

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik I  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. C.-T. Germer  
Abteilung für Molekulare Onkoimmunologie  
Leiterin: Frau Professor Dr. A. M. Waaga-Gasser

**Untersuchung zur Wirksamkeit eines neuen anti-VEGF-Antikörpers  
in Kombination mit Rapamycin  
beim Pankreaskarzinom im C57BL/6-Mausmodell**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Meike Munt  
aus Burgkirchen

Würzburg, Mai 2011

Referent: Priv. Doz. Dr. med. M. Gasser

Koreferent: Prof. Dr. med. M. Scheurlen

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.2012

Die Promovendin ist Ärztin.

---

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Das Pankreaskarzinom .....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Klassifikation .....	1
1.1.3 Prognose und Therapie.....	3
1.2 Tumorbilogie.....	4
1.2.1 Autonome Wachstumskontrolle.....	5
1.2.2 Resistenz gegenüber der Wachstumshemmung.....	5
1.2.3 Apoptoseresistenz.....	5
1.2.4 Invasion und Metastasierung .....	6
1.2.5 Angiogenese .....	6
1.3 Gezielte Krebstherapie.....	8
1.3.1 Definition .....	8
1.3.2 Anwendung gezielter Therapeutika.....	9
1.3.3 Zielmoleküle in der gerichteten Tumorthherapie .....	9
1.3.3.1 Antiangiogenetisch wirksame Substanzen.....	10
1.3.3.2 Der VEGF-Signalweg.....	11
1.3.3.3 mTOR-Inhibitoren am Beispiel des Rapamycins .....	13
1.4 Die Tumorimmunantwort .....	15
1.4.1 Dendritische Zellen .....	16
1.4.2 T-Helferzellen.....	16
1.4.2.1 Th1-Zellen.....	17
1.4.2.2 Th2-Zellen.....	18
1.4.2.3 Th1-/Th2-Immunantwort .....	19
1.4.3 Zytotoxische T-Zellen.....	19
1.4.4 Regulatorische T-Zellen .....	20
1.4.5 Immunologische Escape-Mechanismen.....	21
1.4.5.1 TGF- $\beta$ .....	21
1.4.5.2 Fas und Fas Ligand .....	22
1.4.5.3 Die B7-Signal-Familie .....	22

---

<b>2</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>25</b>
3.1	Tiere	25
3.2	Tumorzellen	25
3.3	Vorbereitung der Zellen für die Injektion	26
3.4	Operation	26
3.5	Behandlung der Tiere	27
3.5.1	Kontrollantikörper	27
3.5.2	Anti-VEGF-Antikörper	27
3.5.3	Rapamycin	27
3.6	Versuchsansätze	28
3.6.1	Versuchsansatz 1	28
3.6.2	Versuchsansatz 2	29
3.6.3	Versuchsansatz 3	29
3.7	Organentnahme	29
3.8	Vorbereitung zur Real-Time PCR	30
3.8.1	RNA-Extraktion	30
3.8.2	cDNA-Synthese	31
3.9	Real-Time PCR	31
3.9.1	Verwendete Materialien	32
3.9.2	Reaktionsansatz für die Real-Time PCR	34
3.9.3	Auswertung der PCR-Daten	35
3.9.4	Berechnung des FoldFactors	36
3.10	Immunhistologie	37
3.10.1	Verwendete Antikörper	38
3.10.2	Auswertung der Immunhistologie	39
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
4.1	Überlebenszeit	41
4.2	Makroskopisches Tumorwachstum	42

---

4.3	Real-Time PCR- und immunhistologische Ergebnisse .....	45
4.3.1	T-Zellpopulationen .....	46
4.3.1.1	T-Helferzellen .....	46
4.3.1.2	Zytotoxische T-Zellen.....	48
4.3.1.3	Regulatorische T-Zellen.....	50
4.3.2	Th1-/Th2-Immunantwort.....	57
4.3.2.1	Interleukin-2 .....	57
4.3.2.2	TNF- $\alpha$ .....	58
4.3.3	Die B7-Signal-Familie .....	63
4.3.4	TGF- $\beta$ .....	71
4.3.5	VEGF .....	75
<b>5</b>	<b>Beantwortung der Fragestellung .....</b>	<b>77</b>
5.1	Beurteilung des Tumorwachstums in der Leber .....	77
5.2	Auswirkungen der Behandlung mit Rapamycin und anti-VEGF-Antikörper auf das Tumorwachstum und die Überlebenszeit.....	77
5.3	Angiogenetische Faktoren.....	79
5.4	T-Zell-Populationen .....	80
5.5	Th1-/Th2-Immunantwort.....	82
5.6	Klinischer Bezug.....	83
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>87</b>
6.1	Wirkung der gezielten Krebstherapie .....	87
6.1.1	Wirksamkeit der Monotherapie mit Rapamycin .....	87
6.1.2	Wirksamkeit der Monotherapie mit einem anti-VEGF-Antikörper .....	88
6.1.3	Wirksamkeit der Kombinationstherapie .....	90
6.1.4	Dosisfindung des Rapamycins .....	91
6.1.5	Überprüfung der Effektivität der Kombinationsbehandlung .....	92
6.2	Die Tumorummunantwort .....	93
6.2.1	T-Zell-Populationen.....	93
6.2.1.1	T-Helferzellen .....	94
6.2.1.2	Zytotoxische T-Zellen.....	95
6.2.1.3	Regulatorische T-Zellen.....	96

---

6.2.2	Th1-/Th2-Immunantwort.....	97
6.2.2.1	Interleukin-2.....	98
6.2.2.2	TNF- $\alpha$ .....	99
6.2.3	Immunologische Escape-Mechanismen.....	100
6.2.3.1	Die B7-Signal-Familie.....	100
6.2.3.2	TGF- $\beta$ .....	103
6.3	Klinische Anwendung.....	105
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>107</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>111</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>117</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>120</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

Ang-1/-2	Angiopoetin-1/-2
APC	antigen presenting cell (antigenpräsentierende Zelle)
B7-H1	B7 homolog-1
bFGF	basic fibroblast growth factor (basischer Fibroblastenwachstumsfaktor)
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
CALGB	Cancer and Leukemia Group B
CDA	cyclin dependent kinase (cyklinabhängige Kinase)
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CD $n$	cluster of differentiation $n$ (Differenzierungscluster $n$ ) ( $n = 4, 8, 8\alpha, 25, 28, 56$ )
COX2	Cyclooxygenase 2
CTL	cytotoxic T-lymphocyte (zytotoxischer T-Lymphozyt)
DAB	diaminobenzidine (Diaminobenzidin)
DC	dendritic cell (dendritische Zelle)
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate (Desoxynukleotidtriphosphat)
dUTP	deoxyuridine triphosphate (Desoxyuridintriphosphat)
EC	endothelial cell (Endothelzelle)
ECM	extracellular matrix (Extrazellulärmatrix)
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid (Äthylendiamintetraessigsäure)
EGF	epidermal growth factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	epidermal growth factor receptor (epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (enzymgebundener Immunadsorptionstest)
Fa.	Firma
FACS	fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FGF	fibroblast growth factor (Fibroblastenwachstumsfaktor)

---

FKBP12	FK506 binding protein1A, transcript variant 12A (FK506 bindendes Protein 1A, Transkriptionsvariante 12A)
Foxp3	forkhead box protein 3 (Forkhead-Box-Protein 3)
G <sub>0</sub>	Ruhephase des Zellzyklus
G <sub>1</sub>	Genitalentwicklungsstadium 1
GAPDH	glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase)
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell (Nabelschnurendothelzelle)
H <sub>2</sub> O	Wasser
IFN-γ	Interferon-γ
IGF-1/-2	insulin-like growth factor-1/-2 (insulinartiger Wachstumsfaktor-1/-2)
IgG	Immunglobulin G
IL- <i>n</i>	Interleukin- <i>n</i> ( <i>n</i> = 2, 4, 6, 10, 13)
Max	MYC associated factor X (MYC assoziierter Faktor X)
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumdichlorid
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MMPI	Matrix-Metalloproteinase-Inhibitor
mRNA	messenger ribonucleic acid (Botenribonukleinsäure)
mTOR	mammalian target of rapamycin (Ziel des Rapamycins im Säugetier)
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	nuclear factor kappa B (nukleärer Faktor kappa B)
NO	nitric oxide (Stickstoffmonoxid)
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PD-1	programmed death 1 (programmierter Zelltod 1)
PDGF	plateled-derived growth factor (thrombozytenabgeleiteter Wachstumsfaktor)
PDL-1/-2	programmed cell death ligand-1/-2 (programmierter Zelltodligand-1/-2)
PLGF	placental growth factor (plazentarer Wachstumsfaktor)



---

pRb	retinoblastoma protein (Retinoblastomprotein)
p53	protein 53
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TAP	transporter associated with antigen processing (mit der Antigenprozessierung assoziierter Transporter)
TGF- <i>n</i>	transforming growth factor- <i>n</i> (transformierender Wachstumsfaktor- <i>n</i> ) ( <i>n</i> = $\alpha$ , $\beta$ 1, $\beta$ )
Th1/Th2	T-helper cell type 1 / T-helper cell type 2 (T-Helferzelle Typ 1/ T-Helferzelle Typ 2)
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$ (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ )
TNM	Tumor / Nodus / Metastase
Treg	T-regulatory cell (regulatorische T-Zelle)
tRNA	transfer ribonucleic acid (Transferribonukleinsäure)
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
UICC	Union Internationale Contre Le Cancer
u.a.	unter anderem
u.v.m.	und vieles mehr
VEGF $n$	vascular endothelial growth factor <i>n</i> (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor <i>n</i> ) ( <i>n</i> = A, B, C, D)
VEGI	vascular endothelial growth inhibitor (vaskulärer Wachstumsinhibitor)
VEGFR- <i>n</i>	vascular endothelial growth factor receptor- <i>n</i> (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor- <i>n</i> ) ( <i>n</i> = 1, 2, 3)
VPF	vascular permeability factor (vaskulärer Permeabilitätsfaktor)
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom stellt aufgrund seiner hohen Letalität bei weltweit steigender Inzidenz mittlerweile die vierthäufigste Krebstodesursache in den USA dar [1]. In 80 % der Fälle erfolgt die Diagnosestellung in einem bereits metastasierten Stadium, sodass die Therapiemöglichkeiten stark eingeschränkt sind.

### 1.1.1 Epidemiologie

In den letzten 40 Jahren hat sich die Inzidenz des Pankreaskarzinoms verdreifacht und entspricht momentan annähernd der Mortalität der Erkrankung [2]. Derzeit beträgt in Deutschland die Inzidenz bei Männern 7/100 000 und bei Frauen 4/100 000 Einwohnern bei einem mittleren Erkrankungsalter zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr. Männer sind damit im Vergleich zu Frauen häufiger von der Erkrankung betroffen (1,5 - 2 : 1) [3].

Die Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist weitgehend ungeklärt. Als Risikofaktoren gelten das Alter, Geschlecht, Rauchen (20 - 30 %) und die chronische Pankreatitis mit einem 5- bis 15fach erhöhten Karzinomrisiko. Diskutiert werden zudem Diabetes und Übergewicht [4]. Ein vermuteter Zusammenhang zwischen Pankreaskarzinom und Alkoholkonsum konnte bisher nicht nachgewiesen werden [3]. Untersuchungen zeigten, dass bei etwa 10 % der Patienten mit Pankreaskarzinom eine genetische Disposition vorliegt [2]. So ist das Erkrankungsrisiko bei autosomal-dominant vererbter hereditärer Pankreatitis 70 bis 100fach erhöht. Auch bei Patienten mit zystischer Fibrose besteht ein ca. 5fach erhöhtes Pankreaskarzinomrisiko. Für das familiär gehäuft auftretende Pankreaskarzinom mit einem 57fach erhöhten Risiko konnte die genetische Ursache auf dem langen Arm des Chromosoms 4 lokalisiert werden [3].

### 1.1.2 Klassifikation

Häufigster maligner Tumor des Pankreas ist das duktale Pankreaskarzinom, das vom Gangepithel ausgeht (80 %) [2]. Daneben gibt es zahlreiche seltener vorkommende exokrine Malignome (5-10 %), wie das Riesenzellkarzinom, das Zystadenokarzinom, das Azinuszellkarzinom oder die intraduktal papillär-muzinöse Neoplasie des

Pankreas. 70-80 % aller Pankreaskarzinome entstehen im Pankreaskopf. Aufgrund der unspezifischen Symptomatik des Pankreaskarzinoms erfolgt die Diagnosestellung meist in einem bereits fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung. Der Symptomenkomplex umfasst in den Rücken ausstrahlende Oberbauchschmerzen, Gewichtsverlust von etwa 1-2 kg/Monat und bei Pankreaskopfkarzinomen des Öfteren einen Ikterus durch Stenose des Ductus pancreaticus und Ductus choledochus („double duct sign“). Auch die Infiltration der Nervenscheiden, die die charakteristischen Rückenschmerzen verursacht, ist typisch für die Tumorbiologie [3]. Das Pankreaskarzinom metastasiert in zwei Drittel der Fälle zunächst lymphogen. Eine hämatogene Metastasierung erfolgt meist in die Leber (80 %), die Lunge (50 %) oder seltener in die Nebennieren, Nieren, Pleura, Peritoneum und Skelett [3]. Die Einteilung des Pankreaskarzinoms erfolgt wie bei den meisten onkologischen Erkrankungen anhand der TNM-Klassifikation (Tabelle 1).

**Tabelle 1:** TNM-Klassifikation exokriner Pankreastumore [3]

<b>Primärtumor (T)</b>	
Tx	Primärtumor nicht beurteilbar
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor begrenzt auf Pankreas, ≤ 2 cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor begrenzt auf Pankreas, > 2 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor breitet sich direkt in Duodenum, Ductus choledochus und/oder peripankreatisches Gewebe aus
T4	Tumor breitet sich direkt in Magen, Milz, Kolon und/oder benachbarte große Gefäße aus
<b>Regionäre Lymphknoten (N)</b>	
Nx	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
N1a	Metastase in einem einzelnen regionären Lymphknoten
N1b	Metastasen in mehreren regionären Lymphknoten
<b>Fernmetastasen (M)</b>	
Mx	Fernmetastasen nicht beurteilbar
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Während die TNM-Klassifikation zur Einteilung und Beschreibung des Pankreaskarzinoms benützt wird, bezieht die Stadieneinteilung der UICC zusätzlich die Prognose mit ein (Tabelle 2 in 1.1.3).

### 1.1.3 Prognose und Therapie

Das Pankreaskarzinom weist ein besonders aggressives und invasives Wachstumsverhalten und damit eine sehr schlechte Prognose für den Patienten auf. Die mittlere Überlebenszeit beträgt weniger als sechs Monate [2], die 5-Jahresüberlebensrate nur 0,4-4 % [1].

**Tabelle 2:** Stadieneinteilung und Prognose des exokrinen Pankreaskarzinoms [3]

Stadium	TNM-System	Medianes Überleben (Monate)	2-Jahresüberlebensrate (%)
0	Tis, N0, M0		
I	T1, N0, M0	12-20	20-45
	T2, N0, M0		
II	T3, N0, M0		
III	T1, N1, M0	6-10	10-15
	T2, N1, M0		
	T3, N1, M0		
IVa	T4, jedes N, M0	3-6	0
IVb	jedes T, jedes N, M1		

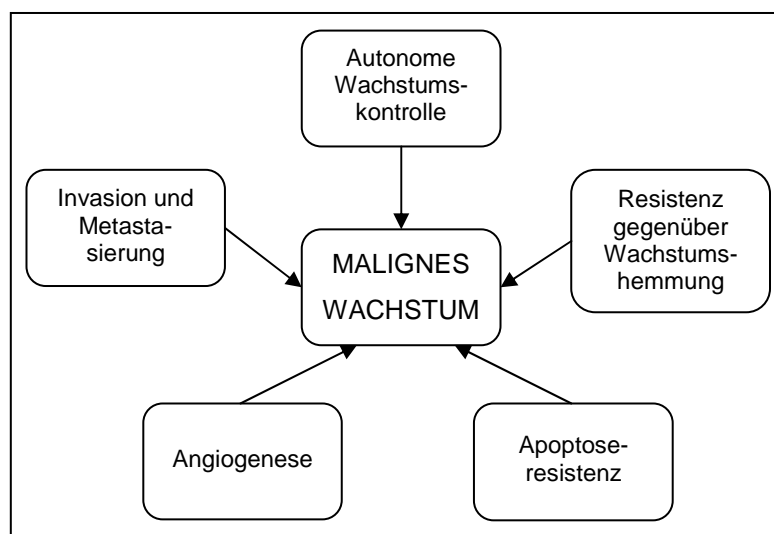
Die einzige Möglichkeit auf Heilung besteht in der chirurgischen Resektion, wobei nur 15-20 % der Patienten einen resezierbaren Tumor aufweisen [5]. Als Standardoperation bei Pankreaskopfkarzinomen gilt in der Regel die pyloruserhaltende Duodenopankreatektomie mit einer mehr oder weniger radikalen Lymphknotendissektion [2]. Doch selbst in diesem frühen Stadium beträgt die Langzeitüberlebensrate postoperativ nur 20 % [1]. Daher wird selbst nach einer kompletten Resektion eine adjuvante Chemotherapie empfohlen. Als Standard hat sich seit Ende der 90er Jahre eine Monotherapie mit Gemcitabin durchgesetzt, die mit einer Steigerung der 3-Jahresüberlebensrate von 20,5 % auf 34 % und einer Verbesserung der mittleren Überlebenszeit von 20,5 auf 24,2 Monate im Vergleich zur nicht nachbehandelten Kontrollgruppe die besten Resultate erzielte [5].

Annähernd 80 % der Patienten weisen zum Zeitpunkt der Diagnose einen bereits lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Tumor auf. Die mittlere Überlebenszeit beträgt dann nur noch 6 bis 9 Monate [1]. Als mögliche Therapieoption steht bei inoperablen Stadien der Erkrankung die Chemotherapie und Chemoradiotherapie zur Verfügung, wobei das Pankreaskarzinom als wenig chemo- und radiotherapieempfindlich gilt [3]. Auch im fortgeschrittenen und metastasierten Stadium ist die Monotherapie mit Gemcitabin die Standardtherapie. Mit dieser konnte das mediane Überleben im metastasierten Stadium von 2,0 auf 3,8 Monate gesteigert werden. Eine Kombinationstherapie mit mehreren Chemotherapeutika sowie eine zusätzliche Bestrahlung brachten bislang keine überzeugenden Ergebnisse [6]. Bei Versagen der Standardtherapie mit Gemcitabin gibt es jedoch keine etablierte *Second-Line* Therapie, sodass die weitere Behandlung nur im Rahmen von verschiedenen klinischen Studien angeboten wird [7].

Da trotz Chemotherapie die Prognose von Patienten mit Pankreaskarzinom immer noch sehr schlecht ist, werden dringend neue Therapiestrategien benötigt. Um Ansätze für neue Behandlungsmethoden entwickeln zu können, sind entsprechende Kenntnisse über die Tumorbilogie unentbehrlich.

## 1.2 Tumorbilogie

Tumorbilogisch ist das maligne Wachstum durch fünf verschiedene Eigenschaften charakterisiert (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Darstellung charakteristischer Tumoreigenschaften. Karzinome unterschiedlicher Entitäten erwerben während ihrer Entstehung die gleichen funktionalen Eigenschaften.

### **1.2.1 Autonome Wachstumskontrolle**

Normale Zellen benötigen mitogene Wachstumsfaktoren, um aus einem ruhenden Zustand in einen aktiven Proliferationsstatus zu wechseln. Tumore dagegen zeichnen sich durch eine autonome Wachstumskontrolle aus, d.h. sie sind weitgehend unabhängig vom umgebenden Normalgewebe. Das erreichen sie unter anderem durch das Imitieren von Wachstumsfaktoren mittels Onkogenen sowie durch Überexpression von Wachstumsfaktorrezeptoren [8].

### **1.2.2 Resistenz gegenüber der Wachstumshemmung**

Ein weiteres Merkmal von Tumorzellen ist die Resistenz gegenüber der Wachstumshemmung [3]. Im Normalgewebe wirken wachstumshemmende Faktoren auf zwei verschiedene Arten, und zwar durch Überführung der Zellen aus dem aktiven Proliferationsstatus in den ruhenden  $G_0$ -Status sowie durch Ausdifferenzierung und Überführung der Zellen in einen postmitotischen Status. Eine Schlüsselrolle spielt dabei sowohl das antiproliferative Retinoblastomprotein (pRb) als auch TGF- $\beta$ , das unter anderem die Phosphorylierung und damit die Inaktivierung von pRb verhindert. Tumore schaffen es, beispielsweise durch Ausschaltung des pRbs mittels Genmutation die Wachstumshemmung zu umgehen. Zudem vermeidet der Tumor durch Überexpression des Onkogens c-Myc und Myc-Max-Komplexbildung eine endgültige Ausdifferenzierung der Zellen [8].

### **1.2.3 Apoptoseresistenz**

Ein anderes Kennzeichen von malignem Wachstum ist die erworbene Resistenz gegenüber Apoptose. Die apoptotischen Vorgänge in normalen Zellen umfassen sensorische und effektorische Komponenten. Zu ersteren gehören Zelloberflächenrezeptoren, die der Zelle Überlebenssignale übermitteln, wie z.B. IGF-1/IGF-2, oder der Zelle nach Detektion von z.B. Zellschäden apoptotische Signale geben. Solche Todessignale sind beispielsweise Fas und TNF- $\alpha$ . Ebenfalls zu den sensorischen Faktoren zählt das Tumorsuppressorgen p53, das nach Hochregulierung des proapoptotischen Proteins Bax Apoptose auslöst. Die effektorischen Faktoren, wie z.B. Caspasen, führen anschließend durch kontrollierten Abbau der Zellstrukturen die Apoptose aus. Tumorzellen gelingt es aber, beispielsweise durch Inaktivierung von p53 anhand von Genmutation, den Hauptregulator der Apoptose auszuschalten und damit eine Apoptoseresistenz zu erreichen [8].

### **1.2.4 Invasion und Metastasierung**

Die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung ermöglicht es einem Karzinom letztendlich, neben dem Primärtumor neue Tumornester an anderer Stelle des Körpers zu bilden. Dazu muss der Tumor die Funktionalität einiger Proteine beeinflussen, die zur Gruppe der Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle sowie zur Gruppe der Integrine gehören, die die Verbindung der Zellen zur Extrazellulärmatrix regeln. Die funktionale Ausschaltung von E-cadherin, das als Suppressor von Invasion und Metastasierung agiert, spielt dabei eine zentrale Rolle. Ein weiterer Punkt ist die Aktivierung extrazellulärer Proteasen durch den Tumor. Dies ermöglicht malignen Zellen die Invasion in das nahe gelegene Stroma und Blutgefäße sowie die Migration durch Epithelien [8].

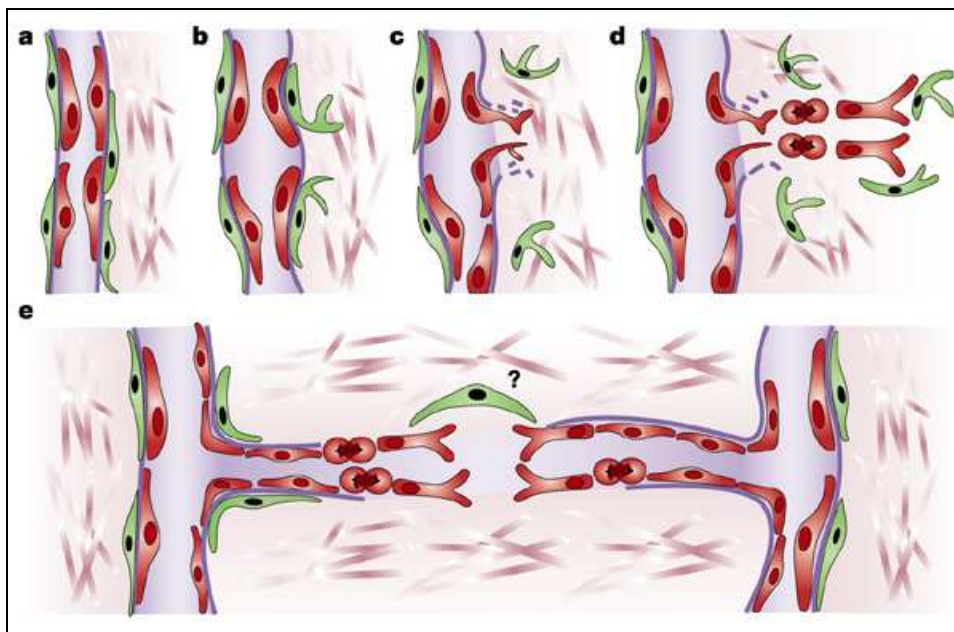
### **1.2.5 Angiogenese**

Die Angiogenese ist ein biologischer Prozess, bei dem Endothelzellen sowie endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark neue Blutgefäße bilden [9]. Während beim Embryo Blutgefäße von Angioblasten neu gebildet werden, findet die Gefäßneubildung beim Erwachsenen durch Aussprossen endothelialer Zellen aus bereits existierenden Blutgefäßen statt. Außer in den weiblichen Reproduktionsorganen, dem physiologischen Wachstum und der Wundheilung ruht die Angiogenese im Erwachsenenalter für gewöhnlich [10].

Jedoch spielt bei einer Reihe von pathologischen Prozessen, z.B. chronischen Entzündungen, rheumatoider Arthritis, Psoriasis und Krebs, die Aktivierung der Gefäßneubildung eine zentrale Rolle. Während bei chronischen Entzündungen und anderen Pathologien die Vaskularisation meist durch infiltrierende Leukozyten und Zytokine wie TGF- $\beta$  und TNF $\alpha$  ausgelöst wird, sind in Karzinomen die Tumorzellen dafür verantwortlich [11]. So gehört die Fähigkeit, Angiogenese zu induzieren und aufrechtzuerhalten – auch angiogenetischer Switch genannt – zu den charakteristischen Zeichen von Karzinomen [8]. Normalerweise wird die angiogenetische Balance auf der einen Seite durch antiangiogenetische Moleküle (Endostatin, Canstatin, Arrestin) und auf der anderen Seite durch proangiogenetische Faktoren (VEGF, PDGF und Ang-2) erhalten [10]. Durch physiologische Stimuli, wie z.B. Hypoxie, die durch eine wachsende Tumormasse entsteht, oder aber auch durch Onkogenaktivierung, Tumorsuppressorgenmutation, Aktivierung der Expression von einigen angiogenetischen Markern sowie durch Überführen der endothelialen Zellen

aus dem ruhenden in einen angiogenetischen Zustand wird das Gleichgewicht zugunsten der Aktivierung der Angiogenese verschoben und ermöglicht so dem Tumor weiteres Wachstum [9].

Der Prozess der Angiogenese beginnt mit der durch VEGF induzierten Vasodilatation und der vermehrten Gefäßdurchlässigkeit bereits bestehender Kapillaren. Daraufhin verlassen Plasmaproteine die Gefäße und bilden im umliegenden Gewebe eine provisorische Matrix. Nach Abbau der lokal gelegenen Basalmembran und Extrazellulärmatrix wandern Endothelzellen durch die perivaskulären Lücken, proliferieren und bilden neben dem Aufbau einer neuen Basalmembran und der Anlagerung von Perizyten ein Gefäßlumen. Der letzte Schritt der Gefäßneubildung beinhaltet die Fusionierung zweier Sprosse miteinander, um eine Zirkulation zu gewährleisten (Abbildung 2) [10, 12].



**Abbildung 2:** Ausbildung neuer Blutgefäße. Blutgefäße in Tumoren entstehen aus bereits existierenden Kapillaren (a). Vor Abbau der Basalmembran und Extrazellulärmatrix lösen sich die Perizyten (grün) und das Gefäß dilatiert (b). Daraufhin wandern endotheliale Zellen (rot) durch die perivaskulären Lücken aus (c), proliferieren (d), ordnen sich säulenförmig an und bilden ein Lumen. Gleichzeitig wird eine neue Basalmembran gebildet und Perizyten lagern sich an. Schließlich fusionieren die Sprosse miteinander und bilden ein neues Zirkulationssystem (e); aus [10].

Bei der im Gegensatz zum Normalgewebe unkontrolliert ablaufenden Angiogenese im Tumor besteht ein großer Unterschied zwischen der Architektur der Tumorgefäße und der des normalen Blutversorgungssystems. So sind die Blutgefäße im Tumor unregelmäßig geformt, erweitert, gewunden und können blind enden. Es gibt keine Einteilung in Venen, Arterien und Kapillaren wie im physiologischen Kreislauf. Das



Gefäßnetz von Tumoren ist außerdem oft undicht und hämorrhagisch, was auf eine Überproduktion von VEGF, der auch vaskulärer Permeabilitätsfaktor (VPF) genannt wird, zurückzuführen ist. Die perivaskulären Zellen, die normalerweise dicht am Endothelium liegen, sind bei Karzinomen häufig nur locker angeordnet und in geringerer Anzahl vorhanden. Der Blutfluss bei Tumoren ist unregelmäßig, langsamer, manchmal sogar stehend und führt gelegentlich zu funktionslosen Kapillaren [9]. So spiegeln die strukturellen und funktionalen Veränderungen in den Tumorgefäßen die pathologische Art der Angiogenese von Tumoren wider.

Abhängig vom Tumortyp und der Tumorumgebung kann ein Karzinom zu den unterschiedlichsten Stadien der Erkrankung die Kontrolle über die Angiogenese erlangen. Es gibt Tumoren, wie z.B. das Astrozytom, die für ihr Wachstum keine Neovaskularisation benötigen [10]. Ferner zeigte sich, dass die Dichte der Gefäßneubildungen eines Tumors nichts über dessen Aggressivität aussagt [13]. Es steht aber fest, dass die Tumorangiogenese einen wichtigen Ansatzpunkt für die alternative Krebsbehandlung darstellt.

### **1.3 Gezielte Krebstherapie**

Da die bisherigen Therapieverfahren für das Pankreaskarzinom keine überzeugenden Verbesserungen gebracht haben, was die Langzeitüberlebenszeit oder die Heilung dieser Erkrankung betrifft, rücken Therapiestrategien, die auf die im Abschnitt 1.2 aufgeführten Tumoreigenschaften zielen, immer weiter in den Vordergrund [8].

#### **1.3.1 Definition**

Der Begriff „Gezielte Krebstherapie“ bezieht sich auf eine neue Generation von Therapeutika, die auf spezielle molekulare Strukturen – typischerweise ein Protein – zielen, denen eine bedeutende Rolle im Tumorwachstum zugeschrieben wird [14]. Im Gegensatz zur konventionellen Chemotherapie, die sich gegen alle sich schnell teilenden Zellen richtet und die damit aber nicht nur Tumorzellen, sondern auch Blutzellen, Zellen in den Haarfollikeln sowie Zellen des Gastrointestinaltraktes angreift, wirkt die gezielte Therapie spezifischer und damit nebenwirkungsärmer [15].

### **1.3.2 Anwendung gezielter Therapeutika**

Eine Art gezieltes Therapeutikum stellen monoklonale Antikörper dar. Diese unterdrücken die Funktion von Oberflächenmolekülen, markieren Tumorzellen für die Komplement-vermittelte Lyse oder agieren wie immunologische Effektorzellen. Sie können aber auch Wirkstoffe, radioaktive Isotope, Zytokine oder Toxine zu den Tumorzellen transportieren [16]. In Phase-II- und -III-Studien werden bereits bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom monoklonale Antikörper (z.B. Cetuximab (anti-EGFR-Antikörper) sowie Trastuzumab und Bevacizumab (anti-VEGF-Antikörper)) eingesetzt. Daneben werden auch kleine Moleküle (z.B. Gefitinib und Erlotinib (beides EGFR-Inhibitoren)), Proteininhibitoren (z.B. Marimastat (Matrix-metalloproteinase Inhibitor)) und Anti-Sense-Therapeutika (z.B. GTI-2501) angewendet. Letztere binden in der Zelle an die mRNA und machen die enthaltene Information unlesbar, sodass die Herstellung des Proteins gestoppt wird [15, 17].

### **1.3.3 Zielmoleküle in der gerichteten Tumortherapie**

Die Identifikation der Zielmoleküle für die spezielle Krebstherapie beruht auf dem Verständnis, welchen molekularen Veränderungen ein Tumor unterliegt [14]. So liegt eine der Ursachen für Karzinome in der durch Mutation defekten Genregulation, die mit einer Überproduktion oder veränderten Expression von Proteinen das Wachstum und die Entwicklung eines Tumors begünstigt [15]. Daher könnten Wirkstoffe als Therapeutika geeignet sein, deren Ziel auf molekularer Ebene die Wege der Signaltransduktion sind, die in der Tumorzellproliferation, Invasion und Tumorangiogenese eine Rolle spielen [18]. Als potenzielles Zielmolekül gelten die Cyclin-abhängigen Kinasen, die den Zellzyklus regulieren, aber auch eine Reihe von Markern der Signaltransduktion, bei denen sich in Tumoren häufig Mutationen finden, wie z.B. Myc, Ras und TGF- $\beta$ . Auch die Blockade der mTOR-Aktivität, z.B. mit Rapamycin, erscheint vielversprechend, da sehr viele Signalwege über mTOR laufen und damit eine Reihe von Tumoren mit unterschiedlichen molekularen Defekten sensitiv für eine solche Behandlung sein könnte [14].

Einen weiteren wichtigen Punkt in der gezielten Krebstherapie stellt die Behandlung mit antiangiogenetisch wirksamen Substanzen dar. Auf diese sowie auf mTOR-Inhibitoren wird im Folgenden etwas detaillierter eingegangen, da in der vorliegenden Arbeit Experimente durchgeführt wurden, bei denen diese Wirkstoffe angewendet wurden.

### 1.3.3.1 Antiangiogenetisch wirksame Substanzen

Die Inhibition der Neoangiogenese stellt eine neue und vielversprechende Strategie in der Tumorthherapie dar. Denn diese Methode weist einige Vorteile gegenüber der konventionellen Therapie auf. So tritt trotz starkem Antitumoreffekt meist keine schwerwiegende Toxizität oder Tumoresistenz auf. Die Behandlung mit antiangiogenetischen Substanzen verhindert nicht nur die Tumorprogression und ermöglicht ein Abtöten der Tumorzellen durch zytotoxische Agenzien, sondern kann sogar die Tumorzellalterung induzieren sowie die Apoptose stimulieren [19]. Dabei setzen die Wirkstoffe durch Reduktion der Expression proangiogenetischer Faktoren, durch Unterdrückung der Proliferation endothelialer Zellen oder mittels Blockierung der Interaktion zwischen proangiogenetischen Faktoren und deren Rezeptoren an unterschiedlichen Stufen der Angiogenese an [9]. Während sich die Forschung in der frühen Phase der antiangiogenetischen Therapie des Pankreaskarzinoms auf den Gebrauch von Matrix-Metalloproteinase-Inhibitoren (MMPis), wie z.B. Marimastat, konzentrierte, liegt nun das Hauptaugenmerk auf Agenzien gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF). Neben einer Reihe anderer Substanzen, wie Celecoxib, einen COX-2 spezifischen Hemmer, mTOR-Inhibitoren oder EGFR-Inhibitoren ist in Tabelle 3 eine Auswahl angiogenetischer Inhibitoren sowie deren Mechanismus aufgeführt [20].

**Tabelle 3:** Angiogenese-Inhibitoren und ihr Mechanismus, nach Bian et al. [9]

Inhibitoren	Mechanismus
Ang-2	Antagonist von Ang-1
Angiostatin	Suppression der Angiogenese
Endostatin	Inhibition des Überlebens und der Migration von EC
Maspin	Proteaseinhibitor
Platelet factor-4	Inhibition der Bindung von bFGF und VEGF an EC
Thalidomid	Inhibition der TNF- und VEGF-Expression
MMP-Inhibitoren	Suppression der pathologischen Angiogenese
Vasostatin, Calreticulin	Inhibition des Wachstums von EC
Löslicher VEGFR-1	Abfangen von VEGF
VEGI	Modulation des Wachstums von EC

Abkürzungen: Ang-1 und Ang-2, Angiopoetin 1 und 2; EC, Endotheliale Zellen; MMP, Matrix-Metalloproteinase; VEGI, vaskulärer endothelialer Wachstumsinhibitor; VEGF, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor; VEGFR-1, VEGF-Rezeptor

Die Effektivität der antiangiogenetischen Substanzen ist nicht bei allen Tumoren gleich. Ihre Wirkung ist unter anderem abhängig vom Tumorstadium. So zeigte sich, dass ein differentes Therapieansprechen auf qualitative Unterschiede im Gefäßsystem zu einem früheren bzw. späteren Stadium der Erkrankung zurückzuführen ist [10]. Aufgrund der Komplexität der Angiogenese in bösartigen Tumoren ist es verständlich, dass ein einzelnes Agens, das auf einen bestimmten Punkt des angiogenetischen Prozesses gerichtet ist, oft nur begrenzten Erfolg in der Krebstherapie hat [9]. Präklinische Studien ergaben, dass die Kombination aus antiangiogenetischer und konventioneller zytotoxischer Therapie einen additiven Effekt aufweist [19]. Die antiangiogenetischen Substanzen interagieren auf eine potenzierende Art und Weise entweder mit Wirkstoffen aus derselben Sparte oder mit einer Vielzahl von anderen Krebstherapeutika, z.B. Zytostatika, sodass der antimetastasierende und antitumoröse Effekt in der Kombinationstherapie stärker ausgeprägt ist als in der Monotherapie [20]. Bei der Behandlung des metastasierten Pankreaskarzinoms geht der Trend hin zu einer Kombination aus Gemcitabin und Angiogenese-Inhibitoren [21]. Neuere Phase-III-Studien bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom, z.B. CALGB 80303 mit dem Therapieschema Bevacizumab und Gemcitabin, ergaben bisher aber keinen überzeugenden Behandlungsvorteil [21]. Dennoch gilt die Kombination von Wirkstoffen, die an verschiedenen Punkten der Angiogenese ansetzen, aber auch die Einbeziehung der antiangiogenetischen Therapeutika in die konventionelle Chirurgie, Bestrahlung und Chemotherapie als vielversprechend und weiter zu erforschen [9].

### **1.3.3.2 Der VEGF-Signalweg**

Ein geeignetes Ziel in der antiangiogenetischen Therapie stellt der VEGF-Signalweg dar, denn VEGF begünstigt über einen parakrinen und autokrinen Mechanismus das Tumorwachstum [20]. VEGF – initial vaskulärer Permeabilitätsfaktor (VPF) genannt – wurde 1983 als ein Heparin-bindendes Protein entdeckt, das als mitogener Aktivator für endotheliale Zellen agiert. Der Begriff VEGF bezieht sich auf die Lokalisation des VEGFA-Gens, das auf dem Chromosom 6p12 zu finden ist. Das Gen beinhaltet acht Exone und sieben dazwischen liegenden Introne [22]. Es werden folgende fünf Isoformen des VEGF-Proteins unterschieden: VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> und VEGF<sub>206</sub>. VEGF gehört zu einer Genfamilie, die den plazentaren Wachstumsfaktor (PLGF), VEGFB, VEGFC und VEGFD einschließt.

Während VEGFC und VEGFD die lymphatische Angiogenese regulieren, nimmt VEGF eine Schlüsselrolle im Wachstum von Blutgefäßen ein. VEGF steuert die physiologische Angiogenese in der Embryonalzeit, das Skelettwachstum, den monatlichen Reproduktionszyklus der Frau sowie die Wundheilung [23]. Dabei fördert VEGF das Wachstum vaskulärer Endothelzellen und ist gleichzeitig deren Überlebensfaktor. Vor allem Endothelzellen in neu gebildeten Gefäßen sind im Gegensatz zu bereits bestehenden Gefäßen von VEGF abhängig [24]. Im Tumorgewebe verbessert VEGF das Überleben endothelialer Zellen, induziert antiapoptotische Wege und bewirkt eine tumorassoziierte Immunsuppression [22]. Daneben vermittelt VEGF neben einer Vasodilatation eine endotheliale Fenestrierung, die es Mediatorstoffen ermöglicht, aus dem Gefäß ins umliegende Gewebe zu gelangen [23].

Die VEGF-Genexpression wird auf die unterschiedlichste Art und Weise reguliert. Hypoxie ist einer der stärksten Agonisten der VEGF-Induktion und kann die Expression von VEGF-mRNA schnell und reversibel in normalen, transformierten und tumorigenen Zellen aktivieren [22]. Außerdem regulieren auch einige Wachstumsfaktoren, wie z.B. EGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IGF-1, FGF und PDGF sowie inflammatorische Zytokine, wie z.B. IL-1 $\alpha$  und IL-6, die Expression von VEGF hoch. Eine große Rolle in der gesteigerten Produktion von VEGF nehmen auch Onkogene wie das mutierte Ras-Onkogen ein [23].

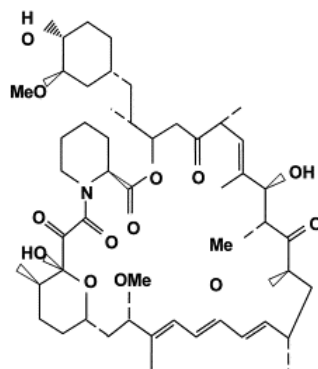
Die Bindung von VEGF erfolgt über drei verschiedene Rezeptortypen, die zur Familie der extrazellulären Tyrosinkinase-Rezeptoren gehören: VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3. VEGF-A bindet an VEGFR-1 und VEGFR-2, wobei VEGFR-2 alle bekannten VEGF-induzierten Prozesse vermittelt und VEGFR-1 die über VEGFR-2 produzierten Signale moduliert. VEGFR-3, der nur auf VEGFC und VEGFD anspricht, spielt in der Lymphangiogenese eine Rolle. Schließlich gibt es noch den VEGF-spezifischen Rezeptor Neuropilin-1, dessen Interaktion mit VEGFR-2 die Bindung von VEGF begünstigt [22]. Sowohl VEGF als auch VEGF-Rezeptoren sind im Pankreaskarzinom überexprimiert [25]. Dabei produzieren die Tumorzellen selbst den größten Anteil von VEGF. Aber auch das tumorassoziierte Stroma spielt bei der VEGF-Produktion eine wichtige Rolle [23]. In Studien zeigte sich, dass eine hohe VEGF-Expression mit einem ausgedehnten Tumorwachstum und, vor allem nach einer kurativen Resektion, mit einem Wiederauftreten des Tumors und einer schlechten Prognose verbunden ist [25, 26]. Während VEGF durchaus positive Aspekte in der Therapie von Gefäßerkrankungen, Myokardinfarkten und schlecht

heilenden Ulcera hat, rückt für die Krebstherapie dessen Blockade immer weiter in den Vordergrund [23]. Bevacizumab, ein monoklonaler anti-VEGF-Antikörper, der auch in der Therapie des Pankreaskarzinoms angewendet wird, bewirkt neben einer Inhibition der Neoangiogenese und Lymphangiogenese eine Abnahme des interstitiellen Drucks im Tumor sowie eine verbesserte Zufuhr von Chemotherapeutika zum Tumor [20]. Derzeit laufen klinische Studien mit Krebspatienten, die mit VEGF-Inhibitoren, anti-VEGFR-2-Antikörpern, kleinen die VEGFR-2 Signaltransduktion hemmenden Molekülen oder löslichen VEGF-Rezeptoren behandelt werden [23]. Ihre Ergebnisse konnten aber bisher aufgrund eines fehlenden Behandlungsvorteils nicht überzeugen [21].

### 1.3.3.3 mTOR-Inhibitoren am Beispiel des Rapamycins

Neben der anti-VEGF-Antikörpertherapie stellt auch die Behandlung mit mTOR-Inhibitoren wie Rapamycin eine vielversprechende Methode in der gezielten Krebstherapie dar [18].

Rapamycin ist ein trizyklisches Makrolidantibiotikum, das von *Streptomyces hygroscopicus* – ein aus einer Bodenprobe von den Osterinseln (Rapa Nui) isoliertes Bakterium – produziert wird und antifungizide, antitumoröse und immunsuppressive Eigenschaften aufweist [27]. Es ist auch unter dem Namen Sirolimus und unter dem Handelsnamen Rapamune bekannt. Strukturell gesehen, ist Rapamycin ein lipophiles makrozyklisches Lakton, das in den meisten organischen Lösungen löslich, in Wasser aber nahezu unlöslich ist (Abbildung 3) [28].



