UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie

Prof. Dr. med. Udo Schumacher

Charakterisierung und funktionelle Analyse der durch eine adenovirale Immuntherapie induzierten Immunreaktion gegen Kolonkarzinommetastasen in der Leber

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Constantin Emanuel Biermann aus Hamburg

Hamburg 2014

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 26.01.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Udo Schumacher

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Jörg Heeren

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. Gisa Tiegs

1	Zielsetzung	6
2	Einleitung	7
2.1	Das kolorektale Karzinom	7
2.1.1	Epidemiologie und Risikofaktoren des kolorektalen Karzinoms	7
2.1.2	Aktuelle Therapieschemata bei hepatischer Metastasierung	9
2.2	Tumorbiologie	10
2.2.1	Konzept der Kanzerogenese	10
2.3	Tumorimmunolgie	12
2.3.1	Das Konzept der Immunüberwachung ("Immunsurveillance")	12
2.3.2	Klinische und experimentelle Bestätigung des Immunsurveillance-Konzepts	12
2.3.3	Phasen der Immunantwort gegen Tumore	13
2.3.4	Cytotoxische Immunantwort gegen Tumore	14
2.4	Das Microenvironment als Schlüssel zum Verständnis der Tumorprogression	15
2.4.1	Tumorales Microenvironment	15
2.4.2	Antitumorales Microenvironment	18
2.5	Adenovirale Immuntherapie	19
2.5.1	Aufbau und Therapeutisches Konzept des Adlm08 Virus	19
3	Material und Methoden	23
3.1	Allgemein benötigte Materialen	23
3.1.1	Allgemein benötigte Geräte	23
3.1.2	Allgemein benötigte Programme	23
3.2	Methoden	24
3.2.1	Zellkultur	24
3.2.2	Tierexperimentelle Arbeiten	25
3.2.3	RNA Isolierung	29
3.2.4	Reverse Transkription	30
3.2.5	Quantitative Real-Time PCR	31
3.2.6	PCR	34
3.2.7	Primer-Effizienzen	36
3.2.8	Auswertung - relative Quantifizierung	36
3.2.9	Lymphozytenaufarbeitung aus Tumoren und Milzen	38
3.2.10	Extrazelluläre Färbung der Lymphozyten	39

7	Ausblick	86
6	Zusammenfassung	85
5.6	Überlebensstudie	83
5.5	IL-2 abhängige T _{reg} Expansion	82
5.4	T-Zell Aktivierung	81
5.3	MDSC und therapiebedingte Splenomegalie	78
5.2	Therapie induzierte Veränderungen des tumoralen Microenvironments	76
5.1	Verwendetes Modell	74
5	Diskussion	74
_		
4.7	Adım08 Therapie erhöht Langzeitüberleben	71
4.6	Therapiebedingte Zunahme von tumorinfiltrierenden Lymphozyten	68
1.5	nachweisbar.	67
4.5	Keine IL-2 bedingte Expansion von Trag Zellen durch Adlm08 Behandlung	
4.4	Nachweis tumorspezifischer CD8 ⁺ Lymphozyten nach <i>ex vivo</i> Restimulation.	63
4.3	Splenozytenexpansion während der Behandlung mit AdGFP und AdIm08	55
4.2.6	Proliferationsmarker Ki67	54
4.2.5	Antiinflammatorische Gene	54
4.2.5	Proinflammatorische Gene	55
4.2.2	IFN-y, IFN-y abhangige Chemokine und Transkriptionsfaktoren	53
4.2.1	Leukozytenmarker	52
	Therapie	46
4.2	Veränderung des inflammatorischen Tumormikromilieus durch die AdIm08	
4.1	In vivo Charakterisierung der AdIm08 Therapie im CT26/BALB/c-Modell	46
4	Ergebnisse	46
3.2.14	ELISA	45
3.2.13	Kokultur: Lymphozyten mit CT26 Zellen	44
3.2.12	Durchflusszytometrie	42
3.2.11	Lymphozyten Fixation und Permeabilisation für intrazelluläre IFN-y/FoxP3 -Färbung	41

8	Abkürzungen	89
9	Verzeichnisse	91
9.1	Abbildungsverzeichnis	91
9.2	Tabellenverzeichnis	93
9.3	Literaturverzeichnis	93
10	Danksagung	103
11	Lebenslauf	104
12	Eidesstattliche Erklärung	105

1 Zielsetzung

Als Teil der präklinischen Evaluation einer neuartigen adenoviralen Immuntherapie soll die therapeutisch induzierte Immunreaktion gegen Tumore der Leber *in vivo* charakterisiert und analysiert werden. Diese Immuntherapie basiert auf einem Adenovirus-Vektor-System. Durch die Injektion des genetisch veränderten Adenovirus, kodierend für Interleukin-12 (IL-12) und Interleukin-2 (IL-2) sowie für den T-Zell co-Stimulator 4-1BBL, ins tumorale Gewebe werden diese Proteine transient exprimiert.

Durch die Expression des proinflammatorischen Cytokins IL-12 soll eine Aktivierung des angeborenen und des adaptiven Immunsystems erreicht werden. IL-2 unterstützt die Prolongation und Amplifikation einer Immunantwort. Das im Tumorgewebe exprimierte

4-1BBL soll durch Bindung an 4-1BB, welches von inaktivierten dendritischen Zellen und aktivierten T-Zellen exprimiert wird, zu einer verstärkten Aktivierung der dendritischen Zellen und T-Zellen führen. Zusammenfassend soll die intratumorale Expression dieser Cytokine und des T-Zell co-Stimulators zu einer Modulation des tumoralen Mikromilieus führen und somit eine effiziente, gegen den Tumor gerichtete Immunantwort verstärken beziehungsweise initiieren.

Die Charakterisierung und Analyse der induzierten Immunantwort erfolgt in vivo an einem hepatogen metastasierten kolorektalen Karzinom-Modell (CT26 Tumore) in Mäusen des syngenen BALB/c Stammes. Zunächst wird das tumorale Mikromilieu und die therapieinduzierte Veränderung mittels quantitativer real time PCR auf RNA Ebene charakterisiert. Unter dem Aspekt, therapieinduzierte Veränderungen auch auf zellulärer Ebene zu erfassen, werden ausgewählte Tumor-infiltrierende Lymphozyten durchflusszytometrisch untersucht. Die systemischen immunologischen Veränderungen werden in der Milz durch die Analyse ausgewählter Populationen zu mehreren Zeitpunkten erfasst (CD4⁺ T-Helfer Zellen, CD8⁺ Cytotoxische T-Zellen, NK-Zellen und Myeloid-derived Suppressor Cells (MDSC)). Eine funktionelle Analyse erfolgt mittels Kokulturassay, bei dem die antigenabhängige IFN-y Produktion therapeutisch geprimter T-Zellen analysiert wird. Die Effektivität der adenoviralen Therapie wird abschließend in einer Überlebensstudie untersucht.

6

2 Einleitung

2.1 Das kolorektale Karzinom

2.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren des kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom ist ein Sammelbegriff für alle malignen epithelialen Primärtumore des Kolons, einschließlich des Rektums, jedoch ohne die des Analkanals. Laut Deutscher Krebsgesellschaft betrug 2006 die Inzidenz in Deutschland für Darmkrebs bei Männern 90 und bei Frauen 77 Neuerkrankungen auf 100 000 Männer/Frauen pro Jahr. Die Inzidenz hat sich seit 1980 bei Männern um 34% und bei Frauen um 26% erhöht. Der Altersmedian bei Erstdiagnose liegt bei > 65 Jahren. Die durchschnittliche, relative 5-Jahres Überlebensrate liegt bei Männern und Frauen zwischen 53% und 63%. Sie hat in den vergangenen Jahren zugenommen. Das kolorektale Karzinom ist mit 16% die zweithäufigste maligne Krebserkrankung und mit 12% bis 14% auch die zweithäufigste Todesursache durch Krebs in Deutschland (Robert Koch Institut 2010).

Nur bei 10% aller Neuerkrankungen ist eine vorbestehende Erkrankung für das kolorektale Karzinom ursächlich. Hierzu zählen die FAP (<u>F</u>amiliäre <u>A</u>denomatöse <u>P</u>olyposis), HNPCC (Hereditäres-Nicht-Polypöses Karzinom) sowie die Colitis Ulcerosa. Die restlichen 90% gelten als sporadisch auftretende Karzinome. Sie entwickeln sich meist aus polypösen, häufig sessilen Adenomen, die als Präkanzerose anzusehen sind. Man spricht auch von der Adenom-Karzinom Sequenz, bei der es auf molekularer Ebene zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und einer Aktivierung von Onkogenen kommt.

Als synergistisch wirkende Umwelt- und Risikofaktoren für ein kolorektales Karzinom gelten:

- Ballastoffarme Ernährung
- Fett- und fleischreiche Ernährung in Kombination mit einer erhöhten Ausscheidung von Gallensäuren, Cholesterin, sowie deren bakteriellen Abbauprodukten
- Rauchen
- Fehlende körperliche Aktivität und Übergewicht

Die kolorektalen Karzinome entstehen zu 50% im Rektum und zu 25% im Sigma. Sie sind zunächst asymptomatisch. Klinisch fallen die Tumore durch Blut im Stuhl, Anämie, Stenosen, veränderte Defäkation (Verstopfung und Durchfall im Wechsel) oder selten durch eine Perforation mit einer Peritonitis auf.

Die Prognose ein Kolonkarzinom zu überleben und die Festlegung einer Therapie hängt maßgeblich von dem Stadium der Erkrankung ab. Kolorektale Karzinome werden nach der UICC auf Grundlage des TNM Klassifikationssystems eingeteilt. Hierbei werden die Invasionstiefe des Primärtumors (Tumor), der Befall von Lymphknoten (**N**ode) und das Vorhandensein von Metastasen (**M**etastase) berücksichtigt.

Tab. 1: Stadienabhängige 5 Jahresüberlebensrate von Kolonkarzinompatienten. (Kasper et al. 2005)

Tumorstadium (eingeteilt		teilt	Pathologisches Bild	Ungefähre Fünf-Jahres-
nach versch. Klassifikationen)		onen)		Überlebensrate
Dukes	TNM	UICC		
А	T1N0M0	Ι	Infiltration auf Submukosa beschränkt	> 90%
B ₁	T2N0M0	Ι	Infiltration erreicht Muskularis	85 %
B ₂	T3N0M0	П	Infiltration oder Penetration der Serosa	70-80 %
С	TxN1M0	III	Befall regionärer Lymphknoten	35-65 %
D	TxNxM1	IV	Fernmetastasen (z.B. Lunge, Leber)	5 %

Patienten mit Kolonkarzinom des UICC Stadiums I werden in kurativer Absicht operiert. Bei Lymphknotenbefall oder fortgeschrittenem Tumorstadium (Stadium II-III) wird zusätzlich eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt. Fortgeschrittene Karzinome mit Metastasen können meist nur noch palliativ mit einer Chemotherapie behandelt werden.

In diesem Zusammenhang berichteten Mantke *et al.*, dass in Deutschland im Zeitraum von 2000 - 2004 bei 18,4% der Patienten mit der Erstdiagnose Kolonkarzinom ein fortgeschrittenes Erkrankungsstadium mit Metastasen festgestellt wurde. Am häufigsten sind Lebermetastasen (2/3 aller Metastasen) die bei Erstdiagnose in 14,6% aller an Kolonkarzinom erkrankten Patienten nachgewiesen wurden. Je höher die T Klassifikation der TNM Einteilung desto höher war die Wahrscheinlichkeit für das gleichzeitige Vorliegen einer Lebermetastase (Mantke et al. 2011).

2.1.2 Aktuelle Therapieschemata bei hepatischer Metastasierung

Sind die Metastasen des Kolonkarzinoms auf die Leber beschränkt und resektabel, ist die chirurgische Entfernung die Behandlungsmöglichkeit mit der langfristig höchsten Überlebensrate (Abdalla et al. 2006). Nach erfolgreicher Resektion erfolgt eine adjuvante Chemotherapie. Jedoch konnte in Deutschland bei Patienten mit in die Leber metastasiertem Kolonkarzionom nur in 8% der Fälle eine chirurgische Therapie in kurativer Absicht durchgeführt werden (Mantke et al. 2011).

Ist der Patient an einem primär nicht vollständig resezierbaren, metastasierten Kolonkarzinom erkrankt, wird eine Chemotherapie durchgeführt. Je nach Zielsetzung, z.B. palliative Behandlung oder Remissionsinduktion der Metastasen um eine Operation zu ermöglichen, werden unterschiedliche Kombinationen von Chemotherapeutika eingesetzt. Begleiterkrankungen und Wünsche des Patienten bezüglich seiner Lebensqualität werden ebenfalls in die Planung der Chemotherapie einbezogen. Häufige Regimes bei metastasiertem Kolonkarzinom sind FOLFIRI (5fluorouracil, leucovorin [folinic acid], irinotecan) oder FOLFOX (5-fluorouracil, leucovorin [folinic acid], oxaliplatin). Zusätzlich werden in Kombination zur Chemotherapie sogenannte Biologicals angewendet wie Bevacizumab (anti-VEGF [Vascular Endothelia Growth Factor]), Cetuximab (anti-EGFR [Epithelia Growth Factor Receptor]) und Panitumumab (anti-EGFR). Bevacizumab ist ein gegen VEGF gerichteter Antikörper, der die Neubildung von Gefäßen unterbinden soll. Das mittlere Überleben eines Patienten mit hepatisch metastasiertem Kolonkarzinom konnte durch die Kombination von cytotoxischen Regimes mit Bevacizumab oder mit einem anti-EGFR Therapeutikum auf 20-24 Monate verlängert werden (Cartwright 2012).

Da bei hepatisch metastasiertem Kolonkarzinom derzeit meist keine kurative Behandlung möglich ist, sind für diese Indikation neue Behandlungsstrategien von Nöten. Aus diesem Grund wurde zur Charakterisierung des adenoviralen Immuntherapeutikums AdIm08 das CT26 BALB/c Mausmodell verwendet, mit dem sich dieses Krankheitsstadium simulieren lässt.

9

2.2 Tumorbiologie

2.2.1 Konzept der Kanzerogenese

Die Umwandlung einer normalen Zelle in eine Krebszelle ist ein Prozess der über mehrere Schritte erfolgt. Studien an verschieden pathologischen Präparaten zeigten unterschiedlich veränderte Entwicklungsstufen bis hin zum invasiven Karzinom und legten schon früh den Schluss nahe, dass sich aus einer normalen Zelle über mehrere Zwischenstufen ein bösartiges Karzinom entwickelt (Foulds 1954). In diesem Prozess gewinnt eine Karzinomzelle durch Selektion immer mehr Überlebensvorteile gegenüber den umliegenden gesunden Zellen und erlangt schließlich ein ungebremstes Wachstumspotential. Die Veränderungen erfolgen über Schritte auf genetischer Ebene (Mutationen, Duplikationen) oder durch epigenetische Modulation. Beides führt zur Aktivierung von Onkogenen bzw. zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. D. Hanahan und A. Weinberg haben im Sinne dieser Multi Step Tumorgenese sechs Veränderungen der Zellphysiologie als die "Hallmarks of cancer" definiert (Hanahan & Weinberg 2000). Die Tumorzellen erlangen:

- Unabhängigkeit von Wachstumssignalen
- Insensitivität gegenüber von Wachstumsinhibitoren
- Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung
- Unendliche Teilungsfähigkeit
- Verhinderung der Apoptose
- Förderung der Angiogenese

Ein Karzinom besteht jedoch nicht nur aus neoplastischen Zellen mit anderer Zellphysiologie, sondern auch aus nicht neoplastischen Gewebs- und Zellanteilen wie Gefäßen, Bindegewebe und Leukozyten. Diese Zellen erzeugen ein lokales Milieu (Microenvironment), welches durch eine Entzündungsreaktion charakterisiert ist. Eine prokarzinogene Entzündungsreaktion kann durch die chronische Schädigung eines Gewebes hervorgerufen werden, auf dessen Basis es erst zu Neoplasien kommt (extrinsischer Signalweg). Oder sie kann durch schon entartete Zellen sekundär hervorgerufen werden (intrinsischer Signalweg). Beispiele für den extrinsischen Signalweg mit chronisch entzündlicher Gewebsschädigung und deshalb erhöhtem Neoplasierisiko sind: chronische Infektionen (z.B. Hepatitis C Virus Infektion der Leber), chronisch chemische Reizungen (Refluxösophagitis) oder chronisch verlaufende Autoimmunerkrankungen (Colitis ulcerosa). Der intrinsische Signalweg wird durch mutierte Onkogene in neoplastischen Zellen ausgelöst. Krebszellen produzieren inflammatorische Mediatoren und schaffen so ein für sie günstiges, inflammatorisches Gewebsmilieu (z.B. durch Aktivierung des RET/PTC Onkogens in papillären Schilddrüsenkarzinomzellen mit konsekutiver proinflammatorischer Cytokinproduktion) (Borrello et al. 2005; Mantovani et al. 2008).

Die Entzündungsreaktion kann durch die Bildung von Entzündungsmediatoren, sowie von Sauerstoff- und Stickstoffradikalen zur genetischen Instabilität von Zellen führen und somit direkt die Krebsentstehung fördern. Indirekt wird die Kanzerogenese, durch Herunterregulation der DNA (Desoxyribonukleinsäure) Reparatursysteme bei chronischen Entzündungen unterstützt. Colotta *et al.* fügten deshalb als siebtes "Hallmark of cancer" der Übersicht Hanahans die Entzündungsreaktion hinzu (Colotta et al. 2009).



Abb. 1: aus der Publikation: Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability (Colotta et al. 2009) Integration der Entzündungsreaktion als siebtes Kennzeichen der Krebsentstehung.

Die Entschlüsselung dieses inflammatorischen Microenvironments spielt eine entscheidende Rolle im Verständnis von Tumorerkrankungen und daraus resultierenden Therapieansätzen.

2.3 Tumorimmunolgie

2.3.1 Das Konzept der Immunüberwachung ("Immunsurveillance")

Paul Ehrlich stellte schon 1909 die These auf, dass das Immunsystem das Wachstum von Tumoren unterdrückt, da sie sonst häufiger auftreten müssten (Ehrlich 1909). Diese These wurde später von Burnet und Thomas aufgegriffen und erweitert. Thomas Hypothese besagte, dass langlebige Organismen einen Schutz gegen Neoplasien haben müssen, ähnlich dem Abstoßungsprozess bei Transplantaten (Thomas 1959). Burnet postulierte, dass auf Tumorzellen exprimierte Neoantigene eine Immunantwort auslösen können (Burnet 1957). Beide Wissenschaftler begründeten das Konzept der "cancer immunsurveillance" (Immunüberwachung des Krebses) bei der zirkulierende Lymphozyten die meisten neu auftretenden neoplastischen Zellen abtöten.

Heute besteht ein breiter wissenschaftlicher Konsens darüber, dass die meisten Tumore Antigene exprimieren, die vom Immunsystem erkannt werden können. Bei diesen Antigenen handelt es sich um spezifische Antigene (durch Mutationen veränderte, nur von Krebszellen exprimierte Moleküle) oder um Tumor-assoziierte Antigene (TAA, Moleküle die unterschiedlich stark von Krebs und normalen Zellen exprimiert werden) (Graziano & Finn 2005). In den letzten Jahren wurden viele solcher Antigene beschrieben.

2.3.2 Klinische und experimentelle Bestätigung des Immunsurveillance-Konzepts

Der Aufbau einer Immunität gegen diese tumor-assoziierten Autoantigene mindert das Risiko an Krebs zu erkranken. Eine solche Immunität kann im Rahmen von schweren Infektionen erworben werden. In retrospektiven Studien konnten bei Patienten die in Ihrer Krankengeschichte akut verlaufende Infektionen der drüsigen Gewebe (z.B. Mastitis, Mumps) aufwiesen, vermehrt Antikörper gegen das TAA Muc1 (Mucin 1) nachgewiesen werden. Muc1 wird von drüsigen Epithelien exprimiert. Eine auf diesem Wege erworbene Immunität gegen das TAA Muc1 minderte das Risiko für das spätere Auftreten eines Ovarialkarzinoms (Cramer et al. 2005). Das Phänomen das eine erworbene Immunität im Rahmen von schweren Infektionen vor einer malignen Grunderkrankung schützt, konnte auch für andere Krebsentitäten wie z.B. das Melanom belegt werden (Krone et al. 2003).

Derselbe Zusammenhang wird bei einer (erworbenen) Immundefizienz deutlich. So konnte in einer Reihe von Publikationen belegt werden, dass immundefiziente Mäuse häufiger Tumore entwickeln als wildtyp Mäuse (Dunn et al. 2004). Dieser Zusammenhang konnte auch bei Patienten mit immunsuppressiver Therapie nach Transplantationen beobachtet werden, die wesentlich häufiger Karzinome entwickelten als die Normalbevölkerung (Webster et al. 2007).

2.3.3 Phasen der Immunantwort gegen Tumore

Die aus Mausmodellen und klinischen Beobachtungen gewonnen Erkenntnisse im Zusammenspiel zwischen Krebsentstehung und Immunüberwachung wurden im Konzept "Immunediting" zusammengefasst und weiter entwickelt. Nach Dunn *et al.* werden bei der Krebsentstehung aus immunologischer Sicht drei Phasen durchlaufen (Dunn et al. 2004):

- Elimination/Immunesurveillance (Immunantwort eliminiert die meisten entstehenden Tumorzellen)
- Equilibrium (Immunantwort kontrolliert das Wachstum und verhindert die Metastasierung, die Tumorzellen entwickeln unter dem Selektionsdruck des Immunsystems immer mehr Mechanismen der zytotoxischen Immunantwort zu entkommen)
- Expansion (Tumorzellen haben eine Resistenz gegen das Immunsystem entwickelt ("Escapemechanism") und expandieren)

Klinisch apparente Tumore befinden sich nach diesem Konzept meist in der Expansionsphase und können nicht mehr effektiv vom Immunsystem am Wachstum gehindert werden. Dies liegt nicht an einer systemischen Ignoranz des Immunsystems sondern vielmehr an dem vom Tumor ausgebildeten Escapemechanismus. Dieser unterbindet eine effektive, tumordestruktive Entzündungsreaktion auf Basis einer TH1 gewichteten Immunantwort.

13

2.3.4 Cytotoxische Immunantwort gegen Tumore

Sowohl in präklinischen Maus-Studien mit transplantierten Tumoren (Spiotto et al. 2002; Blank et al. 2005), als auch in solchen mit genetisch induzierten Tumoren (Nguyen et al. 2002; Drake et al. 2005), konnte eine Induktion tumorspezifischer CD8⁺ T Zellen nachgewiesen werden.

Bei Kolonkarzinompatienten konnten Koch *et al.* und Liu *et al.* ebenfalls reaktive CD8⁺ T Zellen im Blut und im Karzinom nachweisen (Koch et al. 2006; Liu et al. 2008). Auch für weitere Karzinomentitäten wurden ähnliche Beobachtungen publiziert: malignes Melanom (Romero et al. 1998; Valmori et al. 2000), hepatozelluläres Karzinom (Bricard et al. 2005; Gehring et al. 2009), Brustkrebs (Rentzsch et al. 2003), Lungenkrebs (Karanikas et al. 2010).

Auch therapeutisch konnten bereits mittels Vakzinierung oder adaptivem T-Zell Transfer erfolgreich antigen-spezifische CD8⁺ T-Zell Antworten verstärkt beziehungsweise induziert werden. Trotz dieses viel versprechenden Ansatzes betrug die objective response rate - evaluiert nach den Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST) - bei klinischer Vakzinierung nur 3.3% (Rosenberg et al. 2005). Diese bestehende Diskrepanz zwischen den hohen Induktionsraten von Tumorantigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen und Therapieansprechen ist nach wie vor ein Problem welches gelöst werden müsste (Umansky 2010).

Grund für das Scheitern der therapeutisch angestrebten tumordestruktiven Entzündungsreaktion oder der natürlichen Abstoßungsreaktion ist nicht eine immunologische Ignoranz, sondern ein Mikromilieu welches eine tumordestruktive Entzündungsreaktion lokal unterdrücken kann und gleichzeitig die notwendigen Bedingungen für das Wachstum des Tumors schafft. Dieses Milieu ist überwiegend durch eine chronische, TH₂ gerichtete intratumorale Entzündungsreaktion charakterisiert (Coussens & Werb 2002).

