

Aus der Abteilung für
Gastroenterologie der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. S. Liebe

Analyse zum antitumoralen Potential eines attenuierten Bakteriums & eines bakteriellen Lysates von *S. pyogenes* im experimentellen Modell des Pankreaskarzinoms

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der medizinischen Fakultät
der Universität Rostock



vorgelegt von:
Franziska Charrier
aus Frankfurt am Main

Rostock im November 2008

Verteidigung am 1. Dezember 2009

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Jörg Emmrich, Abteilung für Gastroenterologie, Zentrum für Innere Medizin, Klinik II, Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Ernst Klar, Leiter der Abteilung für Allgemeine Chirurgie, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie, Chirurgische Klinik und Poliklinik, Universität Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Walter Halangk, Leiter der experimentellen operativen Medizin, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Pankreaskarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Risikofaktoren	1
1.1.3	Pathogenese	1
1.1.4	Symptome und Diagnostik	3
1.1.5	Therapie	4
1.2	Tumorimmuntherapie	5
1.2.1	Passive Immuntherapie	6
1.2.2	Aktive Immuntherapie	7
1.2.2.1	Aktive spezifische Immuntherapie	7
1.2.2.2	Aktive unspezifische Immuntherapie	8
1.2.2.3	Bakterielle Immuntherapie	9
1.3	Streptococcus pyogenes	12
1.3.1	SLS ⁻ Mutante	12
1.3.2	Bakteriophagenlysin PlyC1	13
1.4	Vorarbeiten zur bakteriellen Immuntherapie mit <i>S. pyogenes</i>	13
1.5	Zielstellung	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Versuchstiere und Tierhaltung	15
2.2	Tiermodell	15
2.3	Anästhesie, Präparation und Gewebeasservierung	15
2.4	Experimentelles Protokoll	16
2.4.1	Versuchsgruppen und Versuchsablauf	17
2.5	Mikrobiologie	18
2.5.1	Bakterien	18
2.5.2	Bakteriophagenlysin C1	18
2.5.3	Herstellung der SLS ⁻ Bakterieninjektates	18
2.5.4	Gewebe- und Blutaussstriche auf Agarplatten	18
2.5.5	Herstellung des Lysates von <i>S. pyogenes</i> M49	19
2.5.6	Nachweis der Bakterienlyse	19
2.6	Zellbiologie	19
2.6.1	Panc02 Zellen	19
2.6.2	Zellarbeiten (Zellen auftauen/ passagieren/ einfrieren/ zählen)	20
2.6.3	Herstellen des Panc02 Injektates	21
2.6.4	Lymphozytenisolierung aus der Milz	22
2.6.5	Durchflusszytometrie	22
2.6.6	Durchflusszytometrische Analyse von Splenozyten	24
2.7	Vollblutanalyse	24
2.7.1	Hämatologische Parameter (Blutbildanalyse)	24
2.7.2	Differentialblutbild	24
2.7.2.1	Herstellung und Färbung	24
2.7.2.2	Manuelle Blutbildauszählung	25
2.7.3	Durchflusszytometrische Analyse aus Vollblut	25

2.8	Histologie	25
2.8.1	Kryokonservierung: Herstellung und Aufbewahrung von Gefrierschnitten	25
2.8.2	HE-Färbung	25
2.8.3	Granulozytennachweis mittels Naphtol-As-D Färbung	26
2.9	Immunhistochemie	26
2.9.1	ABC Methode	26
2.9.2	Nachweis von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	27
2.10	Statistik	27
3	Ergebnisse	28
3.1	Überleben	28
3.2	Wachstumsverlauf der Tumore	28
3.3	Untersuchungsergebnisse zur systemischen Auswirkung der Therapien	31
3.3.1	Blutbildanalyse	31
3.3.2	Differentialblutbildanalyse	34
3.3.3	Organbefunde	37
3.3.4	Blut- und Organausstriche zum Nachweis einer systemischen Infektion	38
3.3.5	Durchflusszytometrische Analysen der Effektorzellen	38
3.3.5.1	Analyse unspezifischer Effektorzellen aus Splenozyten	40
3.3.5.2	Analyse unspezifischer Effektorzellen aus Blutleukozyten	42
3.3.5.3	Analyse spezifischer Effektorzellen aus Splenozyten	46
3.3.5.4	Analyse spezifischer Effektorzellen aus Blutleukozyten	51
3.3.5.5	Analyse des Proliferations- und Eisenstoffwechsels markers CD71 bei den Splenozyten	54
3.3.5.6	Analyse von Adhäsionsmolekülen bei Effektorzellen der Splenozyten	57
3.4	Untersuchungen zum lokalen Effekt der Therapien	59
3.4.1	Histologie	59
3.4.2	Immunhistologie	61
4	Diskussion	63
4.1	Diskussion des Tiermodells	63
4.2	Diskussion des Therapieansatzes	65
4.3	Diskussion der Ergebnisse	67
4.3.1	Rolle des Streptolysins S	68
4.3.2	Induktion eines spezifischen antitumoralen Effektes nach immuntherapeutischer Intervention	69
4.3.3	Bedeutung der Applikationsart	71
4.3.4	Bedeutung der Vitalität der Bakterien	72
4.4	Weiterführende Untersuchungen	76
5	Zusammenfassung	78

6	Anhang	I
6.1	Verwendete Chemikalien	I
6.2	Geräte und Hilfsmittel	I
6.3	Antikörper	II
	6.3.1 FACS	II
	6.3.2 Immunhistologie	III
6.4	Media, Agar	III
6.5	Puffer und Lösungen	III
	6.5.1 Allgemein	III
	6.5.2 FACS	IV
	6.5.3 Histologie	IV
	6.5.3.1 HE Färbung	IV
	6.5.3.2 As-D Färbung	IV
6.5.4	Immunhistochemie	IV
7	Abkürzungsverzeichnis	A
8	Literaturverzeichnis	B
9	Danksagung	C
10	Referenzen	D
11	Curriculum vitae	E
12	Thesen	F
	Eidesstattliche Erklärung	

1 Einleitung

1.1 Pankreaskarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Pankreaskarzinom zählt zu den Malignomen mit äußerst schlechter Prognose. Die relative 5 Jahres-Überlebensrate liegt bei 4-5 % und die mittlere Überlebenszeit nach Diagnose bei 3-6 Monaten. In Deutschland wird die Inzidenz auf 6000 bzw. 6600 (Männer bzw. Frauen) Neuerkrankungen pro Jahr geschätzt und stimmt nahezu mit der Mortalität von 6100 bzw. 6700 Todesfällen pro Jahr überein (Schneider et al. 2003, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V./Robert Koch Institut (GEKID/RKI) 2006). Obwohl es in Bezug auf die Häufigkeit mit 3 % aller neu auftretenden Malignome lediglich auf Platz 8 bzw. 9 der Krebserkrankungen steht, ist es die viert- bis fünfhäufigste malignombedingte Todesursache (GEKID/RKI 2006) und hat von allen Karzinomen die höchste Mortalitätsrate (Saur et al. 2006). Seine Häufigkeit nimmt exponentiell mit dem Alter zu und weist ein mittleres Erkrankungsalter von 68 bzw. 76 Jahren auf (GEKID/RKI I 2006).

1.1.2 Risikofaktoren

Als Risikofaktoren des Pankreaskarzinoms sind eine chronische Pankreatitis, Nikotin, Diabetes mellitus (Everhart und Wright 1995) fettreiche Ernährung sowie berufliche Exposition gegen Noxen wie Acrylamid oder Cadmium bekannt. Eine direkte Assoziation zu Alkohol wird kontrovers diskutiert (Löhr et al. 2003, Saur et al. 2006). Des Weiteren gibt es hereditäre Risikofaktoren, die jedoch nur für einen kleinen Teil des Patientengutes verantwortlich sind. Hierzu zählen u.a. die hereditäre Pankreatitis, die zystische Fibrose, das FAMMM-Syndrom, das FAP-Syndrom, das HNPCC-Syndrom, das Peutz-Jegher-Syndrom, sowie BRCA2 Gen Keimbahnmutationen (Zalatnai 2006).

1.1.3 Pathogenese

Histologisch lassen sich verschiedene Formen des Pankreaskarzinoms unterscheiden, wobei die Neoplasien im exokrinen Pankreasanteil mit 95 % überwiegen. Das duktales Adenokarzinom stellt hierbei mit über 80 % die häufigste Form dar und ist in 70 % der Fälle im Pankreaskopf lokalisiert (Löhr et al. 2003).

Als Konzept für die Pathogenese des duktales Pankreaskarzinoms dient derzeit das Progressionsmodell (Abb. 1) der pankreatischen intraepithelialen Neoplasie (PanIN) I-III (Takaori et al. 2004). Als PanINs werden hyperplastisch-dysplastisch, papilläre Läsionen des

Gangepithels bezeichnet, die mit zunehmendem PanIN Grad auch eine Akkumulation von genetischen Alterationen aufweisen.

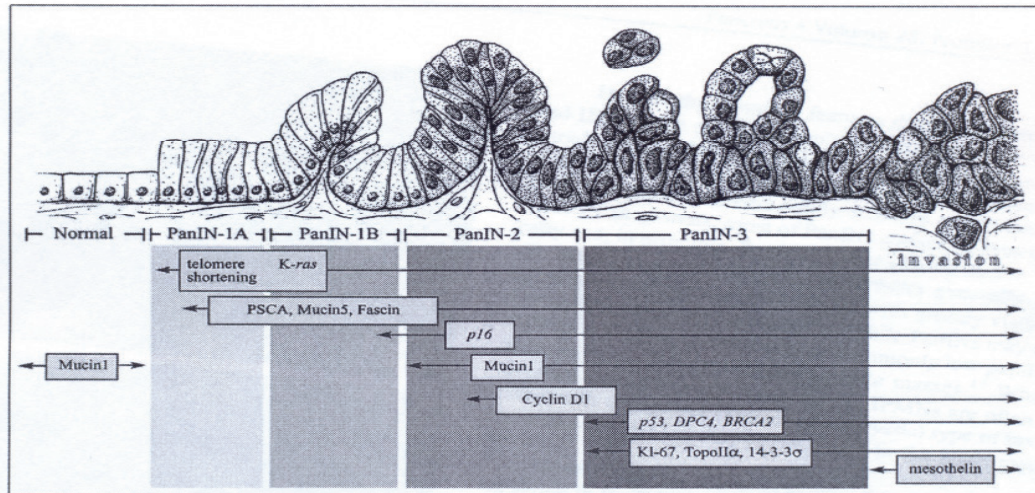


Abb. 1

Tumorprogressionsmodell des Pankreaskarzinoms. Schematische Darstellung der PanIN Läsionen und der akkumulierenden genetischen Alterationen bei zunehmenden PanIN Grad. Aus „Pancreatic Intraepithelial Neoplasia“, Takaori et al. 2004

Zu dem mittlerweile gut bekannten und relativ spezifischen Mutationsspektrum zählen u.a. Mutationen des Protoonkogens K-ras, der Tumorsuppressorgene INK4a, p16, p53 und DPC4, sowie epigenetische Veränderungen von Wachstumsfaktoren bzw. -rezeptoren (Überexpressionen von Transforming growth factor- β (TGF- β), vascular endothelial growth factor (VEGF), epidermal growth factor receptor (EGFR), Herceptin (HER2) u.a.) und Matrixmetalloproteinasen (Schneider et al. 2003, Löhr et al. 2003, Takaori et al. 2004, Schneider et al. 2005). Diese komplexe und aggressive Tumorbilogie trägt bedeutend zur schlechten Prognose und schweren Therapierbarkeit des Tumors bei. Mittlerweile geht man jedoch davon aus, dass nicht nur die genetische Veränderung, sondern auch die Fibrose eine wichtige Rolle in der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms spielt. Der bindegewebige Anteil im Pankreaskarzinom ist markant höher als im gesunden Pankreasgewebe (Imamura et al. 1995) und die Karzinomzellen sind nur als kleine Nester im fibrotischen Gewebe eingebettet. Die massive Synthese der extrazellulären Matrix (EZM) erfolgt dabei vor allem durch Stromazellen, obwohl auch schon gezeigt wurde, dass die Karzinomzellen selbst Komponenten der EZM synthetisieren können (Löhr et al. 1994). Die Stromazellen beinhalten nicht nur Fibroblasten, sondern auch sogenannte pankreatische Sternzellen (PSZ), welche eine entscheidende Rolle in der Organfibrose spielen. PSZ sind myofibroblastoide Zellen, die den Kupfferschen Sternzellen der Leber sehr ähnlich sind (Bachem et al. 1998, Apte et al. 1998). Durch Entzündungsreize und Zellläsionen können sie zur Proliferation und Differenzierung aktiviert werden, woraufhin sie EZM Proteine (ins-

besondere Kollagene, Fibronectin) synthetisieren und vermutlich entscheidend zur Fibrose beitragen (Bachem et al. 2005). Erst kürzlich konnten aktivierte PSZ in fibrotischen Arealen von Pankreaskarzinomgewebe nachgewiesen werden (Apte et al. 2004) und die Arbeitsgruppe um Bachem konnte zeigen, dass PSZ nach parakriner Stimulation durch Karzinomzellen stark zum Tumorwachstum beitragen (Bachem et al. 2005). Eine besonders wichtige Rolle bei der Stimulation spielt hierbei das TGF- β . Beim Pankreaskarzinom stimuliert es die PSZ zur Differenzierung in den myofibroblastären Phänotyp und zur Produktion von EZM und wirkt dadurch im Sinne der Tumorprogression. Verschiedene Untersuchungen haben belegt, dass die Überlebensrate direkt mit der Ausprägung der Fibrose korreliert und der Fibrosegrad somit als prognostischer Faktor gelten kann (Watanabe et al. 2003). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Interaktion zwischen Fibroblasten und Pankreaskarzinomzellen zur Resistenz gegenüber Chemotherapeutika beitragen kann (Muerköster et al. 2004). Dabei schützen vermutlich EZM Proteine die Krebszellen gegen Apoptose und verhelfen ihnen so zu einem beschleunigten Wachstum (Gress et al. 1998).

Für TGF- β , dessen erhöhtes Vorkommen bei der chronischen Pankreatitis und dem Pankreaskarzinom schon mehrfach nachgewiesen wurde (van Laethem et al. 1996, Gress et al. 1998), sind neben der bereits erwähnten Stimulation von PSZ noch weitere Mechanismen bekannt, welche die Tumorprogredivenz im Pankreaskarzinom begünstigen. So übt TGF- β einerseits eine immunsupprimierende Wirkung aus und andererseits versagt seine wachstumshemmende Funktion im Pankreaskarzinom. Denn an den Karzinomzellen selbst kann TGF- β seine wachstumshemmende Wirkung oft nicht mehr ausüben, da zu den häufigen genetischen Alterationen im Pankreaskarzinom auch eine Mutation im TGF- β Signaltransduktionsweg gehört (Massague et al. 2000).

1.1.4 Symptome und Diagnostik

Das Pankreaskarzinom zeigt keine frühen oder spezifischen Symptome, was dazu führt, dass die Diagnosestellung zumeist erst in einem bereits fortgeschrittenen Stadium des Tumors erfolgt. Die Symptome bei der Diagnosestellung sind meist Oberbauchschmerzen, Inappetenz, Gewichtsverlust und bei Prozessen im Bereich des Pankreaskopfes ein schmerzloser Verschlussikterus, welcher in einigen Fällen zu einer früheren Diagnose führen und die Chance auf eine kurative Therapie erhöhen kann. Therapiestudien zufolge sind Schmerzen ein führendes Symptom, das bei 80 % der Patienten festgestellt werden kann (Hochster et al. 2006). Diagnostisch zur Anwendung kommen der perkutane Ultraschall, die Computertomographie, der endosonographische Ultraschall (gegebenenfalls mit Punktion des Geschwürs), sowie in unklaren Fällen die endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie (insbesondere bei tumorbedingter Gallengangsobstruktion, um diese

zugleich interventionell therapieren zu können), die Magnetresonanztomographie und eine diagnostische Laparoskopie. Tumormarker spielen eine untergeordnete Rolle (Saur et al. 2006).

1.1.5 Therapie

Die gegenwärtig einzige Option für eine Heilung oder zumindest deutliche Verlängerung der Überlebenszeit ist die kurative Resektion (= Pankreatikoduodenektomie), die jedoch auf Grund der späten Diagnosestellung nur in 15-35 % der chirurgischen Erstvorstellungen aller Pankreaskopfkarzinome in Frage kommt (Trede et al. 2001, Lühr et al. 2003, Saur et al. 2006) und eine hohe Hospitalisationsrate mit sich bringt (Gudjonsson 1987). Alle anderen Patienten weisen ein bereits lokal zu weit fortgeschrittenes oder metastasiertes Stadium auf. Bei den resektablen Patienten ist jedoch nur bei 10-60 % eine R0-Resektion erreichbar und selbst nach einer solchen R0-Resektion beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate nur 20-30 % (Trede et al. 2001, Richter et al. 2003, Saur et al. 2006). Die Ursache hierfür liegt in der hohen Rezidivrate, die vermutlich aus bereits bei der Operation vorliegenden Metastasen resultiert (Richter et al. 2003, Saur et al. 2006). Als zusätzliche adjuvante Therapie und als Therapie für Patienten mit bereits metastasiertem Pankreaskarzinom steht derzeit die Chemotherapie mit dem Antimetabolit Gemcitabin (Difluorodesoxycytidin) als Standardtherapie zur Verfügung. Gemcitabin weist gegenüber 5-Fluorouracil (5-FU), welches bis 1997 das Chemotherapeutikum der Wahl darstellte, bessere Ergebnisse bezüglich der Lebensqualität und der medianen Überlebenszeit auf (Hochster et al. 2006). Verschiedene Kombinationen von Gemcitabin mit anderen zytotoxischen (Capecitabin, Oxaliplatin) oder biologischen Substanzen, wie z.B. Erlotinib (EGFR Tyrosinkinase Inhibitor), Cetuximab (monoklonaler EGFR AK) und Bevacicumab (monoklonaler VEGF AK) werden zurzeit in klinischen Studien getestet. Hierbei wies die Kombination mit Erlotinib gegenüber der Standardmonotherapie mit Gemcitabin einen Überlebensvorteil für Patienten auf, eine Verbesserung der Lebensqualität konnte bislang jedoch nicht beobachtet werden (Hochster et al. 2006). Eine Kombinationstherapie von Gemcitabin mit Capecitabin (5-FU prodrug) wies in einer klinischen Studie eine signifikante Lebenszeitverlängerung auf, diese belief sich jedoch nur auf 1,5 Monate (Saur et al. 2006).

Bei allen Chemotherapien und laufenden Studien wurde bisher lediglich eine mediane Überlebenszeit von 5-10 Monaten erreicht (Hochster et al. 2006). Eine weitere Therapiemöglichkeit ist die Radiochemotherapie, die jedoch sehr kontrovers diskutiert wird, da ihr Nutzen fraglich erscheint und ihre Nebenwirkungen schwerwiegend sind. In den USA ist diese Art der adjuvanten Therapie auf Grund älterer Studien weit verbreitet. Eine Studie der European Study Group for Pancreatic Cancer (ESPAC 1 Studie) erbrachte jedoch widersprüchliche Ergebnisse bzw. sogar negative Effekte der Radiochemotherapie gegenüber

der alleinigen Chemotherapie. Daher wird die Radiochemotherapie in Europa nur noch selten angewandt (Hopt 2006).

Des Weiteren spielen aufgrund der schlechten Prognose palliative Therapiemassnahmen wie Stenteinlagen bei Gallenwegverschlüssen, sowie eine suffiziente Schmerztherapie und alimentäre Unterstützung eine bedeutende Rolle (Saur et al. 2006).

1.2 Tumorimmuntherapie

Das Problem von unkontrolliertem Tumorwachstum ist insbesondere die Insuffizienz des Immunsystems, den Tumor zu erkennen und zu eliminieren. Erkenntnisse der letzten Jahre haben gezeigt, dass Tumoren bestimmte Peptide auf MHC-Klasse I Molekülen als tumorspezifische Antigene (TSA) oder oft mit Tumoren assoziierte Antigene (TAA) präsentieren, die sie von normalen Körperzellen unterscheiden. Dies können z.B. mutierte Proteine oder Antigene (AG) sein, die von reaktivierten embryonalen Genen exprimiert werden und auf adulten Zellen normalerweise nicht mehr zu finden sind. Darüber hinaus können die Tumorzellen auch aufgrund einer Überexpression normaler Proteine und der damit einhergehenden Antigenexpressionsdichte von normalen Körperzellen unterschieden werden. Da diese Expressionsmuster tumortypisch sind, stellen sie einen guten Angriffspunkt für eine gezielte Therapie dar (Pezzutto 1998). Es ist jedoch auch bekannt, dass die meisten Tumoren nicht immunogen sind und sich der Immunabwehr entziehen können (Pezzutto 1998) was auch für das Pankreaskarzinom zutrifft. Die Zusammenhänge hierfür sind zwar noch nicht vollständig geklärt, viele sogenannter Tumorescapemechanismen sind jedoch bekannt. So ist bei einigen Tumoren die Expression der MHC-Klasse I Moleküle herunterreguliert oder ihre AG sind durch Glykokalix Moleküle maskiert und können daher nicht mehr von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden. Andere Tumorzellen exprimieren keine Adhäsionsmoleküle oder kostimulierenden Proteine mehr, die zur Aktivierung der T-Zellen notwendig sind. Weitere Escapemechanismen bestehen darin, dass Tumorzellen in der Lage sind, Antikörper zu deaktivieren bzw. zu internalisieren, sobald diese andocken, oder immunsuppressive Transmitter wie TGF- β und Interleukin-10 (IL-10) zu sezernieren (Janeway et al. 1999, Abbas et Lichtmann 2005).

Auch beim Pankreaskarzinom ist bekannt, dass MHC-Klasse I Moleküle auf der Oberfläche der Tumorzellen herunterreguliert sind und diese auch TGF- β und IL-10 sezernieren können. Des Weiteren wurden regulatorische CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ T-Zellen (Treg), die ebenfalls durch IL-10 und TGF- β Produktion immunsuppressiv wirken, im Tumormilieu gefunden (Mukherjee et al. 2001). Die Funktion von Treg besteht normalerweise darin, eine immunologische Homöostase aufrecht zu erhalten und Autoimmunkrankheiten zu verhindern. Sie sind in der Lage, aktivierte T-Zellen (CD4⁺, CD8⁺) sowie die NK-Zellen zu supprimieren und die INF- γ und IL-2 Produktion zu inhibieren. Beim Pankreaskarzinom konnte gezeigt wer-

den, dass ein erhöhtes Vorkommen von Treg im Tumor mit einer schlechteren Prognose der Erkrankten korreliert (Hiraoka et al. 2006). Als weiterer Escapemechanismus ist der erst vor kurzem von der Arbeitsgruppe um Märten beschriebene Antigen shift bekannt. Märten et al. konnten zeigen, dass bestimmte an MHC-Klasse I Moleküle gebundene Peptide, die bei Stress und einigen gastrointestinalen Tumoren hochreguliert werden, bei Patienten mit Pankreaskarzinom vermehrt als lösliche Form in das Serum abgegeben werden und in diesem Zustand die zelluläre Zytotoxizität (NK- und T-Zellen) hemmen (Märten et al. 2006). Um diese Escapemechanismen zu überwinden und die Immunogenität der Tumoren zu erhöhen, sind verschiedene Formen der Immuntherapie entwickelt worden, bzw. befinden sich noch in der Entwicklung. Dabei ist das Ziel der Immuntherapie, die körpereigene Immunantwort gegen den Tumor zu stärken (aktiv) oder durch Antikörper das Immunsystem zu unterstützen (passiv). Man unterscheidet daher die aktive und die passive Immuntherapie (Laheru et Yeo 2001, Staib et al. 1999, Abbas et Lichtmann 2005). Da sie spezifisch auf die Tumorzellen abzielt, weist die Immuntherapie minimale nichtspezifische Toxizität auf. Diese Therapieform kann daher entweder adjuvant zur chirurgischen, chemo- oder radiotherapeutischen Behandlung angewandt werden, um das Überleben und die Lebensqualität der Patienten zu verbessern oder neoadjuvant zur Tumorlastreduktion eingesetzt werden, um wieder einen operablen Status und somit sogar eine potentielle Heilung zu erreichen.

