
***In vitro* Effekte von Interferon alpha und
Chemotherapeutika auf das B7-H1 Molekül
im Pankreasadenokarzinom**

von Jasmin Fritz

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

***In vitro Effekte von Interferon alpha und
Chemotherapeutika auf das B7-H1 Molekül
im Pankreasadenokarzinom***

von
Jasmin Fritz
aus Sigmaringen

München
2015

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Physiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

angefertigt in der Chirurgischen Klinik
der Ruprecht-Karls-Universität in Heidelberg
(Betreuer: Prof. Dr. Alexandre V. Bazhin)

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Tag der Promotion: 18. Juli 2015

Meinen Eltern

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis.....	1
II	Abkürzungsverzeichnis.....	6
1	Einleitung	9
1.1	Das Pankreasadenokarzinom	9
1.2	Epidemiologie.....	9
1.3	Ätiologie	10
1.4	Physiologie und Pathologie	10
1.5	Klinisches Erscheinungsbild.....	11
1.6	Diagnose	12
1.7	Therapie und Prognose	12
1.7.1	Resektion.....	13
1.7.2	Adjuvante Therapie	14
1.7.3	Neoadjuvante Therapie.....	15
1.7.4	Palliative Therapie	15
1.7.4.1	Wirkmechanismus von Gemcitabin und 5-FU	15
1.7.4.2	Nutzen und Auswirkung der palliativen Chemotherapie	16
1.8	Das Immunsystem	16
1.8.1	Zellen des angeborenen Immunsystems	17
1.8.2	Zellen des erworbenen Immunsystems	17
1.8.3	Dendritische Zellen-Zweigstelle des angeborenen und erworbenen Systems..	17
1.8.4	Regulatorische Zellen	18
1.8.4.1	Physiologische Funktion der regulatorischen T-Zellen	19
1.8.4.2	Myeloide Zellen können immunsuppressiv sein	19
1.8.5	Regulatorische Moleküle.....	19

1.8.5.1	Die Funktion regulatorischer und kostimulatorischer Signalwege.....	19
1.8.5.2	PD-1 und seine Liganden B7-H1/B7-DC	20
1.9	Tumorimmunologie.....	21
1.9.1	Der Angriff des Immunsystems gegen die Tumorzellen	21
1.9.2	Immunsuppressorische Zellen und Moleküle im Mikromilieu des PaCa	22
1.9.2.1	T_{reg} und die Entstehung des PaCa	22
1.9.2.2	Wie MDSC zum Tumorwachstum beitragen.....	23
1.9.2.3	Dysfunktion der dendritischen Zellen im Mikromilieu des PaCa.....	24
1.9.2.4	B7-H1 auf Tumorzellen	24
1.10	Immuntherapie.....	25
1.10.1	Wirkmechanismen von IFN α	26
1.11	Ziele der vorliegenden Arbeit.....	28
2	Materialien und Methoden.....	29
2.1	Material	29
2.1.1	Labortools	29
2.1.2	OP-Material	30
2.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	31
2.1.4	Lösungen, Puffer und Medien	33
2.1.5	Pharmaka.....	33
2.1.6	Antikörper für die Durchflusszytometrie	34
2.1.7	Beads für die Kompensation	36
2.1.8	Beads für die magnetische Zellseparation	36
2.1.9	Software	37
2.1.10	Pankreaskarzinomzellen (Panc02)	37
2.1.11	Mäuse	37
2.2	Methoden.....	38

2.2.1	Orthotopes Mausmodell	38
2.2.1.1	Gewinnen der Panc02-Zellen.....	38
2.2.1.2	Operation	38
2.2.2	Probenentnahme	39
2.2.3	Herstellen einer Zellkultur.....	39
2.2.3.1	Anfertigen einer Splenozyten-Zellsuspension	39
2.2.3.1.1	Splenozyten-Zellkultur.....	39
2.2.3.2	Anfertigen einer Panc02-Zellsuspension	39
2.2.3.2.1	Panc02-Zellkultur.....	40
2.2.4	Vorbereitung der Zellen für die Durchflusszytometrie	40
2.2.5	Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting)	40
2.2.6	Immunphänotypisierung.....	41
2.2.7	Extrazelluläre Färbung.....	42
2.2.8	Intrazelluläre Färbung	42
2.2.9	Zytotoxizitätsmessung.....	43
2.2.9.1	Separation der tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TiL)	43
2.2.9.2	Magnetische Zellseparation (Magnetic-activated cell sorting; MACS).....	43
2.2.9.3	Reinheitsmessung	44
2.2.9.4	Verbringen der TiL in Kultur	44
2.2.9.5	Gewinnen der TiL nach Ablauf der Inkubationszeit.....	45
2.2.9.6	Herstellen einer Panc02:TiL Kokultur für die Zytotoxizitätsbestimmung ...	45
2.2.9.7	Zytotoxizitätsbestimmung mittels FACS Analyse.....	45
2.2.10	Enzyme Linked Immunsorbent Assay (ELISA)	45
2.2.10.1	Mouse Interferon gamma ELISA Ready-SET-Go!® Protokoll	46
2.2.11	Luminex	46
2.2.12	Statistik	48

3 Ergebnisse	49
3.1 Der Einfluss verschiedener Therapien auf die Panc02-Zelllinie	49
3.1.1 Die Zytokinausschüttung der Panc02-Zelllinie	52
3.2 Der Einfluss verschiedener Therapien auf die Immunzellen	55
3.2.1 Splenozyten gesunder Mäuse	55
3.2.1.1 CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen.....	56
3.2.1.2 Dendritische Zellen (cDC und pDC).....	65
3.2.1.2.1 Konventionelle DC	67
3.2.1.2.2 Plasmazytoide DC	69
3.2.1.3 Makrophagen.....	71
3.2.1.4 Myeloid-derived suppressor cells (MDSC).....	74
3.2.1.5 MDSC.....	75
3.2.1.5.1 Granulozytäre/monozytäre MDSC	76
3.2.1.6 Konventionelle und regulatorische T-Zellen.....	78
3.2.1.7 Konventionelle T-Zellen	80
3.2.1.8 Regulatorische T-Zellen.....	82
3.2.2 Splenozyten tumortragender Mäuse	84
3.2.2.1 CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen.....	84
3.2.2.2 Dendritische Zellen (cDC und pDC)	92
3.2.2.2.1 Konventionelle DC	92
3.2.2.2.2 Plasmazytoide DC	94
3.2.2.3 Makrophagen.....	96
3.2.2.4 Myeloid-derived suppressor cells (MDSC)	98
3.2.2.4.1 Granulozytäre/monozytäre MDSC	99
3.2.2.5 Konventionelle und regulatorische T-Zellen.....	100
3.2.2.5.1 Konventionelle T-Zellen.....	100

3.2.2.5.2	Regulatorische T-Zellen	102
3.2.3	Der Vergleich zwischen Splenozyten aus gesunden und aus tumortragenden Mäusen	104
3.2.4	Vergleich der CD4 ⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen	104
3.2.5	Vergleich der CD8 ⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen	107
3.2.6	Vergleich der konventionellen Dendritischen Zellen (cDC)	111
3.2.7	Vergleich der plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDC).....	113
3.2.8	Vergleich der Makrophagen.....	115
3.2.9	Vergleich der Myeloid-derived suppressor cells (MDSC).....	115
3.2.10	Vergleich der monozytären/granulozytären MDSC	116
3.2.11	Vergleich der konventionellen und der regulatorischen T-Zellen (T _{con} /T _{reg}) ...	118
3.2.12	Der Einfluss verschiedener Therapien auf die Zytotoxizität tumorinfiltrierender Lymphozyten in An- und Abwesenheit des B7-H1 Moleküls	121
3.2.13	Bestimmung der Interferon gamma (IFN γ) Konzentration in der Panc02:TiL Kokultur (Vergleich C57/Bl-6 und B7-H1 KO).....	126
4	Diskussion	128
5	Zusammenfassung	140
III	Summary	142
IV	Literaturverzeichnis	144
V	Abbildungsverzeichnis	150
VI	Tabellenverzeichnis.....	156
VII	Danksagung.....	157

II Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celcius
µl	Mikroliter
µM	mikromolare Masse
5-FU	5-Fluorouracil
5-FU+IFNα	Kombinationstherapie aus 5-Fluorouracil und Interferon alpha
Abb.	Abbildung
ANOVA	one-way analysis of variance
APC	antigenpräsentierende Zelle
APC-Cy7	allophycocyanine-cyanine-7
B7-DC	programmed death-ligand 2, PD-L2
B7-H1	programmed death-ligand 1, PD-L1
B7-H1 KO	B7-H1 ^{-/-} knock-out Mäuse
cDC	Konventionelle dendritische Zelle
CT	Computertomographie
CT-Antigene	cancer testis antigen
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte antigen-4
DAMPs	damage-associated molecular pattern molecules
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ERCP	endoskopische retrograde Cholangiopankreatographie
ESPAC	European Study Group for pancreatic cancer
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calve serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
FMO	fluorescence minus one
FoxP3	forkhead-box-protein 3
FSC	forward scatter
g	Erdbeschleunigung
Gem	Gemcitabin
Gem+IFNα	Kombinationstherapie aus Gemcitabin und Interferon alpha
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
h	Stunde
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HBSS	Hanks Buffered Salt Solution
HCL	Salzsäure
HCO ₃	Hydrogencarbonat
IFNγ	Interferon gamma
IFNα	Interferon alpha
IFNβ	Interferon beta

IFN ω	Interferon omega
IL	Interleukin
iT _{reg}	induzierte Regulatorische T-Zelle
KC	keratinocyte-derived chemokine
kg	Kilogramm
KRAS-Onkogen	Kirsten rat sarcoma viral oncogene
MACS	magnetic activated cell sorting
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells
MDTC	Multidetektorcomputertomographie
MFI	mean fluorescence intensity
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter
MoDC	Monocyte-derived dendritic cells
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NK	natürliche Killerzelle
OP-Techniken	Operationstechniken
p	Signifikanzniveau
PaCa	Pankreasadenokarzinom
Panc02:TiL	Kokultur aus Panc02-Zellen und tumorinfiltrierenden Lymphozyten
PBS	phosphate buffer saline
PD-1	programmed death Rezeptor 1
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PE	phycoerythrin
PE-Cy	phycoerythrin-cyanine
PerCP-Cy 5.5	peridinin chlorophyll protein complex-cyanin-5.5
pg	Pikogramm
PMBC	peripheral blood mononuclear cells
PPPD	pyloruserhaltende Pankreaskopfresektion
rev/min	revolutions per minute
RNS	reaktive Nitrogenspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SD	standard deviation
SE	standard error
sek	Sekunde
SSC	side scatter
TAA	tumor-associated antigen
Tab.	Tabelle
T _{cm}	zentrale Gedächtnis-T-Zelle
T _{con}	Konventionelle T-Zelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
T _{eff}	Effektor-T-Zelle

T_{em}	Effektor-Gedächtnis-T-Zelle
TGF- β	tumor necrosis factor beta
Th1	T-Helferzelle Typ 1
Th2	T-Helferzelle Typ 2
TiL	tumorinfiltrierende Lymphozyten
TLR	Toll-like-Rezeptor
T_{naive}	naive T-Zelle
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
T_{R1}	Typ 1 regulatorische T-Zelle
T_{reg}	Regulatorische T-Zelle
VEGF	vascular endothelial growth factor
Vol%	Volumenprozent

1 Einleitung

1.1 Das Pankreasadenokarzinom

Neoplastische Veränderungen der Bauchspeicheldrüse können sehr aggressiv voranschreiten. In über 90% der Fälle handelt es sich in der Humanmedizin um ein Adenokarzinom, das zu den aggressivsten Tumoren weltweit gezählt wird. Da die Tumorerkrankung überwiegend von unspezifischen Symptomen begleitet wird, kann die Diagnose erst sehr spät gestellt werden. Weil die bisherigen Therapiemöglichkeiten wenig erfolgsversprechend sind, sind die Heilungschancen verschwindend gering. Das Adenokarzinom wird auch in der Veterinärmedizin vorgefunden. Circa 3% aller abdominalen Tumore des Hundes sind Tumore des exokrinen Pankreas. Auch hier ist das Krankheitsbild durch unspezifische Symptome, eine späte Diagnose, geringe Therapiemöglichkeiten und ein schnelles Versterben der Tiere gekennzeichnet.

1.2 Epidemiologie

Jährlich erkranken circa 277.000 Menschen weltweit am Pankreasadenokarzinom (PaCa), welches anteilig 2-3% aller Krebserkrankungen ausmacht [1]. Obwohl das PaCa zu den eher selten auftretenden Tumoren zählt, zeichnet es sich überwiegend durch seine hohe Aggressivität aus. Die Mortalitätsrate bei dieser Tumorentität beträgt nahezu 100% [2]. Patienten, die am PaCa erkrankt sind, versterben meist innerhalb des ersten Jahres [3] und die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt weniger als 4% [4]. Betrachtet man das weltweite Auftreten des PaCa, so ist ersichtlich, dass regionale Unterschiede bestehen. Im Vergleich zu Ländern, die sich nahe am Äquator befinden, sind die nördlichen Länder drei- bis vierfach häufiger von der Erkrankung betroffen [5]. Statistisch gesehen nimmt das PaCa den vierten Rang auf der Liste der häufigsten krebsbedingten Todesfälle in Deutschland ein [6] und betrifft sowohl Männer als auch Frauen, wobei das mittlere Erkrankungsalter zum Zeitpunkt der Diagnose bei 73 Jahren liegt [2] und häufiger Männer als Frauen daran erkranken [6]. Das Risiko, ein PaCa zu entwickeln, erhöht sich mit steigendem Alter deutlich. Diesbezüglich können Parallelen zur Veterinärmedizin verzeichnet werden. Auch hier erkranken die Kleintiere erst in höherem Alter. Im Schnitt sind Hunde und Katzen zum Zeitpunkt der Erkrankung 10,5 Jahre alt. Das PaCa ist ein sehr seltener Tumor, der im Gegensatz zur Humanmedizin häufiger bei weiblichen als bei männlichen Tiere entsteht [7]. Über die möglichen Gründe der Erkrankung

kann in der Veterinärmedizin nur spekuliert werden, da selbst in der Humanmedizin die Ätiologie noch nicht eindeutig geklärt ist.

1.3 Ätiologie

Studien haben bislang gezeigt, dass der Konsum von Zigaretten das Risiko am PaCa zu erkranken, um 75% erhöht [8]. Ebenso erhöht sich das Risiko für Personen um ein Vielfaches, wenn sie an Diabetes mellitus Typ 2 oder an chronischer Pankreatitis leiden [9]. Seltener hingegen wird das PaCa durch einen Diabetes mellitus vom Typ 1 ausgelöst [10]. Es wird vermutet, dass eine ungesunde Ernährung (hohe Aufnahme gesättigter tierischer Fette) in Verbindung mit Bewegungsmangel, Übergewicht und Alkoholkonsum die Tumorentstehung begünstigt [11-14]. Allerdings ist bei etwa 10% der Patienten die Tumorentstehung familiär bedingt. Häufig sind es die Mutationen des Onkogens KRAS2 wie auch des Tumor Suppressor Gens p16INK4A/CDKN2A, die wesentlich zur Entstehung des Adenokarzinoms beitragen [2]. Wenn es innerhalb der Blutsverwandten einer Familie zu einer Entstehung eines PaCa gekommen ist, dann erhöht sich das Risiko für die Familienmitglieder, am PaCa zu erkranken, um das Doppelte [15].

1.4 Physiologie und Pathologie

Das Pankreas des Menschen liegt anatomisch betrachtet retroperitoneal und wird untergliedert in den Kopf, den Körper und den Schwanz des Pankreas [16]. Ca. 98% der Organmasse stellen den exokrinen Teil des Pankreas dar. Dieser besteht aus einer Vielzahl von Drüsen, den sogenannten Azini, die zahlreiche Verdauungsenzyme in das Duodenum abgeben. Die Epithelzellen, die die Azini bilden, produzieren das enzymreiche Sekret und werden als azinäre Zellen bezeichnet. Anfangs münden die Azini in sekreteableitende Gänge, deren Epithelzellen zu Beginn in die Azini hineinragen und deswegen zentroazinäre Zellen genannt werden. Die restlichen 2% der Organmasse bilden den endokrinen Teil des Pankreas, der auch als Inselapparat bekannt ist. In diesem befinden sich unter anderen die B- und A-Zellen, die die Hormone Insulin und Glucagon produzieren, um den Blutglucosespiegel aufrecht zu halten [17]. Wenn es im exokrinen Teil des Pankreas zu neoplastischen Veränderungen kommt, wird in der Humanmedizin in 85-90% der Fälle ein duktales Adenokarzinom diagnostiziert [18]. Aus welchen Zellen sich das Adenokarzinom entwickelt, ist noch nicht eindeutig bewiesen. Es wird davon ausgegangen, dass zentroazinäre Zellen eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung einnehmen [18]. Andere Tumorentitäten machen somit einen sehr geringen

Anteil aus. Zu diesen zählen Zystadenokarzinome, Azinuszellkarzinome und adenosquamöse Karzinome [19]. Das PaCa entsteht größtenteils (zu 78%) im Kopf des Pankreas. Seltener wird der Körper oder der Schwanz befallen (zu je 11%) [20]. Das PaCa neigt dazu, perineurale Strukturen innerhalb wie auch außerhalb des Pankreas zu infiltrieren und sich recht schnell über das Organ hinweg auszubreiten [21, 22]. In der Veterinärpathologie sind Tumore des Pankreas auch bekannt, allerdings meist als Zufallsbefunde. In den meisten Fällen handelt es sich um Adenokarzinome, deren Ursprung azinäre und duktale Zellen darstellen. Im Gegensatz zum humanen PaCa entsteht das PaCa der Kleintiere vor allem im Körper des Pankreas [7].

1.5 Klinisches Erscheinungsbild

Die Tumorentwicklung des humanen PaCa verläuft lange Zeit asymptomatisch und äußert sich in ihrem weiteren Verlauf im Entstehen unspezifischer Symptome, was die frühe Diagnostik dieses aggressiven Tumors erheblich beschwert. Über 90% der Patienten klagen über Oberbauch- und Rückenschmerzen, verlieren zunehmend an Gewicht und entwickeln einen schmerzlosen Ikterus [21]. Ab einem Lebensalter von 50 Jahren sollte der behandelnde Arzt beim Auftreten eines oder mehrerer dieser Symptome Erkrankungen des Pankreas in Erwägung ziehen [19]. Durch die bereits erwähnte Infiltration perineuraler Strukturen kann es zu unspezifischen Schmerzen im Bereich des Oberbauchs und des Rückens kommen. Sitzt der Tumor im Bereich des Pankreaskopfes, kann durch die Verlegung der ableitenden Gallengänge ein schmerzloser Ikterus entstehen. Liegt der Tumor weiter distal, dauert die Entwicklung eines Ikterus längere Zeit an. Ursache hierfür ist die Metastasierung des Tumors in die Leber [21]. Weitere Symptome des Tumors können eine akute Pankreatitis unbekannter Genese und ein neu aufgetretener Diabetes mellitus Typ 2 sein [19], welcher bei circa einem Drittel der Patienten vorkommt [23]. Viele Symptome des Adenokarzinoms des Menschen sind deckungsgleich mit denjenigen der Kleintiere. Auch hier sind die Symptome sehr unspezifisch und äußern sich in Inappetenz, Erbrechen, Gewichtsabnahme und Aszites. Da das PaCa in der Veterinärmedizin auch zur schnellen und ausgeprägten Metastasierung tendiert, entsteht durch die Metastasierung in die Leber ein klinisch sichtbarer Ikterus. Dieser kann auch durch die Verlegung der Gallengänge zustande kommen [7]. Sowohl in der Veterinär- als auch in der Humanmedizin sollten nach dem Auftreten der oben genannten Symptome zügig weitere diagnostische Schritte eingeleitet werden.

1.6 Diagnose

Zur Abklärung des Tumorverdachts eines Adenokarzinoms des Pankreas eignen sich in der Humanmedizin besonders die Endosonographie, die Multidetektorcomputertomographie (MDCT), die Magnetresonanztomographie (MRT) wie auch die endoskopische retrograde Cholangiopankreatographie (ERCP) [19]. Der herkömmliche Ultraschall wird zwar gelegentlich benutzt, eignet sich aber aufgrund der anatomischen Lage des Pankreas nur wenig und ist stark von der Erfahrung des Untersuchers abhängig. Der für die spätere Nachsorge geeignete Tumormarker CA-19-9 kann keine Erstdiagnose sichern, da seine Sensitivität und Spezifität zu gering ist [24]. Eine der wichtigsten Zielsetzungen der Diagnose ist es zu entscheiden, ob der Tumor operabel ist oder nicht. Um mögliche Metastasierungen feststellen zu können, die einer chirurgischen Resektion im Wege stehen, sollte ein Tumorscreening durchgeführt werden. Bereits das Röntgen des Thorax in zwei Ebenen und eine Abdomensonographie können erste Hinweise über die Ausbreitung des Tumors liefern [19]. Ein sehr zuverlässiger Nachweis von Fernmetastasen gelingt sowohl mit der Anwendung des CT wie auch des MRT. Im MRT können selbst kleinste Lebermetastasen entdeckt werden [25]. Eine Biopsie ist unerlässlich, falls der Tumor nicht reseziert werden kann. In weniger als 20% der Fälle ist eine chirurgische Entfernung des Tumors möglich, woraufhin eine histopathologische Untersuchung des entnommenen Gewebes folgt [19]. Die Diagnostik, die in der Veterinärmedizin zur Sicherung eines Adenokarzinoms verwendet wird, kann nicht mit derjenigen der Humanmedizin verglichen werden. Besteht bei Hund oder Katze eine Aszites, kann ein Bauchpunktat entnommen werden, in welchem Karzinomzellen enthalten sein können. Röntgenologisch kann eine abdominale Masse erkennbar sein, die sich sonographisch als schlecht umschriebene, hypoechogene Masse zwischen Magen und Duodenum darstellt. Beim Verdacht auf ein PaCa sollte in jedem Fall die Lunge in mindestens zwei Ebenen geröntgt werden, um mögliche Metastasen zu identifizieren [7]. Wenn es trotz begrenzter Untersuchungsmethoden möglich war, die Diagnose des Adenokarzinoms zu sichern, stehen in der Veterinärmedizin dennoch nur wenige Therapiemöglichkeiten zur Verfügung.

1.7 Therapie und Prognose

In der Regel wird beim Kleintier auf eine Therapie verzichtet, da sich zum Zeitpunkt der Diagnose bei nahezu allen Tieren Metastasen ausgebildet haben. Selbst wenn der Tumor lokal begrenzt ist, sind Pankreatektomien mit oder ohne Duodenektomie wenig erfolgsversprechend. Ebenso erfolglos sind Chemotherapien und Bestrahlungen. Ab dem Zeitpunkt der

Diagnose beträgt die Überlebenszeit für Kleintiere 3-90 Tage [7]. In der Humanmedizin stehen im Vergleich zur Veterinärmedizin mehrere Therapieoptionen des Adenokarzinoms zur Verfügung. Welche Therapie Anwendung findet, ist abhängig von der Tumogröße, der lokalen Ausbreitung, der Ausbildung von Fernmetastasen und vom Allgemeinzustand des Patienten (siehe Abb.1).

1.7.1 Resektion

Die Resektion (Operation) stellt die beste Therapiemöglichkeit für die betroffenen Patienten dar. Eine vollständige chirurgische Entfernung ist nur dann durchführbar, wenn der Tumor lokal begrenzt ist und es zum Zeitpunkt der Diagnose zu keiner Metastasierung kam. Sind nah benachbarte Strukturen wie die Pfortader infiltriert, kann je nach Meinung des zuständigen Operateurs eine Resektion in Erwägung gezogen werden [19]. Der chirurgische Eingriff ist aufgrund der späten Diagnose bei maximal 20% der Patienten möglich [26]. Obwohl es das generelle Ziel jeder Resektion ist, den Tumor im Gesunden zu entnehmen (R0-Resektion), wird eine R0-Resektion nur selten erzielt. Die meisten Operationen werden als R1-Resektion klassifiziert, da im Resektionsrand histopathologisch Reste von Tumorgewebe nachweisbar sind, wohingegen bei R2-Resektionen verbliebenes Tumorgewebe makroskopisch sichtbar ist [27, 28]. Die Operationstechniken (OP-Techniken) unterscheiden sich je nach Lage und Größe des Tumors. Die OP-Techniken, die zur Verfügung stehen, beinhalten unter anderen die pyloruserhaltende Pankreaskopfresektion (PPPD), die Pankreaskopfresektion nach Kausch-Whipple, eine distale Pankreatektomie wie auch eine totale Pankreatektomie [29]. Neben einer chirurgischen Resektion, der meist adjuvante Therapien folgen, kommen weitere Behandlungsmöglichkeiten in Frage. Durch die Gabe neoadjuvanter Therapien können inoperable Tumore auf eine Größe reduziert werden, die eine chirurgische Entfernung erlauben [30]. Sollte eine Entfernung des Tumors nicht möglich sein, kommen palliative Therapien zum Einsatz (siehe Abb.1).

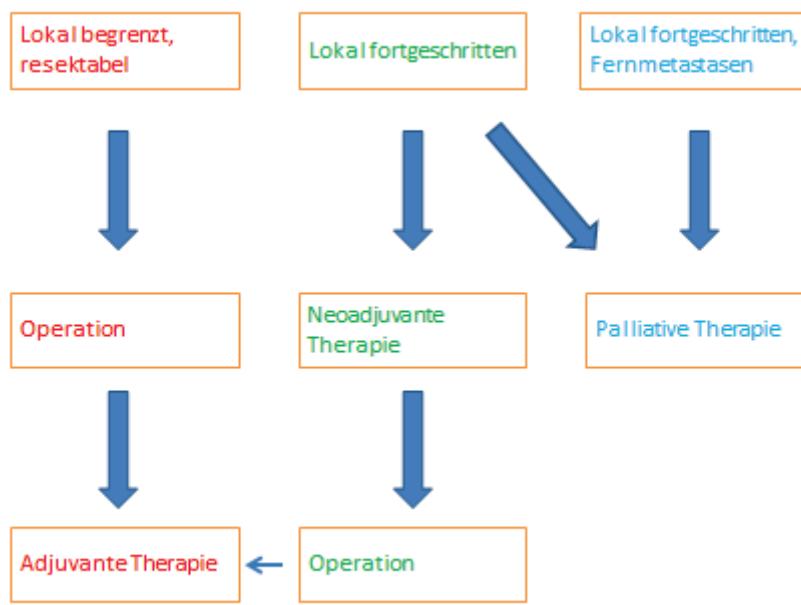


Abb. 1 Graphische Übersicht der Therapieoptionen des Pankreasadenokarzinoms

1.7.2 Adjuvante Therapie

Wie aggressiv das PaCa ist, wird deutlich, wenn man sich die Überlebenszeiten der Patienten anschaut, deren Tumor chirurgisch (als R0-Resektion) entnommen werden konnte. 5 Jahre nach der Resektion leben nur noch maximal 15-20% der Betroffenen. Meist sterben die Patienten, weil der Tumor metastasiert hat oder weil es zu Rezidiven gekommen ist [31]. Daher wird unterstützend zur operativen Entfernung eine nachfolgende adjuvante Therapie eingesetzt, die die Überlebenszeit der Patienten erhöhen soll. Zum Einsatz kommen meist Chemotherapeutika und vereinzelt Radiotherapien [31]. Die European Study Group for Pancreatic Cancer (ESPAC) verglich die mediane Überlebenszeit von Patienten nach einer Resektion, die keine adjuvante Therapie, eine Chemoradiotherapie oder eine Chemotherapie erhielten. Die Gabe von Chemotherapeutika erhöhte die mediane Überlebenszeit von 16,9 Monaten auf 21,6 Monate. Die Chemoradiotherapie übte hingegen keinen positiven Effekt aus [32]. Als adjuvante Therapie wird sehr häufig der Wirkstoff Gemcitabin eingesetzt. So verglich die CONKO-001 Studie Patienten, die nach der Resektion keine weitere Therapie oder den Wirkstoff Gemcitabin als adjuvante Therapie erhielten. Nach einer sechsmonatigen Therapie mit Gemcitabin konnte eine Verlängerung der medianen Überlebenszeit im Vergleich zur alleinigen Resektion erreicht werden [33]. Obwohl die adjuvante Therapie den

chirurgischen Eingriff optimiert, tritt eine Heilung der Erkrankung in weniger als 1% der Fälle ein [34].

1.7.3 Neoadjuvante Therapie

Um die Größe des Tumors zu reduzieren, damit eine Resektion möglich wird, kann den Betroffenen eine Behandlung aus Chemotherapeutika und Bestrahlung angeboten werden. Dies wird als neoadjuvante Therapie bezeichnet. In den USA werden Patienten mit lokal fortgeschrittenem PaCa standardmäßig mit 5-Fluorouracil (5-FU) infundiert, um die Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber der folgenden Strahlentherapie zu erhöhen [35]. Mit der neoadjuvanten Therapie kann in 40% der Fälle eine R0 oder R1 Resektion zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden [30].

1.7.4 Palliative Therapie

Da bei 40% der Patienten das PaCa zum Zeitpunkt der Diagnose lokal fortgeschritten ist und sich bei weiteren 40-45% bereits Fernmetastasen gebildet haben, ist eine chirurgische Resektion hinfällig. Hier bleibt nur der Einsatz palliativer Therapeutika, die die Lebenszeit verlängern und die tumorbedingten Schmerzen lindern sollen [26]. Ohne eine palliative Therapie beträgt die mediane Überlebenszeit beim lokal fortgeschrittenen PaCa, bei dem nah benachbarte Strukturen mitinfiltriert sind, acht bis zwölf Monate. Für Patienten mit Fernmetastasen verkürzt sich die mediane Überlebenszeit auf drei bis sechs Monate, gerechnet ab dem Zeitpunkt der Diagnose [21]. Als Standardtherapie wird hauptsächlich Gemcitabin verwendet, womit 1-Jahres-Überlebensraten von ca. 18% erreicht werden. Darüber hinaus zeigt Gemcitabin im Vergleich zu 5-FU, das in den 50er Jahren Standard war, eine geringere Toxizität und damit bessere Verträglichkeit der Chemotherapie [36]. Mit der Therapie sollte, wenn möglich, direkt nach der Diagnose begonnen und das Medikament ohne Pausen verabreicht werden. Sind die Nebenwirkungen der Chemotherapie so stark, dass die Lebensqualität der Patienten dadurch reduziert wird, kann individuell entschieden werden, ob die weitere Verabreichung des Chemotherapeutikums sinnvoll ist [19].

1.7.4.1 Wirkmechanismus von Gemcitabin und 5-FU

Beide Chemotherapeutika wirken als Antimetaboliten. Gemcitabin ist ein Nukleosidanalogon, das intrazellulär phosphoryliert werden muss, um seine aktive Form zu erhalten [37]. 5-FU ist ein Pyrimidinanalagon, das sich wie Gemcitabin in die DNA der Zelle einlagert und die Replikation stört [38], was dann zum Zelltod führt. Die Wirkungsstärke beider Zytostatika ist

vergleichbar. Allerdings hat Gemcitabin weniger Nebenwirkungen, die sich in Schmerzen und Gewichtsreduktion äußern, als 5-FU [19].

1.7.4.2 Nutzen und Auswirkung der palliativen Chemotherapie

Trotz der Anwendung einer Chemotherapie kann die Lebenszeit der Patienten nur minimal verlängert werden. Die Gründe hierfür sind vielfältig. Großen Einfluss hat sicherlich die geringe Ausbildung von Blutgefäßen im Bereich des Tumors, wodurch die Zytostatika keine hohen Wirkstoffkonzentrationen erlangen können [38]. Doch selbst wenn die Substanzen das Tumorgewebe erreichen, können sie dieses nicht ausreichend genug zerstören, da der Tumor oft gegen Chemo- und Radiotherapien resistent geworden ist [19]. Derzeit mangelt es an Therapiemöglichkeiten, die erfolgsversprechend sind. Daher wird stetig nach neuen Therapieansätzen gesucht. Es entstand die Idee, Zytostatika zu kombinieren, um deren Wirkung zu verbessern. Die meisten dieser Therapien lieferten keine vielversprechenden Ergebnisse. FOLFIRINOX hingegen, eine Kombination aus Oxaliplatin, Irinotecan, Fluorouracil und Leucovorin, konnte eine mediane Überlebenszeit von 11,1 Monaten erzielen. Im Vergleich zur Monotherapie mit Gemcitabin stellt die FOLFIRINOX-Therapie eine Steigerung um 4,3 Monate dar. Allerdings eignet sich FOLFIRINOX nur für Patienten mit sehr gutem Allgemeinbefinden, da die Gefahr einer sich entwickelnden Neutropenie besteht [39]. Weil die alleinige Gabe von Chemotherapeutika keine befriedigenden Ergebnisse liefert, wird nach anderen breitgefächerten Therapiemöglichkeiten gesucht. So erhofft man sich beispielsweise bessere Heilungschancen durch den Einsatz von Immuntherapeutika, wobei hierfür zunächst die Interaktion zwischen den Zellen und Mechanismen des Immunsystems und der neoplastischen Vorgänge verstanden werden muss, bevor derartige Therapien weiter optimiert und entwickelt werden können [40].

1.8 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein sehr komplexes Netzwerk, das unseren Körper vor zahlreichen Gefahren schützt. Neben bakteriellen und viralen Infektionen kann es den Organismus vor der Entstehung von Allergien, Autoimmunerkrankungen und Neoplasien bewahren [41]. Es wird in das angeborene und erworbene Immunsystem unterteilt. Die Immunantwort kommt in der Regel durch das Zusammenspiel beider Teile zustande. Zellen des angeborenen Immunsystems arbeiten unspezifisch und wehren körperfremde Zellen ab oder präsentieren Bruchteile davon dem erworbenen Immunsystem, das diese Zellen zielgerichtet und spezifisch

beseitigen kann. Um einen Angriff auf körpereigene Zellen zu vermeiden und um eine Immunantwort kontrollieren zu können, verfügt das Immunsystem über regulierende Mechanismen und immunhemmende Zelltypen. Ein Gleichgewicht zwischen aktivierenden und hemmenden Mechanismen sorgt dafür, dass der Organismus vor Fremdeinwirkung geschützt ist und dennoch keiner Selbstzerstörung zum Opfer fällt [41].

1.8.1 Zellen des angeborenen Immunsystems

Zu den Vertretern des angeborenen Immunsystems gehören Neutrophile, Makrophagen, dendritische Zellen (DC), Mastzellen und natürliche Killerzellen (NK). Über Oberflächenmoleküle und intra- oder interzelluläre Signalwege können sie verschiedene Pathogene, infizierte Zellen, Tumorzellen und geschädigtes Gewebe erkennen. Diese Interaktion führt zur Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen, die ihrerseits unterschiedliche Reaktionen hervorrufen können. Unter anderem wird das erworbene Immunsystem in das immunologische Geschehen miteinbezogen [41, 42].

1.8.2 Zellen des erworbenen Immunsystems

Die Wirkungsweise der erworbenen Immunität ist ebenfalls sehr komplex. Die Hauptvertreter stellen B-Zellen und T-Zellen dar. Plasmazellen, die aus den B-Zellen entstehen, produzieren spezifische Antikörper gegen Antigene und lösen dadurch eine humorale Immunantwort aus. T-Zellen sind für die zelluläre Immunantwort zuständig. Eines ihrer Hauptmerkmale stellt der T-Zell-Rezeptor (TCR) dar, mit welchem sie Antigene auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (APC) erkennen können. Je nach MHC-Klassen-Molekül (MHC I/II) der antigenpräsentierenden Zellen werden CD8⁺ zytotoxische T-Zellen oder CD4⁺ T-Helfer-Zellen aktiviert. Es folgt eine Zytokinausschüttung, die den Verlauf der weiteren Immunantwort bestimmt. CD4⁺ T-Helfer-Zellen können sowohl CD8⁺ T-Zellen wie auch naive B-Zellen in ihrer Funktion unterstützen, wohingegen CD8⁺ zytotoxische T-Zellen unerwünschte Zellen direkt abtöten können [41, 42].

1.8.3 Dendritische Zellen-Zweigstelle des angeborenen und erworbenen Systems

Damit die gemeinsame Arbeit zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem funktioniert, bedarf es Zellen wie die dendritischen Zellen (DC), die abhängig von ihrem Reifungsgrad unterschiedliche Funktionen erfüllen können. Die zunächst unreifen dendritischen Zellen halten sich in zahlreichen Geweben des Organismus auf und können über die Interaktion mit Antigenen aktiviert werden [41, 43]. Die Antigene binden an Toll-like-

Rezeptoren (TLR), die sowohl extra- wie auch intrazellulär von den DC exprimiert werden können [44]. Nachfolgend werden Chemokinrezeptoren hochreguliert, wodurch DC das ursprüngliche Gewebe verlassen und den regionalen Lymphknoten infiltrieren können, um auf naive T-Zellen zu treffen. Gleichzeitig werden Oberflächenmoleküle (CD80/CD86) auf den DC exprimiert, deren zuständiger Rezeptor (CD28) von naiven T-Zellen exprimiert wird. Die T-Zelle wird nun durch die Bindung des Antigens an ihren TCR und durch die Bindung der kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 an ihren CD28 Rezeptor angeregt (siehe Abb.2). Sie entwickelt sich jetzt in Richtung Effektor-T-Zelle und Gedächtnis-T-Zelle und nimmt aktiv am immunologischen Geschehen teil [41, 43]. Damit eine zu starke Aktivierung der Zellen, die möglicherweise zur Schädigung von gesundem Gewebe führt, verhindert wird, beinhaltet das Immunsystem Zellen und Mechanismen mit regulierender Funktion.

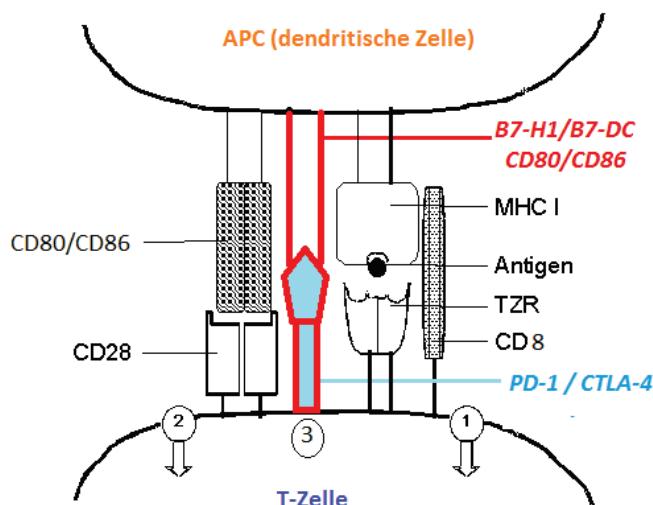


Abb. 2 T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Regulierung. Eine vollständige Aktivierung der naiven T-Zellen erfolgt nach Bindung des Antigen-MHC-Komplexes an den TZR (Signal 1) und nach der Interaktion von kostimulatorischen Molekülen (Signal 2, z.B. Bindung von CD80/CD86 auf einer APZ an CD28 auf der T-Zelle). Die Regulierung der T-Zellen (Inhibition) kann sowohl durch die Bindung von B7-H1/B7-DC an den Rezeptor PD-1 wie auch durch die Bindung von CD80/CD86 an den Rezeptor CTLA-4 erfolgen (Signal 3). Quelle: Orissa Bender: Untersuchungen zur Expression des TIM-3 Moleküls auf murinen T-Helfer-Zellen, 2003[45], MODIFIZIERT

1.8.4 Regulatorische Zellen

Während der Reifung der Immunzellen im Thymus wird die zentrale Toleranz ausgebildet. In diesem Prozess werden Lymphozyten, die gegen körpereigene Antigene aktiv sind, eliminiert [46]. Allerdings können nicht alle autoreaktiven Lymphozyten erkannt werden und dadurch vereinzelt in die Peripherie des Körpers gelangen [47]. Kommt es nun während eines ent-

zündlichen Prozesses zur Freisetzung körpereigener Moleküle, die fälschlicherweise von autoreaktiven Lymphozyten als Fremdantigene erkannt werden, können Autoimmunerkrankungen entstehen. Um dies zu verhindern, gibt es regulatorische Zellen, die generell den Ablauf einer Immunantwort überwachen und gegebenenfalls in diesen eingreifen. Dieser Mechanismus wird auch als periphere Toleranz bezeichnet [48].

1.8.4.1 Physiologische Funktion der regulatorischen T-Zellen

Natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen (T_{reg}) sind als $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T-Zellen definiert. Sie entstehen im Thymus [49] und verhindern das Auftreten von Autoimmunerkrankungen und Allergien, in dem sie vor allem die T-Zellen in ihrer Aktivität hemmen [50]. Die Suppression erfolgt in der Regel antigenabhängig und durch direkten Zell-Zell-Kontakt [49]. Falls es unglücklicherweise zur Entstehung immunmediierter Entzündungen aufgrund einer überproportionalen Immunantwort kommt, schützen T_{reg} durch ihre hemmende Funktion den Körper vor Selbstschädigung [50, 51].

1.8.4.2 Myeloide Zellen können immunsuppressiv sein

Neben den T_{reg} können auch die Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) stark immunsuppressiv sein. Sie können aus der myeloischen Zellreihe entstehen, wenn der Organismus mit chronischen Entzündungen oder mit der Entwicklung eines Tumors zu kämpfen hat. In einem solchen Fall werden die physiologischen Differenzierungsschritte der myeloischen Ursprungszellen im Knochenmark blockiert. Als Folge können sich die unreifen myeloischen Zellen nicht zu reifen myeloischen Zellen entwickeln und als dendritische Zellen, Makrophagen, Granulozyten und Monozyten das Knochenmark verlassen. Es entsteht vielmehr eine sehr heterogene Zellpopulation unreifer MDSC, die sich in granulozytäre und monozytäre MDSC unterteilen lässt und später genauer beschrieben wird [52].

1.8.5 Regulatorische Moleküle

Neben hemmenden Zellen wirken auch regulatorische Moleküle über spezifische Signalwege immunsuppressiv.

1.8.5.1 Die Funktion regulatorischer und kostimulatorischer Signalwege

Einer der bekanntesten regulatorischen Signalwege, der zu den sogenannten „immunologischen Checkpoints“ gezählt wird, ist der B7:CTLA-4 Signalweg. Er steht in enger Beziehung zu dem kostimulatorischen Signalweg B7:CD28. Die Liganden beider Signalwege sind das CD80 und das CD86 Molekül (B7-1/B7-2), die sich hauptsächlich auf antigenpräsentierenden Zellen

befinden [53]. Es wurde bereits erläutert, dass es mehrere Schritte benötigt, um eine T-Zelle zu aktivieren. Die Aktivierung hat erst dann stattgefunden, wenn das Antigen an den TCR der T-Zelle und CD80/CD86 an den CD28 Rezeptor derselben T-Zelle gebunden hat. Parallel hierzu wird der Rezeptor CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4) auf der T-Zelle rapide hochreguliert, um eine überschießende Immunantwort zu verhindern. Es kommt zu einem Konkurrenzverhalten zwischen dem CD28 und dem CTLA-4 Rezeptor (siehe Abb.2). Wohingegen die Bindung an CD28 die T-Zell-Aktivierung und -Proliferation wie auch die Zytokinausschüttung fördert, leitet CTLA-4 unter anderem die Ausschüttung immunhemmender Zytokine ein und verhindert die T-Zell-Aktivierung[53]. Neben dem B7:CTLA-4 Signalweg wird auch der B7-H1:PD-1 Signalweg zu den regulatorischen Signalwegen gezählt. Beide Signalwege sorgen dafür, dass das erworbene Immunsystem in seiner Tätigkeit begrenzt, terminiert oder abgeschwächt werden kann [53].

1.8.5.2 PD-1 und seine Liganden B7-H1/B7-DC

Auf aktivierte T-Zellen kann ein weiterer transmembraner Rezeptor vorhanden sein. Dieser wird als programmed death Rezeptor PD-1 bezeichnet und befindet sich vor allem auf aktivierte T- und B-Zellen sowie auf myeloischen Zellen [53, 54]. Die beiden regulatorischen Moleküle, die an PD-1 spezifisch binden können, sind die Liganden B7-H1 (PD-L1) und B7-DC (PD-L2). B7-H1 kann von B-Zellen, T-Zellen, myeloischen und dendritischen Zellen als auch von regulatorischen T-Zellen exprimiert werden. B7-DC befindet sich hingegen vor allem auf Makrophagen und dendritischen Zellen und wird somit restiktiver exprimiert als B7-H1 [54]. Es ist interessant, dass die Liganden auch auf anderen Zellen vorkommen können, die keinen hämatopoetischen Zellursprung haben. So kann B7-H1 beispielsweise auch auf mikrovaskulären, endothelialen Zellen und von Zellen zahlreicher Organe wie Herz, Plazenta, Pankreas und von vielen Tumorzellen exprimiert werden [54]. PD-1 und seine Liganden regulieren die Immunantwort (v.a. die T-Zell medierte) und wirken bei der Ausbildung der zentralen und der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz mit [55]. In den vergangenen Jahren wurden viele Studien durchgeführt, die die genaue Funktion des Signalwegs aufzeigen sollten. Die gewonnenen Ergebnisse waren allerdings am Anfang sehr kontrovers. Während zunächst einige Arbeitsgruppen davon ausgegangen sind, dass die beiden an PD-1 gebundenen Moleküle die T-Zell-Proliferation verbessern [56, 57], konnten andere zeigen, dass die Moleküle die Proliferation der T-Zellen inhibieren [58-60]. Heutzutage werden B7-H1 und B7-DC als regulatorische Moleküle bezeichnet. Neben der T-Zell-Proliferation hemmen sie weiterhin

die Zytokinproduktion der T-Zellen wie auch deren zytotoxische Funktion [54]. Weitere Forschungsarbeiten konnten Unterschiede zwischen den Molekülen feststellen. Während B7-H1 wesentlich häufiger von den Zellen exprimiert wird, kommt B7-DC in sehr geringer Menge vor, hat allerdings eine dreifach höhere Affinität für PD-1. Zusätzlich wird die Expression der Moleküle durch unterschiedliche Zytokine stimuliert. Beispielsweise können Interferon gamma (IFN γ) [61] und andere proinflammatorische Moleküle das B7-H1 Molekül hochregulieren [62], während Interleukin 4 (IL-4) [63] die B7-DC Expression anregt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass B7-H1 an CD80 binden kann, wozu B7-DC nicht in der Lage ist [55, 63]. Darüber hinaus können diese Moleküle unterschiedlich agieren. Es wird derzeit stark davon ausgegangen, dass B7-DC die Immunantworten, die vom Typ2 der T-Helferzellen (Th2) ausgelöst werden, abschwächt und reguliert und somit eher die humorale Immunantwort beeinflusst. B7-H1 steuert hingegen vielmehr Immunantworten, die vom Typ1 der T-Helferzellen (Th1) ausgelöst werden und somit die zelluläre Immunantwort betreffen. Beide Moleküle können sowohl die Induktionsphase der zustande kommenden Immunantwort wie auch deren Effektorphase modulieren [64, 65]. Obwohl die physiologischen Funktionen regulatorischer Zellen und Mechanismen sehr wichtig sind, sind sie insbesondere bei der Entstehung eines Adenokarzinoms der Bauchspeicheldrüse sehr kontraproduktiv, weswegen die Interaktion zwischen dem Immunsystem und dem PaCa verstanden werden muss.

1.9 Tumorimmunologie

Während der Entwicklung des Adenokarzinoms entsteht ein stark immunsuppressive Mili- eu, in welchem der Anteil regulatorischer Zellen und Mechanismen überwiegt. T_{reg}, MDSC und B7-H1 Moleküle dominieren gegenüber zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen, wodurch das Immunsystem daran gehindert wird, den Tumor vollständig zu bekämpfen [40]. Weil das physiologische Gleichgewicht zwischen aktivierenden und hemmenden Mechanismen nicht mehr besteht, ist es dem Tumor möglich, dem Angriff des Immunsystems zu entkommen.

1.9.1 Der Angriff des Immunsystems gegen die Tumorzellen

Da CD8⁺ T-Zellen im PaCa und dessen umliegendem Gewebe vorhanden sind und ihre Zahl im Vergleich zum gesunden Gewebe deutlich erhöht ist, kann davon ausgegangen werden, dass das Vorhandensein von neoplastischen Vorgängen das Immunsystem aktiviert und die Anti-Tumor-Immunantwort fördert. Denn je höher die Zahl der zytotoxischen T-Zellen, desto besser ist die Prognose für die Patienten [66]. Die zytotoxischen T-Zellen nehmen Tumor-

assoziierte Antigene (TAA) wahr, was dazu führt, dass diese als körperfremde Zellen behandelt und nachfolgend zerstört werden. Werden erhöhte Zahlen von NK-Zellen im Tumor oder dessen umliegendem Gewebe vorgefunden, erhöht sich die Überlebenszeit der Patienten ebenfalls [42]. Nichtsdestotrotz sind auch die immunhemmenden Zellen und Moleküle in großer Zahl vorhanden, was die schlechte Prognose des Adenokarzinoms begünstigt.

1.9.2 Immunsuppressorische Zellen und Moleküle im Mikromilieu des PaCa

Sowohl im peripheren Blut von Patienten mit einem PaCa wie auch im PaCa selbst konnte eine erhöhte Konzentration von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) und von Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) verzeichnet werden [42]. Auch in Tumoren, die einem orthotopen murinen Modell des PaCa entstammten, in welchem Tumorzellen der Panc02-Zelllinie direkt in das Pankreas von Mäusen des Wildtyps injiziert wurden, kam es zu einer deutlichen Akkumulation dieser beiden Zelltypen [40, 52, 67].

1.9.2.1 T_{reg} und die Entstehung des PaCa

Die bereits erwähnte physiologische Funktion der T_{reg} ist in der Bekämpfung des PaCa sehr kontraproduktiv, da sie die Effektivität der Immunzellen durch direkten Zell-Zell Kontakt oder durch die Ausschüttung hemmender Zytokine und Adenosine verhindern [68]. Es ist noch nicht genau geklärt, wie es zur Rekrutierung der T_{reg} in die direkte Tumorumgebung kommt. Sie sind mit Rezeptoren (CCR4/CCR5) ausgestattet, die mit Chemokinen interagieren, die von antigenpräsentierenden Zellen wie von Effektor-T-Zellen ausgesandt werden sollen und zur Migration der T_{reg} beitragen [69, 70]. Zusätzlich können T_{reg} aktives TGF- β sezernieren, wodurch naive CD4 $^{+}$ T-Zellen zu T_{reg} konvertieren und dadurch die Suppressorfunktion der T_{reg} verstärken. Neben den natürlich vorkommenden T_{reg} gibt es auch induzierte regulatorische T-Zellen (iT_{reg}), die nicht im Thymus gereift sind und aus naiven CD4 $^{+}$ T-Zellen, aber auch aus aktivierten T-Effektorzellen entstehen können [49, 71]. Dies kann der Fall sein, wenn antiinflammatorische Zytokine auf diese Zellen einwirken. Insbesondere die Ausschüttung von Interleukin 10 (IL-10) führt zur Entstehung von Typ-1 regulatorischen T-Zellen (T_{R1}), die eine der Hauptpopulationen von iT_{reg} darstellen. Während natürlich vorkommende T_{reg} FoxP3 $^{+}$ sind, exprimieren die iT_{reg} nicht zwingend FoxP3. Des Weiteren supprimieren sie antigenunabhängig und benötigen auch keinen direkten Zellkontakt [49, 51, 71, 72].

1.9.2.2 Wie MDSC zum Tumorwachstum beitragen

MDSC stellen eine heterogene Zellpopulation unreifer myeloischer Zellen dar. Für die Rekrutierung der MDSC in den Tumor und dessen unmittelbare Umgebung sind verschiedene Mechanismen verantwortlich. Tumorzellen können Mediatoren absondern, die die Myelopoiese im Knochenmark zwar stimulieren, gleichzeitig aber die Differenzierung zu reifen myeloischen Zellen stören, wodurch MDSC entstehen. Nachfolgend werden durch weitere Mediatoren, die vom Tumorstroma oder von aktivierte T-Zellen entstammen, die MDSC angelockt und aktiviert [52]. MDSC ($\text{Gr-1}^+ \text{CD11b}^+$) können in zwei Zellpopulationen unterteilt werden. Den Hauptanteil machen granulozytäre MDSC aus. Murine granulozytäre MDSC sind charakterisiert durch $\text{CD11b}^+ \text{Ly6G}^+ \text{Ly6C}^{\text{low}}$ Oberflächenmarker, die humanen als $\text{CD11b}^+ \text{HLA-DR}^{-/\text{low}} \text{CD15}^+ \text{CD14}^-$. Weiterhin werden die murinen monozytären MDSC anhand von $\text{CD11b}^+ \text{Ly6G}^- \text{Ly6C}^{\text{high}}$ definiert, die humanen hingegen anhand von $\text{CD11b}^+ \text{HLA-DR}^{-/\text{low}} \text{CD15}^- \text{CD14}^+$ [52]. Seit 2012 sind Oberflächenmarker zur Bestimmung von MDSC auch im peripheren Blut von Hunden bekannt. Sie können mittels $\text{CD11b}^+ \text{CD14}^- \text{MHCII}^-$ nachgewiesen werden [73]. MDSC verfügen über zahlreiche Mechanismen, die die Immunreaktionen hemmen.

- **Arginase1-Produktion**

MDSC produzieren das Enzym Arginase1, welches das Substrat Arginin zu Urea und L-Ornithin verstoffwechselt. Auf diese Weise wird CD8^+ T-Zellen ein sehr wichtiges Substrat entnommen. Ohne Arginin sind die Zellen nicht imstande zu proliferieren, was dazu führt, dass sie in ihrer Aktivität gehemmt werden [52].

- **Die Ausbildung von oxidativem Stress**

Die Proliferation von T-Zellen kann durch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und reaktiver Nitrogenspezies (RNS) erheblich gestört werden. ROS wird von granulozytären MDSC und RNS hauptsächlich von monozytären MDSC produziert [74].

- **MDSC mindern die L-Selectin-Expression auf naiven T-Zellen**

L-Selectin (CD62L) verhilft naiven T-Zellen Lymphorgane zu infiltrieren, um mit antigenpräsentierenden Zellen in Kontakt zu treten. Auf diese Weise entstehen aus naiven T-Zellen hochspezialisierte Effektor-T-Zellen, die eine Immunantwort gegen Antigene gezielt ausführen können. MDSC können die L-Selectin-Expression auf naiven T-Zellen mindern. Durch das reduzierte Vorhandensein von L-Selectin wird dazu beigetragen, dass eine effektive Immunantwort verhindert wird [74].

- **Aktivierung von T_{reg}**

Wie bereits oben erwähnt, können CD4⁺ T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) konvertieren. Dies geschieht auch dann, wenn sie in direktem Zellkontakt zu den MDSC stehen. Lösliche Substanzen (wie IFN γ), die von den MDSC produziert und ausgeschüttet werden, liefern der naiven CD4⁺ T-Zelle ein ausreichendes Signal, um sich zur regulatorischen T-Zelle (T_{reg}) zu differenzieren. Mithilfe der T_{reg} können folgend Immunantworten gehemmt werden [74].

1.9.2.3 Dysfunktion der dendritischen Zellen im Mikromilieu des PaCa

DC sind von entscheidender Bedeutung in der Herstellung tumorspezifischer T-Zellen [75]. Sie werden in zwei Subpopulationen unterteilt. Murine konventionelle DC (cDC) sind CD11c⁺CD11b⁺Gr-1⁻, humane konventionelle DC sind CD11c⁺BDCA1⁺CD123⁻. Murine plasmazytoiden DC (pDC) sind als CD11c^{int}CD45R⁺Gr-1⁻ charakterisiert [76], die humanen als CD11c^{-/low}BDCA1^{-/low}CD123⁺[74]. Im humanen PaCa kommen DC wenn überhaupt nur im Randbereich des Tumors vor, wobei gezeigt werden konnte, dass eine geringe Anzahl der DC im PaCa die Prognose sichtlich verschlechtert [42]. Studien konnten zeigen, dass Tumorzellen in der Lage sind, DC in ihrer Aktivität und in ihrem Vorhandensein zu hemmen. Wie bereits erwähnt, greift der Tumor mithilfe unterschiedlicher Signale in die Differenzierung myeloischer Zellen ein. Dies sorgt für das Entstehen von MDSC und für die Abnahme der Zellzahl der DC. Durch den Mangel an DC kann die Aktivierung des erworbenen Immunsystems nicht optimal stattfinden und das Tumorwachstum weiter voranschreiten [42, 74].

1.9.2.4 B7-H1 auf Tumorzellen

Das regulatorische Molekül B7-H1 wird auf nahezu allen Tumorentitäten vorgefunden [77]. Studien haben gezeigt, dass die Expression des B7-H1 Moleküls auf den Tumorzellen des PaCa negativen Einfluss auf die Überlebenszeit der Patienten hat. Tragen die Zellen jedoch kein oder nur wenig B7-H1 auf ihrer Oberfläche, verbessert sich die Prognose für die Patienten signifikant, weshalb mittlerweile reseziertes Tumorgewebe auf das Vorhandensein des Moleküls untersucht wird und als prognostischer Marker dient [78]. Die Minderung von B7-H1 könnte zu einer Reduzierung des PaCa führen. So versuchte Okudaira et al. in einer Studie die Auswirkungen von B7-H1 und B7-DC auf Tumorzellen zu untersuchen, indem beide Moleküle mit spezifischen Antikörpern blockiert wurden und die Veränderungen anhand der gemessenen Tumorgrößen festgehalten wurden [79]. Hierfür blockierte er in *in vivo* Untersuchungen an Mäusen mit einem Adenokarzinom der Bauchspeicheldrüse beide regulatori-

schen Moleküle mit spezifischen Antikörpern. Für das B7-H1 Molekül ergaben sich folgende Resultate: Die Expression des Moleküls führt zur verminderten Ausschüttung des Zytokins IFNy, wodurch weniger CD8⁺ T-Zellen und die Subpopulation M1 der Makrophagen das Tumorgewebe infiltrieren können. Für B7-DC konnten andere Funktionen aufgezeigt werden: Die Expression des Moleküls erhöht sowohl die Menge des Zytokins Interleukin 10 (IL-10) wie auch die Menge des Transkriptionsfaktors FoxP3, was zu einer erhöhten Zahl an T_{reg} im Bereich des Tumors führt. Beide Moleküle wirken zwar auf unterschiedlichen Wegen, dennoch wird durch beide Moleküle, insbesondere aber durch die Anwesenheit von B7-H1, das Tumorwachstum signifikant gefördert [79]. Auch Bazhin et al. verwendete in *in vivo* Versuchen an einem orthotopen murinen Panc02 Modell monoklonale Antikörper gegen B7-H1 und betrachtete vor allem die Überlebenszeit der Mäuse und die Metastasierungsrate des Tumors. Aufgrund der Blockade konnte die Überlebenszeit der Mäuse signifikant verlängert werden [40]. In *in vitro* wie in *in vivo* Studien des murinen Panc02 Modells konnte zusätzlich gezeigt werden, dass B7-H1 auch auf Immunzellen und nicht nur auf Tumorzellen vorkommen kann. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass sich die Menge von B7-H1 auf den Immunzellen erhöht, wenn die Mäuse tumortragend sind [40]. Die Fähigkeit des Tumors, insbesondere B7-H1 auf den Tumorzellen auszubilden und die Expression auf anderen Zelltypen zu erhöhen, ist eine der wichtigsten Mechanismen, um das Immunsystem zu hemmen. Die Forschungsarbeit mit B7-H1^{-/-} knock-out (B7-H1 KO) Mäusen ermöglicht es, die Rolle von B7-H1 sowohl im gesunden als auch im tumortragenden Organismus zu untersuchen. Die B7-H1 KO Mäuse wurden durch die homologe Rekombination embryonaler Stammzellen von C57/Bl-6 Mäusen generiert [80]. Wenn den B7-H1 KO Mäusen orthotop Panc02-Zellen in das Pankreas injiziert werden, kann B7-H1 lediglich von den Tumorzellen, nicht aber von anderen Zelltypen, wie den Immunzellen, exprimiert werden. Die Erkenntnis darüber, wie das Immunsystem während des Tumorwachstums gehemmt und reguliert wird, bietet die Möglichkeit, nach neuen Therapieansätzen im Bereich der Immuntherapie zu suchen.

1.10 Immuntherapie

Weil mit keiner der bisherigen Therapien das Wachstum oder das erneute Auftreten des PaCa verhindert werden konnte, werden derzeit immunologisch wirksame Substanzen untersucht, die entweder direkt gegen den Tumor arbeiten oder dessen Wachstum auf indirektem Weg hemmen. Direkt wirksam sind beispielsweise rekombinante monoklonale Antikörper, die tumorspezifische Antigene blockieren. Da bei Patienten mit PaCa häufig Mutationen

des KRAS Onkogens vorkommen, wird es als tumorspezifisches Antigen klassifiziert. Das mutierte Onkogen fördert die Angiogenese und dadurch das Tumorwachstum, weshalb man erhoffte, durch die Verabreichung von monoklonalen Antikörpern gegen KRAS das Wachstum des Tumors hemmen zu können. Obwohl die Gabe monoklonaler Antikörper für die Patienten weitaus weniger toxisch als die herkömmliche Chemo- und Radiotherapie ist, konnten keine befriedigenden Ergebnisse der Therapie verzeichnet werden [81]. Unter den Substanzen, die das Tumorwachstum auf indirektem Weg verhindern sollen, befinden sich Therapeutika, die die Funktion des Immunsystems beeinflussen, da viele Tumorarten eine lediglich schwache Immunantwort auslösen. Beispielsweise wurden monoklonale Antikörper gegen den CTLA-4 Rezeptor an Patienten mit Melanomen und Prostatakarzinomen verabreicht, was bei einigen Patienten zu einer Steigerung der Anti-Tumor-Immunantwort führte [81]. Auch bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem und metastasierendem PaCa wurde das regulatorische Oberflächenmolekül CTLA-4 spezifisch blockiert, weshalb sich bei manchen Patienten die Tumormasse verkleinerte [82, 83]. Bazhin et al. verabreichte spezifische Antikörper gegen das B7-H1 Molekül an tumortragende Mäuse, nachdem diesen orthotop Panc02-Zellen ins Pankreas injiziert wurden. Durch die Blockade von B7-H1 konnten die CD8⁺ T-Effektorzellen stimuliert und die T_{reg} inhibiert werden, wodurch die Mäuse länger am Leben blieben [40]. Zusätzlich werden vorklinische Studien mit Antikörpern gegen die Interleukin 2 (IL-2) Rezeptoren durchgeführt. Die Blockade der IL-2 Rezeptoren führte zu einer dezimierten Anzahl an T_{reg} in Patienten mit PaCa und zu erhöhten Anti-Tumor-Effekten [81]. Unter die beiden Kategorien der direkt wie auch der indirekt immunologisch wirksamen Substanzen fällt das pleiotrope Zytokin Interferon alpha (IFN α), das zur Gruppe der Typ I Interferone gezählt wird. Die Typ I Interferone werden klassifiziert in IFN α , IFN β und IFN ω . Die Kategorisierung erfolgt anhand der Aminosäuresequenz und der immunologischen Fähigkeit. Alle Typ I Interferone sind säurestabil und werden von Leukozyten produziert. Zu den Typ II Interferonen zählt IFN γ , das säurelabil ist und von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen hergestellt wird. In der Therapie wird größtenteils natürliches oder rekombinantes IFN α verwendet [84].