14

2.4 Das Microenvironment als Schlüssel zum Verständnis der Tumorprogression

2.4.1 Tumorales Microenvironment

Eine den Tumor fördernde Entzündungsreaktion ist vereinfacht durch das Überwiegen einer TH₂ gewichteten Immunantwort auf lokaler und später z.T. auch auf systemischer Ebene charakterisiert. Sie verhindert lokal eine effektive zytotoxische, antitumorale Immunantwort und trägt direkt durch Förderung der Neoangiogenese und Metastasierung zur Tumorprogression bei.

So konnte bei Patienten mit kolorektalem Karzinom eine Verschiebung des TH_1/TH_2 -Gewichts in peripheren Blutlymphozyten zugunsten einer TH_2 Antwort nachgewiesen werden (Kanazawa et al. 2005).

Das tumorale Mikroenvironment ist charakterisiert durch Makrophagen des M₂ Typs, MDSC (Myeloid-derived suppressor cells), T_{reg} (regulatorische T-Zellen), Lymphozyten des TH₂ Phänotyps und B-Zellen (Biswas & Mantovani 2010).

Alle genannten Zelltypen aktivieren sich gegenseitig durch die Produktion von spezifischen Cytokinen (IL-10, IL-4, IL-13, TGF- β (tumor growth factor β)) und fördern ihre Migration in Tumore durch sezernierte Chemokine (CCL1, CCL17, CCL22, CCL2, CXCL4 (cc bzw. cxc motif ligand)). Die TH₂ charakteristischen Cytokine, wie z.B. IL-10 korrelieren mit einer vermehrten intratumoralen Angiogenese und somit insgesamt verbesserter Nährstoffversorgung des Tumors bei gleichzeitiger Dichteabnahme von CD8⁺ Lymphozyten-Infiltraten (Sakamoto et al. 2006).

MDSC sind durch die Oberflächenmarker CD11b⁺ und GR-1⁺ charakterisiert. Auch in dem hier untersuchten CT26 Tumormodell konnten diese Zellen sowohl im Tumor als auch systemisch in der Milz nachgewiesen werden. Zu den MDSC gehören unreife Makrophagen, Granulozyten, Dendritische Zellen und noch weitere Zellen der myeloischen Reihe. Die Unterteilung dieser heterogenen Gruppe erfolgt durch Expressionsmuster verschiedener Oberflächenmoleküle. Dolcetti *et al.* unterteilen die MDSC bezüglich ihrer immunsuppressiven Wirkung in drei Gruppen CD11b⁺Gr^{high/int/low}. Mit zunehmender Gr1 Expression sinkt die immunsuppressive Wirkung auf T-Zellen. Gr1^{high} Zellen entsprechen reifen polynukleären Zellen, Gr^{int} Zellen einer heterogenen Population aus Monozyten und myeloiden Vorläuferzellen, bei den Gr1^{low} Zellen handelt es sich hauptsächlich um Monozyten. Die Expansion der Gr1^{low} Population erfolgt GM-CSF (Granulocyte Makrophage Colony-Stimulating Factor) abhängig (Dolcetti et al. 2010).

Die Suppression einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort kann durch die MDSC über mehrere Mechanismen erfolgen. MDSCs exprimieren verstärkt die beiden Enzyme NOS2 (Nitric Oxide Synthase 2) und Arginase 1. Beide Enzyme führen über einen verstärkten Abbau der essentiellen Aminosäure L-Arginin zu einem lokalen L-Arginin Mangel im Gewebe. Aktivierte T-Zellen internalisieren nach Antigenbindung den T-Zellrezeptorkomplex. Die Arginin abhängige Reexpression der ζ-Kette des CD3 Komplexes wird durch den lokalen Arginnmangel inhibiert. Somit ist die antigenabhängige Signaltransduktion in aktivierten T-Zellen unterbrochen. Darüber hinaus hat das von der NOS gebildete NO einen direkten Effekt auf die intrazelluläre Signaltransduktion des IL-2 Rezeptors von T-Zellen. Durch Nitrosylierung von Cysteinresten kommt es zur Inaktivierung von Signalproteinen des IL-2 Rezeptors.

Die physiologische Funktion der MDSC könnte die Limitation einer T-Zell basierten Immunantwort sein. Die medikamentöse Inhibition der NOS2 führt zur verminderten Apoptose der CTL (cytotoxische T Lymphozyten) mit konsekutiv erhöhtem CD8⁺ Memory Zellspiegel nach Beendigung der Immunantwort (Bronte & Zanovello 2005).

Einleitung



Abb. 2: Schematische Darstellung des tumorunterstützenden und des tumordestruktiven Micromilieus.

Auf der rechten Seite sind die Zellen und ihre Funktionen innerhalb des tumordestruktiven Milieus dargestellt, links die des tumorunterstützenden Milieus. Die von diesen Zellen sezernierten Cytokine sind blau hervorgehoben.

2.4.2 Antitumorales Microenvironment

Das antitumorale Microenvironment ist durch Makrophagen des M1 Phänotyps, CD4⁺, CD8⁺ Effektor- und Memory-Lymphozyten des TH₁ Phänotyps, aktivierte NK-Zellen und reife dendritische Zellen charakterisiert. Folgende Cytokine werden u.a. von diesen Zellen sezerniert und führen zur gegenseitigen Aktivierung dieser Zellen: IFN γ , TNF- α (Tumor nekrose Faktor α), IL-15, IL-6 und IL-12. Des Weiteren ist das krebsdestruktive Milieu durch die Expression von Chemokinen wie CXCL9, CXCL10, CCL5 und MIP-1 α (Makrophage Inflammatory Protein 1 α) charakterisiert, welche die Migration TH₁ gewichteter Zellen in das Tumorgewebe unterstützen. CXCL9 und CXCL10 unterbinden außerdem die Neoangiogenese durch Inhibition der proliferierenden Endothelzellen (Smyth et al. 2006).

Welche entscheidende prognostische Bedeutung dieses tumordestruktive Milieu für das Überleben einer Krebserkrankung hat, konnten die Arbeiten der französischen Wissenschaftler Jérôme Galon und Wolf Hervé Friedman nachweisen. Sie beschreiben in verschieden Studien die Quantität und die Lokalisation von Effektor (CD8⁺) und Memory (CD45RO⁺) T-Zellen im Microenvironment humaner Kolonkarzinome. Sie konnten zeigen, dass ein mit diesen Zellen angereichertes Mikroenvironment einen positiven prognostischen Faktor für das Überleben des Patienten darstellt.

Der prognostische Wert eines Scores *in situ* ermittelt aus der Art, Dichte und Lokalisation (IM (Invasive Margin) und CT (Central Tumor)) der Immunzellen in kolorektalen Karzinomen ist unabhängig von der UICC Klassifikation und ihr sogar bezüglich der Rezidivrate und des Gesamtüberlebens überlegen (Galon et al. 2006; Pagès et al. 2009).

Nosho *et al.* konnten eine vermehrte Infiltration CD45RO⁺ Lymphozyten als prognostischen Biomarker bei multivarianter Testung für das Gesamtüberleben bei Kolonkarzinom bestätigen (Nosho et al. 2010).

Sogar die publizierten Ergebnisse von Halama *et al.* zeigen den Zusammenhang zwischen Immunzellinfiltraten und einer erfolgreichen chemotherapeutischen Behandlung bei metastasiertem Kolonkarzinom auf. Die Höhe der T-Zell Dichte an der Invasionsgrenze der Metastase ist mit dem Behandlungserfolg durch eine Chemotherapie assoziiert (Halama et al. 2011).

18

Ein weiteres Resultat, welches die Bedeutung des Mikromilieus unterstreicht und die tumordestruktive Immunantwort präziser beschreibt, ist der Nachweis einer positiven Korrelation zwischen TH₁ gewichteten Chemokinen (CX3CL1, CXCL9, CXCL10), Adhäsionsmolekülen (ICAM1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) und MADCAM1 (Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule 1)) und einer vermehrten Immunzelldichte. Ein großes polyklonales, intratumorales T-Zellrepertoire in Kombination mit oben genannten Chemokinen korreliert ebenfalls positiv mit der Überlebens-wahrscheinlichkeit der Patienten (Mlecnik et al. 2010).

2.5 Adenovirale Immuntherapie

2.5.1 Aufbau und Therapeutisches Konzept des Adlm08 Virus

Bei der Adlm08 Therapie dient ein replikationsinkompetenter Adenovirus als Vektor, um genetisches Material in die Zellen des Tumors einzubringen. Die eingebrachte DNA wird transient transkribiert und die kodierten Gene werden nur zeitlich begrenzt exprimiert. Es erfolgt keine chromosomale Integration. Über einen Zeitraum von bis zu drei Wochen werden die Gene von single chain Interleukin-12 (sc IL-12), IL-2 und dem Kostimulator CD137L/4-1BBL von infizierten Zellen exprimiert. Dabei handelt es sich um Gene die eine wesentliche Funktionen in einer TH₁ gerichteten Immunantwort einnehmen.

Durch die Expression dieser Gene soll die Ausbildung beziehungsweise Verstärkung einer effizienten cytotoxischen TH₁ Immunantwort unterstützt werden. Dies soll durch die intratumorale Injektion vor allem die Balance im lokalen Tumormilieu von einer tumorprogressiven Entzündungsreaktion hin zu einer TH₁ gewichteten tumordestruktiven Entzündungsreaktion verschieben. Hypothetisch käme es dann sowohl auf lokaler Ebene als auch systemisch zu einer Entzündungsreaktion, die zur Destruktion des Tumors führen kann. Diese Hypothese wird im Rahmen dieser Arbeit in einem Mausmodell überprüft.

Als Grundgerüst von Adlm08 dient ein Adenovirus Typ 5 mit deletierter E1 und E3 Region. Die autonome Replikation des Virus in somatischen Zellen wird durch die Deletion der E1 Region verhindert. Das in die E1 Region klonierte Konstrukt besteht aus zwei unabhängigen Expressionskassetten. Inhalt der ersten Expressionskassette ist ein CMV Promotor (Cytomegalie Virus) und die cDNA des _{single chain}IL-12s gefolgt von einem SV40-Polyadenylierungssignal (Simian Virus). Die zweite Expressionskassette beinhaltet einen RSV Promotor (Rous-Sarkoma Virus) gefolgt von der cDNA für 4-1BBL und IL-2, die durch ein EMCV-IRES (Encephalomyocarditis Virus- Internal Ribosome Entry Side) verbunden werden. Am Ende der Kassette liegt das beta-Globin Polyadenylierungssignal (siehe Abb. 3).



Abb. 3: Schematische Darstellung des Insert für AdIm08

CMV: Promotor aus dem humanen Cytomegalie Virus; scIL-12: murines, einkettiges Interleukin-12; SV40 pA: Polyadenylierungssignal aus dem Simian Virus; RSV: Promotor aus dem Rous-Sarkoma Virus; m4-1BBL: muriner T-Zell-co-Stimulator aus der TNF-Familie; EMCV-IRES: Internal Ribosome Entry-Site aus dem Encephalomyocarditis Virus; mIL-2: murines Interleukin 2; beta globin pA: Polyadenylierungssignal des betaGlobin-Gens

2.5.1.1 Interleukin-12 (IL-12) – single chain Interleukin-12 (scIL-12)

Die Effizienz von IL-12 als Gentherapeutikum und IL-12 induzierten Modulatoren basiert auf der Eigenschaft, Zellen des angeboren und adaptiven Immunsystems zu rekrutieren und eine starke TH₁ Antwort zu induzieren (Uekusa et al. 2002; Trinchieri 2003). Die Downstream-Mediatoren von IL-12 können die für die Tumorprogression wichtige Neoangiogenese inhibieren (Pertl et al. 2001). In Studien mit Xenotransplant-Modellen humaner Lungenkarzinome konnte nachgewiesen werden, dass eine intratumorale IL-12 Freisetzung zur Reaktivierung von hyporesponsiven Memory T-Zellen beiträgt (Broderick et al. 2005).

IL-12 besteht aus zwei Untereinheiten, p35 und p40, welche strukturell durch eine Disulfidbrücke verbunden werden. Die p35 Untereinheit ist nur Bestandteil des IL-12, während hingegen die Untereinheit p40 mit sich selbst Homodimere oder mit anderen Untereinheiten Heterodimere bilden kann. Diese Heterodimere besitzen eine andere biologische Funktion. Zum Beispiel bildet die p40 Untereinheit mit p19 das Cytokin IL-23, welches bei Autoimmunprozessen eine Rolle zu spielen scheint (McKenzie et al. 2006). Single chain IL-12 ist ein biologisch aktives IL-12, in welchem die beiden Untereinheiten p35 und p40 durch einen Polypeptid-Linker verbunden sind (Lieschke et al. 1997; Lode et al. 1998).

Neben dem technischen Vorteil, ein funktionales IL-12 -bestehend aus einer Peptidkette- zu produzieren, ist das scIL-12 womöglich besser für die Gentherapie geeignet als das natürliche IL-12, da keine anderen Heterodimere mit abweichenden biologischen Funktionen gebildet werden können. Dies soll die Aktivierung von Autoimmunprozessen bei therapeutischer Anwendung vermindern und somit auch das toxische Potential verringern.

Wähler und Schnieders publizierten 2005 vielversprechende Ergebnisse in einem Rattenmodell für ein hepatozelluläres Karzinom welches sie mit einem Adenovirus, der scIL12 exprimierte, behandelten. Mit diesem Virus konnten sie eine starke antitumorale Immunstimulation mit niedrigen Dosierungen induzieren (Waehler et al. 2005).

2.5.1.2 Interleukin-2 (IL-2)

IL-2 und IL-12 wirken komplementär durch die gegenseitige Hochregulation ihrer Rezeptoren, die Induktion der Proliferation und Verhinderung der Apoptose von NK und T-Zellen (Weiss et al. 2007). Des Weiteren ist IL-2 für die Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen zu Effektor und Memory T-Zellen nötig (Pipkin et al. 2010).

1992 wurde rekombinantes IL-2 durch die FDA zur Behandlung von metastasiertem Nierenzellkarzinom zugelassen. Die Zulassung zur Behandlung des metastasierten malignen Melanoms erfolgte 1998 (Handelsname: Proleukin).

2.5.1.3 4-1BBL (CD137L)

4-1BBL ist ein kostimulatorisch wirkendes Oberflächenprotein, welches zur TNF-alpha Super-Genfamilie gehört. Die Bindung von 4-1BBL an den Rezeptor 4-1BB welcher auf aktivierten T- und NK-Zellen exprimiert wird, führt zu einem kostimulatorischen Signal für CD4⁺ und CD8⁺ Zellen. Dieses kostimulatorische Signal bedingt die IL-2 unabhängige, klonale Expansion von CD8⁺ Zellen, die TH₁ gerichtete Differenzierung von CD4⁺ Zellen und die Induktion zytotoxischer Effektorfunktionen in CD8⁺ Zellen. Außerdem werden Überlebenssignale für CD4⁺ und CD8⁺ Zellen vermittelt und es kommt zur Aufrechterhaltung und Ausbildung einer Langzeitimmunität (Cannons et al. 2001; Wen et al. 2002). Die Bindung von 4-1BBL an 4-1BB, exprimiert auf anergischen T-Zellen, führt zu dessen Reaktivierung (Habib-Agahi et al. 2007).

3 Material und Methoden

3.1 Allgemein benötigte Materialen

3.1.1 Allgemein benötigte Geräte

Autoklav, GVA 460	FRITZ GÖSSNER
Brutschrank, TYP 1705309900312	WTB binder
Eismaschine	Hoshizaki
Heizblock, Eppendorf Thermomixer compact	Eppendorf
Kühlschrank mit Gefrierfach	Liebherr
Kühltruhe, -80 ºC	Kryotech
Laborpipetten	Eppendorf
Mikrowelle, SHARP R-210A	Sharp
Pipettenheber accu-jet	Brand
Spülmaschine, Miele PROFESSIONAL G7883	Miele
Tischzentrifuge, Centrifuge 5415 R	Eppendorf
Zentrifuge, Centrifuge 5810 R	Eppendorf
Trockenschrank, memmert 854 Typ SL50	Memmert
Mikroskop	Olympus
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik

3.1.2 Allgemein benötigte Programme

Excel 2010	Microsoft Corporation
Word 2010	Microsoft Corporation
Corel Draw X4	Corel Corporation
Prism 5	Graph Pad Inc
R 2.13.2	www.R-project.org

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Zelllinien:

CT26 (murines Kolonkarzinom)	DSMZ Nr. ATCC-CRL-2638

Chemikalien:

RPMI 1640 + Glutamax-I	Invitrogen/Gibco	
DMEM + Glutamax-I	Invitrogen/Gibco	
Sodium Pyruvat 100 mM	Invitrogen/Gibco	
HEPES 1M	Invitrogen/Gibco	
Fetales Bovines Serum (FBS)	Lonza	
Penicillin 10.000 U/mL,	Invitragen/Cibco	
Streptomycin 10.000 μg/mL	mont ogen/Gibco	
0,05% Trypsin-EDTA	Invitrogen/Gibco	
DPBS -CaCl ₂ / -MgCl ₂	Invitrogen/Gibco	

Material:

Zellkulturpipetten steril (5 mL, 10 mL, 25 mL)	Greiner
15 mL, 50 mL steril Gefäße	Greiner
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	ТРР
6-Well-Platten	Nunc
Pasteurpipetten	Assistent

Zusammensetzung der Medien:

RPMI 1640 für die	+ 1% Penicillin/Streptomycin, + 10% FBS, + 1 mM HEPES,
CT26-Zellen	+ 1 mM Na-Pyruvat

Die CT26 Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und Wasserdampfsättigung kultiviert. Die Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Reinluftbank. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage im Verhältnis 1:5 passagiert. Die adhärent wachsenden CT26 Zellen wurden dazu zuerst mit DPBS gewaschen, bevor die Trypsinierung über ca. 2 min erfolgte. Die Wirkung des Trypsins wurde durch Zugabe von FBS haltigem Medium gestoppt. Die Zellensuspension wurde bei 200 rcf, 5 min zentrifugiert, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und ein Fünftel der Zellen in neue Zellkulturflaschen ausgesetzt und weiterkultiviert. Alle für die Zellkultur eingesetzten Lösungen wurden auf 37°C vorgewärmt.

3.2.2 Tierexperimentelle Arbeiten

Die tierexperimentellen Arbeiten wurden an Mäusen des Inzuchtstamms BALB/c durchgeführt, welche von der Firma Charles River Lab. bezogen wurden.

Die Behörde für Umwelt und Gesundheit, Amt für Gesundheits- und Verbraucherschutz, Lebensmittelsicherheit und Veterinärswesen, Lagerstraße 36, 20357 Hamburg genehmigte die durchgeführten Versuche unter der Nr. 62-07. Dr. Karim Sultan leitete die tierexperimentellen Versuche. Ihm assistierten bei allen anfallenden Arbeiten (Versorgung, Operation, Monitoring) Marius Schwerg, Carolin Fleischhauer und der Autor selbst.

Der Ablauf der Tierversuche stellte sich wie folgt dar: 1.Tumorimplantation, 2. Behandlung (Virusinjektion), 3. Entnahme der Gewebe zur weiteren Analyse (FACS/PCR Studien) oder fortgesetztes Monitoring (Überlebensstudie).

3.2.2.1 Tumorimplantation

Geräte:IsoflurananlageEickemeyerAbluftpumpeGaymarOperationslampeSchottWärmekissenFineScience Tools

Material:

Nahtmaterial (Vicryl 6.0)

Ethicon

Insulinspritzen	BD Diabetes
Wattestäbchen	Ratiomed/megro
Kompressen	Hartmann
Chemikalien:	
Novalminsulfon-Tropfen	Rathiopharm
Baytril 5%	Bayer
Sauerstoff-medizinisch	TMG-Gase
Isofluran (Forene)	Abbott GmbH
Enthaarungsmousse	VEET
Histoacryl	Aesculap
Cutasept	Bode Chemie
DPBS -CaCl ₂ / -MgCl ₂	Invitrogen/Gibco

Zellen:

 1×10^5 CT26-Zellen/10 µL DPBS

Bei den Versuchstieren handelte es sich um weibliche BALB/c Mäuse mit einem Gewicht von 18 – 20 Gramm und einem Alter von 6-12 Wochen. Um die Implantation der CT26-Zellen (intrahepatische Injektion nach chirurgischer Mobilisierung und adäquater Lagerung der Leber) durchführen zu können, wurden die Tiere mit einem Isofluran-Luftgemisch narkotisiert. Die Narkoseeinleitung erfolgte in einem Narkosekäfig für 3–5 min (2,5% Isofluran), die Narkose-Aufrechterhaltung wurde mittels einer Gasnarkosemaske und einem Isofluran-Anteil von 2% in der Atemluft sichergestellt. Zur Vorbereitung der Operation wurden die betäubten Mäuse in Rückenlage auf einem 37°C warmen Heizkissen gelagert und die vorderen und hinteren Gliedmaßen, sowie die Narkosemaske, mit Hilfe von Klebeband fixiert. Das Operationsfeld wurde mit Enthaarungsmousse enthaart, gereinigt und desinfiziert.

Der rechtsseitige paramediane Hautschnitt erfolgte mittels Stumpfschere von paraumbilikal bis subcostal (ca. 2 cm). Die Cutis wurde kontinuierlich von der Bauchmuskulatur mit der Stumpfschere gelöst. Die nun freiliegenden Musculi abdominis wurden mit einer Pinzette angehoben und unter Schonung der Arteria epigastrica caudalis/cranialis durchtrennt, ohne die darunter liegenden Bauchorgane zu verletzen.

Nach Eröffnung des Abdomens wurde die Leber mit Hilfe von angefeuchteten Wattestäbchen mobilisiert und ein Leberlappen auf einer angefeuchteten Kompresse gelagert und unter Schonung des Organs bestmöglich fixiert. Die Tumorzellen $(3\times10^5$ Zellen in 10 µL PBS) wurden resuspendiert (abgeschnittene Spitze!) und in eine Insulinspritze aufgezogen. Die Zellsupension wurde langsam und kontinuierlich über einen Zeitraum von 30 s in den Leberlappen injiziert. Das unmittelbare Verschließen der Injektionsstelle nach Rückzug der Spritze mit Histoacryl-Gewebekleber verhinderte den Rückfluss der Tumorzellsuspension in den Bauchraum. Das Aufbringen des Gewebeklebers erfolgte mit einer Pipette. Erst nach vollständiger Aushärtung des Histoacryls konnte mit den nächsten Arbeitsschritten begonnen werden. Die perioperative Antibiose der Tiere erfolgte intraperitoneal mit Baytril (1 Tropfen 1:10 verdünnt), kurzfristige postoperative Analgesie wurde mit Novalminsulfon intraperitonal (1 Tropfen 1:4 verdünnt) erreicht.

Nach Applikation der Medikamente sowie Entfernung der Kompresse/Wattestäbchen und Rückverlagerung des Leberlappens, wurde das Abdomen durch eine Muskel- und eine Hautnaht verschlossen. Als Nahtmaterial wurde resorbierbares Vicryl der Stärke 6.0 verwendet. Die Versuchstiere wurden zur späteren Identifikation mit Ohrlöchern versehen und anschließend zur Narkoseausleitung in vorgewärmte Käfige gelegt. Die Versuchstiere wurden postoperativ bis zur ersten Nahrungsaufnahme überwacht.

Die langfristige postoperative Analgesie erfolgte mit Novalminsulfon im Trinkwasser (2 Tropfen in 150 mL Trinkwasser).

3.2.2.2 Injektion des adenoviralen Vektors

Adenovirale Vektoren:

 1×10^8 infektiöse Partikel Im-08/20 µL DPBS

1 x 10⁸ infektiöse Partikel AdGFP/20 μL DPBS

Zur Injektion der adenoviralen Vektoren (1 x 10⁸ infektiöse Partikel) erfolgte nach neun Tagen bei unauffälligen Wundverhältnissen eine Relaparatomie. Die Relaparatomie

27

wurde entsprechend dem zuvor beschriebenen Operationsverlauf durchgeführt um den tumorös infiltrierten Leberlappen optimal zu lagern und eine korrekte Injektion des Therapeutikums zu gewährleisten. Die Größe der Tumore lag zu diesem Zeitpunkt bei ca. 3 x 3 x 3 mm³. Der Hautschnitt für die Eröffnung des Bauchraums erfolgte lateral des alten Schnittes. Der Vektor wurde in entsprechender Konzentration mit einer Insulinspritze kontinuierlich über 30 s direkt in den Tumor injiziert. Die Einstichstelle wurde wie zuvor beschrieben mit Histoacryl-Gewebekleber verschlossen.