**Abbildung 3:** Chemische Struktur von Rapamycin; aus [28]

Die zelluläre Wirkung von Rapamycin ist in erster Linie immunsuppressiv und besteht in der Blockierung der Proliferation von T- und B-Lymphozyten und der Ausdifferenzierung der B-Zellen zu antikörperproduzierenden Zellen sowie der Inhibition des

Zellzyklus in der G<sub>1</sub>-Phase. Rapamycin bindet dazu an das Rezeptorprotein FKBP12 und bildet den Rapamycin/FKB12-Komplex, der dann mit hoher Affinität an mTOR (mammalian target of rapamycin) bindet [29]. mTOR ist eine Serin/Threonin-Kinase, die eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellwachstums, der Zellproliferation, der tRNA-Synthese, der Ribosom-Biogenese u.v.m. spielt [20]. Die Interaktion des Rapamycin/FKB12-Komplexes mit m-TOR bewirkt eine Dephosphorylierung und Inaktivierung der p70S6-Kinase, die im aktivierten Zustand die Produktion der für die Proteinsynthese und den Zellzyklus notwendigen ribosomalen Komponenten stimuliert und somit z.B. das Tumorstadium begünstigt [30].

Diese Inaktivierung, die effektiv die IL-2-Stimulierung der Leukozyten blockiert, stellt die Grundlage der erfolgreichen klinischen Anwendung von Rapamycin als präventives Mittel gegen eine Abstoßungsreaktion bei Organtransplantationen dar [30]. Bisher ist Rapamune als Immunsuppressivum vor allem nach Nierentransplantationen zugelassen und wird normalerweise in Kombination mit Kortikosteroiden oder Ciclosporin eingesetzt [31]. Rapamycin weist im Vergleich zu den üblichen Immunsuppressiva einen anderen Wirkmechanismus und ein differentes Nebenwirkungsprofil auf, nämlich eine fehlende Organtoxizität sowie eine synergistische Wirkung mit anderen Immunsuppressiva ohne überlappende Toxizität [27]. Trotzdem treten auch bei der Behandlung mit Rapamycin Nebenwirkungen auf, die nicht zu vernachlässigen sind. Dazu zählen unter anderem erhöhte Blutfettwerte, Thrombo- und Leukopenien, Wundheilungsstörungen, Lymphödeme, erhöhte Leberenzyme und Exantheme [32].

Die Wirkung von Rapamycin ist aber nicht nur auf die Zellen des Immunsystems beschränkt, sondern beeinflusst auch die Proliferation von Tumorzellen, induziert Apoptose und vermindert die Tumorangio-genese [29]. Neben dem bekannten anti-hämangiogenetischen Effekt blockiert Rapamycin außerdem die Lymphangiogenese [33]. In-vivo-Experimente in der Maus zeigten, dass durch Rapamycin die Expression von VEGFC blockiert wird und damit die Zahl der lymphatischen Gefäße in Primärtumoren sowie die Anzahl der Lymphknotenmetastasen deutlich abnehmen [34]. Zudem ist die Aktivität von mTOR bei humanen Malignomen oft gesteigert, was zu unkontrolliertem Wachstum führen kann. Insofern scheint die Inhibition von mTOR ein geeignetes Ziel in der Tumorthherapie zu sein [32]. Präklinische Studien wiesen bereits eine Verlangsamung des Tumorstadiums in verschiedenen Zellreihen und Xenograft-Modellen durch Rapamycin nach [20]. Dieser Wirkstoff und seine Derivate

erzeugten eine signifikante Wachstumsinhibition bei Brustkrebs, Prostatakarzinom, Leukämie, Melanom, Nierenzellkarzinom, Glioblastom und Pankreaskarzinom [34]. So ergab eine Studie mit einem Modell eines metastasierenden humanen Pankreaskarzinoms an Nacktmäusen, dass die antiangiogenetische Therapie mit Rapamycin alleine einen viel größeren Antitumoreffekt als die übliche Behandlung mit Gemcitabin aufwies und die Kombination beider Therapien das Tumorstadium und die Entwicklung von Metastasen über einen längeren Zeitraum deutlich reduzierte [35]. Ein ähnlich gutes Resultat brachte die Kombinationsbehandlung mit Rapamycin und einem anti-VEGF-Antikörper. Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Reduktion des primären und metastasierenden Tumorstadiums unter Rapamycin allein und in Verbindung mit einem anti-VEGF-Antikörper, wobei mit der Kombination ein signifikant erhöhter Effekt auf die Lebermetastasen erreicht werden konnte [18].

Mit genau diesem Ansatz beschäftigt sich die vorliegende Arbeit. Hierbei wurde die Wirkung von Rapamycin und anti-VEGF-Antikörper allein und in Kombination auf Panc02-Zellen in vivo am Mausmodell untersucht. Daneben wurden die Auswirkungen dieser Behandlung auf das Immunsystem betrachtet. Es folgt nun ein Überblick über die Tumorummunantwort und die damit verbundene Zytokinexpression, wobei nur auf die in dieser Arbeit untersuchten Zytokine näher eingegangen wird.

## **1.4 Die Tumorummunantwort**

Das Immunsystem spielt bei Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle. Meist liegt bei Krebspatienten eine verminderte Immunantwort vor, die sich von einer generellen Immunsuppression, wie sie bei der Behandlung mit hohen Dosen von Kortikosteroiden oder Chemotherapeutika auftritt, unterscheidet. So spricht man bei Krebserkrankungen von einer immunologischen Dysfunktion, die von den Tumorzellen und vom Tumorstroma auszugehen scheint. Diese beeinträchtigen entweder direkt die Zellen des Immunsystems in ihrer Funktion oder beeinflussen die Tumorummunantwort durch Zytokinausschüttung [36].

Generell unterscheidet man die angeborene von der adaptiven Immunabwehr, wobei erst durch ein gut koordiniertes Zusammenspiel der beiden eine komplexe Immunreaktion des Körpers zustande kommt. Während Erstere durch Makrophagen, natürliche Killerzellen (CD56-Zellen) und neutrophile Zellen ausgeführt wird, stellen die zellvermittelte Immunantwort mit den T-Lymphozyten sowie die humorale



Immunität mit den B-Lymphozyten neben den antigenpräsentierenden Zellen (APCs) die adaptive oder spezielle Immunantwort dar [37]. Des Weiteren ist zum Verständnis des Immunsystems die Differenzierung der T-Zellen in T-Helferzellen (CD4-T- oder Th1-/Th2-Zellen), zytotoxische T-Zellen (CD8-T-Zellen oder CTLs) und regulatorische T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen oder Tregs) wichtig, die alle drei unterschiedlichste Aufgaben erfüllen [38].

#### **1.4.1 Dendritische Zellen**

Die dendritischen Zellen (DCs) zählen zu den antigenpräsentierenden Zellen und gelten als die Initiatoren und Modulatoren der Immunantwort, indem sie B- und T-Lymphozyten effektiv stimulieren. Während B-Zellen, die Vorläufer von Antikörperproduzierenden Zellen, Antigene direkt über ihren B-Zell-Rezeptor erkennen, können dies T-Zellen über ihren T-Zell-Rezeptor nur, wenn sie die Antigene von APCs präsentiert bekommen. Dazu werden die Antigenfragmente, die an Moleküle des Histokompatibilitätshauptkomplexes (MHC) gebunden werden, auf der Oberfläche der APCs den T-Zellen angeboten [37]. Es gibt zwei verschiedene peptidbindende Proteine: MHC-Klasse-I, das zytotoxische T-Zellen stimuliert und damit direkt das Abtöten der entsprechenden Zelle bewirkt, und MHC-Klasse-II, das T-Helferzellen aktiviert und so tief greifende immunregulatorische Effekte auslöst [39]. Meist befinden sich die DCs in den unterschiedlichsten Geweben im so genannten unreifen Stadium, in dem sie darauf spezialisiert sind, Antigene aufzunehmen und zu verarbeiten. Sobald dies geschieht, wandern die nun reifen DCs zur Präsentation in lymphatisches Gewebe wie Milz oder Lymphknoten, wo sie mittels Zytokinen Lymphozyten anlocken und die entsprechende Immunantwort auslösen [39].

Einige Tumorkomponenten rufen aber keine antigenspezifische T-Zellantwort hervor, was auf ein Fehlen von DCs in Tumoren zurückzuführen sein könnte. So sezernieren Tumore Faktoren wie IL-10, TGF- $\beta$  oder VEGF, die die Entwicklung und Funktion von DCs reduzieren. Zudem zeigte sich, dass die Prognose einer Krebserkrankung umso besser ist, je mehr DCs einen Tumor infiltrieren [37].

#### **1.4.2 T-Helferzellen**

Die T-Helferzellen werden in Th1- und Th2-Zellen unterteilt, wobei die Th1-Zellen die zellvermittelte Immunität und die Th2-Zellen die humorale Immunität darstellen. Die beiden Zelltypen unterscheiden sich sowohl in ihrer Funktion als auch in ihrer

Zytokinproduktion voneinander. Ein charakteristischer molekularer Marker der Th1- und Th2-Zellen ist das CD4-Protein [40].

#### **1.4.2.1 Th1-Zellen**

Die zellvermittelte Abwehr erfolgt über Th1-Zellen, die über eine Antigenpräsentation der dendritischen Zellen stimuliert werden. Die aktivierten Th1-Zellen schütten daraufhin die Zytokine IL-2, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  aus, woraufhin sie nicht nur proliferieren und zu T-Zellen mit entsprechender Antigenspezifität differenzieren, sondern auch eine Aktivierung und Differenzierung der Makrophagen sowie eine Inhibition der Th2-Antwort bewirken [40]. Ferner führt die T-Zell-vermittelte Immunreaktion zu einer Erweiterung der Blutgefäße und einer Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen auf endothelialen Zellen und fördert damit die Emigration von Zellen aus den Gefäßen ins Gewebe [41].

Das wichtigste Signal für die T-Helferzellen ist das Glykoprotein IL-2, das ursprünglich als Wachstumsfaktor für T-Lymphozyten beschrieben wurde. IL-2 wirkt autokrin auf die T-Zelle selbst und regt sie durch eine intrazelluläre Signalkaskade zur klonalen Expansion und Differenzierung an. Auf dieselbe Art und Weise wirkt IL-2 auch auf B-Zellen und natürliche Killerzellen. Ferner stimuliert IL-2 die reifen T-Zellen zur Synthese und Sekretion von Zytokinen, die daraufhin die Hämatopoese und die gerichtete Immunantwort regulieren. IL-2 ist auch für die intrathymische Entwicklung regulatorisch wirkender CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen von wesentlicher Bedeutung [41].

Mit TNF- $\alpha$ , das erstmals vor 30 Jahren isoliert wurde, sezernieren die Th1-Zellen, vor allem aber Makrophagen und auch andere Lymphozyten, ein multifunktionales inflammatorisches Zytokin, das eine Schlüsselrolle bei der Apoptose, dem Zellüberleben, bei Entzündungen und der Immunität spielt [42]. TNF- $\alpha$  wurde ursprünglich als ein Marker identifiziert, der eine hämorrhagische Nekrose von Tumoren induzieren konnte, und wurde anfangs für die bei terminalen Krebspatienten beobachtete Kachexie verantwortlich gemacht, weshalb das Molekül auch „Kachektin“ genannt wurde. Seine Funktion übt TNF- $\alpha$  über die Rezeptoren TNFR-1 und TNFR-2 aus, die beide über eine Signalkaskade den nukleären Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktivieren, was eine Zellaktivierung, Zelldifferenzierung, Zytokinproduktion und Hemmung der Apoptose zur Folge hat. Im Gegensatz dazu kann TNF- $\alpha$  aber auch durch Aktivierung spezifischer Caspasen den programmierten Zelltod induzieren. Obwohl es namentlich für antitumoröse Eigenschaften steht, weiß man heute, dass TNF- $\alpha$  über ein breites Spektrum biologischer Funktionen verfügt und im Zusammenhang

mit einer Vielzahl von Krankheiten steht. Erhöhte TNF- $\alpha$ -Serumkonzentrationen finden sich bei einer Reihe unterschiedlichster Erkrankungen, wie z.B. rheumatoider Arthritis, Psoriasisarthritis oder Morbus Crohn. Bei diesen Krankheiten wird heutzutage eine anti-TNF- $\alpha$ -Therapie teilweise schon erfolgreich angewandt [41]. In Bezug auf Tumore nimmt TNF- $\alpha$  eine zweiseitige Stellung ein. Zum einen hemmt das Zytokin durch seine zellzerstörenden und proapoptotischen Aktivitäten das Tumorstadium, zum anderen fördert es z.B. mit der Induktion von vaskulären endothelialen Adhäsionsrezeptoren das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren [43].

Ein ebenso immunstimulierendes Zytokin wie TNF- $\alpha$  ist IFN- $\gamma$ , ein Glykoprotein, das unter anderem von Th1-Zellen sezerniert wird. Nach seiner Freisetzung verbessert es die Expression von MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Proteinen sowie die Sekretion von antiangiogenetischen Chemokinen, inhibiert die Tumorzellproliferation und Produktion von immunsuppressiven Molekülen und aktiviert Makrophagen. Damit stellt die IFN- $\gamma$ -Ausschüttung der CD4-T-Zellen einen wichtigen Bestandteil in deren Antitumorwirkung dar [41]. IFN- $\gamma$  besitzt aber auch die Fähigkeit, Tumorzellen positiv zu modulieren, indem es die Präsentation von Tumorantigenen entweder durch Herunterregulierung der Antigenexpression oder durch verminderte Prozessierung des Antigens verhindert [44].

#### **1.4.2.2 Th2-Zellen**

Die Th2-Zellen agieren als Vertreter der humoralen Immunabwehr hauptsächlich mit B-Zellen, die damit zur Synthese und Sekretion von Antikörpern angeregt werden. Gleichzeitig hemmt die Th2-Antwort Mechanismen, die zu einer Th1-Antwort führen. Dies erreichen die Th2-Zellen unter anderem mithilfe der Zytokine IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10, die als Th2-Zytokine die T-Zell-vermittelte Immunität bremsen und eine humorale Immunantwort verstärken [45].

Das Zytokin IL-10, das von Th2-Zellen, Monozyten sowie regulatorischen T-Zellen sezerniert wird, wird auch zur Klasse der antientzündlichen Zytokine gerechnet und wurde aufgrund seiner Fähigkeit, die Produktion von IL-2 und IFN- $\gamma$  durch Th1-Helferzellen zu reduzieren, zunächst als Zytokinsynthese-inhibierender Faktor bezeichnet. Diesen immunsuppressiven Effekt von IL-10 machen sich auch Tumoren mit dessen Produktion zueigen, sodass damit das Tumorstadium begünstigt und die Zellapoptose verhindert wird. Zudem zeigte sich, dass hohe systemische IL-10-Spiegel von Krebspatienten mit einer schlechteren Prognose korrelieren. Es gibt aber

auch gegensätzliche Studien, die nachgewiesen haben, dass IL-10 durch Hemmung der tumorinduzierten Angiogenese und Anregung der Produktion tumortoxischer Moleküle wie NO zu einer Tumorregression führt. Auch wenn IL-10 oft als ein ausschließlich immunsuppressives Zytokin angesehen wird, scheint die komplexe Beziehung zwischen diesem Molekül und Karzinomen noch nicht ausreichend geklärt zu sein [41].

#### **1.4.2.3 Th1-/Th2-Immunantwort**

Zahlreiche Versuche zeigten, dass die Anwesenheit eines fremden Antigens in der Hochregulierung des nichtspezifischen proinflammatorischen Zytokins IL-1- $\alpha$  und - $\beta$  und der Th1-Zytokine resultiert. Th2-Zytokine inhibieren dagegen die Synthese der Th1-Zytokine und regulieren somit die proinflammatorische zellvermittelte Immunität und zytolytische Aktivität herunter [46]. Eine Balance zwischen den beiden Zelltypen Th1 und Th2 spielt für die verschiedenen Immunreaktionen, einschließlich der Tumorimmunantwort, eine große Rolle [39].

Die meisten Malignome sind mit einer Suppression der zellvermittelten Immunität assoziiert. Es findet sich ein regelrechter Shift des Zytokinprofils vom Th1-Typ hin zum Th2-Typ [47]. Das Gleichgewicht ist dadurch zugunsten der humoralen Th2-Immunreaktion verschoben, die mit ihrer proangiogenetischen und antiinflammatorischen Wirkung das Fortschreiten bösartiger Erkrankungen begünstigt [46]. So wiesen Blutuntersuchungen von Patienten mit Pankreaskarzinom eine Prädominanz von Th2-Zytokinen und Th2-Zellen auf, was eine generelle tumorinduzierte Modulation der zellulären Immunantwort vermuten lässt [47].

Mittels einer DC-basierten Immuntherapie, relevanten Impf- oder Zytokinprotokollen oder antiangiogenetischen Agenzien könnte die Th1-/Th2-Ratio auf die Seite der Th1-Immunantwort verlagert und so die Inhibition der Tumorzellproliferation und damit die Tumorregression gefördert werden [46]. Auch wenn Th2-Zellen wie Th1-Zellen eine durchaus gute Antitumoraktivität zeigen, so scheinen Th1-Zellen z.B. für die Immuntherapie geeigneter zu sein, da die Th1-Zell-Therapie im Gegensatz zur Th2-Zell-Therapie in einer Studie z.B. eine Induktion eines immunologischen Gedächtnisses aufwies [47].

#### **1.4.3 Zytotoxische T-Zellen**

Die Aufgabe der zytotoxischen T-Zellen (CTLs) besteht in dem Erkennen veränderter Zellen mithilfe des T-Zell-Rezeptors und des MHC-Klasse-I-Proteins, das auf der

Oberfläche körpereigener Zellen zu finden ist und Peptide aus dem Inneren der Zelle gebunden hat. Sobald eine CTL ein Fremdartigen erkannt hat, erfolgt die Aktivierung und Ausschüttung von Perforinen und Granzymen, die daraufhin in der MHC-Klasse-I-tragenden Zelle den programmierten Zelltod veranlassen. Als Bestandteil der zellulären Immunität richten sich die CTLs vor allem gegen intrazelluläre Infektionen, wie z.B. Virusinfektionen, aber auch gegen Tumorzellen. Als molekularen Marker tragen zytotoxische Zellen das CD8-Protein [48].

#### **1.4.4 Regulatorische T-Zellen**

Regulatorische T-Zellen (Tregs) sind in der Lage, viele T-Zell-vermittelte Immunantworten zu unterdrücken [49]. Sie werden in natürliche und induzierbare regulatorische T-Zellen eingeteilt. Während letztere eine Suppression über zytokinabhängige Wege mit IL-10 und TGF- $\beta$  vermitteln, benötigen die natürlichen regulatorischen T-Zellen dafür einen Zell-Zell-Kontakt [50]. Natürliche Tregs wurden erst Mitte der neunziger Jahre als Untergruppe der CD4-T-Zellen entdeckt, die zusätzlich die IL-2-Rezeptor- $\alpha$ -Subunit, auch CD25 genannt, exprimieren [49]. Während ungefähr 30 % der CD4-T-Zellen den molekularen Marker CD25 in einer niedrigen bis mittleren Intensität tragen und damit als Gedächtniszellen fungieren, exprimieren nur 1-3 % der CD4-T-Zellen CD25 in hoher Konzentration und dienen somit als Suppressorzellen [38].

Eine zentrale Bedeutung in der Entwicklung und Funktion der CD25<sup>+</sup>Treg stellt neben IL-2 das Gen Foxp3 dar, das für einen transkriptionalen Regulator kodiert und derzeit der spezifischste Marker für CD25<sup>+</sup>Tregs ist. Bisher ist wenig über die Regulation und Biochemie von Foxp3 bekannt. Es dient sowohl als transkriptionaler Repressor von Zytokinen, wie z.B. IL-2, als auch als transkriptionaler Aktivator durch Hochregulierung Treg-assoziiierter Oberflächenmoleküle. Mehrere Studien zeigten, dass ein Fehlen oder eine Mutation von Foxp3 zu schwerwiegenden Autoimmunerkrankungen führt [51]. Bei Tumorerkrankungen liegt häufig eine Überexpression von Foxp3 vor, wodurch der Tumor versucht, die Immunantwort zu manipulieren bzw. ihr zu entgehen [51].

Die Aktivierung und der Mechanismus der Suppression der regulatorischen T-Zellen sind bislang weitestgehend unklar. Fest steht aber, dass CD25<sup>+</sup>Tregs eine fundamentale Rolle für das Gleichgewicht fast aller Immunantworten spielen, vor allem was den Schutz vor Autoimmunerkrankungen betrifft [50]. Ferner zeigte die

Forschung der letzten Jahre, dass die Aktivität der regulatorischen T-Zellen nicht immer von Vorteil ist, so z.B. bei Tumorerkrankungen. CD25<sup>+</sup>Tregs inhibieren die Immunantwort gegenüber Tumorantigenen und begünstigen somit das Tumorstadium [38]. Die Zahl der Tregs ist in den meisten Tumoren, der Tumorumgebung sowie im Blut von Tumorpatienten erhöht. Zudem korrelieren höhere Treg-Konzentrationen mit einer schlechteren Prognose und einer verringerten Überlebensrate der Krebspatienten [49]. Eine Verminderung der CD25<sup>+</sup>-Zellen mittels einer Tumormimmuntherapie oder Impfung könnte die Chancen auf Heilung einer Krebserkrankung verbessern. Gleichzeitig birgt dies jedoch die Gefahr, die von den Tregs aufrechterhaltene homöostatische Regulation des Immunsystems, z.B. durch Inhibition einer überschießenden Th1- oder Th2-Antwort, aus dem Gleichgewicht zu bringen und damit beispielsweise eine Autoimmunerkrankung auszulösen [50].

#### **1.4.5 Immunologische Escape-Mechanismen**

Ein weiterer Grund der schlechten Therapiemöglichkeit des Pankreaskarzinoms liegt im biologischen Verhalten der Tumorzellen. Denn Pankreastumorzellen besitzen eine Menge von lokalen und systemischen Mechanismen, um der immunologischen Kontrolle zu entgehen [52]. Sie produzieren beispielsweise eigenständig Wachstumsfaktoren wie TGF- $\alpha$  und IGF-1, die das Tumorstadium fördern, oder VEGF, der die Ausreifung dendritischer Zellen und damit eine adäquate Tumormimmunantwort verhindert, oder antiinflammatorische Zytokine wie TGF- $\beta$  und IL-10, die eine Inhibition der Th1-Immunantwort bewirken [16, 47].

##### **1.4.5.1 TGF- $\beta$**

TGF- $\beta$  ist ein wichtiges Zytokin, das in zahlreiche biologische Prozesse involviert ist, 1983 entdeckt wurde und zur großen Familie der strukturell verwandten Polypeptid-Wachstumsfaktoren gehört. Es gibt drei verschiedene Isoformen (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3), die in epithelialen, endothelialen, hämatopoetischen und mesenchymalen Zellen produziert werden, wobei TGF- $\beta$ 1 die häufigste und überall exprimierte Form ist. TGF- $\beta$  ist einer der stärksten Inhibitoren der zellulären Proliferation in normalen Zellen. Daneben ist das Zytokin an der Embryogenese, Differenzierung, Apoptose, Angiogenese, Immunsuppression und Wundheilung beteiligt. Bei solcher einer multifunktionalen Rolle ist es verständlich, dass jegliche Veränderungen in der normalen Signalkaskade weitläufige pathologische Konsequenzen haben. Tumorzellen überexprimieren TGF- $\beta$  und verändern dessen Funktionalität durch Mutation

des Zellmembranrezeptors oder durch Veränderung der Smad-Proteine, die in der TGF- $\beta$ -Signalkaskade eine zentrale Rolle spielen. So fungiert TGF- $\beta$  nicht mehr als Tumorsuppressor wie in normalen Zellen, sondern als Tumorpromoter und kann als ein Marker für einen fortgeschrittenen Erkrankungsverlauf mit einer verminderten Überlebenszeit angesehen werden [52, 53].

#### **1.4.5.2 Fas und Fas Ligand**

Des Weiteren können Tumorzellen die Funktionalität von Fas und Fas Ligand beeinflussen und damit der Tumorummunantwort ausweichen [16]. Fas und sein natürlicher Ligand Fas Ligand gehören zur Gruppe der TNF-Rezeptor-Familie und spielen eine Schlüsselrolle in der immunologischen Homöostase. Die Aktivierung von Fas durch seinen Liganden induziert den programmierten Zelltod in den Zellen, die Fas exprimieren. Dies ist entscheidend für das Aufrechterhalten der peripheren Toleranz durch Zerstörung aktivierter T-Zellen. Fas und Fas Ligand werden besonders stark auf Lymphozyten exprimiert. Tumorzellen entgehen durch Verminderung der Fas-Expression und Aufheben der Funktion von Fas Ligand der Apoptose [54]. Zudem können Tumore mittels Fas Ligand-Expression den programmierten Zelltod von T-Lymphozyten triggern [36]. Es zeigte sich, dass beim Pankreaskarzinom eine verminderte Fas-Expression und eine gesteigerte Fas Ligand-Expression mit einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert sind [54, 55].

#### **1.4.5.3 Die B7-Signal-Familie**

Ein weiterer Tumorescapemechanismus betrifft die B7-Familie. Durch eine Reduktion der Expression von kostimulierenden Molekülen der B7-Familie, die zum Aufbau einer gut funktionierenden Immunantwort notwendig ist, oder durch eine erhöhte Ausschüttung von koinhibitorischen Molekülen versucht der Tumor, der Tumorummunantwort zu entgehen [16].

Die B7-Familie besteht aus Transmembranproteinen, die durch ihre Bindung an Rezeptoren auf Lymphozyten die Immunantwort regulieren. Obwohl die Aktivierung von T- und B-Lymphozyten hauptsächlich über den Antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptor oder den B-Zell-Rezeptor initiiert wird, bestimmen zusätzliche Signale wie die B7-Liganden die letztendliche Immunreaktion. Diese kostimulierenden und koinhibitorischen Signale werden über Rezeptoren der CD28-Familie vermittelt, die auf der Zelloberfläche von Lymphozyten liegen [56]. Einer dieser Rezeptoren ist PD-1, ein Typ-I-Transmembranprotein, das auf aktivierten B- und T-Zellen präsentiert wird.

Da ruhende B- und T-Zellen keine PD-1-Moleküle aufweisen, gilt PD-1 als Marker-molekül für die Aktivierung von T-Zellen. Unzureichende Expression von PD-1 führt zu Autoimmunerkrankungen und Störungen der peripheren Toleranz [57].

Zwei Liganden für PD-1 sind B7-H1 (PD-L1) und PD-L2 (B7-DC). B7-H1 ist auf der Oberfläche von B- und T-Zellen sowie auf nicht-lymphatischen Zellen zu finden, wohingegen PD-L2 nur auf der Oberfläche von DCs und Makrophagen exprimiert wird [58]. Ihre Expression wird durch Zytokine reguliert. Während die Interleukine IL-4 und IL-13 PD-L2 hochregulieren, modulieren inflammatorische Zytokine wie IFN- $\gamma$  die B7-H1-Expression [56]. Durch die Bindung an PD-1 erreichen B7-H1 und PD-L2 eine negative Regulation der zellulären und humoralen Immunität und damit eine koinhibitorische Wirkung [58]. Bindet B7-H1 an den PD-1-Rezeptor auf aktivierten T-Zellen, wird die Zytokinsekretion und T-Zell-Proliferation inhibiert [58]. Die Expression von B7-H1 auf Tumorzellen erhöht die Apoptose von antigenspezifischen T-Zellen in vitro und fördert somit das Tumorwachstum [58]. Nomi et al. stellten fest, dass B7-H1-positive Patienten mit Pankreaskarzinom eine signifikant schlechtere Prognose als B7-H1-negative Patienten haben. Einen Zusammenhang zwischen PD-L2 und dem Patientenüberleben konnten sie allerdings nicht finden [58]. Während B7-H1 als wichtiger Regulator der Antitumorimmunität gilt, wird die Rolle von PD-L2 in der Tumorimmunität weiterhin kontrovers diskutiert, da sowohl positive als auch negative Effekte der PD-L2-Expression bereits nachgewiesen werden konnten [59]. So konnte Liu et al. einerseits zeigen, dass eine PD-L2-Expression auf den Tumorzellen zu einer CD8-vermittelten Tumorzellregression führte [60]. Andererseits stellten Ohigashi et al. fest, dass PD-L2-positive Patienten mit Ösophaguskarzinom eine schlechtere Prognose als PD-L2-negative Patienten hatten und eine hohe PD-L2-Expression des Tumors mit einer geringeren Anzahl von tumorinfiltrierenden CD8-T-Zellen korrelierte [61].

Neben den bekannten PD-1/B7-H1- und PD-1/PD-L2-Interaktionen, die zu einer Inhibition der T-Zell-Antwort und der Zytokinausschüttung führen, gibt es Hinweise darauf, dass B7-H1 und PD-L2 auch kostimulatorisch auf die T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion wirken. Eine mögliche Erklärung könnte ein zweiter Rezeptor für B7-H1 und PD-L2 sein. So wird abgesehen von dem koinhibitorischen Rezeptor PD-1 ein kostimulierender Rezeptor vermutet, der in die Interaktion mit B7-H1 und PD-L2 involviert ist, dessen Wertigkeit und Funktion bisher aber weitgehend unklar ist [62, 63].



## 2 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wird in drei Versuchsreihen die Wirkung der Monotherapie mit Rapamycin und mit einem anti-VEGF-Antikörper sowie der Kombinationsbehandlung mit Rapamycin und anti-VEGF-Antikörper gegenüber Panc02-Tumorzellen am Mausmodell untersucht. Dabei sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Stärke des Tumorbefalls in der Leber der Tiere und der Größe des Lebervolumens? Eignet sich das experimentelle Tumormodell zur Untersuchung der Substanzen Rapamycin und anti-VEGF-Antikörper?
2. Welche der verschiedenen Behandlungsstrategien mit anti-VEGF-Antikörper und Rapamycin ergeben die besten Ergebnisse bezüglich der Überlebenszeit und der Inhibition des Tumorwachstums?
3. Wie verhalten sich die Angiogenesefaktoren im Milz-, Leber- und Tumorgewebe und finden sich Unterschiede in den einzelnen Behandlungsgruppen? Ist der antiangiogenetische Effekt in den mit anti-VEGF-Antikörper behandelten Gruppen größer?
4. Welche zellulären Infiltrationsmuster weisen die CD4-, CD8- und CD25-T-Zellen im Milz-, Leber- und Tumorgewebe unter der Behandlung mit anti-VEGF-Antikörper und Rapamycin auf und lassen sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungen in den einzelnen Gruppen feststellen?
5. Entstehen durch das weitere Tumorwachstum charakteristische Veränderungen im Zytokinprofil der Th1- und Th2-Zellen und ist eine behandlungsabhängige Verlagerung des Th1-/Th2-Gleichgewichts zu beobachten?
6. Welche Schlussfolgerungen ergeben sich aus den erzielten Ergebnissen für die Klinik? Sollte die Therapie mit anti-VEGF-Antikörper in Kombination mit Substanzen wie Rapamycin im metastasierten Pankreaskarzinom klinisch weiter verfolgt werden?

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Tiere**

Für alle Versuchsreihen wurden weibliche C57BL/6 Mäuse verwendet. Die ca. 7 - 9 Wochen alten und 18 - 20 g schweren Mäuse wurden von der Firma Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Die Tiere wurden unter speziellen pathogenfreien Bedingungen und entsprechend den Richtlinien des Instituts in einem regelmäßigen 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Alle Mäuse bekamen Diätfutter (Altromin Pressfutter, Altromin GmbH, Lage, Deutschland) und Wasser zur freien Verfügung. Sämtliche Versuche erfolgten nach Genehmigung durch das Tierversuchs-Komitee der Universität Würzburg und der Landesregierung.

#### **3.2 Tumorzellen**

Für die Experimente wurden die Tumorzellen Panc02 verwendet. Panc02 ist eine tumorigene pankreatische Zelllinie der Maus mit duktaler Morphologie, die erstmals 1984 ein durch Methylcholanthrene induziertes Tumorwachstum in einer C57BL/6-Maus aufwies [64]. Die Tumorzellen wurden im Brutschrank (HeraCell, Kendro (Heraeus), Hanau, Deutschland) in Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>; Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland) mit 50 ml Zellkulturmedium bei einer Temperatur von 37 °C und 5 %igem CO<sub>2</sub>-Anteil kultiviert. Als Medium wurde RPMI-Zellkulturmedium (GIBCO, Berlin, Deutschland) verwendet, dem zusätzlich 10 % FCS (GIBCO, Berlin, Deutschland), 5 % Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) und 5 % Glutamin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) hinzugefügt wurden. In der Regel wurden die Zellen einmal pro Woche im Verhältnis 1:6 gesplittet. Dazu wurden sie zunächst mit 10 ml PBS (GIBCO, Berlin, Deutschland) gespült. Anschließend wurde 5 ml 0,05 % - 0,02 %ige Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) für ca. 5 bis 8 Minuten dazugegeben, sodass sich die adhärennten Zellen vom Boden der Zellkulturflasche lösten. Zum Schluss wurden 7 ml Zellkulturmedium hinzugefügt und gründlich resuspendiert, um die aneinander haftenden Zellen zu vereinzeln. Je 2 ml der Zellsuspension wurden nun zusammen mit 48 ml frischem Zellkulturmedium in eine neue Zellkulturflasche überführt. Ein Mediumwechsel erfolgte normalerweise alle drei Tage.

### 3.3 Vorbereitung der Zellen für die Injektion

Die für die Injektion benötigten Panc02-Zellen wurden zunächst mithilfe von 5 ml 0,05 % - 0,02 %iger Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Nach dem Hinzugeben von 40 ml Zellkulturmedium wurden die Zellen für 10 Minuten bei 320 rpm zentrifugiert. Das überständige Medium wurde verworfen und die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl der Suspension mithilfe der Neubauer-Kammer (0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm<sup>2</sup>, Optik Labor, Friedrichshofen, Deutschland) bestimmt. Dazu wurden zunächst 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau (0,4 %, SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland) vermischt und auf die Neubauer-Kammer aufgetragen. Dann wurden die Zellen in den 16 Quadraten der Kammer unter dem Lichtmikroskop (Axiostar plus, Carl Zeiss Mikroskopie, Jena, Deutschland) gezählt und nach folgender Formel die Gesamtzellzahl in 5 ml Volumen berechnet:

$$Zellzahl_{gesamt} = Zellzahl_{gezählt} \cdot 10^4_{Kammerfaktor} \cdot 10_{Färbungsverdünnung}$$

Nach nochmaligem Zentrifugieren wurde die Zellsuspension mit PBS auf die notwendige Konzentration von  $1 \times 10^5$  Tumorzellen/50 µl PBS verdünnt. Bis zur Injektion wurden die Zellen in 2 ml Cryoröhrchen (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) im Brutschrank aufbewahrt.

### 3.4 Operation

Die Tiere wurden vor Beginn der chirurgischen Maßnahmen mit Isofluran-Inhalation (Forene<sup>®</sup>, Abbott GmbH & Co, Wiesbaden, Deutschland) in Narkose versetzt. Für die intraportale Injektion wurden die Tiere in Rückenlage unter dem Mikroskop positioniert. Die Narkose wurde während der Operation mit einer speziellen Atemmaske aufrechterhalten. Nach Rasur und Desinfektion erfolgte die mediane Laparotomie. Um die Pfortader richtig einzustellen, wurde zunächst der Dünndarm mobilisiert. Anschließend wurde die zuvor bereitgestellte Zellsuspension ( $1 \times 10^5$  Tumorzellen/50 µl PBS) mit einer Insulinspritze (Omnican<sup>®</sup> 40, 0,30 x 12 mm, B. Braun Petzold GmbH, Melsungen, Deutschland) in die Pfortader gespritzt. Nachdem die Nadel entfernt worden war, wurde zum Stoppen der Blutung mit einem gewöhnlichen Wattestäbchen, das vorher in ein hämostatisches Reagenz (Arista, Medafor GmbH, Ochsenfurt, Deutschland) getaucht worden war, drei Minuten lang auf die Einstich-

stelle gedrückt. Zum Schluss wurde der Darm wieder rückverlagert und das Peritoneum sowie die Haut jeweils mit einem nicht-resorbierbaren Faden 8-0 (Surgipro II, Syneture, Norwalk, USA) in einer fortlaufenden Naht verschlossen.

### **3.5 Behandlung der Tiere**

Während der Versuche wurden die Tiere je nach Gruppe mit einem oder zwei der folgenden drei Substanzen behandelt: Kontrollantikörper, anti-VEGF-Antikörper und Rapamycin.

#### **3.5.1 Kontrollantikörper**

Als Kontrollantikörper wurden Immunglobuline der Klasse G verwendet, die aus Kaninchenserum gewonnen wurden.

#### **3.5.2 Anti-VEGF-Antikörper**

Der für die Versuche dieser Arbeit verwendete anti-VEGF-Antikörper wurde freundlicherweise von Herrn Prof. D. Briscoe aus dem Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA, zur Verfügung gestellt. Er wurde entsprechend den Methoden von Tilton et al. hergestellt [65]. Dazu erfolgte zunächst die Immunisierung von Kaninchen mit der N-terminalen Sequenz des sezernierten VEGF (CAPTTEGEQKSHEVIKFMVYQRSY) von Mäusen gekoppelt an Keyhole Limpet Hemocyanin. Anschließend wurde den Tieren alle sechs Wochen Blut abgenommen und ihr anti-VEGF-Antikörpertiter mittels ELISA gemessen. Die Wirksamkeit der Antikörper wurde anhand der Fähigkeit des Antiserums zur Inhibition der VEGF-induzierten Proliferation von HUVECs überprüft [66, 67].

#### **3.5.3 Rapamycin**

Rapamycin, auch bekannt als Sirolimus, gehört zur Arzneimittelgruppe der Immunsuppressiva. Für die Versuche wurde Rapamune der Firma Wyeth Pharma GmbH verwendet. Es wurde mit Sojaöl (Rapunzel, Naturkost AG, Legau, Deutschland) im ersten Versuchsansatz auf eine Konzentration von Rapamycin 1,5 mg/kg verdünnt. Die zunächst gewählte Dosierung von Rapamycin 1,5 mg/kg wurde entsprechender Literatur entnommen [18, 39]. Für den zweiten bzw. dritten Versuchsansatz wurden zudem Lösungen in einer Konzentration von Rapamycin 0,75 mg/kg und Rapamycin 1 mg/kg hergestellt. Die jeweiligen Verdünnungen von Rapamycin wurden licht-

geschützt im Kühlschrank bei Temperaturen zwischen 2 °C und – 8 °C aufbewahrt und vor Benutzung gut vermischt.

### 3.6 Versuchsansätze

Im Verlauf der Arbeit wurden insgesamt drei Versuchsansätze durchgeführt. Die Tiere bekamen alle eine Tumorzellinjektion mit je  $1 \times 10^5$  Tumorzellen/50 µl PBS intraportal gespritzt und wurden anschließend in verschiedene Gruppen eingeteilt, in denen sie unterschiedlich behandelt wurden. Als Vergleich dienten in allen drei Versuchsansätzen Kontrolltiere, die nach Tumorzellinjektion entweder keine oder eine Kontrollantikörperbehandlung bekamen. In allen drei Versuchsreihen wurden jeweils die Überlebenszeit der Tiere und das makroskopische Tumorstadium bestimmt. Daneben wurden anhand der Real-Time PCR und der Immunhistologie verschiedene Oberflächenmoleküle im Milz-, Leber- und Tumorgewebe untersucht.

#### 3.6.1 Versuchsansatz 1

Der erste Versuchsansatz bestand aus 28 C57BL/6 Mäusen, die in folgende sieben Gruppen eingeteilt wurden (Tabelle 4).

**Tabelle 4:** Darstellung der sieben Gruppen im Versuchsansatz 1

Gruppe	Behandlung	Anzahl der Tiere
0	Unbehandelte Kontrolle	4
A	Kontrollantikörper, ab Tag 0	5
B	Kontrollantikörper, ab Tag 2	2
C	Rapamycin 1,5 mg/kg	4
D	Anti-VEGF-Antikörper, ab Tag 0	4
E	Anti-VEGF-Antikörper, ab Tag 2	5
F	Anti-VEGF-Antikörper, ab Tag 0 + Rapamycin 1,5 mg/kg/d	3

Die Tiere in der Gruppe 0 erhielten nach Tumorzellinjektion keine weitere Behandlung. Den Tieren der Gruppen A, B, D, E und F wurde alle zwei Tage insgesamt fünfmal je 500 µl des jeweiligen Antikörpers in Kurznarkose intraperitoneal gespritzt. In den Gruppen C und F wurde den Tieren ab dem 7. Tag nach Tumorzellinjektion jeden Tag in Kurznarkose Rapamycin 1,5 mg/kg intraperitoneal verabreicht [39].

### 3.6.2 Versuchsansatz 2

Der zweite Versuchsansatz umfasste zwölf Tiere in vier verschiedenen Gruppen und diente der Dosisfindung des Rapamycins (Tabelle 5).

**Tabelle 5:** Darstellung der vier Gruppen im Versuchsansatz 2

Gruppe	Behandlung	Anzahl der Tiere
B	Kontrollantikörper, ab Tag 2	2
G	Rapamycin 1 mg/kg/d	4
H	Rapamycin 0,75 mg/kg/d	4
I	Rapamycin 1,5 mg/kg/d	2

Nach bereits in 3.6.1 beschriebenem Procedere erfolgte die fünfmalige Gabe von je 500 µl des Antikörpers im Abstand von zwei Tagen. Das Rapamycin wurde vom 7. bis zum 30. Tag täglich verabreicht.

### 3.6.3 Versuchsansatz 3

Im dritten Versuchsansatz sollte die Effizienz der Kombinationsbehandlung aus anti-VEGF-Antikörper und Rapamycin evaluiert werden. Hierbei wurden sechs Tiere auf zwei Gruppen aufgeteilt (Tabelle 6).

**Tabelle 6:** Darstellung der zwei Gruppen im Versuchsansatz 3

Gruppe	Behandlung	Anzahl der Tiere
A	Kontrollantikörper, ab Tag 0	2
J	Anti-VEGF-Antikörper, ab Tag 0 + Rapamycin 0,75 mg/kg/d	4

Das Behandlungsschema der Tiere in Versuchsansatz 3 entsprach dem Vorgehen in Versuchsansatz 2.

## 3.7 Organentnahme

Sobald die Tiere Anzeichen von Krankheit, Tumorkachexie, einen abnorm geschwollenen Bauch oder eine ungewöhnliche Trägheit zeigten, wurden sie nach bereits oben genannter Methode anästhesiert und mittels eines Herzschnittes getötet. Die Leber, die Milz und mesenteriale Lymphknoten wurden zur weiteren Untersuchung entnommen. Die Leber wurde zudem mithilfe eines Lineals in Länge,

Breite und Höhe vermessen, um ihr Volumen anhand der folgenden Formel bestimmen zu können:  $V = \pi/6 \cdot a \cdot b \cdot c$  ( $a$  = Länge,  $b$  = Breite,  $c$  = Dicke) [39]. Teile der Organe wurden jeweils entweder in Tissue-Tek für die Immunhistochemie oder direkt in Stickstoff eingefroren. Weitere Gewebeproben wurden in eine RNAlater-Lösung für eine spätere PCR und in Formalin für Paraffinblöcke gegeben. Außerdem wurden von Leber und Milz Zellen für die FACS-Analyse und den TUNEL-Assay gewonnen.

### **3.8 Vorbereitung zur Real-Time PCR**

Um eine Real-Time PCR-Analyse durchführen zu können, muss aus den einzelnen Proben cDNA gewonnen werden. Dazu wird zunächst durch eine RNA-Extraktion aus den Gewebeproben RNA isoliert, die dann mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben wird.

#### **3.8.1 RNA-Extraktion**

Die zur RNA-Extraktion vorgesehenen Gewebeproben wurden direkt nach Entnahme in RNAlater-Lösung (RNAlater RNA Stabilization Reagent, Qiagen, Hilden, Deutschland) gegeben und für zwei Tage im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei – 70 °C eingefroren.