1.10.1 Wirkmechanismen von IFN α

In vielen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass IFN α neben einer antiviralen Wirkung verschiedene Eigenschaften besitzt, die gegen das Wachstum maligner Zellen hilfreich sein können. Somit kann IFN α einerseits immunmodulatorisch wirken, indem es das Wachstum, die Differenzierung und die Funktion zahlreicher Zellen des Immunsystems beeinflusst. Stu-

dien konnten zeigen, dass eine ein- bis zweistündige Inkubation von NK-Zellen mit IFN α ausreicht, um deren Zytotoxizität zu erhöhen [84]. Neben NK-Zellen werden auch T-Zellen und DC von IFN α aktiviert, was auch daran liegt, dass die Substanz die Expression des MHC-Klasse-I-Komplexes erhöht. Andererseits kann IFN α das Wachstum maligner Zellen direkt inhibieren. Die zugrunde liegenden Mechanismen beruhen unter anderem auf einer verminderten Expression von Onkogenen und auf einer vermehrten Expression von Tumor-Suppressor-Genen [85]. Zusätzlich kann die Substanz die Tumorzellzahl dezimieren, indem sie die Apoptose [85] von Tumorzellen einleitet und die Angiogenese [86] verhindert. Zuletzt erhöht IFN α die Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika und Strahlentherapien nachweislich [87, 88]. Aufgrund all dieser Eigenschaften wird die Substanz in zahlreichen Studien getestet. Beispielsweise wurden 287 Patienten mit reseziertem kutanem Melanom in zwei Gruppen eingeteilt. Die eine Gruppe erhielt als adjuvante Therapie hochdosiertes IFN α 2b über einen Zeitraum von einem Jahr. Bei der anderen Gruppe wurde lediglich eine Resektion durchgeführt. Das Ergebnis zeigte eine signifikante Verlängerung der medianen Überlebenszeit unter der IFN α 2b Therapie (3,8 Jahre zu 2,8 Jahre ohne IFN α 2b) und die mittlere rezidiv-freie Zeit erhöhte sich ebenfalls von 0,98 auf 1,7 Jahre [85]. Zusätzlich konnte die Studie zeigen, dass die Gabe von IFN α 2b sehr toxisch ist, wodurch die Therapie meist abgebrochen werden muss. Um die Toxizität zu verringern, hat man in einer weiteren Studie, welche auch die Therapiemöglichkeiten des kutanen Melanoms austestete, die IFN α 2b-Dosis reduziert. Leider konnten mit niedrigeren Konzentrationen keine Effekte der Therapie verzeichnet werden [85]. Auch die CapRi-Studie beschäftigte sich eingehend mit der Verabreichung von IFN α an Patienten mit reseziertem Adenokarzinom des Pankreas. Die Substanz wurde mit 5-FU, Cisplatin und Radiotherapie kombiniert und die Studie konnte zunächst zeigen, dass IFN α zu einer Aktivierung des Immunsystems führt. Anhand der gesteigerten Zellzahl der Neutrophilen, der Monozyten und der CD4 $^{+}$ und CD8 $^{+}$ T-Zellen konnte dies belegt werden [40, 89, 90]. Da sich die Überlebenszeit der Patienten allerdings nicht wie erwartet durch die Verabreichung von IFN α verlängerte [91], ist es denkbar, dass Immuntherapien auch die regulatorischen Zellen und Mechanismen aktivieren, die die erwünschte Reaktion abschwächen oder sogar das Gegenteil bewirken.

1.11 Ziele der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der Arbeit bestand darin, den Einfluss von IFN α auf die Zellen des Immunsystems und auf die Zellen der Panc02-Linie zu untersuchen. Es sollte geprüft werden, ob IFN α neben immunstimulierenden Eigenschaften auch solche Eigenschaften aufweisen kann, die das Tumorwachstum begünstigen und eine Immunantwort verhindern. Um festzustellen, ob IFN α regulatorische Zellen und Moleküle des Immunsystems aktiviert, wurde das Augenmerk insbesondere auf die Ausbildung des B7-H1 Moleküls gelegt. Neben den herkömmlichen Chemotherapeutika Gemcitabin und 5-FU wurde mit IFN α als Monotherapie wie auch als Kombinationstherapie gearbeitet (5-FU+IFN α und Gem+IFN α). Diese Arbeit soll das grundlegende Verständnis fördern, wie aktivierende und supprimierende Mechanismen des Immunsystems zusammenarbeiten. Wenn wir wissen, wie sich das Immunsystem während des Tumorwachstums verhält und wie Immuntherapien das Gleichgewicht zwischen aktivierenden und hemmenden Mechanismen verändert, können neue Therapiemöglichkeiten gegen diesen aggressiven Tumor erforscht werden.

Hierfür wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. *In vitro* Untersuchung zur Bestimmung des Einflusses verschiedener Therapien auf die Expression des B7-H1 Moleküls auf Panc02-Zellen.
2. *Ex vivo* Untersuchung zur Bestimmung des Einflusses verschiedener Therapien auf die Immunzellen von gesunden wie von tumortragenden Mäusen.
3. *Ex vivo* Untersuchung zur Bestimmung der Zytotoxizität von tumorinfiltrierenden Lymphozyten in Abhängigkeit unterschiedlicher Therapien. Hier wurde ein Vergleich zwischen Wildtyp-Mäusen und B7-H1 KO Mäusen hergestellt, um den Einfluss der An- und Abwesenheit des Moleküls auf den Immunzellen zu untersuchen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Tab. 1 Laborgeräte

<u>Gerät</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
	MACS MULTI stand	Miltenyi Biotec GmbH
Autoklav	2540 EL	Tuttnauer Systec GmbH Labor
Blutzentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf
Deckgläschen	20x26x0,4mm	LaborService Albert Brenzinger
ELISA Messgerät	OpsysMR	DYNEX TECHNOLOGIES
FACS	Flow cytometer FACS Canto II	Becton Dickinson (BD)
FACS Software	FlowJo Software	Tree Star, USA
Gefrierschrank	Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Gefrierschrank	Gefrierschrank -80°C	Thermo Scientific
Hämocytometer	Neubauer Improved-Zählkammer	neoLab Laborbedarf GmbH
Inkubator	IncubatorHeracell	Heraeus
Kühlschrank	Kühlschrank 4°C	Liebherr
Luminex Messgerät	Luminex® 100/200 System	BIO-RAD LABORATORIES
Luminex Software	Bio-Plex Manager™ Software 4.1	BIO-RAD LABORATORIES
Luminex Waschstation		Millipore GmbH
MACS Magneten	quadroMACS	Miltenyi Biotec GmbH
Mikroskop	Optical microscopeAxiostar plus	Zeiss
Mikroskop	Optical microscopeAxiovert 25	Zeiss

Multipipette	Multipipette®plus	Eppendorf
Pipette 0,5-10µl	Pipette Research	Eppendorf
Pipetten (1000µl, 200µl, 100µl, 20µl, 10µl)	Pipetman	Gilson
Pipetus	Pipetus®-akku	HirschmannLaborgeräte
Schüttler	Titer Plate Shaker	Thermo Scientific
Sterilbank	Sterile benchHerasafe	Heraeus
Tintendispensierer	Dispensette®	Brand
Tischzentrifuge	Kineticenergy 26 jouels	LabNet Laborsysteme GmbH
Vortex	Bio Vortex V1	Lab4you
Vortex	VortexGenie 2	Scientific Industries
Waage	EW600-2M	KERN&Sohn GmbH
Warmwasserbad	Shaker Bath SBS30	Stuart Scientific
Wecker	Digital timer	neoLab 2-2002
Zellzähler	Mechanischer Zellzähler	VWR International GmbH
Zentrifuge	Centrifuge 5810R	Eppendorf

2.1.2 OP-Material

Tab. 2 OP-Material

<u>Verwendetes Material</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Anatomische Pinzette	5 Inox	A.Dumont & Fils, Schweiz
Chirurgische Pinzette		A.Dumont & Fils, Schweiz
Hamilton-Spritze	GASTIGHT Syringe 25µl	Hamilton Company
Klammerapparat	Reflex 7 Clip Applier	CellPoint Scientific
Klammerentferner	Reflex Clip Remover	CellPoint Scientific
Klammern	Reflex 7 (7mm)	CellPoint Scientific
Messschieber		Mauser INOX
Nadelhalter nach Mayo-Hegar		Aesculap®
Nahtmaterial	Polysorb™ USP 5-0	Covidien AG

Narkosegerät	VIP™3000 Isoflurane	Matrix by Midmark
Schermaschine	Isis GT420	Aesculap®
Sterile Handschuhe	Gammex®PF IsDerm®	Ansell
Wärmeplatte	Hot Plate 062 mit Hot Plate Controller	Labotect
Watteträger mit Kopf	Meditip	servoprax® GmbH

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tab. 3 Verbrauchsmaterial

<u>Verwendetes Material</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
12-well-Platte	Cell Culture Plate steril, with lid	Greiner bio-one
6-well-Platte	Tissue Culture Plate	BD Biosciences
96-well-Platte	Tissue Culture Plate (Flat-Bottom/U-Bottom)	BD Biosciences
Aluminiumfolie	AluFolie	Carl Roth GmbH
Dispensierspritzen	Combitips advanced® 5ml/2,5ml Combitips®PLUS 0,5ml	Eppendorf
Einmal-Filterhalter	MillexSterilfilter 33mm Diameter	Millipore
ELISA Kit IFNγ	Mouse IFN gamma ELISA Ready-SET-Go!®	eBioscience
FACS-Röhrchen	5ml Polystyrene Round-Bottom-Tubes	BD Biosciences
Falcon 15ml, 50ml	Cellstar®Tubes	Greiner bio-one
Gewebekulturschalen/ Petrischalen	35x10mm, mit Nocken 94x16mm, mit Nocken	Greiner bio-one
Handschuhe	LATEX Disposable gloves S 6-7	VWR
Kryogefäß	Nalge® Cryoware	Thermo Fisher Scientific

Luminex Kit 12 plex	MILLIPLEX® MAP Kit Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 96-Well Plate Assay	EMD Millipore Corporation
Luminex Kit TGFß	MILLIPLEX®MAP Kit TGFß1 Single Plex Magnetic Bead Kit 96-Well Plate Assay	EMD Millipore Corporation
MACS-Säulen	MACS®Separation Columns (25LS Columns)	Miltenyi Biotec GmbH
Mikroreaktionsgefäß (1,5ml/2,0ml)	Safe-Lock Tubes	Eppendorf
Mikroreaktionsgefäß 0,5ml	SafeSealmicrotube 0,5ml	Sarstedt
Nadeln; verschiedene Größen	Microlance™3 23Gx1 (0,6mmx25mm) 26Gx1/2 (0,45mmx13mm) 30Gx1/2 (0,3mmx13mm)	BD Biosciences
Pipetten 5ml, 10ml, 25ml	costar®Stripette	Corning Incorporated
Pipettenspitzen	Barrier Tips 10µl	Avant Guard
Pipettenspitzen	Pipette TipGilson®Style 1000µl/200µl	Greiner bio-one
Spritzen 1ml	Injekt®-F 1ml	Braun
Spritzen 20ml, 50ml	Syringe Plastipak™	BD Biosciences
Spritzen 5ml, 10ml	Syringe Luer-Lok™	BD Biosciences
Tinte	Trypan Blue 0,5%	BiochromAG
Wägeschalen (Gr.1/Gr.2)		neoLab
Zellkulturflasche mit Schräghals	Tissue Culture Flask (steril)	BD Biosciences
Zellschaber	CellScraper 25cm	Sarstedt
Zellsieb	Cell Strainer 100µl Nylon	BD Biosciences
Zellsieb	Cell Strainer 40µl Nylon	BD Biosciences

2.1.4 Lösungen, Puffer und Medien

Tab. 4 Lösungen, Puffer und Medien

<u>Lösungen</u>	<u>Hersteller</u>
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (10x)	Sigma®
Ethylenediaminetetraacetic acid-disodium-salt solution 0,5M	SERVA Electrophoresis GmbH
FACS Clean Solution	BD Biosciences
FACS Flow Solution	BD Biosciences
FACS Shutdown Solution	BD Biosciences
Fetal-Calve-Serum (FCS)	BiochromAG
FoxP3 StainingBuffer Set → Bestandteile:	
Fixation/PermeabilizationDiluent	eBioscience
Fixation/Permeabilization Concentrate	eBioscience
10x PermeabilizationBuffer	eBioscience
ISO-Lösung → Bestandteile:	
DNase I (50.000U)	Roche
Collagenase III	BiochromAG
Collagenase IV	BiochromAG
Hyaluronidase	Sigma®
HBSS (Hank's Buffered Salt Solution)	PAA Laboratories GmbH
RPMI-1640 Medium	Sigma®

2.1.5 Pharmaka

Tab. 5 Pharmaka

<u>Pharmakon</u>	<u>Hersteller</u>
5-FU medac 5000mg (50mg/ml)	Medac Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH
Wirkstoff: 5-Fluorouracil	
70% Ethanol	Zentralbereich Neuenheimer Feld
Aqua ad injectabilia	Braun
Bepanthen Augen- & Nasensalbe	Bayer
Desinfektionsspray antifect® N liquid	Schülke&Mayr GmbH

Gemcitabin HEXAL® 40mg/ml (2000mg/50ml) HEXAL AG

Wirkstoff: Gemcitabin

Humanes Insulin (Insuman® Rapid)	Aventis Pharma AG
Isofluran Baxter (Isofluran)	Baxter GmbH
Mouse Interferon alpha a Activity: $1,07 \times 10^6$ units/ml Size: 1×10^5 units	R&D
Mycoplasma-Ex Spray	PromoKine
NaCl (Isotonische Kochsalzlösung 0,9%)	Braun
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH
Rimadyl® ad us. Vet., Injection solution (Carprofen)	Pfizer GmbH
Trypsin-EDTA	Sigma®

2.1.6 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tab. 6 Antikörper für die Durchflusszytometrie

<u>Spezifität</u>	<u>Konjugat</u>	<u>Klon</u>	<u>Isotyp</u>	<u>Endvolumen</u> <u>in μl*</u>	<u>Hersteller</u>
Fixable Viability Dye eFluor® 450	V450	-	-	1 μ l	eBioscience
Anti-Mouse NK-1.1	PE	PK136	Mouse (C3HxBALB7c) IgG2a, k	1 μ l	BD Pharmingen™
Anti-Mouse CD107a	APC	1D4B	Rat (SD) IgG2a, k	2 μ l	BD Pharmingen™
Anti-Mouse CD273 (B7-DC)	FITC	122	Rat IgG2a, k	3 μ l	eBioscience
Anti-Mouse CD4	V450	RM 4-5	Rat (DA) IgG2a, k	1 μ l	BD Horizon™

Materialien und Methoden

Anti-Mouse CD80	FITC	16-10A1	Armenian Hamster IgG2, k	1µl	BD Pharmingen™
Anti-Mouse CD11c	APC	HL3	Armenian Hamster IgG1, λ2	1µl	BD Pharmingen™
Anti-Mouse CD25	APC	3C7	Rat (LEW) IgG2b, k	6µl	BD Pharmingen™
Anti-Mouse CD62L	APC	MEL-14	Rat (F344) IgG2a, k	1µl	BD Pharmingen™
Anti-Mouse CD69	PerCP-Cy™5.5	H1.2F3	Armenian Hamster IgG1, λ3	3µl	BD Pharmingen™
Anti-Mouse CD11b	PerCP-Cy™5.5	M1/70	Rat (DA) IgG2b, k	1,5µl	BD Pharmingen™
Anti-Mouse Ly-6G/Ly-6C	APC-Cy™7	RB6-8C5	Rat IgG2b, k	0,25µl	BD Pharmingen™
Anti-Mouse CD274 (B7-H1)	PE	MIH5	Rat IgG2a, λa	3µl	eBioscience
Anti-Mouse Ly-6C	V450	AL-21	Rat IgM, k	0,1µl	BD Horizon™
Anti-Mouse CD45	V500	30-F11	Rat (LOU) IgG2b, k	2µl	BD Horizon™
Anti-Mouse CD115	APC	AFS98	Rat IgG2a, k	1µl	eBioscience
Anti-Mouse CD3e	APC-Cy™7	145-2C11	Armenian Hamster IgG1, k	1,5µl	BD Pharmingen™
Anti-Mouse CD8a	PerCP-Cy™5.5	53-6.7	Rat (LOU) IgG2a, k	1µl	BD Pharmingen™
Anti-Mouse FoxP3	FITC	FJK-16s	IgG2a, k	1µl	eBioscience

Anti-Mouse CD44	FITC	IM7	IgG2b, k	0,5µl	BD Pharmingen™
Anti-Mouse CD45R/B220	Pacific Blue	RA3-6B2	IgG2a, k	1µl	BD Pharmingen™
Anti-Mouse CD86	PE-Cy™7	GL1	IgG2a, k	1µl	BD Pharmingen™
Blocking-Anti-CD16/CD32		93	Rat IgG2a, λ	2µl	eBioscience
Anti-Mouse F4/80	FITC	BM8	Rat IgG2a, k	1µl	eBioscience

*Endvolumen: 2x10⁶Zellen/50µl

2.1.7 Beads für die Kompensation

Tab. 7 Beads für die Kompensation

Bezeichnung	Komponenten	Endvolumen in µl	Hersteller
Anti-Rat Ig, k/Negative Control (FBS) Compensation Particles Set	51-90-9001189 (BD™CompBeads) Anti-Rat Ig, k) 51-90-9001291 Negative Control (FBS)	1 Tropfen → 60µl	BD Bioscience
Anti-Rat and Anti-Hamster Ig, k/Negative Control Compensation Particles Set	51-90-9000949 (BD™CompBeads) Anti-rat/hamster Ig, k) 51-90-9001291 Negative Control (FBS)	1 Tropfen → 60µl	BD Bioscience

2.1.8 Beads für die magnetische Zellseparation

Tab. 8 Beads für die magnetische Zellseparation

Bezeichnung	Endvolumen in µl
CD45 MicroBeads, mouse (Miltenyi Biotec GmbH)	10µl/1x10 ⁷ Zellen

2.1.9 Software

Tab. 9 Software

<u>Software</u>	<u>Hersteller</u>
Bio-Plex Manager 4.1	BIO-RAD LABORATORIES
EndNote X7	Thomson Reuters
FlowJo 7.6.1 Diva	Tree Star
GraphPad Prism 5.01	GraphPad
MS Office Paket 2010	Microsoft
OpsysMR	DYNEX TECHNOLOGIES

2.1.10 Pankreaskarzinomzellen (Panc02)

Die Tumorzellen, die sowohl für die Operation an den Mäusen als auch für die Zellkultur verwendet wurden, gehörten der syngenen duktalen Pankreaskarzinom-Zelllinie Panc02 an [92].

2.1.11 Mäuse

Für die Experimente wurden zwei unterschiedliche Mauslinien verwendet. C57/Bl-6 Mäuse wurden von der Firma Charles River in Sulzbach und von Janvier, Frankreich, bezogen. Die genetisch veränderten B7-H1 KO Mäuse wurden von Prof. Dr. Percy Knolle und Dr. Linda Diehl aus Bonn zur Verfügung gestellt. Ursprünglich wurden die Mäuse von Dong et al. durch homologe Rekombination der Stammzellen des C57/Bl-6 Inzuchtstamms generiert [80]. In regelmäßigen Abständen wird das Genom der B7-H1 KO Mäuse überprüft.

Das Alter der Tiere bei der Anlieferung betrug mindestens sechs Wochen. Die Tiere wurden im klinisch experimentellen Bereich der interfakultären biomedizinischen Forschungseinrichtung der Universität Heidelberg unter spezifisch-pathogen freien Bedingungen gehalten. Die tierexperimentelle Arbeit erfolgte nach Genehmigung des Antrags für Tierversuche durch das Regierungspräsidium in Karlsruhe (Antragsnummern: 35-9185.81/G184-11, 35-9185.81/A10-11, 35-9185.81/T50-12).

2.2 Methoden

2.2.1 Orthotopes Mausmodell

2.2.1.1 Gewinnen der Panc02-Zellen

Die Panc02-Zellen wurden routinemäßig von Herrn Markus Herbst bei 37°C und 5% CO₂ in sterilen Kulturflaschen inkubiert. Um die Adhärenz der Zellen am Boden der Kulturflasche zu verringern, wurde zunächst Trypsin zu den Zellen hinzugefügt, um sie anschließend für weitere 4min bei 37°C zu inkubieren. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen vorsichtig mit dem Zellschaber vom Boden der Kulturflasche gelöst. Nach Zugabe von 10ml PBS wurden die Zellen in ein 15ml Falcon überführt und bei einer Einstellung von 23°C, 400g, 7min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1ml PBS aufgenommen. In einer 1:100 Verdünnung (Zellen:Trypanblau) wurden die lebenden Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählt, für die Operation in einer Konzentration von 2x10⁷Zellen/ml PBS aufgenommen und in ein Kryogefäß überführt und gekühlt.

2.2.1.2 Operation

Mittels Inhalationsnarkose wurden die Mäuse in das notwendige chirurgische Toleranzstadium versetzt. Die Einleitung der Narkose erfolgte mit Isofluran in einer Volumenkonzentration von 5%, für den Erhalt der Narkose reichten 3,5Vol% aus. Der Sauerstoffgehalt betrug 95Vol%. Die subkutane Injektion von 50µl Rimadyl (5mg/kg in einer 1:10 Verdünnung mit 0,9% NaCl) sorgte für die erforderliche Analgesie. Um die Austrocknung der Kornea zu verhindern, wurde eine Bepanthen Augensalbe verwendet.

In Dorsallage wurde das Abdomen und der ventrale Bereich des Sternums geschoren und desinfiziert. Die Laparotomie erfolgte in der Linea alba. Nach Lokalisation des Pankreas wurden 5µl der gewonnenen Panc02-Zellsuspension mit einer Hamilton Spritze in den Pankreaskopf injiziert und die Injektionsstelle für 30sek abgeklemmt. Nach Reposition des Pankreas wurde das Abdomen in einer fortlaufenden subkutanen und einer fortlaufenden kutanen Naht verschlossen. Als Nahtmaterial wurde eine Nadel-Faden-Kombination aus resorbierbarem Material verwendet (5-0 Polysorb). Zusätzlich wurde die Haut mit zwei Klammern gehalten, die sieben Tage nach der Operation entfernt wurden.

2.2.2 Probenentnahme

Gesunde Mäuse wurden in einem Alter von sechs bis acht Wochen, die tumortragenden Mäuse vier Wochen nach der Operation mittels zervikaler Dislokation tierschutzgerecht getötet. Nach Eröffnen der Bauchhöhle wurde die Milz sowie der Primärtumor steril entnommen und in gekühltem PBS aufbewahrt.

2.2.3 Herstellen einer Zellkultur

2.2.3.1 Anfertigen einer Splenozyten-Zellsuspension

Die gekühlten Milzen sowohl aus gesunden als auch aus tumortragenden Mäusen wurden im Labor unmittelbar unter sterilen Bedingungen verarbeitet.

Die Zellen wurden durch ein 100µl großes Zellsieb gemörsernt, das anschließend mit 10 ml PBS nachgespült wurde, um möglichst viele Zellen zu gewinnen. Nach dem Zentrifugieren bei einer Einstellung von 4°C, 400g, 5min wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1ml PBS aufgenommen, um erneut durch ein 40µl großes Zellsieb filtriert zu werden. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 1ml PBS aufgenommen und die Zellen unter dem Mikroskop mit Hilfe von Trypanblau und der Neubauer-Zählkammer in einer Verdünnung von 1:100 (Zellen:Trypanblau) ausgezählt.

2.2.3.1.1 Splenozyten-Zellkultur

Um die Vitalität der Zellen in Kultur zu erhalten, wurden sie in einem Nährmedium aufgenommen, das sich aus 10% fetalem Kälberserum und RPMI-Medium zusammensetzte.

Die Splenozyten wurden in 6-Well-Platten in einer Endkonzentration von 2×10^6 Zellen/ml Medium pro Well ausplaziert und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 5-Fluorouracil (Endkonzentration: 450µM, 5-FU), Gemcitabin (Endkonzentration: 15µM, Gem), Interferon alpha (1000 U/ 2×10^6 Zellen/ml, IFNα) oder mit den Kombinationen 5-FU+IFNα und Gem+IFNα therapiert. Die Kontrollzellen wurden mit 5µl PBS pro 2×10^6 Zellen/ml behandelt. Alle Zellen wurden für weitere 24h inkubiert.

2.2.3.2 Anfertigen einer Panc02-Zellsuspension

Die Panc02-Zellen wurden, wie unter Punkt 2.1.1 beschrieben, geerntet. Die Konzentration der Zellen wurde unter dem Mikroskop in einer 1:100 Verdünnung (Zellen:Trypanblau) ermittelt. Durch erneutes Zentrifugieren (23°C, 400g, 7min) wurde das restliche PBS, in welchem die Zellen zuvor gelöst waren, entfernt.

2.2.3.2.1 Panc02-Zellkultur

Die Panc02-Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml Medium pro Well in 6-Well-Platten ausplatziert. Die Inkubationszeiten sowie die Therapien waren identisch mit denjenigen der Splenozyten-Zellkultur.

2.2.4 Vorbereitung der Zellen für die Durchflusszytometrie

Nach 24h Inkubationszeit wurden sowohl die Splenozyten als auch die Panc02-Zellen geerntet, indem sie mit dem Zellschaber vorsichtig vom Boden der Wells gelöst und in ein 50ml Falcon überführt wurden. Der Mediumüberstand für die spätere Zytokinbestimmung wurde nach dem Zentrifugieren (4°C , 400g, 5min) bei -20°C weggefroren. Die Zellen wurden in 1ml StainBuffer (PBS + 0,02% EDTA) aufgenommen und in einer 1:100 Verdünnung (Zellen:Trypanblau) unter dem Mikroskop ausgezählt, um sie anschließend für die durchflusszytometrische Analyse (FACS-Analyse) vorzubereiten.

2.2.5 Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting)

Die Durchflusszytometrie erlaubt es, Zellen anhand bestimmter Merkmale zu charakterisieren. Die Zellen passieren mit hoher Geschwindigkeit einzeln einen Laser, wodurch sie angeregt werden. Das abgegebene Licht wird detektiert. Die Größe der Zelle ist im Vorwärtsstreulicht messbar (FSC), die Granularität im Seitwärtsstreulicht (SSC). Durch die Inkubation der Zellen mit fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern ist es möglich, verschiedene Subpopulationen der Zellsuspension zu charakterisieren und, falls von Interesse, auf die Quantität bestimmter Expressionsmoleküle Rückschluss zu ziehen. Um das Spektrum der Subpopulationen zu erhöhen, verfügt das Messgerät über mehrere Laser und Detektoren, die viele verschiedene Farbstoffe anregen und messen können. Zur Verringerung der Streuung des Lichts von einem Kanal in den anderen, wurden für jedes Experiment Kompensationen durchgeführt. Die Kompensationen dienten zur Identifizierung des Streulichts, das dann bei der Messung berücksichtigt werden konnte. Bei jeder Analyse wurden Proben verwendet, sogenannte FMO (fluorescence minus one), die als Negativkontrolle für die spätere Auswertung unerlässlich waren. Bei diesen Proben wurde auf jeweils einen Antikörper bei der Inkubation verzichtet. Alle Proben wurden mit dem BD Canto II Gerät gemessen und mit der FlowJo Software (Tree Star, USA) ausgewertet.

2.2.6 Immunphänotypisierung

Die Immunzellen wurden mit unterschiedlichen fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern versetzt, um die notwendigen Subpopulationen im BD FACS Canto II identifizieren zu können. Hierzu wurden verschiedene Paneele verwendet. Für die Färbung der Panc02-Zellen wurde ein Panel verwendet.

- **Panc02 Panel**

Um die Panc02-Zellen zu identifizieren, wurde der Marker CD45 zu den Zellen hinzugefügt. Die Panc02-Zellen waren CD45⁻, mithilfe des B7-DC und des B7-H1 Markers konnte die Expression der regulatorischen Moleküle auf allen lebenden Panc02-Zellen registriert werden.

- **CD4/CD8 Panel**

Durch die Zugabe des CD45 Antikörpers konnte zwischen Tumorzellen (CD45⁻) und Immunzellen (CD45⁺) unterschieden werden. CD3⁺ Zellen wurden in CD4⁺ und CD8⁺ Zellen aufgeteilt. Von diesen Populationen konnten die folgenden Subpopulationen ermittelt werden: Naive T-Zellen (CD62L⁺CD44⁻; T_{naive}), Effektor-T-Zellen (CD62L⁻CD44⁻; T_{eff}), zentrale Gedächtnis-T-Zellen (CD62L⁺CD44⁺; T_{cm}), Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CD62L⁻CD44⁺; T_{em}). Zusätzlich wurde die Expression des B7-H1 Moleküls mithilfe des B7-H1 Antikörpers gemessen.

- **DC Panel**

Die konventionellen dendritischen Zellen (cDC) konnten als CD11c^{high}CD11b⁺, die plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) als CD11c^{int}CD45R⁺ charakterisiert werden. Zusätzlich wurde die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 und die Expression des regulatorischen Moleküls B7-H1 ermittelt.

- **MDSC Panel**

Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) wurden anhand der Marker CD11b und Gr-1 charakterisiert (CD11b⁺Gr-1⁺) und folgend in ihre zwei Subpopulationen aufgeteilt. Die granulozytären MDSC konnten als Gr-1^{high}Ly-6C^{int} und die monozytären MDSC als Gr-1^{int}Ly-6C^{high} unterschieden werden. Augenmerk wurde auch auf die Makrophagen CD11b⁺Gr-1⁻F4/80⁺ gelegt. Bei allen Populationen wurde die B7-H1 Expression mittels B7-H1 Antikörper erfasst.

- **T_{reg} Panel**

Aus den CD4⁺ Zellen wurden die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}, CD25⁺FoxP3⁺) identifiziert. Auch hier wurde der B7-H1 Antikörper hinzugefügt und der Aktivierungsstatus der Zellen anhand des frühen Aktivierungsmarkers CD69 ermittelt.

- **Zytotoxizität Panel**

Für die Zytotoxizitätsbestimmung (siehe auch unter Punkt 2.2.9) wurde mittels CD45 zwischen Tumorzellen (CD45⁻) und tumorinfiltrierende Lymphozyten (TiL, CD45⁺) unterschieden. Die CD45⁺ Zellen wurden in zytotoxische T-Zellen (CD8⁺, CD3⁺CD8⁺) und in natürliche Killerzellen (NK, CD3⁻NK1.1⁺) aufgeteilt. Sowohl bei den zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen als auch bei den NK-Zellen wurde die Anzahl der Zellen, die degranuliert haben, anhand des Markers CD107a ermittelt. Auf Seiten der Tumorzellen wurde die Anzahl derjenigen, deren Zellmembran durchlässig geworden ist, mittels Viability Dye450 bestimmt.

2.2.7 Extrazelluläre Färbung

In einer Endkonzentration von 2x10⁶ Zellen/50µl StainBuffer wurden die Zellen mit 1µl Blocking-Substanz (AntiCD16/CD32) behandelt und für 15min im Dunkeln bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper am Fc-Rezeptor zu verhindern. Die Zellen wurden anschließend in FACS-Röhrchen überführt und für 20min im Dunkeln bei 4°C mit einem Mix aus unterschiedlichen fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern (siehe Paneele) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit 2ml StainBuffer bei einer Zentrifugeneinstellung von 4°C, 400g, 5min wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 150µl StainBuffer aufgenommen. Die Proben wurden bis zur Messung der Durchflusszytometrie auf Eis gestellt.

2.2.8 Intrazelluläre Färbung

Bei der intrazellulären Färbung wurden, nach Zugabe der Blocking-Substanz, alle fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörper hinzugegeben, die extrazellulär binden und nicht konjugiert sind. Nach einmaligem Waschen der Proben mit 1ml StainBuffer wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, indem sie mit 1ml Fixation/Permeabilisation Buffer für mindestens 3h bei 4°C im Dunkeln inkubiert wurden. Nach Ablauf der Zeit folgte ein zweimaliges Waschen mit 2ml Permeabilisation Buffer. Die Zellen wurden mit den restlichen konjugierten Antikörpern sowie den intrazellulär bindenden Antikörpern für weitere 20min bei 4°C im Dunkeln

inkubiert. Zweimaliges Waschen mit 2ml Permeabilisation Buffer folgte und das Zellpellet wurde in 150µl StainBuffer aufgenommen. Nachfolgend konnte die Messung am BD FACS Canto II durchgeführt werden.

2.2.9 Zytotoxizitätsmessung

Um die Zytotoxizität der tumorinfiltrierenden Lymphozyten in Gegenwart der Panc02-Zellen in Kultur zu messen, mussten zunächst die tumorinfiltrierenden Lymphozyten aus den Primärtumoren isoliert werden.

2.2.9.1 Separation der tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL)

Die Tumoren wurden unter sterilen Bedingungen mithilfe von Pinzette und Schere in einer Petrischale zerkleinert und in ein 50ml Falcon mit 5ml Isolösung pro Tumor überführt, um das Verklumpen der Zellen zu verhindern. Das Gemisch wurde für 15min im Wasserbad bei 80rev/min inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Tumoren durch ein 100µl Sieb gemörsert und der Überstand, bestehend aus PBS und Isolösung, abzentrifugiert (4°C, 400g, 5min) und verworfen. Das Zellpellet wurde in 1ml PBS aufgenommen und passierte zweimal das 40µl Zellsieb, wobei der Überstand erneut abzentrifugiert wurde und das Zellpellet in 1ml PBS aufgenommen wurde. Danach wurde die Gesamtzellzahl bei einer Verdünnung von 1:100 (Zellen:Trypanblau) unter dem Mikroskop ermittelt.

2.2.9.2 Magnetische Zellseparation (Magnetic-activated cell sorting; MACS)

Mithilfe des MACS-Verfahrens (Miltenyi Biotec) ist es möglich, bestimmte Zellpopulationen innerhalb einer Zellsuspension zu isolieren. Hierzu wird die Zellsuspension mit MicroBeads® (an Magnetpartikel gekoppelte Antikörper) vermischt (siehe Abb.3). Nach Ablauf der Inkubationszeit entsteht eine spezifische Bindung zwischen den MicroBeads® und den Rezeptoren der gewünschten Zellpopulation. Wenn die Zellen eine Säule passieren, die an ein magnetisches Feld gekoppelt ist, haften diejenigen Zellen an der Säule, die eine Bindung mit den MicroBeads® eingehen konnten. Diejenigen, die keine Bindung eingegangen sind, werden durch die Säule gespült. Nach Entfernen des Magneten kann die Säule gewaschen und die positive Zellfraktion gewonnen werden.

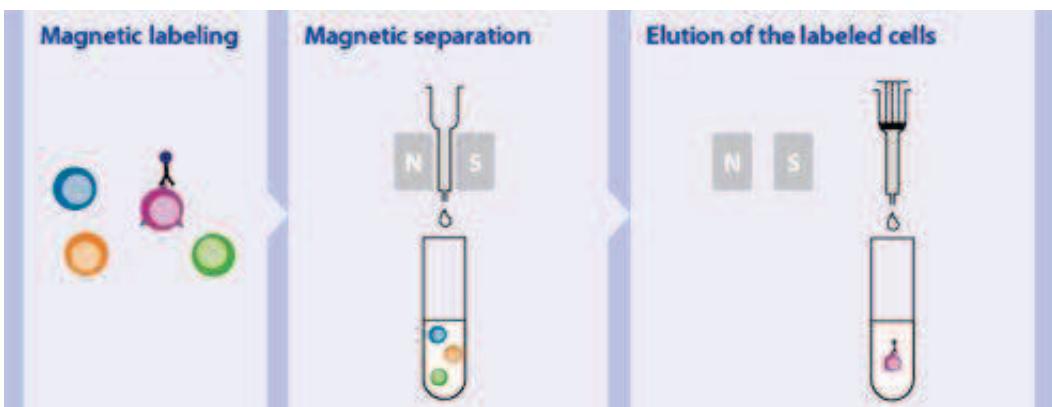


Abb. 3 Schematische Darstellung des MACS-Verfahrens. Positive Selektion: Die MicroBeads® haften an das magnetische Feld, wodurch die gebundene Zellfraktion in der Säule verbleibt. Nachfolgend wird die gewünschte Zellfraktion gewonnen, indem der Magnet entfernt und die Zellsuspension eluiert wird.

Quelle: www.miltenyibiotec.com

Entsprechend dem CD45⁺MicroBeads MACS-Protokoll (Miltenyi Biotec) wurden die Zellen in 90µl MACS-Puffer (PBS + 0,02% EDTA + 0,5% bovines Serumalbumin) pro 1×10^7 Zellen aufgenommen und dann mit 10µl CD45⁺MicroBeads pro 1×10^7 Zellen für 15min bei 4-8°C inkubiert. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit 1-2ml MACS-Puffer pro 1×10^7 Zellen (4°C, 300g, 10min) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in mindestens 500µl MACS-Puffer pro 1×10^8 Zellen aufgenommen. Die magnetische Separation der CD45⁺ Zellen erfolgte unter der Verwendung von LS-Säulen, indem die Zellen nach dem Passieren der Säulen mit 5ml MACS-Puffer eluiert wurden, um anschließend ein zweites Mal neue LS-Säulen zu durchlaufen. Das gewonnene Zellpellet wurde nach dem Zentrifugieren (4°C, 300g, 10min) in 1ml Medium (s.o.) aufgenommen und in einer Verdünnung von 1:100 (Zellen:Trypanblau) unter dem Mikroskop ausgezählt.

2.2.9.3 Reinheitsmessung

$0,5 \times 10^6$ Zellen wurden für die Überprüfung der Reinheit der vorangegangenen Separation entnommen und, wie unter Punkt 2.2.7 beschrieben, für die Durchflusszytometrie vorbereitet, indem sie mit dem Anti-Mouse CD45 Antikörper inkubiert wurden. Die Reinheit betrug in jedem Experiment mindestens 75% und höher.

2.2.9.4 Verbringen der TiL in Kultur

Die Zellen wurden in 6-Well-Platten in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml Medium pro Well ausplaziert und für 1h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Therapie der Zellen mit 5-FU, IFNα und der Kombination aus 5-FU+IFNα in der unter Punkt 2.2.3.1.1 angegebener

Endkonzentration. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit 5 μ l PBS pro 2x10⁶ Zellen/ml behandelt wurden.

2.2.9.5 Gewinnen der TiL nach Ablauf der Inkubationszeit

Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24h wurden die Zellen steril und vorsichtig mit einem Zellschaber vom Boden der Wells gelöst, zentrifugiert (4°C, 400g, 5min), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1ml Medium aufgenommen. Die Zellzahl wurde anhand einer 1:100 Verdünnung (Zellen:Trypanblau) unter dem Mikroskop ermittelt und die Zellen wurden erneut in einer Konzentration von 2x10⁶ Zellen/ml Medium aufgenommen.

2.2.9.6 Herstellen einer Panc02:TiL Kokultur für die Zytotoxizitätsbestimmung

Die Panc02-Zellen wurden wie unter Punkt 2.2.3.2 beschrieben in einer Konzentration von 1x10⁵ Zellen/ml Medium aufgenommen. Die Kokultivierung beider Zellsuspensionen erfolgte in 12-Well-Platten. Panc02-Zellen und tumorinfiltrierende Lymphozyten wurden in einem Verhältnis von 1:5, 1:10, 1:20 kokultiviert. Die Konzentration der Panc02-Zellen betrug 1x10⁵ Zellen; die der tumorinfiltrierenden Lymphozyten erhöhte sich dementsprechend.

2.2.9.7 Zytotoxizitätsbestimmung mittels FACS Analyse

Nach weiteren 12h Inkubation bei 37°C wurden die Kokulturen mit Hilfe des Zellschabers aus den Wells entfernt und für die Durchflusszytometrie vorbereitet. Bis auf eine Ausnahme (Färbung mit dem Viability Dye450 Antikörper) erfolgte die extrazelluläre Färbung wie unter Punkt 2.2.7 erwähnt. Für die 30minütige Inkubation der Zellen mit dem Viability Dye450 Antikörper bei 4°C im Dunkeln mussten die Zellen zuvor zweimalig mit 2ml PBS gewaschen werden. Nach Ablauf der Inkubationszeit und einmaligem Waschen mit 500 μ l StainBuffer wurden die restlichen Antikörper hinzugegeben und nach dem üblichen FACS-Protokoll verfahren.

2.2.10 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Im Rahmen der Zytotoxizitätsmessung wurde das Vorhandensein des Zytokins Interferon gamma (IFNg) in der Kokultur untersucht. Hierfür wurde nach dem Ernten der Zellen der Mediumüberstand der Kokulturen (Panc02:TiL) in ein Eppendorf Gefäß überführt und bei -20°C tiefgefroren. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde dann mithilfe der ELISA-Messung die Zytokinmenge an IFNg, die während der Kokultur produziert und ausgeschüttet wurde, bestimmt. Die Messung erfolgte mit dem Mouse Interferon gamma ELISA Ready-SET-Go!® der Firma eBioscience.

2.2.10.1 Mouse Interferon gamma ELISA Ready-SET-Go!® Protokoll

Zunächst wurde eine 96-Well-Platte mit einem Gemisch aus Capture antibody und Coating Buffer (Konzentration 1:1000) beschichtet, wobei in jedes Well 100µl des verdünnten Capture antibody pipettiert wurden. Die Platte wurde abgedeckt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Platte mit Waschpuffer (1xPBS + 0,05% Tween-20) erhielt jedes Well 200µl 1x Assay Diluent. Es folgte eine 1stündige Inkubation bei Raumtemperatur. Währenddessen wurde der Standard vorbereitet. Hierfür wurde das Mouse Interferon gamma Recombinant Protein (Standard) mit 1x Assay Diluent entsprechend der gewünschten Standardkonzentrationen verdünnt. Um die höchste Konzentration von 2000pg/ml zu erhalten, wurden 20µl des Standards mit 10ml 1x Assay Diluent verdünnt. Für die Standardkurve wurden folgende Konzentrationen hergestellt: 2000pg/ml, 1000pg/ml, 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62,5pg/ml, 31,25pg/ml und 15,62pg/ml. Als Blank-Wert wurde 1x Assay Diluent ohne Standard verwendet. Nach Ablauf der Inkubationszeit konnte der Standard in die entsprechenden Wells pipettiert werden, indem jedes Well 100µl der jeweiligen Standardkonzentration erhielt. In die restlichen Wells wurden jeweils 100µl der zu untersuchenden Proben pipettiert. Es folgte eine 2stündige Inkubation der Platte bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte 3-5mal mit Waschpuffer gewaschen, um unspezifische Bindungen, die das Ergebnis falsch positiv erscheinen lassen, zu beseitigen. Nachfolgend konnte der Detection antibody hinzugegeben werden (pro Well 100µl 1x Detection Antibody). Die Platte wurde erneut für 1h inkubiert und 3-5mal mit Waschpuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurden 100µl Avidin-HRP in jedes Well hinzugefügt, welches eine spezifische Bindung mit dem Biotin-konjugierten Detection Antibody eingehen konnte. Die Platte wurde ein weiteres Mal für 15 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte erneut 5-7mal gewaschen und 100µl der Substrate Solution in jedes Well pipettiert (1x TMB Solution). 15min später wurde die farbige Reaktion mit der Stop Solution (2N H₂SO₄) beendet (50µl/Well). Die IFNγ Konzentration konnte nun mit dem ELISA Messgerät bei einer Wellenlänge von 450nm photometrisch gemessen werden.

2.2.11 Luminex

Die Mediumüberstände der kultivierten Panc02-Zellen wurden in ein Eppendorf Gefäß überführt und bei -20°C weggefroren. Die Proben wurden zu einem späteren Zeitpunkt auf folgende Zytokine hin untersucht: Interferon gamma (IFNγ), diverse Interleukine (IL): IL-1β, IL-2, IL-6, IL-10, IL-17, IL-4, IL-12, IL-13, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), keratinocyte-

derived chemokine (KC), Tumornekrosefaktor alpha und beta (TNF- α /TGF- β). Die Messung der Proben erfolgte anhand des Luminex-Protokolls. Alle Zytokine wurden mit magnetischen Beads gemessen. TGF- β wurde separat mit der Single Plex Luminex Platte gemessen, alle anderen oben genannten Zytokine mit der 12 Plex Luminex Platte.

Zunächst wurden alle Proben für 5min bei 800g zentrifugiert, um sie von möglichen Debris zu entfernen. Die Platten wurden mit Waschpuffer befeuchtet und für 10min bei Raumtemperatur auf dem Shaker geschwenkt. Der Waschpuffer wurde nach Ablauf der angegebenen Zeit mithilfe einer magnetischen Waschstation von den Platten entfernt.

Für die TGF- β Messung wurden 25 μ l der jeweiligen Probe mit 2 μ l einer 1.0 N Hydrochlorid Acid (HCL) Lösung versetzt und für 15min auf dem Shaker inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben mit 2 μ l einer 1.0 N Sodium Hydroxide (NaOH) Lösung neutralisiert. Die Proben für die Messung der 12 Plex Platte mussten nicht zusätzlich behandelt werden.

Auf die befeuchteten Platten konnten nun alle Reagenzien entsprechend dem Protokoll aufgebracht werden: Die Wells für den Background und für die Proben erhielten zunächst 25 μ l Assay Buffer. 25 μ l der verdünnten Standardwerte (TGF- β Platte: 10.000pg/ml, 2500pg/ml, 625pg/ml, 156,3pg/ml, 39,1pg/ml und 9,8pg/ml; 12 Plex Platte: 10.000pg/ml, 2000pg/ml, 400pg/ml, 80pg/ml, 16pg/ml, 3,2pg/ml) und 25 μ l der Quality Controls wurden in die entsprechenden Wells pipettiert. Als Nächstes erhielten die Wells, die dem Background, Standard und den Kontrollen dienten, 25 μ l der Matrix Solution. Von jeder Probe wurden ebenfalls 25 μ l in das entsprechende Well pipettiert und anschließend in alle Wells 25 μ l der Beads hinzugegeben. Die Platte wurde über Nacht bei 4°C auf dem Tischshaker inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Platte zweimal mit jeweils 200 μ l Waschpuffer pro Well gewaschen und mit 25 μ l des Detection Antibody pro Well für 1h auf dem Tischshaker inkubiert. Nach 1h wurden 25 μ l Streptavidin-Phycoerythrin pro Well hinzugegeben und für weitere 30min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer erhielt jedes Well 100 μ l Sheath Fluid und die Platte konnte nach weiteren 30min Inkubation mit dem Luminex®100/200 Messgerät analysiert werden. Die Auswertung der Daten erfolgte mithilfe der Bio-Plex Manager™ Software 4.1 der Firma Bio-Rad Laboratories.

2.2.12 Statistik

Alle statistischen Auswertungen wurden mithilfe des Programms „GraphPad Prism Version 5.01“ durchgeführt. Die Verteilung von Variablen sind als SD, SE, Median, 25% und 75% Perzentile beschrieben. Nullhypotesen und Alternativhypotesen wurden mit dem ungepaarten zweiseitigen T-Test analysiert, sofern die Daten einer normalverteilten Grundgesamtheit entstammten und zwei Gruppen miteinander verglichen wurden. Der Vergleich mehrerer Gruppen wurde mit der one-way analysis of variance (ANOVA) mit dem Bonferroni's post-hoc Test hergestellt. Für die nicht-parametrischen Daten wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p<0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

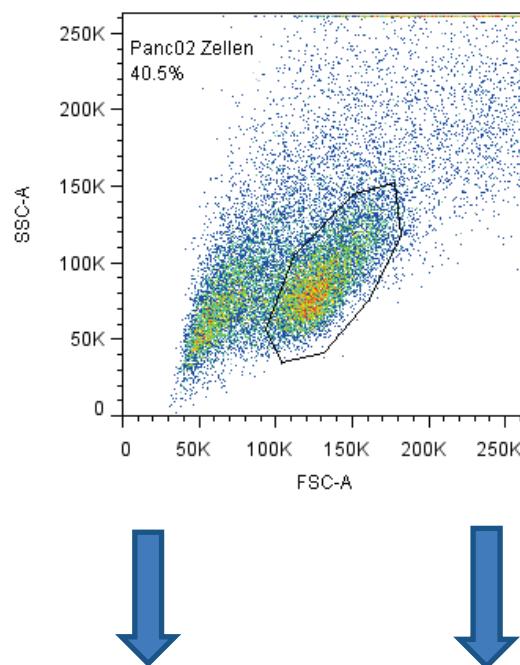
Eine Studie der Virginia Mason Clinic in Seattle (USA) hat in der Vergangenheit für große Aufregung gesorgt, weil die zusätzliche Gabe von IFN α in der adjuvanten Behandlung des Pankreasadenokarzinoms zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit für Patienten führte, die sich bereits einer Resektion des Tumors unterzogen hatten [93]. Weil diese überraschend positiven Ergebnisse mit einer monozentrischen Phase II Studie erzielt wurden, folgten unter anderem klinische Studien der multizentrischen Phase III (CapRi Studie), mit denen diese Ergebnisse nicht erneut erreicht wurden, obwohl man eine deutliche Aktivierung des Immunsystems aufgrund von IFN α registrieren konnte [40, 89, 91]. Daher kommt die Vermutung auf, dass durch die Substanz auch regulatorische Zellen und Moleküle aktiviert werden, die einer erfolgreichen Anti-Tumor-Immunantwort im Wege stehen. Untermauert wird diese Vermutung unter anderem von der Tatsache, dass das PaCa für die Akkumulation immunsuppressiver Zellen und zur Ausbildung regulatorischer Moleküle bekannt ist [40, 77]. Die nachfolgenden Untersuchungen sollen zeigen, ob IFN α , wie auch die herkömmlichen Chemotherapeutika, in der Lage sind, die regulatorischen Mechanismen des Immunsystems zu aktivieren. Ebenso soll gezeigt werden, wie sich Immunzellen verhalten, wenn sie nicht unter dem Einfluss des B7-H1 Moleküls stehen.

3.1 Der Einfluss verschiedener Therapien auf die Panc02-Zelllinie

Die folgenden Experimente wurden durchgeführt, um zu zeigen, ob die Anwendung verschiedener Therapeutika das Expressionsmuster der regulatorischen Moleküle B7-H1 und B7-DC auf den Panc02-Zellen verändert. Hierfür wurden die Panc02-Zellen in 6 Gruppen eingeteilt, die jeweils unterschiedlich behandelt wurden. Die Experimente wurden in vier Durchläufen mit verschiedenen Panc02-Zellchargen ausgeführt.

- 1) Gruppe 1: PBS
- 2) Gruppe 2: Interferon alpha (IFN α)
- 3) Gruppe 3: 5-Fluorouracil (5-FU)
- 4) Gruppe 4: Gemcitabin (Gem)
- 5) Gruppe 5: Kombinationstherapie aus 5-FU+IFN α
- 6) Gruppe 6: Kombinationstherapie aus Gem+IFN α

Als Kontrolle dienten die Zellen, die PBS als Behandlung erhielten. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 24h wurden die Zellen mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern gekoppelt. Durchflusszytometrisch konnte ermittelt werden, wie viele der Zellen die regulatorischen Moleküle B7-H1 oder B7-DC auf ihrer Oberfläche tragen. Um Aussagen über die Veränderung der Gesamtmenge der exprimierten Moleküle auf der Zelloberfläche machen zu können, wurde die **mean fluorescence intensity (MFI)** der Moleküle bestimmt. Die Auswertungsstrategie ist in Abbildung 4 dargestellt. Anhand der Größe „forward scatter“ (FSC) und der Granularität „side scatter“ (SSC) wurden die lebenden Panc02-Zellen von den toten Panc02-Zellen getrennt (Abb. 4 Bild A). Ferner wurden im Histogramm die lebenden Panc02-Zellen analysiert, die B7-H1 oder B7-DC auf ihrer Oberfläche exprimieren (Abb. 4 Bild B und C). Als Negativkontrolle dienten die jeweiligen FMO-Proben (fluorescence minus one).



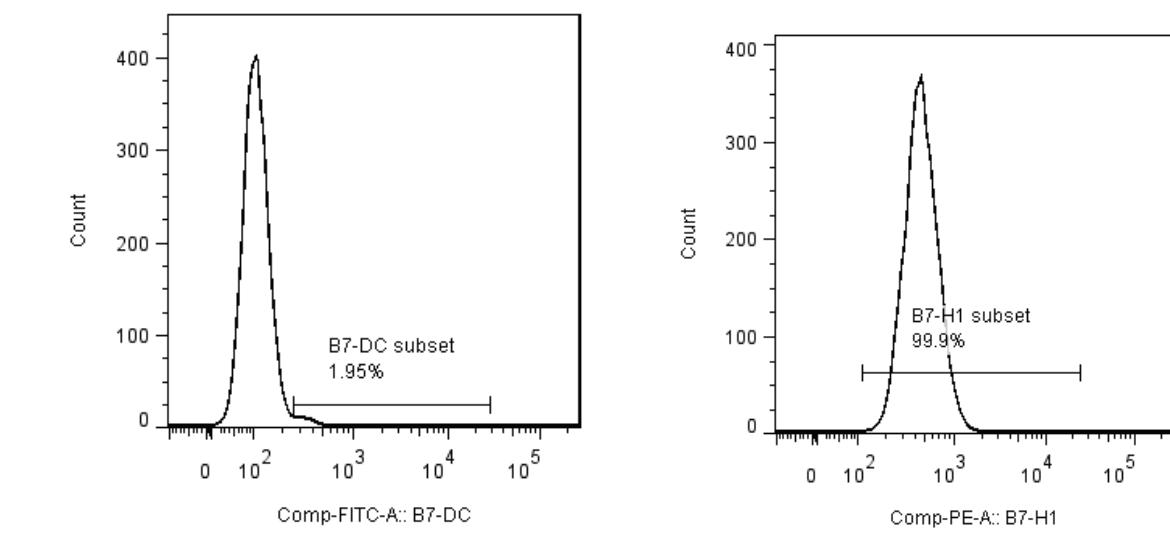


Abb. 4 Auswertungsstrategie zur Bestimmung der regulatorischen Moleküle (B7-H1/B7-DC) auf der Panc02-Zelllinie. A: Identifizierung der vitalen Panc02-Zellen anhand von FSC und SSC. B: Darstellung aller B7-DC⁺ Zellen im Histogramm. C: Darstellung aller B7-H1⁺ Zellen im Histogramm.

Betrachtet man die Ergebnisse in Abb. 5, so wird deutlich, dass die Zahl der B7-H1⁺ Panc02-Zellen hoch signifikant unter dem Einfluss von IFN α und den Kombinationstherapien angestiegen ist (Abb. 5 Bild A). Der MFI-Wert von B7-H1 erhöhte sich signifikant unter dem Einfluss von IFN α und 5-FU+IFN α (Abb. 5 Bild B).

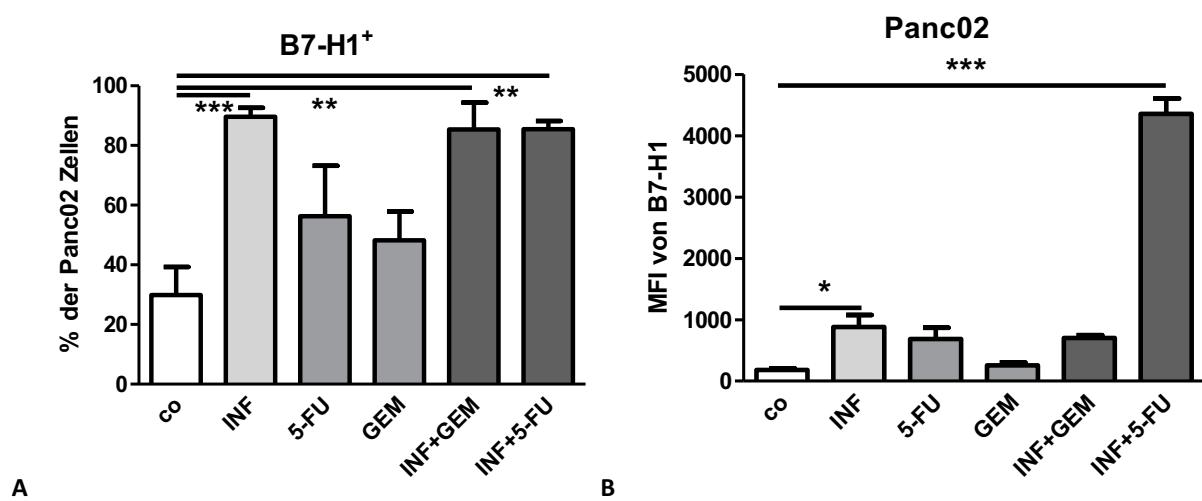


Abb. 5 A: Quantifizierung der B7-H1⁺ Panc02-Zellen. **B:** MFI des B7-H1 Moleküls auf den Panc02-Zellen.
*p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001.

In Abb. 6 wird deutlich, dass das B7-DC Molekül von den Zellen in nur sehr geringen Mengen ausgebildet wird. Einzig unter der Therapie mit 5-FU haben wir eine signifikante Steigerung

der B7-DC⁺ Panc02-Zellen gesehen (Abb. 6 Bild A). Erhöhte MFI-Werte von B7-DC waren unter der Therapie mit Gem festzustellen (Abb. 6 Bild B).

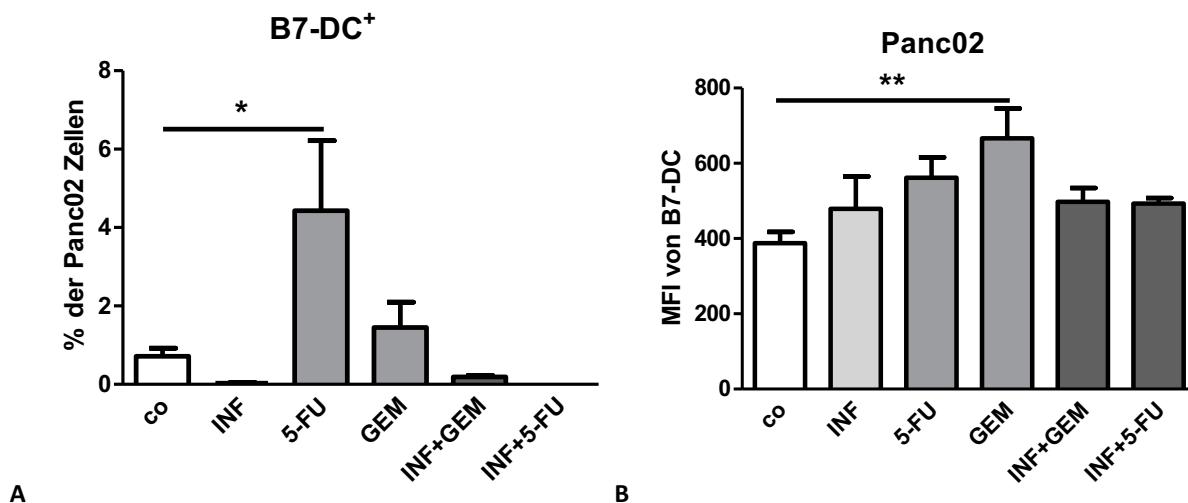


Abb. 6 A: Quantifizierung der B7-DC⁺ Panc02-Zellen. **B:** MFI des B7-DC Moleküls auf den Panc02-Zellen.

*p<0,05. **p<0,01.

Zusammenfassend betrachtet verändert die Verwendung bestimmter Therapeutika, besonders IFN α , nachweislich die Expression regulatorischer Moleküle auf der Panc02-Zelllinie.

3.1.1 Die Zytokinausschüttung der Panc02-Zelllinie

Die Quantifizierung bestimmter Zytokine, die von den Panc02-Zellen gebildet und sezerniert wurden, konnte im Zuge des Experiments, welches unter Punkt 3.1 beschrieben wurde, ermittelt werden. Nachdem die Panc02-Zellen verschiedene *in vitro* Therapien (PBS, 5-FU, Gem, IFN α , 5-FU+IFN α , Gem+IFN α) erhalten hatten, konnte nach der Kultivierung der Mediumüberstand entnommen und tiefgefroren werden. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden die folgenden Zytokine mit der Luminex-Methode bestimmt.

Wie in der untenstehenden Grafik deutlich erkennbar (Abb. 7 Bild A), wurde das Zytokin Interferon gamma (IFN γ) von den Panc02-Zellen in einer signifikant geringeren Menge sezerniert, wenn diese zuvor mit dem Chemotherapeutikum 5-FU kultiviert wurden. Alle anderen *in vitro* Therapien führten, verglichen mit den Kontrollzellen, zu vergleichbaren IFN γ Werten.

Auch in Anbetracht des Zytokins Interleukin 2 (IL-2) ist ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Therapien zu verzeichnen (Abb. 7 Bild B). Im Vergleich zu den Kontrollzellen und allen anderen verwendeten Substanzen, erhöhten sich die IL-2 Mengen deutlich, wenn die Panc02-Zellen zuvor mit IFN α kultiviert wurden.