3.2.2.3 Überlebensstudie

Für die Überlebensstudie wurden die Körpergewichte und das Langzeitüberleben CT26 tumortragender Mäuse unterschiedlicher Behandlungsgruppen beobachtet.

Der Gewichtsverlauf wurde ein bis zweimal wöchentlich dokumentiert. Als Abbruchkriterium wurde eine Gewichtszunahme oder -abnahme von 30% zur vorangegangenen Messung festgelegt. Die Mäuse verstarben durch starke Progression der Tumorerkrankung oder wurden bei Erfüllung der Abbruchkriterien mit CO₂ und anschließender zervikaler Dislokation getötet. Tote Tiere wurden obduziert und ein makroskopischer Befund erhoben.

3.2.2.4 Präparation der Gewebe für unterschiedliche Analysen

Für die Entnahme der Gewebe wurden die Tiere mit CO₂ und anschließender zervikaler Dislokation getötet, der Bauchraum eröffnet und die Leber bzw. die Milz entnommen. Für die Transkriptionsanalyse inflammatorischer Gene erfolgte die Organentnahme 3, 5, 7 bzw. 10 Tage nach der Injektion des adenoviralen Vektors. Die entnommenen Organe wurden in einer Petrischale gefüllt mit kaltem PBS auf Eis präpariert. Sowohl der makroskopisch abgrenzbare Tumor als auch Gewebe an der Invasionsgrenze wurden präpariert, getrennt in Kryotubes überführt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren um einen Abbau der RNA durch RNAsen zu unterbinden. Die weitere Lagerung der Gewebe bis zur Analyse erfolgte ebenfalls in Stickstoff.

Die an Tag 10 präparierten Milzen wurden wegen der offensichtlichen Splenomegalie zu diesem Zeitpunkt zusätzlich gewogen.

Für die durchflusszytometrische Analyse der Tumor infiltrierenden Leukozyten wurden die Tiere 24 Tage nach der Behandlung wie oben beschrieben getötet, die Tumore in

einer mit kaltem PBS gefüllten und auf Eis gelagerten Petrischale präpariert und kurzfristig bis zur weiteren Verarbeitung in 4°C kaltem PBS gelagert.

Die Milzen für die funktionellen Assays und Splenozytenanalysen wurden wie im vorangehenden Absatz für das Tumorgewebe beschrieben präpariert. Die Organentnahme erfolgte jedoch an Tag 9 und 24.

3.2.3 RNA Isolierung

Geräte:	
TissueLyser	Qiagen
NanoDrop Spektrometer	PeqLab
Material:	
Metallmörser	
stainless beads	Qiagen
Chemikalien:	
TRIzol [®] Reagent	Invitrogen
Chloroform ≥ 99% p.a.	Roth
Ethanol ≥ 99,8% p.a.	Roth
PureLink Micro-to-Midi total RNA Purification	Invitrogon
System	mmuogen

Die Dissoziation der Gewebe erfolgte in einem stickstoffgekühlten Metallmörser. Das pulverisierte Gewebe wurde in Aliquots von 25 mg aufgeteilt, die weitere Lagerung erfolgte bis zur Verarbeitung in flüssigem Stickstoff. Zur RNA Isolierung wurden die Aliquots auf Eis aufgetaut und unter einem Abzug mit je 1 mL TRIzol-Reagenz versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter schütteln, wurde jeweils eine Edelstahlkugel zugegeben und die Proben wurden 60 s bei einer Frequenz von 30/s im TissueLyser homogenisiert. Das Homogenat wurde in ein neues Gefäß überführt, mit 200 µL Chloroform versetzt und nach 15 s Schütteln 2-3 min bei RT inkubiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 4°C und 12.000 rcf wurden 400 µL der oberen, wässrigen Phase in ein neues Tube transferiert. Es folgte die Zugabe von 400 µL Ethanol. Die Proben wurden gut durchmischt und mit dem Kit PureLink[™]Micro-to-Midi gereinigt. Die Durchführung erfolgte nach dem vom Hersteller vorgegebenen Protokoll. Die RNA wurde mit einem Volumen von 100 µL RNase freiem Wasser von der Säule eluiert. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch mit dem NanoDrop bestimmt. Die isolierte Gesamt-RNA wurde anschließend bei -80°C gelagert.

3.2.4 Reverse Transkription

Geräte:	
Thermocycler	Biometra
Chemikalien:	
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
Water, PCR Grade, RNase free	Roche

Zur Reversen Transkription wurde 1 μ g Gesamt-RNA eingesetzt. Die RNA wurde in 10 μ L RNase freiem Wasser aufgenommen und mittels des HighCapacity cDNA Reverse Transcription Kits nach Herstellerangaben in einem Ansatz von 20 μ L in cDNA umgeschrieben. Als Primer wurden Random Hexamere (0,5 x) und Oligo-dT Primer (1,25 μ M) eingesetzt.

Einstellung des Thermocyclers:

25 ºC	10 min
37 ºC	120 min
85°C	5 s
4ºC	Pause

Die cDNA-Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei - 20°C gelagert.

3.2.5	Quantitative Real-Time PCR		
Geräte:			
Mx4000		Stratagene	
Program	ime:		
Primer3	(v.0.4.0)	SourceForge, Inc.	
Datenba	anken und Programme:		
		Service of WTSI (Welcome trust	
F		sanger institute) and EBI	
Ensemp	i (www.ensembl.org)	(European Bioinformatics	
		Institute)	
		Service of U.S. National Library of	
NCBI (w	ww.pubmed.org)	Medicine and the National	
		Institutes of Health	
Mx4000	v4.20	Stratagene	
Mataria	1.		
		Churchensen	
ser Strip		Stratagene	
Gestoph	te Pipettenspitzen	Nerbe Plus	
DNA-Aw	ay	Molecular Bio Products	
Chemika	alien:		
SYBR-Gr	een Master Mix	Roche	
Water, F	PCR Grade, RNase free	Roche	
Primer (10 pM)	MWG	

Mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR (Q-RT-PCR) ist es möglich, ein bestimmtes Template mit einem Fluoreszenzsignal, das nach jedem Zyklus der PCR aufgenommen wird, zu quantifizieren. In dieser Arbeit wurde die PCR mit dem interkalierenden Farbstoff SYBR Green durchgeführt. Nach beendeter Amplifikation kann über die Analyse der Schmelzkurve die Spezifität der PCR überprüft werden. Wenn die Schmelzkurve nur einen Peak zeigte und die dazu gehörige Temperatur mit der Länge des Amplifikats korrelierte, binden die ausgewählten Primer spezifisch an der zu analysierenden cDNA.

3.2.5.1 Primerdesign

Die Primer für die zu analysierenden Gene wurden eigenständig ausgewählt. Dazu wurde die Sequenz der cDNA der z.B. zu untersuchenden Cytokine in der Datenbank *NCBI* gesucht und die verlinkte Primersuche geöffnet. Die Suchkriterien wurden so eingestellt, dass folgende Angaben erfüllt waren:

- Schmelztemperaturen um die 60°C (+/- 7°C)
- Länge von ca. 20 bp
- Unterschied der Schmelztemperaturen beider Primer max. 5°C
- PCR-Produkt Intron überspannend (Vermeidung von DNA Amplifikationen)
- Keine Amplifikation anderer cDNA

Welche(s) Intron(s) die PCR-Produkte des ausgewählten Primerpaares überspannen, wurde anhand der Datenbank *Ensembl* überprüft.

Tab. 2: Primerpaare für die Cytokine und Effektorproteine.

Außerdem sind die Länge des Amplifikats, die Datenbankquellen und die Lage der Primer angegeben.

TG	Primer	Produkt -größe	Genbank N°	Kommentar/ Blast Ergebnisse
GAPDH	AACTTTGGCATTGTGGAAGG ACACATTGGGGGGTAGGAACA	223	M32599	Primer3: 539-761 von 1228 Mo: NM_001001303 Exon-4 Exon-5 Intron 4-5: 134 bp
INFg	GCTTTGCAGCTCTTCCTCAT GTCACCATCCTTTTGCCAGT ACTGGCAAAAGGATGGTGAC	162	NM_008337 ENSMUSG000000 55170	<u>Primer-3: 1207</u> <u>For: exon-1</u> <u>Rev: exon-2/3</u>
CD45	CCTGCTCCTCAAACTTCGAC GACACCTCTGTCGCCTTAGC GCTAAGGCGACAGAGGTGTC	194	NM_001111316.1 NM_011210.3	<u>Primer-3: 5664</u> <u>For: exon-24</u> <u>Rev: exon-25</u>

Perforin	GATGTGAACCCTAGGCCAGA GGTTTTTGTACCAGGCGAAA TTTCGCCTGGTACAAAAACC	161	NM_011073.2 ENSMUSG000000 37202	<u>Primer-3: 2102</u> <u>For: exon-2</u> <u>Rev: exon-3</u>
Granzyme B	TCGACCCTACATGGCCTTAC TGGGGAATGCATTTTACCAT ATGGTAAAATGCATTCCCCA	198	NM_013542.2 ENSMUSG000	Primer-3: 1418 For: exon-2 Rev: exon-3
CXCL 9	CCGCTGTTCTTTTCCTCTTG AGTCCGGATCTAGGCAGGTT AACCTGCCTAGATCCGGACT	225	NM_008599.4 ENSMUST000001 13093	Primer-3: 381(coding sequence) For: exon-1 Rev: exon-3
CXCL 11	AGTAACGGCTGCGACAAAGT AGTCAGACGTTCCCAGGATG CATCCTGGGAACGTCTGACT	164	NM_019494 ENSMUST000000 77820	Primer-3: 1597 For: exon-3 Rev: UTR
CCL 4 /MIP-1ß	CTCCAAGCCAGCTGTGGTAT GAGGAGGCCTCTCCTGAAGT ACTTCAGGAGAGGCCTCCTC	155	NM_013652.2 ENSMUSG000000 18930	<u>Primer-3: 676</u> <u>For: exon 2-3</u> <u>Rev: UTR</u>
CCL 5/RANTES	CCCTCACCATCATCCTCACT GAGCACTTGCTGCTGGTGTA TACACCAGCAGCAAGTGCTC	154	NM_013653.3 ENSMUSG000000 35042	<u>Primer-3: 581</u> <u>For: exon 1</u> <u>Rev: exon 2</u>
TNF-a	GAACTGGCAGAAGAGGCACT AGGGTCTGGGCCATAGAACT AGTTCTATGGCCCAGACCCT	203	NM_013693.2 ENSMUSG000000 24401	<u>Primer-3: 1020 (ohne</u> <u>UTR)</u> <u>For: exon 1</u> <u>Rev: exon 2</u>
IL-10	TGCTATGCTGCCTGCTCTTA TCATTTCCGATAAGGCTTGG CCAAGCCTTATCGGAAATGA	243	NM_010548.1 ENSMUSG000000 16529	<u>Primer-3: 1316</u> <u>For: exon 1</u> <u>Rev: exon 3</u>
IL-6	CCGGAGAGGAGACTTCACAG TTCTGCAAGTGCATCATCGT ACGATGATGCACTTGCAGAA	166	NM_031168.1 ENSMUSG000000 25746	<u>Primer-3: 1087</u> <u>For: exon 2</u> <u>Rev: exon 3</u>
IL-1RA (isoform 1+2)	CCAGCTCATTGCTGGGTACT TTCTCAGAGCGGATGAAGGT ACCTTCATCCGCTCTGAGAA	231	NM_001039701.2 ENSMUSG000000 26981	<u>Primer-3: 840 (ohne</u> <u>UTR)</u> <u>For: exon 3</u> <u>Rev: exon 5</u>
NOS2	CCTGTGTTCCACCAGGAGAT CCCTGGCTAGTGCTTCAGAC GTCTGAAGCACTAGCCAGGG	247	NM_010927.3 ENSMUSG000000 20826	<u>Primer-3: 3990</u> <u>For: exon 12</u> <u>Rev: exon 14</u>
CXCL10	GGTCTGAGTGGGACTCAAGG GTGGCAATGATCTCAACACG CGTGTTGAGATCATTGCCAC	152	NM_021274.1 ENSMUSG000000 34855	Primer-3: 3990 For: exon 12 Rev: exon 14
CXCR3	GCAAGTTCCCAACCACAAGT TCTCGTTTTCCCCATAATCG CGATTATGGGGAAAACGAGA	189	ENSMUST000000 56614 NM_009910.2	<u>Primer-3:</u> <u>1609/excluded 261-</u> <u>1609</u> <u>For: 5´UTR</u> <u>Rev: exon 2</u>
CD 8	TCAGTTCTGTCGTGCCAGTC ATCACAGGCGAAGTCCAATC GATTGGACTTCGCCTGTGAT	167	ENSMUST000000 66747	Primer-3: 919 For: exon 1 Rev: exon 3

CD 4	CAGGAAGTGAACCTGGTGGT TCCTGGAGTCCATCTTGACC GGTCAAGATGGACTCCAGGA	223	ENSMUST000000 24044	<u>Primer-3: 1180</u> <u>For: exon 6</u> <u>Rev: exon 7</u>
CCR-1	GTTGGGACCTTGAACCTTGA CCCAAAGGCTCTTACAGCAG CTGCTGTAAGAGCCTTTGGG	250	ENSMUST000000 26911	<u>Primer-3: 2707</u> <u>For: exon 1</u> <u>Rev: exon 2</u>
FOXp3	AGGGTGGGTGTCAGGAGCCC TCCTGGGGATGGGCCAAGGG CCCTTGGCCCATCCCCAGGA	220	NM_054039.1	Primer are separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA
Tgfbeta1	TACAACAGCACCCGCGACCG GGGGTTCGGGCACTGCTTCC GGAAGCAGTGCCCGAACCCC	202	NM_011577.1	Primer are separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA
CCR5	AGGTGAGACATCCGTTCCCCCT CACGCTCTTCAGCTTTTTGCAGC GCTGCAAAAAGCTGAAGAGCGTG	244	NM_009917.5	Primer are separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA
Tbx21	GCCTATCCAACGCGCGCTCA CGTCACTCGGCATCGGCTCG CGAGCCGATGCCGAGTGACG	212	NM_019507.2	Primer are not seperated by an intron
EOMES	CGAGGCTGCACATCGTGGAAGT TGGGATCTAGGGGAATCCGTGGG A	250	NM_010136.3	Intron spanning (2064 bp)
IRF-1	CTTTCGGGAGGAGGTGCCACAGC CAGCCGTGCTTAGCAGCGTGC	164	NM_0011159396. 1	Intron spanning (1463 bp)
Ki-67	TTGGAAAGGAACCATCAAGG TTTCTGCCAGTGTGCTGTTC GAACAGCACACTGGCAGAAA	214	NM_001081117.2 ENSMUSG000000 31004	Primer-3: exon-1 bis 8 For: exon-4/5 Rev: exon-6

3.2.6 PCR

Bei Durchführung der PCR-Analysen wurde darauf geachtet, dass alle Analysen eines Gens, die nachher verglichen werden sollten, zeitgleich durchgeführt wurden. Es wurde für jede Analyse mit dem definierten Primerpaar ein Mastermix angesetzt. Nach Verteilung des Mastermixes erfolgte die Zugabe der Template cDNA. Alle Lösungen wurden während des Pepettierens auf Eis bereitgestellt.

Der PCR-Arbeitsplatz wurde zu Beginn der Arbeiten mit DNA-Away gereinigt, es wurde mit gestopften Pipettenspitzen gearbeitet und es wurde darauf geachtet, dass keine amplifizierten PCR Produkte in der Nähe des Arbeitsplatzes bearbeitet wurden. Diese Maßnahmen dienten der Verhinderung von Produktkontaminationen. Durch Analyse einer No Template Kontrolle wurden Kontaminationen bei jedem Lauf analysiert und ausgeschlossen.

Probenanzahl	1
PCR-Wasser[µL]	10,5
SYBR GREEN PCR Mastermix Roche 2x [µL]	12,5
Primer forward (10 pM) [µL]	0,5
Primer reverse (10 pM) [µL]	0,5
Template [µL]	1,0
Gesamtvolumen [µL]	25,0

Tab. 3: Zusammensetzung des Mastermix für die PCR

Die PCR-Streifen wurden mit Deckeln verschlossen, gut gemischt und anschließend zentrifugiert, damit der gesamte PCR Ansatz für die Messung im Mx4000 am Gefäßboden lokalisiert ist. Für die Messung wurde folgendes Temperaturprofil eingestellt (Abb. 4):



Abb. 4: Temperatur-Profil mit dem jede PCR durchgeführt wurde.

Ein Messdurchlauf besteht aus vier Segmenten, wobei im Segment 1 die Hot-Start-Polymerase aktiviert wird und im Segment 2 die Amplifikation und Vermessung des Templates in 40 Zyklen erfolgt. Jeder Zyklus besteht aus Denaturierung (95°C), Annealing (60°C), Elongation und einer dreimaligen Fluoreszenzmessung am Ende der Elongationsphase. Das emittierte Licht des interkalierenden SYBR Greens wird nach Anregung mit Licht der Wellenlänge von 492 nm bei 516 nm detektiert. Die zusätzliche Messung des Referenzfarbstoffs Rox (585 nm Anregung, 610 nm Messung) erfolgte, um Pipettierfehler auszugleichen. Zur Qualitätskontrolle wurde anschließend in den Segmenten 3 und 4 eine Schmelzkurve erstellt, wobei in Segment 3 die Denaturierung aller DNA-Stränge erfolgt mit anschließender homogener Paarung sämtlicher Stränge durch die Abkühlung auf 55°C im Segment. Die folgende kontinuierliche Anhebung der Temperatur in 1°C Schritten alle 30 s mit Fluoreszenzmessung diente der eigentlichen Erstellung der Schmelzkurve mit der die Amplifikatreinheit und Primerspeziftät beurteilt wurde.

3.2.7 Primer-Effizienzen

Die Primer-Effizienz ist das Maß für die Amplifikationsrate eines PCR-Produkts während der exponentiellen Phase der quantitativen PCR. Theoretisch kann es unter optimalen Bedingungen zu einer Verdopplung des Amplifikats während eines Zyklus kommen. Die Primereffizienz ist abhängig von den Bindungsaffinitäten der Primer und der Bildung von Primerdimeren. Um die Primer-Effizienzen zu bestimmen wurden aus einem cDNA Pool für jedes Primerpaar cDNA-Verdünnungsreihen (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, Darstellung 1:16) angesetzt und gemessen. Bei des Logarithmus der Verdünnungsfaktoren gegen die ermittelten CT-Werte der Verdünnungsfaktoren kann die Primer-Effizienz aus der Steigung der Ausgleichgerade abgelesen werden. Die Bestimmung der Primer-Effizienz erfolgte in zwei unabhängigen Versuchen mit Doppelbestimmung.

3.2.8 Auswertung - relative Quantifizierung

Programme:	
Microsoft Excel	Microsoft Corporation
R 2.14.0win	The R Foundation for Statistical
	Computing
R Studio, Version 0.94.110	R Studio Inc
Package: gplots 2.10.1 Funktion: heatmap.2() Gregory R. Warnes, CRAN, 2011-09-03

Für die Auswertung von real-time-PCR Experimenten können prinzipiell zwei Quantifizierungsmethoden verwendet werden, nämlich die relative oder die absolute Quantifizierung. Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression eines Target-Gens relativ zu einem Referenz-Gen bestimmt, bei der absoluten Quantifizierung kann eine absolute Kopienanzahl mit Hilfe einer Kalibrierungskurve ermittelt werden.

Da in dieser Arbeit die Induktion ausgewählter inflammatorischer Gene AdIm08 behandelter Tiere im Vergleich zur AdGFP Kontrolle ausgewertet werden sollten, wurde eine relative Quantifizierungsmethode nach Michael W. Pfaffl gewählt (Pfaffl 2001):

Verhältnis =
$$\frac{(E_{\text{Target}})^{\Delta Ct_{\text{target}} (\text{Kontrolle-Behandelt})}}{(E_{\text{Referenz}})^{\Delta Ct_{\text{ref}} (\text{Kontrolle-Behandelt})}}$$

Gleichung 1: Relative Quantifizierung nach Michael W. Pfaffl (Pfaffl 2001). E: Effizienz der Primer; Target: Zielgen; Referenz: *Gapdh* (*Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase*); Kontrolle: AdGFP Tiere; Behandelt: AdIm08 Tiere

Für die Darstellung der Transkriptionslevel in der Heatmap wurden die untersuchten Gene sowohl in der Adlm08 als auch in der AdGFP Kontrollgruppe relativ zum zugehörigen Gapdh Transkriptionslevel (Housekeeping-Gen) dargestellt. Der relative Transkriptionslevel berechnet sich aus dem Δ Ct zwischen dem untersuchten inflammatorischen Gen und dem Referenzgen Gapdh zur Basis Effizienz_{Gen}. Der natürliche Logarithmus des relativen Transkriptionslevel wurde mit einer farbkodierten Skala in der Heatmap dargestellt.

relatives Transkriptionslevel =
$$\ln(E_{t \arg et}^{-(\Delta Ct_{t \arg et} - \Delta Ct_{referenz}) \cdot 100})$$

Gleichung 2: Relatives Transkriptionslevel

E: Effizienz der Primer; Target: Zielgen; Referenz: Gapdh (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase);

Die Heatmap wurde mit der im Package gplots enthaltenen Funktion heatmap.2() mit dem Programm R 2.14.0 win erstellt. Die Funktion heatmap.2() verwendet zur Erstellung der Dendrogramme ein hierarchisches agglomeratives Clusterverfahren. Dabei handelt es sich um ein statistisches Verfahren zur Strukturanalyse von Datensätzen. Objekte mit ähnlichen Eigenschaften werden in immer größeren Clustern (Familien) zusammengefasst, sodass Objekte/Cluster mit den meisten Gemeinsamkeiten bzw. geringsten Differenzen in einer Grafik benachbart dargestellt werden.

3.2.9 Lymphozytenaufarbeitung aus Tumoren und Milzen

Geräte:	
Neubauer Zählkammer	
FC 500	Beckman Coulter
Material:	
BD Falcon Cell strainer (70 μm) (352350)	BD
BD Falcon 50ml	BD
Chemikalien:	
EryLysis Puffer:	
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl) c(0,155 mol/L)	
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃) c(0,01 mol/L)	
Ethylen-diamin-tetraacetat (EDTA) c(0,001 mol/L)	
BC Flow-count-beads (7547053)	Beckman Coulter
FACS-Puffer (PBS + 3% FCS):	
PBS w/o Ca/Mg (H15-002)	ΡΑΑ
FCS	Lonza

Die Präparation der Milz wurde in einer mit kaltem PBS benetzten Petrischale auf Eis durchgeführt. Anschließend wurde die Milz mit einem Spritzenstempels im 70 μ m

Falcon Cell strainer zerrieben um die Splenozyten zu vereinzeln. Die Splenozyten wurden durch wiederholte Spülung mit 4°C kaltem PBS (insgesamt max. 40 mL) in ein 50 mL Falcon Tube überführt und bei 280 rcf, 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 3 mL EryLysis Puffer resuspendiert, für 3-5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut nach Zugabe von 17 mL 4°C kaltem PBS bei 280 rcf, 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 11 mL kaltem PBS resuspendiert und die Splenozytenkonzentration wurde mittels Flow-Count-Analyse (100 μ L Zellsuspension + 100 μ L Flow-count beads + 300 mL FACS-Puffer) oder in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Die Isolierung der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten erfolgte entsprechend der Splenozytenaufarbeitung. Das eingesetzte Tumorgewebe wurde vor der Präparation gewogen um nachträglich die Lymphozytenanzahl pro Gramm Tumorgewebe definieren zu können.

