, frühen Tumorstadien und adjuvanten Tumortherapien, da bei diesen Krankheitsbildern die Immunsuppression noch nicht so stark ausgeprägt ist wie bei bereits fortgeschrittenen Tumorerkrankungen.

5. Zusammenfassung

Eine zentrale Aufgabe des Immunsystems besteht neben der Bekämpfung von Infektionen in der Erkennung und Eliminierung maligne entarteter Zellen im Organismus. Maligne Tumoren entwickeln Mechanismen zur Umgehung der Erkennung durch das Immunsystem und zur Supprimierung seiner Effektorzellen. Die hier beschriebene Immuntherapie mit einer OVA/ISCOM-Vakzine in Kombination mit CpG-Oligonukleotiden als Adjuvans stellt einen neuen Ansatz dar, diese Abwehrmechanismen von Malignomen durch Stimulation des angeborenen und des adaptiven Immunsystems zu überwinden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war der Einsatz dieser Vakzinierungskombination für die Immuntherapie des Pankreaskarzinoms. Für präklinische Untersuchungen erfolgte eine prophylaktische und therapeutische Vakzinierung bei subkutanen und orthotopen Panc02-Pankreaskarzinomen im Mausmodell. Hierfür verwendeten wir eine OVA/ISCOM-Vakzine und murine Panc02-Pankreaskarzinomzellen, die mit dem Modellantigen Ovalbumin (OVA) transfiziert wurden. Die Zellen führten mit nahezu hundertprozentiger Penetranz sowohl subkutan als auch orthotop zur Ausbildung von Pankreaskarzinomen.

Zunächst wurden die Mäuse prophylaktisch zweimal subkutan vakziniert und anschließend erfolgte die Tumorinduktion. Die Vakzinierung mit der OVA/ISCOM-Vakzine allein reichte aus, um bei allen Versuchstieren einen Schutz gegen eine nachfolgende Tumorinduktion zu erlangen.

Die therapeutische Gabe derselben Vakzine bei bereits etablierten Pankreaskarzinomen blieb wirkungslos. Als Erklärung hierfür fanden wir eine ausgeprägte Immunsuppression in den tumortragenden Tieren mit reduzierter Anzahl antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen im Blut nach erfolgter Vakzinierung.

In weiteren Tests konnten wir signifikant erhöhte Serumspiegel des immunsuppressiven Zytokins TGF- β und eine signifikant erhöhte Anzahl regulatorischer T-Zellen nachweisen. Deren Hauptaufgabe besteht in der Suppression der T-Zell-Antwort. Die erhöhte Anzahl von regulatorischen T-Zellen fand sich sowohl im Blut als auch in den lymphatischen Organen und im Tumor bei Mäusen mit Pankreaskarzinom.

Ziel der Arbeit war es daher, eine Strategie zu entwickeln, diese Immunsuppression aufzuheben. Wir kombinierten die OVA/ISCOM-Vakzine mit dem *Toll-like*-Rezeptor 9-Liganden CpG ODN 1826, um herauszufinden, ob dadurch die Immunantwort gegen bereits etablierte Pankreaskarzinome verstärkt werden kann. CpG ODN 1826 allein blieb ebenso wie die Vakzine allein wirkungslos. Die Kombination aus beiden führte jedoch zur Regression bereits großer Pankreastumoren bei sieben von zehn Mäusen und einem verlangsamten Tumorstadium bei zwei weiteren Mäusen.

Im nächsten Schritt untersuchten wir die Wirkung dieser Vakzinierungsstrategie bei Mäusen mit chirurgisch implantierten, orthotopen Pankreastumoren. Erneut blieb die Vakzinierung mit der OVA/ISCOM-Vakzine oder CpG ODN 1826 allein wirkungslos und die Mäuse starben zeitgleich mit der Kontrollgruppe. Die Kombinationsvakzinierung führte hingegen auch im orthotopen Modell zur Tumorabstoßung und zum Langzeitüberleben bei acht von zehn Mäusen. Interessanterweise führte die Kombinationsvakzine zu einer kompletten Aufhebung der Tumor-induzierten Immunsuppression mit einer antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellzahl, die identisch mit der tumorfreier Mäuse war und bei ca. 25 % lag. Zusätzlich war die Frequenz der regulatorischen T-Zellen im Blut und Tumorgewebe bei Mäusen, die die Kombinationsvakzinierung erhielten, signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe mit Tumor ohne Vakzinierung.