1.2.1. Passive Immuntherapie

Die passive Immuntherapie beruht vor allem auf der Verwendung von markierten (gekoppelt an radioaktive oder an toxische Substanzen) oder unmarkierten monoklonalen Antikörpern (AK), die gegen spezifische Tumorantigene gerichtet sind. Der Vorteil hierbei ist, dass durch die Spezifität der AK gegen Tumorzellen systemische Nebenwirkungen minimiert werden können. Der Nachteil zeigt sich allerdings in dem Mangel einer aktiven nachhaltigen Immunreaktion im Sinne einer T-Zellaktivierung und der Synthese von Memory T-Zellen, sowie bei der Tumorerheterogenität. So ist einerseits die Möglichkeit der sofortigen Reaktion des Immunsystems beim Auftreten eines Rezidivs nicht gegeben und andererseits kann es durch die Heterogenität der Tumorzellen zu einer insuffizienten Eliminierung und somit positiver Selektion derjenigen Tumorzellen kommen, welche die bekämpften AG noch nicht oder nicht mehr exprimieren. Beim Pankreaskarzinom gibt es bisher Studien, welche Therapien gegen tumorspezifische AG untersuchten (Nishihara et al. 2000, Nielsen et al. 2000, Staib et al. 2001). So werden gegenwärtig z.B. AK gegen TAA wie Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren eingesetzt. Der Nachteil dieser Variante ist jedoch, dass die Wachstumsfaktoren bzw. -rezeptoren zwar stark erhöht, jedoch nicht ausschließlich auf den Tumorzellen exprimiert werden und somit stärkere Nebenwirkungen hervorgerufen

werden können. Studien hierzu wurden bzw. werden noch mit Cetuximab und Bevacizumab durchgeführt. Als adjuvante Therapie zur Chemotherapie mit Gemcitabin zeigten sich bislang tendenziell längere mediane Überlebenszeiten (Hochster et al. 2006). Fortführende klinische Studien müssen jedoch noch folgen.

Eine weitere Form der passiven Immuntherapie ist die adoptive Immuntherapie, welche auf dem Transfer von immunaktiven Zellen beruht. Tumorerinfiltrierende Lymphozyten von Tumorkranken werden *in vitro* mit Zytokinen (Lymphokinen) stimuliert, expandiert und anschließend den Tumorkranken wieder injiziert. Mit diesem Konzept von Lymphokinaktivierten Killerzellen (LAK) wurden zunächst experimentelle Studien an verschiedenen tierexperimentellen Modellen durchgeführt (Linn et al. 2003, Abbas et al. 2005). Bei zusätzlicher systemischer Gabe von IL-2 zeigten sich gute Resultate hinsichtlich der Tumorreduktion (Masuzawa et al. 2001, Abbas et al. 2005). Studien der LAK Therapie bei Menschen, die bisher vor allem bei Erkrankten mit fortgeschrittenen Malignomen durchgeführt wurden, zeigten jedoch patientenabhängig eine unterschiedliche Effektivität (Leemhuis et al. 2005). In Studien mit Pankreaskarzinompatienten schien eine intraportale Gabe von LAK und IL-2 in einer möglichen Verlängerung der Lebenszeit und verminderten Inzidenz von Lebermetastasen zu resultieren (Kobari et al. 2000). Ein Erfolg versprechendes Ergebnis bezüglich der Tumorreduktion konnte jedoch nicht erreicht werden.

1.2.2 Aktive Immuntherapie

Die aktive Immuntherapie zielt darauf ab, die körpereigene Immunantwort gegen den Tumor zu stärken, indem zytotoxische T-Zellen und B-Zellen verstärkt rekrutiert und aktiviert werden. Dies kann über zwei Wege geschehen, man unterscheidet daher die spezifische und die unspezifische aktive Immuntherapie.

1.2.2.1 Aktive spezifische Immuntherapie

Spezifische immuntherapeutische Ansätze haben eine direkte Aktivierung spezifischer Effektorzellen (B- und T-Lymphozyten) zum Ziel. Sie beruhen vor allem auf Vakzinierungsstrategien. Hierbei wird - wie bei einer Impfung - versucht, Substanzen zu verabreichen, die als Tumorantigene bekannt sind und so zur Bildung von spezifischen T-Zellen und AK führen. Es gibt die unterschiedlichsten Ansätze für Vakzine. Hierzu zählen neben genetisch modifizierten Tumorzellvakzinen auch rekombinant viralbasierte Vakzine, bei denen rekombinante Viren bzw. Plasmide mit Tumor cDNA verabreicht werden, sowie Vakzine, die auf Proteinen oder Peptiden und auf dendritischen Zellen (DZ) basieren. Peptid- bzw. Proteinvakzinierungsstudien beim Pankreaskarzinom beruhen zum Beispiel auf der Verabreichung mutierter k-ras Peptide (Gjertsen et al. 1995, Gjertsen et al. 1997) oder

MUC1 Proteine (Goydos et al. 1996), die vermehrt im Pankreaskarzinom vorkommen. Ergebnisse solcher Studien bei k-ras Peptid/Proteinvakzinen lieferten bisher vielversprechende Ergebnisse. So konnte in einer Studie beim Pankreaskarzinom eine positive Hauttestreaktion und eine verlängerte Überlebenszeit festgestellt werden (Gjertsen et al. 2001). Weitere Studien für eine gesicherte Aussage sind jedoch notwendig und stehen noch aus. Genetisch modifizierte Tumorzellvakzine zielen darauf ab, dass Tumorzellen z.B. nach retroviralem Gentransfer (Engels et al. 2003) vermehrt immunaktivierende Zytokine (IL-2, Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interferon- γ (IFN- γ), IL-4 und granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)) sezernieren und damit eine verstärkte Immunantwort hervorrufen. Beim Pankreaskarzinom wurde bisher eine Studie mit GM-CSF transfizierten, bestrahlten allogenen Tumorzellen als adjuvante Vakzinierung durchgeführt. Der Einsatz dieses Vakzins als adjuvante Therapie zur konventionellen Behandlung bei Pankreaskarzinompatienten konnte eine tumorspezifische Immunantwort hervorrufen, die mit einem Anstieg einer DTH (delayed type hypersensitivity) Reaktion korrelierte (Jaffee et al. 2001, Laheru et al. 2001). Weitere klinische Studien, die einen tumorregredienten Effekt nachweisen, müssen jedoch erst noch folgen.

Viele andere Vakzinierungsstudien arbeiten vor allem mit DZ. DZ sind die potentesten antigenpräsentierenden Zellen (APZ), die sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen aktivieren können. Bei Studien mit murinen Tumoren haben mit Tumor AG beladene DZ bessere anti-tumorale Effekte gezeigt als die Peptide-Vakzine (Nestle et al. 1998). Beim Pankreaskarzinom konnte bei einer Studie mit MUC1 beladenen DZ jedoch keine Tumorregression bei den Patienten erzielt werden (Pecher et al. 2002).

1.2.2.2 Aktive unspezifische Immuntherapie

Bei der aktiven unspezifischen Immuntherapie werden bakterielle oder immunstimulierende Adjuvantien (IFN- α , IFN- β) verabreicht, um primär unspezifische Effektorzellen (Makrophagen, NK-Zellen, DZ) zu aktivieren und somit einen verstärkten Angriff des Tumors durch diese Zellen zu ermöglichen. Dieses Prinzip findet z.B. im Einsatz von Endotoxinen, IFN- α oder IFN- β Anwendung (Thanhäuser et al. 1993). Außerdem wird versucht, die Immunogenität des Tumorgewebes durch Zellmodulation zu steigern. Im Verlauf kann es hierbei auch zu einer Aktivierung der spezifischen Immunreaktion kommen. Ein Ansatz ist beispielsweise der Versuch, mittels Gentransfer die zur T-Zellaktivierung benötigte Sekretion von Interleukinen und Zytokinen bzw. die notwendige Expression von Molekülen zu induzieren (Mitchell et al. 1992, Staib et al. 1999). Positive Ergebnisse lieferte hier eine Studie von der Arbeitsgruppe um Pützer, die nach intratumoraler Injektion eines IL-12 und B7.1 koexprimierenden Vektors im syngen Panc02 Mausmodell massive Tumorregressionen

und protektive Immunogenität gegen eine erneute Applikation von Tumorzellen nachweisen konnte (Pützer et al. 2002).

1.2.2.3 Bakterielle Immuntherapie

Der Ansatz der bakteriellen Immuntherapie wird auch der aktiven unspezifischen Immuntherapie zugeordnet. Dabei zählt sie zu den Therapieansätzen, die im Verlauf auch auf die Induktion einer spezifischen Immunreaktion abzielen. Die ersten therapeutischen Versuche dieser Therapieform fanden schon vor weit über 100 Jahren Anwendung. Ende des 19. Jahrhunderts führte der New Yorker Chirurg William B. Coley eine bakterielle Immuntherapie bei Sarkompatienten durch, nachdem er beobachtet hatte, dass Sarkompatienten nach fiebrigen Erysipelinfektionen (verursacht durch *S. pyogenes*) Tumorremissionen erfuhren. Als er bei seinen Untersuchungen auf Beschreibungen ähnlicher Fälle stieß, entwickelte er das sogenannte Coley's Toxin, einen Cocktail aus hitzeinaktivierten Bakterienkulturen der Gattung *Serratia marcescens* und *S. pyogenes*, mit dem er die Patienten wiederholt lokal behandelte. Er vermutete, dass die Immunreaktion gegen die Infektion insbesondere im Zusammenhang mit Fieber in ungeklärter Weise mit den Tumorzellen kreuzreagierte und es so zur Regression kam. Die immunologischen Zusammenhänge und molekularen Mechanismen waren zu dieser Zeit jedoch noch nicht hinreichend genug bekannt, um die Weiterführung dieses immuntherapeutischen Ansatzes durchzusetzen (Coley 1893, Wiemann & Starnes 1994). Des Weiteren erlangten nach Coley's Tod 1936 die Radio- und Chemotherapie gerade große Akzeptanz. Damalige Erfolge drängten die Fortentwicklung dieses Ansatzes zunächst in den Hintergrund (Hoption et al. 2003). Berendt und Mitarbeiter griffen 1978 erneut auf die Idee zurück, als sie verschiedene syngene Tumoren von Mäusen mit bakteriellen Endotoxinen behandelten (Berendt et al 1978, A). Sie erreichten dabei jedoch nur bei immunogenen Tumoren eine komplette Regression, sowie eine deutliche T-Zell-vermittelte Immunität. Ausgehend von diesen Befunden stellten sie die These auf, dass die Tumorregression vor allem von dem Vorkommen bereits spezifischer Effektor T-Zellen abhängt, die durch die Endotoxine aktiviert werden (Berendt et al 1978, A). Sie vermuteten ebenso, dass es auch bedingt durch endotoxininduzierte hämorrhagische Nekrosen zu einem Milieuwechsel kommt, der die Migration und Funktion von Effektor T-Zellen fördert (Berendt et al. 1978, B). Eine weitere Anwendung fand die Idee der bakteriellen Immuntherapie bei Studien an murinen Tumormodellen, die Agrawal et al. 2004 durchführten. Sie behandelten verschiedene syngene und xenogene Tumoren in Mäusen, indem sie systemisch Sporen des anaeroben attenuierten Bakteriums *Clostridium novyi*-NT applizierten, die sich anschließend in hypoxischen Tumorarealen vermehrten. Bei 30 % der Tiere konnten die Autoren damit eine Heilung erreichen und außerdem nachweisen, dass diese Effekte nachhaltig immunologisch vermittelten Mechanismen unterlagen. Denn eine erneute

Tumorinduktion desselben Tumors wurde von den Tieren abgewehrt. Agrawal et al. erklärten den antitumoralen Effekt hierbei neben der gesteigerten Immunreaktion auch mit der direkten tumorlytischen Wirkung der Sporen.

Der erfolgreiche Einsatz von vitalen oder attenuierten Bakterien, von Toxinen, Sporen oder anderen bakteriellen Bestandteilen wurde somit schon mehrmals in der Literatur beschrieben und ist Gegenstand aktueller Forschung. Darüber hinaus werden Bakterien bereits therapeutisch in der Klinik eingesetzt. So hat sich der Einsatz von attenuiertem *Mycobacterium bovis* (BCG) zur Behandlung des oberflächlichen Blasenkarzinoms etabliert. Durch die repetetive lokale Gabe von BCG kommt es zu einer lokalen Entzündungsreaktion, die zur Tumorregression führt. Die Verabreichung der Bakterien stellt derzeit die effektivste Therapie des superfiziellen Blasenkarzinoms dar (Bassi 2002, Böhle et al. 2003).

Bei immuntherapeutischen Ansätzen für das Pankreaskarzinom ist ein alleiniger Einsatz von Bakterien als lokale Monotherapie jedoch noch nicht bekannt. Bisher wurden Bakterien oder bakterielle Bestandteile nur adjuvant als Stimulantien bei Vakzinierungsstrategien angewandt. So setzten McConnell et al. Enterotoxin B von Staphylokokken ein, um die Wirkung eines MUC1-Vakzins zu steigern. Sie untersuchten in einem Mausmodell die Wirkung des Vakzins in Kombination mit Staphylokokkenenterotoxin gegen die alleinige Gabe des Staphylokokkenenterotoxins. Bei den Tieren dieses Modells war zuvor schon nachgewiesen worden, dass MUC1-spezifische Vorläufer von zytotoxischen T-Lymphozyten (ZTL) präsent waren, die die Mäuse jedoch nicht vor dem Tumor schützten. Die Aktivierung dieser ZTL und eine signifikant verlängerte Überlebenszeit konnte bei der alleinigen Gabe des Enterotoxins ebenso nachgewiesen werden wie bei der Kombinationstherapie. Dessen ungeachtet kam es bei beiden Behandlungsformen zur Tumorprogression (McConnell et al. 2002). Demzufolge müssen bakterielle immuntherapeutische Ansätze noch weiterentwickelt und verbessert werden.

Die Hypothese der bakteriellen Immuntherapie begründet sich auf der Initiierung mehrerer immunologischer Vorgänge. Geht man davon aus, dass das Immunsystem den Tumor entweder nicht erkennt bzw. ihn zwar erkennt, aber trotzdem nicht stark genug ist, um den Tumor effektiv zu bekämpfen, so liefert die Applikation der Bakterien hierbei jeweils Abhilfe. Mit Unterstützung der Bakterien, die durch ihre zytolytische Wirkung zu einer Senkung der Tumorlast führen, ist das Immunsystem nun in der Lage, zum einen die residuelle Tumorzellen zu eliminieren, zum anderen werden die Effektorzellen durch die auch als ein adjuvanter Stimulus fungierenden Bakterien und durch aus abgestorbenen Tumorzellen freigesetzte endogene Adjuvantien (Gallucci et al. 1999, Sauter et al 2000) stimuliert (ähnlich wie bei Impfungen). Die resultierenden immunologischen Reaktionen sind somit sowohl unspezifisch als auch im Verlauf spezifisch und laufen wie folgt ab: Nach Injektion von Bakterien oder deren Bestandteile in den Tumor kommt es dort zunächst zu einer Kaskade der un-

spezifischen Immunreaktion. Durch die pathogenen Fremdkörper entsteht eine Entzündung im Gewebe, sowohl gegenüber den Tumorzellen (Tumornekrose) als auch gegen die Fremdkörper (Komplementsystem, Entzündungsmediatoren). Angelockt durch das entzündliche Geschehen wandern nun vermehrt inflammatorische Effektorzellen (Granulozyten, Makrophagen) in das Tumorgewebe ein (Pezzutto 1998). Sie phagozytieren bakterielle und zelluläre Bestandteile und sezernieren zur Stimulation der Immunabwehr (erhöhte Aktivität von NK-Zellen, Makrophagen etc.) weitere Zytokine. Die phagozytierten Bestandteile werden auf der Oberfläche der APZ (Makrophagen, DZ) den Zellen der spezifischen Immunabwehr (T- und B-Zellen) als AG präsentiert, so dass es nun sekundär zur Aktivierung des spezifischen Immunsystems und nachfolgend zur Bildung tumorspezifischer ZTL, sowie tumorantigenspezifischer AK kommt. Die sonst vom Immunsystem nicht erkannten Tumorzellen werden somit durch ein nun aktiviertes und sensibilisiertes Immunsystem wieder effektiv bekämpft (Abb. 2).

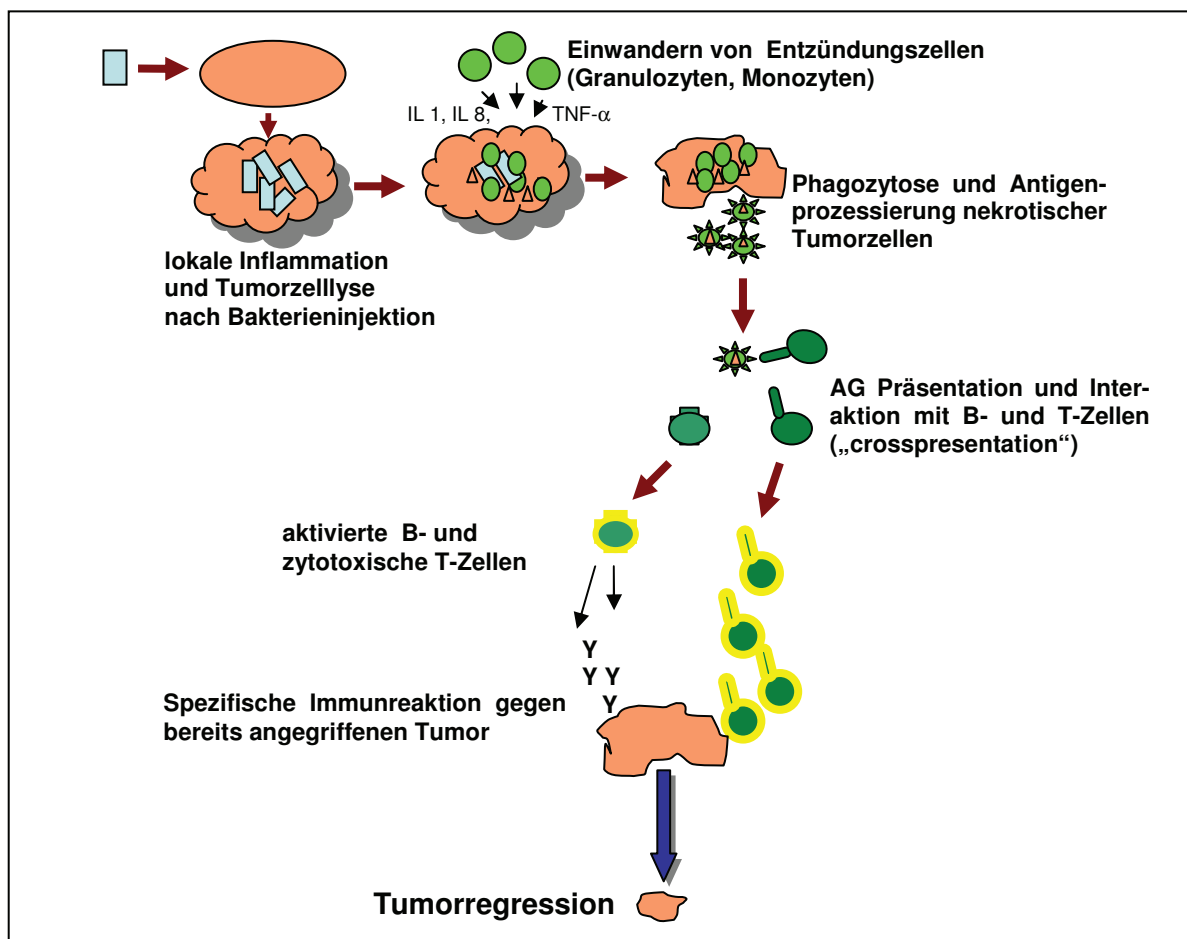


Abb. 2
Prinzip der bakteriellen Immuntherapie

1.3 *Streptococcus pyogenes*

S. pyogenes Serotyp M49 Stamm 591 ist ein grampositives, fakultativ anaerobes Bakterium. Es zählt zu der Gruppe der β -hämolyisierenden A Streptokokken. Klinisch hat es vor allem Bedeutung als Erreger oberer Atemwegsinfektionen wie Tonsillitis und Scharlach oder Hautinfektionen wie Erysipel, Impetigo contagiosa und Phlegmone (Cunningham 2000). Gelegentlich können Streptokokken auch lebensbedrohliche Infektionen wie das toxische Schock Syndrom (TSS) oder eine nekrotisierende Fasciitis verursachen. *S. pyogenes* besitzt verschiedene Virulenzfaktoren. Zu ihnen zählen u.a. die M Proteine, die das Bakterium vor Phagozytose schützen und zur Adhäsion an Zellen beitragen. Anhand dieser M Proteine können die Streptokokken in verschiedene Serotypen unterteilt werden (Courtney et al. 2002). Des Weiteren kann das Bakterium verschiedene Enzyme (Protease, DNase, Streptokinase) und Toxine (Streptolysin O, Streptolysin S) produzieren, die der Zerstörung und Ausbreitung im Gewebe dienen. Das Toxin Streptolysin S (SLS = Streptolysin oxygen Stabil) ist eines der potentesten heute bekannten Toxine. Es bildet an Zielzellen (Erythrozyten, Lymphozyten, Neutrophile Granulozyten, Blutplättchen, sowie Tumorzellen) transmembrane Poren und führt somit zur osmotischen Lyse (Taketo et al. 1966, Datta et al. 2005). Durch die Lysierung von Erythrozyten entsteht der bekannte Hämolysehof auf Blutagar, der als komplette Hämolyse bezeichnet wird (Nizet et al. 2000). Streptolysin S ist, im Gegensatz zu Streptolysin O (Streptolysin Oxygenlabil), nicht immunogen. Beide Toxine spielen eine wesentliche Rolle bei zytolytischen Effekten gegenüber eukaryoten Zellen (Sierig et al. 2003). *S. pyogenes* kann gut mit Antibiotika, wie z.B. Penicillin, behandelt werden und stellt in der Klinik somit keinen Problemkeim dar.

1.3.1 SLS⁻ Mutante

Durch genetische Modifikation können bei Bakterien aus Wildtypstämmen artifiziell Mutantenstämme generiert werden. Eine Methode dafür ist die Inaktivierung eines codierenden Genes durch Transposon Mutagenese. Hierbei wird ein Transposon (springendes Gen) mittels eines Plasmids als Vektor in die Promotorregion eines Operons inseriert, so dass das folgende Gen nicht mehr abgelesen werden kann. Erfolgt diese mutagenetische Inaktivierung für ein für Streptolysin S kodierendes Gen (SagA= SLS-associated genes) (Nizet et al. 2000, Betschel et al. 1998), so wird die Produktion des Toxins Streptolysin S stark herunterreguliert (Datta et al. 2005) und eine weniger virulente Mutante des Wildtyps entsteht. Dies kann in Weichteil-Infektionsmodellen von Nacktmäusen nachgewiesen werden, wobei untersucht wird, wie sich dermatonekrotische Läsionen nach einer subkutanen Injektion der Bakterien entwickeln (Betschel et al. 1998).

1.3.2 Bakteriophagenlysin PlyC₁

Als Bakteriophagen bezeichnet man eine Gruppe von Viren, die auf Bakterien als Wirtszelle spezialisiert sind. Sie docken zunächst an der Zellwand ihrer Wirtszelle an und injizieren dieser nachfolgend ihr virales Erbgut (DNA), so dass es anschließend zu einer Vermehrung der Viren und viraler Enzyme kommt. Sind ausreichend Viren produziert worden, wird mit Hilfe viraler Enzyme die Zellwand der Bakterien aufgelöst (= bakterielle Lyse). Die viralen Enzyme werden als Bakteriophagenlysine bezeichnet und können gezielt isoliert werden. So ist es möglich, für den Bakteriophagen spezifische Bakterien gezielt zu lysieren und abzutöten. Durch die Lyse des Bakteriums kommt es sekundär zur Freisetzung intrazellulärer bakterieller Bestandteile wie Enzyme oder Toxine.

Das in dieser Arbeit verwendete Bakteriophagenlysin wurde 1957 erstmals beschrieben, als man eine schnelle Lyse von Kulturen der A und C Streptokokken durch ein Bakteriophagenlysat bemerkte (Nelson et al. 2006). Infiziert durch den Bakteriophagen, der dieses Lysin produziert, werden jedoch nur die Gruppe der C Streptokokken. Basierend auf dieser Erkenntnis erfolgte die Isolation des Lysins aus diesem Bakterienwirt (Nelson et al. 2001) und das Lysin wurde als „PlyC₁“ (**p**hage **l**ysin from C₁) bezeichnet. Von den heute bekannten Lysinen, die aus einem Bakteriophagen abstammen, ist PlyC₁ das potenteste, d.h. es reichen schon sehr kleine Mengen aus, um Bakterien effektiv und schnell zu lysieren (Nelson et al. 2006). PlyC₁ ist spezifisch wirksam gegen A, C und E Streptokokken und führt durch eine Murein-Hydrolase konzentrationsabhängig zu einer schnellen Lyse der Bakterien. Irritationen gegen andere murine Zellen dagegen sind nicht bekannt (Nelson et al. 2001).