Die RNA-Gewinnung erfolgte mithilfe eines RNA Extraktionssets (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß dem von der Firma Qiagen mitgelieferten Protokoll [68]. Pro Probe sollte nicht mehr als 30 mg Gewebe verarbeitet werden. Zunächst wurde die entsprechende Organprobe in eine Lösung von RLT-Puffer und  $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma Aldrich, München, Deutschland) (10  $\mu$ l  $\beta$ -ME/1 ml RLT) gegeben und daraufhin mit einer Edelstahlkugel in einem Tube mithilfe einer Schwingmühle (Qiagen TissueLyser, Retsch GmbH&Co KG, Haan, Deutschland) zerkleinert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand auf eine RNeasy Mini-Säule pipettiert und nacheinander mit 70 % Ethanol, RW1-Puffer und RPE-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die RNA durch Zugabe RNA-freien Wassers gelöst. Der Gehalt an RNA wurde durch Extinktion ( $\mu$ g/ml) an einem Photometer (Bio-Photometer 6131, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Bis zur Herstellung der cDNA wurden die Proben bei – 20 °C eingefroren .

### 3.8.2 cDNA-Synthese

Für die Real-Time PCR muss die zuvor gewonnene RNA in cDNA umgeschrieben werden. Dies wurde mithilfe des iScript cDNA Synthese Kits (Bio-Rad, München, Deutschland) durchgeführt und erfolgte nach dem folgenden Ansatz pro Probe:

$$12\mu\text{l Reaction Mix} + 3\mu\text{l Reverse Transkriptase} + x\mu\text{l RNA} + x\mu\text{l H}_2\text{O} = 60\mu\text{l}$$

Die Menge der jeweils zuzugebenden RNA in  $\mu\text{l}$  bezüglich 3  $\mu\text{g}$  RNA (nach Vorgabe) wurde mittels der zuvor bestimmten Extinktion ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) berechnet. Zuletzt wurde die benötigte Menge an Nuklease-freiem Wasser berechnet. Die einzelnen Reagenzien wurden schließlich in den vorgeschriebenen bzw. berechneten Mengen in 0,5 ml Tubes pipettiert und in den iCycler (Bio-Rad, München, Deutschland) gegeben. Die cDNA wurde nach folgendem Protokoll synthetisiert: 5 Minuten bei 25 °C, 30 Minuten bei 42 °C und 5 Minuten bei 85 °C. Der Gehalt an cDNA wurde wiederum mittels Extinktion ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) bestimmt. Zuletzt wurde die cDNA auf eine Konzentration von 50  $\text{ng}/\mu\text{l}$  mit RNA-freiem Wasser verdünnt. Die dazu benötigte Menge Wasser wurde nach folgendem Ansatz berechnet:

$$x \text{ H}_2\text{O } \mu\text{l} = \left( \frac{\text{gemessene Extinktion (ng/\mu l)}}{50 \text{ (ng/\mu l)}} - 1 \right) \cdot 54 \mu\text{l cDNA}$$

Die mit der berechneten Menge Wasser verdünnte cDNA wurde schließlich in einem 1,5 ml Tube bei – 20 °C eingefroren.

### 3.9 Real-Time PCR

Um die Genexpression von speziellen Oberflächenmolekülen und Zytokinen in den verschiedenen Geweben zu untersuchen, ist die Real-Time PCR die Methode der Wahl. Die Real-Time PCR ist eine Vervielfältigungsmethode von DNA, die zusätzlich zu der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion die Möglichkeit der relativen Quantifizierung beinhaltet. Diese ermöglicht den Vergleich zwischen dem Gehalt eines Zielgens und dem eines Referenzgens [69]. Als Referenzgen dient in der Regel ein geeignetes so genanntes Housekeeping Gen [70]. In den Experimenten wurde GAPDH als Housekeeping Gen verwendet. Dessen konstanter Wert dient



dazu, unterschiedliche Genexpressionen in verschiedenen Proben miteinander zu vergleichen. Am Ende eines PCR-Zyklus erfolgte außerdem eine Quantifizierung mithilfe von Fluoreszenz-Messungen. Dazu wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green (qPCR MasterMix Plus for SYBR Green I, Eurogentec, Seraing, Belgien) verwendet. Er bindet sich nicht an einsträngige DNA sondern nur an doppelsträngige DNA-Moleküle. Bei Bindung an doppelsträngige DNA steigt die Fluoreszenz an, in ungebundenem Zustand dagegen ist die Fluoreszenz vernachlässigbar [71]. Da der Farbstoff allerdings nicht produktspezifisch ist und sich somit nicht nur an das gewünschte Amplifikationsprodukt bindet, sondern auch an Fehlerprodukte, wie z.B. Primerdimere, wurde im Anschluss an einen PCR-Lauf die „Reinheit“ des Amplifikats anhand einer Schmelzkurvenanalyse überprüft [72]. Dazu wird die doppelsträngige DNA durch steigende Temperatur zunächst aufgeschmolzen. Daraufhin nimmt das Fluoreszenzsignal ab. Nun wird die Temperatur wieder gesenkt und bei der für die Amplifikationsprodukte spezifischen Temperatur bilden sich wieder DNA-Doppelstränge aus, was zu einem signifikanten Anstieg der Fluoreszenz führt. Je steiler sich also die Schmelzkurve verhält, desto reiner ist das Produkt. Kurven mit einem Peak bei einer niedrigeren Temperatur als das spezifische PCR-Produkt weisen auf die Bildung von Primerdimeren hin, wohingegen verschiedene Peaks bei unterschiedlichen Temperaturen oder Plateaus für nichtspezifische Produkte oder eine Verunreinigung sprechen [73]. Um eine gewisse Repräsentativität zu gewährleisten, wurde ein Real-Time PCR-Lauf mit anschließender Schmelzkurvenanalyse insgesamt dreimal pro Probe durchgeführt.

### **3.9.1 Verwendete Materialien**

Für die Real-Time PCR Analyse wurden die folgenden Reagenzien verwendet:

- Master Mix

Als Master Mix wurde der qPCR MasterMix Plus for SYBR<sup>®</sup> Green I (Eurogentec, Seraing, Belgien) eingesetzt. Der Mix besteht aus einem Reaction Puffer, dNTPs (dUTP eingeschlossen), HotGoldStar DNA Polymerase, MgCl<sub>2</sub> (5 mM), Uracil-N-Glycosylase, SYBR<sup>®</sup> Green I.

- cDNA

Die cDNA wurde mittels RNA-Extraktion aus den Gewebeproben gewonnen und für die Real-Time PCR standardmäßig auf eine Konzentration von 50 ng/µl mit RNase-freiem Wasser verdünnt.

- Primer

Als Primer wurden die folgenden Zielgene verwendet: GAPDH, B7-H1, CD8 $\alpha$ , Fas, Fas Ligand, Foxp3, IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$ , PD-1, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  und VEGF sowie CD4, CD25, CD56 und PDL-2. Die Primer der meisten Zielgene wurden nach den in der Tabelle 7 aufgeführten Sequenzen von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

**Tabelle 7:** Übersicht über die Sequenzen der Primer, die von der Firma MWG-Biotech AG bezogen wurden.

Primer	Richtung	Sequenz
GAPDH	forward	5'- GGT GAA GGT CGG TGT GAA CGG A -3'
GAPDH	reverse	5'- TGT TAG TGG GGT CTC GCT CCT G -3'
B7-H1	forward	5'- AAG CCT CAG CAC AGC AAC TT -3'
B7-H1	reverse	5'- ACA TCA TTC GCT GTG GCG TT -3'
CD8 $\alpha$	forward	5'- CCG TTG ACC CGC TTT CTG T -3'
CD8 $\alpha$	reverse	5'- CGG CGT CCA TTT TCT TTG GAA -3'
Fas	forward	5'- TGC TCC CAG CTG CAG GC -3'
Fas	reverse	5'- GCC CGG TAG CTC TGG GTG TA -3'
Fas Ligand	forward	5'- CAG CTC TTC CAC CTG CAG AAG G -3'
Fas Ligand	reverse	5'- AGA TTC CTC AAA ATT GAT CAG AGA GAG -3'
Foxp3	forward	5'- CCC AGG AAA GAC AGC AAC CTT -3'
Foxp3	reverse	5'- TTC TCA CAA CCA GGC CAC TTG -3'
IL-2	forward	5'- CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT -3'
IL-2	reverse	5'- GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C -3'
IL-10	forward	5'- CCA GTA CAG CCG GGA AGA CA -3'
IL-10	reverse	5'- CTC TGG CCG ACT GGG AAG T -3'
IFN- $\gamma$	forward	5'- CCT CAT GGC TGT TTC TGG CTG TTA -3'
IFN- $\gamma$	reverse	5'- CAT TGA ATG CTT GGC GCT GGA CC -3'
PD-1	forward	5'- TTC ACC TGC AGC TTG TCC AA -3'
PD-1	reverse	5'- TGG GCA GCT GTA TGA TCT GG -3'
TGF- $\beta$ 1	forward	5'- CAC TGA TAC GCC TGA GTG -3'
TGF- $\beta$ 1	reverse	5'- GTG AGC GCT GAA TCG AAA -3'
TGF- $\beta$	forward	5'- TGA CGT CAC TGG AGT TGT ACG G -3'
TGF- $\beta$	reverse	5'- GGT TCA TGT CAT GGA TGG TGC -3'
TNF- $\alpha$	forward	5'- GAA AGC ATG ATC CGC GAC GTG GA -3'
TNF- $\alpha$	reverse	5'- TAC GAC GTG GGC TAC AGG CTT G -3'
VEGF	forward	5'- TTG CCA AGG GTC CTC ACA CT -3'
VEGF	reverse	5'- GAC ATG CCC CCA TCC TTG T -3'

Die als Trockensubstanz gelieferten Primer wurden entsprechend den Angaben des Herstellers in RNase-freiem Wasser aufgelöst und als Stocklösung in einer Konzentration von 100 pmol/ $\mu$ l bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Für die Real-Time PCR wurde aus der Stocklösung eine Arbeitslösung in einer Konzentration von 10 pmol/ $\mu$ l aus 10  $\mu$ l forward Primer, 10  $\mu$ l reverse Primer und 80  $\mu$ l RNase-freiem Wasser hergestellt.

Die Primer für die in Tabelle 8 aufgeführten Zielgene wurden bereits gebrauchsfertig von der Firma Qiagen (QuantiTect Primer Assay, Qiagen, Hilden, Deutschland) bezogen.

**Tabelle 8:** Übersicht über die von der Firma Qiagen bezogenen Primer

Qiagenprimer	Produktname
CD4	Mm_CD4_1_SG QuantiTect Primer Assay
CD25	Mm_Il2ra_1_SG Quanti Tect Primer Assay
CD56	Mm_Ncam1_2_SG Quanti Tect Primer Assay
PDL-2	Mm_Pdcd1lg2_1_SG Quanti Tect Primer Assay
GAPDH	Mm_Gapd_2_SG Quanti Tect Primer Assay

### 3.9.2 Reaktionsansatz für die Real-Time PCR

Standardmäßig wurde mit einem 22  $\mu$ l Ansatz gearbeitet, der sich abhängig von den verwendeten Primern unterschiedlich zusammensetzt (siehe Tabelle 9).

**Tabelle 9:** Reaktionsansatz der Real-Time PCR jeweils für Biotech- und Qiagen-Primer

Reagenz	Volumina in $\mu$ l für Biotech-Primer	Volumina in $\mu$ l für Qiagen-Primer
H <sub>2</sub> O	8	6,8
SYBR Green	11	11
Primer-Arbeitslösung	1	2,2
cDNA	2	2

Nach Entwerfen der PCR-Platte und Zählen der benötigten Ansätze pro Primer wurde der jeweilige Premix zusammenpipettiert. Dabei wurde als erstes Wasser vorgelegt und dann der Master Mix dazugegeben. Anschließend wurde der Primer hinzugefügt und der Premix gemischt und abzentrifugiert. Nach dem Beladen des

entsprechenden Wells mit je 20  $\mu\text{l}$  wurden je 2  $\mu\text{l}$  der cDNA-Templates mit der Multikanalpipette aufgezogen und in die Wells pipettiert.

Schließlich wurde die Real-Time PCR unter Einsatz des Opticon Monitor (MJ Research/Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland) nach folgendem Protokoll durchgeführt: 15 min bei 95 °C zur Aktivierung der Taq-DNA-Polymerase, gefolgt von 40 Zyklen bei 94 °C für 15 s, 58 °C für 30 s und 72 °C für 30 s.

### **3.9.3 Auswertung der PCR-Daten**

Am Ende eines PCR-Laufs ergibt sich neben der Schmelzkurve, mit der die Reinheit eines Laufs ermittelt werden kann, ein Diagramm, in dem die Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl aufgetragen wird. In logarithmischer Darstellung ergibt sich eine s-förmige Fluoreszenzkurve, die in eine Plateau-Phase, eine exponentielle Phase und wiederum eine Plateau-Phase unterteilt werden kann [73]. Während der exponentiellen Phase steigt das DNA-Produkt in jedem Zyklus um den gleichen Faktor an, verdoppelt sich also im Idealfall [71]. Da dies auch die Reaktionsphase ist, in der der Fluoreszenzwert über dem Anfangsplateau liegt, aber noch nicht so viele Zyklen abgelaufen und damit so viele Reaktionskomponenten verbraucht sind, dass das Endplateau erreicht wird, erfolgte die Quantifizierung in diesem Bereich. Dazu wurde relativ willkürlich der so genannte Threshold oder Schwellenwert an die Stelle der Kurve gelegt, bei der zum ersten Mal ein exponentieller Anstieg der Fluoreszenz zu erkennen war. Für jeden Ansatz wurde so ein C(t)-Wert abgeleitet. Das ist der Wert, bei dem die entsprechende Amplifikationskurve den Threshold kreuzt. Er besagt, wie viele Zyklen durchlaufen werden mussten, um den Threshold zu erreichen [74]. Im Gegensatz zur absoluten Quantifizierung hat der C(t)-Wert bei der relativen Quantifizierung allein keine Aussagekraft. Die Expression des zu untersuchenden Gens wird vielmehr auf ein zweites, ubiquitär und homogen exprimiertes Gen, das so genannte Housekeeping Gen bezogen [72]. Dadurch wird die Varianz der Expressionsergebnisse reduziert, da unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen und Fehler bei der Real-Time PCR innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das Housekeeping Gen betreffen [70]. In den dargestellten Versuchen wurde stets GAPDH als Referenzgen verwendet, mit dessen Expression die anderen Gene durch den so genannten  $\Delta\text{C}(t)$ -Wert verglichen wurden. Er berechnet sich folgendermaßen [75]:

$$\Delta C(t) = C(t)_{\text{target gene}} - C(t)_{\text{housekeeping gene}}$$

Ein  $\Delta C(t)$ -Wert von 3 bedeutet also beispielsweise, dass ein bestimmtes Zielgen den Threshold erst drei Zyklen später erreicht hat als das Referenzgen GAPDH. Da sich die DNA im Idealfall pro Zyklus verdoppelt, lässt sich daraus schließen, dass in der Probe  $2^3 = 8$ mal mehr Housekeeping-DNA als Zielgen-DNA vorhanden war.

### 3.9.4 Berechnung des FoldFactors

Im Rahmen der Auswertung wurden die Ergebnisse der behandelten Tiere mit den Werten der Kontrolltiere verglichen. Bei den Kontrolltieren handelte es sich um Versuchstiere, die unter den gleichen Bedingungen wie die anderen Tiere gehalten wurden, aber nach der Tumorzellinjektion keine weitere Behandlung erfuhren. Ein Probenvergleich ist nach Normierung der Proben durch Berechnung des  $\Delta C(t)$ -Wertes mittels des FoldFactors möglich. Der FoldFactor und damit der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle, normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, lässt sich aus folgender Formel berechnen [75]:

$$\text{FoldFactor} = 2^{-\left(\Delta C(t)_{\text{behandelt}} - \Delta C(t)_{\text{Kontrolle}}\right)}$$

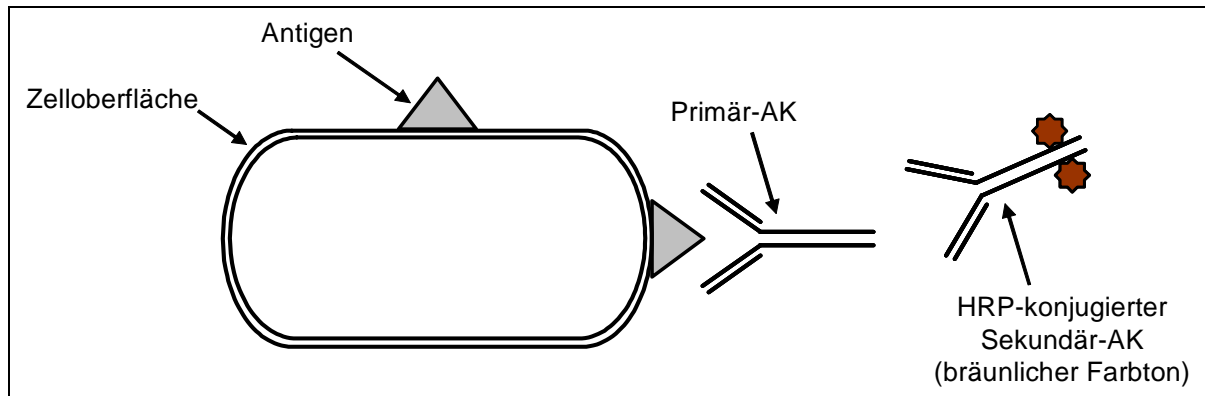
Der  $\Delta C(t)$ -Wert der Kontrolle entspricht dem für jedes Zielgen berechneten Mittelwert der  $\Delta C(t)$ -Werte der Kontrolltiere. Nun kann mit dem entsprechenden Mittelwert als Vergleichsbasis der spezifische FoldFactor für jedes Versuchstier und jedes Zielgen berechnet werden. Ergibt sich beispielsweise ein FoldFactor von 4, so bedeutet das, dass die Expression des Zielgens in den behandelten Tieren viermal höher ist als in den Kontrolltieren. Dieses Berechnungsschema wird auch als „delta-delta-CT“-Modell bezeichnet und geht von einer optimalen Real-Time PCR-Effizienz mit Verdoppelung der DNA-Menge in jedem Zyklus aus [70]. Zur Darstellung der Ergebnisse wurden aus den FoldFactor-Einzelwerten für jede Versuchsgruppe der FoldFactor-Mittelwert sowie die entsprechende Standardabweichung errechnet. Mit dem t-Test wurden die verschiedenen Gruppen auf Signifikanz untersucht, wobei signifikante ( $p < 0,05$ ) und hochsignifikante Ergebnisse ( $p < 0,01$ ) unterschieden wurden. In der graphischen Darstellung wurden die Werte der Gruppen C und I zusammengefasst, da beide

Gruppen für eine Behandlung mit Rapamycin 1,5 mg/kg/d stehen. Unterhalb der Graphen ist jeweils das Signifikanzniveau der signifikanten ( $p < 0,05$ ) bzw. hochsignifikanten ( $p < 0,01$ ) Ergebnisse angegeben. Die hochsignifikanten Ergebnisse sind zusätzlich durch hellblaue Unterlegung gekennzeichnet.

### **3.10 Immunhistologie**

Die Immunhistologie beruht auf dem antikörperbasierten Nachweis von Zielstrukturen auf der Proteinebene in den verschiedensten Geweben. Dafür wurden bei der Organentnahme der Tiere Gewebeproben von Milz, Leber und Tumor in TissueTek gegeben, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei  $-80\text{ °C}$  im Gefrierschrank gelagert. Mithilfe der Einzelfärbemethode wurden im Tumorgewebe die Marker B7-H1, CD4, CD8 $\alpha$ , CD25, CD56, Fas, Fas Ligand, Foxp3, IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$ , PD-1, PDL-2, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  und VEGF analysiert, deren Expression bereits in der Real-Time PCR untersucht worden waren.

Zunächst wurden aus den gefrorenen Gewebeblöcken 5  $\mu\text{m}$  dünne Schnitte angefertigt. Daraufhin wurden die Einzelfärbungen wie folgt durchgeführt: Die histologischen Präparate wurden über 10 Minuten in Aceton (Fa. Baker, Deventer, Niederlande) fixiert und anschließend luftgetrocknet. Nach dem Waschen des Gewebes in Tris-NaCl-Puffer (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) erfolgte in einer feuchten Kammer über Nacht bei  $4\text{ °C}$  oder eine Stunde bei Raumtemperatur die Inkubation mit einem spezifischen, aber unkonjugierten Primärantikörper (Tabelle 7), der sich an die Epitope bestimmter Antigene anheftet. Im nächsten Schritt wurde das Gewebe erneut mit Tris-NaCl-Puffer gewaschen und ein HRP-konjugierter Sekundärantikörper (Tabelle 8) dazugegeben, der über 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Dieser bindet spezifisch an den Primärantikörper und führt schließlich zu einer festen Verknüpfung zwischen den beiden Antikörpern. Danach wurde der Enzym-Substrat-Komplex mit einem Chromogen, Liquid DAB Substrate Pack (Biogenex, San Ramon, CA, USA), der sich als bräunlicher Farbton auf dem Gewebe darstellt, sichtbar gemacht (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Einfachfärbung mit dem Enzym-Substrat-Komplex bestehend aus Primär- und HRP-konjugiertem Sekundärantikörper. Der Substratumsatz (DAB) durch das Enzym HRP stellt sich im Gewebe als bräunlicher Farbton dar. AK, Antikörper; DAB, Diaminobenzidin; HRP, Horseradish peroxidase

Nach einer erneuten Waschung mit Tris-NaCl-Puffer erfolgte zuletzt eine Gegenfärbung mit Hämalan (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) und Fixierung der Gewebeschnitte mit Glycerol (Fa. Dako, Glostrup, Dänemark). Als Kontrollfärbung diente die Immunglobulin-Isotyp Kontrolle (IgG).

### 3.10.1 Verwendete Antikörper

Für die Einfachfärbung werden spezifische Primärantikörper, die sich an bestimmte Zielstrukturen binden, und HRP-konjugierte Sekundärantikörper benötigt, die mit dem Primärantikörper einen Enzym-Substrat-Komplex bilden, der als bräunlicher Farbton auf dem Gewebe sichtbar wird. Die nachfolgenden Tabellen 10 und 11 geben einen Überblick über die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper, deren Verdünnung und Hersteller. Aufgeführt sind nur die Antikörper für die Marker B7-H1, PDL-2, Foxp3, IL-2, TGF- $\beta$  und TNF- $\alpha$ , deren Ergebnisse unter 4.3 dargestellt sind.

**Tabelle 10:** Übersicht über die in der Immunhistologie verwendeten Primärantikörper mit Angaben zu Verdünnung und Hersteller der Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
B7-H1	eBioscience (San Diego, USA) 16-5982 Clone MIH5	1:150
PDL-2	eBioscience (San Diego, USA) 14-5986- 82 Clone TY25	1:50
Foxp3	eBioscience (San Diego, USA) 14-5773-82 Clone FJK-16s	1:50
IL-2	BioLegend (San Diego, USA) 503811 Clone JES6-5H4	1:50
TGF- $\beta$	Abcam (Cambridge, UK) ab25121-100	1:50
TNF- $\alpha$	Serotec (Oxford,UK) MCA1488	1:50

**Tabelle 11:** Übersicht über die in der Immunhistologie verwendeten Sekundärantikörper mit Angaben zu Verdünnung und Hersteller der Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Donkey Anti-Rat IgG – HRP	Jackson Immunoresearch (Hamburg, Deutschland) 715-036-150	1:100
Donkey Anti-Rabbit IgG – HRP	Jackson Immunoresearch (Hamburg, Deutschland) 711-036-152	1:100
Donkey Anti-Goat IgG – HRP	Jackson Immunoresearch (Hamburg, Deutschland) 705-036-147	1:100

### 3.10.2 Auswertung der Immunhistologie

Immunhistologisch beurteilt und miteinander verglichen wurde die Expression verschiedener Zelloberflächenantigene im Tumorgewebe der Tiere. Dabei wurde die Intensität, mit der die Zellen angefärbt wurden, bei jedem Gewebeschnitt in sechs Gesichtsfeldern bei 400facher Vergrößerung bestimmt und einem Score von 0 bis 3 in einer vierstufigen Beurteilungsskala zugeordnet. Die genaue Einteilung der Skala ist in Tabelle 12 aufgeführt.



**Tabelle 12:** Immunhistochemisches Auswertungsschema

Score	Expression in %
0	0-10
1	10-30
2	30-50
3	> 50

Um die Ergebnisse der einzelnen Gruppen miteinander zu vergleichen und auf Signifikanz zu überprüfen, wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Als signifikant galt auch hierbei ein Wert von  $p < 0,05$ . Für die graphische Darstellung der Daten wurde der Box-Whisker-Plot gewählt. Diese Kastengraphik vermittelt rasch einen Eindruck darüber, in welchem Bereich die Daten liegen und wie sie sich in diesem Bereich verteilen. Dargestellt werden alle Werte der so genannten Fünf-Punkte-Zusammenfassung, also der Median, die zwei Quartile und die beiden Extremwerte [76]. Der Box-Whisker-Plot zeigt für die Gruppen A bis J jeweils eine Box, in der die mittleren 50 % der Daten liegen und die durch das obere und das untere Quartil begrenzt wird. Die Länge der Box entspricht dem Interquartilsabstand, der die Streuung der Daten darstellt und durch die Differenz des oberen und unteren Quartils bestimmt wird. Der durchgehende Strich in der Box steht für den Median der jeweiligen Gruppe. Außerhalb der Box liegende Werte sind durch so genannte Whisker abgebildet, deren Länge auf maximal das 1,5fache des Interquartilsabstands beschränkt ist. Ihre Länge wird aber nicht durch den maximal möglichen Interquartilsabstand bestimmt, sondern endet bei dem Datenwert, der noch innerhalb dieser Grenze liegt [76]. Als kleine Kreise oder Dot Plots sind die Werte für jede Maus einzeln eingezeichnet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Überlebenszeit

Nach Injektion der Tumorzellen am Tag 0 wurden die Tiere täglich kontrolliert. Sobald die Mäuse Anzeichen von Krankheit, zunehmende Tumorkachexie, einen abnorm geschwollenen Bauch oder eine ungewöhnliche Trägheit zeigten, wurden die Tiere getötet. Nach Versuchsende wurden unter anderem die mittleren Überlebenszeiten der einzelnen Gruppen ermittelt, die in Tabelle 13 aufgeführt sind.

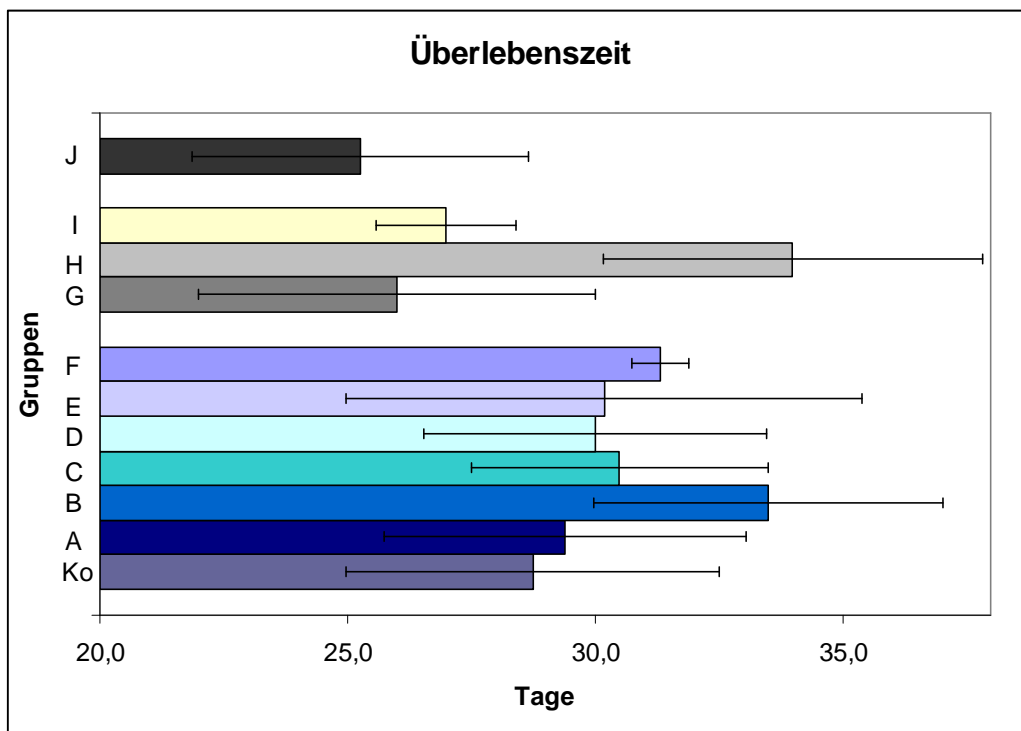
**Tabelle 13:** Übersicht der mittleren Überlebenszeit der Gruppen A-J in den Versuchsansätzen 1-3

Versuchsansatz 1		Versuchsansatz 2		Versuchsansatz 3	
Gruppe	Mittlere Überlebenszeit (Tage)	Gruppe	Mittlere Überlebenszeit (Tage)	Gruppe	Mittlere Überlebenszeit (Tage)
0	28,8	G	26	J	25,3
A	29,4	H	34		
B	33,5	I	27		
C	30,5				
D	30,0				
E	30,2				
F	31,3				

Anhand der Überlebenszeit ließ sich im ersten Versuchsansatz kein signifikanter Behandlungsvorteil einer Gruppe feststellen. Die kürzeste Überlebenszeit erreichte mit 28,8 Tagen die Gruppe der Kontrolltiere. Die Tiere, die mit einer Kombinationsbehandlung aus Rapamycin und anti-VEGF-Antikörper behandelt wurden, erzielten abgesehen von den Tieren mit Kontrollantikörperbehandlung (Gruppe B) mit 31 Tagen die längste Überlebenszeit. Im zweiten Versuchsansatz wurden drei verschiedene Dosierungen von Rapamycin untersucht. Hierbei zeigte die Gruppe H mit Rapamycin 0,75 mg/kg/d mit 34 Tagen die längste mittlere Überlebenszeit. Daraufhin wurde im dritten Versuchsansatz nochmals die Effektivität der Kombinationsbehandlung mit der reduzierten Dosis Rapamycin 0,75 mg/kg/d überprüft. In diesem ergab die Kombinationsbehandlung jedoch nur eine mittlere

Überlebenszeit von 25 Tagen. Somit konnte durch die Kombinationsbehandlung keine Verbesserung erzielt werden.

Neben der Berechnung der mittleren Überlebenszeiten der einzelnen Gruppen wurde die Standardabweichung errechnet sowie ein t-Test durchgeführt, um signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen aufzuzeigen, wobei sich keine relevanten Signifikanzen ergaben. In Abbildung 5 ist die mittlere Überlebenszeit der Gruppen A-J graphisch dargestellt.



**Abbildung 5:** Darstellung der mittleren Überlebenszeit der Tiere in den Gruppen A-J. Im ersten Versuchsansatz zeigten die Tiere der Gruppe F (Rapamycin 1,5 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) mit 31 Tagen abgesehen von Gruppe B (Kontrollantikörper ab Tag 2) mit 33 Tagen die längste Überlebenszeit. Bei Austestung dreier verschiedener Dosierungen von Rapamycin erzielten die Tiere der Gruppe H (Rapamycin 0,75mg/kg/d) mit einer Überlebenszeit von 34 Tagen das beste Ergebnis. In der Kombinationsbehandlung (Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) im dritten Versuchsansatz betrug die Überlebenszeit nur 25 Tage.

## 4.2 Makroskopisches Tumorwachstum

Bei der Organentnahme wurde vor Asservierung der Organe makroskopisch das Tumorwachstum intraabdominell beurteilt. Keines der Tiere des ersten Versuchsansatzes war tumorfrei. Es zeigte sich, dass bei den Tieren der Gruppe F (Rapamycin 1,5 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) der Tumorbefall am geringsten war. Da auch die Überlebenszeit mit 31 Tagen in Gruppe F mit am höchsten lag,

erzielten die Tiere mit der Kombinationsbehandlung aus Rapamycin und anti-VEGF-Antikörper insgesamt das beste Ergebnis.

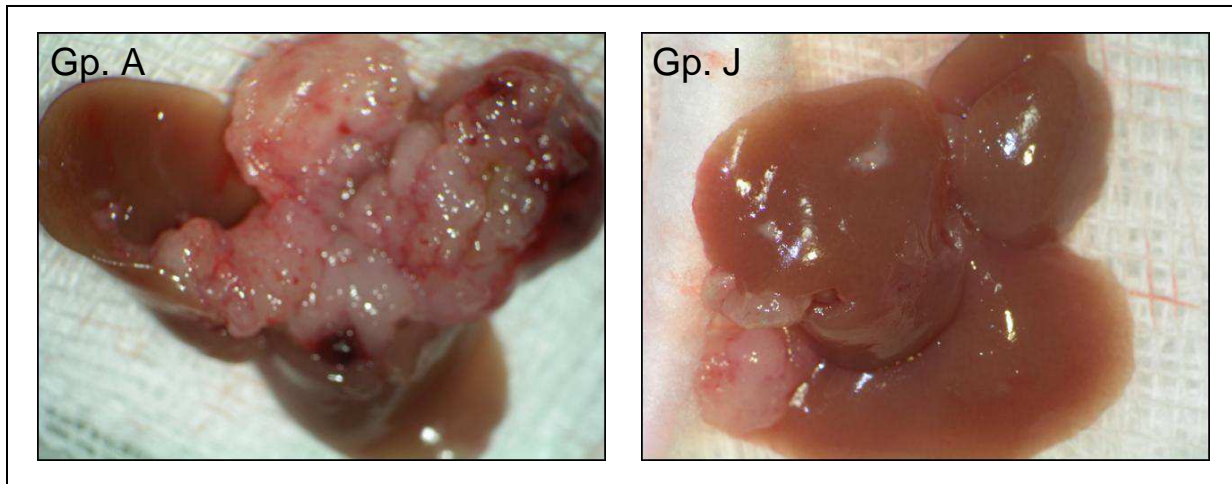
Bei den Tieren der Gruppe C und F, die ab dem 7. Tag mit täglichen Rapamycininjektionen behandelt wurden, fielen bei der Obduktion der Tiere gelbliche teils abgekapselte Rapamycinöl-Ablagerungen in der Leber und im Darmpaket auf (Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Rapamycinöl-Ablagerungen in der Leber eines mit Rapamycin behandelten Tieres.

Zur Bestätigung der im ersten Versuchsansatz gewählten Dosierung von Rapamycin 1,5 mg/kg/d wurden im zweiten Versuchsansatz drei verschiedene Dosierungen getestet. Das beste Ergebnis zeigte sich in Gruppe H mit einer Dosis von Rapamycin 0,75 mg/kg/d mit sowohl geringerer Tumormasse und Lebervolumen (Tabelle 14) als auch längerer Überlebenszeit mit 34 Tagen vs. 26 bzw. 27 Tagen (Tabelle 13). Auch hier fanden sich beim Eröffnen des Bauchraums der Tiere Rapamycinöl-Ablagerungen mit teils starken Verklebungen im Darmbereich.

Bei der im dritten Versuchsansatz durchgeführten Kombinationsbehandlung aus Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper lag die Überlebenszeit der Tiere bei nur 25 Tagen. Der Tumorbefall der mit der Kombinationsbehandlung therapierten Tiere (Gruppe J) entsprach aber annähernd dem der Tiere mit dem besten Ergebnis in Versuchsansatz 2 (Gruppe H) und war damit deutlich geringer als in der Kontrollantikörpergruppe A (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Vergleich des Tumorbefalls in der Leber. Es zeigt sich ein massiver Tumorbefall in der Leber eines repräsentativen Tieres der Gruppe A, das mit Kontrollantikörper ab Tag 0 behandelt wurde. Dagegen weist die Leber eines mit Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper therapierten Tieres ein deutlich geringes Tumorwachstum auf. Gp., Gruppe

Das Gewicht der Leber wurde stets unter 1 g gemessen. Die Größe des Lebervolumens korrelierte mit Ausnahme der Gruppen F (Rapamycin 1,5 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) und J (Rapamycin 1,5 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) mit der Stärke des Tumorbefalls in der Leber. Bei den Tieren mit starkem Tumorbefall in der Leber war das Lebervolumen jeweils größer als bei den Tieren mit leichtem Befall. So ergab sich bei den Tieren mit massivem Tumorbefall ein Lebervolumen von  $0,8 \text{ cm}^3$  bis  $1,1 \text{ cm}^3$  und bei den Tieren mit geringerem Befall ein Volumen zwischen  $0,5 \text{ cm}^3$  und  $0,6 \text{ cm}^3$ . Tabelle 14 zeigt eine Übersicht zum Tumorbefall in der Leber und intraabdominell sowie das durchschnittliche Lebervolumen. Dabei steht „+“ für sichtbaren Tumorbefall und „++“ für massiven Tumorbefall.

**Tabelle 14:** Darstellung des Tumorbefalls sowohl in der Leber als auch intraabdominell und des Lebervolumens in den Gruppen A-J in den drei Versuchsreihen. „+“ steht für sichtbaren, „++“ für massiven Tumorbefall, das Lebervolumen ist in cm<sup>3</sup> aufgeführt. Im ersten Versuchsansatz war der Tumorbefall bei den Tieren der Gruppe F (Rapamycin 1,5 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) am geringsten. Im zweiten Versuchsansatz war die Ausdehnung des Tumors in der Leber bei den Tieren der Gruppe H (Rapamycin 0,75 mg/kg/d) geringer als bei den Tieren der Gruppen G und I. Im dritten Versuchsansatz entsprach die Tumorausbreitung in der Leber der Tiere der Gruppe J (Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) der der Tiere der Gruppe H. Das Lebervolumen korrelierte mit Ausnahme der Gruppen F und J mit der Stärke des Tumorbefalls. Bei mäßigem Tumorbefall lagen die Werte der Lebervolumina zwischen 0,5 cm<sup>3</sup> und 0,6 cm<sup>3</sup>, bei massivem Leberbefall bei 0,8 cm<sup>3</sup> bis 1,1 cm<sup>3</sup>.

Gruppe	Tumorbefall		Volumen (cm <sup>3</sup> )
	Leber	intraabdominell	
<b>Versuchsansatz 1</b>			
0	+	+	0,60
A	++	++	1,10
B	+	++	0,49
C	+	+	0,59
D	++	++	1,11
E	++	++	0,93
F	+	+	0,81
<b>Versuchsansatz 2</b>			
G	++	++	0,78
H	+	++	0,63
I	++	++	0,88
<b>Versuchsansatz 3</b>			
J	+	++	1,35

### 4.3 Real-Time PCR- und immunhistologische Ergebnisse

Neben der Bestimmung der Überlebenszeit und der Beurteilung der Tumorausbreitung wurden eine Real-Time PCR und eine immunhistologische Untersuchung von Milz-, Leber- und Tumorgewebe durchgeführt.

Im Folgenden sind die Real-Time PCR-Ergebnisse der einzelnen Marker jeweils im Milz-, Leber- und Tumorgewebe dargestellt, wobei der Übersichtlichkeit wegen nur die Zytokine mit signifikanten bzw. hochsignifikanten Ergebnissen graphisch aufgeführt sind. So sind die Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-10, CD56, TGF- $\beta$ 1, Fas und Fas Ligand aufgrund fehlender Signifikanz nicht gezeigt.

In der immunhistologischen Analyse sind die Ergebnisse der Marker IL-2, TNF- $\alpha$ , Foxp3, TGF- $\beta$ , B7-H1 und PD-L2 im Tumorgewebe dargestellt.

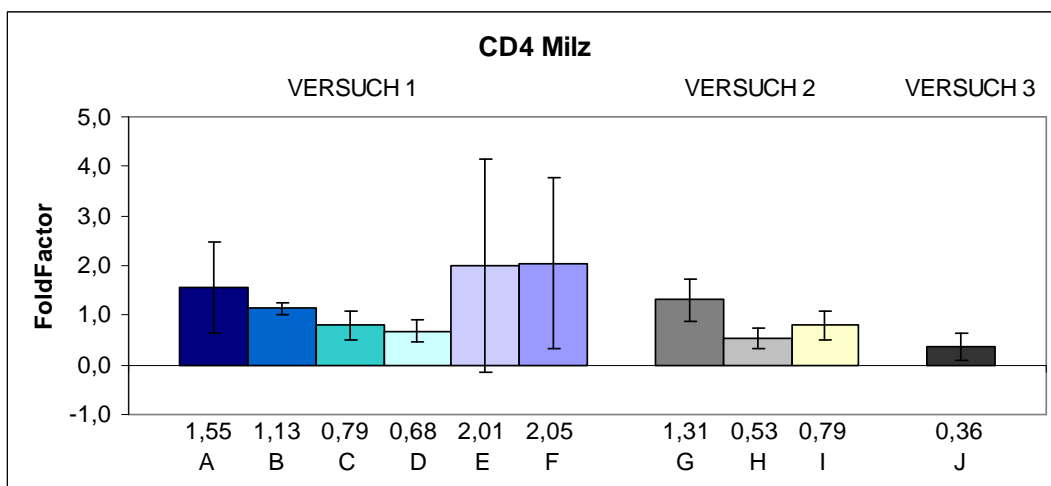
### 4.3.1 T-Zellpopulationen

Untersucht wurden die Expressionsprofile für T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen und regulatorische T-Zellen. Alle drei Subtypen besitzen Oberflächenmarker, mit denen sie näher charakterisiert werden.

#### 4.3.1.1 T-Helferzellen

T-Helferzellen sind durch den molekularen Marker CD4 gekennzeichnet. Bei der Expression von CD4 zeigten sich in der Real-Time PCR in allen drei Geweben signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

Im Milzgewebe lag die Expression von CD4 in Gruppe H, in der die Tiere Rapamycin 0,75 mg/kg/d bekommen hatten, dreifach, in Gruppe J, in der die Tiere mit der Kombination aus Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper therapiert wurden, vierfach unter der mit Kontrollantikörper behandelten Gruppe A und war damit signifikant niedriger (Abbildung 8).



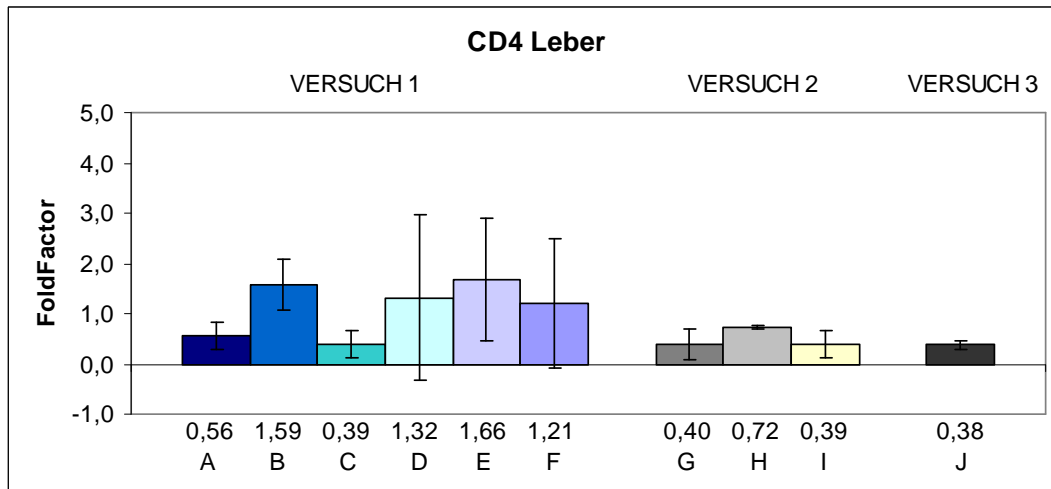
**Abbildung 8:** Darstellung der Genexpression von CD4 in der Milz von Tieren der Gruppen A-J. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen A und H sowie den Gruppen A und J mit einem um etwa das Dreifache bzw. das Vierfache erniedrigten FoldFactor in H bzw. J verglichen mit der Gruppe A.

**Signifikanzniveau** (signifikant:  $p < 0,05$  und hochsignifikant:  $p < 0,01$ ):

A#H	A#J
0,032	0,041

Im Lebergewebe zeigte sich eine Signifikanz zwischen den Tieren mit der Kontrollantikörperbehandlung ab Tag 2 (Gruppe B) und den Tieren mit der Kombinationsbehandlung aus Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper (Gruppe J) mit einem vierfach erniedrigten FoldFactor in Gruppe J sowie ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den mit Rapamycin 0,75 mg/kg/d behandelten Tieren

(Gruppe H) und der Gruppe J mit einer knapp zweifach höheren Expression von CD4 in Gruppe H (Abbildung 9).