Bei den Mäusen, die aufgrund der Kombinationsvakzinierung die orthotopen Pankreaskarzinome abgestoßen hatten und 90 Tage tumorfrei blieben, konnten wir mittels erneuter Tumorexposition eine langanhaltende, T-Zell-vermittelte Immunreaktion gegen den Tumor nachweisen. Zudem entwickelten die erfolgreich behandelten Tiere eine Immunreaktion gegen Tumorantigene, die nicht Bestandteile der Vakzine waren, was mit einem erfolgreichen Abstoßen auch von Wild-Typ-Tumoren bei einigen der Mäuse korrelierte. Dies entspricht dem Phänomen des sogenannten *epitope spreadings*, was in klinischen Studien als ein wichtiger Faktor für eine erfolgreiche Immuntherapie identifiziert werden konnte.

Zusammenfassend beschreiben wir in dieser Arbeit eine erfolgreiche Therapie in dem äußerst aggressiven, orthotopen Panc02-Pankreaskarzinommodell mittels einer Kombinationsvakzinierung bestehend aus einer OVA/ISCOM-Vakzine und dem *Toll-like*-Rezeptor 9-Liganden CpG ODN 1826.

Durch immunologische Parallelen mit dem menschlichen Pankreaskarzinom bezogen auf die tumorvermittelte Immunsuppression könnte dieses Modell hilfreich sein, neue immunologische Therapien für diese äußerst schwierig zu behandelnde Tumorerkrankung zu entwickeln. Zellfreie Tumorstoffe stellen eine vielversprechende Therapie für Pankreaskarzinome dar und bedürfen weiterer klinischer Untersuchungen.

6. Literaturverzeichnis

- Alexandroff, A. B., A. M. Jackson, et al. (2000). "Role for CD40-CD40 ligand interactions in the immune response to solid tumours." Mol Immunol **37**(9): 515-26.
- Armstrong, A. C., D. Eaton, et al. (2001). "Science, medicine, and the future: Cellular immunotherapy for cancer." BMJ **323**(7324): 1289-93.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-52.
- Bauer, C., F. Bauernfeind, et al. (2007). "Dendritic cell-based vaccination combined with gemcitabine increases survival in a murine pancreatic carcinoma model." Gut **56**(9): 1275-82.
- Bauer, S., C. J. Kirschning, et al. (2001). "Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9237-42.
- Beacock-Sharp, H., A. M. Donachie, et al. (2003). "A role for dendritic cells in the priming of antigen-specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes by immune-stimulating complexes in vivo." Int Immunol **15**(6): 711-20.
- Becker, Y. (1992). "Anticancer role of dendritic cells (DC) in human and experimental cancers--a review." Anticancer Res **12**(2): 511-20.
- Beckhove, P., M. Feuerer, et al. (2004). "Specifically activated memory T cell subsets from cancer patients recognize and reject xenotransplanted autologous tumors." J Clin Invest **114**(1): 67-76.
- Beltinger, C., H. U. Saragovi, et al. (1995). "Binding, uptake, and intracellular trafficking of phosphorothioate-modified oligodeoxynucleotides." J Clin Invest **95**(4): 1814-23.
- Bonifaz, L. C., D. P. Bonnyay, et al. (2004). "In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination." J Exp Med **199**(6): 815-24.
- Boon, T., J. C. Cerottini, et al. (1994). "Tumor antigens recognized by T lymphocytes." Annu Rev Immunol **12**: 337-65.
- Brossart, P. and M. J. Bevan (1997). "Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines." Blood **90**(4): 1594-9.
- Brossart, P., A. Schneider, et al. (2001). "The epithelial tumor antigen MUC1 is expressed in hematological malignancies and is recognized by MUC1-specific cytotoxic T-lymphocytes." Cancer Res **61**(18): 6846-50.
- Brossart, P., S. Wirths, et al. (2001). "Dendritic cells in cancer vaccines." Exp Hematol **29**(11): 1247-55.
- Brossart, P., S. Wirths, et al. (2000). "Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells." Blood **96**(9): 3102-8.
- Bruns, C. J., M. T. Harbison, et al. (1999). "In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice." Neoplasia **1**(1): 50-62.
- Burris, H. and A. M. Storniolo (1997). "Assessing clinical benefit in the treatment of pancreas cancer: gemcitabine compared to 5-fluorouracil." Eur J Cancer **33** Suppl 1: S18-22.