1.4 Vorarbeiten zur bakteriellen Immuntherapie mit *S. pyogenes*

Erste Versuche, um einen Ansatz für eine bakterielle Immuntherapie des Pankreaskarzinoms zu entwickeln, wurden bereits in der gastroenterologischen Forschungsgruppe der Universität Rostock durchgeführt. Hierbei wurde zunächst *in vitro* die Wirkung verschiedener Stämme des Bakteriums *S. pyogenes* getestet, wobei sich zeigte, dass besonders *S. pyogenes* Serotyp M49 Stamm 591 starke zytotoxische Aktivitäten gegen murine und humane Pankreaskarzinomzellen entwickelt. Daraufhin erfolgte die *in vivo* Untersuchung dieses Stammes an dem Modell eines murinen Pankreastumors. Die vitalen Bakterien wurden direkt intratumoral (i.t.) injiziert, um eine möglichst große lokale antitumorale und geringe systemische Wirkung zu erzielen. In einem Beobachtungszeitraum von 4 Wochen konnte daraufhin eine komplette Tumorregression beobachtet werden. Im Blutbild wurde eine transiente Leukozytose festgestellt, die mit einer immunhistologisch nachgewiesenen Granulozyteninfiltration des Tumorgewebes einherging und somit als Antwort auf die Strepto-

kokkeninfektion eingeordnet wurde. Die Aktivierung des unspezifischen Immunsystems konnte auch durch durchflusszytometrische Analysen von Splenozyten unterstützt werden. Auffällig war dabei eine massive Splenomegalie der infizierten Tiere, die auf eine Immunzellexpansion und Proliferation als Antwort auf die lokale Infektion zurückgeführt wurde. Als Nachweis für eine initiierte spezifische Immunreaktion konnte zum einen ein spezifischer zytotoxischer Effekte der Splenozyten gegen die Tumorzellen nachgewiesen und zum anderen ein systemischer Anstieg von Th₁ Zytokinen gemessen werden.

Somit erwies sich der bakteriolytische Ansatz mit *S. pyogenes* M49 in den Vorversuchen als potent, eine effektive onkolytische, sowie unspezifische und spezifische antitumorale Immunreaktion mit nachfolgender Tumorregression zu induzieren. Dies macht die Fortführung der Untersuchungen zu diesem Ansatz dringend erforderlich und Erfolg versprechend.

1.5 Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung einer bakteriolytischen Immuntherapie zweier attenuierter Formen des Bakteriums von *S. pyogenes* zu analysieren. Basierend auf den Voruntersuchungen, in denen bereits gezeigt werden konnte, dass Bakterien der Gattung *S. pyogenes* antitumoral wirksam sind, sollte der therapeutische Ansatz nun in funktionellen Analysen zu dem Bakterium weiter untersucht werden. Dabei wurde die Wirksamkeit eines attenuierten Serotyps von *S. pyogenes*, welcher kein funktionelles Exotoxin mehr produziert, mit der eines Lysates des Wildtyps verglichen. Die Untersuchungen erfolgten hierzu in einem syngenem murinen heterotopen Pankreastumormodell. Parallel zu den *in vivo* Untersuchungen (Beurteilung des Tumolvolumenverlaufes) sollte anhand hämatologischer, durchflusszytometrischer, histologischer & immunhistochemischer Analysen die immunologische Reaktion beurteilt werden. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen zum besseren Verständnis der antitumoralen Wirksamkeit der pathogenen Komponenten von *S. pyogenes* beitragen und die Grundlage für spätere klinische Studien zur Entwicklung einer klinisch anwendbaren Therapieform darstellen.

2 Material und Methoden

Die Namen aller Hersteller und Firmen der im nachfolgenden aufgeführten Chemikalien, Geräte und Hilfsmittel sind dem Anhang (I) zu entnehmen. Ebenso die Zusammensetzung der angegebenen Puffer und Lösungen.

2.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere wurden weibliche C57Bl/6N Mäuse mit einem Körpergewicht von 20 g verwendet. Die Tiere stammten aus einer Zucht (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) und wurden nach Ankunft in der zentralen Versuchstierhaltung der Universität Rostock (Leitung Prof. Dr. Vollmar) für ca. 5-7 Tage an die neue Umgebung akklimatisiert. Von geschultem Tierpersonal betreut wurden sie artgerecht bis max. 6 Mäuse pro Laborkäfig bei 12-stündigem Tag-/Nachtzyklus unter Bereitstellung von Standardlaborfutter und Wasser gehalten. Nach der Infektion mit den Bakterien wurden die infizierten Tiere in einem separaten Quarantänerraum weiter betreut.

2.2 Tiermodell

Für die tierexperimentellen Untersuchungen wurde ein bereits etabliertes heterotopes Tiermodell zum Pankreaskarzinom gewählt. 8-10 Wochen alten weiblichen C57Bl/6N Mäusen wurden hierzu 1×10^6 Zellen der syngenischen Tumorzelllinie Panc02 (suspendiert in 50 μ l PBS) s.c. in die rechte Flanke injiziert, woraufhin sich innerhalb von 7-9 Tagen ein sichtbarer Tumor bildete. Am Tag 9 erfolgte eine einmalige i.t. Injektion von 10^6 cfu Streptolysin S negativer Streptokokken (suspendiert in 50 μ l PBS) bzw. die erste i.t. Injektion von 10^9 cfu durch PlyC₁ lysierte Wildtyp-Streptokokken (suspendiert in 50 μ l PBS, 2. Injektion nach 4 Tagen). Die Präparation der Tiere erfolgte in Gruppen von n=7 jeweils 7, 14, 21 und 28 Tage nach Therapiebeginn.

2.3 Anästhesie, Präparation und Gewebeasservierung

Die Injektion der Panc02 Zellen, sowie der Bakterien bzw. des bakteriellen Lysates erfolgte unter kurzer Ethernarkose. Diese Narkose ist ein etabliertes Verfahren zur ausreichenden Sedierung und Relaxation mit erhaltener Spontanatmung. Sie verliert kurz nach Inhalation sende ihre Wirkung und dient ausschließlich der Ruhigstellung der Tiere, da eine Analgesie bei den Eingriffen nicht nötig ist.

Um den Verlauf des Tumorstwachstums besser verfolgen zu können, wurden die Tiere nach Anwachsen des Tumors an der Flanke rasiert, die Tumoren 2x pro Woche mit Hilfe einer

Schieblehre gemessen und das Tumervolumen nach der Formel $B^2 \times L \times 0,52 = \text{mm}^3$ berechnet. Für die Gewebe- und Probenentnahme wurden die Tiere zunächst mit der Kombination Ketamin/Xylazin (90/25 mg/Kg KG) per intraperitonealer Injektion narkotisiert. Nach der Bestimmung von Gewicht und Tumorgroße wurde Blut mittels einer Kapillare aus dem retrobulbären Sinus entnommen und in ein EDTA-beschichtetes Röhrchen überführt. Die Euthanasie der Tiere erfolgte durch eine Überdosis an Ketamin/Xylazin (90/25 mg/Kg KG). Anschließend wurde der Tumor reseziert, das Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C für nachfolgende histologische Analysen asserviert. Nach Rasur und Desinfektion des Abdomens wurde das Abdomen mit einem medianen Longitudinalschnitt geöffnet (Abb. 3). Es folgte die Lungen- und Leberresektion, sowie die Extirpation der Milz und Lymphknoten. Die Milz, die Lymphknoten und das Lungen- und Leberresektat wurden bis zur Weiterverarbeitung in DMEM-Medium aufbewahrt.



Abb. 3
Darstellung des Präparationssitus der Maus

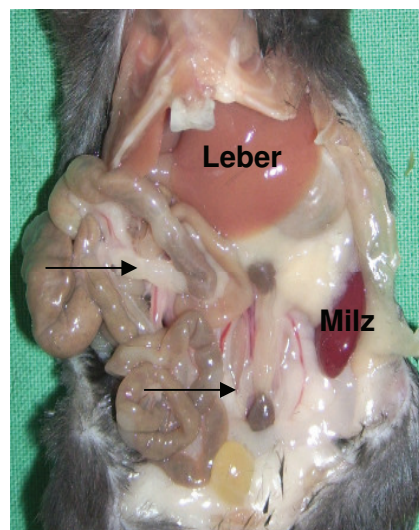


Abb. 4
Darstellung der mesenterialen bzw. paraaortale Lymphknoten (Pfeile), der Milz und der Leber

2.4 Experimentelles Protokoll

Ziel der Untersuchungen war es, den Effekt der i.t. Injektion einer Bakterienmutante (SLS⁻) im Vergleich zu einem Bakterienlysat auf den Verlauf des Tumorwachstums selbst, sowie potentielle systemische Auswirkungen zu erfassen und näher zu analysieren.

2.4.1 Versuchsgruppen und Versuchsablauf

Therapiegruppen:

Nach Tumoretablierung (Tag 9) wurden jeweils 28 Mäuse 1x mit der SLS⁻ Mutante bzw. 2x im Abstand von 4 Tagen mit dem Bakterienlysat von *S. pyogenes* M49wt i.t. infiziert. Zur detaillierteren Analyse wurden die Tiere in 4 Gruppen (n=7) unterteilt und je eine Gruppe 7, 14, 21 bzw. 28 Tage nach der Infektion seziert (Tab. 1).

Kontrollgruppen:

Vehikelkontrolltiere (n=7) erhielten eine i.t. Injektion der Vehikellösung PBS (Trägerlösung SLS⁻ Mutante) bzw. PBS/Bakteriophagenlysin C₁ (Trägerlösung Bakterienlysat).

7 weitere Tiere ohne i.t. Injektion dienten zur Dokumentation des Tumorstwachstums als *Tumorkontrolle*. Bei weiteren 7 Tieren wurde keine dieser Interventionen vorgenommen. Diese Tiere der *Kontrollgruppe* dienten zur Erfassung physiologischer Parameter und wurden alle nach 28 Tagen seziert, da sich in Vorversuchen mit Tumorkontroll- und PBS-Tieren bereits gezeigt hatte, dass kein wesentlicher Unterschied bezüglich der Untersuchungen zu verschiedenen Sektionszeitpunkten besteht.

Tab. 1
Versuchsprotokoll

Gruppe	n	Maßnahme	Sektion
Gesunde Tiere	7		Zeitgleich mit Tumorkontrolltieren
Tumorkontrolltiere	7	s.c. Tumorinduktion	4 Wochen nach Tumoretablierung
Vehikeltiere PBS	7	s.c. Tumorinduktion, i.t. Injektion von PBS	4 Wochen post interventionem
Vehikeltiere Lysin	7	s.c. Tumorinduktion, i.t. Injektion von Lysin	4 Wochen post interventionem
Therapietiere SLS⁻	28	s.c. Tumorinduktion, i.t. Injektion von SLS ⁻	1-4 Wochen post infektionem, je 7 pro Zeitpunkt
Therapietiere Lysat	28	s.c. Tumorinduktion, i.t. Injektion (2x im Abstand von 4 Tagen)	1-4 Wochen post primum injektionem, je 7 pro Zeitpunkt

2.5 Mikrobiologie

2.5.1 Bakterien

Die Wildtyp- und Mutantenstämme von *S. pyogenes* M49 wurden von dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universität Rostock (Leitung: Prof. Dr. Dr. Podbielski) zur Verfügung gestellt. Durch ein bei der Transfektion mitübertragenes Antibiotika-Resistenzgen liegt bei der SLS⁻ Mutante eine Resistenz gegen Chloramphenicol und Erythromycin vor.

2.5.2 Bakteriophagenlysin C1

Das Bakteriophagenlysin C₁ (PlyC₁) wurde von dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universität Rostock zur Verfügung gestellt.

2.5.3 Herstellung des SLS⁻ Bakterieninjektates

Um die SLS⁻ Bakterien anhand ihrer Antibiotikaresistenz zu selektieren, erfolgte die Kultivierung auf einer Agarplatte mit THY (Todd Hewitt Broth Yeast Extract)-cm²/e² (Chloramphenicol/Erythromycin). Einen Tag vor der Injektion wurden einige Bakterienkolonien in flüssigem THY Medium angeimpft und über Nacht im Brutschrank bei 37° C, 5 % CO₂ kultiviert, so dass ein Wachstum bis zur mittleren logarithmischen Phase erfolgte. Anschließend wurde die Bakteriensuspension abzentrifugiert (3000 rpm, 5 min), in 5 ml PBS gewaschen, erneut pelletiert und in 1 ml PBS resuspendiert. Die optische Dichte (OD₆₀₀) wurde mittels spektrophotometrischer Messung auf 0,1 (entspricht ca. 10⁶ cfu/ml) eingestellt. Daraufhin wurde 1ml der eingestellten Suspension in ein 1,5 ml Tube überführt, pelletiert (3000 rpm, 10 min) und in 50 µl PBS resuspendiert. Die Lagerung bis zur Injektion erfolgte auf Eis.

2.5.4 Gewebe- und Blutausstriche auf Agarplatten

Um eine potentielle systemische Infektion durch die inokulierten Bakterien nachzuweisen, wurden Gewebe- und Blutausstriche auf Agarplatten durchgeführt. Für die Gewebeausstriche wurden die Geweberesektate (Lunge, Leber, Milz) durch ein 70 µm Sieb passiert, bei 1500 rpm pelletiert, 1x in PBS gewaschen und abschließend in 1 ml Medium resuspendiert. Anschließend wurde ein Teil des Homogenats auf einer THY-cm²/e² Agarplatte ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht im Brutschrank (37° C, 5 % CO₂) wurden die Platten auf Bakterienkolonien untersucht.

2.5.5 Herstellung des Lysates von *S. pyogenes* M49

Für die Herstellung des Bakterienlysates erfolgte die Kultivierung des Wildtypstammes (M49), auf einer THY Agarplatte. Einen Tag vor der Injektion wurden einige Bakterienkulturen in flüssigem THY Medium angeimpft und über Nacht im Brutschrank (37° C, 5 % CO₂) aufbewahrt, so dass ein Wachstum bis zur mittleren logarithmischen Phase erfolgte. Anschließend wurde die Bakteriensuspension abzentrifugiert (3000 rpm, 5 min), in 5 ml PBS gewaschen, erneut pelletiert und in 1ml THY-Medium resuspendiert. Die optische Dichte (OD₆₀₀) wurde mittels spektrophotometrischer Messung auf 1,0 (entspricht ca. 10⁹cfu/ml) eingestellt. Daraufhin wurden 1ml der eingestellten Suspension in ein 1,5 ml Tube überführt, pelletiert (3000 rpm, 10 min) und in 50 µl PBS resuspendiert. Abschließend wurden jeweils 40 units des PlyC₁ zugesetzt und bei 37° C für 30 min in einem Thermomixer unter permanenter Rotation inkubiert.

2.5.6 Nachweis der Bakterienlyse

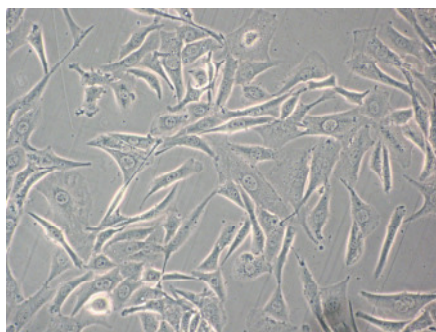
Um die Effizienz der Bakterienlyse zu überprüfen, wurde ein Teil der lysierten Bakteriensuspension auf einer THY Agarplatte ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht im Brutschrank (37° C, 5 % CO₂) wurden die Agarplatten auf Bakterienwachstum untersucht.

2.6 Zellbiologie

2.6.1 Panc02 Zellen

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten steril unter einer Laminarbox. Als Kultivierungsmedium wurde DMEM verwendet, welches mit Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (100 µg/ml) und 10 % FCS supplementiert war. Die Panc02-Zellen wurden im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO₂ in Kulturflaschen inkubiert. 2x pro Woche erfolgte ein Mediumwechsel.

Die Panc02 Zellen sind syngene Tumorzellen der Maus, die adhären in Kultur als Monolayer wachsen (s. Abb.5). Die Zelllinie wurde im Jahre 1984 aus C57Bl/6 Mäusen isoliert, denen das Karzinogen 3-Methylcholanthren in das Pankreas injiziert worden war (Corbett et al. 1984). Panc02 Zellen sind stark tumorigen in Mäusen und zeichnen sich durch eine schlechte Differenzierung, sowie geringe Immunogenität (Herunterregulation von MHC-Klasse I Molekülen auf der Zelloberfläche) und Multiresistenz gegenüber Therapeutika aus. Panc02-Zellen zeigen Alterationen des Ras Onkogens, von p53, des Her2 Rezeptors und der CDK (Schneider et al. 2004) sowie eine mangelnde Expression von kostimulatorischen Molekülen (insbesondere B7.1). Die Zellen wurden ursprünglich von der Arbeitsgruppe um Dr. A. Scholz (Charite Berlin, Berlin) bezogen und standen der Arbeitsgruppe bereits zur Verfügung.

**Abb.5**

Lichtmikroskopische Aufnahme von Panc02 Zellen aus einer ü. N. Kultur auf Coverslips. Originalvergrößerung 20x.

2.6.2 Zellarbeiten

Zellen auftauen:

Die Zellen wurden aus Flüssigstickstoff entnommen und schnell im Wasserbad bei 37° C aufgetaut. Anschließend wurden sie langsam in ein mit vorgewärmtem Medium gefülltes Gefäß überführt und bei 900 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit Medium resuspendiert und in einer kleinen Kulturflasche (25 cm²) eingesät.

Zellen passagieren:

Nach Ausbildung eines konfluenten Monolayers erfolgte die Passagierung der Zellen. Dabei wurde das Medium verworfen und die Kulturflasche zweimal mit PBS gespült. Die Zellen wurden anschließend abtrypsinisiert, in Medium resuspendiert und bei 900 rpm für 5 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde erneut in Medium resuspendiert. Die Zellen wurden daraufhin in einer Kulturflasche eingesät und im Brutschrank (37° C, 5 % CO₂) inkubiert.

Zellen einfrieren:

Zur Konservierung der Zellen, wurden diese nach dem Abtrypsinieren und Zentrifugieren in Einfriermedium resuspendiert, zunächst für 2 Tage langsam in einer zweifachen Styroporverpackung bei -80° C heruntergekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Zellen zählen:

Bei zellbiologischen Arbeiten müssen die Zellen zunächst quantifiziert werden. Eine gängige Methode hierfür ist die Zellzählung in der Neubauer Zählkammer (s. Abb.6). Bei der Neubauer Zählkammer handelt es sich um eine Glasplatte mit einer rasterunterlegten geeichten und von einem ebenfalls geeichten Deckgläschen bedeckten Vertiefung, in die die zu zählende Zellsuspension pipettiert wird.

Hierfür wird die Zellsuspension mit PBS und Trypanblau 1:10 verdünnt (10 µl Zellsuspension, 50 µl PBS, 40 µl Trypanblau), um lebende von toten Zellen zu differenzieren. Lebende

Zellen können aufgrund einer intakten Membran den Farbstoff Trypanblau ausschließen und färben sich nicht an, tote Zellen hingegen können dies durch den Verlust der Membranintegrität nicht und stellen sich daher unter dem Mikroskop blau dar. Lebende Zellen werden in jeweils 16 Kleinquadraten der 4 Eckquadranten (blau) unter dem Auflichtmikroskop ausgezählt.

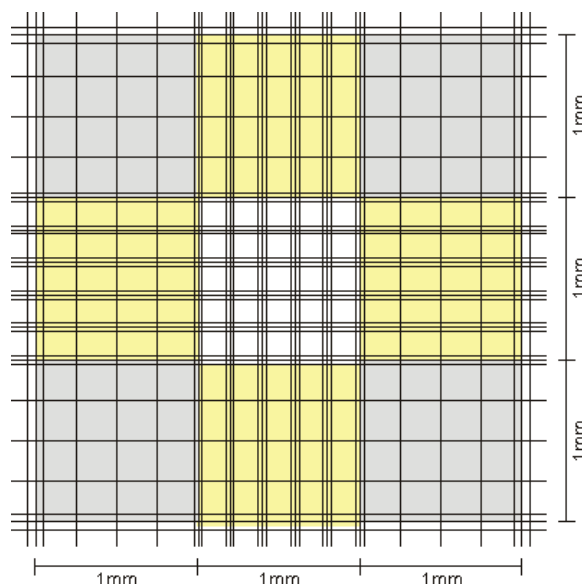


Abb.6

Neubauer Zählkammer improved mit L x B x H = 1 mm x 1 mm x 0,1 mm

Die Anzahl der Zellen/ml wird daraus dann unter Berücksichtigung der Verdünnung und dem durch das Volumen der Kammer vorgegebenen Zählkammerfaktor wie folgt berechnet:

	gezählte Zellzahl (16 Kleinquadrate) x Verdünnungsfaktor (10) x Zählkammerfaktor (10)
Zellen/ml =	<div style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; height: 1.2em; margin: 0 auto; width: 80%;"></div>
	4 (Anzahl der ausgezählten Eckquadranten)

2.6.3 Herstellen des Panc02 Injektates

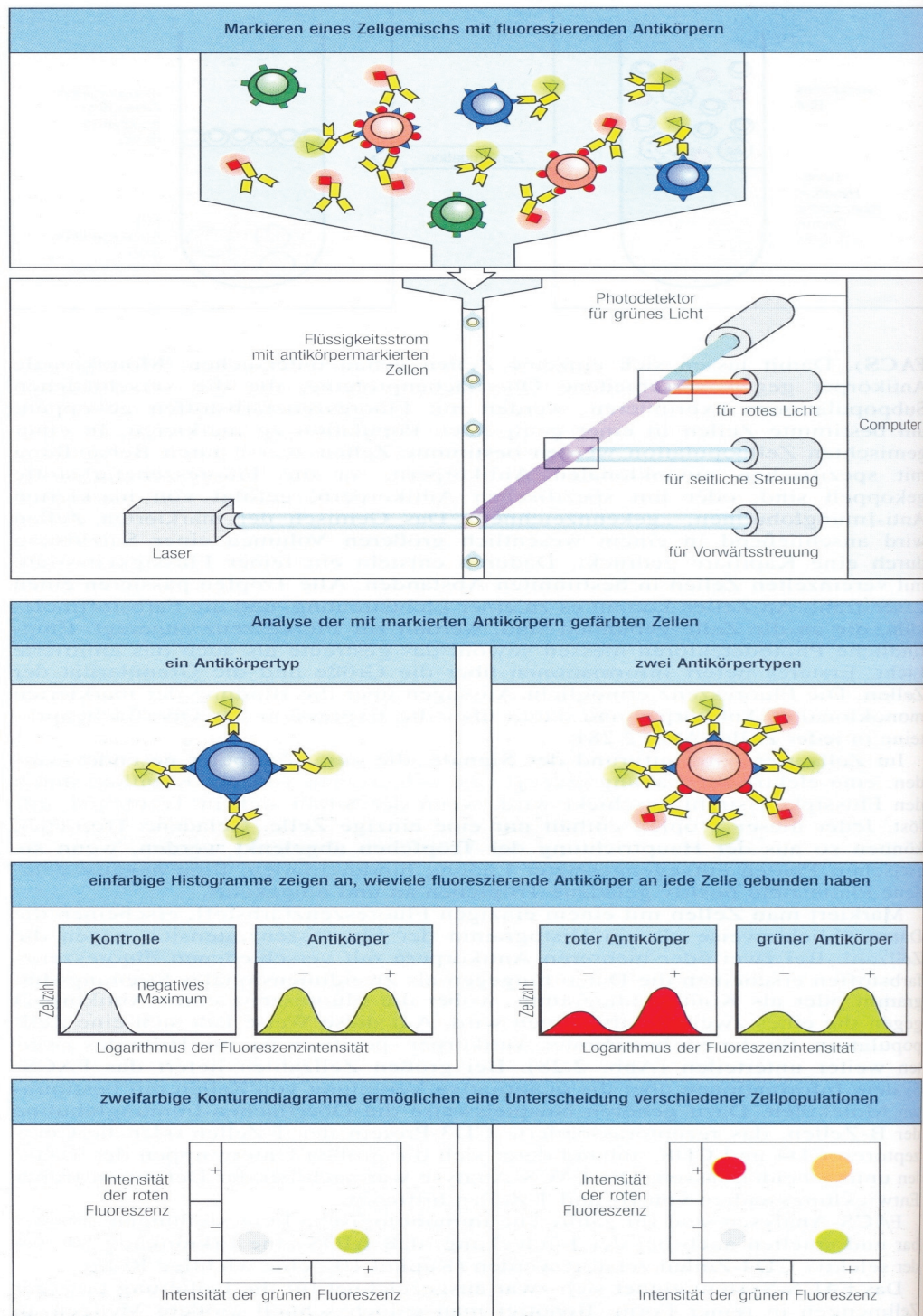
Nach dem Abtrypsinieren und Zentrifugieren der Zellen wurde das Zellpellet in Medium resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend gezählt, die Zellzahl auf 1×10^6 Zellen eingestellt und das entsprechende Volumen bei 5000 rpm für 5 min bei 4° C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50 µl PBS aufgenommen und bis zur Injektion auf Eis gelagert.

