

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Liganden von RIG-I-like-Helikasen induzieren immunogenen Zelltod  
von Pankreaskarzinomzellen und Typ-I-Interferon-abhängige  
Aktivierung von dendritischen Zellen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hannah Lohr

aus München

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Max Schnurr

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Stemmler  
Prof. Dr. med. David Horst

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. rer. hum. biol. Peter Düwell

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 12.04.2018

Für meine Eltern

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Pathologische und klinische Aspekte des Pankreaskarzinoms .....	1
1.2 Immunüberwachung von Tumoren .....	3
1.3 Tumorimmunologische Aspekte des Pankreaskarzinoms .....	4
1.4 Generierung und Ablauf einer antitumoralen Immunantwort .....	6
1.4.1 Dendritische Zellen und Antigen-Kreuzpräsentation .....	6
1.4.2 Die Rolle von dendritischen Zellen in malignen Erkrankungen .....	8
1.5 Immunogener Zelltod .....	10
1.6 RIG-I-like-Helikasen .....	13
1.6.1 Struktur und Aktivierung .....	13
1.6.2 Liganden von RIG-I-like-Helikasen in der Tumorthherapie .....	15
1.7 Zielsetzung der Arbeit .....	17
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
2.1 Material.....	19
2.1.1 Geräte.....	19
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	19
2.1.3 Kommerzielle Kits und Reagenzienansätze .....	20
2.1.4 Antikörper .....	21
2.1.5 Stimulanzien und blockierende Antikörper .....	22
2.1.6 Materialien für die Zellkultur .....	23
2.1.7 Medien und Puffer für Zellkultur und Isolation dendritischer Zellen.....	24
2.1.8 Puffer für ELISA, Western Blot und Durchflusszytometrie .....	24
2.1.9 Software .....	25
2.2 Methoden .....	25
2.2.1 Zellbiologische Methoden.....	25
2.2.1.1 Zelllinien.....	25
2.2.1.2 Zellkulturbedingungen.....	25

---

2.2.1.3 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität .....	26
2.2.1.4 Transfektion von Panc02-Zellen mit RLH-Liganden .....	26
2.2.2 Zellisolation.....	27
2.2.2.1 Versuchstiere .....	27
2.2.2.2 Haltungsmethoden .....	27
2.2.2.3 Isolation von dendritischen Zellen aus der Milz .....	27
2.2.2.4 Isolation von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark.....	28
2.2.2.5 Gewinnung von den CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> cDC entsprechenden dendritischen Zellen .....	29
2.2.3 Funktionelle Assays.....	30
2.2.3.1 Apoptose-Assay mittels Annexin V / Propidium-Iodid Färbung .....	30
2.2.3.2 Assay für Aktivierung dendritischer Zellen.....	31
2.2.3.3 Analyse der Expression von Oberflächenantigenen .....	31
2.2.3.4 Intrazelluläre CXCL10-Färbung .....	32
2.2.4 PARP-1 Western Blot .....	32
2.2.5 Konfokalmikroskopie .....	33
2.2.6 Molekularbiologische Methoden .....	33
2.2.6.1 Generierung von 5' Triphosphat-RNA durch <i>in vitro</i> Transkription .....	33
2.2.6.2 Quantitative <i>real-time</i> -Polymerase-Kettenreaktion .....	33
2.2.7 CXCL10 ELISA.....	35
2.3 Statistische Analyse .....	35
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
3.1 Folgen der RLH-Aktivierung in Panc02-Tumorzellen.....	36
3.1.1 RLH-Liganden induzieren Typ-I-IFN und Zelltod in Panc02-Zellen.....	36
3.1.2 RLH-Liganden induzieren die Expression von Fas (CD95) auf Panc02-Zellen.....	38
3.1.3 RLH-Liganden induzieren die Expression von MHC-I und Translokation von Calreticulin auf die Zelloberfläche von Panc02-Zellen .....	38
3.2 Konsequenzen der RLH-Aktivierung für dendritische Zellen .....	40
3.2.1 Dendritische Zellen regulieren nach Kontakt mit Überstand von RLH-aktivierten Panc02-Tumorzellen Aktivierungsmarker hoch.....	40
3.2.2 Dendritische Zellen produzieren nach Inkubation mit Überständen RLH-aktivierter Tumorzellen CXCL10 .....	41

---

3.2.3 Dendritische Zell-Aktivierung ist keine direkte Wirkung der im Medium vorhandenen RNA-Transfektionskomplexe .....	42
3.2.4 Dendritische Zell-Aktivierung wird durch einen löslichen Faktor vermittelt.....	43
3.3 Untersuchung der Rolle bekannter immunogener Signale in der RLH-induzierten Aktivierung dendritischer Zellen mit Hilfe von <i>knockout</i> -Mäusen .....	44
3.3.1 Aktivierung dendritischer Zellen ist unabhängig von NLRP3, P2X7, ASC und IL-18	45
3.3.2 Einfluss des RAGE-Rezeptors .....	48
3.3.3 Einfluss von Typ-I-IFN .....	49
3.3.3.1 Einfluss von exogenem Typ-I-IFN und IL-6 auf die Aktivierung dendritischer Zellen .....	49
3.3.3.2 Rolle des Typ-I-IFN-Rezeptors auf dendritischen Zellen .....	50
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>53</b>
4.1 Übersicht über die Ergebnisse .....	53
4.2 RIG-I-like-Helikasen als Zielstrukturen der Tumorimmuntherapie .....	54
4.2.1 Prinzip und Vorteile einer Nutzung von RLH in der Tumorthherapie.....	54
4.2.2 Antitumorale Effekte einer RLH-Aktivierung .....	55
4.3 Charakterisierung des Zelltods RLH-aktivierter Panc02-Tumorzellen .....	57
4.4 Immunogener Zelltod durch RLH-Aktivierung .....	58
4.5 Immunologische Konsequenzen der RLH-Aktivierung.....	60
4.5.1 Vergleichbarkeit der dendritischen Zellen aus Milz und Knochenmark .....	60
4.5.2 Mechanismus der dendritischen Zell-Aktivierung .....	61
4.5.3 Interferone: Verbindung von angeborener und erworbener Immunität.....	64
4.6 Weitere Ergebnisse und klinischer Ausblick .....	66
4.6.1 Therapeutische Wirksamkeit <i>in vivo</i> .....	66
4.6.2 Möglichkeiten und Vorteile einer klinischen Anwendung von RLH-Liganden.....	67
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>70</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>72</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>92</b>

---

<b>8. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....</b>	<b>95</b>
8.1 Abbildungsverzeichnis .....	95
8.2 Tabellenverzeichnis.....	96
<b>9. Danksagung .....</b>	<b>97</b>
<b>10. Veröffentlichungen .....</b>	<b>98</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Pathologische und klinische Aspekte des Pankreaskarzinoms

Das Pankreaskarzinom besitzt aufgrund eines ausgesprochen aggressiven Wachstums- und Metastasierungsverhaltens und der daraus resultierenden schlechten Prognose eine besondere klinische Relevanz. Die mittlere Lebenserwartung nach Diagnosestellung beträgt nur sechs bis zehn Monate. Jährliche Inzidenz und Mortalität sind nahezu identisch [Robert-Koch-Institut 2015].

Pankreaskarzinome sind zu 95 % Adenokarzinome. Sie entstehen aus prämaligen Vorstufen des Epithels im Pankreasgangsystem, sogenannten pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN) [Brat et al. 1998, Cubilla et al. 1976, Hruban et al. 2000]. Bekannte, mit dem Auftreten eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas (PDA) assoziierte Risikofaktoren sind Rauchen, Übergewicht und ein langjähriger Diabetes mellitus [Becker et al. 2014, Iodice et al. 2008, Lin et al. 2007, Lin et al. 2002, Lin et al. 2013]. Eine chronische Pankreatitis ist mit zwei- bis sechsfach erhöhter Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung eines PDA der größte nicht erbliche Risikofaktor [Raimondi et al. 2010, Ryan et al. 2014]. Des Weiteren besteht eine Assoziation mit einigen familiären Syndromen wie der hereditären Pankreatitis [Ryan et al. 2014].

Der genaue pathophysiologische Mechanismus der Entstehung des PDA ist nicht aufgeklärt. Da sich jedoch in über 90 % der Vorläuferläsionen (PanIN) aktivierende *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (KRAS)-Mutationen finden, wird davon ausgegangen, dass diese zur Proliferation der betroffenen Zellen führen und zur Entstehung von PanIN beitragen [Kanda et al. 2012]. In späteren Stadien kommen weitere Mutationen, unter anderem im Bereich der Gene p16, p53, DPC4, und *breast cancer 2* (BRCA2), hinzu [Day et al. 1996, DiGiuseppe et al. 1994, Goggins et al. 2000, Ruggeri et al. 1992, Yamano et al. 2000].

Den derzeit einzigen kurativen Therapieansatz stellt die komplette chirurgische Resektion dar. Sie besteht beim Pankreaskopfkarzinom aus einer partiellen Duodenopankreatektomie mit oder ohne Pyloruserhalt bzw. beim Karzinom des Pankreasschwanzes aus einer Pankreaslinksresektion [Deutsche Krebsgesellschaft - Deutsche Krebshilfe - AWMF 2013].

Dabei ist jedoch zu erwähnen, dass nur 10 bis 20 % der Patienten bei Diagnosestellung noch die Kriterien für eine vollständige Resektabilität erfüllen [Poruk et al. 2015]. Zudem kommt es selbst nach R0-Resektion häufig zu Metastasierung und Rezidiven was zu einem Langzeitüberleben der in kurativer Absicht operierten Patienten von nur 24 % führt [Wagner et al. 2004]. Eine adjuvante Chemotherapie mit Gemcitabin oder 5-Fluoruracil in Kombination mit Folinsäure bietet einen leichten Vorteil bezüglich des krankheitsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens im Vergleich zur Operation allein [Neoptolemos et al. 2010, Oettle et al. 2013]. In den letzten Jahren kam es dank Innovationen im Bereich der Chemotherapie zu gewissen Fortschritten. Eine neoadjuvante Therapie mit dem Schema FOLFIRINOX (Oxaliplatin, Irinotecan, Fluoruracil und Leucovorin) konnte in einer aktuellen Studie bei 10 von 51 Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom Resektabilität erreichen [Khushman et al. 2015]. Beim metastasierten Pankreaskarzinom erbrachten das Chemotherapieregime FOLFIRINOX sowie die Kombination von Gemcitabin und Nab-Paclitaxel einen Überlebensvorteil im Vergleich zu Gemcitabin allein. Da sich das verlängerte Überleben im Rahmen von wenigen Monaten bewegt, bleibt die Prognose des metastasierten PDA trotz dieser Fortschritte infaust [Conroy et al. 2011, Von Hoff et al. 2013]. Zudem können nur wenige Patienten in sehr gutem Allgemeinzustand zum Zeitpunkt der Diagnose mit diesen belastenden Chemotherapie-Protokollen behandelt werden. Die geringen Fortschritte in der Therapie des Pankreaskarzinoms spiegeln sich in Daten wider, die zeigen, dass sich seit Ende der 1990er Jahre altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten kaum verändert haben [Robert-Koch-Institut 2015].

Der wenig zufriedenstellende Stand der therapeutischen Möglichkeiten macht deutlich, wie wichtig die Erforschung neuer Therapien jenseits von Chirurgie und konventioneller Chemotherapie ist. Ein vielversprechender Ansatz sind hierbei Strategien, die eine adaptive Immunantwort gegen den Tumor hervorrufen bzw. wiederherstellen. Bei anderen Tumorentitäten konnten in diesem Bereich zum Beispiel mit *checkpoint*-Inhibitoren Erfolge verzeichnet werden. Ipilimumab, ein monoklonaler Antikörper gegen *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4* (CTLA-4), erzielte beim metastasierten Melanom einen signifikanten Überlebensvorteil im Vergleich zum Vakzinierungspeptid Glycoprotein 100 [Hodi et al. 2010]. Der anti-*programmed cell death protein-1* (PD-1)-Antikörper Nivolumab war Docetaxel beim fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom hinsichtlich Gesamt- und progressionsfreiem Überleben überlegen und wurde auch für die Therapie fortgeschrittener Stadien des Nierenzellkarzinoms und Melanoms zugelassen [Brahmer et al. 2015, Motzer et al. 2015, Robert et al.

2015]. Besonders beeindruckend ist, dass einige Patienten durch Immuntherapien komplette Remissionen erreichen, die über viele Jahre anhalten [Ascierto et al. 2016]. Diese Fortschritte bei bisher nur unzureichend therapierbaren malignen Erkrankungen berechtigen zur Annahme, dass Immuntherapien auch beim Pankreaskarzinom eine erfolgversprechende Strategie sein könnten [Bauer et al. 2016, Schnurr et al. 2015]. So zeigte sich bei einer Subgruppe von Patienten mit mikrosatelliteninstabilen Pankreastumoren, bei denen zahlreiche Neoantigene durch Mutationen entstehen, ein beeindruckendes Therapieansprechen durch PD-1-Blockade [Le et al. 2017].

## 1.2 Immunüberwachung von Tumoren

In den 50er Jahren gelang es aus klinischen Erfahrungen der Transplantationsmedizin Rückschlüsse auf die Reaktion des Immunsystems auf fremde oder veränderte Zellen zu ziehen. Zum einen ließ die Beobachtung der Transplantatabstoßung die Schlussfolgerung zu, dass das Immunsystem Zellen, die morphologisch nicht dem bekannten Selbst entsprechen, angreift. Zum anderen gab das gehäufte Auftreten von malignen Neoplasien bei Patienten unter dauerhafter Immunsuppression Anlass zur Annahme, dass das Immunsystem eine tragende Rolle in der Elimination von entarteten Zellen spielt [Burnet 1970, Dunn et al. 2002]. Thomas und Burnet entwickelten aus diesen Beobachtungen die Hypothese, dass der Körper einer konstanten Entstehung transformierter Zellen ausgesetzt ist, die vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden. Sie wählten für diese Wächterfunktion des Immunsystems den Begriff Immunüberwachung (*immunosurveillance*) [Thomas 1982].

Da Krebserkrankungen jedoch auch bei intaktem Immunsystem entstehen können, bestand weiterhin die Frage, wie diese Tumore der Immunabwehr entgehen. Im Jahr 2001 zeigten Shankaran et al., dass Tumore aus immunkompetenten Mäusen wesentlich weniger immunogen sind als Tumore aus immundefizienten Mäusen [Shankaran et al. 2001]. Daraus zogen sie die Schlussfolgerung, dass durch den vom Immunsystem imponierten Selektionsdruck nur die Tumorzellen überleben, die durch unterschiedliche Mechanismen, wie beispielsweise dem Verlust von bestimmten Erkennungsmerkmalen, der Wahrnehmung des Immunsystems entgehen. Sie ersetzten daher den Begriff der Immunüberwachung durch *immunoediting (tumor editing)*, der zum Ausdruck bringt, dass das Immunsystem zwar in vielen Fällen in der Lage ist, Tumorentstehung zu verhindern, in anderen aber durch Selektion zur Generierung von nicht-immunogenen Neoplasien beiträgt [Shankaran et al. 2001]. Das Konzept des *immunoediting* wird in die drei Phasen Elimination, Äquilibrium und Evasion unterteilt, die den unterschiedlichen Rollen des Immunsystems im Verlauf der

Tumorentstehung Rechnung tragen sollen [Dunn et al. 2002, Schreiber et al. 2011]. Dabei stellt die Phase der Elimination den Zustand vor Entstehung eines klinisch manifesten Tumors dar, in der dem Immunsystem eine vollständige Beseitigung entarteter Zellen gelingt. Sollten einzelne Zellen der Elimination entgehen, können sie meistens zunächst noch vom adaptiven Immunsystem unter Kontrolle gehalten werden. Diese Phase wird als Äquilibrium bezeichnet. Es entsteht ein Selektionsdruck, der die Entstehung neuer Mutationen begünstigt. Wenn die Zellen dadurch weiter an Immunogenität einbüßen oder in der Lage sind ein immunsuppressives Tumorumfeld zu induzieren, können sie in das Stadium der Evasion übergehen und sich zu klinisch manifesten malignen Neoplasien entwickeln [Dunn et al. 2002, Mittal et al. 2014].

### 1.3 Tumorimmunologische Aspekte des Pankreaskarzinoms

Die Charakterisierung des Tumors und seiner Umgebung gibt Aufschluss über die Mechanismen, mit denen das PDA der Elimination durch das Immunsystem entgeht. Die Struktur des PDA ist von einer starken desmoplastischen Reaktion mit ausgeprägtem kollagenreichem Stroma geprägt, das bis zu 90 % des Tumorumfanges ausmachen kann [Neesse et al. 2011]. Die geringe Vaskularisation begrenzt zwar einerseits das Tumorstadium, erschwert jedoch andererseits den Zugang für Zellen des Immunsystems und macht ihn für Chemotherapeutika schlecht erreichbar [Olive et al. 2009]. Die eingeschränkte Perfusion konnte als negativer Prognosefaktor identifiziert werden [Komar et al. 2009].

Vorherrschend im PDA und seinem Umfeld sind eine Reihe immunsuppressiver Zelltypen und Zytokine [Zheng et al. 2013]. Eine dominante Gruppe stellen *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) dar. Dabei handelt es sich um unreife myeloide Zellen, deren Akkumulation im Tumorgewebe durch vom Tumor produzierte Faktoren vermittelt wird [Kumar et al. 2016]. Ihre immunsuppressiven Eigenschaften basieren unter anderem auf ihrer Fähigkeit, die Aktivierung und Proliferation von T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup> T-Zellen) und zytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup> T-Zellen) zu verhindern und regulatorische T-Zellen zu rekrutieren. Darüberhinaus induzieren sie die Produktion von *transforming growth factor β* (TGF-β) und Interleukin-10 (IL-10), das wiederum die Stimulation CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch dendritische Zellen behindert [Hu et al. 2011, Huang et al. 2006, Marvel et al. 2015]. Während MDSC im gesunden Pankreasgewebe kaum vorhanden sind, machen sie beim PDA bis zu 68 % des Leukozyteninfiltrats aus und akkumulieren auch im Blut der Patienten [Porembka et al. 2012]. Neben MDSC tragen auch Tumor-assoziierte Makrophagen zur Generierung eines immunsuppressiven Umfelds bei [Zheng et al. 2013].

Eine ähnliche Rolle nehmen regulatorische T-Zellen ein. Dabei handelt es sich um  $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$  T-Zellen, die ebenfalls mit einer Vielzahl an Mechanismen zur Unterdrückung einer antitumoralen Immunantwort beitragen. So sind sie in der Lage, Perforin- oder Granzym-B-vermittelt Zelltod von T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen zu induzieren, T-Zell-Aktivierung zu hemmen und die Antigenpräsentation durch dendritische Zellen zu behindern. Auch sie produzieren immunsuppressive Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  [Zou 2006]. Regulatorische T-Zellen sind ebenfalls im Tumor und Blut von Patienten mit PDA in signifikant höherer Zahl als bei gesunden Kontrollen vorhanden [Inman et al. 2014, Liyanage et al. 2002]. Ihre Prävalenz korreliert invers mit der von  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen und ihr Vorkommen beim Pankreaskarzinom ist mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einer schlechten Prognose assoziiert [Clark et al. 2007, Hiraoka et al. 2006, Zheng et al. 2013].

Clark et al. charakterisierten umfassend den zeitlichen Verlauf der Entwicklung des Tumorumfelds im murinen Pankreaskarzinommodell und stellten fest, dass es während der Progression von präinvasiven zu invasiven Stadien zur Akkumulation regulatorischer T-Zellen und MDSC kommt, während die Prävalenz von  $CD8^+$  und  $CD4^+$  T-Zellen beim Übergang in invasive Stadien drastisch abnimmt. Die wenigen vorhandenen  $CD8^+$  T-Lymphozyten befinden sich in einem nicht aktivierten Zustand [Clark et al. 2007]. Hinzu kommen morphologische Veränderungen der Tumorzellen, wie die verminderte Expression von *major histocompatibility complex-I* (MHC-I)-Molekülen, die die Erkennung der Tumorzellen durch T-Zellen erschweren [Pandha et al. 2007].

Die klinische Relevanz des immunologischen Tumorumfelds für die Prognose des PDA zeigen Studien, die eine deutliche Korrelation zwischen immunsuppressiven Faktoren, wie der Infiltration mit MDSC und regulatorischen T-Zellen, und einem ungünstigen Krankheitsverlauf herstellen [Gabitass et al. 2011, Hiraoka et al. 2006, Ikemoto et al. 2006]. Dagegen verbessern tumorinfiltrierende Lymphozyten die Prognose von vielen malignen Neoplasien [Chen et al. 2014, Clark et al. 2007, Clemente et al. 1996, Naito et al. 1998, Zhang et al. 2003]. Die Tatsache, dass auch beim PDA eine Infiltration des Tumors mit  $CD8^+$  T-Zellen einen günstigen prognostischen Faktor im Hinblick auf das Überleben darstellt, zeigt das therapeutische Potential der Wiederherstellung einer suffizienten T-Zell-Antwort [Ryschich et al. 2005]. Die Analyse des Tumorumfelds macht deutlich, dass es ein wichtiger Schritt in der Therapie des PDA ist, die dort herrschenden immunsuppressiven Mechanismen zu überwinden und eine Immunantwort gegen den Tumor hervorzurufen bzw. wiederherzustellen.

## 1.4 Generierung und Ablauf einer antitumoralen Immunantwort

An einer suffizienten antitumoralen Immunantwort, wie sie in der Eliminationsphase des *immunoediting* abläuft, sind sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem beteiligt. Wichtige Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind phagozytische Zellen, wie Makrophagen oder dendritische Zellen, und natürliche Killerzellen. Das angeborene Immunsystem arbeitet mit nicht-antigenspezifischen *pattern recognition receptors* (PRR), zu denen unter anderem die Toll-*like*-Rezeptoren (TLR) und NOD-*like* Rezeptoren (NLR) gehören. Das erworbene Immunsystem setzt sich im Wesentlichen aus B- und T-Lymphozyten zusammen und verfügt über antigenspezifische Rezeptoren. Dabei spielen CD8<sup>+</sup> T-Zellen aufgrund ihrer Fähigkeit Zellen antigenspezifisch zu lysieren, eine besondere Rolle [Smyth et al. 2001]. In der Phase der Evasion ist es den Tumorzellen durch unterschiedliche Mechanismen gelungen, der Abwehr durch das Immunsystem zu entgehen. Ziel dieser Arbeit ist es, über die Aktivierung des angeborenen Immunsystems eine antigenspezifische T-Zell-Antwort wiederherzustellen.

### 1.4.1 Dendritische Zellen und Antigen-Kreuzpräsentation

Damit naive T-Zellen ihre zytotoxische Funktion erlangen und proliferieren können, müssen sie zunächst über die Präsentation von Antigenen aktiviert werden. Eine wichtige Rolle nehmen dabei dendritische Zellen ein. Dies sind phagozytische Zellen mit dendritischen Zellfortsätzen, die aufgrund ihrer Fähigkeit naive T-Zellen zu stimulieren, eine essentielle Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunität darstellen [Bell et al. 1999, Steinman et al. 1973].

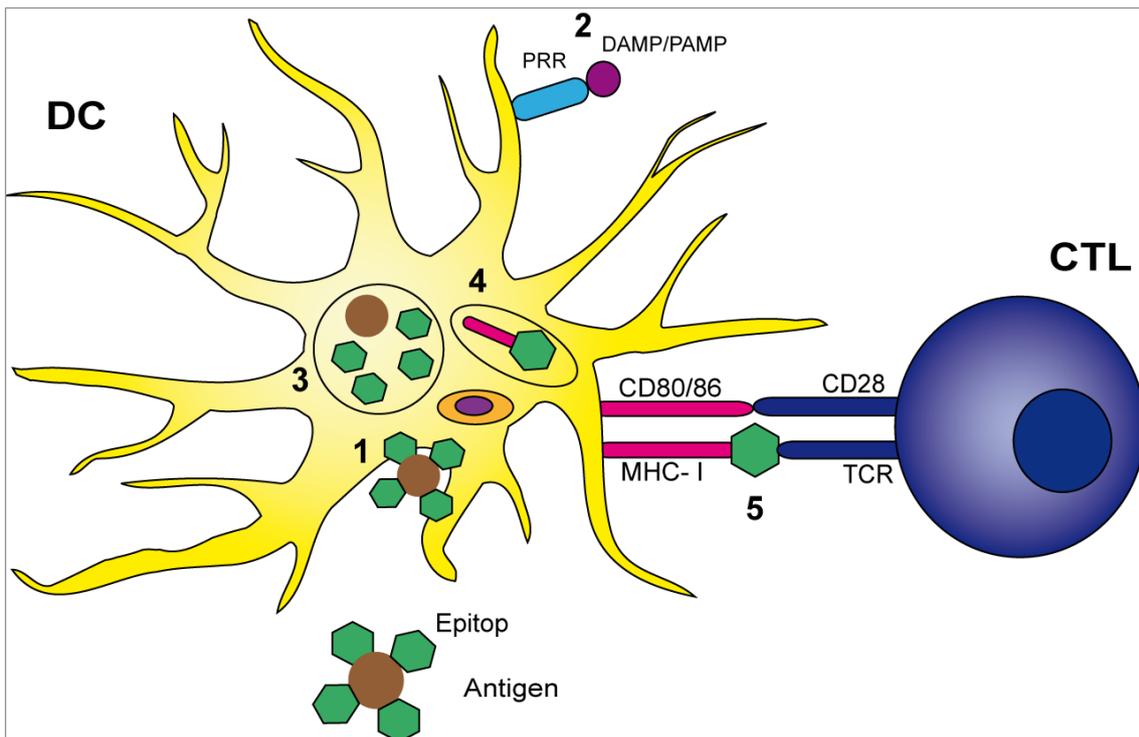
Dendritische Zellen stammen von myeloiden Progenitorzellen aus dem Knochenmark ab. Als Vorläuferzellen gelangen sie von dort aus über das Blut in die lymphatischen Organe [Liu et al. 2010, Manz et al. 2001]. Dendritische Zellen sind in der Lage, mittels Phagozytose, Makropinozytose oder Rezeptor-vermittelter Endozytose Antigene aus ihrer Umgebung aufzunehmen und intrazellulär zu prozessieren [Albert et al. 1998a, Engering et al. 1997]. Die größte Antigenaufnahmekapazität besitzen sie im unreifen Zustand [Albert et al. 1998a]. Um bei der Antigenpräsentation T-Zellen zur Proliferation anregen zu können, benötigen dendritische Zellen kostimulatorische Moleküle, deren Expression erst hochreguliert wird, wenn sie bei der Antigenaufnahme mit Hilfe verschiedener Rezeptoren Gefahrensignale wahrnehmen. Auf die einzelnen *damage-associated molecular patterns* (DAMP) wird an späterer Stelle noch eingegangen. Bei Abwesenheit von DAMP maturieren die dendritischen Zellen nicht und die Antigenpräsentation führt zu immunologischer Toleranz [Dresch et al. 2012]. Werden

Gefahrensignale erkannt, kommt es zur Aktivierung, die mit morphologischen und funktionellen Veränderungen einhergeht. Die kostimulatorischen B7.1- und B7.2-Rezeptoren (CD80 und CD86) werden hochreguliert und die Expression von MHC-Molekülen erhöht.

Als antigenpräsentierende Zellen können dendritische Zellen Antigene, die sie zum Beispiel durch Phagozytose apoptotischer Zellen aufgenommen haben, auf MHC-II Molekülen an CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentieren. Ihre einzigartige Fähigkeit ist es, solche exogenen Antigene auch auf MHC-I Molekülen an CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentieren zu können und somit antigenspezifische zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) zu generieren. Dieser Vorgang, der im Gegensatz dazu in anderen Zelltypen nur für endogene Antigene genutzt wird, wird als Kreuzpräsentation bezeichnet [Albert et al. 1998b, Guermonprez et al. 2002]. Bei der Kreuzpräsentation interagiert der Komplex aus Antigen und MHC-I-Molekül mit dem T-Zell-Rezeptor auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Zusätzlich muss es zur Interaktion von kostimulatorischen Molekülen, insbesondere CD86, mit dem CD28-Molekül auf dem zytotoxischen T-Lymphozyten kommen. Die Folge dieser Interaktionen sind die Proliferation der T-Zelle und Freisetzung von IL-2 [Caux et al. 1994] (Abb.1).

Es werden mehrere Subgruppen von dendritischen Zellen mit unterschiedlicher Ontogenese, Funktion und Lokalisation unterschieden. Murine dendritische Zellen werden in plasmazytoide (pDC) und konventionelle dendritische Zellen (cDC) eingeteilt, wobei eine Subpopulation der cDC CD8 $\alpha$  und eine weitere CD4 exprimiert. Eine dritte weist weder CD8 $\alpha$  noch CD4 auf (doppelt negativ) [Vremec et al. 1992]. Im Gegensatz zu inflammatorischen Zellpopulationen, die als Wachstumsfaktor *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) benötigen, entwickeln sich CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> cDC mit Hilfe von *FMS-related tyrosine kinase 3 ligand* (Flt3L) [Maraskovsky et al. 1996]. CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> cDC sind effizient in der Antigenaufnahme, insbesondere von toten Zellen, und möglicherweise der einzige dendritische Zell-Subtyp, der zur Kreuzpräsentation in der Lage ist [den Haan et al. 2000].

Der Ablauf einer adaptiven Immunantwort verdeutlicht die Bedeutung der dendritischen Zellen für die Bildung spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Sie spielen eine zentrale Rolle in der Vermittlung einer anti-Tumor-Immunantwort.



**Abb. 1: Antigen-Kreuzpräsentation**

Dendritische Zellen (DC) können exogene Epitope von aufgenommenen (1) und anschließend intrazellulär prozessierten (3) Antigenen auf MHC-I (4) an CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten (CTL) präsentieren (5). Dazu interagiert der Komplex aus Antigen und MHC-I-Molekül der DC mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) des CTL. Um Autoimmunität zu verhindern, muss für die Aktivierung der naiven T-Zelle zusätzlich eine Interaktion zwischen den B7-Rezeptoren CD80 und CD86 der DC und dem CD28-Molekül auf CTL stattfinden [Salomon et al. 2001]. Die Expression von B7-Molekülen auf DC wird hochreguliert, wenn DC bei der Antigenaufnahme durch die Wahrnehmung von Gefahrensignalen, wie *damage-associated molecular patterns* (DAMP) oder *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP), über *pattern recognition receptors* (PRR) aktiviert werden (2) [Dresch et al. 2012].

#### 1.4.2 Die Rolle von dendritischen Zellen in malignen Erkrankungen

Ihre oben dargestellte Fähigkeit tumorspezifische zytotoxische T-Zellen zu generieren, macht dendritische Zellen zu einer wichtigen Komponente der antitumoralen Immunantwort. Im Tumorumfeld sind Differenzierung und Aktivierung der dendritischen Zellen jedoch häufig so stark beeinträchtigt, dass sie nicht in der Lage sind als Vermittler adaptiver Immunität zu fungieren. Tumordinfiltrierende dendritische Zellen weisen meist einen unreifen Phänotyp mit geringer Expression von kostimulatorischen Molekülen und MHC-Molekülen auf und induzieren damit eher Toleranz als Immunität [Chaput et al. 2008]. Dies kann soweit gehen, dass sie über Sekretion von TGF- $\beta$  regulatorische T-Zellen zur Proliferation anregen und damit sogar immunsupprimierende Funktionen ausüben [Chaput et al. 2008, Ghiringhelli et al. 2005]. Die Dysfunktionalität der dendritischen Zellen kann sowohl auf dem Fehlen von Gefahrensignalen als auch auf tumorinduzierter Immunsuppression beruhen. So

behindern zum Beispiel hohe Konzentrationen an *vascular endothelial growth factor* (VEGF) im Tumor deren Differenzierung, was zu einer verminderten Anzahl an dendritischen Zellen bei Tumorpatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen führt [Almand et al. 2000]. Von den Tumorzellen produziertes IL-10 vermindert die Expression kostimulatorischer Moleküle mit der Folge, dass die dendritischen Zellen beim Kontakt mit T-Zellen Toleranz induzieren [Fricke et al. 2006].

Strategisches Ziel sollte es also sein, Bedingungen zu schaffen, unter denen die dendritischen Zellen zur Aktivierung zytotoxischer T-Zellen in der Lage sind. Eine Möglichkeit ist es, im Tumorumfeld immunogene Gefahrensignale hervorzurufen, die deren Reifung veranlassen [Palucka et al. 2012].

Dass aktivierte dendritische Zellen einen entscheidenden Beitrag zur Tumorabwehr leisten können, zeigen zahlreiche klinische Studien, in denen die Infiltration mit dendritischen Zellen als unabhängiger prognostischer Faktor für das krankheitsfreie Überleben herausgearbeitet werden konnte [Chaput et al. 2008]. Beim Melanom konnte eine hohe Dichte an dendritischen Zellen in Tumor-drainierenden Lymphknoten mit der Existenz tumorspezifischer CTL, dem Fehlen von Metastasen und einem längeren Überleben assoziiert werden [Elliott et al. 2007, Movassagh et al. 2004]. Auch beim hepatozellulären Karzinom stellte sich eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der dendritischen Zellen im Tumor und dem Überleben heraus [Cai et al. 2006]. Insbesondere Verbände aus dendritischen Zellen und aktivierten T-Zellen stellen einen günstigen prognostischen Marker dar [Chaput et al. 2008].