- Butterfield, L. H., A. Ribas, et al. (2003). "Determinant spreading associated with clinical response in dendritic cell-based immunotherapy for malignant melanoma." Clin Cancer Res **9**(3): 998-1008.
- Carbone, F. R. and W. R. Heath (2003). "The role of dendritic cell subsets in immunity to viruses." Curr Opin Immunol **15**(4): 416-20.
- Celluzzi, C. M., J. I. Mayordomo, et al. (1996). "Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity." J Exp Med **183**(1): 283-7.
- Chen, W., W. Jin, et al. (2003). "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." J Exp Med **198**(12): 1875-86.
- Conroy, H., N. A. Marshall, et al. (2008). "TLR ligand suppression or enhancement of Treg cells? A double-edged sword in immunity to tumours." Oncogene **27**(2): 168-80.
- Costello, R. T., J. A. Gastaut, et al. (1999). "Tumor escape from immune surveillance." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **47**(2): 83-8.
- Curiel, T. J., G. Coukos, et al. (2004). "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival." Nat Med **10**(9): 942-9.
- Davis, I. D., W. Chen, et al. (2004). "Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4(+) and CD8(+) T cell responses in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(29): 10697-702.
- Drane, D., C. Gittleson, et al. (2007). "ISCOMATRIX adjuvant for prophylactic and therapeutic vaccines." Expert Rev Vaccines **6**(5): 761-72.
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, et al. (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." Nat Immunol **3**(11): 991-8.
- Dutoit, V., R. N. Taub, et al. (2002). "Multiepitope CD8(+) T cell response to a NY-ESO-1 peptide vaccine results in imprecise tumor targeting." J Clin Invest **110**(12): 1813-22.
- Espinoza-Delgado, I. (2002). "Cancer vaccines." Oncologist **7 Suppl 3**: 20-33.
- Fenton, R. G. and D. L. Longo (1997). "Danger versus tolerance: paradigms for future studies of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes." J Natl Cancer Inst **89**(4): 272-5.
- Filgueira, L., F. O. Nestle, et al. (1996). "Human dendritic cells phagocytose and process *Borrelia burgdorferi*." J Immunol **157**(7): 2998-3005.
- Fu, J., D. Xu, et al. (2007). "Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients." Gastroenterology **132**(7): 2328-39.
- Fukunaga, A., M. Miyamoto, et al. (2004). "CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma." Pancreas **28**(1): e26-31.
- Gabrilovich, D. I., H. L. Chen, et al. (1996). "Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells." Nat Med **2**(10): 1096-103.
- Gilboa, E. (1999). "The makings of a tumor rejection antigen." Immunity **11**(3): 263-70.

- Gnjatic, S., E. Jager, et al. (2002). "CD8(+) T cell responses against a dominant cryptic HLA-A2 epitope after NY-ESO-1 peptide immunization of cancer patients." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(18): 11813-8.
- Heikenwalder, M., M. Polymenidou, et al. (2004). "Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration." Nat Med **10**(2): 187-92.
- Hemmi, H., O. Takeuchi, et al. (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." Nature **408**(6813): 740-5.
- Higgins, D., J. D. Marshall, et al. (2007). "Immunostimulatory DNA as a vaccine adjuvant." Expert Rev Vaccines **6**(5): 747-59.
- Hiraoka, N., K. Onozato, et al. (2006). "Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions." Clin Cancer Res **12**(18): 5423-34.
- Hornung, V., S. Rothenfusser, et al. (2002). "Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides." J Immunol **168**(9): 4531-7.
- Imai, H., M. Saio, et al. (2007). "Depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells enhances interleukin-2-induced antitumor immunity in a mouse model of colon adenocarcinoma." Cancer Sci **98**(3): 416-23.
- Jacobs, C., P. Duewell, et al. (2010). "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.
- Jager, E., Y. T. Chen, et al. (1998). "Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes." J Exp Med **187**(2): 265-70.
- Janeway, C. (1989). "Immunogenicity signals 1,2,3 ... and 0." Immunol Today **10**(9): 283-6.
- Jemal, A., R. Siegel, et al. (2008). "Cancer statistics, 2008." CA Cancer J Clin **58**(2): 71-96.
- Kanzler, H., F. J. Barrat, et al. (2007). "Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists." Nat Med **13**(5): 552-9.
- Kim, J., R. L. Modlin, et al. (1995). "IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response." J Immunol **155**(4): 2240-7.
- Kimura, Y., K. Sonehara, et al. (1994). "Binding of oligoguanylate to scavenger receptors is required for oligonucleotides to augment NK cell activity and induce IFN." J Biochem **116**(5): 991-4.
- Krieg, A. M. (2002). "CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects." Annu Rev Immunol **20**: 709-60.
- Krieg, A. M. (2006). "Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation." Nat Rev Drug Discov **5**(6): 471-84.
- Krieg, A. M. (2007). "Development of TLR9 agonists for cancer therapy." J Clin Invest **117**(5): 1184-94.
- Krieg, A. M., A. K. Yi, et al. (1995). "CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation." Nature **374**(6522): 546-9.