2.6.4 Lymphozytenisolierung aus der Milz

Die nach der Entnahme in Medium aufbewahrte Milz wurde durch ein 70 µm Sieb passiert. Die so erhaltene Zellsuspension wurde bei 1500 rpm und 4° C für 10 min abzentrifugiert, das Zellpellet mit Medium gewaschen und erneut abzentrifugiert. Nach Resuspension des Zellpellets in Lysepuffer und Inkubation unter Schütteln für 5 min bei RT wurde die Suspension mit Medium versetzt und erneut bei 900 rpm für 5 min abzentrifugiert. Es folgte das Waschen des Pellets mit Medium und wiederholtes Abzentrifugieren bei 1500 rpm für 10 min bei 4° C. Zuletzt wurde das Zellpellet in Medium resuspendiert und die Anzahl der Zellen durch Zählung bestimmt.

2.6.5 Durchflusszytometrie

Zur Identifizierung der verschiedenen Zellpopulationen der Milz- und Blutleukozyten wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Bei der Durchflußzytometrie werden in Suspension vorliegende Zellen in einem Durchflusszytometer mit Hilfe eines Lasers sortiert. Die Zellen passieren einzeln in einer dünnen Kapillare den Laser (s. Abb.7). Hierbei wird die Lichtstreuung des Laserstrahls durch die Zelle gemessen. Die Streuung des Laserlichts nach vorne wird als forward scatter (FSC) bezeichnet und ist ein Maß für die Größe der Zellen. Die Streuung des Laserlichts zur Seite wird als side scatter (SSC) bezeichnet und ist ein Maß für die Granularität und Membranbeschaffenheit der Zellen. Liegen die Zellen markiert mit einem fluoreszenzgekoppeltem Antikörper gegen Oberflächenmoleküle vor, können die Zellen hierbei auch anhand der Messung der spezifischen Fluoreszenz-emission diskriminiert werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch monochromatisches Licht des Lasers angeregt und strahlen darauf Licht einer bestimmten Wellenlänge ab, das gemessen wird. Durch die Verwendung verschiedener fluoreszenzmarkierter Antikörper ist es möglich, Mehrfachmarkierungen verschiedener Oberflächenmoleküle einer Zelle vorzunehmen und diese dann simultan zu messen und zu diskriminieren. Häufig verwendete Fluoreszenzfarbstoffe sind z.B. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) mit einem Emissionsspektrum von 500-550 nm) und Phycoerythrin (PE) mit einem Emissionspektrum von 570-600 nm). Mit Hilfe des Durchflusszytometers können in ca. 10 sec 10.000 Zellen anhand dieser drei verschiedenen Parameter FSC (Größe), SSC (Granularität) und Fluoreszenz (Oberflächenmoleküle) untersucht werden. Werden die Zellen anhand der Messung elektrisch modifiziert und anschließend noch zusätzlich sortiert, spricht man vom „FACS“ (Fluorescence activated cell sorting).

**Abb. 7**

Prinzip der Durchflusszytometrie (aus „Immunologie“ Janeway & Travers, 2. Auflage 1999)

2.6.6 Durchflusszytometrische Analyse von Splenozyten

Nach der Isolierung und Zählung der Splenozyten (s. Punkt 2.6.7.) wurden jeweils 2×10^5 Zellen enthaltende Volumina der Zellsuspension in FACS Röhrchen überführt und 10 min bei 1200 rpm und 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellpellets in 100 μl Medium resuspendiert und bis auf eine Kontrollprobe mit 5 μl Antikörper ($1 \mu\text{g}/10^6$ Zellen) für 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Daraufhin erfolgte die Waschung mit kaltem PBS und erneutes Abzentrifugieren. Nach Abpipettieren des Überstandes wurde das Zellpellet in 300 μl PBS resuspendiert und gemessen oder mit 1 % Paraformaldehyd fixiert und dunkel bei 4°C aufbewahrt.

2.7 Vollblutanalyse

2.7.1 Hämatologische Parameter (Blutbild)

Die Messung des Blutes erfolgte aus 200 μl EDTA komplexiertem Blut mittels eines Automaten im Hämatologischen Zentrallabor der Klinik für Innere Medizin (KIM) der Medizinischen Fakultät (Universität Rostock). Es wurden Leukozyten ($10^6/\text{L}$), Erythrozyten ($10^{12}/\text{L}$), Hämoglobin (mmol/L), Hämatokrit (%) und Blutplättchen ($10^9/\text{L}$) sowie MCV (fL) und MCH (fmol/L) erfasst.

2.7.2 Differentialblutbild

2.7.2.1 Herstellung und Färbung

Zur Bestimmung der prozentualen Zusammensetzung der Leukozyten wurde ein Differentialblutbild erstellt. Hierfür wurden 5 μl Blut auf einen mit 70 % Ethanol entfetteten Objektträger pipettiert. Der Blutstropfen wurde mit einem im 45° Winkel angelegtem Deckgläschen unter möglichst geringem mechanischem Druck auf den Objektträger ausgestrichen und luftgetrocknet. Die Färbung erfolgte maschinell im Hämatologischen Zentrallabor der KIM der Universitätsklinik Rostock nach der Pappenheim Methode. Hierbei werden die einzelnen Zellkompartimente ähnlich der HE Färbung mit sauren und basischen Farbstoffen angefärbt und zugleich fixiert (Methanol) und stabilisiert (Glycerin), so dass ein Eindecken nicht mehr erforderlich ist. Die Zellkerne erscheinen dunkelrot bis violett, Lymphozyten und Monozyten können neben Größe und Kern anhand ihrer Zytoplasmafärbung, Granulozyten anhand ihrer verschieden gefärbten Granula diskriminiert werden.

2.7.2.2 Manuelle Blutbildauszählung

Zur Auszählung des Differentialblutbildes wurden jeweils 100 Zellen unter dem Mikroskop (63 x Vergrößerung, Ölimmersionsobjektiv) ausgezählt. Hierbei wurde zwischen Lymphozyten segment- und stabförmigen neutrophilen Granulozyten, eosinophilen und basophilen Granulozyten, sowie Monozyten unterschieden und anschließend der prozentuale Anteil bestimmt.

2.7.3 Durchflusszytometrische Analyse aus Vollblut

Für die FACS-Analysen wurde das Vollblut zunächst 1:2 mit FACS-Puffer verdünnt. Anschließend wurden 50 µl Probe in ein FACS Röhrchen pipettiert, 2,5 µl Antikörper dazugegeben und geschüttelt. Nach 20-30 minütiger Inkubation im Dunkeln (4° C) erfolgte die Zugabe von 1ml 1x Lysepuffer und eine erneute Inkubation im Dunkeln für 10 min. Daraufhin wurde das Röhrchen bei 2000 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Das Pellet wurde in 200 µl FACS Puffer resuspendiert und gemessen.

2.8 Histologie

2.8.1 Kryokonservierung: Herstellung und Aufbewahrung von Gefrierschnitten

Aus dem nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen und bei -20° C gelagerten Tumoren wurden im Kryostaten bei -20° C 6 µm dünne Schnitte hergestellt und diese für 1 h luftgetrocknet. Anschließend erfolgte entweder direkt die histologische bzw. immunhistochemische Aufarbeitung oder die Schnitte wurden nach Fixierung für 10 sec in kaltem Aceton und erneuter Luftttrocknung bei -80° C gelagert.

2.8.2 HE-Färbung

Die HE-Färbung wurde im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Rostock durchgeführt.

Sie dient als Übersichtsfärbung zur Darstellung von Geweben. Durch die Farbstoffe Mayers Hämalaun und Eosin G (s. Anhang) werden spezifische Zellkompartimente angefärbt. Die Zellkerne erscheinen dunkelrot bis violett, das Zytoplasma und proteinhaltige Lösungen rosa.

Die frisch hergestellten Gefrierschnitte wurden nach kurzer Fixation in 4 % Formalin mit destilliertem Wasser gespült, nachfolgend 30 sec in Hämalaun gefärbt und bis zum Farbumschlag in warmen Leitungswasser gebläut. Daran schloss sich eine 2 minütige Färbung

in Eosin (0,5 %) an. Überschüssiges Eosin wurde durch Abspülen mit A. dest. eliminiert. Daraufhin wurden die Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt und mit Per-tex eingedeckt.

2.8.3 Granulozytennachweis mittels Naphthol-As-D Färbung

Für den Nachweis tumorinfiltrierender neutrophiler Granulozyten wurden die Gefrierschnitte mit Naphthol-Anilinsulfat-D-Chlorazetat gefärbt. Mit Hilfe dieser Färbung kann die Aktivität der zytoplasmatischen Esterase dargestellt werden.

Die Gefrierschnitte wurden zunächst 30 sec in Formaldehyd (37 %) / Methanol (1:10) fixiert, in der angefertigten Reagenzlösung für 1 h gefärbt und anschließend für 5 min leicht gewässert. Zur Darstellung der Zellkerne erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun, sowie Nachbläuen in Leitungswasser und eindecken mit Glyceringelatine. Zur Auswertung der As-D Färbung wurden im 40er Objektiv unter dem Mikroskop je 20 GF verblindet gezählt, wobei eine Diskriminierung zwischen Rand- und Nekrosezone, sowie Tumorzentrum erfolgte. Anschließend wurden die GF auf mm^3 umgerechnet ($1\text{GF} = 1,17 \text{ mm}^3$)

2.9 Immunhistochemie

Für den Nachweis lokaler Infiltration von spezifischen Effektorzellen wurden die Gefrierschnitte immunhistochemisch aufgearbeitet. Immunhistochemische Methoden ermöglichen den Nachweis von Proteinen mit Hilfe von Antikörpern, indem die Antikörper Oberflächenepitope nativer Proteine von histologischen Schnitten erkennen.

2.9.1 ABC Methode

In der vorliegenden Arbeit wurde die indirekte Immunhistochemie mit Primärantikörper und biotinyliertem Sekundärantikörper an Gefrierschnitten durchgeführt. Das Detektionssystem bestand aus einem Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex (ABC Methode), Wasserstoffperoxid als Substrat und dem Chromogen DAB (3,3-Diaminobenzidin) als Farbreagenz. Der AB-Enzym Komplex bindet auf Grund der hohen Affinität zwischen Avidin und Biotin an den biotinylierten sekundären Antikörper und wird anschließend durch die Reaktion zwischen Enzym, Substrat und Chromogen sichtbar gemacht: es kommt zu einem sehr sensitiven braunen Farbumschlag des Chromogens. Die Färbungen wurden mit einem ABC-Staining Kit durchgeführt.

2.9.2 Nachweis von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen

Für den Nachweis der Infiltration von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in das Tumorgewebe wurden die Gefrierschnitte zunächst für 30 sec in eiskaltem Methanol fixiert, 3x mit PBS gewaschen und 1 h mit der Blockierungslösung (Ziegenerum) in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden 50 µl/Schnitt des Primärantikörpers aufgetragen (1 Schnitt inkubierte weiterhin mit der Blockierungslösung als negativ- Kontrolle) und nach einstündiger Inkubation in der Feuchtkammer wieder 3x mit PBS gewaschen, worauf sich dann eine 30 minütige Inkubation mit dem sekundären Antikörper (50µl/Schnitt) anschloss. Im nächsten Schritt wurde die zuvor frisch angesetzte AB Lösung für 30 min aufgetragen und anschließend 4 min mit dem Peroxidase-Substrat-Mix inkubiert. Nach Waschen in destilliertem Wasser folgte die Gegenfärbung der Kerne mit Hämalaun (1:5 verdünnt) für 5 min und das Eindecken mit Aquatex. Zum Verlängern der Haltbarkeit der Schnitte wurden die Kanten des Deckgläschens mit Nagellack abgedichtet. Zur Auswertung der Schnitte wurden im 40er Objektiv unter dem Mikroskop je 20 GF verblindet ausgezählt. Anschließend wurden die GF auf mm³ umgerechnet (1GF = 1,17 mm³).

2.10 Statistik

Die grafische Darstellung und die statistische Auswertung erfolgten mit Hilfe des Programmes SPSS13. Da die Daten einer nicht parametrischen Verteilung entsprachen bzw. von einer Normalverteilung auf Grund der kleinen Tieranzahl pro Gruppe nicht ausgegangen werden konnte, erfolgte ihre Angabe und Berechnung als Median mit Spannweite. Als statistischer Test diente der parameterfreie U-Test (Mann-Whitney). Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Form von Box Plots, wobei die Box 50 % der Werte (zwischen der 25. und der 75. Perzentile), die mittlere Linie den Median und die senkrechten Linien die höchsten und niedrigsten Werte ohne Ausreißer- bzw. Extremwerte repräsentieren. Die Medianwerte wurden mit Linien verbunden, die *ausschließlich* als optisches Hilfsmittel *ohne inhaltliche Bedeutung* eine bessere Übersicht der Diagramme gewährleisten sollen. Ausreißer sind als kleine Kreise, Extremwerte als kleine Sterne dargestellt. Um statistisch signifikante Abweichungen festzulegen, wurde ein Signifikanzniveau von 5 % angenommen ($p < 0,05$). Da sich bei den Tumorkontroll- und Vehikeltieren zu den unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 7, 14, 21 und 28) im Vorfeld keine wesentlichen Unterschiede in den Ergebnissen ergaben, wurden die Parameter bei diesen Gruppen nur zum Ende des Beobachtungszeitraumes untersucht und entsprechend als ein Boxplot dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Überleben

Im Rahmen der Untersuchungen verstarben insgesamt vier Tiere. Betroffen waren davon jeweils ein Vehikeltier aus jeder Versuchsreihe (1 PBS-Vehikelkontrolltier, ein PlyC₁-Vehikelkontrolltier) und zwei mit SLS⁻ Bakterien behandelte Tiere. Die Therapie mit dem PlyC₁ Lysat hingegen führte zu keiner Letalität. Die Überlebensrate betrug 100 % (Abb. 8 a und b).

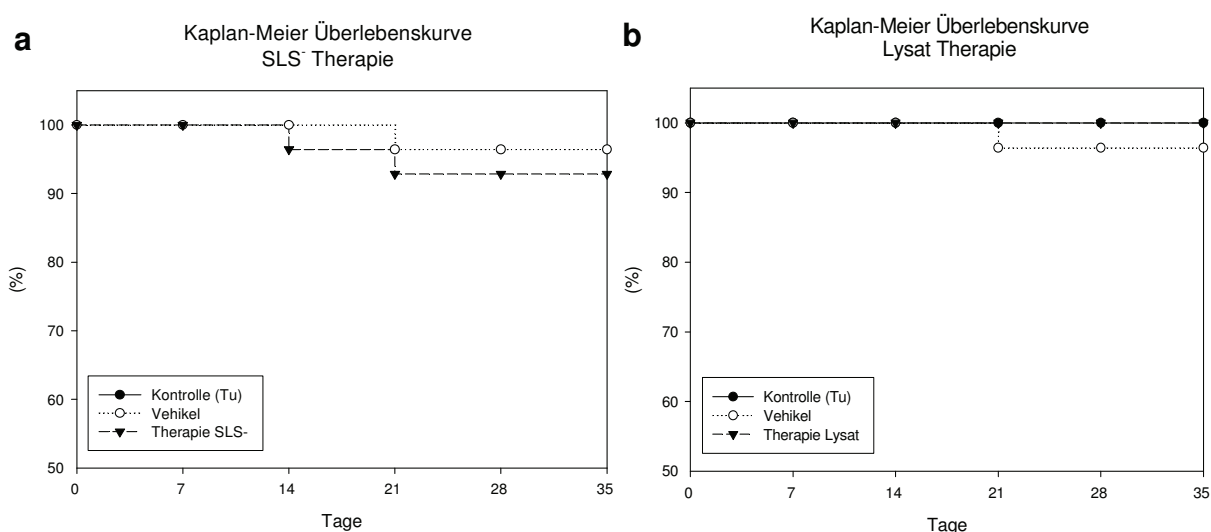


Abb. 8 a und b

Überlebenskurven der Tiere nach Kaplan-Meier ohne Intervention (Kontrolltiere) und mit Intervention (Vehikeltiere und Therapietiere)

Es ist jedoch zu bemerken, dass alle verstorbenen Tiere kleine (im Falle der Vehikeltiere) bis starke (im Falle der Therapietiere) ulzerierte Tumorbereiche und das Bild einer Sepsis mit Anorexie, Ataxie und Anämie aufwiesen. Da diese Tiere auch zu identischen Zeitpunkten nach Tumorinduktion erkrankten, was eine Infektion im Rahmen einer verunreinigten Tumorzellcharge vermuten läßt, wurden die Tiere aus dem Versuch genommen. Bei keinem der verstorbenen Tiere konnte ein direkter Zusammenhang mit der Bakterieninjektion festgestellt werden. Beide Therapieformen wurden von den Tieren gut toleriert und führten zu keiner Beeinträchtigung der Vitalität.

3.2 Wachstumsverlauf der Tumoren

Nach s.c. Injektion der Panc02 Zellen wuchsen die Tumoren bis Tag 9 (durchschnittlicher Interventionszeitpunkt) zu einem Volumen von 84,24 mm³ (37,44 – 487,38) heran. Ohne Intervention setzte sich das Tumorwachstum bei den Kontrolltieren kontinuierlich bis auf

1810,32 mm³ (666,24 – 2358,72) zum Ende des Beobachtungszeitraumes fort. Die Tumoren wiesen keine Ulzerationen auf (Abb.9 a), nur in einzelnen Fällen zeigten sich leichte Verkrustungen. Erreichten die Tumoren ein zu großes Volumen (über 2500 mm³), erfolgte aus ethischen Gründen die Euthanasie der Tiere. Makroskopisch imponierten die Tumoren bei der Präparation als gut durchblutetes homogenes Gewebe, mit zentralen Nekrosen. Die mit PBS behandelten Kontrolltiere zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren keine wesentlichen Unterschiede im Tumorwachstum und in der Tumormorphologie. Das mittlere Tumolvolumen lag am Ende des Beobachtungszeitraumes bei 1825 mm³ (937,44-1834,56) (Abb. 9 b).

Bei der mit der SLS⁻ Mutante behandelten Therapiegruppe kam es in den ersten ein bis zwei Wochen zunächst zu keiner sichtbaren Beeinflussung des Tumorwachstums, nachfolgend bildeten sich jedoch verkrustete, nekrotische oder ulzerierte Bereiche aus (Abb.9 c) und das Tumorwachstum blieb im Vergleich mit den Kontrollgruppen leicht zurück. Zu einem deutlichen Tumorrückgang auf 837,66 mm³ (341,64 – 1185,45) kam es allerdings erst am Ende des Beobachtungszeitraumes (Abb. 11 a). Diese partielle Remission war jedoch nicht so massiv und auch im zeitlichen Vergleich gegenüber der mit dem Wildtyp behandelten Therapiegruppe aus den Vorarbeiten verzögert (Maletzki et al. 2008).



Abb. 9 a, b und c

Tumoren eines Kontrolltieres ohne Intervention (a), eines PBS-Vehikelkontrolltieres (b) und eines Therapietieres (c) 3 Wochen nach i.t. Injektion der SLS⁻ Mutante mit ulzerierten, nekrotischen Bereichen

Da sich bei den mit dem Lysat behandelten Tieren nach zunächst nur einmaliger Injektion lediglich ansatzweise ein antitumoraler Effekt zeigte, wurde die Konzentration der lysierten Bakterien vor der Lyse erhöht (von 10⁶ cfu/ml auf 10⁹ cfu/ml) und eine zweite Injektion nach 4 Tagen durchgeführt. Daraufhin zeigten sich schon kurz nach der 2. Injektion erste Nekrosen und alle weiteren Tiere erhielten jeweils 2 Injektionen, welche im weiteren Verlauf zu einem deutlichen und den Kontrollgruppen (Kontrolltiere ohne Intervention und Vehikeltiere) gegenüber signifikanten Tumorrückgang auf 155,47 mm³ (0-399,36) führten. In 2 Fällen kam es sogar zu einer kompletten Remission (Abb. 10 a und b).

Bei Vehikelkontrolltieren, denen das PlyC₁ 2x injiziert wurde, zeigte sich gegenüber den PBS-Vehikelkontrolltieren eine leichte Tumorwachstumsverzögerung mit einem mittleren

Tumorzusatz von 1313,77 mm³ (599,29-2564,98). Dies war jedoch gegenüber den Kontrolltieren nicht statistisch signifikant (Abb. 11 a und b).

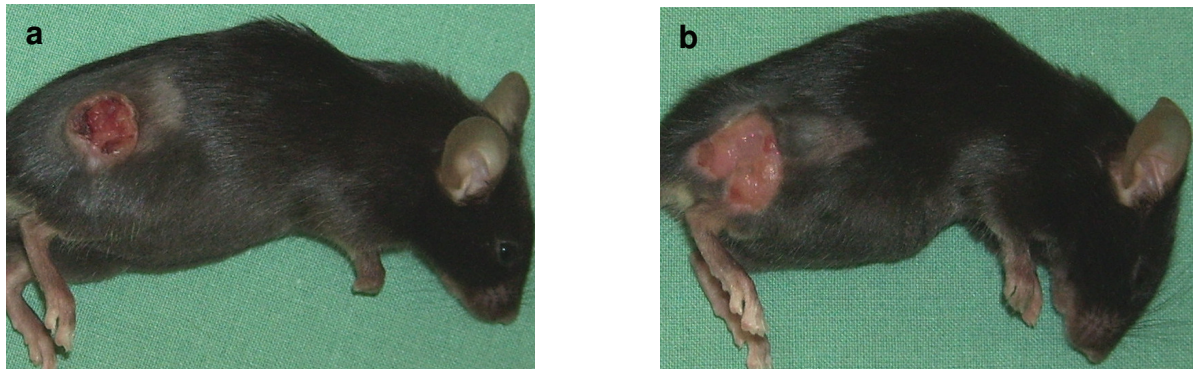


Abb. 10 a und b

Tumoren von Therapietieren 2 Wochen nach i.t. Injektion des Lysates: Deutlich nekrotischer und regressiver Tumor, zumeist blieb nur noch ein kleiner Randwall bestehen (a), 2 von 7 Mäusen zeigten sogar eine komplette Regression (b)

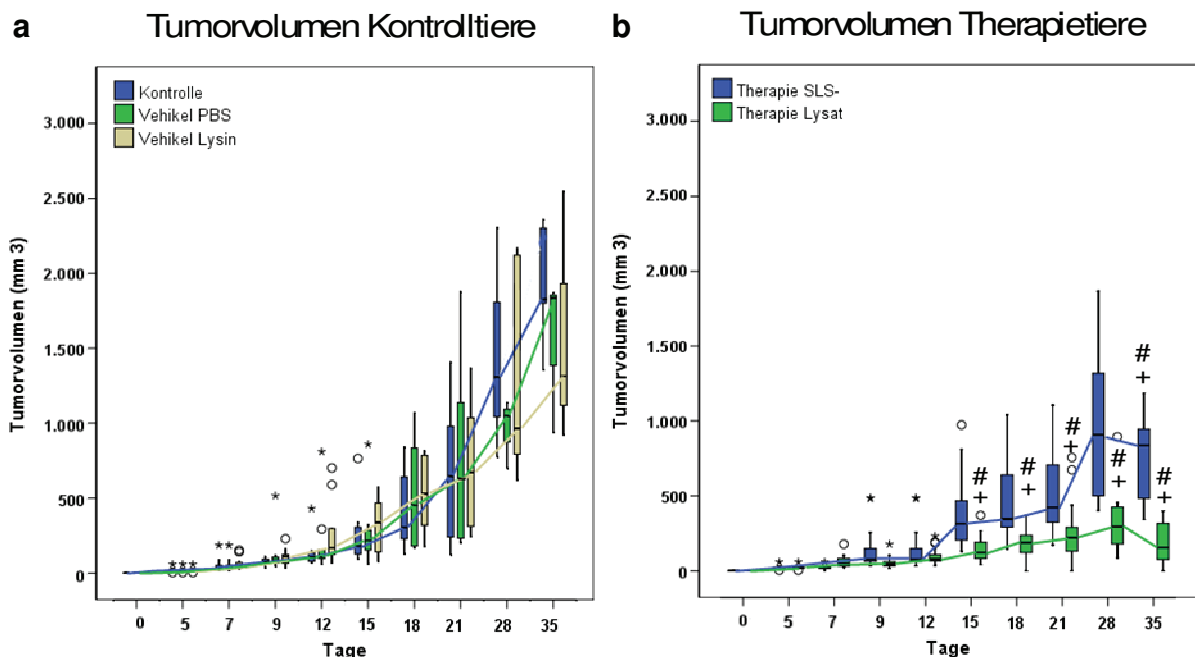


Abb. 11 a und b

Darstellung des Wachstumsverlaufs von Tumoren der Kontrolltiere (Tumorkontrollen ohne Intervention, nach PBS Injektion und nach PlyC₁ Injektion) (a) und der Therapietiere (nach SLS- Bakterien Infektion, bzw. Lysatinjektion) (b): Angegeben sind der Median und die Spannweite (x_{\min} - x_{\max}), parameterfreier U-Test (Mann-Whitney), # $p < 0,05$ vs. Kontrolle, + $p < 0,05$ vs. Vehikel, o/* Ausreißer

Anhand des Verlaufs der Tumorzusätze konnte somit eine geringe antitumorale Wirkung der SLS⁻ Mutante beobachtet werden, die das Wachstum jedoch nur verzögerte. Das Lysat der Wildtypstreptokokken hingegen wies ein stärkeres antitumorales Potential auf und induzierte in einigen Fällen sogar eine totale Tumorzusatzregression (Abb. 11 a und b).