Auf diese Ergebnisse stützen sich Vakzinierungsstrategien in der Krebstherapie, bei denen dendritische Zellen *ex vivo* mit Tumorantigenen beladen, aktiviert und anschließend dem Patienten reinfundiert werden. In diesem Bereich konnten bereits einige Erfolge verzeichnet werden. Eine Phase I/II Studie konnte ein außergewöhnlich langes Überleben einiger Patienten mit Tumoren im pankreatobiliären System, die mit einer MUC1-Peptid-beladenen dendritische Zell-Vakzine behandelt worden waren, nachweisen [Lepisto et al. 2008]. Bei manchen der Studienteilnehmer wurde ein sehr hoher Prozentsatz an CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die die Effektormoleküle Granzym B und Perforin produzierten, gefunden. Dies korrelierte jedoch nicht mit dem klinischen Ergebnis [Lepisto et al. 2008]. Mit Sipuleucel-T, einer zellulären Immuntherapie bestehend aus *ex vivo* aktivierten dendritischen Zellen, konnte beim fortgeschrittenen Prostatakarzinom ein Überlebensvorteil erzeugt werden, was zur Zulassung der Therapie geführt hat [Higano et al. 2009, Kantoff et al. 2010, Mulders et al. 2015]. Die

Aktivierung von dendritischen Zellen mit einem agonistischen CD40-Antikörper erwies sich beim Pankreaskarzinom in präklinischen und ersten klinischen Studien als effektiv [Beatty et al. 2013, Gladue et al. 2011]. Im experimentellen Bereich konnte eine auf immunstimulatorischen Komplexen basierende dendritische Zell-Vakzinierung in Kombination mit dem TLR9-Agonisten CpG-Oligodesoxynukleotid eine tumorspezifische CTL-Antwort im murinen Pankreaskarzinommodell hervorrufen und zur Rückbildung des Tumors mit Ausbildung einer dauerhaften Immunität führen [Jacobs et al. 2011].

## 1.5 Immunogener Zelltod

Im Verlauf des *immunoediting* geht die Immunogenität der Tumorzellen verloren. Eine Möglichkeit sie wiederherzustellen, ist die Induktion von immunogenem Zelltod [Garg et al. 2013, Kroemer et al. 2013, Krysko et al. 2012]. Anhand morphologischer Charakteristika kann zwischen verschiedenen Formen von Zelltod unterschieden werden: Hierbei werden unter anderem Apoptose, Nekrose, Autophagie, mitotische Katastrophe und Seneszenz differenziert. Neuere Nomenklaturen schlagen eine Einteilung vor, die hauptsächlich auf molekularen Eigenschaften basiert [Galluzzi et al. 2012].

Apoptose findet beim Zellumsatz gesunder Gewebe, im Verlauf der Embryonalentwicklung, aber auch im Tumorgewebe spontan oder durch bestimmte Chemotherapeutika induziert statt [Kerr et al. 1972]. Morphologisch definiert ist sie durch runde Verformung der Zelle, Retraktion von Pseudopodien und Verkleinerung des Kernvolumens mit Chromatinkondensation und anschließender Kernfragmentation [Kroemer et al. 2009]. Apoptose kann, z.B. nach DNA-Schädigung, über den intrinsischen Signalweg durch Freisetzung von proapoptotischen Molekülen aus den Mitochondrien verlaufen. Bindung von Liganden am Fas-Rezeptor (FasR) oder am *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) initiiert den extrinsischen Signalweg mit anschließender Caspase-Aktivierung [Flusberg et al. 2015, Fuchs et al. 2015].

Da Apoptose auch bei physiologischen Vorgängen vorkommt, bei denen keine Immunantwort ausgelöst werden soll, wurde sie lange Zeit als immunologisch „still“ betrachtet. Es wurde angenommen, dass nur die grundsätzlich unter pathologischen Umständen auftretende Nekrose eine Immunreaktion hervorruft [Gallucci et al. 2001]. Man ging ferner davon aus, dass die Aktivierung, die den dendritischen Zellen die Fähigkeit zur Antigenpräsentation an T-Zellen verleiht, um Autoimmunität zu

verhindern, nur durch Phagozytose von nekrotischen Zellen, nicht jedoch durch Aufnahme apoptotischer Zellen induziert wird [Sauter et al. 2000]. Da mittlerweile mehrfach gezeigt wurde, dass auch apoptotische Zellen eine Immunantwort hervorrufen können, wurde diese These verworfen bzw. modifiziert [Apetoh et al. 2007b, Casares et al. 2005].

Heute ist bekannt, dass nicht die Form des Zelltods, sondern die Umstände unter denen eine Zelle zugrunde geht und die Faktoren, die im Verlauf freigesetzt werden, das immunologische Ergebnis bestimmen [Green et al. 2009]. Entscheidend für die Reaktion des Immunsystems auf sterbende Zellen ist neben fremden Antigenen, die beispielsweise beim Tod von Tumorzellen exponiert werden können, das Auftreten von DAMP. DAMP sind Moleküle, die unter physiologischen Bedingungen nicht außerhalb der Zelle vorkommen. Beim Zelltod können sie durch aktive oder passive Freisetzung aus der Zelle, Translokation auf die Außenseite der Zellmembran oder Degradierung von Zellbestandteilen in den Extrazellularraum gelangen [Garg et al. 2013]. Kommt es beim Zelltod zur Freisetzung solcher DAMP, die eine adaptive Immunantwort gegen die toten Zellen hervorrufen können, spricht man von immunogenem Zelltod (Abb. 2) [Green et al. 2009, Kroemer et al. 2013]. DAMP, die den immunogenen Zelltod charakterisieren, sind *high-mobility group box-1* Protein (HMGB1), Adenosintriphosphat (ATP) und Typ-I-Interferon (Typ-I-IFN) sowie Calreticulin, das auf die Zelloberfläche transloziert wird [Bell et al. 2006, Ghiringhelli et al. 2009, Green et al. 2009, Obeid et al. 2007a].

Extrazelluläre DAMP binden an PRR von dendritischen Zellen und können die Antigenaufnahme erleichtern sowie deren Aktivierung induzieren. Die dendritischen Zellen erlangen dadurch die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation und Generierung zytotoxischer T-Zellen [Green et al. 2009]. So erleichtert zum Beispiel das Auftreten von Hitzeschockproteinen an der Zelloberfläche oder die präapoptische Translokation von Calreticulin auf die Außenseite der Zellmembran die Antigenaufnahme [Obeid et al. 2007b]. HMGB1 hingegen reguliert die Antigenprozessierung [Apetoh et al. 2007b].

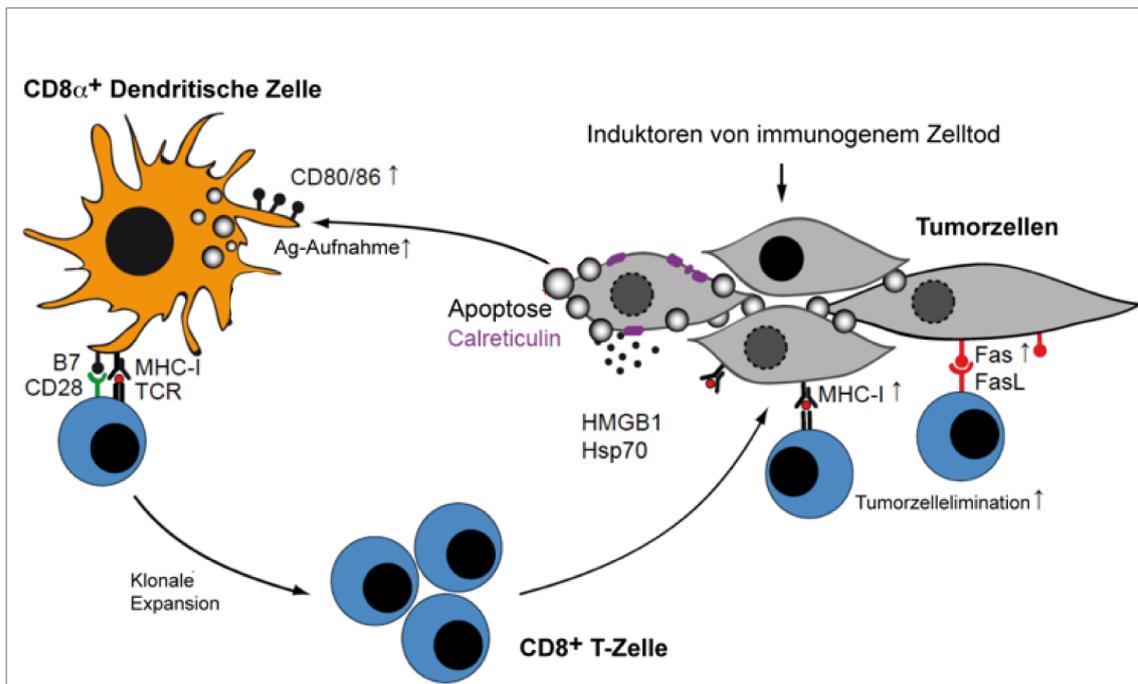
Die Freisetzung von Gefahrensignalen beim Zelltod ist somit eine Grundlage für die Ausbildung von adaptiver Immunität [Garg et al. 2013]. Die sterbenden Tumorzellen dienen hierbei als physiologische Vakzine [Kroemer et al. 2013]. Aus dieser Erkenntnis leitet sich der immuntherapeutische Ansatz ab, Tumorummunogenität durch die

---

Induktion von Zelltod, bei dem DAMP freigesetzt werden, also immunogenem Zelltod, wiederherzustellen [Zitvogel et al. 2008].

Neuere Erkenntnisse zeigen, dass selbst der Erfolg konventioneller Therapien teilweise auf diesem Prinzip beruht. So kann der therapeutische Effekt von Zytostatika nicht nur auf ihre direkte zytotoxische Wirkung zurückgeführt werden, sondern hängt bei einigen Präparaten wesentlich von sekundären immunogenen Effekten ab [Zitvogel et al. 2008]. Für Strahlentherapie und Chemotherapeutika wie Oxaliplatin, Doxorubicin und Cyclophosphamid ist die Aktivierung des Immunsystems durch Induktion von immunogenem Zelltod bekannt [Casares et al. 2005, Schiavoni et al. 2011, Tesniere et al. 2010]. So ist ein TLR4-Polymorphismus, der die Bindung von HMGB1 verhindert, ein unabhängiger negativer Prognosefaktor für ein frühes Rezidiv eines Mammakarzinoms bei systemischer Anthrazyklin- und lokaler Radiotherapie [Apetoh et al. 2007a]. Auch eine ausgeprägte Lymphopenie wirkt sich auf den therapeutischen Erfolg einer Chemotherapie negativ aus [Chu-Yuan et al. 2013].

Chemotherapie und chirurgische Resektion können den Großteil der Tumorzellen eliminieren. Um jedoch Rezidive und die Ausbildung von Metastasen zu verhindern, ist die Wächterfunktion des Immunsystems und die Etablierung eines immunologischen Gedächtnisses unabdingbar. Durch die Induktion von immunogenem Zelltod kann die Immunogenität der Tumorzellen wiederhergestellt werden, was ein wichtiger Schritt für eine langfristige Tumorkontrolle ist.



**Abb. 2: Immunogener Zelltod (modifiziert nach Duewells et al. [Duewells et al. 2014])**

Nach Induktion eines immunogenen Zelltods treten DAMP, wie die Translokation von Calreticulin auf die Zelloberfläche oder die Freisetzung von HMGB1, auf. Diese Gefahrensignale aktivieren dendritische Zellen, die daraufhin die Expression von kostimulatorischen B7 Molekülen hochregulieren. Dies verleiht ihnen die Fähigkeit zur Antigenpräsentation und damit Aktivierung naiver Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

## 1.6 RIG-I-like-Helikasen

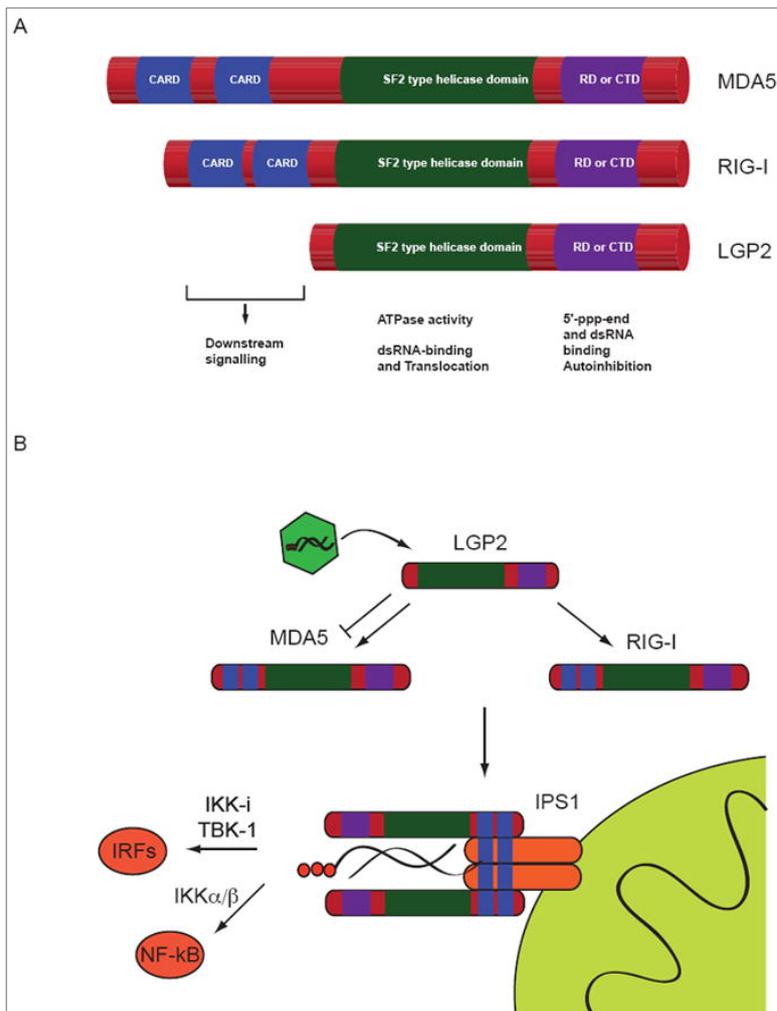
### 1.6.1 Struktur und Aktivierung

RIG-I-like-Helikasen (RLH) sind zytosolische Rezeptoren für virale RNA. Die drei Hauptvertreter der Superfamilie sind *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I), *melanoma differentiation-associated antigen 5* (MDA5) und *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2) [Venkataraman et al. 2007, Yoneyama et al. 2005, Yoneyama et al. 2004]. Sie sind in fast allen Zelltypen vorhanden und stellen die wesentlichen PRR für RNA-Viren und RNA-Produkte von DNA-Viren dar. RIG-I und MDA5 bestehen je aus einer Helikasen-Domäne, einer C-terminalen Domäne und zwei N-terminalen *caspase activation and recruitment* (CARD)-Domänen [Goubau et al. 2013] (Abb. 3).

Als ausschlaggebendes Kriterium für die Aktivierung von RIG-I wurde eine Triphosphat (ppp)-Gruppe am 5' Ende eines RNA-Strangs identifiziert. Bei endogener Wirts-RNA wird das ppp-Ende entweder durch einen 7-Methyl-Guanosin-Rest verdeckt oder während der Prozessierung entfernt. Da virale RNA diese Modifikation nicht durchläuft, signalisiert ein freies ppp-Ende an der RNA der Zelle eine virale Infektion [Hornung et al. 2006, Pichlmair et al. 2006]. MDA5 erkennt *in vivo* doppelsträngige RNA (dsRNA),

wird aber auch durch den synthetischen Liganden *polyinosinic-polycytidylic acid* (poly(I:C)) aktiviert [Kato et al. 2006].

Binden Liganden an RIG-I oder MDA5, kommt es zur Interaktion mit dem Adapterprotein *mitochondrial antiviral signaling protein* (MAVS), auch bekannt als *interferon- $\beta$  promoter stimulator* (IPS-1), *virus-induced signaling adaptor* (VISA) oder *CARD adapter inducing IFN- $\beta$*  (CARDIF), das an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist [Kawai et al. 2005]. Durch diese Interaktion werden mehrere Signalkaskaden in Gang gesetzt, bei denen ein Komplex aus den kanonischen Kinasen *inhibitor of nuclear factor kappa B kinase* (IKK)  $\alpha$  und  $\beta$  und der regulatorischen Untereinheit NF- $\kappa$ B *essential modulator* (NEMO) zur Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern führt, während die nicht-kanonischen IKK zusammen mit *TANK binding kinase 1* (TBK1) und IKK $\epsilon$  die Phosphorylierung von *interferon regulatory factor* 3 und 7 (IRF3 und IRF7) induzieren. Diese Transkriptionsfaktoren stimulieren die Transkription von Typ-I-IFN und proinflammatorischen Zytokinen [Yoneyama et al. 2004] (Abb. 3).



**Abb. 3: Struktur von RLH und Signalwege nach Aktivierung [Schmidt et al. 2012]**

(A) RIG-I und MDA5 weisen zwei N-terminale CARD-Domänen und eine Helikase-Domäne auf. (B) Aktivierung von RLH führt zur Assoziation mit IPS1 und nachfolgender Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3/7 und NF-κB.

### 1.6.2 Liganden von RIG-I-like-Helikasen in der Tumorthherapie

Das in unserer Arbeitsgruppe untersuchte Konzept einer Anwendung von RLH in der Krebstherapie besteht darin, durch RLH-Aktivierung eine virale Infektion der Tumorzellen zu simulieren. Da die RLH-Aktivierung zur Apoptose der betroffenen Zelle und einer gegen sie gerichteten IFN-vermittelten Immunantwort führt, könnte durch eine simulierte Virusinfektion eine Immunantwort gegen die Tumorzelle hervorgerufen und der *immune escape* des Tumors verhindert werden.

In den letzten Jahren wurde die Anwendung von RLH in der onkologischen Therapie in mehreren experimentellen Studien erprobt [Besch et al. 2009, Ellermeier et al. 2013, Kubler et al. 2010]. RLH weisen einige Eigenschaften auf, die ihre Anwendung als Zielstrukturen in der Tumorthherapie erleichtern. Zum einen zeigte sich, dass RLH-Aktivierung Apoptose präferentiell in malignen Zellen auslöst, während gesunde Zellen

---

unversehrt bleiben [Besch et al. 2009]. Zum anderen sind sie aufgrund ihrer ubiquitären Expression ein interessantes Ziel bei vielen Tumorentitäten.

Aus vorangegangenen Studien existieren bereits Hinweise auf die erfolgreiche Induktion einer angeborenen Immunantwort durch eine RLH-basierte Immuntherapie. So führte die Behandlung von Ovarialkarzinomzellen mit RLH-Liganden zur Phagozytose der apoptotischen Tumorzellen durch dendritische Zellen und in der Folge zur deren Aktivierung [Kubler et al. 2010, Kubler et al. 2011]. Unsere Arbeitsgruppe zeigte erstmals, dass durch RLH-Aktivierung zusätzlich zur angeborenen auch eine adaptive Immunantwort hervorgerufen wird [Düewell et al. 2014]. In Vorarbeiten wurde bei Anwendung eines bifunktionellen Moleküls aus ppp-RNA und einer TGF $\beta$ -siRNA beim Pankreaskarzinom *in vivo* ein Überlebensvorteil festgestellt, der über CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermittelt wurde [Ellermeier et al. 2013].

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung des Immunsystems durch RLH-Liganden ein vielversprechender therapeutischer Ansatz ist.

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das Fehlen einer Immunantwort gegen die Tumorzellen ist möglicherweise ein wesentlicher Grund für die Entstehung und schlechte Therapierbarkeit des Pankreaskarzinoms. Da die Karzinomzellen im Verlauf ihrer Transformation durch Veränderungen wie dem Verlust von MHC-I-Molekülen ihre Immunogenität einbüßen, entgehen sie der Elimination durch das Immunsystem. Eine Virusinfektion der Zelle führt zu Apoptose und einer Typ-I-IFN-vermittelten Immunantwort. Durch die Simulation einer viralen Infektion von Pankreaskarzinomzellen durch Aktivierung von RLH kann folglich Tumorzelltod und eine spezifische Immunantwort hervorgerufen werden.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden RLH als Zielstrukturen einer Immuntherapie gegen das PDA untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass RLH-Aktivierung zu Apoptose der Tumorzellen führt. *In vivo* konnte eine Immunaktivierung mit Generierung aktivierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden [Ellermeier et al. 2013]. Die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen ergaben, dass RLH-Aktivierung bei Ovarialkarzinomzellen zu Phagozytose der Tumorzellen und Aktivierung von dendritischen Zellen führt [Kubler et al. 2010, Kubler et al. 2011]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich beim RLH-induzierten Zelltod um einen immunogenen Zelltod handelt.

In dieser Arbeit sollten die Charakteristika und Folgen des RLH-vermittelten Zelltods untersucht werden. Ziel war es, aufzuklären, welche Konsequenzen die RLH-Aktivierung für Tumorzellen hat und welche Mechanismen die Aktivierung von dendritischen Zellen induzieren und somit die Grundlage für die Generierung einer adaptiven Immunantwort bilden.

Folgende Fragestellungen sollten untersucht werden:

- 1) Was sind die Folgen der Transfektion von Pankreaskarzinomzellen mit den Liganden von RIG-I und MDA5, nämlich 5`ppp-RNA und poly(I:C)?
- 2) Welche Mechanismen führen zur Aktivierung von dendritischen Zellen?

Für die erste Fragestellung sollten die Tumorzellen und ihr Überstand nach Transfektion mit RLH-Liganden analysiert werden. Es wurde dafür die Apoptoserate der murinen Panc02-Zellen, ihre MHC-I- und Fas-Expression und die Konzentration von CXCL10 und IFN- $\beta$  im Tumorzellüberstand bestimmt.

---

Die zweite Fragestellung sollte anhand primärer dendritischer Zell-Populationen und mit Hilfe diverser *knockout*-Mausstämme beantwortet werden. Es wurden dabei zunächst Signalwege untersucht, die in der Literatur als Vermittler von immunogenem Zelltod beschrieben wurden. Um den Einfluss des NLRP3-Inflammasoms zu untersuchen, wurden Aktivierungen mit dendritischen Zellen von NLRP3<sup>-/-</sup>, ASC<sup>-/-</sup>, P2X7<sup>-/-</sup> und IL18<sup>-/-</sup>-Mäusen geprüft. Der Einfluss von HMGB1 wurde mit RAGE<sup>-/-</sup>-Mäusen und der Einfluss von Typ-I-IFN mit IFNAR<sup>-/-</sup>-Mäusen und einem den IFN-Rezeptor blockierenden Antikörper ermittelt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

BD FACS Canto II	Fa. Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
Brutschrank (BBD 6220 CO <sub>2</sub> -Inkubator)	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Dynal MPC® Magnet	Fa. Invitrogen (Oslo, N)
Eismaschine	Fa. Ziegra (Isernhagen, D)
Kühlgeräte (4°C, -20°C)	Fa. Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe, D)
	Fa. Liebherr (Biberach an der Riss, D)
Laminare <i>Flow</i>	Fa. Heraeus (Hanau, D)
LAS-4000, <i>Image reader</i>	Fa. Fujitsu (Tokio, J)
Lichtmikroskop Axiovert 25	Fa. Zeiss (Jena, D)
<i>LightCycler® 480 Instrument II</i>	Fa. Roche (Mannheim, D)
<i>mini Quick Spin™ Oligo Columns</i>	Fa. Roche (Mannheim, D)
Mithras LB940 Plattenlesegerät	Fa. Berthold (Bad Wildbad, D)
Multifuge 3L-R	Fa. Heraeus (Hanau, D)
NanoPhotometer	Fa. Implen GmbH (München, D)
Neubauer-Zählkammer	Fa. Optik Labor Frischknecht (Balgach, D)
pH-Meter	Fa. WTW (Weilheim, D)
Pipetus	Fa. Hirschmann (Eberstadt, D)
Rotina 380R Zentrifuge	Fa. Hettich (Tuttlingen, D)
Schüttler	Fa. NeoLab (Heidelberg, D)
SP5 Konfokalmikroskop	Fa. Leica (Wetzlar, D)
Thermocycler T3	Fa. Biometra (Göttingen, D)
Tiefkühlschränke (-80°C)	Fa. Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Vortex Genie 2	Fa. Bender & Hobein AG (Zürich, CH)
Vortex VF2	Fa. Janke & Kunkel (Staufen, D)
Waage (LP 6209)	Fa. Sartorius (Göttingen, D)
Waage (SBC 21)	Fa. Scaltec Instruments (Heiligenstadt, D)
Wasser-Deionisierungsmaschine	Fa. SG Reinstwasser-Sys. (Hamburg, D)
Zentrifuge 5424	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)

#### 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Annexin V-APC (AN)	Fa. ImmunoTools (Friesoythe, D)
Brefeldin A	Fa. Merck Millipore (Darmstadt, D)
Bromphenolblau	Fa. Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Choleratoxin B-Alexa Fluor 647	Fa. Invitrogen (Darmstadt, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Dithiothreitol (DTT)	Fa. Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
<i>ECL Western Blotting Substrate</i>	Fa. GE Healthcare (Sulingen, D)

ELISA <i>Substrate Reagent A/B</i>	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Ethanol (100 Vol.-%)	Fa. Merck KGaA (Darmstadt, D)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
FACSFlow	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
FACSSafe	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Glycerol	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Glycin	Fa. Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Hoechst	Fa. Invitrogen (Darmstadt, D)
Isofluran (Forene®)	Fa. Abbott (Zug, CH)
Isopropanol (70 Vol.-%)	Apotheke Innenstadt LMU (München, D)
Lipofectamine™ RNAiMAX	Fa. Invitrogen (Darmstadt, D)
2-Mercaptoethanol	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim, D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fa. Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Paraformaldehyd	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
PharmLyse Lysereagenz	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Phenol-Chloroform-Amylalkohol	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Propidium Iodid (PI)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Saponin	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Trisaminomethan (TRIS)	Fa. Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Trypanblau	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Trypsin (10 x)	Fa. PAA (Pasching, A)
TURBOTM DNase	Fa. Ambion (Austin, TX, USA)
Tween 20	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

### 2.1.3 Kommerzielle Kits und Reagenzienansätze

#### DC-Isolation:

*Dynabeads Mouse DC Enrichment Kit* Fa. Invitrogen Dynal (Oslo, N)

#### ELISA:

*Mouse CXCL10 ELISA Kit* Fa. R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, D)

#### In vitro Transkription:

*Klenow Fragment exo-dNTP-Mix* Fa. Fermentas (Waltham, MA, USA)  
*MEGAscript T7 Kit* Fa. Intvitrogen (Darmstadt, D)

#### RNA-Isolation, reverse Transkription, qRT-PCR:

*RNeasy Mini Kit* Fa. Qiagen (Hilden, D)  
*RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* Fa. Fisher Scientific (Schwerte, D)  
*LightCycler® 480 Instrument II* Fa. Roche (Mannheim, D)  
*Universal ProbeLibrary* Fa. Roche (Mannheim, D)

Alle Primerpaare, die in der quantitativen *real-time*-PCR zur Verwendung kamen, wurden von der Fa. Eurofins MWG Synthesis (Ebersberg, D) erworben.

## 2.1.4 Antikörper

### FACS-Antikörper

Bezeichnung	Klon	Fluorochrom	Verdünnung	Hersteller
Anti-B220	RA3-6B2	PE-Cy7	1:100	BioLegend
Anti-CD8α	C3-6.7	PerCP	1:100	BioLegend
Anti-CD11b	M1/70	APC	1:200	BioLegend
Anti-CD11c	N418	PacificBlue	1:100	BioLegend
Anti-CD11c	N418	APC	1:200	BioLegend
Anti-CD69	H1.2F3	FITC	1:200	BioLegend
Anti-CD80	16-10A1	PE	1:200	BioLegend
Anti-CD86	GL-1	APC	1:200	BioLegend
Anti-CD24	M1/69	PerCP-Cy5.5	1:100	BioLegend
Anti-MHC-I	AF6-88.5	FITC	1:100	BioLegend
Anti-CD95	Jo-2	PE	1:200	BDBiosciences
Anti-CD95L	MFL3	FITC	1:200	eBioscience

**Tabelle 1: FACS-Antikörper**

### Isotyp-Kontrollantikörper

Bezeichnung	Klon	Fluorochrom	Verdünnung	Hersteller
PE/Cy7 Rat IgG2a, κ Isotype Ctrl Antibody	RTK2758	PeCy7	1:100	BioLegend
PerCP Rat IgG2a, κ Isotype Ctrl Antibody	RTK2758	PerCP	1:100	BioLegend
APC Armenian Hamster IgG Isotype Ctrl Antibody	HTK888	APC	1:200	BioLegend

Pacific Blue™ Armenian Hamster IgG Isotype Ctrl Antibody	HTK888	PacificBlue	1:100	BioLegend
FITC Armenian Hamster IgG Isotype Ctrl Antibody	HTK888	FITC	1:200	BioLegend
PE Armenian Hamster Isotype Ctrl. Antibody	HTK888	PE	1:200	BioLegend
APC Rat IgG2a, κ Isotype Ctrl Antibody	RTK2758	APC	1:200	BioLegend

**Tabelle 2: Isotyp-Kontrollantikörper**

CXCL10-Intrazellulärfärbung, Calreticulin-Färbung und PARP-1 *Western Blot*:

Primärantikörper:

*Goat anti-mouse* CXCL10 (Fa. R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, D)

*Rabbit anti-mouse* Calreticulin (Fa. Biomol, Hamburg, D)

*Rabbit anti-mouse* PARP-1 (Fa. New England Biolabs, Frankfurt, D)

Sekundärantikörper:

*Donkey-anti-goat* IgG FITC (Fa. Invitrogen, Darmstadt, D)

*Goat anti-rabbit* Alexa Fluor 488 (Fa. Invitrogen, Darmstadt, D)

*Goat anti-rabbit* IgG-HRP (Fa. Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D)

**2.1.5 Stimulanzen und blockierende Antikörper**

DNA-*templates* für ppp-RNA

Fa. Eurofins MWG Synth. (Ebersberg, D)

Kontroll-siRNA (OH-RNA)

Fa. Eurofins MWG Synth. (Ebersberg, D)

LEAF *Purified anti-mouse* -IFNAR-1  
Antibody

Fa. BioLegend (San Diego, Ca, USA)

LEAF *Purified mouse* IgG1 κ  
*Isotype ctrl. Antibody*

Fa. BioLegend (San Diego, Ca, USA)

poly(I:C) (HMW) VacciGrade™

Fa. InvivoGen (Toulouse, F)

Rekombinanter muriner Flt3 Ligand

Fa. InvivoGen (Toulouse, F)

Rekombinantes murines IFN-α

Fa. Miltenyi Biotech (Bergisch  
Gladbach, D)

Rekombinantes murines IFN-β

Fa. BioLegend (London, GB)

Rekombinantes murines IL-6

Fa. Immunotools (Friesoythe, D)

Ultra Pure LPS

Fa. Invivogen (Toulouse, F)

Oligonukleotide:

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz (5' > 3')
DNA- <i>template</i> ( <i>sense</i> )	TACGTAAGCTGGATAGCGCTATAGTGAGTCG
DNA- <i>template</i> ( <i>antisense</i> )	GCGCTATCCAGCTTACGTATATAGTGAGTCG
OH-RNA	GCGCUAUCCAGCUUACGUAdTdT

Tabelle 3: Oligonukleotide

### 2.1.6 Materialien für die Zellkultur

β-Mercaptoethanol	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Fa. Gibco (Darmstadt, D)
DNase I	Fa. Roche (Mannheim, D)
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM) Zellkulturmedium <i>high glucose</i>	Fa. PAA (Pasching, A)
Fötales Kälberserum (FCS)	Fa. Gibco (Darmstadt, D)
<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (HBSS)	Fa. Biochrom (Berlin, D)
Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure- (HEPES)-Puffer	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Kollagenase D	Fa. Roche (Mannheim, D)
L-Glutamin	Fa. PAA (Pasching, A)
<i>Microscope Glass Bottom Dishes</i>	Fa. MatTec (Ashland, MA, USA)
MycoAlert® <i>Mycoplasma-Detection-Kit</i>	Fa. Lonza (Basel, CH)
Natrium-Pyruvat	Fa. PAA (Pasching, A)
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	Fa. Gibco (Darmstadt, D)
Nycodenz	Fa. Progen Biotechnik (Heidelberg, D)
Nylonfilter 100 µm/40 µm	Fa. Fisher Scientific (Schwerte, D)
Opti-MEM® I <i>Reduced Serum Medium</i>	Fa. Gibco (Darmstadt, D)
Penicillin / Streptomycin (100 x)	Fa. PAA (Pasching, A)
Percoll (1,077 g/cm <sup>3</sup> )	Fa. Biochrom (Berlin, D)
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS)	Fa. PAA (Pasching, A)
RPMI 1640 Zellkulturmedium	Fa. Biochrom (Berlin, D)
<i>Sphero-Blank Calibration Particles</i>	Fa. BD Biosciences (Heidelberg, D)

Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Becton Dickinson (San Jose, CA, USA), Bibby Sterilin (Stone, Staffordshire, GB), Biozym (Hessisch Oldendorf, D), Corning (Corning, USA), Eppendorf (Hamburg, D), Falcon (Heidelberg, D), Gilson (Den Haag, NL), Greiner (Frickenhausen, D), Henke-Sass Wolf (Tuttlingen, D), Nunc (Rochester, USA) und Sarstedt (Nümbrecht, D) erworben.

### 2.1.7 Medien und Puffer für Zellkultur und Isolation dendritischer Zellen

<u>DMEM-Vollmedium</u>	<u>RPMI-Vollmedium</u>	<u>Transfektionsmedium</u>
10 Vol.-% FCS	10 Vol.-% FCS	10 Vol.-% FCS
2 mM L-Glutamin	2 mM L-Glutamin	2 mM L-Glutamin
100 IU/ml Penicillin	100 IU/ml Penicillin	in DMEM-Medium
100 µg/ml Streptomycin	100 µg/ml Streptomycin	
in DMEM-Medium	1 mM Natrium-Pyruvat	
	100 mM NEAA	
	10 mM HEPES Puffer	
	0,1 mM β-Mercaptoethanol	
	in RPMI 1640-Medium	
<u>HBSS-Isolationspuffer</u>	<u>Trypsin-EDTA</u>	<u>FCS-EDTA</u>
5 Vol.-% FCS	10 Vol.-% Trypsin	2 mM EDTA
5 mM EDTA	0,65 mM EDTA	in FCS
in HBSS	in PBS	
<u>Erythrozyten-Lysepuffer</u>	<u>Gefriermedium</u>	
10 Vol.-% PharmLyse	90 Vol.-% FCS	
in PBS	10 Vol.-% DMSO	

Um unspezifische Immunstimulation zu verhindern, wurden endotoxinarme Medien und Substanzen eingesetzt. Um die Komplementfaktoren zu inaktivieren, wurde das verwendete FCS bei 60°C für 30 Minuten im Wasserbad erhitzt.