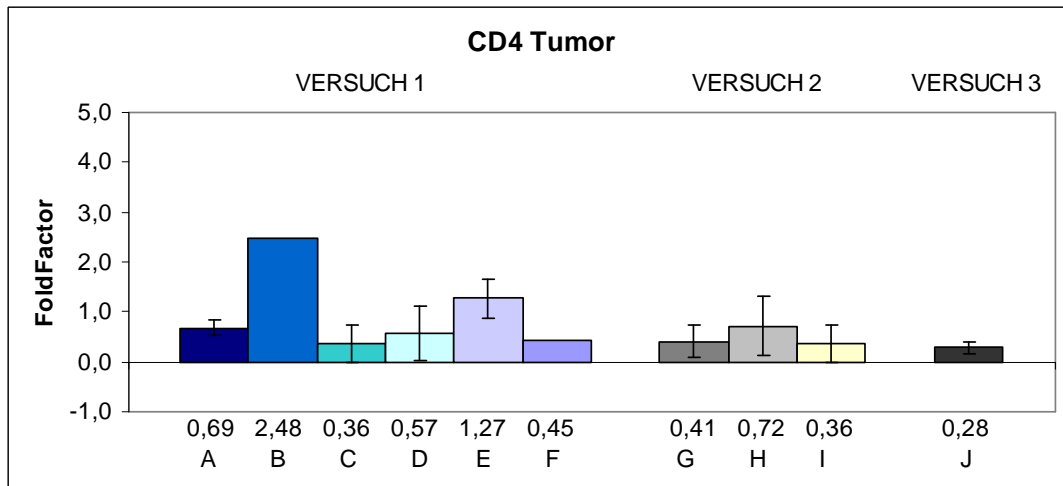
**Abbildung 9:** Darstellung der Genexpression von CD4 in der Leber von Tieren der Gruppen A-J. Es zeigten sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen B und J mit einer vierfach erniedrigten Expression von CD4 in J sowie eine hochsignifikante Differenz zwischen den Gruppen H und J mit einer ca. zweifach erhöhten Expression in Gruppe H.

**Signifikanzniveau** (signifikant:  $p < 0,05$  und hochsignifikant:  $p < 0,01$ ):

B#J	H#J
0,023	0,004

Im Tumorgewebe lag der Wert in Gruppe J, die mit der Kombination aus Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper behandelt wurde, 2,5fach bzw. 4,5fach unter dem der Gruppe A, in der die Tiere Kontrollantikörper bekommen hatten, bzw. E, in der die Tiere mit anti-VEGF-Antikörper ab Tag 2 therapiert wurden, und verhielt sich damit signifikant (Abbildung 10).





**Abbildung 10:** Darstellung der Genexpression von CD4 im Tumor von Tieren der Gruppen A-J. Die Expression von CD4 in der Gruppe J verhielt sich mit einem 2,5fach bzw. 4,5fach erniedrigten Expressionsniveau in Gruppe J signifikant zu den Gruppen A und E.

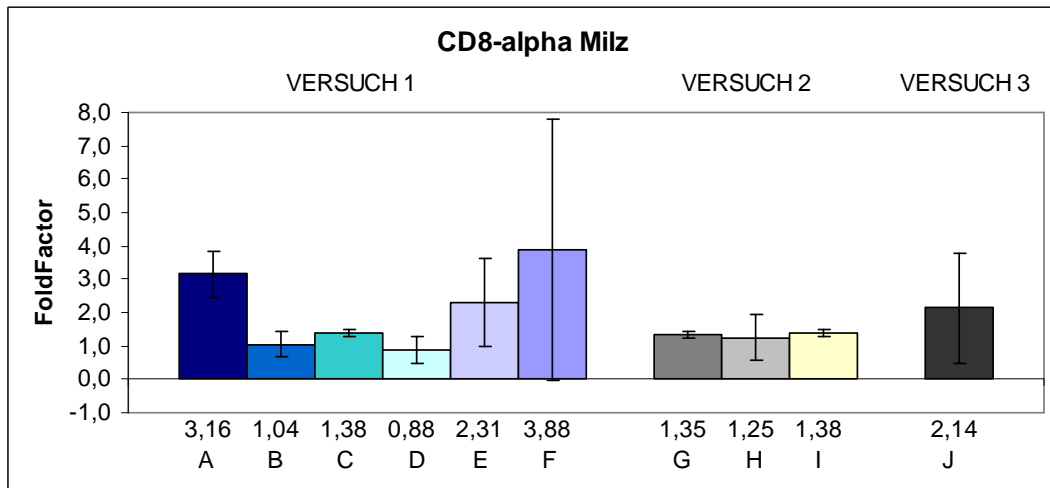
**Signifikanzniveau** (signifikant:  $p < 0,05$  und hochsignifikant:  $p < 0,01$ ):

A#J	E#J
0,034	0,022

Im Tumorgewebe ergab sich wie auch schon im Milz- und Lebergewebe in der Gruppe J ein Expressionsniveau von ca. 0,3. Damit war die Expression von CD4 in allen drei Geweben verglichen mit den Kontrollgruppen deutlich erniedrigt. Somit war die Expression von CD4 in den Gruppen mit geringerer Tumorausdehnung (Gruppen H und J) insgesamt deutlich niedriger als in den stark mit Tumor befallenen Tieren der Gruppen A und B.

#### 4.3.1.2 Zytotoxische T-Zellen

Als molekularer Marker für zytotoxische T-Zellen dient CD8 $\alpha$ . Im Milzgewebe zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den mit Rapamycin 1,5 mg/kg/d therapierten Tieren der Gruppen C bzw. I und der Gruppe A, in der die Tiere mit Kontrollantikörper behandelt wurden. Die Expression von CD8 $\alpha$  lag in den Gruppen C und I um das 2,3fache niedriger als in A (Abbildung 11).

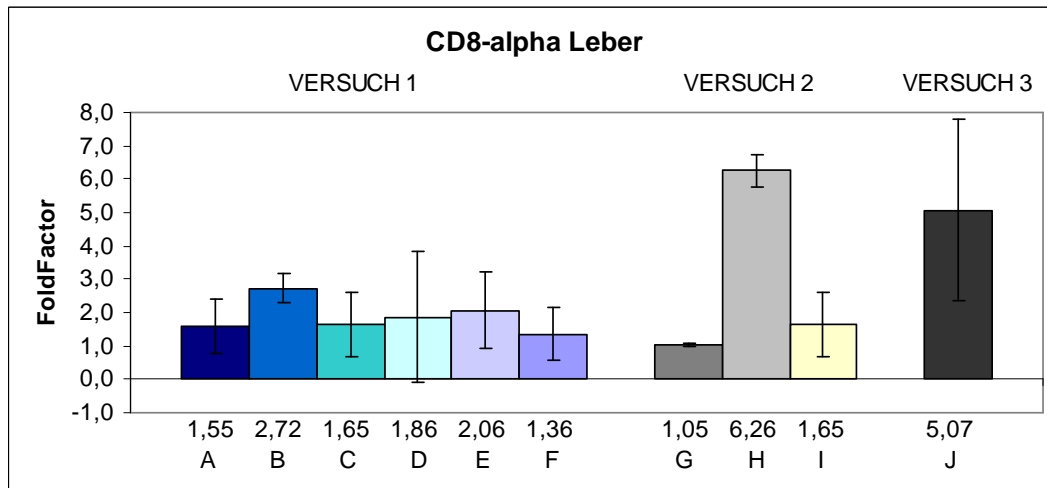


**Abbildung 11:** Darstellung der Genexpression von CD8 $\alpha$  in der Milz von Tieren der Gruppen A-J. Hierbei verhielten sich die Gruppen C bzw. I mit einer 2,3fach erniedrigten Expression von CD8 $\alpha$  signifikant unterschiedlich zur Gruppe A.

**Signifikanzniveau** (signifikant:  $p < 0,05$  und hochsignifikant:  $p < 0,01$ ):

A#C/I
0,018

Im Lebergewebe unterschied sich Gruppe H (Rapamycin 0,75 mg/kg/d) zu fast allen Gruppen hochsignifikant unterschiedlich. Nur Gruppe J mit der Kombinationsbehandlung aus Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper war nicht signifikant unterschiedlich bezüglich Gruppe H. Das Expressionsniveau in Gruppe H lag 2-4,5fach über dem der Gruppe A-F und I und 6fach über dem der Gruppe G (Rapamycin 1,0 mg/kg/d) (Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Darstellung der Genexpression von CD8 $\alpha$  in der Leber von Tieren der Gruppen A-J. Die Tiere der Gruppe H exprimierten in ihrer Leber verglichen mit denen der Gruppen A-C und E-G mit einem 2-6fach höheren Expressionsniveau hochsignifikant mehr CD8 $\alpha$ .

**Signifikanzniveau** (signifikant:  $p < 0,05$  und hochsignifikant:  $p < 0,01$ ):

A#H	B#H	C/I#H	D#H	E#H	F#H	G#H
0,004	0,004	0,002	0,027	0,009	0,003	0,001

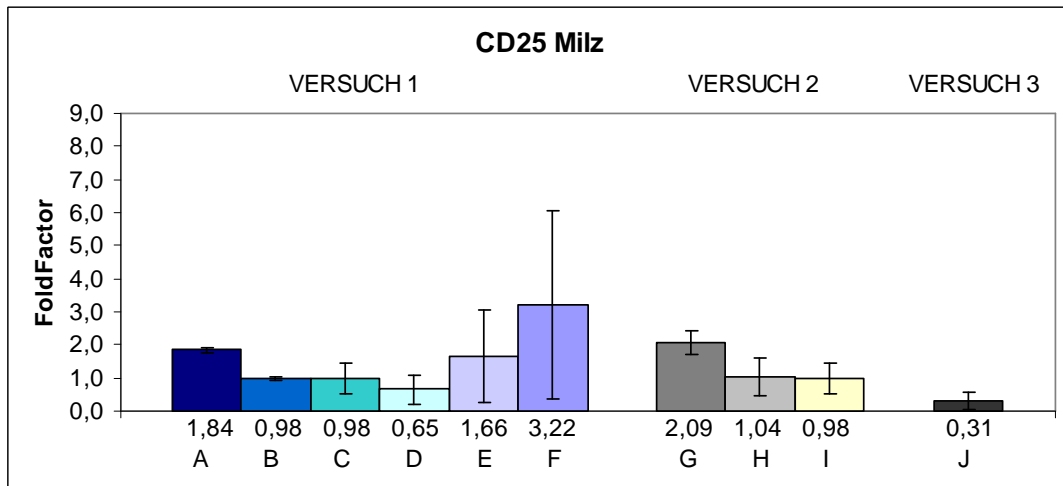
Im Tumorgewebe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Insgesamt zeigte vor allem das Expressionsprofil im Lebergewebe, dass CD8 $\alpha$  genau in den Gruppen hoch exprimiert war, die zugleich ein geringeres Tumorstadium aufwiesen. Dies spricht für eine gesteigerte Infiltration der zytotoxischen T-Zellen in die Leber und damit in die Tumorumgebung.

#### 4.3.1.3 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen zeichnen sich durch die Marker CD25 und Foxp3 aus.

#### CD25

Die Expression von CD25 wies in allen drei Geweben Signifikanzen auf. Im Milzgewebe verhielt sich die Gruppe J (Kombinationsbehandlung aus Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) mit einem drei- bzw. sechsfach erniedrigten Expressionsniveau zum Teil hochsignifikant unterschiedlich zu den Gruppen A, B und G. Ferner unterschied sich die Gruppe G (Rapamycin 1,0 mg/kg/d) signifikant von der Kontrollantikörpergruppe B. Die Expression in Gruppe G war dabei um das Zweifache im Vergleich zur Gruppe B erhöht (Abbildung 13).

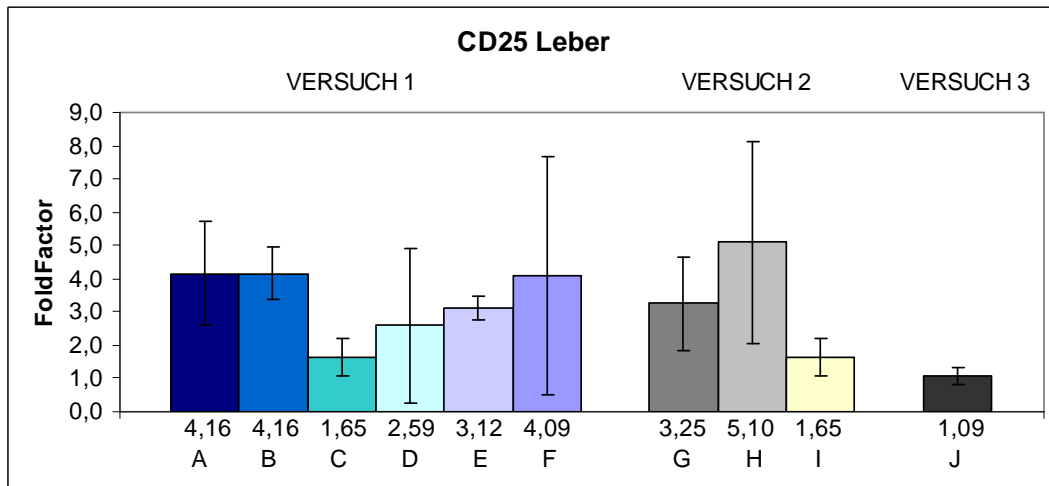


**Abbildung 13:** Darstellung der Genexpression von CD25 in der Milz von Tieren der Gruppen A-J. Die Gruppe J unterschied sich mit einem drei- bzw. sechsfach erniedrigten Expressionsniveau zum Teil hochsignifikant zu den Gruppen A, B und G. Zudem verhielt sich Gruppe G mit einer zweifach erhöhten Expression signifikant unterschiedlich zur Gruppe B.

**Signifikanzniveau** (signifikant:  $p < 0,05$  und hochsignifikant:  $p < 0,01$ ):

A#B	A#J	B#G	B#J	G#J
0,007	0,004	0,049	0,037	0,007

Im Lebergewebe wies vor allem die Gruppe J mit der Kombinationsbehandlung aus Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper signifikante Unterschiede auf. Sie zeigte sich hochsignifikant unterschiedlich zu der Gruppe B, in der die Tiere Kontrollantikörper ab Tag 2 erhalten hatten, und zur Gruppe E, in der die Tiere mit anti-VEGF-Antikörper ab Tag 2 therapiert wurden, sowie signifikant unterschiedlich zu der Gruppe A (Kontrollantikörper ab Tag 0). Die Expression in Gruppe J lag 3-4fach unter der der Gruppen A, B und E und mit einem Wert von 1,09 insgesamt meist deutlich unter den Werten aller Gruppen. Außerdem lag das Expressionsniveau in den Gruppen C und I, in denen die Tiere mit Rapamycin 1,5 mg/kg/d behandelt wurden, mit einem 2,5fach erniedrigten Wert signifikant unter dem der Gruppe B (Kontrollantikörper ab Tag 2) (Abbildung 14).

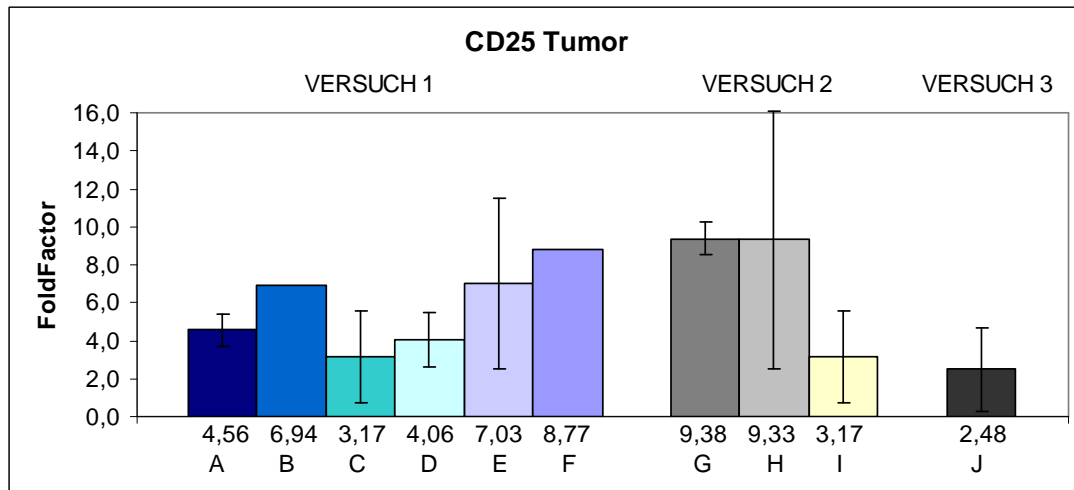


**Abbildung 14:** Darstellung der Genexpression von CD25 in der Leber von Tieren der Gruppen A-J. Der FoldFactor in der Gruppe J lag mit einem Wert von 1,09 insgesamt meist deutlich unter den Werten der anderen Gruppen und wies eine Signifikanz zur Gruppe A sowie eine hohe Signifikanz zu den Gruppen B und E auf. Ebenfalls signifikant waren die Gruppen C und I zur Gruppe B mit einer 2,5fach erniedrigten Expression in den Gruppen C und I.

**Signifikanzniveau** (signifikant:  $p < 0,05$  und hochsignifikant:  $p < 0,01$ ):

B#C/I	A#J	B#J	E#J
0,024	0,036	0,007	0,005

Im Tumorgewebe lag die Expression von CD25 insgesamt höher als im Milz- und Lebergewebe. Es ergaben sich Signifikanzen in der Gruppe G, in der die Tiere mit Rapamycin 1,0 mg/kg/d behandelt wurden, bezüglich der Gruppe A (Kontrollantikörper ab Tag 0), der Gruppe C bzw. I (Rapamycin 1,5 mg/kg/d), der Gruppe D (anti-VEGF-Antikörper ab Tag 0) und der Gruppe J (Kombination aus Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) mit einem 2-3,8fach erhöhten Expressionsniveau (Abbildung 15).



**Abbildung 15:** Darstellung der Genexpression von CD25 im Tumor von Tieren der Gruppen A-J. Gruppe G verhielt sich signifikant gegenüber den Gruppen A, C, D, I und J mit einem 2-3,8fach erhöhten Expressionsniveau.

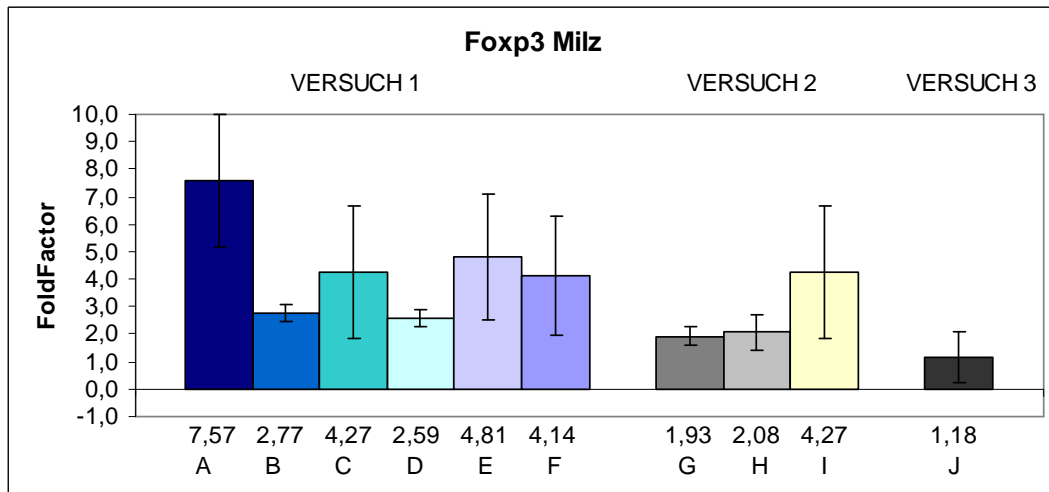
**Signifikanzniveau** (signifikant:  $p < 0,05$  und hochsignifikant:  $p < 0,01$ ):

G#A	G#C/I	G#D	G#J
0,028	0,044	0,045	0,027

Im Tumorgewebe war die Expression von CD25 deutlich erhöht. Dies deutet auf eine gesteigerte Infiltration regulatorischer T-Zellen im Tumorgewebe hin. Im Lebergewebe wiesen die Kontrollantikörpergruppen A und B, die stärker vom Tumor befallen waren, ein höheres Expressionsniveau von CD25 als beispielsweise Gruppe J (Kombination aus Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) auf, die in allen drei Geweben eine teils signifikant erniedrigte Expression von CD25 zeigte und zugleich geringer vom Tumor befallen war. Eine stärkere Infiltration des Tumors mit möglichen regulatorischen T-Zellen war somit mit einem ausgeprägteren Tumorwachstum assoziiert.

### Foxp3

Die Expression von Foxp3 war im Milz- und Lebergewebe signifikant erhöht. Im Milzgewebe verhielten sich die Gruppen H (Rapamycin 0,75 mg/kg/d) und J (Kombinationsbehandlung Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) signifikant gegenüber der Gruppe A, in der die Tiere mit Kontrollantikörper ab Tag 0 behandelt wurden. Das Expressionsniveau der Gruppen H und J lag dabei 3,6fach bzw. 6,4fach unter dem der Gruppe A (Abbildung 16).

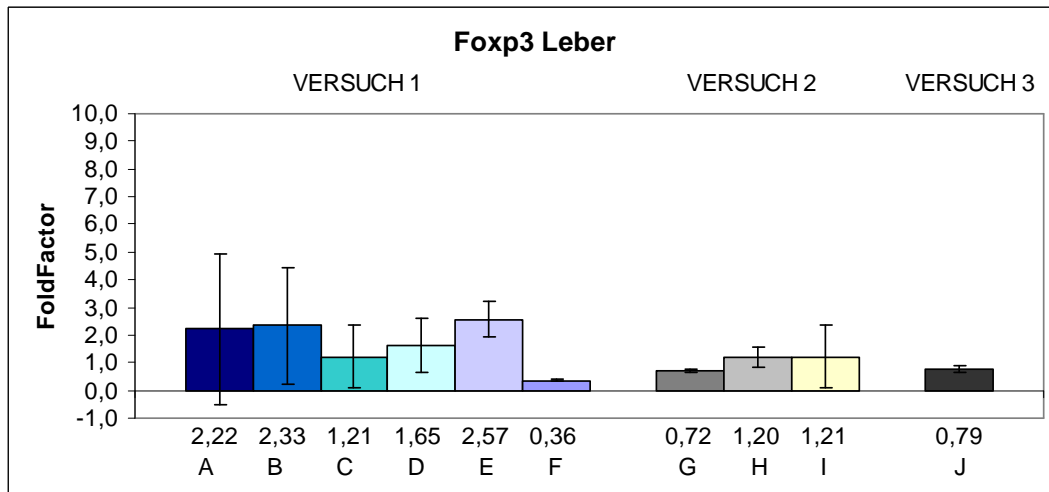


**Abbildung 16:** Darstellung der Genexpression von Foxp3 in der Milz von Tieren der Gruppen A-J. Die Gruppen H und J unterschieden sich mit einem 3,6 bzw. 6,4fach erniedrigten Expressionsniveau signifikant von der Gruppe A.

**Signifikanzniveau** (signifikant:  $p < 0,05$  und hochsignifikant:  $p < 0,01$ ):

A#H	A#J
0,027	0,021

Im Lebergewebe unterschied sich die Gruppe F, in der die Tiere mit Rapamycin 1,5 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper therapiert wurden, mit einer 7fach bzw. 2fach erniedrigten Expression von Foxp3 signifikant von der Gruppe E (anti-VEGF-Antikörper ab Tag 2) und der Gruppe G (Rapamycin 1,0 mg/kg/d). Zudem ergab sich eine Signifikanz der Gruppen E (anti-VEGF-Antikörper ab Tag 2) und F (Kombination aus Rapamycin 1,5 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) bezüglich der Gruppe J, in der die Tiere die Kombinationsbehandlung mit Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper erhalten hatten. Dabei lag der FoldFactor von Gruppe J dreifach unter dem von E und zweifach über dem von F (Abbildung 17).



**Abbildung 17:** Darstellung der Genexpression von Foxp3 in der Leber von Tieren der Gruppen A-J. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Gruppe F bzgl. der Gruppen E und G mit einem 7fach bzw. 2fach erniedrigten FoldFactor. Außerdem verhielt sich die Gruppe J signifikant zu den Gruppen E und F mit einer dreifach erniedrigten Expression von J gegenüber E und einer zweifach gesteigerten Expression von J gegenüber F.

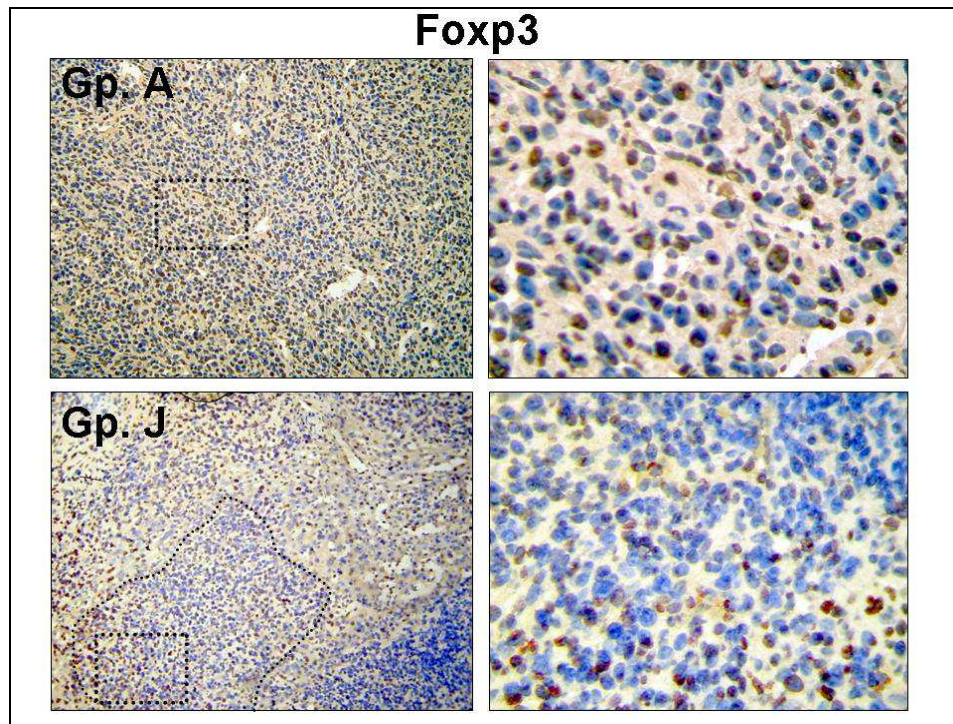
**Signifikanzniveau** (signifikant:  $p < 0,05$  und hochsignifikant:  $p < 0,01$ ):

E#F	G#F	E#J	F#J
0,040	0,013	0,015	0,020

Sowohl im Milz- als auch im Lebergewebe war die Foxp3-Expression, hinweisend auf mögliche regulatorische T-Zellen, in den Tieren mit der Kombinationsbehandlung aus Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper (Gruppe J), die zudem einen geringeren Tumorbefall zeigten, niedriger als in den Tieren, die mit Kontrollantikörper behandelt wurden (Gruppe A). Im Tumorgewebe ergaben sich in der Real-Time PCR für die Foxp3-Expression keine relevanten Unterschiede.

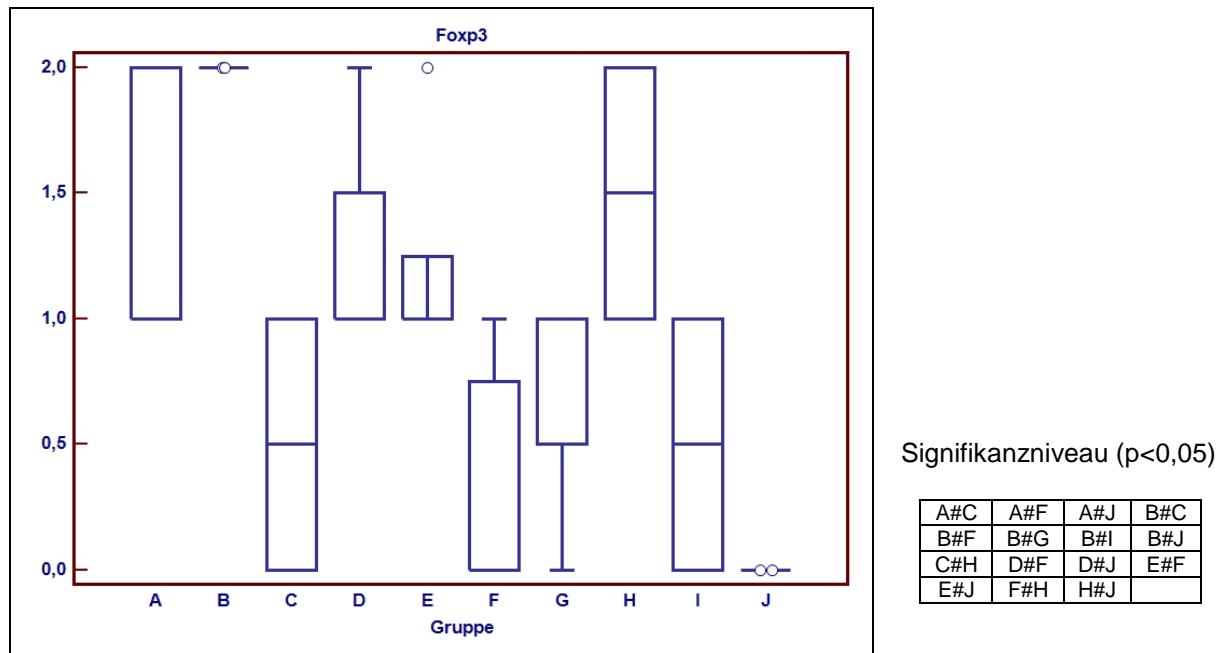
In der Immunhistologie des Tumorgewebes zeigte sich dagegen, dass die Expression von Foxp3 in der Gruppe J deutlich unter der der Kontrollantikörpergruppe A lag (Abbildung 18).





**Abbildung 18:** Repräsentative immunhistochemische Darstellung der Foxp3-Expression im Tumor. Es zeigte sich eine im Vergleich zur Gruppe A (Kontrollantikörper ab Tag 0) (linkes und rechtes oberes Bild) deutlich verringerte Foxp3-Expression im Tumorgewebe bei den Tieren der Gruppe J (Kombinationsbehandlung aus Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) (linkes und rechtes unteres Bild). Braune Zellen sind DAB-positiv, die blaue Farbe entspricht der Hämalaun-Kerngegenfärbung. Linke Bilder 100fache Vergrößerung, rechte Bilder 400fache Vergrößerung des im linken Bild als Kasten gekennzeichneten Arealen. Die unterbrochene Linie im Bild links unten stellt die Lebermetastase umgeben von normalem Leberparenchym dar. Gp., Gruppe

Immunhistologisch zeigte sich außerdem, dass die Expression des Markers Foxp3 nicht nur in der Gruppe J, sondern auch die der Gruppen C (Rapamycin 1,5 mg/kg/d) und F (Kombinationsbehandlung aus Rapamycin 1,5 mg/kg und anti-VEGF-Antikörper) signifikant gegenüber der Kontrollantikörpergruppe A erniedrigt war. Eine Übersicht über die Expression von Foxp3 in den einzelnen Gruppen sowie über die signifikanten Ergebnisse gibt Abbildung 19.



**Abbildung 19:** Darstellung der immunhistologisch positiv markierten Zellen für Foxp3 im Tumor von Tieren der Gruppen A-J. Daneben sind die zueinander signifikanten Gruppen aufgeführt. Die Expression von Foxp3 lag in den Gruppen A, B, D und H bei Werten zwischen 10 und 50 % positiver Zellen und damit teils signifikant über der Expression in den Gruppen C, F, G, I und J.

Insgesamt zeigte sich sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene, dass die Foxp3- ebenso wie die CD25-Expression und damit die Zahl der vermutlich regulatorischen T-Zellen im Milz-, Leber- und Tumorgewebe bei den Tieren deutlich niedriger exprimiert war, die ein geringeres Tumorstadium aufwiesen (Gruppen C, F und J).

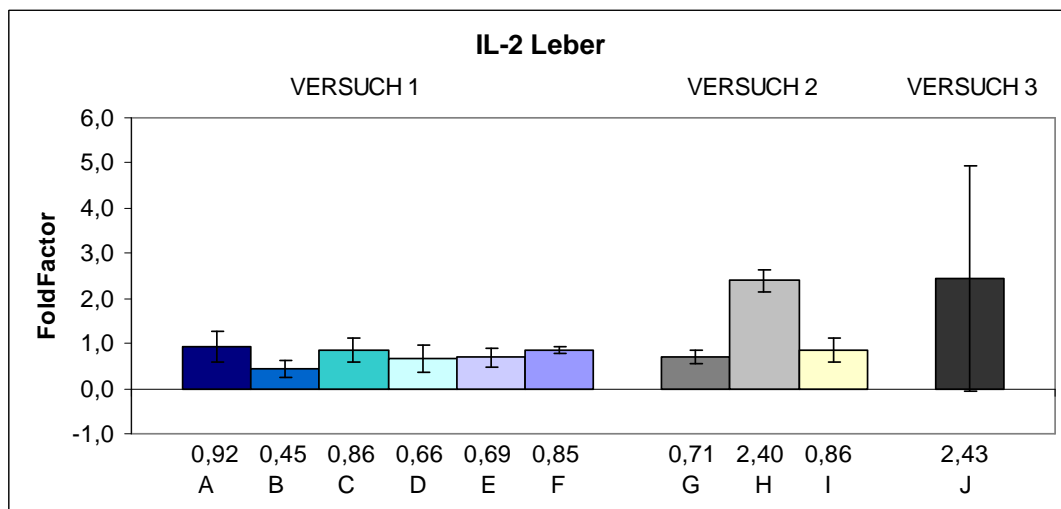
### 4.3.2 Th1-/Th2-Immunantwort

T-Helferzellen werden in Th1- und Th2-Zellen unterteilt, die sich sowohl funktionell als auch durch ihr Zytokinprofil voneinander unterscheiden. Aktivierte Th1-Zellen sezernieren u.a. die inflammatorischen Zytokine IL-2, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ . Zu den Zytokinen der Th2-Immunantwort gehören u.a. IL-4, IL-6 und IL-10, wobei im Rahmen dieser Arbeit nur IL-10 untersucht wurde. Signifikante Ergebnisse ergaben sich für die Zytokine IL-2 und TNF- $\alpha$ , die im Folgenden graphisch dargestellt sind. Auf eine Darstellung der Ergebnisse von IL-10 wurde aufgrund fehlender Signifikanz verzichtet.

#### 4.3.2.1 Interleukin-2

Das Zytokin IL-2 wurde in Milz-, Leber- und Tumorgewebe mittels Real-Time PCR untersucht. Im Milz- und Tumorgewebe variierte die Expression von IL-2 in den einzelnen Gruppen stark und wies keine signifikanten Unterschiede auf.

Die Untersuchung der Expression von IL-2 im Lebergewebe zeigte dagegen einen signifikanten Unterschied der Gruppe H, die mit Rapamycin 0,75 mg/kg/d behandelt wurde, gegenüber der Kontrollantikörpergruppe A und einen hochsignifikanten Unterschied bezüglich den Gruppen B (Kontrollantikörper ab Tag 2), C/I (Rapamycin 1,5 mg/kg/d), D (anti-VEGF-Antikörper ab Tag 0), E (anti-VEGF-Antikörper ab Tag 2), F (Kombination aus Rapamycin 1,5 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) und G (Rapamycin 1,0 mg/kg/d). Das Zytokin IL-2 wurde in Gruppe H 2,5-fach stärker exprimiert als in den Gruppen A-I. (Abbildung 20).



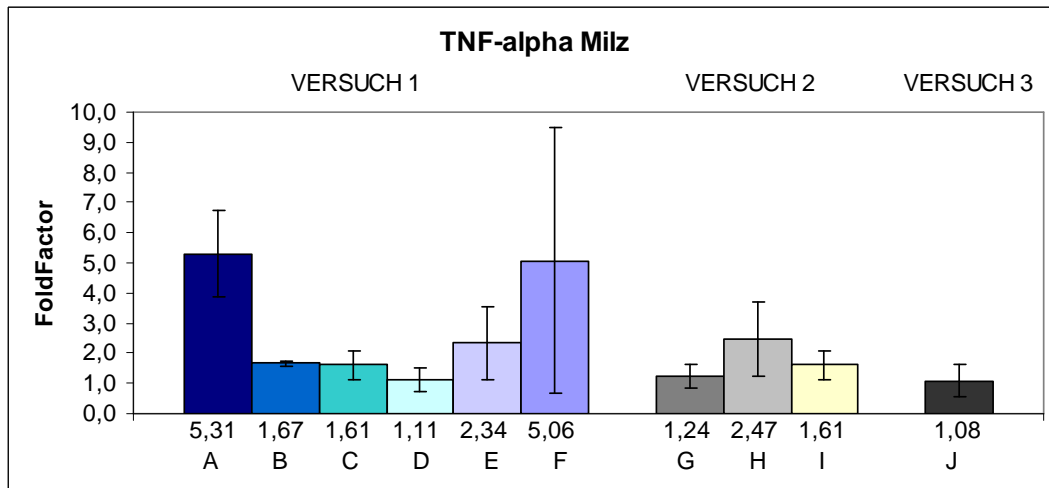
**Abbildung 20:** Darstellung der Genexpression von IL-2 in der Leber von Tieren der Gruppen A-J. Es zeigten sich in der Gruppe H gegenüber der Gruppe A eine um das 2,5fache signifikant gesteigerte Expression sowie eine um das 2,5-5fache hochsignifikant gesteigerte Expression von IL-2 gegenüber den Gruppen B-I.

**Signifikanzniveau** (signifikant:  $p < 0,05$  und hochsignifikant:  $p < 0,01$ ):

H#A	H#B	H#C	H#D	H#E	H#F	H#G
0,011	0,003	0,002	0,006	0,004	0,004	0,003

#### 4.3.2.2 TNF- $\alpha$

Die Expression von TNF- $\alpha$  wies in allen drei Geweben signifikante Ergebnisse auf. Im Milzgewebe ergab sich ein signifikanter Unterschied für die Gruppen C/I (Rapamycin 1,5 mg/kg/d) und J (Kombinationsbehandlung aus Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) bezüglich der Gruppe A, in der die Tiere Kontrollantikörper ab Tag 0 bekommen hatten. Das Expressionsniveau der Gruppen C/I und J lag dabei dreifach bzw. fünffach unter dem der Gruppe A (Abbildung 21).

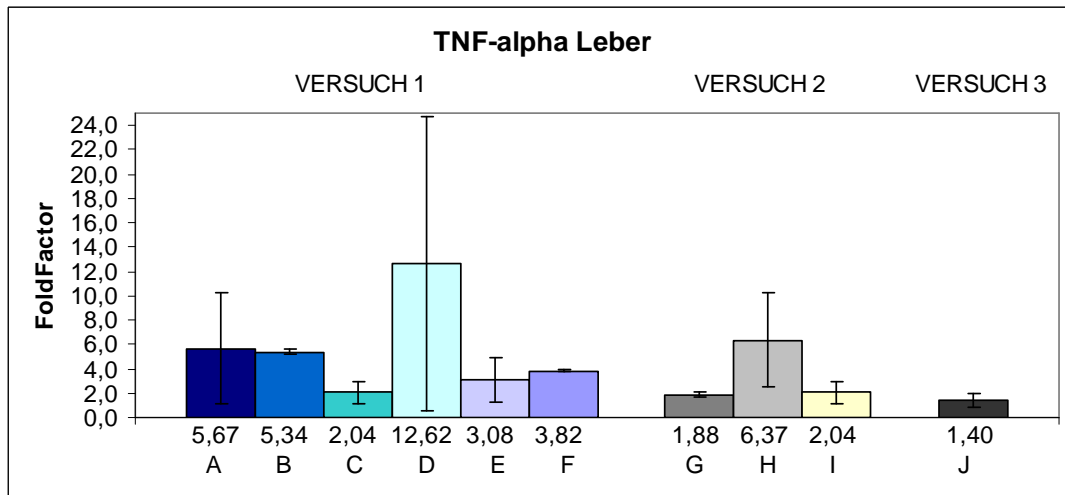


**Abbildung 21:** Darstellung der Genexpression von TNF $\alpha$  in der Milz von Tieren der Gruppen A-J. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Gruppen C/I und J gegenüber der Gruppe A mit einer dreifach bzw. fünffach erniedrigten Expression.

**Signifikanzniveau** (signifikant:  $p < 0,05$  und hochsignifikant:  $p < 0,01$ ):

A#C/I	A#J
0,021	0,016

Im Lebergewebe verhielten sich die Gruppe C und I, in der die Tiere mit Rapamycin 1,5 mg/kg/d therapiert wurden, sowie die Gruppe F (Rapamycin 1,5 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) mit einem 2,6 bzw. 1,4fach erniedrigten Expressionsniveau signifikant zur Gruppe B (Kontrollantikörper ab Tag 2). Zudem unterschieden sich die Gruppen G (Rapamycin 1,0 mg/kg/d) und J (Kombination aus Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) hochsignifikant von der Gruppe B. Dabei lag die Expression von TNF- $\alpha$  in den Gruppen G und J um das 2,8 und 3,8fache unter der der Gruppe B. Des Weiteren wies die Gruppe F mit der Kombinationsbehandlung aus Rapamycin 1,5 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper eine hohe Signifikanz zu der Gruppe G (Rapamycin 1,0 mg/kg/d) und der Gruppe J (Kombination aus Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) mit einer um das Zwei- bis knapp Dreifache gesteigerten Genexpression auf (Abbildung 22).

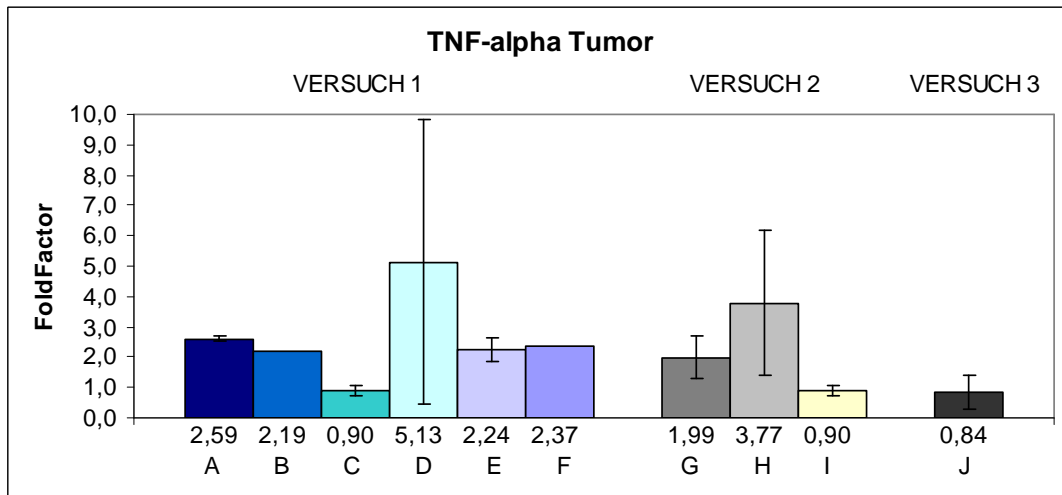


**Abbildung 22:** Darstellung der Genexpression von TNF- $\alpha$  in der Leber von Tieren der Gruppen A-J. Die Gruppe C und I sowie die Gruppe F wiesen mit einem 2,6 bzw. 1,4fach erniedrigten Expressionsniveau einen signifikanten Unterschied zur Gruppe auf. Die Gruppen G und J verhielten sich hochsignifikant unterschiedlich gegenüber der Gruppe B. Dabei lag die Expression von TNF- $\alpha$  in den Gruppen G und J um das 2,8 und 3,8fache unter der der Gruppe B. Zudem zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied bei Gruppe F zu G und J mit einer zwei- bis knapp dreifach gesteigerten Expression.