- Krug, A., S. Rothenfusser, et al. (2001). "Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells." Eur J Immunol **31**(7): 2154-63.
- Lally, K. M., S. Mocellin, et al. (2001). "Unmasking cryptic epitopes after loss of immunodominant tumor antigen expression through epitope spreading." Int J Cancer **93**(6): 841-7.
- Leao, I. C., P. Ganesan, et al. (2008). "Effective depletion of regulatory T cells allows the recruitment of mesothelin-specific CD8 T cells to the antitumor immune response against a mesothelin-expressing mouse pancreatic adenocarcinoma." Clin Transl Sci **1**(3): 228-39.
- Lin, Y., S. Kikuchi, et al. (2006). "Serum transforming growth factor-beta1 levels and pancreatic cancer risk: a nested case-control study (Japan)." Cancer Causes Control **17**(8): 1077-82.
- Lipford, G. B., S. Bendigs, et al. (2000). "Poly-guanosine motifs costimulate antigen-reactive CD8 T cells while bacterial CpG-DNA affect T-cell activation via antigen-presenting cell-derived cytokines." Immunology **101**(1): 46-52.
- Liyanage, U. K., T. T. Moore, et al. (2002). "Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma." J Immunol **169**(5): 2756-61.
- Macfarlane, D. E., L. Manzel, et al. (1997). "Unmethylated CpG-containing oligodeoxynucleotides inhibit apoptosis in WEHI 231 B lymphocytes induced by several agents: evidence for blockade of apoptosis at a distal signalling step." Immunology **91**(4): 586-93.
- Maraskovsky, E., S. Sjolander, et al. (2004). "NY-ESO-1 protein formulated in ISCOMATRIX adjuvant is a potent anticancer vaccine inducing both humoral and CD8+ t-cell-mediated immunity and protection against NY-ESO-1+ tumors." Clin Cancer Res **10**(8): 2879-90.
- Matzinger, P. (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." Annu Rev Immunol **12**: 991-1045.
- McKenna, K., A. S. Beignon, et al. (2005). "Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity." J Virol **79**(1): 17-27.
- Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." Nat Rev Immunol **1**(2): 135-45.
- Nagaraj, S., C. Ziske, et al. (2006). "Dendritic cells pulsed with alpha-galactosylceramide induce anti-tumor immunity against pancreatic cancer in vivo." Int Immunol **18**(8): 1279-83.
- Nicholaou, T., L. M. Ebert, et al. (2009). "Regulatory T-cell-mediated attenuation of T-cell responses to the NY-ESO-1 ISCOMATRIX vaccine in patients with advanced malignant melanoma." Clin Cancer Res **15**(6): 2166-73.
- Pasare, C. and R. Medzhitov (2003). "Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells." Science **299**(5609): 1033-6.
- Rabinovich, G. A., D. Gabrilovich, et al. (2007). "Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells." Annu Rev Immunol **25**: 267-96.
- Radoja, S. and A. B. Frey (2000). "Cancer-induced defective cytotoxic T lymphocyte effector function: another mechanism how antigenic tumors escape immune-mediated killing." Mol Med **6**(6): 465-79.
- Ranieri, E., L. S. Kierstead, et al. (2000). "Dendritic cell/peptide cancer vaccines: clinical responsiveness and epitope spreading." Immunol Invest **29**(2): 121-5.