3.2.10 Extrazelluläre Färbung der Lymphozyten

Material:

FACS Tubes Sarstedt

Chemikalien:

FACS-Puffer (PBS + 3% FCS):	
PBS w/o Ca/Mg (H15-002)	PAA
FCS	Lonza

γ-Globulin Blocking solution 10 mg/ml (G4386-1g) Sigma

Antikörper:

Antikörper	Klon		Konjugat	Bezugsquelle/Katalognummer
IFN-γ	XMG1.2	Rat-anti- mouse	PE	BD Biosciences (562020)
CD8a		Rat-anti- mouse	PE-Cy7	Beckman Coulter (733266)
CD4		Rat-anti-	SPRD	Beckman Coulter (732004)

		mouse		
CD49b		Rat-anti- mouse	FITC	Beckman Coulter (732290)
CD69		Hamster-anti- mouse	PE	Beckman Coulter (731716)
Rat IgG1 Isotype			PE	Beckman Coulter (731659)
CD11b	M1/70	Rat-anti- mouse	FITC	eBioscience (11-0112)
Gr1	RB6-8C5	Rat-anti- mouse	PE	BD Biosciences (553128)
CD62L	MEL-14	Rat-anti- mouse	PE	eBioscience (12-0621-81)
FoxP3	FJK-16s	Rat-anti-	PE	eBioscience Treg staining Kit
		mouse		(88-8111-40)
CD25	PC61.5	Rat-anti-	APC	eBioscience Treg staining Kit
		mouse		(88-8111-40)
CD4	RM4-5	Rat-anti-	FITC	eBioscience Treg staining Kit
		mouse		(88-8111-40)

Für jede Färbung wurden 10⁶ Lymphozyten in FACS-Tubes pipettitiert. Der Überstand wurde nach dem ersten Zentrifugationszyklus (Lymphozyten: 4 min, 394 g, 4°C) verworfen. Anschließend erfolgte der erste Waschgang des Lymphozytenpellets, indem es in 2 ml FACS-Puffer resuspendiert (vortexen) und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen.

Um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren, wurden die Zellen in 100 μ L γ -Globulin Blocking-solution resuspendiert und 20 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde ein weiterer Waschgang durchgeführt.

Zur Färbung von 10⁶ Zellen wurden unterschiedliche Mengen der Antikörper eingesetzt, um eine optimale Intensität bei niedrigem Verbrauch zu gewährleisten:

CD8a PE-Cy7	2 µl
CD4 SPRD	2 µl
CD49b FITC	2 µl
IFN-γ PE	0.5 μl
Rat IgG1 Isotype PE	2 μl

CD11b FITC	1 µl
Gr1 PE	1 µl
CD62L PE	1 µl
FoxP3 PE	1 µl
CD25 APC	1 µl

Für die jeweilige Färbung wurde ein Mastermix bestehend aus den benötigten Antikörpern in 100 μl FACS-Puffer pro Probe angesetzt. Das Lymphozytenpellet wurde in dieser Antikörperlösung resuspendiert und 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Es folgten zwei Waschgänge mit je 2 ml FACS-Puffer und dem Lymphozyten-Zentrifugationszyklus.

Zur Messung wurden die Zellen in 500 μ L FACS-Puffer resuspendiert. Bei zusätzlicher intrazellulärer Färbung von IFN- γ schließt sich die intrazelluläre Färbung mit Fixierung der Zellen an.

3.2.11 Lymphozyten Fixation und Permeabilisation für intrazelluläre IFN-γ/FoxP3 -Färbung

Material:	
FACS Tubes	Sarstedt
Chemikalien:	
BD Cytofix/Cytoperm Plus	BD Pharmingen
fixation/permeabilization Kit With GolgiStop	
containing Monensin (554715)	

4% Paraformaldehyd		Roth
FACS-Puffer (PBS + 3% FCS):		
PBS w/o Ca/Mg (H15-002)	PAA	
FCS	Lonza	

Zur intrazellulären Anreicherung des IFN- γ werden die Splenozyten vor der Durchflusszytometrie mit GolgiStop behandelt, welches Monensin enthält. 0,66 μ L Monensin/pro mL Medium wurde dem Kulturmedium zugefügt. Die Inkubation mit Monensin wurde für mindestens 4 h und maximal 12 h vor der Färbung durchgeführt. Nach der Inkubation mit GolgiStop erfolgte zunächst die extrazelluläre Färbung (s.o.). Nach der extrazellulären Färbung wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und für die intrazelluläre Färbung permeabilisiert. Hierfür wurden die Zellen nach der extrazellulären Färbung in 100 μ L einer 4% Paraformaldehyd-Lösung resuspendiert und für 15 min bei 4°C inkubiert. Die Inkubation wird durch Zugabe von 1 ml FACS-Puffer und zwei Zentrifugationszyklen (Lymphozyten: 4 min, 394 g, 4°C, Resuspension in 1 ml FACS-Puffer) beendet.

Permeabilisierte und fixierte Zellen können nun entsprechend der extrazellulären Färbung mit IFN-γ oder FoxP3 entsprechend den Herstellerangaben gefärbt werden. Begonnen wird mit dem unter "extrazelluläre Färbung" beschriebenen Schritt einen Mastermix zu erstellen und das Zellpellet in 100 μL Färbelösung zu resuspendieren.

3.2.12 Durchflusszytometrie

Chemikalien:

Gerät:	
FC500	Beckman Coulter
FACS Calibur	BD Pharmingen

Coulter Clenz	Beckman Coulter
Isoton	Beckman Coulter
CompBeads Murin	BD Pharmingen

Die Durchflusszytometrie eignet sich zur Charakterisierung einzelner Zellen bezüglich ihrer Größe und Granularität. Exprimierte Proteine können mittels Fluoreszenzmarkierter Antikörper nachgewiesen werden. Die Größe der Zelle wird im FS (forward scatter) die Granularität im SS (sideward scatter) gemessen. Das FC500 Gerät von Beckman Coulter verfügt über einen 20mW-Argon-Laser der Exzitationswellenlänge 488 nm. Folgende an Antikörper gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe wurden für die Experimente mit dem FC500 eingesetzt (Detektionskanal in Klammern):

- FITC (fluorescein isothiocyanate) (FL1) Emissionsmaximum 520 nm,
- PE (phycoerythrin), (FL2) Detektor, Emissionsmaximum 560-600 nm,
- SPRD (spectral red) (FL4), Emissionsmaximum 655-695 nm
- PE-Cy7 (phycoerythrin gekoppelt mit Cy7) (FL5) Emissionsmaximum 767 nm

Die bei der Durchflusszytometrie verwendeten Farbstoffe haben zum Teil sich überschneidende Emissionswellenlängen. Aus diesem Grund müssen vor einer Messung die verwendeten Farbstoffe gegeneinander kompensiert werden. Hierzu wurden kleine Kügelchen (Beads) genutzt, die mit Anti-Ratten-Fc und Anti-Hamster-Fc IgG vom Hersteller beschichtet (coated) waren. Die Beads wurden gemäß den Herstellerangaben mit den in den Messungen verwendeten Antikörpern gefärbt. "Uncoated Beads" dienten als Kontrolle. Für die Kompensation wurden die Kontroll-Beads mit den Coated-Beads im Verhältnis von 1:1 gemischt und jeweils mit einem Antikörper gefärbt. Nach dem Färben erfolgte gemäß Herstellerprotokoll ein Waschgang mit nachfolgender Zentrifugation.

Nach der Resuspension in FACS-Puffer wurde die Kompensation durchgeführt. Jeder im Protokoll genutzte Kanal (FL1-FL5) musste gegen jeden kompensiert werden. Hierzu war zu beachten, dass der x- bzw. y-Median der Kontroll-Beads und der positiven Beads durch Veränderung der Kompensation so eingestellt wurde, dass ihre Werte nach Möglichkeit identisch waren. Nachdem dies mit allen gefärbten beads separat durchgeführt wurde, wurden in einem letzten Schritt zur Feinkompensation die mit den unterschiedlichen Antikörpern gefärbten beads in gleichen Verhältnissen gemischt und zur Feineinstellung im Gerät gemessen.

3.2.13 Kokultur: Lymphozyten mit CT26 Zellen

Material:

6-well Platten

Nunc

Chemikalien:

BD Cytofix/Cytoperm PlusBD Pharmingenfixation/permeabilization Kit With GolgiStopcontaining Monensin (554715)

Zunächst wurden CT26 Tumore am Tag -7 in die Lebern von Balb/*c* Mäusen implantiert und an Tag 0 mit 1×10^8 ivp AdIm08 (n=5) oder 1×10^8 ivp AdGFP (n=3) therapiert. Die Splenozyten wurden 9 Tage nach Behandlung isoliert und einen Tag *in vitro* mit Medium oder CT26 Zellen kultiviert. Einen Tag vor Kokulturbeginn wurden 6×10^5 CT26 Zellen auf 6-Wellplatten ausgesetzt, um eine ausreichende Adhärenz und Konfluenz der CT26 Zellen bei Ko-Kulturbeginn zu gewährleisten. Pro Well wurden 1×10^7 Splenozyten ausgesetzt und mit Medium oder den ausgesetzten CT26 Zellen unter CT26-Zellkulturbedingungen 24 h kultiviert. Nach 24 h Stunden wurden die Zellkulturüberstände aliquotiert und bei -80°C bis zur IFN-γ Konzentrationsbestimmung mittels ELISA gelagert. Zu den Wells, bei denen die Anzahl IFN-γ positiver Splenozyten per Durchflusszytometrie bestimmt werden sollte, wurde 4h vor Analyse Monensin zugegeben (siehe: Lymphozyten Fixation und Permeabilisation für intrazelluläre IFN-γ Färbung).

3.2.14 ELISA

Geräte:	
Sunrise ELISA Reader mit Magellan Software	Tecan
Material:	
DuoSet® ELISA m IFNgamma Femto HS	eBioscience
Chemikalien:	
PBS 10x	Roth
Tween 20	Roth
H ₂ SO ₄	Roth

Die IFN-γ Konzentration [pg/ml] der Co-Kulturüberstände wurde mit einem IFN-γ high sensitive ELISA der Firma eBioscience bestimmt. Der ELISA wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Bestimmung der IFN-γ-Konzentration wurden jeweils 100 µL der Ko-Kulturüberstände eingesetzt, nachdem sie auf Eis aufgetaut wurden.

Die Bestimmung der Absorptionen erfolgt bei 570 nm (Leerwert) und 650 nm (Messwert) im Sunrise ELISA Reader der Firma Tecan. Nach Subtraktion der Leerwerte von den Messwerten können die IFN-γ Konzentrationen der Proben mit Hilfe der Standardkurve ermittelt werden. Die Auswertung erfolgte im Programm Magellan.

4 Ergebnisse

4.1 *In vivo* Charakterisierung der AdIm08 Therapie im CT26/BALB/*c*-Modell

Als Tumormodell für alle durchgeführten Experimente diente das CT26/BALB/c-Modell. Dabei handelt es sich um ein syngenes Tumormodell in einer immunkompetenten BALB/c Maus. Zur Charakterisierung der durch die AdIm08 Therapie ausgelösten Immunantwort wurden verschiedene Methoden angewendet. Zur Charakterisierung des lokalen Tumormilieus wurde das Expressionsprofil verschiedener Gene (Lymphozytenmarker, Chemokine und Cytokine) mittels Q-RT-PCR erstellt. Veränderungen Therapiebedingte systemische bezüglich immunsuppressiver Immunzellen konnten durch durchflusszytometrische Analysen der Splenozyten erfasst werden. Die funktionelle Analyse der cytotoxischen T-Zellen erfolgte in einem ex vivo Restimulationsassay. Tumorinfiltrierende Lymphozyten konnten per Durchflusszytometrie quantitativ und qualitativ bestimmt werden. Abschließend wurde der Therapieerfolg von Adlm08 in einer Überlebensstudie analysiert.

4.2 Veränderung des inflammatorischen Tumormikromilieus durch die Adlm08 Therapie

Um therapieabhängige Veränderungen im inflammatorischen Tumormikromilieu zu untersuchen, wurde eine große Auswahl von Lymphozytenmarkern, Chemokinen und Cytokinen mittels Q-RT-PCR in Gewebsproben aus einem in vivo Experiment (CT26 BALB/c Tumormodell) untersucht. Diese Analyse erlaubt erste komplexe Einblicke in die therapiebedingte Veränderung des Mikromilieus.

Hierzu wurden 10^5 CT26 Zellen intrahepatisch in BALB/*c*-Mäuse implantiert. Nach 9 Tagen wurde in die implantierten Tumore eine Dosis von 1 x 10^8 infektiösen Viruspartikeln (ivp) AdIm08 oder AdGFP als Kontrolle injiziert. An vier verschiedenen Zeitpunkten (3, 5, 7, 10 Tage) nach Injektion wurde das zentrale Tumorgewebe (CT (Central Tumor)), und das peritumorale Gewebe (IM (Invasive Margin)) präpariert und daraus die gesamt RNA isoliert. Die Expressionsanalyse erfolgte mittels Q-RT-PCR. Der Versuchsaufbau ist zur Übersicht in **Abb. 6** dargestellt.



Abb. 5: Studienschema zur *in vivo* Charakterisierung der AdIm08-Therapie mittels Q-RT-PCR. |Methode: An Tag -9 implantierte CT26 Tumore (10⁵ CT26 Zellen) wurden an Tag 0 mit 1x10⁸ ivp AdGFP oder 1x10⁸ ivp AdIm08 behandelt. Die Gewebeentnahme erfolgte zur Q-RT-PCR Analyse nach 3, 5, 7 und 10 Tagen. (**Tag 3:** AdIm08 n=4; **Tag 5:** AdIm08 n=4, AdGFP n=5; **Tag 7:**AdIm08 n=6; **Tag 10:** AdIm08=5, AdGFP n=5)

Die analysierten Gene können in folgende Gruppen eingeteilt werden:

- Leukozyten:
 - Leukozytenmarker (CD45 genereller Leukozytenmarker, CD8 cytotoxische T-Zellen, CD4 T-Helfer-Zellen, FoxP3 T_{reg}s)
 - o Effektorproteine (Perforin, Granzyme B, NOS2)
 - TH₁ Chemokinrezeptoren (CCR-1 (CD191), CCR-5 (CD195), CXCR-3 (CD183)
- IFN-γ und IFN-γ abhängige TH₁ Faktoren
 - ο IFN-γ
 - IFN-γ induzierte Transkriptionsfaktoren (Eomes (Eomesodermin), Tbet (TBX21, T-box Transcription Factor), IRF-1 (Interferon Regulatory Factor 1))
 - o IFN-γ induzierte CXC-Chemokine
 - CXCL-9 (MIG, Monokine-induced by interferon gamma)
 - CXCL-10 (IP-10, Interferon gamma-induced protein 10).
 - CXCL-11 (I-TAC , Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant)
- TH₁ assoziierte Chemokine
 - o CCL-4 (MIP-1 β , Makrophage inflammatory protein-1 β)

- CCL-5 (RANTES, regulated upon activation normal T-cell expressed, and presumably secreted)
- Pro-inflammatorische Cytokine (TNF- α (tumor-necrosis factor α), IL-6))
- Anti-inflammatorische Cytokine (IL-10, IL-1Ra (IL-1 receptor antagonist))
- Proliferationsmarker Ki67

Die Ergebnisse der Q-RT-PCR Analyse wurden in **Abb. 6** als Heatmap dargestellt. Dies ermöglicht eine übersichtliche und leicht erfassbare Darstellung der Transkriptionslevel. Die **Abb. 7** hingegen stellt die Induktion der analysierten Gene in der Adlm08 Gruppe in Bezug zur Kontrollgruppe dar.

In der Heatmap (Abb. 6) wurden durch das agglomerative Clusterverfahren links die Behandlungsgruppen bzw. Gewebe mit dem durchschnittlich niedrigsten und rechts die mit dem durchschnittlich höchsten Transkriptionslevel angeordnet. Ähnliche Transkriptionsprofile wurden zu Clustern zusammengefasst. Da die Behandlungsgruppen und Lokalisationen der Proben ähnliche Transkriptionsprofile aufweisen, bilden sie jeweils gemeinsame Cluster.

In der AdGFP Gruppe konnte ein niedrigeres Transkriptionslevel der Entzündungsmarker als in der AdIm08 Gruppe der gleichen Lokalisation nachgewiesen werden. Dennoch fällt auf, dass bei der AdGFP Gruppe die inflammatorischen Gene im zentralen Tumor wesentlich höhere Transkriptionslevel aufweisen, als im peritumoralen Gewebe. Deshalb bilden die Proben des zentralen Tumors der AdGFP Gruppe ein gemeinsames Cluster mit den stärker entzündeten AdIm08 Behandlungsgruppen im Dendrogramm. Auch in der AdIm08 Gruppe ist eine stärkere Entzündungsaktivität im zentralen Tumor nachzuweisen.

Bei den auf der Ordinate angeordneten Genen bilden die IFN-γ abhängigen proinflammatorischen Gene das Cluster mit dem höchsten Transkriptionslevel (von CXCL-11 bis CXCL-9). Anti-inflammatorische Gene (FoxP3, IL-10, IL1Ra, IRF 1) befinden sich in den Clustern mit mittlerem bis niedrigem Transkriptionslevel.



Abb. 6: Adlm08 Behandlung bedingte Expressionssteigerung von TH1 assoziierten Transkriptionsfaktoren, Lymphozytenmarkern und Cytokinen im peritumoralen Lebergewebe und im zentralen Tumor.

Ergebnis: Das durchschnittliche Transkriptionslevel TH₁ abhängiger inflammatorischer Gene ist in den Geweben der AdIm08 behandelten Tiergruppe höher als in der AdGFP Kontrollgruppe. Innerhalb der Kontrollgruppe ist beim Vergleich von peritumoralem Gewebe mit zentralem Tumorgewebe in letzterem eine Entzündungsreaktion mit erhöhter Expression inflammatorischer Gene festzustellen. Die Adlm08 Behandlung induziert ein inflammatorisches Milieu, wobei die stärkste Induktion verglichen mit der Kontrollgruppe im peritumoralen Gewebe erreicht wird (vgl. Abb. 7). Klassische mit einer TH₁ Antwort assoziierte Cytokine wie IFN-y, CXCL-9, CXCL-10 und CXCL-11 werden hochreguliert. Die Zunahme der Lymphozytenmarker CD4, CD8, CD45 konnte nachgewiesen werden, bei gleich bleibender Expression des Treg Markers FoxP3. Die Transkription von Effektorproteinen wie Perforin und iNOS ist ebenfalls erhöht. Die Rezeptoren CCR1, CCR5 und CXCR3, die die Leukozytenmigration in inflammatorisches Gewebe bedingen, werden durch eine Adlm08 Behandlung vermehrt transkribiert. |Methode: Die an Tag -9 implantierten CT26 Tumore wurden an Tag 0 mit 1x10⁸ ivp AdGFP oder 1x10⁸ ivp AdIm08 behandelt. Die Gewebeentnahme erfolgte nach 3, 5, 7 und 10 Tagen. Die RNA-Expressionslevel unterschiedlicher Gene wurden mittels Q-RT-PCR bestimmt. |Auswertung: Expressionslevel wurden mit der ΔCT –Methode ausgewertet (Housekeeping Gen: gapdh; Dargestelltes Expressionslevel = In(Effizienz - (CT Gen - CT GAPDH)*100). Die Heatmap wurde mit R 2.14.0win, heatmap.2() errechnet. Die Reihenfolge der Gene und der Behandlungsgruppen bzw. Gewebe wurde durch Berechnung mittels eines agglomerativen hierarchischen Clusterverfahrens festgelegt.

In Abb. 7 sind die Induktionen der inflammatorischen Gene durch die AdIm08 Behandlung im Vergleich zur AdGFP Kontrollgruppe dargestellt. Die Rohdaten der Q-RT-PCR Analyse wurden mit der ΔCT- Methode ausgewertet und die Induktionen zwischen den AdIm08 Gruppen und den vergleichbaren AdGFP Kontrollgruppen berechnet. Da die Darstellung der Induktion der Gene hierbei relativ erfolgt, wurden die stärksten Induktionen im peritumoralen Gewebe gemessen. Dies lässt sich mit dem niedrigen Transkriptionslevel der AdGFP Kontrollgruppe im peritumoralen Gewebe erklären.



51

Abb. 7: Adim08 Behandlung bedingt Induktion von TH₁ assoziierten Transkriptionsfaktoren, Lymphozytenmarkern und Cytokinen im peritumoralen Lebergewebe und im zentralen Tumor. |Ergebnis: Die Behandlung führt sowohl zu einer Anhebung von IFN- γ , TH₁ Chemokinen und inflammatorischen Cytokinen als auch zur Induktion des "Anticytokins" IL-10. Die Induktion der meisten inflammatorischen Gene ist im peritumoralen Gewebe stärker als im Tumor, da diese im Tumor bereits in der Kontrollgruppe auf einem höheren Niveau exprimiert werden (vgl. Abb. 7). Die Expression von Ki67 als Zellteilungsmarker ist im Tumor im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt. |**Methode**: Die an Tag -9 implantierten CT26 Tumore wurden an Tag 0 mit $1x10^8$ ivp AdGFP oder $1x10^8$ ivp AdIm08 behandelt. Die Gewebeentnahme erfolgte nach 3, 5, 7 und 10 Tagen. Die Expression unterschiedlicher Gene wurden mittels Q-RT-PCR bestimmt. |**Auswertung:** Die Induktion wurde nach Normalisierung auf die *gapdh* Expression (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) mittels der Δ CT –Methode im Verhältnis für die Tage 5 und 10 ausgewertet.

4.2.1 Leukozytenmarker

Durch die Behandlung mit AdIm08 soll das tumorprogressive Milieu durchbrochen werden und die Immigration von tumordestruktiven Zellen gefördert werden. Die Leukozytenmarker CD45 (allgemeiner Leukozytenmarker), CD4 (T-Helfer Lymphozyten) und CD8 (cytotoxische T-Lymphozyten) werden durch die AdIm08 Behandlung sowohl in der peritumoralen Leber als auch im zentralen Tumor mittel bis stark induziert. Im Tumor wird eine um die 10-20 fache im angrenzenden Lebergewebe eine um die 5-20 fache Induktion der Leukozytenmarker gemessen. Das Transkriptionslevel von CD45 ist am höchsten, gefolgt von dem von CD8. CD4 hat ein niedriges Transkriptionsniveau.

Der T_{reg} Transkriptionsfaktor FoxP3 wird durch die Therapie mit AdIm08 nur geringfügig induziert und befindet sich auf einem sehr niedrigen Transkriptionsniveau. Perforin und Granzyme B, die Effektorproteine einer cytotoxischen Zellantwort, werden im peritumoralen Gewebe stärker induziert als im zentralen Tumor. Im Tumor ist bei hohem Transkriptionslevel keine Induktion von Granzyme B festzustellen. Perforin ist im zentralen Tumor nur am Tag 5 induziert. iNOS weist die höchsten Induktionsraten (bis 250fach) der untersuchten Effektorproteine auf, obwohl das Transkriptionslevel nach AdIm08 Behandlung nur auf dem Niveau von Perforin und Granzyme B liegt. Eine Erklärung hierfür ist ein sehr geringes Expressionslevel von iNOS in der AdGFP Behandlungsgruppe.

In der AdIm08 Behandlungsgruppe beträgt die Induktion der Chemokinrezeptoren CCR1, CCR5 und CXCR3, die von aktivierten Leukozyten exprimiert werden, das 2-10 fache verglichen mit der AdGFP Gruppe. Im zentralen Tumorgewebe ist CCR1 nicht induziert, da schon das Gewebe der Kontrollgruppe ein erhöhtes Expressionslevel

52

aufweist.

CCR5, der Rezeptor für die ebenfalls untersuchten Liganden CCL5 und CCL4, weist das höchste Transkriptionslevel auf.

4.2.2 IFN-γ, IFN-γ abhängige Chemokine und Transkriptionsfaktoren

Das zentrale Cytokin einer TH₁ gewichteten Immunantwort ist IFN-γ. Durch die AdIm08 Behandlung kommt es zu einer starken Induktion von IFN-γ. Die höchste Transkriptionsrate wird fünf Tage nach Behandlung erreicht. Zu diesem Zeitpunkt konnte eine Induktion um das 50-fache in der peritumoralen Leber und um das 25-fache im Tumor gemessen werden. Die Transkriptionslevel sind in der mit AdIm08 behandelten Gruppe generell höher als in der AdGFP Kontrollgruppe.

IFN-γ und IL12 abhängige Transkriptionsfaktoren wie EOMES und T-bet werden ebenfalls induziert, jedoch auf einem niedrigeren Transkriptionslevel als IFN-γ. IRF1 ist ein IFN-γ abhängiger pleiotroper Transkriptionsfaktor. Er reguliert unter anderem die Expression von iNOS, IL12p35 und IL12p40 und spielt eine Rolle in der NK-, CD8- und TH₁-Zelldifferenzierung. Das IRF1 Transkriptionslevel ist sehr niedrig. Eine minimale Induktion ist im zentralen Tumor nachweisbar, während im umliegenden Lebergewebe eine negative Induktion festzustellen ist.