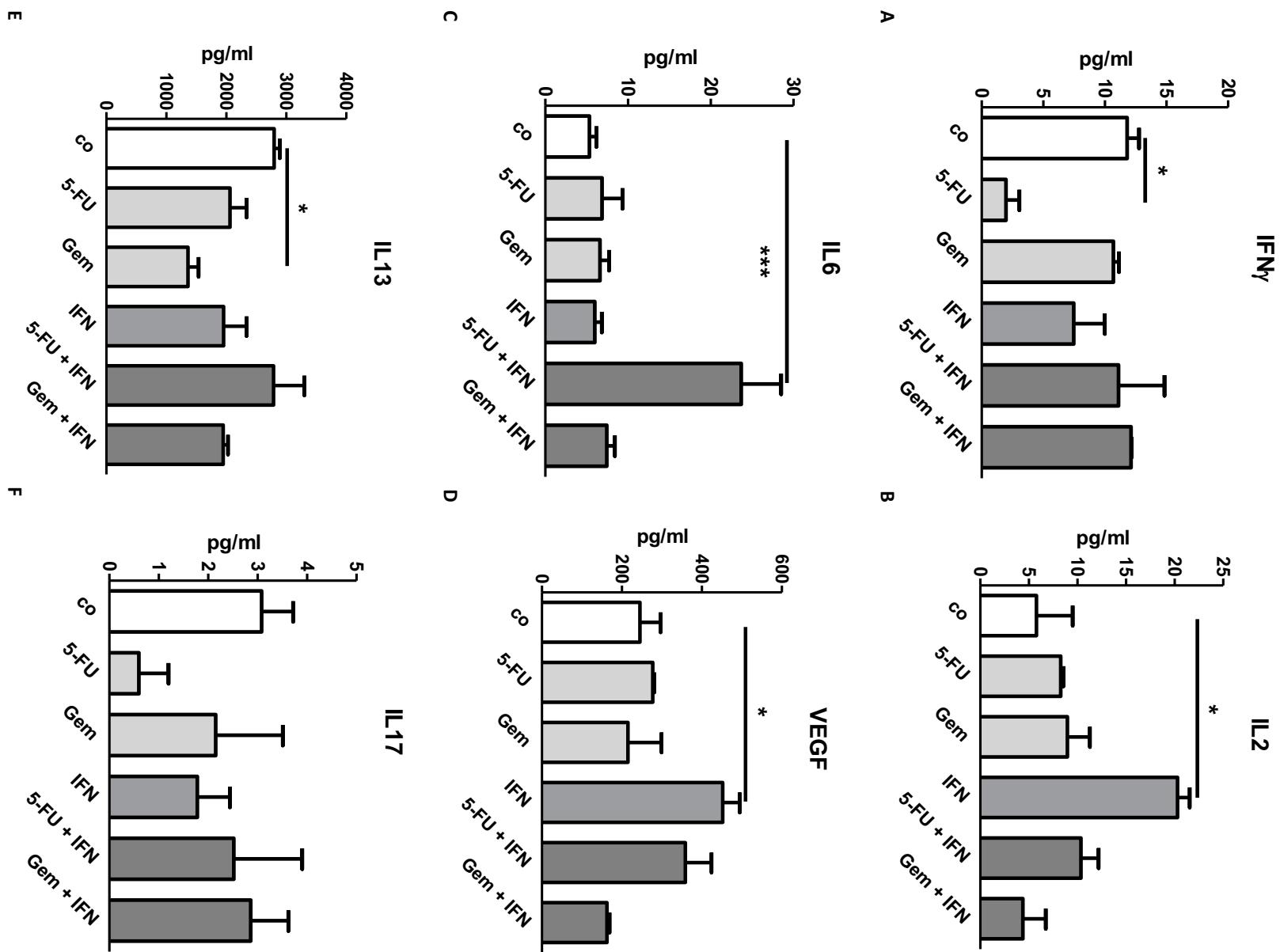
Hoch signifikante Unterschiede bestehen bei dem Zytokin Interleukin 6 (IL-6) (Abb. 7 Bild C). Dieses wird im Vergleich zu den IL-6 Konzentrationen der Kontrollzellen in weitaus größerer Menge ausgeschüttet, wenn die Panc02-Zellen zuvor mit der Kombinationstherapie 5-FU+IFN α kultiviert wurden.

Die Therapie mit IFN α hat auch auf den vascular endothelial growth factor (VEGF) signifikanten Einfluss (Abb. 7 Bild D). VEGF wird deutlich stärker von den Panc02-Zellen ausgeschüttet, wenn diese zuvor mit IFN α behandelt wurden. Für die restlichen Therapien sind keine Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollzellen zu verzeichnen.

Eine signifikante Abnahme der Interleukin 13 (IL-13) Konzentration war nach der Therapie mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabin festzustellen (Abb. 7 Bild E), während für das Interleukin 17 (IL-17) keinerlei Veränderungen der Konzentration im Vergleich zu den Kontrollzellen aufgrund der verschiedenen Therapien beobachtet werden konnte.

Vergleicht man die Konzentrationen des transforming growth factor beta (TGF- β), welches von den unterschiedlich behandelten Panc02-Zellen nach 24ständiger Kultivierung ausgeschüttet wurde, so konnten keinerlei Differenzen im Vergleich zu den Kontrollzellen gesehen werden (Abb. 7 Bild G).

Abschließend ist der Grafik (Abb. 7 Bild H) zu entnehmen, dass von allen untersuchten Zytokinen, die Zytokine IL-13, TGF- β und VEGF im Mediumüberstand der Panc02-Zellen dominierten.



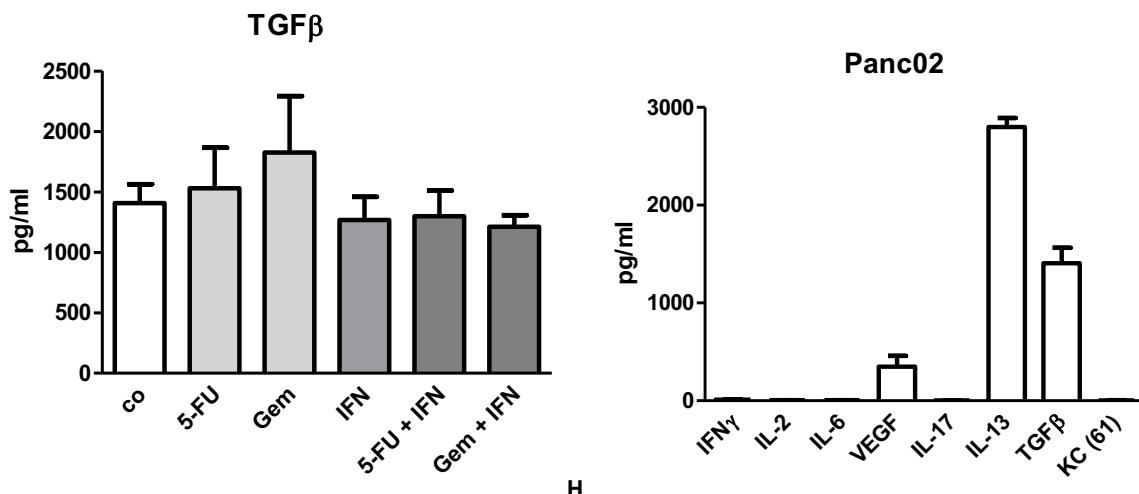


Abb. 7 Quantifizierung verschiedener Zytokine, die von den Zellen der Panc02-Zelllinie unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Behandlungen gebildet wurden. A: Interferon gamma Konzentration in pg/ml. B: Interleukin 2 Konzentration in pg/ml. C: Vascular endothelial growth factor Konzentration in pg/ml. D: Interleukin 6 Konzentration in pg/ml. E: Interleukin 13 Konzentration in pg/ml. F: Interleukin 17 Konzentration in pg/ml. G: Transforming growth factor beta Konzentration in pg/ml. H: Konzentration aller genannten Zytokine im Vergleich (pg/ml). *p<0,05. ***p<0,001.

3.2 Der Einfluss verschiedener Therapien auf die Immunzellen

Um zu sehen, welchen Einfluss Chemotherapeutika und die Immuntherapie auf die Zellen des Immunsystems ausüben, wurden Splenozyten von gesunden wie von tumortragenden Mäusen behandelt und kultiviert. Auch hier lag das Interesse neben der Zusammensetzung der Immunzellen hauptsächlich auf der Expression des B7-H1 Moleküls.

3.2.1 Splenozyten gesunder Mäuse

Aus Milzen von gesunden Mäusen wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die Splenozyten wurden in Kultur gebracht und mit verschiedenen Therapeutika behandelt.

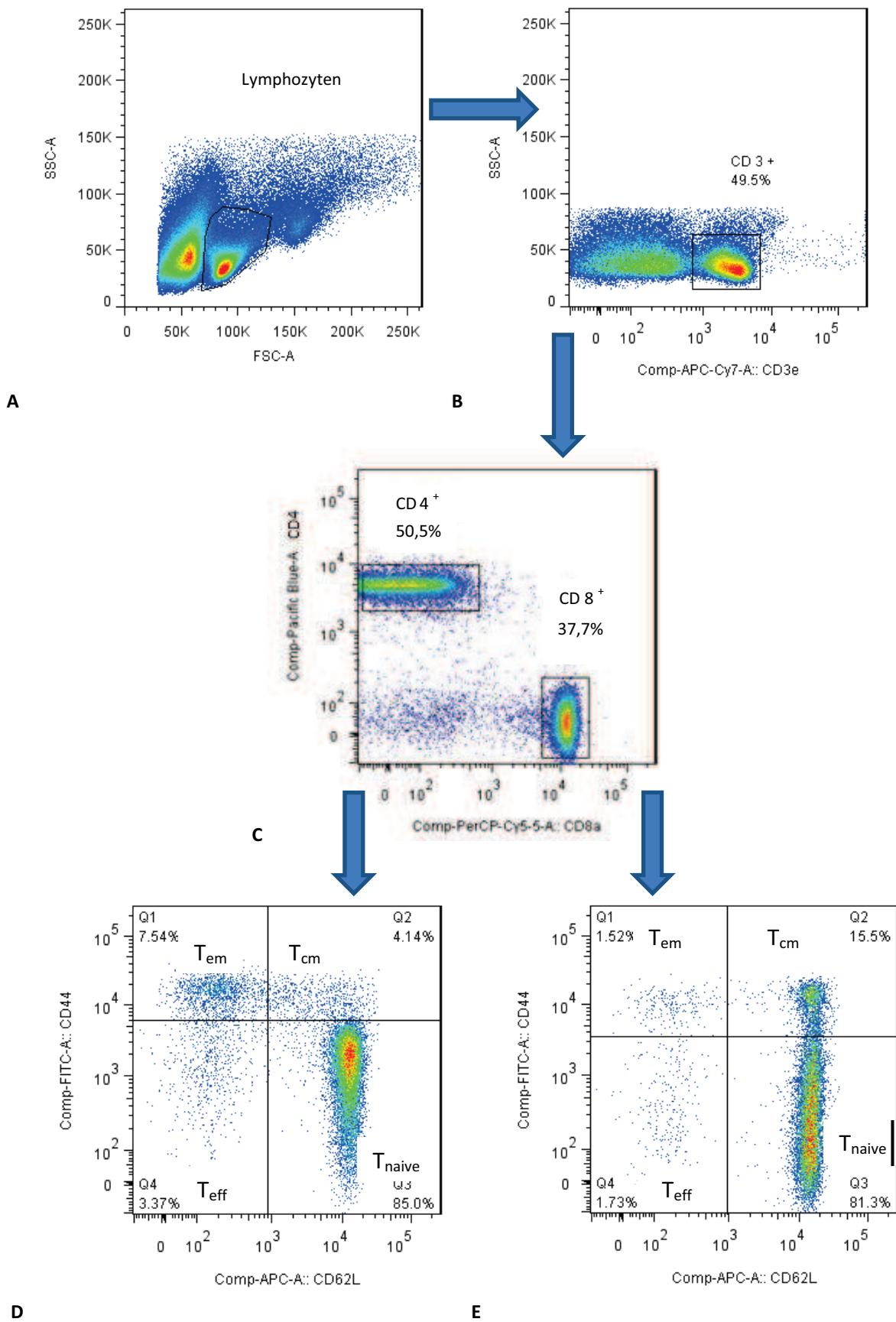
- 1) Gruppe 1: PBS
- 2) Gruppe 2: Gem
- 3) Gruppe 3: 5-FU
- 4) Gruppe 4: IFN α
- 5) Gruppe 5: 5-FU+IFN α
- 6) Gruppe 6: Gem+IFN α

Nach Ablauf der Inkubationszeit von 24h wurden die Zellen mithilfe der FACS-Analyse untersucht. Die spezifischen Antikörper dienten der Charakterisierung bestimmter Zellpopulatio-

nen und zum Nachweis bestimmter Oberflächenmoleküle. Die Experimente wurden in drei Durchläufen ausgeführt. Insgesamt wurden 16 männliche C57/Bl-6 Mäuse verwendet.

3.2.1.1 CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Um CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wie auch deren Subpopulationen zu bestimmen, wurde folgende Auswertungsstrategie verwendet (Abb. 8). Die Lymphozyten wurden in der dot plot Darstellung (FSC zu SSC) ermittelt (Abb. 8 Bild A). Aus allen CD3⁺ Lymphozyten konnten die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen identifiziert werden (Abb. 8 Bild C). Die Antikörper CD44 und CD62L wurden zur Bestimmung der Subpopulationen verwendet (Abb. 8 Bild D und E). Diese setzen sich aus folgenden Zellen zusammen: Naive T-Zellen (T_{naive} : CD44⁻CD62L⁺), Effektor-T-Zellen (T_{eff} : CD44⁻CD62L⁻), Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T_{em} : CD44⁺CD62L⁻) und zentrale Gedächtnis-T-Zellen (T_{cm} : CD44⁺CD62L⁺).



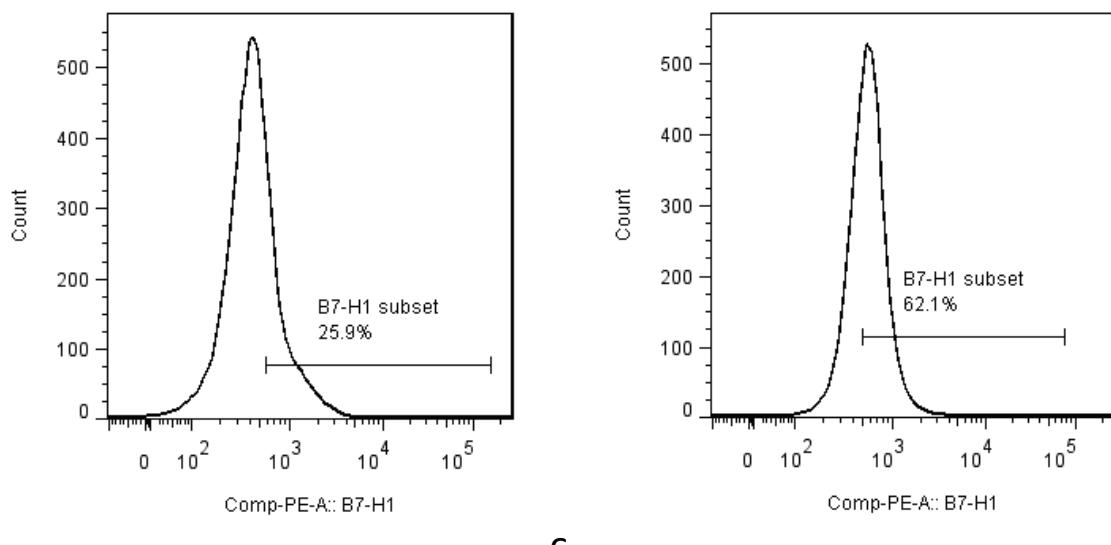
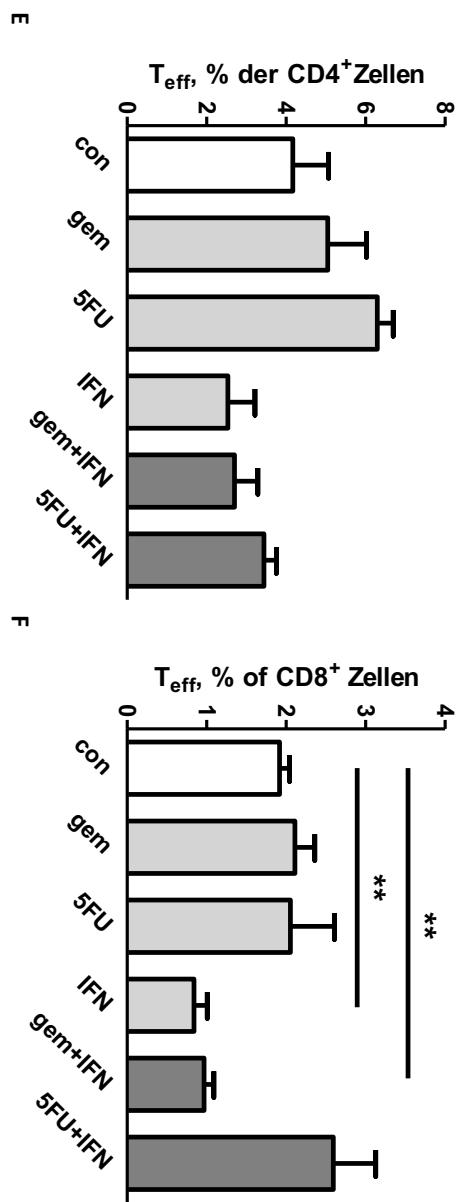
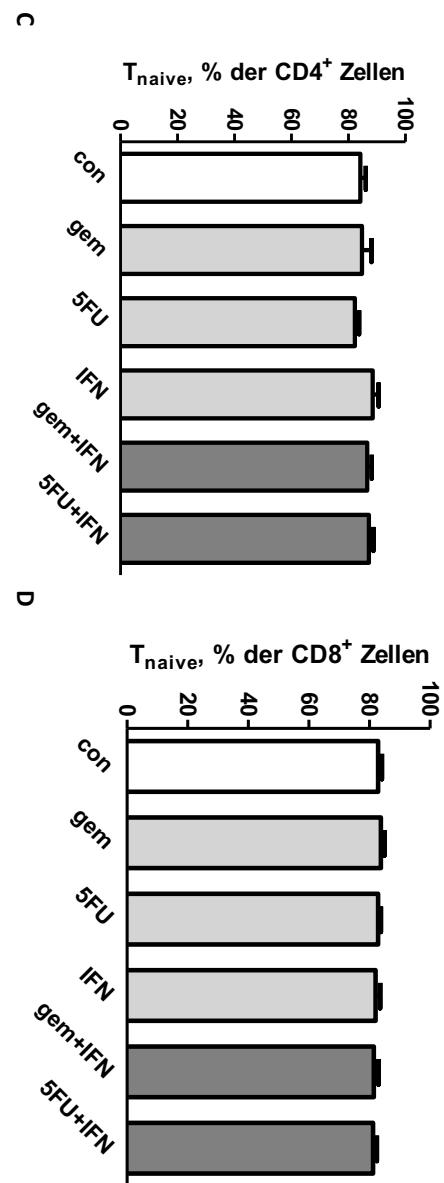
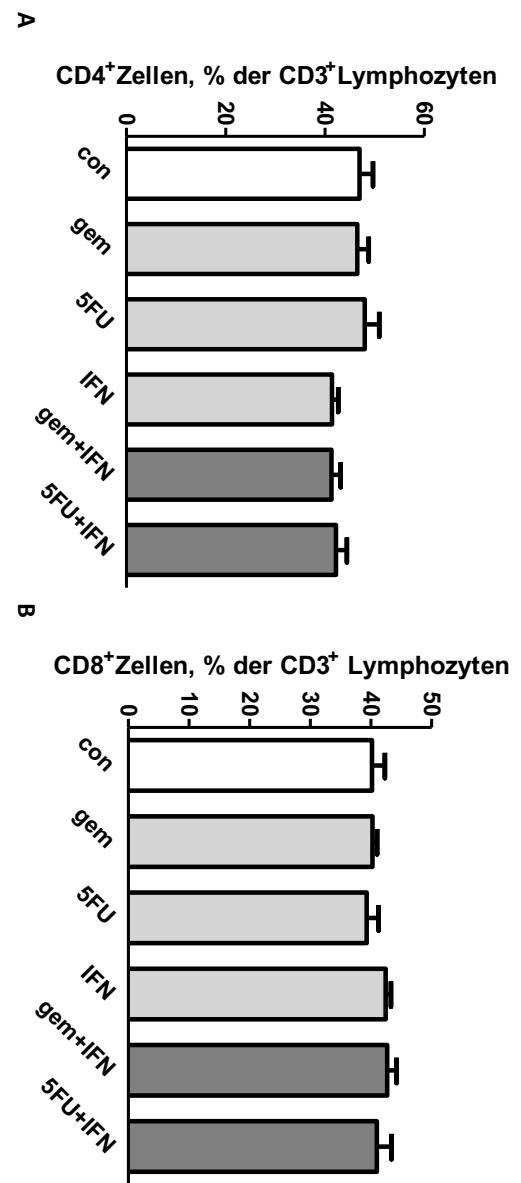


Abb. 8 Auswertungsstrategie zur Bestimmung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse. **A:** Lymphozyten. **B:** CD3⁺ Lymphozyten. **C:** CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. **D:** Subpopulationen der CD4⁺ T-Zellen. **Q1:** T_{em}; **Q2:** T_{cm}; **Q3:** T_{naive}; **Q4:** T_{eff}. **E:** Subpopulationen der CD8⁺ T-Zellen. **Q1:** T_{em}; **Q2:** T_{cm}; **Q3:** T_{naive}; **Q4:** T_{eff}. **F:** Darstellung aller B7-H1⁺ CD4⁺ T-Zellen im Histogramm. **G:** Darstellung aller B7-H1⁺ CD8⁺ T-Zellen im Histogramm. Die Bestimmung der B7-H1 positiven Zellen erfolgte anhand der jeweiligen FMO Kontrolle.

Betrachtet man in Abb. 9 Bild A und B den prozentualen Anteil der CD4⁺ T-Zellen und der CD8⁺ T-Zellen in Bezug auf die CD3⁺ Lymphozyten, so ist dieser unabhängig der verwendeten Substanzen nahezu konstant geblieben. Dies konnte auch für die Subpopulationen der CD4⁺ T-Zellen verzeichnet werden. Einzig bei den T_{em} der CD4⁺ T-Zellen gab es einen signifikanten Abfall der Zellfrequenz unter der Therapie mit IFN α (Abb. 9 Bild G). Für die T_{eff} der CD8⁺ T-Zellen stellte sich eine signifikante Abnahme der prozentualen Zellzahl unter der Monotherapie mit IFN α und der Kombinationstherapie mit Gem+IFN α ein (Abb. 9 Bild E und F). Keine deutlichen Unterschiede der Prozentzahlen konnten wir für die restlichen CD8⁺ Subpopulationen feststellen (Abb. 9 Bild D, H und J).



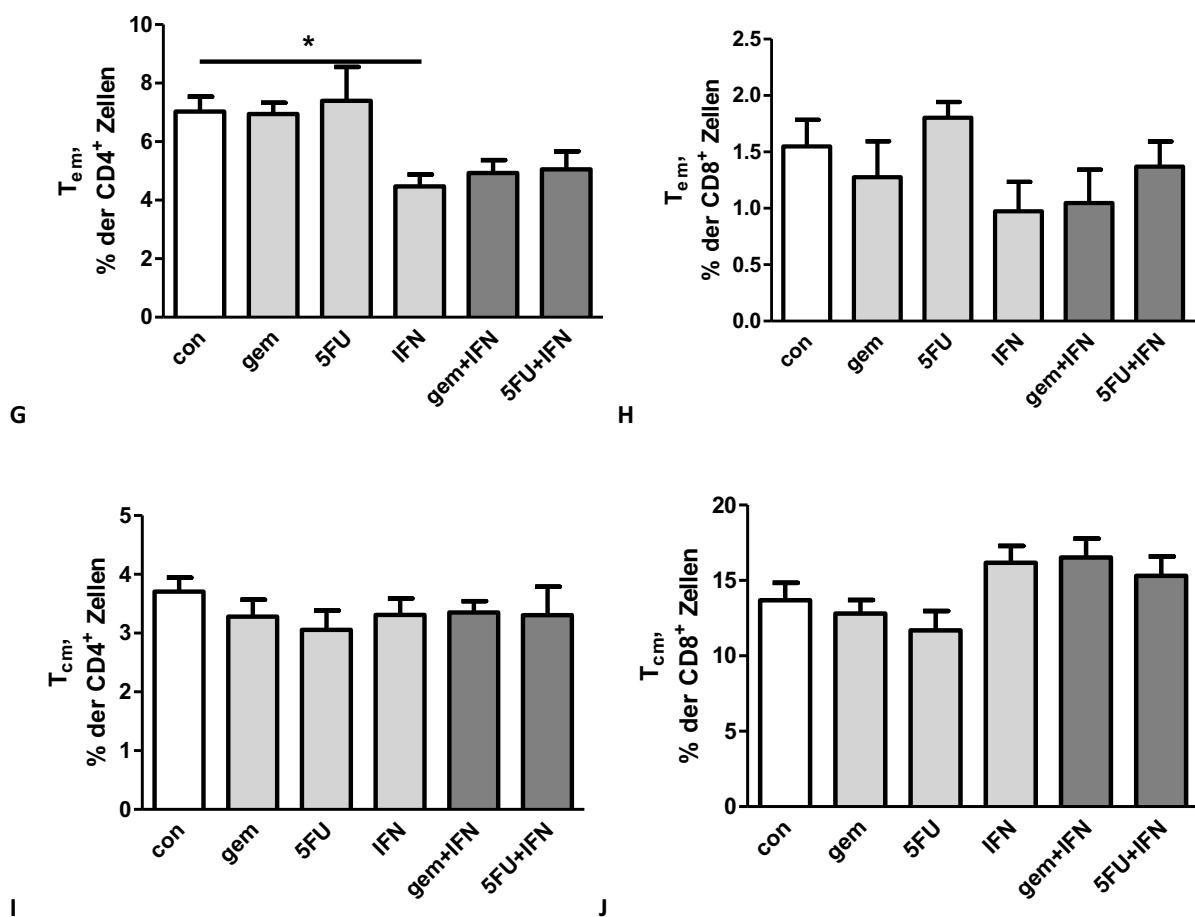


Abb. 9 Quantifizierung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: prozentualer Anteil CD4⁺ T-Zellen in Bezug auf CD3⁺ T-Zellen. B: prozentualer Anteil CD8⁺ T-Zellen in Bezug auf CD3⁺ T-Zellen. C: prozentualer Anteil T_{naive} in Bezug auf CD4⁺ T-Zellen. D: prozentualer Anteil T_{naive} in Bezug auf CD8⁺ T-Zellen. E: prozentualer Anteil T_{eff} in Bezug auf CD4⁺ T-Zellen. F: prozentualer Anteil T_{eff} in Bezug auf CD8⁺ T-Zellen. G: prozentualer Anteil T_{em} in Bezug auf CD4⁺ T-Zellen. H: prozentualer Anteil T_{em} in Bezug auf CD8⁺ T-Zellen. I: prozentualer Anteil T_{cm} in Bezug auf CD4⁺ T-Zellen. J: prozentualer Anteil T_{cm} in Bezug auf CD8⁺ T-Zellen. *p<0,05. **p<0,01

Als nächsten Schritt haben wir, wie in Abb. 10 dargestellt, die Expression des B7-H1 Moleküls auf den CD4⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen betrachtet. Für die CD4⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen waren signifikante Unterschiede bezüglich der Expression des B7-H1 Moleküls zu verzeichnen. Bei ausnahmslos allen Zellpopulationen (T_{naive}, T_{eff}, T_{em}, T_{cm}) stieg die prozentuale Zahl der B7-H1 positiven Zellen signifikant an, sobald IFN α oder die beiden Kombinationstherapien verwendet wurden. Zellen, die mit 5-FU oder Gem alleine kultiviert wurden, exprimierten in nahezu gleicher Anzahl B7-H1 wie die Zellen der Kontrollgruppe (Abb. 10 Bild A-E).

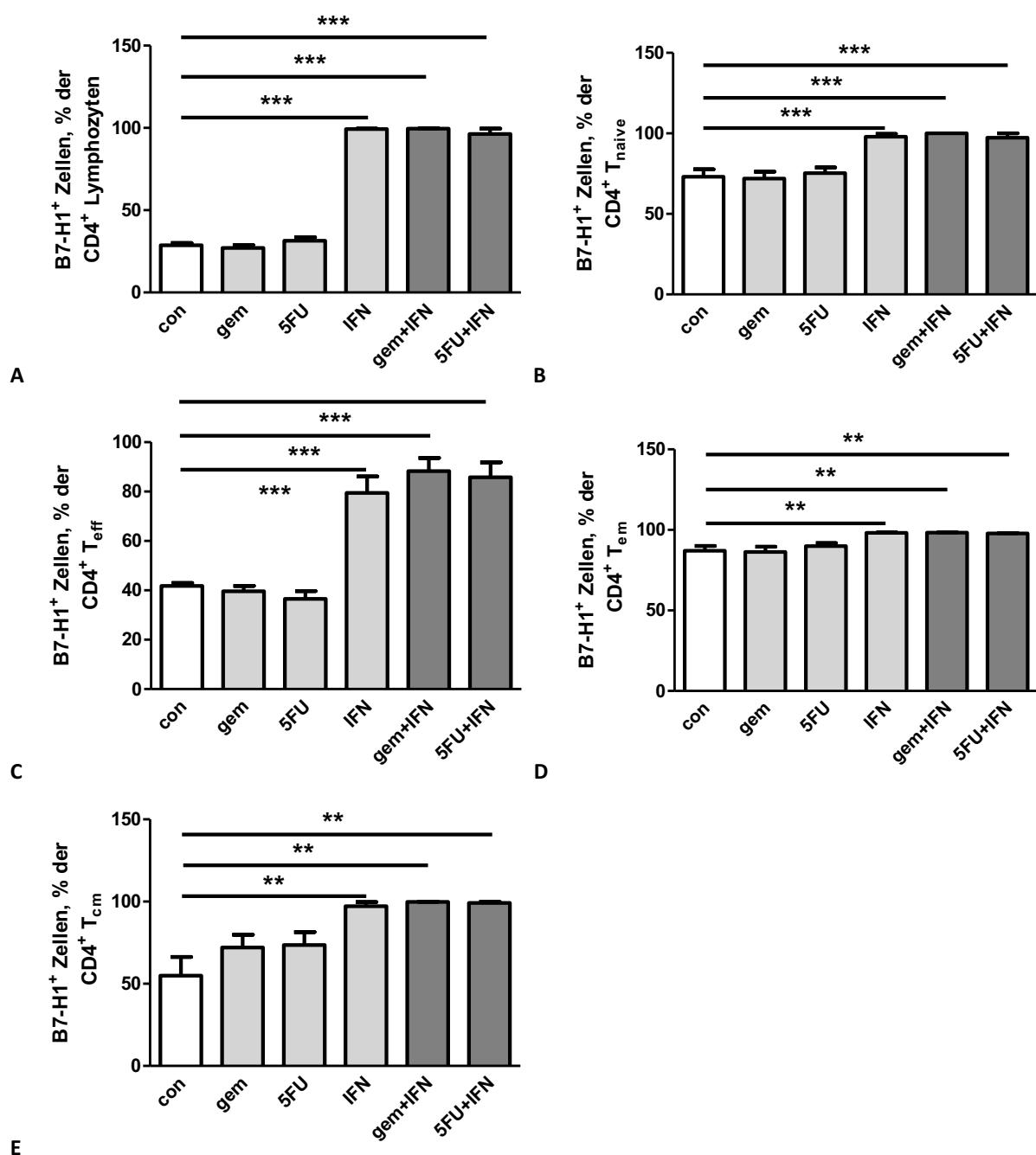


Abb. 10 Quantifizierung der B7-H1⁺ Zellen (CD4⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen) aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: prozentualer Anteil B7-H1⁺ Zellen aus CD4⁺ T-Zellen. **B:** prozentualer Anteil B7-H1⁺ Zellen aus CD4⁺ T_{naive}. **C:** prozentualer Anteil B7-H1⁺ Zellen aus CD4⁺ T_{eff}. **D:** prozentualer Anteil B7-H1⁺ Zellen aus CD4⁺ T_{em}. **E:** prozentualer Anteil B7-H1⁺ Zellen aus CD4⁺ T_{cm}. **p<0,01. ***p<0,001.

Für die CD8⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen konnten wir auch signifikante Unterschiede bezüglich der Expression des B7-H1 Moleküls feststellen. Unter der Verwendung von IFN α und den Kombinationstherapien stieg die prozentuale Zahl der B7-H1⁺ CD8⁺ T-Zellen signifikant an. Dies traf auch auf die Subpopulationen T_{eff} und T_{cm} zu (Abb. 11 Bild A, C, E). Bei den

$CD8^+$ T_{em} haben wir allerdings unter Verwendung derselben Therapeutika keine Änderung der B7-H1 Expression gesehen (Abb. 11 Bild D). Bei den T_{naive} gab es einen signifikanten Anstieg der B7-H1 $^+$ Zellen nach der Behandlung mit den Kombinationstherapien 5-FU+IFN α und Gem+IFN α (Abb. 11 Bild B).

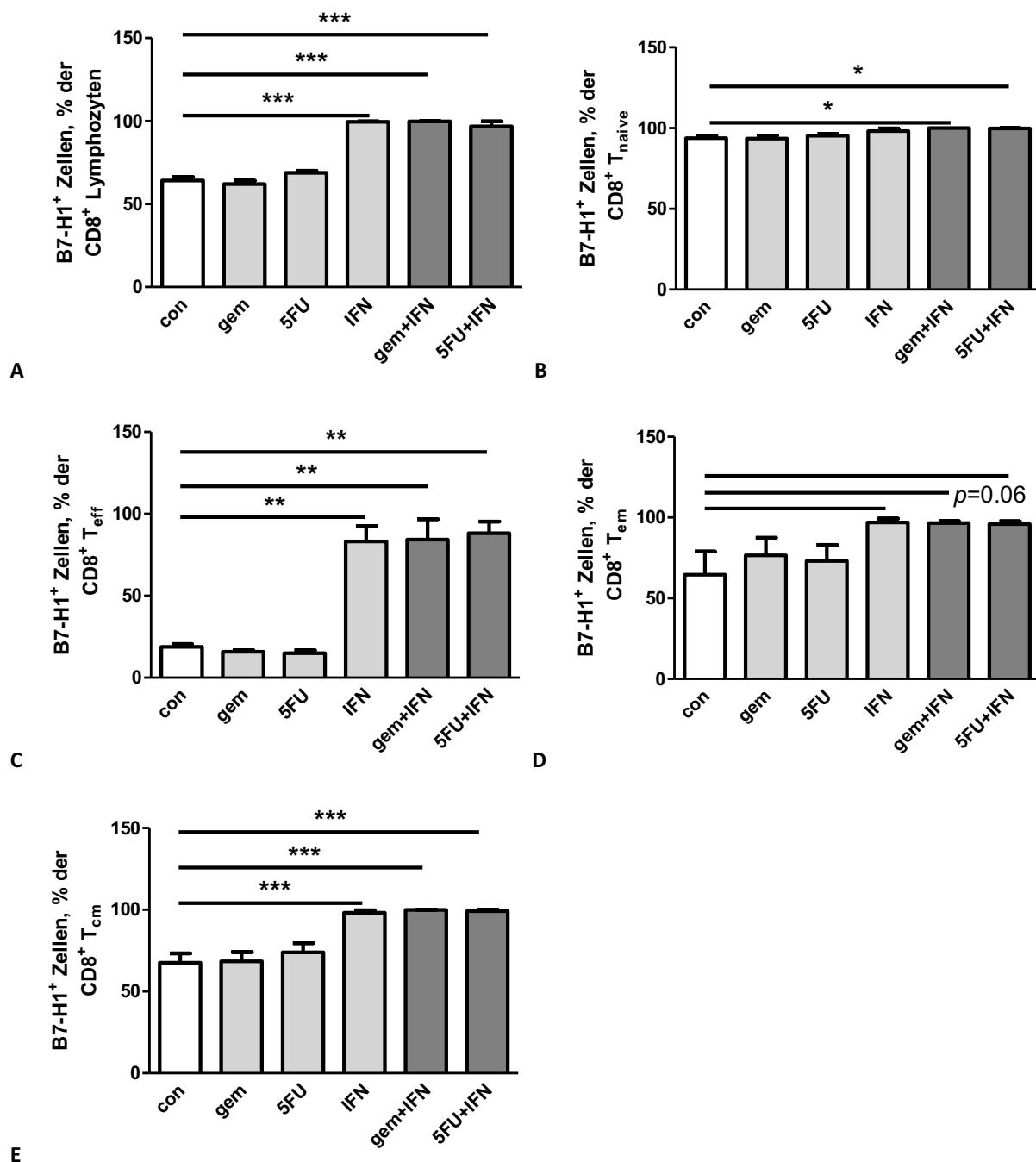


Abb. 11 Quantifizierung der B7-H1 $^+$ Zellen (CD8 $^+$ T-Zellen und deren Subpopulationen) aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: prozentualer Anteil B7-H1 $^+$ Zellen aus CD8 $^+$ T-Zellen. **B:** prozentualer Anteil B7-H1 $^+$ Zellen aus CD8 $^+$ T_{naive} . **C:** prozentualer Anteil B7-H1 $^+$ Zellen aus CD8 $^+$ T_{eff} . **D:** prozentualer Anteil B7-H1 $^+$ Zellen aus CD8 $^+$ T_{em} . **E:** prozentualer Anteil B7-H1 $^+$ Zellen aus CD8 $^+$ T_{cm} . *p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001.

Um die Veränderungen in der Gesamtmenge der B7-H1 Moleküle auf den Zellen festzustellen, wurde die B7-H1 mean fluorescence intensity (**MFI**) der B7-H1⁺ Zellen analysiert. Hier wurde bei allen T-Zellen (CD4⁺/CD8⁺/Subpopulationen) eine signifikante Mengenzunahme des B7-H1 Moleküls nach der Behandlung mit IFN α und den Kombinationstherapien beobachtet (Abb. 12 und Abb. 13).

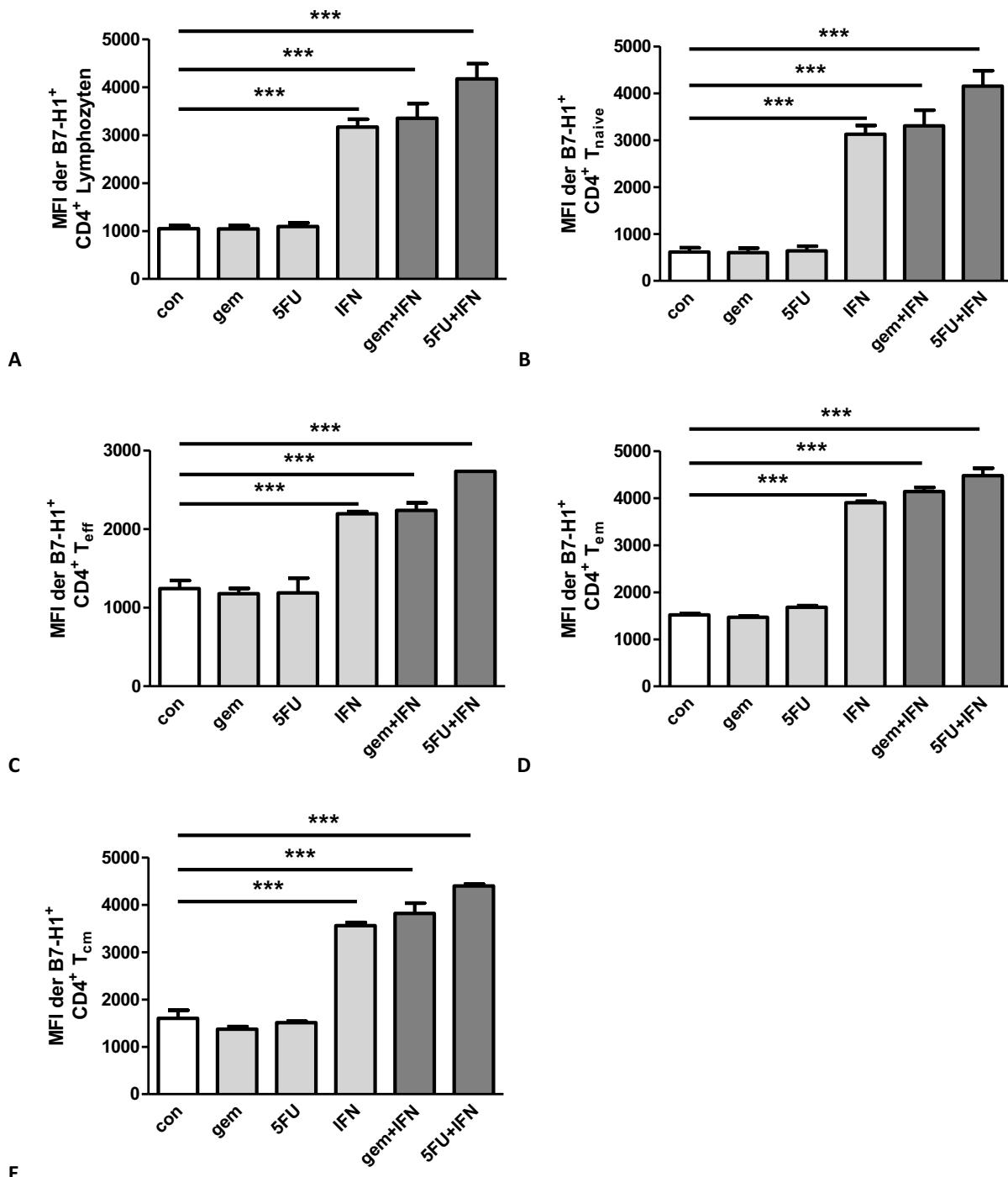


Abb. 12 MFI des B7-H1 Moleküls auf CD4⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ CD4⁺ T-Zellen. B: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ CD4⁺ T_{naive}. C: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ CD4⁺ T_{eff}. D: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ CD4⁺ T_{em}. E: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ CD4⁺ T_{cm}. ***p<0,001.

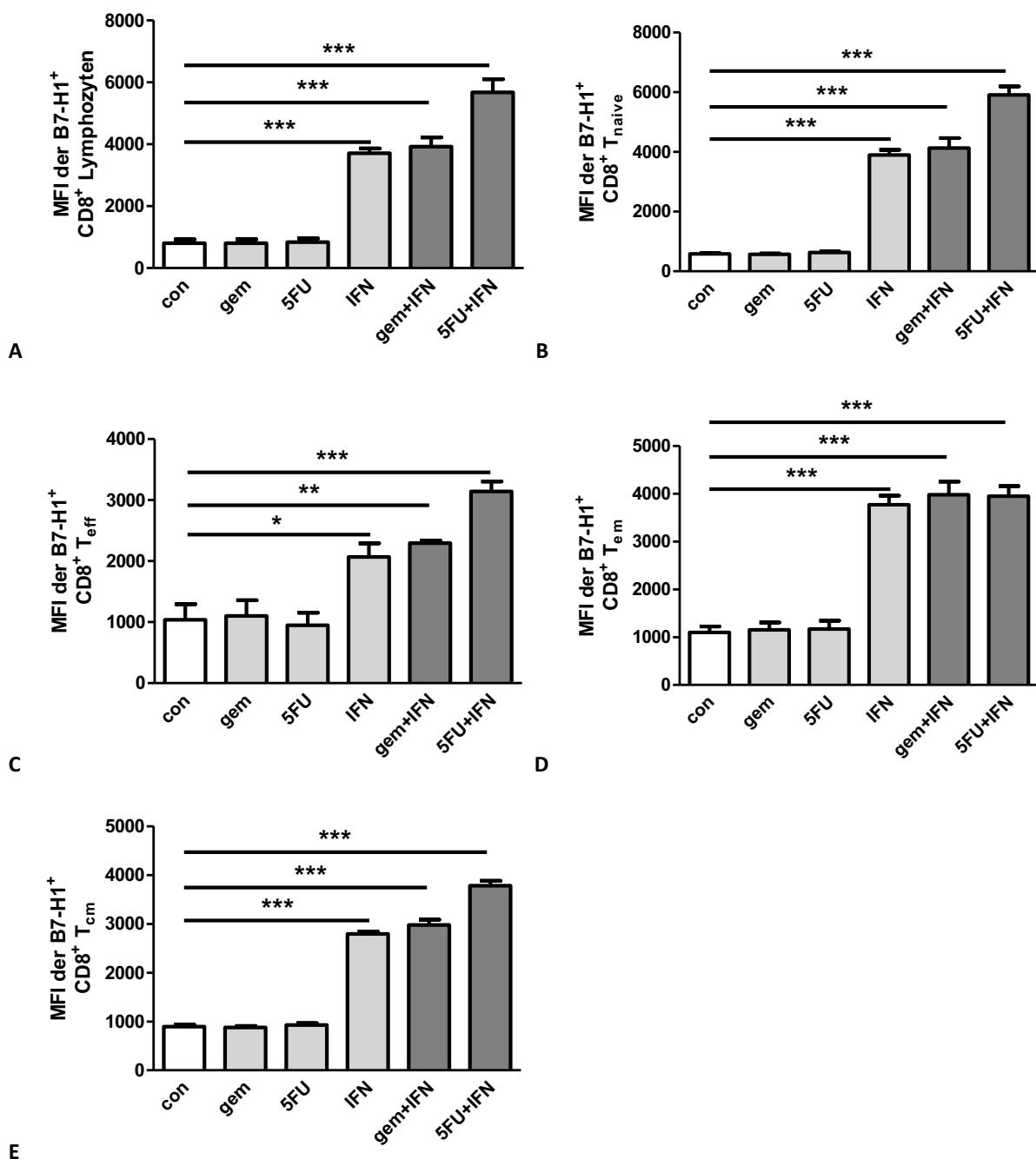


Abb. 13 MFI des B7-H1 Moleküls auf CD8⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ CD8⁺ T-Zellen. B: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ CD8⁺ T_{naive}. C: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ CD8⁺ T_{eff}. D: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ CD8⁺ T_{em}. E: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ CD8⁺ T_{cm}. *p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001.

Betrachtet man die Ergebnisse im Gesamten, so sieht man, dass bis auf wenige Ausnahmen IFN α und die Kombinationstherapien die Expression des B7-H1 Moleküls auf den CD4 und CD8 positiven Zellen deutlich verstärken.

3.2.1.2 Dendritische Zellen (cDC und pDC)

Die Auswertungsstrategie der DC-Subpopulationen ist in Abb. 14 dargestellt. Anhand der Größe (FSC) und der Granularität (SSC) wurden die Leukozyten bestimmt. Aus diesen wurden mithilfe des CD11c und des CD45R Markers die plasmazytoiden DC (pDC: $CD45R^+CD11c^{int}$) identifiziert (Abb. 14 Bild B). Ebenso konnten anhand des CD11c und des CD11b Markers die konventionellen DC (cDC: $CD11b^+CD11c^+$) bestimmt werden (Abb. 14 Bild C). Neben der B7-H1 Expression wurde die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 auf diesen Zellen ermittelt (Abb. 15 Bild A-C). Somit war es möglich, nicht nur die Veränderung der regulatorischen Mechanismen (B7-H1) des Immunsystems aufgrund der verschiedenen Therapien zu sehen, sondern auch die Veränderungen der aktivierenden Mechanismen (CD80/CD86).

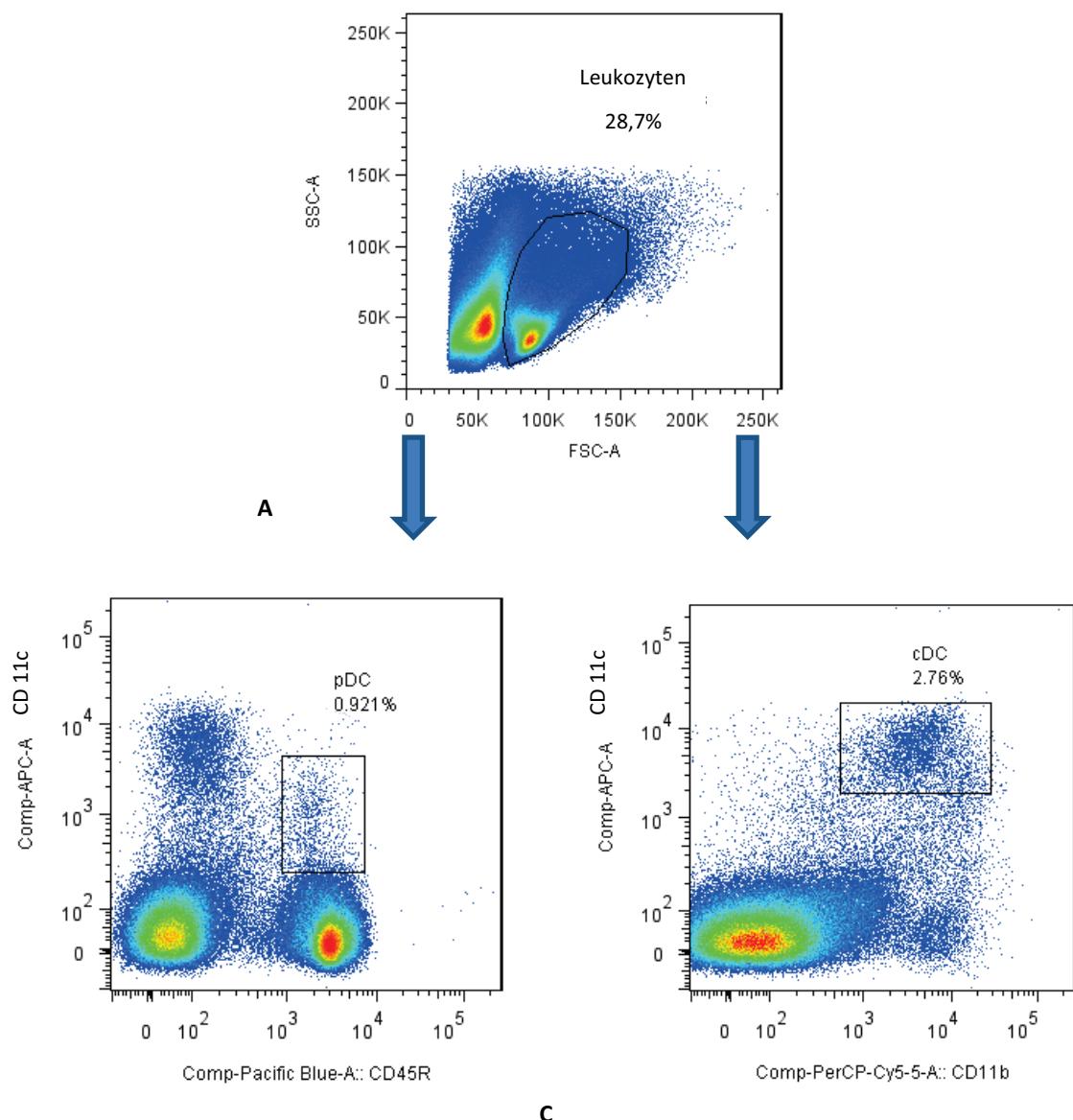


Abb. 14 Auswertungsstrategie zur Bestimmung der dendritischen Zellen (DC) aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse: A: Leukozyten. B: konventionelle dendritische Zellen (cDC). C: plasmazytoide dendritische Zellen (pDC).

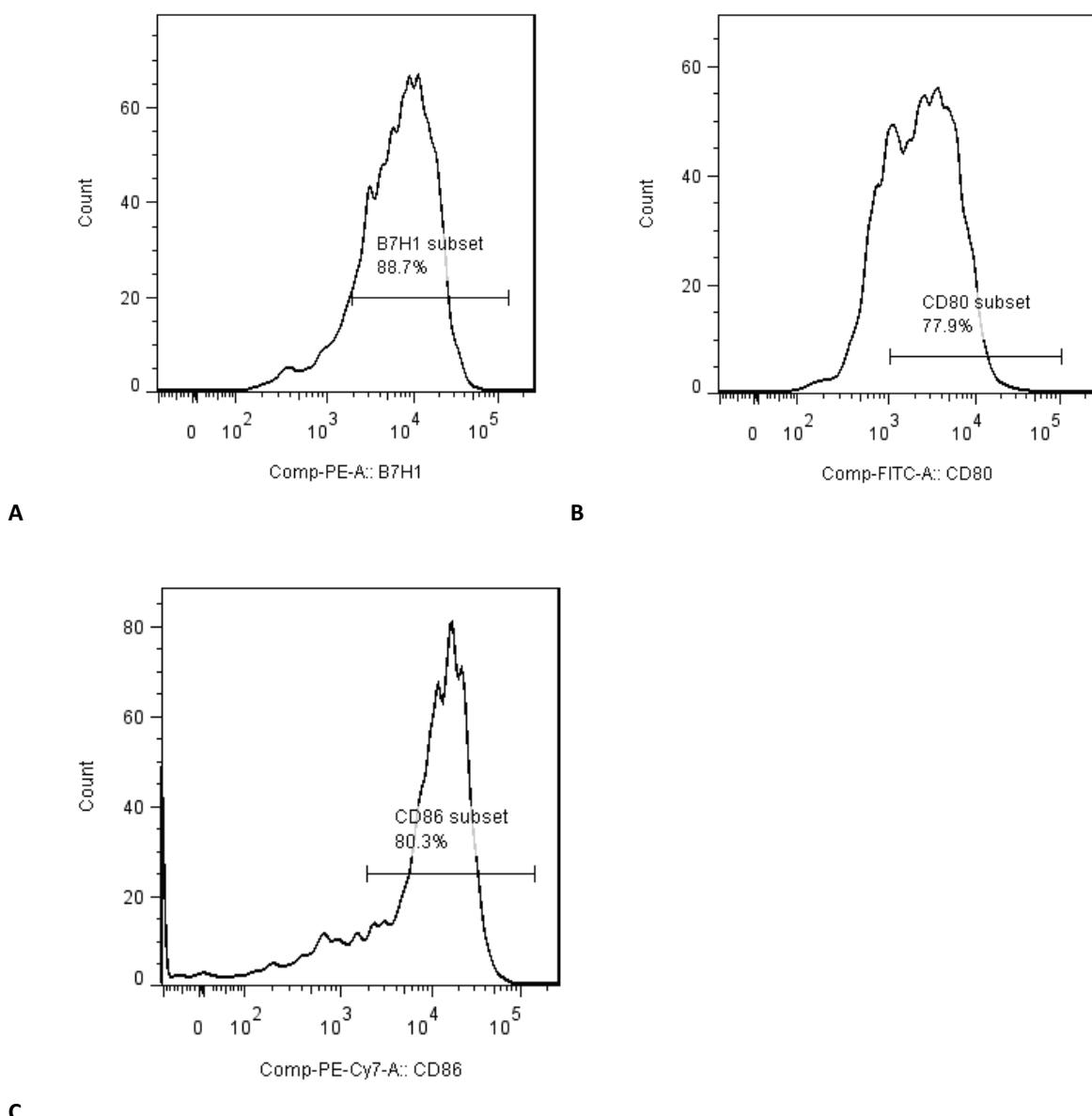
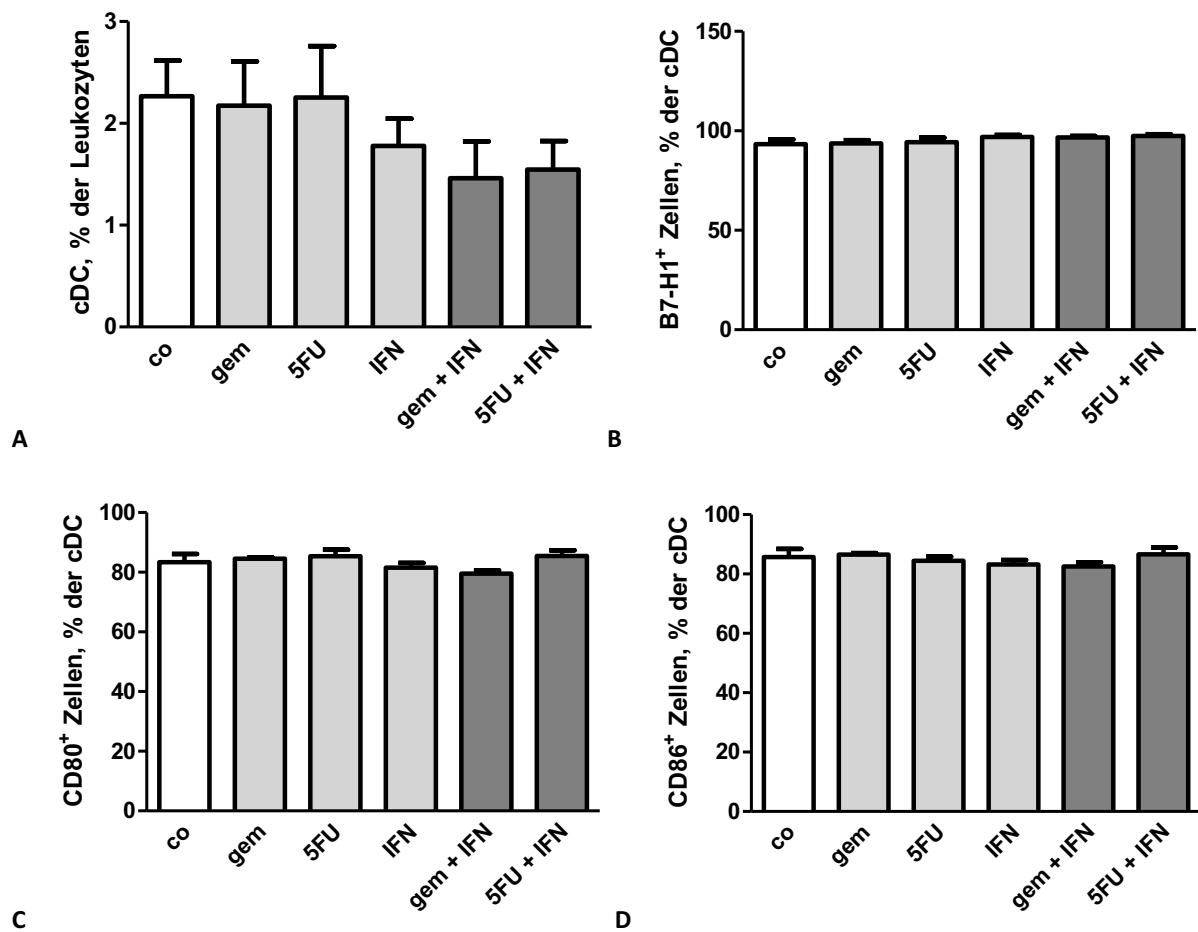


Abb. 15 Histogramme zur Darstellung folgender Oberflächenmarker auf den dendritischen Zellen (hier auf cDC): A: prozentualer Anteil der B7-H1⁺ cDC. B: prozentualer Anteil der CD80⁺ cDC. C: prozentualer Anteil der CD86⁺ cDC. Die Bestimmung der Werte erfolgte anhand des Vergleichs mit den Werten der Negativkontrollen (FMO).

3.2.1.2.1 Konventionelle DC

Betrachtet man die Anzahl der cDC in Bezug auf die Leukozyten, so ist der prozentuale Anteil der behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe nahezu konstant geblieben (Abb. 16 Bild A). Bezüglich der Expression des B7-H1 Moleküls und der kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 gab es signifikante Unterschiede. Dies machte sich in der Veränderung der Gesamtmenge der exprimierten Moleküle bemerkbar. In Abb. 16 sehen wir, dass der B7-H1 MFI Wert der B7-H1⁺ Zellen unter den Therapien mit 5-FU, IFN α und den beiden Kombinationen-

therapien signifikant angestiegen ist. Der MFI Wert des CD80 Moleküls erhöhte sich signifikant unter der Verwendung von 5-FU, IFN α und der Kombination aus 5-FU+IFN α (Abb. 16 Bild F). Signifikant erhöhte CD86 MFI Werte der CD86 $^{+}$ Zellen waren unter den Therapien mit IFN α und den Kombinationstherapien zu verzeichnen (Abb. 16 Bild G). Betrachtet man hingegen die prozentuale Anzahl der Zellen, die die Moleküle exprimieren, bleibt diese konstant (Abb. 16 Bild B-D).