- Rayman, P., R. G. Uzzo, et al. (2000). "Tumor-induced dysfunction in interleukin-2 production and interleukin-2 receptor signaling: a mechanism of immune escape." Cancer J Sci Am **6 Suppl 1**: S81-7.
- Ribas, A., J. M. Timmerman, et al. (2003). "Determinant spreading and tumor responses after peptide-based cancer immunotherapy." Trends Immunol **24**(2): 58-61.
- Robson, N. C., H. Beacock-Sharp, et al. (2003). "The role of antigen-presenting cells and interleukin-12 in the priming of antigen-specific CD4+ T cells by immune stimulating complexes." Immunology **110**(1): 95-104.
- Robson, N. C., S. Hoves, et al. "Presentation of tumour antigens by dendritic cells and challenges faced." Curr Opin Immunol **22**(1): 137-44.
- Rodriguez, A., A. Regnault, et al. (1999). "Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells." Nat Cell Biol **1**(6): 362-8.
- Romero, P., V. Dutoit, et al. (2001). "CD8+ T-cell response to NY-ESO-1: relative antigenicity and in vitro immunogenicity of natural and analogue sequences." Clin Cancer Res **7**(3 Suppl): 766s-772s.
- Sakaguchi, S. (2008). "Regulatory T cells in the past and for the future." Eur J Immunol **38**(4): 901-37.
- Sallusto, F., P. Schaerli, et al. (1998). "Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation." Eur J Immunol **28**(9): 2760-9.
- Schmidt, C. S. and M. F. Mescher (2002). "Peptide antigen priming of naive, but not memory, CD8 T cells requires a third signal that can be provided by IL-12." J Immunol **168**(11): 5521-9.
- Schmidt, T., C. Ziske, et al. (2003). "Intratumoral immunization with tumor RNA-pulsed dendritic cells confers antitumor immunity in a C57BL/6 pancreatic murine tumor model." Cancer Res **63**(24): 8962-7.
- Schmitz-Winnenthal, F. H., C. Volk, et al. (2005). "High frequencies of functional tumor-reactive T cells in bone marrow and blood of pancreatic cancer patients." Cancer Res **65**(21): 10079-87.
- Schnurr, M., Q. Chen, et al. (2005). "Tumor antigen processing and presentation depend critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery." Blood **105**(6): 2465-72.
- Schnurr, M., P. Galambos, et al. (2001). "Tumor cell lysate-pulsed human dendritic cells induce a T-cell response against pancreatic carcinoma cells: an in vitro model for the assessment of tumor vaccines." Cancer Res **61**(17): 6445-50.
- Schnurr, M., M. Orban, et al. (2009). "ISCOMATRIX adjuvant induces efficient cross-presentation of tumor antigen by dendritic cells via rapid cytosolic antigen delivery and processing via tripeptidyl peptidase II." J Immunol **182**(3): 1253-9.
- Schnurr, M., C. Scholz, et al. (2002). "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 **62**(8): 2347-52.
- Schreiber, K., D. A. Rowley, et al. (2006). "Cancer immunotherapy and preclinical studies: why we are not wasting our time with animal experiments." Hematol Oncol Clin North Am **20**(3): 567-84.
- Schuler-Thurner, B., E. S. Schultz, et al. (2002). "Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature,

- cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells." J Exp Med **195**(10): 1279-88.
- Steinman, R. M. (1991). "The dendritic cell system and its role in immunogenicity." Annu Rev Immunol **9**: 271-96.
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." J Exp Med **137**(5): 1142-62.
- Steinman, R. M., K. Inaba, et al. (1999). "Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies." Hum Immunol **60**(7): 562-7.
- Stewart, T. J., D. Drane, et al. (2004). "ISCOMATRIX adjuvant: an adjuvant suitable for use in anticancer vaccines." Vaccine **22**(27-28): 3738-43.
- Tan, M. C., P. S. Goedegebuure, et al. (2009). "Disruption of CCR5-dependent homing of regulatory T cells inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer." J Immunol **182**(3): 1746-55.
- Tarhini, A. A. and F. Iqbal (2010). "CTLA-4 blockade: therapeutic potential in cancer treatments." Onco Targets Ther **3**: 15-25.
- Tross, D. and D. M. Klinman (2008). "Effect of CpG oligonucleotides on vaccine-induced B cell memory." J Immunol **181**(8): 5785-90.
- Van den Eynde, B. J. and T. Boon (1997). "Tumor antigens recognized by T lymphocytes." Int J Clin Lab Res **27**(2): 81-6.
- von Bernstorff, W., M. Voss, et al. (2001). "Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients." Clin Cancer Res **7**(3 Suppl): 925s-932s.
- Wagner, H. (2002). "Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity." Curr Opin Microbiol **5**(1): 62-9.
- Zarembek, K. A. and P. J. Godowski (2002). "Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines." J Immunol **168**(2): 554-61.
- Zhang, D., G. Zhang, et al. (2004). "A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria." Science **303**(5663): 1522-6.