**Signifikanzniveau** (signifikant:  $p < 0,05$  und hochsignifikant:  $p < 0,01$ ):

B#C/I	B#F	B#G	B#J	F#G	F#J
0,019	0,011	0,003	0,003	0,005	0,009

Im Tumorgewebe ergaben sich signifikante Ergebnisse zwischen der Gruppe J (Kombination aus Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) und der Kontrollantikörpergruppe A sowie zwischen der Gruppe C/I (Rapamycin 1,5 mg/kg/d) und der Gruppe E, in der die Tiere anti-VEGF-Antikörper ab Tag 2 erhalten hatten. Dabei lag das Expressionsniveau für TNF- $\alpha$  von Gruppe J ca. dreifach unter dem von A sowie das der Gruppe C/I 2,5fach unter dem von E. Zudem verhielt sich die Gruppe C/I (Rapamycin 1,5 mg/kg/d) mit einer dreifach erniedrigten Expression hochsignifikant zur Kontrollantikörpergruppe A (Abbildung 23).



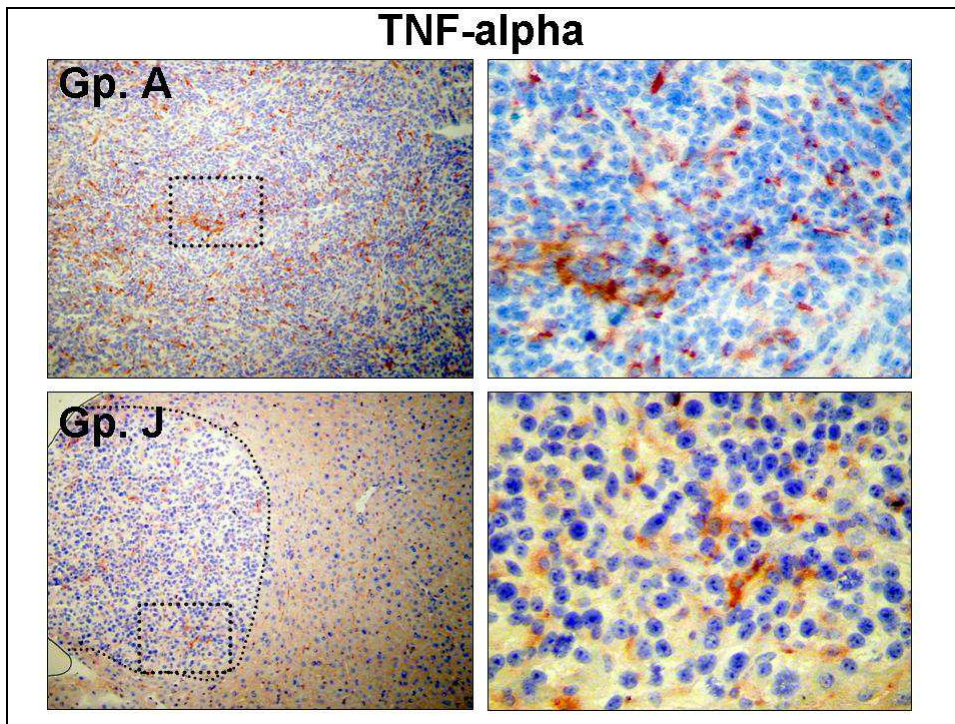
**Abbildung 23:** Darstellung der Genexpression von TNF- $\alpha$  im Tumor von Tieren der Gruppen A-J. Gruppe C/I verhielt sich mit einer ca. dreifach erniedrigten Expression von TNF- $\alpha$  hochsignifikant zur Gruppe A. Signifikante Unterschiede zeigten sich zwischen den Gruppen J und A sowie zwischen den Gruppen C/I und E mit einer 3 bzw. 2,5fach erniedrigten Expression.

**Signifikanzniveau** (signifikant:  $p < 0,05$  und hochsignifikant:  $p < 0,01$ ):

A#C/I	A#J	C/I#E
0,001	0,027	0,012

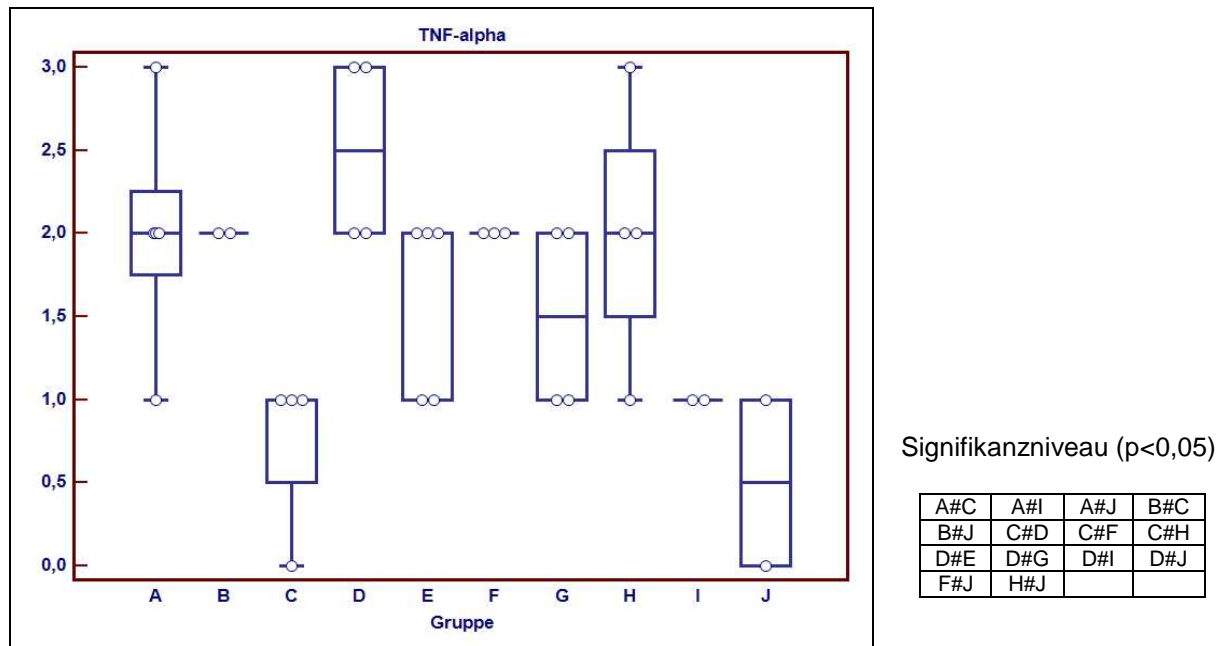
Insgesamt lässt sich aus den PCR-Ergebnissen schließen, dass TNF- $\alpha$  sowohl im Tumorgewebe als auch in der Leber und Milz bei den Tieren, die entweder mit Rapamycin oder der Kombination aus Rapamycin und anti-VEGF-Antikörper behandelt wurden und einen geringeren Tumorbefall aufwiesen, niedriger exprimiert war als bei den Tieren, die eine Kontrollantikörperbehandlung erhalten hatten. Dies zeigte auch die immunhistologische Aufarbeitung des Tumorgewebes. TNF- $\alpha$  war in der Gruppe J, in der die Tiere mit der Kombination aus Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper therapiert wurden, deutlich geringer exprimiert als in der Kontrollantikörpergruppe A (Abbildung 24).





**Abbildung 24:** Repräsentative immunhistochemische Darstellung der TNF- $\alpha$ -Expression im Tumor. Es zeigte sich bei den Tieren der Gruppe J (Kombinationsbehandlung aus Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) (linkes und rechtes unteres Bild) eine deutlich verringerte TNF- $\alpha$ -Expression im Tumorgewebe im Vergleich zur Gruppe A (Kontrollantikörper ab Tag 0) (linkes und rechtes oberes Bild). Braune Zellen sind DAB-positiv, die blaue Farbe entspricht der Hämalaun-Kerngegenfärbung. Linke Bilder 100fache Vergrößerung, rechte Bilder 400fache Vergrößerung des im linken Bild als Kasten gekennzeichneten Areals. Die unterbrochene Linie im Bild links unten stellt die Lebermetastase umgeben von normalem Leberparenchym dar. Gp., Gruppe

Insgesamt ergaben sich in der Immunhistologie des Tumorgewebes ähnliche Ergebnisse wie in der Real-Time PCR. In beiden Verfahren wiesen die Gruppen C und I (jeweils Rapamycin 1,5 mg/kg/d) und J (Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) im Tumorgewebe mit einem FoldFactor von ca. 0,9 bzw. mit einem Anteil von 10-30 % positiver Zellen niedrige Werte für TNF- $\alpha$  auf. Die Tiere dieser Gruppen zeigten zugleich ein relativ geringes Tumorstadium. Am höchsten war TNF- $\alpha$  dagegen sowohl immunhistologisch mit einer Expression von 30-50 % als auch molekulargenetisch in den Gruppen A, B, D, F und H exprimiert (Abbildung 25).



**Abbildung 25:** Darstellung der immunhistologisch positiv markierten Zellen für TNF- $\alpha$  im Tumor von Tieren der Gruppen A-J. Daneben sind die zueinander signifikanten Gruppen aufgeführt. Die Expression von TNF- $\alpha$  war in den Gruppen A, B, D, F und H mit Werten zwischen 30 und 50 % am stärksten ausgeprägt. Am geringsten war TNF- $\alpha$  in den Gruppen C/I und J exprimiert.

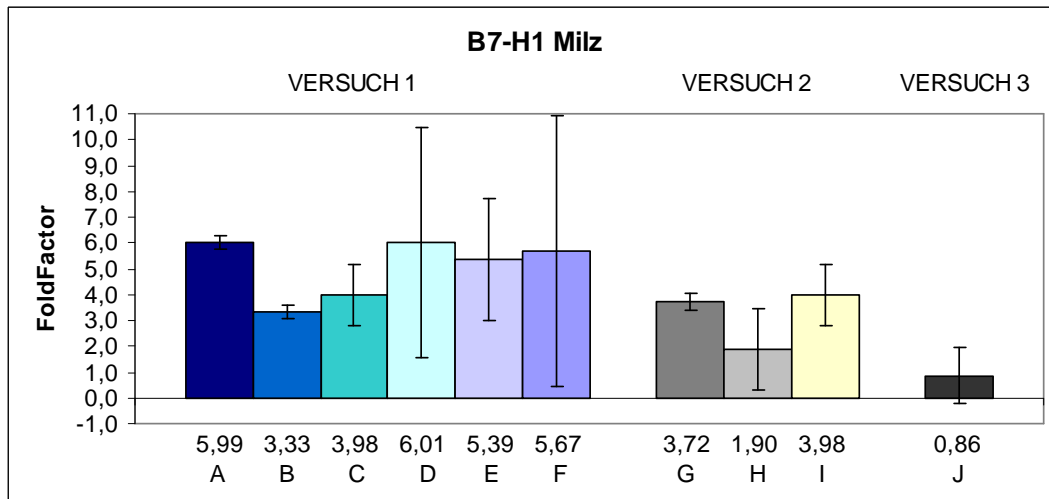
### 4.3.3 Die B7-Signal-Familie

Aus der B7-Familie wurden die koinhibitorischen Zytokine B7-H1 (PD-L1) und PD-L2 sowie PD-1, einer ihrer Rezeptoren, molekulargenetisch und immunhistologisch untersucht. Dargestellt sind wiederum nur die Ergebnisse, bei denen sich signifikante Unterschiede ergaben.

#### B7-H1 (PD-L1)

Die Untersuchung des Oberflächenmoleküls B7-H1 zeigte im Milz- und Lebergewebe signifikante Ergebnisse. Im Milzgewebe verhielten sich unter anderem die Gruppen G (Rapamycin 1,0 mg/kg/d) und H (Rapamycin 0,75 mg/kg/d) signifikant unterschiedlich zur Gruppe A, in der die Tiere mit Kontrollantikörper ab Tag 0 behandelt wurden. Dabei lag das Expressionsniveau der Gruppen G und H 1,6-3fach unter dem der Gruppe A. Des Weiteren wies die Gruppe J (Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) mit einem 7fach erniedrigten Expressionsniveau eine hohe Signifikanz gegenüber der Kontrollantikörpergruppe A auf. Außerdem unterschied sich Gruppe J mit der Kombinationsbehandlung aus Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper mit einem ca. 4fach erniedrigten FoldFactor signifikant von der Gruppe C/I (Rapamycin 1,5 mg/kg/d) und der Gruppe G (Rapamycin 1,0 mg/kg/d) (Abbildung 26).



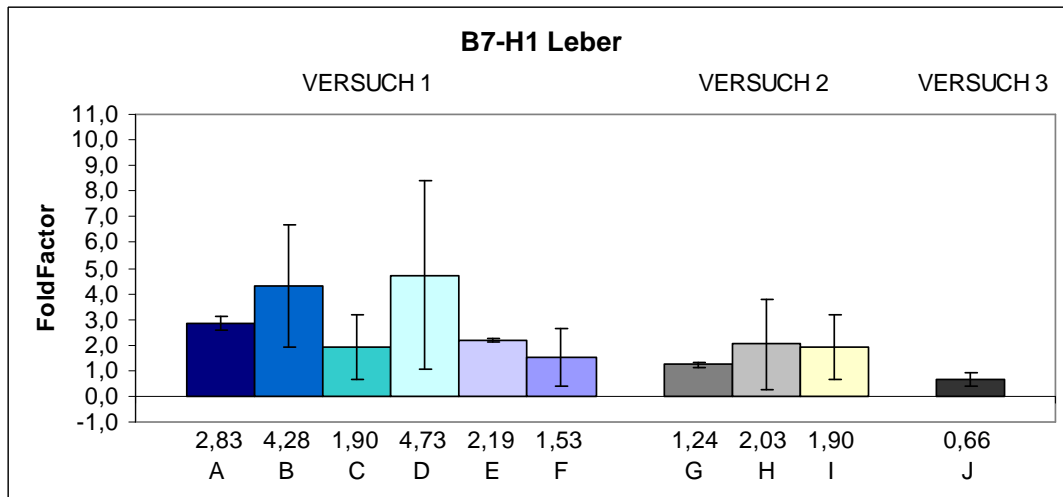


**Abbildung 26:** Darstellung der Genexpression von B7-H1 (PD-L1) in der Milz von Tieren der Gruppen A-J. Die Tiere der Gruppen G und H verhielten sich mit einer 1,6-3fach erniedrigten Expression signifikant gegenüber der Gruppe A. Zudem unterschied sich die Gruppe J mit einem 7fach erniedrigten Expressionsniveau hochsignifikant bzgl. der Gruppe A. Die Tiere der Gruppe J zeigten zudem eine 4fach niedrigere B7-H1-Expression verglichen mit den Tieren der Gruppen C/I und G.

**Signifikanzniveau** (signifikant:  $p < 0,05$  und hochsignifikant:  $p < 0,01$ ):

A#B	A#G	A#H	A#J	C/I#J	G#J
0,010	0,016	0,041	0,008	0,028	0,040

Mit einem 2fach bzw. 4fach erniedrigten Expressionsniveau zeigte sich im Lebergewebe die Gruppe G, in der die Tiere Rapamycin 1,0 mg/kg/d erhalten hatten, signifikant bzw. die Gruppe J (Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) hochsignifikant unterschiedlich bezüglich der Kontrollantikörpergruppe A. Ebenfalls hochsignifikant verhielt sich die Gruppe E (anti-VEGF-Antikörper ab Tag 2) zu den Gruppen G (Rapamycin 1,0 mg/kg/d) und J (Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper). Hierbei lag die Expression von B7-H1 in Gruppe E 1,8 bzw. 3,3fach über der von Gruppe G bzw. J (Abbildung 27).

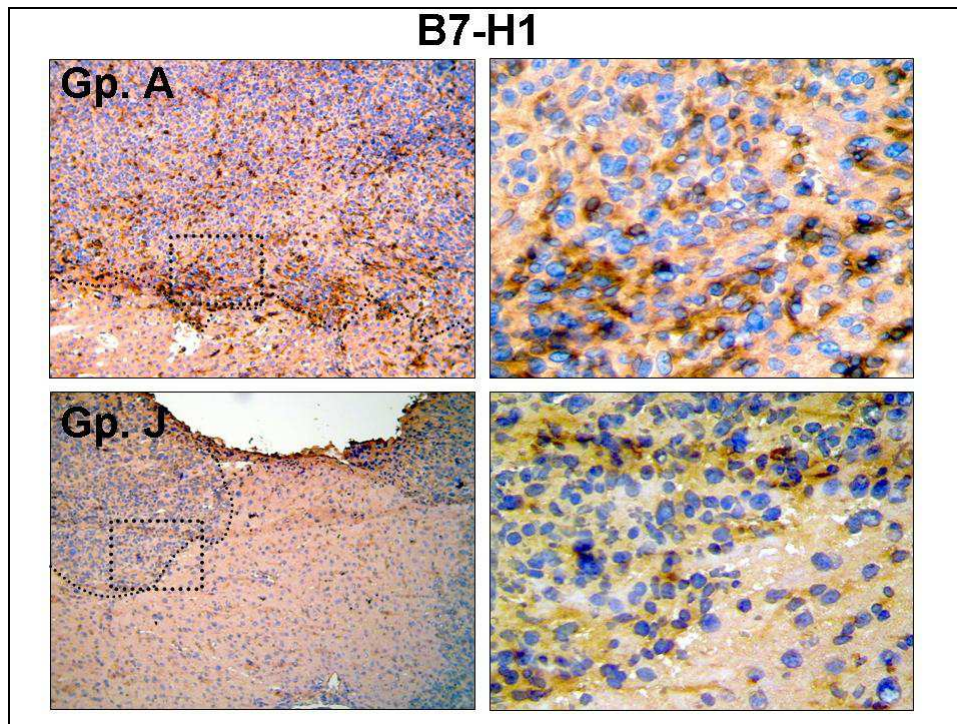


**Abbildung 27:** Darstellung der Genexpression von B7-H1 (PD-L1) in der Leber von Tieren der Gruppen A-J. Hierbei zeigte sich eine Signifikanz zwischen der Gruppe G und A sowie eine hohe Signifikanz zwischen J und A. Das Expressionsniveau der Gruppe G lag 2fach, das der Gruppe J 4fach unter dem der Gruppe A. Zudem verhielt sich Gruppe E mit einer 1,8 bzw. 3,3fach erhöhten Expression hochsignifikant zu den Gruppen G und J.

**Signifikanzniveau** (signifikant:  $p < 0,05$  und hochsignifikant:  $p < 0,01$ ):

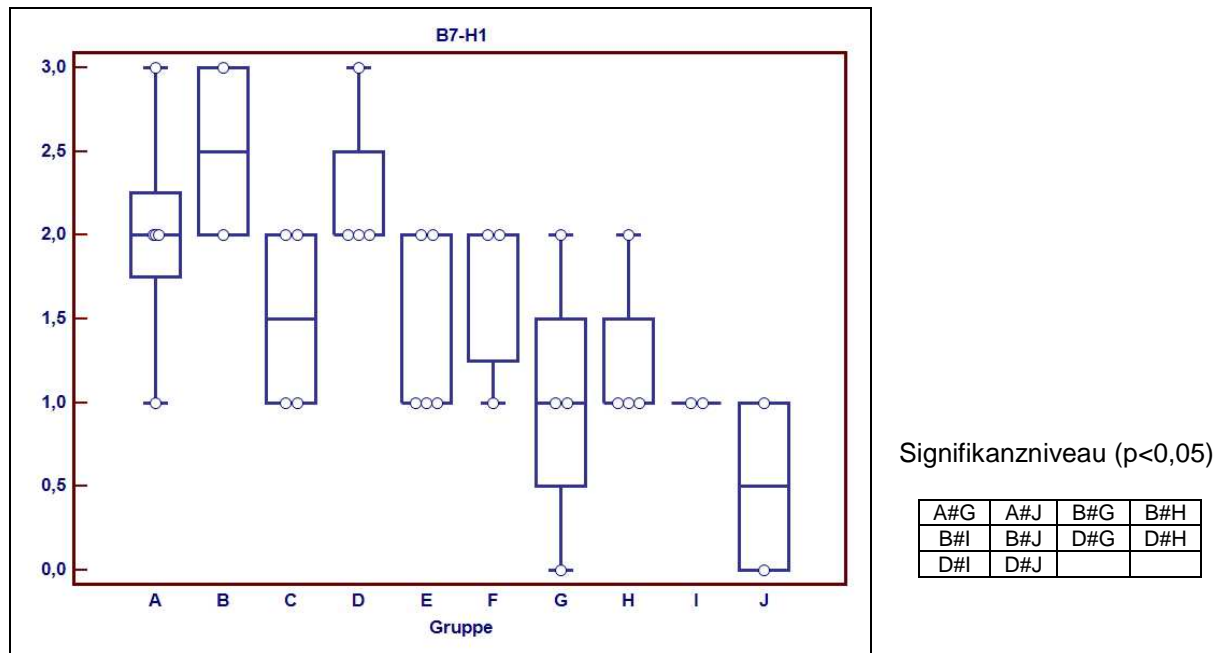
A#G	A#J	E#G	E#J
0,015	0,003	0,008	0,004

Die B7-H1-Genexpressionsmuster der Gruppe J (Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) zeigten sowohl im Milz- als auch im Lebergewebe hochsignifikante Unterschiede gegenüber denen der Gruppe A (Kontrollantikörper ab Tag 0). Dabei lag das Expressionsniveau für B7-H1 von Gruppe J im Milzgewebe 7fach und im Lebergewebe 4fach unter dem von Gruppe A. Dieser signifikante Unterschied zwischen den beiden Gruppen J und A korrelierte mit den immunhistologischen Ergebnissen im Tumorgewebe. B7-H1 war in Gruppe J mit Werten zwischen 0-30 % deutlich niedriger exprimiert als in Gruppe A mit Werten zwischen 30-50 % (Abbildung 28).



**Abbildung 28:** Repräsentative immunhistochemische Darstellung der B7-H1 (PD-L1)-Expression im Tumor. Es zeigte sich bei den Tieren der Gruppe J (Kombinationsbehandlung aus Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) (linkes und rechtes unteres Bild) eine deutlich verringerte B7-H1-Expression im Tumorgewebe im Vergleich zur Gruppe A (Kontrollantikörper ab Tag 0) (linkes und rechtes oberes Bild). Braune Zellen sind DAB-positiv, die blaue Farbe entspricht der Hämalaun-Kerngegenfärbung. Linke Bilder 100fache Vergrößerung, rechte Bilder 400fache Vergrößerung des im linken Bild als Kasten gekennzeichneten Areal. Die unterbrochene Linie stellt die Lebermetastase umgeben von normalem Leberparenchym dar. Gp., Gruppe

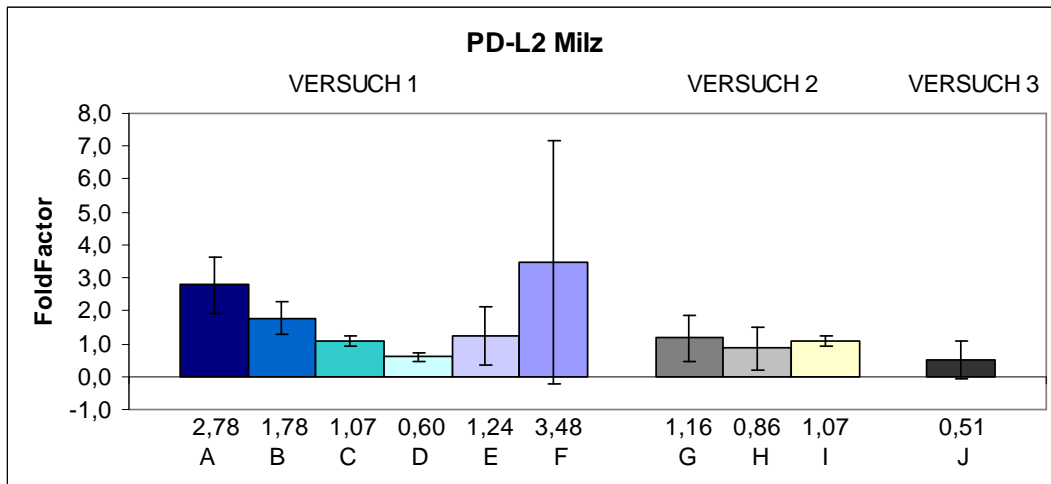
Insgesamt lag die Expression für B7-H1 (PD-L1) in der immunhistologischen Untersuchung im Tumorgewebe wie in der Milz und in der Leber in der Real-Time PCR in den Gruppen G (Rapamycin 1,0 mg/kg/d), H (Rapamycin 1,0 mg/kg/d), I (Rapamycin 1,5 mg/kg/d) und J (Rapamycin 1,5 mg/kg/d) meist signifikant niedriger als in den Gruppen A (Kontrollantikörper ab Tag 0), B (Kontrollantikörper ab Tag 2) und D (anti-VEGF-Antikörper ab Tag 0). Zudem wiesen die Gruppen G, H, I und J ein deutlich geringeres Tumorwachstum verglichen mit den Gruppen A, B und D auf (Abbildung 29).



**Abbildung 29:** Darstellung der immunhistologisch positiv markierten Zellen für B7-H1 (PD-L1) im Tumor von Tieren der Gruppen A-J. Daneben sind die zueinander signifikanten Gruppen aufgeführt. Die Expression von B7-H1 lag in den Gruppen G, H, I und J mit Werten zwischen 10-30 % meist signifikant unter der Expression in den Gruppen A, B und D mit Werten zwischen 30-50 %.

## PD-L2

Die Genexpression von PD-L2 wies im Milz- und Lebergewebe signifikante Ergebnisse auf. Im Milzgewebe verhielten sich die Gruppen C/I (Rapamycin 1,5 mg/kg/d) und J (Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) signifikant unterschiedlich zur Kontrollantikörpergruppe A sowie die Gruppe C/I (Rapamycin 1,5 mg/kg/d) zur Gruppe D, in der die Tiere mit anti-VEGF-Antikörper therapiert wurden. Die PD-L2-Genexpression lag in den Gruppen C und I 2,6fach, in Gruppe J 5,5fach unter dem von A. PD-L2 war in den Gruppen C und I knapp zweifach stärker exprimiert als in Gruppe D (Abbildung 30).

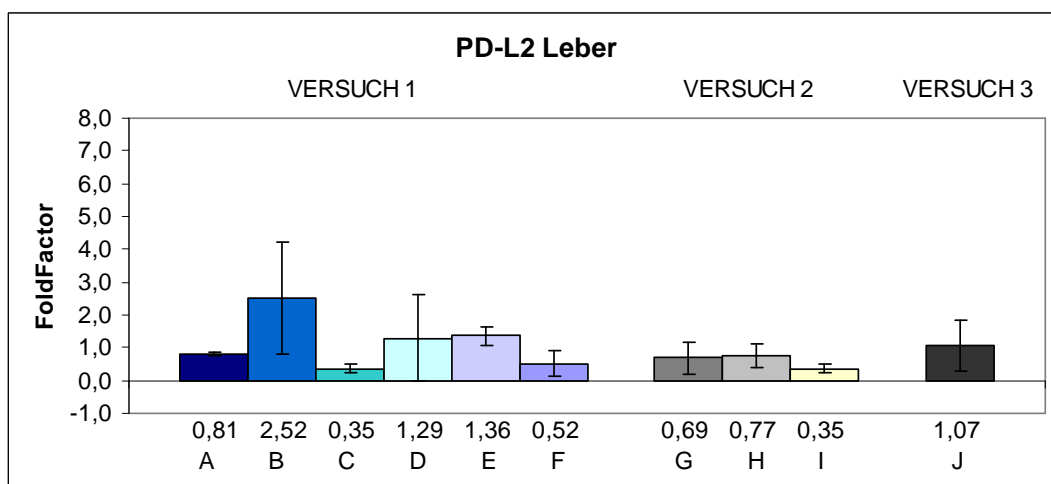


**Abbildung 30:** Darstellung der Genexpression von PD-L2 in der Milz von Tieren der Gruppen A-J. Die Gruppen C, I und J wiesen mit einer 2,6fach bzw. 5,5fach erniedrigten Expression eine Signifikanz zur Gruppe A auf. Mit einer knapp zweifach gesteigerten PD-L2-Expression verhielt sich die Gruppe C/I signifikant bzgl. der Gruppe D.

**Signifikanzniveau** (signifikant:  $p < 0,05$  und hochsignifikant:  $p < 0,01$ ):

A#C/I	A#J	C/I#D
0,035	0,035	0,042

Die Expression von PD-L2 im Lebergewebe war insgesamt in allen Gruppen relativ niedrig. Die Gruppen C und I (Rapamycin 1,5 mg/kg/d) verhielten sich mit einem zweifach bzw. 3,9fache niedrigeren Wert von 0,35 signifikant gegenüber den Gruppen A (Kontrollantikörper ab Tag 0) und E (anti-VEGF-Antikörper ab Tag 2) (Abbildung 31).

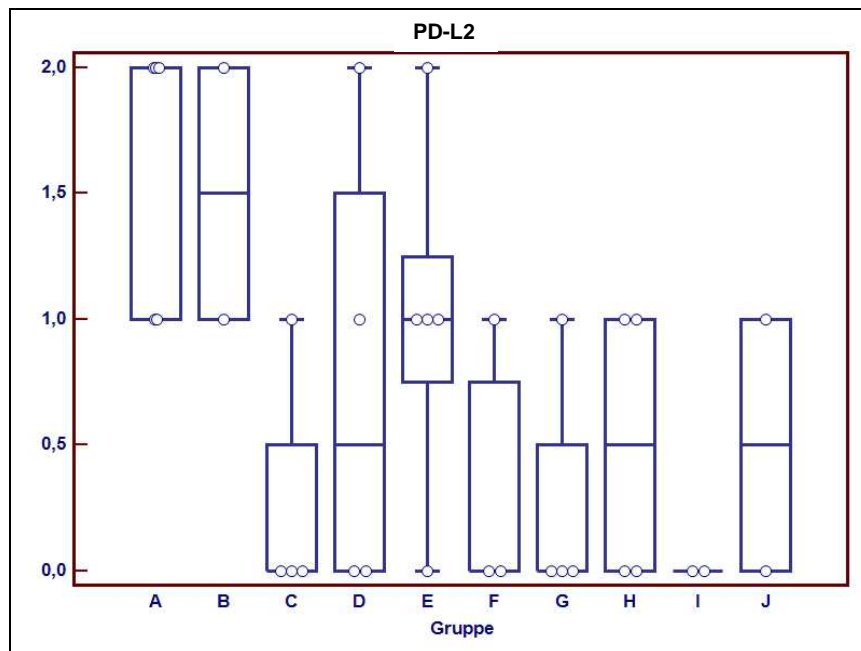


**Abbildung 31:** Darstellung der Genexpression von PD-L2 in der Leber von Tieren der Gruppen A-J. Die Gruppen C und I unterschieden sich signifikant zu den Gruppen A und E mit einer um das 2 bzw. 3,9fache erniedrigten Expression.

**Signifikanzniveau** (signifikant:  $p < 0,05$  und hochsignifikant:  $p < 0,01$ ):

C/I#A	C/I#E
0,018	0,011

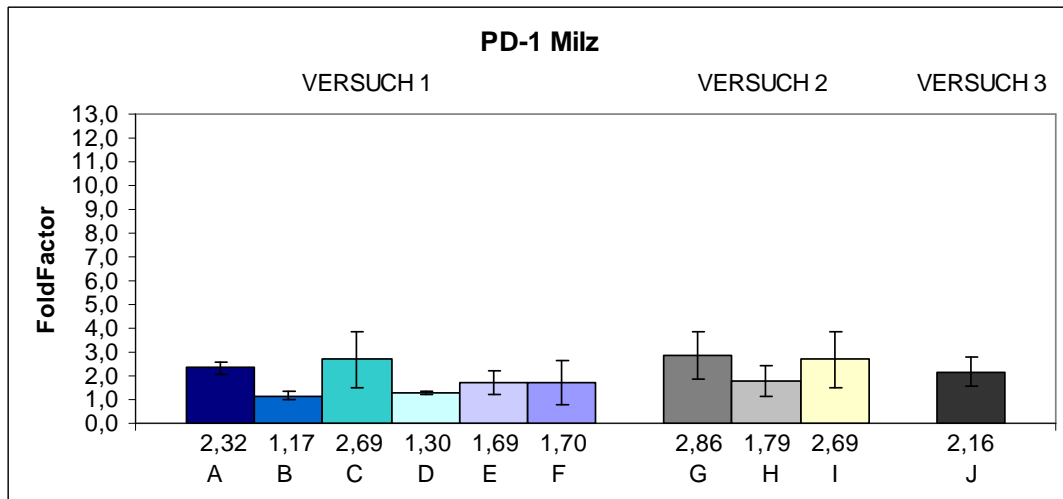
In der Real-Time PCR zeigte sich, dass PD-L2 im Milzgewebe in den mit Rapamycin behandelten Gruppen C, G, H, I und J niedriger exprimiert war als in der Kontrollantikörpergruppe A. Dies korrelierte mit den immunhistologischen Ergebnissen im Tumorgewebe. Die PD-L2-Genexpression lag in den mit Rapamycin therapierten Gruppen C, F, G, H, I und J unter der Expression der Kontrollantikörpergruppen A und B. Die Gruppen unterschieden sich jedoch nicht signifikant voneinander (Abbildung 32).



**Abbildung 32:** Darstellung der immunhistologisch positiv markierten Zellen für PD-L2 im Tumor von Tieren der Gruppen A-J. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Expression von PD-L2 lag in den mit Rapamycin behandelten Gruppen C/I, F, G, H, I und J unter der Expression der Kontrollantikörpergruppen A und B.

### PD-1

Die Genexpression des Oberflächenmoleküls PD-1 wies im Milz- und Lebergewebe signifikante Ergebnisse auf. Im Milzgewebe zeigte sich die Gruppe D (anti-VEGF-Antikörper ab Tag 0) mit einer knapp zweifach erniedrigten Expression signifikant unterschiedlich zur Kontrollantikörpergruppe A (Abbildung 33).

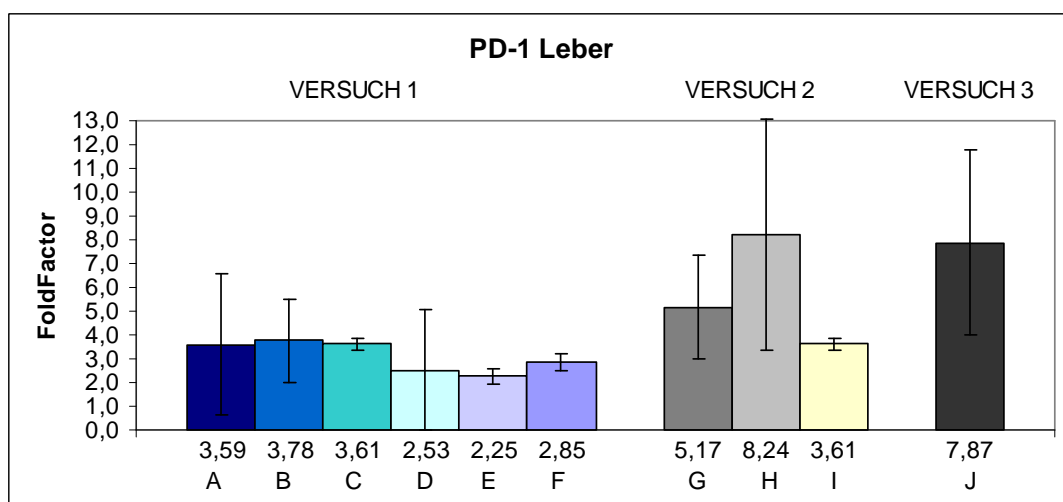


**Abbildung 33:** Darstellung der Genexpression von PD-1 in der Milz von Tieren der Gruppen A-J. Die Gruppe D verhielt sich mit einer knapp zweifach erniedrigten Expression signifikant zur Gruppe A.

**Signifikanzniveau** (signifikant:  $p < 0,05$  und hochsignifikant:  $p < 0,01$ ):

A#B	A#D
0,035	0,034

Im Lebergewebe wies die PD-1-Genexpression der Gruppen C und I (Rapamycin 1,5 mg/kg/d) eine Signifikanz zu Gruppe E (anti-VEGF-Antikörper ab Tag 2) auf. Hierbei lag das Expressionsniveau der Gruppen C und I 1,6fach über dem von E. Die PD-1-Expression in den Gruppen H und J war deutlich, jedoch nicht signifikant gesteigert (Abbildung 34).

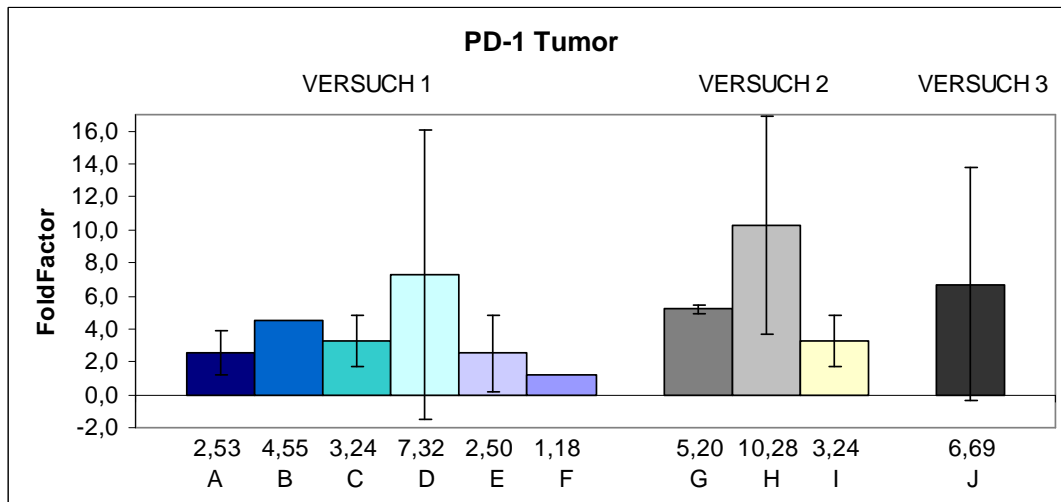


**Abbildung 34:** Darstellung der Genexpression von PD-1 in der Leber von Tieren der Gruppen A-J. Die Gruppe C und I unterschieden sich mit einer um das 1,6fache gesteigerten Expression signifikant gegenüber der Gruppe E. Die Gruppen H und J zeigten eine deutlich erhöhte Expression für PD-1, wiesen jedoch keine Signifikanz auf.

**Signifikanzniveau** (signifikant:  $p < 0,05$  und hochsignifikant:  $p < 0,01$ ):

C/#E
0,014

Die Expression von PD-1 im Tumorgewebe wies ähnlich erhöhte Werte wie im Lebergewebe und verglichen zum Milzgewebe zum Teil deutlich gesteigerte FoldFactoren auf. Allerdings ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abbildung 35).



**Abbildung 35:** Darstellung der Genexpression von PD-1 im Tumor von Tieren der Gruppen A-J. Wie im Lebergewebe wies PD-1 eine zum Teil gesteigerte Expression auf. Es ergaben sich allerdings keine signifikanten Unterschiede.

Insgesamt war die Genexpression von PD-1 im Leber- und Tumorgewebe in den Gruppen G (Rapamycin 1,0 mg/kg/d), H (Rapamycin 0,75 mg/kg/d) und J (Rapamycin 0,75mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) deutlich gesteigert. Diese Gruppen wiesen zugleich niedrige Werte für seine Liganden B7-H1 und PD-L2 auf und zeigten im Gegensatz zu den anderen Gruppen ein geringeres Tumorstadium. Da nur aktivierte T-Zellen PD-1-Moleküle aufweisen, könnte die gesteigerte Expression von PD-1 auf eine bessere Tumormunantwort in diesen Gruppen hindeuten.

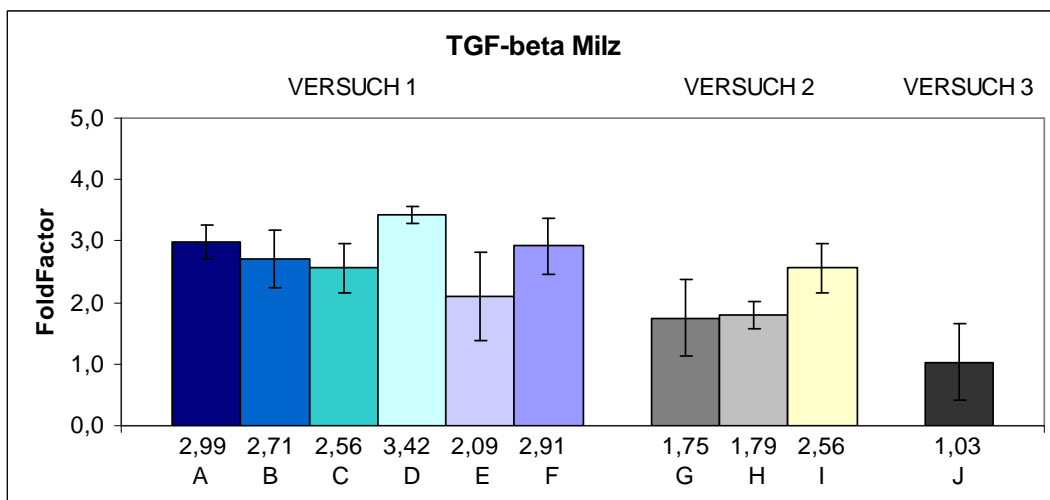
#### 4.3.4 TGF- $\beta$

Die Zytokine TGF- $\beta$  und TGF- $\beta$ 1 wurden getrennt voneinander untersucht, wobei nur die Ergebnisse für TGF- $\beta$  im Folgenden aufgeführt sind. Beide Oberflächenmoleküle wurden wiederum im Milz-, Leber- und Tumorgewebe untersucht.

Bei der Expression von TGF- $\beta$  unterschied sich im Milzgewebe Gruppe H (Rapamycin 0,75 mg/kg/d) signifikant von den Gruppen A (Kontrollantikörper ab Tag 0) und F (Rapamycin 1,5 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) sowie hochsignifikant von



Gruppe D (anti-VEGF-Antikörper ab Tag 0). Das Expressionsniveau von TGF- $\beta$  war in Gruppe H um das 1,6fache niedriger als in Gruppe A und F und um das Zweifache geringer als in Gruppe D. Auch Gruppe J mit der Kombinationsbehandlung aus Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper wies mit einer ca. dreifach verminderten Expression von TGF- $\beta$  eine Signifikanz zu den Gruppen A (Kontrollantikörper ab Tag 0), B (Kontrollantikörper ab Tag 2), D (anti-VEGF-Antikörper ab Tag 0) und F (Rapamycin 1,5 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) auf (Abbildung 36).

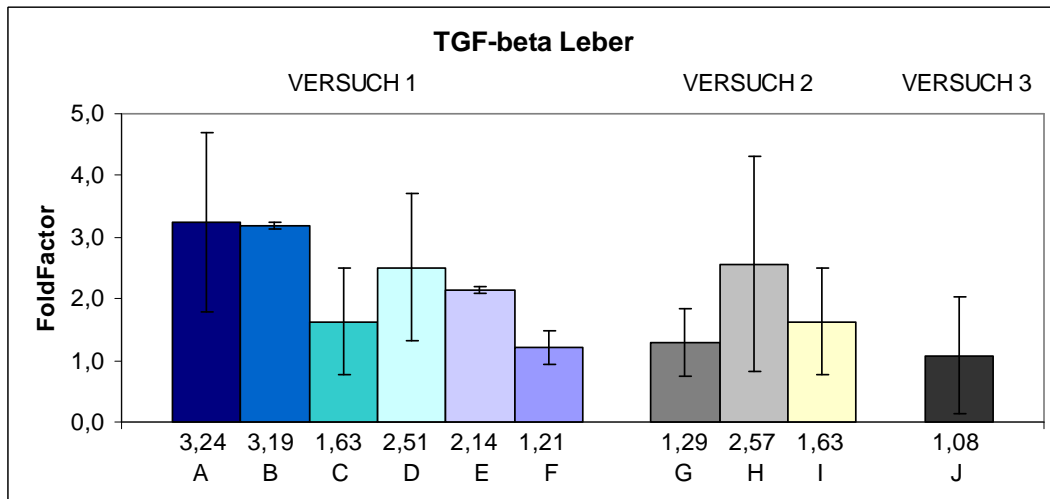


**Abbildung 36:** Darstellung der Genexpression von TGF- $\beta$  in der Milz von Tieren der Gruppen A-J. Es zeigte sich eine Signifikanz zwischen der Gruppe H und den Gruppen A und F mit 1,6fach erniedrigten Werten in Gruppe H sowie zwischen den Gruppen J und A, B, D und F mit einer ca. dreifach verminderten Expression von TGF- $\beta$  in Gruppe J. Hochsignifikant unterschied sich Gruppe H von Gruppe D mit einer 2fach geringeren Expression in Gruppe H.