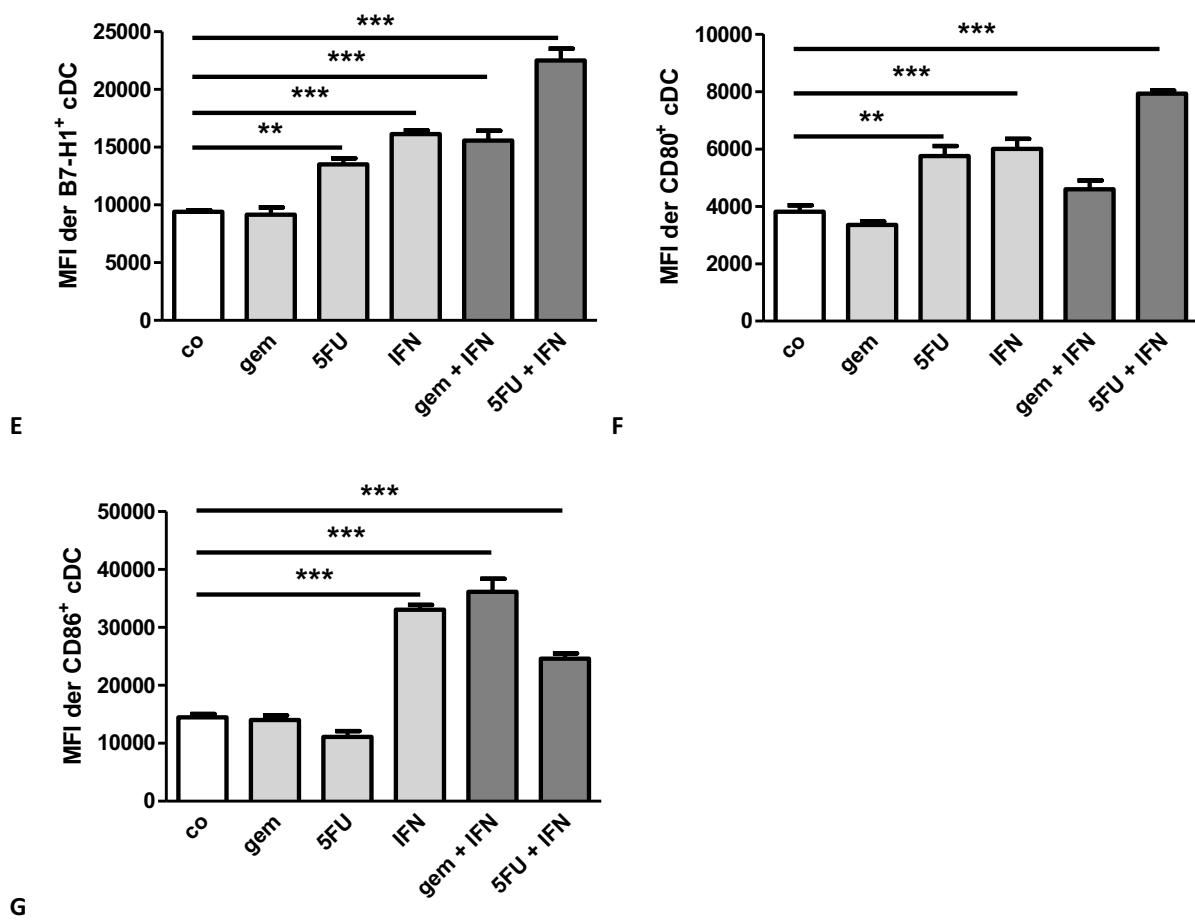
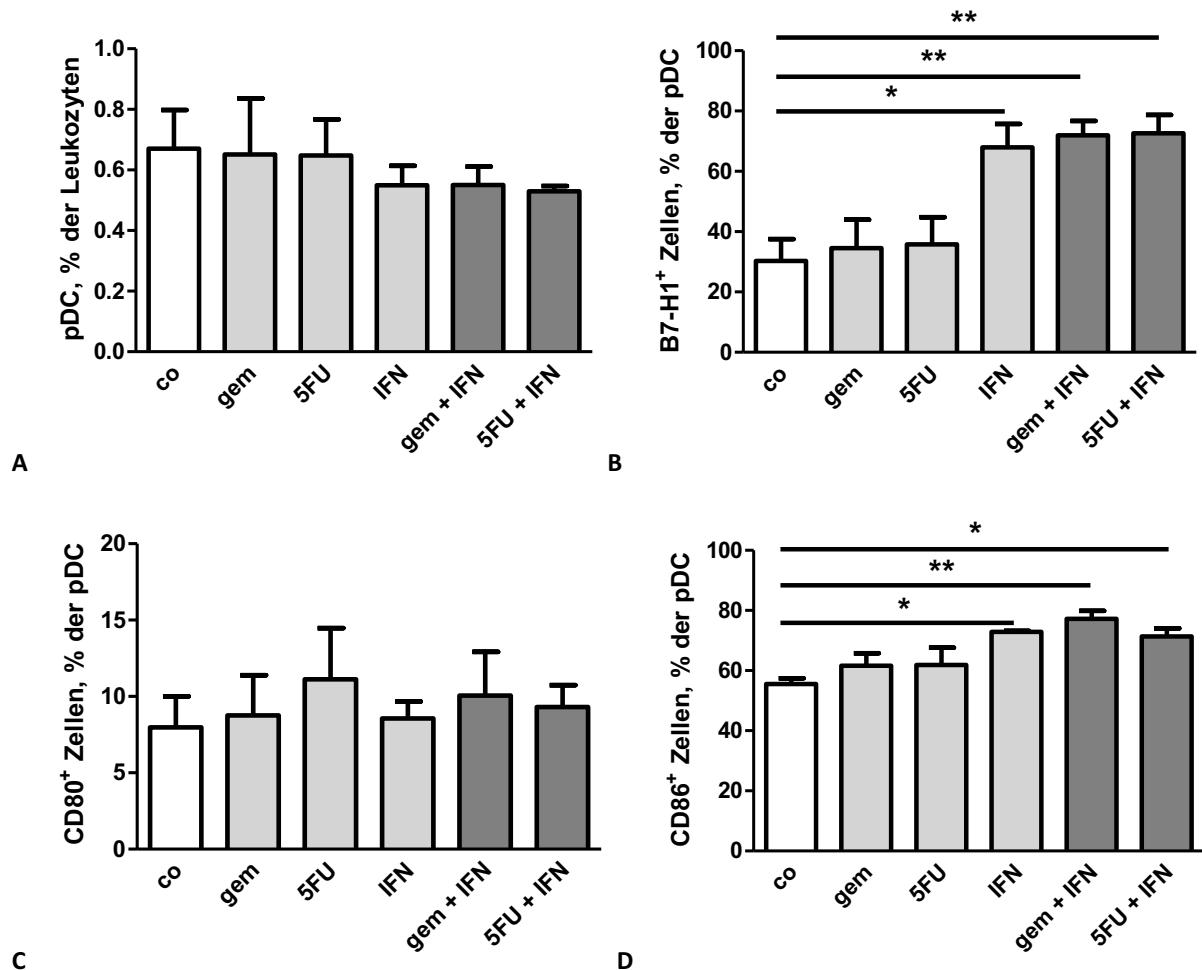


Abb. 16 Untersuchung der cDC und deren B7-H1/CD80/CD86 Expression aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien: A: Prozentzahl der cDC aus Leukozyten. B: Prozentzahl der B7-H1⁺ cDC. C: Prozentzahl der CD80⁺ cDC. D: Prozentzahl der CD86⁺ cDC. E: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ cDC. F: CD80 MFI der CD80⁺ cDC. G: CD86 MFI der CD86⁺ cDC. **p<0,01. ***p<0,001.

3.2.1.2.2 Plasmazytoide DC

Wenn wir uns den prozentualen Anteil der pDC in Bezug auf die Leukozyten ansehen, sind keine Unterschiede zwischen behandelten Zellen und Zellen der Kontrollgruppe erkennbar. Im Hinblick auf das kostimulatorische Molekül CD80 waren keine Veränderungen in der Häufigkeit der Zellzahl (CD80⁺ pDCs) zu verzeichnen und der MFI Wert des CD80 Moleküls blieb ebenfalls konstant (Abb. 17 Bild A, C, F). Das B7-H1 Molekül wurde unter der Therapie mit IFN α und den beiden Kombinationstherapien von signifikant mehr Zellen ausgebildet. Ebenso stieg der B7-H1 MFI Wert für die B7-H1⁺ Zellen unter der Verwendung von IFN α und den Kombinationen signifikant an (Abb. 17 Bild B und E). Des Weiteren sehen wir, dass sich die prozentuale Zahl der pDC, die das CD86 Molekül exprimieren, signifikant unter dem Einfluss derselben Therapien (IFN α und Kombinationstherapien) erhöhte. Der CD86 MFI Wert und

somit die Gesamtmenge von CD86 blieb allerdings konstant und veränderte sich aufgrund der verschiedenen Therapien nicht (Abb. 17 Bild D und G).



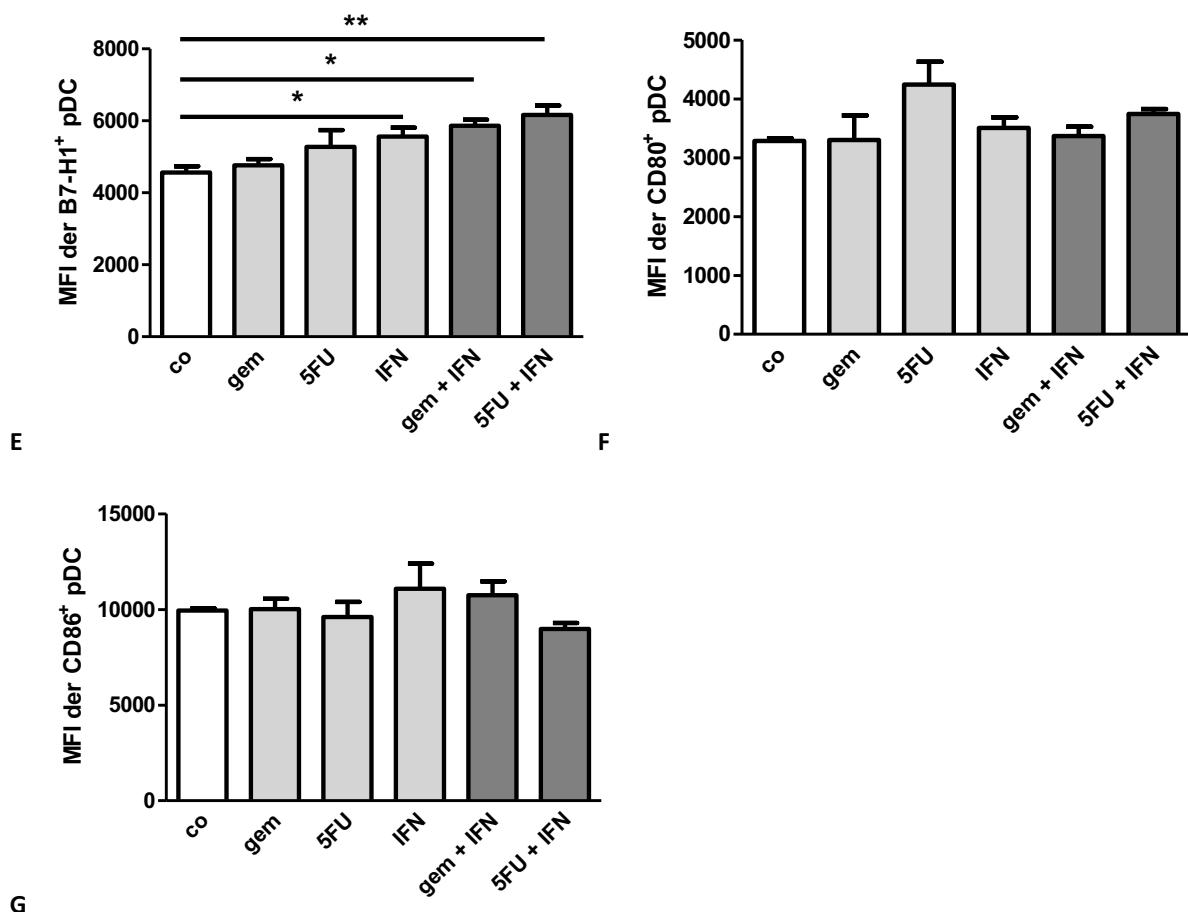


Abb. 17 Untersuchung der pDC und deren B7-H1/CD80/CD86 Expression aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien: A: Prozentzahl der pDC aus Leukozyten. B: Prozentzahl der B7-H1⁺ pDC. C: Prozentzahl der CD80⁺ pDC. D: Prozentzahl der CD86⁺ pDC. E: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ pDC. F: CD80 MFI der CD80⁺ pDC. G: CD86 MFI der CD86⁺ pDC. *p<0,05. **p<0,01.

Insgesamt können wir feststellen, dass die verschiedenen Behandlungen, insbesondere die mit IFN α , starken Einfluss auf die Expression der regulatorischen als auch der kostimulatorischen Moleküle auf den dendritischen Zellen nehmen. Dabei ist deutlich erkennbar, dass sich die Expressionsmuster von CD80, CD86 und B7-H1 auf beiden DC Subpopulationen unterschiedlich verhalten.

3.2.1.3 Makrophagen

Die nächste Subpopulation, die wir mit der Zugabe spezifischer Antikörper identifiziert und untersucht haben, waren die Makrophagen. Die Auswertungsstrategie ist in Abb. 18 dargestellt. Anhand der Größe (FSC) und der Granularität (SSC) wurden die Leukozyten ermittelt. Mithilfe des Gr-1 und CD11b Markers konnte die Gr-1 negative, CD11b positive Population definiert werden (Abb. 18 Bild B). Aus dieser wurden die Makrophagen (CD11b positiv, F4/80

positiv) ermittelt (Abb. 18 Bild C). Im Histogramm wurde der prozentuale Anteil B7-H1⁺ Makrophagen bestimmt (Abb. 18 Bild D).

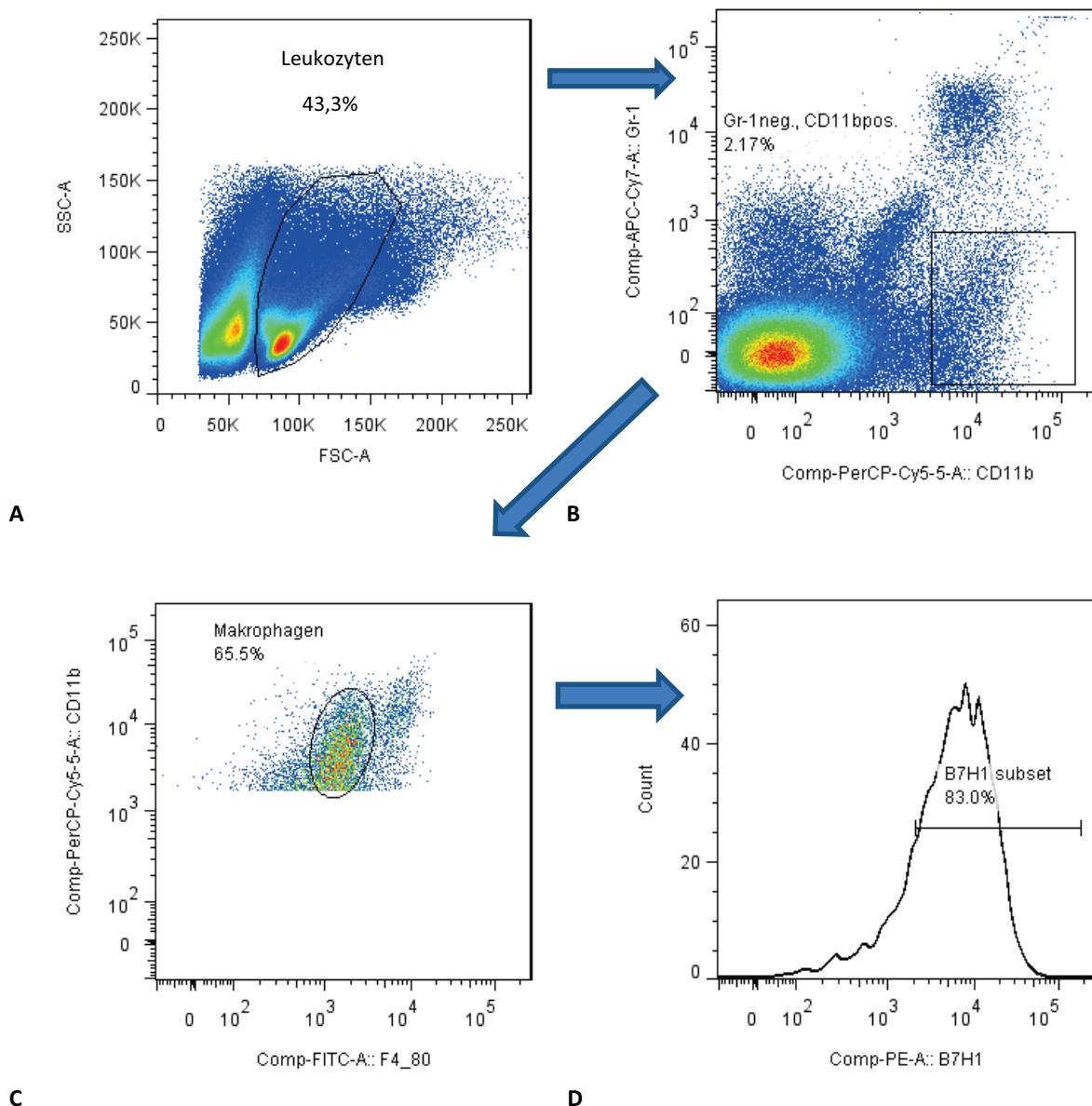


Abb. 18 Auswertungsstrategie zur Bestimmung der Makrophagen aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse.
A: Leukozyten. **B:** Gr-1 negative, CD11b positive Population. **C:** Makrophagen. **D:** B7-H1⁺ Makrophagen im Histogramm.

Die Bestimmung der Werte erfolgte anhand des Vergleichs mit den Werten der Negativkontrollen (FMO).

Wie man in Abb. 19 Bild A sehen kann, veränderte sich der prozentuale Anteil der Makrophagen in Bezug auf die Leukozyten aufgrund der verschiedenen Therapien nicht. Die Frequenz der B7-H1⁺ Makrophagen stieg allerdings während der Therapie mit IFN α und der Kombinationstherapie aus Gem+IFN α signifikant an (Abb. 19 Bild B). Folgend haben wir den

B7-H1 MFI Wert für die B7-H1⁺ Zellen betrachtet. Es war ersichtlich, dass sich dieser unter der Therapie mit IFN α und den beiden Kombinationstherapien signifikant erhöhte. Zellen, die mit 5-FU und Gem allein behandelt wurden, zeigten keine nennenswerten Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 19 Bild C).

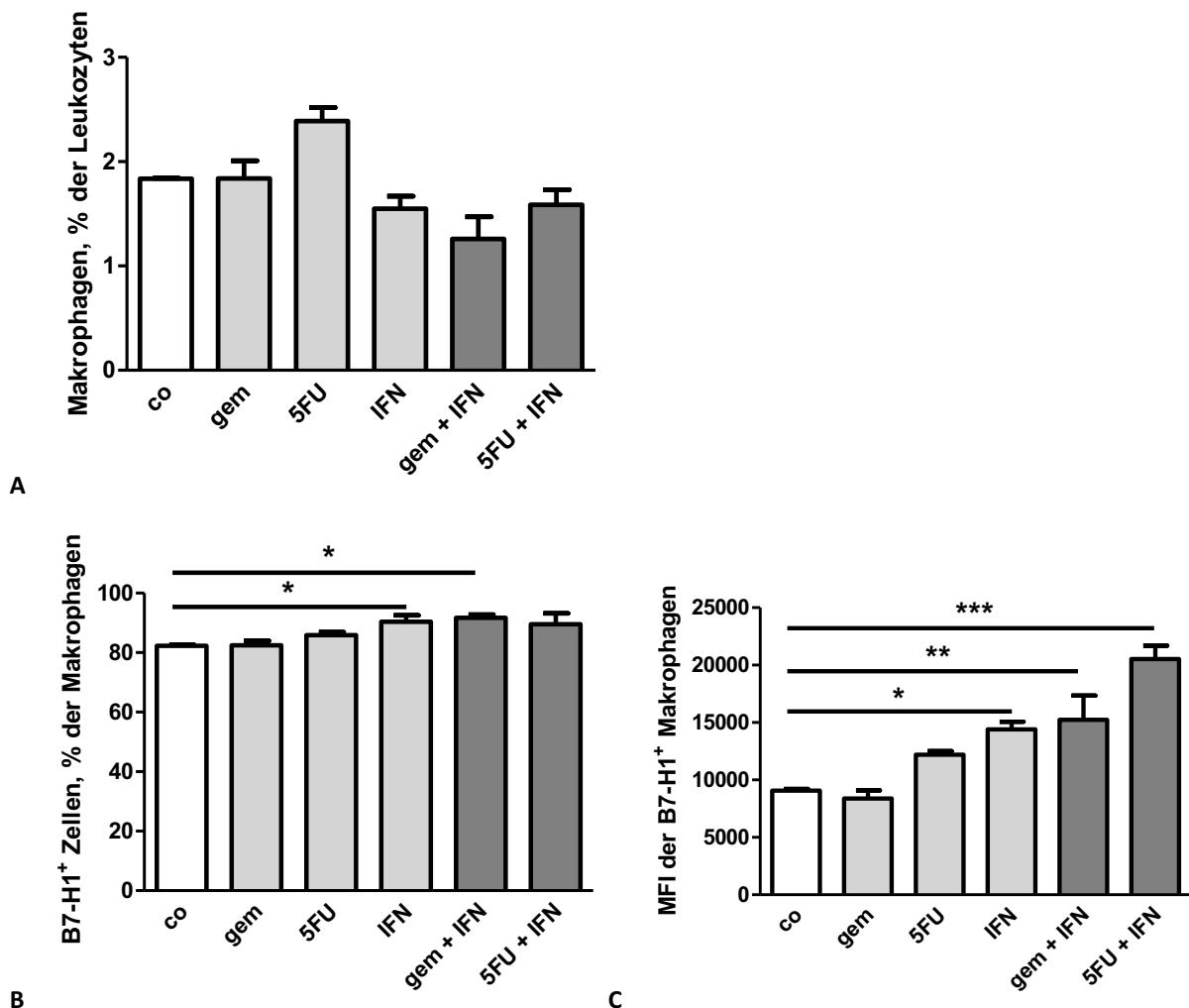
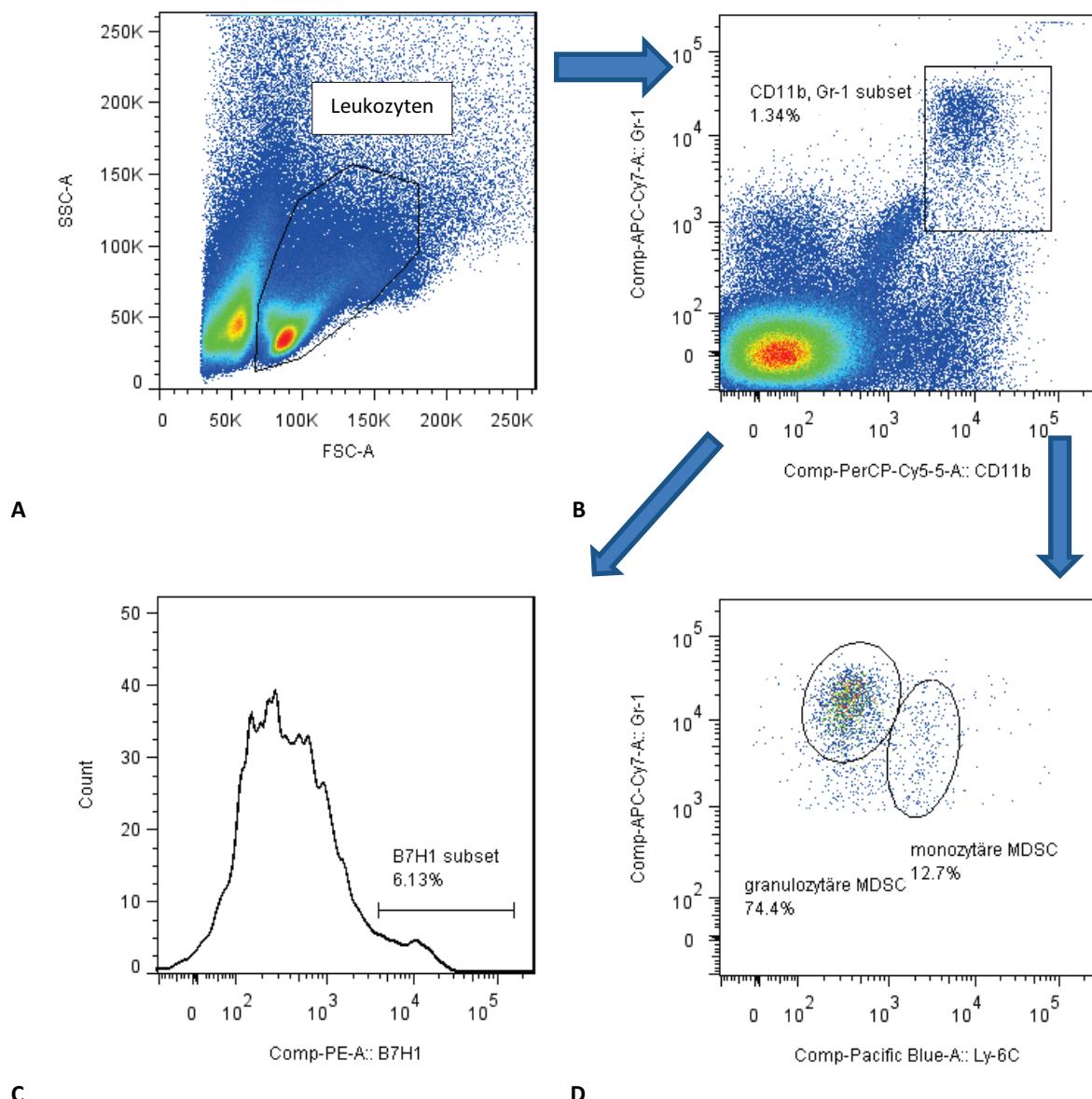


Abb. 19 Untersuchung der Makrophagen und deren B7-H1 Expression aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: prozentualer Anteil der Makrophagen aus Leukozyten. **B:** prozentualer Anteil B7-H1⁺ Makrophagen. **C:** B7-H1 MFI der B7-H1⁺ Makrophagen. *p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001.

Es ist deutlich sichtbar, dass Makrophagen, die IFN α oder die Kombinationstherapien erhalten haben, das B7-H1 Molekül vermehrt exprimieren.

3.2.1.4 Myeloid-derived suppressor cells (MDSC)

Weil die MDSC in der Tumorumgebung stark immunsuppressorisch wirken, wurden diese auch in den gesunden Mäusen genauer untersucht. In Abb. 20 sind die Auswertungsstrategie der MDSC und deren Subpopulationen dargestellt. Anhand der Größe (FSC) und der Granularität (SSC) konnten die Leukozyten identifiziert werden. Die MDSC ergaben sich aus dem CD11b⁺ und Gr-1⁺ Zellkompartiment, das weiterhin in zwei Subpopulationen unterteilt wurde (Abb. 20 Bild B und D). Zu diesen Subpopulationen zählen die Ly6C^{high} CD11b⁺ Gr-1⁺ Zellen (monozytäre MDSC) und die Ly6C^{int} CD11b⁺ Gr-1⁺ Zellen (granulozytäre MDSC). Mithilfe des Histogramms konnte die Expression des B7-H1 Moleküls auf den MDSC und deren Subpopulationen dargestellt werden (Abb. 20 Bild C, E, F).



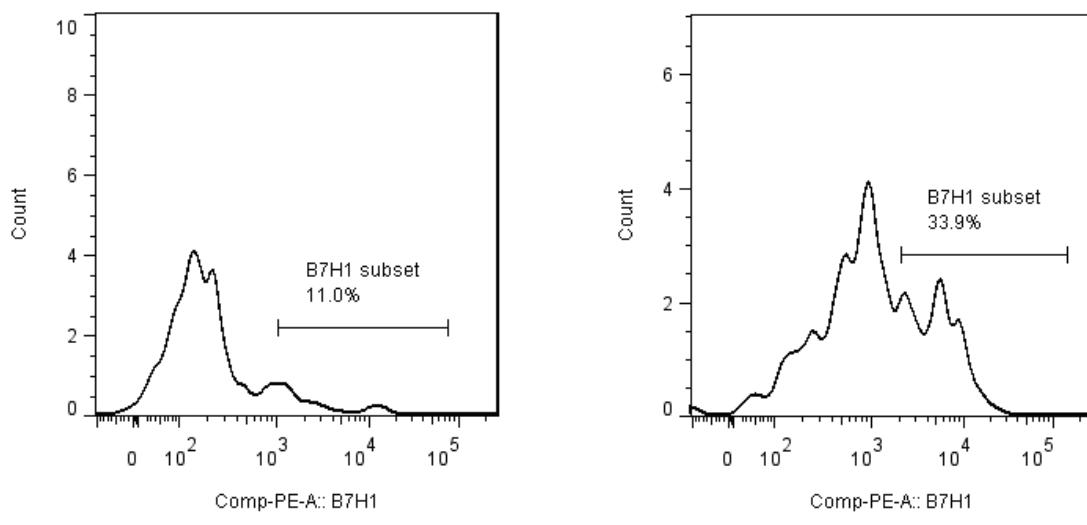


Abb. 20 Auswertungsstrategie zur Bestimmung der MDSC aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse. A: Leukozyten. **B:** CD11b⁺ Gr-1⁺ MDSC. **C:** B7-H1⁺ MDSC im Histogramm. **D:** Granulozytäre (Gr-1⁺ Ly6C^{int}) und monozytäre (Gr-1⁺ Ly6C^{high}) MDSC. **E:** B7-H1⁺ granulozytäre MDSC im Histogramm. **F:** B7-H1⁺ monozytäre MDSC im Histogramm.

3.2.1.5 MDSC

Die prozentuale Zellzahl der MDSC in Bezug auf die Leukozyten blieb trotz unterschiedlicher Behandlungen konstant (Abb. 21 Bild A). Unter der Verwendung von IFN α und den Kombinationstherapien wurde allerdings eine signifikant höhere Zahl der B7-H1⁺ MDSC erreicht. Für 5-FU und Gem blieb die Zahl B7-H1 positiver MDSC unverändert (Abb. 21 Bild B). Unter der Behandlung von 5-FU+IFN α erhöhte sich nicht nur die prozentuale Zellzahl B7-H1 positiver Zellen, sondern auch die Gesamtmenge der B7-H1⁺ Zellen (MFI) (Abb. 21 Bild C).

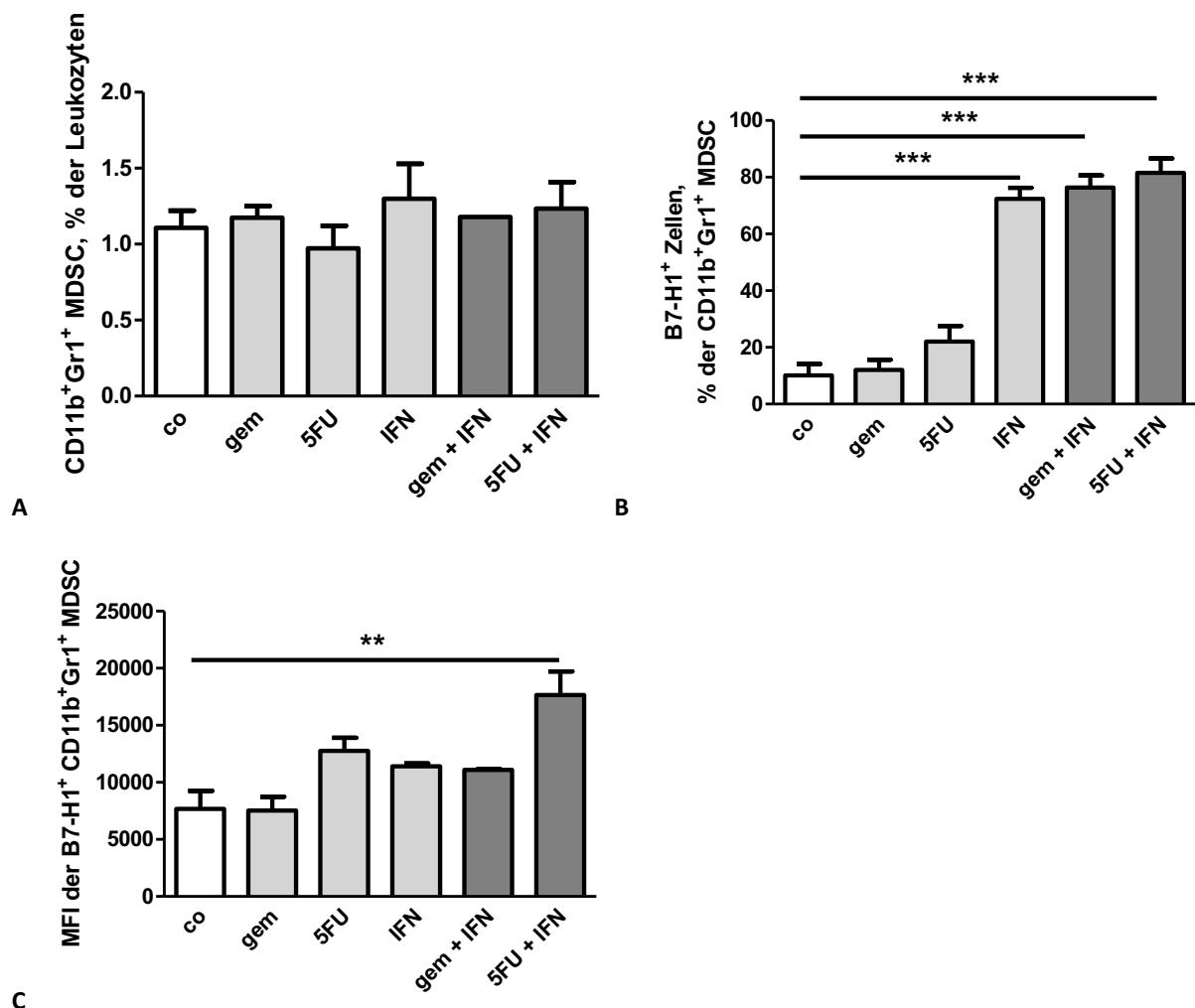


Abb. 21 Untersuchung der MDSC und deren B7-H1 Expression aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: Prozentzahl der CD11b⁺ Gr-1⁺ MDSC aus Leukozyten. **B:** Prozentzahl B7-H1⁺ MDSC. **C:** B7-H1 MFI der B7-H1⁺ MDSC. **p<0,01. ***p<0,001.

3.2.1.5.1 Granulozytäre/monozytäre MDSC

Die Anzahl der granulozytären und der monozytären MDSC bezüglich der CD11b⁺ Gr-1⁺ MDSC hat sich wie die Zahl der Kontrollgruppe verhalten und veränderte sich somit nicht (Abb. 22 Bild A und B). IFN α und die Kombinationstherapien erhöhten die Zahl B7-H1 positiver Zellen in beiden Subpopulationen signifikant. Auch in Anbetracht des B7-H1 MFI der B7-H1⁺ Zellen konnten wir signifikant höhere Werte unter der Therapie mit IFN α und den Kombinationstherapien vernehmen (Abb. 22 Bild C-F).

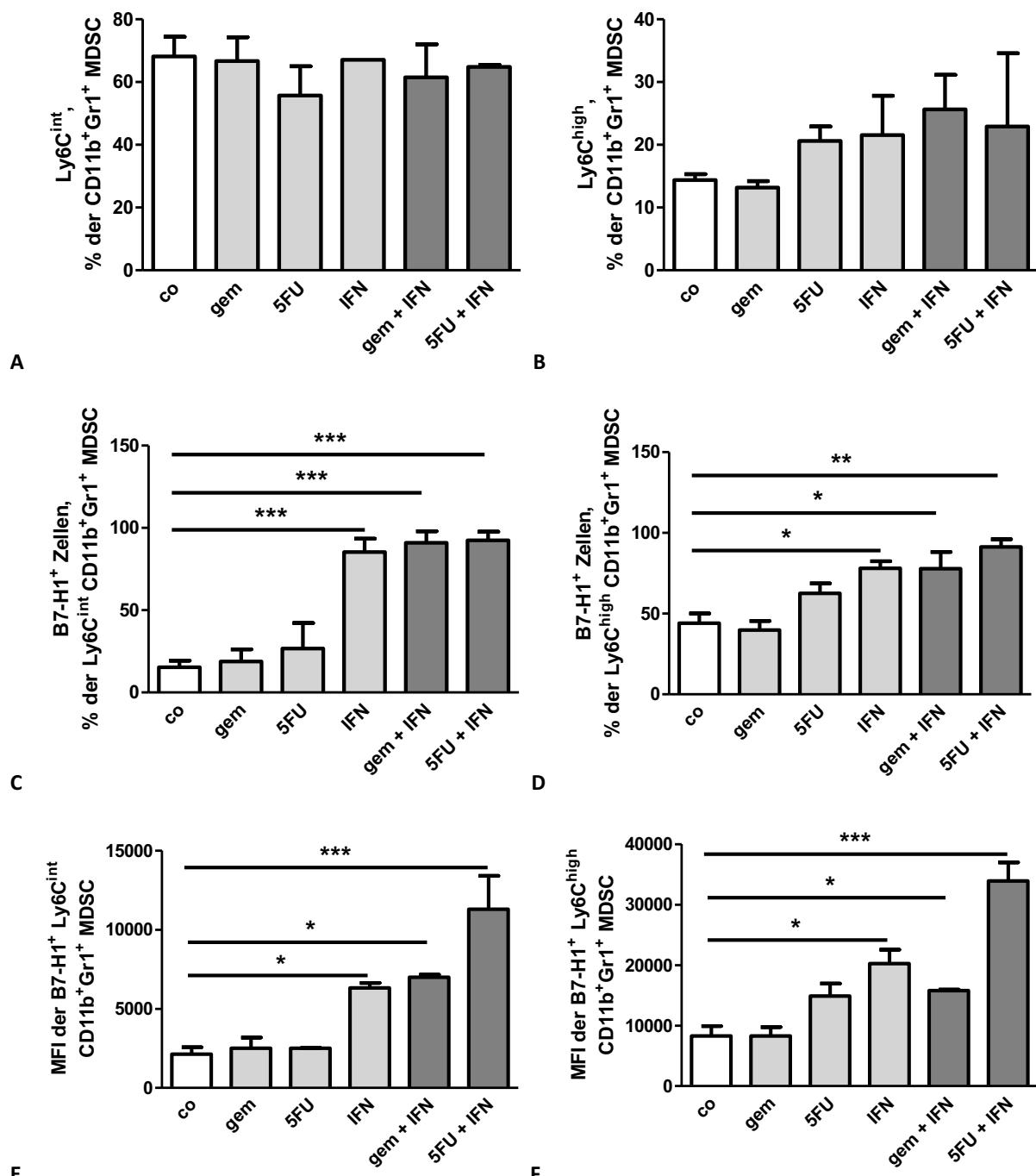


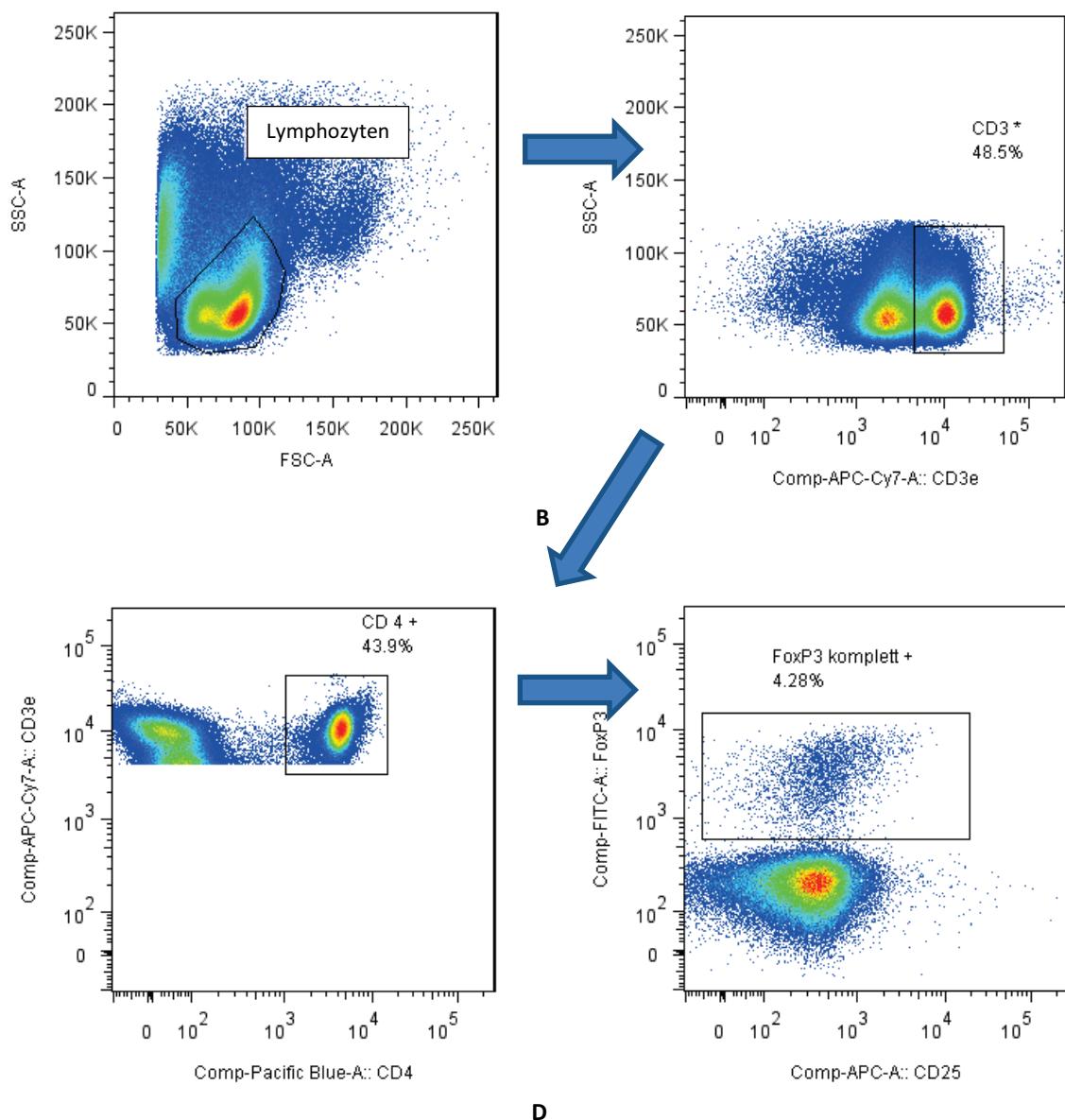
Abb. 22 Untersuchung der granulozytären und monozytären MDSC und deren B7-H1 Expression aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: Prozentualer Anteil der granulozytären (Ly6C^{int}) MDSC aus $\text{CD11b}^+ \text{Gr-1}^+$ MDSC. **B:** Prozentualer Anteil der monozytären ($\text{Ly6C}^{\text{high}}$) MDSC aus $\text{CD11b}^+ \text{Gr-1}^+$ MDSC. **C:** Prozentualer Anteil der $\text{B7-H1}^+ \text{Ly6C}^{\text{int}}$ MDSC. **D:** Prozentualer Anteil der $\text{B7-H1}^+ \text{Ly6C}^{\text{high}}$ MDSC. **E:** B7-H1 MFI der $\text{B7-H1}^+ \text{Ly6C}^{\text{int}}$ MDSC. **F:** B7-H1 MFI der $\text{B7-H1}^+ \text{Ly6C}^{\text{high}}$ MDSC.

* $p<0,05$. ** $p<0,01$. *** $p<0,001$.

Wie hier dargestellt, nehmen einige Therapeutika, insbesondere $\text{IFN}\alpha$, sichtbaren Einfluss auf die Expression des B7-H1 Moleküls auf den MDSC-Zellen. Dieser Effekt ist nicht nur auf den MDSC im Allgemeinen zu sehen, sondern auch auf beiden Subpopulationen der MDSC.

3.2.1.6 Konventionelle und regulatorische T-Zellen

Zuletzt wurden die konventionellen (T_{con}) und die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) näher betrachtet (Abb. 23). Wie alle bisher beschriebenen Zellen wurden sie nach der Behandlung mit verschiedenen Therapeutika und nach Ablauf der Inkubationszeit von 24h mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern gekoppelt. Anhand von FSC und SSC konnten die Lymphozyten bestimmt werden. Aus diesen wurden alle $CD3^+$ Lymphozyten erfasst und weiterhin die $CD4^+$ Zellpopulation definiert. Des Weiteren sind T_{reg} als $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ beschrieben, wohingegen T_{con} $FoxP3^-$ sind (Abb. 23 Bild D). Im Histogramm wurde das regulatorische Molekül B7-H1 auf den T_{con} und den T_{reg} näher betrachtet. Mithilfe des Histogramms konnte der Aktivierungsstatus der T_{con} und der T_{reg} bestimmt werden. Hierfür wurde der frühe Aktivierungs-Oberflächenmarker CD69 verwendet (Abb. 23 Bild E und F).



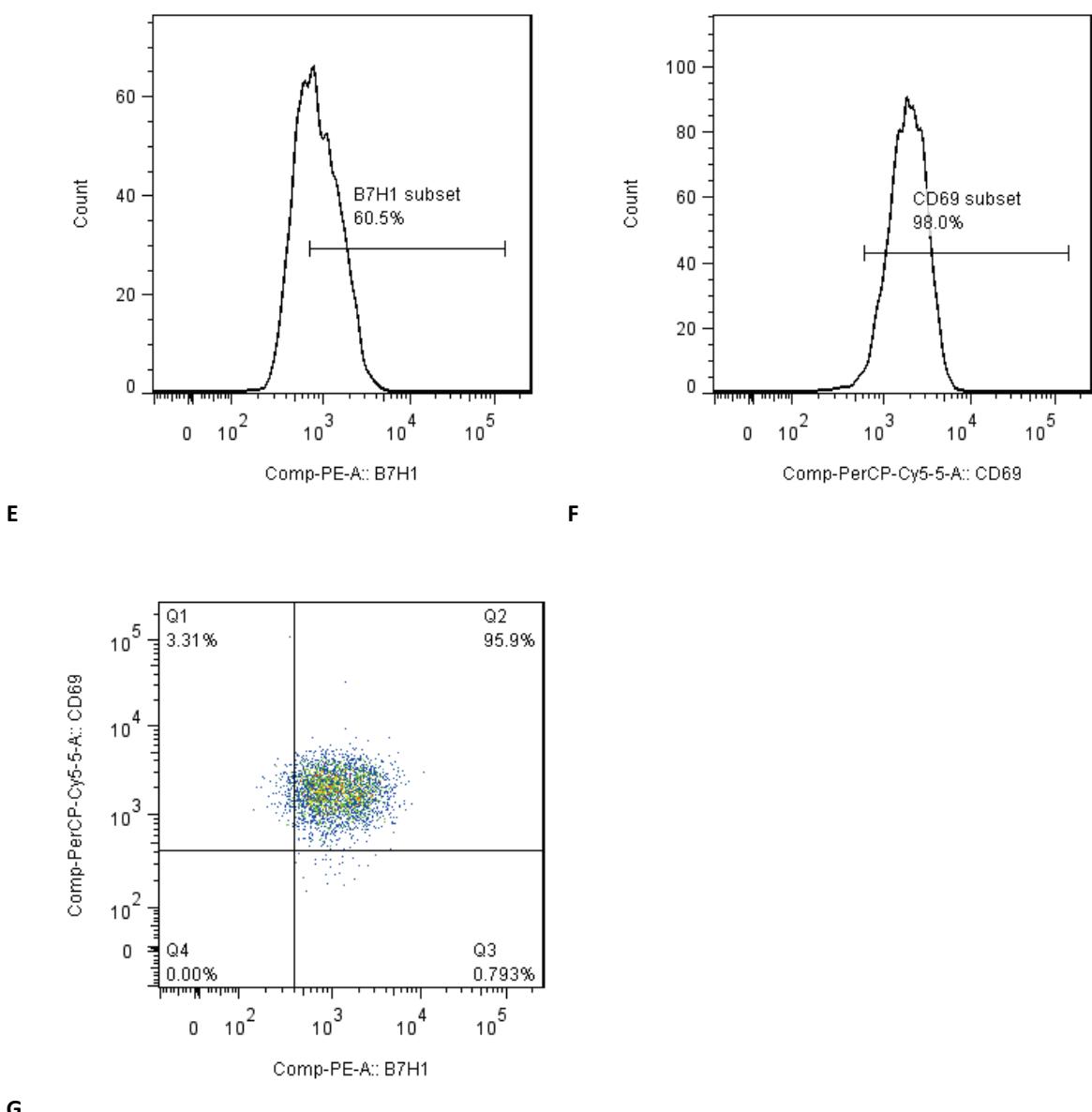


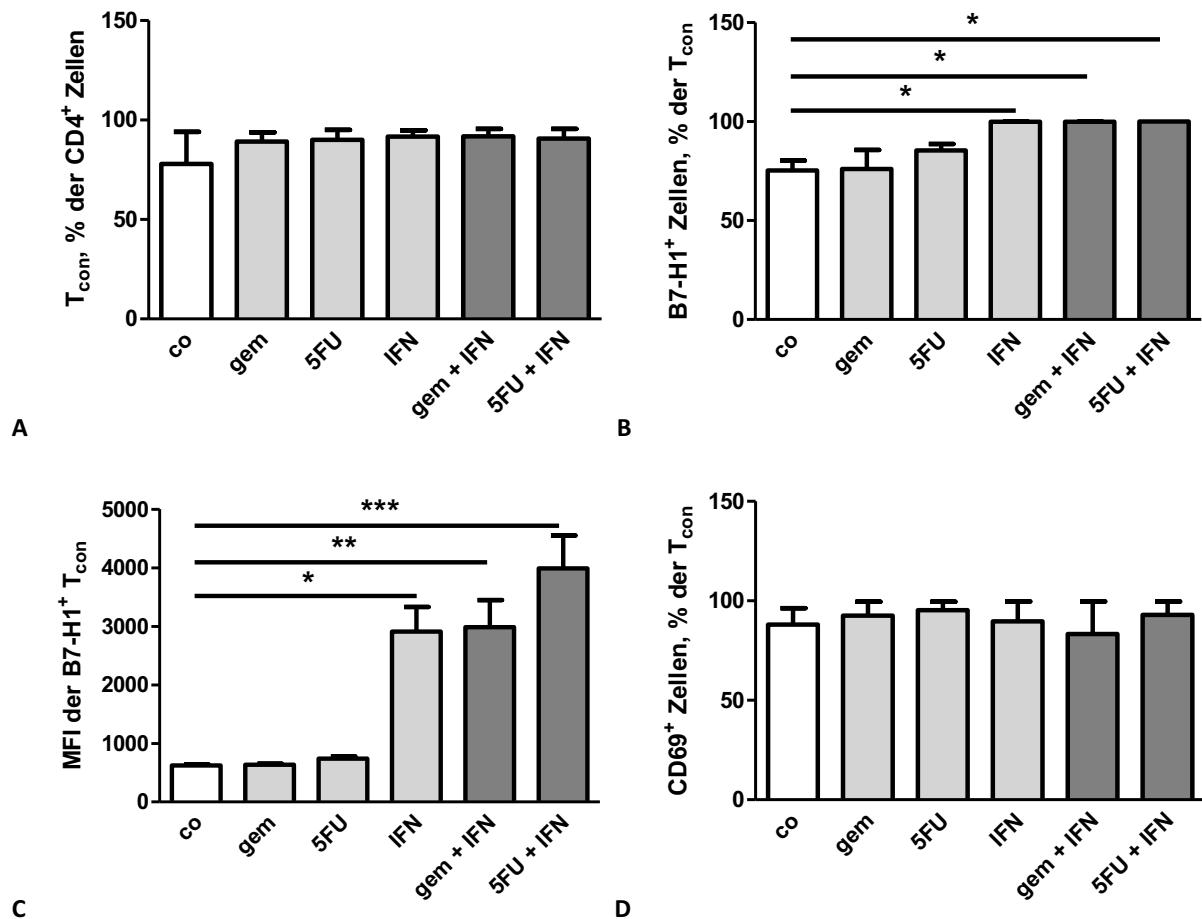
Abb. 23 Auswertungsstrategie zur Bestimmung der T_{reg} und T_{con} aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse.
A: Lymphozyten. **B:** $CD3^+$ Lymphozyten. **C:** $CD4^+$ T-Zellen. **D:** T_{con} ($FoxP3^+$), T_{reg} ($FoxP3^+$). **E:** $B7-H1^+$ T_{reg} im Histogramm. **F:** $CD69^+$ T_{reg} im Histogramm. **G:** $B7-H1^+$ und $CD69^+$ T_{reg} im DotPlot.

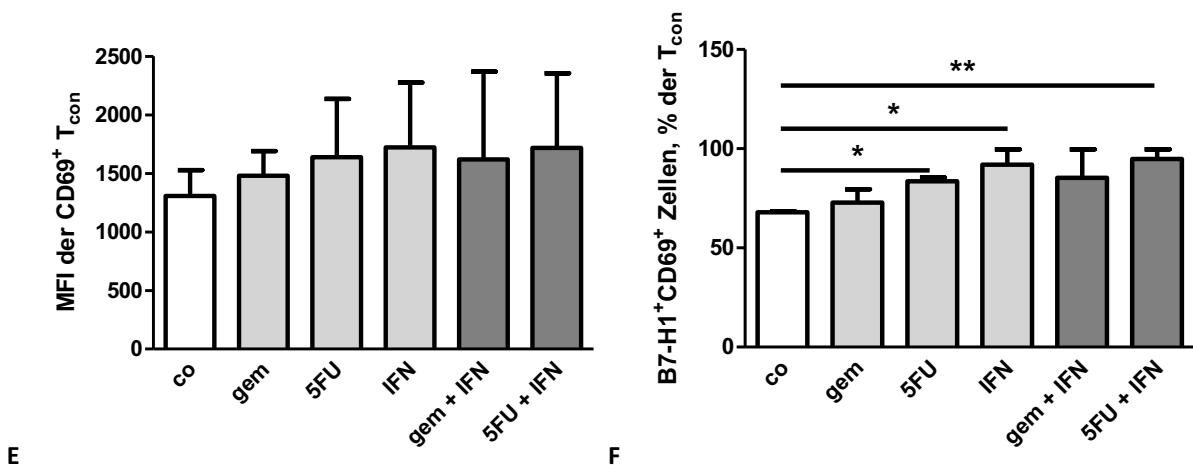
Die Bestimmung der Werte erfolgte anhand des Vergleichs mit den Werten der Negativkontrollen (FMO).

3.2.1.7 Konventionelle T-Zellen

Der prozentuale Anteil der T_{con} in Bezug auf die $CD4^+$ T-Zellen bewegte sich für alle Therapiegruppen in einem nahezu identischen Bereich. Für das regulatorische Molekül B7-H1 konnten wir Folgendes beobachten: Sowohl die Zahl der B7-H1 positiven T_{con} als auch der MFI Wert des B7-H1 Moleküls erhöhte sich signifikant, wenn $IFN\alpha$ oder die Kombinationstherapeutika verwendet wurden (Abb. 24 Bild B und C). Andererseits haben die Therapien auf die

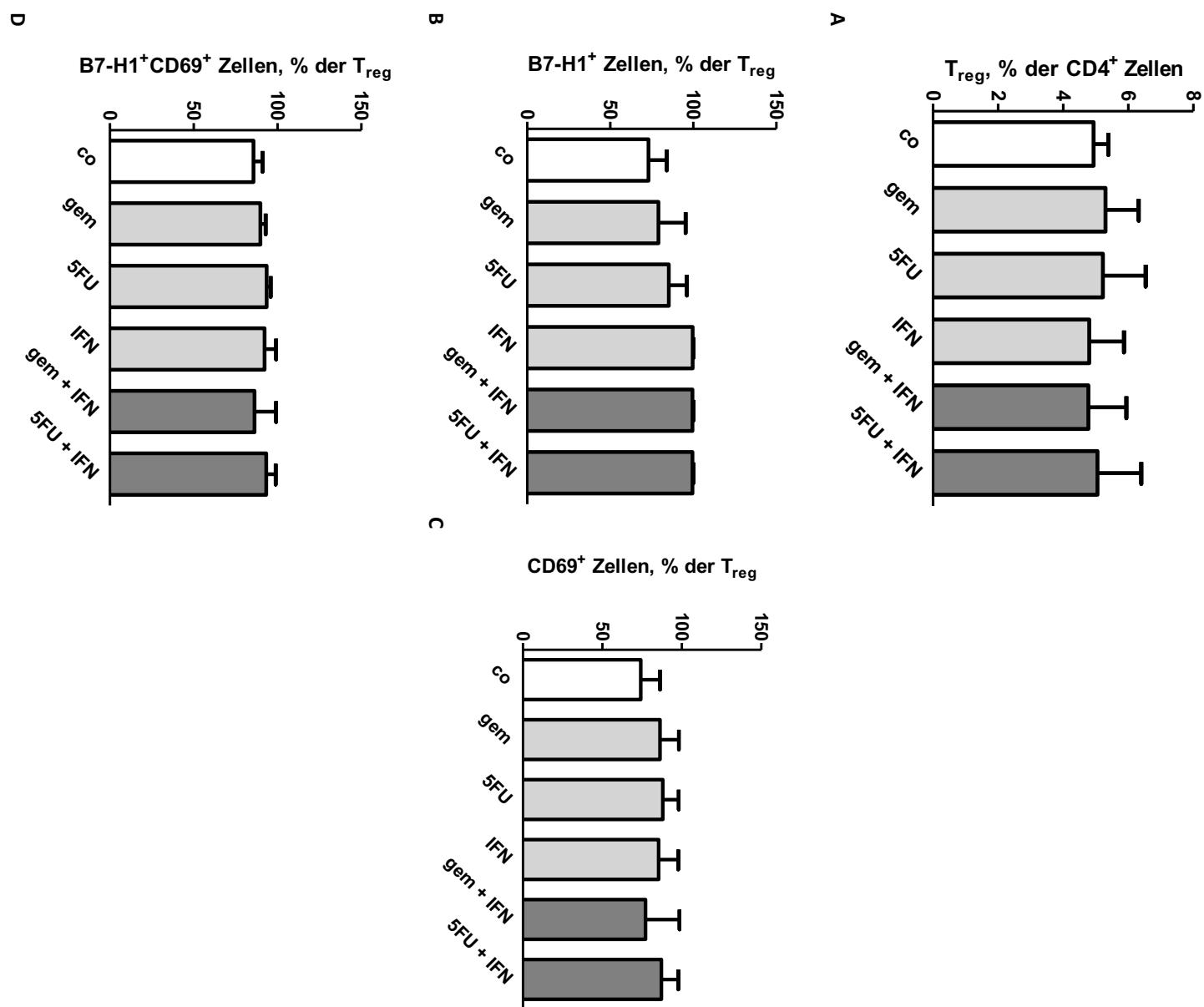
Expression des CD69 Moleküls keinen Einfluss genommen. Alle T_{con} exprimierten CD69 in gleicher Anzahl und Menge wie die Zellen der Kontrollgruppe (Abb. 24 Bild D und E). Be- trachtet man allerdings die T_{con} , die sowohl B7-H1 als auch CD69 auf ihrer Oberfläche ex- primierten, so sind deutliche Unterschiede erkennbar. Mit 5-FU, IFN α und der Kombination aus 5-FU+IFN α exprimierte ein deutlich höherer Prozentsatz der T_{con} gleichzeitig die Moleküle B7-H1 und CD69 (Abb. 24 Bild F).





3.2.1.8 Regulatorische T-Zellen

Der prozentuale Anteil der T_{reg} bezüglich der CD4⁺ T-Zellen blieb konstant. Auch hier haben die verschiedenen Behandlungen keinen Einfluss auf die Zellzahl genommen. Die Zahl der B7-H1⁺ T_{reg} wie auch der CD69⁺ T_{reg} veränderte sich gegenüber den Kontrollzellen ebenfalls nicht (Abb. 25 Bild A-C). Weiterhin haben wir keine Ab- oder Zunahme hinsichtlich der T_{reg}, die doppelt positiv für die Moleküle B7-H1 und CD69 waren, verzeichnet (Abb. 25 Bild D). Die einzige signifikante Änderung war in der Gesamtmenge des B7-H1 Moleküls zu sehen. IFN α und die Kombinationstherapien führten zu einer deutlichen Steigerung der B7-H1 MFI Werte auf den T_{reg}. Die Gesamtmenge des CD69 Moleküls blieb hingegen unverändert (Abb. 25 Bild E und F).



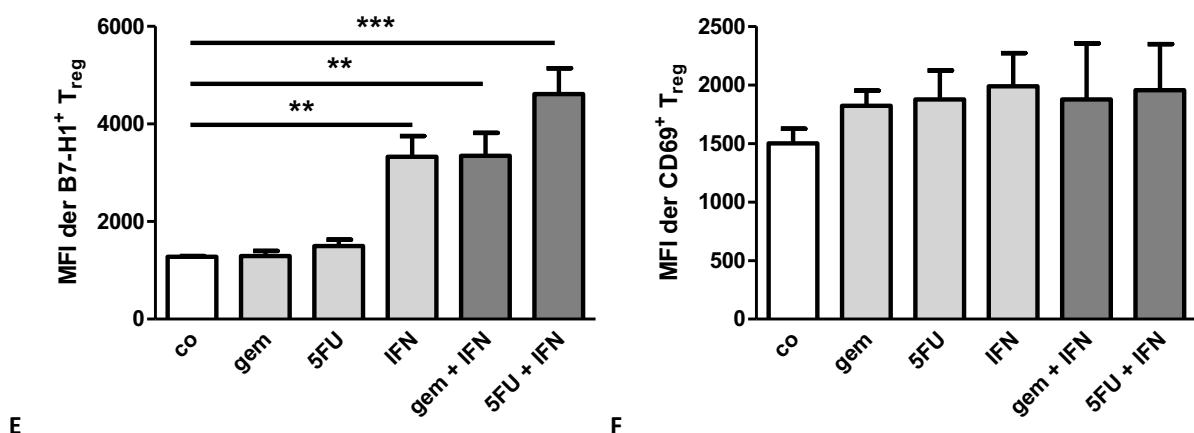


Abb. 25 Untersuchung der regulatorischen T-Zellen und deren B7-H1/CD69 Expression aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: prozentualer Anteil der T_{reg} aus CD4⁺ T-Zellen. B: prozentualer Anteil der B7-H1⁺ T_{reg}. C: prozentualer Anteil der CD69⁺ T_{reg}. D: prozentualer Anteil der B7-H1⁺ und CD69⁺ T_{reg}. E: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ T_{reg}. F: CD69 MFI der CD69⁺ T_{reg}. **p<0,01. *p<0,001.**

Zusammengefasst sind bei den T_{con} signifikante Veränderungen hinsichtlich der Expression des B7-H1 und des CD69 Moleküls sichtbar, die vor allem nach Zugabe von IFN α und dessen Kombinationstherapien ermittelt werden konnten. Bei den T_{reg} hingegen gibt es kaum Veränderungen, einzig die MFI Werte des exprimierten B7-H1 Moleküls ändern sich aufgrund von IFN α und den Kombinationstherapien.

3.2.2 Splenozyten tumortragender Mäuse

In einem weiteren Schritt wurde der Einfluss der verschiedenen Therapeutika auf die oben genannten Zellen im tumortragenden Organismus untersucht. Hierfür wurden C57/Bl-6 Mäuse vier Wochen nach dem chirurgischen Eingriff, in welchem Panc02-Zellen orthotop in das Pankreas injiziert wurden, tierschutzgerecht getötet und die Milzen steril entnommen. Die gewonnenen Splenozyten wurden auf die gleiche Art und Weise wie diejenigen der gesunden C57/Bl-6 Mäuse behandelt und kultiviert. Sie erhielten die identischen Therapien mit 5-FU, Gem, IFN α und den Kombinationstherapien und wurden einerseits auf dieselben Konstellationen der Immunzellen wie die gesunden Mäuse, andererseits auf die Expression des B7-H1 Moleküls hin untersucht. Die Experimente wurden in drei Durchläufen mit 8 männlichen C57/Bl-6 Mäusen durchgeführt.

3.2.2.1 CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Die CD4⁺ und die CD8⁺ T-Zellen wurden für die FACS-Analyse mit denselben Antikörpern gekoppelt wie die der gesunden Mäuse. Die Auswertungsstrategie zur Beurteilung der B7-H1

Expression auf den T-Zellen und deren Subpopulation ist in Abb. 8 dargestellt. Bei der Analyse wurde zusätzlich der CD45 Antikörper verwendet, mit dessen Hilfe es zunächst möglich war, Immunzellen ($CD45^+$) von Tumorzellen ($CD45^-$) zu unterscheiden (Abb. 26). Die restlichen Auswertungsschritte sind der Abb. 8 zu entnehmen.