### 2.1.8 Puffer für ELISA, Western Blot und Durchflusszytometrie

<u>Coating buffer 1</u>	<u>Coating buffer 2</u>	<u>Assay diluent</u>
0,2 M Natriumphosphat	0,1 mM Natriumcarbonat	10 Vol % FCS
pH 6,5	pH 9,5	pH 7,0
in <i>aqua dest.</i>	in <i>aqua dest.</i>	in PBS
<u>Reagent diluent / Block buffer</u>	<u>Waschpuffer</u>	<u>FACS-Puffer</u>
1 Vol.-% BSA	0,05 Vol.- % Tween 20	2 Vol.-% FCS
pH 7,0	pH 7,0	2 mM EDTA
in PBS	in PBS	in PBS
<u>Lämmli-puffer (6x)</u>	<u>Sammelgel (4x)</u>	<u>Laufpuffer (10x)</u>
1,2 g SDS	30,25 g TRIS in 300 ml H <sub>2</sub> O	30,2 g TRIS
2 mg Bromphenolblau	gereinigtes H <sub>2</sub> O ad 1000 ml	144 g Glycin
4,7 ml Glycerol	4 g SDS	10 g SDS
1,2 ml 0,5 M TRIS	10 mg Bromphenolblau	H <sub>2</sub> O ad 1000 ml
4,1 ml gereinigtes H <sub>2</sub> O	pH 6,8	
0,93 g DTT		
pH 6,8		

<u>Trenngel (4x)</u>	<u>Wet-transfer-Puffer</u>	<u>TBST</u>
182 g TRIS in 600ml H <sub>2</sub> O	24,22 g TRIS	50 mM TRIS
gereinigtes H <sub>2</sub> O ad 1000 ml	150,12 g Glycin	150 mM NaCl
4 g SDS	200 ml Methanol	0,05% Tween20
pH 8,8	gereinigtes H <sub>2</sub> O ad 2000 ml	pH 7,6

### 2.1.9 Software

Adobe Design Premium CS5.5

FACSDiva Software

FlowJo 8.7

GraphPad Prism 5

Fa. Adobe System (San Jose, CA, USA)

Fa. BD Biosciences (San Diego, CA, USA)

Fa. Tree Star (Ashland, OR, USA)

Fa. GraphPad Software (La Jolla, CA, USA)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Zelllinien

Als *in vitro* Modell für das Pankreaskarzinom wurde die murine Zelllinie Panc02 verwendet. Sie entstammt einem 3-Methylchloranthren-induzierten duktalem Adenokarzinom aus C57BL/6 Mäusen [Corbett et al. 1984]. Um eine für die Versuche ausreichende Menge dendritischer Zellen aus der Milz von C57BL/6-Mäusen zu gewinnen, wurde die murine FLB16-Zelllinie verwendet. Dabei handelt es sich um eine, den *Fms-like tyrosine kinase* 3-Liganden (Flt3L) überexprimierende Melanomzelllinie, die durch retroviralen Gentransfer generiert wurde. Der Flt3L ist ein Wachstumsfaktor für dendritische Zellen. Daher kann die Zelllinie zur Expansion von murinen dendritischen Zellen in der Milz von C57BL/6-Mäusen, denen ein subkutaner Tumor aus FLB16-Zellen gesetzt wurde, genutzt werden. Hierdurch können Versuchstiere für die Zellisolation effektiv eingespart werden. Die FLB16-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Glenn Dranoff (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA) zur Verfügung gestellt.

#### 2.2.1.2 Zellkulturbedingungen

Die Zelllinien wurden in einem Zellkulturschrank bei 37°C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 10 % CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Sie befanden sich in 75 ml Zellkulturflaschen in DMEM *high glucose* mit 10 Vol.-% hitzeinaktiviertem FBS, 100 IU/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin. Die Zellen wurden circa dreimal pro Woche im Verhältnis 1:10 geteilt. Hierfür wurden die Zellen mit

Trypsin und EDTA abgelöst, zentrifugiert (400 g, 5 min, 4°C) und ein Zehntel der Zellen in frischem Medium weiterkultiviert. Zellkultur und Experimente mit Zellen erfolgten unter sterilen Bedingungen. Es fanden regelmäßige Testungen auf Verunreinigung der Zellkultur durch Mykoplasmen statt.

#### 2.2.1.3 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit Trypsin und EDTA abgelöst und die Lebendzellzahl mit 0,4 % Trypanblau-Ausschlussfärbung in der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Bei dieser Färbung nehmen die toten Zellen aufgrund gestörter Membranintegrität den Farbstoff auf, während die lebenden farblos bleiben.

#### 2.2.1.4 Transfektion von Panc02-Zellen mit RLH-Liganden

Die Tumorzellen wurden 48 h vor Transfektion mit poly(I:C) bzw. 24 h vor Transfektion mit ppp-RNA in DMEM Vollmedium ausplattiert. Dabei wurde eine Zelldichte von  $1,5 \times 10^4$  Zellen pro Well für die Transfektion mit poly(I:C) bzw.  $3,0 \times 10^4$  Zellen pro Well für die Transfektion mit ppp-RNA in 24-Well Zellkulturplatten angestrebt. Somit wurde gewährleistet, dass die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion adhärent und ungefähr 50 % konfluent waren. Eine Stunde vor Transfektion wurde das Medium durch Transfektionsmedium ersetzt. Die benötigten Mengen an RNA bzw. poly(I:C) und RNAiMAX (Transfektionsreagenz) wurden in gleichen Mengen Opti-MEM I *Reduced Serum Medium* angesetzt und nach 5 min zusammengefügt. Es wurden 0,0005 µl RNAiMAX pro ng RNA, und 0,0025 µl RNAiMax pro ng poly(I:C) verwendet. Die Zellen wurden mit 3 µg/ml ppp-RNA oder 0,5 µg/ml poly(I:C) bzw. entsprechenden Mengen einer Kontroll OH-RNA transfiziert.

Die ppp-RNA wurde mittels *in vitro* Transkription nach folgenden DNS-Nukleotid-Sequenzen generiert: *Sense*: 5'-TACGTAAGCTGGATAGCGCTATAGTGAGTCG-3' und *Anti-Sense*: 5'GCGCTATCCAGCTTACGTATATAGTGAGTCG-3'. Die passende unspezifische OH-RNA Kontrollsequenz wurde von Eurofins (Ebersberg, D) erworben. Der synthetische MDA5-Ligand *polyinosinic:polycytidylic acid* (poly(I:C)) wurde von Invivogen (Toulouse, F) bezogen. Nach 20 min Inkubation von RNAiMAX und RNA bzw. poly(I:C) bei Raumtemperatur zur Gewährleistung einer suffizienten Komplexbildung wurden die Zellen transfiziert.

## 2.2.2 Zellisolation

### 2.2.2.1 Versuchstiere

Für die Isolation von dendritischen Zellen aus der Milz wurden, mit Ausnahme der IFNAR<sup>-/-</sup>- und ASC<sup>-/-</sup>-Stämme, weibliche C57BL/6 Mäuse verwendet. Die NLRP3<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Jürg Tschopp (früher Abteilung für Biochemie, Universität Lausanne, Schweiz), die RAGE<sup>-/-</sup>-Mäuse von Prof. Markus Sperandio (Walter Brendel Zentrum für Experimentelle Medizin, LMU München) und die ASC<sup>-/-</sup>- und IFNAR<sup>-/-</sup>-Mäuse (129/SvEv Hintergrund) von Prof. Hans-Joachim Anders (Medizinische Klinik und Poliklinik IV, LMU München) zur Verfügung gestellt. IL-18<sup>-/-</sup>- und P2X7R<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden bei Charles River (Wilmington, USA) erworben. Die Experimente wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (TVA: 55.2-1-54-2532-175-12).

### 2.2.2.2 Haltungsmethoden

Für die Tierhaltung wurde die Tierversuchshaltung der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der Universität München genutzt. Diese erfüllt die hygienischen Standards und wird von ausgebildeten Tierpflegern geleitet. Die Mäuse erhielten Pelletfutter und Wasser *ad libitum*. Pro Käfig wurden maximal sechs Mäuse gehalten. Ein zwölfstündiger Tag-Nacht-Rhythmus wurde durch einen automatischen Lichtregler simuliert.

### 2.2.2.3 Isolation von dendritischen Zellen aus der Milz

Physiologischerweise sind nur 1-2 % der Splenozyten dendritische Zellen. Um die für die Versuche benötigte Anzahl an dendritischen Zellen zu erhalten, wurde C57BL/6-Mäusen durch subkutane Injektion von  $5 \times 10^6$  FLB16-Zellen ein Tumor gesetzt. Wie oben dargelegt, wird von dieser genetisch modifizierten Melanomzelllinie der Wachstumsfaktor Flt3L sezerniert. Dies führt nach Etablierung eines subkutanen Tumors zu einer Expansion von dendritischen Zellen *in vivo* [Maraskovsky et al. 1996]. Die Milzentnahme wurde 10 Tage nach Injektion der Tumorzellen durchgeführt. Für die Milzentnahme wurden die Mäuse mit Isofluran anästhesiert und durch zervikale Dislokation getötet. Die Milz wurde unter sterilen Bedingungen über einen seitlichen Bauchschnitt mit Eröffnung des Peritoneums entnommen und nach Entfernung des perihilären Fettgewebes in eine Petrischale mit RPMI Medium ohne fötales bovines Serum (FBS) transferiert. Die Petrischale wurde eisgekühlt um eine Wärmeaktivierung der Splenozyten zu verhindern. Mit Hilfe einer Kanüle wurde das Blut aus der Milz in das Medium gespült und anschließend die Milz mechanisch zerkleinert. Zellsuspension

und Milzreste wurden durch einen Nylonfilter mit 40  $\mu\text{M}$  Porengröße gespült und 5 min bei 400 g zentrifugiert.

Das Pellet wurde in RPMI-Vollmedium ohne FBS, dem 1 mg/ml Kollagenase D und 0,01 % DNase I hinzugefügt wurden, resuspendiert und die Suspension 20 min unter ständigem Mischen bei Raumtemperatur inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch 400  $\mu\text{l}$  0,1 M EDTA pro 4 ml Verdauungslösung fünf min abgestoppt und die Suspension anschließend durch einen Nylonfilter mit Porengröße 100  $\mu\text{M}$  gespült, um noch vorhandenes Bindegewebe und Debris zu entfernen. Die Suspension wurde zentrifugiert (400 g, 5 min, 4°C) und anschließend das Pellet mit 5 ml Biocoll (Dichte: 1,077 g/cm<sup>3</sup> bei 4°C) resuspendiert. In einem 14 ml Röhrchen vorgelegte 5 ml Biocoll wurden mit der Zellsuspension überschichtet. Als abschließende Schicht dienten 3 ml FCS/EDTA (hitzeinaktiviertes FBS plus 2 % 0,1 M EDTA). Hierauf wurde eine Gradientenzentrifugation für 10 min (1700 g, Bremse 0, 4°C) durchgeführt. Die Bande mit den angereicherten Zellen wurde abgenommen, in HANKS-Puffer resuspendiert und gezählt. Die weitere Aufreinigung erfolgte mit dem *Dynabeads Mouse DC Enrichment Kit* (Invitrogen, Oslo) nach dem Protokoll des Herstellers. Die Reinheit der dendritischen Zellen wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse unmittelbar nach Isolation ermittelt.

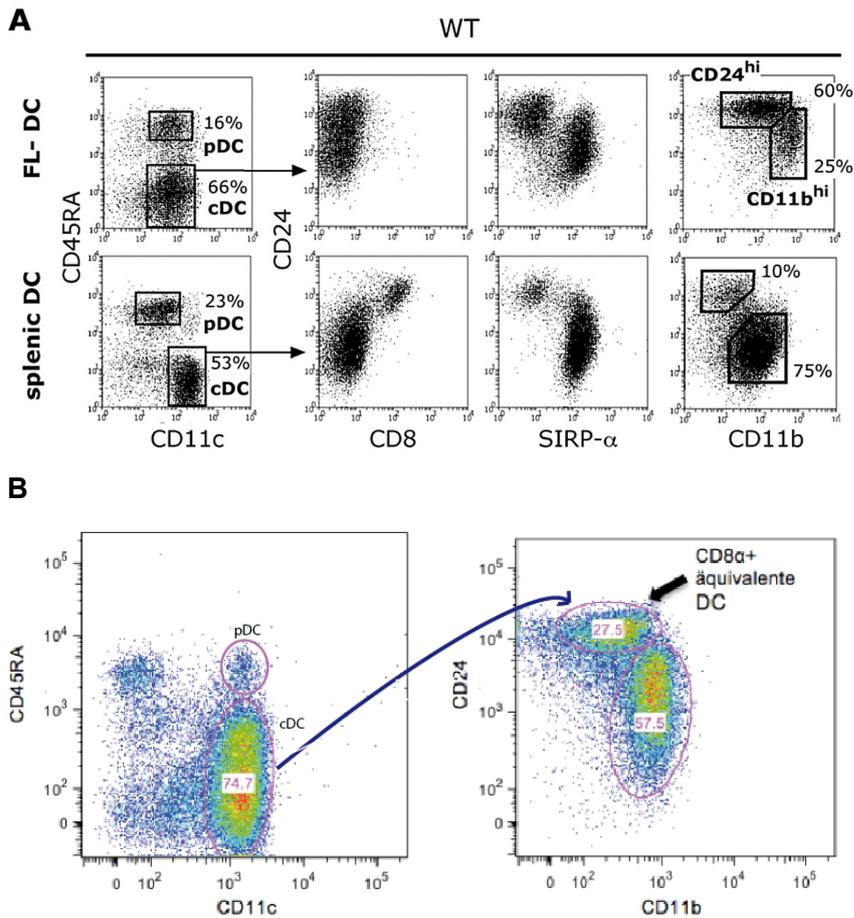
#### 2.2.2.4 Isolation von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark

Da ASC<sup>-/-</sup>- und IFNAR<sup>-/-</sup>-Mäuse nicht mit C57BL/6 Hintergrund zur Verfügung standen, konnte die dendritische Zell-Generierung nicht mittels FLB16-Tumor erfolgen. Daher wurden Zellen dieser *knockout*-Stämme aus dem Knochenmark isoliert und anschließend *in vitro* mit rekombinantem Flt3L inkubiert. Als Grundlage für die Methode diente eine Publikation von Naik et al. [Naik et al. 2005]. Für die Gewinnung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark wurden Mäuse mit Isofluran anästhesiert und durch zervikale Dislokation getötet. Aus beiden Hinterläufen wurden Femur und Tibia unter sterilen Bedingungen entnommen und nach Entfernung von Geweberesten in eine Petrischale mit RPMI Vollmedium gelegt. Die Knochen wurden 90 Sekunden in 70 % Ethanol sterilisiert und anschließend in eine Petrischale mit PBS transferiert. Die Epiphysen wurden an beiden Enden abgeschnitten. Mit einer 25 G Kanüle auf einer mit RPMI Vollmedium gefüllten Spritze wurden die Knochenmarkszellen aus der Diaphyse durch einen 40  $\mu\text{M}$  Filter in ein Falcon gespült. Das Medium wurde nach Zentrifugation entfernt (400 g, 4 min, 4°C). Das Pellet wurde mit 3 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und drei Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit PBS aufgefüllt und zentrifugiert (400 g, 5 min,

4°C) Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen gezählt und auf die Zelldichte  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml Medium gebracht.

#### 2.2.2.5 Gewinnung von den $CD8\alpha^+$ cDC entsprechenden dendritischen Zellen

Zu den aus dem Knochenmark isolierten Zellen wurden 300 ng/ml rekombinanter muriner Flt3L hinzugefügt. Die Zellen wurden in einer 6-Well Zellkulturplatte mit 5 ml Zellsuspension pro Well in einer Dichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml ausplattiert. Nach zehn Tagen Inkubation im Zellkulturschrank wurden die Zellen abgenommen, gezählt und auf die gewünschte Zelldichte gebracht. Aus den auf diese Weise generierten Zellen kann in der FACS-Analyse eine Zellpopulation identifiziert werden, die trotz Abweichungen im Bezug auf die Oberflächenmarker funktionell und phänotypisch den cDC der Milz entspricht. Diese Gruppe kann in Subgruppen unterteilt werden, die den  $CD8\alpha^+$  bzw. den  $CD8\alpha^-$  cDC äquivalent sind [Naik et al. 2005]. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen mit CD45RA, CD11b, CD11c und CD24 gefärbt. Die  $CD45RA^{low} CD11b^{low} CD24^{high}$  Population stellt dabei die den  $CD8\alpha^+$  cDC entsprechende Population dar (Abb. 4).



**Abb. 4: Durchflusszytometrische Bestimmung der den  $CD8\alpha^+$  cDC äquivalenten  $CD24^{high}$   $CD11b^{low}$  DC**

(A) Die mittels exogenem Flt3L generierten Zellen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD11b, CD11c, CD45RA und CD24 gefärbt. In der durchflusszytometrischen Analyse wurde die  $CD45RA^{low}$   $CD11c^{high}$  Population, die den cDC entspricht, hinsichtlich ihrer Expression von CD24 und CD11b analysiert. Die Zellen, die eine hohe Expression von CD24 und geringe Expression von CD11b aufweisen stellen funktionelle Äquivalente der  $CD8\alpha^+$  cDC aus der Milz dar [Naik et al. 2005]. (B) Für die Aktivierungsversuche mit  $ASC^{-/-}$  und  $IFNAR^{-/-}$ -Mäusen wurden dendritische Zellen auf die oben vorgestellte Weise generiert. Es konnten durchflusszytometrisch die gleichen Populationen wie in der Publikation von Naik et al. [Naik et al. 2005] identifiziert werden.

## 2.2.3 Funktionelle Assays

### 2.2.3.1 Apoptose-Assay mittels Annexin V / Propidium-Iodid Färbung

Tumorzellen wurden mit ppp-RNA und poly(I:C) transfiziert (siehe Transfektion mit ppp-RNA und poly(I:C)). 48 h nach Transfektion mit ppp-RNA bzw. 24 h nach Transfektion mit poly(I:C) wurde durchflusszytometrisch mittels Annexin V / Propidiumiodid-Färbung der Anteil lebender Zellen bestimmt. Annexin V bindet Phosphatidylserin, das bei lebenden Zellen auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran lokalisiert ist. Im Verlauf der Apoptose kommt es zur Translokation von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zellmembran, was zur Folge hat, dass

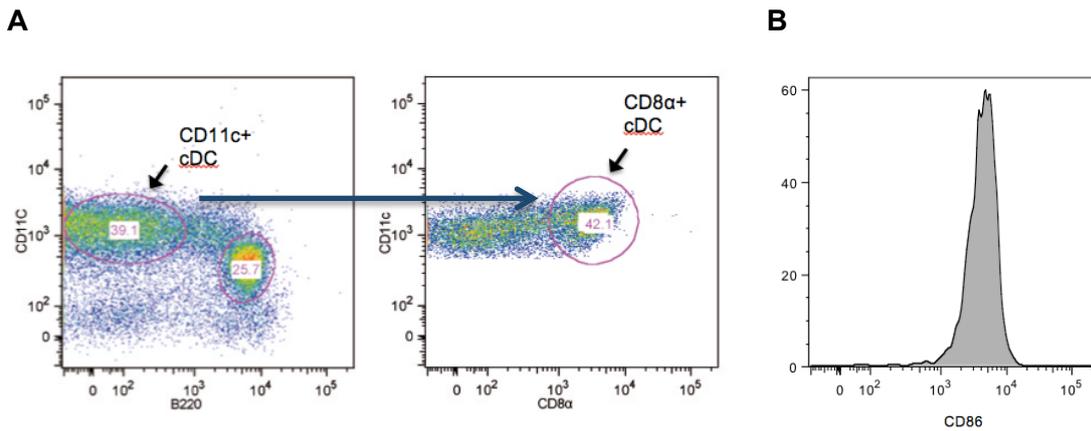
apoptotische Zellen im Gegensatz zu lebenden Zellen Annexin V binden. Bei Propidiumiodid handelt es sich um einen Nukleinsäureinterkalator, der nur eine perforierte Zellmembran überwinden kann. Dies lässt den Schluss zu, dass sich in der Durchflusszytometrie Propidiumiodid gefärbte Zellen bereits in einem Endstadium der Apoptose befinden bzw. durch Nekrose zugrunde gegangen sind. Für die Färbung wurden die Panc02-Zellen aus den Zellkulturplatten abgenommen, in FACS-Röhrchen transferiert und nach Zentrifugation mit Annexin-APC gefärbt. Propidiumiodid wurde unmittelbar vor der FACS-Analyse hinzugefügt. Die doppelt-negative Population stellt den Anteil lebender Zellen dar.

#### 2.2.3.2 Assay für Aktivierung dendritischer Zellen

Panc02-Zellen wurden nach der Transfektion mit poly(I:C) für 24 h, bzw. nach Transfektion mit ppp-RNA für 48 h im Zellkulturschrank inkubiert. Am Tag der dendritischen Zell-Isolation wurden die 24-Well-Zellkulturplatten mit den Tumorzellen zentrifugiert (400 g, 5 min, 4°C), der Überstand wurde abgenommen und pro Versuchsbedingung auf  $0,5-1 \times 10^6$  am selben Tag isolierte dendritische Zellen gegeben. Diese wurden 12 bis 14 h in RPMI Komplettmedium und Tumorzellüberstand im Verhältnis 1:1 kultiviert und dann für die durchflusszytometrische Analyse vorbereitet. Dafür wurden sowohl die adhärenenten als auch die nicht-adhärenenten dendritischen Zellen durch Spülen mit PBS von der Zellkulturplatte abgelöst und mit Antikörpern gegen B220, CD11c, CD8, CD86, CD80 und CD69 gefärbt.

#### 2.2.3.3 Analyse der Expression von Oberflächenantigenen

Zur Quantifizierung der Expression von Oberflächenantigenen auf dendritischen Zellen wurden diese in FACS-Röhrchen transferiert, zentrifugiert und in je 50 µl PBS resuspendiert. Anschließend wurden die fluoreszierenden Antikörper zugegeben. Nach Inkubation bei 4°C für 20 min in Dunkelheit wurden die Zellen gewaschen und somit nicht gebundener Antikörper entfernt. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in jeweils 150 µl FACS-Puffer resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 5). Analog dazu erfolgte die Färbung von Pan02-Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen MCH-I und CD95.



**Abb. 5: Durchflusszytometrische Analyse dendritischer Zellen**

(A) Die aus der Milz isolierten dendritischen Zellen wurden zur Identifikation der einzelnen Populationen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD11c, B220 und CD8 $\alpha$  gefärbt. Bei den CD11c<sup>+</sup> B220<sup>-</sup> Zellen handelt es sich um die Gruppe der cDC. Die CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Subpopulation der cDC wurde auf die Expression von CD69, CD80 und CD86 untersucht. (B) Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität von CD86 der CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> cDC als Histogramm.

#### 2.2.3.4 Intrazelluläre CXCL10-Färbung

Um die CXCL10 Produktion von DC nach Inkubation mit Tumorüberstand zu messen, wurden die dendritischen Zellen nach 4 h Kultur im Tumorzellüberstand im Verhältnis 1:1 (RPMI Vollmedium : Tumorzellüberstand) für 6 h in Anwesenheit von 2  $\mu$ g/ml Brefeldin A inkubiert. Nach Abnahme aus den Kulturplatten, wurden die dendritischen Zellen zur Identifikation in der FACS Analyse mit Antikörpern gegen Oberflächenantigene gefärbt. Nach Fixierung mit Paraformaldehyd 2 % für 15 min bei Raumtemperatur wurden sie mit 0,5 % Saponin permeabilisiert und anschließend mit Ziege-anti-Maus-CXCL10-Antikörper gefärbt. Die Detektion erfolgte mit dem Sekundärantikörper Esel-anti-Ziege IgG-FITC. Nach Zugabe der Antikörper wurden die Zellen jeweils für 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert und zweimal gewaschen. Anschließend erfolgte die Resuspension in Paraformaldehyd 2 % und die durchflusszytometrische Analyse.

#### 2.2.4 PARP-1 Western Blot

Panc02-Zellen wurden mit ppp-RNA oder OH-RNA transfiziert. Nach 24 h wurden die transfizierten Zellen und unbehandelte Zellen mittels Lämmli-puffer lysiert. Das Lysat wurde 10 min auf 100°C erhitzt und anschließend zentrifugiert. In einem 8 % Natriumdodecylsulfat (SDS) Trenngel wurden die Proteine und der Marker #SM1811 unter Anlage eines konstanten elektrischen Feldes von 30 mA nach Molekulargröße aufgetrennt. Die separierten Proteine wurden daraufhin mittels *Wet-Transfer*-Technik in einem Transferpuffer bei 360 mA 1 h auf eine Membran geblottet. Anschließend wurde die Membran mit *Tris-buffered saline and Tween 20* (TBST) gewaschen, in einer

*blocking*-Lösung zur Verhinderung unspezifischer Antikörperbindungen inkubiert und weitere Male in TBST gewaschen. Als Primärantikörper wurde Kaninchen-anti-Maus PARP-1-Antikörper, als Sekundärantikörper an Meerrettichperoxidase gekoppeltes anti-Kaninchen-IgG verwendet. Die Visualisierung erfolgte mittels *enhanced-chemiluminescence*- (ECL-) Substrat, dessen Lichtsignal von einem LAS-4000 Bildlesegerät detektiert wurde.

### 2.2.5 Konfokalmikroskopie

Panc02 wurden auf Mikroskop-Glasbodenplatten ausplattiert und mit ppp-RNA bzw. OH-RNA transfiziert. Die Oberflächenfärbung für Calreticulin erfolgte mit 5 µg/ml Kaninchen-anti-Maus-Antikörper gegen Calreticulin. Als fluoreszierender Sekundärantikörper für die FACS-Analyse wurde Alexa Fluor 488-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper verwendet. Die Zellen wurden zusätzlich mit Alexa Fluor 647 Cholera Toxin Untereinheit B für die Markierung der Zelloberfläche und Hoechst-Lösung für die Darstellung des Zellkerns gefärbt.

### 2.2.6 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.6.1 Generierung von 5' Triphosphat-RNA durch *in vitro* Transkription

Für die Generierung der 5' Triphosphat-RNA (ppp-RNA) diente das *MEGAscript T7 Kit* [Hornung et al. 2006]. Anhand eines DNA-Templates führt die T7-RNA-Polymerase die Transkription der RNA aus und modifiziert das 5' Ende mit einem Triphosphat-Rest, der für die Erkennung durch RIG-I essentiell ist. Für die Synthese der doppelsträngigen DNA wurde die Klenow Fragment, *exo*-DNA-Polymerase genutzt. *Sense* und *antisense* ppp-RNA Einzelstränge wurden gemeinsam inkubiert und hybridisiert. Mit DNase Verdau (TURBO™ DNase), Phenol-/Chloroformzugabe und anschließender Ausfällung mit Ethanol und Zentrifugation mit *mini Quick Spin Oligo Columns* wurde die ppp-RNA aufgereinigt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch.

#### 2.2.6.2 Quantitative *real-time*-Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe von *messenger* RNA (mRNA)-basierter quantitativer *real-time*-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) wurde die quantitative Expression der mRNA bestimmter Gene bestimmt. Es handelte sich um eine relative Quantifizierung im Verhältnis zur mRNA-Expression des *house keeping*-Gens Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase (HPRT). 18 h nach Transfektion mit RLH-Liganden wurde der Überstand der Tumorzellen abgenommen. Zu den adhärennten Tumorzellen wurden anschließend

je 600 µl Lysepuffer pro Well gegeben. Das Lysat wurde in 2 ml Eppendorfgefäße überführt und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette homogenisiert. Die RNA wurde nach Anleitung des Herstellerprotokolls des *RNeasy Mini Kits* isoliert. Die Konzentration der erhaltenen RNA wurde anschließend photometrisch bestimmt. Unter Verwendung einer reversen Transkriptase wurde die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Es wurde der *Oligo* (dT)<sub>18</sub> Primer verwendet, der mRNA an ihrem Poly-A Schwanz erkennt. Für reverse Transkription wurde das kommerziell erhältliche *RevertAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit* genutzt. Die Reaktionslösung enthielt folgende Bestandteile:

Komponente	Volumen	Finale Konzentration
RNA-Probe	1 µg	
<i>Oligo</i> (dT) <sub>18</sub> Primer	2 µl	10 µM
5X <i>Reaction Buffer</i>	4 µl	1X
RiboLock <sup>TM</sup> RNase Inhibitor (20 u/µl)	1 µl	1 U/µl
dNTP Mix	2 µl	1 mM
RevertAid <sup>TM</sup> M-MuLV Reverse Transkriptase	1 µl	10 U/µl
Nuklease-freies Wasser	ad 20 µl	

**Tabelle 4: Ansatz für reverse Transkription**

Die RNA wurde 5 min bei 70°C denaturiert. Anschließend wurde mittels reverser Transkriptase bei 42°C die cDNA synthetisiert. Durch Erhitzung auf 80°C wurde das Enzym inaktiviert und hierauf die gewonnene cDNA mit 30 µl nukleasefreiem Wasser verdünnt und bei -20°C aufbewahrt.

Für die Durchführung der qRT-PCR wurden das *LightCycler® 480 Probes Master Kit* und kurzkettige fluoreszierende Hydrolysesonden der *Universal ProbeLibrary* verwendet. Es wurde auf Lichtschutz geachtet und alle Reagenzien auf Eis aufbewahrt. Jeder qRT-PCR-Ansatz setzte sich aus den folgenden Reagenzien zusammen:

Komponente	Volumen	Finale Konzentration
Nuklease-freies Wasser	1,5 µl	
Primer <i>sense</i>	0,2 µl	0,5 µM
Primer <i>antisense</i>	0,2 µl	0,5 µM
2X <i>LightCycler® 480 Probes Master Mix</i>	5 µl	1X
Sonde	0,1 µl	0,1 µM
cDNA-Probe	3 µl	

**Tabelle 5: Ansatz für Polymerase-Kettenreaktion**

Die Proben wurden mit einem LightCycler® 480 2.0 System amplifiziert und mit der *LightCycler® 480* Software (Version 1.5.0) ausgewertet. Die PCR-Parameter wurden folgendermaßen programmiert:

Zyklen	Vorgang	Zieltemperatur	Dauer
1	Vorinkubation	95 °C	10 min
45	Denaturierung	95 °C	10 sec
	<i>Annealing</i>	60 °C	30 sec
	Elongation	72 °C	1 sec
1	Abkühlung	40 °C	30 sec

**Tabelle 6: Polymerase-Kettenreaktion**

Folgende Primersequenz wurde verwendet:

Zielgen	Sequenz <i>forward</i>	Sequenz <i>reverse</i>	Sonde
Murines IFN- $\beta$	CCCAGTGCTGGAGAAATTGT	ACTGCCTTTGCCATCCAA	50

**Tabelle 7: Primersequenz**

### 2.2.7 CXCL10 ELISA

Beim ELISA handelt es sich um eine antikörperbasierte Methode zur Quantifizierung von Proteinen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein kommerzieller Sandwich ELISA (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, D) zur Messung der Konzentration von löslichem CXCL10 im Überstand transfizierter Tumorzellen nach Herstellerangaben verwendet. Für die Durchführung wurden 96-Well-Rundboden-Mikrotiterplatten verwendet. Ausgewertet wurde der ELISA mit einem Mithras LB940 Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 450 nm. Zur Quantifizierung dienten mit rekombinant hergestelltem CXCL10 generierte Standardkurven. Die Konzentration von CXCL10 wurde 48 bzw. 24 h nach Transfektion mit ppp-RNA bzw. poly(I:C) bestimmt.

## 2.3 Statistische Analyse

Die Daten wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben. Für die Analyse signifikanter Unterschiede wurde der zweiseitige Student-t-Test verwendet. Dafür wurde die Software *GraphPad Prism 5* genutzt. Ein p-Wert <0,05 wurde als signifikant erachtet.

### 3. Ergebnisse

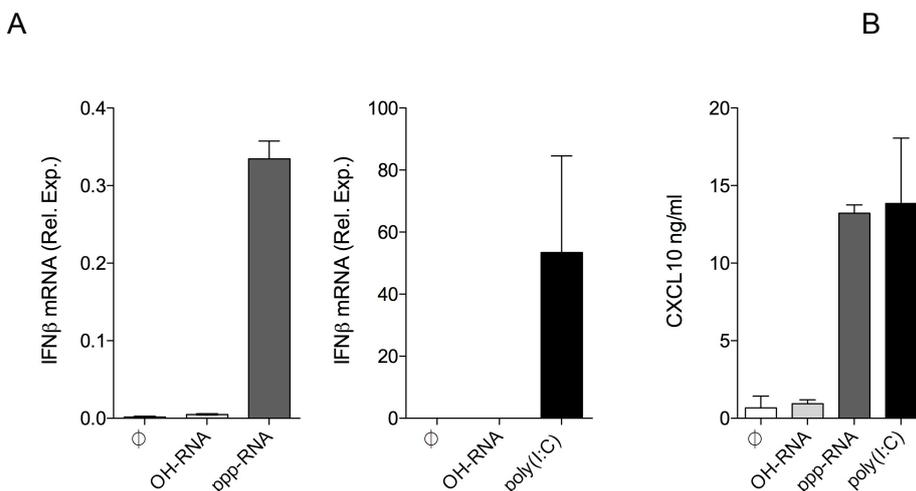
#### 3.1 Folgen der RLH-Aktivierung in Panc02-Tumorzellen

Von virusinfizierten Zellen ist bekannt, dass die Aktivierung von RLH zur Produktion von Typ-I-IFN und Apoptose führt [Roulston et al. 1999, Rouse et al. 2010]. Es wurde zunächst untersucht, ob diese Folgen auch nach Transfektion von Panc02-Tumorzellen mit RLH-Liganden auftreten.