**Signifikanzniveau** (signifikant:  $p < 0,05$  und hochsignifikant:  $p < 0,01$ ):

H#A	H#D	H#F	J#A	J#B	J#D	J#F
0,012	0,003	0,030	0,026	0,048	0,014	0,035

Im Lebergewebe zeigte sich eine hohe Signifikanz zwischen den Gruppen E (anti-VEGF-Antikörper ab Tag 2) und B (Kontrollantikörper ab Tag 2) mit einem 1,5fach erniedrigten Wert für TGF- $\beta$  in der Gruppe E. Signifikant verhielten sich zudem die Gruppen F (Rapamycin 1,5 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) und G (Rapamycin 1,0 mg/kg/d) zur Gruppe B. Ihr Expressionsniveau lag 2,5fach unter dem der Gruppe B. Ebenfalls signifikante Unterschiede wiesen die TGF- $\beta$ -Genexpressionsmuster der Gruppen E und F auf (Abbildung 37).

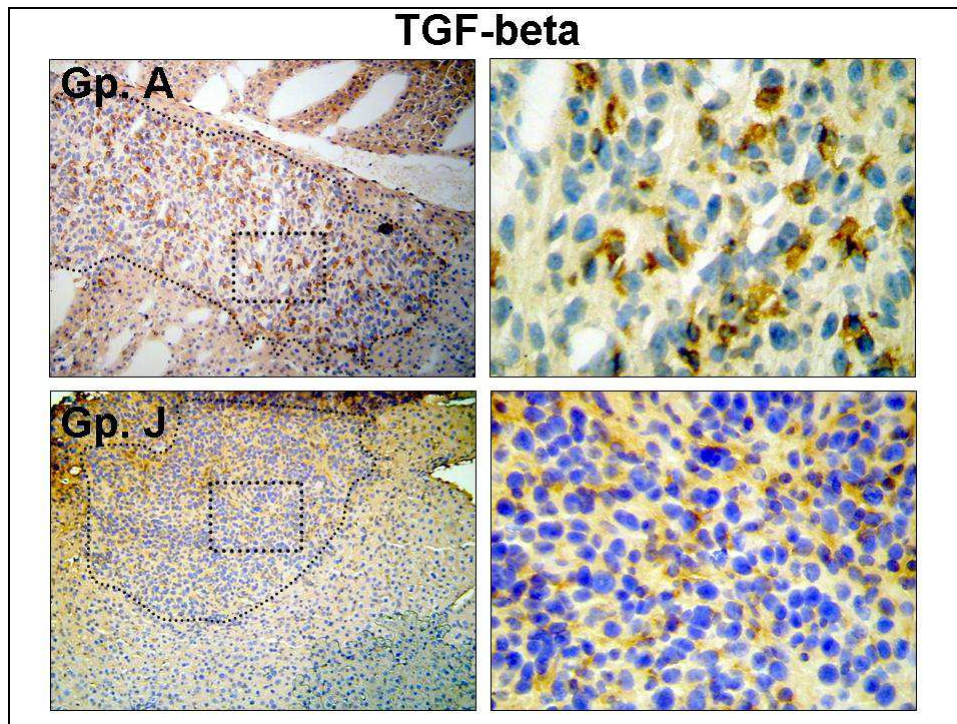


**Abbildung 37:** Darstellung der Genexpression von TGF- $\beta$  in der Leber von Tieren der Gruppen A-J. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied der Gruppen F und G zur Gruppe B mit einem um das 1,5-2,5fach erniedrigten Wert in den Gruppen F bzw. G und zwischen den Gruppen E und F mit einer 1,8fach gesteigerten Expression in E. Hochsignifikant verhielt sich Gruppe E zu B mit einer 1,5fach geringeren Expression von TGF- $\beta$  in Gruppe E.

**Signifikanzniveau** (signifikant:  $p < 0,05$  und hochsignifikant:  $p < 0,01$ ):

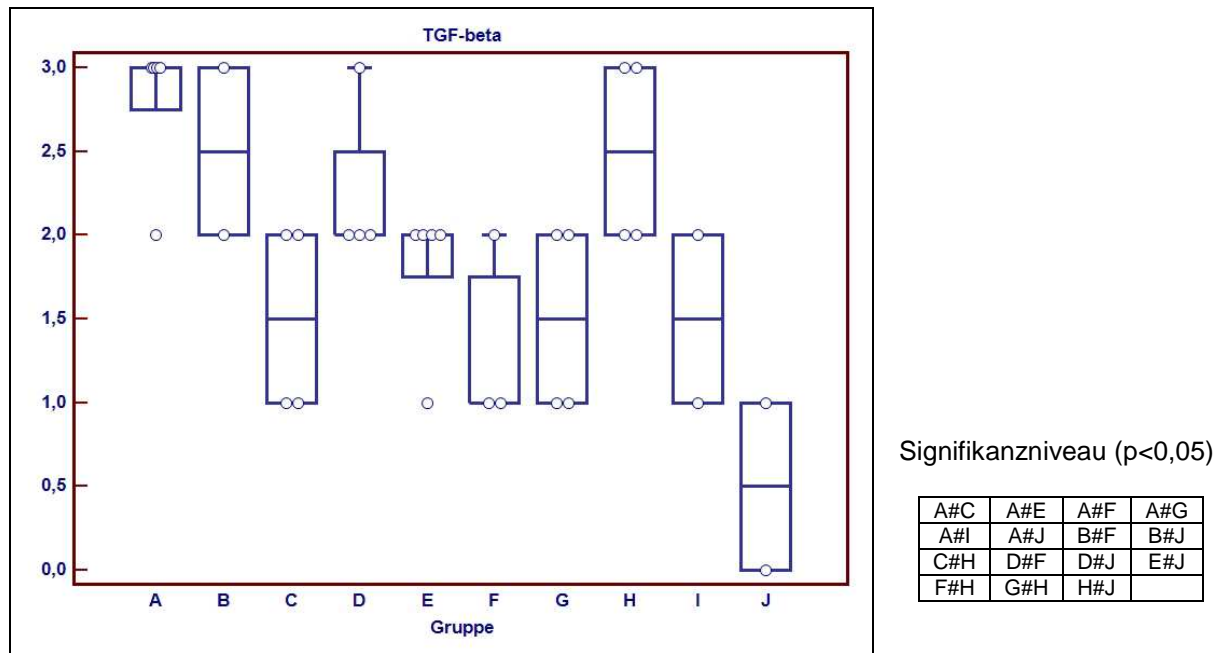
B#E	B#F	B#G	E#F
0,002	0,010	0,039	0,045

Keine signifikanten Unterschiede zeigte die Genexpression von TGF- $\beta$  in den verschiedenen Gruppen im Tumorgewebe. In Gruppe J (Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) war aber das Expressionsniveau von TGF- $\beta$  in allen drei Geweben mit einem Wert von annähernd 1 sehr niedrig (Foldfactor der Gruppe J im Milzgewebe 1,03, im Lebergewebe 1,08 und im Tumorgewebe 1,34), wohingegen TGF- $\beta$  in den Kontrollantikörpergruppen A und B mit am stärksten exprimiert war. Dies zeigte auch die Immunhistologie des Tumorgewebes. Sie ergab, dass die Expression von TGF- $\beta$  in der Gruppe J signifikant niedriger war als in der Kontrollantikörpergruppe A (Abbildung 38).



**Abbildung 38:** Repräsentative immunhistochemische Darstellung der TGF- $\beta$ -Expression im Tumor. Es zeigte sich bei den Tieren der Gruppe J (Kombinationsbehandlung aus Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) (linkes und rechtes unteres Bild) eine deutlich verringerte TGF- $\beta$ -Expression im Tumorgewebe im Vergleich zur Gruppe A (Kontrollantikörper ab Tag 0) (linkes und rechtes oberes Bild). Braune Zellen sind DAB-positiv, die blaue Farbe entspricht der Hämalaun-Kerngegenfärbung. Linke Bilder 100fache Vergrößerung, rechte Bilder 400fache Vergrößerung des im linken Bild als Kasten gekennzeichneten Areal. Die unterbrochene Linie stellt die Lebermetastase umgeben von normalem Leberparenchym dar. Gp., Gruppe

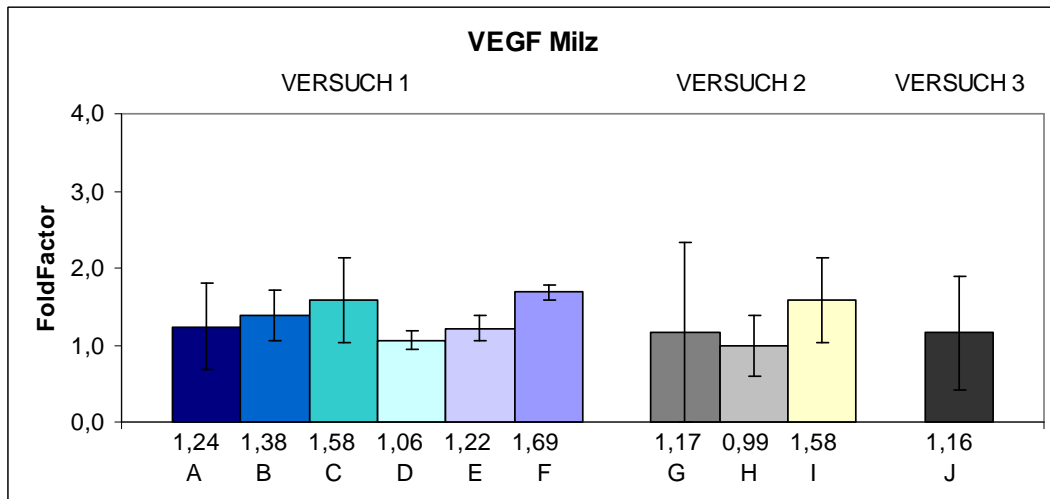
Aus den immunhistologischen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass TGF- $\beta$  in den Gruppen, die mit Rapamycin behandelt wurden und einen geringeren Tumorbefall aufwiesen (Gruppen C, F, G, I und J), meist signifikant niedriger exprimiert war als in den anderen Gruppen. Gruppe H (Rapamycin 0,75 mg/kg/d) bildet mit einer relativ hohen Expression eine Ausnahme. Daneben lag die TGF- $\beta$ -Expression mit am höchsten in den Kontrollantikörpergruppen A und B sowie der Gruppe D (anti-VEGF-Antikörper ab Tag 0) (Abbildung 39). Ein dazu analoges Ergebnis zeigte sich bereits in der Real-Time PCR vor allem im Lebergewebe. Auch hier war TGF- $\beta$  am stärksten in den Gruppen A, B, D und H und am niedrigsten in den mit Rapamycin behandelten Gruppen C, F, G, I und J exprimiert (Abbildung 37).



**Abbildung 39:** Darstellung der immunhistologisch positiv markierten Zellen für TGF- $\beta$  im Tumor von Tieren der Gruppen A-J. Daneben sind die zueinander signifikanten Gruppen aufgeführt. Die Expression von TGF- $\beta$  lag in den Gruppen C, F, G, I und J meist signifikant unter der Expression in den Gruppen A, B, D und H, die mit Werten zwischen 30 % bis >50 % am höchsten exprimiert waren.

#### 4.3.5 VEGF

Die Expression von VEGF wies in allen drei Geweben nur vereinzelt signifikante Unterschiede auf. Im Milzgewebe zeigte sich, dass die Expression von VEGF mit einem FoldFactor von ca. 1 in annähernd allen Gruppen der der Kontrolltiere entsprach. Eine Signifikanz wies lediglich die Gruppe D, in der die Tiere mit anti-VEGF-Antikörper ab Tag 0 behandelt wurden, bezüglich der Gruppe F auf, in der die Tiere eine Kombinationstherapie aus Rapamycin 1,5 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper erhalten hatten (Abbildung 40).

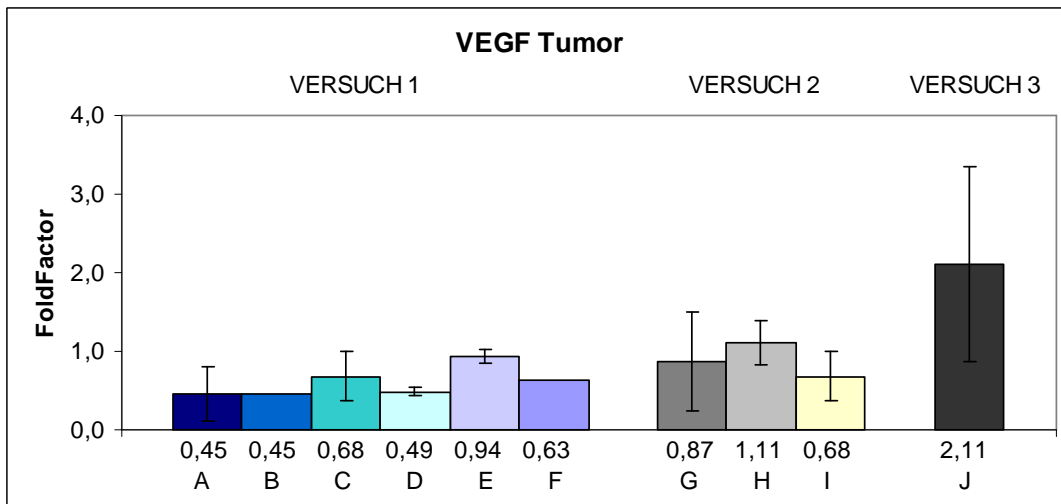


**Abbildung 40:** Darstellung der Genexpression von VEGF in der Milz von Tieren der Gruppen A-J. Die Expression von VEGF entsprach mit einem FoldFactor-Wert von ca. 1 annähernd der Expression der Kontrolltiere. Lediglich Gruppe D verhielt sich mit einem 1,6fach erniedrigten Expressionsniveau signifikant bezüglich der Gruppe F.

**Signifikanzniveau** (signifikant:  $p < 0,05$  und hochsignifikant:  $p < 0,01$ ):

D#F
0,032

Im Tumorgewebe unterschieden sich die Gruppen untereinander ebenfalls kaum. Das Expressionsniveau von VEGF war insgesamt niedriger als im Milzgewebe (Abbildung 41).



**Abbildung 41:** Darstellung der Genexpression von VEGF im Tumor von Tieren der Gruppen A-J. Die Gruppen unterschieden sich in ihrer Expression kaum voneinander.

**Signifikanzniveau** (signifikant:  $p < 0,05$  und hochsignifikant:  $p < 0,01$ ):

D#E
0,030

## **5 Beantwortung der Fragestellung**

### **5.1 Beurteilung des Tumorwachstums in der Leber**

Die Bewertung des Tumorbefalls in der Leber zeigte, dass die Größe des Lebervolumens mit Ausnahme der Gruppen F (Rapamycin 1,5 mg/kg und anti-VEGF-Antikörper) und J (Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) mit der Stärke des Tumorbefalls in der Leber korrelierte. Die Tiere, die stärker vom Tumor befallen waren, wiesen mit Werten zwischen 0,8 cm<sup>3</sup> und 1,1 cm<sup>3</sup> ein größeres Lebervolumen auf als die Tiere mit leichtem Tumorbefall. Letztere erreichten mit Werten zwischen 0,5 cm<sup>3</sup> und 0,6 cm<sup>3</sup> ein deutlich geringeres Lebervolumen. Somit konnte bereits teilweise anhand des Lebervolumens eine Aussage über den Effekt von Rapamycin und anti-VEGF-Antikörper auf das Tumorwachstum getroffen werden.

### **5.2 Auswirkungen der Behandlung mit Rapamycin und anti-VEGF-Antikörper auf das Tumorwachstum und die Überlebenszeit**

Die Wirkung der beiden Substanzen Rapamycin und anti-VEGF-Antikörper gegenüber Panc02-Tumorzellen wurde in drei Versuchsreihen an einem Metastasierungsmodell untersucht. Rapamycin ist ein spezifischer Inhibitor der Serin/Threonin-Kinase mTOR, der durch Blockierung der Proliferation von T- und B-Lymphozyten immunsuppressiv wirkt. Neben seinem Effekt auf das Immunsystem beeinflusst Rapamycin auch die Proliferation von Tumorzellen, führt zu einer Induktion der Apoptose und vermindert die Tumorangiogenese. Die inhibierende Wirkung von anti-VEGF-Antikörper auf die Tumorangiogenese und das Tumorwachstum wurde bereits in einigen Studien nachgewiesen.

Zunächst wurden die Tiere im ersten Versuchsansatz in sieben Gruppen eingeteilt und je nach Gruppenzugehörigkeit entweder mit Kontrollantikörper ab Tag 0 oder Tag 2, mit einer Monotherapie Rapamycin 1,5 mg/kg/d, mit anti-VEGF-Antikörper ab Tag 0 oder Tag 2 oder mit einer Kombinationstherapie aus Rapamycin 1,5 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper behandelt.

Hierbei erzielten die mit der Kombinationsbehandlung aus Rapamycin (1,5 mg/kg/d) und anti-VEGF-Antikörper therapierten Tiere (Gruppe F) das beste Resultat. Die Tiere dieser Gruppe erreichten sowohl mit 31,3 Tagen eine der längsten Überlebenszeiten als auch den geringsten Tumorbefall in der Leber und intraabdominell. Zwar

lag die Überlebenszeit der mit Kontrollantikörper ab Tag 2 behandelten Tiere (Gruppe B) mit 33,5 Tagen über der der Tiere, die die Kombinationsbehandlung bekommen hatten (Gruppe F), die Tiere wiesen aber einen deutlich stärkeren Tumorbefall auf und erzielten damit insgesamt ein schlechteres Ergebnis als Gruppe F.

Die Tiere, die eine Monotherapie mit Rapamycin erhalten hatten, zeigten einen ähnlich geringen Tumorbefall wie die mit der Kombinationsbehandlung therapierten Tiere, erreichten aber nur eine durchschnittliche Überlebenszeit von 30 Tagen. Ein Grund für das eingeschränkte Überleben sowohl der Tiere mit der Monotherapie Rapamycin als auch der Tiere mit der Kombinationsbehandlung könnte das Nebenwirkungsprofil von Rapamycin und seiner öligen Trägersubstanz sein. Die mit Rapamycin therapierten Tiere wiesen deutliche Ablagerungen der öligen Trägersubstanz im Bauchraum und starke Darmverklebungen auf, sodass ihr Ableben nicht unbedingt auf den Tumor zurückzuführen sein könnte.

Die Therapie der Tiere mit dem anti-VEGF-Antikörper zeigte nicht den gewünschten Effekt. Die mittlere Überlebenszeit der mit anti-VEGF-Antikörper behandelten Tiere entsprach zwar mit 30 Tagen dem Überleben der mit Rapamycin behandelten Gruppe, aber Leber und Abdomen waren im Gegensatz zu den mit Rapamycin behandelten Tieren massiv von Tumor befallen. Der fehlende Antitumoreffekt der anti-VEGF-Antikörpertherapie könnte mit der kurzen Behandlungsdauer erklärt werden. Die Tiere bekamen im ersten Versuchsansatz im Abstand von zwei Tagen insgesamt eine fünfmalige Gabe des anti-VEGF-Antikörpers und anschließend keine weitere Behandlung. Somit könnte der geringe Therapieeffekt mit einer schnellen Revaskularisierung des Tumors nach Beendigung der VEGF-Inhibition begründet werden.

Um die Effektivität der Kombinationsbehandlung aus Rapamycin und anti-VEGF-Antikörper noch zu steigern, wurden in einer zweiten Versuchsreihe neben der bereits im ersten Versuchsansatz verwendeten Rapamycindosis von 1,5 mg/kg/d die Dosierungen Rapamycin 1,0 mg/kg/d und Rapamycin 0,75 mg/kg/d getestet. Die Tiere zeigten hierbei ebenfalls wie in der ersten Versuchsreihe Rapamycin- bzw. Trägersubstanz-induzierte Nebenwirkungen, sodass die letzte Gabe Rapamycin jeweils am 30. Tag erfolgte. Mit einer Überlebenszeit von 34 Tagen erzielten die Tiere, die mit einer Dosierung von Rapamycin 0,75 mg/kg/d behandelt wurden (Gruppe H), das beste Ergebnis im Gegensatz zu den mit Rapamycin 1,0 mg/kg/d bzw. 1,5 mg/kg/d behandelten Tieren, die eine Überlebenszeit von 26 bzw. 27 Tagen

erreichten. Auch der Tumorbefall der mit Rapamycin 0,75 mg/kg/d therapierten Tiere (Gruppe H) fiel geringer als in den anderen beiden Gruppen aus. Die niedrigere Dosis von Rapamycin könnte zu einem abgeschwächten Nebenwirkungsprofil und so zu einem längeren Überleben der Tiere geführt haben.

Im letzten Versuchsansatz wurde die Rapamycin-Dosierung von 0,75 mg/kg/d, die im zweiten Versuchsansatz die besten Ergebnisse gezeigt hatte, mit dem anti-VEGF-Antikörper kombiniert und damit die Wirksamkeit der Kombinationsbehandlung überprüft. Die Tiere in dieser Versuchsreihe erreichten jedoch nur eine Überlebenszeit von 25 Tagen. Das Tumorwachstum war aber geringer ausgeprägt als das der anderen Gruppen und entsprach in etwa dem der Tiere, die im zweiten Versuchsansatz das beste Resultat erzielt hatten und mit der niedrigen Rapamycindosis von 0,75mg/kg/d behandelt worden waren (Gruppe H). Das schlechtere Ergebnis der Kombinationsbehandlung könnte wiederum mit den Nebenwirkungen des Rapamycins bzw. seiner Trägersubstanz erklärt werden.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Rapamycin als Monotherapie zwar zu einer Tumorreduktion führt, aber nicht für eine gänzliche Kontrolle der Tumorprogression ausreicht. Die Kombinationsbehandlung aus Rapamycin und anti-VEGF-Antikörper scheint trotz der nur durchschnittlichen Überlebenszeiten der Tiere einen potenzierenden Effekt bei der Inhibition des Tumorwachstums zu haben. Es bleibt zu klären, ob die mit Rapamycin behandelten Tiere tumorbedingt oder aufgrund der Nebenwirkungen des Rapamycins starben. Dennoch könnte die Kombinationstherapie aus Rapamycin und anti-VEGF-Antikörper einen neuen und vielversprechenden Therapieansatz in der Behandlung des Pankreaskarzinoms darstellen.

### **5.3 Angiogenetische Faktoren**

Die Fähigkeit, Angiogenese zu induzieren und aufrechtzuerhalten, gehört zu den charakteristischen Zeichen von Karzinomen. Von den untersuchten Markern besitzen TNF- $\alpha$  und VEGF eine angiogenetische Wirkung. Dabei nehmen VEGF und sein Rezeptor VEGFR-2 eine zentrale Rolle in der Tumorangiogenese ein. Beim Pankreaskarzinom ist die Expression von VEGF meist durch eine VEGF-Sekretion der Tumorzellen selbst erhöht und mit einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung und einer schlechten Prognose assoziiert. Infolgedessen wurde in den letzten



Jahren eine Reihe von verschiedenen Inhibitoren der VEGF-Aktivität entwickelt, wie z.B. anti-VEGF-Antikörper.

Molekulargenetisch fand sich in der vorliegenden Arbeit keine gesteigerte VEGF-Expression im Tumorgewebe. Vielmehr war das Genexpressionsniveau von VEGF im Tumorgewebe mit Werten zwischen 0,45 und 1,11 relativ niedrig. Noch geringer war die VEGF-Expression im Lebergewebe. Ferner zeigten sich keine nennenswerten Signifikanzen zwischen den unterschiedlichen Behandlungsstrategien. Alle Gruppen exprimierten VEGF im Milz-, Leber- und Tumorgewebe ungefähr gleich stark. Daraus lässt sich schließen, dass die Höhe der VEGF-Expression nicht mit der Stärke des Tumorbefalls korrelierte. Insbesondere wiesen die mit anti-VEGF-Antikörper behandelten Gruppen im Milz-, Leber- und Tumorgewebe keine signifikanten Erniedrigungen von VEGF auf. Ein Grund für den fehlenden Unterschied in der Expression von VEGF könnte sein, dass der anti-VEGF-Antikörper mit einer fünfmaligen Gabe nur relativ kurz angewendet wurde und sich so keine signifikanten Veränderungen bei den mit dem Antikörper behandelten Tieren entwickeln konnten.

#### **5.4 T-Zell-Populationen**

Die einzelnen T-Zellpopulationen können anhand ihrer Oberflächenmarker voneinander unterschieden werden. T-Helferzellen exprimieren konstitutiv CD4, zytotoxische T-Zellen CD8 und regulatorische Zellen CD25 und Foxp3.

T-Helferzellen spielen die entscheidende Rolle in der Koordination der Tumorummunität. Sie fördern die Bildung klonaler tumorspezifischer CD8-T-Zellen, sorgen für eine Akkumulation der CD8-T-Zellen im Tumor, verbessern die Tumolyse in der akuten Immunantwort und aktivieren Makrophagen und Eosinophile. Die Aufgabe der zytotoxischen T-Zellen dagegen ist es, veränderte Zellen zu erkennen und zu zerstören. Meist findet sich um die Tumorzellnester herum eine desmoplastische Reaktion, die durch tumorinfiltrierende Zellen gekennzeichnet ist. Diese sind zu 90 % CD4- und CD8-T-Zellen, wobei meist die Zahl der zytotoxischen T-Zellen überwiegt. Hierfür fanden sich auch Hinweise in der Real-Time PCR. CD8 war in allen Gruppen jeweils in Milz-, Leber- und Tumorgewebe stärker exprimiert als CD4. Während sich die beiden Marker in ihrer Expression im Milzgewebe relativ wenig unterschieden, lag die Expression von CD8 im Leber- und Tumorgewebe meist deutlich über der von CD4. Dies deutet auf eine gesteigerte Infiltration von zytotoxischen T-Zellen in das Tumorbett hin.

Darüber hinaus zeigten die PCR-Ergebnisse eine in allen Gruppen relativ niedrige CD4-Expression. Vor allem in den mit Rapamycin behandelten Gruppen, in denen der Tumorbefall meist geringer war, war die CD4-Genexpression in allen drei Geweben vermindert. Dies deutet auf ein vermehrtes Einwandern der CD4-T-Zellen in stark vom Tumor befallene Regionen hin.

Im Gegensatz dazu war die CD8-Genexpression im Lebergewebe in den Gruppen mit geringerem Tumorbefall deutlich erhöht. Die Werte für CD8 waren in den mit niedriger Rapamycin-Dosis von 0,75 mg/kg/d und mit der Kombination aus Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper behandelten Gruppen H und J signifikant gesteigert. Somit korrelierten die gefundenen Anzeichen einer erhöhten Infiltration der zytotoxischen T-Zellen in Tumornähe mit einem geringeren Tumorbefall. Im Tumorgewebe fanden sich dagegen in allen Gruppen in der Real-Time PCR Hinweise für eine deutlich gesteigerte Infiltration von CD8-T-Zellen. Da die CD8-Expression in allen Gruppen unabhängig von ihrer Behandlung und ihrem Tumorbefall erhöht war, ist die Funktion der mit dem Marker CD8 vermuteten zytotoxischen T-Zellen im Zentrum des Tumors fraglich. Tumore scheinen durch regulatorische Mechanismen in der Lage zu sein, funktionsfähige T-Zellen im Stromagewebe um den Tumor herum und CD8-T-Zellen mit fehlendem Aktivierungsmarker im Bereich der höchsten Tumorzell-dichte zu platzieren und somit der Tumorlyse zu entgehen.

Regulatorische T-Zellen üben durch die Sekretion inhibitorischer Zytokine eine supprimierende Funktion gegenüber T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen aus. Eine Schlüsselrolle in ihrer Entwicklung und Funktion nimmt der Transkriptionsfaktor Foxp3 ein. Er gilt bisher als der einzige definitive Marker der CD25<sup>+</sup>Tregs. Es zeigte sich, dass Tumore häufig aktiv die Zahl der Tregs im Tumor erhöhen oder Foxp3 vermehrt exprimieren, um die T-Zell-Funktion zu verändern und die Tumorumantwort zu beeinflussen.

Hierfür fanden sich in der vorliegenden Arbeit bestätigende Hinweise. Im Tumorgewebe war die CD25-Genexpression im Vergleich zum Milz- und Lebergewebe in den meisten Gruppen um das 2-3fache gesteigert. Im Gegensatz zu den anderen Gruppen wies Gruppe J, in der die Tiere mit der niedrigeren Rapamycindosis von 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper therapiert wurden und einen mäßigen Tumorbefall zeigten, eine im Vergleich zu den Kontrollantikörpergruppen A und B geringere Expression von CD25 in allen drei Geweben auf. Dies spricht für eine

verminderte Zahl regulatorischer T-Zellen, die somit einen geringeren negativ regulierenden Einfluss auf die Tumorummunreaktion haben und damit zu einem geringeren Tumorbefall geführt haben könnten. Eine erhöhte Expression von Foxp3 im Tumorgewebe konnte anhand der PCR-Ergebnisse nicht nachgewiesen werden. Immunhistologisch zeigte sich dagegen im Tumorgewebe, dass die Expression von Foxp3 in den Kontrollantikörpergruppen A und B und in den mit anti-VEGF-Antikörper behandelten Gruppen D und E deutlich über der mit Rapamycin therapierten Gruppen C, F, G, I und J lag. Auch in der Real-Time PCR war die Expression von Foxp3 in allen drei Geweben in den mit Rapamycin behandelten Gruppen C, F, G, H, I und J geringer ausgeprägt als in den anderen Gruppen. Da diese Gruppen meist auch ein geringeres Tumorstadium aufwiesen, spricht dies insgesamt für einen Zusammenhang zwischen einem besseren Tumorstadium und einer niedrigeren Foxp3-Expression und damit einer verminderten Anzahl regulatorischer T-Zellen.

## **5.5 Th1-/Th2-Immunantwort**

Th1-Zellen sezernieren die Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF- $\alpha$  und sind als entscheidend für die Induktion der zellulären Immunantwort und Tumorummunität anzusehen. Im Gegensatz dazu produzieren Th2-Zellen die Zytokine IL-4, IL-6 und IL-10, inhibieren die Synthese von Th1-Zytokinen und regulieren so die zytolytische Aktivität herunter. Eine Balance zwischen den beiden Zelltypen Th1 und Th2 spielt nach heutiger Auffassung für die verschiedenen Immunreaktionen eine besondere Rolle und könnte auch für die Tumorummunantwort bedeutungsvoll sein. Bei Krebspatienten gibt es Hinweise für einen Shift des Zytokinprofils hin zu einem Th2-Typ. Dadurch wird das Gleichgewicht zugunsten der humoralen Th2-Immunreaktion verschoben, die mit ihren proangiogenetischen und antiinflammatorischen Faktoren die Tumorstadiumprogression begünstigt.

In der vorliegenden Arbeit müssten demzufolge die Zytokine IL-2 und TNF- $\alpha$  als Vertreter der Th1-Zytokine niedriger exprimiert sein als das Th2-Zytokin IL-10. Allerdings ergaben die Ergebnisse der PCR und der Immunhistologie für IL-10 kein eindeutiges Bild. IL-2 war in allen drei Geweben durchweg niedrig exprimiert. Nur die Tiere der Gruppe H, die mit Rapamycin 0,75 mg/kg/d behandelt wurden und die das beste Ergebnis in der zweiten Versuchsreihe aufwiesen, zeigten im Lebergewebe ein deutlich erhöhtes Expressionsniveau. Dies könnte bei den Tieren der Gruppe H auf eine gesteigerte zelluläre Th1-Immunantwort und eine dementsprechend effizientere

Tumorimmunität hindeuten. Des Weiteren könnten die niedrigen Werte für IL-2 für eine Suppression der Th1-Antwort und ein Überwiegen der Th2-Immunantwort sprechen. TNF- $\alpha$  nimmt mit seinen einerseits proapoptotischen und andererseits proangiogenetischen Eigenschaften in Bezug auf Tumore eine zweiseitige Stellung ein. In der Real-Time PCR und der Immunhistologie fanden sich Hinweise darauf, dass das Zytokin TNF- $\alpha$  eher tumorprogressiv agiert. So war TNF- $\alpha$  in allen drei Geweben meist in den Gruppen höher exprimiert, die stärker vom Tumor befallen waren. Im Milz- und Lebergewebe unterschieden sich die unbehandelten Kontrollantikörpergruppen A und B mit einer deutlich gesteigerten TNF- $\alpha$ -Expression teils signifikant bzw. hochsignifikant von den behandelten und insgesamt weniger mit Tumor befallenen Gruppen, die mit Rapamycin therapiert wurden (Gruppe C, F; G, H, I und J). Im Tumorgewebe fand sich in der Kontrollgruppe A ebenfalls wie im Milz- und Lebergewebe eine erhöhte TNF- $\alpha$ -Expression. Ferner wies die Gruppe J, die mit der Kombinationsbehandlung aus Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper einen relativ geringen Tumorbefall gezeigt hatte, in allen drei Geweben sowohl in der PCR als auch immunhistologisch die niedrigste TNF- $\alpha$ -Expression auf. Zusammenfassend ging eine geringere TNF- $\alpha$ -Konzentration mit einem verminderten Tumorwachstum einher. Die gewonnenen Ergebnisse der Th1- und Th2-Zytokine lassen somit nur eine differenzierte Betrachtung über das Th1-/Th2-Gleichgewicht zu.

## **5.6 Klinischer Bezug**

Mittlerweile gibt es eine Vielzahl von Ansätzen, die sich gezielt auf molekularer Ebene gegen das Pankreaskarzinom richten. Dazu zählen die Gentherapie, die Inhibition der Signaltransduktion, antiangiogenetische und Matrix-Metalloproteinase-Inhibitoren sowie die passive und aktive Immuntherapie.

In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl der Effekt einer Monotherapie mit Rapamycin und einem anti-VEGF-Antikörper als auch die Wirkung der Kombination aus beiden Substanzen in einem experimentellen Pankreastumormodell getestet. Die beste Wirksamkeit zeigte dabei die Kombinationsbehandlung aus Rapamycin und anti-VEGF-Antikörper. Beide Wirkstoffe werden als Monotherapeutika bereits erfolgreich klinisch in der Antitumortherapie angewendet. So wird der VEGF blockierende Antikörper Bevacizumab zur Therapie von Patienten mit kurativ nicht resektablen kolorektalen Lebermetastasen eingesetzt. In den durchgeführten

Versuchen dieser Arbeit zeigte die Monotherapie mit anti-VEGF-Antikörper allerdings nicht den erwarteten Antitumoreffekt. Ein Grund dafür liegt wahrscheinlich in der zu kurzen Anwendungszeit des Antikörpers. Rapamycin wurde in der Klinik bisher als Immunsuppressivum bei Patienten nach Organtransplantation angewendet. Präklinische Studien wiesen aber ebenfalls eine inhibierende Wirkung von Rapamycin auf das Tumorwachstum nach. Dies zeigten zum Teil auch die Ergebnisse dieser Arbeit. Zwar war die Überlebenszeit der Tiere, die mit Rapamycin behandelt wurden, nicht signifikant verlängert, das Tumorwachstum der Tiere in diesen Gruppen war aber verglichen mit den anderen Gruppen geringer ausgeprägt. Da die mit Rapamycin therapierten Tiere deutlich weniger vom Tumor befallen waren, bleibt zu klären, ob ihre vergleichsweise nur durchschnittliche Überlebenszeit tumorbedingt oder durch beobachtete Nebenwirkungen des Rapamycins begründet war. Weitere Studien zeigten, dass sowohl Rapamycin als auch die anti-VEGF-Antikörpertherapie in der Kombination mit einer weiteren Substanz, wie z. B. einem Chemotherapeutikum, einen größeren antitumorösen Effekt zeigte als eine Monotherapie [18, 74]. So wies auch die Kombinationsbehandlung aus Rapamycin und anti-VEGF-Antikörper zumindest im ersten Versuchsansatz dieser Arbeit eine längere Überlebenszeit und ein besseres Tumoransprechen im Sinne einer synergistischen Wirkung verglichen mit den Monotherapien auf.

Im Hinblick auf die tumorinfiltrierenden Leukozyten fanden sich Hinweise für eine erhöhte Anzahl von zytotoxischen T-Zellen und regulatorischen T-Zellen sowie eine erniedrigte Zahl von T-Helferzellen. Die unabhängig von ihrer Behandlung und dem Tumorbefall in allen Tieren vorgefundenen erhöhten CD8-Genexpressionsprofile im Tumorgewebe sprechen dafür, dass infiltrierende CD8-T-Zellen im Tumor nicht in der Lage waren, die Tumorzellen effizient zu zerstören. Die zytotoxischen T-Zellen könnten einer gesteigerten Apoptose unterlegen gewesen sein oder durch den Tumor inaktiviert worden sein. In der Tumorperipherie dagegen korrelierte eine stärkere CD8-Genexpression mit einem geringeren Tumorbefall. Somit könnte an der Tumordinvasionsfront eine gesteigerte Infiltration von CD8-T-Zellen mit einer effektiveren Tumorummunantwort einhergehen. Um die Tumorummunität von Patienten zu stärken, gilt es folglich den Grund für den Funktionsverlust der zentral im Tumor befindlichen CTLs zu klären. Bei den CD4-T-Zellen war eine vermehrte Zellinfiltration bei den Tieren mit starkem Tumorbefall zu beobachten, was auf eine T-Zell-Aktivierung in den Tumorzellnestern hindeuten könnte. Diese könnte z.B. durch

aktive Immunisierung weiter verstärkt werden, um den Effekt der Tumorummunantwort zu verbessern. Die Anzahl der CD25-T-Zellen erschien vor allem im Tumorgewebe deutlich gesteigert. Da diese eine zentrale Rolle bei der Suppression einer tumorspezifischen Immunantwort spielen, wäre es durchaus interessant, die Auswirkung einer Blockade der regulatorischen T-Zellen mittels einer Immuntherapie oder eines spezifischen Antikörpers gegen CD25-T-Zellen zu untersuchen. Dies birgt jedoch auch die Gefahr, die von den Tregs aufrechterhaltene homöostatische Regulation des Immunsystems aus dem Gleichgewicht zu bringen und damit beispielsweise eine Autoimmunerkrankung auszulösen.

Bei Patienten mit Krebserkrankungen scheint meist eine Th2-gerichtete Immunantwort zu überwiegen. In der vorliegenden Arbeit ließ sich aber anhand der Zytokinprofile keine eindeutige Aussage über das Th1-/Th2-Gleichgewicht treffen. IL-2 wies in der Real-Time PCR in allen Geweben sehr niedrige Werte auf. Dies könnte für eine Suppression der Th1-Antwort und ein Überwiegen der Th-2-Immunantwort sprechen. So könnte durch eine Gabe des Zytokins IL-2 die Th1-Immunantwort gegen den Tumor verstärkt werden. Ein Problem der klinischen Anwendung von IL-2 stellen aber nach wie vor die schwerwiegenden Nebenwirkungen dar, die bei höheren suffizienten Dosierungen auftreten. TNF- $\alpha$  lies in der vorliegenden Arbeit eher auf tumorprogressive Eigenschaften schließen. So war ein stärkerer Tumorbefall mit einer höheren Expression von TNF- $\alpha$  assoziiert. Ob eine Blockade von TNF- $\alpha$ , die bereits erfolgreich bei Patienten mit chronischen Erkrankungen angewendet wird, auch bei Krebspatienten günstige Effekte erwarten ließe, wäre zu überprüfen. Insgesamt ist es sicherlich von Interesse, die Zytokinprofile der Th1- und Th2-Immunantwort bei Krebspatienten genauer zu untersuchen. So könnte ein Anstieg der Th2-Zytokine und ein Abfall der Th1-Zytokine im Rahmen von Screeninguntersuchungen als Zeichen einer möglichen Tumorprogression interpretiert werden. Des Weiteren ist in Tumoren häufig eine Überexpression von TGF- $\beta$  zu finden. Dies ermöglicht es dem Tumor, die normale Immunantwort in der Art zu verändern, dass eine Klasse von supprimierenden Zellen generiert wird, die inaktiv gegenüber Tumorzellen ist, und somit eine für das Tumorstadium günstige Umgebung schafft. In der Real-Time PCR und in der Immunhistologie zeigte sich ein Zusammenhang zwischen einer hohen Expression von TGF- $\beta$  und einem starken Tumorbefall. Infolgedessen wäre zu überprüfen, ob mit einem TGF- $\beta$ -neutralisierenden Antikörper die tumorspezifische Immunabwehr verbessert werden kann.

Darüber hinaus überexprimieren Tumore häufig koinhibitorische Moleküle wie B7-H1 und PD-L2. Sowohl die Real-Time PCR als auch die Immunhistologie ergaben, dass eine niedrigere Expression von B7-H1 und PD-L2 meist mit einem besseren Tumoransprechen assoziiert war. Somit könnte durch die Anwendung monoklonaler Antikörper gegen B7-H1 und PD-L2 die Antitumorantwort verstärkt und das weitere Tumorwachstum inhibiert werden.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Kombination aus Rapamycin und anti-VEGF-Antikörper zu einem besseren Tumoransprechen führte als die Monotherapien mit einer der beiden Substanzen. Daher sollten die in dieser Arbeit erhobenen Daten nun dazu verwendet werden, gezielt neue immunologische und antiangiogenetische Therapiestrategien für die Behandlung des Pankreaskarzinoms in der Klinik zu entwickeln. Dabei muss vor allem ein Augenmerk auf die Nebenwirkungen der Rapamycinbehandlung, die einen limitierenden Faktor in der Behandlung der Tiere darstellten, und auf den durch die kurze Anwendungszeit schwachen inhibitorischen Effekt der anti-VEGF-Antikörperbehandlung auf das Tumorwachstum gelegt werden.

## 6 Diskussion

### 6.1 Wirkung der gezielten Krebstherapie

Das Pankreaskarzinom zählt zu den am schlechtesten therapierbaren Krebserkrankungen mit einer 5-Jahresüberlebensrate von nur 1-4 %. Da Pankreastumore kaum auf eine Chemotherapie oder sonstige bisher verfügbare konventionelle Therapien ansprechen, liegt die Hoffnung in neuen Therapiestrategien [14].

Ein geeigneter Angriffspunkt für neue Methoden in der Krebstherapie stellt die Gefäßversorgung von Tumoren dar, da schnell proliferierende Tumore auf eine effiziente Blutversorgung angewiesen sind, um weiter wachsen und Metastasen ausbilden zu können [9]. Für einige Wirkstoffe, wie z.B. Angiostatin, MMP-Inhibitoren, Vasostatin und den endothelial wirksamen Wachstumsinhibitor VEGI, konnte bereits ein antiangiogenetischer Effekt nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass die antiangiogenetischen Substanzen die Bildung neuer Blutgefäße inhibieren und damit das Tumorwachstum reduzieren konnten [9].

In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Wirkstoffe Rapamycin und ein neuer anti-VEGF-Antikörper in insgesamt drei aufeinander folgenden Versuchsansätzen in vivo auf ihre antitumorösen Eigenschaften gegenüber den pankreatischen Tumorzellen Panc02 überprüft. Dabei wurden Gewebeproben aus Milz-, Leber- und Tumorgewebe gewonnen und die biologischen Auswirkungen im Tumor in Bezug auf verschiedene Zellmarker und Zytokine mittels Real-Time PCR und Immunhistologie untersucht.

#### 6.1.1 Wirksamkeit der Monotherapie mit Rapamycin

Rapamycin und seine Analoga Temsirolimus und Everolimus sind spezifische Inhibitoren der Serin/Threonin-Kinase mTOR, die eine entscheidende Rolle in einer Reihe von Regulationen der Transkription von Genen spielen, die am Prozess der onkogenen Transformation und des Tumorprogresses beteiligt sind [27]. Substanzen wie Rapamycin üben einen suppressiven Effekt auf die Proliferation, Invasion und Metastasierung von Tumoren aus und induzieren eine Apoptose in Tumorzellen [77]. Neben diesen direkten Effekten von mTOR-Inhibitoren auf Tumorzellen besitzt Rapamycin durch Suppression der VEGF-Signaltransduktion auch starke antiangiogenetische Eigenschaften. So bewirkt Rapamycin nicht nur eine Verminderung der



Produktion von VEGF, sondern vermittelt zudem eine Inhibition der Antwort der vaskulären endothelialen Zellen auf eine VEGF-Stimulierung [78]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Rapamycin auch Thrombosen insbesondere in Tumorgefäßen hervorrufen kann [78]. Betrachtet man die Vielzahl der mTOR-abhängigen Wege, die in die Tumorprogression involviert sind, so werden die Bedeutung und das Potenzial der Inhibition dieser Wege durch Substanzen wie Rapamycin deutlich [77]. Dementsprechend konnte in einigen Studien die inhibierende Wirkung von Rapamycin auf das Tumorwachstum bereits belegt werden [29, 34, 78].