Die durch IFN-γ induzierten Chemokine CXCL-9, CXCL-10 und CXCL-11 werden im peritumoralen Gewebe um das 5- bis 30-fache induziert. Im Tumor konnten Induktionsraten vom 4- bis 30-fachen gemessen werden. Die größten Induktionen wurden für beide Gewebe nach dem IFN-γ Peak an Tag 10 gemessen. Die IFN-γ abhängigen Chemokine gehören zu den untersuchten Genen mit den höchsten Transkriptionslevel. CXCL-9 wird teilweise sogar stärker als das Housekeeping Gen *gapdh* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) transkribiert.

4.2.3 TH₁ assoziierte Chemokine

Die TH₁ assoziierten Gene CCL-4 und CCL-5 werden vermehrt durch Behandlung mit AdIm08 induziert, CCl-4 um das 2- bis 5-fache und CCL-5 um das bis zu 20-fache. Das Transkriptionslevel beider Gene wird durch die Behandlung auf ein hohes Niveau angehoben und erreicht an Tag 10 sowohl in der peritumoralen Leber als auch im zentralen Tumor das höchste Transkriptionsniveau.

4.2.4 Proinflammatorische Gene

Das Pyrogen TNF- α ist als Akutphase-Protein an der Entstehung einer Entzündungsreaktion beteiligt. In der AdIm08 behandelten Gruppe konnte im zentralen Tumor eine Induktion um das 8-fache und im peritumoralen Lebergewebe eine Induktion um das 20-fache gemessen werden. Das Transkriptionslevel lag in den AdIm08 behandelten Tieren auf hohem Niveau.

Für das Interleukin der Akutphase IL-6 wurde eine Deduktion am Tag 5 nach Behandlung im zentralen Tumor nachgewiesen. 10 Tage nach Behandlung wurde kein Unterschied zwischen Behandlungsgruppe und Kontrollgruppe gemessen. Im peritumoralen Gewebe wurde eine leichte Induktion um das 5-fache detektiert. Das höchste Transkriptionsniveau wurde im zentralen Tumor der AdGFP behandelten Kontrollgruppe sowohl an Tag 5 als auch an Tag 10 erreicht.

4.2.5 Antiinflammatorische Gene

IL-10 wird von Lymphozyten und Monozyten sezerniert und hat einen pleiotropen Effekt bei der Immunregulation. Es reguliert z.B. die Expression von TH₁-Cytokinen, MHC II und zellulären Costimulatoren herunter und führt gleichzeitig zur verstärkten Proliferation der B-Zellen, fördert das Überleben von B-Zellen und deren Antikörperproduktion. Dieses, die TH₁ Antwort begrenzende Cytokin, wird im untersuchten Modell durch die AdIm08 Therapie induziert (zentraler Tumor: 7- bis 8fach, peritumorales Gewebe: 10- bis 13-fach) und auf mittlerem Level transkribiert.

IL1Ra (IL1 receptor antagonist) wird von unterschiedlichen Zellen sezerniert und ist der natürliche Inhibitor der proinflammatorisch wirkenden Interleukine IL1α und IL1β. IL1Ra wird durch die AdIm08 Therapie induziert (zentraler Tumor: 3-fach, peritumorales Gewebe: 4-fach). Wobei das niedrige Transkriptionslevel in der Leber der AdGFP Behandlungsgruppe durch die AdIm08 Behandlung auf ein mittleres Niveau, entsprechend dem des zentralen Tumors, angehoben wird.

4.2.6 Proliferationsmarker Ki67

Ki67 ist für die Zellproliferation notwendig und wird deshalb als Marker für die Zellteilung verwendet. Die höchsten Ki67 Transkriptionsraten konnten im zentralen

Tumor der AdGFP Kontrollgruppe nachgewiesen werden, gefolgt vom zentralen Tumor der AdIm08 Gruppe. Ki67 weist im zentralen Tumor eine Deduktion um die Hälfte auf und im peritumoralen Gewebe eine 10-fache Induktion auf.

4.3 Splenozytenexpansion während der Behandlung mit AdGFP und AdIm08

Bei systemisch verlaufenden Entzündungen kann eine Splenomegalie auftreten. Bei der Präparation der Gewebeproben für die Q-RT-PCR fiel eine Vergrößerung der Milzen von AdIm08 behandelten Tieren am Tag 10 nach Behandlung auf. Das Gewicht der Milzen wurde bei Gewebepräparation bestimmt und als Mittelwert der beiden Behandlungsgruppen mit Standardabweichung im Balkendiagramm **Abb. 8** dargestellt. Das durchschnittliche Milzgewicht der AdIm08 Behandlungsgruppe ist mit 0,4 g signifikant (p= 0,0001) gegenüber dem der AdGFP Kontrollgruppe (0,1 g) erhöht (Mann-Whitney-test).



Abb. 8: Durchschnittliche Milzgewichte sind in der Adlm08 Behandlungsgruppe gegenüber der AdGFP Kontrollgruppe signifikant erhöht.

Ergebnis: Das durchschnittliche Milzgewicht der mit Adlm08 behandelten Gruppe (0,44 g) ist im Vergleich zu dem der AdGFP Kontrollgruppe (0,14 g) signifikant erhöht (p= 0,0001). |**Methode**: Die an Tag -9 implantierten CT26 Tumore wurden an Tag 0 mit 1×10^8 ivp AdGFP (n=5) oder 1×10^8 ivp Adlm08 (n=5) behandelt. Die Milzgewichte wurden 10 Tage nach Behandlung ermittelt. |**Statistik:** Graph Pad 5.01: Mittelwert, Stabw; Mann Whitney test.

Um das beobachtete Phänomen der Splenomegalie innerhalb der AdIm08 Behandlungsgruppe zu klären, wurde die Gesamtsplenozytenanzahl und die Verteilung der Subpopulationen quantitativ bestimmt. In Abb. 9 ist die mittlere Zunahme der Gesamtsplenozyten in Millionen Zellen pro Milz 9 Tage bzw. 24 Tage nach Behandlung mit AdIm08 oder AdGFP dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. 9 Tage nach Behandlung konnte eine signifikant höhere mittlere Gesamtsplenozytenanzahl von 160 Mio. Zellen/Milz in der AdIm08 Gruppe (n=5) im Vergleich zu 91 Mio. Zellen/Milz in der AdGFP Kontrollgruppe (n=3) nachgewiesen werden (p= 0,0333, Mann-Whitney-test). 24 Tage nach Behandlung ist die Gesamtsplenozytenanzahl AdIm08 behandelter Tiere (n=6) mit 130 Mio. Zellen/Milz wesentlich kleiner als in der AdGFP Kontrollgruppe (n=5) mit 214 Mio. Zellen/Milz (p=0,0303). Während die Gesamtsplenozytenanzahl in der AdGFP Kontrollgruppe im Beobachtungszeitraum zunimmt, ist in der AdIm08 Behandlungsgruppe eine Abnahme von Tag 9 auf Tag 24 festzustellen.





|Ergebnis: 9 Tage nach Behandlung ist die durchschnittliche Anzahl der Splenozyten in der mit Adlm08 behandelten Gruppe (160 Mio. Zellen) im Vergleich zur AdGFP Kontrollgruppe (91 Mio. Zellen) signifikant erhöht (p= 0,0333). Am 24. Tag nach Behandlung ist die Anzahl der Splenozyten in AdGFP behandelten Mäusen (213 Mio. Zellen) im Vergleich zu AdIm08 behandelten Mäusen (130 Mio. Zellen) erhöht (p= 0,0303). |**Methode**: Die an Tag -9 implantierten CT26 Tumore wurden an Tag 0 mit 1x10⁸ ivp AdGFP oder 1x10⁸ ivp AdIm08 behandelt. Die Anzahl der Splenozyten wurde nach Präparation der Milz durch Zählung in einer Neubauer-Zählkammer bzw. mittels Flowcounts im Durchflusszytometer bestimmt. |**Statistik:** Graph Pad 5.01: Mittelwert, Stabw; Mann Whitney test.

Um die Zunahme der Splenozyten genauer charakterisieren zu können, wurden die absoluten Zellzahlen einzelner Subpopulationen bestimmt. Die absolute Zellzahl konnte durch Multiplikation der Gesamtsplenozytenanzahl mit den mittels Durchflusszytometrie bestimmten relativen Anteilen der Subpopulationen errechnet werden. Da in diesem Tumormodell den als CD11b⁺Gr1^{high+} und CD11b⁺Gr1^{low+} charakterisierten MDSCs eine besondere Bedeutung zukommt, wurde die Gatingstrategie zum besseren Verständnis in **Abb. 10** exemplarisch dargestellt.



Abb. 10: Charakterisierung der CD11b⁺Gr⁺ MDSC im Durchflusszytometer. Im FS/SS wurde das Gate für Leukozyten gesetzt. Die Leukozyten wurden dann im CD11b/Gr1 Dotplot dargestellt und der prozentuale Anteil der CD11b⁺Gr1^{low+} und CD11b⁺Gr1^{high+} MDSCs an den Leukozyten bestimmt.

In **Abb 11 A** sind die Ergebnisse der 9 Tage nach Behandlung untersuchten Milzen dargestellt. Zu diesem Zeitpunkt nahm die Population der CD11b⁺Gr1^{high+} Zellen mit 55 Mio. Zellen/Milz den größten Anteil an den Gesamtsplenozyten ein. Diese Population war in der AdIm08 Behandlungsgruppe ungefähr doppelt so groß wie in der Kontrollgruppe. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Die Population der CD11b⁺Gr1^{low+} Zellen betrug im Mittel 1 Mio. Zellen/Milz, durchschnittlich konnten 13 Mio. CD8⁺ Zellen, 22 Mio. CD4⁺ Zellen und 9 Mio. CD49b⁺ Zellen/Milz nachgewiesen werden. Diese Populationen unterschieden sich in der Anzahl nicht wesentlich zwischen den beiden Gruppen.

24 Tage nach Behandlung mit AdIm08 oder AdGFP (**Abb 11 B**) war bezüglich der CD8⁺ -Zellen (10 Mio. Zellen/Milz), CD4⁺ Zellen (31 Mio. Zellen/Milz) und CD49b⁺ Zellen (7 Mio. Zellen/Milz) kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen nachzuweisen. In AdGFP behandelten Tieren konnten zu diesem Zeitpunkt vergrößerte Populationen der CD11b⁺Gr1^{high+} (63 Mio. Zellen/Milz) und der CD11b⁺Gr1^{low+} (15 Mio. Zellen/Milz) Splenozyten nachgewiesen werden.



Abb. 11: Zunahme der MDSC Populationen in der Kontrollgruppe bei gleichzeitiger Abnahme in der Adlm08 Behandlungsgruppe zwischen Tag 9 (A) und Tag 24 (B) nach Behandlung.

|**Ergebnis:** 9 Tage nach Behandlung bilden die CD11b⁺Gr1^{high+} Zellen die größte Splenozytenpopulation. Zu diesem Zeitpunkt unterscheiden sich die absoluten Zellzahlen der einzelnen untersuchten Zellpopulationen nicht signifikant zwischen den Behandlungsgruppen. 24 Tage nach Behandlung unterscheiden sich die Behandlungsgruppen signifikant bezüglich der CD11b⁺Gr1^{high+} (p= 0,0303) und CD11b⁺Gr1^{low+} Populationen (p= 0,0303). Zu diesem Zeitpunkt bildet die CD11b⁺Gr1^{high+} Population in AdGFP behandelten Tieren mit Abstand die größte Zellpopulation (Mittelwert 63,4 Mio. Zellen/Milz). Bezüglich der CD4⁺, CD8⁺ und CD49b⁺ Populationen besteht kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen. |**Methode**: Die an Tag -9 implantierten CT26 Tumore wurden an Tag 0 mit 1x10⁸ ivp AdGFP oder 1x10⁸ ivp AdIm08 behandelt und die Milzen an Tag 9 bzw. Tag 24 mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die absolute Zellzahl wurde durch Multiplikation der Gesamtsplenozytenanzahl mit den relativen Anteilen der Subpopulationen errechnet. |**Statistik:** Graph Pad 5.01: Mittelwert, Stabw; Mann Whitney test.

Um zu ermitteln welche Subpopulation mit der Anzahl der Gesamtsplenozyten korreliert, wurde die Zellanzahl der Subpopulationen (Abszisse) gegen die Gesamtsplenozytenanzahl (Ordinate) aufgetragen und unter Annahme der Gaußschen Normalverteilung nach Pearson korreliert (Abb. 12 und Abb. 13).

Eine positive Korrelation mit der Gesamtsplenozytenanzahl konnte an Tag 9 nach Behandlung für CD49b⁺ (r= 0.9595, p= <0.0001), CD11b⁺Gr-1^{low+} (r= 0.8699, p= 0.0023) und CD11b⁺Gr-1^{high+} Zellen (r= 0.9667, p=0,0002) nachgewiesen werden. Die Anzahl der CD8⁺ Zellen (r= 0.5304, p= 0.1418) und der CD4⁺ Zellen (r= -0.2789, p= 0.4673) korrelierte jedoch nicht mit der Gesamtsplenozytenanzahl.

Die größte Expansion konnte der CD11b⁺Gr-1^{high+} Zellpopulation zugewiesen werden. Diese Population betrug bei naiven Tieren 4 Mio. Zellen/Milz und stieg auf bis zu 100 Mio. Zellen/Milz in einem AdIm08 behandelten Tier an. Auch die Populationen der CD49b⁺ NK-Zellen und CD11b⁺Gr-1^{low+} Zellen expandierten um ca. das 5 fache von 3 Mio. Zellen/Milz auf 15 Mio. Zellen/Milz bzw. von 0,4 Mio. Zellen/Milz auf 3 Mio. Zellen/Milz (Abb. 12).

Eine positive Korrelation zwischen der Gesamtsplenozytenanzahl und der $CD11b^+Gr-1^{high+}$ Population (r= 0.9545, p=<0,0001) und der $CD11b^+Gr-1^{low+}$ Population (r= 0.9064, p= 0.0001) konnte 24 Tage nach Behandlung nachgewiesen werden. Keine Korrelation konnte für $CD8^+$ Zellen (r= 0.3063 p= ns), $CD4^+$ Zellen (r= 0.2113, p= ns) und $CD49b^+$ Zellen (r= 0.2301, p= ns) gefunden werden. Den größten Anteil an der beobachteten Splenozytenexpansion konnte wie schon an Tag 9 der $CD11b^+Gr-1^{high+}$ Zellpopulation zugeordnet werden. 24 Tage nach Behandlung beträgt ihre Anzahl bis zu 130 Mio. Zellen/Milz in AdGFP behandelten Tieren (Abb.13).

Tag 9



Abb. 12: Die Splenozytenanzahl korreliert 9 Tage nach Behandlung mit der Anzahl CD49b⁺, CD11b⁺Gr-1^{low+} und CD11b⁺Gr-1^{high+} Zellen.

|**Ergebnis:** Eine Korrelation mit der Gesamtsplenozytenanzahl konnte bei CD49b⁺ (r= 0.9595, p= <0.0001), CD11b⁺Gr-1^{low+} (r= 0.8699, p= 0.0023) und CD11b⁺Gr-1^{high+} Zellen (r= 0.9667, p=0,0002) nachgewiesen werden. Die CD8⁺ (r= 0.5304, p= 0.1418) und CD4⁺ Zellen (r= -0.2789, p= 0.4673) korrelierten nicht. Der größte Anteil an der Splenozytenexpansion konnte der CD11b⁺Gr-1^{high+} Zellpopulation zugeschrieben werden, da diese Population bei naiven Tieren nur 4 Mio. Zellen/Milz beträgt und auf bis zu 100 Mio. Zellen/Milz in einem AdIm08 behandelten Tier anstieg. |**Methode**: Die an Tag -9 implantierten CT26 Tumore wurden an Tag 0 mit 1x10⁸ ivp AdGFP (n=3) oder 1x10⁸ ivp AdIm08 (n=5) behandelt und die Milzen am Tag 9 mittels Durchflusszytomtrie analysiert. |**Statistik:** Graph Pad 5.01: Korrelation nach Pearson.

Tag 24



Abb. 13: Die Splenozytenanzahl korreliert 24 Tage nach Behandlung mit der Anzahl CD11b⁺Gr-1^{low+} und CD11b⁺Gr-1^{high+} Zellen.

|**Ergebnis:** Eine Korrelation mit der Gesamtsplenozytenanzahl konnte bei CD11b⁺Gr-1^{high+} Zellen (r= 0.9545, p=<0,0001) und CD11b⁺Gr-1^{low} Zellen (r= 0.9064, p= 0.0001) nachgewiesen werden. Die CD8⁺ (r= 0.3063 p= ns), CD4⁺ (r= 0.2113, p= ns) und CD49b⁺ Zellen (r= 0.2301, p= ns), korrelierten nicht. Den größten Anteil an der beobachteten Splenozytenexpansion konnte 24 Tage nach Behandlung der CD11b⁺Gr-1^{high+} Zellpopulation zugeschrieben werden, da diese Population nur ca. 5 Mio. Zellen/Milz in einigen Tieren beträgt und auf bis zu 130 Mio. Splenozyten in einem AdGFP behandelten Tier ansteigt. 24 Tage nach Behandlung weisen AdGFP behandelte Tiere die größten Populationen von CD11b⁺Gr^{low+} und CD11b⁺Gr^{high+} Zellen auf. |**Methode**: Die an Tag -9 implantierten CT26 Tumore wurden an Tag 0 mit 1x10⁸ ivp AdGFP (n=5) oder 1x10⁸ ivp AdIm08 (n=5) behandelt und die Milzen an Tag 24 mittels Durchflusszytomtrie analysiert. |**Statistik:** Graph Pad 5.01: Korrelation nach Pearson.



Abb. 14: Abnahme der CD11b⁺Gr1^{high+} MDSC Population bei der Adlm08 Behandlungsgruppe zwischen Tag 9 und Tag 24 auf das Niveau gesunder Tiere, die CD11b⁺Gr1^{low+} Population verringert sich erst nach Tag 24.

| **Ergebnis:** Bei AdIm08 behandelten Tieren ist der prozentuale Anteil der CD11b⁺Gr1^{high+} Splenozyten an Tag 9 am höchsten, verringert sich zum Tag 24 bzw. im weiteren Verlauf (Tag 207) signifikant (p= 0.0043) auf das Niveau gesunder Tiere. Bei AdGFP behandelten Mäusen wurde an Tag 9 und Tag 24 ein erhöhter Anteil der CD11b⁺Gr1^{high+} Splenozyten gegenüber gesunden Tieren nachgewiesen, der an Tag 24 signifikant (p= 0.0303) gegenüber der AdIm08 Gruppe erhöht ist. Der prozentuale Anteil der CD11b⁺Gr1^{low+} Splenozyten ist an Tag 24 in der AdGFP Behandlungsgruppe statistisch signifikant gegenüber der AdIm08 Behandlungsgruppe erhöht (p= 0.0357). |**Methode**: Die an Tag -9 implantierten CT26 Tumore wurden an Tag 0 mit 1x10⁸ ivp AdGFP oder 1x10⁸ ivp AdIm08 behandelt und die Milzen am Tag 9 bzw. Tag 24 mittels Durchflusszytomtrie analysiert. Die an Tag 207 untersuchten Milzen stammen aus einer Überlebensstudie. Zu diesem Zeitpunkt waren keine Kontrolltiere mehr am Leben. |**Statistik:** Graph Pad 5.01: Mittelwert, Stabw; Mann Whitney test.

In **Abb. 14** ist der Anteil CD11b⁺Gr1^{high+} und CD11b⁺Gr1^{low+} MDSC an den Gesamtsplenozyten 9, 24 und 207 Tage nach Behandlung mit AdGFP und AdIm08 dargestellt. An Tag 207 wurden die Milzen AdIm08 behandelter Mäuse einer Überlebensstudie untersucht.

Bei Adlm08 behandelten Tieren ist der prozentuale Anteil der CD11b⁺Gr1^{high+} Splenozyten an Tag 9 am höchsten und liegt 24 Tage (p= 0,0043) bzw. 207 Tage nach Behandlung im Bereich gesunder Tiere. Bei AdGFP behandelten Mäusen konnte an Tag 9 und Tag 24 ein gegenüber gesunden Tieren erhöhter Anteil der CD11b⁺Gr1^{high+} Splenozyten nachgewiesen werden, der an Tag 24 signifikant (p= 0,0303) gegenüber der AdIm08 Gruppe erhöht ist. Der prozentuale Anteil der CD11b⁺Gr1^{low+} Splenozyten ist an Tag 24 in der AdGFP Behandlungsgruppe signifikant gegenüber der AdIm08 Behandlungsgruppe erhöht (p= 0,0357).

4.4 Nachweis tumorspezifischer CD8⁺ Lymphozyten nach *ex vivo* Restimulation.

Die Adlm08 Therapie soll eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort initiieren und unterstützen. CT26 Tumore exprimieren Tumorantigene (z.B. gp70) gegen die eine tumorzellspezifische Immunantwort ausgelöst werden kann. Zum Nachweis dieser tumorzellspezifischen Immunantwort wurde ein CT26 Restimulations-Assay mit Splenozyten von tumortragenden Mäusen 9 Tage nach Behandlung durchgeführt (vgl. Versuchsübersicht Abb. 15).



Abb. 15: Studienschema zur *ex vivo* Charakterisierung der therapiebedingten Immunantwort mittels Durchflusszytometrie und Restimulations Assay.

|**Methode**: Die an Tag -9 implantierten CT26 Tumore wurden an Tag 0 mit 1x10⁸ ivp AdGFP (n=3) oder 1x10⁸ ivp AdIm08 (n=5) behandelt. Die an Tag 9 isolierten Splenozyten wurden direkt mittels Durchflusszytomtrie analysiert und oder einen Tag in einem Kokulturassay restimuliert.

CT26 Tumore wurden am Tag -9 implantiert und an Tag 0 mit 1x10⁸ ivp AdIm08 (n=5) oder 1x10⁸ ivp AdGFP (n=3) therapiert. Die Splenozyten wurden 9 Tage nach Behandlung isoliert und 24 h *in vitro* mit Medium oder CT26 Zellen kultiviert. IFN-γ wurde sowohl intrazellulär mittels Durchflusszytometrie als auch im Überstand mittels ELISA quantifiziert. Als weiterer Aktivierungsmarker wurde durchflusszytometrisch das Expressionsverhältnis des Oberflächenmarkers CD62L^{low}/CD62L^{gesamt} bestimmt. Abb. 16 stellt die Auswertung der IFN-γ und CD62L Messung dar.



Abb. 16: Gating-Strategie zur Bestimmung des Aktivierungsmarkers CD62L und des intrazellulären IFN-γ.

Zunächst wurde ein Gate für die Lymphozyten im FSC/SSC Diagramm gesetzt um im nächsten Schritt die gefärbten Subpopulationen der CD4⁺-, CD8⁺- und CD49b⁺-Lymphozyten zu erfassen. Zur Bestimmung der IFN- γ^{high+} Lymphozyten wurde das in den Histogrammen dargestellte M2 Gate ausgewertet. Zur Bestimmung des prozentualen Anteils der CD62L^{low} Population wurden die Gates M2 / (M1 + M2) ausgewertet.

In **Abb. 17** ist in der linken Spalte das Ergebnis der intrazellulären IFN- γ Färbung dargestellt. IFN- γ wird bei einer TH₁ Immunantwort exprimiert und gilt als Aktivierungsmarker für Lymphozyten.