7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BSA	Bovines Serum-Albumin
C57BL/6	C57 Black 6, eine Mauslinie
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CpG	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid
cpm	<i>Counts per minute</i>
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isocyanat
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IPC	Interferon-produzierende Zelle
ISCOM	Immunstimulatorischer Komplex
LPS	Lipopolysaccharid
MDC	Myeloide dendritische Zelle
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minute(n)
Mio	Million(en)
MyD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
ODN	Oligodesoxynukleotid
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerithrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein
RT	Raumtemperatur
Tetramere	Tetramere MHC-I-Komplexe
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>

TH

T-Helfer

TLR

Toll-like-Rezeptor

TNF- α

Tumor-Nekrose-Faktor- α

8. Danksagung

Mein allerherzlichster Dank gilt alle denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere:

- Herrn Prof. Endres von der Abteilung für Klinische Pharmakologie des Klinikums der Innenstadt der LMU München für die herzliche Aufnahme in sein Team, sowie die menschliche und fachliche Unterstützung, die zum guten Gelingen der Arbeit geführt haben,
- meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn PD Max Schnurr für die Überlassung des interessanten Themas, die umfassende fachliche Betreuung und die konstruktive Tatkraft bei der Anfertigung meiner Arbeit,
- meinem Mitbetreuer Dr. Klaus Heckelsmiller für die stetige und ausdauernde Hilfe bei der praktischen Durchführung der Versuche sowie seiner aktiven Hilfe und Unterstützung in allen Phasen der Arbeit,
- meinem Mitdoktoranden Peter Düwell für die Unterstützung in der Durchführung der Versuche und die gemeinsame Zeit im Labor mit wertvollen Hinweisen und Ratschlägen,
- Herrn Dr. Christian Bauer für seine Hilfe bei der praktischen Durchführung der orthotopen Tumorversuche,
- Frau Dr. Cornelia Wurzenberger für ihre Bereitschaft, mich bei der statistischen Analyse (SPSS) zu unterstützen,
- Frau Rosemarie Kiefl für die freundliche Hilfe bei organisatorischen Fragen und die Nutzung des Labors,
- meinen Eltern für die liebevolle Unterstützung und Rückhalt, ohne die mir die Verwirklichung meiner beruflichen Ziele nur schwer möglich gewesen wäre.

9. Veröffentlichungen

Originalarbeiten

1. Weber A-A, **Jacobs C**, Meila D, Weber S, Zotz RB, Scharf RE, Kelm M, Strauer BE, Schrör K. No evidence for an influence of the human platelet antigen-1 polymorphism on the antiplatelet effects of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Pharmacogenetics* 2002; 12:581-583.
2. Weber A-A, Meila D, **Jacobs C**, Weber S, Kelm M, Strauer BE, Zotz RB, Scharf RE, Schrör K. Low incidence of paradoxical platelet activation by glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Thromb Res* 2002; 106:25-29.
3. **Jacobs C.**, Düwell P., Heckelsmiller K., Wei J., Bauernfeind F., Ellermeier J., Kisser U., Bauer C., Dauer M., Eigler A., Maraskovsky E, Endres S., and Schnurr M.. 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].

Poster und Kongressbeiträge

1. Meila D, **Jacobs C**, Weber S, Zotz RB, Scharf RE, Kelm M, Strauer BE, Weber A-A, Schrör K. Paradoxical platelet activation by glycoprotein IIb/IIIa inhibitors – A possible role of the human platelet antigen-1 polymorphism? *Ann Hematol* 2002; 81(Suppl.1):218.
2. **Jacobs C**, Meila D, Weber S, Zotz RB, Scharf RE, Kelm M, Strauer BE, Weber A-A, Schrör K. The human platelet antigen-1 polymorphism does not influence the antiplatelet effects of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Ann Hematol* 2002; 81(Suppl.1):138
3. **Collin Jacobs**, Klaus Heckelsmiller, Peter Düwell, Franz Bauernfeind, Christian Bauer, Marc Dauer, Andreas Eigler, Stefan Endres, Max Schnurr. Vaccination with an ISCOM-based tumor vaccine and a TLR ligand overcomes tumor-induced immune suppression and leads to eradication of pancreatic

carcinoma. *62. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten e.V., 2007.*