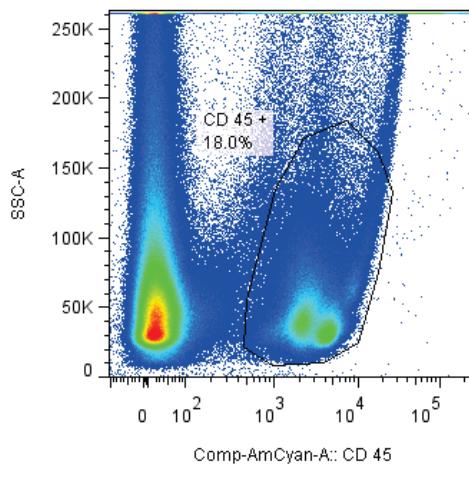
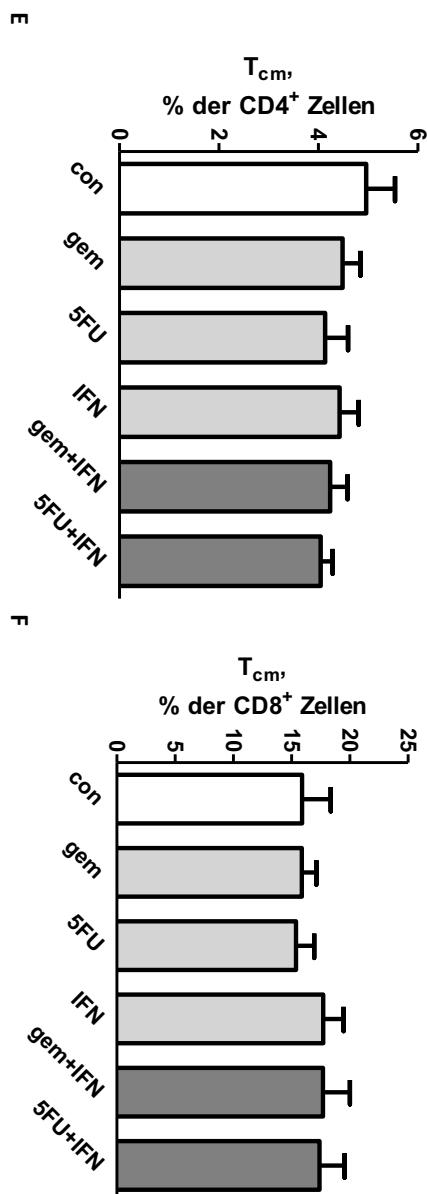
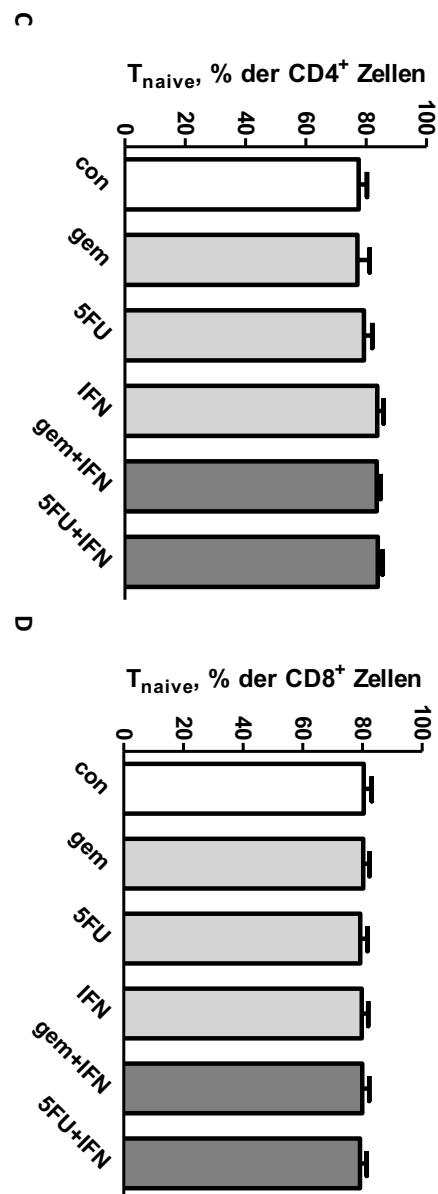
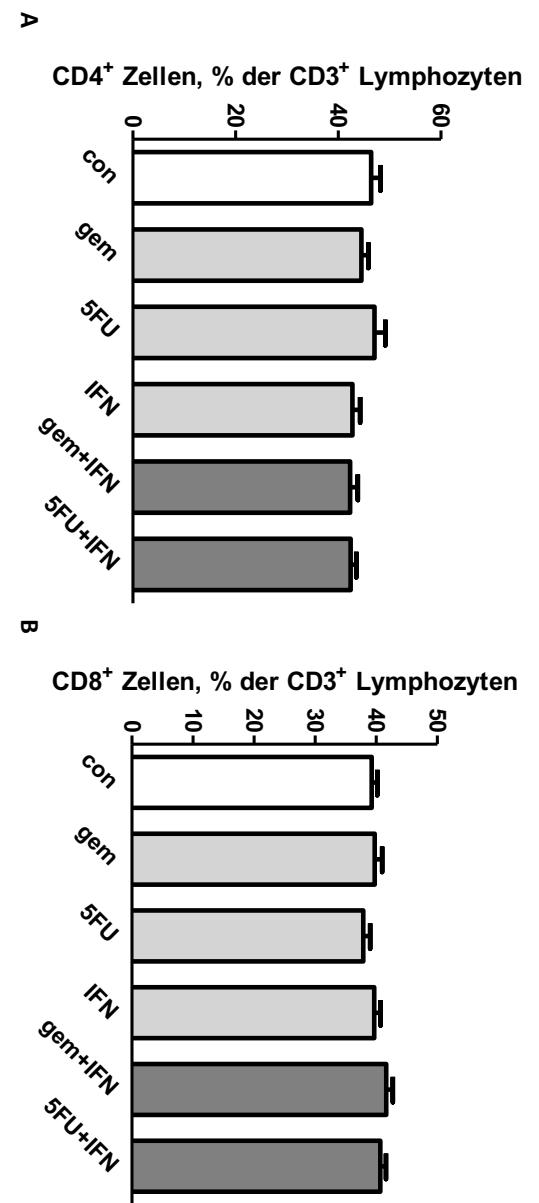
**A**

Abb. 26 Auswertungsstrategie zur Bestimmung der $CD45^+$ Zellen aus Splenozyten tumortragender C57/Bl-6 Mäuse. A: Anhand von CD45 konnten Immunzellen ($CD45^+$) von Tumorzellen ($CD45^-$) unterschieden werden.

Die therapierten $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen haben im Vergleich zur Kontrollgruppe nahezu denselben Anteil bezüglich der $CD3^+$ T-Zellfraktion eingenommen (Abb. 27 Bild A und B). Betrachten wir allerdings den prozentualen Anteil der Subpopulationen in Bezug auf die $CD4^+/\text{CD}8^+$ T-Zellen, so können wir Folgendes beobachten:

Bei der Betrachtung der T_{eff} waren signifikante Veränderungen festzustellen. Wir sehen bei den $CD4^+ T_{\text{eff}}$ eine signifikant geringere prozentuale Zellzahl, wenn sie mit IFN α oder den Kombinationstherapien behandelt wurden. Auch die $CD8^+ T_{\text{eff}}$ waren im Vergleich zu den Kontrollzellen prozentual weniger vorhanden unter dem Einfluss von IFN α und Gem+IFN α . Die prozentuale Zellzahl der T_{eff} hat hingegen deutlich unter der Therapie mit 5-FU zugenommen (Abb. 27 Bild I und J). Die T_{naive} wie auch die T_{cm} und die T_{em} veränderten sich hingegen in ihrem prozentualen Anteil aufgrund der verschiedenen Therapeutika nicht (Bild C-H).



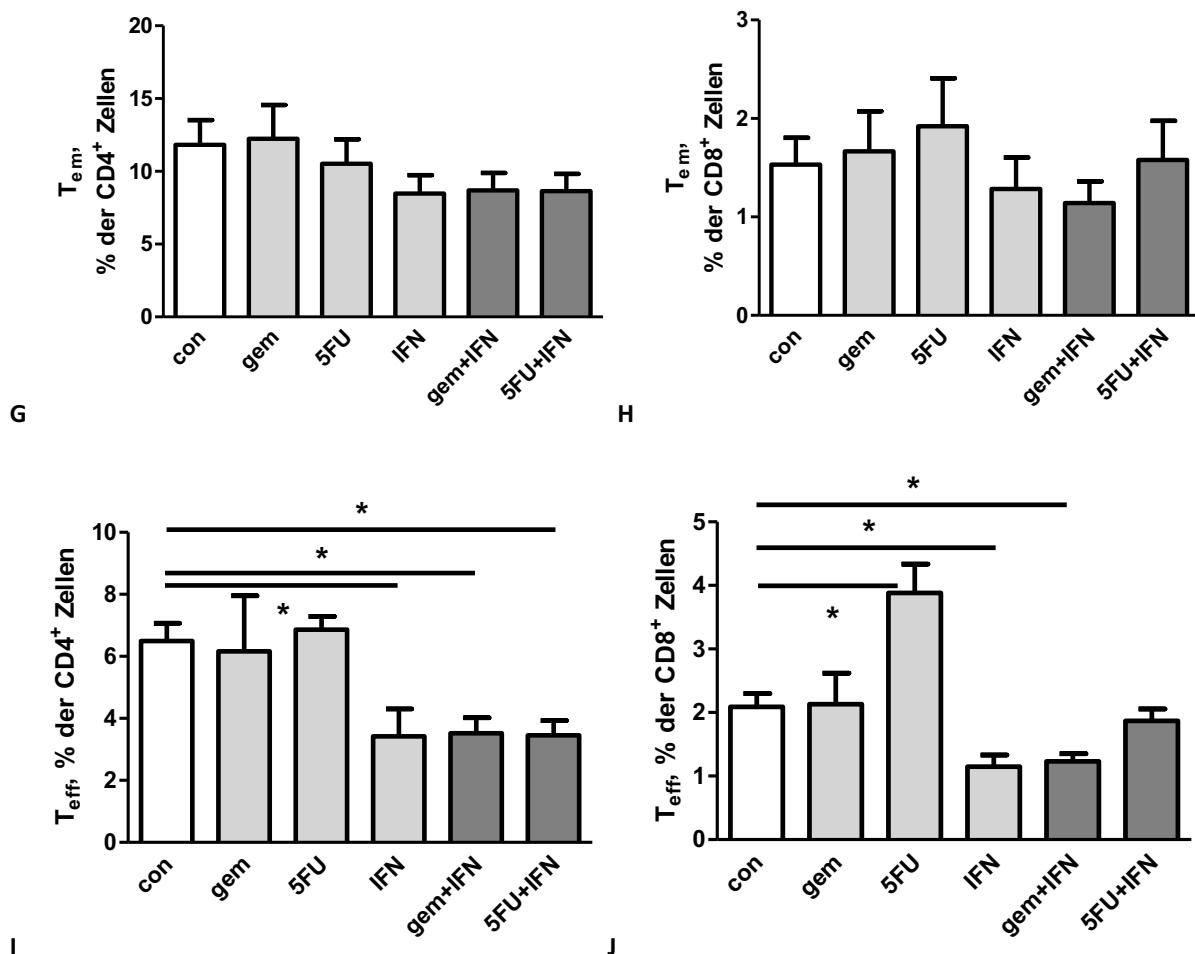


Abb. 27 Quantifizierung der CD4 $^{+}$ und CD8 $^{+}$ T-Zellen und deren Subpopulationen aus Splenozyten tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: prozentuale Anzahl CD4 $^{+}$ T-Zellen in Bezug auf CD3 $^{+}$ T-Zellen. **B:** prozentuale Anzahl CD8 $^{+}$ T-Zellen in Bezug auf CD3 $^{+}$ T-Zellen. **C:** prozentuale Anzahl T_{naive} in Bezug auf CD4 $^{+}$ T-Zellen. **D:** prozentuale Anzahl T_{naive} in Bezug auf CD8 $^{+}$ T-Zellen. **E:** prozentuale Anzahl T_{cm} in Bezug auf CD4 $^{+}$ T-Zellen. **F:** prozentuale Anzahl T_{cm} in Bezug auf CD8 $^{+}$ T-Zellen. **G:** prozentuale Anzahl T_{em} in Bezug auf CD4 $^{+}$ T-Zellen. **H:** prozentuale Anzahl T_{em} in Bezug auf CD8 $^{+}$ T-Zellen. **I:** prozentuale Anzahl T_{eff} in Bezug auf CD4 $^{+}$ T-Zellen. **J:** prozentuale Anzahl T_{eff} in Bezug auf CD8 $^{+}$ T-Zellen. *p<0,05.

Für die CD4 $^{+}$ T-Zellen und deren Subpopulationen waren weiterhin signifikante Unterschiede in der Expression des B7-H1 Moleküls je nach verwendeter Therapie zu verzeichnen. Wenn wir die Zellen mit IFN α und den Kombinationstherapeutika behandelt haben, stieg die Zahl der B7-H1 positiven Zellen sowohl bei den CD4 $^{+}$ T-Zellen allgemein als auch bei den T_{em} , T_{eff} und den T_{cm} der CD4 $^{+}$ T-Zellen an (Abb. 28 Bild A-D). Für die T_{cm} war zusätzlich ein signifikanter Anstieg der B7-H1 positiven Zellen unter der Verwendung von 5-FU sichtbar (Bild D). Bei den naiven T-Zellen (T_{naive}) konnten keine Änderungen im Vergleich zu den Kontrollzellen festgestellt werden (Abb. 28 Bild E).

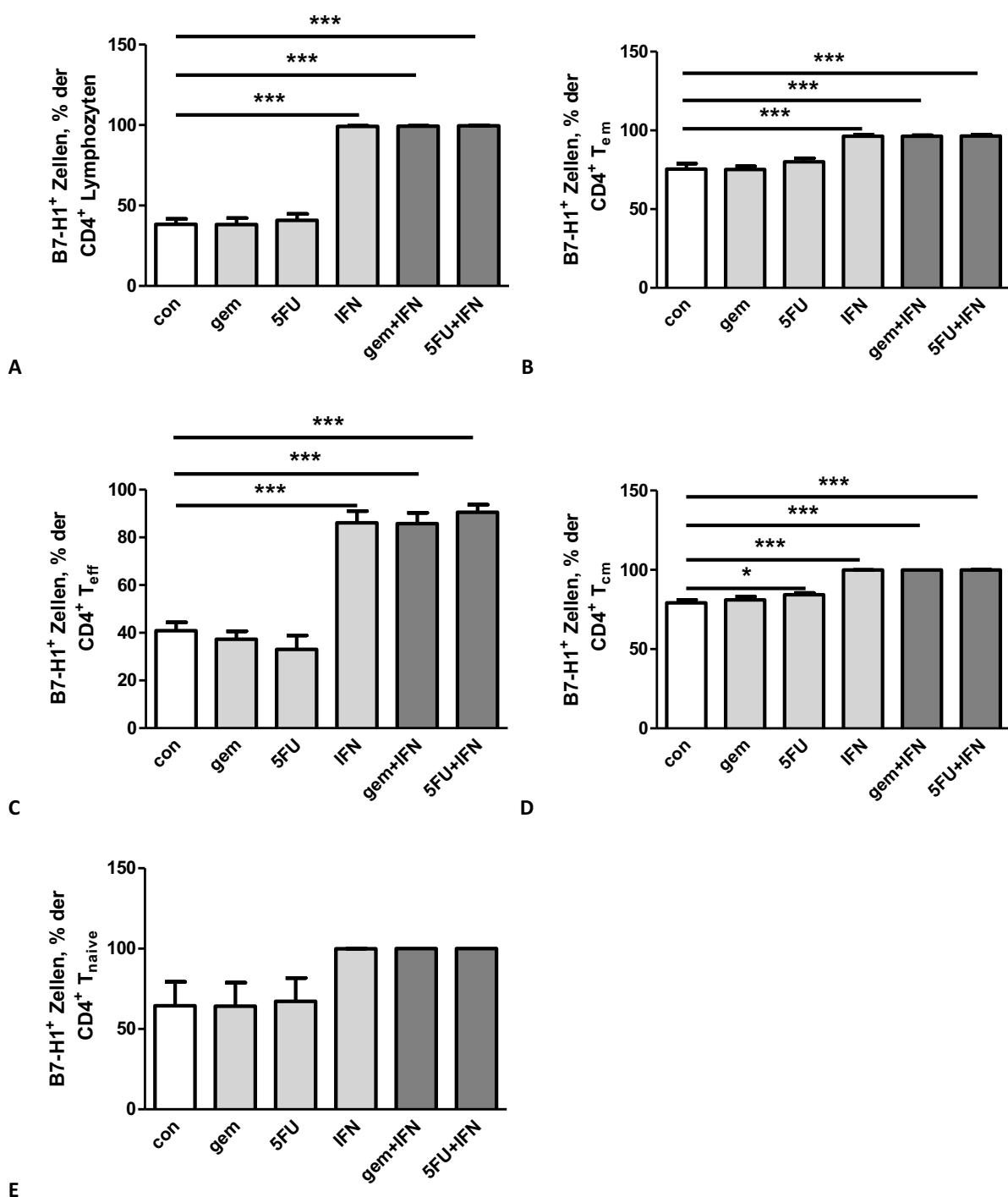


Abb. 28 Quantifizierung der B7-H1⁺ Zellen (CD4⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen) aus Splenozyten tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: Prozentzahl der B7-H1⁺ Zellen aus CD4⁺ T-Zellen. **B:** Prozentzahl der B7-H1⁺ Zellen aus CD4⁺ T_{em}. **C:** Prozentzahl der B7-H1⁺ Zellen aus CD4⁺ T_{eff}. **D:** Prozentzahl der B7-H1⁺ Zellen aus CD4⁺ T_{cm}. **E:** Prozentzahl der B7-H1⁺ Zellen aus CD4⁺ T_{naive}. *p<0,05 **p<0,01. ***p<0,001.

Bei den CD8⁺ T-Zellen und bei allen CD8⁺ Subpopulationen (T_{naive}, T_{eff}, T_{em} und T_{cm}) wurden einheitliche Veränderungen in der Expression des B7-H1 Moleküls festgestellt: Mit IFN α und den Kombinationstherapien stieg die Zahl derjenigen Zellen, die B7-H1 auf ihrer Oberfläche

tragen, signifikant an. Zellen, die mit 5-FU und Gem allein therapiert wurden, verhielten sich wie die Kontrollzellen (Abb. 29 Bild A-E).

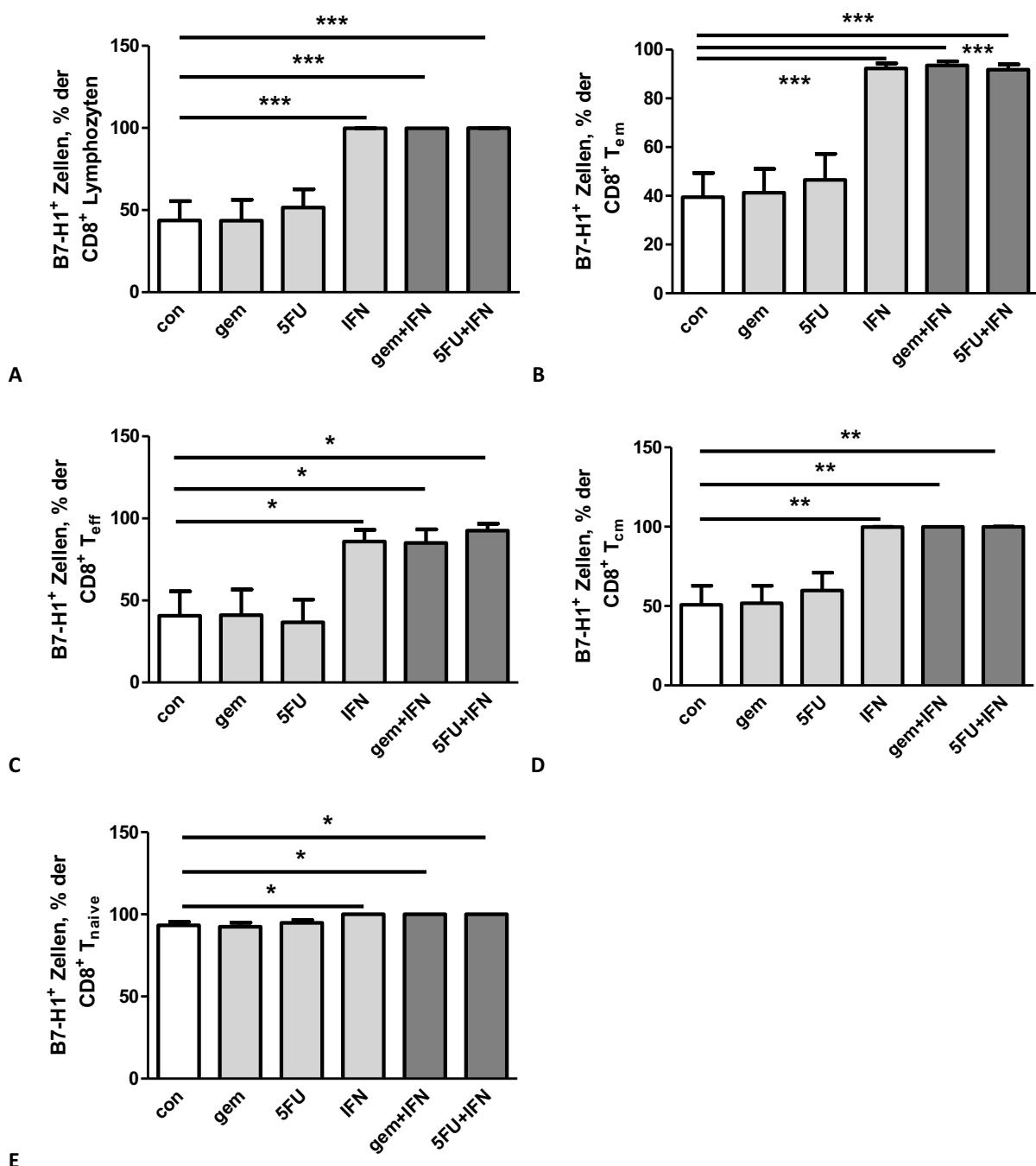


Abb. 29 Quantifizierung der B7-H1⁺ Zellen (CD8⁺ T-Zellen und deren Subpopulation) aus Splenozyten tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: Prozentzahl der B7-H1⁺ Zellen aus CD8⁺ T-Zellen. B: Prozentzahl der B7-H1⁺ Zellen aus CD8⁺ T_{em}. C: Prozentzahl der B7-H1⁺ Zellen aus CD8⁺ T_{eff}. D: Prozentzahl der B7-H1⁺ Zellen aus CD8⁺ T_{cm}. E: Prozentzahl der B7-H1⁺ Zellen aus CD8⁺ T_{naive}.
*p<0,05 **p<0,01. ***p<0,001.

Abschließend wurde die Veränderung der Gesamtmenge des exprimierten B7-H1 Moleküls auf den CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen und auf den Zellen der Subpopulationen anhand der B7-H1 MFI

Werte ermittelt. Alle genannten Zellen ($CD4^+$, $CD8^+$, Subpopulationen) exprimierten eine signifikant größere Menge an B7-H1 unter der Therapie mit IFN α und den Kombinationstherapeutika im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach der Behandlung mit 5-FU und Gem allein bewegte sich die Menge an B7-H1 im Bereich derjenigen der Kontrollgruppe (Abb. 30 und Abb. 31 Bild A-E).

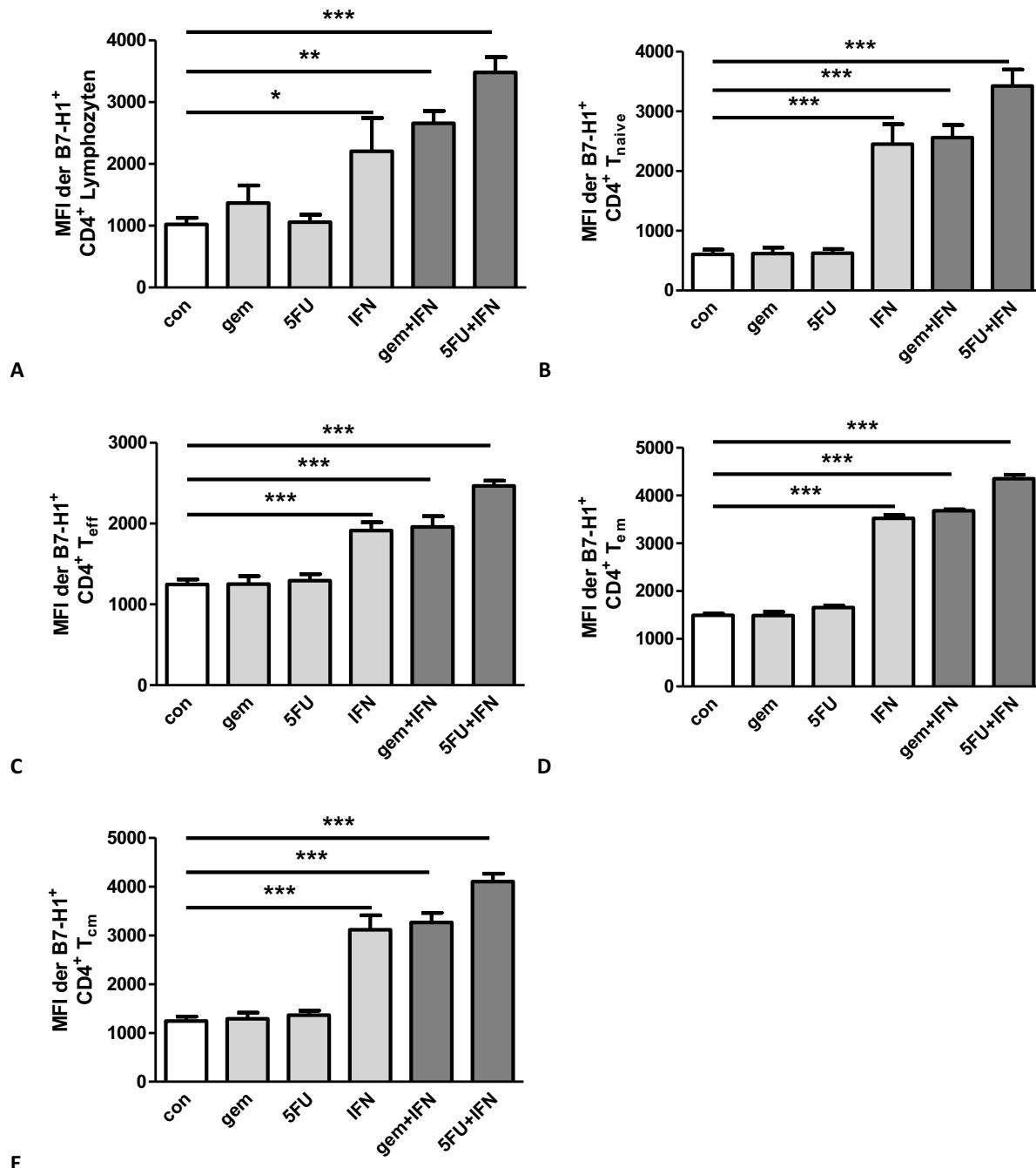


Abb. 30 MFI des B7-H1 Moleküls auf $CD4^+$ T-Zellen und deren Subpopulationen aus Splenozyten tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: B7-H1 MFI der $B7-H1^+ CD4^+ T$ -Zellen. B: B7-H1 MFI der $B7-H1^+ CD4^+ T_{naive}$. C: B7-H1 MFI der $B7-H1^+ CD4^+ T_{eff}$. D: B7-H1 MFI der $B7-H1^+ CD4^+ T_{em}$. E: B7-H1 MFI der $B7-H1^+ CD4^+ T_{cm}$. *p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001.

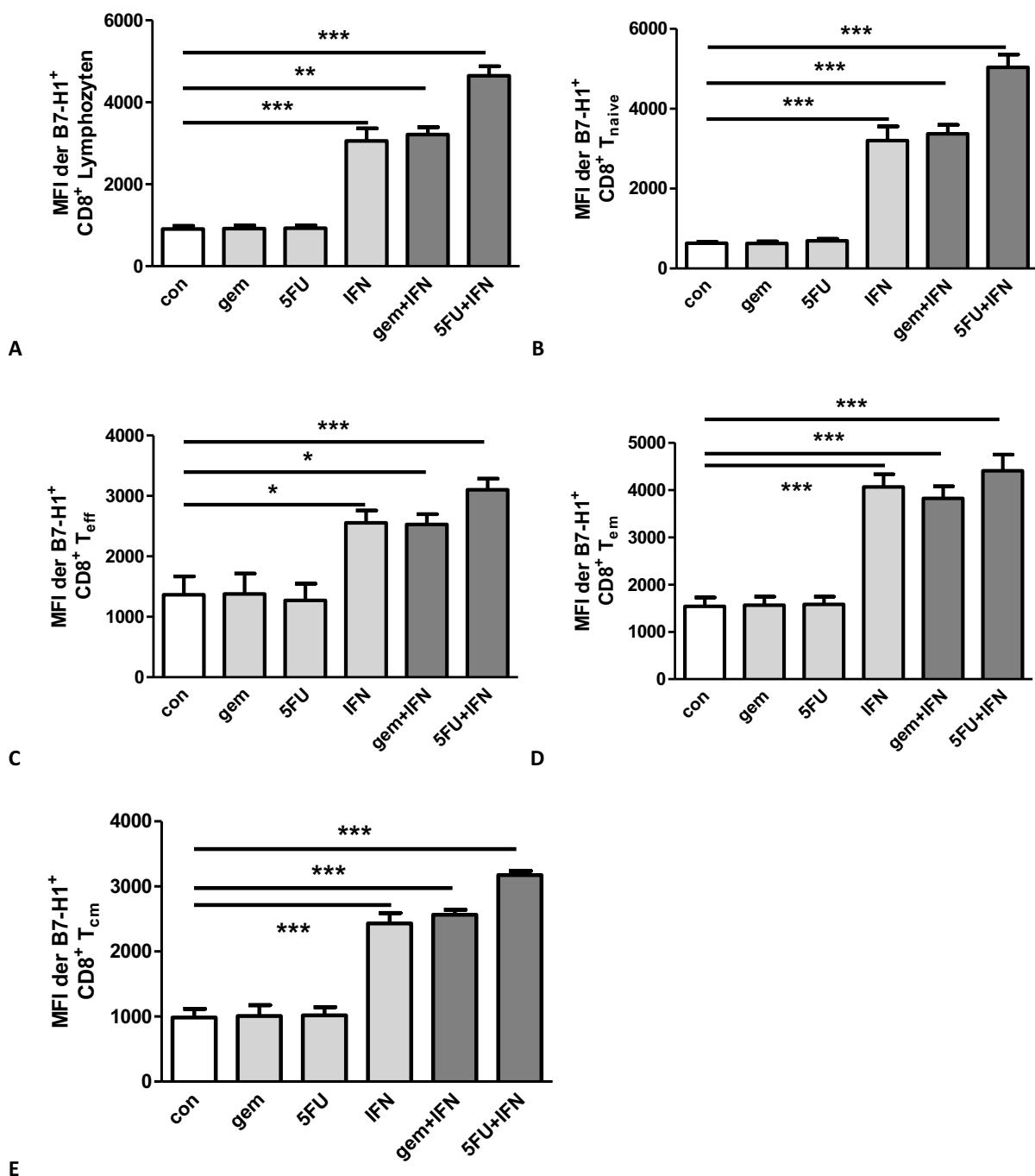


Abb. 31 MFI des B7-H1 Moleküls auf CD8⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen aus Splenozyten tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ CD8⁺ T-Zellen. B: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ CD8⁺ T_{naive}. C: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ CD8⁺ T_{eff}. D: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ CD8⁺ T_{em}. E: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ CD8⁺ T_{cm}. *p<0,05. **p<0,01. *p<0,001.**

Daraus können wir schließen, dass die CD4⁺ und die CD8⁺ T-Zellen, wie auch ihre Subpopulationen, ihren prozentualen Anteil bzw. die Expression des B7-H1 Moleküls, nachweislich erhöhen, wenn sie mit IFN α und den Kombinationstherapeutika behandelt wurden. Vereinzelt

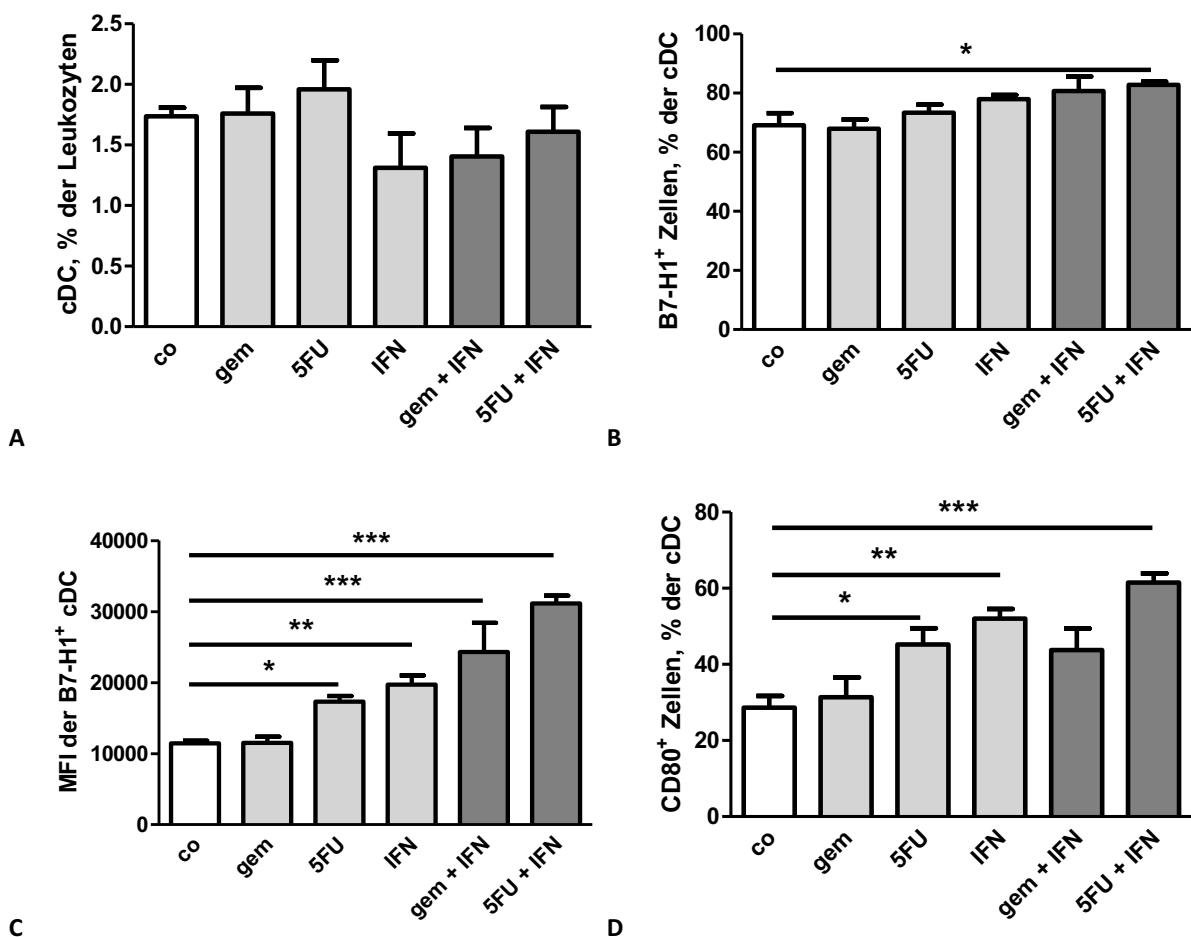
reagierten die Zellen auch auf die Behandlung mit 5-FU, das Chemotherapeutikum Gemcitabin hingegen führte zu keinen Veränderungen.

3.2.2.2 Dendritische Zellen (cDC und pDC)

Die dendritischen Zellen wurden, wie in der Abb. 14 ersichtlich, ausgewertet. Wir haben sie ebenfalls auf das Vorhandensein des regulatorischen Moleküls B7-H1 und der kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 untersucht.

3.2.2.2.1 Konventionelle DC

Der Anteil der cDC an der Leukozytenpopulation ist nach den verschiedenen *in vitro* Therapien im Vergleich zum Anteil der cDC der Kontrollzellen nahezu konstant geblieben. Die Zusage von 5-FU+IFN α bewirkte allerdings eine signifikante Zunahme derjenigen Zellen, die B7-H1 exprimierten (Abb. 32 Bild B). Betrachten wir weiterhin den MFI Wert des B7-H1 Moleküls, so vergrößerte sich dieser signifikant unter der Therapie mit 5-FU, IFN α , 5-FU+IFN α und Gem+IFN α (Abb. 32 Bild C). Das kostimulatorische Molekül CD80 wurde von mehr cDC Zellen produziert, wenn sie mit 5-FU, IFN α oder 5-FU+IFN α therapiert wurden. Die Gesamtmenge von CD80 ist aufgrund der Behandlung mit 5-FU, IFN α und den beiden Kombinationstherapien signifikant angestiegen (Abb. 32 Bild D und E). Auch das CD86 Oberflächenmolekül wurde anhand von IFN α , 5-FU+IFN α und Gem+IFN α vermehrt exprimiert. Betrachtet man allerdings nur die Prozentzahl der CD86 positiven cDC, waren keine Unterschiede zu den Kontrollzellen zu vernehmen (Abb. 32 Bild F und G).



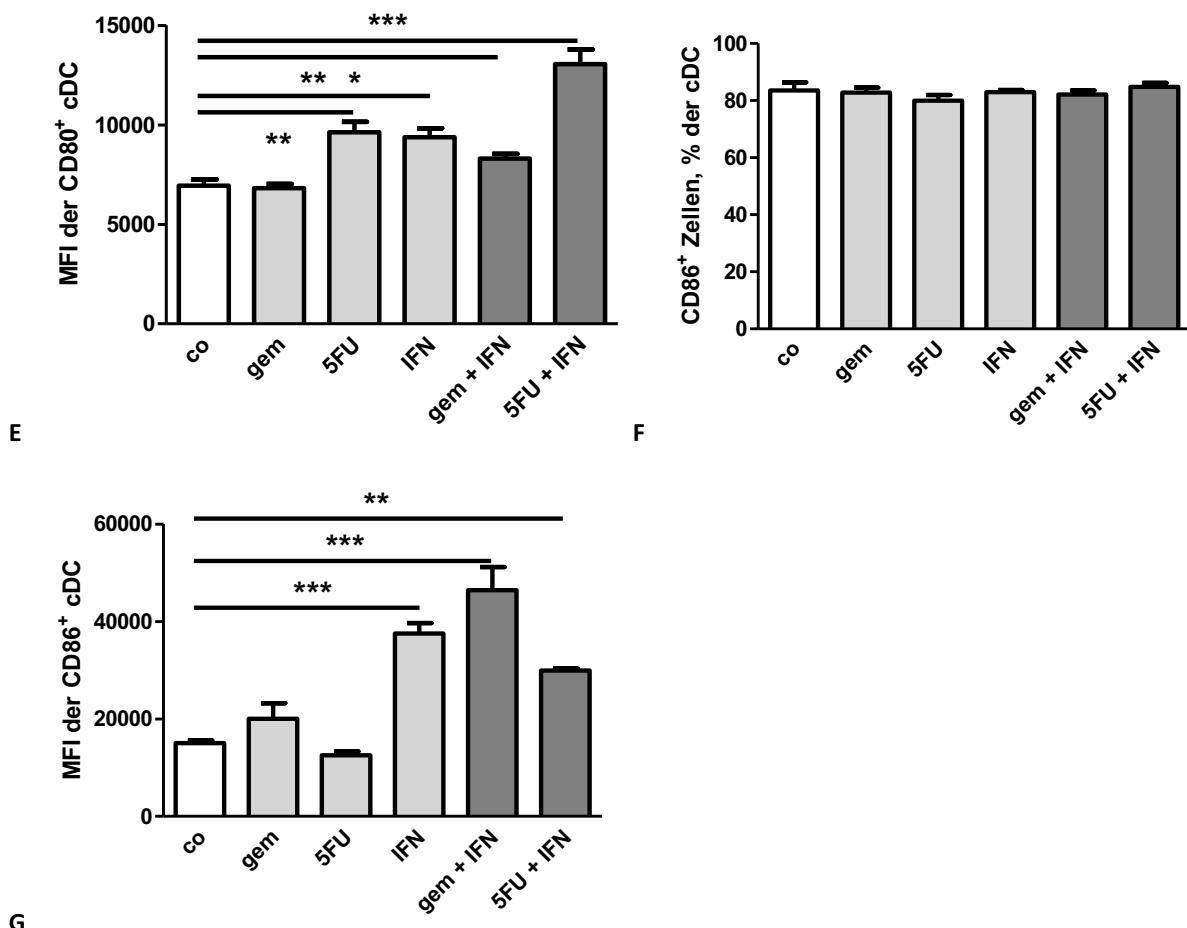
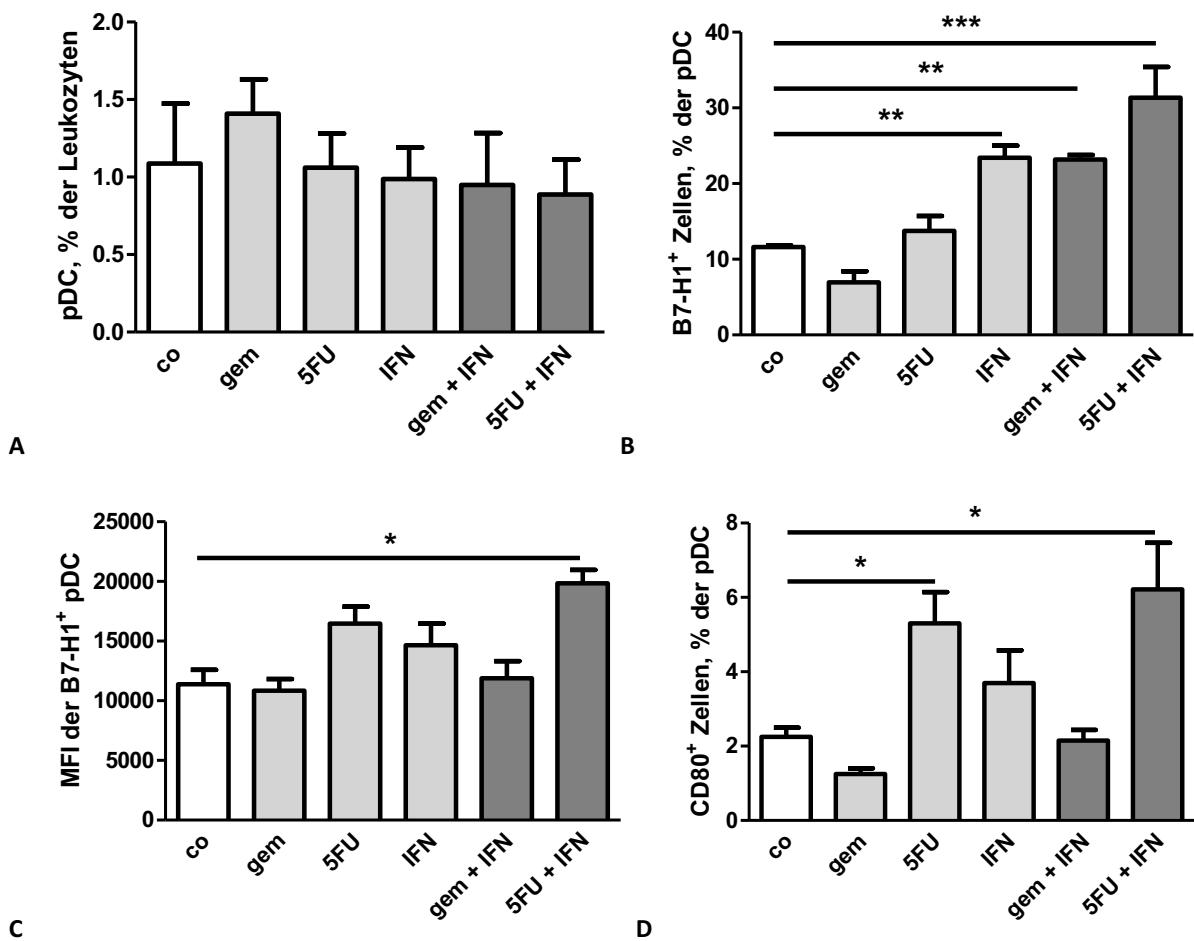


Abb. 32 Untersuchung der cDC und deren B7-H1/CD80/CD86 Expression aus Splenozyten tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien: A: Prozentzahl der cDC aus Leukozyten. B: Prozentzahl der B7-H1⁺ cDC. C: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ cDC. D: Prozentzahl der CD80⁺ cDC. E: CD80 MFI der CD80⁺ cDC. F: Prozentzahl der CD86⁺ cDC. G: CD86 MFI der CD86⁺ cDC. *p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001.

3.2.2.2 Plasmazytoide DC

Mit keiner der verwendeten Therapien konnte eine Ab- oder Zunahme des prozentualen Anteils der pDC in Bezug auf die Leukozyten im Vergleich zu den Kontrollzellen gesehen werden. Allerdings stieg die Zahl der B7-H1 positiven pDC nach der Zugabe von IFN α und den beiden Kombinationstherapien signifikant an. Der B7-H1 MFI Wert der B7-H1⁺ pDC Zellen erhöhte sich hingegen nur nach der Therapie mit 5-FU+IFN α (Abb. 33 Bild B und C). Das bedeutet, dass die Zellen durch die Zugabe von 5-FU+IFN α insgesamt mehr B7-H1 exprimierten. Bei den beiden kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 haben wir signifikant mehr Zellen gesehen, die positiv für CD80 waren, wenn sie mit 5-FU und 5-FU+IFN α kultiviert wurden. Die MFI Werte des CD80 Moleküls und somit die Gesamtmenge von CD80 zeigten keine Unterschiede im Vergleich zum MFI Wert der Kontrollgruppe. Für das CD86 Molekül waren keinerlei Differenzen nachzuweisen (Abb. 33 Bild D-G).



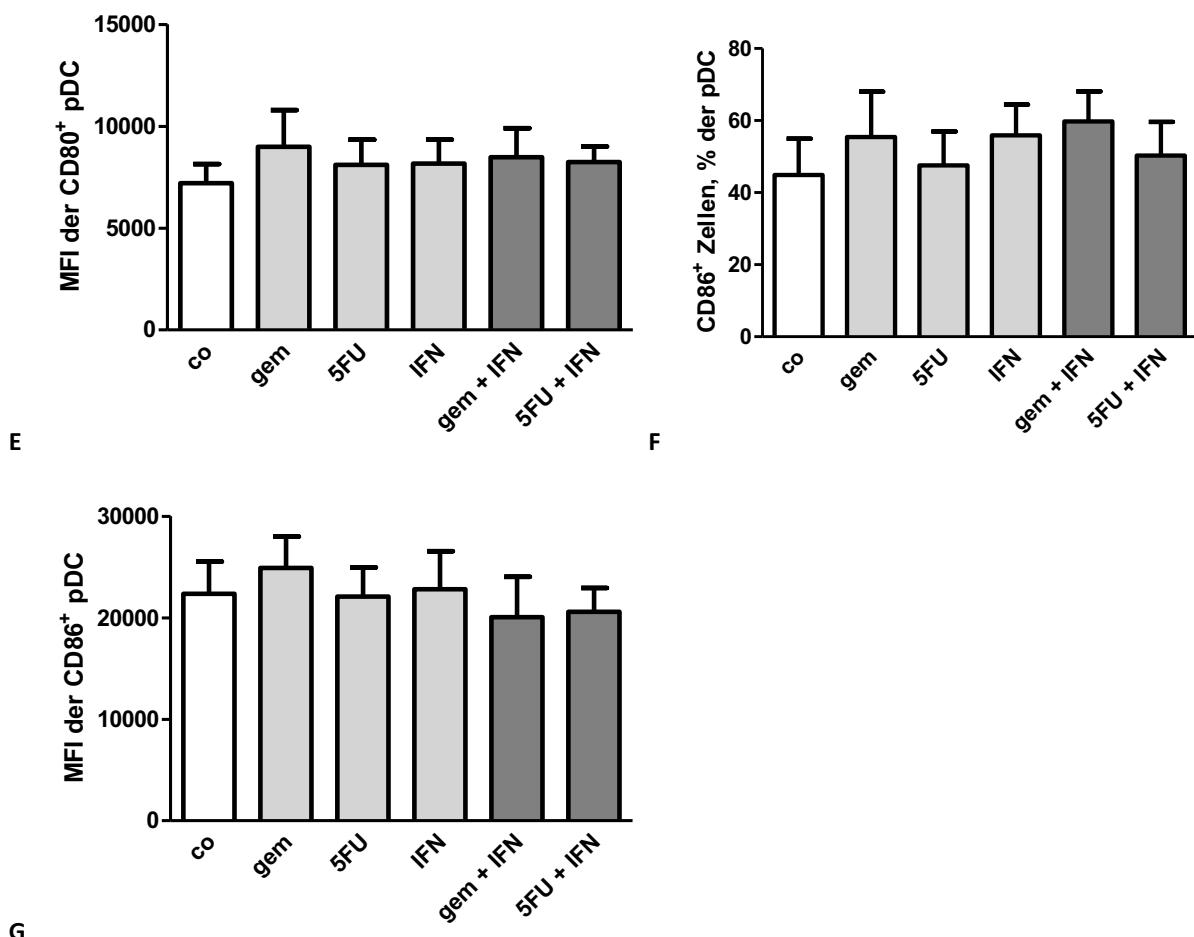


Abb. 33 Untersuchung der pDC und deren B7-H1/CD80/CD86 Expression aus Splenozyten tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien: A: prozentualer Anteil der pDC aus Leukozyten. B: prozentualer Anteil der B7-H1⁺ pDC. C: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ pDC. D: prozentualer Anteil der CD80⁺ pDC. E: CD80 MFI der CD80⁺ pDC. F: prozentualer Anteil der CD86⁺ pDC. G: CD86 MFI der CD86⁺ pDC. *p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001.

Die dendritischen Zellen reagierten auf die zugefügten Therapeutika in unterschiedlicher Weise. Während die cDC das Expressionsmuster für alle drei untersuchten Moleküle (B7-H1, CD80, CD86) aufgrund von 5-FU, IFN α , 5-FU+IFN α und Gem+IFN α veränderten, hat man bei den pDC zumindest bei den kostimulatorischen Molekülen nur wenige Effekte gesehen. Veränderungen der B7-H1 Expression gab es bei den pDC vor allem dann, wenn sie mit IFN α oder den Kombinationen kultiviert wurden.

3.2.2.3 Makrophagen

Die Auswertungsstrategie der Makrophagen ist in Abb. 18 dargestellt. In diesem Experiment wurde besonders die Expression des regulatorischen B7-H1 Moleküls auf den Makrophagen genauer untersucht. Die Makrophagen haben unabhängig der verschiedenen *in vitro* Therapien im Vergleich zur Kontrollgruppe denselben Anteil der Leukozytenpopulation einge-

nommen (Abb. 34 Bild A). Die B7-H1 positiven Makrophagen waren nach der Behandlung mit 5-FU+IFN α im Vergleich zu den Kontrollzellen in signifikant höherer Konzentration vorhanden (Abb. 34 Bild B). Die MFI Werte des regulatorischen Moleküls B7-H1 erhöhten sich signifikant bei denjenigen Zellen, die mit 5-FU, IFN α und den beiden Kombinationstherapeutika kultiviert wurden. Für 5-FU+IFN α war eine höchst signifikante Mengenzunahme zu sehen (Abb. 34 Bild C).

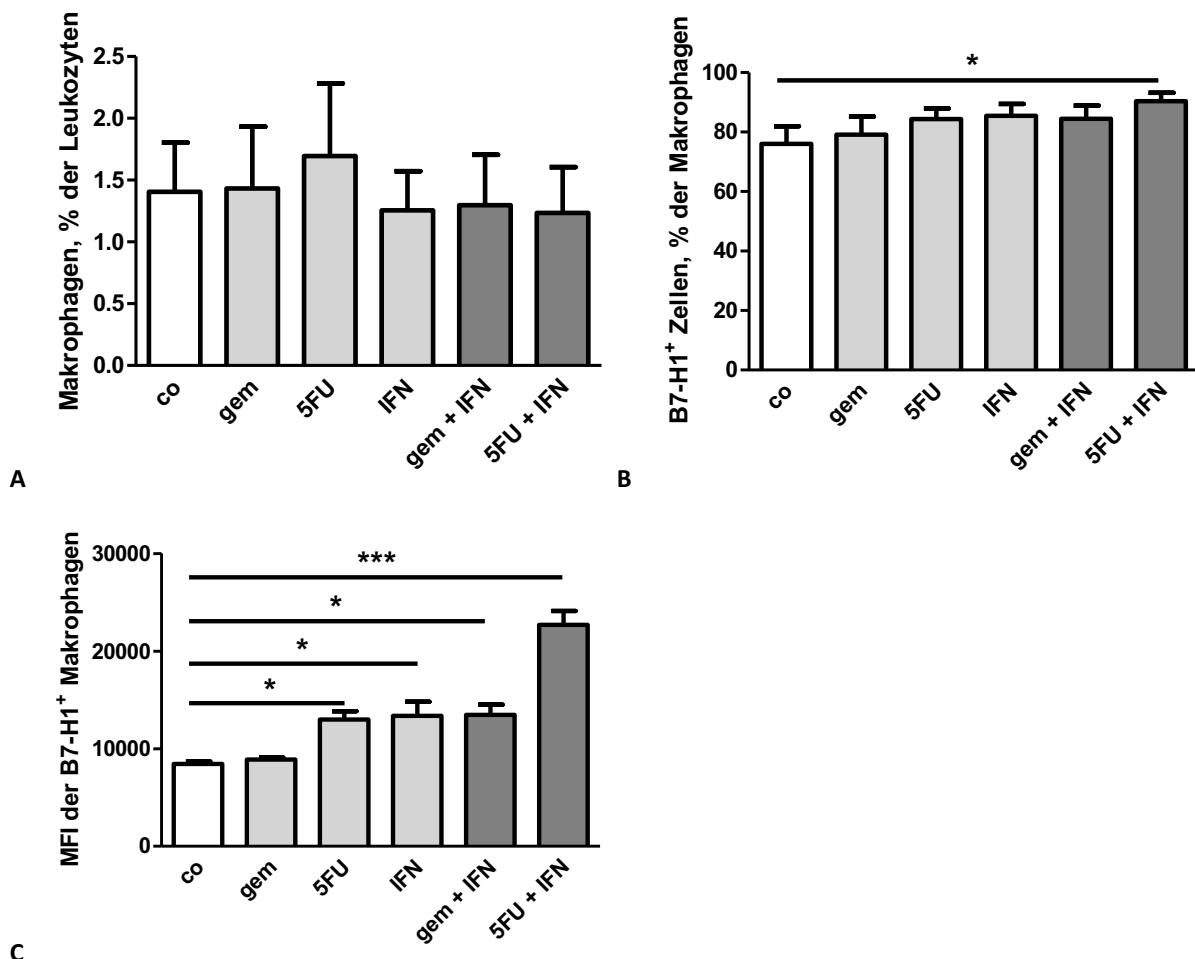


Abb. 34 Untersuchung der Makrophagen und deren B7-H1 Expression aus Splenozyten tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: Prozentzahl der Makrophagen aus Leukozyten. B: Prozentzahl B7-H1 $^{+}$ Makrophagen. C: B7-H1 MFI der B7-H1 $^{+}$ Makrophagen. *p<0,05. ***p<0,001.

Zusammenfassend bewirkte die Kombination aus 5-FU+IFN α bei den Makrophagen eine eindeutige Steigerung der B7-H1 Expression. Auch 5-FU alleine, IFN α und die Kombination aus Gem+IFN α waren in der Lage, die Expression des Moleküls auf den Makrophagen positiv zu verstärken.

3.2.2.4 Myeloid-derived suppressor cells (MDSC)

Wie bei den gesunden Mäusen wurden auch bei den tumortragenden Mäusen die MDSC und deren Subpopulationen (granulozytäre und monozytäre MDSC) genauer untersucht. Wie die Zellen ausgewertet wurden, ist in Abb. 20 dargestellt.

Der prozentuale Anteil der MDSC in Bezug auf die Leukozyten blieb im Vergleich zu demjenigen der Kontrollzellen weitestgehend unverändert (Abb. 35 Bild A). 5-FU, IFN α und die beiden Kombinationstherapien bewirkten, dass die Zahl der B7-H1 positiven MDSC signifikant angestiegen ist (Abb. 35 Bild B). Wichtig war auch hier die Beurteilung der Veränderung der exprimierten Gesamtmenge des regulatorischen Moleküls B7-H1 (MFI). Zellen, die mit 5-FU und 5-FU+IFN α therapiert wurden, haben weitaus mehr B7-H1 auf ihrer Zelloberfläche exprimiert (Abb. 35 Bild C).

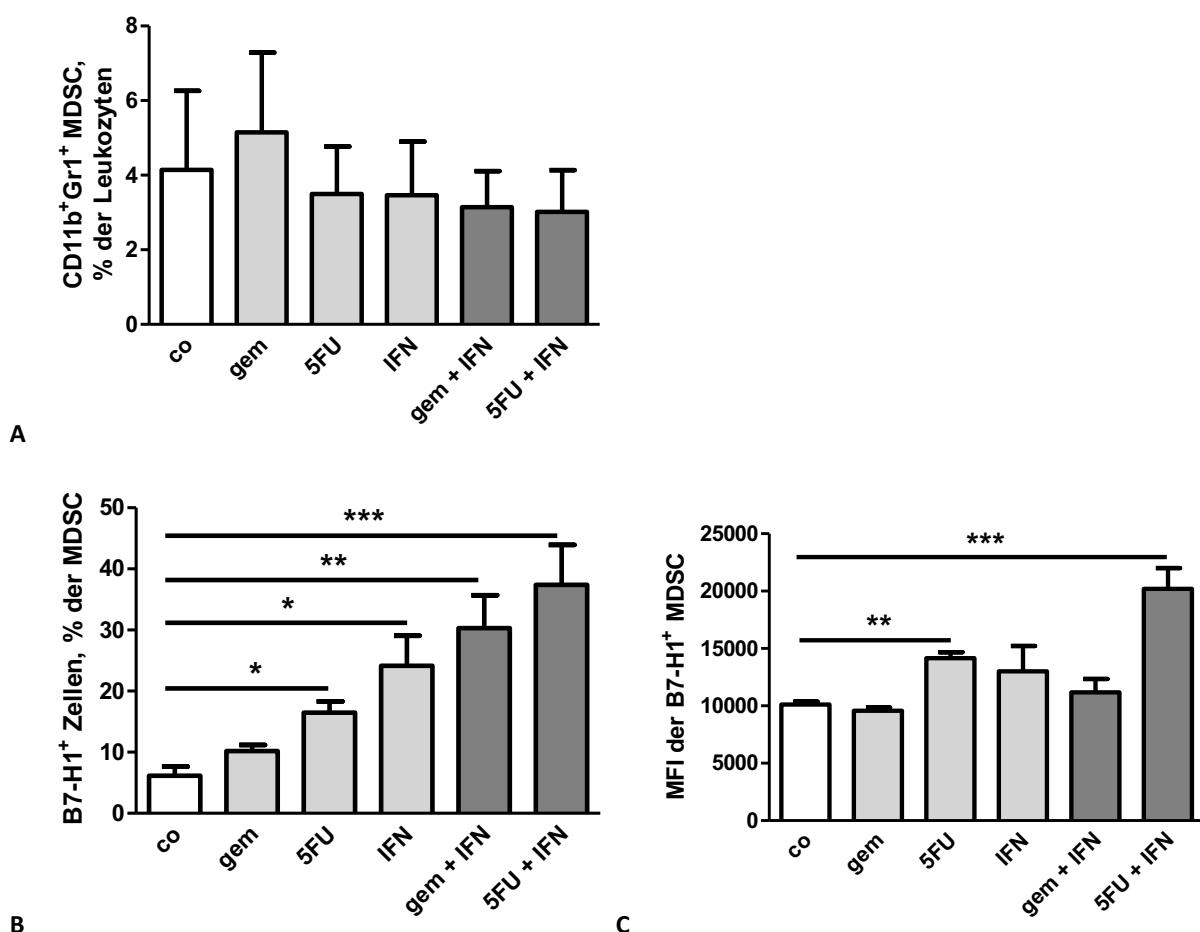
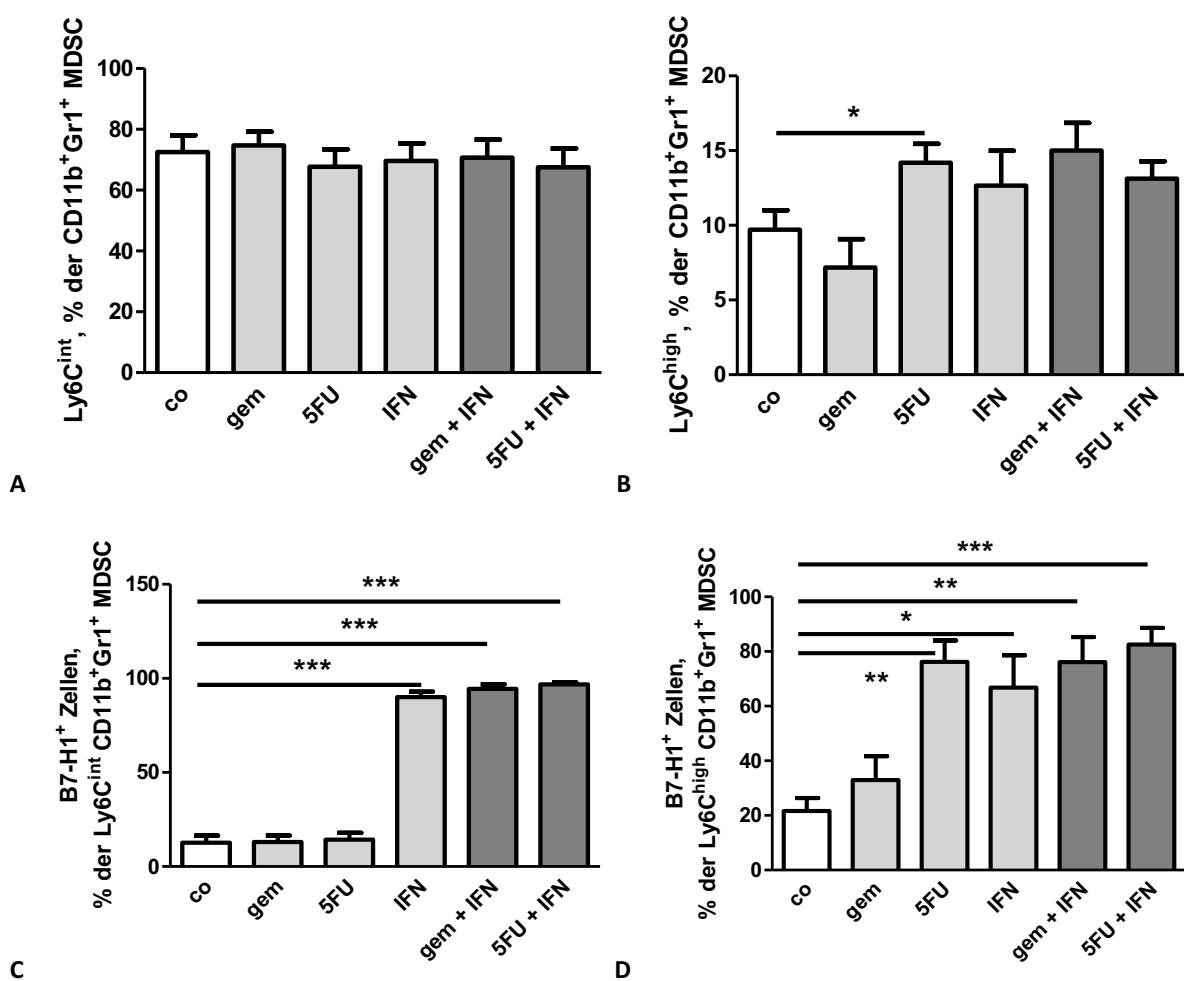


Abb. 35 Untersuchung der MDSC und deren B7-H1 Expression aus Splenozyten tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: prozentualer Anteil der MDSC aus Leukozyten. **B:** prozentualer Anteil B7-H1⁺ MDSC. **C:** B7-H1 MFI der B7-H1⁺ MDSC. *p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001.