Dies konnte auch im ersten Versuchsansatz dieser Arbeit bestätigt werden. Es zeigte sich, dass die Tiere, die mit Rapamycin entweder allein oder in Kombination behandelt worden waren, einen deutlich geringeren Tumorbefall in der Leber und intraabdominell aufwiesen als die Tiere, die anti-VEGF-Antikörper oder Kontrollantikörper erhalten hatten.

Dennoch erreichten die Tiere, die mit Rapamycin alleine therapiert wurden, mit 30 Tagen nur eine durchschnittliche Überlebenszeit. Dies könnte im Nebenwirkungsprofil der Substanz begründet sein. Die mit Rapamycin behandelten Tiere wiesen zum Ende der Beobachtungszeit deutliche zum Teil abgekapselte Ablagerungen der öligen Trägersubstanz im Bauchraum und starke Darmverklebungen auf, sodass ihr Ableben nicht unbedingt tumorbedingt, sondern beispielsweise durch einen Ileus hervorgerufen gewesen sein könnte.

Während also der Gebrauch von mTOR-Inhibitoren als Monotherapie nicht für eine gänzliche Kontrolle der Tumorprogression auszureichen scheint, könnte eine Kombinationsbehandlung zusätzlich potenzierende Effekte aufweisen [77]. Eine solche additive oder synergistische Wirkung wies z.B. eine Studie mit einer Kombinationsbehandlung aus Rapamycin und dem Zytostatikum Gemcitabin an einem pankreatischen Krebsmodell nach [35].

### **6.1.2 Wirksamkeit der Monotherapie mit einem anti-VEGF-Antikörper**

Eine zentrale Rolle in der Tumorangiogenese nehmen VEGF und VEGFR-2 ein, die kritische Regulatoren der Proliferation, Migration, Differenzierung und des Überlebens der endothelialen Zellen sind [79]. Beim Pankreaskarzinom ist die Expression von VEGF meist durch Sekretion der Tumorzellen selbst erhöht und mit einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung assoziiert [25]. Außerdem konnte in Studien gezeigt werden, dass eine gesteigerte VEGF-Expression mit einer schlechten

Prognose korreliert [26]. Infolgedessen wurde in den letzten Jahren eine Reihe von verschiedenen Inhibitoren der VEGF-Aktivität, wie anti-VEGF-Antikörper, lösliche VEGFRs, anti-sense-VEGF-RNA-tragende Moleküle, Konjugate aus VEGF-Toxin oder Inhibitoren der VEGFR-Funktion, entwickelt [80]. Während ihre inhibierende Wirkung auf die Tumorangio-genese und das Tumorstadium bereits in einigen Studien nachgewiesen werden konnte [81-83], fielen die Ergebnisse des ersten Versuchsansatzes für die mit anti-VEGF-Antikörper behandelten Tiere eher enttäuschend aus. Die mittlere Überlebenszeit der mit anti-VEGF-Antikörper therapierten Tiere entsprach zwar mit 30 Tagen dem Überleben der mit Rapamycin behandelten Gruppe, aber Leber und Abdomen waren im Gegensatz zu den mit Rapamycin therapierten Tieren massiv von Tumor befallen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Studien fand sich keine gesteigerte VEGF-Genexpression im Tumorgewebe [26]. Vielmehr war das Expressionsniveau von VEGF im Tumor mit Werten zwischen 0,45 und 1,11 relativ niedrig und lag insgesamt unter dem des Milzgewebes. Im Lebergewebe war die Expression von VEGF am geringsten (Daten nicht gezeigt). Auch ergaben sich im Milz-, Leber- und Tumorgewebe keine signifikant erniedrigten VEGF-Expressionsprofile bei den mit anti-VEGF-Antikörper behandelten Tieren (Gruppen D, E, F und J).

Ein Grund für den fehlenden Antitumoreffekt der anti-VEGF-Antikörpertherapie könnte in der kurzen Anwendungszeit liegen. Die Tiere bekamen im ersten Versuchsansatz im Abstand von zwei Tagen insgesamt eine fünfmalige Gabe des anti-VEGF-Antikörpers und anschließend keine weitere Behandlung. Somit könnte der geringe Therapieeffekt in den Metastasen des Pankreastumors mit einem raschen proangiogenetischen Effekt von VEGF nach Beendigung der VEGF-Inhibition erklärt werden. Mancuso et al. zeigten in einer Studie, dass durch eine Therapie mit anti-VEGF-Antikörpern die Anzahl der Tumorgefäße um rund 50-60 % reduziert werden konnte, aber so genannte „leere Bahnen“ entlang der Basalmembranen und lebende Perizyten zurückblieben [84]. Schon einen Tag nach Absetzen der antiangiogenetischen Behandlung wuchsen endotheliale Abkömmlinge in die leeren Bahnen ein und offene Stellen an den Gefäßen wurden geschlossen, sodass der Tumor nach sieben Tagen wieder voll revaskularisiert war [84]. Dies könnte das geringe Ansprechen des Pankreastumors auf die anti-VEGF-Antikörpertherapie bei den mit anti-VEGF-Antikörper behandelten Tieren (Gruppe D und E) begründen.

Des Weiteren konnte in einigen Studien nachgewiesen werden, dass auch in der anti-VEGF-Antikörpertherapie eine Kombinationsbehandlung effektiver als eine Monotherapie ist [20]. Eine Studie an einem Nacktmausmodell zeigte, dass eine Blockade der VEGFR-2-Funktion mittels eines Antikörpers das primäre pankreatische Tumorstadium und die Metastasierung in ähnlichem Ausmaß wie eine Behandlung mit Gemcitabin verminderte, die Kombinationstherapie mit Gemcitabin und anti-VEGF-Antikörper jedoch das Tumorstadium um ein Vielfaches mehr reduzierte [85].

### **6.1.3 Wirksamkeit der Kombinationstherapie**

Die Kombinationsbehandlung aus Rapamycin und anti-VEGF-Antikörper zeigte insgesamt einen stärkeren Antitumoreffekt als die Monotherapien und erzielte damit das beste Ergebnis. So erreichten im ersten Versuchsansatz die Tiere, die mit Rapamycin 1,5 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper behandelt wurden (Gruppe F), sowohl mit 31,3 Tagen eine der längsten Überlebenszeiten als auch einen sehr geringen Tumorbefall in der Leber. Zwar lag die Überlebenszeit der mit Kontrollantikörper behandelten Tiere (Gruppe B) mit 33,5 Tagen über der der Tiere, die die Kombinationsbehandlung bekommen hatten (Gruppe F), das Ergebnis insgesamt war aber aufgrund des größeren Tumorbefalls bei den mit Kontrollantikörper behandelten Tieren (Gruppe B) schlechter als das der mit Rapamycin und anti-VEGF-Antikörper therapierten Tiere (Gruppe F). Das längste Überleben wiesen somit die Tiere dieser beiden Gruppen auf. Sie konnten sich damit aber nicht signifikant von den anderen Gruppen absetzen. Auch die übrigen Gruppen unterschieden sich in ihrer mittleren Überlebenszeit nicht signifikant voneinander. Mit einer Überlebenszeit von 28,8 bis 33,5 Tagen lagen die Gruppen bei einer maximalen Differenz von 4,7 Tagen recht nahe aneinander.

Es gibt verschiedene Ansätze, die die beobachtete Verbesserung des therapeutischen Effekts von Rapamycin durch die Mitwirkung des anti-VEGF-Antikörpers begründen könnten.

Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass VEGFA nicht nur die Angiogenese, sondern auch die Lymphangiogenese induziert. Im Gegensatz zu VEGFC und VEGFD, die hauptsächlich die lymphatische Gefäßneubildung regulieren, sind die Lymphgefäße, die von VEGFA generiert werden, strukturell und funktionell abnormal. Wenn nun im Tumor VEGF überexprimiert ist, kommt es vermehrt zu

solchen lymphatischen Malformationen, die eine VEGF-gesteuerte Plasmaextravasation und Ödeme fördern, sodass eine schlechte Bioverfügbarkeit von Medikamenten oder Substanzen, wie z.B. Rapamycin, die Folge ist. Eine anti-VEGF-Antikörpertherapie könnte also im Umkehrschluss eine bessere Bioverfügbarkeit und damit eine bessere Wirkung von Rapamycin bewirken [86].

Außerdem könnte das bessere Ansprechen der Kombinationstherapie in einer induzierten Apoptose begründet sein. Studien zeigten eine zweifach erhöhte Induktion der Tumorzellapoptose nach Monotherapie mit Rapamycin und lassen daher vermuten, dass Rapamycin möglicherweise auch einen Effekt auf die Regulation des programmierten Zelltods hat [18]. Schon länger bekannt ist dieser Effekt in Verbindung mit VEGF und VEGFR. In vivo Studien zum Pankreaskarzinom wiesen einen durch eine gezielte Therapie gegen VEGF und VEGFR verursachten höheren Apoptose-Index nach [80, 81]. Beide Therapien zusammen könnten daher eine stärker ausgeprägte Apoptose verursachen und damit unter anderem das bessere Tumorausprechen begründen.

Den Vorteil der Kombinationsbehandlung aus Rapamycin und anti-VEGF-Antikörper gegenüber einer Monotherapie wies auch eine weitere Studie nach. In dieser inhibierte eine kombinierte antiangiogenetische Therapie das primäre und metastatische Tumorwachstum im Pankreaskarzinom in vivo stärker als eine Monotherapie mit anti-VEGF-Antikörper oder Rapamycin [18].

Demzufolge könnte die Kombinationstherapie aus Rapamycin und anti-VEGF-Antikörper ein neuer und vielversprechender Therapieversuch in der Behandlung des Pankreaskarzinoms sein.

#### **6.1.4 Dosisfindung des Rapamycins**

Um die Effektivität der Kombinationsbehandlung noch zu verbessern, wurden in einer zweiten Versuchsreihe drei verschiedene Dosierungen von Rapamycin getestet. Die Dosis von Rapamycin 1,5 mg/kg/d aus dem ersten Versuchsansatz wurde entsprechender Literatur entnommen [18, 35, 82]. Guba et al. testeten in einer Studie mehrere Dosierungen von Rapamycin, die intraperitoneal verabreicht wurden. Dabei zeigten Mäuse mit einem zu unserem Modell vergleichsweise artifiziellen subkutanen CT-26-Tumor, die täglich mit Rapamycin 1,5 mg/kg behandelt wurden, in den ersten zwanzig Tagen ein leicht verzögertes Tumorwachstum und daraufhin eine merkliche Regression mit einer 100 % Überlebensrate. Die niedrigste angewandte Dosis von

0,15 mg/kg/d bewirkte zunächst ebenfalls ein verlangsamtes Tumorwachstum, jedoch starben alle Tiere bis zum 23. Tag. Eine hohe Dosis von 15 mg/kg/d verursachte innerhalb der ersten drei Wochen eine ausgeprägte Tumorregression. Nach dieser Zeit aber wuchs der Tumor sehr schnell und alle Tiere verstarben kurz darauf. Eine noch höhere Dosis von 30 mg/kg/d resultierte im Tod aller Tiere innerhalb von 17 Tagen [87]. Diese Studie wies wiederum die inhibitorische Wirkung von Rapamycin auf das Wachstum eines Tumors nach und zeigte, dass dieser Effekt am besten mit einer relativ geringen Medikamentendosis zu erzielen ist.

So wurde im zweiten Versuchsansatz die Wirkung der folgenden drei Dosierungen von Rapamycin untersucht: 0,75 mg/kg/d, 1,0 mg/kg/d und 1,5 mg/kg/d. Hierbei zeigten die Tiere wie in der ersten Versuchsreihe Nebenwirkungen des Rapamycins bzw. der Trägersubstanz, wie z.B. abgekapselte ölige Ablagerungen und Verklebungen des Darmpakets, sodass die letzte Gabe von Rapamycin jeweils am 30. Tag erfolgte. Das beste Ergebnis erreichten mit einer Überlebenszeit von 34 Tagen die Tiere, die mit einer niedrigen Dosierung von Rapamycin (0,75 mg/kg/d) behandelt wurden (Gruppe H). Die Leber der Tiere war nur leicht vom Tumor befallen, jedoch kam es zeitabhängig zur Tumorzell dissemination aus der Leber in die Bauchhöhle. Die anderen beiden Gruppen G und I, die mit einer höheren Dosis von Rapamycin (1,0 mg/kg/d bzw. 1,5 mg/kg/d) therapiert wurden, lagen mit einer Überlebenszeit von 26 bzw. 27 Tagen deutlich unter der Gruppe H mit der niedrigen Rapamycin-Dosierung von 0,75 mg/kg/d. Auch der Tumorbefall war sowohl in der Leber als auch im Abdomen in beiden Gruppen ausgeprägter als in Gruppe H.

### **6.1.5 Überprüfung der Effektivität der Kombinationsbehandlung**

Im dritten Versuchsansatz wurde die Wirksamkeit der Kombinationsbehandlung überprüft. Hierbei wurde nun anstelle der bisherigen Dosierung von Rapamycin (1,5 mg/kg/d) die im zweiten Versuchsansatz wirksamste halbierte Dosis von 0,75 mg/kg/d gewählt und mit dem anti-VEGF-Antikörper kombiniert. Die Tiere erreichten allerdings nur eine Überlebenszeit von 25 Tagen. Das Tumorwachstum entsprach ungefähr dem der Tiere, die im zweiten Versuchsansatz das beste Resultat erzielt hatten und mit Rapamycin 0,75mg/kg/d behandelt wurden (Gruppe H), und war somit geringer ausgeprägt als in den meisten Gruppen der vorhergehenden Versuchsreihen. Eine mögliche Erklärung für das schlechtere Überleben könnte wiederum das starke Nebenwirkungsprofil der Trägersubstanz

bzw. des Rapamycins sein, sodass die Tiere nicht tumorbedingt, sondern aufgrund der Nebenwirkungen, z.B. eines Ileus, verstarben. Auch könnte ein entsprechender Synergismus zwischen den beiden Substanzen erst in einer höheren Dosierung von Rapamycin entstehen.

## **6.2 Die Tumorimmunantwort**

Nach Bestimmung der besten Ergebnisse anhand der Überlebenszeit und des Tumorbefalls von Leber und Bauchraum wurde die Reaktion des Immunsystems auf den Tumor untersucht.

Es gibt heute zunehmend Hinweise dafür, dass sich ein Tumor der immunologischen Überwachung und Zerstörung entziehen kann. Die immunologische Dysfunktion gegenüber einem Tumor ist zu Beginn einer Krebserkrankung antigen-spezifisch und wird mit zunehmender Tumorprogression generalisierter [36]. Tumore können der Überwachung des Immunsystems mithilfe verschiedener Mechanismen, wie z.B. der Produktion immunsuppressiver Faktoren (z.B. TGF- $\beta$ ) oder der Inaktivierung infiltrierender Lymphozyten durch das Fas/Fas Ligand-System, entgehen [47]. Die Auswirkungen des Tumorwachstums auf das Immunsystem wurden in der vorliegenden Arbeit mittels einer Real-Time PCR bestimmt, da sich mit ihr eine molekulare Analyse der verschiedensten Zytokine und Oberflächenmarker durchführen lässt [74]. Zudem wurden die Gewebeproben immunhistologisch auf ihre Expressionsmuster untersucht.

Diskutiert werden hier nur die Ergebnisse, die eine Signifikanz in der Real-Time PCR aufwiesen. Somit werden aufgrund fehlender Signifikanz die untersuchten Zytokine bzw. Marker CD56, Fas, Fas Ligand, IFN- $\gamma$ , IL-10 und TGF- $\beta$ 1 nicht besprochen.

### **6.2.1 T-Zell-Populationen**

Die verschiedenen T-Zellpopulationen können anhand ihrer Zelloberflächenmarker voneinander unterschieden werden. T-Helferzellen exprimieren konstitutiv CD4, zytotoxische T-Zellen CD8 und regulatorische Zellen CD25 sowie intrazellulär Foxp3 [88]. Für die Induktion einer optimalen systemischen Antitumorimmunität ist die Aktivierung sowohl der CD4-T-Zellen als auch der CD8-T-Zellen notwendig [89]. Diese ist aber häufig in Karzinomen durch eine veränderte Präsentation von MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen auf Tumorzellen gestört. Die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen ist beispielsweise in Pankreastumoren als zum Teil deutlich

vermindert beobachtet worden, sodass eine effektive Immunreaktion durch T-Zellen erschwert ist. Im Gegensatz zu Patienten mit MHC-Klasse-I-negativen Tumoren, die nur eine geringe Zahl von tumorinfiltrierenden zytotoxischen T-Zellen aufwiesen, ergab sich für Patienten mit einer hohen Akkumulation von CTLs ein besseres Langzeitüberleben [40].

Oftmals findet sich histomorphologisch um die Tumorzellverbände herum eine starke desmoplastische Reaktion. Typischerweise sind dort auch tumorinfiltrierende Zellen lokalisiert, welche zu 90 % entweder CD4- oder CD8-T-Zellen sind [90]. Eine Studie zeigte, dass sowohl bei einer chronischen Pankreatitis als auch beim Pankreaskarzinom die Zahl der Leukozyten im pankreatischen Gewebe im Vergleich zum normalen Pankreasgewebe signifikant erhöht ist. Dabei überwiegt die Zahl der zytotoxischen Zellen [91].

Dies zeigten auch die Ergebnisse der Real-Time PCR in dieser Arbeit. Das Expressionsniveau von CD8 lag in allen Gruppen jeweils im Milz-, Leber- und Tumorgewebe über dem von CD4. Während sich die beiden Zelltypen im Milzgewebe relativ wenig unterschieden, war CD8 im Lebergewebe meist deutlich stärker exprimiert als CD4. Den größten Unterschied in der Expression von CD4 und CD8 wiesen die Tiere auf, die mit der niedrigeren Dosis an Rapamycin 0,75 mg/kg/d (Gruppe H) behandelt wurden, mit einer knapp neunfach erhöhten Expression von CD8. Auch im direkten Tumorgewebe lag die CD8-Genexpression in allen Gruppen 2-12fach über der CD4-Genexpression.

#### **6.2.1.1 T-Helferzellen**

Häufig wird die tumorprotektive Funktion der CD4-T-Zellen aufgrund der fehlenden Expression von MHC-Klasse-II-Proteinen durch Tumore so gestört, dass die Tumorzellen nicht mehr direkt von tumorspezifischen T-Helferzellen erkannt werden können. Um aber gegen MHC-Klasse-II-negative Tumorzellen immunologisch antworten zu können, sind die CD4-T-Zellen von APCs abhängig, die nach Endozytose und Prozessierung der Tumorantigene diese an APC-eigene MHC-Klasse-II binden und den CD4-T-Zellen präsentieren [37]. Daneben spielen die CD4-T-Zellen eine entscheidende Rolle in der Koordination der Tumorummunantwort. In ihrer Gegenwart wird die Bildung klonaler tumorspezifischer CD8-T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen gefördert. Außerdem ermöglichen aktivierte CD4-T-Zellen eine Akkumulation der CD8-T-Zellen im Tumor und verbessern die Tumorzelllyse in der akuten Immunantwort. Neben der CD4-CD8-T-Zell-Kooperation können T-

Helferzellen zudem Makrophagen und Eosinophile rekrutieren und aktivieren, die wiederum tumorzerstörende Radikale freisetzen. Darüber oder durch Sekretion eigener T-Zell-spezifischer Zytokine wird eine Antitumorantwort ausgelöst [92].

In der Real-Time PCR zeigte sich, dass die Expression von CD4 insgesamt in allen Gruppen relativ niedrig war. Vor allem in den mit Rapamycin behandelten Gruppen, in denen der Tumorbefall meist geringer war, war das CD4-Expressionsniveau in allen drei Geweben vermindert. So unterschied sich Gruppe J (Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) im Milz-, Leber- und Tumorgewebe mit einer 2,5-4fach niedrigeren Expression signifikant von den Kontrollantikörpergruppen A und B. Mit am höchsten wurde CD4 in der Kontrollantikörpergruppe B in allen drei Geweben exprimiert. Insgesamt sprechen die geringe Expression von CD4 in den nur leicht vom Tumor befallenen Tieren und die hohe CD4-Expression in den Tieren mit großer Tumorausdehnung dafür, dass die CD4-T-Zellen vermehrt in die Tumorzellnester einwandern.

#### **6.2.1.2 Zytotoxische T-Zellen**

Da die meisten soliden Tumore MHC-Klasse-I-, aber nicht MHC-Klasse-II-Proteine exprimieren, sind die Klasse-I-spezifischen CD8-T-Zellen vermutlich das erste Mittel, um die Tumorzellen anzugreifen [92].

Die CD8-Expression zeigte im Milzgewebe kaum relevante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Im Lebergewebe dagegen war das CD8-Expressionsniveau bei den Tieren, die mit der niedrigeren Rapamycindosis behandelt wurden (0,75 mg/kg/d, Gruppe H), im Vergleich zu den meisten anderen Gruppen hochsignifikant gesteigert. Und auch unter der kombinierten Behandlung mit dem anti-VEGF-Antikörper in der Gruppe J (Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper), die ebenso wie Gruppe H einen geringeren Tumorbefall aufwies, zeigte sich eine erhöhte CD8-Genexpression. Dies deutet darauf hin, dass eine gesteigerte Infiltration zytotoxischer CD8-T-Zellen in der tumortragenden Leber mit einem geringeren Tumorbefall assoziiert ist. Im Tumor selbst ließ sich ebenfalls eine erhöhte Infiltration von CD8-T-Zellen vermuten, was an den in allen Gruppen gesteigerten CD8-Expressionen erkennbar war. Allerdings lagen im Tumorgewebe keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen vor. Offenbar führte diese Infiltration nicht in allen Gruppen zu einer verbesserten Tumorumantwort und damit zu einem geringeren Tumorwachstum. Ein Grund dafür könnte sein, dass der Tumor in der Lage ist, funktionsfähige CD8-T-Zellen im fibrösen



Gewebe um den Tumor herum und CD8-T-Zellen, denen ein Aktivierungsmarker fehlt, im Tumor selbst zu regulieren und damit dem zytolytischen Effekt dieser Zellen zu entgehen [90].

### **6.2.1.3 Regulatorische T-Zellen**

Regulatorische T-Zellen (Tregs) können von anderen T-Zellen durch die konstitutive Expression des Oberflächenmarkers CD25 und des Transkriptionsfaktors Foxp3, den Hauptregulator in deren Entwicklung, unterschieden werden. Tregs üben teilweise durch die Sekretion inhibitorischer Zytokine eine supprimierende Funktion gegenüber T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen aus, was Tumore für sich ausnutzen, um der Tumorummunantwort zu entgehen [93]. So konnte an einem pankreatischen Mausmodell nachgewiesen werden, dass der Tumor aktiv die Ansammlung von Tregs durch verschiedene Mechanismen, wie die Aktivierung natürlicher Tregs oder die Konversion von non-Tregs in regulatorische T-Zellen, fördert [93]. Ferner zeigte sich, dass die Zahl der regulatorischen T-Zellen in Tumoren erhöht ist sowie mit einer schlechteren Prognose und einer verminderten Überlebensrate assoziiert ist [49].

Hierfür konnten in der vorliegenden Arbeit Hinweise gefunden werden. Im Tumorgewebe fand sich eine deutliche Steigerung der CD25-Expression im Vergleich zum Milz- und Lebergewebe. Das Expressionsniveau im Tumor war dabei in den meisten Gruppen um das 2-3fache erhöht. Im Gegensatz zu den anderen Gruppen wies Gruppe J, in der die Tiere mit der niedrigeren Rapamycindosis von 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper therapiert wurden und nur mäßig vom Tumor befallen waren, eine vergleichsweise niedrigere Expression von CD25 in allen drei Geweben verglichen mit den Kontrollgruppen A und B auf, wobei sich die Ergebnisse für Milz und Leber signifikant verhielten. So könnte der geringere Tumorbefall der Gruppe J mit einer niedrigeren Zahl von regulatorischen T-Zellen und einer infolgedessen verbesserten Immunreaktion mitbegründet werden. Schon Viehl et al. zeigten, dass eine Verminderung der regulatorischen Zellen innerhalb eines Tumors beispielsweise durch eine Immuntherapie zu einer Eradikation voll entwickelter Tumore und zur Aktivierung einer tumorspezifischen Immunantwort führt [94].

Der Transkriptionsfaktor Foxp3 nimmt eine Schlüsselrolle in der Entwicklung und Funktion der regulatorischen T-Zellen ein und gilt bisher als der einzige definitive Marker der CD25<sup>+</sup>Tregs [38]. Er ist der entscheidende Faktor für die Bildung nukleärer Komplexe, die wichtig für die Transkription einiger Zielgene sind, die den regulatorischen Zellen ihre suppressive Funktion verleihen [95]. Hinz et al. konnten

nachweisen, dass pankreatische Tumorzellen selbst Foxp3 exprimieren, um die T-Zell-Funktion zu verändern. So sind Tumore in der Lage, potenziell tumorinvasive T-Zellen direkt durch Inhibition ihrer Proliferation oder indirekt über die regulatorischen T-Zellen zu supprimieren [96].

Eine signifikant erhöhte Foxp3-Genexpression im Tumorgewebe konnte nicht nachgewiesen werden. Vielmehr gestaltete sich das Expressionsbild im Tumor uneinheitlich und ohne signifikante Unterschiede. Die Immunhistologie des Tumorgewebes ergab dagegen, dass die Expression von Foxp3 in den Kontrollantikörpergruppen A und B und in den mit anti-VEGF-Antikörper behandelten Gruppen D und E durchaus zum Teil deutlich erhöht war. Diese Gruppen verhielten sich signifikant zu den mit Rapamycin therapierten Gruppen C, F, G, I und J, in denen Foxp3 niedriger exprimiert war. Des Weiteren ließ sich in der Real-Time PCR feststellen, dass die Expression von Foxp3 im Milz- und Lebergewebe in den mit Rapamycin behandelten Gruppen C, F, G, H, I und J geringer war als in den anderen Gruppen. Gruppe J (Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) zeigte wie bereits bei der Expression von CD25 ein verglichen mit den anderen Gruppen erniedrigtes Expressionsniveau für Foxp3. So unterschied sich die Gruppe J beispielsweise im Milzgewebe mit einem 6,4fach gesenkten FoldFactor signifikant von der Kontrollantikörpergruppe A. Dies spricht insgesamt für einen Zusammenhang zwischen der Therapie mit Rapamycin, die eine bessere Tumorkontrolle zeigte, und einer niedrigeren Foxp3-Genexpression, die auf eine verminderte Anzahl regulatorischer T-Zellen hinweist.

### **6.2.2 Th1-/Th2-Immunantwort**

In Studien konnte belegt werden, dass eine Th1-/Th2-Balance, die von Th1- und Th2-Zellen und deren exprimierten Zytokinen aufrechterhalten wird, eine wichtige Rolle für die verschiedenen Immunreaktionen, so auch für die Tumorummunantwort spielt [47]. Th1-Zellen, die u.a. IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF- $\alpha$  sezernieren, sind entscheidend für die Induktion der zellulären Immunantwort und die Tumorummunität, wohingegen Th2-Zellen mit der Produktion von IL-4, IL-6 und IL-10 die humorale Immunreaktion anregen und die zytolytische Aktivität unterdrücken. Einige Studien wiesen einen erhöhten Spiegel an Th2-Zytokinen im peripheren Blut von Tumorpatienten nach [39]. So wurde im Knochenmark und Blut von Pankreaskarzinompatienten eine hohe Zahl von tumorreaktiven T-Zellen gefunden, die als Reaktion auf eine Stimulation mit

Tumorantigen Th2-Zytokine exprimierten. Ferner konnte gezeigt werden, dass Pankreastumore immunmodulierende Zytokine wie IL-10 oder TGF- $\beta$  sezernieren, die die Th1-Antwort supprimieren sowie die Th2-Antwort unterstützen und damit die CTL-Aktivität herunterregulieren [53]. Daraus ergibt sich eine tumorabhängige Verschiebung des Th1-/Th2-Gleichgewichts hin zu einem Th2-Profil [47]. In der vorliegenden Arbeit müssten demzufolge die Zytokine IL-2 und TNF- $\alpha$  als Vertreter der Th1-Zytokine niedriger exprimiert sein als das Th2-Zytokin IL-10. Allerdings ergaben die Ergebnisse der PCR und der Immunhistologie für IL-10 kein eindeutiges Bild. IL-2 war in allen drei Geweben durchweg niedrig exprimiert, wohingegen TNF- $\alpha$  sowohl in der Immunhistologie als auch in der PCR eine zum Teil deutlich gesteigerte Expression aufwies. Insgesamt lässt sich aus den gewonnenen Ergebnissen keine eindeutige Aussage über das Th1-/Th2-Gleichgewicht treffen.

#### **6.2.2.1 Interleukin-2**

IL-2 ist das wichtigste Signal für die T-Helferzellen und fördert in autokriner und parakriner Weise die klonale Expansion und Differenzierung von reifen T-Zellen. Außerdem ist es von wesentlicher Bedeutung für die Entwicklung der regulatorischen T-Zellen und für die Stimulation der Zytokinsynthese und -sekretion. IL-2 regt durch Bindung an Monozyten und Makrophagen diese zu einer gesteigerten zytotoxischen Aktivität an [41]. Es gilt daher als eines der potentesten Antitumorzytokine, das jedoch als systemisches Therapeutikum aufgrund seiner starken Nebenwirkungen bisher keinen überzeugenden Behandlungsvorteil aufwies.

Für den antitumorösen Effekt von IL-2 fanden sich in der vorliegenden Arbeit im Lebergewebe deutliche Hinweise. Während die IL-2-Genexpression im Milz- und Tumorgewebe in allen Gruppen niedrig war und keine Signifikanzen ergab, zeigte die Gruppe H, in der die Tiere mit der niedrigeren Rapamycindosis von 0,75 mg/kg/d behandelt wurden und die insgesamt das beste Ergebnis im zweiten Versuchsansatz aufwies, im Lebergewebe ein deutlich erhöhtes Expressionsniveau im Vergleich zu allen anderen Gruppen außer der Gruppe J (Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper). Die Gruppe H unterschied sich mit einem 2,5-3fach gesteigerten FoldFactor signifikant von der Kontrollantikörpergruppe A und hochsignifikant von den anderen Gruppen. Dies deutet bei den Tieren der Gruppe H, die im Vergleich zu den Tieren der Gruppen G (Rapamycin 1,0 mg/kg/d) und I (Rapamycin 1,5 mg/kg/d) des zweiten Versuchsansatzes einen geringeren Tumorbefall und verglichen mit allen Gruppen das längste Überleben aufwies, auf eine gesteigerte zelluläre Th1-

Immunantwort und eine dementsprechend effizientere Tumormunität hin. Die niedrigen Werte für IL-2 in allen drei Geweben könnten auch für eine Suppression der Th1-Antwort und ein Überwiegen der Th2-Immunantwort sprechen.

#### **6.2.2.2 TNF- $\alpha$**

Die Expression von TNF- $\alpha$  wies in allen drei Geweben signifikante Ergebnisse auf. Das multifunktionale Zytokin spielt eine wichtige Rolle in der Apoptose und dem Zellüberleben sowie bei Entzündungen und Immunreaktionen [41]. So ist TNF- $\alpha$  mit einer Reihe von pathologischen Prozessen der verschiedensten Krankheiten assoziiert. Im Hinblick auf Tumorerkrankungen nimmt TNF- $\alpha$  eine zweiseitige Stellung ein. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass TNF- $\alpha$  bei tumorassoziierten Gefäßen eine Hyperpermeabilität induzierte und damit die Gefäßdicke beschädigte. Dies führte zu einer sofortigen Akkumulation zytostatischer Medikamente innerhalb des Tumors und einer nachfolgenden Zerstörung des Tumorgefäßnetzes [42]. So hemmte das Zytokin durch seine zellzerstörenden und proapoptischen Aktivitäten das Tumorstadium. Andererseits fördert TNF- $\alpha$  z.B. mit der Induktion von vaskulären endothelialen Adhäsionsrezeptoren das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren [97]. Eine Studie wies die Mitbeteiligung von TNF- $\alpha$ , das teilweise durch die Tumorzellen selbst freigesetzt wurde, sowohl an der Entwicklung und Progression als auch an einem postoperativen Rezidiv des Tumors und an der Metastasierung nach. Eine Behandlung mit einem anti-TNF- $\alpha$ -Antikörper reduzierte das Tumorstadium und die Metastasierung um 30 % bzw. 50 % [98].

In der Real-Time PCR und der Immunhistologie fanden sich Hinweise darauf, die darauf schließen lassen, dass das Zytokin TNF- $\alpha$  eher tumorprogressiv agiert. So war TNF- $\alpha$  in allen drei Geweben meist in den Gruppen höher exprimiert, die auch ein stärkeres Tumorstadium aufwiesen. Im Milz- und Lebergewebe unterschieden sich beispielsweise die Gruppen, die mit Kontrollantikörper behandelt wurden (Gruppe A und B), mit einer deutlich gesteigerten TNF- $\alpha$ -Expression teils signifikant bzw. hochsignifikant von den Gruppen, die mit Rapamycin therapiert wurden (Gruppe C, F; G, H, I und J). Im Tumorgewebe fand sich ebenfalls wie im Milz- und Lebergewebe ein erhöhter, aber nicht ganz so ausgeprägter Expressionswert in der Kontrollgruppe A. Signifikante Unterschiede zeigten sich hier zwischen der Kontrollantikörpergruppe A und den Gruppen C und I (jeweils Rapamycin 1,5 mg/kg/d) und F (Rapamycin 1,5 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper). Auffällig ist außerdem, dass die Gruppe J, die mit der Kombinationsbehandlung aus Rapamycin 0,75 mg/kg/d und

anti-VEGF-Antikörper einen relativ geringen Tumorbefall gezeigt hatte, in allen drei Geweben sowohl in der PCR als auch immunhistologisch die niedrigste TNF- $\alpha$ -Expression aufwies. Dies spricht ebenfalls dafür, dass eine geringere Konzentration von TNF- $\alpha$  mit einem verminderten Tumorwachstum assoziiert ist. Die letztendliche Tumorwirkung von TNF- $\alpha$  könnte aber von seiner Konzentration oder dem Stadium der Erkrankung abhängig sein [42].

### **6.2.3 Immunologische Escape-Mechanismen**

Es werden zahlreiche Strategien diskutiert, wie der Tumor der Immunantwort entkommen kann. Pankreatische Tumorzellen besitzen z.B. eine Reihe von lokalen und systemischen Mechanismen, mit denen sie kostimulatorische Moleküle herunterregulieren, immunsuppressive Faktoren produzieren und die Apoptose von Immunzellen hochregulieren, um damit die körpereigene Abwehr manipulieren oder umgehen zu können [46]. Sie erreichen beispielsweise mit der Sekretion von TGF- $\beta$ , IL-6 und IL-10 eine inadäquate Aktivierung von DCs, die zu einer ineffektiven Antitumorantwort führt [99]. Ferner sezernieren Tumorzellen zur Förderung des Tumorwachstums Wachstumsfaktoren wie TGF- $\alpha$ , IGF-1 und VEGF [47]. Auch wurde die Akkumulation immunsuppressiver Tregs, eine verminderte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen und des Transporters TAP, der mit der Antigenprozessierung assoziiert ist, sowie das Abtöten von Lymphozyten durch Fas Ligand-Expression beschrieben [16].

#### **6.2.3.1 Die B7-Signal-Familie**

Ein weiterer Mechanismus, der immunologischen Kontrolle zu entgehen, besteht in der verminderten Expression kostimulatorischer Moleküle und einer gesteigerten Sekretion koinhibitorischer Moleküle wie B7-H1 (PD-L1) und PD-L2. Die beiden Transmembranproteine gehören zur B7-Familie, deren Mitglieder mit kostimulatorischen oder koinhibitorischen Signalen über Rezeptoren der CD28-Familie eine Immunantwort initiieren oder stoppen [56]. Einer der Rezeptoren der beiden Liganden B7-H1 und PD-L2 ist PD-1, ein Typ-I-Transmembranprotein der CD28-Familie, das auf aktivierten T- und B-Zellen präsentiert wird. Über den PD-1-Rezeptor sind B7-H1 und PD-L2 an der negativen Regulation der zellulären und humoralen Immunantwort beteiligt [57]. Da einige Studien zeigten, dass B7-H1 und PD-L2 auch kostimulierend wirken können, wird neben PD-1 noch ein weiterer Rezeptor für die beiden Liganden vermutet [57, 62, 63]. Kürzlich veröffentlichte Studien zeigten, dass

der PD-L/PD-1-Signalweg eine entscheidende Rolle in der Tumormunität spielt [61, 62, 63]. So konnte für eine Vielzahl von Tumoren, darunter auch das Pankreaskarzinom, eine Überexpression von B7-H1 und PD-L2 nachgewiesen werden [100]. Für den Ligand B7-H1 konnte gezeigt werden, dass die Tumorzell-assoziierte B7-H1-Expression die Apoptose von CTLs und aktivierten tumorreaktiven T-Zellen steigerte und das Tumorstadium begünstigte [58]. Somit kann der Tumor mit einer erhöhten B7-H1-Expression der Tumormunität entgehen. Demzufolge konnten Iwai et al. in einer Studie nachweisen, dass eine Blockade der Interaktion zwischen PD-1 und B7-H1 eine vielversprechende Strategie der spezifischen Immuntherapie darstellt [101]. Die wichtige Stellung des PDL-1/PD-1-Signalwegs als Regulator im Pankreaskarzinom verdeutlichte darüber hinaus eine Studie, in der eine Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen B7-H1 und PD-1 einen starken Antitumoreffekt an einem Mausmodell hervorrief. Die B7-H1-Blockade förderte die CD8-T-Zell-Infiltration in den Tumor und induzierte eine lokale Immunaktivierung. Ferner ließ sich für das Pankreaskarzinom eine Korrelation zwischen der B7-H1-Überexpression und der Krebsmortalität nachweisen. B7-H1-positive Patienten hatten eine signifikant schlechtere Prognose als B7-H1-negative Patienten [58].

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die FoldFactoren für B7-H1 im Tumorgewebe in allen Gruppen auf Werte zwischen 2,08 bis 5,88 erhöht waren, aber keine signifikanten Unterschiede zueinander aufwiesen. Dagegen wiesen im Milzgewebe alle Gruppen außer den Gruppen H (Rapamycin 0,75 mg/kg/d) und J (Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) ein erhöhtes Expressionsniveau für B7-H1 auf. B7-H1 war in der Kontrollantikörpergruppe A mit am höchsten exprimiert und verhielt sich meist signifikant gegenüber den Gruppen, die mit Rapamycin behandelt und auch geringer vom Tumor befallen waren (Gruppe G, H und J). Der FoldFactor der Gruppe J, in der die Tiere mit der Kombination aus Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper behandelt wurden, lag siebenfach und damit hochsignifikant unter dem der Kontrollantikörpergruppe A. Im Lebergewebe war der Unterschied nicht so ausgeprägt. Die Expression von B7-H1 war insgesamt niedriger als im Milzgewebe und war wiederum vor allem in den mit Rapamycin behandelten Gruppen C, F, G, H, I und J, die ein geringeres Tumorstadium aufwiesen, geringer als in den anderen Gruppen. Auch histomorphologisch wiesen die mit Rapamycin therapierten Gruppen G, H, I und J eine deutlich niedrigere Expression von B7-H1 auf verglichen mit den stark von Tumor befallenen Kontrollantikörpergruppen A und B

sowie den mit anti-VEGF-Antikörper therapierten Tieren der Gruppe D. Somit zeigte sowohl die Real-Time PCR als auch die Immunhistologie, dass ein niedrigeres Expressionsniveau von B7-H1 in allen Geweben mit einem besseren Tumoransprechen assoziiert war.

Die Bedeutung von PD-L2 für die Tumorummunantwort wird im Gegensatz zu B7-H1 weiterhin kontrovers diskutiert, da bisher sowohl positiv als auch negativ kostimulatorische Effekte für PD-L2 dokumentiert werden konnten [63]. So zeigte eine Studie einerseits auf, dass PD-L2 die CD8-T-zellvermittelte Bekämpfung von Tumorzellen förderte [60]. Andererseits wies eine Studie einen umgekehrten Zusammenhang zwischen der PD-L2-Expression und der Zahl von tumorinfiltrierenden Zellen nach [61]. Auch konnte belegt werden, dass PD-L2 einen hemmenden Einfluss auf die Aktivierung von T-Zellen *in vivo* und *in vitro* ausübt und ein Mangel an PD-L2 zu einer erhöhten T-Zell-Aktivierung führt [59]. Eine weitere Studie ergab, dass Tiere, die mit einem *cross-linking* Antikörper gegen PD-L2 behandelt wurden, ein im Vergleich zu nicht therapierten Tieren deutlich geringeres Tumorstadium aufwiesen [102]. Es zeigte sich allerdings im Gegensatz zu B7-H1 keine signifikante Korrelation zwischen der PD-L2-Expression des Tumors und dem Patientenüberleben [63].

In der vorliegenden Arbeit unterschied sich die PD-L2-Genexpression tumorbefallener Kontrolltiere im Milzgewebe deutlich von den Gruppen C und I, in denen die Tiere jeweils mit Rapamycin 1,5 mg/kg/d behandelt wurden, und der Gruppe J (Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper). Hierbei lag das Expressionsniveau in den Kontrolltieren mit einem 2,5-5fach erhöhten FoldFactor signifikant über den Werten der Behandlungsgruppen C, I und J. Auch immunhistologisch zeigte sich, dass die Expression von PD-L2 in den Kontrollantikörpergruppen A und B über der Expression der mit Rapamycin behandelten und geringer vom Tumor befallenen Tiere (Gruppe C, F, G, H, I und J) lag. Es ergaben sich dabei aber keine signifikanten Unterschiede. Dies könnte dennoch bedeuten, dass eine hohe PD-L2-Expression mit einem stärkeren Tumorstadium wie dem in der Kontrollgruppe A einhergeht und der Tumor durch eine erhöhte PD-L2-Expression versucht, die Tumorummunantwort zu umgehen. Da die Gruppen aber insgesamt in der PCR recht niedrige Werte in allen drei Geweben aufwiesen, kann keine eindeutige Aussage über die Bedeutung von PD-L2 für das Tumorstadium getroffen werden.

PD-1 ist ein Rezeptor, der die Signale über den T-Zell-Rezeptor durch Interaktion mit seinen zwei Liganden B7-H1 und PD-L2 negativ reguliert und so eine wichtige Rolle

in der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz einnimmt [57]. Da ruhende B- und T-Zellen keine PD-1-Moleküle exprimieren, gilt PD-1 als Markermolekül für die Aktivierung von T-Zellen.

Bei der Expression von PD-1 fielen im Leber- und Tumorgewebe verglichen zum Milzgewebe deutlich höhere Werte auf. Dabei war PD-1 im Leber- und Tumorgewebe genau in den Gruppen (G (Rapamycin 1,0 mg/kg/d), H (Rapamycin 0,75 mg/kg/d) und J (Rapamycin 0,75mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) stärker exprimiert, die zugleich niedrige Werte für B7-H1 und PD-L2 als Liganden des Rezeptors aufwiesen und im Gegensatz zu den anderen Gruppen ein geringeres Tumorstadium zeigten. Somit war PD-1 in den Gruppen höher exprimiert, die einen leichteren Tumorbefall aufwiesen. Da PD-1 nur auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird, könnte die erhöhte Expression von PD-1 als Hinweis auf eine gesteigerte Aktivierung von T-Zellen und damit auf eine verstärkte Tumormunantwort angesehen werden.