3.3 Untersuchungsergebnisse zur systemischen Auswirkungen der Therapien

3.3.1 Blutbildanalyse

Um hämatologische Veränderungen infolge der einzelnen Interventionen zu erfassen, wurden Blutbilder von allen Tieren erstellt. Die Blutbildanalyse hierfür erfolgte im Rahmen der Präparation. Aus jeweils 200 µl EDTA Blut wurde ein kleines Blutbild (Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, MCV und MCH) bestimmt.

Dabei zeigte sich bei den mit SLS⁺ Bakterien behandelten Tieren gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren und den PBS-Vehikelkontrolltieren tendenziell eine leichte, transiente Leukozytose, welche besonders an den Tagen 7 und 21 zu beobachten war (Abb. 12 a). Von den anderen Parametern wiesen im Verlauf die Erythrozyten, das Hämoglobin, der Hämatokrit und die Thrombozyten eine deutliche Abnahme auf, die gegenüber der Kontrollgruppe ab dem Tag 14 statistisch signifikant war und auf eine Infektion hindeutete (Abb. 12 a - c). Auch gegenüber der PBS-Vehikelgruppe, die sich bis auf eine erniedrigte Anzahl an Thrombozyten kaum von der Kontrollgruppe unterschied, zeigte sich eine teils signifikante Abnahme dieser Parameter. Diese Konstellation ließ ein septisches Geschehen vermuten, wobei jedoch keine weiteren Verhaltensauffälligkeiten oder physische Zeichen einer Sepsis bei den Tieren beobachtet wurden.

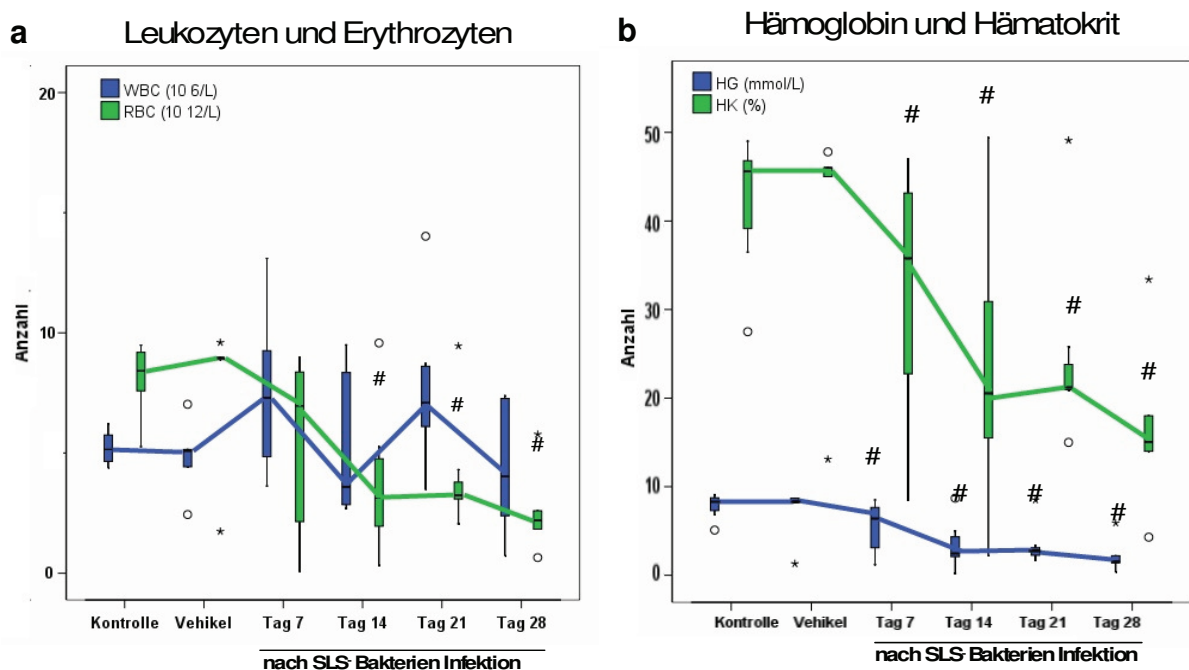
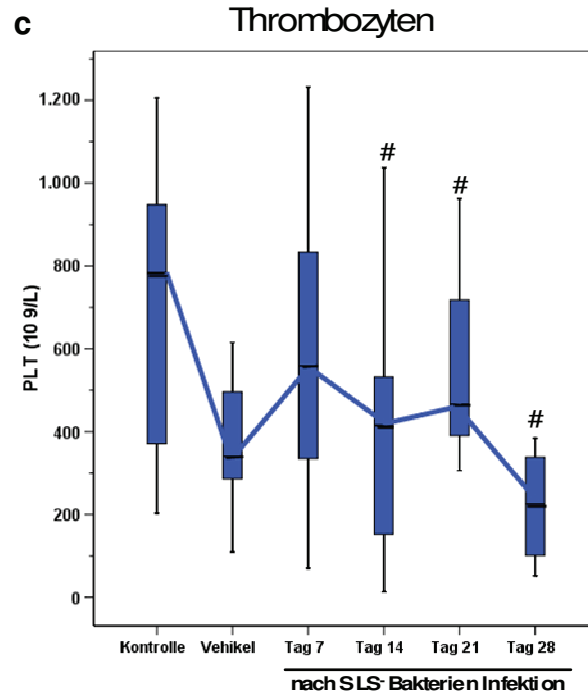


Abb. 12 a und b

Darstellung von Leukozyten, Erythrozyten (a), Hämoglobin und Hämatokrit (b) von mit SLS⁺ Bakterien behandelten Tieren (n=7 pro Zeitpunkt) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Kontrolle n=7, Vehikel n=6): Angegeben sind der Median und die Spannweite (x_{\min} - x_{\max}), parameterfreier U-Test (Mann-Whitney), # p<0,05 vs. Kontrolle, * p<0,05 vs. Vehikel, o Ausreißer

**Abb. 12 c**

Darstellung von Thrombozyten der mit SLS⁻ Bakterien behandelten Tiere (n=7 pro Zeitpunkt) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Kontrolle n=7, Vehikel n=6): Angegeben sind der Median und die Spannweite (x_{min}-x_{max}), parameterfreier U-Test (Mann-Whitney), # p<0,05 vs. Kontrolle, * p<0,05 vs. Vehikel, o Ausreißer

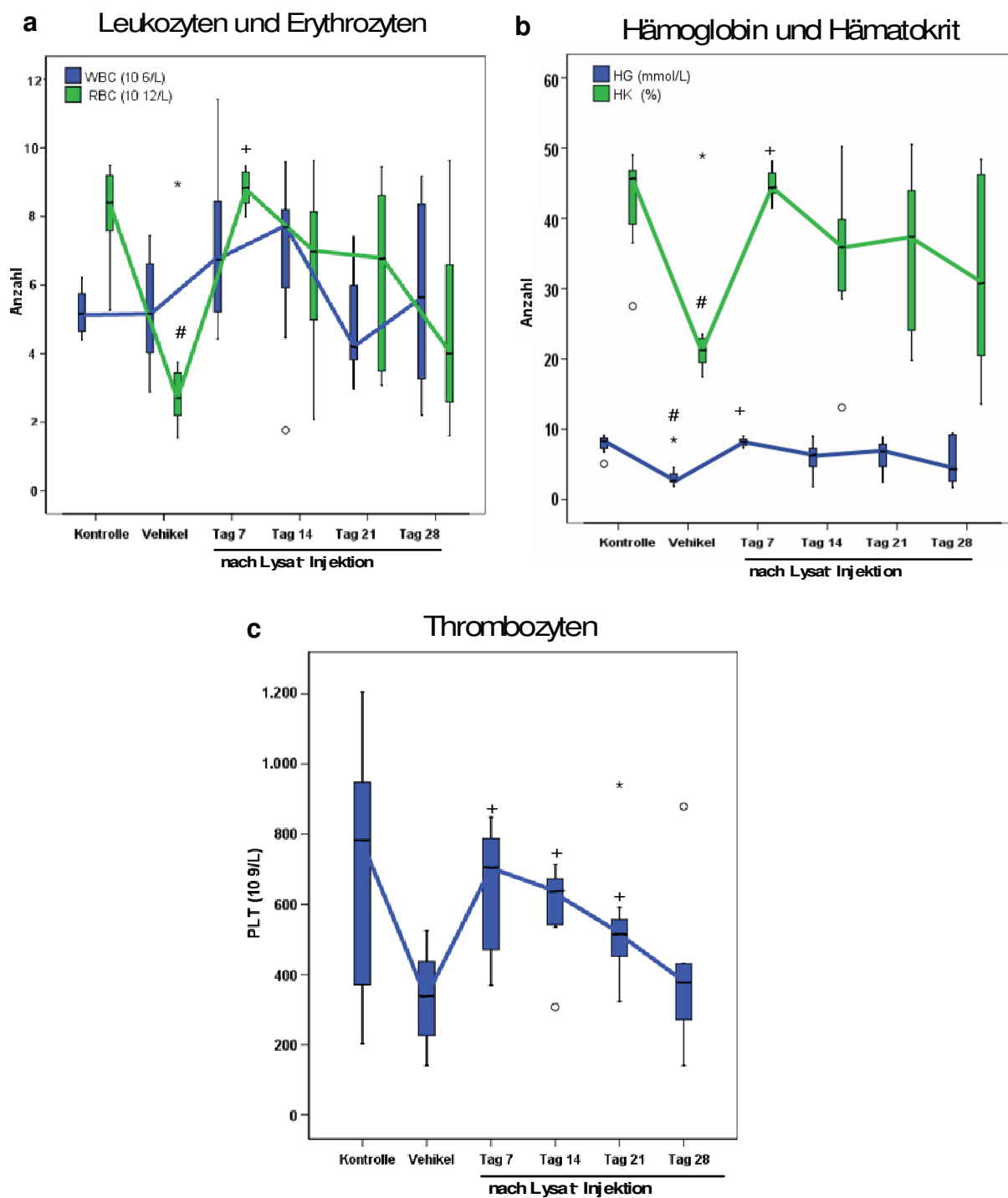
Das MCV stieg nach SLS⁻ Bakterieninjektion im Verlauf kontinuierlich leicht an, das MCH hingegen fiel kontinuierlich (nicht dargestellt).

Die PlyC₁-Vehikelkontrolltiere wiesen ebenfalls bei allen Blutparametern einen deutlichen und teilweise signifikanten Abfall gegenüber den Kontrolltieren auf, welche eine Auswirkung des Lysins *in vivo* im Vergleich zur PBS Vehikellösung vermuten lässt (Abb. 13 a - c).

Bei den mit Lysat behandelten Tieren kam es zu einem geringgradig transienten Anstieg der Leukozyten. Die Werte der Erythrozyten, des Hämoglobins, des Hämatokrits und der Thrombozyten waren verglichen mit der PlyC₁-Vehikelkontrollgruppe stets höher. Gegenüber der Kontrollgruppe nahmen sie im Verlauf zwar ab, die Reduktion war jedoch moderater als nach SLS⁻ Bakterieninjektion und zu keinem Zeitpunkt signifikant (Abb. 13 a - c).

Diese Befunde sprechen somit im Vergleich zu den mit vitalen SLS⁻ Bakterien erzielten Ergebnissen gegen eine hämatotoxische Auswirkung der lysierten Bakterien.

Das MCV stieg zum Ende des Beobachtungszeitraumes an, das MCH änderte sich im Vergleich zu den Kontrolltieren kaum (nicht dargestellt).

**Abb. 13 a - c**

Darstellung von Leukozyten, Erythrozyten (a), Hämoglobin, Hämatokrit (b), sowie Thrombozyten (c) von mit Lysat behandelten Tieren (n=7 pro Zeitpunkt) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Kontrolle n=7, Vehikel n=7): Angegeben sind der Median und die Spannweite (x_{\min} - x_{\max}), parameterfreier U-Test (Mann-Whitney), # $p < 0,05$ vs. Kontrolle, * $p < 0,05$ vs. Vehikel, o Ausreißer

3.3.2 Differentialblutbildanalyse

Zur detaillierteren Aufschlüsselung der Leukozyten erfolgte die Erfassung der Differentialblutbilder. Hierfür wurden aus dem frischen Vollblut manuell Ausstriche angefertigt und jeweils 100 Zellen ausgezählt.

Die Maus weist im Gegensatz zum Menschen ein mononukleär dominiertes Blutbild auf (Abb. 14 a), daher war bei den gesunden Kontrolltieren die Identifikation der Lymphozyten mit 79 % (71-84) als stärkster Anteil der Bluteukozyten auch erwartungsgemäß. Segmentförmige Granulozyten waren zu 17 % (8-27) vorhanden, stabförmige Granulozyten zu 3 % (1-5), Monozyten zu 1 % (1-5) und eosinophile und basophile Granulozyten jeweils unter 1 % (Tabelle 2).

Tab. 2

Differentialblutanalyse im Ausstrich von mit SLS⁻ Bakterien und Lysat behandelten Tieren (n=7 pro Zeitpunkt) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Gesund n=7, Kontrolle n=7, Vehikel n=7): Dargestellt ist jeweils der prozentuale Anteil an Leukozyten.

	Lymphozyten	Stabf. trophile nulozyten	segmkern. neutrophile Granulozyten	eosinophile Granulozyten	basophile Granulozyten	Monozyten
Gesund	79 (71-84)	3 (1-5)	17 (8-27)	0,76 (0-5)	0 (0)	1 (1-5)
Kontrolle	65 (52-80)	3 (2-10)	23,5 (10-46)	0 (2-5)	0 (0)	1 (0-4)
Vehikel PBS	71,5 (65-84)	2,5 (0-5)	24 (8-32)	1 (0-3)	0 (0)	3 (0-5)
Vehikel PlyC₁	72 (52-75)	3 (1-12)	23 (16-35)	1 (0-1)	0 (0)	2 (0-17)
SLS⁻ Therapie						
Tag 7	79 (38-94)	1 # (0-9)	17 (4-51)	0 (0-4)	0 (0)	2 (0-3)
Tag 14	49 (14-70)	6 (2-14)	42#+ (24-75)	0 (0-2)	0 (0-1)	4 (0-7)
Tag 21	40 (20-81)	1 # (0-4)	50 (9-76)	0 (0-2)	0 (0)	2 (0-5)
Tag 28	59,5 (30-73)	2 (1-8)	34,5 (25-60)	0 (0-1)	0 (0-1)	3 (0-6)
Lysat Therapie						
Tag 7	70 (53-75)	1 (0-4)	26 (13-45)	1 (0-2)	0 (0)	2 (1-5)
Tag 14	74 (53-83)	1 (0-5)	19 (10-34)	0 (0-2)	0 (0)	2 (0-7)
Tag 21	75 (22-91)	5 (0-8)	18 (4-63)	0 (0-2)	0 (0)	4 (1-7)
Tag 28	70 (37-81)	5 (3-8)	23 (13-55)	1 (0-3)	0 (0)	3 (1-4)

Angegeben sind der Median und die Spannweite (x_{\min} - x_{\max}), parameterfreier U-Test (Mann-Whitney), # $p < 0,05$ vs. Kontrolle, + $p < 0,05$ vs. Vehikel

Die Tumorkontroll- und beide Vehikelgruppen zeigten keine wesentlichen Unterschiede zu den gesunden Tieren. Die Zahl der Lymphozyten war jeweils leicht erniedrigt auf 65-71,5 % und die der Granulozyten leicht erhöht (24 %, Abb. 14 a und b). Dies kann jedoch auf die Tumorlast zurückgeführt werden.

Bei den mit SLS⁻ Bakterien behandelten Tieren kam es ab Tag 14 zu einer Abnahme der Lymphozyten und zu einer signifikanten Zunahme der segmentförmigen neutrophilen Granulozyten gegenüber der Tumorkontroll- und Vehikelgruppe (Abb. 14). Alle anderen Leu-

kozytensubpopulationen zeigten keine wesentlichen Veränderungen (Tab. 2). Somit ist der zuvor im Blutbild gemessene Anstieg der Leukozyten vor allem auf eine Granulozytose (Abb. 15 b) zurückzuführen, die als Ausdruck einer systemischen inflammatorischen Reaktion auf die Injektion vitaler Bakterien anzusehen ist.

Bei Tieren, die mit dem Lysat behandelt wurden, zeigten sich keine wesentlichen Veränderungen im Differentialblutbild, somit lagen systemisch nur geringe Auswirkungen der lysierten Bakterien vor.

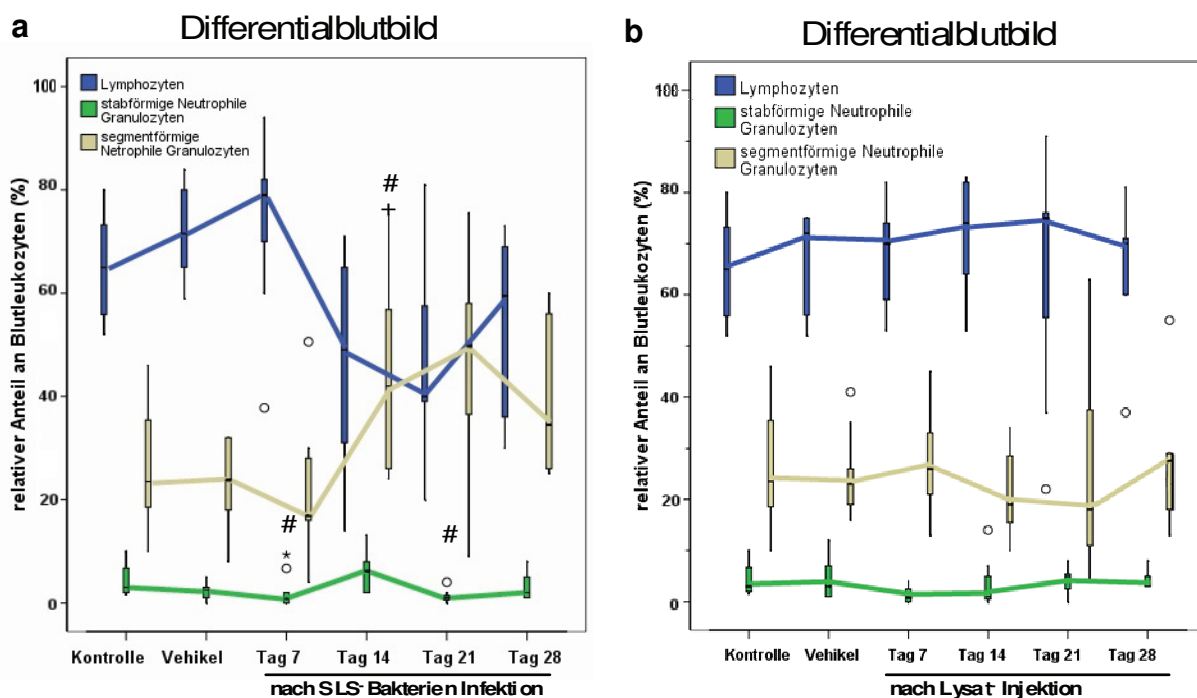
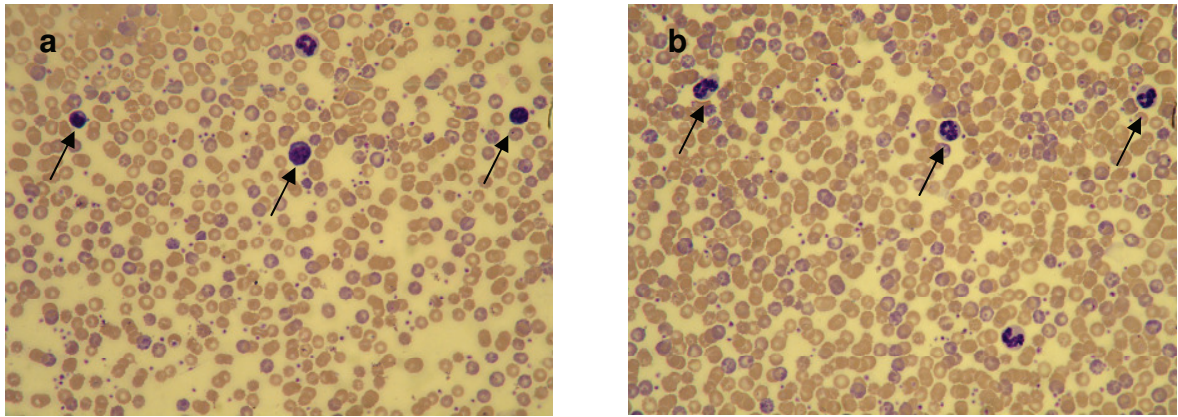


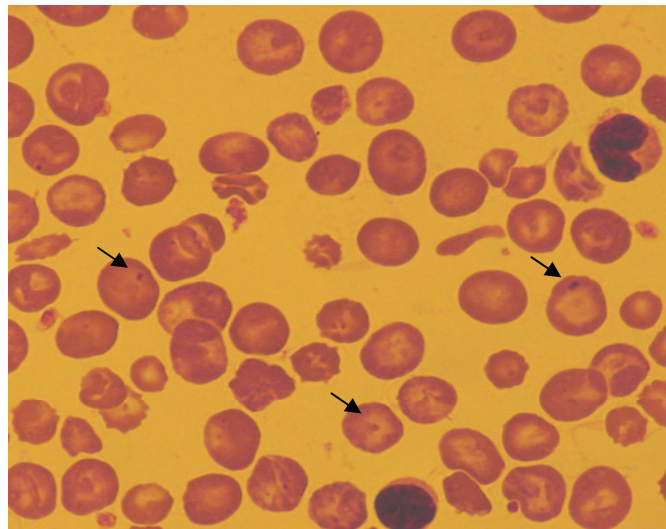
Abb. 14 a und b

Darstellung der relativen Anteile der Lymphozyten bzw. neutrophilen Granulozyten bezogen auf 100 ausgezählte Leukozyten von mit SLS-Bakterien und mit Lysat behandelten Tieren ($n=7$ pro Zeitpunkt) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Kontrolle $n=7$, Vehikel $n=7$): Angegeben sind der Median und die Spannweite ($x_{\min}-x_{\max}$). Parameterfreier U-Test (Mann-Whitney, # $p<0,05$ vs, Kontrolle, + $p<0,05$ vs. Vehikel, o Ausreißer

**Abb. 15 a und b**

Lichtmikroskopische Aufnahme (Original x 60) eines Blutausstriches von einem Kontrolltier (a) und von einem mit SLS⁺ Bakterien (b) behandelten Tier: Bei dem Tumorkontrolltier dominierten die Lymphozyten (Pfeile Abb. a), bei dem therapierten Tier hingegen die neutrophilen Granulozyten (Pfeile Abb. b).

Ein Nebenfund in der Auswertung der Blutausstriche stellte die Identifikation von Howell-Jolly-Körperchen in den Erythrozyten dar. Diese wurden bei allen Tieren (gesunde Tiere, Kontroll- und Therapietiere) gefunden (Abb. 16). Howell-Jolly-Körperchen sind chromosomale Resteinschlüsse der Erythrozyten, die normalerweise bei Asplenie oder starker Dysfunktion der Milz auftreten. Im Rahmen der Untersuchungen konnte jedoch keine eindeutige Korrelation zwischen der Häufigkeit der Howell-Jolly-Körperchen und der Milzgröße, der Therapie oder einem anderen Parameter festgestellt werden, weshalb dieser Befund vermutlich eine Normavarianz bei der verwandten Mausspezies ist.