Eine tumorzellspezifische Stimulation konnte nur bei den $CD8^+$ T-Zellen nachgewiesen werden die 24h mit CT26 Zellen restimuliert wurden. Der prozentuale Anteil IFN- $\gamma^{high+}/CD8^+$ T- Zellen ist bei AdIm08 behandelten Tieren sowohl im Vergleich zur Kultivierung in Medium (p=0,0119) als auch im Vergleich zur AdGFP Kontrolle (p=0,0357) signifikant auf 0,6% der CD8⁺ Zellen erhöht. CD4⁺ und CD49b⁺ Zellen wiesen

keinen Unterschied in der IFN-γ Expression in Abhängigkeit von der Restimulation auf. (linke Spalte Abb. 18)





| Ergebnis: Nach Restimulation mit CT26 Zellen konnte ein erhöhter Anteil IFN-γ^{high+}CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. (AdIm08 [-CT26] / AdIm08 [+CT26] p= 0,0110; AdIm08 [+CT26] / AdGFP [+CT26] p= 0,0357). Der prozentuale Anteil der CD62L^{low} Subpopulationen war kulturunabhängig. AdIm08 behandelte Tiere wiesen eine größere CD62^{low} Population bei CD4⁺ (p=0,0357) und CD8⁺ Zellen (p=0,0357) auf. Bei AdGFP Kontrolltieren wurde eine größere CD62L^{low}CD49b⁺ Population (p=0,0357) nachgewiesen. |**Methode**: Die an Tag -9 implantierten CT26 Tumore wurden an Tag 0 mit 1x10⁸ ivp AdGFP (n=3) oder 1x10⁸ ivp AdIm08 (n=5) behandelt. Die Milzentnahme erfolgte 9 Tage nach Behandlung. Die Splenozyten wurden für einen Tag in Medium (-CT26) oder mit CT26-Zellen (+CT26) restimuliert, gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. |**Auswertung:** Gating-Strategie siehe Abb. 15. |**Statistik**: Graph Pad 5.01: Mittelwert, Stabw; Mann Whitney test.

CD62L (L-Selectin) ist ein Oberflächenadhäsionsmolekül welches beispielsweise von Central Memory T-Zellen und naiven T-Zellen exprimiert wird und die Immigration in sekundäre lymphatische Organe ermöglicht (Homingreceptor für Lymphknoten). Die Expression von CD62L nimmt bei der Expansion von Memory Effector T-Zellen ab, die durch einen CD127^{high}/CCR7/CD62L^{low} Phänotyp gekennzeichnet sind. Diese Zellen immigrieren dann in entzündete Gewebe. Eine CD62L^{low} Expression kann als allgemeiner Aktivierungsmarker für CD8⁺ und CD4⁺ Zellen verwendet werden (Schlub et al. 2010).

Bezüglich der CD62L^{low} Subpopulationen waren keine signifikanten Unterschiede durch Restimulation (+CT26) / (-CT26) festzustellen.

Bei Tieren der Kontrollgruppe konnte im Vergleich zur AdIm08 Behandlungsgruppe ein erhöhter Anteil CD62L^{low}CD49b⁺ NK-Zellen nachgewiesen werden, wobei das Signifikanzniveau nur nach Restimulation mit CT26 Zellen erreicht wurde (p=0,0357). Innerhalb der AdIm08 Behandlungsgruppe konnte ein größerer Anteil der CD62L^{low} CD4⁺ und CD62L^{low}CD8⁺ Zellen im Vergleich zur AdGFP Kontrollgruppe nachgewiesen werden (p=0,0357). Das Signifikanzniveau wurde bei der CD62L^{low}CD4⁺ Population ohne Restimulation (-CT26) und bei der CD62L^{low}CD8⁺ Population mit Restimulation (+CT26) erreicht.

Bei den untersuchten Behandlungsgruppen fällt auf, dass der Anteil der CD62L^{low}CD49b⁺ und CD62L^{low}CD8⁺ Zellpopulationen geringer war, als bei einer naiven Maus. (**rechte Spalte Abb. 17**)

Um das Ergebnis der intrazellulären IFN-γ^{high+} Bestimmung zu verifizieren, wurde ein ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) zum Nachweis von IFN-γ in den Kulturüberständen desselben Experiments durchgeführt. Es konnte ein signifikanter IFN-γ Anstieg in den Kulturmedien AdIm08 behandelter Tiere bei Restimulation mit CT26 Zellen nachgewiesen werden (**Abb. 18**). Signifikant ist sowohl der Unterschied zwischen den Kulturbedingungen (+/- CT26) (p=0,0212) als auch zwischen der AdIm08 Behandlungsgruppe (+CT26) und der AdGFP Kontrollgruppe (+CT26) (p=0,0357).

Dieses Ergebnis bekräftigt zusammen mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie die tumorspezifische Aktivität von restimulierbaren CD8⁺ T-Zellen in der AdIm08 Behandlungsgruppe.

66



Abb. 18: Restimulation mit CT26 Zellen steigerte die IFN-γ Sekretion von Splenozyten bei AdIm08 behandelten Tieren signifikant.

|Ergebnis: Eintägige Restimulation von Splenozyten AdIm08 behandelter Mäuse mit CT26 Zellen bedingte einen IFN-γ Anstieg im Medium auf 45 pg/ml. Ein signifikanter Unterschied bestand zwischen den Kulturbedingungen (AdIm08 (-/+ CT26); p=0,0212) und der Behandlungsgruppe (AdIm08 (+ CT26); AdGFP (+ CT26); p=0,0357). |**Methode**: Die an Tag -9 implantierten CT26 Tumore wurden an Tag 0 mit 1x10⁸ ivp AdGFP (n=3) oder 1x10⁸ ivp AdIm08 (n=5) behandelt. Die Milzentnahme erfolgte 9 Tage nach Behandlung. 10⁶ isolierte Splenozyten wurden für einen Tag in Medium (- CT26) kultiviert oder mit CT26-Zellen restimuliert (+ CT26). Die Konzentration des sezernierten IFN-γ wurde in den Kulturüberständen mittels ELISA bestimmt. |**Auswertung:** Magellan|**Statistik:** Graph Pad 5.01: Mittelwert, Stabw; Mann Whitney test.

4.5 Keine IL-2 bedingte Expansion von T_{reg} Zellen durch AdIm08 Behandlung nachweisbar.

Nachweislich kann die Gabe von IL-2 in hohen Konzentrationen zu einer Expansion von immunregulatorisch wirkenden T_{reg}-Zellen führen (Sakaguchi 2005). Um eine therapiebedingte Zu- oder Abnahme immunsuppressiver T_{reg}-Zellen zu erfassen, wurde der prozentuale Anteil der CD25⁺FoxP3⁺ Zellen an den CD4⁺ Lymphozyten in der Milz bestimmt.

Neun Tage nach Behandlung war der prozentuale Anteil CD25⁺FoxP3⁺ T_{reg}-Zellen an den CD4⁺ Lymphozyten in der AdGFP Kontrollgruppe mit 11% signifikant höher als in der AdIm08 Behandlungsgruppe mit 8% (p=0,0357). Es kommt somit zumindest am Untersuchten Zeitpunkt nicht zu einer Therapie bedingten Expansion von T_{reg} Zellen (**Abb. 19**).

Bezüglich der CD25⁺FoxP3⁻ aktivierten Subpopulation der CD4⁺ Lymphozyten ist kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und Behandlungsgruppe festzustellen (Abb. 19).



Abb. 19: Signifikant geringerer Anteil an CD25+FoxP3+ T_{reg}-Zellen in der Adlm08 Behandlungsgruppe 9 Tage nach Behandlung.

|Ergebnis: Neun Tage nach Behandlung war der prozentuale Anteil CD25⁺FoxP3⁺ T_{reg}⁻Zellen an den CD4⁺ Lymphozyten in der AdGFP Kontrollgruppe mit 11% signifikant höher, als in der AdIm08 Behandlungsgruppe mit 8% (p=0,0357). Für die CD25⁺FoxP3⁻ Subpopulation der CD4⁺ Lymphozyten konnte kein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. **|Methode**: Die an Tag -9 implantierten CT26 Tumore wurden an Tag 0 mit 1x10⁸ ivp AdGFP (n=3) oder 1x10⁸ ivp AdIm08 (n=5) behandelt. Die Splenektomie erfolgte 9 Tage nach Behandlung mit anschließender Färbung und durchflusszytometrischer Analyse. **|Statistik:** Graph Pad 5.01: Mittelwert, Stabw; Mann Whitney test.

4.6 Therapiebedingte Zunahme von tumorinfiltrierenden Lymphozyten

Bei erfolgreicher Tumorelimination immigrieren Effektorzellen des Immunsystems in das Tumorgewebe. Zum Nachweis tumorinfiltrierender Leukozyten (TIL) wurden 24 Tage nach Behandlung mit AdIm08 oder AdGFP die Tumore isoliert und die Zellen mechanisch vereinzelt. Die Zellsuspension wurde gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. **Abb. 20** zeigt die Gating-Strategie zur Bestimmung der TILs. Die Leukozyten wurden durch das Gate TIL im Dotplot FS/SS (Forward Scatter/ Sideward Scatter) erfasst, im Histogramm FL2 CD45 PE dargestellt und in die Populationen CD4⁺/CD8⁺/CD49b⁺ aufgetrennt.



Abb. 20: Gating-Strategie zur Quantifizierung der Tumor infiltrierenden Lymphozyten. Die Leukozyten wurden durch das Gate TIL im FS/SS Dotplot erfasst und im Histogramm FL2 CD45 PE dargestellt. Die CD45⁺ Zellen wurden zur weiteren Analyse im Gate CD45 zusammengefasst und der Anteil der CD4⁺, CD8⁺ und CD49b⁺ Lymphozyten ermittelt.

In Abb. 21 ist der Anteil der verschiedenen TIL Populationen an den gesamt CD45⁺ Leukozyten 24 Tage nach Behandlung mit AdGFP oder AdIm08 dargestellt. Bei den CD45⁺CD8⁺ Lymphozyten konnte ein signifikant höherer Anteil in der AdIm08 Behandlungsgruppe (18%) im Vergleich zur AdGFP Kontrollgruppe (5%) nachgewiesen werden (p=0,0128). Der Anteil tumorinfiltrierender CD45⁺CD11b⁺Gr1⁺ Zellen war in der AdGFP Behandlungsgruppe mit 26% im Vergleich zur AdIm08 Gruppe mit 17% signifikant erhöht (p= 0,0317). Bei den CD45⁺CD4⁺ und CD45⁺CD49b⁺ TILs ist zwischen den Behandlungsgruppen zu diesem Zeitpunkt kein Unterschied festzustellen.





Ergebnis: 24 Tage nach Behandlung konnten in Tumoren der AdGFP Kontrollgruppe mit 26% CD11b⁺Gr1⁺ Zellen prozentual wesentlich mehr MDSCs nachgewiesen werden als in der AdIm08 Gruppe (16%, p=0,0317). Ein signifikant höherer Anteil an CD8⁺ TIL im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte in Tumoren nach AdIm08 Behandlung mit bis zu 18% der CD45⁺ Zellen nachgewiesen werden (p=0,0117). Bezüglich der CD4⁺ und CD49⁺ TILs besteht kein signifikanter Unterschied. |**Methode**: Die an Tag -9 implantierten CT26 Tumore wurden an Tag 0 mit 1x10⁸ ivp AdGFP (n=5) oder 1x10⁸ ivp AdIm08 (n=5) behandelt. Die Tumorentnahme erfolgte 24 Tage nach Behandlung. Zellen der Tumore wurden mechanisch vereinzelt, gefärbt und per Durchflusszytometrie analysiert. |**Auswertung:** Flow X |**Statistik**: Graph Pad 5.01: Mittelwert, Stabw; Mann Whitney test.

Eine cytotoxische T-Zellantwort ist durch eine erhöhte Ratio $CD8^+/CD4^+$ Zellen gekennzeichnet. In Abb 22 ist die Ratio $CD8^+/CD4^+$ Zellen im Whiskers-Boxplot Diagramm dargestellt. Die AdGFP Behandlungsgruppe wies 24 Tage nach Behandlung eine niedrigere durchschnittliche Ratio (0,3) als die AdIm08 Behandlungsgruppe (1) auf. Da die ermittelten Verhältnisse innerhalb der AdIm08 Gruppe eine große Streuung mit hoher Standardabweichung aufwiesen, wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht (p=0,0950).



Abb. 22: Nicht signifikante Erhöhung der Ratio CD8⁺/CD4⁺ Tumor infiltrierender Lymphozyten durch Adlm08 Behandlung.

|Ergebnis: 24 Tage nach Behandlung weist die mit AdIm08 behandelte Gruppe wesentlich höhere Verhältnisse von CD8⁺ cytotoxischen T Zellen pro CD4⁺ T Helferzellen auf als die AdGFP Kontrollgruppe. Durch die große Streuung und geringe n-Zahl innerhalb der Gruppen wird das Signifikanzniveau nicht erreicht (p=0,0950). |**Methode**: Die an Tag -9 implantierten CT26 Tumore wurden an Tag 0 mit 1x10⁸ ivp AdGFP (n=5) oder 1x10⁸ ivp AdIm08 (n=5) behandelt. Die Tumorentnahme erfolgte 24 Tage nach Behandlung. Zellen der Tumore wurden mechanisch vereinzelt, gefärbt und per Durchflusszytometrie analysiert. |**Statistik:** Graph Pad 5.01, Box-Whisker Plot: Median, Whiskers entsprechen Min und Max; Mann Whitney test.

4.7 Adlm08 Therapie erhöht Langzeitüberleben

Zur abschließenden Beurteilung der Effektivität der AdIm08 Therapie gegenüber einer AdGFP Kontrollbehandlung wurden die Körpergewichte und das Langzeitüberleben CT26 tumortragender Mäuse beobachtet.

Der Gewichtsverlauf wurde ein bis zweimal wöchentlich dokumentiert. Als Abbruchkriterium wurde eine Gewichtszu- oder abnahme von 30% zur vorangegangenen Messung festgelegt. Die Mäuse verstarben durch starke Progression der Tumorerkrankung oder wurden bei Erfüllung der Abbruchkriterien mit CO₂ und anschließender zervikaler Dislokation getötet. Tote Tiere wurden obduziert und ein makroskopischer Befund erhoben.

In **Abb 23** sind die gemessenen Gewichte der behandelten Mäuse im Zeitraum bis 160 Tage nach Behandlung dargestellt. Die Körpergewichte nahmen im Beobachtungszeitraum dem Alter entsprechend um 6-7 g zu. Die meisten Tiere der AdGFP Kontrollgruppe (7/9) mit progressiver Tumorerkrankung verzeichneten zwischen dem 23. und 55. Tag nach Behandlung einen starken Anstieg des Körpergewichts durch massive Massenzunahme der Lebertumore. In der Adlm08 Behandlungsgruppe kam es im selben Zeitraum präfinal zur Gewichtsabnahme mit Dyspnoe bei 2 Tieren. In der Obduktion konnten große thorakale Metastasen als Grund für die Dyspnoe eruiert werden bei vergleichsweise kleineren Tumoren in der Leber. Ein Tier der AdIm08 Behandlungsgruppe zeigte eine vergleichbare Gewichtszunahme durch Massenzunahme des Lebertumors wie die AdGFP Kontrollgruppe, jedoch erst zu einem wesentlich späteren Zeitpunkt. Ein Tier der AdIm08 Gruppe wurde an Tag 98 tot aufgefunden.



Abb. 23: Körpergewicht behandelter Tiere der Überlebensstudie über einen Zeitraum von 160 Tagen |Ergebnis: Die Körpergewichte nahmen im Beobachtungszeitraum dem Alter entsprechend im Schnitt um 6-7 g zu. Alle Tiere der AdGFP Kontrollgruppe mit progressiver Tumorerkranken verzeichneten präfinal einen massiven Anstieg des Körpergewichts durch starke Zunahme der Lebertumore, gehäuft ab dem 23 Tag nach Behandlung. In der AdIm08 Behandlungsgruppe kam es bei 2 Tieren präfinal zur Gewichtsabnahme durch thorakale Metastasen. Ein Tier zeigte eine vergleichbare Gewichtszunahme wie in der AdGFP Kontrollgruppe, jedoch erst zu einem wesentlich späteren Zeitpunkt. |**Methode:** Die an Tag -9 implantierten CT26 Tumore wurden an Tag 0 mit 1x10⁸ ivp AdGFP (n=9) oder 1x10⁸ ivp AdIm08 (n=9) behandelt. Die Bestimmung des Körpergewichts erfolgte per Waage.)|**Auswertung:** Graph Pad 5.01.

Die Ergebnisse der Überlebensstudie wurden als Kaplan Meier Kurve über den Beobachtungszeitraum von 300 Tagen dargestellt (Abb. 24). In der AdIm08 Gruppe überlebten 56% (5/9) der behandelten Mäuse. In der AdGFP Kontrollgruppe überlebten im untersuchten Zeitintervall 11% (1/9) der behandelten Mäuse. Die AdIm08 Gruppe wies gegenüber der AdGFP Kontrollgruppe eine signifikant höhere Überlebensrate auf (p=0,0138).


Abb. 24: Signifikant erhöhtes Langzeitüberleben der CT26 Tumorerkrankung nach Adlm08 Behandlung.

|Ergebnis: Die Adlm08 Gruppe wies eine signifikant höhere Überlebensrate auf als die mit AdGFP behandelte Gruppe (p=0,0138). Es überlebten in der Adlm08 Gruppe 56% (5/9) der behandelten Tiere. **|Methode:** Die an Tag -9 implantierten CT26 Tumore wurden an Tag 0 mit 1x10⁸ ivp AdGFP (n=9) oder 1x10⁸ ivp Adlm08 (n=9) behandelt und über einen Zeitraum von 300 Tagen beobachtet. **|Statistik:** Graph Pad 5.01: Kaplan Meier Überlebenskurve, Log-rank (Mantel-Cox) Test.

5 Diskussion

5.1 Verwendetes Modell

Die vorliegenden Arbeiten wurden an einem Tiermodell für ein hepatisch metastasiertes Kolonkarzinom (CT26/BALB/c) durchgeführt. Dieses Modell wurde aufgrund unterschiedlicher Aspekte gewählt. Ein wichtiger Aspekt ist die klinische Relevanz dieses Modells. 14,6% aller Patienten weisen bei der Erstdiagnose eines Kolonkarzinoms bereits multiple Lebermetastasen auf (Mantke et al. 2011). In diesen Fällen ist meistens keine kurative Behandlung mit den aktuell verfügbaren Therapieschemata mehr möglich. Das mittlere Überleben in dieser Patientengruppe beträgt ca. 24 Monate nach Diagnosestellung, so dass ein hoher Bedarf für neue Therapien wie AdIm08 besteht. Eine weitere Anforderung die aufgrund des Wirkmechanismus von AdIm08 an das Modell gestellt wurde, ist das Vorhandensein vollständiger Immunkompetenz des tumortragenden Organismus. Diese Anforderung schließt jegliche Mausmodelle mit transplantierten humanen Tumoren aus (Xenograft Modelle mit SCID Mäusen (Severe Combined Immunodeficiency)).

Bei dem gewählten Modell handelt es sich um in die Leber implantierte, monoklonale Tumorzellen, die in einem sehr kurzen Zeitraum einen sichtbaren Tumorknoten ausbilden. Die Wachstumskinetik und die Monoklonalität der entstandenen Tumore entsprechen nicht den Eigenschaften klinischer Tumore.

Grundsätzlich musste jedoch ein hoher Anspruch an das Tiermodell bezüglich der Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit gestellt werden, um den Einsatz von Tieren möglichst gering zu halten. Spontan entstehende Tumore in transgenen Tumormodellen entsprechen zwar eher den klinischen Tumoren, erschweren jedoch aufgrund ihrer unterschiedlichen Lokalisation, Größe und Heterogenität die Durchführung von reproduzierbaren Studien. Versuche in transgenen Tumormodellen benötigen einen größeren Vorlauf mit komplizierten Staginguntersuchungen bei gleichzeitig höherem Einsatz von Versuchstieren.

Die verwendete Inzuchtlinie BALB/c weist immunologische Besonderheiten auf, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen. Es ist bekannt, dass unterschiedliche Mauslinien stark verschiedene Krankheitsverläufe nach Infektion mit

intrazellulären Parasiten aufweisen. Aufgrund des genetischen Hintergrunds von BALB/c Mäusen bildet das Immunsystem dieser Mäuse vornehmlich eine TH2 Antwort aus. Aus diesem Grund verläuft z.B. eine Leishmania major Infektion in diesen Mäusen immer tödlich, im Gegensatz zu anderen Mauslinien (z.B.: C57BL/6), welche vornehmlich eine TH1 Antwort ausbilden und in der Lage sind die Protozoen zu eliminieren (Sacks and Noben-Trauth 2002; Tacchini-Cottier, Weinkopff, and Launois 2012). Aus diesem Grund ist eine therapeutisch induzierte cytotoxische TH1 Antwort in dem BALB/c Modell schwieriger zu erreichen. Dieses Modell weist jedoch auch, durch das Überwiegen der TH2 Antwort, eine geringere Toxizität nach IL-12-Administration auf (Mazzolini et al. 2001).

Postexperimentell wurde in der Arbeitsgruppe die schlechte Infizierbarkeit der CT26-Zellen mit Adenoviren nachgewiesen, da sie kaum CAR (coxsackie-adenovirus receptor) exprimieren. Dies war erstaunlich, da diese Zelllinie weithin etabliert ist in der Untersuchung von Ad5 adenoviralen Immuntherapien. Die schlechte Infizierbarkeit der Tumorzellen in Zusammenschau mit der nachgewiesenen intratumoralen Expression der Transgene (Diplomarbeit Carolin Fleischhauer, 2008) weisen darauf hin, dass wahrscheinlich auch andere im Tumormicroenvironment befindliche Zellen von den Adenoviren infiziert werden.

Insgesamt ermöglicht das verwendete BALB/c / CT26 Modell für hepatisch metastasierte Kolonkarzinome reproduzierbare Versuchsreihen zur Analyse wesentlicher Wirkungsmechanismen. Darüber hinaus ist es das klassische Modell der MDSC-Forschung. Die gewonnen Ergebnisse lassen sich daher sehr gut mit anderen Ergebnissen der Literatur vergleichen, da viele Arbeitsgruppen ebenfalls mit diesem Modell arbeiten.

In Hinblick auf die Ergebnisse von Vlachaki et al., die eine geringere Transgenexpression nach adenoviraler Therapie in präimmunisierten Versuchstieren zeigten (Vlachaki et al. 2002), sollten vor einer möglichen klinische Anwendung von AdIm08 Effekte einer Präimmunisierung mit Ad5 betrachtet werden. Dies ist von besonderer Bedeutung, da die Prävalenz neutralisierender Antikörper gegen Ad5 in der europäischen Bevölkerung hoch ist (Sumida et al. 2005).

5.2 Therapie induzierte Veränderungen des tumoralen Microenvironments

Die Adlm08 induzierten Veränderungen im tumoralen Microenvironment und in der systemischen Immunantwort wurden im Rahmen dieser Arbeit detailliert analysiert. Dabei wurde in jedem Experiment eine Kontrollgruppe mit AdGFP behandelt. Dieser Kontrollvirus hat bis auf den Unterschied in der Transgenexpressionskassette die gleichen Eigenschaften wie AdIm08. Dieser Versuchsaufbau hat gegenüber einer PBS-Kontrollgruppe den Vorteil, dass die Immunantwort, die alleinig durch den Adenovirus ausgelöst wird, auch in der Kontrollgruppe ausgebildet wird. Somit ist der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der AdIm08 Gruppe nur auf die Expression der drei Transgene scIL-12, 4-1BBL (CD137L), IL-2 zurückzuführen.

Im Zeitverlauf von Tag 3 nach Vektorinjektion bis hin zu Tag 10, wurde ein immunologisches Transkriptionsprofil des zentralen Tumors und des peritumoralen Gewebes analysiert.

Diese Expressionsprofile wurden in einer Heatmap dargestellt. Dabei wurde ein agglomeratives Clusterverfahren angewendet, das eine Gruppierung ähnlicher Expressionsprofile vornimmt (Abb. 6, S. 49). Proben derselben Behandlungsgruppe und Lokalisation wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Expressionsprofile eindeutig in Cluster unterteilt. Dabei wurde das Cluster mit dem im Mittel niedrigsten Expressionslevel links und das mit dem höchsten rechts angeordnet. Hieraus ergibt sich eine Zunahme des inflammatorischen Milieus von der AdGFP Gruppe (peritumoral) hin zur AdIm08 Gruppe (zentraler Tumor).

Das Expressionsprofil des Microenvironments zeigt, dass der zentrale Tumor der Kontrollgruppe ein höheres inflammatorisches Expressionsprofil aufweist als das peritumorale Gewebe. Dieses Ergebnis kann zum einen dadurch erklärt werden, dass adenovirale Vektoren aufgrund der Immunogenität ihrer Kapside sowohl eine angeborene Immunantwort, als auch eine adaptive Immunantwort auslösen (Muruve 2004). Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass Tumore generell von einer Entzündungsreaktion begleitet werden. Diese ist in diesem Fall besonders durch das schnelle Wachstum begünstigt.