4. Max Schnurr, **Collin Jacobs**, Klaus Heckelsmiller, Peter Düwell, Marc Dauer, Andreas Eigler, Eugene Maraskovsky. Linking innate and adaptive immunity by vaccination with adjuvant-formulated tumor antigen. *7th World Congress on Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis – TSIS 2007.*

5. Max Schnurr, **Collin Jacobs**, Klaus Heckelsmiller, Peter Düwell, Marc Dauer, Eugene Maraskovsky, Andreas Eigler. Eradication of orthotopic pancreatic cancers by vaccination with adjuvant-formulated tumor antigen and a TLR ligand. *35. Jahrestagung der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern, 2007.*

6. **C.Jacobs**, K. Heckelsmiller, P. Düwell, F. Bauernfeind, Ch. Bauer, M. Dauer, A. Eigler, S. Endres, Max Schnurr: „Vaccination with an ISCOM-based tumor vaccine and a TLR ligand overcomes tumor-induced immune suppression and leads to the eradication of established pancreatic carcinomas“. *114. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, 2008.*

7. Max Schnurr, Peter Düwell, **Collin Jacobs**, Jiwu Wei, Marc Dauer, Andreas Eigler, Stefan Endres. Durchbrechung der vom Pankreaskarzinom ausgehenden Immunsuppression durch Depletion regulatorischer T- Zellen. *36. Jahrestagung der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern, 2008.*

8. Max Schnurr, Jiwu Wei, Peter Düwell, **Collin Jacobs**, Marc Dauer, Stefan Endres, Andreas Eigler. Die Rolle regulatorischer T-Zellen im murinen Pankreaskarzinom: Herausforderung für die Entwicklung effektiver Immuntherapien. *63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten e.V., 2008.*

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jacobs, Collin
Eltern: Prof. Dr. Dr. Hans-Georg Jacobs, Dr. Claudia Jacobs-Müller
Geburtsdatum: 11.12.1978
Geburtsort: Göttingen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1984-1988 St. Godehardt-Grundschule in Göttingen

1988-1990 Bonifatius-Orientierungsschule in Göttingen

1990-1997 Max-Planck-Gymnasium in Göttingen

1997 Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

1997 – 1998 Zivildienst in der Kardiologie im Krankenhaus Neu-Bethlehem in Göttingen

Studium

10/1998 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

08/2000 Ärztliche Vorprüfung

02-10/2001 Freisemester für den experimentellen Teil der Promotionsarbeit am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Professor Dr. K. Schrör und der Betreuung von Priv. Doz. Dr. A.-A. Weber

Thema: "Der "human platelet antigen-1" (HPA-1)-
Polymorphismus beeinflusst nicht die Wirkungen von
Glykoprotein IIb/IIIa-Inhibitoren"

04/2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04-11/2004	Praktisches Jahr an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
12/2004-03/2005	Chirurgisches Tertial im Concord Hospital der University of Sydney
03/2005	Aufnahme des Studiums der Zahnheilkunde an der Ludwig-Maximilians-Universität München
05/2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2006	Promotion zum Dr. med. (Experimentelle Promotionsarbeit am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Professor Dr. K. Schrör, abgeschlossen mit „magna cum laude“)
07/2006-08/2007	Freisemester für den experimentellen Teil der vorliegenden Promotionsarbeit in der Max-Eder-Forschungsgruppe der Deutschen Krebshilfe (PD. Dr. Max Schnurr) der Abteilung für Klinische Pharmakologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (Leiter: Professor Dr. Stefan Endres)
11/2008	Examen in der Zahnheilkunde an der Ludwig-Maximilians-Universität München
01/2009	Vorbereitungsassistent in der kieferorthopädischen Praxis von Dr. C. Jacobs-Müller in Göttingen

Seit 06/2009 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Poliklinik für Kieferorthopädie
im Klinikum der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Stipendium

07/2006-02/2007 Stipendiat des Graduiertenkollegs der DFG „ Oligonukleotide in
Zellbiologie und Therapie“