3.2.2.4.1 Granulozytäre/monozytäre MDSC

Die granulozytären MDSC stellen eine Subpopulation der gesamten MDSC dar. Der Anteil, den sie an der Gesamtanzahl der MDSC einnehmen, veränderte sich aufgrund der unterschiedlichen Behandlungsmethoden der Zellen nicht (Abb. 36 Bild A). Die zweite Subpopulation der MDSC sind die monozytären MDSC. Hier stieg der prozentuale Anteil der Zellpopulation in Bezug auf die MDSC im Allgemeinen unter der Therapie mit 5-FU an (Abb. 36 Bild B). Mit IFN α und den Kombinationstherapien ist die Zahl der B7-H1 positiven granulozytären MDSC hoch signifikant angestiegen. Dies trifft auch auf die monozytären MDSC zu, wobei wir hier einen zusätzlichen Anstieg der B7-H1 positiven Zellen nach der Behandlung mit 5-FU sehen konnten (Abb. 36 Bild C und D). Für beide Subpopulationen hat sich die Gesamtmenge des regulatorischen Moleküls erhöht, nachdem die Zellen mit IFN α oder den Kombinationstherapien kultiviert wurden (Abb. 36 Bild E und F).



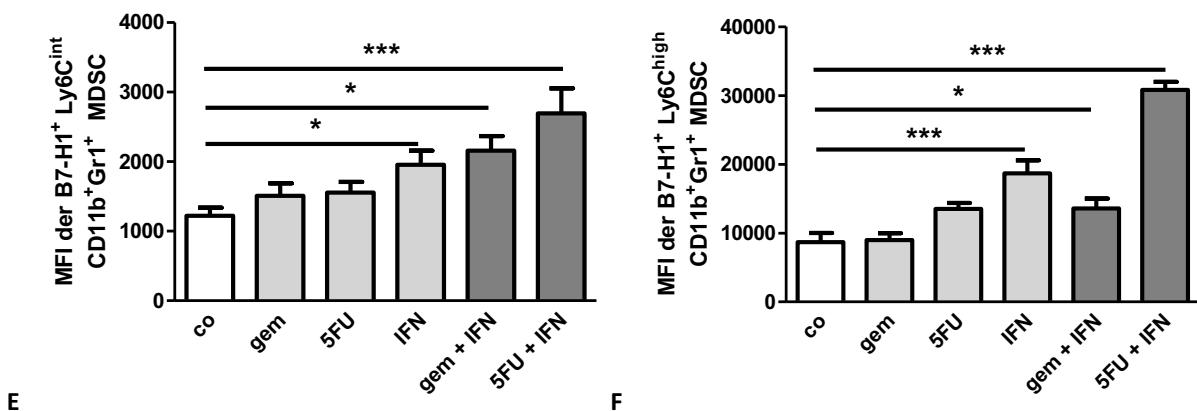


Abb. 36 Quantifizierung der granulozytären und monozytären MDSC und deren B7-H1 Expression aus Splenozyten tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: prozentualer Anteil der granulozytären (Ly6C^{int}) MDSC aus CD11b⁺ Gr-1⁺ MDSC. B: prozentualer Anteil der monozytären (Ly6C^{high}) MDSC aus CD11b⁺ Gr-1⁺ MDSC. C: prozentualer Anteil B7-H1⁺ Ly6C^{int} MDSC. D: prozentualer Anteil B7-H1⁺ Ly6C^{high} MDSC E: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ Ly6C^{int} MDSC. F: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ Ly6C^{high} MDSC.

*p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001.

Vor allem die *in vitro* Behandlungen mit IFN α und den Kombinationstherapien führten zu einem deutlichen Anstieg der Expression des B7-H1 Moleküls auf den MDSC und den beiden Subpopulationen.

3.2.2.5 Konventionelle und regulatorische T-Zellen

Die Auswertung der T_{con} und der T_{reg} ist in Abb. 23 dargestellt. Die T_{con} und die T_{reg} der tumortragenden C57/Bl-6 Mäuse wurden sowohl auf ihren Aktivierungsstatus (gemessen anhand des CD69 Markers) als auch auf die Expression des B7-H1 Moleküls untersucht.

3.2.2.5.1 Konventionelle T-Zellen

Der prozentuale Anteil der T_{con} in Bezug auf alle CD4⁺ T-Zellen blieb konstant. Allerdings erhöhte sich die prozentuale Zellzahl der B7-H1 positiven T_{con} signifikant, nachdem diese mit IFN α oder den Kombinationstherapeutika kultiviert wurden (Abb. 37 Bild B). Im Hinblick auf die Veränderung der Gesamtmenge des regulatorischen Moleküls B7-H1, gemessen anhand des B7-H1 MFI, war diese ebenfalls mit IFN α alleine und den Kombinationstherapien signifikant erhöht (Abb. 37 Bild C). Keine Veränderungen wurden in der prozentualen Zellzahl der CD69⁺ T_{con} beobachtet. Wir sehen hingegen, dass die MFI Werte des CD69 Moleküls bei den Kontrollzellen, im Vergleich zu den Zellen, die mit IFN α therapiert wurden, signifikant größer waren (Abb. 37 Bild E). Zuletzt ist ersichtlich, dass die prozentuale Zahl der T_{con}, die sowohl B7-H1⁺ als auch CD69⁺ waren, unter der Therapie mit IFN α und den Kombinationstherapien deutlich angestiegen ist (Abb. 37 Bild F).

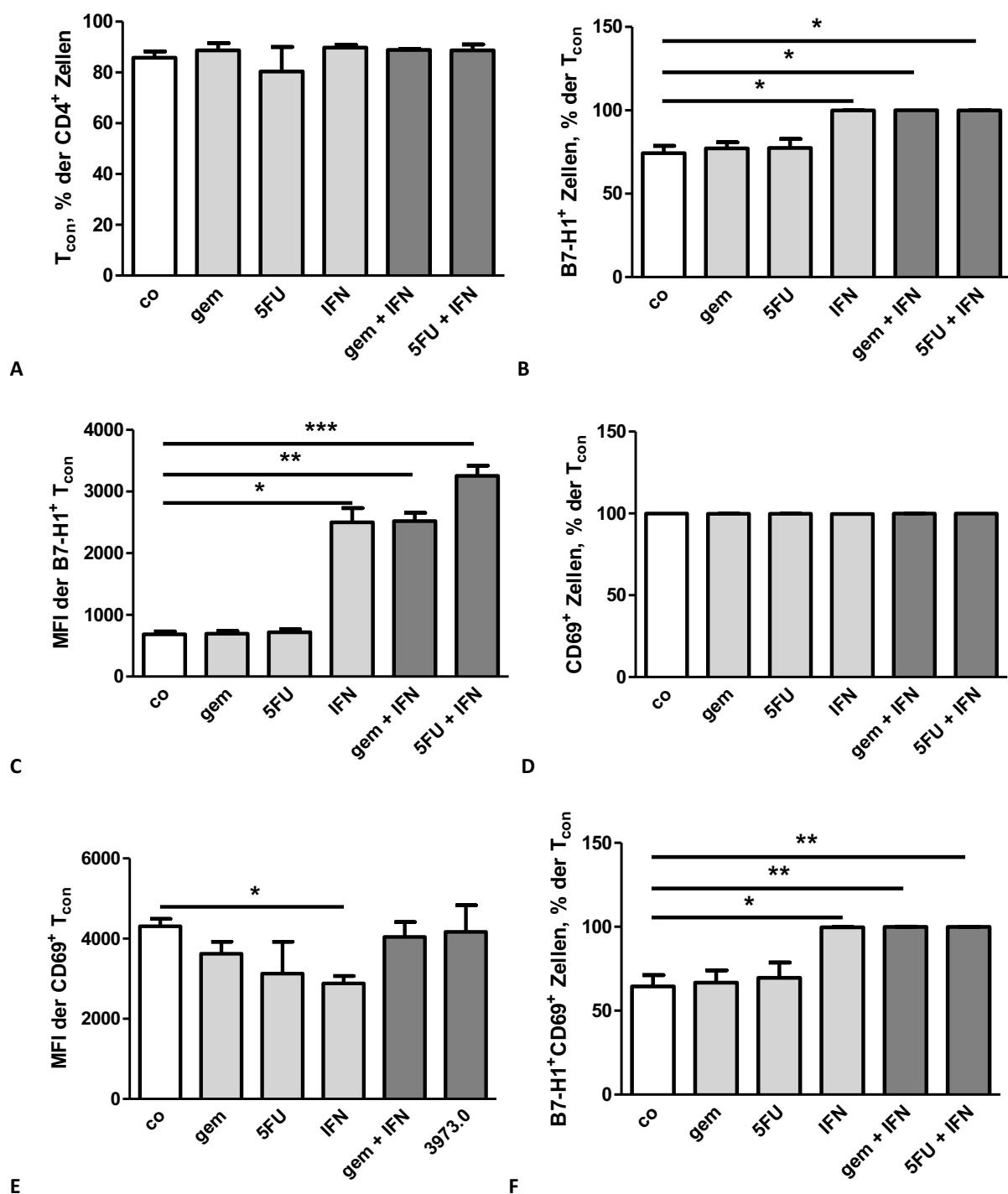


Abb. 37 Untersuchung der konventionellen T-Zellen und deren B7-H1/CD69 Expression aus Splenozyten tu-mortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: prozentualer Anteil der T_{con} aus CD4⁺ T-Zellen. B: prozentualer Anteil B7-H1⁺ T_{con}. C: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ T_{con}. D: prozentualer Anteil CD69⁺ T_{con}. E: CD69 MFI der CD69⁺ T_{con}. F: prozentualer Anteil B7-H1⁺ und CD69⁺ T_{con}. *p<0,05. **p<0,01. *p<0,001.**

3.2.2.5.2 Regulatorische T-Zellen

Betrachtet man den prozentualen Anteil der T_{reg} an den CD4 $^{+}$ T-Zellen, so konnten keine Unterschiede zwischen den therapierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet werden (Abb. 38 Bild A). Die Ergebnisse für das regulatorische Moleköl B7-H1 waren vergleichbar mit denjenigen der T_{con} . Signifikant höhere Werte waren sowohl für die B7-H1 positive Zellzahl als auch für die B7-H1 MFI Werte des Moleküls nach der Therapie mit IFN α und den Kombinationstherapien festzustellen (Abb. 38 Bild B und C). Keine Abweichungen haben wir im Hinblick auf die Anzahl der CD69 $^{+}$ Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen können. Zellen, die mit IFN α kultiviert wurden, haben im Vergleich zu den Kontrollzellen insgesamt weniger CD69 Moleküle (MFI) exprimiert (Abb. 38 Bild E). T_{reg} , die B7-H1 und CD69 auf ihrer Oberfläche exprimierten, kamen in weitaus höherer Zellzahl vor, nachdem sie mit IFN α , 5-FU+IFN α und Gem+IFN α kultiviert wurden (Abb. 38 Bild F).

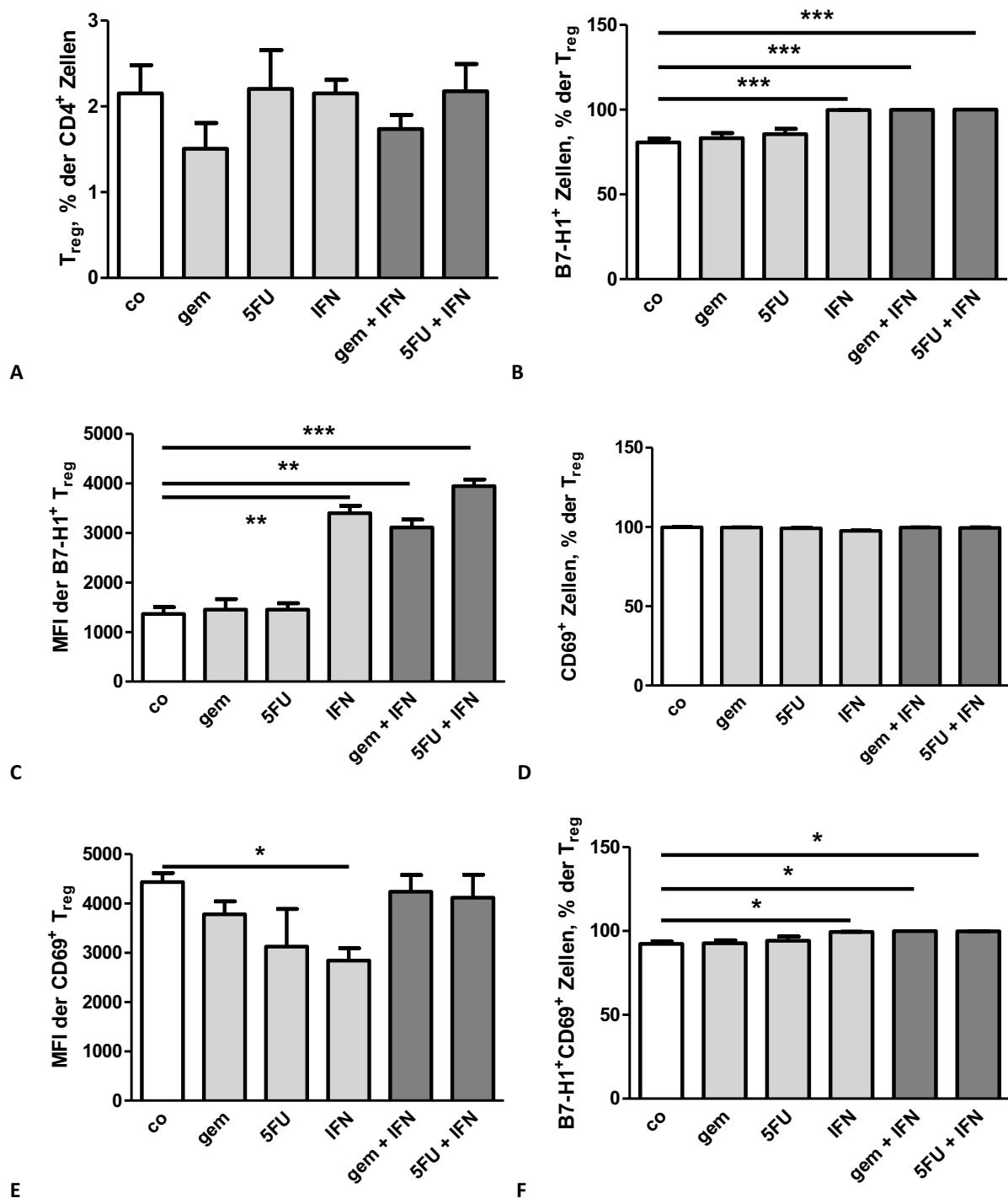


Abb. 38 Untersuchung der regulatorischen T-Zellen und deren B7-H1/CD69 Expression aus Splenozyten tu-mortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: Prozentzahl der T_{reg} aus CD4⁺ T-Zellen. **B:** Prozentzahl B7-H1⁺ T_{reg}. **C:** B7-H1 MFI der B7-H1⁺ T_{reg}. **D:** Prozentzahl CD69⁺ T_{reg}. **E:** CD69 MFI der CD69⁺ T_{reg}. **F:** Prozentzahl B7-H1⁺ und CD69⁺ T_{reg}. *p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001.

Zusammengefasst konnten wir sehen, dass deutlich mehr T_{con} und T_{reg} Zellen durch die Zugeabe von IFN α und den Kombinationstherapeutika B7-H1 Moleküle exprimieren und sich die

Gesamtmenge von B7-H1 ebenfalls erhöhte. Das CD69 Moleköl wurde im Vergleich zu den Kontrollzellen mit der Zugabe von IFN α insgesamt weniger häufig exprimiert.

3.2.3 Der Vergleich zwischen Splenozyten aus gesunden und aus tumortragenden Mäusen

Zuletzt wurden die oben beschriebenen Immunzellen aus den Milzen der gesunden und der tumortragenden Mäuse vergleichsweise beurteilt. Zum einen haben wir die jeweiligen Kontrollgruppen (gesund/tumortragend → ohne Therapie) miteinander verglichen, um zu sehen, ob und wie sich die Konstellation der Immunzellen und die Expression bestimmter Moleküle aufgrund der neoplastischen Vorgänge verändert. Zum anderen haben wir die verschiedenen Therapien nebeneinander gestellt, um auch hier Unterschiede oder Übereinstimmungen feststellen zu können.

3.2.4 Vergleich der CD4 $^{+}$ T-Zellen und deren Subpopulationen

Wir haben den prozentualen Anteil der CD4 $^{+}$ T-Zellen bezüglich der CD3 $^{+}$ Lymphozyten miteinander verglichen und konnten keine Unterschiede zwischen „gesund und tumortragend“ feststellen. Allerdings exprimierten CD4 $^{+}$ T-Zellen aus tumortragenden Mäusen ohne Behandlung weitaus mehr B7-H1 als die Zellen der „gesunden“ Kontrollgruppe. Des Weiteren lag die B7-H1 mean fluorescence intensity (MFI) der B7-H1 $^{+}$ Zellen bei beiden Kontrollgruppen im nahezu gleichen Bereich (Abb. 39 Bild A-C).

Zusätzlich haben wir die jeweiligen Behandlungen miteinander verglichen und konnten sehen, dass die CD4 $^{+}$ T-Zellen, die mit Gem und 5-FU kultiviert wurden, signifikant mehr B7-H1 exprimierten, wenn sie aus tumortragenden Mäusen stammten. Bei den restlichen Therapien konnten wir keine nennenswerten Unterschiede verzeichnen (Abb. 39 Bild B und C).

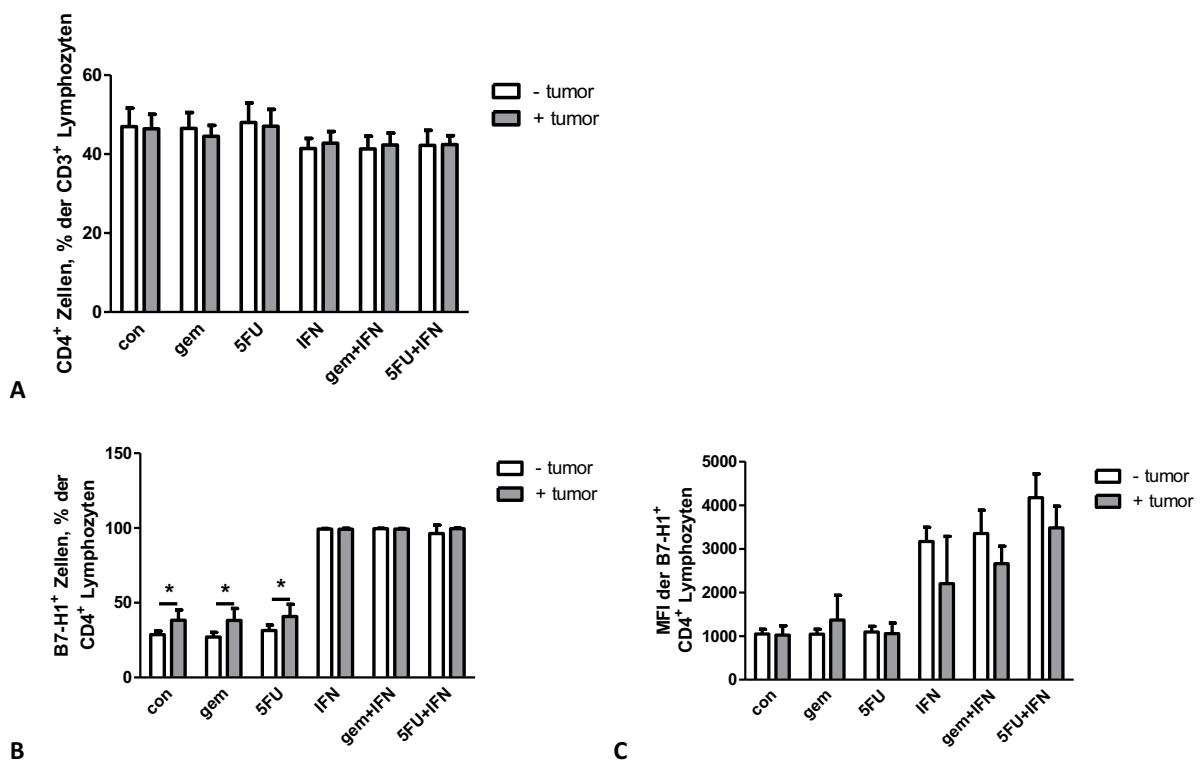


Abb. 39 Vergleich CD4⁺ T-Zellen aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: Prozentzahl CD4⁺ T-Zellen in Bezug auf CD3⁺ Lymphozyten. B: Prozentzahl B7-H1⁺ Zellen aus CD4⁺ T-Zellen. C: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ CD4⁺ T-Zellen. *p<0,05.

Wenn man den prozentualen Anteil der Subpopulationen in Bezug auf die CD4⁺ T-Zellen betrachtet, kann ein signifikanter Unterschied zwischen „gesund und tumortragend“ beobachtet werden. T_{eff}, die der Kontrolle dienten, kamen in tumortragenden Mäusen in signifikant größerer Menge vor als in den gesunden Mäusen (Abb. 40 Bild B). Für die restlichen Subpopulationen (T_{naive}, T_{em} und T_{cm}) waren keine signifikanten Unterschiede erkennbar (Abb. 40 Bild A, C, D).

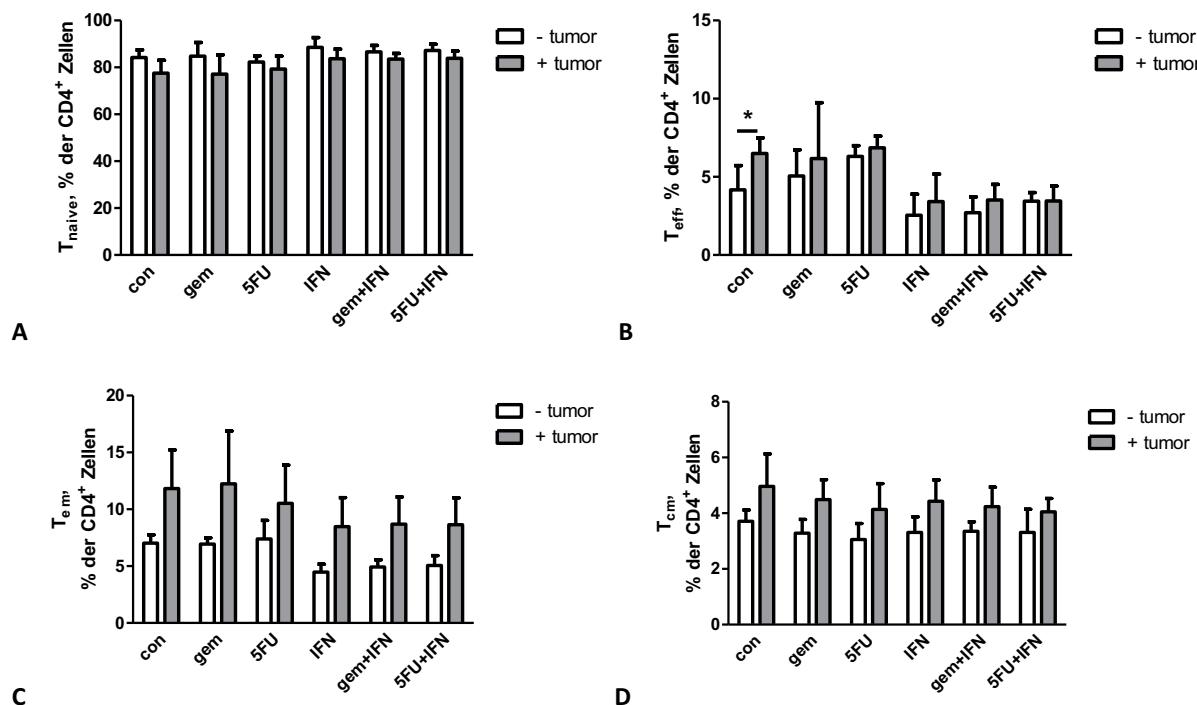


Abb. 40 Vergleich CD4 $^{+}$ Subpopulationen aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: prozentualer Anteil T_{naive} in Bezug auf CD4 $^{+}$ T-Zellen. **B:** prozentualer Anteil T_{eff} in Bezug auf CD4 $^{+}$ T-Zellen. **C:** prozentualer Anteil T_{em} in Bezug auf CD4 $^{+}$ T-Zellen. **D:** prozentualer Anteil T_{cm} in Bezug auf CD4 $^{+}$ T-Zellen. *p<0,05.

Wir konnten weiterhin sehen, dass die Kontrollgruppe der gesunden Mäuse signifikant mehr B7-H1 $^{+}$ T_{em} aufweist als die Kontrollzellen der tumortragenden Mäuse. Auch die Kultivierung mit Gem und 5-FU führte bei den gesunden Mäusen zu signifikant mehr B7-H1 $^{+}$ T_{em} als dieselben Therapien auf den T_{em} tumortragender Mäuse. Ebenso lag der MFI Wert des B7-H1 Moleküls auf den T_{em} in gesunden Mäusen unter der Verwendung von IFN α und Gem+IFN α signifikant höher als in tumortragenden Mäusen (Abb. 41 Bild A und B), wohingegen prozentual mehr T_{cm} Zellen der Kontrollgruppe der tumortragenden Mäuse B7-H1 exprimierten. Der MFI Wert des B7-H1 Moleküls auf den T_{cm} zeigte hingegen keine signifikanten Veränderungen (Abb. 41 Bild C und D). Für die T_{naive} und die T_{eff} konnten in Hinblick auf die Zahl der B7-H1 exprimierenden Zellen keine Abweichungen beobachtet werden (Abb. 41 Bild F).

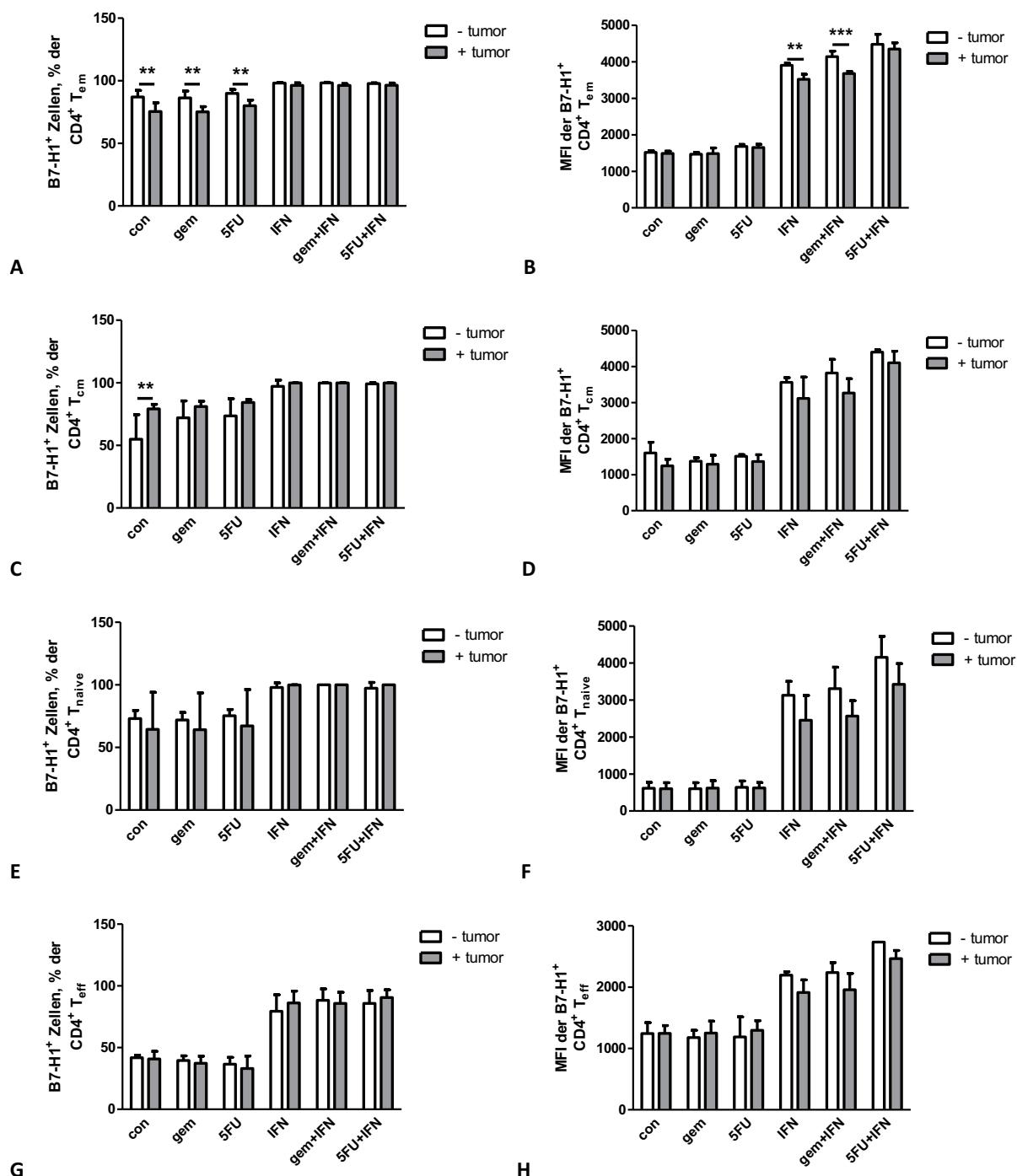


Abb. 41 Vergleich der CD4⁺ Subpopulationen aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. **A:** Prozentzahl B7-H1⁺ Zellen aus CD4⁺ T_{em}. **B:** B7-H1 MFI der B7-H1⁺ CD4⁺ T_{em}. **C:** Prozentzahl B7-H1⁺ Zellen aus CD4⁺ T_{cm}. **D:** B7-H1 MFI der B7-H1⁺ CD4⁺ T_{cm}. **E:** Prozentzahl B7-H1⁺ Zellen aus CD4⁺ T_{naive}. **F:** B7-H1 MFI der B7-H1⁺ CD4⁺ T_{naive}. **G:** Prozentzahl B7-H1⁺ Zellen aus CD4⁺ T_{eff}. **H:** B7-H1 MFI der B7-H1⁺ CD4⁺ T_{eff}. **p<0,01. ***p<0,001.

3.2.5 Vergleich der CD8⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen

Wir haben ebenso die prozentuale Zahl der CD8⁺ T-Zellen aus gesunden Mäusen mit denjenigen aus tumortragenden in Bezug auf die CD3⁺ Lymphozyten verglichen und konnten keine

Unterschiede feststellen. Des Weiteren können wir aus der Grafik entnehmen, dass es keine Unterschiede zwischen den B7-H1⁺ CD8⁺ T-Zellen gesunder und tumortragender Mäuse gibt (Abb. 42 Bild A und B). Eindeutig ersichtlich ist, dass der MFI Wert des B7-H1 Moleküls unter der Verwendung von 5-FU+IFN α in gesunden Mäusen signifikant höher lag als der MFI Wert von B7-H1 auf Zellen tumortragender Mäuse (Abb. 42 Bild C).

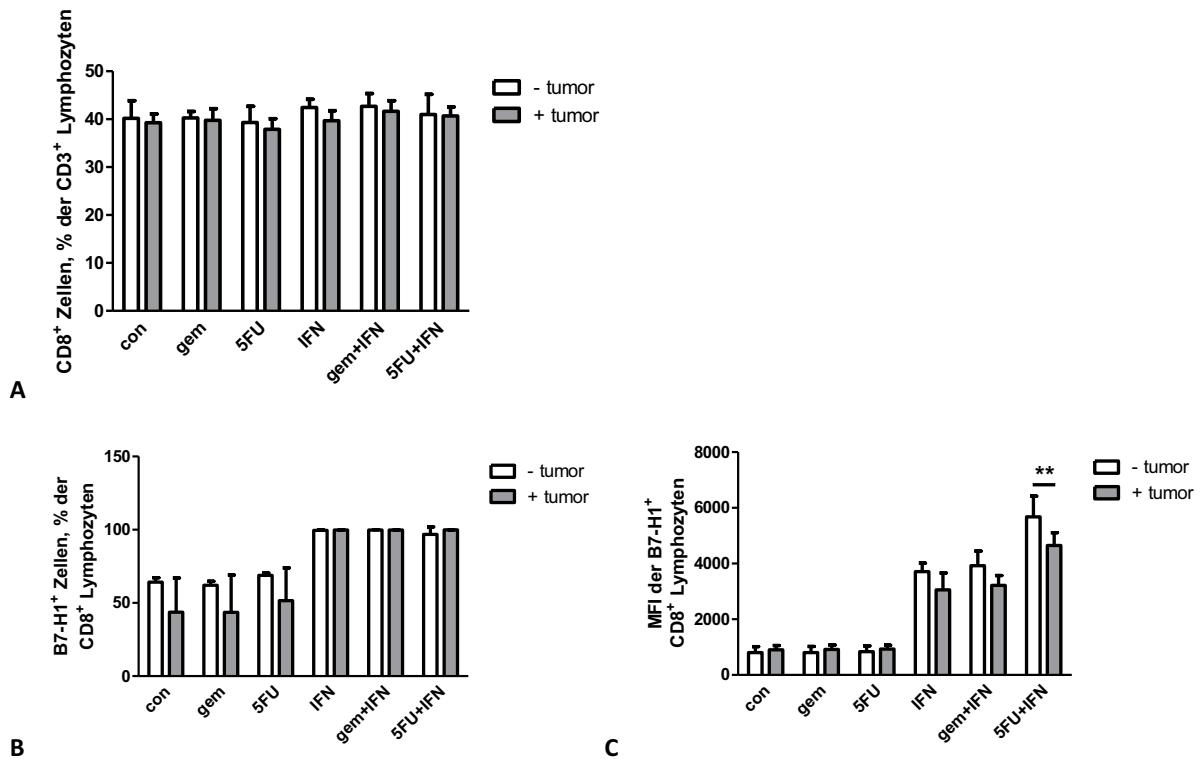


Abb. 42 Vergleich der CD8⁺ T-Zellen aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: prozentualer Anteil CD8⁺ T-Zellen in Bezug auf CD3⁺ Lymphozyten. B: prozentualer Anteil B7-H1⁺ Zellen aus CD8⁺ T-Zellen. C: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ CD8⁺ T-Zellen. **p<0,01.

Die Subpopulationen (T_{naive} , T_{eff} , T_{em} und T_{cm}) der CD8⁺ T-Zellen zeigten bis auf eine Ausnahme keine signifikanten Abweichungen in Hinblick auf ihren prozentualen Anteil bezüglich der CD8⁺ T-Zellmenge. Die T_{eff} in tumortragenden Mäusen machten im Vergleich zu den T_{eff} der gesunden Mäuse dann einen signifikant größeren Anteil der CD8⁺ T-Zellen aus, wenn sie mit 5-FU kultiviert wurden (Abb. 43 Bild B).

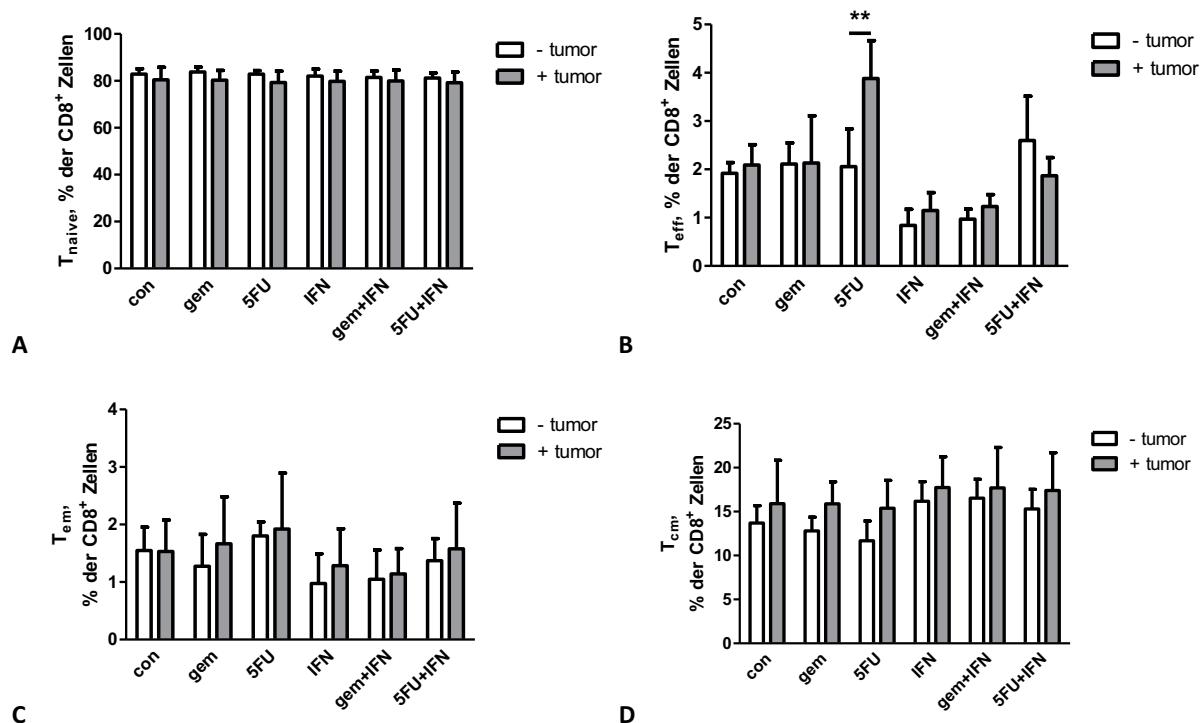


Abb. 43 Vergleich CD8⁺ Subpopulationen aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: Prozentzahl T_{naive} in Bezug auf CD8⁺ T-Zellen. B: Prozentzahl T_{eff} in Bezug auf CD8⁺ T-Zellen. C: Prozentzahl T_{em} in Bezug auf CD8⁺ T-Zellen. D: Prozentzahl T_{cm} in Bezug auf CD8⁺ T-Zellen. **p<0,01.

In der Kontrollgruppe der gesunden Mäuse hatten wir signifikant höhere prozentuale Zellzahlen der B7-H1⁺ T_{em} als in der Kontrollgruppe der tumortragenden Mäuse. Auch für die Behandlungen mit Gem und 5-FU wurde eine signifikante Zunahme der B7-H1⁺ T_{em} beobachtet, wenn die Zellen aus gesunden Mäusen (im Vergleich zu den tumortragenden) stammten (Abb. 44 Bild A). Für die Zahl der B7-H1 positiven T_{naive}, der B7-H1 positiven T_{eff}, sowie der B7-H1 positiven T_{cm} konnten keine nennenswerten Unterschiede zwischen „gesund und tumortragend“ festgestellt werden (Abb. 44 Bild B-D).

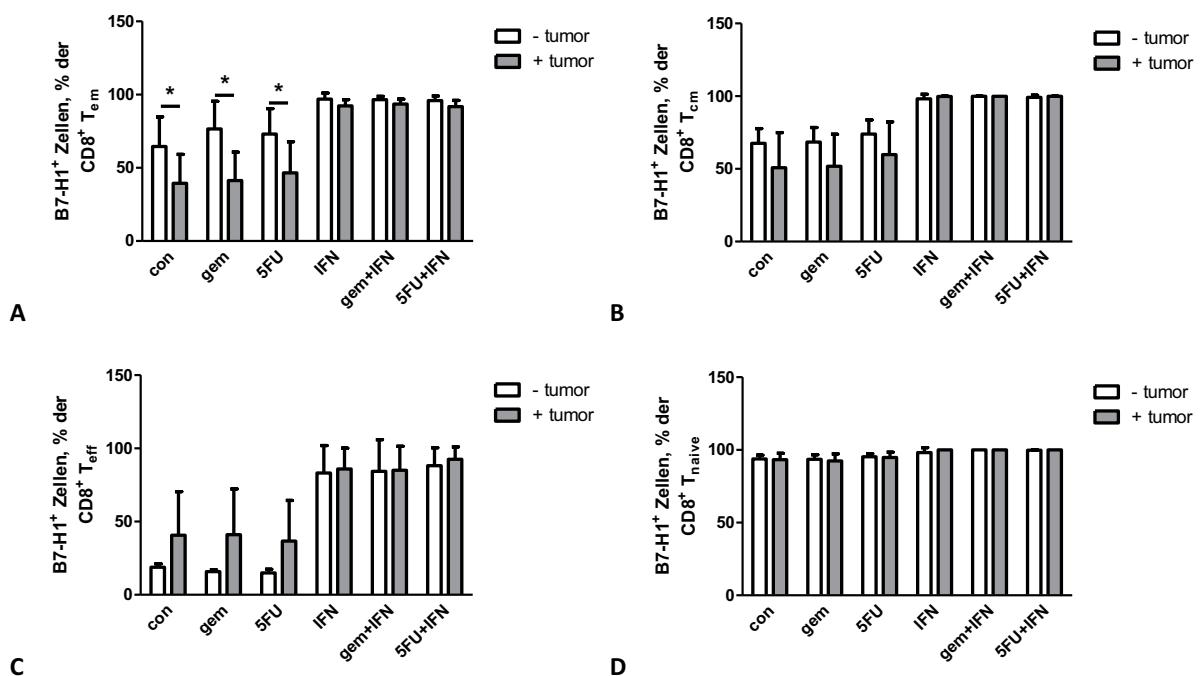


Abb. 44 Vergleich CD8⁺ Subpopulationen aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: prozentualer Anteil B7-H1⁺ Zellen aus CD8⁺ T_{em}. **B:** prozentualer Anteil B7-H1⁺ Zellen aus CD8⁺ T_{cm}. **C:** prozentualer Anteil B7-H1⁺ Zellen aus CD8⁺ T_{eff}. **D:** prozentualer Anteil B7-H1⁺ Zellen aus CD8⁺ T_{naive}. *p<0,05.

Wenn wir die Gesamtmenge der B7-H1 Moleküle betrachten, verändert sich diese bei den T_{em}, den T_{eff} und den T_{naive} im Vergleich „gesund zu tumortragend“ nicht. Signifikante Abweichungen sind hingegen beim B7-H1 MFI Wert der B7-H1⁺ T_{cm} aufgetreten. Hier kam das B7-H1 Molekül unter der Therapie mit 5-FU+IFN α in gesunden Mäusen signifikant häufiger vor als in tumortragenden Mäusen (Abb. 45 Bild C).

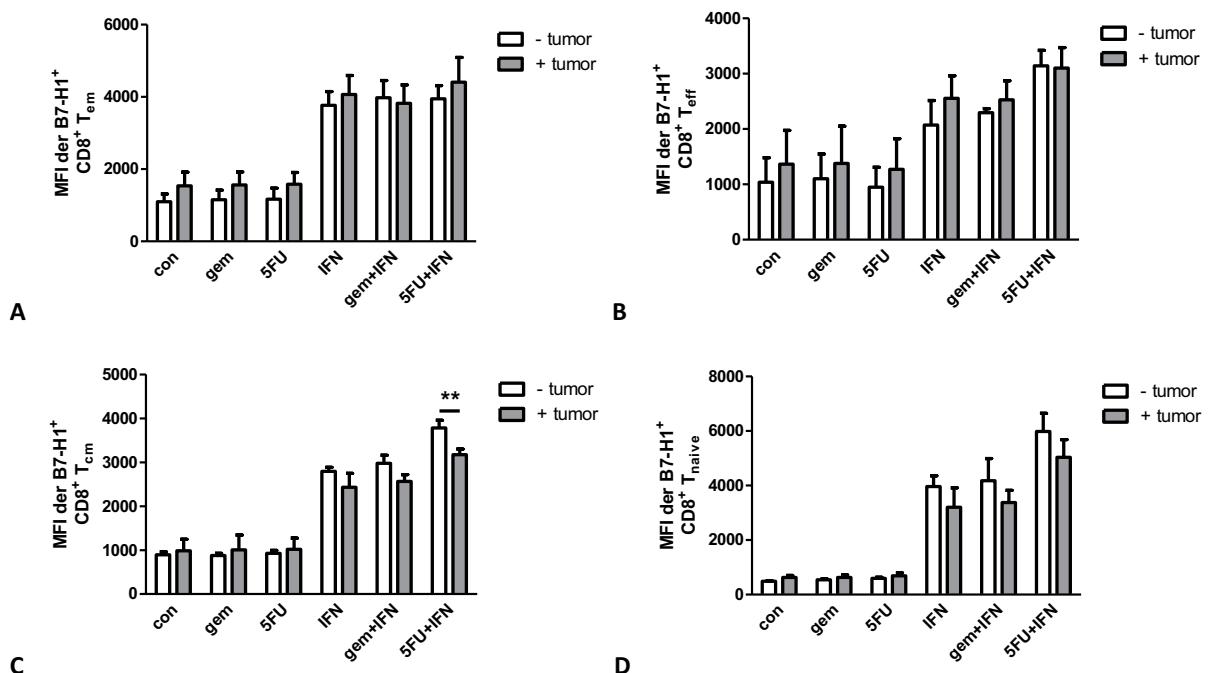


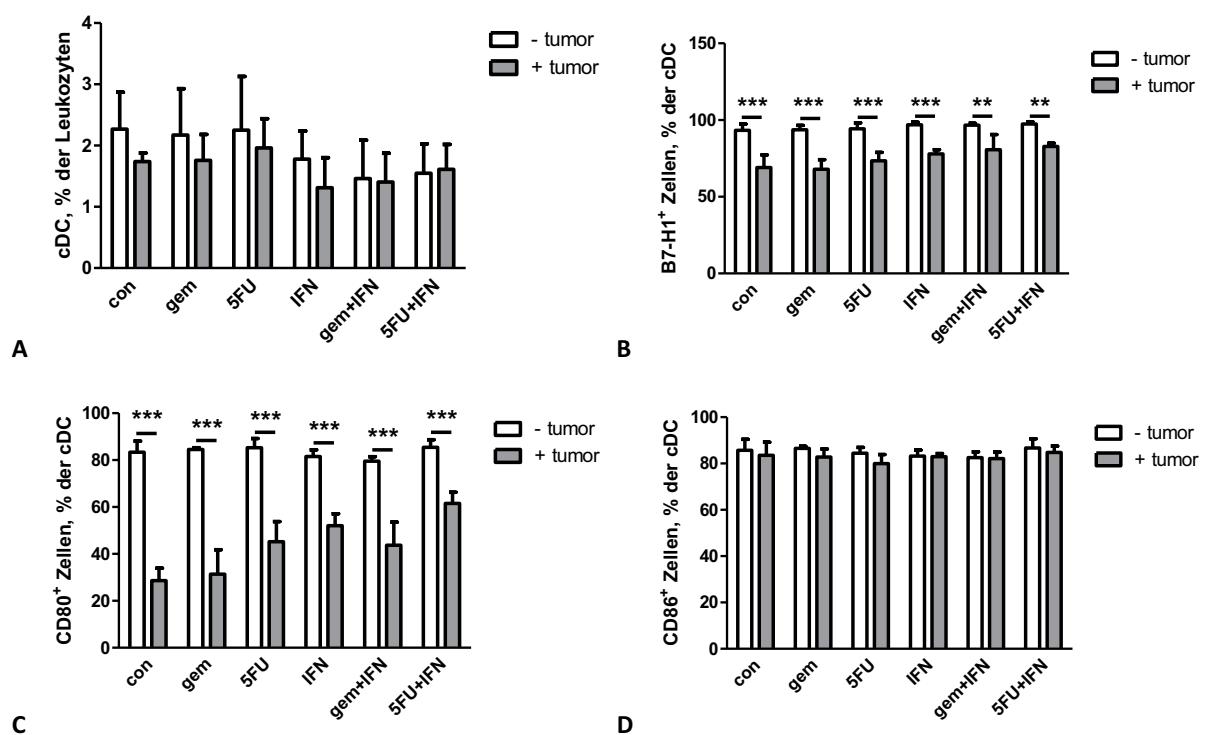
Abb. 45 Vergleich CD8⁺ Subpopulationen aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ CD8⁺ T_{em}. B: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ CD8⁺ T_{eff}. C: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ CD8⁺ T_{cm}. D: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ CD8⁺ T_{naive}. **p<0,01.

Somit können wir sowohl bei den CD4⁺ T-Zellen als auch bei den CD8⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen vereinzelt Unterschiede zwischen den Zellen gesunder und tumortragender Mäuse erkennen. In Hinblick auf die verschiedenen *in vitro* Therapien waren sowohl für die Monotherapien 5-FU und Gem, wie auch für die Kombinationstherapie mit 5-FU+IFNα Differenzen festzustellen.

3.2.6 Vergleich der konventionellen Dendritischen Zellen (cDC)

Beim Vergleich des prozentualen Anteils der cDC bezüglich der Leukozytenmenge gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellen gesunder und tumortragender Mäuse (Abb. 46 Bild A). Signifikant höher war hingegen der prozentuale Anteil der B7-H1⁺ cDC wie auch der CD80⁺ cDC gesunder Mäuse im Vergleich zu den Zellen tumortragender Mäuse (Abb. 46 Bild B und C). Bei der prozentualen Zellzahl der cDC, die CD86 exprimierten, waren keine signifikanten Abweichungen zwischen den beiden Kontrollgruppen festzustellen (Abb. 46 Bild D). Wenn wir das Augenmerk auf die verschiedenen Behandlungen legen, können wir zwar für die CD86⁺ cDC keine Unterschiede sehen, dafür aber für die CD80⁺ und B7-H1⁺ cDC. Wie bei den Kontrollgruppen bereits beschrieben, war die Zahl der CD80⁺ und der B7-H1⁺ cDC nach allen *in vitro* Therapien in gesunden Mäusen signifikant höher als in tumortragenden Mäusen.

den Mäusen (Abb. 46 Bild B und C). Abschließend wurden die MFI Werte der Moleküle CD80, CD86 und B7-H1 betrachtet. In der Kontrollgruppe der tumortragenden Mäuse konnten höhere MFI Werte für das CD80 Molekül festgestellt werden als in der Kontrollgruppe gesunder Mäuse (Abb. 46 Bild F). Der Vergleich der Kontrollgruppen hinsichtlich des CD86 und des B7-H1 Moleküls konnte keine Differenzen zwischen den Zellen gesunder und tumortragender Mäuse aufzeigen (Abb. 46 Bild E und G). Zuletzt wurden die Behandlungen einander gegenüber gestellt. Bei allen verwendeten Therapeutika waren auf den cDC aus tumortragenden Mäusen im Vergleich zu den cDC aus gesunden Mäusen signifikant höhere Mengen des CD80 Moleküls zu registrieren (Abb. 46 Bild F), wohingegen die Menge des B7-H1 Moleküls nur in cDC aus tumortragenden Mäusen mit der Verwendung der Kombinationstherapeutika höher war. Die Menge des CD86 Moleküls war lediglich unter dem Einfluss von Gem+IFN α in cDC aus tumortragenden Mäusen höher als in cDC aus gesunden Mäusen (Abb. 46 Bild E und G).



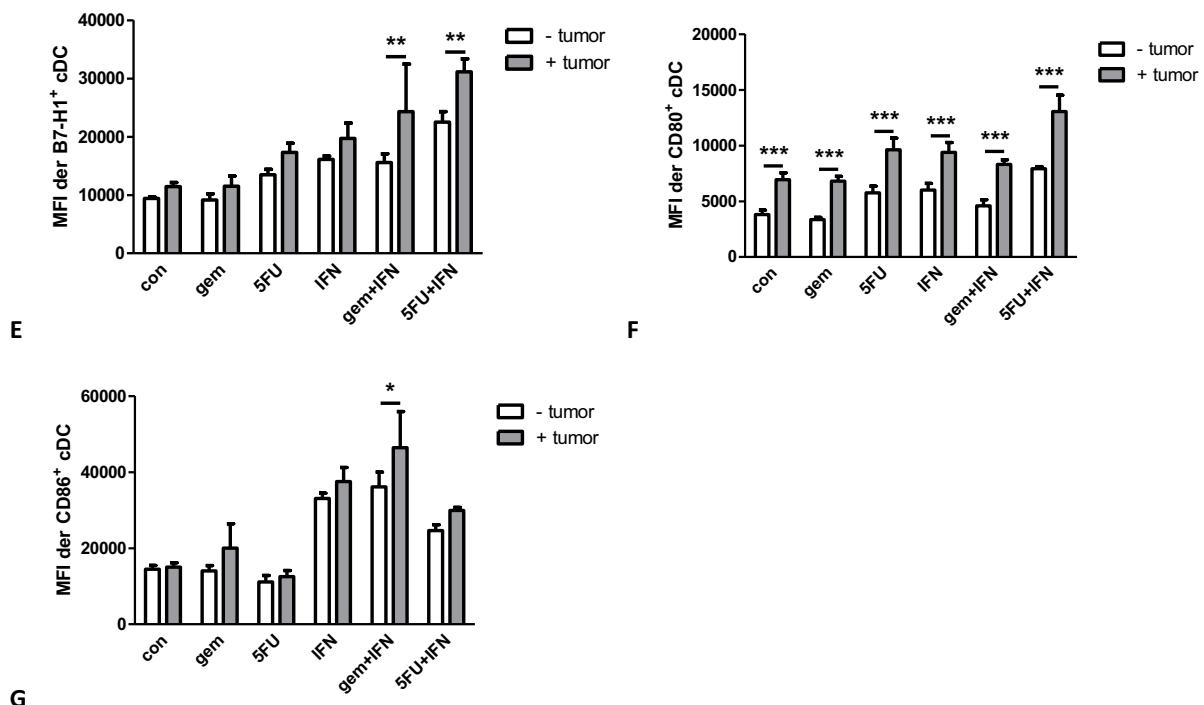


Abb. 46 Vergleich konventioneller DC und deren B7-H1/CD80/CD86 Expression aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. **A:** prozentualer Anteil der cDC aus Leukozyten. **B:** prozentualer Anteil der B7-H1⁺ cDC. **C:** prozentualer Anteil der CD80⁺ cDC. **D:** prozentualer Anteil der CD86⁺ cDC. **E:** B7-H1 MFI der B7-H1⁺ cDC. **F:** CD80 MFI der CD80⁺ cDC. **G:** CD86 MFI der CD86⁺ cDC. *p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001.

3.2.7 Vergleich der plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDC)

Betrachten wir den prozentualen Anteil der pDC in Bezug auf die Leukozytenmenge, so können wir keinen Unterschied zwischen den Zellen gesunder und tumortragender Mäuse feststellen (Abb. 47 Bild A). Wie bei den cDC beschrieben, war auch bei den pDC die prozentuale Zahl der B7-H1 und CD80 positiven Zellen höher in den gesunden als in den tumortragenden Mäusen. Für die B7-H1 positiven pDC hat dies nicht nur auf die Kontrollgruppe, sondern auf alle Therapiegruppen zugetroffen (Abb. 47 Bild B und C). Auch in allen therapierten Gruppen, bis auf die Therapie mit 5-FU+IFN α , war der Anteil aller CD80 positiver pDC in den gesunden Mäusen signifikant höher (Abb. 47 Bild C). Vergleicht man den prozentualen Anteil CD86 positiver pDC, waren keine Differenzen zwischen den gesunden und tumortragenden Mäusen zu verzeichnen. Auch der Vergleich der verschiedenen Therapien erbrachte keine Unterschiede (Abb. 47 Bild D). In der Veränderung der Gesamtmenge der drei Moleküle, die anhand der mean fluorescence intensity (MFI) gemessen wurde, war ein einheitlicher signifikanter Unterschied zwischen „gesund und tumortragend“ zu sehen: pDC aus tumortragenden Mäusen exprimierten nicht nur im Vergleich zur Kontrollgruppe der gesunden Mäuse,

sondern auch unter dem Einfluss aller Therapeutika weitaus mehr B7-H1, CD80 und CD86 (Abb. 47 Bild E-G).

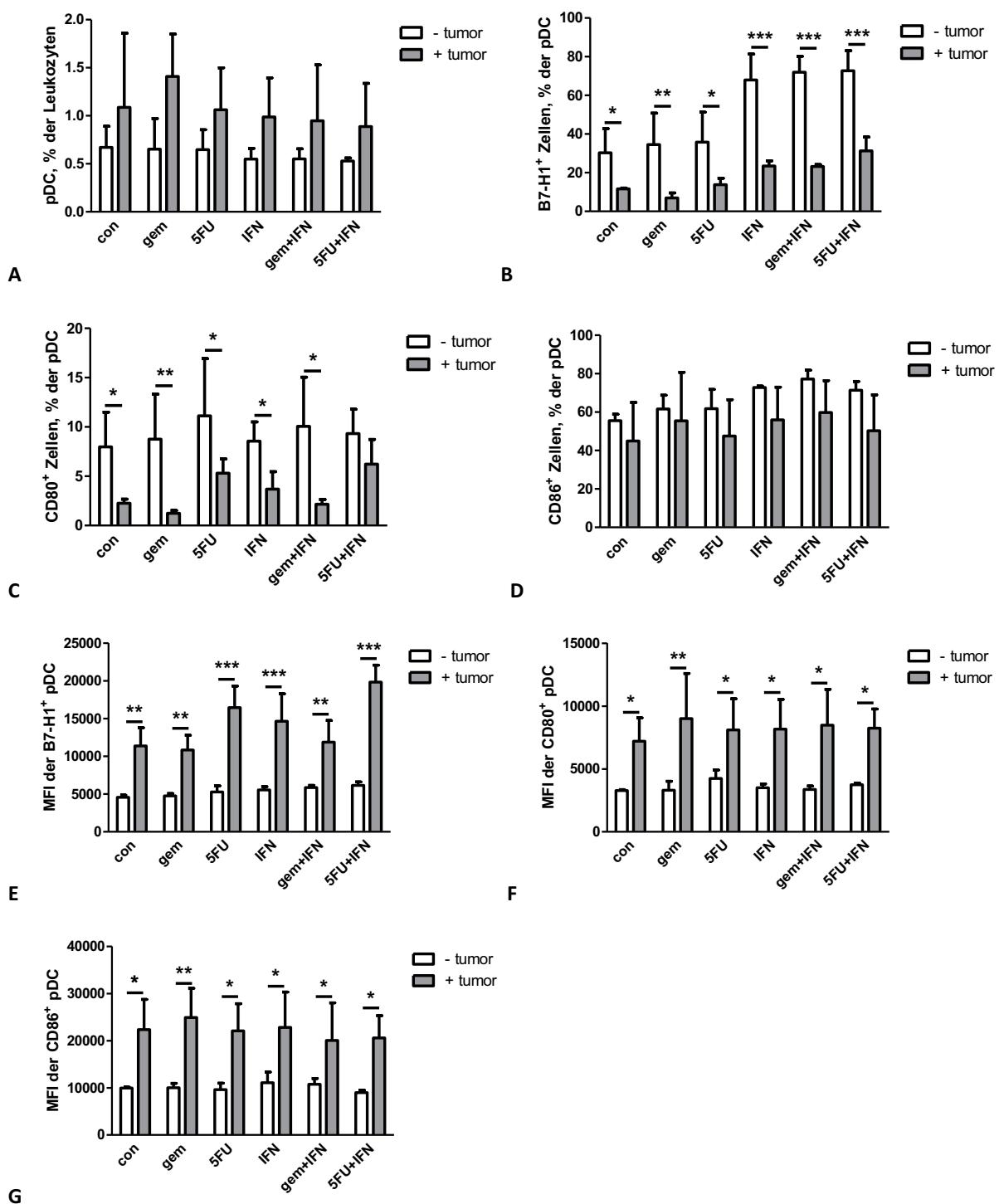


Abb. 47 Vergleich plasmazytoider DC und deren B7-H1/CD80/CD86 Expression aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: Prozentzahl der pDC aus Leukozyten. **B:** Prozentzahl der B7-H1⁺ pDC. **C:** Prozentzahl der CD80⁺ pDC. **D:** Prozentzahl der CD86⁺ pDC. **E:** B7-H1 MFI der B7-H1⁺ pDC. **F:** CD80 MFI der CD80⁺ pDC. **G:** CD86 MFI der CD86⁺ pDC. *p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001.

Zusammenfassend können wir festhalten, dass der prozentuale Anteil der B7-H1⁺ und CD80⁺ Zellen, sowohl bei den cDC als auch bei den pDC höher liegt, wenn die Zellen aus gesunden Mäusen stammen. Die CD80/CD86/B7-H1 MFI Werte sind hingegen bei den pDC für alle drei Moleküle (CD80/CD86/B7-H1) und bei den cDC für das CD80 Molekül signifikant höher, wenn die Zellen aus tumortragenden Mäusen stammen. Diese Ergebnisse konnten sowohl für die Kontrollgruppen als auch für alle verwendeten Therapien erfasst werden.