Diskussion

Die zusätzliche Expression der Transgene in den AdIm08 Behandlungsgruppen führt zu einer gesteigerten Expression der meisten untersuchten für eine TH1 Antwort charakteristischen Transkripte. Im Zeitverlauf lässt sich eine kontinuierliche Zunahme dieser Genexpression peritumoral nachweisen. Im zentralen Tumor war die Zunahme diskontinuierlich. Zu den gesteigert exprimierten Genen gehören IFN-y, die IFN-y abhängigen Chemokine (CXCL9, CXCL10 und CXCL11), sowie weitere TH1 Chemokine (CCL4 und CCL5). Die dazu kompatiblen TH1/CTL Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3 sind ebenfalls erhöht. Diese Ergebnisse, zusammen mit der erhöhten Expression der Leukozytenmarker (CD4, CD8, CD45), lassen vermuten, dass es zu einer gesteigerten Migration von aktivierten TH1 gewichteten Lymphozyten in den Tumor und das peritumorale Gewebe kommt. Auch 24 Tage nach Behandlung konnte im zentralen Tumor noch eine erhöhte Anzahl CD8⁺ Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden (Abb.21, S. 70).

Besonders in der (Abb. 6, S. 49) wird deutlich, dass die Expression des Proliferationsmarkers Ki67 im zentralen Tumor im Verlauf der Therapie abnimmt, jedoch eine Zunahme im peritumoralen Gewebe nachweisbar ist. Dieses Ergebnis ist vermutlich durch die Nekrose/Apoptose der Tumorzellen im Verlauf der Therapie mit konsekutiver Abnahme der Proliferationsaktivität im zentralen Tumor erklärbar. Es ist im Gegensatz dazu plausibel, dass die aktivierten Immunzellen, die häufig an der Invasionsgrenze des Tumors lokalisiert sind (Halama et al. 2011) im Verlauf der Therapie verstärkt proliferieren. Einen zusätzlichen Beitrag zur verstärkten Proliferation im peritumoralen Gewebe könnten ortsständige Gewebszellen liefern. Chew *et al.* konnten zeigen, dass in humanen HCC Geweben eine zunehmende Ki67 Expression von Immunzellen mit einer abnehmenden Ki67 Expression der Tumorzellen korreliert (Chew et al. 2010). Um dies auch im Fall des AdIm08 Therapieverlaufs zu verifizieren, müssten histochemische Analysen der Gewebe ähnlich denen in der erwähnten Publikation erfolgen.

Eine zunehmende Induktion der induzierten NO-Synthase auf ein mittleres Expressionslevel konnte sowohl im zentralen Tumor als auch im peritumoralen Gewebe nach AdIm08 Gabe nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass murine Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile, DC und NK Zellen im Verlauf einer TH1

Diskussion

Antwort die NOS2 Expression steigern können. Der Hauptinduktor der NOS2 ist das TH1 Cytokin IFN-y, weitere inflammatorische Cytokine wie IL-1, TNF, IFN-α oder IFN-β können ebenfalls induktiv wirken (Bronte & Zanovello 2005). Die hier nachgewiesene starke Induktion könnte auf eine Aktivierung ortsständiger, beziehungsweise immigrierter Zellen der myeloiden Reihe, insbesondere Makrophagen und MDSC hindeuten. So konnten Kerkar *et al.* nachweisen, dass es durch IL-12 Expression zu einer Umprogrammierung der Zellen im Tumormicroenvironment kommt, die die Immunantwort unterdrücken. Sie konnten zeigen, das MDSC, alternativ aktivierte Makrophagen (M2-Typ) und nicht funktionelle Dendritische Zellen zu Antigen-präsentierenden Zellen differenzieren (Kerkar et al. 2011).

Insgesamt wird durch die AdIm08 Therapie ein TH1 gewichtetes tumordestruktives Mikromilieu induziert mit dem vermehrten Nachweis Tumor-infiltrierender Lymphozyten. In zahlreichen klinischen Untersuchungen konnte eine kausale Beziehung zwischen einem solchen Milieu und dem Überleben einer Krebserkrankung nachgewiesen werden. In histologischen Untersuchungen und PCR Analysen von humanen Kolonkarzinomen korrelieren erhöhte Marker einer TH1 Antwort (u.a. CXCL-9 und CXCL-10) sowie eine erhöhte Dichte von cytotoxischen und Memory T Zellen im zentralen und peripheren Tumor mit einem niedrigen Rezidivrisiko und sind ein entscheidender prognostischer Faktor (Galon et al. 2006; Mlecnik et al. 2010). Der Nachweis vermehrter TIL an der Invasionsgrenze von humanen hepatischen Kolonkarzinommetastasen korreliert ebenfalls mit dem Überleben und ist sogar ein prognostischer Faktor für den Erfolg der Chemotherapie (Halama et al. 2011).

5.3 MDSC und therapiebedingte Splenomegalie

Bei Entnahme der Milzen zur Analyse fiel auf, dass 10 Tage nach Behandlung mit Adlm08 eine deutliche Splenomegalie im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisbar war (Abb. 8, S. 55). Korrelierend zur Splenomegalie konnte eine erhöhte Anzahl an Gesamtsplenozyten nachgewiesen werden. 24 Tage nach der Adlm08 Behandlung war keine erhöhte Splenozytenanzahl mehr nachweisbar, zu diesem Zeitpunkt hingegen wies die Kontrollgruppe eine erhöhte Splenozytenanzahl auf (Abb. 9, S. 56). Um die für die Splenomegalie ursächliche Splenozytenpopulation zu identifizieren, wurde die

Anzahl der jeweiligen Populationen CD8⁺, CD49⁺, CD4⁺, CD11b⁺Gr1^{high/low} bestimmt und mit der Anzahl der Gesamtsplenozyten korreliert (Abb. 12 und Abb. 13, S. 60-61). Für die Ergebnisse an Tag 9 nach Virusinjektion ergibt sich eine Korrelation der CD11b⁺Gr1^{high/low} und der CD49b⁺ Zellen mit der Gesamtsplenozytenanzahl. Wobei die Gruppe derCD11b⁺Gr1^{high} am stärksten für den Anstieg der Splenozyten verantwortlich ist. An Tag 24 nach Behandlung ist nur in der AdGFP Kontrollgruppe eine Expansion der CD11b⁺Gr1^{high/low} Splenozytenpopulationen nachzuweisen.

Die beiden mit den Antikörpern gegen CD11b und Gr1 charakterisierten Populationen (CD11b⁺Gr1^{high/low}) gehören zu der heterogenen Gruppe der Myeloid-derived Suppressor Cells (MDSC). Diese Populationen weisen ein unterschiedliches Potential bezüglich ihrer immunsuppressiven Wirkung auf T-Zellen auf. Die immunsuppressive Wirkung wird vornehmlich über NOS2 und ARG1 vermittelt. Beide Enzyme führen zum verstärkten Abbau der essentiellen Aminosäure L-Arginin, so dass es zu einem lokalen Mangel an L-Arginin bei den aktivierten T-Zellen kommt.

Aktivierte T-Zellen internalisieren nach Antigenbindung den T-Zellrezeptorkomplex. Die Reexpression der ζ-Kette des CD3 Komplexes wird durch den Argininmangel inhibiert. Somit ist die antigenabhängige Signaltransduktion unterbrochen. Darüber hinaus hat das von der NOS gebildete NO einen direkten Effekt auf die intrazelluläre Signaltransduktion des IL2-Rezeptors von T-Zellen. Durch Nitrosylierung von Cysteinresten kommt es zur Inaktivierung von Signalproteinen des IL-2 Rezeptors (Bronte & Zanovello 2005).

Dolcetti *et al.* unterteilen die MDSC bezüglich ihrer immunsuppressiven Wirkung in drei Gruppen CD11b⁺Gr1 ^{high}, CD11b⁺Gr1 ^{intermediate} und CD11b⁺Gr1 ^{low}. Mit zunehmender Gr1 Expression sinkt die immunsuppressive Wirkung auf T-Zellen. Gr1^{high} Zellen entsprechen reifen polynukleären Zellen, Gr1^{intermediate} Zellen einer heterogenen Population aus Monozyten und myeloiden Vorläuferzellen, bei den Gr1^{low} Zellen handelt es sich hauptsächlich um Monozyten. Die Expansion der Gr1^{low} Population erfolgt GM-CSF abhängig (Dolcetti et al. 2010).

Zunächst wurde eine chronische Expansion der MDSC Population in diversen Tumormodellen und auch bei Karzinompatienten nachgewiesen. Eine Expansion der

MDSC Population in peripheren Lymphorganen und im Blut konnte später auch bei akuten Infektionen, schweren Traumen und bei Sepsis (Gabrilovich & Nagaraj 2009) nachgewiesen werden. MDSC scheinen eine entscheidende Rolle in der Kontraktionsphase der T-Zellantwort zu spielen und damit eine überschießende T-Zellantwort zu limitieren. Bei chronischen Infektionen oder Tumorerkrankungen mit langanhaltender Antigenpräsentation kommt es zu einer persistierenden MDSC Aktivität mit Suppression der T-Zellantwort. Bronte und Zanovello postulieren folgende Verläufe der MDSC Expansion und Kontraktion in Abhängigkeit von der zugrundeliegenden Antigenverfügbarkeit:



Abb. 25: aus der Publikation: Regulation of immune responses by L-Arginine metabolism, by V. Bronte and P. Zanovello (Bronte & Zanovello 2005)

Es ist bekannt, dass die verwendeten CT26 Zellen durch spontane GM-CSF Bildung eine chronische Expansion der MDSC in BALB/c Mäusen hervorrufen. Folglich führt dies zur Suppression aktivierter T-Zellen (Bronte et al. 1999), dies stellt einen wesentlichen Bestandteil des Tumorescapemechanismus in diesem Modell dar. Es konnten bei AdGFP behandelten Versuchstieren beginnend an Tag 9 und ausgeprägter an Tag 24 deutlich erhöhte MDSC Populationen in der Milz nachgewiesen werden, vergleichbar mit publizierten Angaben anderer Arbeitsgruppen. (Dolcetti et al. 2010). Sowohl die CD11b⁺Gr1^{low} Population, die eine stark suppressive Wirkung aufweist, als auch die CD11b⁺Gr1^{high} Population nimmt in der AdGFP Behandlungsgruppe erwartungsgemäß mit der Tumorprogression zu.

In der Adlmo8 Behandlungsgruppe weist die MDSC Population eine andere Kinetik bezüglich der zwei untersuchten Zeitpunkte auf. An Tag 9 ist die Population der MDSC in der Milz im Vergleich zur AdGFP Gruppe transient erhöht und fällt an Tag 24 auf das Niveau naiver Tiere (Abb. 14, S. 62). Das Signifikanzniveau wird zwischen der AdGFP und der AdIm08 Gruppe bei kleiner Gruppenstärke an Tag 9 nicht erreicht. Der Abfall der MDSC Population an Tag 24 kann als indirekter Marker der Tumorelimination gewertet werden, da die CT26 abhängige GM-CSF-Produktion zurückgeht.

Die transiente MDSC Induktion an Tag 9 könnte durch die starke IL-12 Expression nach AdIm08 Behandlung bedingt sein, dies würde dann der MDSC Induktion im Rahmen einer starken Entzündungsreaktion entsprechen (Abb. 25 a, Seite 80, Bronte and Zanovello 2005). IL-12 kann über IFN-y und GM-CSF indirekt eine Aktivierung (NOS2 Expression) und Expansion der MDSC hervorrufen. Damit könnte auch die mittels PCR nachgewiesene NOS2 Induktion im Tumor und im peritumoralen Gewebe erklärt werden (Abb. 6, S. 49).

Der hier erstmalig beschriebene Zusammenhang zwischen der IL-12 Expression im Rahmen der AdIm08 Administration und der transienten MDSC Expansion mit Suppression der aktivierten T-Zellen wurde bisher noch nicht untersucht. Dieser Mechanismus könnte ein Erklärungsmodell für bisher publizierte Phänomene im Zusammenhang mit der IL-12 Administration darstellen.

Schon Ende der 90er Jahre wurde IL-12 als Adjuvanz bei Tumorvakzinierungen verwendet. Bei hohen IL-12 Gaben konnte eine transiente Suppression aktivierter T-Zellen nachgewiesen werden, begleitet von einer Splenomegalie. Die gleichzeitige Gabe von NOS2 Inhibitoren konnte die Suppression aufheben. Für die NO abhängige T-Zellsuppression konnten in *in vitro* Experimenten adhärente Zellen aus der Milz identifiziert werden (Kurzawa et al. 1998; Koblish et al. 1998; Lasarte et al. 1999).

Die IL-12 abhängige MDSC-Induktion könnte auch das Phänomen der verminderten Toxikologie bei repetitiver Gabe von IL-12 erklären (Coughlin et al. 1997; Leonard et al. 1997).

5.4 T-Zell Aktivierung

9 Tage nach AdIm08 Gabe wurde ein Kokulturassay mit CT26 Zellen und Splenozyten durchgeführt um eine antigenabhängige Aktivierung von cytotoxischen T-Zellen nachzuweisen. Durchflusszytometrisch konnten statistisch signifikant mehr CD8⁺IFN- γ^{high} T-Zellen nach Antigenstimulation in der AdIm08 Behandlungsgruppe nachgewiesen werden (Abb. 17, S. 65). Das Ergebnis wurde mit einem high-sensitive IFN-γ ELISA verifiziert. (Abb. 18, S. 67). Auch hier konnte ein antigenabhängiger IFN-γ Anstieg in den Kokulturüberständen von zuvor mit AdIm08 behandelten Tieren nachgewiesen werden.

Eine durchflusszytometrische Analyse der CD8⁺IFN-γ^{high} Zellen ohne vorherige *in vitro* Expansion der Splenozyten in einer mehrtägigen Kokultur liegt verfahrensbedingt an der unteren Nachweisgrenze, weshalb zur Verifikation des Ergebnisses ein highsensitive IFN-γ ELISA durchgeführt wurde. Eine noch höhere Sensitivität wäre mit einem Elispot Assay erreichbar gewesen.

Die relativ hohe Standardabweichung könnte mit unterschiedlichen Konzentrationen aktivierter T-Zellen erklärt werden. Große Konzentrationsunterschiede könnten in der Kontraktionsphase der T-Zellantwort und bei Nichtansprechen der Therapie auftreten. Insgesamt konnte eine durch AdIm08 induzierte, spezifisch gegen CT26-Zellen gerichtete systemische T-Zellantwort nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass eine effektive TH1 Antwort gegen den Tumor induziert wurde.

Spezifisch gegen den Tumor gerichtete T-Zellen können klinisch bei vielen Krebspatienten nachgewiesen werden (Koch et al. 2006; Liu et al. 2008). Auch die neueren Therapieverfahren der Tumorvakzinierungen erreichen schon hohe Spiegel von aktivierten Effektor T-Zellen in peripheren Kompartimenten. Für eine effektive Elimination des Tumors ist jedoch vor allem eine Migration dieser Zellen in den Tumor bzw. ins peritumorale Gewebe nötig. 24 Tage nach Behandlung weisen AdIm08 behandelte Tiere eine signifikant höhere Anzahl CD8⁺ T-Zellen und eine erniedrigte Anzahl an CD11b⁺Gr1⁺ unter den TILs auf als AdGFP Tiere (Abb. 21, S. 70). Dies spräche in Zusammenschau mit den PCR Daten für eine durch AdIm08 ermöglichte Migration aktivierter T-Zellen ins peritumorale/ tumorale Gewebe.

5.5 IL-2 abhängige T_{reg} Expansion

 T_{reg} Zellen sind in der Lage eine cytotoxische T-Zellantwort zu limitieren. Eine IL-2 abhängige Expansion von T_{reg} Zellen wurde häufig beschrieben (Sakaguchi 2005). Um eine therapeutische Induktion dieser Zellen zu untersuchen, wurde 9 Tage nach Behandlung der Anteil der Treg Zellen an den Splenozyten bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt weist die AdGFP Behandlungsgruppe einen erhöhten Anteil T_{reg} Zellen $(CD4^+CD25^+Foxp3^+)$ im Vergleich zur AdIm08 Gruppe auf (Abb. 19, S. 68). Zumindest lässt sich 9 Tage nach Behandlung keine therapeutisch induzierte Expansion der T_{reg} Zellen durch eine vermehrte IL-2 Expression nach AdIm08 Administration nachweisen. Ein leicht erhöhter Anteil an T_{reg} in der AdGFP Behandlungsgruppe könnte in Zusammenhang mit den progredienten CT26 Tumoren stehen. Um eine mögliche therapeutische Expansion der T_{reg} Zellen im Verlauf jedoch beurteilen zu können, müssten weitere Zeitpunkte untersucht werden.

5.6 Überlebensstudie

Um die Effektivität der AdIm08 Therapie zu untersuchen, wurde eine Langzeitüberlebensstudie über 300 Tage im CT26 BALB/c Modell durchgeführt (Abb. 24, s. 73). Die Körpergewichte der Versuchstiere wurden im Verlauf erfasst (Abb. 23, S. 72). Beim Monitoring der Gewichte wiesen die mit AdGFP behandelten Tiere prämortal immer eine Gewichtszunahme bei zunehmender Tumorlast auf. Bei zwei AdIm08 behandelten Tieren konnte eine prämortale Gewichtsabnahme und Dyspnoe beobachtete werden, was autoptisch mit großen thorakalen Fernmetastasen erklärt werden konnte, bei relativ kleinem Primärtumor in der Leber. Dies könnte fraglich durch eine therapeutisch induzierte Wachstumsverzögerung des Primarius bedingt sein, bei der insgesamt keine suffiziente Immunantwort gegen den Tumor und etwaige Fernmetastasen aufgebaut werden konnte.

Die Adlm08 Behandlungsgruppe wies eine statistisch signifikant höhere Überlebensrate mit 56% (5/9) auf als die AdGFP Behandlungsgruppe mit 11% (1/9) (Abb. 24, S. 73). Nach Implantation von CT26 Zellen bilden nicht alle Versuchstiere einen Tumor aus. Da keine Präselektion bezüglich Tumorgröße direkt vor der Behandlung durchgeführt wurde, entspricht die Überlebensrate in der AdGFP Behandlungsgruppe der Überlebensrate nach CT26 Implantation (Brattain et al. 1980).

Xu et al. führten im selben Tumormodell vergleichbare Studien durch. Sie erreichten mit einer Kombination aus einem Adenovirus kodierend für IL-12 (AD IL12) und einer systemischen Gabe eines agonistischen 4-1BB Antikörpers eine Überlebensrate von 60% (3/5). Für eine Kombination von AD IL12 und einen Adenovirus kodierend für einen löslichen agonistischen Antikörpers für 4-1BB (AD/IG 4-1BBL) konnte eine

Überlebensrate von 43% (3/7) bei einer Dosis von 3,2x10^9 IU und 25% (2/7) bei einer Dosis 1,6x10^9 IU gezeigt werden. Eine Behandlung alleinig mit AD IL12 zeigte keine Wirksamkeit bei einer Überlebensrate von 0% (Xu et al. 2005).

Mit der hier untersuchten adenoviralen Gentherapie bestehend aus einem Adenovirus kodierend für _{single}IL-12, IL-2 und 4-1BBL konnte mit einer 32 fach geringeren Dosis eine höhere Überlebensrate erreicht werden. Dies könnte bei klinischer Anwendung eine höhere Sicherheit unter Vermeidung einer cytotoxininduzierten Toxizität bedingen.

6 Zusammenfassung

Spontan entstandene Karzinome entziehen sich einer effektiven antitumoralen Immunantwort des Wirtsorganismus durch die Ausbildung eines tumorprogressiven Mikromilieus. Dieses tumorprogressive Mikromilieu aufzuheben und eine effektive antitumorale Entzündungsreaktion zu verstärken bzw. zu initiieren ist Gegenstand der klinischen Forschung und Ansatzpunkt der hier untersuchten adenoviralen Immuntherapie (AdIm08). AdIm08 ist ein Adenovirus mit einer Transgenkassette kodierend für IL-12, IL-2 und 4-1BBL.

In einem Mausmodell für ein hepatisch metastasiertes Kolonkarzinom (CT26 BALB/c) wurden nach intratumoraler Injektion von AdIm08 die therapeutisch induzierten Veränderungen mit Q-RT-PCR und durchflusszytometrischen Analysen untersucht. Als Kontrolle diente eine AdGFP Behandlungsgruppe.

Nach Behandlung mit Adlm08 konnte eine vermehrte Expression von TH₁ gewichteten Chemokinen, Cytokinen und Lymphozytenmarkern im tumoralen und peritumoralen Gewebe nachgewiesen werden (Q-RT-PCR). Zusätzlich wurde eine erhöhte Dichte von CD8⁺ Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (Durchflusszytometrie) nachgewiesen. In einem Kokulturassay konnte in der Adlm08 Behandlungsgruppe eine CT26-Antigen abhängige Restimulation von *in vivo* geprimten T-Zellen gezeigt werden, nicht jedoch in der Kontrollgruppe.

Als Teil des Tumorescapemechanismus ist bei CT26 Tumoren eine kontinuierliche Expansion der Myeloid-derived Suppressor Cells (MDSC) beschrieben (Bronte et al. 1999). Dieser Mechanismus war in der AdGFP Kontrollgruppe deutlich nachweisbar. Nach AdIm08 Injektion war eine transiente Expansion der MDSC zu beobachten, diese erfolgte IL-12 abhängig und ist Bestandteil der Kontraktionsphase einer T-Zellantwort.

Die Adlm08 Behandlungsgruppe zeigte insgesamt eine erhöhte Überlebensrate [5/9 (56%) Adlm08 vs. 1/9 (11%) AdGFP; p= 0,0138].

Zusammenfassend konnte durch die intratumorale AdIm08 Injektion die Ausbildung eines tumordestruktiven, TH₁ gewichteten Mikromilieus nachgewiesen werden, bei insgesamt signifikant erhöhter Überlebensrate.

7 Ausblick

Die Charakterisierung der Immunantwort erfolgte auf transkriptioneller Ebene im Tumor mittels Q-RT-PCR. Für zukünftige Studien ist eine Erweiterung der untersuchten Transkripte insbesondere in Hinblick auf TH₂ abhängige Cytokine und Chemokine anzustreben. Auch die Verifikation dieser Ergebnisse auf Proteinebene und mit zellulärem Bezug wäre weiterführend. Hieraus könnten sich weitere Ansätze zum Verständnis des Wirkmechanismus der Adlm08 Therapie ergeben.

In dieser Arbeit konnten reaktive CD8⁺ Zellen nach Kokultur mit CT26 Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Aufgrund der kleinen Zellpopulation sind die Ergebnisse mit dieser Methode nur knapp im nachweisbaren Bereich. Um die Ausbildung einer therapieinduzierten zytotoxischen Immunantwort gegen die CT26 Zellen sicherer nachzuweisen, könnte als sensitiveres Verfahren ein IFN-y Elispot nach T-Zellexpansion angewendet werden. Da mittlerweile spezifische CT26 Antigene publiziert wurden, könnten auch mittels Tetramer-Färbung und durchflusszytometrischer Analyse reaktive T-Lymphozyten sicherer nachgewiesen werden.

Um die Ausbildung einer langfristigen Immunität gegen CT26 Zellen nach Behandlung mit AdIm08 nachzuweisen, könnten weitere Überlebensstudien mit einem sogenannten "rechallenge", also einer weiteren Implantation von CT26 Zellen nach Behandlung durchgeführt werden.

Die in dem verwendetem CT26 BALB/c Modell nachgewiesene TH1 Immunantwort ist umso beachtlicher vor dem Hintergrund, dass das Immunsystem der BALB/c Maus vornehmlich mit einer TH2 gerichteten Immunantwort reagiert. Es wäre deshalb, insbesondere auch unter toxikologischen Aspekten, interessant die Wirkungsweise des Vektors AdIm08 in einem weiteren Mausmodell zu untersuchen das vornehmlich eine TH1 Antwort ausbildet.