**Abb. 16**

Lichtmikroskopisch Aufnahme (100x) eines Blutausstriches von einem mit SLS⁺ Bakterien behandeltem Tier mit Howell-Jolly-Körperchen (Pfeile)

3.3.3 Organbefunde

Die makroskopische Analyse der inneren Organe offenbarte keine pathologischen Veränderungen. Auffälligkeiten wurden ausschließlich bei der Größe der Milz festgestellt (Abb. 17). Bei den Vehikeltiergruppen zeigte sich nur vereinzelt eine leichte Splenomegalie. Die Milz bei der SLS⁻ Bakterien-Therapiegruppe hingegen war stark vergrößert ohne Auswirkung auf ihre Konsistenz. In den meisten Fällen war die Milz gegenüber den Kontrolltieren ca. doppelt so lang und breit (Abb. 18 a). Korrelierend mit der Größe der Milzen stieg bei den mit SLS⁻ Bakterien behandelten Tieren auch die absolute Anzahl der aus den Milzen isolierten Splenozyten an. Auch bei den mit dem Lysat therapierten Tieren war eine Splenomegalie zu beobachten, die jedoch nicht so massiv ausfiel und keine Erhöhung der absoluten Anzahl der aus den Milzen isolierten Splenozyten aufwies (Abb. 18 b).

Die Splenomegalie entwickelte sich somit insbesondere als Reaktion auf die lokale Infektion mit den Bakterien. Die SLS⁻ Bakterien verursachten eine massive, hypertrophe und hyperplastische Splenomegalie, das Wildtyp-Lysat hingegen nur eine moderatere, hypertrophe Splenomegalie.

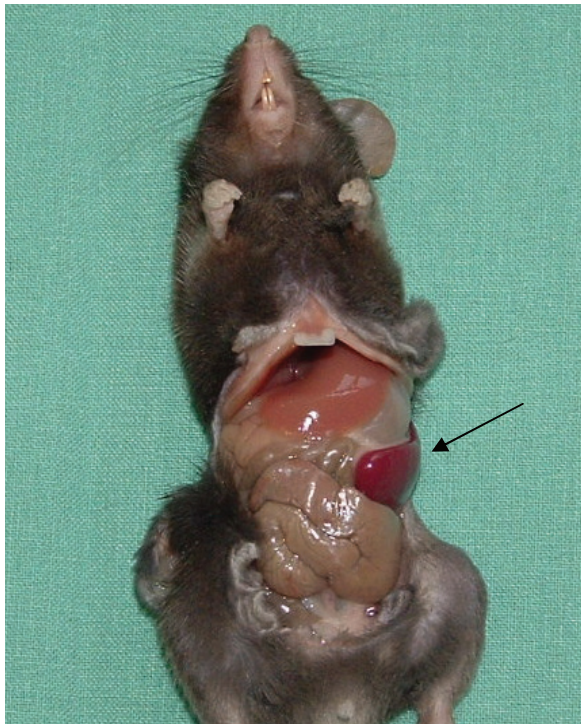


Abb. 17

Präparationssitus eines mit SLS⁻ Bakterien behandelten Tieres: Massiv vergrößerte, weit in den Bauchraum vorgewölbte Milz (s. Pfeil). Leber, Lunge und Nieren ohne Veränderungen in Größe oder Konsistenz

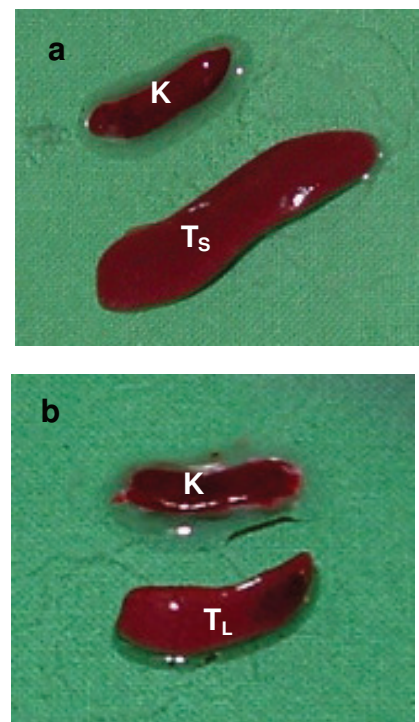


Abb. 18 a und b

Milzen von Tumorkontrolltieren (K), ca. 1,2 cm lang im Vergleich zu Milzen von Therapietieren:

Abb. 18 a: massiv vergrößerte Milz eines mit SLS⁻Bakterien (T_S) behandelten Tieres, ca. 2,5 cm lang

Abb. 18 b: nur leicht vergrößerte Milz eines mit Lysat (T_L) behandelten Tieres

3.3.4 Blut- und Organausstriche zum Nachweis einer systemischen Infektion

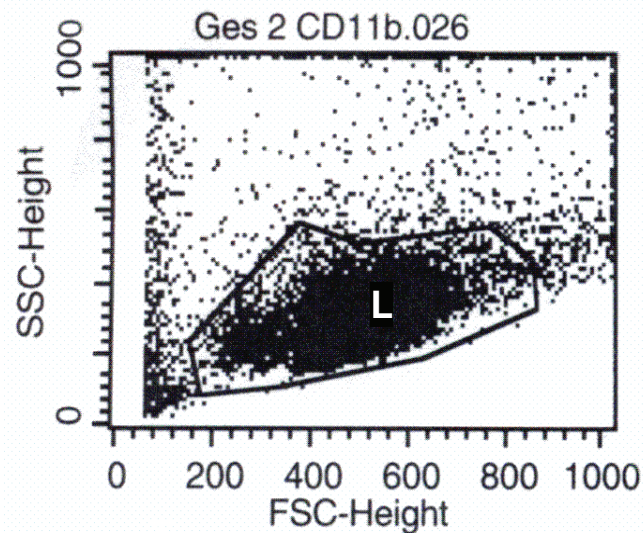
Um eine systemische Dissemination von Bakterien mit anschließender Infektion zu erfassen, wurden Blut und Gewebeproben von Lunge, Leber und Milz auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Sowohl bei den mit der SLS⁻ Mutante als auch mit dem Lysat behandelten Tieren konnte in keinem der Ausstriche eine bakterielle Kontamination nachgewiesen werden.

Die im Rahmen der Ausstriche erhobenen Ergebnisse belegen daher, dass nach i.t. Applikation keine starke Dissemination der vitalen Bakterien in den Organen nachweisbar war. Auf Grund einer eingeschränkten Sensitivität des Testes kann eine schwache Kontamination jedoch nicht ausgeschlossen werden.

3.3.5 Durchflusszytometrische Analyse der Effektorzellen

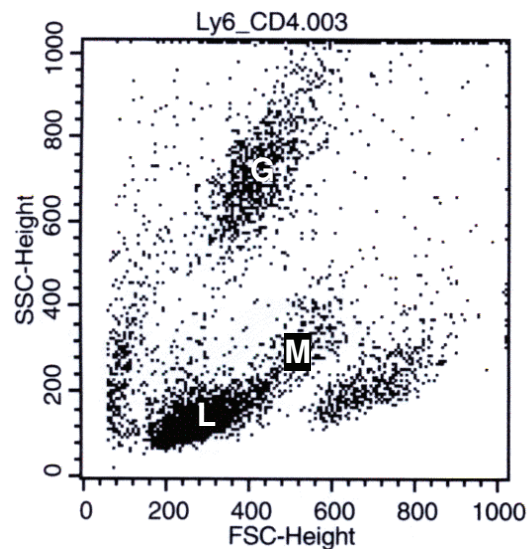
Um systemische Veränderungen der immunkompetenten Zellen verfolgen und deren Korrelation zum Tumorwachstum untersuchen zu können, wurden jeweils durchflusszytometrische Analysen aus Milzzellen (Splenozyten) und aus Vollblut (Blutleukozyten) durchgeführt. Die isolierten Zellen wurden mit einem Durchflusszytometer mittels FITC-gekoppelter Antikörper bezüglich ihrer Oberflächenantigene untersucht, um die prozentuale Zusammensetzung aus verschiedenen Zellpopulationen identifizieren und Veränderungen im Verlauf beurteilen zu können. Ebenso erfolgte die Auswertung der absoluten Werte der untersuchten Zellen (im Bezug zu der Anzahl der Leukozyten im Blutbild). Da sich hierbei jedoch zumeist keine für die Ergebnisse wesentlichen Abweichungen ergaben, wurde auf die zusätzliche Darstellung der Graphiken absoluter Werte im Folgenden verzichtet und nur die der relativen Zellpopulationsanteile dargestellt.

Bei der Untersuchung der Splenozyten bzw. Blutleukozyten wurde ein Gate um die gesamte Zellpopulation gesetzt, um avitale Zellen von der Messung auszuschließen (Abb. 19). Die Splenozytenpopulation stellte sich wie in Abb. 19 beschrieben dar.

**Abb. 19**

Darstellung der Splenozytenpopulation einer gesunden Maus im Dot Plot: Das Gate grenzt die lebenden (L) von den toten Zellen ab

Die Analyse des Vollblutes diente nun zur Erfassung von Korrelationen zwischen Splenozyten und Blutleukozyten. Hierbei wurden nach Elimination der Erythrozyten die Subpopulationen von Blutleukozyten in gleicher Weise wie bei den Splenozytenanalysen im Durchflusszytometer untersucht. In einem Plot konnten zunächst die einzelnen Populationen der Blutleukozyten dargestellt werden. Hierbei bestätigte sich, wie schon bei den Blutausstrichen, dass die Lymphozyten bei der gesunden Maus die stärkste Population darstellen (Abb. 15 a).

**Abb. 20**

Durchflusszytometrische Analyse von Blutleukozyten im FSC-SSC Plot:; Darstellung einzelner Populationen anhand ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC); granulaarme kleinere Lymphozyten (L) sind im unteren linken Bereich als stärkste Fraktion (Punktedichte) abgebildet; größere, granulareichere Monozyten (M) finden sich rechts unten; größere und granulareiche Granulozyten (G) sind rechts oben abgebildet

3.3.5.1 Analyse unspezifischer Effektorzellen aus Splenozyten

Als Marker für die unspezifische Immunabwehr wurden Antikörper gegen die Oberflächenmoleküle CD11b und Gr1 (Ly6G) eingesetzt. Das murine Oberflächenmolekül CD11b ist eine Untereinheit von einem Rezeptor für Komplement- (CR3), Fibrinogen und Endotheladhäsionsmoleküle, der v. a. auf Makrophagen, Monozyten und Granulozyten, sowie teils auch auf DZ exprimiert wird. Gr1 ist ein myeloides Differenzierungsantigen, das vor allem auf reifen Granulozyten exprimiert ist. Des Weiteren erfolgte die Messung der Marker CD11c (ein vor allem auf dendritischen Zellen exprimiertes Antigen) sowie NK1.1 (NK-Zellen). DZ und NK-Zellen spielen in ihrer Funktion jedoch nicht nur bei der unspezifischen, sondern auch der spezifischen Immunabwehr eine Rolle, wobei hier die DZ besonders im Übergang von unspezifischer zu spezifischer Immunreaktion und die NK-Zellen durch ihre ADCC (antikörperabhängige Zytotoxizität) und bei der Entstehung von Gedächtnis T-Zellen (Kelly et al. 2002) von Bedeutung sind (Coupland et al. 2000).

Bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen der Splenozyten wurden bei den tumortragenden Kontrolltieren 4,11 % (2,17-15,04) CD11b positive (+), 3,8 % (1,24-6,03) Gr1⁺, 2,86 % (1,77-6,91) CD11c⁺ und 8,34 % (3,88-16,54) NK1.1⁺-Zellen nachgewiesen (Tab. 3). Die Analyse der Splenozyten von den Vehikeltieren beider Gruppen zeigte keinen wesentlichen Unterschied, es kam lediglich zu einem leichten Anstieg aller vier gemessenen Populationen auf ca. 7 % bei CD11b, 5 % bei Gr1, 5 % bei CD11c⁺ und 10 % bei den NK1.1⁺-Zellen. Dies läßt sich als eine unspezifische Reaktion auf die jeweilige i.t. Injektion interpretieren (Tab. 3).

Tab. 3

Durchflusszytometrische Analysen der Splenozyten: Darstellung prozentualer Anteile der Splenozyten, die positiv für die angegebenen Oberflächenmoleküle gemessen wurden

	CD11b	Gr1	NK1.1	CD11c
Kontrolle	4,11 (2,17-15,04)	3,8 (1,24-6,03)	8,34 (3,88-16,54)	2,86 (1,77-6,91)
Vehikel PBS	7,09 (4,45-16,36)	6,91 (0,34-15)	11,61 (5,14-13,27)	4,83 (3,28-6,86)
Vehikel PlyC₁	7,97 (6,08-10,03)	4,35 (0,54-10,03)	9,91# (4,75-14,14)	5,78 (4,37-8,15)
SLS Therapie				
Tag 7	5,42 (2,89-9,19)	2,99 (1,16-8,89)	10,67 (7,75-13,43)	3,13 (2,59-5,34)
Tag 14	1,48#+ (0,94-4,59)	1,98 (0,34-2,58)	8,21 (4,85-13,45)	2,16 (1,2-2,82)
Tag 21	3,89# (1,55-5,04)	2,18 (4,85-13,45)	5,97 (4,53-7,31)	1,43 (0,01-3,69)
Tag 28	6,45 (0,72-16,1)	7,91 (1,2-2,82)	14,38 (4,91-39,34)	3,17 (1,43-4,98)
Lysat Therapie				
Tag 7	14,85#+ (9,8-23,77)	9,61#+ (5,46-16,48)	13,39#+ (9,53-21,5)	7,81#+ (6,65-10,97)
Tag 14	14,65#+ (8,72-19,77)	10,06#+ (2,33-18,36)	11,71# (5,7-42,25)	9,09# (4,88-11,16)
Tag 21	13,33#+ (7,77-16,6)	6,75 (1,59-15,86)	16,47# (7,54-28,16)	7,5 (4,45-11,08)
Tag 28	13,85#+ (7,17-17,39)	6,65 (2,16-10,63)	17,16# (10,95-40,25)	6,76#+ (6,07-11,89)

Angegeben sind jeweils Median und Spannweite (x_{\min} - x_{\max}), parameterfreier U-Test (Mann-Whitney); # p<0,05 vs. Kontrolle, + p<0,05 vs. Vehikel

Bei Tieren, denen die SLS⁻ Mutante i.t. injiziert wurde, zeigte sich bei allen untersuchten Splenozytenpopulationen ein ähnlicher Verlauf: Nach transients Abnahme, welche bei den Granulozyten und Makrophagen an Tag 14 signifikant war, konnte ein terminaler Anstieg beobachtet werden.

Der Anteil CD11b⁺, Gr1⁺ (Abb. 21 a), sowie CD11c⁺ Zellen (Abb. 21 b) stieg wieder auf das Niveau der Ausgangswerte. Die NK-Zellen zeigten darüber hinaus zum Zeitpunkt 28 Tage eine Zunahme auf 12,72 % (4,91-39,34) (Abb. 21 b).

Die transiente Abnahme von Granulozyten und Makrophagen in der Milz deutete somit auf die Rekrutierung der Zellen in das Tumorgewebe hin, welche auch mit dem Anstieg des Anteils an Granulozyten im Differentialblutbild zu vereinbaren ist.

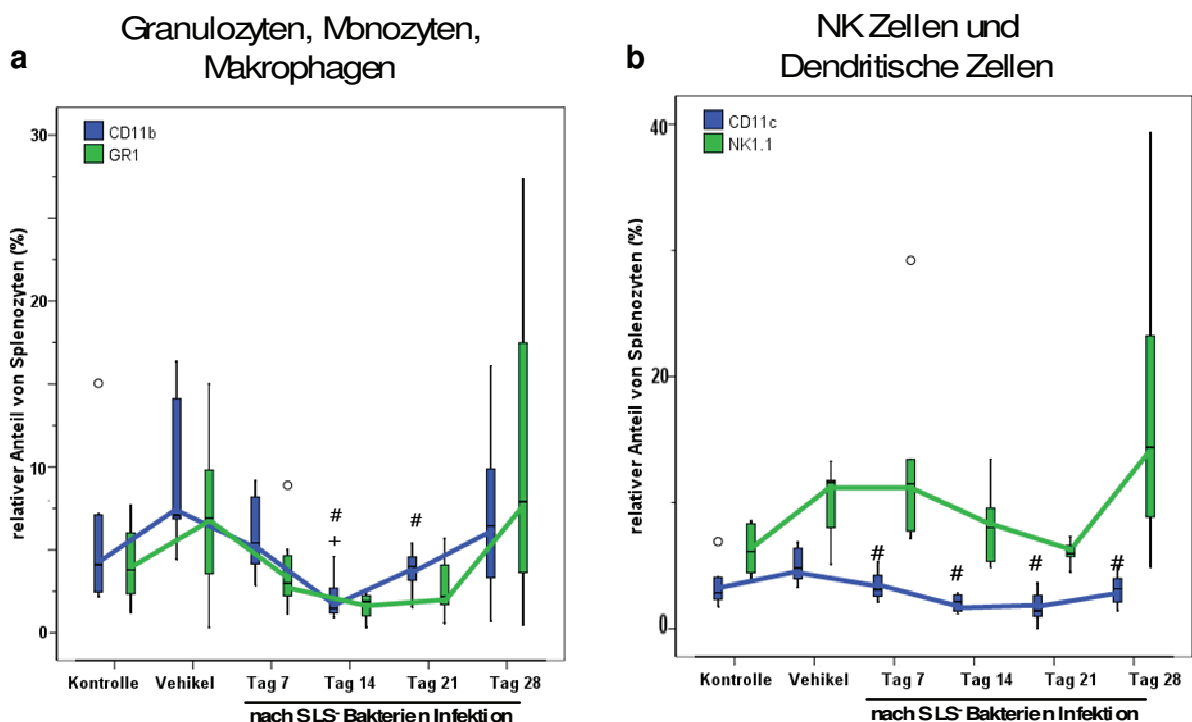
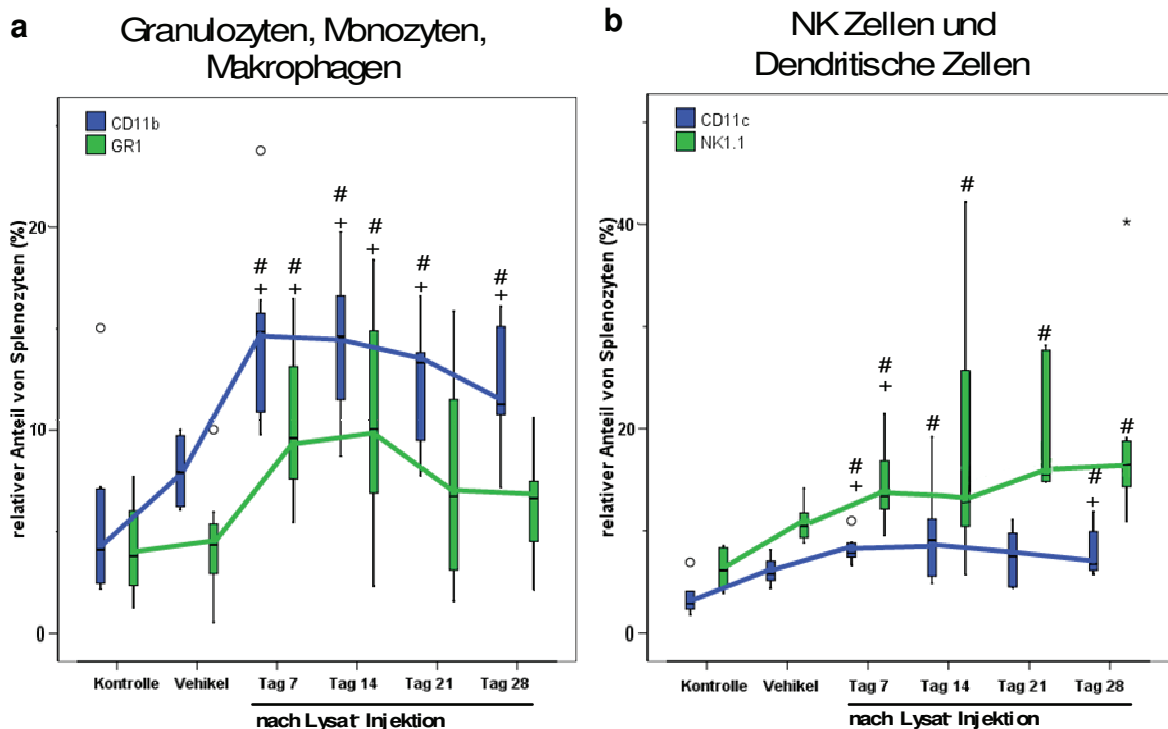


Abb. 21 a und b

Durchflusszytometrische Analyse der Splenozyten von mit SLS⁻ Bakterien behandelten Tieren (n=7 pro Zeitpunkt) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Kontrolle n=7, Vehikel n=5): Darstellung relativer Anteile an Splenozyten, welche für die Oberflächenmoleküle CD11b, Gr1 (a) bzw. NK1.1 und CD11c (b) positiv waren, angegeben sind der Median und die Spannweite (x_{\min} - x_{\max}), parameterfreier U-Test (Mann-Whitney): # $p < 0,05$ vs. Kontrolle, o Ausreißer

Bei den mit Lysat behandelten Tieren kam es dagegen zu einem signifikanten Anstieg der Granulozyten und Makrophagen mit Maximalwerten an Tag 7 und 14 auf ca. 12 % der Population. In weiteren Verlauf nahm die Anzahl jedoch ab (Abb. 22 a). DZ und NK-Zellen stiegen kontinuierlich und den Kontrollgruppen gegenüber signifikant bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes an (Abb. 22 b) und deuten damit auf den Übergang in eine spezifischen Immunreaktion hin.

**Abb. 22 a und b**

Durchflusszytometrische Analyse der Splenozyten von mit Lysat behandelten Tieren (n=7 pro Zeitpunkt) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Kontrolle n=7, Vehikel n=7): Darstellung relativer Anteile an Splenozyten, welche für die Oberflächenmoleküle CD11b, Gr1 (a) bzw. NK1.1 und CD11c (b) positiv waren, angegeben sind der Median und die Spannweite (x_{\min} - x_{\max}), parameterfreier U-Test (Mann-Whitney): # $p < 0,05$ vs. Kontrolle, + $p < 0,05$ vs. Vehikel, o/* Ausreißer

3.3.5.2 Analyse unspezifischer Effektorzellen aus Blutleukozyten

Bei der Analyse nicht-adaptiver Effektorzellen im Blut zeigten sich innerhalb der Kontrollgruppen (Tumorkontroll- und Vehikelgruppen) keine signifikanten Unterschiede bezüglich der einzelnen Leukozytenpopulationen. Der Anteil Gr1⁺ Zellen betrug ca. 23 % und der Anteil CD11b⁺ Zellen 30 %. NK-Zellen wurden im peripheren Blut mit ca. 15 % detektiert (Tab. 4). Die Zellpopulationen sind somit physiologisch weitaus stärker im peripheren Blut als in der Milz vertreten (s. 3.3.5.1.)