##### 3.1.1 RLH-Liganden induzieren Typ-I-IFN und Zelltod in Panc02-Zellen

Als Erstes wurde geprüft, ob die Transfektion von Panc02-Zellen mit RLH-Liganden zur Produktion von Typ-I-IFN führt. Dafür wurde im Zelllysate die relative Konzentration von IFN- $\beta$ -mRNA mittels qRT-PCR bestimmt. Für die Transfektion mit poly(I:C) wurde eine subletale Dosis verwendet. Im Vergleich zu Tumorzellen, die mit einer Kontroll-RNA ohne Triphosphat-Modifikation (OH-RNA) transfiziert worden waren, konnte eine deutlich erhöhte Expression von IFN- $\beta$ -mRNA gemessen werden (Abb. 6A).

Zudem wurde mittels ELISA die Konzentration von CXCL10 im Überstand der Tumorzellen bestimmt. Auch hier war bei den RLH-aktivierten Panc02-Zellen eine deutlich erhöhte Konzentration von CXCL10 messbar (Abb. 6B).

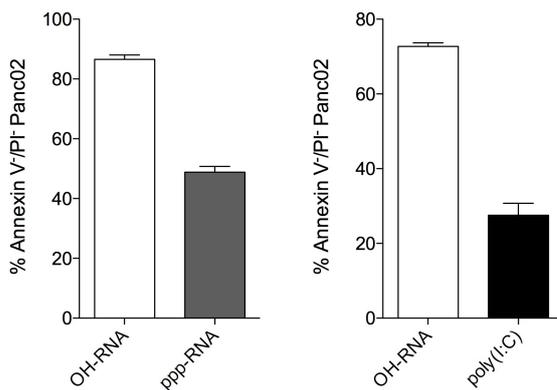


**Abb. 6: RLH-Liganden führen zu Produktion von IFN- $\beta$  und CXCL10 in Panc02-Zellen**

(A) 18 h nach Transfektion mit RLH-Liganden (ppp-RNA 3000 ng/ml bzw. poly(I:C) 62,5 ng/ml) bzw. einer Kontroll RNA (OH-RNA) wurde die relative Menge an IFN- $\beta$ -mRNA mittels qRT-PCR und (B) die Konzentration von CXCL10 mittels ELISA im Überstand bestimmt. Die Balken repräsentieren Mittelwert + Standardabweichung (SD). Es sind repräsentative Ergebnisse aus je zwei unabhängigen Versuchen dargestellt.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob RLH-Liganden in Panc02 Zelltod induzieren. Dafür wurden Panc02-Zellen mit den RLH-Liganden ppp-RNA (RIG-I) und poly(I:C) (MDA5) transfiziert und nach 48 bzw. 24 h mit Annexin V und Propidiumiodid (PI) für die FACS Analyse gefärbt. Da während des Vorgangs der Apoptose Phosphatidylserin auf die extrazelluläre Seite der Zellmembran transloziert wird, stellen sich früh-apoptotische Zellen durchflusszytometrisch Annexin V positiv dar. Werden Zellen nekrotisch, wird die Membranintegrität der Zellwand stärker geschädigt und es kommt zum Übertritt von PI nach intrazellulär, weshalb nekrotische bzw. spät-apoptotische Zellen als PI positiv zu erkennen sind. Nach Aktivierung von RLH mit poly(I:C) oder ppp-RNA konnte eine deutliche Abnahme der Anzahl an Annexin<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> Zellen (lebenden Zellen) beobachtet werden (Abb. 7A). Der Nachweis von gespaltenem PARP-1 weist darauf hin, dass die Apoptose der RLH-aktivierten Tumorzellen über den intrinsischen Signalweg verläuft (Abb. 7B).

**A**



**B**

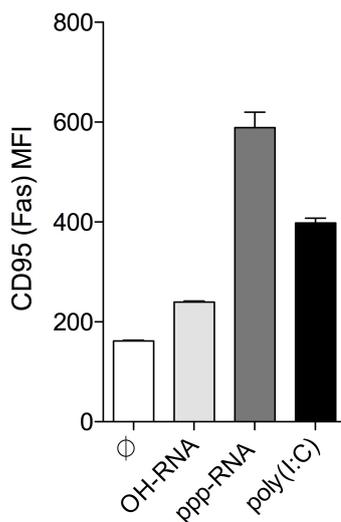


**Abb. 7: RLH-Liganden induzieren in Panc02-Zellen intrinsische Apoptose**

(A) 48 h bzw. 24 h nach Transfektion mit 3 µg/ml ppp-RNA bzw. 0,5 µg/ml poly(I:C) wurden Panc02-Zellen mit Annexin V-APC und PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> Zellen stellen den lebenden Anteil dar. Die Balken repräsentieren Mittelwerte + SD. Es ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt. (B) Mittels Western Blot wurde gespaltenes PARP-1 bei mit ppp-RNA transfizierten Zellen nachgewiesen. Es ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt [Düewell et al. 2014].

### 3.1.2 RLH-Liganden induzieren die Expression von Fas (CD95) auf Panc02-Zellen

Um zu untersuchen, ob die RLH-Aktivierung auch zu einer erhöhten Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber Fas-Rezeptor-vermittelter Apoptose, also extrinsischer Apoptose, führt, wurde die Expression des Fas-Rezeptors (CD95) auf Panc02-Tumorzellen 48 bzw. 24 h nach Transfektion mit ppp-RNA bzw. poly(I:C) durchflusszytometrisch analysiert. RLH-aktivierte Tumorzellen zeigten eine verstärkte Expression von CD95 (Abb. 8).



**Abb. 8: RLH-Aktivierung führt zu Expression von CD95 auf Panc02-Tumorzellen**

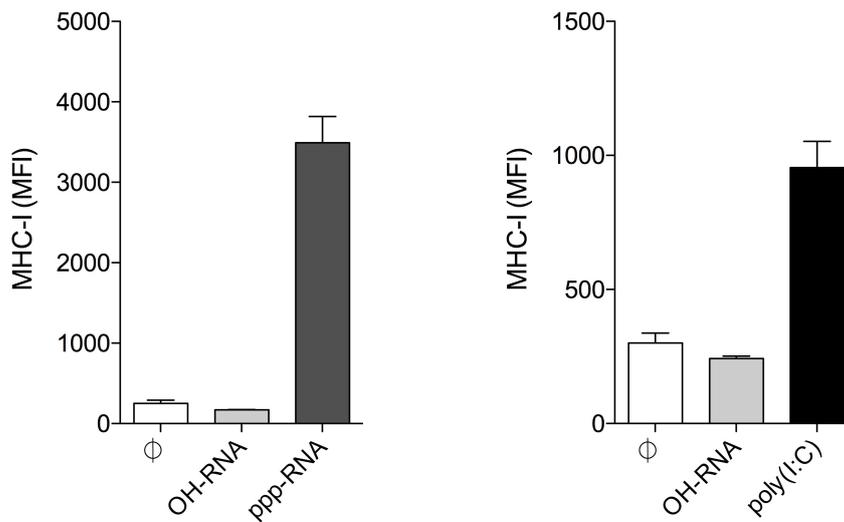
Panc02-Tumorzellen wurden mit ppp-RNA (3 µg/ml) bzw. poly(I:C) (0,5 µg/ml) transfiziert. Nach 48 bzw. 24 h wurde mittels Durchflusszytometrie die Expression des Fas-Rezeptors (CD95) gemessen. Die Balken repräsentieren Mittelwerte + SD. Es ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt [Düwell et al. 2014].

### 3.1.3 RLH-Liganden induzieren die Expression von MHC-I und Translokation von Calreticulin auf die Zelloberfläche von Panc02-Zellen

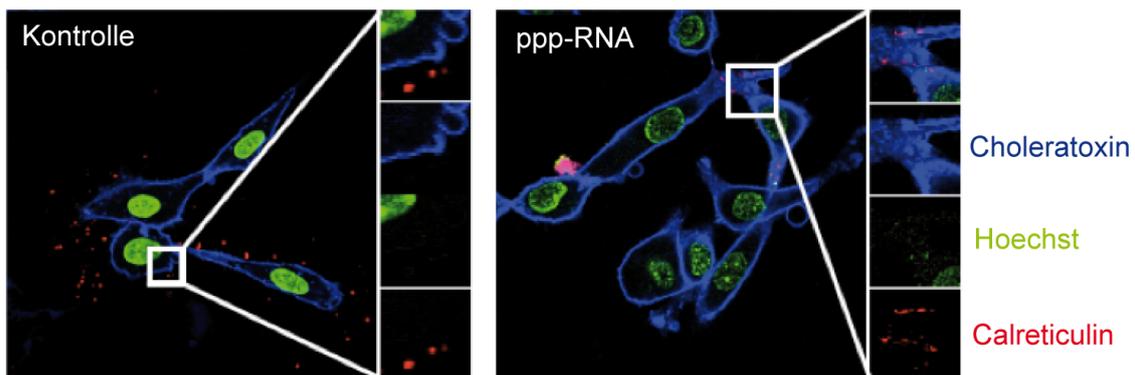
Als Nächstes sollte untersucht werden, ob durch RLH-Aktivierung Veränderungen der Panc02-Zellen auftreten, wie sie im Rahmen eines immunogenen Zelltods zu erwarten sind. Um aufzuklären, ob durch RLH-Aktivierung die Expression von MHC-I auf Pankreaskarzinomzellen wiederhergestellt wird, wurden Panc02-Zellen mit RLH-Liganden bzw. OH-RNA transfiziert und die Expression von MHC-I durchflusszytometrisch bestimmt. Panc02-Zellen, die mit RLH-Liganden transfiziert worden waren, zeigten eine deutlich stärkere Expression von MHC-I als unbehandelte Tumorzellen. Die Transfektion mit OH-RNA führte nicht zur Hochregulation von MHC-I (Abb. 9A).

Des Weiteren bestand die Frage, ob RLH-Aktivierung zum Auftreten immunogener Signale führt. Es ist bekannt, dass es im Rahmen des immunogenen Zelltods bei präapoptotischen Zellen zur Translokation von Calreticulin aus dem endoplasmatischen Retikulum in die Zellmembran kommt [Obeid et al. 2007b]. Mittels Konfokalmikroskopie konnte auch bei RLH-transfizierten Panc02 Calreticulin an der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Abb. 9B).

**A**



**B**



**Abb. 9: RLH-Aktivierung führt zu MHC-I Hochregulation und Translokation von Calreticulin auf die Zelloberfläche**

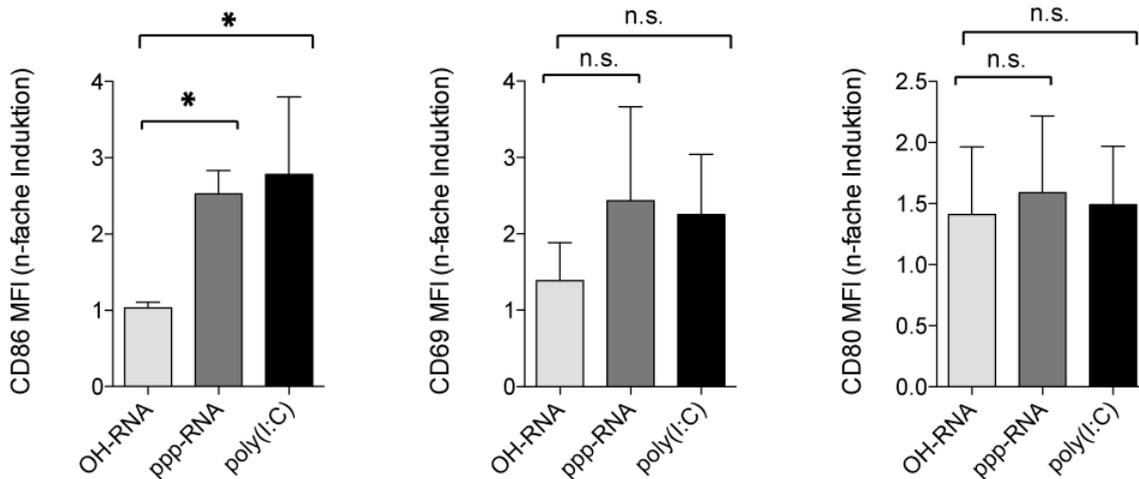
(A) Panc02-Zellen wurden mit 3 µg/ml ppp-RNA, 0,5 µg/ml poly(I:C) bzw. 3 µg/ml Kontroll-OH-RNA transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde die Expression von MHC-I auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch bestimmt. (B) Calreticulin (rot) wurde mittels konfokaler Mikroskopie detektiert. Die Zellmembranen wurden mit der Cholera toxin B-Untereinheit (blau) und die Zellkerne mit Hoechst (grün) gefärbt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte + SD. Es sind repräsentative Ergebnisse aus je drei unabhängigen Versuchen dargestellt [Düewell et al. 2014].

## 3.2 Konsequenzen der RLH-Aktivierung für dendritische Zellen

### 3.2.1 Dendritische Zellen regulieren nach Kontakt mit Überstand von RLH-aktivierten Panc02-Tumorzellen Aktivierungsmarker hoch

Als Nächstes wurde untersucht, ob RLH-Aktivierung von Tumorzellen zur Aktivierung von dendritischen Zellen führt. Aus der Milz isolierte dendritische Zellen setzen sich aus unterschiedlichen Subpopulationen zusammen. In der Durchflusszytometrie können diese mit Hilfe von Oberflächenfärbungen differenziert werden. Grundsätzlich werden CD11c<sup>+</sup> cDC von CD11c<sup>int</sup> pDC unterschieden. pDC exprimieren zudem B220. Murine cDC wiederum werden anhand ihrer Oberflächenmarker in drei Subgruppen eingeteilt, CD4<sup>+</sup>, CD8α<sup>+</sup> und doppelnegative DC [Vremec et al. 1992]. Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Kreuzpräsentation und Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen wurden in dieser Arbeit fokussiert die CD8α<sup>+</sup> cDC analysiert.

Frisch isolierte dendritische Zellen wurden mit Überständen von Tumorzellen, die 48 h zuvor mit ppp-RNA (3 µg/ml) bzw. 24 h zuvor mit poly(I:C) (0,5 µg/ml) oder OH-RNA (3µg/ml) behandelt worden waren, kultiviert. Nach 14 h wurde die Expression der Aktivierungsmarker CD86, CD80 und CD69 bestimmt. Unbehandelte Zellen zeigten eine basale Expression der Aktivierungsmarker, die durch Kultur mit Überständen von unbehandelten oder mit OH-RNA transfizierten Tumorzellen diskret erhöht war. Dagegen zeigten dendritische Zellen, die mit Überständen von RLH-aktivierten Tumorzellen inkubiert worden waren, eine ungefähr 3-fache Hochregulation von CD86. Diese übertraf die ca. 2,5-fach erhöhte Expression von CD86 durch LPS (Daten nicht gezeigt). Bei CD69 und CD80 war keine signifikant verstärkte Expression nachweisbar (Abb. 10).

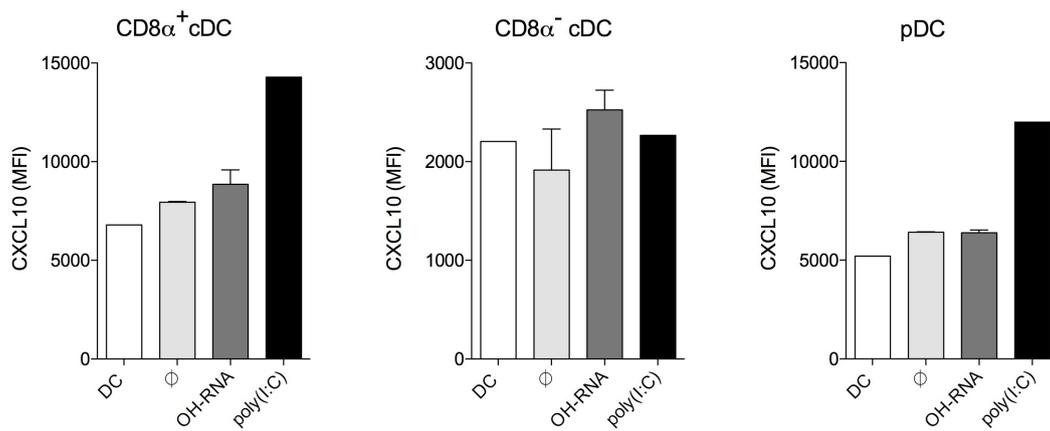


**Abb. 10: Aktivierung von dendritischen Zellen nach Inkubation mit Überstand von RNA- bzw. poly(I:C)-transfizierten Tumorzellen**

Dendritische Zellen wurden mit Überstand von OH-RNA-, ppp-RNA- bzw. poly(I:C)-transfizierten Tumorzellen inkubiert. Nach 14 h wurde durchflusszytometrisch die Expression von CD86, CD80 und CD69 der CD8 $\alpha^+$  cDC gemessen. Dargestellt ist die n-fache Induktion von CD86, CD80 und CD69 im Vergleich zu DC, die mit Überstand unbehandelter Tumorzellen inkubiert wurden. Die Balken repräsentieren Mittelwerte + SD aus drei unabhängigen Versuchen,  $p < 0,05$ .

### 3.2.2 Dendritische Zellen produzieren nach Inkubation mit Überständen RLH-aktivierter Tumorzellen CXCL10

Um zu untersuchen, ob dendritische Zellen nach Kontakt mit den Tumorzell-Überständen zur Sekretion von CXCL10 angeregt werden, wurden die Zellen nach siebenstündiger Kultur intrazellulär mit einem Antikörper gegen CXCL10 gefärbt. In der durchflusszytometrischen Auswertung zeigte sich bei DC, die mit poly(I:C) transfiziert worden waren, eine deutlich gesteigerte CXCL10 Produktion. Die CXCL10 Produktion war bei CD8 $\alpha^+$  cDC und in abgeschwächter Form auch bei pDCs zu beobachten, nicht jedoch bei den CD8 $\alpha^-$  DC (Abb. 11).

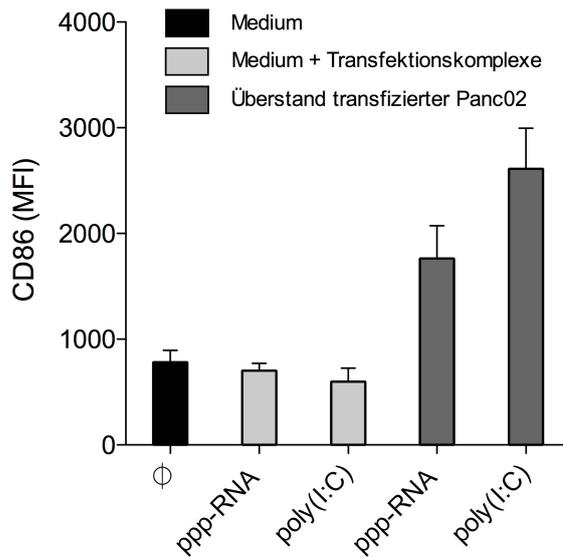


**Abb. 11: CXCL10-Produktion von dendritischen Zellen nach Kontakt mit Überstand RLH-Ligand-behandelter Tumorzellen**

Dendritische Zellen wurden 14 h im Medium von Tumorzellen kultiviert, die zuvor mit poly(I:C) transfiziert worden waren. Anschließend wurde die Produktion von CXCL10 in diversen DC-Populationen intrazellulär gemessen. Die Balken repräsentieren Mittelwerte + SD. Es ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt [Düewell et al. 2014].

### 3.2.3 Dendritische Zell-Aktivierung ist keine direkte Wirkung der im Medium vorhandenen RNA-Transfektionskomplexe

Um auszuschließen, dass die Aktivierung der dendritischen Zellen direkt durch im Tumorzellmedium vorhandene RLH-Liganden vermittelt wird, wurden dendritische Zellen in Medium, dem analog zu den Tumorversuchen 24 bzw. 48 h zuvor ppp-RNA- bzw. poly(I:C)-Transfektionskomplexe zugesetzt worden waren, inkubiert und nach 14 h die Aktivierung gemessen. Es zeigte sich, dass die Kultur im Medium mit Transfektionskomplexen nicht zur Zellaktivierung führt (Abb. 12). Die Schlussfolgerung, dass die Aktivierung keine direkte Wirkung der RLH-Liganden auf dendritische Zellen ist, ergibt sich auch aus Daten, die zeigen, dass dendritische Zellen aus MDA5- und IRF3/7-*knockout*-Mäusen dieselbe Aktivierung wie dendritische Zellen aus Wildtyp-Mäusen aufweisen (Daten nicht gezeigt) [Düewell et al. 2014]. Der fehlende direkte Effekt der RLH-Liganden auf die Zellaktivierung ist am ehesten auf die Instabilität der RNA-Komplexe im Serum-haltigen Medium zurückzuführen.



**Abb. 12: Aktivierung von dendritischen Zellen nach Kultur mit Überständen transfizierter Panc02-Zellen bzw. mit Medium, dem RNA-Transfektionskomplexe zugesetzt wurden**

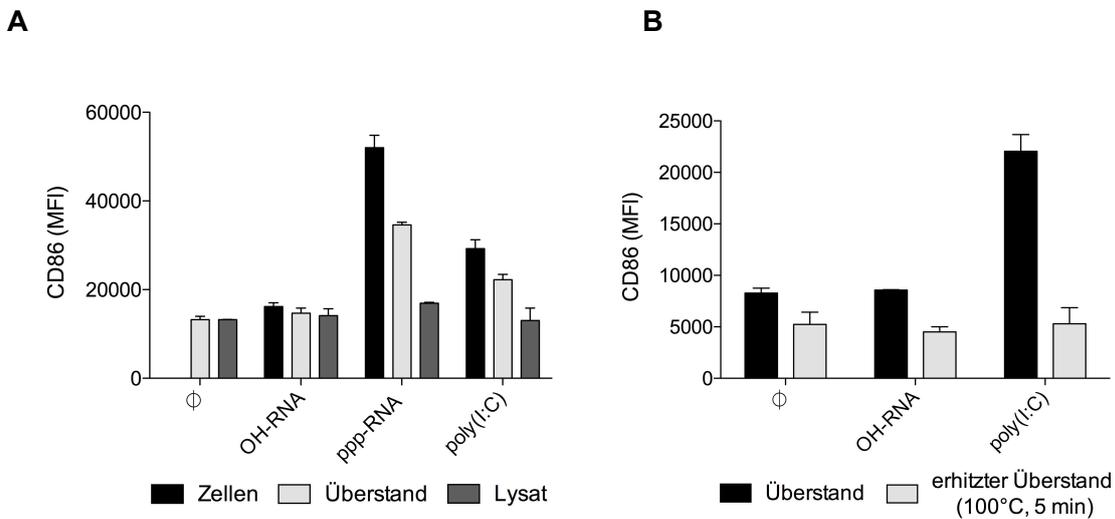
Dendritische Zellen wurden mit Kulturmedium oder Medium, dem Transfektionskomplexe mit 3 µg/ml ppp-RNA bzw. 0,5 µg/ml poly(I:C) zugesetzt wurden, inkubiert. Nach 14 h wurde die CD86 Expression bestimmt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte + SD. Es ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Versuchen dargestellt.

### 3.2.4 Dendritische Zell-Aktivierung wird durch einen löslichen Faktor vermittelt

Um sich der Frage anzunähern über welchen Mechanismus die Aktivierung der dendritischen Zellen stattfindet, wurde untersucht, ob sie durch einen Tumorzell-gebundenen oder löslichen Faktor vermittelt wird. Zudem wurde die Stabilität des Faktors gegenüber Hitze geprüft. Für die erste Fragestellung wurden dendritische Zellen entweder mit gewaschenen Tumorzellen oder mit dem durch Zentrifugation der Tumorzellkulturen gewonnenem Überstand inkubiert. Als weitere Bedingung diente Tumorzelllysate, das durch drei Frier-Tau-Zyklen generiert wurde. Sowohl nach Kokultur der dendritischen Zellen mit apoptotischen Tumorzellen, als auch nach Inkubation mit dem Überstand der Tumorzellen, der durch Zentrifugation frei von zellulären Bestandteilen war, konnte eine Hochregulation der Aktivierungsmarker beobachtet werden. Tumorzelllysate führte dagegen nicht zur Aktivierung. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Aktivierung durch einen von den Tumorzellen in das Medium freigesetzten löslichen Faktor vermittelt wird (Abb. 13A).

In einem weiteren Experiment wurde der Überstand der Tumorzellen für 5 min auf 100°C erhitzt und nach Abkühlung dem Kulturmedium der dendritischen Zellen im

Verhältnis 1:1 zugesetzt. Mit erhitztem Überstand ließ sich keine Aktivierung erreichen, woraus geschlossen werden kann, dass der gesuchte Faktor hitzelabil ist (Abb. 13B).



**Abb. 13: Aktivierung von dendritischen Zellen durch RLH-aktivierte Tumorzellen**

(A) Dendritische Zellen wurden mit transfizierten Tumorzellen, deren Überstand oder Tumorzelllysate inkubiert. Nach 14 h wurde durchflusszytometrisch die Aktivierung anhand der CD86 Expression gemessen. Die Balken repräsentieren Mittelwert + SD. Es ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt [Duewell et al. 2014]. (B) DC wurden mit Tumorzellüberstand, der zuvor für 5 min auf 100°C erhitzt worden war, inkubiert. Nach 14 h wurde durchflusszytometrisch die Aktivierung gemessen. Die Balken repräsentieren Mittelwert + SD. Es ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Versuchen dargestellt.

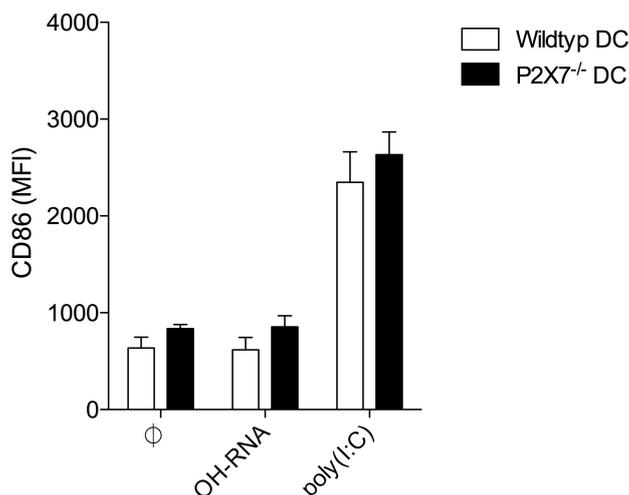
### 3.3 Untersuchung der Rolle bekannter immunogener Signale in der RLH-induzierten Aktivierung dendritischer Zellen mit Hilfe von *knockout*-Mäusen

Aus der Literatur sind einige Faktoren und Signalkaskaden bekannt, die im Rahmen des immunogenen Zelltodes freigesetzt werden und die dendritische Zell-Aktivierung vermitteln könnten. Dabei handelt es sich zum Beispiel um Calreticulintranslokation auf die Zelloberfläche, Freisetzung von ATP (P2X7-Rezeptor) oder HMGB1 (RAGE-Rezeptor) oder die NLRP3-Inflammasom-Aktivierung [Krysko et al. 2012]. Um die Rolle dieser Faktoren bei der Zellaktivierung durch RLH-vermittelten Zelltod aufzuklären, wurden dendritische Zellen aus *knockout*-Mäusen mit Gendefekten in den entsprechenden Signalwegen isoliert. Aus Unterschieden in der Aktivierung im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen konnte auf den Einfluss der untersuchten Faktoren geschlossen werden.

### 3.3.1 Aktivierung dendritischer Zellen ist unabhängig von NLRP3, P2X7, ASC und IL-18

Beim NOD-like-Rezeptor Protein 3 (NLRP3)-Inflammasom handelt es sich um einen Proteinkomplex bestehend aus NLRP3, *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* (ASC) und Pro-Caspase 1, der zur Aktivierung von Caspase-1 führt. Caspase-1 spaltet IL-1 $\beta$  und IL-18 aus ihren inaktiven Proformen ab. Das NLRP3-Inflammasom kann sowohl über Bestandteile von Pathogenen als auch über Bindung von ATP am P2X7-Rezeptor aktiviert werden. In den folgenden Versuchen wurde untersucht, ob die Reifung der dendritischen Zellen auf einer Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms bzw. des P2X7-Rezeptors beruht.

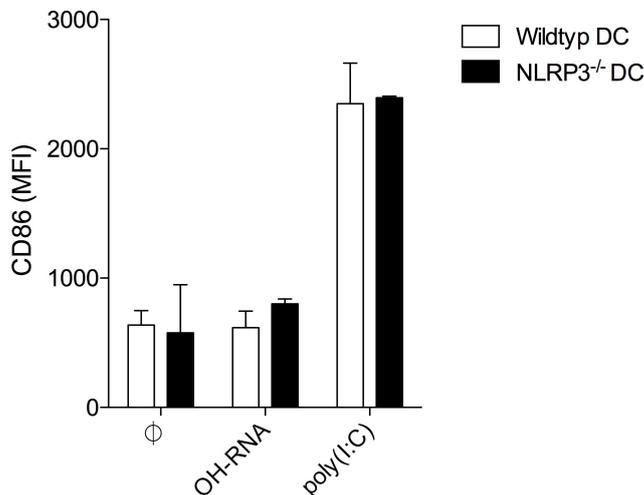
Das Molekül mit der stärksten Affinität zum P2X7-Rezeptor ist ATP [Martins et al. 2009]. ATP wird beim Zelltod in großer Menge aus dem Intrazellularraum freigesetzt und stellt ein wichtiges Gefahrensignal dar. Um die Frage zu klären, ob ATP über Bindung am P2X7-Rezeptor auf dendritischen Zellen den immunogenen Zelltod nach RLH-Aktivierung vermittelt, wurden dendritische Zellen aus P2X7<sup>-/-</sup>-Mäusen isoliert und mit Tumorzellüberständen kultiviert. Es bestand kein Unterschied in der CD86-Expression von Wildtyp- und P2X7<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die Aktivierung ist somit P2X7-unabhängig (Abb. 14).



**Abb. 14: CD86 Expression von dendritischen Zellen aus P2X7<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäusen**

Aus der Milz von P2X7<sup>-/-</sup>- bzw. Wildtyp-Mäusen wurden dendritische Zellen isoliert und mit Überständen RLH-aktivierter Tumorzellen inkubiert. Nach 14 h wurde die Expression von CD86 durchflusszytometrisch gemessen. Die Balken repräsentieren Mittelwerte + SD. Es ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Versuchen dargestellt.

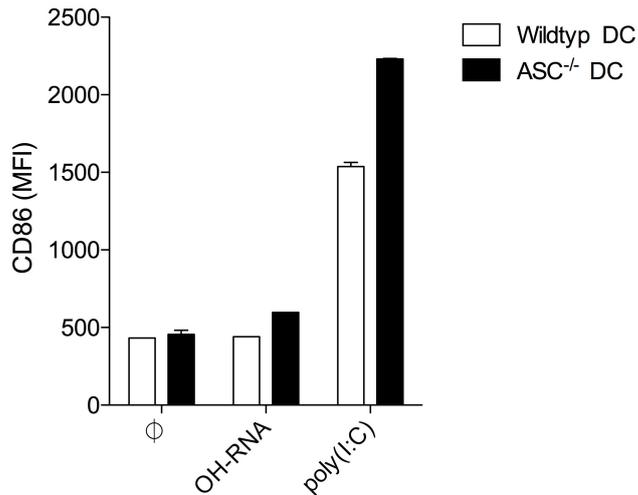
Bei der Aktivierung mit Überständen RLH-Ligand-transfizierter Tumorzellen konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen dendritischen Zellen aus NLRP3<sup>-/-</sup>-Mäusen und Wildtyp-Mäusen festgestellt werden. NLRP3 ist somit nicht essentiell für die Aktivierung dendritischer Zellen unter diesen Bedingungen (Abb. 15).



**Abb. 15: Expression von CD86 auf dendritischen Zellen aus NLRP3<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäusen nach Inkubation mit Tumorzellüberstand**

Aus der Milz von NLRP3<sup>-/-</sup>- bzw. Wildtyp-Mäusen wurden dendritische Zellen isoliert und mit Überständen RLH-aktivierter Tumorzellen inkubiert. Nach 14 h wurde die Expression von CD86 durchflusszytometrisch gemessen. Die Balken repräsentieren Mittelwerte + SD. Es ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Versuchen dargestellt.

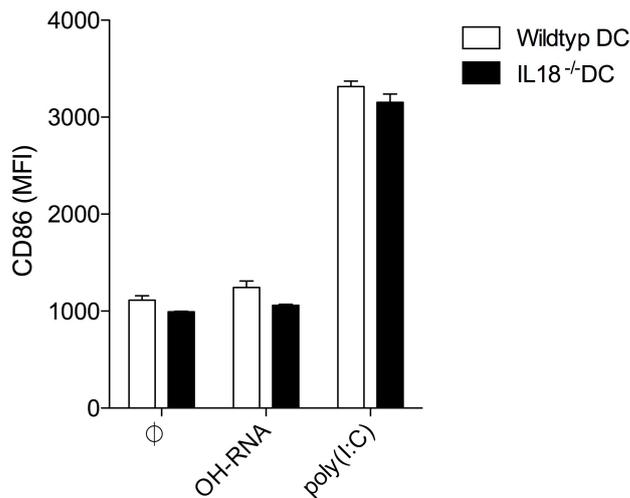
ASC ist ein Adapterprotein des NLRP3-Inflammasoms, aber auch anderer Inflammasome, das als Verbindung zwischen NLRP3 und Pro-Caspase-1 fungiert [Schroder et al. 2010]. Um den Einfluss von ASC auf die Aktivierung dendritischer Zellen zu bestimmen, wurden ASC<sup>-/-</sup>-Mäuse verwendet. Da ASC<sup>-/-</sup>-Mäuse nicht auf C57BL/6 Hintergrund zu erhalten waren und daher mit B16-Flt3-Tumoren keine *in vivo* Expansion der dendritischen Zellen erzielt werden konnte, wurden dendritische Zellen aus Knochenmarkskulturen gewonnen, die mit rekombinantem Flt3-Liganden kultiviert wurden. Hier wurde gezielt die CD24<sup>high</sup> CD11b<sup>low</sup> Subpopulation analysiert, die funktionell den CD8α<sup>+</sup> cDC aus der Milz entspricht [Naik et al. 2005]. Auch bei DC aus ASC<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte eine Hochregulation der CD86 Expression nach Kultur mit Überständen RLH-aktivierter Tumorzellen gemessen werden (Abb. 16). Somit spielt auch das Adaptermolekül ASC keine entscheidende Rolle bei der Zellaktivierung.