3.2.8 Vergleich der Makrophagen

Hinsichtlich der Anzahl der Makrophagen in Bezug auf die Leukozytenpopulation wie auch der B7-H1 Expression auf diesen, waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Splenozyten aus gesunden und aus tumortragenden Mäusen zu verzeichnen (Abb. 48).

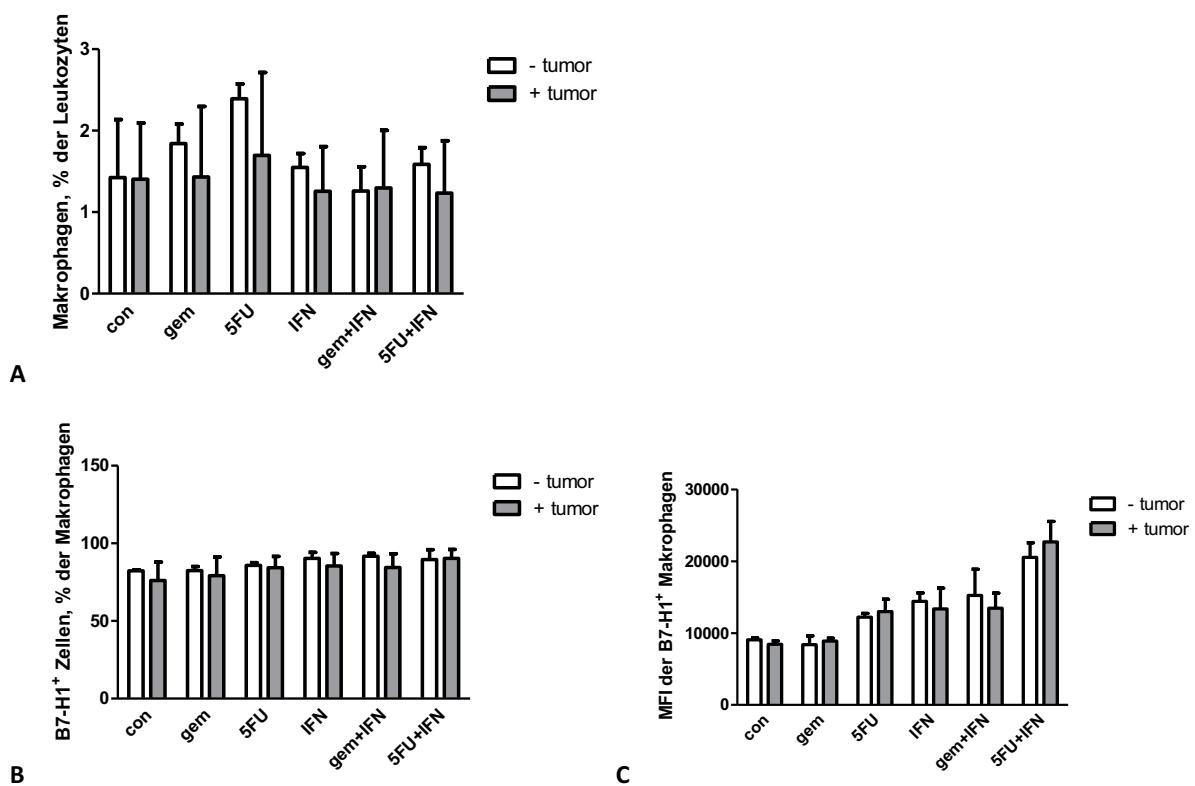


Abb. 48 Vergleich der Makrophagen und deren B7-H1 Expression aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. **A:** Prozentzahl der Makrophagen aus Leukozyten. **B:** Prozentzahl der B7-H1⁺ Makrophagen. **C:** B7-H1 MFI der B7-H1⁺ Makrophagen.

3.2.9 Vergleich der Myeloid-derived suppressor cells (MDSC)

Der Anteil der MDSC in den Milzen gesunder und tumortragender Mäuse variierte in Bezug auf die Gesamtzellzahl der Leukozyten nicht. Die Zellzahl der MDSC in gesunden Mäusen war mit derjenigen in tumortragenden Mäusen vergleichbar (Abb. 49 Bild A). Signifikante Unter-

schiede konnten wir allerdings für die B7-H1 positiven MDSC sehen. Unter der Verwendung von IFN α und den Kombinationstherapien waren signifikant mehr B7-H1 $^+$ MDSC in gesunden Mäusen im Vergleich zu tumortragenden Mäusen vorhanden (Abb. 49 Bild B). Zuletzt wurde ein Vergleich der B7-H1 mean fluorescence intensity (MFI) der B7-H1 $^+$ Zellen hergestellt. Die exprimierte Menge des B7-H1 Moleküls hat sich kaum zwischen den Zellen der gesunden und der tumortragenden Mäuse unterschieden (Abb. 49 Bild C).

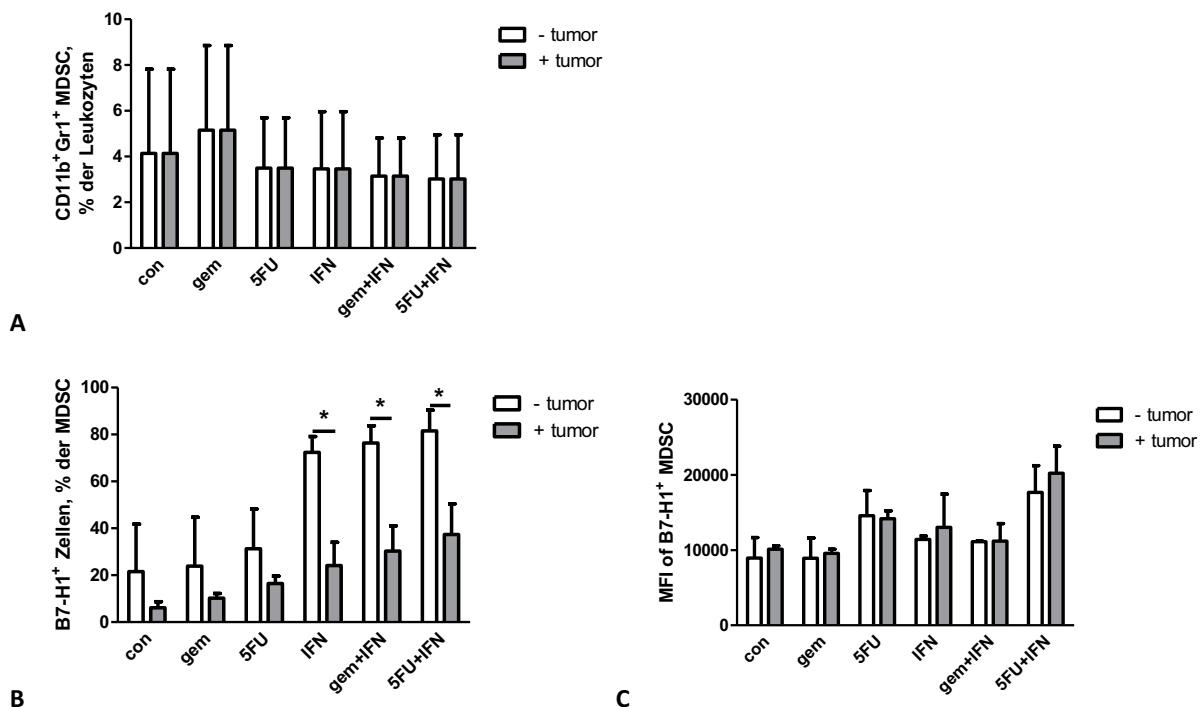


Abb. 49 Vergleich der MDSC und deren B7-H1 Expression aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung der verschiedenen *in vitro* Therapien. A: prozentualer Anteil der CD11b $^+$ Gr-1 $^+$ MDSC aus Leukozyten. B: prozentualer Anteil der B7-H1 $^+$ MDSC. C: B7-H1 MFI der B7-H1 $^+$ MDSC.

*p<0,05.

3.2.10 Vergleich der monozytären/granulozytären MDSC

Der Vergleich der monozytären und der granulozytären MDSC aus gesunden und aus tumortragenden Mäusen erbrachte keine signifikanten Unterschiede. Auch die verwendeten *in vitro* Therapien führten zu keinen signifikanten Veränderungen (Abb. 50).

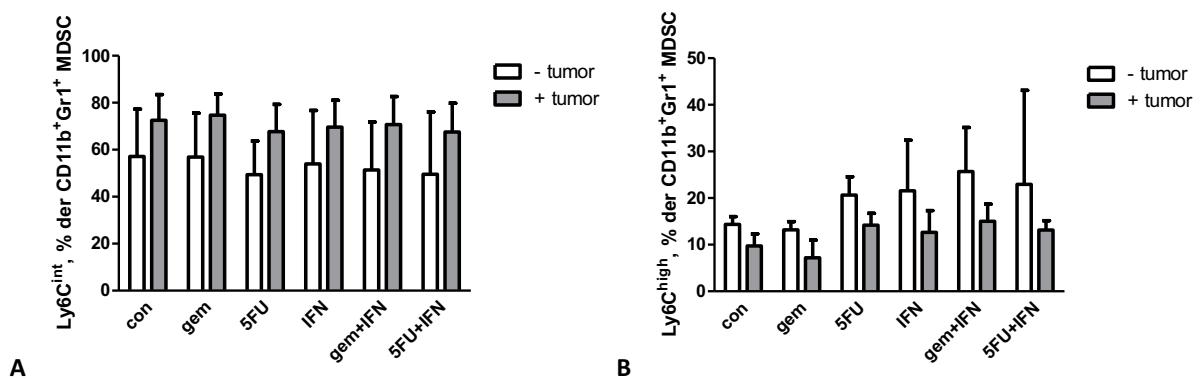


Abb. 50 Vergleich der granulozytären und der monozytären MDSC aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: Prozentualer Anteil der granulozytären (Ly6C^{int}) MDSC aus $\text{CD11b}^+ \text{Gr-1}^+$ MDSC. **B:** Prozentualer Anteil der monozytären ($\text{Ly6C}^{\text{high}}$) MDSC aus $\text{CD11b}^+ \text{Gr-1}^+$ MDSC.

Während man bei der Anzahl der B7-H1 positiven granulozytären MDSC keinen Unterschied zwischen „gesund und tumortragend“ sehen konnte, waren deutliche Unterschiede zu sehen, wenn man den B7-H1 MFI Wert für B7-H1^+ Zellen betrachtet. Granulozytäre MDSC aus gesunden Mäusen exprimierten signifikant mehr B7-H1 unter dem Einfluss von $\text{IFN}\alpha$ und den beiden Kombinationstherapien als dieselben Zellen in tumortragenden Mäusen (Abb. 51 Bild B). Bei den monozytären MDSC war die einzige signifikante Abweichung folgende: Es exprimierten weitaus mehr Zellen B7-H1 auf ihrer Oberfläche, wenn sie aus gesunden Mäusen stammten und keine *in vitro* Therapie erhalten hatten (Abb. 51 Bild C).

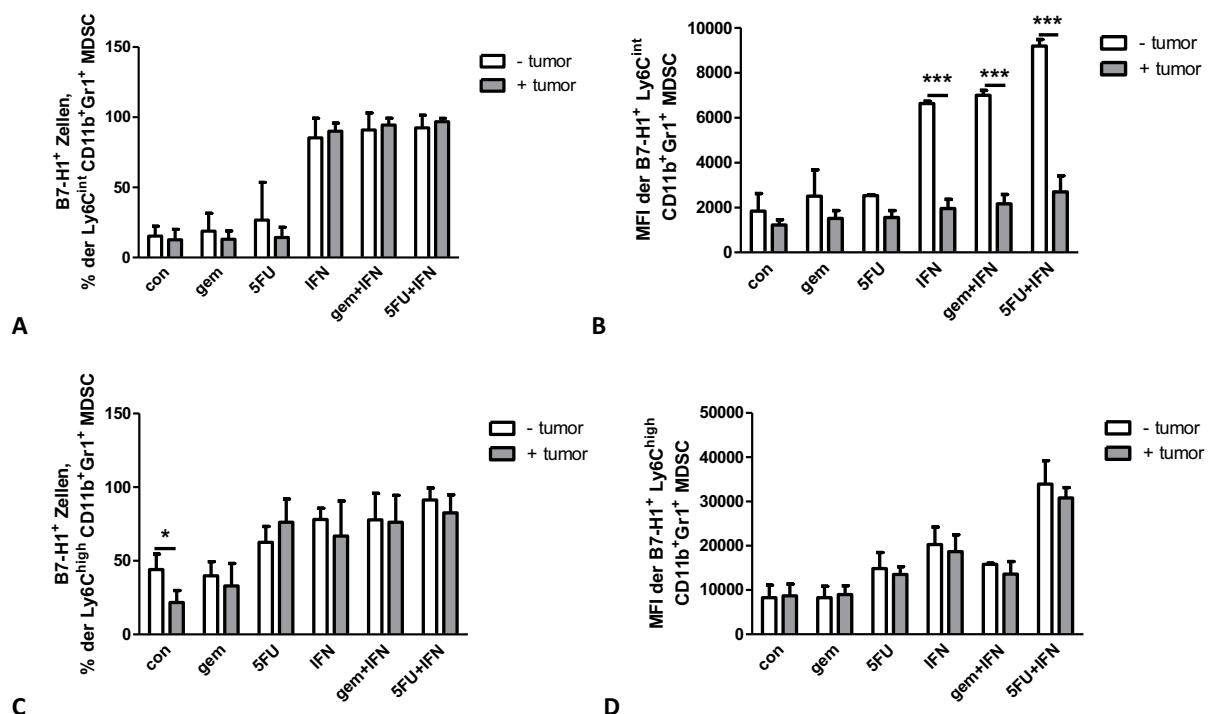


Abb. 51 Vergleich granulozytärer und monozytärer MDSC und deren B7-H1 Expression aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: Prozentzahl der B7-H1⁺ Ly6C^{int} MDSC. B: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ Ly6C^{int} MDSC. C: Prozentzahl der B7-H1⁺ Ly6C^{high} MDSC. D: B7-H1 MFI der B7-H1⁺ Ly6C^{high} MDSC. *p<0,05. *p<0,001.**

Generell waren bei den MDSC und deren Subpopulationen nur wenige Unterschiede zwischen den Zellen aus gesunden und aus tumortragenden Mäusen erkennbar. Der deutlichste Unterschied besteht in den höheren MFI Werten des B7-H1 Moleküls, das von den granulozytären MDSC exprimiert wird, sofern diese aus gesunden Mäusen stammen und mit IFN α und den beiden Kombinationstherapien kultiviert werden.

3.2.11 Vergleich der konventionellen und der regulatorischen T-Zellen (T_{con}/T_{reg})

Während wir bei der Anzahl der T_{con} bezüglich der CD4 $^{+}$ T-Zellmenge keine Unterschiede zwischen den Zellen aus gesunden und den Zellen aus tumortragenden Mäusen feststellen konnten, haben die T_{reg} aus gesunden Mäusen einen signifikant höheren Anteil der CD4 $^{+}$ T-Zellen eingenommen als die T_{reg} aus tumortragenden Mäusen (Abb. 52 Bild B). Dieser erhöhte Anteil ist bei allen therapierten Zellen deutlich sichtbar.

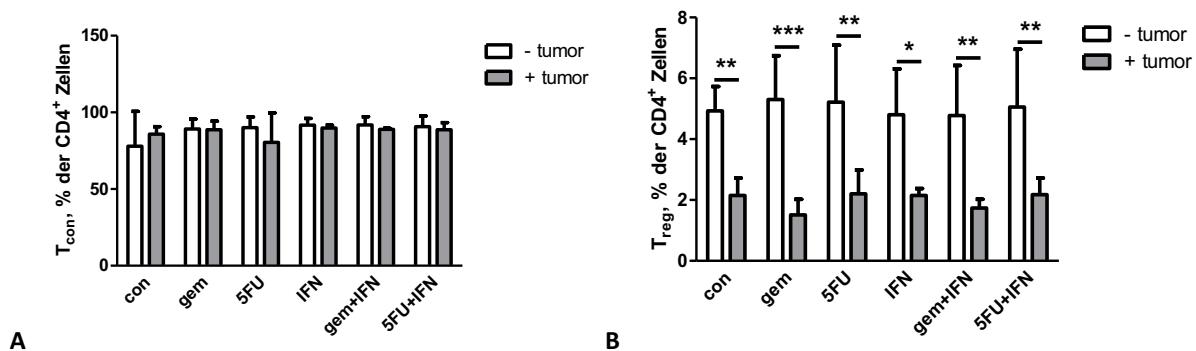


Abb. 52 Vergleich konventioneller und regulatorischer T-Zellen aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: Prozentzahl der T_{con} aus CD4⁺ T-Zellen. **B:** Prozentzahl der T_{reg} aus CD4⁺ T-Zellen. *p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001.

Wenn man auf diesen Zellpopulationen die Expression des B7-H1 Moleküls genauer betrachtet, dann ist das Expressionsmuster der Zellen aus den gesunden Mäusen vergleichbar mit dem der Zellen aus den tumortragenden. Dies hat sowohl auf die beiden Kontrollgruppen als auch auf alle Therapiegruppen zugetroffen (Abb. 53 Bild A und C). Neben der Anzahl der B7-H1⁺ T_{con} und T_{reg} Zellen wurden auch die MFI Werte des B7-H1 Moleküls statistisch miteinander verglichen. Signifikante Unterschiede konnten hier nicht festgestellt werden (Abb. 53 Bild B und D).

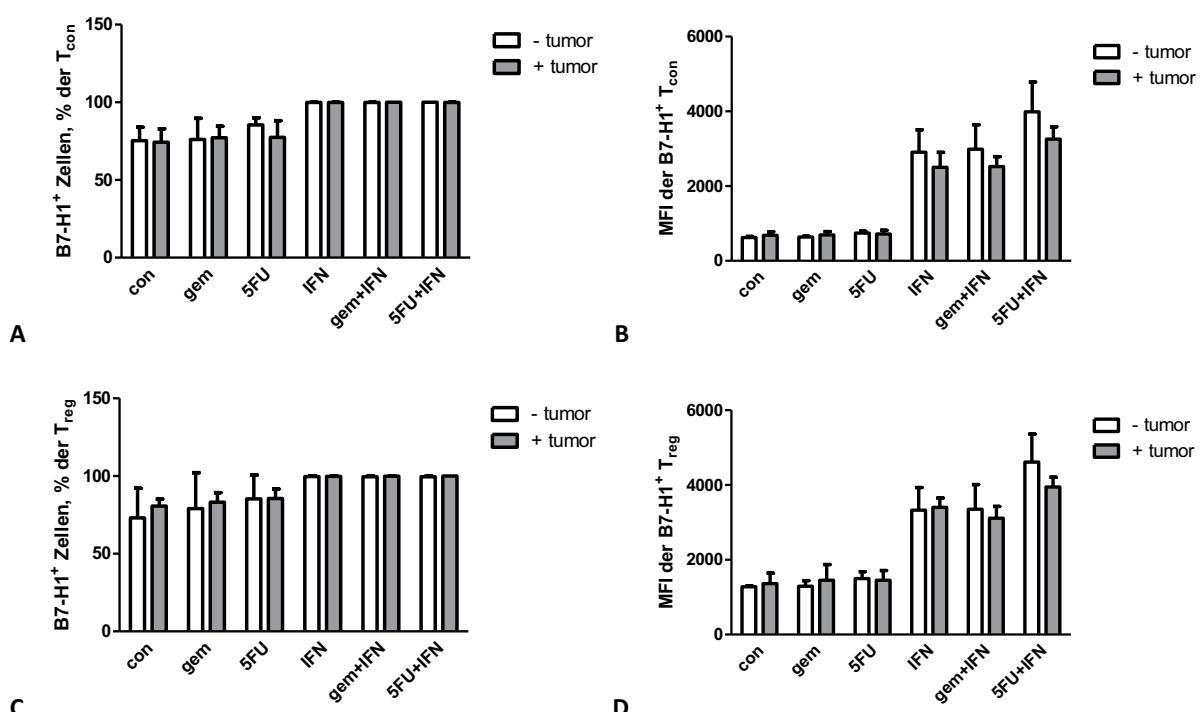


Abb. 53 Vergleich des B7-H1 Moleküls auf konventionellen und regulatorischen T-Zellen aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: prozentualer Anteil der B7-H1⁺ T_{con}. **B:** B7-H1 MFI der B7-H1⁺ T_{con}. **C:** prozentualer Anteil der B7-H1⁺ T_{reg}. **D:** B7-H1 MFI der B7-H1⁺ T_{reg}.

Obwohl sich die prozentuale Anzahl der T_{con} und der T_{reg} , die CD69 auf ihrer Oberfläche exprimierten, nicht voneinander unterschieden hat, haben wir deutliche Unterschiede in den MFI Werten des CD69 Moleküls gesehen. Die signifikanten Unterschiede waren nicht nur innerhalb der Kontrollgruppen (gesund-tumortragend) zu sehen. Sowohl bei den T_{con} als auch bei den T_{reg} war die Menge von CD69 in tumortragenden Mäusen gegenüber den Zellen in gesunden Mäusen signifikant mit den Behandlungen Gem, 5-FU+IFN α und Gem+IFN α erhöht (Abb. 54 Bild B und D). Zuletzt haben wir die Expression beider Moleküle (B7-H1 und CD69) auf den T_{con} und den T_{reg} betrachtet und konnten keine Unterschiede zwischen „gesund“ und „tumortragend“ registrieren(Abb. 54 Bild E und F).

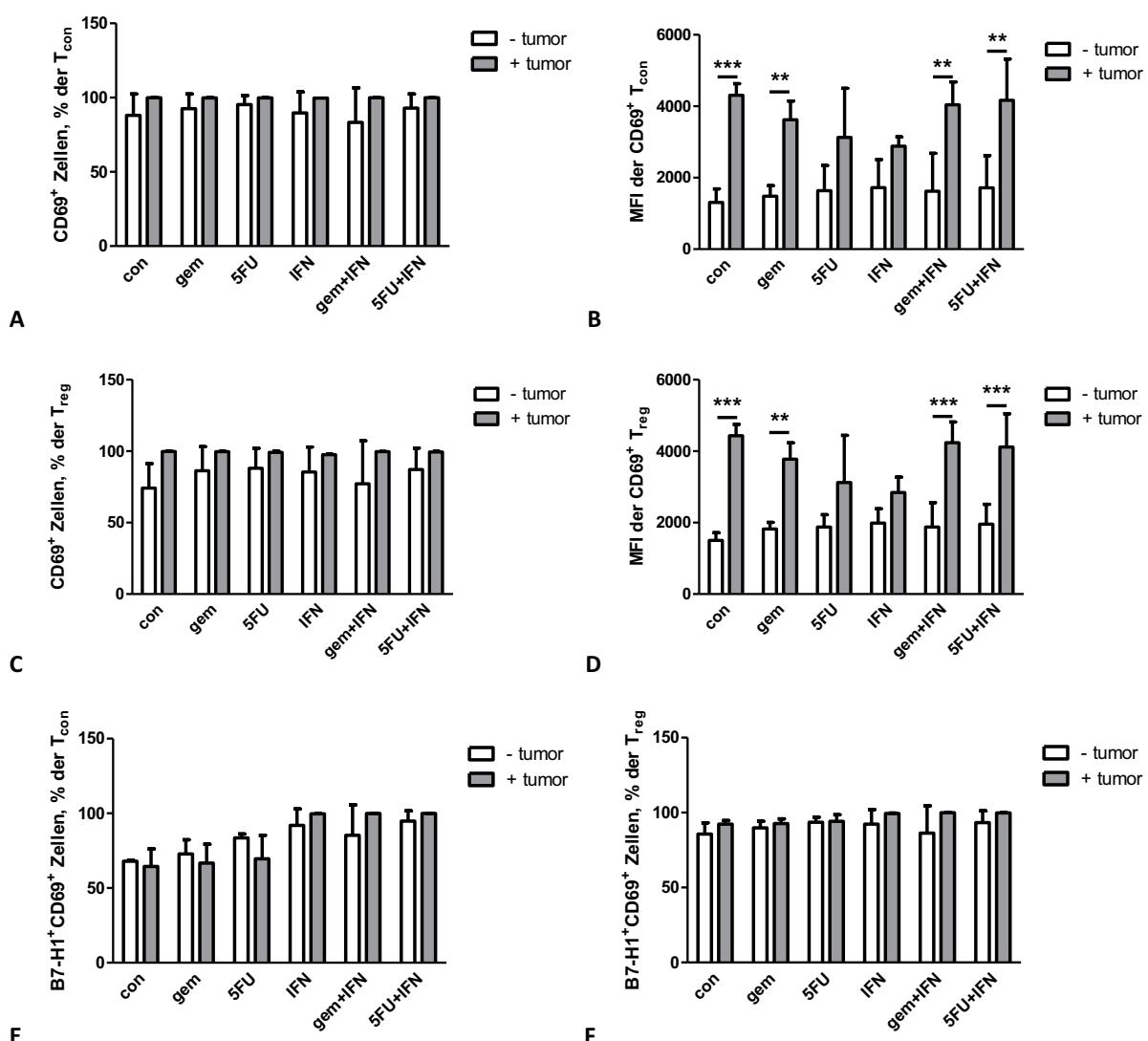


Abb. 54 Vergleich des CD69 Moleküls auf konventionellen und regulatorischen T-Zellen aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener *in vitro* Therapien. A: prozentualer Anteil der $CD69^+$ T_{con} . B: CD69 MFI der $CD69^+$ T_{con} . C: prozentualer Anteil der $CD69^+$ T_{reg} . D: CD69 MFI der $CD69^+$ T_{reg} . E: prozentualer Anteil der $B7-H1^+/CD69^+$ T_{con} . F: prozentualer Anteil der $B7-H1^+/CD69^+$ T_{reg} .

p<0,01. *p<0,001.

Die deutlichsten Unterschiede, die bei den konventionellen und den regulatorischen T-Zellen registriert werden konnten, haben den Aktivierungsstatus, der anhand des CD69 Moleküls gemessen wurde, betroffen. Die MFI Werte des CD69 Moleküls lagen in den T_{con} und T_{reg} tumortragender Mäuse meist höher als in denjenigen gesunder Mäuse.

3.2.12 Der Einfluss verschiedener Therapien auf die Zytotoxizität tumorinfiltrierender Lymphozyten in An- und Abwesenheit des B7-H1 Moleküls

Da die vorherigen Untersuchungen zeigen konnten, dass die Verwendung verschiedener Therapien, vor allem die mit IFN α , die Expression des B7-H1 Moleküls auf den Splenozyten der C57/Bl-6 Mäuse verstärkt, wurde folgend geprüft, ob die Abwesenheit des B7-H1 Moleküls auf den Splenozyten deren Zytotoxizität verändert. Hierfür wurde neben den C57/Bl-6 Mäusen mit B7-H1 KO Mäusen gearbeitet. Neben der Fragestellung, ob die Abwesenheit des B7-H1 Moleküls auf den Immunzellen Einfluss auf die funktionelle Zytotoxizität der tumorinfiltrierenden Lymphozyten nimmt (TiL), konnte in diesem Pilotexperiment gleichzeitig untersucht werden, ob die verschiedenen Therapien (s.u.) die Zytotoxizität der TiL beeinflussen.

Für die Untersuchungen wurden die tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TiL) sowohl aus den tumortragenden C57/Bl-6 Mäusen als auch aus den tumortragenden B7-H1 KO Mäusen isoliert und nach dem Zusatz verschiedener Therapeutika (5-FU, IFN α und 5-FU+IFN α) für 24h in Kultur verbracht. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die TiL mit den Zellen der Panc02-Zelllinie für weitere 12h in aufsteigenden Konzentrationen kokultiviert, wobei sich nur die Zellzahl der TiL erhöhte, die Zahl der Panc02-Zellen blieb konstant (siehe 2.2.9 Methodenteil). Die Zytotoxizität der TiL konnte nachfolgend anhand der FACS-Analyse bestimmt werden. Die Auswertungsstrategie ist in Abb. 55 dargestellt. Mit Hilfe des CD45 Antikörpers konnten die Panc02-Zellen ($CD45^-$) und die TiL ($CD45^+$) identifiziert werden (Abb. 55 Bild A). Anschließend wurden durch die Zugabe des Viability Dye450 Antikörpers die lebenden Panc02-Zellen (V.Dye 450 $^-$) und die toten Panc02-Zellen (V.Dye450 $^+$) bestimmt (Abb. 55 Bild B).

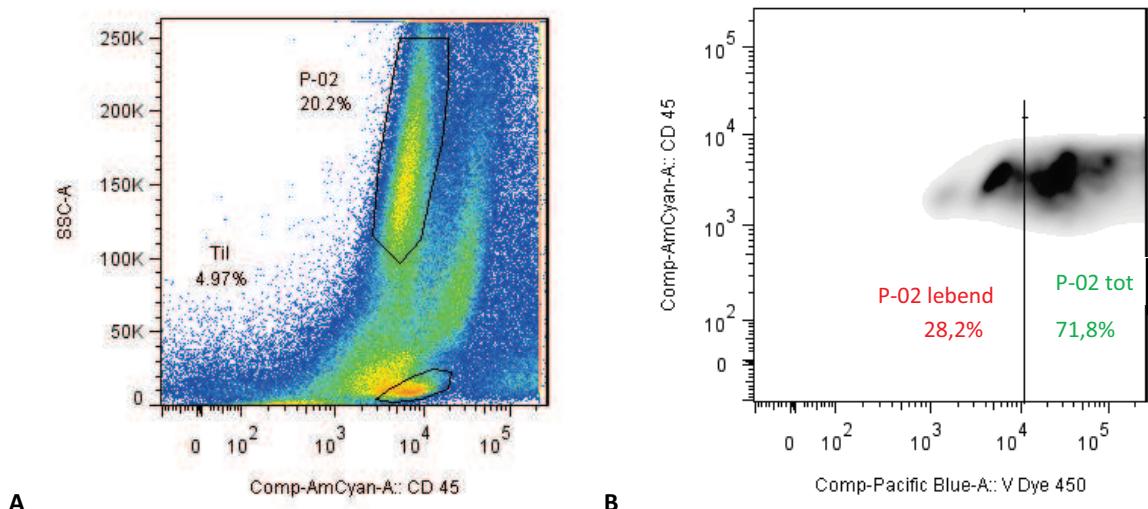


Abb. 55 Auswertungsstrategie zur Bestimmung der Zytotoxizität tumorinfiltrierender Lymphozyten (TiL) nach einer Kokultivierung mit Zellen der Panc02 Zelllinie. A: Panc02-Zellen und TiL. B: lebende und tote Panc02-Zellen.

Wir konnten in den ersten Versuchsreihen keine Unterschiede in der Zytotoxizität zwischen den Zellen der C57/Bl-6 Mäuse und den Zellen der B7-H1 KO Mäuse feststellen (Abb. 56 Bild A-C). Im Hinblick auf die Verwendung verschiedener Therapeutika konnten bei den Zellen der C57/Bl-6 Mäuse ebenfalls keine signifikanten Abweichungen registriert werden (Abb. 57 Bild A-C). Kleine, aber dennoch signifikante Unterschiede haben sich allerdings in der Verwendung der verschiedenen Therapeutika bei den Zellen der B7-H1 KO Mäuse ergeben. Wurden die TiL mit 5-FU oder mit 5-FU+IFN α therapiert und dann mit den Panc02-Zellen in einer Konzentration von 1:5 kokultiviert (Panc02:TiL), ist die relative Zytotoxizität der Zellen signifikant angestiegen (Abb. 58 Bild A), was vermuten lässt, dass die Abwesenheit des B7-H1 Moleküls die Effekte der Therapie mit 5-FU und/oder 5-FU+IFN α minimal positiv verstärkt. Wenn wir hingegen die Konzentrationen 1:10 und 1:20 in der Kokultur betrachten, ist nach dem Zusatz von IFN α die relative Zytotoxizität der TiL nicht drastisch, aber dennoch signifikant gesunken (Abb. 58 Bild B und C). Sowohl bei den C57/Bl-6 Mäusen, als auch bei den B7-H1 KO Mäusen, ist die relative Zytotoxizität mit der Erhöhung der Zellzahl der TiL in der Kokultur (1:5, 1:10, 1:20), entsprechend der Erwartungen, signifikant angestiegen (Abb. 59 Bild A und B).

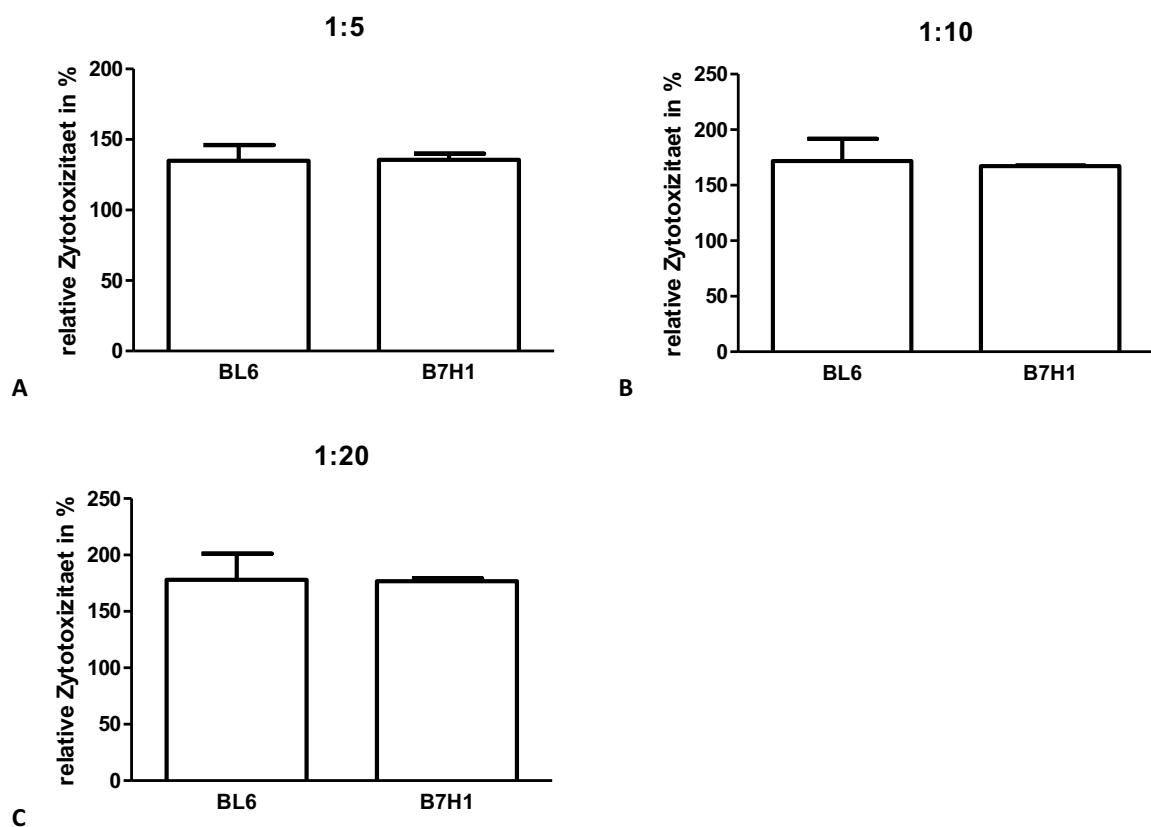


Abb. 56 Vergleich der relativen Zytotoxizität zwischen tumorinfiltrierenden Zellen aus C57/Bl-6 und aus B7H1 KO Mäusen. A: Vergleich der relativen Zytotoxizität bei einer Konzentration von 1:5. **B:** Vergleich der relativen Zytotoxizität bei einer Konzentration von 1:10. **C:** Vergleich der relativen Zytotoxizität bei einer Konzentration von 1:20.

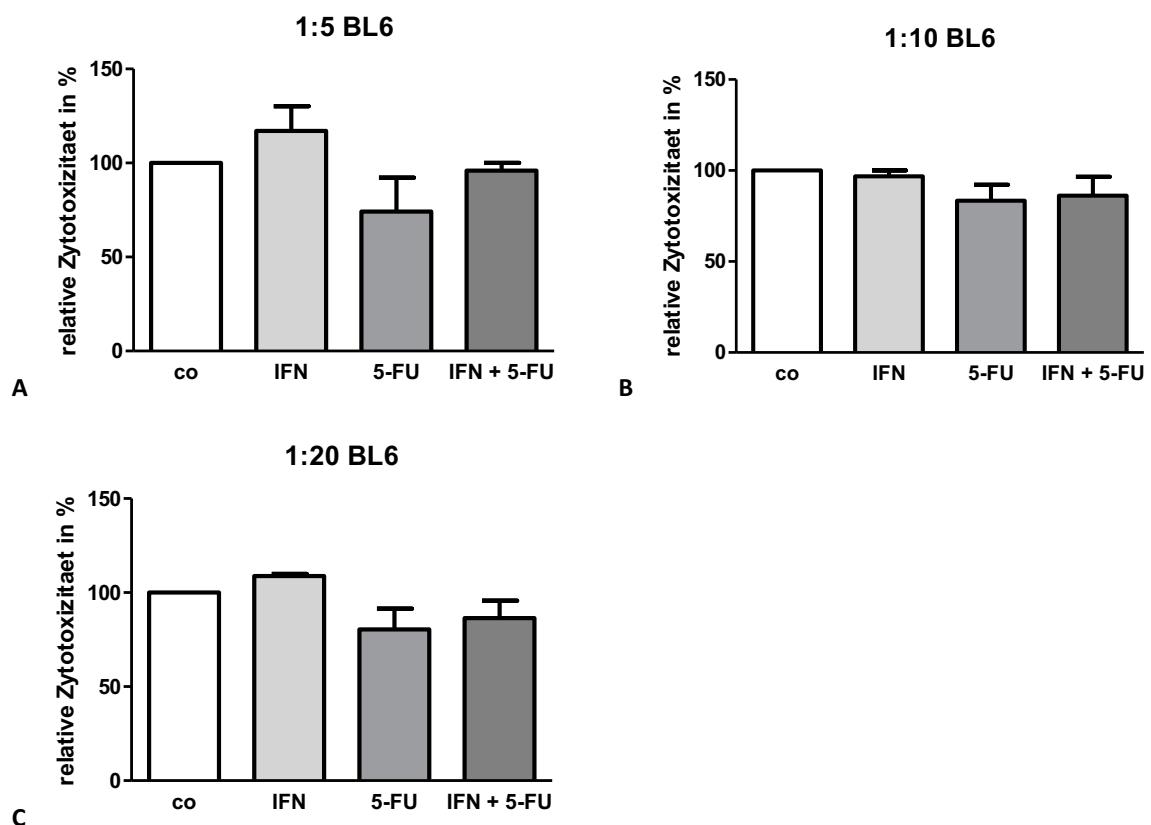


Abb. 57 relative Zytotoxizität der tumorinfiltrierenden Zellen aus C57/Bl-6 Mäusen in Abhängigkeit verschiedener *in vitro* Therapien. A: relative Zytotoxizität bei einer Konzentration von 1:5. B: relative Zytotoxizität bei einer Konzentration von 1:10. C: relative Zytotoxizität bei einer Konzentration von 1:20.

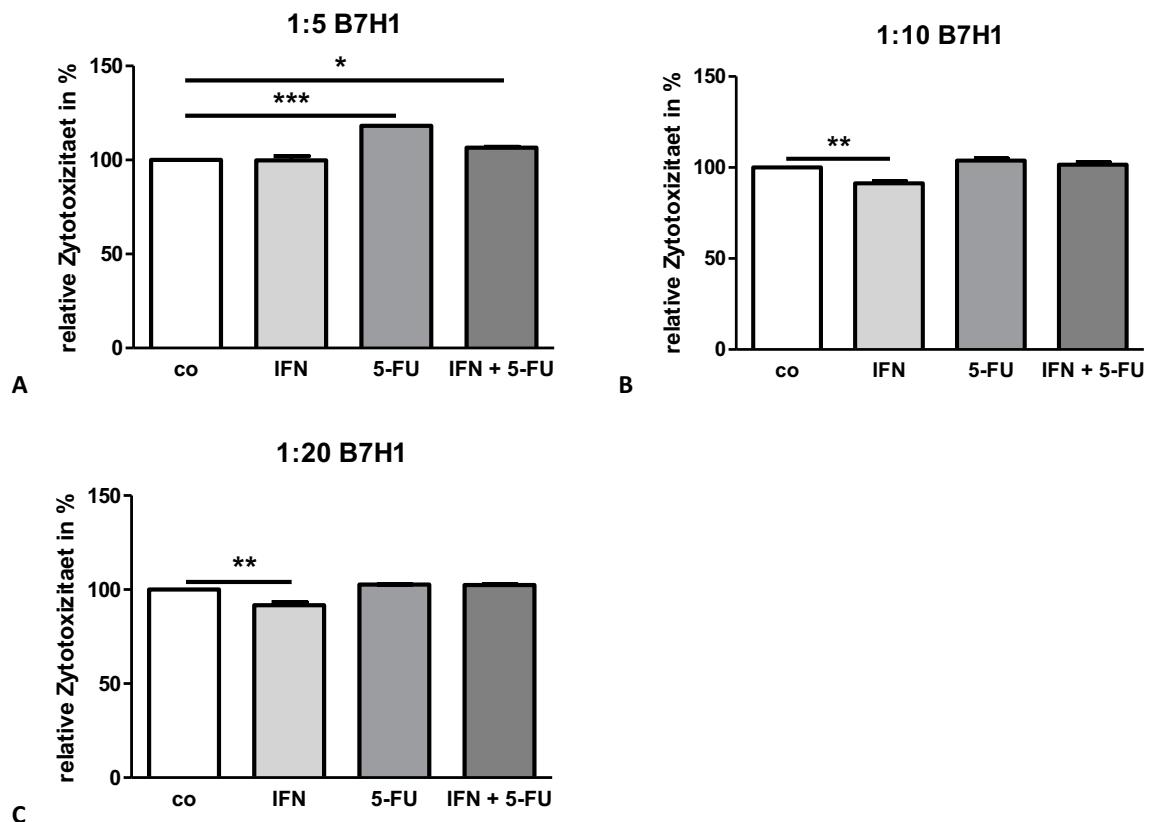


Abb. 58 relative Zytotoxizität der tumorinfiltrierenden Zellen aus B7-H1 KO Mäusen in Abhängigkeit verschiedener *in vitro* Therapien. A: relative Zytotoxizität bei einer Konzentration von 1:5. **B:** relative Zytotoxizität bei einer Konzentration von 1:10. **C:** relative Zytotoxizität bei einer Konzentration von 1:20. *p< 0,05. **p< 0,01. ***p< 0,001.

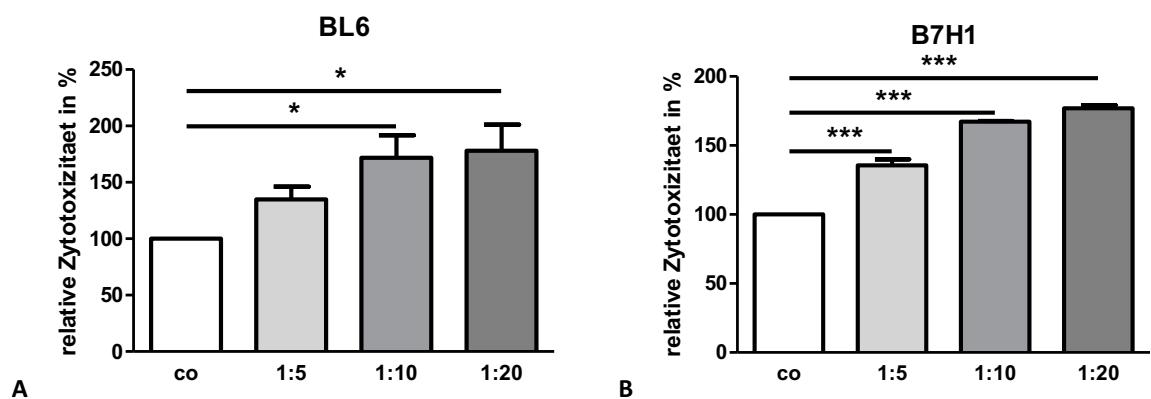


Abb. 59 Darstellung der relativen Zytotoxizität der tumorinfiltrierenden Zellen aus C57/Bl-6 und aus B7-H1 KO Mäusen in direktem Vergleich mit der Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen. A: relative Zytotoxizität der tumorinfiltrierenden Lymphozyten aus C57/Bl-6 Mäusen in folgenden Konzentrationen: 1:5, 1:10 und 1:20. **B:** relative Zytotoxizität der tumorinfiltrierenden Lymphozyten aus B7-H1 KO Mäusen in folgenden Konzentrationen: 1:5, 1:10 und 1:20. *p< 0,05. ***p< 0,001.

3.2.13 Bestimmung der Interferon gamma (IFN γ) Konzentration in der Panc02:TiL Kokultur (Vergleich C57/Bl-6 und B7-H1 KO)

Im Zuge der Zytotoxizitätsmessung wurde die Interferon gamma (IFN γ) Konzentration im Mediumüberstand der Panc02:TiL Kokultur mit Hilfe des enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) gemessen.

Im Mediumüberstand der Panc02:B7-H1 KO Kokultur (Kontrollgruppe) waren die IFN γ Konzentrationen im Vergleich zu den IFN γ Werten der Zellen der Panc02:C57/Bl-6 Kokultur mit guter Tendenz höher (Abb. 60 Bild A). Auch wenn die TiL der B7-H1 KO Mäuse zuvor mit 5-FU oder 5-FU+IFN α behandelt wurden, konnten höhere IFN γ Konzentrationen im Vergleich zu den Zellen der C57/Bl-6 Mäuse gemessen werden (Abb. 60 Bild B+C). Wurden hingegen die TiL der C57/Bl-6 Mäuse mit IFN α therapiert und die nachfolgenden IFN γ Werte mit denen der Zellen der B7-H1 KO Mäuse verglichen, so waren die IFN γ Werte bei den Zellen der C57/Bl-6 Mäuse tendenziell höher (Abb. 60 Bild D).

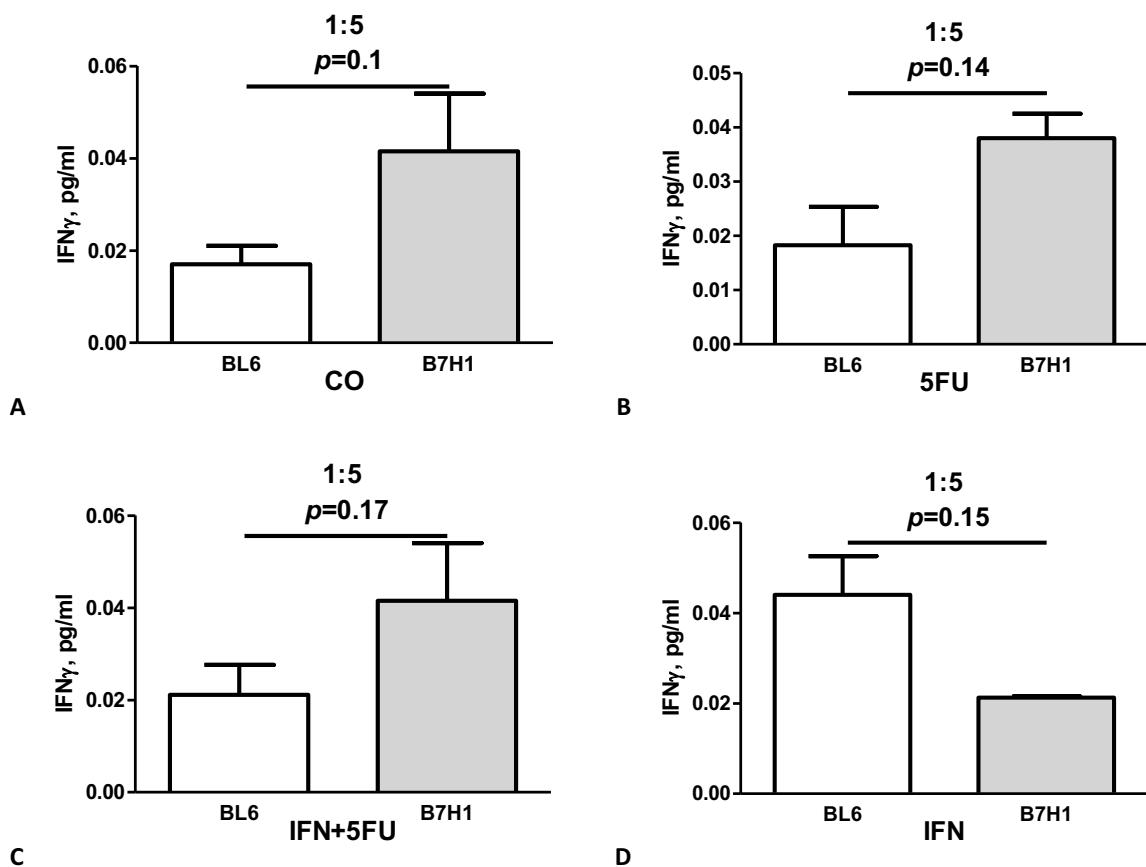


Abb. 60 Vergleich der Interferon gamma (IFN γ) Konzentration im Mediumüberstand der Kokulturen, bestehend aus TiL der C57/Bl-6 Mäuse (+ Panc02-Zellen), sowie aus TiL der B7-H1 KO Mäuse (+Panc02-Zellen). A: IFN γ Konzentration in der Kokultur C57/Bl-6 und in der Kokultur B7-H1 KO ohne Behandlung (Kontrollgruppe). B: IFN γ Konzentration in der Kokultur C57/Bl-6 und in der Kokultur B7-H1 KO nach der Behandlung mit 5-FU. C: IFN γ Konzentration in der Kokultur C57/Bl-6 und in der Kokultur B7-H1 KO nach der Behandlung mit 5-FU+IFN. D: IFN γ Konzentration in der Kokultur C57/Bl-6 und in der Kokultur B7-H1 KO nach der Behandlung mit IFN.

Wenn wir die IFNy Konzentration in den Kokulturen der C57/Bl-6 Mäuse und in den Kokulturen der B7-H1 KO Mäuse (jeweils in einer Konzentration von 1:5) in Abhängigkeit der Therapien direkt miteinander vergleichen, können wir feststellen, dass signifikant mehr IFNy ausgeschüttet wurde, wenn die tumorinfiltrierenden Lymphozyten mit IFN α behandelt wurden und aus tumortragenden C57/Bl-6 Mäusen stammten (Abb. 61).

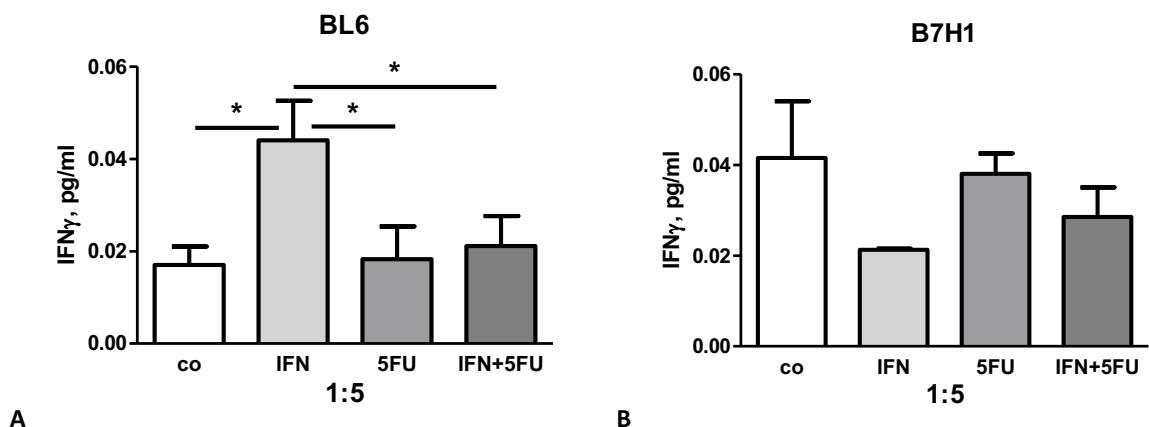


Abb. 61 Direkter Vergleich der Interferon gamma (IFNy) Konzentration im Mediumüberstand der C57/Bl-6 Kokultur (1:5) und der B7-H1 KO Kokultur (1:5) in Abhängigkeit verschiedener Therapeutika. A: IFNy Konzentration der C57/Bl-6 Kokultur. **B:** IFNy Konzentration der B7-H1 KO Kokultur.

Insgesamt konnte die Versuchsreihe somit zunächst zeigen, dass sich die Zytotoxizität der tumorinfiltrierenden Lymphozyten hinsichtlich der An- oder Abwesenheit des regulatorischen Moleküls B7-H1 nicht verändert. Leicht erhöht hat sich hingegen die Zytotoxizität der TiL der B7-H1 KO Mäuse, wenn diese zuvor mit 5-FU oder 5-FU+IFN α therapiert wurden, wohingegen deren Zytotoxizität nach der Behandlung mit IFN α leicht gesunken ist. In Hinblick auf die IFNy Konzentration im Mediumüberstand der Kokulturen konnte festgestellt werden, dass diese wesentlich höher lag, wenn die Zellen zuvor mit IFN α behandelt wurden und aus den C57/Bl-6 Mäusen stammten.

Um die gewonnenen Ergebnisse zu bestätigen und um weitere Zusammenhänge aufzuzeigen zu können, sollten zusätzliche Projekte durchgeführt werden.

4 Diskussion

Das Pankreasadenokarzinom (PaCa) stellt einen der aggressivsten Tumore weltweit dar und den betroffenen Patienten kann selten die Hoffnung auf Heilung und die Aussicht auf eine lange Überlebenszeit gegeben werden. Trotz intensiver Forschung an neuen Therapien gibt es bislang keine Möglichkeit, den Tumor langfristig zu bekämpfen und herkömmliche Chemo- wie auch Radiotherapien reichen nicht aus, um befriedigende Ergebnisse erzielen zu können. Seitdem man weiß, dass das Immunsystem stark an der Entstehung und Progression des PaCa beteiligt ist, werden zahlreiche Forschungsgruppen in der Entwicklung von Immuntherapien vor eine große Herausforderung gestellt. Sie müssen sowohl die aktivierenden als auch die hemmenden Funktionen des Immunsystems verstehen, die während der Immunantwort Einfluss auf deren weiteren Verlauf nehmen. Die kostimulatorischen Moleküle, die man beispielsweise auf den DC findet, führen physiologisch zu einer Immunantwort, indem sie T-Zellen aktivieren. Die regulatorischen Mechanismen in Form von molekularen Wegen, die zusammenfassend in der Literatur als immunologische Checkpoints beschrieben werden, haben gleichermaßen wichtige Aufgaben zu erfüllen. Sie verhindern durch ihre Anwesenheit die Entstehung von Autoimmunkrankheiten und allergischen Reaktionen. Im Tumorgeschehen ist es hingegen wünschenswert, dass antigenspezifische T-Zellen gegen Tumorzellen permanent und uneingeschränkt vorgehen. Dennoch dominieren in der Umgebung des PaCa viele immunsuppressorische Mechanismen, die sich vor allem aus T_{reg} , MDSC und dem B7-H1 Molekül zusammensetzen [40]. Die Arbeit der Forschungsgruppen zielt darauf ab, die Aufgabe und Wirkungsweise der immunsuppressorischen Mechanismen und immunologischen Checkpoints im Tumorgeschehen aufzudecken und diese Signalwege therapeutisch auszuschalten. Darüber hinaus muss bei der Verwendung von Immuntherapien bedacht werden, dass die Substanzen sowohl die kostimulatorischen Mechanismen wie auch die immunologischen Checkpoints positiv wie negativ beeinflussen können. Eine Studie der Mason Clinic in Seattle (monozentrische Studie Phase II) hat den Einsatz des Zytokins IFN α *in vivo* an PaCa erkrankten Patienten erprobt und vielversprechende Ergebnisse erzielen können. Der Studie nach zu urteilen sollte sich die Überlebenszeit der Patienten im Vergleich zu den herkömmlichen adjuvanten Therapien deutlich verlängert haben [93]. Einige Jahre später konnten die Ergebnisse einer vergleichbaren, klinischen Studie der multizentrischen Phase III (CapRI Stu-

die) jedoch nicht untermauert, sondern größtenteils widerlegt werden. Die CapRi Studie konnte zwar zeigen, dass IFN α Zellen des Immunsystems aktiviert, dennoch sind die Überlebenszeiten im Vergleich zur Monotherapie mit 5-FU und Folinsäure gleich geblieben [89, 91]. Aufgrund dieser Ergebnisse hat sich uns die Frage gestellt, wie genau sich der Einsatz von exogen zugeführtem IFN α auf die regulatorischen Moleküle (hier auf das B7-H1 Molekül), die immunsupprimierenden wie -stimulierenden Zellen und auf die Tumorzellen selbst auswirkt. Wir wissen, dass endogen produzierte IFN vom Typ I zytotoxische T-Zellen aktivieren und die Tumorzellzahl dezimieren, indem sie die Angiogenese vermindern und die Apoptose der Tumorzellen einleiten. Zusätzlich führen sie zu einer verminderten Expression von Onkogenen und zu einer vermehrten Expression von Suppressor-Genen [84-86]. Unsere *in vitro* Untersuchungen sollten zeigen, ob exogen zugeführtes IFN α neben den aktivierenden Mechanismen des Immunsystems auch die supprimierenden Mechanismen beeinflussen und damit doppelseitige Wirkungen auslösen kann.

Da B7-H1 als regulatorisches Molekül und Hauptligand des PD-1 Rezeptors ein essentieller Bestandteil des regulatorischen Arms des Immunsystems ist und durch dessen Bindung an PD-1 auf physiologischer Ebene Autoimmunreaktionen und Allergien im Organismus verhindert werden, wird dieser Signalweg zu den wichtigen immunologischen Checkpoints gezählt [53]. Weil wissenschaftlich längst bewiesen ist, dass das B7-H1 Molekül eine wichtige Rolle in der Entwicklung des PaCa einnimmt [94] und dessen Expression auf Immunzellen von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen wie IFN β [95], IFN γ [60, 96] und IL-27 [97] erhöht werden kann, ist von großer Bedeutung ob IFN α die B7-H1-Expression ebenfalls verstärkt. Demnach würde eine Immunantwort stark gehemmt werden und das Tumorwachstum könnte fortschreiten.

In dieser Arbeit wurden sowohl die Immunzellen aus gesunden Mäusen wie auch aus tumortragenden Mäusen *in vitro* auf die Expression des B7-H1 Moleküls untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss von IFN α auf die Immunzellen und auf die Tumorzelllinie Panc02 dokumentiert. Alle Untersuchungen wurden *in vitro* angefertigt und neben IFN α kamen auch die herkömmlichen Chemotherapeutika 5-FU und Gemcitabin zum Einsatz, da IFN α in der Tumortherapie selten als einzige Substanz eingesetzt wird.

Die Untersuchungen konnten zeigen, dass der Einsatz von IFN α *in vitro* die Expressionsstärke von B7-H1, die anhand des MFI Wertes gemessen wurde, auf den Zellen der Panc02-Zelllinie signifikant erhöht. Bislang war bekannt, dass IFN γ eines der Hauptzytokine ist, das die Ex-

pression von B7-H1 auf den Tumorzellen induzieren kann [98, 99]. Loos und Kollegen ist es gelungen, den Einfluss von IFNy auf die B7-H1 Expression zweier Pankreaskarzinom-Zelllinien, den sogenannten MiaPaca-2 und SE8686, zu erforschen. Nur durch die *in vitro* Zugabe von IFNy erhöhte sich die B7-H1 Expression auf den Tumorzelllinien signifikant, andere Zytokine führten zu keinen signifikanten Veränderungen [100]. Neben Loos et al. hat auch die Arbeitsgruppe von Dong et al. humane Gewebeproben unterschiedlicher Tumore auf die Expression von B7-H1 hin untersucht und nachfolgend die Tumorzelllinien mit IFNy behandelt. Auch hier führte die Zugabe von IFNy zu einer vermehrten B7-H1 Expression. Selbst Tumorzelllinien, die zuvor kaum oder keine Expression von B7-H1 aufgewiesen haben, exprimierten mit IFNy das B7-H1 Molekül [58]. Somit konnten unsere Untersuchungen zeigen, dass nicht nur Interferone vom Typ II die Expression von B7-H1 auf Tumorzellen erhöhen können, sondern auch Interferone vom Typ I. Wir können annehmen, dass exogen zugeführtes IFN α nicht wie erwartet ausschließlich zu einer Anti-Tumor-Immunantwort führt, sondern auch als „Nebenwirkung“ die Aktivierung des immunologischen Checkpoints B7-H1:PD-1 herbeiführt, wodurch das Tumorwachstum unerwünscht begünstigt werden kann. Während Bui und Kollegen zeigen konnten, dass IFN α , welches *in vitro* zu murinen Tumorzellen hinzugefügt wird, zu einer verminderten Expression des H60 Liganden und somit zu einer verminderten Tumorprogression führt [101], kann das exogen zugeführte IFN α *in vitro* die Mechanismen, die eine Anti-Tumor-Immunantwort begünstigen, allerdings auch verringern. Im Vorfeld konnten Dong und Kollegen zeigen, dass die *in vitro* Zugabe von IFN α zu einer Melanomzelllinie (624mel) die Expression von B7-H1 signifikant erhöht, die ihrerseits in humanen *in vitro* Versuchen zu einer erhöhten Apoptoserate der zytotoxischen T-Zellen führt [58]. Aus unseren und den oben genannten Ergebnissen können wir den Rückschluss ziehen, dass unter dem Einfluss von IFNy und IFN α signifikant mehr B7-H1 Moleküle von den Tumorzellen exprimiert werden, wodurch sich die Chance für die zytotoxischen T-Zellen, Tumorzellen zu vernichten, signifikant verringert.

Zusätzlich konnten unsere Untersuchungen aufzeigen, dass die VEGF Konzentration im Mediumüberstand der Panc02 + IFN α Kultur im Vergleich zur Kontrolle signifikant höher lag. VEGF fördert nicht nur die Angiogenese der Tumorzellen [102], VEGF besitzt auch die Fähigkeit, das Einwandern von T-Zellen in die direkte Umgebung von Tumoren zu verringern und gleichzeitig die Akkumulation von MDSC und T_{reg} zu erhöhen. Da in unseren Untersuchungen die VEGF Konzentrationen in den Panc02-Kulturen, die mit IFN α versetzt wurden, deutlich

höher lagen, nehmen wir an, dass IFN α auch auf diesem Weg das Tumorwachstum ungewollt fördert [103]. Des Weiteren führt der Einsatz von IFN α aber auch zu signifikant erhöhten IL-2 Werten, was wiederum die These untermauert, dass IFN α die Anti-Tumor-Immunantwort fördert. Denn IL-2 (auch als T cell growth factor bekannt) begünstigt das Wachstum und die Differenzierung verschiedener T-Zellen und mit dem Einsatz von IL-2 konnten in der Tumortherapie bereits sehr positive Erfolge erzielt werden [104].