#### **6.2.3.2 TGF- $\beta$**

TGF- $\beta$  wurde ursprünglich als ein von Tumorzellen produzierter Wachstumsfaktor beschrieben. Heute ist bekannt, dass das Zytokin in eine Reihe von zellulären Abläufen, wie der Regulation des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung, der Angiogenese und dem Aufbau der Extrazellulärmatrix, involviert ist [103]. Eine seiner wesentlichen biologischen Eigenschaften ist seine negativ immunregulatorische Wirkung, die unter anderem die Proliferation naiver T-Zellen und anderer Zellen hemmt [41]. Es gibt Hinweise dafür, dass einige Malignome die Eigenschaften von TGF- $\beta$  zu ihrem Vorteil einsetzen. Diese Krebsarten produzierten TGF- $\beta$  und steigerten seine Expression, sodass TGF- $\beta$  mittlerweile als Marker für eine fortgeschrittene Metastasierung und ein vermindertes Überleben angesehen werden kann. Eine Studie zeigte hierzu, dass eine Überexpression von TGF- $\beta$  mit einem fortgeschrittenem Stadium und einer schlechteren Überlebenszeit assoziiert ist [53]. Während TGF- $\beta$  in normalen Zellen als Tumorsuppressor agiert, scheint er in Tumorzellen als Tumorpromotor zu dienen. Eine Überexpression von TGF- $\beta$  ermöglicht es dem Tumor, die normale Immunantwort in der Art zu verändern, dass eine Klasse von supprimierenden Zellen generiert wird, die inaktiv gegenüber Tumorzellen ist, und somit eine für das Tumorstadium günstige Umgebung geschaffen wird [104]. Vor allem TGF- $\beta$ 1 induzierte die Überführung epithelialer Zellen in Mesenchymzellen und veränderte die Extrazellulärmatrix so, dass die Möglichkeiten zur Invasion und Metastasierung bösartiger Zellen verbessert werden [105]. Die tumorbedingte



Sekretion von TGF- $\beta$ 1 ermöglicht ferner die Produktion mitogener Wachstumsfaktoren, wie z.B. PDGF oder FGF [106]. Eine Neutralisation von TGF- $\beta$  oder eine Inhibition seiner Produktion beispielsweise durch anti-TGF- $\beta$ -Antikörper wurde als eine neue Methode in der Krebstherapie bereits erfolgreich am Tiermodell getestet [104].

Die eigenen Untersuchungen ergaben eine erhöhte Genexpression für TGF- $\beta$  im Milz- und Lebergewebe tumorbefallener Tiere. Eine speziell im Tumorgewebe gesteigerte TGF- $\beta$ -Genexpression konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Die FoldFactoren lagen in einem Bereich von 1,28 bis 2,32. Im Lebergewebe war TGF- $\beta$  vor allem in den Tieren erhöht exprimiert, die nicht mit Rapamycin behandelt wurden und einen ausgeprägten Tumorbefall aufwiesen (Gruppen A, B und D). Die mit Rapamycin therapierten Tiere zeigten dagegen ein niedrigeres Expressionsniveau für TGF- $\beta$ . Somit war eine geringere TGF- $\beta$ -Genexpression mit einem geringeren Tumorbefall in den mit Rapamycin behandelten Gruppen assoziiert. Im Milzgewebe wiesen die Tiere der Gruppen H (Rapamycin 0,75 mg/kg/d) und J (Rapamycin 0,75 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper), die etwa in gleichem Ausmaß vom Tumor befallen waren, ein signifikant erniedrigtes Genexpressionsniveau auf. Die Tiere der Gruppe H unterschieden sich dabei signifikant von denen der Gruppen A (Kontrollantikörper ab Tag 0), D (anti-VEGF-Antikörper ab Tag 0) und F (Rapamycin 1,5 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper) sowie die Tiere der Gruppe J von denen der Gruppen B (Kontrollantikörper ab Tag 2), D (anti-VEGF-Antikörper ab Tag 0) und F (Rapamycin 1,5 mg/kg/d und anti-VEGF-Antikörper). Damit ergab sich auch im Milzgewebe eine niedrigere Expression von TGF- $\beta$  in den Gruppen, die einen geringeren Tumorbefall aufwiesen. Immunhistologisch zeigte sich für TGF- $\beta$  im Tumorgewebe ein nahezu identisches Expressionsmuster wie in der Real-Time PCR im Lebergewebe. Wiederum wiesen die Gruppen mit starkem Tumorbefall (Gruppen A, B und D) im Gegensatz zu den mit Rapamycin behandelten Gruppen eine ausgeprägte TGF- $\beta$ -Expression auf.

Insgesamt war somit eine niedrigere Expression von TGF- $\beta$  in der Real-Time PCR und der Immunhistologie mit einem geringeren Tumorbefall assoziiert, was auf eine verstärkte Tumorumantwort in den Gruppen mit geringerem Tumorstadium hindeuten könnte.

### 6.3 Klinische Anwendung

Das bessere Verständnis über die tumorbiologischen Prozesse im Pankreaskarzinom hat dazu geführt, dass es mittlerweile eine Vielzahl von Studien mit Ansätzen gibt, die sich gegen die molekularen Veränderungen im Zuge dieser Erkrankung richten. Hierzu zählen die Gentherapie, die Inhibition der Signaltransduktion, antiangiogenetische und Matrix-Metalloproteinase-Inhibitoren sowie die Immuntherapie [107]. Die passive Immuntherapie basiert auf der Verwendung von in vitro hergestellten anti-tumorösen Substanzen, wie z.B. monoklonalen Antikörpern, während die aktive Immuntherapie das Ziel hat, beispielsweise durch eine Impfung T-Lymphozyten zu rekrutieren und zu aktivieren, sodass diese tumorspezifische Antigene erkennen [108]. So gibt es heutzutage zahlreiche Behandlungsstrategien, die bereits bei Patienten mit Pankreaskarzinom in klinischen Studien auf ihre Wirksamkeit überprüft werden.

Ein Beispiel dafür sind klinische Studien mit mTOR-Inhibitoren wie Rapamycin, die bisher als Abstoßungsprophylaxe bei Nierentransplantationen benützt wurden [28]. Humane Malignome zeigen eine erhöhte mTOR-Aktivität, sodass die Inhibition dieser ein vielversprechender Ansatz in der Antitumortherapie zu sein scheint [32]. Mehrere Phase-II-Studien an soliden Tumoren, wie z.B. dem Nierenzellkarzinom, dem Glioblastom oder dem Mammakarzinom, demonstrierten bereits einen positiven Effekt der Monotherapie mit Rapamycin [29]. Es sind aber noch weitere Untersuchungen notwendig, um aufzuzeigen, welche Patienten am meisten von dieser Behandlung profitieren, welche Dosierung die wirksamste ist, und ob eine Kombinationsbehandlung mit anderen Substanzen den therapeutischen Effekt noch verbessern kann [77].

Des Weiteren rückt in der Krebstherapie die Blockade von VEGF immer weiter in den Mittelpunkt des Interesses. Derzeit wird in klinischen Studien die Wirksamkeit von VEGF-Inhibitoren, anti-VEGFR-2-Antikörpern, kleinen die VEGFR-2 Signaltransduktion hemmenden Molekülen oder löslichen VEGF-Rezeptoren getestet [23]. Es zeigte sich, dass eine Kombination aus anti-VEGF-Antikörpertherapie und Chemotherapie oder Bestrahlung einen größeren antitumorösen Effekt aufweist als eine Monotherapie. So erreichten in einer Phase-II-Studie 52 Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom, die mit einer Kombination aus dem anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab und Gemcitabin behandelt wurden, verglichen mit der Kontrollgruppe ein besseres Ergebnis, was Ansprechen und Überlebenszeit betraf.

Nicht zu vernachlässigen sind jedoch die Nebenwirkungen, die unter dieser Therapie auftraten, wie Hypertension bei 19 %, Thrombosen bei 13 %, viszerale Perforationen bei 8 % und Blutungen bei 2 % der Patienten [20]. Eine auf diese Ergebnisse aufbauende Phase-III-Studie mit Gemcitabin und Bevacizumab wurde aufgrund enttäuschender Ergebnisse abgebrochen [19].

Auch die Anwendung von Zytokinen und Immunmodulatoren wird mittlerweile klinisch erprobt. IL-2 gilt als eines der potentesten Antitumorzytokine, das jedoch als Therapeutikum systemisch angewendet trotz seiner klinischen Erfolge in der Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms die Erwartungen bisher nicht erfüllen konnte. Zusätzlich zu den schwerwiegenden Nebenwirkungen, wie z.B. dem *Capillary-leak*-Syndrom, die bei höheren suffizienten Dosierungen auftraten, war die Effektivität der Behandlung durch den schnellen Abbau von IL-2 deutlich vermindert. Eine Lösung des Problems scheint die Konjugation von IL-2 an einen Trägerstoff zu sein, wodurch der therapeutische Index von IL-2 erhöht und die toxischen Nebenwirkungen verringert werden [109].

Auch das multifunktionale Zytokin TNF- $\alpha$  weist ein antitumoröses Potenzial in Verbindung mit zytostatischen Substanzen auf [42]. Außerdem laufen derzeit klinische Phase-II/-III-Studien zum Pankreaskarzinom mit TNFerade an. Dies ist ein Adenovirus, das die Gene für TNF- $\alpha$  trägt und in Verbindung mit einer Bestrahlung die Genexpression startet [107]. Es gibt aber auch klinische Versuche, die mit einer Blockade von TNF- $\alpha$  nicht nur bei Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen, sondern auch bei Krebspatienten gute Ergebnisse erzielten [42].

Ferner läuft derzeit hinsichtlich einer TGF- $\beta$ -basierten Immuntherapie eine klinische Phase-I-Studie mit einem TGF- $\beta$ -neutralisierenden Antikörper [110]. Darüber hinaus wird die Anwendung monoklonaler Antikörper, die bestimmte Moleküle der B7-Familie herunterregulieren, für die Krebstherapie klinisch erprobt [107, 108]. Sowohl für B7-H1 als auch für PD-L2 konnte bereits gezeigt werden, dass deren Blockade die Antitumorimmunantwort verstärkt und das weitere Tumorwachstum verhindert [101, 102].

## 7 Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom stellt aufgrund seiner hohen Letalität ein bisher ungelöstes Behandlungsproblem dar. Da die Erkrankung meist erst in einem späten Stadium erkannt wird, sehr aggressiv verläuft und effektive systemische Therapien bisher fehlen, beträgt die 5-Jahresüberlebensrate nur etwa 1-4 %. Bei mehr als 80 % der Patienten erfolgt die Diagnosestellung in einem lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Stadium. Die Standardchemotherapie mit Gemcitabin spricht nur bei etwa 12-27 % der Patienten an, sodass die mittlere Überlebenszeit nur vier bis sechs Monate beträgt.

Daher ist die Entwicklung neuer Therapiestrategien dringend notwendig. Geeignet dafür sind neuartige Ansätze einer gezielten Krebstherapie, die sich speziell gegen die tumorbiologischen Veränderungen des Pankreaskarzinoms richten.

Eine vielversprechende Strategie ist die Therapie mit antiangiogenetisch wirksamen Substanzen, wie z.B. Rapamycin und anti-VEGF-Antikörper. Rapamycin, ein spezifischer Inhibitor der Serin/Threonin-Kinase mTOR, übt einen suppressiven Effekt auf die Proliferation, Invasion und Metastasierung von Tumoren aus und induziert die Apoptose von Tumorzellen. Anti-VEGF-Antikörper weisen ebenfalls eine inhibierende Wirkung auf das Tumorwachstum und die Tumorangiogenese auf.

Ziel dieser Arbeit war es, die beiden Wirkstoffe Rapamycin und anti-VEGF-Antikörper allein und in Kombination auf ihre antitumorösen Eigenschaften gegenüber Panc02-Tumorzellen in drei aufeinander folgenden Versuchsansätzen an einem Metastasierungsmodell in vivo zu untersuchen. Beurteilt wurden dabei zunächst die Überlebenszeit der Tiere und die Tumorausdehnung in der Leber. Da Tumore eine immunologische Dysfunktion verursachen können und durch unterschiedliche Mechanismen in der Lage sind, verschiedene Zellabläufe zu manipulieren, um damit der immunologischen Kontrolle zu entgehen, wurden anschließend anhand einer quantitativen PCR und der Immunhistologie die Auswirkungen des Tumors auf verschiedene Zellmarker und Zytokine im Milz-, Leber- und Tumorgewebe bestimmt. Aus den erhobenen Ergebnissen geht hervor, dass mit der Kombinationsbehandlung aus Rapamycin (1,5 mg/kg/d) und anti-VEGF-Antikörper das beste Tumoranprechen mit einer der längsten Überlebenszeiten und einem sehr geringen Tumorbefall zu erreichen war. Die Monotherapie mit Rapamycin zeigte zwar ebenfalls im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen einen geringeren Tumorbefall, war

aber mit einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert. Ein Grund für ein eingeschränktes Überleben der mit Rapamycin behandelten Tiere könnte das Nebenwirkungsprofil von Rapamycin sein. Die Tiere wiesen deutliche, zum Teil abgekapselte Ablagerungen der öligen Trägersubstanz im Bauchraum und starke Darmverklebungen mit Ileus auf. Die Behandlung mit dem anti-VEGF-Antikörper erzielte weder hinsichtlich der Überlebenszeit noch bezüglich des Tumorbefalls überzeugende Ergebnisse. Der fehlende Antitumoreffekt der anti-VEGF-Antikörpertherapie könnte in der kurzen Behandlungsdauer des Antikörpers begründet sein.

Bei der Überprüfung der Dosierung von Rapamycin schnitt die Gruppe mit der niedrigsten Rapamycindosis von 0,75 mg/kg/d am besten ab. Neben der längsten Überlebenszeit wies sie verglichen mit den anderen Gruppen den geringsten Tumorbefall auf.

Ein erneuter Versuchsansatz mit der Kombination aus der reduzierten Rapamycindosis (0,75 mg/kg/d) und dem anti-VEGF-Antikörper konnte den zuvor erzielten Vorteil der Kombinationsbehandlung nicht vollends bestätigen. Die Tumorausbreitung entsprach zwar dem Ergebnis der in der zweiten Versuchsreihe am besten abgeschnittenen Gruppe, die Überlebenszeit lag aber deutlich unter der der Vergleichsgruppen. Auch hier könnten wiederum die Nebenwirkungen des Rapamycins für das frühe Versterben der Tiere ursächlich sein.

Zur Bewertung des Tumorbefalls der Leber wurden die einzelnen Leberlappen auf Metastasen durchgesehen und das Lebervolumen bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Größe des Lebervolumens mit Ausnahme der Gruppen F (Rapamycin 1,5 mg/kg und anti-VEGF-Antikörper) und J (Rapamycin und anti-VEGF-Antikörper) stets mit der Stärke des Tumorbefalls in der Leber korrelierte.

In der Real-Time PCR ergab sich hinsichtlich des lymphozytären Infiltrationsmusters folgendes Bild: Im Milz-, Leber- und Tumorgewebe lag die Zahl der zytotoxischen T-Zellen über der der T-Helferzellen. Vor allem im Tumorgewebe war die Genexpression von CD8 deutlich erhöht und teilweise mit einem besseren Tumoransprechen assoziiert. Dies könnte auf eine effiziente Tumorimmunantwort der zytotoxischen T-Zellen hindeuten. Die Expression von CD4 war dagegen in allen drei Geweben relativ gering. Ferner konnte in der Real-Time PCR und in der Immunhistologie eine Steigerung der CD25-Genexpression im Leber- und Tumorgewebe im Vergleich zum Milzgewebe nachgewiesen werden. Dies könnte auf eine

Ansammlung supprimierender regulatorischer T-Zellen im Tumor und damit eine ineffizientere Tumorummunantwort hindeuten.

Ein bereits in zahlreichen Studien belegtes Überwiegen der Th2-Immunantwort konnte auf quantitativer Genexpressionsebene sowie immunhistologisch nicht nachgewiesen werden. Demzufolge hätten die Zytokine IL-2 und TNF- $\alpha$  als Vertreter der Th1-Zytokine niedriger exprimiert sein müssen als das Th2-Zytokin IL-10.

IL-2 war allen drei Geweben durchweg niedrig exprimiert. Dies könnte für eine Suppression der Th1-Antwort und ein Überwiegen der Th-2-Immunantwort sprechen. Für IL-2 ergab sich außerdem im Lebergewebe ein Zusammenhang zwischen einem geringeren Tumorbefall und einer höheren Expression, was eine gesteigerte zelluläre Th1-Immunantwort vermuten lässt. Im Gegensatz dazu korrelierte eine höhere TNF- $\alpha$ -Expression mit einem gesteigerten Tumorwachstum.

Des Weiteren wurden die Auswirkungen des Tumors auf B7-H1 und PD-L2 sowie auf PD-1, einen ihrer Rezeptoren, untersucht. Eine in einigen Studien beschriebene Überexpression von B7-H1 konnte in der Real-Time PCR nur im Milzgewebe nachgewiesen werden. Es zeigte sich sowohl molekulargenetisch als auch in der Immunhistologie, dass ein niedrigeres Expressionsniveau des inhibitorisch wirksamen B7-H1 mit einem besseren Tumoransprechen assoziiert war. Ein ähnliches aber nicht so eindeutiges Expressionsbild wies PD-L2 auf, sodass eine definitive Aussage über die Bedeutung von PD-L2 für das Tumorwachstum nicht getroffen werden konnte. Der Rezeptor PD-1 zeigte im Lebergewebe genau in den Gruppen eine höhere Expression, die zugleich geringere Werte für seine Liganden ergaben, und verhielt sich damit nahezu umgekehrt proportional zur Expression von B7-H1 und PD-L2. Zugleich lag seine Expression in den nur leicht mit Tumor befallenen Gruppen deutlich höher und lässt damit auf eine gesteigerte T-Zell-Aktivierung und bessere Tumorummunantwort schließen.

Auch für TGF- $\beta$  gilt, dass seine Expression häufig im Tumorgewebe gesteigert ist. In der Real-Time PCR war die Expression von TGF- $\beta$  im Milz- und Lebergewebe gesteigert. Dabei korrelierte im Leber- und teilweise im Milzgewebe eine höhere Expression von TGF- $\beta$  mit einem ausgeprägten Tumorbefall. Diesen Zusammenhang zeigte auch die Immunhistologie von TGF- $\beta$  im Tumorgewebe.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Kombinationstherapie aus Rapamycin und anti-VEGF-Antikörper zu einem besseren Tumoransprechen führte als die Monotherapie mit einer der beiden Substanzen. Die in dieser Arbeit

erhobenen Ergebnisse sollten nun dazu verwendet werden, gezielt neue immunologische und antiangiogenetische Therapiestrategien für die Behandlung des Pankreaskarzinoms in der Klinik zu entwickeln.

Allerdings zeigt die vorliegende Arbeit auch Ansätze und Probleme auf, die zunächst in weiteren Studien zu lösen sind. So stellten beispielsweise die Nebenwirkungen der Rapamycinbehandlung einen limitierenden Faktor in der Behandlung der Tiere dar. Auch sollte geklärt werden, ob der schwache Effekt der anti-VEGF-Antikörperbehandlung in dieser Arbeit mit der kurzen Behandlungsdauer erklärt werden kann und möglicherweise eine längere Anwendung der VEGF-Antikörper bessere Resultate erzielt.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Mancuso, A., F. Calabro, and C.N. Sternberg, *Current therapies and advances in the treatment of pancreatic cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2006. **58**(3): p. 231-41.
2. Röcken, C. and M.P.A. Ebert, *Postoperative staging of pancreatic cancer*, in *Pancreatic cancer*, H. Riess, Editor. 2008, Springer Verlag: Berlin. p. 39-48.
3. Büchler, M.W., W. Uhl, and P. Malfertheiner, *Tumore des Pankreas*, in *Pankreaserkrankungen*, M.W. Büchler, W. Uhl, and P. Malfertheiner, Editors. 2004, Karger: Basel. p. 134-155.
4. Simon, B. and H. Printz, *Epidemiological trends in pancreatic neoplasias*. Dig Dis, 2001. **19**(1): p. 6-14.
5. Roll, L., *Adjuvant therapy in patients with pancreatic cancer*, in *Pancreatic cancer*, H. Riess, Editor. 2008, Springer Verlag: Berlin. p. 49-56.
6. Pelzer, U., *First-line chemotherapy in advanced pancreatic cancer*, in *Pancreatic cancer*, H. Riess, Editor. 2008, Springer Verlag: Berlin. p. 57-60.
7. Pelzer, U., *Second-line chemotherapy in advanced pancreatic cancer*, in *Pancreatic cancer*, H. Riess, Editor. 2008, Springer Verlag: Berlin. p. 61-64.
8. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
9. Bian, X.W., et al., *Angiogenesis as an immunopharmacologic target in inflammation and cancer*. Int Immunopharmacol, 2004. **4**(12): p. 1537-47.
10. Bergers, G. and L.E. Benjamin, *Tumorigenesis and the angiogenic switch*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 401-10.
11. Carmeliet, P., *Angiogenesis in health and disease*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 653-60.
12. Kalluri, R., *Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 422-33.
13. Hlatky, L., P. Hahnfeldt, and J. Folkman, *Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(12): p. 883-93.
14. Sawyers, C., *Targeted cancer therapy*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 294-7.
15. Schlingensiepen, K.-H., et al., *Antisense therapeutics for tumor treatment: The TGF-beta2 inhibitor AP 12009 in clinical development against malignant tumors*, in *Pancreatic cancer*, H. Riess, Editor. 2008, Springer Verlag: Berlin. p. 137-150.
16. Stieler, J., *Immunotherapeutic approaches in pancreatic cancer*, in *Pancreatic cancer*, H. Riess, Editor. 2008, Springer Verlag: Berlin. p. 164-177.
17. Heeger, S., *Targeted therapy of the epidermal growth factor receptor in the treatment of pancreatic cancer*, in *Pancreatic cancer*, H. Riess, Editor. 2008, Springer Verlag: Berlin. p. 131-136.
18. Stephan, S., et al., *Effect of rapamycin alone and in combination with antiangiogenesis therapy in an orthotopic model of human pancreatic cancer*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(20): p. 6993-7000.
19. Riess, H., *Antiangiogenic strategies in pancreatic cancer*, in *Pancreatic cancer*, H. Riess, Editor. 2008, Springer Verlag: Berlin. p. 123-129.
20. Saif, M.W., *Anti-angiogenesis therapy in pancreatic carcinoma*. JOP, 2006. **7**(2): p. 163-73.
21. Philip, P.A., *Targeting angiogenesis in pancreatic cancer*. Lancet, 2008. **371**(9630): p. 2062-4.



22. Birk, D., et al., *Current Insights on the Biology and Clinical Aspects of VEGF Regulation*. Vasc Endovascular Surg, 2008.
23. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 669-76.
24. Benjamin, L.E., et al., *Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal*. J Clin Invest, 1999. **103**(2): p. 159-65.
25. Niedergethmann, M., et al., *High expression of vascular endothelial growth factor predicts early recurrence and poor prognosis after curative resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas*. Pancreas, 2002. **25**(2): p. 122-9.
26. Seo, Y., et al., *High expression of vascular endothelial growth factor is associated with liver metastasis and a poor prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma*. Cancer, 2000. **88**(10): p. 2239-45.
27. Sehgal, S.N., *Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression*. Clin Biochem, 1998. **31**(5): p. 335-40.
28. Sehgal, S.N., *Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action*. Transplant Proc, 2003. **35**(3 Suppl): p. 7S-14S.
29. Bjornsti, M.A. and P.J. Houghton, *The TOR pathway: a target for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(5): p. 335-48.
30. A.G. Scientific, I. *Rapamycin, Sirolimus, RAPA, Rapamune*. 2008 [cited; Available from: <http://www.agscientific.com/Item/R1018.htm>].
31. *Rapamune Lösung - Gebrauchsinformation*. 2005, Wyeth Pharma GmbH. p. 3.
32. Dutcher, J.P., *Mammalian target of rapamycin inhibition*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(18 Pt 2): p. 6382S-7S.
33. Huber, S., et al., *Inhibition of the mammalian target of rapamycin impedes lymphangiogenesis*. Kidney Int, 2007. **71**(8): p. 771-7.
34. Gibbons, J., et al., *The effect of CCI-779, a novel macrolide antitumor agent, on the growth of human tumor cells in vitro and in nude mouse xenograft in vivo*. Proceedings of the american association for cancer research annual, 2000. **40**: p. 301.
35. Bruns, C.J., et al., *Rapamycin-induced endothelial cell death and tumor vessel thrombosis potentiate cytotoxic therapy against pancreatic cancer*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(6): p. 2109-19.
36. Finke, J., et al., *Where have all the T cells gone? Mechanisms of immune evasion by tumors*. Immunol Today, 1999. **20**(4): p. 158-60.
37. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
38. Wing, K., E. Suri-Payer, and A. Rudin, *CD4+CD25+-regulatory T cells from mouse to man*. Scand J Immunol, 2005. **62**(1): p. 1-15.
39. Mashino, K., et al., *Effective strategy of dendritic cell-based immunotherapy for advanced tumor-bearing hosts: the critical role of Th1-dominant immunity*. Mol Cancer Ther, 2002. **1**(10): p. 785-94.
40. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. 1986. J Immunol, 2005. **175**(1): p. 5-14.
41. Holländer, G.A., et al., *Zytokine und ihre Netzwerke*, in *Immunologie: Grundlagen für Klinik und Praxis*, G.A. Holländer, Editor. 2006, Urban und Fischer Verlag: München. p. 147-182.

42. van Horssen, R., T.L. Ten Hagen, and A.M. Eggermont, *TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility*. *Oncologist*, 2006. **11**(4): p. 397-408.
43. Khatib, A.M., et al., *Characterization of the host proinflammatory response to tumor cells during the initial stages of liver metastasis*. *Am J Pathol*, 2005. **167**(3): p. 749-59.
44. Beatty, G. and Y. Paterson, *IFN-gamma-dependent inhibition of tumor angiogenesis by tumor-infiltrating CD4+ T cells requires tumor responsiveness to IFN-gamma*. *J Immunol*, 2001. **166**(4): p. 2276-82.
45. Nishimura, T., et al., *Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo*. *J Exp Med*, 1999. **190**(5): p. 617-27.
46. O'Byrne, K.J. and A.G. Dalglish, *Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy*. *Br J Cancer*, 2001. **85**(4): p. 473-83.
47. Poch, B., et al., *Systemic immune dysfunction in pancreatic cancer patients*. *Langenbecks Arch Surg*, 2007. **392**(3): p. 353-8.
48. Holländer, G.A., et al., *Das T-Zell-System*, in *Immunologie: Grundlagen für Klinik und Praxis*, G.A. Holländer, Editor. 2006, Urban und Fischer Verlag: München. p. 82-131.
49. Beyer, M. and J.L. Schultze, *Regulatory T cells in cancer*. *Blood*, 2006. **108**(3): p. 804-11.
50. Damoiseaux, J., *Regulatory T cells: back to the future*. *Neth J Med*, 2006. **64**(1): p. 4-9.
51. Hori, S. and S. Sakaguchi, *Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells*. *Microbes Infect*, 2004. **6**(8): p. 745-51.
52. Basso, D. and M. Plebani, *Cytokines and exocrine pancreatic cancer: is there a link?* *JOP*, 2000. **1**(2): p. 19-23.
53. Truty, M.J. and R. Urrutia, *Basics of TGF-beta and pancreatic cancer*. *Pancreatology*, 2007. **7**(5-6): p. 423-35.
54. Bernstorff, W.V., et al., *Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand expression in normal pancreas and pancreatic tumors. Implications for immune privilege and immune escape*. *Cancer*, 2002. **94**(10): p. 2552-60.
55. Ohta, T., et al., *Fas ligand expression in human pancreatic cancer*. *Oncol Rep*, 2004. **12**(4): p. 749-54.
56. Collins, M., V. Ling, and B.M. Carreno, *The B7 family of immune-regulatory ligands*. *Genome Biol*, 2005. **6**(6): p. 223.
57. Yamazaki, T., et al., *Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC*. *J Immunol*, 2002. **169**(10): p. 5538-45.
58. Nomi, T., et al., *Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(7): p. 2151-7.
59. Zhang, Y., et al., *Regulation of T cell activation and tolerance by PDL2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(31): p. 11695-700.
60. Liu, X., et al. *B7DC/PDL2 promotes tumor immunity by a PD-1-independent mechanism*. *J Exp Med*, 2003. **197**(12):p. 1721-30.
61. Ohigashi, Y. et al., *Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(8): p:2947-53.
62. Wang, S. and L. Chen, *T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family*. *Cell Mol Immunol*, 2004. **1**(1): p. 37-42.
63. Seo, S.K., et al., *Co-inhibitory role of T-cell-associated B7-H1 and B7-DC in the T-cell immune response*. *Immunol Lett*, 2006. **102**(2): p. 222-8.

64. Nagaraj, S., et al., *Dendritic cells pulsed with alpha-galactosylceramide induce anti-tumor immunity against pancreatic cancer in vivo*. *Int Immunol*, 2006. **18**(8): p. 1279-83.
65. Tilton, R.G., et al., *Vascular dysfunction induced by elevated glucose levels in rats is mediated by vascular endothelial growth factor*. *J Clin Invest*, 1997. **99**(9): p. 2192-202.
66. Reinders, M.E., et al., *Proinflammatory functions of vascular endothelial growth factor in alloimmunity*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(11): p. 1655-65.
67. Tsuchihashi, S., et al., *Vascular endothelial growth factor antagonist modulates leukocyte trafficking and protects mouse livers against ischemia/reperfusion injury*. *Am J Pathol*, 2006. **168**(2): p. 695-705.
68. *RNeasy Mini protocol for isolation of total RNA from animal tissues*, in *RNeasy Mini Handbook*, Q. GmbH, Editor. 2001, Qiagen GmbH: Hilden. p. 50-55.
69. *Appendix C: Determination of PCR efficiency and quantification of gene expression levels*, in *QuantiTect SYBR Green PCR Handbook*, Q. GmbH, Editor. 2005, Qiagen GmbH: Hilden. p. 27-29.
70. Pfaffl, M.W., *Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung*. *BIOSpektrum*, 2004. **10**(1): p. 92-102.
71. Wilfingseder, D. and H. Stoiber, *Quantifizierung von PCR-Produktmengen durch real-time PCR-Verfahren*. *Antibiotika Monitor*, 2002. **18**(1/2).
72. Klein, D., *Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations*. *Trends Mol Med*, 2002. **8**(6): p. 257-60.
73. *Appendix G: Data Analysis*, in *QuantiTect SYBR Green Handbook*, Q. GmbH, Editor. 2005, Qiagen GmbH: Hilden. p. 32-37.
74. Bernard, P.S. and C.T. Wittwer, *Real-time PCR technology for cancer diagnostics*. *Clin Chem*, 2002. **48**(8): p. 1178-85.
75. Dorak, T.M. *Real-time PCR*. *Real-time PCR (Advanced Methods Series)* 2006 1 Sept 2008 [cited 2006; Available from: <http://www.dorak.info/genetics/realtime.html>].
76. Tukey, J.W., *Exploratory Data Analysis*. 1. ed. 1977, London: Addison Wesley.
77. Seeliger, H., et al., *Role of mTOR in solid tumor systems: a therapeutic target against primary tumor growth, metastases, and angiogenesis*. *Cancer Metastasis Rev*, 2007. **26**(3-4): p. 611-21.
78. Guba, M., et al., *Rapamycin induces tumor-specific thrombosis via tissue factor in the presence of VEGF*. *Blood*, 2005. **105**(11): p. 4463-9.
79. Fidler, I.J., et al., *Critical determinants of neoplastic angiogenesis*. *Cancer J*, 2000. **6 Suppl 3**: p. S225-36.
80. Epstein, R.J., *VEGF signaling inhibitors: more pro-apoptotic than anti-angiogenic*. *Cancer Metastasis Rev*, 2007. **26**(3-4): p. 443-52.
81. Bockhorn, M., et al., *Differential vascular and transcriptional responses to anti-vascular endothelial growth factor antibody in orthotopic human pancreatic cancer xenografts*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(11): p. 4221-6.
82. Bruns, C.J., et al., *Effect of the vascular endothelial growth factor receptor-2 antibody DC101 plus gemcitabine on growth, metastasis and angiogenesis of human pancreatic cancer growing orthotopically in nude mice*. *Int J Cancer*, 2002. **102**(2): p. 101-8.
83. Kim, K.J., et al., *Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo*. *Nature*, 1993. **362**(6423): p. 841-4.
84. Mancuso, M.R., et al., *Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(10): p.2610-21.

85. Kindler, H.L., et al., *Phase II trial of bevacizumab plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(31): p. 8033-40.
86. Nagy, J.A., et al., *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis*. J Exp Med, 2002. **196**(11): p. 1497-506.
87. Guba, M. et al., *Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor*. Nat Med, 2002. **8**(2): p. 128-35
88. Mocellin, S., et al., *Use of quantitative real-time PCR to determine immune cell density and cytokine gene profile in the tumor microenvironment*. J Immunol Methods, 2003. **280**(1-2): p. 1-11.
89. Hung, K., et al., *The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response*. J Exp Med, 1998. **188**(12): p. 2357-68.
90. Ademmer, K., et al., *Effector T lymphocyte subsets in human pancreatic cancer: detection of CD8+CD18+ cells and CD8+CD103+ cells by multi-epitope imaging*. Clin Exp Immunol, 1998. **112**(1): p. 21-6.
91. Emmrich, J., et al., *Immunohistochemical characterization of the pancreatic cellular infiltrate in normal pancreas, chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma*. Digestion, 1998. **59**(3): p. 192-8.
92. Wong, S.B., R. Bos, and L.A. Sherman, *Tumor-specific CD4+ T cells render the tumor environment permissive for infiltration by low-avidity CD8+ T cells*. J Immunol, 2008. **180**(5): p. 3122-31.
93. Linehan, D.C. and P.S. Goedegebuure, *CD25+ CD4+ regulatory T-cells in cancer*. Immunol Res, 2005. **32**(1-3): p. 155-68.
94. Viehl, C.T., et al., *Depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells promotes a tumor-specific immune response in pancreas cancer-bearing mice*. Ann Surg Oncol, 2006. **13**(9): p. 1252-8.
95. Karanikas, V., et al., *Foxp3 expression in human cancer cells*. J Transl Med, 2008. **6**: p. 19.
96. Hinz, S., et al., *Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(17): p. 8344-50.
97. Yan, B., et al., *Tumor necrosis factor-alpha is a potent endogenous mutagen that promotes cellular transformation*. Cancer Res, 2006. **66**(24): p. 11565-70.
98. Egberts, J.H., et al., *Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis*. Cancer Res, 2008. **68**(5): p. 1143-50.
99. Bellone, G., et al., *Cooperative induction of a tolerogenic dendritic cell phenotype by cytokines secreted by pancreatic carcinoma cells*. J Immunol, 2006. **177**(5): p. 3448-60.
100. Loos, M., et al., *Clinical significance and regulation of the costimulatory molecule B7-H1 in pancreatic cancer*. Cancer Lett, 2008. **268**(1): p. 98-109.
101. Iwai, Y., et al., *Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12293-7.
102. Radhakrishnan, S., et al., *Immunotherapeutic potential of B7-DC (PD-L2) cross-linking antibody in conferring antitumor immunity*. Cancer Res, 2004. **64**(14): p. 4965-72.
103. Garcea, G., et al., *Molecular prognostic markers in pancreatic cancer: a systematic review*. Eur J Cancer, 2005. **41**(15): p. 2213-36.
104. Wojtowicz-Praga, S., *Reversal of tumor-induced immunosuppression by TGF-beta inhibitors*. Invest New Drugs, 2003. **21**(1): p. 21-32.

105. Taipale, J., J. Saharinen, and J. Keski-Oja, *Extracellular matrix-associated transforming growth factor-beta: role in cancer cell growth and invasion*. *Adv Cancer Res*, 1998. **75**: p. 87-134.
106. Elliott, R.L. and G.C. Blobe, *Role of transforming growth factor Beta in human cancer*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(9): p. 2078-93.
107. Wong, H.H. and N.R. Lemoine, *Biological approaches to therapy of pancreatic cancer*. *Pancreatology*, 2008. **8**(4-5): p. 431-61.
108. Laheru, D. and E.M. Jaffee, *Immunotherapy for pancreatic cancer - science driving clinical progress*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(6): p. 459-67.
109. Wagner, K., et al., *The targeted immunocytokine L19-IL2 efficiently inhibits the growth of orthotopic pancreatic cancer*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(15): p. 4951-60.
110. Teicher, B.A., *Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(21): p. 6247-51.

## 9 Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Darstellung charakteristischer Tumoreigenschaften.....	4
Abbildung 2: Ausbildung neuer Blutgefäße; aus [10]. .....	7
Abbildung 3: Chemische Struktur von Rapamycin; aus [28] .....	13
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Einfachfärbung mit dem Enzym-Substrat-Komplex bestehend aus Primär- und HRP-konjugiertem Sekundärantikörper .....	38
Abbildung 5: Darstellung der mittleren Überlebenszeit der Tiere in den Gruppen A-J.....	42
Abbildung 6: Rapamycinöl-Ablagerungen in der Leber eines mit Rapamycin behandelten Tieres .....	43
Abbildung 7: Vergleich des Tumorbefalls in der Leber.....	44
Abbildung 8: Darstellung der Genexpression von CD4 in der Milz von Tieren der Gruppen A-J. ....	46
Abbildung 9: Darstellung der Genexpression von CD4 in der Leber von Tieren der Gruppen A-J.....	47
Abbildung 10: Darstellung der Genexpression von CD4 im Tumor von Tieren der Gruppen A-J. ....	48
Abbildung 11: Darstellung der Genexpression von CD8 $\alpha$ in der Milz von Tieren der Gruppen A-J.....	49
Abbildung 12: Darstellung der Genexpression von CD8 $\alpha$ in der Leber von Tieren der Gruppen A-J.....	50
Abbildung 13: Darstellung der Genexpression von CD25 in der Milz von Tieren der Gruppen A-J.....	51
Abbildung 14: Darstellung der Genexpression von CD25 in der Leber von Tieren der Gruppen A-J.....	52
Abbildung 15: Darstellung der Genexpression von CD25 im Tumor von Tieren der Gruppen A-J.....	53
Abbildung 16: Darstellung der Genexpression von Foxp3 in der Milz von Tieren der Gruppen A-J.....	54
Abbildung 17: Darstellung der Genexpression von Foxp3 in der Leber von Tieren der Gruppen A-J.....	55

Abbildung 18: Repräsentative immunhistochemische Darstellung der Foxp3-Expression im Tumor.....	56
Abbildung 19: Darstellung der immunhistologisch positiv markierten Zellen für Foxp3 im Tumor von Tieren der Gruppen A-J.....	57
Abbildung 20: Darstellung der Genexpression von IL-2 in der Leber von Tieren der Gruppen A-J.....	58
Abbildung 21: Darstellung der Genexpression von TNF $\alpha$ in der Milz von Tieren der Gruppen A-J.....	59
Abbildung 22: Darstellung der Genexpression von TNF- $\alpha$ in der Leber von Tieren der Gruppen A-J.....	60
Abbildung 23: Darstellung der Genexpression von TNF- $\alpha$ im Tumor von Tieren der Gruppen A-J.....	61
Abbildung 24: Repräsentative immunhistochemische Darstellung der TNF- $\alpha$ -Expression im Tumor.....	62
Abbildung 25: Darstellung der immunhistologisch positiv markierten Zellen für TNF- $\alpha$ im Tumor von Tieren der Gruppen A-J.....	63
Abbildung 26: Darstellung der Genexpression von B7-H1 (PD-L1) in der Milz von Tieren der Gruppen A-J.....	64
Abbildung 27: Darstellung der Genexpression von B7-H1 (PD-L1) in der Leber von Tieren der Gruppen A-J.....	65
Abbildung 28: Repräsentative immunhistochemische Darstellung der B7-H1 (PD-L1)-Expression im Tumor.....	66
Abbildung 29: Darstellung der immunhistologisch positiv markierten Zellen für B7-H1 (PD-L1) im Tumor von Tieren der Gruppen A-J.....	67
Abbildung 30: Darstellung der Genexpression von PD-L2 in der Milz von Tieren der Gruppen A-J.....	68
Abbildung 31: Darstellung der Genexpression von PD-L2 in der Leber von Tieren der Gruppen A-J.....	68
Abbildung 32: Darstellung der immunhistologisch positiv markierten Zellen für PD-L2 im Tumor von Tieren der Gruppen A-J.....	69
Abbildung 33: Darstellung der Genexpression von PD-1 in der Milz von Tieren der Gruppen A-J.....	70

Abbildung 34: Darstellung der Genexpression von PD-1 in der Leber von Tieren der Gruppen A-J.....	70
Abbildung 35: Darstellung der Genexpression von PD-1 im Tumor von Tieren der Gruppen A-J.....	71
Abbildung 36: Darstellung der Genexpression von TGF- $\beta$ in der Milz von Tieren der Gruppen A-J.....	72
Abbildung 37: Darstellung der Genexpression von TGF- $\beta$ in der Leber von Tieren der Gruppen A-J.....	73
Abbildung 38: Repräsentative immunhistochemische Darstellung der TGF- $\beta$ -Expression im Tumor.....	74
Abbildung 39: Darstellung der immunhistologisch positiv markierten Zellen für TGF- $\beta$ im Tumor von Tieren der Gruppen A-J.....	75
Abbildung 40: Darstellung der Genexpression von VEGF in der Milz von Tieren der Gruppen A-J.....	76
Abbildung 41: Darstellung der Genexpression von VEGF im Tumor von Tieren der Gruppen A-J.....	76



## 10 Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: TNM-Klassifikation exokriner Pankreastumore [3].....	2
Tabelle 2: Stadieneinteilung und Prognose des exokrinen Pankreaskarzinoms [3].....	3
Tabelle 3: Angiogenese-Inhibitoren und ihr Mechanismus, nach Bian et al. [9] .....	10
Tabelle 4: Darstellung der sieben Gruppen im Versuchsansatz 1 .....	28
Tabelle 5: Darstellung der vier Gruppen im Versuchsansatz 2 .....	29
Tabelle 6: Darstellung der zwei Gruppen im Versuchsansatz 3 .....	29
Tabelle 7: Übersicht über die Sequenzen der Primer, die von der Firma MWG-Biotech AG bezogen wurden.....	33
Tabelle 8: Übersicht über die von der Firma Qiagen bezogenen Primer .....	34
Tabelle 9: Reaktionsansatz der Real-Time PCR jeweils für Biotech- und Qiagen-Primer .....	34
Tabelle 10: Übersicht über die in der Immunhistologie verwendeten Primärantikörper mit Angaben zu Verdünnung und Hersteller der Antikörper.....	39
Tabelle 11: Übersicht über die in der Immunhistologie verwendeten Sekundärantikörper mit Angaben zu Verdünnung und Hersteller der Antikörper.....	39
Tabelle 12: Immunhistochemisches Auswertungsschema.....	40
Tabelle 13: Übersicht der mittleren Überlebenszeit der Gruppen A-J in den Versuchsansätzen 1-3 .....	41
Tabelle 14: Darstellung des Tumorbefalls sowohl in der Leber als auch intraabdominell und des Lebervolumens in den Gruppen A-J in den drei Versuchsreihen.....	45

---

## Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Professor Dr. med. Germer, dem Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg, dass er mir die Durchführung des praktischen Teils dieser Arbeit im Labor ermöglichte.

Außerordentlich möchte ich Frau Professor Dr. Waaga-Gasser für Ihre umfassende Unterstützung und Ihre Anleitung zum selbstständigen wissenschaftlichen Arbeiten danken. Sie hatte stets ein offenes Ohr für jegliche Fragen und stand mir nicht nur in fachlichen Belangen immer mit Rat und Tat zur Seite.

Herrn PD Dr. med Gasser danke ich für die enorme Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit, die ohne seine tatkräftige Unterstützung und seine hilfreichen Anregungen nicht möglich gewesen wäre. Ebenfalls sehr herzlich danke ich Herrn Dr. med. dent. Grimm und Frau Dragan für ihre Unterstützung und wertvollen Hinweise den immunhistologischen Teil meiner Arbeit betreffend. Des Weiteren gilt mein Dank dem gesamten Team der Molekularen Onkoimmunologie, insbesondere Frau Müller, Frau Trumpfheller und Frau Dr. rer. nat. Nichiporuk, die mich ausführlich in die Abläufe im Labor einarbeiteten.

Mein besonderer Dank gilt meinen lieben Eltern, die mich im Lauf der Arbeit immer ermutigten und mich stets unterstützten. Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Schwester Irene für ihre aufmunternden Worte und ihre wertvollen Tipps bei der Gestaltung meiner Doktorarbeit bedanken.