**Abb. 16: Expression von CD86 auf dendritischen Zellen aus ASC<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäusen nach Inkubation mit Tumorzellüberstand**

Aus dem Knochenmark isolierte, mit Hilfe von Flt3-Ligand differenzierte dendritische Zellen aus ASC<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäusen wurden mit Überständen RLH-aktivierter Tumorzellen inkubiert. Nach 14 h wurde die Expression von CD86 durchflusszytometrisch gemessen. Die Balken repräsentieren Mittelwerte + SD. Es ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Versuchen dargestellt.

Das pro-inflammatorische Zytokin IL-18 wird sowohl NLRP3-Inflammasom-abhängig als auch -unabhängig von dendritischen Zellen, aber auch epithelialen Zellen produziert. Um auszuschließen, dass IL-18 an der Aktivierung der dendritischen Zellen beteiligt ist, wurde der Aktivierungsversuch auch mit IL-18<sup>-/-</sup> Mäusen durchgeführt. Auch hier war die Hochregulation von CD86 mit der aus Wildtypmäusen vergleichbar (Abb. 17).

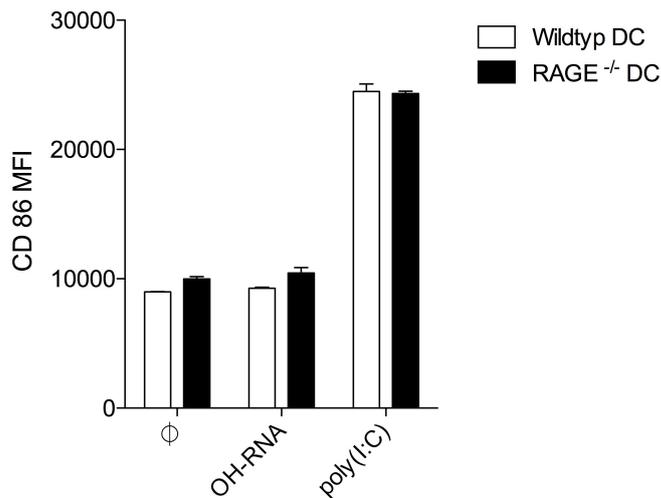


**Abb. 17: Expression von CD86 auf dendritischen Zellen aus IL-18<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäusen nach Inkubation mit Tumorzellüberstand**

Aus der Milz von IL-18<sup>-/-</sup>- bzw. Wildtyp-Mäusen wurden dendritische Zellen isoliert und mit Überständen RLH-aktivierter Tumorzellen inkubiert. Nach 14 h wurde die Expression von CD86 durchflusszytometrisch gemessen. Die Balken repräsentieren Mittelwerte + SD. Es ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt [Düewell et al. 2014].

### 3.3.2 Einfluss des RAGE-Rezeptors

HMGB1 ist ein DNA-bindendes Protein, das beim Zelltod passiv freigesetzt wird und als DAMP fungiert [Scaffidi et al. 2002, Sims et al. 2010]. Es wurde als wesentliches Protein in der Induktion einer Immunantwort gegen Tumorzellen, die mit Chemo- oder Radiotherapie behandelt wurden, identifiziert [Apetoh et al. 2007b]. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass HMGB1 auch im Überstand der RLH-stimulierten Tumorzellen in hohen Konzentrationen vorhanden ist, was es als möglichen Faktor für die DC-Aktivierung erscheinen ließ [Düewell et al. 2014]. HMGB1 vermittelt immunogene Effekte über TLR2, TLR4 und den *receptor for advanced glycation endproducts* (RAGE). Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe konnten einen signifikanten Beitrag von TLR2 und TLR4 zur dendritischen Zell-Reifung bereits ausschließen [Düewell et al. 2014]. Der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Aktivierungsversuch mit RAGE<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigte, dass die Immunogenität durch RLH-induzierten Tumorzelltod auch nicht über den RAGE-Rezeptor vermittelt wird, womit eine tragende Rolle von HMGB1 im immunogenen Zelltod durch RLH-Aktivierung ausgeschlossen werden kann (Abb. 18).



**Abb. 18: Expression von CD86 auf dendritischen Zellen aus RAGE<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäusen nach Inkubation mit Tumorzellüberstand**

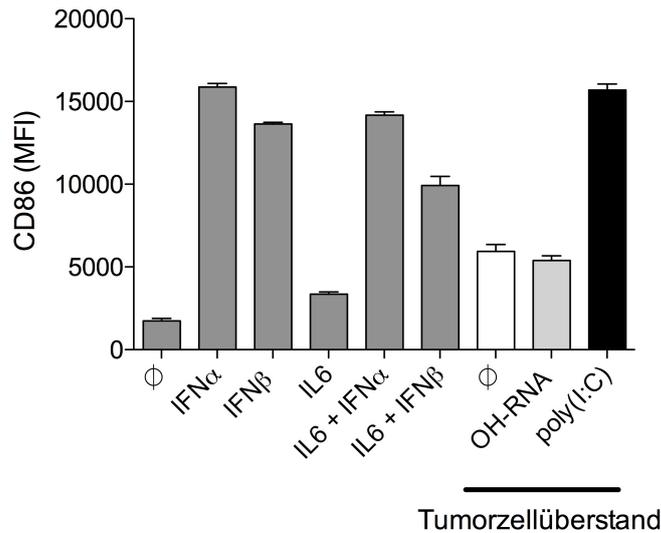
Aus der Milz von RAGE<sup>-/-</sup>- bzw. Wildtyp-Mäusen wurden dendritische Zellen isoliert und mit Überständen RLH-aktivierter Tumorzellen inkubiert. Nach 14 h wurde die Expression von CD86 durchflusszytometrisch gemessen. Die Balken repräsentieren Mittelwerte + SD. Es ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Versuchen dargestellt.

### 3.3.3 Einfluss von Typ-I-IFN

Die Aktivierung von RLH führt zur Produktion von Typ-I-IFN [Yoneyama et al. 2004]. Wie oben gezeigt, gilt dies auch für Panc02-Zellen [Ellermeier et al. 2013]. In Vorarbeiten konnte bei Panc02-Zellen nach RLH-Aktivierung zudem die Produktion von IL-6 nachgewiesen werden.

#### 3.3.3.1 Einfluss von exogenem Typ-I-IFN und IL-6 auf die Aktivierung dendritischer Zellen

Um den Einfluss von Typ-I-IFN und IL-6 zu untersuchen, wurden aus der Milz isolierte dendritische Zellen mit 1000 IU/ml IFN- $\alpha$  bzw. IFN- $\beta$  behandelt. Als weitere Bedingungen wurden dendritische Zellen mit IL-6 allein und in Kombination mit Typ-I-IFN inkubiert. Nach 14 h wurde die Expression des Aktivierungsmarkers CD86 bestimmt. Es konnte durch exogenes IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  eine Hochregulation von CD86 induziert werden, die in ihrem Ausmaß ähnlich der Aktivierung durch Tumorzellüberstände RLH-stimulierter Panc02-Zellen war. Dieser Effekt konnte weder durch IL-6 noch durch IFN- $\gamma$  (Daten nicht gezeigt) erreicht werden. Auch eine Kombination von IFN- $\alpha$  oder IFN- $\beta$  mit IL-6 konnte die durch die Typ-I-IFN vermittelte Aktivierung nicht verstärken (Abb. 19).

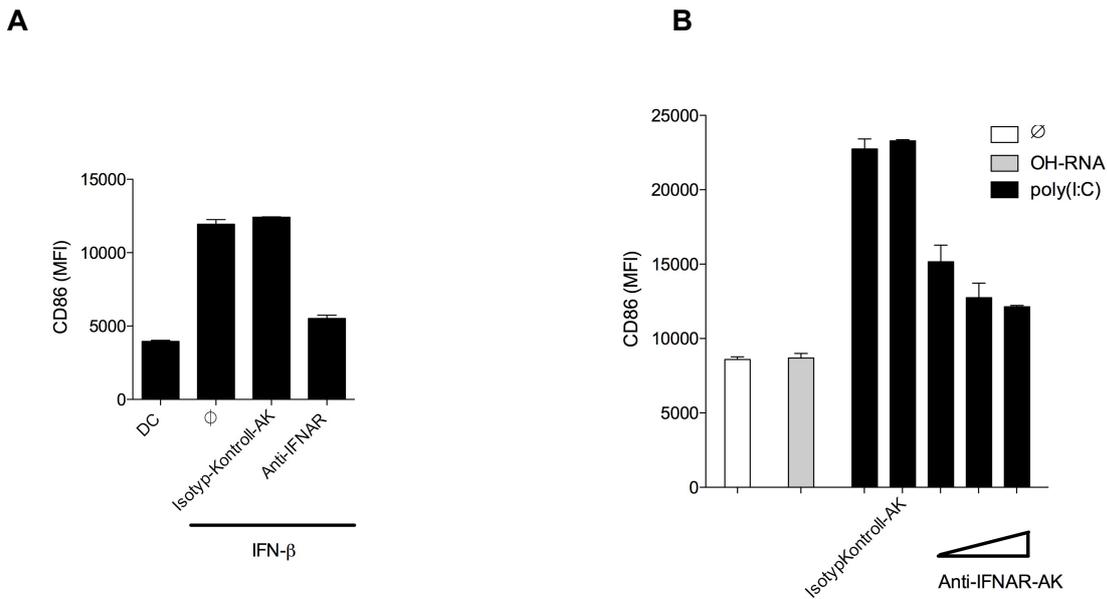


**Abb. 19: Aktivierung von dendritischen Zellen mit Typ-I-IFN und IL-6**

Dendritische Zellen wurden mit 1000 U/ml IFN- $\alpha$  bzw. IFN- $\beta$  und / oder 10 ng/ml IL-6 inkubiert. Nach 14 h wurde die Expression von CD86 durchflusszytometrisch bestimmt. Als Vergleich ist die Aktivierung durch Überstände RLH-aktivierter Panc02 abgebildet. Die Balken repräsentieren Mittelwerte + SD. Es ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

### 3.3.3.2 Rolle des Typ-I-IFN-Rezeptors auf dendritischen Zellen

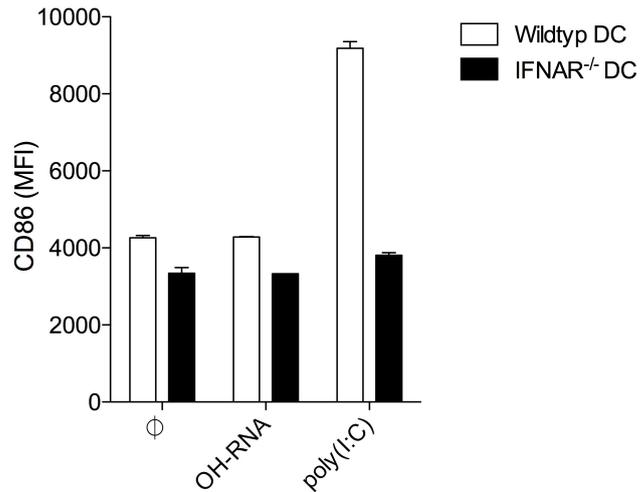
Um zu klären, ob Typ-I-IFN eine Rolle bei der Aktivierung der dendritischen Zellen im Rahmen des RLH-induzierten Zelltods spielt, wurden aus der Milz von Wildtyp-Mäusen isolierte dendritische Zellen mit einem Antikörper, der die IFNAR1 Untereinheit des Typ-I-IFN-Rezeptors (IFNAR) blockiert, bzw. einer entsprechenden Isotypkontrolle des Antikörpers präinkubiert. Anschließend wurden Überstände der transfizierten Tumorzellen zu den Zellen gegeben. Als Kontrolle für die Wirksamkeit der IFNAR-Blockade wurden Zellen, die mit dem Antikörper vorinkubiert worden waren, mit exogenem Typ-I-IFN behandelt. Es zeigte sich, dass DC, die mit dem anti-IFNAR1-Antikörper präinkubiert worden waren, sowohl durch den Überstand RLH-aktivierter Tumorzellen als auch, wie erwartet, durch exogenes Typ-I-IFN deutlich weniger aktiviert wurden (Abb. 20).



**Abb. 20: Blockade des IFNAR-Rezeptors durch anti-IFNAR1-Antikörper**

(A) Dendritische Zellen wurden unbehandelt gelassen oder mit 1000 U/ml IFN- $\beta$  inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde mit einem anti-IFNAR1-AK bzw. dessen Isotypkontrolle präinkubiert. Analysiert wurde die CD86 Expression mittels Durchflusszytometrie. (B) Dendritische Zellen wurden 3 h vor Kultur mit den Tumorzellüberständen mit 1, 3 bzw. 5  $\mu$ g/ml anti-IFNAR1-Antikörper oder der Isotypkontrolle des Antikörpers inkubiert und die CD86-Expression analysiert. Die Balken repräsentieren Mittelwerte + SD. Es ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

Um die Vermutung, dass die Aktivierung der dendritischen Zellen durch die Tumorzellüberstände Typ-I-IFN-abhängig ist, zu bestätigen, wurden dendritische Zellen aus dem Knochenmark von IFNAR1<sup>-/-</sup>-Mäusen durch Kultur in Anwesenheit von rekombinantem Flt3-Liganden generiert, da auch dieser Mausstamm nicht auf C57BL/6 Hintergrund zur Verfügung stand. Die Zellen wurden für 14 h mit Überständen von transfizierten Tumorzellen kultiviert und die CD86-Expression mit der von auf die gleiche Weise generierten dendritischen Zellen aus Wildtyp-Mäusen verglichen. Bei den dendritischen Zellen aus Wildtyp-Mäusen konnte durch den Überstand poly(I:C)-transfizierter Tumorzellen eine Induktion der CD86-Expression erreicht werden. Im Gegensatz dazu regulierten die Zellen aus IFNAR1<sup>-/-</sup>-Mäusen den Aktivierungsmarker nicht hoch (Abb. 21). Dieser Versuch bestätigt die Hypothese, dass Typ-I-IFN den für die Zellaktivierung verantwortlichen DAMP darstellt, der von RLH-aktivierten Panc02-Tumorzellen freigesetzt wird.



**Abb. 21: Expression von CD86 auf dendritischen Zellen aus IFNAR<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäusen nach Inkubation mit Tumorzellüberstand**

Aus dem Knochenmark isolierte, mit Hilfe von Flt3-Ligand differenzierte dendritische Zellen aus IFNAR<sup>-/-</sup>- bzw. Wildtyp-Mäusen wurden mit Überständen RLH-aktivierter Tumorzellen inkubiert. Nach 14 h wurde die Expression von CD86 durchflusszytometrisch gemessen. Die Balken repräsentieren Mittelwerte + SD. Es ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Versuchen dargestellt.

## 4. Diskussion

### 4.1 Übersicht über die Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es, die Folgen der RLH-Aktivierung in Panc02-Tumorzellen und die Mechanismen der Aktivierung von dendritischen Zellen nach Kontakt mit den behandelten Tumorzellen zu untersuchen. Es wurde gezeigt, dass Behandlung mit RLH-Liganden bei Panc02-Tumorzellen zu Apoptose sowie zur Produktion von Typ-I-IFN und CXCL10 führt. Ergänzend zu den Vorarbeiten, in denen der intrinsische Signalweg als verantwortlich für den RLH-vermittelten Zelltod identifiziert wurde, konnte nachgewiesen werden, dass bei Panc02-Tumorzellen nach RLH-Aktivierung auch eine Hochregulation von CD95 stattfindet, wodurch Tumorzellen für Fas-vermittelte Apoptose sensibilisiert werden. Zudem regulieren Panc02-Zellen nach RLH-Aktivierung MHC-I Moleküle hoch, eine Voraussetzung für eine Erkennung durch zytotoxische T-Zellen. Des Weiteren weisen Veränderungen, wie die Translokation von Calreticulin vom endoplasmatischen Retikulum auf die Zellmembran, ein sogenanntes „eat me“ Signal für Phagozyten, auf das Vorliegen eines immunogenen Zelltods hin.

Im Hinblick auf die Immunogenität des Zelltods zeigte sich, dass primäre dendritische Zell-Populationen nach Kontakt zu den apoptotischen Tumorzellen Aktivierungsmarker wie CD86 hochregulieren. Besonders stark war dieser Effekt bei den CD8 $\alpha^+$  cDC ausgeprägt, die aufgrund ihrer Fähigkeit zur Kreuzpräsentation für die Induktion zytotoxischer T-Zell-Antworten verantwortlich sind. Für deren Aktivierung war ein Faktor notwendig, der in den Überstand der behandelten Tumorzellen abgegeben und durch Erhitzen inaktiviert wurde. Dies führte zur Schlussfolgerung, dass es sich beim Stimulus für die dendritische Zell-Reifung um einen löslichen, hitzelabilen Faktor handeln muss. Studien mit dendritischen Zellen aus unterschiedlichen *knockout*-Mausstämmen zeigten, dass die Aktivierung unabhängig vom P2X7-Rezeptor (ATP), dem NLRP3-Inflammasom und RAGE (HMGB1) ist. In parallel durchgeführten Studien mit MyD88- und TRIF-defizienten Mäusen zeigte sich zudem, dass sie auch TLR-unabhängig ist.

Ein wichtiger Kandidat war Typ-I-IFN, welches von RLH-aktivierten Tumorzellen produziert wird und verschiedene immunaktivierende Funktionen vermittelt. In der Tat führte die Stimulation von dendritischen Zellen mit exogenem Typ-I-IFN zu deren Aktivierung, die in ihrem Ausmaß ähnlich wie die durch RLH-aktivierte Tumorzellen ausfiel. Wurde der Typ-I-IFN Rezeptor durch einen Antikörper blockiert, war die Aktivierung der dendritischen Zellen stark reduziert. Zudem ließen sich Zellen aus

IFNAR<sup>-/-</sup>-Mäusen durch den Überstand von mit RLH-Liganden behandelten Tumorzellen nicht aktivieren.

In dieser Arbeit konnte somit experimentell gezeigt werden, dass Typ-I-IFN, das als Folge der Behandlung mit RLH-Liganden aus den Tumorzellen freigesetzt wird, für die Aktivierung der CD8α<sup>+</sup> cDC verantwortlich ist.

## **4.2 RIG-I-like-Helikasen als Zielstrukturen der Tumorummuntherapie**

### **4.2.1 Prinzip und Vorteile einer Nutzung von RLH in der Tumorthherapie**

Im Rahmen einer Virusinfektion wird bei infizierten Zellen Apoptose eingeleitet und eine antivirale Immunantwort generiert [Roulston et al. 1999, Rouse et al. 2010]. Solche Konsequenzen wären auch in der Tumorthherapie wünschenswert, insbesondere da Tumorzellen vom Immunsystem oft nicht als fremd wahrgenommen werden. Die in dieser Arbeit untersuchte Immuntherapie beruht auf dem Konzept durch die Simulation einer Virusinfektion der Tumorzelle eine Immunantwort gegen diese hervorzurufen. Für die Wahrnehmung viraler Infektionen verfügen Zellen über zytosolische Rezeptoren für virale RNA, die RLH [Pichlmair et al. 2006, Yoneyama et al. 2004]. Binden virale Nukleinsäuresequenzen an diesen Rezeptoren, kommt es zur Produktion von Typ-I-IFN und Transkription von IFN- und NFκB-abhängigen Genen [Kato et al. 2006]. Die Simulation einer viralen Infektion gelingt über die Transfektion von Pankreaskarzinomzellen mit den synthetischen RLH-Liganden ppp-RNA und poly(I:C). In *in vivo* Vorarbeiten wurde bereits eine antitumorale Immunantwort nach Therapie mit RLH-Liganden beobachtet [Ellermeier et al. 2013]. In dieser Arbeit sollten die immunologischen Konsequenzen der RLH-Aktivierung in Panc02-Tumorzellen näher untersucht werden.

RLH weisen mehrere Eigenschaften auf, die sie hervorragend als Zielstrukturen in der Tumorthherapie qualifizieren. Eine davon ist ihre ubiquitäre Expression. In Melanom- und Ovariakarzinomzellen wurde funktionelles RIG-I-*signaling* bereits nachgewiesen [Besch et al. 2009, Kubler et al. 2010]. Für das Pankreaskarzinom konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass RLH sowohl in prämaligen PanIN Läsionen, als auch in Tumorgewebe und Metastasen vorhanden sind. Ihre Expression wurde in Vorarbeiten in murinen und humanen Pankreaskarzinomzelllinien beschrieben [Ellermeier et al. 2013].

#### 4.2.2 Antitumorale Effekte einer RLH-Aktivierung

Im Hinblick auf die unmittelbaren Folgen der RLH-Aktivierung konnten in dieser Arbeit, wie erwartet, Apoptose und Produktion von Typ-I-IFN beobachtet werden. Die gleichen Effekte wurden von unserer Arbeitsgruppe auch für andere Pankreaskarzinomzelllinien bestätigt [Düewell et al. 2014, Ellermeier et al. 2013].

Die hohe Empfindlichkeit für RLH-vermittelte Apoptose ist insofern bemerkenswert, da Pankreaskarzinomzellen aufgrund von häufig auftretenden p53 Mutationen partiell vor Apoptose geschützt sind. Dies gilt jedoch nicht für den RLH-vermittelten Zelltod, da dieser unabhängig von p53 verläuft [Besch et al. 2009, Scarpa et al. 1993]. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass auch die p53-defizienten Zelllinien PANC-1, BxPC-3, und MIA- PaCa-2 empfindlich für diese Form von Apoptose sind [Ellermeier et al. 2013]. Nicht maligne transformierte Zellen scheinen dagegen vor RLH-induzierter Apoptose geschützt zu sein. Besch et al. zeigten, dass die Aktivierung von RLH in Melanomzellen Apoptose über den intrinsischen mitochondrialen Signalweg mit Hochregulation der proapoptotischen Proteine Puma und Noxa auslöst, während bei untransformierten Zellen wie Fibroblasten oder Melanozyten antiapoptotisches *B cell lymphoma-2* (Bcl-2), Bcl-xL und Bcl-w protektiv wirken [Besch et al. 2009, Kaneda 2013].

Trotz hoher Empfindlichkeit für RLH-vermittelte Apoptose überleben nach Transfektion mit RLH-Liganden ca. 30-50 % der Tumorzellen. Somit ist der primäre Effekt der Induktion von Zelltod konventionellen Zytostatika nicht überlegen. Entscheidend sind aber möglicherweise sekundäre Folgen der RLH-Aktivierung. Dazu zählen die immunogenen Effekte der von den RLH-aktivierten Tumorzellen produzierten Moleküle. Typ-I-IFN unterstützt die Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und begünstigt ihr Überleben [Curtsinger et al. 2005]. Eine in Studien erprobte Transduktion des IFN- $\alpha$ -Gens in Tumorzellen führte zu einer durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermittelten antitumoralen Immunantwort [Belardelli et al. 1998, Ferrantini et al. 1994]. Zudem nehmen Typ-I-IFN positiven Einfluss auf das Überleben von dendritischen Zellen nach Antigenaufnahme [Lorenzi et al. 2011, Rizza et al. 2014]. Diamond et al. zeigten, dass Typ-I-IFN essentiell für die Funktion von CD8 $\alpha^+$  cDC in der anti-Tumor-Immunantwort ist und Typ-I-IFN-Rezeptor-defiziente dendritische Zellen schwerwiegende Defizite in der Kreuzpräsentation von Tumorantigen aufweisen [Diamond et al. 2011]. Außerdem unterstützt Typ-I-IFN die Funktion natürlicher Killerzellen und kann die immunsuppressiven Funktionen regulatorischer T-Zellen inhibieren [Bacher et al. 2013, Nguyen et al. 2002]. Die Relevanz dieser Mechanismen zeigt zum Beispiel, dass ein

IFNAR-*knockout* im Mausmodell die Entstehung von Knochenmetastasen beim Mamma-Karzinom begünstigt. In klinischen Studien ließ sich eine positive Korrelation zwischen einer hohen Expression IRF7 regulierter Gene im Primärtumor und dem Ausbleiben von Knochenmetastasen herstellen [Bidwell et al. 2012]. Durch die in den Versuchen dieser Arbeit beobachtete Produktion von Typ-I-IFN durch Panc02 nach Transfektion mit RLH-Liganden könnte somit eine Unterstützung einer antitumoralen Immunantwort erzielt werden.

Neben der Induktion von Apoptose und Typ-I-IFN kommt es durch die RLH-Aktivierung zu Veränderungen der Tumorzellen. In dieser Arbeit konnte die Hochregulation von MHC-I auf Panc02-Zellen nach RLH-Aktivierung beobachtet werden. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Kubler et al., die auf RLH-aktivierten Ovarialkarzinomzellen ebenfalls eine verstärkte Expression von MHC-I feststellten [Kubler et al. 2010]. Da es im Rahmen des *immunoediting* häufig zur deutlichen Reduktion der Expression von MHC-I auf Tumorzellen kommt, deutet die Hochregulation auf einen Wiedergewinn von Immunität hin [Schreiber et al. 2011].

Eine weitere Veränderung der Tumorzellen, die nach Transfektion mit RLH-Liganden beobachtet werden konnte, ist die Hochregulation des Fas-Rezeptors. Der Fas-Rezeptor ist ubiquitär auf der Oberfläche von Zellen exprimiert. Nach Bindung des Fas-Liganden (FasL), der sich auf aktivierten T-Lymphozyten und NK-Zellen findet, kommt es zu Caspase-Aktivierung und Ablauf von Signalkaskaden, die in Apoptose münden [Nagata 1999]. Die Fas/FasL-vermittelte Apoptose stellt einen der wichtigsten Mechanismen der Tumorbekämpfung durch CTL dar [Caldwell et al. 2003, Kagi et al. 1994]. Im Verlauf der Tumorentstehung wird die Expression von Fas jedoch häufig herunterreguliert, was zu einer Resistenz der Zellen gegenüber Fas-vermittelter Apoptose führt [Bullani et al. 2002, Liu 2010]. Weiterführende Versuche unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass RLH-Ligand-transfizierte Tumorzellen durch die Hochregulation von Fas eine deutlich erhöhte Empfindlichkeit für Fas-vermittelte Apoptose durch einen Fas-aktivierenden Antikörper aufwiesen [Duewell et al. 2014]. Somit könnte die Behandlung von Tumorzellen mit RLH-Liganden nicht nur direkt Apoptose induzieren, sondern insbesondere in subletalen Dosen durch die Hochregulation von MHC-I und des Fas-Rezeptors das Erkennen und Eliminieren der Tumorzellen durch das adaptive Immunsystems erleichtern und somit zu einer langfristigen Tumorkontrolle führen.

### 4.3 Charakterisierung des Zelltods RLH-aktivierter Panc02-Tumorzellen

Grundsätzlich existieren zwei Wege über die Apoptose initiiert werden kann. Man unterscheidet den Verlauf über den extrinsischen und den über den intrinsischen Signalweg [Fuchs et al. 2015]. Der intrinsische Weg wird durch externe Noxen wie Chemotherapie oder Bestrahlung, aber auch durch die Abwesenheit bestimmter Zytokine eingeleitet. Solche Bedingungen führen zur Permeabilisierung der inneren Mitochondrienmembran und in der Folge zur Freisetzung proapoptotischer Proteine, darunter Cytochrom c [Kuwana et al. 2002]. Das Protein Apoptose-auslösender Faktor-1 (Apaf-1) bindet daraufhin an Cytochrom c und oligomerisiert [Cain et al. 2000]. Dieser Komplex, auch Apoptosom genannt, kann die Initiator-Caspase-9 aktivieren, die wiederum die Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 in den funktionsfähigen Zustand bringt [Li et al. 1997]. Sowohl die Ergebnisse von Besch et al. als auch die unserer Arbeitsgruppe legen nahe, dass beim RLH-vermittelten Zelltod Apoptose über den intrinsischen Signalweg abläuft. Es wurden gespaltenes PARP-1, aktivierte Caspase-9, -3 und -7 und die Hochregulation von Puma und Noxa in RLH-aktivierten Pankreaskarzinomzellen nachgewiesen [Ellermeier et al. 2013]. Auch bei Melanomzellen lagen aktive Caspase-9 Untereinheiten vor [Besch et al. 2009]. Der extrinsische Signalweg dagegen wird durch die Bindung von Todesrezeptoren wie CD95 (Fas) initiiert. Durch die Bindung wird das Adapterprotein *Fas-associated via death domain* (FADD) rekrutiert, was die Aktivierung von Procaspasen-8 und -9 zur Folge hat. Die aktivierten Caspasen wiederum proteolysieren die Procaspasen-3, -6 und -7 in Effektor-Caspasen [Green 2000]. Wie oben bereits dargestellt, wurde in dieser Arbeit in Folge der RLH-Aktivierung eine erhöhte Expression von CD95 auf Panc02 gemessen. Somit ist davon auszugehen, dass die Tumorzellen nicht nur durch intrinsische Apoptose zu Grunde gehen, sondern auch ihre Empfindlichkeit für Fas-vermittelte extrinsische Apoptose erhöht wird.

Neben Apoptose scheint auch Autophagie eine Rolle im RLH-vermittelten Zelltod zu spielen. Dabei handelt es sich um die lysosomale Zersetzung zelleigener zytosolischer Bestandteile in Autophagosomen [Mizushima et al. 2011]. In Versuchen unserer Arbeitsgruppe wurde der Autophagie-Marker LC3-II bei poly(I:C)-behandelten Pankreaskarzinomzellen nachgewiesen [Düwell et al. 2014]. Dies steht im Einklang mit einer Publikation, in der die Induktion von Autophagie durch MDA5 beschrieben ist [Tormo et al. 2009]. Das gleichzeitige Vorliegen von Autophagie und Apoptose ist jedoch nicht grundsätzlich als widersprüchlich anzusehen. Kroemer et al. führten aus, dass der Zelltod nicht primär durch Autophagie ausgelöst wird, sondern dass es sich

bei Autophagie in vielen Fällen um ein begleitendes Phänomen der Apoptose handelt [Kroemer et al. 2008]. Auch die Ergebnisse von Shen et al., die zeigen, dass von 80 Autophagie-induzierenden Chemotherapeutika die Inhibition von Autophagie keinen hemmenden Einfluss auf den Eintritt des Zelltods hat, unterstützen diese These [Shen et al. 2012]. Es mehren sich also die Hinweise aus der Literatur, dass es sich bei der Autophagie nicht um eine eigene Zelltodform, sondern um Prozesse, die den Zelltod begleiten können, handelt. Wie Eisenberg-Lerner zusammenfasst, kann Autophagie Partner, Antagonist oder Ermöglicher der Apoptose sein [Eisenberg-Lerner et al. 2009]. Die genaue Rolle der Autophagie beim RLH-vermittelten Zelltod wurde jedoch bisher nicht weiter aufgeklärt.

#### **4.4 Immunogener Zelltod durch RLH-Aktivierung**

Zunächst stellt sich die Frage, ob es sich beim RLH-vermittelten Zelltod der Begriffsdefinition nach um einen immunogenen Zelltod handelt. Immunogener Zelltod geht mit der Freisetzung von DAMP einher. In der Literatur wurden einige klassische Gefahrensignale des immunogenen Zelltods identifiziert. Zu diesen gehören die Translokation von Calreticulin auf die äußere Seite der Plasmamembran, die Sekretion von ATP, Typ-I-IFN und die Freisetzung von HMGB1 [Apetoh et al. 2007b, Ghiringhelli et al. 2009, Obeid et al. 2007b, Sistigu et al. 2014]. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob diese Faktoren auch beim RLH-vermittelten Zelltod auftreten.

Calreticulin ist ein Chaperon, das im endoplasmatischen Retikulum zur Faltung von Proteinen beiträgt. Bei apoptotischen bzw. präapoptotischen Zellen kann es jedoch auf die Zelloberfläche transloziert werden und bindet dort an Rezeptoren [Gardai et al. 2005]. An der Außenseite der Plasmamembran lokalisiertes Calreticulin wurde als notwendig für die Phagozytose von Anthrazyklin-behandelten Tumorzellen durch DC und somit für den immunogenen Zelltod durch Anthrazykline identifiziert. Es tritt ausschließlich bei immunogenem Zelltod auf [Obeid et al. 2007b]. In dieser Arbeit wurde mittels Konfokalmikroskopie gezeigt, dass auch nach RLH-Aktivierung Calreticulin an die Oberfläche der Panc02-Tumorzellen transloziert wird.

RLH-transfizierte Panc02-Zellen regulierten nach Transfektion mit RLH-Liganden deutlich die Expression von IFN- $\beta$ -mRNA hoch, was auf eine Produktion und Freisetzung von Typ-I-IFN durch die Tumorzellen schließen lässt. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da von RLH, wie oben beschrieben, die Induktion einer antiviralen Interferon-Antwort bekannt ist [Ellermeier et al. 2013, Kato et al. 2006]. Als Folge der IFN- $\beta$ -Produktion kommt es zur Sekretion von Chemokinen wie CXCL10 [Buttmann et

al. 2007]. Auch CXCL10 konnte nach RLH-Aktivierung in hoher Konzentration im Überstand der Tumorzellen gemessen werden.