Myeloid-derived Suppressor Cells (MDSC), eine heterogene Population unreifer myeloider Vorläuferzellen, tragen in dem untersuchten Tumormodelle zunächst auf lokaler und bei Fortschreiten des Tumors auch auf systemischer Ebene zum Escapemechanismus des Tumors bei. MDSC können sowohl Teile des angeboren

Ausblick

Immunsystems (NK und NKT Zellen) als auch des adaptiven Immunsystems (CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen) inhibieren. Die Induktion der MDSC erfolgt durch kontinuierliche GM-CSF Sezernierung der Tumorzellen. Nach der Behandlung mit AdIm08 konnte ebenfalls eine transiente, systemische Expansion dieser Zellpopulation nachgewiesen werden, diese erfolgte jedoch IL-12 abhängig. Um die Expansions- und Kontraktionsphase dieser Population genauer darzustellen müssten weitere Zeitpunkte nach Behandlung untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern erste Hinweise für eine therapiebedingte Differenzierung tumoraler MDSC zu funktionstüchtigen antigen präsentierenden Zellen (APC). Dies müsste jedoch durch weiterführende Experimente bestätigt werden. Eine therapieinduzierte Reifung dieser Zellen könnte eine cytotoxische Immunatwort gegen Tumore aktiv unterstützen.

Das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell mit implantierten Tumoren eignet sich gut um grundlegende Wirkmechanismen der untersuchten adenoviralen Immuntherapie zu charakterisieren. Ein solches Modell weist jedoch durch Verwendung von Inzuchtstämmen und schnell wachsenden, chemisch induzierten Karzinomen Limitationen bezüglich des Wirtsimmunsystems und der Tumorbiologie auf. Für weitere Studien oder Heilversuche wird deshalb die Behandlung von spontan entstandenen Tumoren von Haustieren in Kooperation mit Veterinären angestrebt.

Bestätigende und weiterführende präklinische Experimente sollen auch in humanen Modellen durchgeführt werden, da die aus Mausmodellen gewonnenen Ergebnisse nur bedingt auf den Menschen übertragbar sind. Synergistische Effekte der Immunstimulatoren konnten bereits in *in vitro* Kokulturen mit humanen PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) und humanen Karzinomzellen untersucht werden.

Um die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse bezüglich der therapieinduzierten Modulation des Mikromilieus zu bestätigen beziehungsweise weiter zu untersuchen, werden zurzeit *ex vivo* Studien mit humanen Blasenkarzinomen etabliert. Hierzu werden unmittelbar nach Zystektomie kleine Gewebeblöcke aus dem Resektat entnommen und in Kultur gebracht. Hierdurch wird gewährleistet, dass neben den Tumorzellen auch die lokalen Immunzellen kultiviert werden und somit das Mikromilieu erhalten bleibt. Durch die Behandlung der Gewebeblöcke mit dem

adenoviralen Immuntherapeutikum soll die therapieinduzierte Modulation des Mikromilieus analysiert werden. Hierzu kommen Chip-Analysen zur Erfassung des gesamten Transkriptoms, durchflusszytometrische und immunhistochemische Verfahren zum Einsatz.

8 Abkürzungen

4-1BBL	Transmembran Glycoprotein der TNF Familie
Ad	Adenovirus
AdGFP	Adenovirus kodierend für Green Fluorescent Protein
Adlm08	Adenovirus kodierend für scIL-12, IL-2, 4-1BBL
APC	Antigen-presenting Cell
BALB/c	Inzucht Mauslinie
CAR	Coxackie-Adenovirus Rezeptor
CCL1	CC Motif Ligand 1
CD4	Cluster of Differentiation 4 (T-Helfer)
CD8	Cluster of Differentiation 8 (cytotoxische T-Zellen)
CMV	Cytomegalie Virus
СТ	Zentraler Tumor
CT26	Zelllinie eines Kolonkarzinoms
CTL	zytotoxische T Lymphozyten
CXCL4	CXC Motif Ligand 4
DNA	Desoxyribonucleic acid
EGFR	Epithelia Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMCV-IRES	Encephalomyocarditis Virus- Internal Ribosome Entry Side
EOMES	Eomesodermin
	Familiare Adenomatose Polyposis
	Chemotherapieschema: 5-fluorouracii, leucovorin [folinic acid], irinotecan
	Chemolinerapieschema. 5-huorouracii, ieucovorin [roiniic aciu], oxalipialin
FoxP3	Forknead Box P3
FS/SS	Forward Scatter/ Sideward Scatter
gapdh	GlycerinAldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	Green Fluorescent Protein
GM-CSF	Granulocyte Makrophage Colony-Stimulating Factor
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HNPCC	Hereditäres-Nicht-Polypöses-Colon-Carcinom
ICAM1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IFN-y	Interferon y
IL-12	Interleukin 12
IL-1RA	IL-1 Receptor Antagonist
IL-2	Interleukin 2
IM	Invasiv Margin (Invasions Grenze)
IP-10	Interferon Gamma-induced Protein 10
IRF-1	Interferon Regulatory Factor 1
I-Tac	Interferon-inducible T-cell Alpha Chemoattractant
Ki67	Proliferationsmarker
MADCAM1	Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1
MDSC	Myeloid-derived Suppressor Cells
MIG	Monokine induced by Interferon Gamma
MIP-1α	Makrophage Inflamatory Protein 1 α
ΜΙΡ-1β	Makrophage Inflammatory Protein-1β
Muc1	Mucin 1
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NO	Nitric Oxide

NOS2	Nitric Oxide Synthase 2
PBMC	Peripheral Blood Monouclear Cell
PCR	Polymerase Chain Reaction
Q-RT-PCR	Quantitativ Real-Time Polymerase Chain Reaction
RANTES	Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed, and presumably
NANTES	Secreted
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RET/PTC	Rearranged During Transfection/Papillary Thyroid Carcinoma Onkogene
RSV	Rous-Sarkoma Virus
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SV	Simian Virus
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
Tbet	entspricht T-box Transcriptor Factor 1 (TBX21)
TGF-β	tumor growth factor β
TIL	Tumor Infiltrierende Lymphozyten
TNF-α	Tomor nekrose Faktor α
TNM-Klassifikation	Tumor Node Metastase – Klassifikation
Treg	T regulatorische Zellen
UICC	Union for International Cancer Control
VEGF	Vascular Endothelia Growth Factor

9 Verzeichnisse

9.1 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: aus der Publikation: Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability (Colotta et al. 2009) Integration der Entzündungsreaktion als siebtes Kennzeichen der Krebsentstehung.
- Abb. 2:SchematischeDarstellungdestumorunterstützendenunddestumordestruktiven Micromilieus.17
- Abb. 3: Schematische Darstellung des Insert für Adlm08 20
- Abb. 4: Temperatur-Profil mit dem jede PCR durchgeführt wurde. 35
- Abb. 5:Studienschema zur *in vivo* Charakterisierung der AdIm08-Therapie mittels Q-
RT-PCR.47
- Abb. 6:AdIm08 Behandlung bedingte Expressionssteigerung von TH1 assoziiertenTranskriptionsfaktoren,LymphozytenmarkernundCytokinenimperitumoralen Lebergewebe und im zentralen Tumor.49
- Abb. 7: AdIm08 Behandlung bedingt Induktion von TH1 assoziiertenTranskriptionsfaktoren, Lymphozytenmarkern und Cytokinen imperitumoralen Lebergewebe und im zentralen Tumor.52
- Abb. 8: Durchschnittliche Milzgewichte sind in der AdIm08 Behandlungsgruppegegenüber der AdGFP Kontrollgruppe signifikant erhöht.55
- Abb. 9: Zunahme der Gesamtsplenozytenanzahl in der Kontrollgruppe bei gleichzeitiger Abnahme in der AdIm08 Behandlungsgruppe zwischen Tag 9 und Tag 24 nach Behandlung. 56
- Abb. 10: Charakterisierung der CD11b⁺Gr⁺ MDSC im Durchflusszytometer. 57

- Abb. 11: Zunahme der MDSC Populationen in der Kontrollgruppe bei gleichzeitigerAbnahme in der AdIm08 Behandlungsgruppe zwischen Tag 9 (A) undTag 24 (B) nach Behandlung.58
- Abb. 12: Die Splenozytenanzahl korreliert 9 Tage nach Behandlung mit der Anzahl CD49b⁺, CD11b⁺Gr-1^{low+} und CD11b⁺Gr-1^{high+} Zellen. 60
- Abb. 13: Die Splenozytenanzahl korreliert 24 Tage nach Behandlung mit der AnzahlCD11b+Gr-1</t
- Abb. 14: Abnahme der CD11b⁺Gr1^{high+} MDSC Population bei der AdIm08
 Behandlungsgruppe zwischen Tag 9 und Tag 24 auf das Niveau gesunder
 Tiere, die CD11b⁺Gr1^{low+} Population verringert sich erst nach Tag 24.
- Abb. 15: Studienschema zur *ex vivo* Charakterisierung der therapiebedingten Immunantwort mittels Durchflusszytometrie und Restimulations Assay. 63
- Abb. 16: Gating-Strategie zur Bestimmung des Aktivierungsmarkers CD62L und desintrazellulären IFN-γ.64
- Abb. 17: Restimulation mit CT26 Zellen steigerte den Anteil IFN-γ^{high+} /CD8⁺ T-Zellen bei behandelten Tieren signifikant. Der Anteil der CD62L^{low}/CD4⁺ und CD62L^{low}/CD8⁺ Lymphozyten erhöhte sich durch Behandlung mit AdIm08, bei Kontrollbehandlung waren gesteigerte Anteile CD62L^{low}/CD49b⁺ nachweisbar.
- Abb. 18: Restimulation mit CT26 Zellen steigerte die IFN-γ Sekretion von Splenozytenbei AdIm08 behandelten Tieren signifikant.67
- Abb. 19: Signifikant geringerer Anteil an CD25+FoxP3+ Treg-Zellen in der AdIm08Behandlungsgruppe 9 Tage nach Behandlung.68
- Abb. 20: Gating-Strategie zur Quantifizierung der Tumor infiltrierendenLymphozyten.69

- Abb. 21: Erhöhter Anteil tumorinfiltrierender CD8⁺ Lymphozyten und verminderter Anteil CD11b⁺Gr1⁺ MDSCs in der AdIm08 Behandlungsgruppe im Vergleich zur AdGFP Kontrollgruppe. 70
- Abb. 22: Nicht signifikante Erhöhung der Ratio CD8⁺/CD4⁺ Tumor infiltrierender Lymphozyten durch AdIm08 Behandlung. 71
- Abb. 23: Körpergewicht behandelter Tiere der Überlebensstudie über einen Zeitraum
von 160 Tagen72
- Abb. 24: Signifikant erhöhtes Langzeitüberleben der CT26 Tumorerkrankung nachAdIm08 Behandlung.73
- Abb. 25: aus der Publikation: Regulation of immune responses by L-Arginine metabolism, by V. Bronte and P. Zanovello (Bronte & Zanovello 2005) 80

9.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Stadienabhängige 5 Jahresüberlebensrate von Kolonkarzinompatienten.	8
Tab. 2:	Primerpaare für die Cytokine und Effektorproteine.	32
Tab. 3:	Zusammensetzung des Mastermix für die PCR	35

9.3 Literaturverzeichnis

- Abdalla, E.K. et al., 2006. Improving resectability of hepatic colorectal metastases: expert consensus statement. *Annals of surgical oncology*, 13(10), pp.1271–80.
- Biswas, S.K. & Mantovani, A., 2010. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature immunology*, 11(10), pp.889–96.

- Blank, C. et al., 2005. ICAM-1 contributes to but is not essential for tumor antigen cross-priming and CD8+ T cell-mediated tumor rejection in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174(6), pp.3416–20.
- Borrello, M.G. et al., 2005. Induction of a proinflammatory program in normal human thyrocytes by the RET/PTC1 oncogene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(41), pp.14825–30.
- Brattain, M.G. et al., 1980. Establishment of mouse colonic carcinoma cell lines with different metastatic properties. *Cancer research*, 40(7), pp.2142–6.
- Bricard, G. et al., 2005. Naturally acquired MAGE-A10- and SSX-2-specific CD8+ T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174(3), pp.1709–16.
- Broderick, L. et al., 2005. Human CD4+ effector memory T cells persisting in the microenvironment of lung cancer xenografts are activated by local delivery of IL-12 to proliferate, produce IFN-gamma, and eradicate tumor cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174(2), pp.898–906.
- Bronte, V. et al., 1999. Unopposed production of granulocyte-macrophage colonystimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. :* 1950), 162(10), pp.5728–37.
- Bronte, V. & Zanovello, P., 2005. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nature reviews. Immunology*, 5(8), pp.641–54.
- Burnet, S.M., 1957. Cancer A Biological Approach. *British Medical Journal*, 5022(1), pp.779–786.
- Cannons, J.L. et al., 2001. 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(3), pp.1313–24.

- Cartwright, T.H., 2012. Treatment decisions after diagnosis of metastatic colorectal cancer. *Clinical colorectal cancer*, 11(3), pp.155–66.
- Chew, V. et al., 2010. Inflammatory tumour microenvironment is associated with superior survival in hepatocellular carcinoma patients. *Journal of hepatology*, 52(3), pp.370–9.
- Colotta, F. et al., 2009. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30(7), pp.1073–81.
- Coughlin, C.M. et al., 1997. The effect of interleukin 12 desensitization on the antitumor efficacy of recombinant interleukin 12. *Cancer research*, 57(12), pp.2460–7.
- Coussens, L.M. & Werb, Z., 2002. Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), pp.860–867.
- Cramer, D.W. et al., 2005. Conditions associated with antibodies against the tumorassociated antigen MUC1 and their relationship to risk for ovarian cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 14(5), pp.1125–31.
- Dolcetti, L. et al., 2010. Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloidderived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *European journal of immunology*, 40(1), pp.22–35.
- Drake, C.G. et al., 2005. Androgen ablation mitigates tolerance to a prostate/prostate cancer-restricted antigen. *Cancer cell*, 7(3), pp.239–49.
- Dunn, G.P., Old, L.J. & Schreiber, R.D., 2004. The three Es of cancer immunoediting. Annual review of immunology, 22, pp.329–60.
- Ehrlich, P., 1909. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. Ned Tijdschr Geneeskd, 5, pp.273–290.

- Foulds, L., 1954. The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer research*, 14(5), pp.327–39.
- Gabrilovich, D.I. & Nagaraj, S., 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature reviews. Immunology*, 9(3), pp.162–74.
- Galon, J. et al., 2006. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5795), pp.1960–4.
- Gehring, A.J. et al., 2009. Profile of tumor antigen-specific CD8 T cells in patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 137(2), pp.682–90.
- Graziano, D.F. & Finn, O.J., 2005. Tumor antigens and tumor antigen discovery. *Cancer treatment and research*, 123, pp.89–111.
- Habib-Agahi, M., Phan, T.T. & Searle, P.F., 2007. Co-stimulation with 4-1BB ligand allows extended T-cell proliferation, synergizes with CD80/CD86 and can reactivate anergic T cells. *International immunology*, 19(12), pp.1383–94.
- Halama, N. et al., 2011. Localization and density of immune cells in the invasive margin of human colorectal cancer liver metastases are prognostic for response to chemotherapy. *Cancer research*, 71(17), pp.5670–7.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. Cell, 100(1), pp.57–70.
- Kanazawa, M. et al., 2005. Effects of PSK on T and dendritic cells differentiation in gastric or colorectal cancer patients. *Anticancer research*, 25(1B), pp.443–49.
- Karanikas, V. et al., 2010. Naturally occurring tumor-specific CD8+ T-cell precursors in individuals with and without cancer. *Immunology and cell biology*, 88(5), pp.575-85.

- Kasper, D.L. et al., 2005. *Harrisons Innere Medizin* 16th ed. M. Dietel, N. Suttorp, & M. Zeitz, eds., ABW Wissenschaftsverlag GmbH.
- Kerkar, S.P. et al., 2011. IL-12 triggers a programmatic change in dysfunctional myeloid-derived cells within mouse tumors. *The Journal of clinical investigation*, 121(12), pp.4746–57.
- Koblish, H.K. et al., 1998. Immune suppression by recombinant interleukin (rIL)-12 involves interferon gamma induction of nitric oxide synthase 2 (iNOS) activity: inhibitors of NO generation reveal the extent of rIL-12 vaccine adjuvant effect. *The Journal of experimental medicine*, 188(9), pp.1603–10.
- Koch, M. et al., 2006. Tumor infiltrating T lymphocytes in colorectal cancer: Tumorselective activation and cytotoxic activity in situ. *Annals of surgery*, 244(6), pp.986-92; discussion 992–3.
- Krone, B. et al., 2003. Impact of vaccinations and infectious diseases on the risk of melanoma--evaluation of an EORTC case-control study. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 39(16), pp.2372–78.
- Kurzawa, H. et al., 1998. Recombinant interleukin 12 enhances cellular immune responses to vaccination only after a period of suppression. *Cancer research*, 58(3), pp.491–9.
- Lasarte, J.J. et al., 1999. Different doses of adenoviral vector expressing IL-12 enhance or depress the immune response to a coadministered antigen: the role of nitric oxide. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(9), pp.5270–77.
- Leonard, J.P. et al., 1997. Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. *Blood*, 90(7), pp.2541–8.
- Lieschke, G.J. et al., 1997. Bioactive murine and human interleukin-12 fusion proteins which retain antitumor activity in vivo. *Nature biotechnology*, 15(1), pp.35–40.

- Liu, F.-F. et al., 2008. The specific immune response to tumor antigen CP1 and its correlation with improved survival in colon cancer patients. *Gastroenterology*, 134(4), pp.998–1006.
- Lode, H.N. et al., 1998. Gene therapy with a single chain interleukin 12 fusion protein induces T cell-dependent protective immunity in a syngeneic model of murine neuroblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), pp.2475–80.
- Mantke, R. et al., 2011. Incidence of synchronous liver metastases in patients with colorectal cancer in relationship to clinico-pathologic characteristics. Results of a German prospective multicentre observational study. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, pp.1–7.
- Mantovani, A. et al., 2008. Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203), pp.436–44.
- Mazzolini, G. et al., 2001. Genetic heterogeneity in the toxicity to systemic adenoviral gene transfer of interleukin-12. *Gene therapy*, 8(4), pp.259–67.
- McKenzie, B.S., Kastelein, R.A. & Cua, D.J., 2006. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends in immunology*, 27(1), pp.17–23.
- Mlecnik, B. et al., 2010. Biomolecular network reconstruction identifies T-cell homing factors associated with survival in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 138(4), pp.1429–40.
- Muruve, D.A., 2004. The innate immune response to adenovirus vectors. *Human gene therapy*, 15(12), pp.1157–66.
- Nguyen, L.T. et al., 2002. Tumor growth enhances cross-presentation leading to limited T cell activation without tolerance. *The Journal of experimental medicine*, 195(4), pp.423–35.

- Nosho, K. et al., 2010. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *The Journal of pathology*, 222(4), pp.350–66.
- Pagès, F. et al., 2009. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(35), pp.5944–51.
- Pertl, U. et al., 2001. IFN-gamma-inducible protein-10 is essential for the generation of a protective tumor-specific CD8 T cell response induced by single-chain IL-12 gene therapy. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(11), pp.6944–51.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), p.e45.
- Pipkin, M.E. et al., 2010. Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity*, 32(1), pp.79–90.
- Rentzsch, C. et al., 2003. Evaluation of pre-existent immunity in patients with primary breast cancer: molecular and cellular assays to quantify antigen-specific T lymphocytes in peripheral blood mononuclear cells. *Clinical cancer research : an* official journal of the American Association for Cancer Research, 9(12), pp.4376– 86.
- Robert Koch Institut, 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes: Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends,
- Romero, P. et al., 1998. Ex vivo staining of metastatic lymph nodes by class I major histocompatibility complex tetramers reveals high numbers of antigenexperienced tumor-specific cytolytic T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*, 188(9), pp.1641–50.

- Rosenberg, S.A. et al., 2005. Tumor progression can occur despite the induction of very high levels of self/tumor antigen-specific CD8+ T cells in patients with melanoma. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(9), pp.6169–76.
- Sacks, D. & Noben-Trauth, N., 2002. The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. *Nature reviews. Immunology*, 2(11), pp.845–58.
- Sakaguchi, S., 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature immunology*, 6(4), pp.345–52.
- Sakamoto, T. et al., 2006. Interleukin-10 expression significantly correlates with minor CD8+ T-cell infiltration and high microvessel density in patients with gastric cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 118(8), pp.1909–14.
- Schlub, T.E. et al., 2010. Predicting CD62L expression during the CD8+ T-cell response in vivo. *Immunology and cell biology*, 88(2), pp.157–64.
- Smyth, M.J., Dunn, G.P. & Schreiber, R.D., 2006. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. G. D. James P. Allison and Frederick W. Alt BT -Advances in Immunology, ed. Advances in immunology, 90, pp.1–50.
- Spiotto, M.T. et al., 2002. Increasing tumor antigen expression overcomes "ignorance" to solid tumors via crosspresentation by bone marrow-derived stromal cells. *Immunity*, 17(6), pp.737–47.
- Sumida, S.M. et al., 2005. Neutralizing antibodies to adenovirus serotype 5 vaccine vectors are directed primarily against the adenovirus hexon protein. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174(11), pp.7179–85.

- Tacchini-Cottier, F., Weinkopff, T. & Launois, P., 2012. Does T Helper Differentiation Correlate with Resistance or Susceptibility to Infection with L. major? Some Insights From the Murine Model. *Frontiers in immunology*, 3(February), p.32.
- Thomas, L., 1959. *Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States: A Symposium at the New York Academy of Medicine* 1th ed. H. Sherwood Lawrence, ed., Paul B. Hoeber Inc.
- Trinchieri, G., 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature reviews. Immunology*, 3(2), pp.133–46.
- Uekusa, Y. et al., 2002. A pivotal role for CC chemokine receptor 5 in T-cell migration to tumor sites induced by interleukin 12 treatment in tumor-bearing mice. *Cancer research*, 62(13), pp.3751–8.
- Umansky, V., 2010. The 3rd International Conference on Cancer Vaccines/Adjuvants/Delivery for the Next Decade (CVADD): meeting highlights. 11-13 November, 2009, Dublin, Ireland. *Immunotherapy*, 2(2), pp.151–4.
- Valmori, D. et al., 2000. Naturally occurring human lymphocyte antigen-A2 restricted CD8+ T-cell response to the cancer testis antigen NY-ESO-1 in melanoma patients. *Cancer research*, 60(16), pp.4499–506.
- Vlachaki, M.T. et al., 2002. Impact of preimmunization on adenoviral vector expression and toxicity in a subcutaneous mouse cancer model. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 6(3), pp.342–8.
- Waehler, R. et al., 2005. Low-dose adenoviral immunotherapy of rat hepatocellular carcinoma using single-chain interleukin-12. *Human gene therapy*, 16(3), pp.307-17.
- Webster, A.C. et al., 2007. Identifying high risk groups and quantifying absolute risk of cancer after kidney transplantation: a cohort study of 15,183 recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of*

Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons, 7(9), pp.2140-51.

- Weiss, J.M. et al., 2007. Immunotherapy of cancer by IL-12-based cytokine combinations. *Expert opinion on biological therapy*, 7(11), pp.1705–21.
- Wen, T., Bukczynski, J. & Watts, T.H., 2002. 4-1BB ligand-mediated costimulation of human T cells induces CD4 and CD8 T cell expansion, cytokine production, and the development of cytolytic effector function. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(10), pp.4897–906.
- Xu, D.-P. et al., 2005. The systemic administration of Ig-4-1BB ligand in combination with IL-12 gene transfer eradicates hepatic colon carcinoma. *Gene therapy*, 12(20), pp.1526–33.

10 Danksagung

"Das Schönste, was wir entdecken können, ist das Geheimnisvolle." Albert Einstein (1879-1955)

Für die zunächst geheimnisvollen dann zunehmend klarer werdenden Einblicke in die Immunologie und Gentherapie möchte ich danken:

Insbesondere Frank, Andrea, Ulrike, Marius, Karim, Julia die mich bei allen Fragen immer unterstützt haben.

Allen Mitarbeitern, Doktoranden und Diplomanden des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie II für die gemeinsamen sportlichen Stunden am Kicker und die große Hilfsbereitschaft.

Meiner Mutter Anna und meinen Schwiegereltern Gabriele und Günther für ihre Bereitschaft mir als Korrektoren beiseite zu stehen.

Meiner Frau Carolin und meiner kleinen Tochter Marlene für die schier unermessliche Geduld und den Zuspruch.

11 Lebenslauf

Constantin Emanuel Biermann

12 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Ahrensburg im Frühjahr 2014

Constantin Biermann