Neben der Expression von B7-H1 auf Tumorzellen kann das B7-H1 Molekül auch auf Immunzellen ausgebildet werden [54] und die Immunantwort gegen das PaCa reduzieren, weshalb wir weitere Untersuchungen durchgeführt haben. Diese sollten die Expression von B7-H1 auf bestimmten Immunzellen gesunder und tumortragender Mäuse unter dem Einfluss von IFN α aufzeigen. Trotz der murinen Studie von von Hoegen und Kollegen, in der beschrieben ist, dass IFN α zwingend notwendig ist, um eine zytotoxische T- Zell Antwort gegen Tumore auszulösen [105], dürfen wir nicht außer Acht lassen, dass IFN α ein sehr breites Wirkspektrum besitzt und neben der Aktivierung auch eine Suppression der Immunantwort auslösen kann. Wenn sowohl IFN γ als auch IFN α dazu in der Lage sind, die Expression von B7-H1 auf den Tumorzellen zu erhöhen [58], kommt zwangsläufig die Frage auf, ob IFN α nicht auch die B7-H1 Expression auf Immunzellen erhöhen kann.

Tatsächlich führte in unseren Untersuchungen die *in vitro* Zugabe von IFN α zu den Immunzellen aus gesunden wie aus tumortragenden Mäusen auf allen CD4 und CD8 positiven Zellen, inklusive deren Subpopulationen (T_{naive} , T_{eff} , T_{em} und T_{cm}), zu signifikant erhöhten B7-H1 Expressionsraten. Eine signifikant höhere Expressionsrate des B7-H1 Moleküls konnte auch nach der Behandlung mit IFN α in Kombination mit den herkömmlichen Chemotherapeutika festgestellt werden, was sehr wahrscheinlich auf den Einfluss von IFN α zurückzuführen ist, da die Monotherapie mit 5-FU oder Gem zu keinen signifikanten Veränderungen führte. Neben den CD4 und CD8 positiven Zellen haben weitere Immunzellen eine vermehrte B7-H1 Expressionsrate in Folge der Therapie mit IFN α aufgewiesen. Zu diesen zählen sowohl die aktivierenden Immunzellen (Makrophagen, DC und T_{con}) wie auch die regulierenden Immunzellen (MDSC und T_{reg}). Somit kann IFN α die B7-H1 Expression auf den verschiedensten Immunzellen hochregulieren. Bereits Planès und Kollegen konnten zeigen, dass die Expression von B7-H1 auf den Immunzellen, in deren Arbeit speziell auf Monocyte-derived dendritic cells (MoDC), durch die Anwesenheit des Zytokins TNF α erhöht wird [106]. Auch *in vitro* Studien unserer Arbeitsgruppe konnten beweisen, dass das proinflammatorische Zytokin IL-27

die Expression von B7-H1 auf humanen DC verstärkt [97], während Jin und Kollegen in humanen *in vitro* Studien herausfinden konnten, dass die B7-H1 Expression auf DC durch den Einfluss von IL-6 zunimmt [107]. Demnach dürfen wir den Einfluss proinflammatorischer Zytokine nicht vernachlässigen.

Die dendritischen Zellen (cDC und pDC) nehmen eine besondere Stellung während der Immunantwort ein. Sie verbinden durch ihre Aufgabe das angeborene Immunsystem mit dem erworbenen Immunsystem. Um Antigene präsentieren zu können, müssen sie sich zunächst verschiedenen Aktivierungsschritten unterziehen [41, 43]. Als antigenpräsentierende Zellen (APC) vereinen die DC letzten Endes die beiden Teile des Immunsystems und können eine optimale Immunantwort veranlassen. Auf den dendritischen Zellen können sowohl kostimulatorische Moleküle (CD86, CD80) wie auch regulatorische Moleküle (B7-H1) exprimiert werden [41, 43]. Anhand dieser Zellen war es möglich zu sehen, inwiefern IFN α die immunstimulierenden wie auch -supprimierenden Moleküle aktiviert oder reguliert. Wir konnten zeigen, dass IFN α *in vitro* die Expressionsrate von B7-H1 auf den cDC und pDC aus gesunden und tumortragenden Mäusen signifikant erhöht. Somit verstärkt IFN α auf ausnahmslos allen untersuchten Zellen die B7-H1 Expression. Vergleichbare Ergebnisse konnten die Arbeitsgruppen von Chen et al. und Mühlbauer et al. erzielen. In der Studie von Chen et al. wurden humane mDC aus gesunden Patienten *in vitro* mit IFN γ und IFN α behandelt [96]. Mühlbauer und Kollegen kultivierten zwei verschiedene Hepatozyten-Zelllinien mit IFN α und IFN γ [108]. In beiden Studien führte der Einsatz der IFN vom Typ I und II zu einer signifikanten Steigerung der B7-H1 Expression. Eine Studie von Schreiner et al. untermauert die oben aufgeführten Ergebnisse. Seine Arbeitsgruppe stellte fest, dass sich die B7-H1 Expression auf den Monozyten gesunder Patienten im Vergleich zu den Monozyten von an Multipler Sklerose (MS) erkrankten Patienten nicht unterschied. Die nachfolgende *in vitro* Behandlung der Monozyten, wie auch die *in vivo* Behandlung der an MS erkrankten Patienten mit IFN β (IFN Typ I), führte hingegen zu einer signifikanten Steigerung der B7-H1 Expression auf den Monozyten. Wurde IFN β den Patienten intramuskulär verabreicht, konnte bereits nach 24h eine Steigerung der B7-H1 Expression auf den Monozyten detektiert werden [95]. Anhand der Ergebnisse können wir davon ausgehen, dass der therapeutische Einsatz von IFN α zu einer vermehrten Expression von B7-H1 und dadurch zu einer eingeschränkten Wirkung und Funktion der DC führt. Zusätzlich konnten wir in dieser Arbeit und in unseren anderen Studien auf den T_{reg} und T_{con} Zellen tumortragender Mäuse sehen, dass die Therapie mit IFN α zu einem signifi-

kant geringeren Anteil der CD69 Moleküle (früher Aktivierungsmarker) führt [90]. Dieses Ergebnis bekräftigt unsere Annahme, dass IFN α neben der T-Zell-Aktivierung die T-Zellen auch negativ beeinflussen kann.

Um die doppelseitige Wirkung von IFN α aufzuzeigen, müssen wir auch den Einfluss von IFN α auf die kostimulatorischen Moleküle der DC betrachten. Wir konnten zeigen, dass die Expression von CD80 und CD86 vor allem auf den cDC gesunder und tumortragender Mäuse *in vitro* mit der Zugabe von IFN α signifikant ansteigt. Diesen positiven Einfluss von IFN α auf die Entwicklung der DC zeigten auch die Arbeiten von Luft et al. und Santini et al. Die Arbeitsgruppe von Luft et al. generierte *in vitro* aus humanen CD34 $^+$ Vorläuferzellen DC, die sich innerhalb von 4 Wochen zu reifen CD80/CD86 positiven DC ausdifferenzierten. Einzig die Zugabe von IFN α/β beschleunigte die Reifung und vor allem die Expression von CD80 und CD86 auf den DC hoch signifikant [109], wodurch anzunehmen ist, dass IFN vom Typ I die Aktivierung der DC erzielen. Santini und Kollegen kultivierten humane Monozyten mit GM-CSF und IFN vom Typ I. Sie erreichten durch die Zugabe von IFN α eine stärkere T-Zell-Antwort [110] und einen rapiden Anstieg der Expression von CD80/CD86 [111]. Auch die Arbeit von Radvanyi et al. ergab, dass die *in vitro* Zufuhr von IFN α zu einer humanen PBMC Kultur (peripheral blood mononuclear cells) einen signifikanten Anstieg des CD86 Moleküls bewirkt [112].

Ähnliche Ergebnisse konnten auch durch Studien gewonnen werden, die den Einfluss von IFN α auf DC im virus- oder tumortragenden Organismus untersucht haben. Versetzt man die mit GM-CSF und IFN α generierten DC in der Kultur mit Peptiden, die den Epitopen des Epstein-Barr Virus entsprechen, wird die Differenzierung der Monozyten zu DC (APC) signifikant begünstigt und es entsteht eine spezifische CD8 T-Zell Antwort, die aufgrund der Anwesenheit von IFN α im Vergleich zur Kontrollgruppe (GM-CSF und IL-4) wesentlich zytotoxischer ist [113]. Auch in *in vivo* Studien, die IFN α zusätzlich zur Standardtherapie an tumortragende Patienten verabreicht hatten, konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Mengenzunahme der CD80/CD86 Moleküle registriert werden [114]. Wir können anhand unserer Ergebnisse bezüglich der CD80/CD86 und B7-H1 Expression auf den cDC davon ausgehen, dass der Anstieg dieser Moleküle eine uns bekannte physiologische Reaktion des Immunsystems wiedergibt. Der Anstieg regulatorischer Moleküle (hier des B7-H1 Moleküls) stellt eine physiologische Gegenreaktion zum Anstieg kostimulatorischer Moleküle (hier der CD80/CD86 Moleküle) dar, um eine zu starke Immunantwort zu verhindern [53]. Allerdings

kann, wie bereits erwähnt, das B7-H1 Molekül unabhängig von der Anwesenheit kostimulatorischer Moleküle auch aufgrund der Anwesenheit von Zytokinen hochreguliert werden [60, 95, 96] und die Aktivität der DC stark verringern [97]. Dies könnte ein Grund dafür sein, weshalb in unseren Untersuchungen das B7-H1 Molekül, nicht aber die kostimulatorischen Moleküle auf den pDC angestiegen sind.

Erstaunlicherweise zeigte die *in vitro* Zugabe von IFN α in unserer Arbeit kaum einen Einfluss auf die Expression von CD80/CD86 auf den pDC, wodurch im weiteren Sinne deren Aktivierung nicht begünstigt wird. In der Literatur sind Studien beschrieben, die zu ähnlichen Ergebnissen führten. So kultivierten Dauer und Kollegen *in vitro* humane Monozyten mit GM-CSF und IFN vom Typ I und konnten weder die Ausdifferenzierung der Monozyten zu DC noch deren typischen Charaktereigenschaften feststellen [115]. Diese divergierenden Ergebnisse lassen den Rückschluss zu, dass die Expression kostimulatorischer Moleküle komplexen Vorgängen unterliegt und von multiplen Mechanismen reguliert wird. In unseren Untersuchungen erhöhte auch die *in vitro* Zugabe von 5-FU zu den Splenozyten die Expressionsrate von CD80 auf den cDC. Da auch eine größere Zellzahl der pDC aus tumortragenden Mäusen CD80 unter der Therapie von 5-FU und 5-FU+IFN α , nicht aber mit IFN α alleine, exprimiert, scheint die Chemotherapie mit 5-FU Auswirkungen auf die Expression kostimulatorischer Moleküle zu haben. Die Verwendung von Chemotherapeutika führt nicht nur zur Lyse von Tumorzellen und gesunden Zellen, sondern kann auch die Freisetzung sogenannter DAMPs (damage-associated molecular pattern molecules) auslösen, die die Differenzierung und Aktivierung der DC begünstigen sollen. Es wurde nachgewiesen, dass 5-FU die Freisetzung von DAMPs veranlassen kann, was folgend zu einem signifikanten Anstieg von CD80 und CD86 auf humanen DC führte [116].

Neben CD80 und CD86 kann 5-FU als Chemotherapeutikum auch die Expression von B7-H1 auf bestimmten Immunzellen begünstigen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Zugabe von 5-FU in die Kultur bei folgenden Immunzellfraktionen zu signifikant erhöhten B7-H1 Expressionsraten führt: Bei den cDC aus gesunden und tumortragenden Mäusen und bei den Makrophagen, MDSC und monozytären MDSC tumortragender Mäuse. Bislang gibt es zwar keine veröffentlichten Daten, die zeigen, dass 5-FU die Expression von B7-H1 auf Immunzellen fördert, aber es gibt Studien, die beweisen konnten, dass 5-FU wie auch andere Chemotherapeutika in der Lage sind, die Expression von B7-H1 auf Tumorzellen signifikant zu erhöhen [117-119]. Obwohl in unserer Arbeit aufgrund der Behandlung mit 5-FU und Gemcitabin kei-

ne Steigerung der B7-H1 Expression auf der Panc02-Zelllinie zu sehen war, erhöhte sich signifikant die Expressionsrate von B7-DC, dem zweiten Ligand des PD-1 Rezeptors, nach der Zugabe von Gemcitabin. Anhand von 5-FU exprimierte eine signifikant höhere Tumorzellzahl das B7-DC Molekül. Die verstärkte Expression des B7-H1 Moleküls nach Zugabe der Chemotherapeutika ist überwiegend auf den CD4⁺/CD8⁺ Zellen und den DC zu beobachten. Der Einfluss der Chemotherapie scheint jedoch unabhängig davon zu sein, ob die Zellen aus gesunden oder tumortragenden Mäusen stammen. Ob die Chemotherapeutika dadurch die Anti-Tumor-Immunantwort negativ beeinflussen, bleibt fraglich, muss aber sicherlich in Erwägung gezogen werden.

Des Weiteren konnten unsere Untersuchungen zeigen, dass die Expressionsstärke der Moleküle B7-H1, CD80 und CD86 auf den DC, vor allem der pDC, der tumortragenden Mäuse im Vergleich zu den Zellen gesunder Mäuse signifikant höher liegt. Neben dem Vergleich der Kontrollgruppen waren die Expressionsraten von B7-H1, CD80 und CD86 auch nach Zugabe der Immun- und/oder Chemotherapeutika deutlich höher auf den DC der tumortragenden Mäuse. Wir gehen davon aus, dass dieses Ergebnis eine generelle Aktivierung des Immunsystems aufgrund des Tumorgeschehens widerspiegelt. Es ist beschrieben, dass neoplastische Vorgänge zur Expression der TAA (tumor-associated antigens) führen können, die das Immunsystem aktivieren [120]. Auch für das PaCa konnte die Anwesenheit der sogenannten cancer testis Antigenen (CT-Antigene) bewiesen werden, die zur Entstehung der Anti-Tumor-Immunantwort beitragen [40, 121]. Die oben aufgeführte gesteigerte Expression kostimulatorischer und regulatorischer Moleküle auf den DC des tumortragenden Organismus bekräftigt den Gedanken, das PaCa mit Hilfe von Immuntherapien zu bekämpfen.

Wir finden in unserer Arbeit keinen Anhaltspunkt dafür, dass IFN α neben den oben aufgeführten Molekülen auch die Zellen des Immunsystems (weder die aktivierenden noch die regulierenden) beeinflusst. Entgegen zahlreicher Ergebnisse von humanen und murinen Studien, die *in vitro* und/oder *in vivo* durchgeführt wurden und aufzeigten, dass IFN α Zellen wie NK-Zellen, DC, CD4 und CD8 positive Zellen aktiviert und deren Proliferation fördert [40, 85, 90], zeigen unsere Daten aufgrund der Zugabe von IFN α bei keiner der untersuchten Immunzellfraktionen einen signifikanten prozentualen Anstieg der Zellzahl. Auch keine der anderen Therapien (Chemotherapie, Kombinationstherapien) ergaben im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikante Ergebnisse.

Die vorliegenden Daten dieser Arbeit weisen eher das Gegenteil auf. Mit der Zugabe von IFN α zu den Zellen aus gesunden Mäusen reduzierte sich der prozentuale Anteil der T_{eff} in Bezug auf die CD8 $^{+}$ T-Zellen wie auch der prozentuale Anteil der T_{em} in Bezug auf die CD4 $^{+}$ T-Zellen signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe. Überraschenderweise führte IFN α auch bei den folgenden Zellen aus tumortragenden Mäusen zu signifikant verringerten Prozentzahlen: T_{eff} der CD4 und T_{eff} der CD8 positiven T-Zellen. In veröffentlichten *in vivo* Versuchen führt sowohl die Verabreichung von IFN α (+Standardtherapie) an Patienten, die an einem Melanom Grad IV erkrankt sind, wie auch die alleinige IFN α Therapie in niedriger Dosierung bei Patienten mit einem PaCa zu signifikant mehr T_{eff} [40, 114]. Auch murine *in vivo* Studien konnten zeigen, dass der Einsatz von IFN α zu einer lang anhaltenden Tumor-Immunantwort führt, die sich meist in der dominierenden Anwesenheit der T_{em} und T_{cm} Zellen widerspiegelt [122]. Man könnte annehmen, dass das Ergebnis unserer Arbeit im Vergleich zu anderen Ergebnissen gegenteilig ist, weil mit *in vitro/ex vivo* und nicht mit *in vivo* Versuchen gearbeitet wurde. Es sind aber auch *in vitro* Studien beschrieben, die aufzeigen, dass humane Monozyten, die mit IFN α und GM-CSF kultiviert wurden, in einem weiteren Kultivierungsschritt zu einer signifikanten Steigerung der T_{em} führten [113], die sich bei einem wiederholten Antigenkontakt zu T_{eff} entwickeln können. Selbst wenn wir die prozentualen Anteile der T_{eff} Zellen aus gesunden Mäusen mit denen aus tumortragenden direkt vergleichen, konnten wir keinen signifikanten Anstieg der T_{eff} Zellen aus tumortragenden Mäusen anhand der Behandlung mit IFN α sehen. Demzufolge muss man den Einsatz von IFN α kritisch betrachten, denn die Auswirkungen von IFN α auf die Immunzellen scheinen individuell und modellabhängig zu sein.

Übereinstimmungen mit zahlreichen anderen Studien können wir mit unseren Ergebnissen bezüglich der T_{reg} Zellen aus Splenozyten sehen. Im Vergleich der T_{reg} Zellen aus gesunden und aus tumortragenden Mäusen konnten wir feststellen, dass der prozentuale Anteil der T_{reg} Zellen in Bezug auf die CD4 $^{+}$ T-Zellen signifikant höher liegt, wenn die Zellen aus gesunden Mäusen stammen. Eine mögliche Erklärung, weshalb die kultivierten Splenozyten gesunder Mäuse einen höheren Anteil an T_{reg} enthalten, als die Splenozyten der tumortragenden, kann darin liegen, dass die T_{reg} Zellen im tumortragenden Organismus ins Mikromilieu des Tumors abwandern und sich dort ansammeln. Damit untermauern wir unsere früheren Ergebnisse, die anhand des murinen orthotopen Panc02-Modells bereits zeigen konnten, dass das Tumorgewebe von zahlreichen T_{reg} Zellen infiltriert wird [123]. Tumorzellen schei-

nen in der Lage zu sein, T_{reg} Zellen in ihre direkte Umgebung zu mobilisieren [124]. Während der Tumorgenese erhöht sich die Zahl der T_{reg} Zellen signifikant [125, 126], was im Rückkehrschluss oft eine geringe Anzahl an T_{reg} Zellen in der Milz zur Folge hat.

Weil die Ergebnisse dieser Arbeit deutlich zeigen konnten, dass IFN α die Expression von B7-H1 signifikant erhöht, ist es von Interesse, ob sich die Zytotoxizität der tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TiL) unter dem Einfluss von IFN α verändert. Zusätzlich wurden hierfür B7-H1 KO Mäuse verwendet, denen es nicht möglich ist, das B7-H1 Molekül auf den Immunzellen zu exprimieren. Wir haben zunächst vermutet, dass die Zytotoxizität der TiL der B7-H1 KO Mäuse unter dem Einfluss von IFN α signifikant höher liegen muss als die der TiL der C57/Bl-6 Mäuse. Unsere Ergebnisse ergaben allerdings keine signifikanten Unterschiede bezüglich der relativen Zytotoxizität zwischen den TiL der B7-H1 KO Mäuse und denen der C57/Bl-6 Mäuse. Wir konnten gegenteilig feststellen, dass die TiL der B7-H1 KO Mäuse nach der Behandlung mit IFN α signifikant weniger zytotoxisch waren, als die vergleichbaren TiL der C57/Bl-6 Mäuse. Es ist fraglich, ob die geringere Zytotoxizität auf den Einfluss von IFN α zurückzuführen ist. Wir haben bereits murine *in vivo* Studien durchgeführt, die einen Vergleich von Immunzellen und Zytokinen zwischen gesunden B7-H1 KO Mäusen und gesunden C57/Bl-6 Mäusen herstellen sollten. Die Studien konnten zeigen, dass die Splenozyten von B7-H1 KO Mäusen deutlich weniger NK-Zellen und mehr T_{reg} Zellen beinhalten [127]. Da T_{reg} Zellen NK-Zellen hemmen können [128], kann eine Begründung für die geringere Zytotoxizität der TiL der B7-H1 KO Mäuse möglicherweise in der verringerten Funktion zytotoxischer NK-Zellen liegen. Zusätzlich konnte in diesen Studien eine geringere IL-2 Konzentration im Serum der B7-H1 KO Mäuse gemessen werden [127], was wie bereits erwähnt eine geringere Differenzierung von T-Zellen zur Folge haben kann [104]. Unsere jetzigen Untersuchungsergebnisse können aber auch die Tatsache widerspiegeln, dass die TiL eine sehr heterogene Subpopulation bilden und aus einer Vielzahl von Zellen bestehen, die das Tumorwachstum positiv wie negativ beeinflussen können [129]. Daher ist es wichtig, die TiL näher einzugrenzen, indem man beispielsweise nur die zytotoxischen CD8 $^{+}$ T-Zellen betrachtet, um detaillierte Ergebnisse erhalten zu können.

Im Rahmen der Zytotoxizitätsmessung haben wir die IFN γ Konzentrationen im Mediumüberstand der angefertigten Kokulturen gemessen. Interessanterweise waren die IFN γ Konzentrationen der unbehandelten B7-H1 KO Kokultur im Vergleich zur unbehandelten C57/Bl-6 Kokultur signifikant höher, was sich mit früheren Ergebnissen erklären lässt. Bereits 2002

stellten Dong et al. fest, dass IFN γ die B7-H1 Expression auf verschiedenen Tumorzelllinien verstärken kann, was nachfolgend zur Apoptose zytotoxischer T-Zellen führt [58]. Es folgten weitere Studien, in denen bestätigt werden konnte, dass IFN γ die B7-H1 Expression verstärkt [130-132]. Andererseits konnte auch gezeigt werden, dass die Expression von B7-H1 dazu führt, dass T-Zellen die Ausschüttung von IFN γ verringern [62, 97]. Die höheren IFN γ Werte der B7-H1 KO Kokultur kann man eventuell damit begründen, dass den B7-H1 KO Mäusen die Fähigkeit zur Expression des B7-H1 Moleküls fehlt und kein negativer Feedback-Mechanismus stattfindet, der die IFN γ Ausschüttung beendet. Wenn die Kulturen allerdings mit IFN α versetzt wurden, lagen die IFN γ Konzentrationen in den C57/Bl-6 Kokulturen signifikant höher. Wir gehen anhand der Ergebnisse davon aus, dass IFN α die Ausschüttung des IFN γ Zytokins begünstigen und aufgrund der daraus resultierenden verstärkten B7-H1 Expression die Immunantwort hemmen kann. Demnach kann IFN α die Expression von B7-H1 sowohl direkt wie auch indirekt über den Einfluss von IFN γ erhöhen (siehe Abb. 62). Nichtdestotrotz sind, wie bereits erwähnt, die TiL der C57/Bl-6 Mäuse, die mit IFN α versetzt wurden, gegenüber den TiL der B7-H1 KO Mäuse dennoch zytotoxischer. Inwiefern IFN α auf die Zytotoxizität der TiL überhaupt einen Einfluss hat, bleibt somit fraglich.

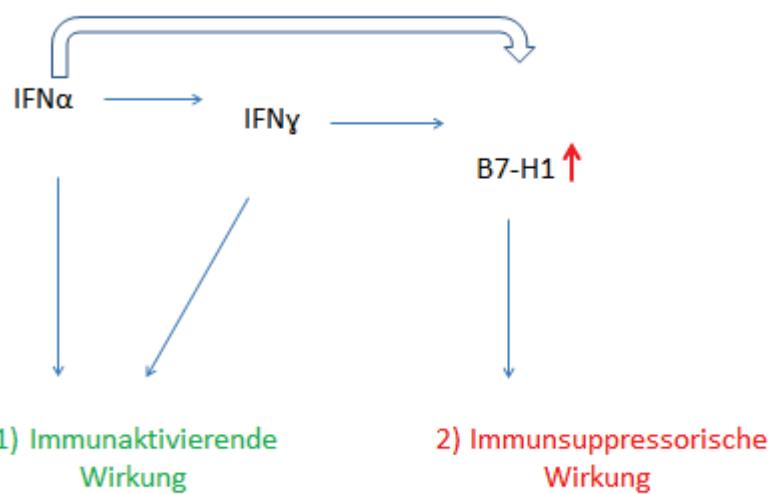


Abb. 62 Schematische Darstellung des Einflusses von IFN α auf die Ausschüttung des Zytokins IFN γ , die ihrerseits zu einer vermehrten Expression von B7-H1 führt, wodurch das Tumorwachstum begünstigt werden kann.

Summa summarum können wir zu dem Resultat kommen, dass der therapeutische Einsatz von IFN α in der Onkologie mit mehr Vorsicht und kritischem Blick betrachtet werden muss. Aufgrund unserer Ergebnisse müssen wir davon ausgehen, dass die Verwendung von IFN α neben den aktivierenden Mechanismen auch die immunsupprimierenden Mechanismen des Immunsystems verstärkt. Diese doppelseitige Wirkung stellt den alleinigen Einsatz von IFN α in der Tumortherapie in Frage. Es sollte vielmehr die Kombination aus mehreren Substanzen angestrebt werden, um die unerwünschten Nebenwirkungen von IFN α , die sich in einer Aktivierung immunsuppressorischer Mechanismen äußern, zu minimieren. Eine Möglichkeit bietet sicherlich die Kombination aus IFN α und einem Blocking-Antikörper gegen das B7-H1 Molekül, um die verstärkte Expression von B7-H1, ausgelöst durch IFN α , zu neutralisieren. Es müssen therapeutische Strategien gefunden werden, sodass ausschließlich nur die positiven Wirkungen von IFN α eintreten.

5 Zusammenfassung

In vitro Effekte von Interferon alpha und Chemotherapeutika auf das B7-H1 Moleköl

im Pankreasadenokarzinom

Charakteristisch für das Pankreasadenokarzinom (PaCa) ist dessen hohe Aggressivität, die schnelle Metastasierungsrate, die Resistenz gegenüber Chemo- und Radiotherapeutika und die damit verbundene schlechte Prognose, die nahezu infaust ist. Bislang stehen der Wissenschaft keine Therapien zur Verfügung, die die Entwicklung des PaCa vollständig zum Stillstand bringen und eine dauerhafte Regression des Tumors veranlassen, weshalb neue Therapien benötigt werden. Während der Progression des Tumors kommt es neben der Anreicherung von immunsupprimierenden Zellen zu einer Aktivierung des immunologischen Checkpoints B7-H1:PD-1, der eine aktive Immunantwort gegen das PaCa minimiert. Aufgrund der Beteiligung des Immunsystems an der Tumorentwicklung wird der Einsatz von immunologisch wirksamen Substanzen erforscht. Das Ziel derartiger Therapien besteht neben der Aktivierung des Immunsystems in der Reduzierung immunsupprimierender Vorgänge, die die Progression des PaCa begünstigen. Da der therapeutische Einsatz von Interferon alpha (IFN α) in der Behandlung des Melanoms als positiv bewertet werden konnte, kann der Einsatz von IFN α in der Therapie des PaCa ebenfalls eine vielversprechende Option darstellen. Allerdings konnten unsere *in vitro* Ergebnisse zeigen, dass der Einsatz von IFN α sowohl auf den murinen Panc02 Tumorzellen als auch auf zahlreichen Subpopulationen von murinen Immunzellen zu einer signifikanten Steigerung der B7-H1 Expression führt. Durch die gesteigerte Expression von B7-H1 wird der immunologische Checkpoint B7-H1:PD-1 vermehrt aktiviert und verhindert eine wirksame Anti-Tumor-Immunantwort. Außerdem führte die Behandlung mit IFN α zu keiner Vermehrung derjenigen murinen Immunzellen, die zu den immunstimulierenden Zellen gezählt werden. Weder CD4 $^+$ /CD8 $^+$ T-Zellen, Makrophagen, noch dendritische Zellen konnten in signifikant gesteigerter Zahl nachgewiesen werden. Der Einsatz von IFN α erhöhte in einem unserer Experimente die Konzentration des Zytokins IFN γ , welches selbst wiederum eine vermehrte B7-H1 Expression auslösen kann, obwohl es als proinflammatorisches Zytokin wichtig für die Anti-Tumor-Immunantwort ist. Aufgrund der Tatsache, dass IFN α neben den aktivierenden Mechanismen auch die immunsupprimieren-

den Mechanismen des Immunsystems verstärken kann, stellt der alleinige Einsatz von IFN α keine optimale Therapieoption dar. Um die positive und gewünschte Wirkung von IFN α erhalten zu können, müssen Kombinationstherapien (z.B. Blocking-Antikörper gegen das B7-H1 Molekül und IFN α) verwendet werden, die zumindest eine der ungewollten „Nebenwirkungen“ von IFN α neutralisieren, damit das Wachstum dieses aggressiven Tumors verhindert werden kann.

III Summary

In vitro effects of interferon alpha and chemotherapy on B7-H1 in pancreatic carcinoma

Characterizing for pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is its high aggressiveness and early metastasis with extremely poor prognosis. Besides, PDAC is highly resistant to chemo- and radiotherapy. So far, researches have failed to develop therapeutic strategies to fully stop the growth of PDAC and to permanently induce tumor regression. Therefore, other modern therapeutic approaches are needed in this field. During tumor development an progression in the frequency of immunosuppressive cells as well as activation of the surface regulatory molecule B7-H1 prevent a proper immunological response against PDAC.

Due to the involvement of the immune system in cancer development and progression the use of immunologically active substances is being investigated. Other than the activation of the immune system, the main goal of these therapies is to reduce immunosuppressive mechanisms which promote tumor progression. The therapeutic use of interferon alpha (IFN α) in malignant melanoma has been evaluated to be profitable for some melanoma patients. Therefore, it has been proposed that IFN α could be a promising therapeutic option in PDAC as well.

However, in our *in vitro* experiments we found that the IFN α treatment led to a significant increase in the B7-H1 expression on murine Panc02 tumor cells as well as on many different types of murine immune cells. Due to the increased expression of B7-H1 the immunological checkpoint B7-H1:PD-1 is more active and prevents an effective immunological anti-tumor response. Further, treatment with IFN α did not lead to an expansion of those immune cells being considered to be of immune stimulating character. Neither CD4 $^+$ /CD8 $^+$, macrophages nor dendritic cells (DC) were observed comparatively often. In our experiments the use of IFN α increased the concentration of IFN γ , a cytokine, which, by itself has the potential to increase B7-H1 expression. Due to the fact that IFN α can augment both, immunoactivation and immunosuppression, a single agent therapy consisting of IFN α alone does not represent a promising therapeutic strategy. To utilize the benefit of IFN α , combinations with other

agents such as B7-H1 blocking antibody should be used to neutralize at least one of the side effects of IFN α to stop the PDAC progression.

IV Literaturverzeichnis

1. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int J Cancer, 2010. **127**(12): p. 2893-917.
2. Koorstra, J.B., et al., *Pancreatic carcinogenesis*. Pancreatology, 2008. **8**(2): p. 110-25.
3. Lowenfels, A.B. and P. Maisonneuve, *Risk factors for pancreatic cancer*. J Cell Biochem, 2005. **95**(4): p. 649-56.
4. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2003*. CA Cancer J Clin, 2003. **53**(1): p. 5-26.
5. Ferlay J, S.I., Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11*. 2013 [12/05/2014].
6. Dr. Peter Kaatsch, D.C.S.D.K., Kapitel 4) and D.S.H.G. Prof. Dr. Alexander Katalinic, Kapitel 1.2, 1.3, Anhang GEKID), *Krebs in Deutschland 2007/2008 8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg)*. Berlin, 2012. 2012, ruksaldruck, Berlin.
7. Kessler, M., *Kleintieronkologie: Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hunden und Katzen*. 2005: Enke; Auflage: 2., durchgesehene Auflage 449 Abbildungen 177 Tabellen (15. Juni 2005).
8. Iodice, S., et al., *Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis*. Langenbecks Arch Surg, 2008. **393**(4): p. 535-45.
9. Hart, A.R., H. Kennedy, and I. Harvey, *Pancreatic cancer: a review of the evidence on causation*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2008. **6**(3): p. 275-82.
10. Stevens, R.J., A.W. Roddam, and V. Beral, *Pancreatic cancer in type 1 and young-onset diabetes: systematic review and meta-analysis*. Br J Cancer, 2007. **96**(3): p. 507-9.
11. Tramacere, I., et al., *Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation*. Int J Cancer, 2010. **126**(6): p. 1474-86.
12. Arslan, A.A., et al., *Anthropometric measures, body mass index, and pancreatic cancer: a pooled analysis from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan)*. Arch Intern Med, 2010. **170**(9): p. 791-802.
13. Thiebaut, A.C., et al., *Dietary fatty acids and pancreatic cancer in the NIH-AARP diet and health study*. J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(14): p. 1001-11.
14. Jiao, L., et al., *A combined healthy lifestyle score and risk of pancreatic cancer in a large cohort study*. Arch Intern Med, 2009. **169**(8): p. 764-70.
15. Permuth-Wey, J. and K.M. Egan, *Family history is a significant risk factor for pancreatic cancer: results from a systematic review and meta-analysis*. Fam Cancer, 2009. **8**(2): p. 109-17.
16. Helga Fritsch, W.K., *Taschenatlas Anatomie, Band 2: Innere Organe*. 2009: Thieme (Verlag) 10., überarbeitete und erweiterte Auflage. 484.
17. Michael Schünke, E.S., Udo Schumacher, *PROMETHEUS Lernatlas der Anatomie. Hals und Innere Organe*. 2005: Thieme (verlag) gebundene Ausgabe.
18. Shi, C., J.A. Daniels, and R.H. Hruban, *Molecular characterization of pancreatic neoplasms*. Adv Anat Pathol, 2008. **15**(4): p. 185-95.
19. Seufferlein, T. and G. Adler, *[The S3 guideline exocrine pancreatic cancer]*. Med Klin (Munich), 2009. **104**(11): p. 869-74.

20. Sener, S.F., et al., *Pancreatic cancer: a report of treatment and survival trends for 100,313 patients diagnosed from 1985-1995, using the National Cancer Database*. J Am Coll Surg, 1999. **189**(1): p. 1-7.
21. Warshaw, A.L. and C. Fernandez-del Castillo, *Pancreatic carcinoma*. N Engl J Med, 1992. **326**(7): p. 455-65.
22. Cubilla, A.L. and P.J. Fitzgerald, *Cancer of the exocrine pancreas: the pathologic aspects*. CA Cancer J Clin, 1985. **35**(1): p. 2-18.
23. Chari, S.T., et al., *Pancreatic cancer-associated diabetes mellitus: prevalence and temporal association with diagnosis of cancer*. Gastroenterology, 2008. **134**(1): p. 95-101.
24. Frebourg, T., et al., *The evaluation of CA 19-9 antigen level in the early detection of pancreatic cancer. A prospective study of 866 patients*. Cancer, 1988. **62**(11): p. 2287-90.
25. Messmann, H., *Klinische Gastroenterologie*. Das Buch für Fort- und Weiterbildung plus DVD mit über 1.000 Befunden. 2011: Thieme (Verlag).
26. Pliarchopoulou, K. and D. Pectasides, *Pancreatic cancer: current and future treatment strategies*. Cancer Treat Rev, 2009. **35**(5): p. 431-6.
27. Esposito, I., et al., *Most pancreatic cancer resections are R1 resections*. Ann Surg Oncol, 2008. **15**(6): p. 1651-60.
28. Wittekind, C., et al., *A uniform residual tumor (R) classification: integration of the R classification and the circumferential margin status*. Cancer, 2009. **115**(15): p. 3483-8.
29. Löhr, J.-M., *Pancreatic cancer*. 2005: Uni-Med; Bremen; 1. Auflage.
30. Strobel, O., et al., *Resection after neoadjuvant therapy for locally advanced, "unresectable" pancreatic cancer*. Surgery, 2012. **152**(3 Suppl 1): p. S33-42.
31. Paulson, A.S., et al., *Therapeutic advances in pancreatic cancer*. Gastroenterology, 2013. **144**(6): p. 1316-26.
32. Neoptolemos, J.P., et al., *A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer*. N Engl J Med, 2004. **350**(12): p. 1200-10.
33. Oettle, H., et al., *Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial*. JAMA, 2013. **310**(14): p. 1473-81.
34. Schneider, G., et al., *Pancreatic cancer: basic and clinical aspects*. Gastroenterology, 2005. **128**(6): p. 1606-25.
35. Mancuso, A., F. Calabro, and C.N. Sternberg, *Current therapies and advances in the treatment of pancreatic cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2006. **58**(3): p. 231-41.
36. Burris, H.A., 3rd, et al., *Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial*. J Clin Oncol, 1997. **15**(6): p. 2403-13.
37. Hertel, L.W., et al., *Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine)*. Cancer Res, 1990. **50**(14): p. 4417-22.
38. Shi, S., et al., *Combinational therapy: new hope for pancreatic cancer?* Cancer Lett, 2012. **317**(2): p. 127-35.
39. Conroy, T., et al., *FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer*. N Engl J Med, 2011. **364**(19): p. 1817-25.
40. Bazhin, A.V., et al., *Two immune faces of pancreatic adenocarcinoma: possible implication for immunotherapy*. Cancer Immunol Immunother, 2013.

41. Lippolis, J.D., *Immunological signaling networks: integrating the body's immune response*. J Anim Sci, 2008. **86**(14 Suppl): p. E53-63.
42. Wachsmann, M.B., L.M. Pop, and E.S. Vitetta, *Pancreatic ductal adenocarcinoma: a review of immunologic aspects*. J Investig Med, 2012. **60**(4): p. 643-63.
43. Ardavin, C., S. Amigorena, and C. Reis e Sousa, *Dendritic cells: immunobiology and cancer immunotherapy*. Immunity, 2004. **20**(1): p. 17-23.
44. Kaisho, T. and S. Akira, *Toll-like receptor function and signaling*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(5): p. 979-87; quiz 988.
45. Bender, O., *Untersuchungen zur Expression des TIM-3 Moleküls auf murinen T-Helfer-Zellen*. 2003, Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I urn:nbn:de:kobv:11-10019722: Berlin.
46. Nossal, G.J., *Negative selection of lymphocytes*. Cell, 1994. **76**(2): p. 229-39.
47. von Boehmer, H., *Positive selection of lymphocytes*. Cell, 1994. **76**(2): p. 219-28.
48. Theofilopoulos, A.N., *The basis of autoimmunity: Part I. Mechanisms of aberrant self-recognition*. Immunol Today, 1995. **16**(2): p. 90-8.
49. Joachim Saloga, L.K., Roland Buhl, Wolf Mann, Jürgen Knop, Stephan Grabbe, *Allergologie-Handbuch: Grundlagen und klinische Praxis*. 2011: Schattauer; Auflage: 2., überarb. u. erw. Auflage 2011 (26. August 2011).
50. Sakaguchi, S., *Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 531-62.
51. Shevach, E.M., *CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(6): p. 389-400.
52. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(3): p. 162-74.
53. Chambers, C.A., *The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited*. Trends Immunol, 2001. **22**(4): p. 217-23.
54. Greenwald, R.J., G.J. Freeman, and A.H. Sharpe, *The B7 family revisited*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 515-48.
55. Riella, L.V., et al., *Role of the PD-1 pathway in the immune response*. Am J Transplant, 2012. **12**(10): p. 2575-87.
56. Dong, H., et al., *B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion*. Nat Med, 1999. **5**(12): p. 1365-9.
57. Tseng, S.Y., et al., *B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells*. J Exp Med, 2001. **193**(7): p. 839-46.
58. Dong, H., et al., *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion*. Nat Med, 2002. **8**(8): p. 793-800.
59. Latchman, Y., et al., *PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation*. Nat Immunol, 2001. **2**(3): p. 261-8.
60. Freeman, G.J., et al., *Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation*. J Exp Med, 2000. **192**(7): p. 1027-34.
61. Blank, C., et al., *PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells*. Cancer Res, 2004. **64**(3): p. 1140-5.
62. Karakhanova, S., et al., *ERK/p38 MAP-kinases and PI3K are involved in the differential regulation of B7-H1 expression in DC subsets*. Eur J Immunol, 2010. **40**(1): p. 254-66.
63. Francisco, L.M., P.T. Sage, and A.H. Sharpe, *The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity*. Immunol Rev, 2010. **236**: p. 219-42.

64. Okazaki, T. and T. Honjo, *PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application.* Int Immunol, 2007. **19**(7): p. 813-24.
65. Rozali, E.N., et al., *Programmed death ligand 2 in cancer-induced immune suppression.* Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 656340.
66. Ryschich, E., et al., *Control of T-cell-mediated immune response by HLA class I in human pancreatic carcinoma.* Clin Cancer Res, 2005. **11**(2 Pt 1): p. 498-504.
67. Erdman, S.E., et al., *Unifying roles for regulatory T cells and inflammation in cancer.* Int J Cancer, 2010. **126**(7): p. 1651-65.
68. Strauss, L., et al., *A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment.* Clin Cancer Res, 2007. **13**(15 Pt 1): p. 4345-54.
69. Iellem, A., et al., *Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells.* J Exp Med, 2001. **194**(6): p. 847-53.
70. Bystry, R.S., et al., *B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4.* Nat Immunol, 2001. **2**(12): p. 1126-32.
71. Roncarolo, M.G., et al., *Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans.* Immunol Rev, 2006. **212**: p. 28-50.
72. Ondondo, B., et al., *Home sweet home: the tumor microenvironment as a haven for regulatory T cells.* Front Immunol, 2013. **4**: p. 197.
73. Goulart, M.R., G.E. Pluhar, and J.R. Ohlfest, *Identification of myeloid derived suppressor cells in dogs with naturally occurring cancer.* PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33274.
74. Gabrilovich, D.I., S. Ostrand-Rosenberg, and V. Bronte, *Coordinated regulation of myeloid cells by tumours.* Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 253-68.
75. Diebold, S.S., *Determination of T-cell fate by dendritic cells.* Immunol Cell Biol, 2008. **86**(5): p. 389-97.
76. Okada, T., et al., *Murine thymic plasmacytoid dendritic cells.* Eur J Immunol, 2003. **33**(4): p. 1012-9.
77. Blank, C. and A. Mackensen, *Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion.* Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(5): p. 739-45.
78. Wang, L., et al., *Clinical significance of B7-H1 and B7-1 expressions in pancreatic carcinoma.* World J Surg, 2010. **34**(5): p. 1059-65.
79. Okudaira, K., et al., *Blockade of B7-H1 or B7-DC induces an anti-tumor effect in a mouse pancreatic cancer model.* Int J Oncol, 2009. **35**(4): p. 741-9.
80. Dong, H., et al., *B7-H1 determines accumulation and deletion of intrahepatic CD8(+) T lymphocytes.* Immunity, 2004. **20**(3): p. 327-36.
81. Laheru, D. and E.M. Jaffee, *Immunotherapy for pancreatic cancer - science driving clinical progress.* Nat Rev Cancer, 2005. **5**(6): p. 459-67.
82. Royal, R.E., et al., *Phase 2 trial of single agent Ipilimumab (anti-CTLA-4) for locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma.* J Immunother, 2010. **33**(8): p. 828-33.
83. Wolchok, J.D., et al., *Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria.* Clin Cancer Res, 2009. **15**(23): p. 7412-20.
84. Pfeffer, L.M., et al., *Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons.* Cancer Res, 1998. **58**(12): p. 2489-99.

85. Belardelli, F., et al., *Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(2): p. 119-34.
86. Decatris, M., S. Santhanam, and K. O'Byrne, *Potential of interferon-alpha in solid tumours: part 1*. BioDrugs, 2002. **16**(4): p. 261-81.
87. Holsti, L.R., et al., *Enhancement of radiation effects by alpha interferon in the treatment of small cell carcinoma of the lung*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1987. **13**(8): p. 1161-6.
88. Zhu, Y., et al., *Interferon-alpha enhances antitumor effect of chemotherapy in an orthotopic mouse model for pancreatic adenocarcinoma*. J Immunother, 2008. **31**(7): p. 599-606.
89. Knaebel, H.P., et al., *Phase III trial of postoperative cisplatin, interferon alpha-2b, and 5-FU combined with external radiation treatment versus 5-FU alone for patients with resected pancreatic adenocarcinoma -- CapRI: study protocol [ISRCTN62866759]*. BMC Cancer, 2005. **5**: p. 37.
90. Karakhanova, S., et al., *Influence of interferon-alpha combined with chemo (radio) therapy on immunological parameters in pancreatic adenocarcinoma*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(3): p. 4104-25.
91. Schmidt, J., et al., *Open-label, multicenter, randomized phase III trial of adjuvant chemoradiation plus interferon Alfa-2b versus fluorouracil and folinic acid for patients with resected pancreatic adenocarcinoma*. J Clin Oncol, 2012. **30**(33): p. 4077-83.
92. Corbett, T.H., et al., *Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice*. Cancer Res, 1984. **44**(2): p. 717-26.
93. Picozzi, V.J., R.A. Kozarek, and L.W. Traverso, *Interferon-based adjuvant chemoradiation therapy after pancreaticoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma*. Am J Surg, 2003. **185**(5): p. 476-80.
94. Geng, L., et al., *B7-H1 up-regulated expression in human pancreatic carcinoma tissue associates with tumor progression*. J Cancer Res Clin Oncol, 2008. **134**(9): p. 1021-7.
95. Schreiner, B., et al., *Interferon-beta enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation: relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 2004. **155**(1-2): p. 172-82.
96. Chen, L., et al., *B7-H1 up-regulation on myeloid dendritic cells significantly suppresses T cell immune function in patients with chronic hepatitis B*. J Immunol, 2007. **178**(10): p. 6634-41.
97. Karakhanova, S., et al., *IL-27 renders DC immunosuppressive by induction of B7-H1*. J Leukoc Biol, 2011. **89**(6): p. 837-45.
98. Lyford-Pike, S., et al., *Evidence for a role of the PD-1:PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer Res, 2013. **73**(6): p. 1733-41.
99. Flies, D.B. and L. Chen, *The new B7s: playing a pivotal role in tumor immunity*. J Immunother, 2007. **30**(3): p. 251-60.
100. Loos, M., et al., *Clinical significance and regulation of the costimulatory molecule B7-H1 in pancreatic cancer*. Cancer Lett, 2008. **268**(1): p. 98-109.
101. Bui, J.D., et al., *IFN-dependent down-regulation of the NKG2D ligand H60 on tumors*. J Immunol, 2006. **176**(2): p. 905-13.
102. Hicklin, D.J. and L.M. Ellis, *Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis*. J Clin Oncol, 2005. **23**(5): p. 1011-27.

103. Voron, T., et al., *Control of the immune response by pro-angiogenic factors*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 70.
104. Atkins, M.B., *Interleukin-2: clinical applications*. Semin Oncol, 2002. **29**(3 Suppl 7): p. 12-7.
105. von Hoegen, P., *Synergistic role of type I interferons in the induction of protective cytotoxic T lymphocytes*. Immunol Lett, 1995. **47**(3): p. 157-62.
106. Planes, R., et al., *HIV-1 Tat protein induces PD-L1 (B7-H1) expression on dendritic cells through tumor necrosis factor alpha- and toll-like receptor 4-mediated mechanisms*. J Virol, 2014. **88**(12): p. 6672-89.
107. Jin, Y.H., et al., *The role of interleukin-6 in the expression of PD-1 and PDL-1 on central nervous system cells following infection with Theiler's murine encephalomyelitis virus*. J Virol, 2013. **87**(21): p. 11538-51.
108. Mühlbauer, M., et al., *PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and -gamma and mediates T cell apoptosis*. J Hepatol, 2006. **45**(4): p. 520-8.
109. Luft, T., et al., *Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells*. J Immunol, 1998. **161**(4): p. 1947-53.
110. Santini, S.M., et al., *Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice*. J Exp Med, 2000. **191**(10): p. 1777-88.
111. Santini, S.M., et al., *A new type I IFN-mediated pathway for the rapid differentiation of monocytes into highly active dendritic cells*. Stem Cells, 2003. **21**(3): p. 357-62.
112. Radvanyi, L.G., et al., *Low levels of interferon-alpha induce CD86 (B7.2) expression and accelerates dendritic cell maturation from human peripheral blood mononuclear cells*. Scand J Immunol, 1999. **50**(5): p. 499-509.
113. Santodonato, L., et al., *Monocyte-derived dendritic cells generated after a short-term culture with IFN-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulate a potent Epstein-Barr virus-specific CD8+ T cell response*. J Immunol, 2003. **170**(10): p. 5195-202.
114. Di Puccio, T., et al., *Immunization of stage IV melanoma patients with Melan-A/MART-1 and gp100 peptides plus IFN-alpha results in the activation of specific CD8(+) T cells and monocyte/dendritic cell precursors*. Cancer Res, 2006. **66**(9): p. 4943-51.
115. Dauer, M., et al., *Interferon-alpha disables dendritic cell precursors: dendritic cells derived from interferon-alpha-treated monocytes are defective in maturation and T-cell stimulation*. Immunology, 2003. **110**(1): p. 38-47.
116. Fang, H., et al., *TLR4 is essential for dendritic cell activation and anti-tumor T-cell response enhancement by DAMPs released from chemically stressed cancer cells*. Cell Mol Immunol, 2014. **11**(2): p. 150-9.
117. Zhang, P., et al., *Chemopreventive agents induce programmed death-1-ligand 1 (PD-L1) surface expression in breast cancer cells and promote PD-L1-mediated T cell apoptosis*. Mol Immunol, 2008. **45**(5): p. 1470-6.
118. Gong, W., et al., *Paclitaxel induced B7-H1 expression in cancer cells via the MAPK pathway*. J Chemother, 2011. **23**(5): p. 295-9.
119. Qin, X., et al., *Cisplatin induces programmed death-1-ligand 1(PD-L1) over-expression in hepatoma H22 cells via Erk /MAPK signaling pathway*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2010. **56 Suppl**: p. OI1366-72.

120. Buonaguro, L., et al., *Translating tumor antigens into cancer vaccines*. Clin Vaccine Immunol, 2011. **18**(1): p. 23-34.
121. Schmitz-Winnenthal, F.H., et al., *Potential target antigens for immunotherapy in human pancreatic cancer*. Cancer Lett, 2007. **252**(2): p. 290-8.
122. Belardelli, F. and I. Gresser, *The neglected role of type I interferon in the T-cell response: implications for its clinical use*. Immunol Today, 1996. **17**(8): p. 369-72.
123. Shevchenko, I., et al., *Low-dose gemcitabine depletes regulatory T cells and improves survival in the orthotopic Panc02 model of pancreatic cancer*. Int J Cancer, 2013. **133**(1): p. 98-107.
124. Clark, R.A., et al., *Human squamous cell carcinomas evade the immune response by down-regulation of vascular E-selectin and recruitment of regulatory T cells*. J Exp Med, 2008. **205**(10): p. 2221-34.
125. Fu, J., et al., *Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients*. Gastroenterology, 2007. **132**(7): p. 2328-39.
126. Gallimore, A. and A. Godkin, *Regulatory T cells and tumour immunity - observations in mice and men*. Immunology, 2008. **123**(2): p. 157-63.
127. Bazhin, A.V., et al., *Immunological in vivo effects of B7-H1 deficiency*. Immunol Lett, 2014. **162**(2 Pt B): p. 273-86.
128. Pedroza-Pacheco, I., A. Madrigal, and A. Saudemont, *Interaction between natural killer cells and regulatory T cells: perspectives for immunotherapy*. Cell Mol Immunol, 2013. **10**(3): p. 222-9.
129. Sasada, T. and S. Suekane, *Variation of tumor-infiltrating lymphocytes in human cancers: controversy on clinical significance*. Immunotherapy, 2011. **3**(10): p. 1235-51.
130. Seo, S.K., et al., *Attenuation of IFN-gamma-induced B7-H1 expression by 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 via downregulation of the Jak/STAT/IRF-1 signaling pathway*. Life Sci, 2014. **112**(1-2): p. 82-9.
131. Cao, Y., et al., *B7-H1 overexpression regulates epithelial-mesenchymal transition and accelerates carcinogenesis in skin*. Cancer Res, 2011. **71**(4): p. 1235-43.
132. Lee, S.J., et al., *Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN-gamma-induced upregulation of B7-H1 (CD274)*. FEBS Lett, 2006. **580**(3): p. 755-62.

V Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Graphische Übersicht der Therapieoptionen des Pankreasadenokarzinoms	14
Abb. 2 T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Regulierung	18
Abb. 3 Schematische Darstellung des MACS-Verfahrens	44
Abb. 4 Auswertungsstrategie zur Bestimmung der regulatorischen Moleküle (B7-H1/B7-DC) auf der Panc02-Zelllinie.....	51
Abb. 5 A: Quantifizierung der B7-H1 ⁺ Panc02-Zellen.....	51
Abb. 6 A: Quantifizierung der B7-DC ⁺ Panc02-Zellen.....	52

Abb. 7 Quantifizierung verschiedener Zytokine, die von den Zellen der Panc02-Zelllinie unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Behandlungen gebildet wurden.....	55
Abb. 8 Auswertungsstrategie zur Bestimmung der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse.....	58
Abb. 9 Quantifizierung der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	60
Abb. 10 Quantifizierung der B7-H1 ⁺ Zellen (CD4 ⁺ T-Zellen und deren Subpopulation) aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	61
Abb. 11 Quantifizierung der B7-H1 ⁺ Zellen (CD8 ⁺ T-Zellen und deren Subpopulation) aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	62
Abb. 12 MFI des B7-H1 Moleküls auf CD4 ⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	63
Abb. 13 MFI des B7-H1 Moleküls auf CD8 ⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	64
Abb. 14 Auswertungsstrategie zur Bestimmung der dendritischen Zellen (DC) aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse.....	66
Abb. 15 Histogramme zur Darstellung folgender Oberflächenmarker (B7-H1/CD80/CD86) auf den dendritischen Zellen (cDC).....	67
Abb. 16 Untersuchung der cDC und deren B7-H1/CD80/CD86 Expression aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	69
Abb. 17 Untersuchung der pDC und deren B7-H1/CD80/CD86 Expression aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	71
Abb. 18 Auswertungsstrategie zur Bestimmung der Makrophagen aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse.....	72
Abb. 19 Untersuchung der Makrophagen und deren B7-H1 Expression aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	73

Abb. 20 Auswertungsstrategie zur Bestimmung der MDSC aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse.....	75
Abb. 21 Untersuchung der MDSC und deren B7-H1 Expression aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	76
Abb. 22 Untersuchung der granulozytären und monozytären MDSC und deren B7-H1 Expression aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	77
Abb. 23 Auswertungsstrategie zur Bestimmung der T _{reg} und T _{con} aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse.....	80
Abb. 24 Untersuchung der konventionellen T-Zellen und deren B7-H1/CD69 Expression aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	82
Abb. 25 Untersuchung der regulatorischen T-Zellen und deren B7-H1/CD69 Expression aus Splenozyten gesunder C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	84
Abb. 26 Auswertungsstrategie zur Bestimmung der CD45 ⁺ Zellen aus Splenozyten tumortragender C57/Bl-6 Mäuse.....	85
Abb. 27 Quantifizierung der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen aus Splenozyten tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	87
Abb. 28 Quantifizierung der B7-H1 ⁺ Zellen (CD4 ⁺ T-Zellen und deren Subpopulation) aus Splenozyten tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	88
Abb. 29 Quantifizierung der B7-H1 ⁺ Zellen (CD8 ⁺ T-Zellen und deren Subpopulation) aus Splenozyten tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	89
Abb. 30 MFI des B7-H1 Moleküls auf CD4 ⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen aus Splenozyten tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	90
Abb. 31 MFI des B7-H1 Moleküls auf CD8 ⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen aus Splenozyten tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	91

Abb. 32 Untersuchung der cDC und deren B7-H1/CD80/CD86 Expression aus Splenozyten tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.	94
Abb. 33 Untersuchung der pDC und deren B7-H1/CD80/CD86 Expression aus Splenozyten tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.	96
Abb. 34 Untersuchung der Makrophagen und deren B7-H1 Expression aus Splenozyten tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.	97
Abb. 35 Untersuchung der MDSC und deren B7-H1 Expression aus Splenozyten tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.	98
Abb. 36 Quantifizierung der granulozytären und monozytären MDSC und deren B7-H1 Expression aus Splenozyten tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.	100
Abb. 37 Untersuchung der konventionellen T-Zellen und deren B7-H1/CD69 Expression aus Splenozyten tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.	101
Abb. 38 Untersuchung der regulatorischen T-Zellen und deren B7-H1/CD69 Expression aus Splenozyten tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.	103
Abb. 39 Vergleich CD4 ⁺ T-Zellen aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.	105
Abb. 40 Vergleich CD4 ⁺ Subpopulationen aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.	106
Abb. 41 Vergleich der CD4 ⁺ Subpopulationen aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.	107
Abb. 42 Vergleich der CD8 ⁺ T-Zellen aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.	108
Abb. 43 Vergleich CD8 ⁺ Subpopulationen aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.	109

Abb. 44 Vergleich CD8 ⁺ Subpopulationen aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	110
Abb. 45 Vergleich CD8 ⁺ Subpopulationen aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	111
Abb. 46 Vergleich konventioneller DC und deren B7-H1/CD80/CD86 Expression aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	113
Abb. 47 Vergleich plasmazytoider DC und deren B7-H1/CD80/CD86 Expression aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	114
Abb. 48 Vergleich der Makrophagen und deren B7-H1 Expression aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	115
Abb. 49 Vergleich der MDSC und deren B7-H1 Expression aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung der verschiedenen <i>in vitro</i> Therapien.....	116
Abb. 50 Vergleich der granulozytären und der monozytären MDSC aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	117
Abb. 51 Vergleich granulozytärer und monozytärer MDSC und deren B7-H1 Expression aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	118
Abb. 52 Vergleich konventioneller und regulatorischer T-Zellen aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	119
Abb. 53 Vergleich des B7-H1 Moleküls auf konventionellen und regulatorischen T-Zellen aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	119
Abb. 54 Vergleich des CD69 Moleküls auf konventionellen und regulatorischen T-Zellen aus Splenozyten gesunder und tumortragender C57/Bl-6 Mäuse unter Berücksichtigung verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	120

Abb. 55 Auswertungsstrategie zur Bestimmung der Zytotoxizität tumorinfiltrierender Lymphozyten (TiL) nach einer Kokultivierung mit Zellen der Panc02-Zelllinie.....	122
Abb. 56 Vergleich der relativen Zytotoxizität zwischen tumorinfiltrierenden Zellen aus C57/Bl-6 und aus B7-H1 KO Mäusen.....	123
Abb. 57 relative Zytotoxizität der tumorinfiltrierenden Zellen aus C57/Bl-6 Mäusen in Abhängigkeit verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	124
Abb. 58 relative Zytotoxizität der tumorinfiltrierenden Zellen aus B7-H1 KO Mäusen in Abhängigkeit verschiedener <i>in vitro</i> Therapien.....	125
Abb. 59 Darstellung der relativen Zytotoxizität der tumorinfiltrierenden Zellen aus C57/Bl-6 und aus B7-H1 KO Mäusen in direktem Vergleich mit der Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen.....	125
Abb. 60 Vergleich der Interferon gamma (IFN γ) Konzentration im Mediumüberstand der Kokulturen, bestehend aus TiL der C57/Bl-6 Mäuse (+ Panc02-Zellen) sowie aus TiL der B7-H1 KO Mäuse (+Panc02-Zellen).	126
Abb. 61 Direkter Vergleich der Interferon gamma (IFN γ) Konzentration im Mediumüberstand der C57/Bl-6 Kokultur (1:5) und der B7-H1 KO Kokultur (1:5) in Abhängigkeit verschiedener Therapeutika.	127
Abb. 62 Schematische Darstellung des Einflusses von IFN α auf die Ausschüttung des Zytokins IFN γ	138

VI Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Laborgeräte	29
Tab. 2 OP-Material	30
Tab. 3 Verbrauchsmaterial	31
Tab. 4 Lösungen, Puffer und Medien	33
Tab. 5 Pharmaka	33
Tab. 6 Antikörper für die Durchflusszytometrie	34
Tab. 7 Beads für die Kompensation	36
Tab. 8 Beads für die magnetische Zellseparation	36
Tab. 9 Software	37

VII Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, daher gilt mein ganz besonderer Dank

- Herrn Prof. Dr. Bazhin und Frau Dr. Karakhanova, die mir mit ihrem Fachwissen jederzeit zur Seite standen und mir diese Arbeit bereitgestellt haben. Danke für das gegenseitige Vertrauen.
 - Herrn Univ.-Prof. Dr. Göbel für die Übernahme der Dissertation und die professionelle Betreuung.
 - Markus, Tina und Ina für die tolle Unterstützung während der Experimente und für die absolut sensationelle Atmosphäre im Labor.
 - Caro, Andy und Kadda für die unvergesslichen Tage und Nächte im Labor, Ihr seid Freunde fürs Leben geworden!
 - meiner Schwester Kerstin dafür, dass sie mir immer wieder gezeigt hat, dass man Vieles erreichen kann, wenn man an sich glaubt und die Ruhe bewahrt. Danke, dass Du mir immer beruflich wie privat zur Seite stehst, du bist die Tollste!
 - Alex. Danke für Deine grenzenlose Geduld und den Mut, den Du mir während dieser Phase zugesprochen hast. Du hast mir nicht nur den Rücken frei gehalten, sondern mir jederzeit mit Deiner Hilfe die Hoffnung gegeben, dass wir das „Ding“ zu Ende bringen können. Wir haben es geschafft!
 - meinen Eltern. Euch Danke zu sagen fällt mir am Schwersten, da es keine Worte gibt, die beschreiben, wie sehr Ihr mich mein ganzes bisheriges Leben unterstützt, motiviert, aufgebaut, getröstet und mir vertraut habt. Ihr habt nie an mir gezweifelt und Euch über jeden meiner Erfolge mindestens genauso gefreut wie ich. Ihr habt mir nicht nur beruflich den besten Start ins Leben gegeben, um glücklich zu sein.
- Danke für Eure Liebe.