HMGB1 ist ein DNA Chaperon, das in fast allen eukaryotischen Zellen vorhanden ist. Im Zellkern trägt es zur Bildung des Nukleosoms bei und steuert die Expression von Genen. Bei Freisetzung in den Extrazellularraum fungiert es als Zytokin und DAMP über Bindung am RAGE-Rezeptor, TLR2 und TLR4 [Lotze et al. 2005]. HMGB1 kann sowohl aktiv sezerniert werden als auch passiv bei Zellnekrose oder in späten Stadien der Apoptose austreten [Bell et al. 2006]. Auch HMGB1 konnte von unserer Arbeitsgruppe im Überstand transfizierter Tumorzellen nachgewiesen werden.

Obligates Kriterium des immunogenen Zelltods ist die Generierung einer adaptiven Immunantwort gegen die toten Zellen [Green et al. 2009]. Diese Arbeit und weitere Versuche unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass RLH-aktivierte Tumorzellen bzw. deren Überstände zur Hochregulation der Expression des Aktivierungsmarkers CD86 auf dendritischen Zellen und zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen wie IL-6 und CXCL10 führen. Da dendritische Zellen im nicht-aktivierten Zustand zu T-Zell-Anergie führen und erst nach Aktivierung zur Kreuzpräsentation in der Lage sind, ist deren Aktivierung die Grundlage für eine T-Zell-Antwort [Heath et al. 2004]. Des Weiteren wurde in Folgeversuchen eine suffiziente Kreuzpräsentation von Tumorantigen an CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Proliferation von Antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet [Düewell et al. 2015, Düewell et al. 2014, Ellermeier et al. 2013].

Als sicherster Nachweis einer adaptiven Immunantwort gilt der Vakzinierungsversuch, bei dem Mäusen Tumorzellen injiziert werden, die zuvor mit dem immunogenen Zelltod induzierenden Agens behandelt wurden. Bei Induktion adaptiver Immunität gegen die toten Zellen sollten die Mäuse bei Re-Exposition gegenüber lebenden Tumorzellen der gleichen Art vor einer Tumorentstehung geschützt sein [Kroemer et al. 2013]. In *in vivo* Folgeversuchen unserer Arbeitsgruppe konnte eine erfolgreiche Vakzinierung mit poly(I:C)-behandelten Panc02-Zellen bei sechs von acht Mäusen erreicht werden [Düewell et al. 2014].

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der RLH-vermittelte Zelltod sowohl eine adaptive Immunantwort mit Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses hervorruft, als auch mit dem Auftreten zahlreicher in der Literatur als essentiell beschriebener immunogener Gefahrensignale einhergeht. Aufgrund dieser

Daten kann es als gesichert angesehen werden, dass es sich beim RLH-induzierten Zelltod um einen immunogenen Zelltod handelt.

## 4.5 Immunologische Konsequenzen der RLH-Aktivierung

Nachdem das Vorliegen eines immunogenen Zelltods durch RLH-Aktivierung nachgewiesen wurde, stellte sich als nächstes die Frage, welcher Mechanismus für die Aktivierung der dendritischen Zellen verantwortlich ist.

### 4.5.1 Vergleichbarkeit der dendritischen Zellen aus Milz und Knochenmark

Zunächst soll kurz die Methodik der dendritischen Zell-Aufreinigung diskutiert werden. Der Großteil der für die Versuche verwendeten dendritischen Zellen wurde aus der Milz von Wildtyp- und *knockout*-Mausstämmen auf C57BL/6 Hintergrund isoliert, deren *in vivo* Expansion durch syngene Flt3L-sezernierende Tumorzellen erreicht wurde. ASC<sup>-/-</sup>- und IFNAR<sup>-/-</sup>-Mäuse hingegen waren nicht auf C57BL/6 Hintergrund erhältlich, weshalb die dendritischen Zellen alternativ aus dem Knochenmark gewonnen wurden. Aufgrund des unterschiedlichen Ursprungs stellt sich die Frage, ob die dendritischen Zellen funktionell vergleichbar sind.

Die durchschnittliche Zahl der aus einer murinen Milz isolierbaren dendritischen Zellen beträgt  $5 \times 10^6$ , wobei der Anteil der CD8 $\alpha^+$  cDC bei maximal  $10^6$  liegt [Naik et al. 2005, Vremec et al. 2000]. Um die für die Versuche benötigte Menge an Zellen zu erhalten, wurden Protokolle etabliert, mit denen die Ausbeute vergrößert werden kann. Für die Isolation von dendritischen Zellen aus der Milz wurde eine Melanomzelllinie genutzt, bei der mittels eines retroviralen Gentransfers die Sekretion von Flt3L induziert worden war. Flt3 ist ein auf DC-Vorläufern exprimierter Rezeptor. Nach aktuellem Wissensstand wird die dendritische Zell-Differenzierung physiologisch unter stationären Bedingungen durch endogenen Flt3L vermittelt [Karsunky et al. 2003]. Wird Mäusen ein subkutaner Tumor aus Flt3L-sezernierenden Zellen gesetzt, kommt es zu einer circa 100-fachen Expansion der dendritischen Zellen in der Milz [Mach et al. 2000]. Da bei dieser Methode die dendritische Zell-Differenzierung *in vivo* auf physiologische Weise stattfinden kann und lediglich durch die zusätzliche Administration von Flt3L die Differenzierungsrate aus Vorläufern gesteigert wird, entsprechen die gewonnenen dendritischen Zellen den *in vivo* vorkommenden *steady state* DC. Aus diesem Grund wurde die Methode bevorzugt verwendet. Unabhängig dafür sind Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund, die für ASC<sup>-/-</sup>- und IFNAR<sup>-/-</sup>-Stämme nicht zur Verfügung standen. In diesen Fällen musste auf ein Protokoll zur Generierung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark ausgewichen werden. Zur *in vitro*

Differenzierung von dendritischen Zellen aus Monozyten kann GM-CSF oder Flt3L als Wachstumsfaktor verwendet werden [Inaba et al. 1992, Xu et al. 2007]. Da GM-CSF erst bei Inflammation in signifikanten Mengen produziert wird, kann es *in vivo* nicht für die Differenzierung von *steady state* DC verantwortlich sein [Cheers et al. 1988, Xu et al. 2007]. Charakterisierungen von GM-CSF-dendritischen Zellen legen nahe, dass diese morphologisch und funktionell eher inflammatorischen dendritischen Zellen als den in den lymphatischen Organen vorkommenden *steady state* DC entsprechen. Auch ihr Zytokinprofil gleicht dem des inflammatorischen Typs [Xu et al. 2007]. *In vivo* sind nur die Zellen des Knochenmarks, die Flt3 exprimieren, Vorläufer von dendritischen Zellen [D'Amico et al. 2003]. Daraus lässt sich ableiten, dass zur *in vitro* Generierung von dendritischen Zellen aus Zellen des Knochenmarks Flt3L notwendig ist. Naik et al. charakterisierten die *in vitro* mittels Flt3L generierten Knochenmark-dendritischen Zellen. Sowohl dendritische Zellen aus der Milz als auch Flt3L-Kulturen aus dem Knochenmark exprimieren CD11c und lassen sich anhand ihrer CD45RA Expression in CD45RA<sup>-</sup> cDC und CD45RA<sup>+</sup> pDC differenzieren. Da die Flt3L-stimulierten Knochenmarkskulturen kein CD8 $\alpha$  aufweisen, erfolgte die weitere Unterscheidung der cDC über CD24 und CD11b. CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> cDC aus der Milz weisen eine hohe Expression von CD24 und geringe Expression von CD11b auf. Naik et al. konnten nachweisen, dass die CD24<sup>high</sup>CD11b<sup>low</sup> Subgruppe der Flt3L-Kulturen hinsichtlich ihrer Expression von TLR- und Chemokinrezeptoren und ihres Zytokin- und Chemokinprofils funktionelle Äquivalente der CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DC aus der Milz sind. Im Gegensatz zu den CD24<sup>low</sup> CD11b<sup>high</sup> DC sind sie, entsprechend den CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> cDC aus der Milz, zur Kreuzpräsentation in der Lage und können T-Zellen zur Proliferation anregen [Naik et al. 2005]. In den Aktivierungsversuchen mit ASC<sup>-/-</sup> und IFNAR<sup>-/-</sup>-DC wurde daher die CD86 Expression der CD24<sup>high</sup>CD11b<sup>low</sup> DC analysiert.

#### 4.5.2 Mechanismus der dendritischen Zell-Aktivierung

Da dendritische Zellen das Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität darstellen, sollte untersucht werden, welcher immunogene Faktor zur Reifung führt und ihnen damit die Fähigkeit zur Aktivierung von T-Zellen verleiht. Am deutlichsten war die Hochregulation des Aktivierungsmarkers und kostimulatorischen Moleküls CD86 (B7.2) auf den dendritischen Zellen in Folge des Kontaktes mit RLH-aktivierten Tumorzellen zu beobachten. Kostimulation ist essentiell für die effektive Interaktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit dendritischen Zellen. Sowohl CD86 als auch CD80 vermitteln über Bindung am T-Zell-Rezeptor CD28 den DC-T-Zell-Kontakt, wobei die tragende Rolle dabei dem CD86 Molekül zukommt [Sharpe et al. 2002]. CD69 ist ein früher Aktivierungsmarker, der funktionell wohl keinen Einfluss auf

die Vermittlung einer T-Zell-Antwort hat [Alari-Pahissa et al. 2012]. Da er die deutlichste Hochregulation zeigte und funktionell für die Kreuzpräsentation am wichtigsten ist, galt das Augenmerk bei der Beurteilung der DC-Aktivierung der Induktion von CD86 bei den dendritischen Zellen aus Wildtyp-Mäusen und spezifischen Gen-defizienten Mäusen, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Verschiedene aus der Literatur bekannte, potentiell immunogene Signale kamen in Frage. Als erstes wurde die Rolle von HMGB1 untersucht. Wie oben dargestellt, ist die Freisetzung von HMGB1 ein klassisches Merkmal des immunogenen Zelltods. *In vitro* kann rekombinantes HMGB1 die Reifung und IL-12 Produktion von dendritischen Zellen induzieren [Messmer et al. 2004]. Der Effekt ist am ehesten über eine Bindung am RAGE-Rezeptor vermittelt, es bestehen jedoch auch Hinweise für eine Beteiligung von TLR2 und TLR4 [Park et al. 2004]. Apetoh et al. identifizierten HMGB1 als essentiellen Faktor für den immunogenen Zelltod von Tumorzellen. Der Effekt wurde über die Bindung von HMGB1 an TLR4 vermittelt. Diese Interaktion war für die therapeutische Effizienz von Chemo- und Strahlentherapie essentiell. In TLR4<sup>-/-</sup> Mäusen war die Behandlung einer Osteosarkomzelllinie mit Oxaliplatin nicht erfolgreich [Apetoh et al. 2007a].

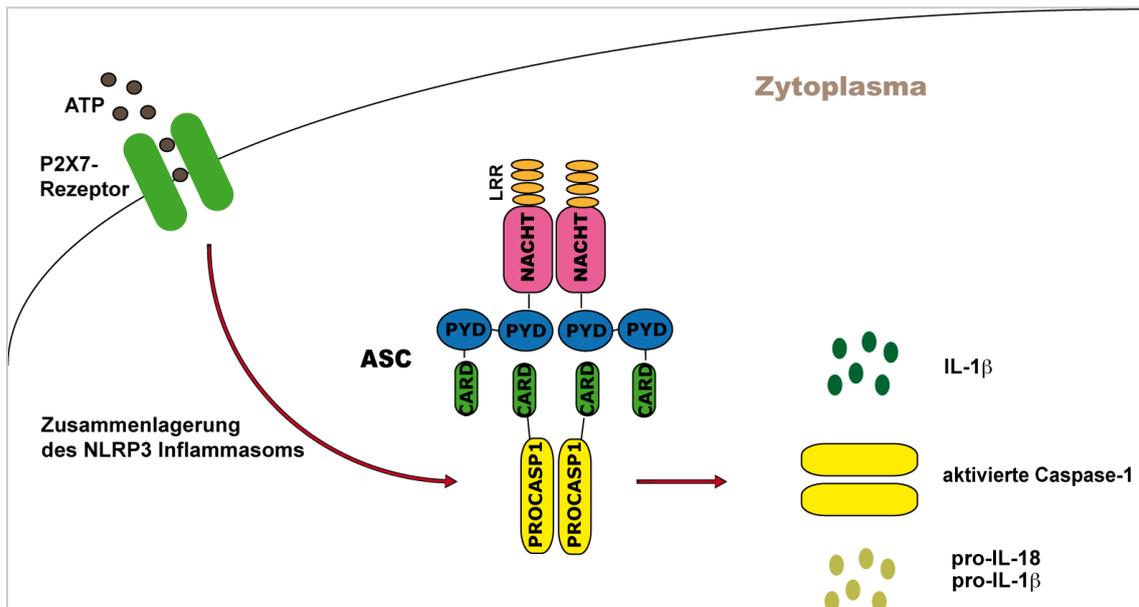
Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten eine hohe Konzentration von HMGB1 im Überstand der RLH-transfizierten Tumorzellen feststellen [Düewell et al. 2014]. Die Aktivierungsversuche mit dendritischen Zellen aus TLR4<sup>-/-</sup>, MyD88<sup>-/-</sup> und TRIF<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten jedoch keine reduzierte Aktivierung [Düewell et al. 2014]. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Aktivierung der dendritischen Zellen über eine Bindung von HMGB1 am RAGE-Rezeptor vermittelt wird. Der RAGE-Rezeptor ist ein auf vielen Zelltypen vorhandener Transmembranrezeptor, welcher der Superfamilie der Immunglobuline zugerechnet wird [Neeper et al. 1992]. Er bindet *advanced glycation endproducts*, fungiert aber auch als PRR. In dieser Rolle bindet er proinflammatorische Liganden, unter anderem HMGB1 [Hori et al. 1995, Schmidt et al. 1992, Xie et al. 2013]. In dieser Arbeit konnte auch ein Einfluss der Interaktion von HMGB1 und dem RAGE-Rezeptor auf die Aktivierung von dendritischen Zellen durch RLH-transfizierte Zellen ausgeschlossen werden.

Auch beim immunogenen Zelltod durch Chemo- oder Radiotherapie war die Aktivierung und Zytokinproduktion von dendritischen Zellen nach Kontakt zu apoptotischen Tumorzellen durch einen TLR4-*knockout* nicht inhibiert [Apetoh et al. 2007b]. Dagegen war HMGB1 hier für die Antigenprozessierung von dendritischen

Zellen nach Aufnahme von Tumorzellen, die mit Doxorubicin oder Radiotherapie behandelt worden waren, notwendig. TLR4<sup>-/-</sup>-DC zeigten nach Beladung mit Antigen apoptotischer Tumorzellen eine reduzierte Anzahl an Antigen-beladenen MHC-I Komplexen im Vergleich zu Wildtyp-dendritischen Zellen, was ihre Kapazität zur Kreuzpräsentation signifikant einschränkte [Apetoh et al. 2007b]. Der Einfluss von HMGB1 auf die Kreuzpräsentation nach Aufnahme von RLH-transfizierten Tumorzellen wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

Ein weiterer, im Rahmen des immunogenen Zelltods in der Literatur beschriebener Faktor, ist das NLRP3-Inflammasom. Es formiert sich aus dem Protein NLRP3, dem Adaptermolekül ASC und Procaspase-1. Die vom Komplex proteolytisch aktivierte Caspase-1 führt zur Bildung von IL-1 $\beta$  und IL-18 aus den jeweiligen inaktiven Proformen [Agostini et al. 2004, Mariathasan et al. 2004] (Abb.22). Die Inflammasom-Komplexformation findet unter anderem nach Wahrnehmung von TLR-Liganden und Bestandteilen von Pathogenen, wie bakterieller RNA oder ATP statt [Ogura et al. 2006]. ATP wird beim Zelltod in großer Menge freigesetzt und bindet an den P2X7-Rezeptor auf Makrophagen und dendritischen Zellen. In dieser Arbeit wurde die Rolle des NLRP3-Inflammasoms in der Aktivierung von dendritischen Zellen durch RLH-aktivierte Tumorzellen untersucht. Die Versuche zeigten, dass weder ein *knockout* im Bereich des P2X7-Rezeptors, noch ein Fehlen von NLRP3, ASC oder IL-18 die Aktivierung der dendritischen Zellen beeinflusst. Es kann somit angenommen werden, dass das NLRP3-Inflammasom bei der Zellaktivierung in Folge des RLH-induzierten Zelltodes keine wesentliche Rolle spielt.

Dies steht im Einklang mit der Literatur zur Untersuchung des immunogenen Zelltods Oxaliplatin-behandelter Zellen. Ghiringhelli et al. zeigten zwar, dass die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und die damit verbundene Produktion von IL-1 $\beta$  nach Bindung von freigesetztem ATP am P2X7-Rezeptor entscheidend für die Wirkung von Oxaliplatin bei Tumor-tragenden Mäusen ist, die Hochregulation der Aktivierungsmarker MHC-II, CD40, CD80 und CD86 auf dendritischen Zellen oder deren Produktion von IL-12p40 war jedoch nicht vom NLRP3-Inflammasom abhängig [Ghiringhelli et al. 2009]. Stattdessen scheint die Bedeutung des NLRP3-Inflammasoms beim immunogenen Zelltod durch Oxaliplatin in der Sekretion von IL-1 $\beta$  von dendritischen Zellen nach Kontakt mit behandelten Tumorzellen und der Anregung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu liegen [Ghiringhelli et al. 2009]. Es wäre interessant in Folgeversuchen herauszuarbeiten, inwiefern das NLRP3-Inflammasom beim RLH-vermittelten Zelltod an der Antigenkreuzpräsentation und T-Zell-Aktivierung beteiligt ist.



**Abb. 22: Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms**

Bindung von ATP am P2X7-Rezeptor führt zur Formierung von NLRP3, dem Adapterprotein ASC und Pro-Caspase-1 zum NLRP3-Inflammasom und damit zur Bildung von aktivierter Caspase-1, die zur Proteolyse von pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL-18 in bioaktives IL-1 $\beta$  und IL-18 führt.

#### 4.5.3 Interferone: Verbindung von angeborener und erworbener Immunität

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Typ-I-IFN eine wesentliche Rolle in der Aktivierung von dendritischen Zellen durch den Überstand RLH-aktivierter Tumorzellen spielen.

Die Gruppe der Typ-I-IFN setzt sich aus 13 humanen bzw. 14 murinen Subtypen von IFN- $\alpha$  und einem IFN- $\beta$  zusammen. Weitere, weniger bekannte Vertreter sind IFN- $\epsilon$ , - $\omega$ , - $\delta$  und - $\kappa$  [de Weerd et al. 2012]. Sie binden am heterodimeren Rezeptor IFNAR, der aus einer IFNAR1 und einer IFNAR2 Untereinheit besteht [Ivashkiv et al. 2014]. Typ-I-IFN sind Teil der antiviralen Immunantwort und werden unter anderem nach Aktivierung von RLH MAVS-abhängig transkribiert [Seth et al. 2005]. Nach Bindung an IFNAR führen sie über die Aktivierung der Januskinase 1 und Tyrosinkinase 2 zur *signal transducer and activator of transcription* (STAT) Dimerisation. Die STAT-Dimere regulieren dann die Expression von Genen, die zur Ausbildung einer antiviralen Immunantwort und Entzündungsreaktion beitragen [Stetson et al. 2006].

Die in dieser Arbeit aus der Milz isolierten dendritischen Zellen konnten mit rekombinantem IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  aktiviert werden. Dies war zu erwarten, da die *in vitro* Aktivierung von dendritischen Zellen durch Typ-I-IFN bekannt ist [Luft et al. 1998]. Wird dendritischen Zellen in Kultur exogenes IFN- $\beta$  zugefügt, führt dies zur Hochregulation von CD86, CD80 und MHC-II und die Zellen sind in der Lage T-Zellen zur Produktion

von IL-13, IL-10 und IL-5 anzuregen [Gessani et al. 2014, Paquette et al. 1998, Wiesemann et al. 2002]. Bei Zugabe von IFN- $\alpha$  statt IL-4 zu GM-CSF Monozytenkulturen zeigen die dendritischen Zellen einen aktivierten Phänotyp mit CD86 Expression und Produktion von CXCL10 [Parlato et al. 2001].

Durch Blockade der IFNAR1-Untereinheit des Interferon-Rezeptors wurde die Aktivierung der dendritischen Zellen durch Tumorzellüberstand deutlich vermindert. Ebenso konnten dendritische Zellen aus IFNAR<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht mit Überstand RLH-Ligand transfizierter Panc02-Zellen aktiviert werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die dendritische Zell-Aktivierung durch Typ-I-IFN vermittelt wird, welche von den Tumorzellen nach RLH-Aktivierung sezerniert werden. Die Produktion von IFN- $\beta$  war im Tumorzellüberstand nach Transfektion mit RLH-Liganden nachweisbar. Den Einwand, dass es sich bei IFNAR<sup>-/-</sup>-dendritischen Zellen um grundsätzlich nicht funktionsfähige dendritische Zellen handelt, konnten Burnette et al. durch den Nachweis einer vollen Kapazität der Zellen zur Kreuzpräsentation und Zytokinproduktion entkräften [Burnette et al. 2011].

Die Interferon-Abhängigkeit der dendritischen Zell-Aktivierung, wie sie in dieser Arbeit gezeigt wurde, steht im Einklang mit den Daten von Poeck et al., die beobachteten, dass der therapeutische Effekt einer ppp-*small interfering* (si)RNA beim Melanom auf intakten Interferonrezeptoren basiert [Poeck et al. 2008]. Für adaptive Immunität, die auf einer Typ-I-IFN-vermittelten dendritischen Zell-Aktivierung beruht, gibt es weitere Beispiele aus der Literatur. So ist der immunogene Effekt von Radiotherapie von der Wirkung von Typ-I-IFN auf dendritische Zellen abhängig. Bei IFNAR<sup>-/-</sup> Mäusen führt Bestrahlung nicht zur Aktivierung von dendritischen Zellen und Ausbildung einer zytotoxischen T-Zell-Antwort. Anders als beim RLH-vermittelten Zelltod wird das Typ-I-IFN in diesem Fall nicht von den Tumorzellen, sondern autokrin von dendritischen Zellen produziert [Burnette et al. 2011]. Dunn et al. stellten fest, dass die Blockade des IFNAR-Rezeptors bei Mäusen die Abstoßung stark immunogener Tumore verhindert. Die Interferone agierten dabei an hämatopoetischen Zellen [Dunn et al. 2005]. Folgeexperimente identifizierten CD8 $\alpha^+$  cDC als Ziel der Interferonwirkung, die dadurch die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation erhielten [Diamond et al. 2011].

Von den Tumorzellen freigesetztes Interferon hat neben der Aktivierung von dendritischen Zellen noch weitere positive Effekte auf die Tumorabwehr. Studien legen nahe, dass Typ-I-IFN die immunsuppressiven MDSC in ihrer Funktion behindern [Zoglmeier et al. 2011]. Dies wurde durch Vorarbeiten unserer Gruppe bestätigt, die

zeigen konnten, dass *in vivo* Applikation einer ppp-TGF $\beta$ -siRNA zu einer Reduktion der Zahl an MDSC in der Milz um 50 % führte. Bei einer reinen TGF $\beta$ -siRNA war der Effekt nicht im gleichen Maße vorhanden [Ellermeier et al. 2013].

## 4.6 Weitere Ergebnisse und klinischer Ausblick

Unabdingbar für eine adaptive Immunantwort gegen den Tumor sind neben der dendritischen Zell-Reifung auch die Antigenaufnahme und Kreuzpräsentation. Auch diese Schritte wurden von unserer Arbeitsgruppe untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die aktivierten CD8 $\alpha^+$  cDC Tumorantigen von transfizierten Pankreaskarzinomzellen, die das Modellantigen Ovalbumin exprimieren (PancOVA), suffizient aufnehmen. Die dendritischen Zellen waren auch in der Lage das Antigen an OVA-spezifische OT1-T-Zellen zu präsentieren und sie zur Proliferation anzuregen. Beides war nach Kontakt mit Tumorzellen, die mit anderen Apoptoseinduktoren, wie Staurosporin und Oxaliplatin, behandelt oder mit Frier/Tau-Zyklen lysiert worden waren, nicht der Fall [Düewell et al. 2014]. Wie bereits erwähnt, war auch ein *in vivo* Vakzinierungsversuch bei 6 von 8 Mäusen erfolgreich [Düewell et al. 2014].

Um die Mechanismen des immunogenen Zelltods von Panc02 nach RLH-Aktivierung weiter aufzuklären, sollte in Folgeversuchen der Einfluss der in dieser Arbeit im Bezug auf die dendritische Zell-Aktivierung untersuchten Faktoren auf die Antigenkruzpräsentation und T-Zell-Aktivierung untersucht werden.

### 4.6.1 Therapeutische Wirksamkeit *in vivo*

In einem Therapieversuch unserer Arbeitsgruppe, bei dem Panc02-tumortragenden Mäusen poly(I:C) intratumoral appliziert wurde, kam es zu signifikant verlängertem Überleben und Tumorregression in der Therapiegruppe im Vergleich zu den unbehandelten oder mit Kontroll-RNA behandelten Gruppen. Die Analyse des Tumorumfelds ergab erhöhte Konzentrationen an IFN- $\beta$ , CXCL10, IL-12p40, IFN- $\gamma$ , IL-6 und IL-5, was für ein durch proinflammatorische Zytokine geprägtes Tumormilieu spricht. Die aus der Milz isolierten dendritischen Zellen zeigten einen gereiften Phänotyp mit hoher Expression von CD69, CD80, CD86 und MHC II [Düewell et al. 2014]. Auch die systemische Behandlung mit dem MDA5-Liganden poly(I:C) führte in zwei verschiedenen murinen Pankreaskarzinommodellen zu einer Überlebensverlängerung [Düewell et al. 2015]. Die therapeutische Wirksamkeit von RLH-Liganden bestätigen auch die Versuche von Poeck et al., bei denen Mäusen intravenös B16-Melanomzellen injiziert wurden. Die mit ppp-RNA behandelten Mäuse entwickelten fast 50 % weniger makroskopisch erkennbare Lungenmetastasen als die

Kontrollen. Als noch wirksamer erwies sich eine bifunktionelle siRNA gegen Bcl2, die mit einer ppp-Modifikation ausgestattet wurde [Poeck et al. 2008]. Im Fall von B16-Melanomzellen war die Immunogenität jedoch im Gegensatz zum Pankreaskarzinommodell, bei dem CD8<sup>+</sup> T-Zellen die entscheidende Rolle spielten, durch NK-Zellen vermittelt [Poeck et al. 2008].

#### **4.6.2 Möglichkeiten und Vorteile einer klinischen Anwendung von RLH-Liganden**

Aufgrund der nahezu ubiquitären Expression von RLH ist der RLH-vermittelte Zelltod nicht nur im Bereich des Pankreaskarzinoms erfolgversprechend. In den oben zitierten Studien erwies er sich auch im Fall des Melanoms und des Ovarialkarzinoms als effektiv [Kubler et al. 2011, Poeck et al. 2008]. Bei einer Kolonkarzinomzelllinie war ppp-RNA ebenso wirksam [Poeck et al. 2008]. Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass auch bei Zellen des hepatozellulären Karzinoms RLH-induziert Apoptose ausgelöst werden kann. Es ist also anzunehmen, dass das hier untersuchte Konzept auf eine Reihe von Tumorentitäten anwendbar ist.

Zur Verstärkung der Wirksamkeit ist ein bifunktionelles Molekül aus ppp-RNA und einer siRNA beispielsweise gegen immunsuppressive Zytokine denkbar. Die Idee eines bifunktionellen Moleküls hat sich sowohl in unserer Arbeitsgruppe als auch bei Poeck et al. als valides Konzept erwiesen. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass eine systemische Therapie mit einer TGF- $\beta$ -spezifischen siRNA die systemische und intratumorale Konzentration von TGF- $\beta$  signifikant reduziert. Das bifunktionelle ppp-modifizierte RNA-Molekül führte *in vivo* zu verlängertem Überleben von tumortragenden Mäusen im Vergleich zu ppp-RNA oder TGF- $\beta$ -siRNA allein sowie zu einer Typ-I-IFN Produktion systemisch und im Tumor [Ellermeier et al. 2013]. Poeck et al. konnten die Apoptoserate von Melanomzellen durch die Kombination von ppp-RNA mit einer siRNA gegen das anti-apoptotische Molekül bcl-2 erhöhen [Poeck et al. 2008].

Eine weitere Möglichkeit, die Effizienz der RLH-Ligand-basierten Therapie zu verbessern, ist die Kombination mit Chemotherapeutika. Apetoh et al. zeigten auf, dass der Ansatz, Chemotherapie und Immuntherapie zu kombinieren, keineswegs widersprüchlich ist. Chemotherapie kann, obwohl ihr lange Zeit im Bereich des Immunsystems nur eine suppressive Wirkung zugeschrieben wurde, synergistisch mit Immuntherapie wirken [Apetoh et al. 2015]. Einige Chemotherapeutika beseitigen regulatorische Zellgruppen, wie MDSC, die ein immunsuppressives Tumormilieu aufrechterhalten [Apetoh et al. 2015]. Des Weiteren trägt der Einsatz von

Chemotherapeutika dazu bei, das Tumorstroma zu reduzieren und den Tumor für Zellen des Immunsystems besser zugänglich zu machen. Hinzu kommen spezifische Effekte einiger Therapeutika. So erhöht zum Beispiel 5-FU die Empfindlichkeit der Tumorzellen für Granzym B-vermittelte Lyse durch CTL [Ramakrishnan et al. 2010]. Um die von hochdosierten Chemotherapieprotokollen ausgelöste Leukopenie zu verhindern, kommen *low-dose* Schemata in Frage [Nars et al. 2013]. Niedrig dosiertes Gemcitabin eliminiert MDSC, wobei CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht geschädigt werden [Ko et al. 2007, Suzuki et al. 2005, Zheng et al. 2015]. In unserer Arbeitsgruppe wurden Daten erhoben, die eine Chemoimmuntherapie mit ppp-RNA und Gemcitabin evaluieren.

Anstelle einer *in vivo* Applikation zur Induktion einer zytotoxischen T-Zell-Antwort im Tumor ist auch eine *ex vivo* Anwendung von RLH-Liganden zur Verbesserung von Tumorstromazellen denkbar. Bei der therapeutischen Tumorstromazellinierung werden dem Patienten entweder bestrahlte Tumorstromazellen bzw. Tumorstromapeptide zusammen mit einem immunstimulierenden Agens oder dendritische Zellen, die zuvor mit Tumorstromantigenen beladen wurden, injiziert, um eine Immunantwort gegen den Tumor hervorzurufen [Berger et al. 2007, Guo et al. 2013, Rosenblatt et al. 2011]. Bei auf dendritischen Zellen basierten Vakzinierungsstrategien stellt derzeit die mangelnde Fähigkeit der unreifen dendritischen Zellen zur Kreuzpräsentation eine Hürde dar. Eine Reifung der dendritischen Zellen wurde bisher beispielsweise mit GM-CSF induziert [Kantoff et al. 2010]. Um die Expression von kostimulatorischen Molekülen auf dendritischen Zellen zu erhöhen wurden unter anderem die Gentransduktion mittels viraler Vektoren oder die mRNA Elektroporation genutzt [Feder-Mengus et al. 2005, Guo et al. 2013, Tcherepanova et al. 2008]. Da die Transfektion der Tumorstromazellen mit RLH-Liganden zur Aktivierung von dendritischen Zellen führt und diesen die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation verleiht, könnte eine Kultur von dendritischen Zellen mit transfizierten Tumorstromazellen in einem Schritt zur Antigenbeladung und Aktivierung der dendritischen Zellen führen. Auf diese Weise könnte eine potente Tumorstromavakzine hergestellt werden.

Eine wichtige Frage für die klinische Anwendung von RLH-Liganden in der Tumorstromatherapie ist der Applikationsweg. In den *in vivo* Versuchen unserer Arbeitsgruppe wurden die RLH Liganden intravenös injiziert. Dies führte zu Tumorstromazellapoptose, Infiltration mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen und erhöhten Zytokinkonzentrationen im Tumorstromagewebe [Ellermeier et al. 2013]. Dass trotz systemischer Gabe die Induktion von Apoptose auf die Tumorstromazellen beschränkt bleibt und gesunde Organe nicht

betroffen sind, ist wahrscheinlich auf die besonders hohe Empfindlichkeit der Tumorzellen für RLH-vermittelte Apoptose und den Schutz untransformierter Zellen durch anti-apoptotische Moleküle zurückzuführen [Besch et al. 2009]. Dies erleichtert die klinische Anwendung, da trotz antitumoraler Wirksamkeit nur eine minimale Toxizität, wie eine transiente Leukopenie, auftritt. Durch die Entwicklung neuer Methoden für eine tumorspezifische Wirkstoffapplikation können zukünftig vielleicht auch Verbesserungen im Hinblick auf die Konzentration der RLH-Liganden im Tumor, sowie bezüglich potenzieller Nebenwirkungen erwartet werden. Eine Möglichkeit wären Nanopartikel, die ppp-RNA enthalten und tumorspezifische Oberflächenmarker binden, was zur Internalisation der Nanopartikel und damit RLH-Liganden führt [Shu et al. 2014]. Eine weitere Option stellt das Antikörper-*Targeting* dar, bei dem der RLH-Ligand an einen Antikörper gebunden wird, der spezifisch an Tumorantigene bindet [Palanca-Wessels et al. 2016]. Auch eine direkte ultraschall-gesteuerte Injektion von RLH-Liganden in das Tumorgewebe ist denkbar [Schnurr et al. 2014].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die RLH-Aktivierung in der Tumorthherapie eine im Hinblick auf Wirksamkeit, geringe Toxizität und suffiziente Induktion einer adaptiven Immunantwort ein vielversprechender therapeutischer Ansatz ist. Die Therapie mit RLH-Liganden könnte adjuvant nach Tumoresektion durch die Induktion einer adaptiven Immunantwort einen wesentlichen Beitrag zur Elimination von residualen Tumorzellen leisten, die sonst zu Rezidiven und Metastasen führen. Zudem könnte durch die Etablierung eines immunologischen Gedächtnisses eine langfristige Tumorkontrolle erreicht werden. Insbesondere Kombinationsstrategien mit Chemo- oder Strahlentherapie haben großes Potential, zur Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten des Pankreaskarzinoms beizutragen.