Tab. 4

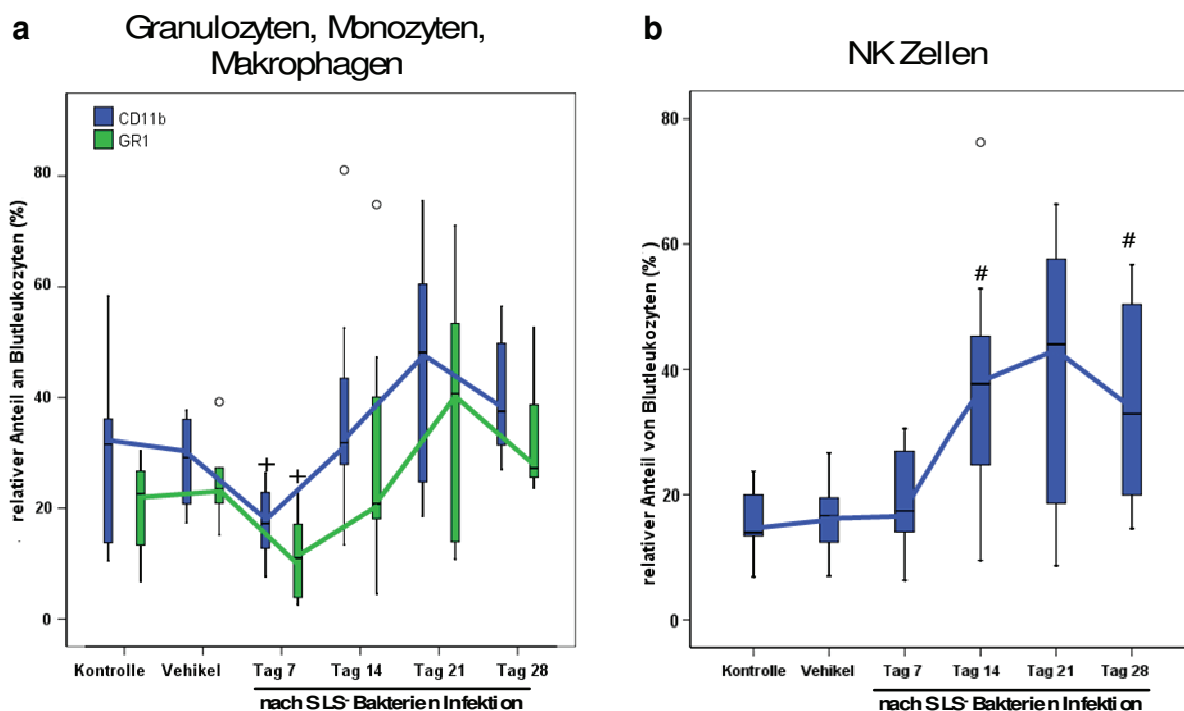
Durchflusszytometrische Analysen der Blutleukozyten: Darstellung prozentualer Anteile der Blutleukozytensubpopulationen, die positiv für die angegebenen Oberflächenmoleküle gemessen wurden

	CD11b	Gr1	NK1.1
Kontrolle	31,59 (10,51-58,34)	22,66 (6,84-30,45)	13,95 (6,89-23,75)
Vehikel PBS	29,2 (17,36-37,73)	23,61 (15,23-39,23)	16,66 (7-26,66)
Vehikel PlyC₁	32,74 (20,33-57,11)	21,38 (11,66-40,31)	16,05 (7,41-48,48)
SLS⁻ Therapie			
Tag 7	17,54+ (7,65-26,48)	8,17+ (2,61-23,43)	14,73 (6,31-30,53)
Tag 14	31,85 (13,46-52,58)	20,85 (4,95-74,88)	37,67[#] (9,47-76,22)
Tag 21	48,2 (18,51-75,58)	40,76 (10,83-44,72)	44,02 (8,65-66,33)
Tag 28	37,52 (27,01-56,52)	27,27 (23,71-52,63)	32,88+ (14,57-56,68)
Lysat Therapie			
Tag 7	29,03 (20-50,01)	18,73 (14,71-41,56)	23,18 (9,83-45,51)
Tag 14	34,12 (22,35-67,61)	25,8 (9,33-62,96)	24,62 (15,93-70,17)
Tag 21	28,96[#] (17,69-67,47)	22,13[#] (10,02-63,8)	25,06^{#+} (18,97-71,76)
Tag 28	51,26[#] (18,69-67,1)	35,98[#] (9,92-60,25)	37,84[#] (24,03-61,09)

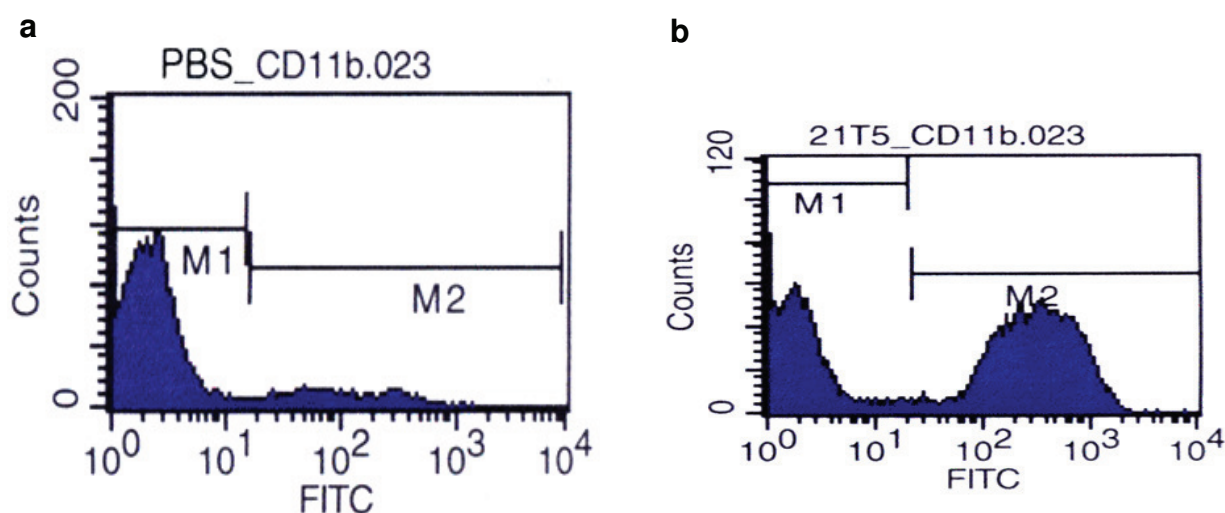
Angegeben sind jeweils Median und Spannweite (x_{\min} - x_{\max}), parameterfreier U-Test (Mann-Whitney); # $p < 0,05$ vs. Kontrolle, + $p < 0,05$ vs. Vehikel

Bei der mit SLS⁻ Bakterien behandelten Gruppe zeigte sich ein zu den Splenozyten konträrer Verlauf hinsichtlich der Anzahl der untersuchten Zellen: Nach einem leichten initialen Abfall an Tag 7 kam es zu einer deutlichen Zunahme CD11b⁺ und Gr1⁺ Zellen (über 40 %) (Abb. 24 b). Im weiteren Verlauf zeigte sich dann ein leichter Rückgang, der Anteil CD11b⁺ und Gr1⁺ Zellen lag jedoch immer noch über dem Niveau der Kontrolltiere (Abb. 23 a). Dies lässt auf einen starken proinflammatorischen Stimulus schließen. Dieser konträre Verlauf bestätigt damit auch die vermutete Rekrutierung der Zellen aus der Milz in das periphere Blut.

Der Anteil der NK-Zellen war zu allen untersuchten Zeitpunkten gegenüber den Kontrolltieren erhöht, nahm gegen Ende jedoch wieder tendenziell ab. An Tag 7 konnten 14,73 % (6,31-30,53) der Zellen als positiv detektiert werden. 28 Tage nach Intervention betrug der Anteil NK1.1⁺-Zellen 32,88 % (14,57-56,68). (Abb. 2 b). Somit konnte ebenfalls eine inflammationsbedingte Migration dieser Zellen aus der Milz in die Peripherie beobachtet werden.

**Abb. 23 a und b**

Durchflusszytometrische Analyse der Bluteukozyten von mit SLS⁻ Bakterien behandelten Tieren (n=7 pro Zeitpunkt) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Kontrolle n=7, Vehikel n=5): Darstellung relativer Anteile an Leukozyten, welche für die Oberflächenmoleküle CD11b, Gr1 (a) bzw. NK1.1 (b) positiv waren, angegeben sind der Median und die Spannweite (x_{\min} - x_{\max}), parameterfreier U-Test (Mann-Whitney), + p<0,05 vs. Vehikel, o Ausreißer

**Abb. 24 a und b**

Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse von Bluteukozyten eines PBS-Vehikelkontrolltieres (a) und von einem Therapietier 3 Wochen nach SLS⁻ Bakterieninjektion (b), Darstellung der Expression des Oberflächenmoleküls CD11b: Der Peak unter M1 Peak entspricht den CD11b⁻ Zellen, der Peak unter M2 entspricht den CD11b⁺ Zellen, die Anzahl positiver Zellen ist nach therapeutischer Intervention deutlich höher

Durch die Behandlung mit dem Lysat konnte eine derartige Korrelation im Sinne einer granulozytären und monozytären Migration aus der Milz in das periphere Blut nicht beobachtet werden. Der Anstieg der unspezifischen Effektorzellen in der Milz während der akuten und postakuten Phase ging auch nicht mit einem entsprechend ausgeprägten Anstieg im peripheren Blut einher, was in Konkordanz zu den Differentialblutbildanalysen steht. Erst zu späteren Zeitpunkten wurde in der Milz eine Abnahme der unspezifischen Effektorzellen (jedoch nicht unter den Ausgangswert fallend) und im peripheren Blut ein signifikanter Anstieg nachgewiesen (CD11b auf 51,26 % (18,69-67,1) und Gr1 auf 35,98 % (9,92-60,25)) (Abb. 25 a).

Die NK-Zellen nahmen wie schon in der Milz kontinuierlich und signifikant, insbesondere zum Ende des Beobachtungszeitraumes auf 37,84 % (24,03-61,09, Abb. 25 b, 26 b) hin zu. Diese im Vergleich zu den Kontrolltieren auffällige Erhöhung der NK-Zellen in Milz und Blut zum Ende des Beobachtungszeitraumes deutet auf die Entwicklung einer spezifischen Abwehr beispielsweise im Rahmen eines ADCC oder der Entstehung von Gedächtnis T-Zellen hin.

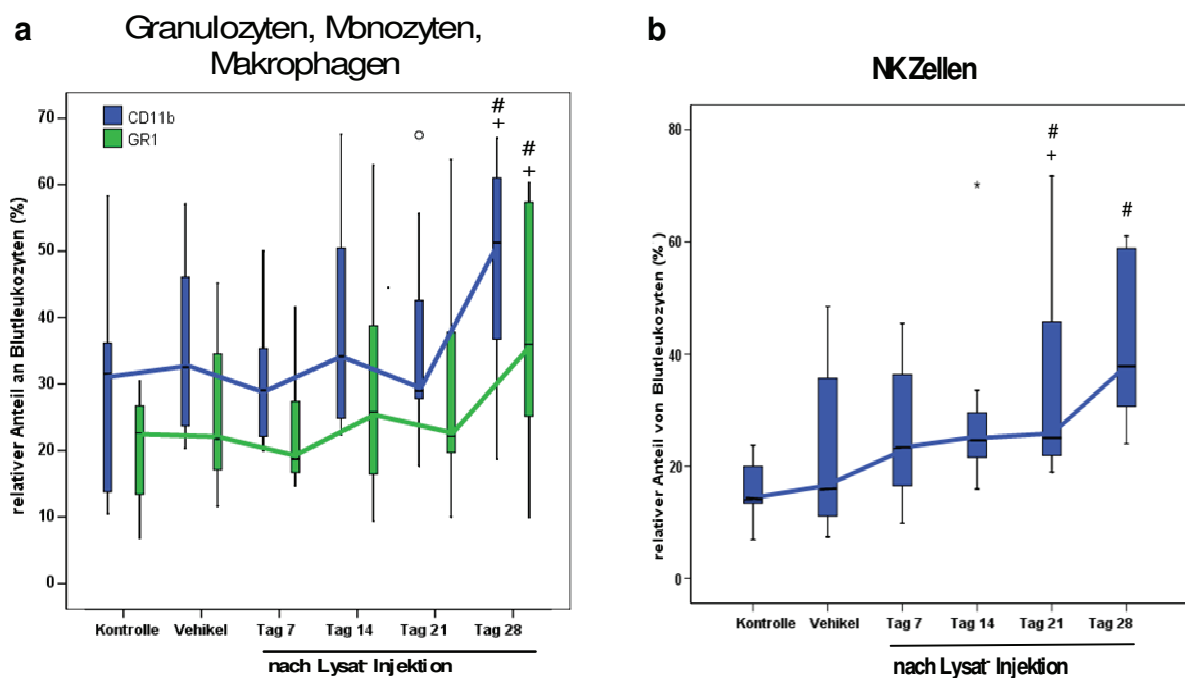


Abb. 25 a und b

Durchflusszytometrische Analyse der Blutleukozyten von mit Lysat behandelten Tieren (n=7 pro Zeitpunkt) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Kontrolle n=7, Vehikel n=7): relative Anteile an Leukozyten, welche für die Oberflächenmoleküle CD11b, Gr1 (a) bzw. NK1.1 (b) positiv waren, angegeben sind der Median und die Spannweite (x_{\min} - x_{\max}), parameterfreier U-Test (Mann-Whitney), + p<0,05 vs. Vehikel, o Ausreißer

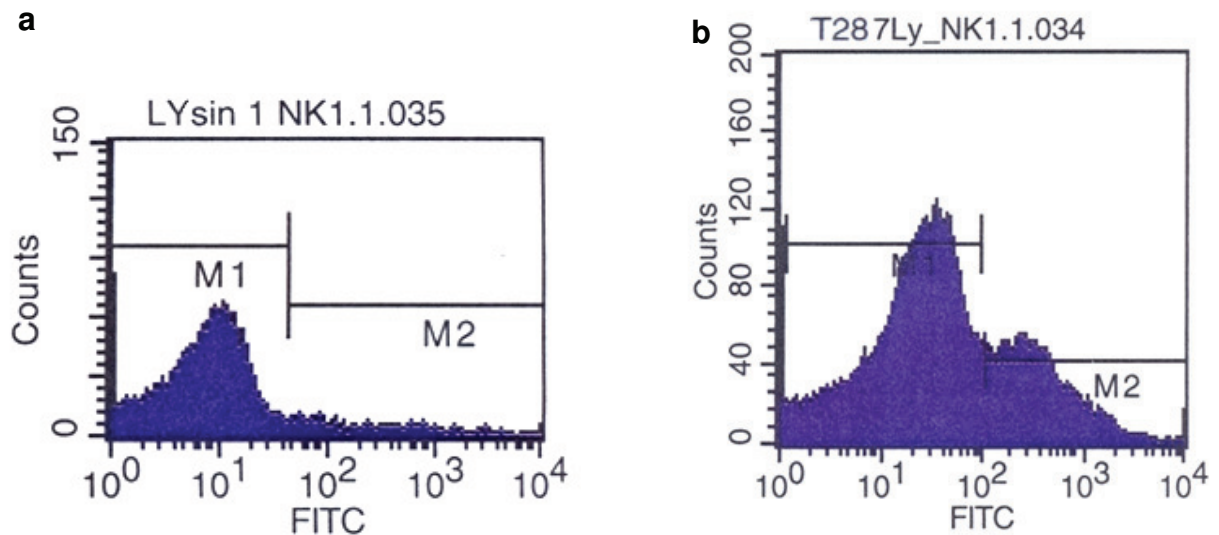


Abb. 26 a und b

Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse von Blutleukozyten eines Vehikel- (a) und eines Lysattherapietieres 4 Wochen nach Behandlung (b), Darstellung der Expression des Oberflächenmoleküls NK1.1 von natürlichen Killerzellen: Der Peak unter M1 entspricht den NK1.1⁺ Zellen, der Peak unter M2 den NK1.1⁺ Zellen, die Anzahl positiver Zellen ist nach therapeutischer Intervention deutlich erhöht.

Die Analyse unspezifischer Effektorzellen zeigt somit, dass die Injektion der SLS⁻ Mutante eine starke proinflammatorische Reaktion induzierte, welche mit einer Mobilisierung der Zellen aus der Milz in das periphere Blut verbunden war, was auch die nachgewiesene systemische Granulozytose im Differentialblutbild unterstützt. Eine solche Auswirkung konnte nach Applikation des Lysates nicht beobachtet werden.

Der systemische Anstieg von NK-Zellen und DZ insbesondere zum Ende des Beobachtungszeitraumes hin als Zeichen eines Übergangs in die spezifische Immunabwehr war nach Lysatbehandlung deutlicher und höher als bei den mit der SLS⁻ Mutante therapierten Tieren.

3.3.5.3 Analyse spezifischer Effektorzellen aus Splenozyten

Zur Detektion von T-Zellen wurden Antikörper gegen den T-Zellrezeptorkomplex CD3, welcher auf allen reifen T-Zellen exprimiert ist, gegen CD4 (T-Helfer Zellen) und CD8a (zytotoxische T-Zellen) eingesetzt. B-Zellen wurden nach Markierung mit einem anti-CD19 Antikörper nachgewiesen. CD19 ist ein Differenzierungsantigen der B-Zellen, welches besonders bei der Differenzierung zu reifen B-Zellen exprimiert und bei reifen Plasmazellen wieder herunterreguliert wird. Zusätzlich wurden die Zellen auf die Expression von CD40 untersucht, einem auf B-Zellen und Makrophagen exprimierten Rezeptor, bei dessen Ko-Stimulation durch CD4⁺ T-Zellen (als „second signal“ neben der Stimulation durch ein Antigen) es zur Differenzierung und Wachstum der B-Zellen bzw. zur Zytokinausschüttung bei Makrophagen kommt (Janeway & Travers 1999). Als Marker für die T-Zellaktivierung wur-

den Antikörper gegen die Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 (auch bekannt als B7.1 und B7.2) eingesetzt, sowie Antikörper gegen CD25. CD80 und CD86 sind auf APZ exprimierte Moleküle, die zur Kostimulation von zytotoxischen T-Zellen benötigt werden, wobei CD80 vor allem auf B-Zellen exprimiert wird und CD86 auf allen APZ (Monozyten, DZ und aktivierten B-Zellen) vorkommt. CD25 (IL-2 Rezeptor α - Kette) wird bei Aktivierung von T-Zellen hochreguliert (wobei ebenso auch auf Monozyten und B-Zellen bei Aktivierung derselben eine Hochregulation erfolgt). Infolge der T-Zellaktivierung werden dann die kostimulatorischen Moleküle CD40L, CD80 bzw. CD86 hochreguliert, die zur weiteren Immunstimulierung beitragen.

Der Anteil CD3⁺ T-Zellen betrug bei den Tumorkontrolltieren 33,06 % (15,05-48,88) der Splenozyten und der Anteil der B-Zellen 28 %. CD80 und CD86 wurden bei 10,68 % (7,23-26,29) bzw. 1,76 % (0,25-11,98) der Zellen detektiert. Der Anteil CD25⁺ Zellen lag bei 7,37 % (3,11-12,19). Bei den Vehikelkontrolltieren wurden keine wesentlichen Unterschiede bei den T-Zellen nachgewiesen (Tab. 4).

Tab. 4

Durchflusszytometrische Analysen der Splenozyten: Darstellung prozentualer Anteile der Splenozyten, die positiv für die angegebenen Oberflächenmoleküle gemessen wurden

	CD3	CD4	CD8	CD19	CD40	CD25	CD80	CD86
Kontrolle	33,06 (15,05-48,08)	12,83 (4,97-20,71)	8,4 (4,97-20,71)	26,74 (6,72-47,03)	29,86 (6,47-45,28)	7,37 (3,11-12,19)	10,68 (7,23-26,29)	1,76 (0,25-11,98)
Vehikel PBS	32,03 (6,84-33,24)	13,2 (3,87-17,39)	8,24 (2,75-8,86)	36,34 (12,9-41,43)	49,78 (11,92-58,89)	4,61 (4,61-12,2)	13,46+ (7,51-18,79)	5,24 (1,54-9,55)
Vehikel PlyC₁	17,46 (9,84-29,24)	4,8 (2,34-18,66)	3,84 (2,48-13,61)	22,45 (10,6-48,35)	27,91 (13,69-46,28)	8,48 (5,62-11,63)	16,32 (6,51-2284)	6,38 (0,12-27,24)
SLS⁻ Therapie								
Tag 7	30,4 (13,89-49,41)	8,45 (3,55-16,41)	6,57 (2,81-11,45)	32,29 (8,46-44,77)	37,3#+ (16,83-47,28)	5,94# (3,93-7,5)	16,89#+ (6,78-43,44)	7,95 #+ (0,98-22,56)
Tag 14	8,53#+ (4,85-38,03)	2,44 (1,63-13,69)	2,24 (1,63-9,55)	9,97 (4,21- 42,81)	12,54#+ (7,52-43,71)	4,35#+ (0,01-7,23)	15,03#+ (5,46- 23,61)	1,44 (0,41-5,62)
Tag 21	10,59 (3,65-26,71)	4 (1,58-12,02)	5 (7,19-7,69)	14,6 (6,84-41,88)	16,59+ (7,29-25,86)	4,44#+ (2,96-18,66)	7,3#+ (5,77-23,15)	1,25 # (0,11-2,9)
Tag 28	12,05 (5,53-30,13)	3,31 (2,1-11,12)	3,15 (1,02-5,55)	11,43 (3,93-18,22)	26,52 (13,86-45,63)	7,55#+ (4,38-10,68)	15,83#+ (10,06-8,22)	3,02 (0,99-14,61)
Lysat Therapie								
Tag 7	27,77+ (23,8-33,67)	11,24+ (5,89-14,31)	7,73+ (6,45-9,34)	50,33 (42,09-56,23)	61,1 (54,16-69,08)	15,43# (4,98-20,41)	26,7#+ (13,68-38,15)	9,25 (2,53-17,86)
Tag 14	27,32+ (18,25-32,14)	9,21 (3,47-11,92)	8,19+ (4,09-13,75)	40,68 (28,32-53,75)	48,59 (40,91-65,54)	17,6#+ (11,73-26,12)	27,04#+ (11,04-33,59)	13,26#+ (6,46-16,04)
Tag 21	29,5+ (15,41-37,58)	10+ (4,7-17,47)	7,42 (3,59-15,5)	35,37 (16,89-54,19)	44,55 (41,36-66,35)	17,17#+ (8,67-26,27)	29,05#+ (10,82-42,25)	15,07 (3,43-32,07)
Tag 28	23,16+ (9-35,73)	9,21 (2,55-16,34)	5,93 (2,31-10,82)	38,78 (11,68-47,61)	39,18 (27,3-70,49)	15,31#+ (7,64-35,32)	25,47#+ (15,46-53,12)	13,4# (3,76-24,51)

Angegeben sind jeweils Median und Spannweite (x_{\min} - x_{\max}), parameterfreier U-Test (Mann-Whitney); # p<0,05 vs. Kontrolle, + p<0,05 vs. Vehikel

Infolge der Behandlung mit den SLS⁻ Bakterien kam es zu einer kontinuierlichen Abnahme der T-Zellen (auch bei den Absolutwerten). An den Tagen 21 und 28 nach Injektion wurden jeweils nur noch ca. 10 % CD3⁺ T-Zellen detektiert (Abb. 27 b, 28 a). Dies weist auf eine systemisch hämatotoxische Wirkung der vitalen Bakterien hin. Die Marker für die T-

Zellaktivierung fielen nach einem leichten initialen Anstieg im Verlauf deutlich ab und zeigten erst zum Ende des Beobachtungszeitraumes wieder einen Anstieg (Abb. 29 b).