## 5. Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom ist gekennzeichnet durch ein aggressives Wachstums- und Metastasierungsverhalten, eine extrem schlechte Prognose und wenig zufriedenstellende therapeutische Möglichkeiten. Ein äußerst immunsuppressives Tumormilieu erschwert eine spontane Immunantwort gegen die Tumorzellen. Dass die Infiltration mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen unabhängigen günstigen Prognosefaktor darstellt, weist jedoch darauf hin, dass die Überwindung der tumorinduzierten Immunsuppression ein erfolgversprechender Ansatz neuer Therapien ist [Ryschich et al. 2005].

Die in dieser Arbeit untersuchte therapeutische Strategie hat eine tumorspezifische adaptive Immunantwort zum Ziel und macht sich dafür das Prinzip des immunogenen Zelltods zunutze. Das Therapiekonzept basiert auf der Simulation einer viralen Infektion der Tumorzelle durch die Aktivierung von RIG-I-like-Helikasen (RLH). RLH sind zytosolische Rezeptoren für virale RNA. Ihre Aktivierung induziert Apoptose und eine Typ-I-IFN-vermittelte antivirale Immunantwort und kann so zur Wiederherstellung der Immunogenität von Tumorzellen beitragen. Die Expression von RLH wurde von unserer Arbeitsgruppe sowohl in murinen als auch in humanen Pankreaskarzinomzelllinien nachgewiesen [Düewell et al. 2015, Ellermeier et al. 2013].

Für die vorliegende Arbeit wurden zunächst die Folgen der RLH-Aktivierung in der murinen Pankreaskarzinomzelllinie Panc02 analysiert. Transfektion mit synthetischen Liganden der RLH, einer ppp-RNA bzw. poly(I:C), führte zu Apoptose der Tumorzellen. Bisher war bekannt, dass der RLH-vermittelte Zelltod über den intrinsischen Signalweg verläuft. Nach Transfektion kam es bei den Tumorzellen jedoch auch zur Hochregulation von CD95, was eine zusätzliche Erhöhung der Empfindlichkeit für extrinsische Apoptose vermuten lässt.

Da in *in vivo* Vorarbeiten eine deutliche Immunaktivierung nach Therapie mit RLH-Liganden festgestellt wurde, liegt es nahe, dass es sich bei der RLH-vermittelten Apoptose um einen immunogenen Zelltod handelt. Unter immunogenem Zelltod versteht man die Freisetzung von Gefahrensignalen beim Zelltod, die zur Aktivierung von dendritischen Zellen führen. Diese erhalten dadurch die Fähigkeit, antigenspezifische zytotoxische T-Zellen zur Proliferation anzuregen und so eine adaptive Immunantwort zu induzieren [Kroemer et al. 2013]. Gefahrensignale, die im Rahmen eines immunogenen Zelltods auftreten, sind insbesondere die Freisetzung

von Typ-I-IFN, proinflammatorischen Zytokinen, ATP, HMGB1 und die Translokation von Calreticulin an die Zelloberfläche [Garg et al. 2010].

Beim RLH-vermittelten Zelltod treten die klassischen DAMP des immunogenen Zelltodes auf. In Vorarbeiten konnte HMGB1 in hoher Konzentration im Überstand von transfizierten Panc02 nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass RLH-aktivierte Panc02-Zellen Typ-I-IFN und CXCL10 produzieren und Calreticulin an die Zelloberfläche translozieren. Des Weiteren kommt es zur Hochregulation von MHC-I, was für einen Wiedergewinn an Immunogenität der Tumorzellen spricht.

Die Kultur von dendritischen Zellen mit transfizierten Tumorzellen oder deren Überständen führte zur Aktivierung der dendritischen Zellen mit Hochregulation kostimulatorischer Moleküle und Freisetzung von CXCL10. Den Mechanismus der Zellaktivierung aufzuklären, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Da zur Aktivierung der dendritischen Zellen auch Überstände der Panc02-Zellen, aus denen die zellulären Bestandteile durch Zentrifugation entfernt worden waren, ausreichten, war von einem löslichen Faktor auszugehen. Mit Hilfe von dendritischen Zellen aus diversen *knockout*-Mausstämmen, deren Aktivierungsmarker nach Kultur mit Überständen RLH-behandelter Tumorzellen mit der Aktivierung dendritischer Zellen aus Wildtyp-Mäusen verglichen wurde, konnte ein signifikanter Einfluss des NLRP3-Inflammasoms ausgeschlossen werden. Auch der RAGE-Rezeptor, an den HMGB1 bindet, war für die Aktivierung nicht notwendig. Dagegen stellte sich heraus, dass ein den Typ-I-IFN-Rezeptor blockierender Antikörper die dendritische Zell-Aktivierung deutlich verminderte und sich dendritische Zellen aus IFNAR-defizienten Mäusen durch Tumorzellüberstand nicht aktivieren ließen. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass Typ-I-IFN, welches von den transfizierten Panc02-Zellen freigesetzt wird, als Gefahrensignal für die dendritische Zell-Aktivierung dient.

In Folgeexperimenten konnte eine suffiziente Antigenaufnahme und Kreuzpräsentation von dendritischen Zellen nach Kultur mit RLH-aktivierten Tumorzellen gezeigt werden. Zudem wurden antigenspezifische zytotoxische T-Zellen von den dendritischen Zellen zur Proliferation angeregt und erlangten zytotoxische Funktion. Es lässt sich somit zusammenfassend sagen, dass der RLH-vermittelte Zelltod allen Kriterien eines immunogenen Zelltods entspricht und über die Vermittlung von Typ-I-IFN zur Induktion einer adaptiven Immunantwort gegen die Tumorzellen in der Lage ist.

## 6. Literaturverzeichnis

- Agostini, L., Martinon, F., Burns, K., McDermott, M.F., Hawkins, P.N., Tschopp, J. NALP3 forms an IL-1 $\beta$ -processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 20 (2004) 319-325
- Alari-Pahissa, E., Notario, L., Lorente, E., Vega-Ramos, J., Justel, A., Lopez, D., Villadangos, J.A., Lauzurica, P. CD69 does not affect the extent of T cell priming. *PLoS One* 7 (2012) e48593
- Albert, M.L., Pearce, S.F., Francisco, L.M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R.L., Bhardwaj, N. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via  $\alpha$ v $\beta$ 5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 188 (1998a) 1359-1368
- Albert, M.L., Sauter, B., Bhardwaj, N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392 (1998b) 86-89
- Almand, B., Resser, J.R., Lindman, B., Nadaf, S., Clark, J.I., Kwon, E.D., Carbone, D.P., Gabrilovich, D.I. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clinical Cancer Research* 6 (2000) 1755-1766
- Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Criollo, A., Ortiz, C., Lidereau, R., Mariette, C., Chaput, N., Mira, J.P., Delaloge, S., Andre, F., Tursz, T., Kroemer, G., Zitvogel, L. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunological Reviews* 220 (2007a) 47-59
- Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., Mignot, G., Maiuri, M.C., Ullrich, E., Saulnier, P., Yang, H., Amigorena, S., Ryffel, B., Barrat, F.J., Saftig, P., Levi, F., Lidereau, R., Nogues, C., Mira, J.P., Chompret, A., Joulin, V., Clavel-Chapelon, F., Bourhis, J., Andre, F., Delaloge, S., Tursz, T., Kroemer, G., Zitvogel, L. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nature Medicine* 13 (2007b) 1050-1059
- Apetoh, L., Ladoire, S., Coukos, G., Ghiringhelli, F. Combining immunotherapy and anticancer agents: the right path to achieve cancer cure? *Annals of Oncology* (2015)
- Ascierto, P.A., Vanella, V., Grimaldi, A.M., Lucia, F., Palla, M., Simeone, E., Mozzillo, N. Complete response to nivolumab monotherapy in a treatment-naive, BRAF wild-type patient with advanced mucosal melanoma and elevated lactate dehydrogenase: a case report from a phase III trial. *Cancer Immunology, Immunotherapy* (2016)
- Bacher, N., Raker, V., Hofmann, C., Graulich, E., Schwenk, M., Baumgrass, R., Bopp, T., Zechner, U., Merten, L., Becker, C., Steinbrink, K. Interferon- $\alpha$  suppresses cAMP to disarm human regulatory T cells. *Cancer Research* 73 (2013) 5647-5656

- Bauer, C., Kuhnemuth, B., Duewell, P., Ormanns, S., Gress, T., Schnurr, M. Prevailing over T cell exhaustion: New developments in the immunotherapy of pancreatic cancer. *Cancer Letters* 381 (2016) 259-268
- Beatty, G.L., Torigian, D.A., Chiorean, E.G., Saboury, B., Brothers, A., Alavi, A., Troxel, A.B., Sun, W., Teitelbaum, U.R., Vonderheide, R.H., O'Dwyer, P.J. A phase I study of an agonist CD40 monoclonal antibody (CP-870,893) in combination with gemcitabine in patients with advanced pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research* 19 (2013) 6286-6295
- Becker, A.E., Hernandez, Y.G., Frucht, H., Lucas, A.L. Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection. *World Journal of Gastroenterology* 20 (2014) 11182-11198
- Belardelli, F., Ferrantini, M., Santini, S.M., Baccarini, S., Proietti, E., Colombo, M.P., Sprent, J., Tough, D.F. The induction of in vivo proliferation of long-lived CD44hi CD8+ T cells after the injection of tumor cells expressing IFN-alpha1 into syngeneic mice. *Cancer Research* 58 (1998) 5795-5802
- Bell, C.W., Jiang, W., Reich, C.F., 3rd, Pisetsky, D.S. The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 291 (2006) C1318-1325
- Bell, D., Young, J.W., Banchereau, J. Dendritic cells. *Advances in Immunology* 72 (1999) 255-324
- Berger, M., Kreutz, F.T., Horst, J.L., Baldi, A.C., Koff, W.J. Phase I study with an autologous tumor cell vaccine for locally advanced or metastatic prostate cancer. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 10 (2007) 144-152
- Besch, R., Poeck, H., Hohenauer, T., Senft, D., Hacker, G., Berking, C., Hornung, V., Endres, S., Ruzicka, T., Rothenfusser, S., Hartmann, G. Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *The Journal of Clinical Investigation* 119 (2009) 2399-2411
- Bidwell, B.N., Slaney, C.Y., Withana, N.P., Forster, S., Cao, Y., Loi, S., Andrews, D., Mikeska, T., Mangan, N.E., Samarajiwa, S.A., de Weerd, N.A., Gould, J., Argani, P., Moller, A., Smyth, M.J., Anderson, R.L., Hertzog, P.J., Parker, B.S. Silencing of Irf7 pathways in breast cancer cells promotes bone metastasis through immune escape. *Nature Medicine* 18 (2012) 1224-1231
- Brahmer, J., Reckamp, K.L., Baas, P., Crino, L., Eberhardt, W.E., Poddubskaya, E., Antonia, S., Pluzanski, A., Vokes, E.E., Holgado, E., Waterhouse, D., Ready, N., Gainor, J., Aren Frontera, O., Havel, L., Steins, M., Garassino, M.C., Aerts, J.G., Domine, M., Paz-Ares, L., Reck, M., Baudalet, C., Harbison, C.T., Lestini, B., Spigel, D.R. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. *The New England Journal of Medicine* 373 (2015) 123-135

- Brat, D.J., Lillemoe, K.D., Yeo, C.J., Warfield, P.B., Hruban, R.H. Progression of pancreatic intraductal neoplasias to infiltrating adenocarcinoma of the pancreas. *The American Journal of Surgical Pathology* 22 (1998) 163-169
- Bullani, R.R., Wehrli, P., Viard-Leveugle, I., Rimoldi, D., Cerottini, J.C., Saurat, J.H., Tschopp, J., French, L.E. Frequent downregulation of Fas (CD95) expression and function in melanoma. *Melanoma Research* 12 (2002) 263-270
- Burnet, F.M. The concept of immunological surveillance. *Progress in Experimental Tumor Research* 13 (1970) 1-27
- Burnette, B.C., Liang, H., Lee, Y., Chlewicki, L., Khodarev, N.N., Weichselbaum, R.R., Fu, Y.X., Auh, S.L. The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type I interferon-dependent innate and adaptive immunity. *Cancer Research* 71 (2011) 2488-2496
- Buttmann, M., Berberich-Siebelt, F., Serfling, E., Rieckmann, P. Interferon-beta is a potent inducer of interferon regulatory factor-1/2-dependent IP-10/CXCL10 expression in primary human endothelial cells. *Journal of Vascular Research* 44 (2007) 51-60
- Cai, X.Y., Gao, Q., Qiu, S.J., Ye, S.L., Wu, Z.Q., Fan, J., Tang, Z.Y. Dendritic cell infiltration and prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 132 (2006) 293-301
- Cain, K., Bratton, S.B., Langlais, C., Walker, G., Brown, D.G., Sun, X.M., Cohen, G.M. Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (2000) 6067-6070
- Caldwell, S.A., Ryan, M.H., McDuffie, E., Abrams, S.I. The Fas/Fas ligand pathway is important for optimal tumor regression in a mouse model of CTL adoptive immunotherapy of experimental CMS4 lung metastases. *Journal of Immunology* 171 (2003) 2402-2412
- Casares, N., Pequignot, M.O., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Roux, S., Chaput, N., Schmitt, E., Hamai, A., Hervas-Stubbs, S., Obeid, M., Coutant, F., Metivier, D., Pichard, E., Aucouturier, P., Pierron, G., Garrido, C., Zitvogel, L., Kroemer, G. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *The Journal of Experimental Medicine* 202 (2005) 1691-1701
- Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Azuma, M., Okumura, K., Lanier, L.L., Banchereau, J. B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine* 180 (1994) 1841-1847
- Chaput, N., Conforti, R., Viaud, S., Spatz, A., Zitvogel, L. The Janus face of dendritic cells in cancer. *Oncogene* 27 (2008) 5920-5931
- Cheers, C., Haigh, A.M., Kelso, A., Metcalf, D., Stanley, E.R., Young, A.M. Production of colony-stimulating factors (CSFs) during infection: separate determinations of

- macrophage-, granulocyte-, granulocyte-macrophage-, and multi-CSFs. *Infection and Immunity* 56 (1988) 247-251
- Chen, Z., Chen, X., Zhou, E., Chen, G., Qian, K., Wu, X., Miao, X., Tang, Z. Intratumoral CD8(+) cytotoxic lymphocyte is a favorable prognostic marker in node-negative breast cancer. *PLoS One* 9 (2014) e95475
- Chu-Yuan, H., Jing, P., Yi-Sheng, W., He-Ping, P., Hui, Y., Chu-Xiong, Z., Guo-Jian, L., Guo-Qiang, W. The impact of chemotherapy-associated neutrophil/lymphocyte counts on prognosis of adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *BMC Cancer* 13 (2013) 177
- Clark, C.E., Hingorani, S.R., Mick, R., Combs, C., Tuveson, D.A., Vonderheide, R.H. Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion. *Cancer Research* 67 (2007) 9518-9527
- Clemente, C.G., Mihm, M.C., Jr., Bufalino, R., Zurrida, S., Collini, P., Cascinelli, N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 77 (1996) 1303-1310
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouche, O., Guimbaud, R., Becouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J.L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardiere, C., Bennouna, J., Bachet, J.B., Khemissa-Akouz, F., Pere-Verge, D., Delbaldo, C., Assenat, E., Chauffert, B., Michel, P., Montoto-Grillot, C., Ducreux, M., Groupe Tumeurs Digestives of, U., Intergroup, P. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine* 364 (2011) 1817-1825
- Corbett, T.H., Roberts, B.J., Leopold, W.R., Peckham, J.C., Wilkoff, L.J., Griswold, D.P., Jr., Schabel, F.M., Jr. Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice. *Cancer Research* 44 (1984) 717-726
- Cubilla, A.L., Fitzgerald, P.J. Morphological lesions associated with human primary invasive nonendocrine pancreas cancer. *Cancer Research* 36 (1976) 2690-2698
- Curtsinger, J.M., Valenzuela, J.O., Agarwal, P., Lins, D., Mescher, M.F. Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *Journal of Immunology* 174 (2005) 4465-4469
- D'Amico, A., Wu, L. The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *The Journal of Experimental Medicine* 198 (2003) 293-303
- Day, J.D., Digiuseppe, J.A., Yeo, C., Lai-Goldman, M., Anderson, S.M., Goodman, S.N., Kern, S.E., Hruban, R.H. Immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms. *Human Pathology* 27 (1996) 119-124

- de Weerd, N.A., Nguyen, T. The interferons and their receptors--distribution and regulation. *Immunology and Cell Biology* 90 (2012) 483-491
- den Haan, J.M., Lehar, S.M., Bevan, M.J. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 192 (2000) 1685-1696
- Deutsche Krebsgesellschaft - Deutsche Krebshilfe - AWMF Leitlinienprogramm Onkologie S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom - Langversion 1.0 e.V. DK Berlin 2013 Registernummer 032-010OL <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> (17.03.2017)
- Diamond, M.S., Kinder, M., Matsushita, H., Mashayekhi, M., Dunn, G.P., Archambault, J.M., Lee, H., Arthur, C.D., White, J.M., Kalinke, U., Murphy, K.M., Schreiber, R.D. Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *The Journal of Experimental Medicine* 208 (2011) 1989-2003
- DiGiuseppe, J.A., Hruban, R.H., Goodman, S.N., Polak, M., van den Berg, F.M., Allison, D.C., Cameron, J.L., Offerhaus, G.J. Overexpression of p53 protein in adenocarcinoma of the pancreas. *American Journal of Clinical Pathology* 101 (1994) 684-688
- Dresch, C., Leverrier, Y., Marvel, J., Shortman, K. Development of antigen cross-presentation capacity in dendritic cells. *Trends in Immunology* 33 (2012) 381-388
- Duewelling, P., Beller, E., Kirchleitner, S.V., Adunka, T., Bourhis, H., Siveke, J., Mayr, D., Kobold, S., Endres, S., Schnurr, M. Targeted activation of melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) for immunotherapy of pancreatic carcinoma. *Oncoimmunology* 4 (2015) e1029698
- Duewelling, P., Steger, A., Lohr, H., Bourhis, H., Hoelz, H., Kirchleitner, S.V., Stieg, M.R., Grassmann, S., Kobold, S., Siveke, J.T., Endres, S., Schnurr, M. RIG-I-like helicases induce immunogenic cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8+ T cells. *Cell Death and Differentiation* 21 (2014) 1825-1837
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., Schreiber, R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology* 3 (2002) 991-998
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Sheehan, K.C., Shankaran, V., Uppaluri, R., Bui, J.D., Diamond, M.S., Koebel, C.M., Arthur, C., White, J.M., Schreiber, R.D. A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nature Immunology* 6 (2005) 722-729
- Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H.U., Kimchi, A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death and Differentiation* 16 (2009) 966-975

- Ellermeier, J., Wei, J., Duewell, P., Hoves, S., Stieg, M.R., Adunka, T., Noerenberg, D., Anders, H.J., Mayr, D., Poeck, H., Hartmann, G., Endres, S., Schnurr, M. Therapeutic efficacy of bifunctional siRNA combining TGF-beta1 silencing with RIG-I activation in pancreatic cancer. *Cancer Research* 73 (2013) 1709-1720
- Elliott, B., Scolyer, R.A., Suci, S., Lebecque, S., Rimoldi, D., Gugerli, O., Musat, E., Sharma, R.N., Lienard, D., Keilholz, U., Testori, A., Eggermont, A., MacKie, R., Robert, C., Cook, M., Thompson, J.F., Angevin, E., Spatz, A., European Organization for, R., Treatment of Cancer Melanoma, G. Long-term protective effect of mature DC-LAMP+ dendritic cell accumulation in sentinel lymph nodes containing micrometastatic melanoma. *Clinical Cancer Research* 13 (2007) 3825-3830
- Engering, A.J., Cella, M., Fluitsma, D.M., Hoefsmit, E.C., Lanzavecchia, A., Pieters, J. Mannose receptor mediated antigen uptake and presentation in human dendritic cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 417 (1997) 183-187
- Feder-Mengus, C., Schultz-Thater, E., Oertli, D., Marti, W.R., Heberer, M., Spagnoli, G.C., Zajac, P. Nonreplicating recombinant vaccinia virus expressing CD40 ligand enhances APC capacity to stimulate specific CD4+ and CD8+ T cell responses. *Human Gene Therapy* 16 (2005) 348-360
- Ferrantini, M., Giovarelli, M., Modesti, A., Musiani, P., Modica, A., Venditti, M., Peretti, E., Lollini, P.L., Nanni, P., Forni, G., et al. IFN-alpha 1 gene expression into a metastatic murine adenocarcinoma (TS/A) results in CD8+ T cell-mediated tumor rejection and development of antitumor immunity. Comparative studies with IFN-gamma-producing TS/A cells. *Journal of Immunology* 153 (1994) 4604-4615
- Flusberg, D.A., Sorger, P.K. Surviving apoptosis: life-death signaling in single cells. *Trends in Cell Biology* 25 (2015) 446-458
- Fricke, I., Gabrilovich, D.I. Dendritic cells and tumor microenvironment: a dangerous liaison. *Immunological Investigations* 35 (2006) 459-483
- Fuchs, Y., Steller, H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16 (2015) 329-344
- Gabitass, R.F., Annels, N.E., Stocken, D.D., Pandha, H.A., Middleton, G.W. Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 60 (2011) 1419-1430
- Gallucci, S., Matzinger, P. Danger signals: SOS to the immune system. *Current Opinion in Immunology* 13 (2001) 114-119
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D.R., Hengartner, M.O., Kepp, O., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A.,

- Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nunez, G., Peter, M.E., Piacentini, M., Rubinsztein, D.C., Shi, Y., Simon, H.U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G., Kroemer, G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation* 19 (2012) 107-120
- Gardai, S.J., McPhillips, K.A., Frasch, S.C., Janssen, W.J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J.E., Bratton, D.L., Oldenborg, P.A., Michalak, M., Henson, P.M. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123 (2005) 321-334
- Garg, A.D., Dudek, A.M., Agostinis, P. Cancer immunogenicity, danger signals, and DAMPs: what, when, and how? *BioFactors* 39 (2013) 355-367
- Garg, A.D., Nowis, D., Golab, J., Vandenabeele, P., Krysko, D.V., Agostinis, P. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1805 (2010) 53-71
- Gessani, S., Conti, L., Del Corno, M., Belardelli, F. Type I interferons as regulators of human antigen presenting cell functions. *Toxins* 6 (2014) 1696-1723
- Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., Vermaelen, K., Panaretakis, T., Mignot, G., Ullrich, E., Perfettini, J.L., Schlemmer, F., Tadmehir, E., Uhl, M., Genin, P., Civas, A., Ryffel, B., Kanellopoulos, J., Tschopp, J., Andre, F., Lidereau, R., McLaughlin, N.M., Haynes, N.M., Smyth, M.J., Kroemer, G., Zitvogel, L. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 $\beta$ -dependent adaptive immunity against tumors. *Nature Medicine* 15 (2009) 1170-1178
- Ghiringhelli, F., Puig, P.E., Roux, S., Parcellier, A., Schmitt, E., Solary, E., Kroemer, G., Martin, F., Chauffert, B., Zitvogel, L. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF- $\beta$ -secreting cells inducing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell proliferation. *The Journal of Experimental Medicine* 202 (2005) 919-929
- Gladue, R.P., Paradis, T., Cole, S.H., Donovan, C., Nelson, R., Alpert, R., Gardner, J., Natoli, E., Elliott, E., Shepard, R., Bedian, V. The CD40 agonist antibody CP-870,893 enhances dendritic cell and B-cell activity and promotes anti-tumor efficacy in SCID-hu mice. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 60 (2011) 1009-1017
- Goggins, M., Hruban, R.H., Kern, S.E. BRCA2 is inactivated late in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence and implications. *The American Journal of Pathology* 156 (2000) 1767-1771
- Goubau, D., Deddouch, S., Reis, E.S.C. Cytosolic sensing of viruses. *Immunity* 38 (2013) 855-869
- Green, D.R. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 102 (2000) 1-4

- Green, D.R., Ferguson, T., Zitvogel, L., Kroemer, G. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nature Reviews Immunology* 9 (2009) 353-363
- Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., Amigorena, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual Review of Immunology* 20 (2002) 621-667
- Guo, C., Manjili, M.H., Subjeck, J.R., Sarkar, D., Fisher, P.B., Wang, X.Y. Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future. *Advances in Cancer Research* 119 (2013) 421-475
- Heath, W.R., Belz, G.T., Behrens, G.M., Smith, C.M., Forehan, S.P., Parish, I.A., Davey, G.M., Wilson, N.S., Carbone, F.R., Villadangos, J.A. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunological Reviews* 199 (2004) 9-26
- Higano, C.S., Schellhammer, P.F., Small, E.J., Burch, P.A., Nemunaitis, J., Yuh, L., Provost, N., Frohlich, M.W. Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer. *Cancer* 115 (2009) 3670-3679
- Hiraoka, N., Onozato, K., Kosuge, T., Hirohashi, S. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clinical Cancer Research* 12 (2006) 5423-5434
- Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., Akerley, W., van den Eertwegh, A.J., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J.M., Linette, G.P., Hogg, D., Ottensmeier, C.H., Lebbe, C., Peschel, C., Quirt, I., Clark, J.I., Wolchok, J.D., Weber, J.S., Tian, J., Yellin, M.J., Nichol, G.M., Hoos, A., Urba, W.J. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England Journal of Medicine* 363 (2010) 711-723
- Hori, O., Brett, J., Slattery, T., Cao, R., Zhang, J., Chen, J.X., Nagashima, M., Lundh, E.R., Vijay, S., Nitecki, D., et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of RAGE and amphotericin in the developing nervous system. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (1995) 25752-25761
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.K., Schlee, M., Endres, S., Hartmann, G. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314 (2006) 994-997
- Hruban, R.H., Goggins, M., Parsons, J., Kern, S.E. Progression model for pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research* 6 (2000) 2969-2972
- Hu, C.E., Gan, J., Zhang, R.D., Cheng, Y.R., Huang, G.J. Up-regulated myeloid-derived suppressor cell contributes to hepatocellular carcinoma development by impairing dendritic cell function. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 46 (2011) 156-164

- Huang, B., Pan, P.Y., Li, Q., Sato, A.I., Levy, D.E., Bromberg, J., Divino, C.M., Chen, S.H. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Research* 66 (2006) 1123-1131
- Ikemoto, T., Yamaguchi, T., Morine, Y., Imura, S., Soejima, Y., Fujii, M., Maekawa, Y., Yasutomo, K., Shimada, M. Clinical roles of increased populations of Foxp3+CD4+ T cells in peripheral blood from advanced pancreatic cancer patients. *Pancreas* 33 (2006) 386-390
- Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., Steinman, R.M. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of Experimental Medicine* 176 (1992) 1693-1702
- Inman, K.S., Francis, A.A., Murray, N.R. Complex role for the immune system in initiation and progression of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology* 20 (2014) 11160-11181
- Iodice, S., Gandini, S., Maisonneuve, P., Lowenfels, A.B. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbeck's Archives of Surgery* 393 (2008) 535-545
- Ivashkiv, L.B., Donlin, L.T. Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology* 14 (2014) 36-49
- Jacobs, C., Duewell, P., Heckelsmiller, K., Wei, J., Bauernfeind, F., Ellermeier, J., Kissler, U., Bauer, C.A., Dauer, M., Eigler, A., Maraskovsky, E., Endres, S., Schnurr, M. An ISCOM vaccine combined with a TLR9 agonist breaks immune evasion mediated by regulatory T cells in an orthotopic model of pancreatic carcinoma. *International Journal of Cancer* 128 (2011) 897-907
- Kagi, D., Vignaux, F., Ledermann, B., Burki, K., Depraetere, V., Nagata, S., Hengartner, H., Golstein, P. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 265 (1994) 528-530
- Kanda, M., Matthaei, H., Wu, J., Hong, S.M., Yu, J., Borges, M., Hruban, R.H., Maitra, A., Kinzler, K., Vogelstein, B., Goggins, M. Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology* 142 (2012) 730-733 e739
- Kaneda, Y. The RIG-I/MAVS signaling pathway in cancer cell-selective apoptosis. *Oncoimmunology* 2 (2013) e23566
- Kantoff, P.W., Higano, C.S., Shore, N.D., Berger, E.R., Small, E.J., Penson, D.F., Redfern, C.H., Ferrari, A.C., Dreicer, R., Sims, R.B., Xu, Y., Frohlich, M.W., Schellhammer, P.F., Investigators, I.S. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *The New England Journal of Medicine* 363 (2010) 411-422

- Karsunky, H., Merad, M., Cozzio, A., Weissman, I.L., Manz, M.G. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 198 (2003) 305-313
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C.S., Reis e Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T., Akira, S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441 (2006) 101-105
- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K.J., Takeuchi, O., Akira, S. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nature Immunology* 6 (2005) 981-988
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26 (1972) 239-257
- Khushman, M., Dempsey, N., Cudris Maldonado, J., Loaiza-Bonilla, A., Velez, M., Carcas, L., Dammrich, D., Hurtado-Cordovi, J., Parajuli, R., Pollack, T., Harwood, A.P., Macintyre, J., Tzeng, C.D., Merchan, J.R., Restrepo, M.H., Akunyili, I., Ribeiro, A., Narayanan, G., Portelance, L., Sleeman, D., Levi, J.U., Rocha Lima, C.M., Hosein, P.J. Full dose neoadjuvant FOLFIRINOX is associated with prolonged survival in patients with locally advanced pancreatic adenocarcinoma. *Pancreatology* 15 (2015) 667-673
- Ko, H.J., Kim, Y.J., Kim, Y.S., Chang, W.S., Ko, S.Y., Chang, S.Y., Sakaguchi, S., Kang, C.Y. A combination of chemoimmunotherapies can efficiently break self-tolerance and induce antitumor immunity in a tolerogenic murine tumor model. *Cancer Research* 67 (2007) 7477-7486
- Komar, G., Kauhanen, S., Liukko, K., Seppanen, M., Kajander, S., Ovaska, J., Nuutila, P., Minn, H. Decreased blood flow with increased metabolic activity: a novel sign of pancreatic tumor aggressiveness. *Clinical Cancer Research* 15 (2009) 5511-5517
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., Zitvogel, L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annual Review of Immunology* 31 (2013) 51-72
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nunez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G., Nomenclature Committee on Cell, D. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation* 16 (2009) 3-11
- Kroemer, G., Levine, B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (2008) 1004-1010

- Krysko, D.V., Garg, A.D., Kaczmarek, A., Krysko, O., Agostinis, P., Vandenabeele, P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 12 (2012) 860-875
- Kubler, K., Gehrke, N., Riemann, S., Bohnert, V., Zillinger, T., Hartmann, E., Polcher, M., Rudlowski, C., Kuhn, W., Hartmann, G., Barchet, W. Targeted activation of RNA helicase retinoic acid-inducible gene-I induces proimmunogenic apoptosis of human ovarian cancer cells. *Cancer Research* 70 (2010) 5293-5304
- Kubler, K., Pesch, C., Gehrke, N., Riemann, S., Dassler, J., Coch, C., Landsberg, J., Wimmenauer, V., Polcher, M., Rudlowski, C., Tuting, T., Kuhn, W., Hartmann, G., Barchet, W. Immunogenic cell death of human ovarian cancer cells induced by cytosolic poly(I:C) leads to myeloid cell maturation and activates NK cells. *European Journal of Immunology* 41 (2011) 3028-3039
- Kumar, V., Patel, S., Tcyganov, E., Gabrilovich, D.I. The nature of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *Trends in Immunology* 37 (2016) 208-220
- Kuwana, T., Mackey, M.R., Perkins, G., Ellisman, M.H., Latterich, M., Schneiter, R., Green, D.R., Newmeyer, D.D. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111 (2002) 331-342
- Le, D.T., Durham, J.N., Smith, K.N., Wang, H., Bartlett, B.R., Aulakh, L.K., Lu, S., Kemberling, H., Wilt, C., Luber, B.S., Wong, F., Azad, N.S., Rucki, A.A., Laheru, D., Donehower, R., Zaheer, A., Fisher, G.A., Crocenzi, T.S., Lee, J.J., Greten, T.F., Duffy, A.G., Ciombor, K.K., Eyring, A.D., Lam, B.H., Joe, A., Kang, S.P., Holdhoff, M., Danilova, L., Cope, L., Meyer, C., Zhou, S., Goldberg, R.M., Armstrong, D.K., Bever, K.M., Fader, A.N., Taube, J., Housseau, F., Spetzler, D., Xiao, N., Pardoll, D.M., Papadopoulos, N., Kinzler, K.W., Eshleman, J.R., Vogelstein, B., Anders, R.A., Diaz, L.A., Jr. Mismatch-repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* (2017)
- Lepisto, A.J., Moser, A.J., Zeh, H., Lee, K., Bartlett, D., McKolanis, J.R., Geller, B.A., Schmotzer, A., Potter, D.P., Whiteside, T., Finn, O.J., Ramanathan, R.K. A phase I/II study of a MUC1 peptide pulsed autologous dendritic cell vaccine as adjuvant therapy in patients with resected pancreatic and biliary tumors. *Cancer Therapy* 6 (2008) 955-964
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., Wang, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91 (1997) 479-489
- Lin, Y., Kikuchi, S., Tamakoshi, A., Yagyu, K., Obata, Y., Inaba, Y., Kurosawa, M., Kawamura, T., Motohashi, Y., Ishibashi, T., Group, J.S. Obesity, physical activity and the risk of pancreatic cancer in a large Japanese cohort. *International Journal of Cancer* 120 (2007) 2665-2671
- Lin, Y., Tamakoshi, A., Kawamura, T., Inaba, Y., Kikuchi, S., Motohashi, Y., Kurosawa, M., Ohno, Y. Risk of pancreatic cancer in relation to alcohol drinking, coffee consumption and medical history: findings from the Japan collaborative cohort

- study for evaluation of cancer risk. *International Journal of Cancer* 99 (2002) 742-746
- Lin, Y., Yagyu, K., Ueda, J., Kurosawa, M., Tamakoshi, A., Kikuchi, S., Group, J.S. Active and passive smoking and risk of death from pancreatic cancer: findings from the Japan Collaborative Cohort Study. *Pancreatology* 13 (2013) 279-284
- Liu, K. Role of apoptosis resistance in immune evasion and metastasis of colorectal cancer. *World Journal of Gastrointestinal Oncology* 2 (2010) 399-406
- Liu, K., Nussenzweig, M.C. Origin and development of dendritic cells. *Immunological Reviews* 234 (2010) 45-54
- Liyanage, U.K., Moore, T.T., Joo, H.G., Tanaka, Y., Herrmann, V., Doherty, G., Drebin, J.A., Strasberg, S.M., Eberlein, T.J., Goedegebuure, P.S., Linehan, D.C. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *Journal of Immunology* 169 (2002) 2756-2761
- Lorenzi, S., Mattei, F., Sistigu, A., Bracci, L., Spadaro, F., Sanchez, M., Spada, M., Belardelli, F., Gabriele, L., Schiavoni, G. Type I IFNs control antigen retention and survival of CD8 $\alpha$ (+) dendritic cells after uptake of tumor apoptotic cells leading to cross-priming. *Journal of Immunology* 186 (2011) 5142-5150
- Lotze, M.T., Tracey, K.J. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nature Reviews Immunology* 5 (2005) 331-342
- Luft, T., Pang, K.C., Thomas, E., Hertzog, P., Hart, D.N., Trapani, J., Cebon, J. Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells. *Journal of Immunology* 161 (1998) 1947-1953
- Mach, N., Gillessen, S., Wilson, S.B., Sheehan, C., Mihm, M., Dranoff, G. Differences in dendritic cells stimulated in vivo by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand. *Cancer Research* 60 (2000) 3239-3246
- Manz, M.G., Traver, D., Akashi, K., Merad, M., Miyamoto, T., Engleman, E.G., Weissman, I.L. Dendritic cell development from common myeloid progenitors. *Annals of the New York Academy of Sciences* 938 (2001) 167-173; discussion 173-164
- Maraskovsky, E., Brasel, K., Teepe, M., Roux, E.R., Lyman, S.D., Shortman, K., McKenna, H.J. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *The Journal of Experimental Medicine* 184 (1996) 1953-1962
- Mariathasan, S., Newton, K., Monack, D.M., Vucic, D., French, D.M., Lee, W.P., Roose-Girma, M., Erickson, S., Dixit, V.M. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 430 (2004) 213-218

- Martins, I., Tesniere, A., Kepp, O., Michaud, M., Schlemmer, F., Senovilla, L., Seror, C., Metivier, D., Perfettini, J.L., Zitvogel, L., Kroemer, G. Chemotherapy induces ATP release from tumor cells. *Cell Cycle* 8 (2009) 3723-3728
- Marvel, D., Gabrilovich, D.I. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *The Journal of Clinical Investigation* 125 (2015) 3356-3364
- Messmer, D., Yang, H., Telusma, G., Knoll, F., Li, J., Messmer, B., Tracey, K.J., Chiorazzi, N. High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization. *Journal of Immunology* 173 (2004) 307-313
- Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D., Smyth, M.J. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology* 27 (2014) 16-25
- Mizushima, N., Komatsu, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147 (2011) 728-741
- Motzer, R.J., Escudier, B., McDermott, D.F., George, S., Hammers, H.J., Srinivas, S., Tykodi, S.S., Sosman, J.A., Procopio, G., Plimack, E.R., Castellano, D., Choueiri, T.K., Gurney, H., Donskov, F., Bono, P., Wagstaff, J., Gaurer, T.C., Ueda, T., Tomita, Y., Schutz, F.A., Kollmannsberger, C., Larkin, J., Ravaud, A., Simon, J.S., Xu, L.A., Waxman, I.M., Sharma, P., CheckMate, I. Nivolumab versus everolimus in advanced renal-cell carcinoma. *The New England Journal of Medicine* 373 (2015) 1803-1813
- Movassagh, M., Spatz, A., Davoust, J., Lebecque, S., Romero, P., Pittet, M., Rimoldi, D., Lienard, D., Gugerli, O., Ferradini, L., Robert, C., Avril, M.F., Zitvogel, L., Angevin, E. Selective accumulation of mature DC-Lamp+ dendritic cells in tumor sites is associated with efficient T-cell-mediated antitumor response and control of metastatic dissemination in melanoma. *Cancer Research* 64 (2004) 2192-2198
- Mulders, P.F., De Santis, M., Powles, T., Fizazi, K. Targeted treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer with sipuleucel-T immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 64 (2015) 655-663
- Nagata, S. Fas ligand-induced apoptosis. *Annual Review of Genetics* 33 (1999) 29-55
- Naik, S.H., Proietto, A.I., Wilson, N.S., Dakic, A., Schnorrer, P., Fuchsberger, M., Lahoud, M.H., O'Keefe, M., Shao, Q.X., Chen, W.F., Villadangos, J.A., Shortman, K., Wu, L. Cutting edge: generation of splenic CD8+ and CD8-dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. *Journal of Immunology* 174 (2005) 6592-6597
- Naito, Y., Saito, K., Shiiba, K., Ohuchi, A., Saigenji, K., Nagura, H., Ohtani, H. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Research* 58 (1998) 3491-3494

- Nars, M.S., Kaneno, R. Immunomodulatory effects of low dose chemotherapy and perspectives of its combination with immunotherapy. *International Journal of Cancer* 132 (2013) 2471-2478
- Neeper, M., Schmidt, A.M., Brett, J., Yan, S.D., Wang, F., Pan, Y.C., Elliston, K., Stern, D., Shaw, A. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 267 (1992) 14998-15004
- Neesse, A., Michl, P., Frese, K.K., Feig, C., Cook, N., Jacobetz, M.A., Lolkema, M.P., Buchholz, M., Olive, K.P., Gress, T.M., Tuveson, D.A. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut* 60 (2011) 861-868
- Neoptolemos, J.P., Stocken, D.D., Bassi, C., Ghaneh, P., Cunningham, D., Goldstein, D., Padbury, R., Moore, M.J., Gallinger, S., Mariette, C., Wente, M.N., Izbicki, J.R., Friess, H., Lerch, M.M., Dervenis, C., Olah, A., Butturini, G., Doi, R., Lind, P.A., Smith, D., Valle, J.W., Palmer, D.H., Buckels, J.A., Thompson, J., McKay, C.J., Rawcliffe, C.L., Buchler, M.W., European Study Group for Pancreatic, C. Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association* 304 (2010) 1073-1081
- Nguyen, K.B., Salazar-Mather, T.P., Dalod, M.Y., Van Deusen, J.B., Wei, X.Q., Liew, F.Y., Caligiuri, M.A., Durbin, J.E., Biron, C.A. Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *Journal of Immunology* 169 (2002) 4279-4287
- Obeid, M., Panaretakis, T., Joza, N., Tufi, R., Tesniere, A., van Endert, P., Zitvogel, L., Kroemer, G. Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 14 (2007a) 1848-1850
- Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G.M., Apetoh, L., Perfettini, J.L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., Metivier, D., Larochette, N., van Endert, P., Ciccocanti, F., Piacentini, M., Zitvogel, L., Kroemer, G. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nature Medicine* 13 (2007b) 54-61
- Oettle, H., Neuhaus, P., Hochhaus, A., Hartmann, J.T., Gellert, K., Ridwelski, K., Niedergethmann, M., Zulke, C., Fahlke, J., Arning, M.B., Sinn, M., Hinke, A., Riess, H. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. *Journal of the American Medical Association* 310 (2013) 1473-1481
- Ogura, Y., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A. The inflammasome: first line of the immune response to cell stress. *Cell* 126 (2006) 659-662
- Olive, K.P., Jacobetz, M.A., Davidson, C.J., Gopinathan, A., McIntyre, D., Honess, D., Madhu, B., Goldgraben, M.A., Caldwell, M.E., Allard, D., Frese, K.K., Denicola, G., Feig, C., Combs, C., Winter, S.P., Ireland-Zecchini, H., Reichelt, S., Howat, W.J., Chang, A., Dhara, M., Wang, L., Ruckert, F., Grutzmann, R., Pilarsky, C., Izeradjene, K., Hingorani, S.R., Huang, P., Davies, S.E., Plunkett, W., Egorin,

- M., Hruban, R.H., Whitebread, N., McGovern, K., Adams, J., Iacobuzio-Donahue, C., Griffiths, J., Tuveson, D.A. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 324 (2009) 1457-1461
- Palanca-Wessels, M.C., Booth, G.C., Convertine, A.J., Lundy, B.B., Berguig, G.Y., Press, M.F., Stayton, P.S., Press, O.W. Antibody targeting facilitates effective intratumoral siRNA nanoparticle delivery to HER2-overexpressing cancer cells. *Oncotarget* 7 (2016) 9561-9575
- Palucka, K., Banchereau, J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews Cancer* 12 (2012) 265-277
- Pandha, H., Rigg, A., John, J., Lemoine, N. Loss of expression of antigen-presenting molecules in human pancreatic cancer and pancreatic cancer cell lines. *Clinical and Experimental Immunology* 148 (2007) 127-135
- Paquette, R.L., Hsu, N.C., Kiertscher, S.M., Park, A.N., Tran, L., Roth, M.D., Glaspy, J.A. Interferon-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells. *Journal of Leukocyte Biology* 64 (1998) 358-367
- Park, J.S., Svetkauskaite, D., He, Q., Kim, J.Y., Strassheim, D., Ishizaka, A., Abraham, E. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (2004) 7370-7377
- Parlato, S., Santini, S.M., Lapenta, C., Di Pucchio, T., Logozzi, M., Spada, M., Giammarioli, A.M., Malorni, W., Fais, S., Belardelli, F. Expression of CCR-7, MIP-3beta, and Th-1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells: importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities. *Blood* 98 (2001) 3022-3029
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.P., Naslund, T.I., Liljestrom, P., Weber, F., Reis e Sousa, C. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 314 (2006) 997-1001
- Poock, H., Besch, R., Maihoefer, C., Renn, M., Tormo, D., Morskaya, S.S., Kirschnek, S., Gaffal, E., Landsberg, J., Hellmuth, J., Schmidt, A., Anz, D., Bscheider, M., Schwerd, T., Berking, C., Bourquin, C., Kalinke, U., Kremmer, E., Kato, H., Akira, S., Meyers, R., Hacker, G., Neuenhahn, M., Busch, D., Ruland, J., Rothenfusser, S., Prinz, M., Hornung, V., Endres, S., Tuting, T., Hartmann, G. 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and RIG-I activation against melanoma. *Nature Medicine* 14 (2008) 1256-1263
- Porembka, M.R., Mitchem, J.B., Belt, B.A., Hsieh, C.S., Lee, H.M., Herndon, J., Gillanders, W.E., Linehan, D.C., Goedegebuure, P. Pancreatic adenocarcinoma induces bone marrow mobilization of myeloid-derived suppressor cells which promote primary tumor growth. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 61 (2012) 1373-1385
- Poruk, K.E., Weiss, M.J. The current state of surgery for pancreatic cancer. *Minerva Gastroenterologica e Dietologica* (2015)

- Raimondi, S., Lowenfels, A.B., Morselli-Labate, A.M., Maisonneuve, P., Pezzilli, R. Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology* 24 (2010) 349-358
- Ramakrishnan, R., Assudani, D., Nagaraj, S., Hunter, T., Cho, H.I., Antonia, S., Altio, S., Celis, E., Gabilovich, D.I. Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 120 (2010) 1111-1124
- Rizza, P., Moretti, F., Capone, I., Belardelli, F. Role of type I interferon in inducing a protective immune response: Perspectives for clinical applications. *Cytokine Growth Factor Rev* (2014)
- Robert, C., Long, G.V., Brady, B., Dutriaux, C., Maio, M., Mortier, L., Hassel, J.C., Rutkowski, P., McNeil, C., Kalinka-Warzocho, E., Savage, K.J., Hernberg, M.M., Lebbe, C., Charles, J., Mihalciou, C., Chiarion-Sileni, V., Mauch, C., Cognetti, F., Arance, A., Schmidt, H., Schadendorf, D., Gogas, H., Lundgren-Eriksson, L., Horak, C., Sharkey, B., Waxman, I.M., Atkinson, V., Ascierto, P.A. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *The New England Journal of Medicine* 372 (2015) 320-330
- Robert-Koch-Institut Zentrum für Krebsregisterdaten Krebs in Deutschland 2011/2012 Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Berlin 2015  
[http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2015/krebs\\_in\\_deutschland\\_2015.pdf](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2015/krebs_in_deutschland_2015.pdf) (17.03.2017)
- Rosenblatt, J., Vasir, B., Uhl, L., Blotta, S., Macnamara, C., Somaiya, P., Wu, Z., Joyce, R., Levine, J.D., Dombagoda, D., Yuan, Y.E., Francoeur, K., Fitzgerald, D., Richardson, P., Weller, E., Anderson, K., Kufe, D., Munshi, N., Avigan, D. Vaccination with dendritic cell/tumor fusion cells results in cellular and humoral antitumor immune responses in patients with multiple myeloma. *Blood* 117 (2011) 393-402
- Roulston, A., Marcellus, R.C., Branton, P.E. Viruses and apoptosis. *Annual Review of Microbiology* 53 (1999) 577-628
- Rouse, B.T., Sehrawat, S. Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? *Nature Reviews Immunology* 10 (2010) 514-526
- Ruggeri, B., Zhang, S.Y., Caamano, J., DiRado, M., Flynn, S.D., Klein-Szanto, A.J. Human pancreatic carcinomas and cell lines reveal frequent and multiple alterations in the p53 and Rb-1 tumor-suppressor genes. *Oncogene* 7 (1992) 1503-1511
- Ryan, D.P., Hong, T.S., Bardeesy, N. Pancreatic adenocarcinoma. *The New England Journal of Medicine* 371 (2014) 1039-1049
- Ryschich, E., Notzel, T., Hinz, U., Autschbach, F., Ferguson, J., Simon, I., Weitz, J., Frohlich, B., Klar, E., Buchler, M.W., Schmidt, J. Control of T-cell-mediated

- immune response by HLA class I in human pancreatic carcinoma. *Clinical Cancer Research* 11 (2005) 498-504
- Salomon, B., Bluestone, J.A. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annual Review of Immunology* 19 (2001) 225-252
- Sauter, B., Albert, M.L., Francisco, L., Larsson, M., Somersan, S., Bhardwaj, N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine* 191 (2000) 423-434
- Scaffidi, P., Misteli, T., Bianchi, M.E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418 (2002) 191-195
- Scarpa, A., Capelli, P., Mukai, K., Zamboni, G., Oda, T., Iacono, C., Hirohashi, S. Pancreatic adenocarcinomas frequently show p53 gene mutations. *The American Journal of Pathology* 142 (1993) 1534-1543
- Schiavoni, G., Sistigu, A., Valentini, M., Mattei, F., Sestili, P., Spadaro, F., Sanchez, M., Lorenzi, S., D'Urso, M.T., Belardelli, F., Gabriele, L., Proietti, E., Bracci, L. Cyclophosphamide synergizes with type I interferons through systemic dendritic cell reactivation and induction of immunogenic tumor apoptosis. *Cancer Research* 71 (2011) 768-778
- Schmidt, A., Rothenfusser, S., Hopfner, K.P. Sensing of viral nucleic acids by RIG-I: from translocation to translation. *European Journal of Cell Biology* 91 (2012) 78-85
- Schmidt, A.M., Vianna, M., Gerlach, M., Brett, J., Ryan, J., Kao, J., Esposito, C., Hegarty, H., Hurley, W., Clauss, M., et al. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *The Journal of Biological Chemistry* 267 (1992) 14987-14997
- Schnurr, M., Duewell, P. Induction of immunogenic cell death by targeting RIG-I-like helicases in pancreatic cancer. *Oncoimmunology* 3 (2014) e955687
- Schnurr, M., Duewell, P., Bauer, C., Rothenfusser, S., Lauber, K., Endres, S., Kobold, S. Strategies to relieve immunosuppression in pancreatic cancer. *Immunotherapy* 7 (2015) 363-376
- Schreiber, R.D., Old, L.J., Smyth, M.J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331 (2011) 1565-1570
- Schroder, K., Tschopp, J. The inflammasomes. *Cell* 140 (2010) 821-832
- Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.K., Chen, Z.J. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 122 (2005) 669-682

- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., Schreiber, R.D. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410 (2001) 1107-1111
- Sharpe, A.H., Freeman, G.J. The B7-CD28 superfamily. *Nature Reviews Immunology* 2 (2002) 116-126
- Shen, S., Kepp, O., Kroemer, G. The end of autophagic cell death? *Autophagy* 8 (2012) 1-3
- Shu, Y., Pi, F., Sharma, A., Rajabi, M., Haque, F., Shu, D., Leggas, M., Evers, B.M., Guo, P. Stable RNA nanoparticles as potential new generation drugs for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 66 (2014) 74-89
- Sims, G.P., Rowe, D.C., Rietdijk, S.T., Herbst, R., Coyle, A.J. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annual Review of Immunology* 28 (2010) 367-388
- Sistigu, A., Yamazaki, T., Vacchelli, E., Chaba, K., Enot, D.P., Adam, J., Vitale, I., Goubar, A., Baracco, E.E., Remedios, C., Fend, L., Hannani, D., Aymeric, L., Ma, Y., Niso-Santano, M., Kepp, O., Schultze, J.L., Tuting, T., Belardelli, F., Bracci, L., La Sorsa, V., Ziccheddu, G., Sestili, P., Urbani, F., Delorenzi, M., Lacroix-Triki, M., Quidville, V., Conforti, R., Spano, J.P., Puzstai, L., Poirier-Colame, V., Delalogue, S., Penault-Llorca, F., Ladoire, S., Arnould, L., Cyrta, J., Dessoliers, M.C., Eggermont, A., Bianchi, M.E., Pittet, M., Engblom, C., Pfirschke, C., Preville, X., Uze, G., Schreiber, R.D., Chow, M.T., Smyth, M.J., Proietti, E., Andre, F., Kroemer, G., Zitvogel, L. Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nature Medicine* 20 (2014) 1301-1309
- Smyth, M.J., Godfrey, D.I., Trapani, J.A. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nature Immunology* 2 (2001) 293-299
- Steinman, R.M., Cohn, Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of Experimental Medicine* 137 (1973) 1142-1162
- Stetson, D.B., Medzhitov, R. Type I interferons in host defense. *Immunity* 25 (2006) 373-381
- Suzuki, E., Kapoor, V., Jassar, A.S., Kaiser, L.R., Albelda, S.M. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clinical Cancer Research* 11 (2005) 6713-6721
- Tcherepanova, I.Y., Adams, M.D., Feng, X., Hinohara, A., Horvatinovich, J., Calderhead, D., Healey, D., Nicolette, C.A. Ectopic expression of a truncated CD40L protein from synthetic post-transcriptionally capped RNA in dendritic cells induces high levels of IL-12 secretion. *BMC Molecular Biology* 9 (2008) 90
- Tesniere, A., Schlemmer, F., Boige, V., Kepp, O., Martins, I., Ghiringhelli, F., Aymeric, L., Michaud, M., Apetoh, L., Barault, L., Mendiboure, J., Pignon, J.P., Jooste,

- V., van Endert, P., Ducreux, M., Zitvogel, L., Piard, F., Kroemer, G. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene* 29 (2010) 482-491
- Thomas, L. On immunosurveillance in human cancer. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 55 (1982) 329-333
- Tormo, D., Checinska, A., Alonso-Curbelo, D., Perez-Guijarro, E., Canon, E., Riveiro-Falkenbach, E., Calvo, T.G., Larribere, L., Megias, D., Mulero, F., Piris, M.A., Dash, R., Barral, P.M., Rodriguez-Peralto, J.L., Ortiz-Romero, P., Tuting, T., Fisher, P.B., Soengas, M.S. Targeted activation of innate immunity for therapeutic induction of autophagy and apoptosis in melanoma cells. *Cancer Cell* 16 (2009) 103-114
- Venkataraman, T., Valdes, M., Elsbey, R., Kakuta, S., Caceres, G., Saijo, S., Iwakura, Y., Barber, G.N. Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. *Journal of Immunology* 178 (2007) 6444-6455
- Von Hoff, D.D., Ervin, T., Arena, F.P., Chiorean, E.G., Infante, J., Moore, M., Seay, T., Tjulandin, S.A., Ma, W.W., Saleh, M.N., Harris, M., Reni, M., Dowden, S., Laheru, D., Bahary, N., Ramanathan, R.K., Taberner, J., Hidalgo, M., Goldstein, D., Van Cutsem, E., Wei, X., Iglesias, J., Renschler, M.F. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *The New England Journal of Medicine* 369 (2013) 1691-1703
- Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., Shortman, K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *Journal of Immunology* 164 (2000) 2978-2986
- Vremec, D., Zorbas, M., Scollay, R., Saunders, D.J., Ardavin, C.F., Wu, L., Shortman, K. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine* 176 (1992) 47-58
- Wagner, M., Redaelli, C., Lietz, M., Seiler, C.A., Friess, H., Buchler, M.W. Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *The British Journal of Surgery* 91 (2004) 586-594
- Wiesemann, E., Sonmez, D., Heidenreich, F., Windhagen, A. Interferon-beta increases the stimulatory capacity of monocyte-derived dendritic cells to induce IL-13, IL-5 and IL-10 in autologous T-cells. *Journal of Neuroimmunology* 123 (2002) 160-169
- Xie, J., Mendez, J.D., Mendez-Valenzuela, V., Aguilar-Hernandez, M.M. Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Cellular Signalling* 25 (2013) 2185-2197
- Xu, Y., Zhan, Y., Lew, A.M., Naik, S.H., Kershaw, M.H. Differential development of murine dendritic cells by GM-CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking. *Journal of Immunology* 179 (2007) 7577-7584

- Yamano, M., Fujii, H., Takagaki, T., Kadowaki, N., Watanabe, H., Shirai, T. Genetic progression and divergence in pancreatic carcinoma. *The American Journal of Pathology* 156 (2000) 2123-2133
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y.M., Gale, M., Jr., Akira, S., Yonehara, S., Kato, A., Fujita, T. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *Journal of Immunology* 175 (2005) 2851-2858
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., Fujita, T. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature Immunology* 5 (2004) 730-737
- Zhang, L., Conejo-Garcia, J.R., Katsaros, D., Gimotty, P.A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M.N., Rubin, S.C., Coukos, G. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *The New England Journal of Medicine* 348 (2003) 203-213
- Zheng, L., Xue, J., Jaffee, E.M., Habtezion, A. Role of immune cells and immune-based therapies in pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology* 144 (2013) 1230-1240
- Zheng, Y., Dou, Y., Duan, L., Cong, C., Gao, A., Lai, Q., Sun, Y. Using chemo-drugs or irradiation to break immune tolerance and facilitate immunotherapy in solid cancer. *Cellular Immunology* 294 (2015) 54-59
- Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Andre, F., Tesniere, A., Kroemer, G. The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *The Journal of Clinical Investigation* 118 (2008) 1991-2001
- Zoglmeier, C., Bauer, H., Norenberg, D., Wedekind, G., Bittner, P., Sandholzer, N., Rapp, M., Anz, D., Endres, S., Bourquin, C. CpG blocks immunosuppression by myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Clinical Cancer Research* 17 (2011) 1765-1775
- Zou, W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 6 (2006) 295-307

## 7. Abkürzungsverzeichnis

AN	Annexin V
Apaf-1	Apoptose-auslösender Faktor-1
APC	Allophycocyanin
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ASC	<i>Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	<i>B cell lymphoma-2</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BRCA2	<i>Breast Cancer 2</i>
BSA	Bovines Serum-Albumin
CARD	<i>Caspase activation and recruitment</i>
CARDIF	<i>CARD adapter inducing IFN-<math>\beta</math></i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDC	Konventionelle DC
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4</i>
CXCL10	<i>C-X-C motif chemokine 10</i>
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
DC	Dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsDNA	Doppelsträngige DNA
dsRNA	Doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
ECL-Substrat	<i>Enhanced chemiluminescence-Substrat</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbant assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FADD	<i>Fas-associated via death domain</i>
FasL	Fas-Ligand
FasR	Fas-Rezeptor
FCS	Fötales Kälberserum

---

FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Flt3L	<i>FMS-related tyrosine kinase 3 ligand</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
HMGB1	<i>High-mobility group box-1 Protein</i>
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IFNAR	Typ-I-IFN-Rezeptor
IKK	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase</i>
IL-10	Interleukin-10
IL-12p40	Interleukin-12p40
IL-18	Interleukin-18
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-2	Interleukin-2
IL-6	Interleukin-6
IPS-1	<i>Interferon-<math>\beta</math> promoter stimulator-1</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LGP2	<i>Laboratory of genetics and physiology 2</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-reiche Repeats
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral signaling protein</i>
MCH-I	<i>Major histocompatibility complex-I</i>
MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated antigen 5</i>
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MyD88	<i>Myeloid-differentiation-Factor 88</i>
NACHT	<i>Nucleotide-binding and oligomerization domain</i>
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NEMO	<i>NF-<math>\kappa</math>B essential modulator</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLR	<i>NOD-like-Rezeptor</i>

---

NLRP3	NOD- <i>like</i> -Rezeptor Protein 3
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PARP	<i>Poly(ADP-ribose)-Polymerase</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein-1</i>
PDA	Duktales Adenokarzinom des Pankreas
pDC	Plasmazytoide DC
PE	Phycoerithrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein
PI	Propidium Iodid
Poly(I:C)	Polyinosinic-polycytidylic acid
ppp-	Triphosphat-
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PYD	<i>Pyrin domain</i>
qRT-PCR	Quantitative <i>real time</i> Polymerasekettenreaktion
RAGE	<i>Receptor for advanced glycation endproducts</i>
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene 1</i>
RLH	RIG-I- <i>like</i> -Helikase
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TBK1	TANK <i>binding kinase 1</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline and Tween</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TLR	Toll- <i>like</i> -Rezeptor
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis- inducing-ligand</i>
TRIF	<i>TIR-domain containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i>
TRIS	Trisaminomethan
Typ-I-IFN	Typ-I-Interferon
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VISA	<i>Virus-induced signaling adapter</i>

## 8. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Antigen-Kreuzpräsentation.....	8
Abb. 2: Immunogener Zelltod (modifiziert nach Duewell et al. [Duewell et al. 2014]) ..	13
Abb. 3: Struktur von RLH und Signalwege nach Aktivierung [Schmidt et al. 2012].....	15
Abb. 4: Durchflusszytometrische Bestimmung der den CD8 $\alpha^+$ cDC äquivalenten CD24 <sup>high</sup> CD11b <sup>low</sup> DC.....	30
Abb. 5: Durchflusszytometrische Analyse dendritischer Zellen.....	32
Abb. 6: RLH-Liganden führen zu Produktion von IFN- $\beta$ und CXCL10 in Panc02-Zellen .....	36
Abb. 7: RLH-Liganden induzieren in Panc02-Zellen intrinsische Apoptose .....	37
Abb. 8: RLH-Aktivierung führt zu Expression von CD95 auf Panc02-Tumorzellen .....	38
Abb. 9: RLH-Aktivierung führt zu MHC-I Hochregulation und Translokation von Calreticulin auf die Zelloberfläche.....	39
Abb. 10: Aktivierung von dendritischen Zellen nach Inkubation mit Überstand von RNA- bzw. poly(I:C)-transfizierten Tumorzellen .....	41
Abb. 11: CXCL10-Produktion von dendritischen Zellen nach Kontakt mit Überstand RLH-Ligand-behandelter Tumorzellen.....	42
Abb. 12: Aktivierung von dendritischen Zellen nach Kultur mit Überständen transfizierter Panc02-Zellen bzw. mit Medium, dem RNA-Transfektionskomplexe zugemischt wurden.....	43
Abb. 13: Aktivierung von dendritischen Zellen durch RLH-aktivierte Tumorzellen .....	44
Abb. 14: CD86 Expression von dendritischen Zellen aus P2X7 <sup>-/-</sup> - und Wildtyp-Mäusen .....	45
Abb. 15: Expression von CD86 auf dendritischen Zellen aus NLRP3 <sup>-/-</sup> - und Wildtyp- Mäusen nach Inkubation mit Tumorzellüberstand .....	46
Abb. 16: Expression von CD86 auf dendritischen Zellen aus ASC <sup>-/-</sup> - und Wildtyp- Mäusen nach Inkubation mit Tumorzellüberstand .....	47
Abb. 17: Expression von CD86 auf dendritischen Zellen aus IL-18 <sup>-/-</sup> - und Wildtyp- Mäusen nach Inkubation mit Tumorzellüberstand .....	48
Abb. 18: Expression von CD86 auf dendritischen Zellen aus RAGE <sup>-/-</sup> - und Wildtyp- Mäusen nach Inkubation mit Tumorzellüberstand .....	49
Abb. 19: Aktivierung von dendritischen Zellen mit Typ-I-IFN und IL-6 .....	50
Abb. 20: Blockade des IFNAR-Rezeptors durch anti-IFNAR1-Antikörper.....	51
Abb. 21: Expression von CD86 auf dendritischen Zellen aus IFNAR <sup>-/-</sup> - und Wildtyp- Mäusen nach Inkubation mit Tumorzellüberstand .....	52

---

Abb. 22: Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms .....	64
---	----

## 8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: FACS-Antikörper .....	21
Tabelle 2: Isotyp-Kontrollantikörper .....	22
Tabelle 3: Oligonukleotide .....	23
Tabelle 4: Ansatz für reverse Transkription .....	34
Tabelle 5: Ansatz für Polymerase-Kettenreaktion .....	35
Tabelle 6: Polymerase-Kettenreaktion .....	35
Tabelle 7: Primersequenz .....	35

## 9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Max Schnurr für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Anleitung zum wissenschaftlichen Denken und die umfassende und kontinuierliche fachliche Betreuung und Unterstützung, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Auch für die Möglichkeit, meine Daten auf Kongressen vorzustellen, möchte ich ihm danken.

Ebenso möchte ich mich bei meinem Mitbetreuer Dr. Peter Düwell für die Einarbeitung in die Labortätigkeit, für seinen Rat und seine Unterstützung und die gute Stimmung im Labor, für die er stets gesorgt hat, bedanken.

Des Weiteren möchte ich Prof. Stefan Endres, dem Direktor der Abteilung für Klinische Pharmakologie, für die Möglichkeit, in seiner Abteilung zu promovieren, und für ein sehr bereicherndes und angenehmes Arbeitsumfeld danken, in dem auf ein hohes wissenschaftliches Niveau sowie auf ein kollegiales Miteinander gleichermaßen Wert gelegt wird. Auch für die Aufnahme in das *Graduiertenkolleg 1202: Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie*, das mit Seminaren, Journal Clubs und Retreats den wissenschaftlichen Austausch gefördert hat, möchte ich ihm danken.

Mein Dank gilt auch dem *Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe)* für die Unterstützung bei der Auswahl einer Arbeitsgruppe und eines Dissertationsthemas, die interessanten Einblicke in andere wissenschaftliche Themengebiete und die finanzielle Förderung während meiner Dissertation.

Meiner Arbeitsgruppe, insbesondere meinen Mitdoktoranden und Freunden Anja Funk und Hannes Hölz, möchte ich für die Unterstützung, die gute Zusammenarbeit und die schöne Zeit danken. Ich hätte mir keine besseren Laborkollegen wünschen können.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich während meines gesamten Studiums und der Arbeit an meiner Dissertation immer bedingungslos unterstützt und ermutigt haben. Sie haben mir eine unbeschwertere und schöne Studienzeit mit vielen Erfahrungen ermöglicht, wofür ich ihnen sehr dankbar bin. Ebenso möchte ich meinem Freund Christopher-Philipp Nobis für seine unermüdliche Motivation und Unterstützung danken.

---

## 10. Veröffentlichungen

### Originalarbeit

1. DUEWELL P, Steger A, **Lohr H**, Bourhis H, Hoelz H, Kirchleitner S V, Stieg MR, Grassmann S, Kobold S, Siveke JT, Endres S and Schnurr M.  
RIG-I-like helicases induce immunogenic cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8<sup>+</sup> T-cells.  
*Cell Death and Differentiation* 2014; 21:1825-37.

### Vorträge

1. **Lohr H**, Bourhis H., Beller E, Hoves S, Düwell P, Schnurr M.  
Aktivierung von RIG-I-like Helikasen (RLH) in Pankreaskarzinomzellen führt zu immunogenem Zelltod und Aktivierung tumorreaktiver zytotoxischer T-Zellen  
Viszeralmedizin 2013 (DGVS), Nürnberg
2. **Lohr H**, Steger M, Beller E, Hoves S, Düwell P, Schnurr M.  
RIG-I-like helicases (RLH) mediate immunogenic cell death of pancreatic ductal adenocarcinoma cells via type I IFN signaling  
Cancer Immunotherapy Annual Meeting (CIMT) 2013
3. **Lohr H**, Steger M, Beller E, Hoves S, Düwell P, Schnurr M.  
Immunogener Zelltod von Pankreaskarzinomzellen durch Aktivierung von RIG-I-like Helikasen  
33. Jahrestagung des Deutschen Pankreasclub 2012

### Posterpräsentation

1. **Lohr H**, Bourhis H., Beller E, Düwell P, Schnurr M  
RIG-I-like helicases (RLH) mediate immunogenic cell death of pancreatic ductal adenocarcinoma cells via type I IFN signaling  
Cancer Immunotherapy Annual Meeting (CIMT) 2013

### **Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Hannah Lohr, erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Liganden von RIG-I-like-Helikasen induzieren immunogenen Zelltod von  
Pankreaskarzinomzellen und Typ-I-Interferon-abhängige Aktivierung von  
dendritischen Zellen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 19.08.2017