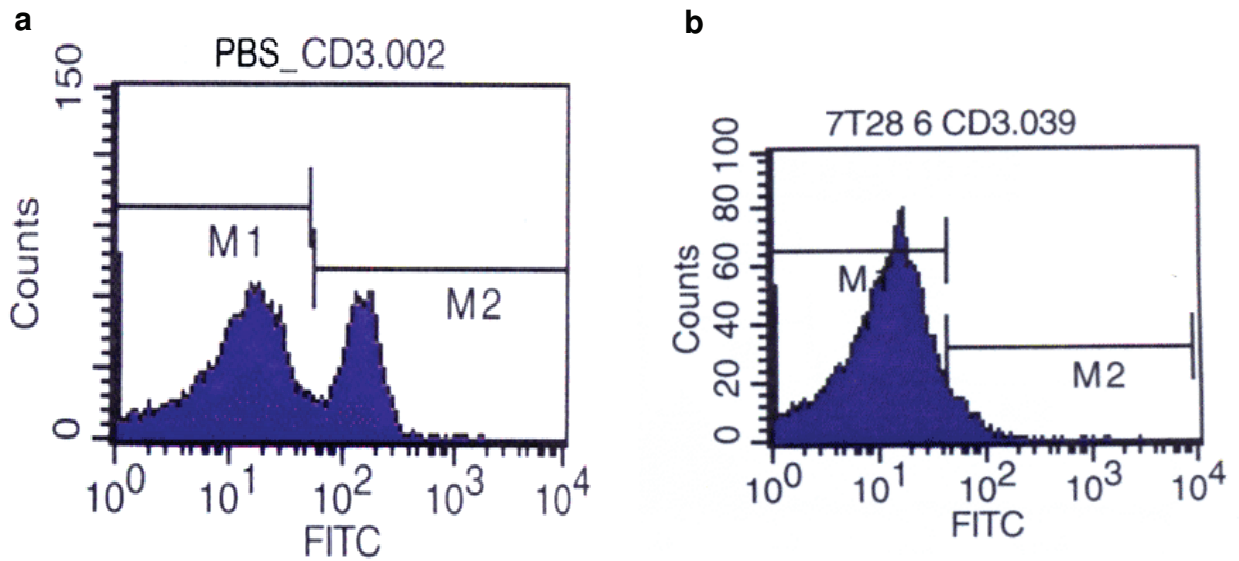


Abb. 27 a und b

Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse eines Vehikeltierkontrollieres (a) und eines SLS⁻ Bakterien Therapietieres 4 Wochen nach Behandlung (b), die auf die Expression des Oberflächenmoleküls CD3 (T Zellen) untersucht wurden: Der Peak unter M1 entspricht den CD3⁺ Zellen, der Peak unter M2 den CD3⁻ Zellen, bei dem Vehikeltier waren ca. 30 % der Zellen positiv (M2 Abb. a), bei dem Therapietier hingegen maximal 10 % (M2 Abb. b)

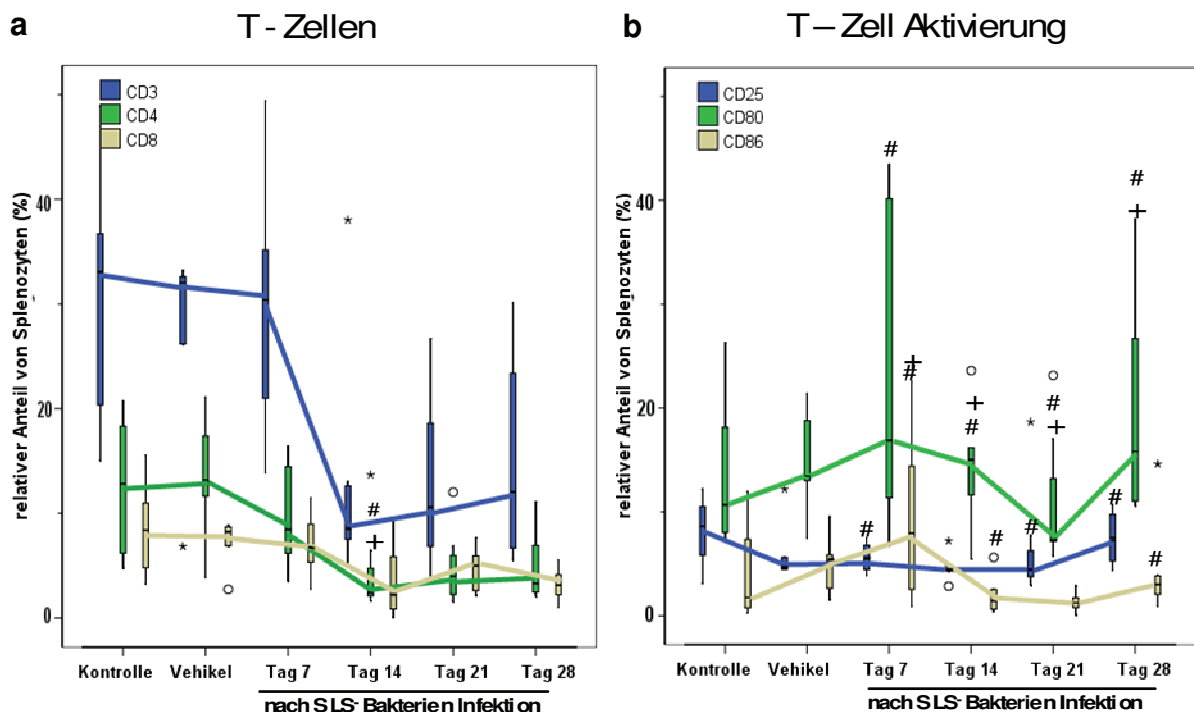


Abb. 28 a und b

Durchflusszytometrische Analyse der Splenozyten von mit SLS⁻ behandelten Tieren (n=7 pro Zeitpunkt) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Kontrolle n=7, Vehikel n=5): Darstellung relativer Anteile der T-Zellen (a), bzw. Zellen, die bei T-Zellaktivierung verstärkt exprimierte Oberflächenmoleküle aufweisen (b), angegeben sind der Median und die Spannweite (x_{\min} - x_{\max}), parameterfreier U-Test (Mann-Whitney): # p<0,05 vs. Kontrolle, + p<0,05 vs. Vehikel, o/* Ausreißer

Dagegen konnte in Rahmen der durchflusszytometrischen Analyse der Splenozyten von mit Lysat behandelten Tieren eine kontinuierlich höhere Anzahl der T-Zellen ($CD3^+$) im Vergleich zu den Vehikeltieren identifiziert werden (Abb. 29 a). Ebenfalls kam es zu einer kontinuierlichen, teilweise auch gegenüber den Kontrolltieren signifikanten Zunahme der T-Zellaktivierungsmarker (Abb. 51). Die T-Zellaktivierung war bei den mit Lysat behandelten Tieren somit deutlich stärker mit Maximalwerten bis 17 % (CD25), 29 % (CD80) und 15 % (CD86) als bei den mit SLS⁻ Bakterien therapierten Tieren mit 7 % (CD25), 16 % (CD80) und 7 % (CD86).

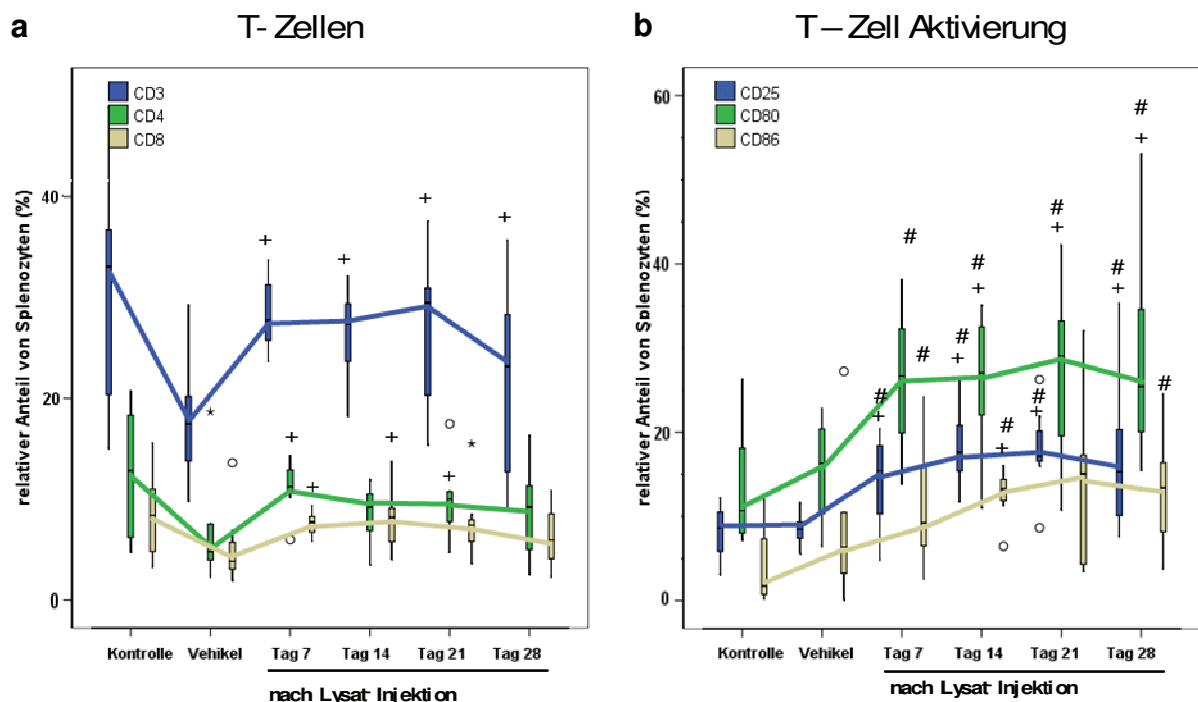
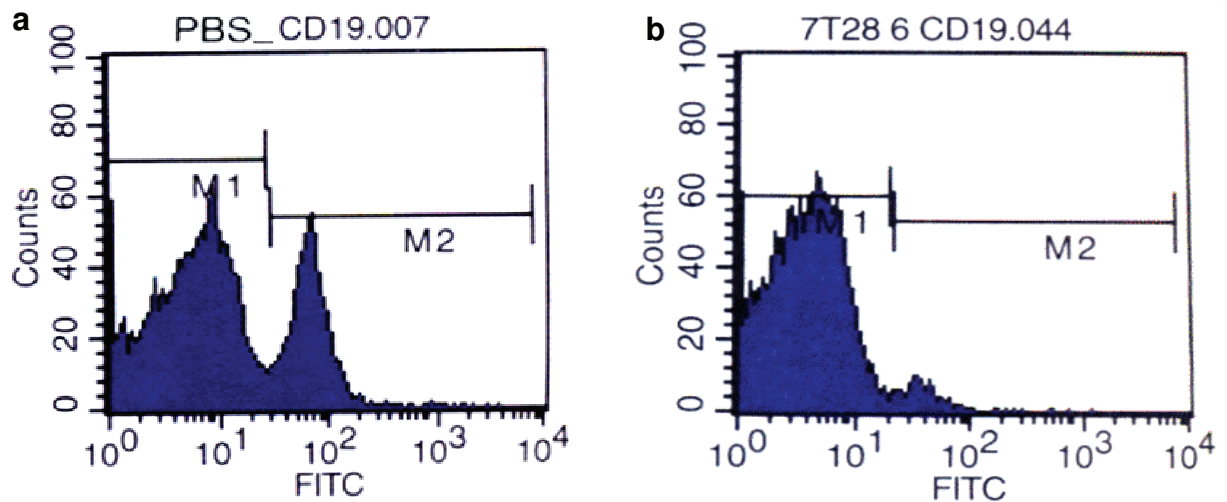


Abb. 29 a und b

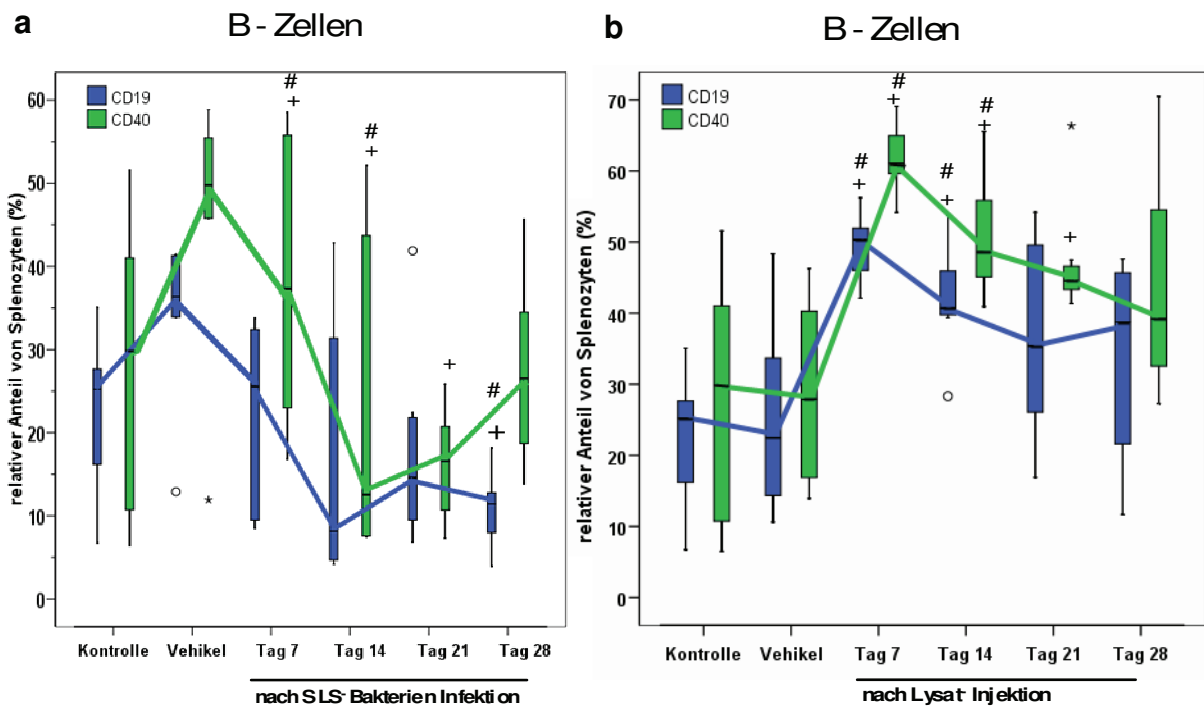
Durchflusszytometrische Analyse der Splenozyten von mit Lysat behandelten Tieren ($n=7$ pro Zeitpunkt) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Kontrolle $n=7$, Vehikel $n=7$): Darstellung relativer Anteile der T-Zellen (a), bzw. Zellen, die bei T-Zellaktivierung verstärkt exprimierte Oberflächenmoleküle aufwiesen (b), angegeben sind der Median und die Spannweite (x_{\min} - x_{\max}), parameterfreier U-Test (Mann-Whitney): # $p<0,05$ vs. Kontrolle, + $p<0,05$ vs. Vehikel, o/* Ausreißer

Auch die B-Zellpopulation verringerte sich nach der SLS⁻ Mutanten Injektion kontinuierlich auf einen der Vehikelgruppe (36,34% (12,9-41,43)) gegenüber signifikant niedrigeren Splenozytenanteil von 11,43 % (3,93-18,22) am Tag 28 p.i.. Einen ähnlichen Verlauf zeigte die Expression des Oberflächenmoleküls CD40. Beide Zellpopulationen stiegen tendenziell gegen Ende jedoch wieder an (Abb. 30 b, 31 a).

Nach Lysatinjektion hingegen wurde initial eine Zunahme der B-Zellpopulation beobachtet, die erst im weiteren Verlauf leicht abfiel (Abb. 31 b).

**Abb. 30 a und b**

Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse eines Vehikelkontrolltieres (a) und eines SLS⁻ Bakterien Therapietieres 4 Wochen nach Behandlung (b), Darstellung der Expression des Oberflächenmoleküls CD19 (B Zellen): Der Peak unter M1 entspricht den CD19⁻ Zellen, der Peak unter M2 den CD19⁺ Zellen, bei den Kontrollgruppen waren ca. 30 % der Zellen positiv (M2 Abb. a), bei dem Therapietier hingegen maximal 10 % (M2 Abb. b).

**Abb. 31 a und b**

Durchflusszytometrische Analyse der Splenozyten von mit SLS⁻ Bakterien und Lysat behandelten Tieren (n=7 pro Zeitpunkt) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Kontrolle n=7, Vehikel n=5 bzw. 7): Darstellung relativer Anteile der Splenozyten, die für die B-Zellen und bei deren Aktivierung typische Oberflächenmoleküle exprimierten, angegeben sind der Median und die Spannweite (x_{\min} - x_{\max}), parameterfreier U-Test (Mann-Whitney): # $p < 0,05$ vs. Kontrolle, + $p < 0,05$ vs. Vehikel, o/* Ausreißer

3.3.5.4 Analyse spezifischer Effektorzellen aus Blutleukozyten

Bei der Analyse der spezifischen immunkompetenten Zellen aus dem peripheren Blut zeigten sich bei der Verteilung der T-Zellen keine Unterschiede zwischen den beiden Kontroll- und Vehikelgruppen. Nur bei den B-Zellen fiel generell ein leichter Anstieg bei den Vehikeltieren beider Gruppen auf. Der Anteil CD3⁺ und CD19⁺ T-Zellen betrug in der Kontrollgruppe 27,62 % (17,34-34,15) bzw. 34,22 % (28,06-60,42) (Tab. 6.).

Tab. 6

Durchflusszytometrische Analysen der Blutleukozyten: Darstellung prozentualer Anteile der Blutleukozyten, die positiv für die angegebenen Oberflächenmoleküle gemessen wurden

	CD3	CD4	CD8	CD19
Kontrolle	28,102 (17,34-34,15)	16,08 (10,3-21,71)	11,31 (0,08-12,15)	35,12 (28,06-60,42)
Vehikel PBS	27,37 (21,5-39,21)	15,54 (10,56-25,56)	11,58 (8,89-19,4)	41,52 (31,04-48,87)
Vehikel PlyC₁	28,93 (18,02-30,83)	12,03 (7,91-18,94)	8,12 (6,93-10,93)	38,50 (22,43-52,79)
SLS⁻ Therapie				
Tag 7	35,63 (22,33-48,28)	19,37 (9,96-24,92)	11,4 (8,8-15,59)	46,59 (39,59-63,48)
Tag 14	29,78 (9,59-32,53)	13,73 (9,7-15,86)	8,88 (6,1-16,81)	40,83 (12,14-57,07)
Tag 21	17,33 (6,34-33,06)	9,97 (3,58-17,46)	7,12 (3,89-13,06)	27,65 (10,71-47,31)
Tag 28	26,72 (20,07-28,97)	13,53 (12,41-18,11)	10,49 (8,82-11,82)	41,11 (24,66-54,11)
Lysat Therapie				
Tag 7	29,23+ (24,07-76,81)	15,63+ (14,94-18,34)	10,35 (9,09-11,95)	43,13 (27,7-50,1)
Tag 14	32,82 (15,75-68,26)	13,24 (8,05-27,08)	10,04 (6,43-13,68)	32,93 (18,3-62,72)
Tag 21	32,72+ (18,89-38,97)	15,7 (8,68-22,6)	12,34+ (6,5-14,17)	40,99 (18,31-,03)
Tag 28	27,47 (12,74-29,89)	10,64# (8,05-15,95)	8,44 (6,62-15,95)	29,17 (17,9-49,19)

Angegeben sind jeweils Median und Spannweite (x_{\min} - x_{\max}), parameterfreie U-Test (Mann-Whitney): # p<0,05 vs. Kontrolle, + p<0,05 vs. Vehikel, o/*Ausreißer

Die mit SLS⁻ Bakterien behandelten Tiere zeigten im Verlauf nach einem initialen Anstieg auf 35,63 % (22,33-48,28) an Tag 7 p.i. einen transienten Rückgang der CD3⁺ T-Zellen bis zum Tag 21 auf 17,33 % (6,34-33,06). Zum Ende des Beobachtungszeitraumes zeigten sich jedoch mit 26,72 % (20,07-28,97) den Kontrollgruppen gegenüber vergleichbare Werte (ca. 28 %) (Abb. 32 a).

Die Therapie mit SLS⁻ Bakterien führte damit zu einer generellen transienten systemischen Abnahme der T-Zellen, wie schon in der Splenozytenanalyse detektiert, die vermutlich toxisch bedingt ist und erst gegen Ende des Experiments wieder kompensiert wurde. Auch die Analyse der B-Zellen zeigte einen vergleichbaren transienten Abfall und erst terminalen Wiederanstieg. Bei den absoluten Werten zeigte sich zwar eine leichte Abweichung in Form von wieder ansteigenden Zahlen zuvor abgefallenen T- und B-Zellen an Tag 7 und 21. Dies widerspricht jedoch dem zu den relativen Werten korrelierende Abfall der Lymphozyten im Differentialblutbild ebenso wie den ähnlichen Verläufen der Splenozyten bei

dem Wildtyp aus den Vorarbeiten. Die Abweichungen sind daher als Auswirkungen von Ausreißerwerten, welche zu diesen beiden Zeitpunkten bei den Analysen der Blutbilder auftraten, zu werten und die Ergebnisse - wie bei den Relativwerten dargestellt - tatsächlich als Abfall der Lymphozyten zu sehen.

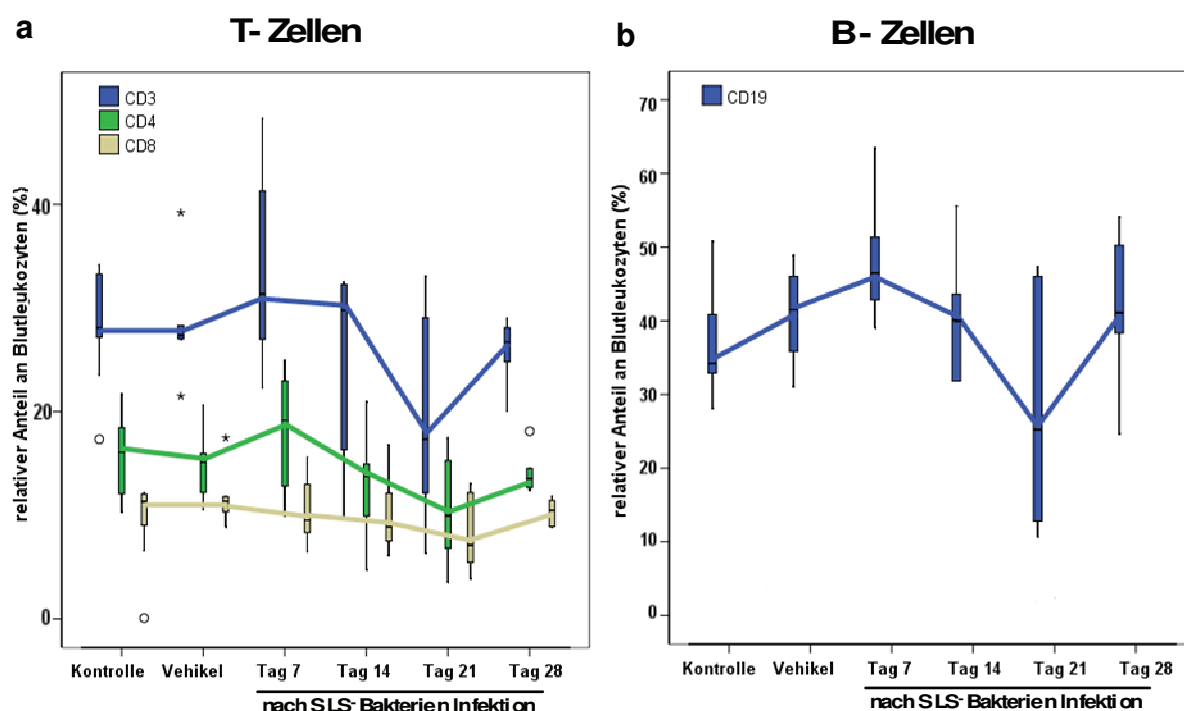
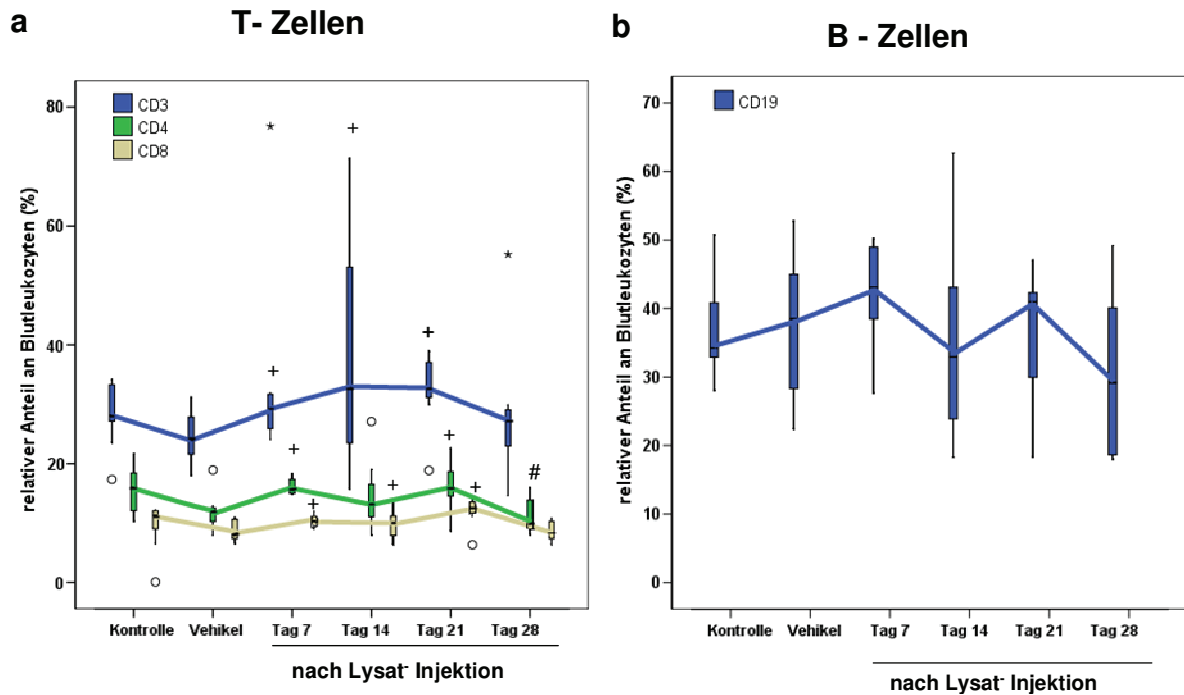


Abb. 32 a und b

Durchflusszytometrische Analyse der Blutleukozyten von mit SLS⁻ Bakterien behandelten Tieren (n=7 pro Zeitpunkt) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Kontrolle n=7, Vehikel n=5): Darstellung relativer Anteile an T- und B-Zellen, angegeben sind der Median und die Spannweite (x_{\min} - x_{\max}). o/* = Ausreißer

Die Behandlung mit dem Lysat führte hingegen zu einem gegenüber den Vehikelkontrolltieren teilweise signifikanten Anstieg von T-Zellen. Initial kam es zu einer Zunahme von CD4⁺ T-Helferzellen. Im weiteren Verlauf wurden dann vermehrt CD8⁺ zytotoxische T-Zellen nachgewiesen (Abb. 33 a). Der Verlauf der B-Zellen war unspezifisch mit nicht signifikanten Zu- und Abnahmen im Verlauf und lässt somit keine eindeutige Aussage zu (Abb. 33 b).

**Abb. 33 a und b**

Durchflusszytometrische Analyse der Blutleukozyten von mit Lysat behandelten Tieren (n=7 pro Zeitpunkt) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Kontrolle n=7, Vehikel n=7): Darstellung relativer Anteile der T- und B-Zellen, angegeben sind der Median und die Spannweite (x_{\min} - x_{\max}), parameterfreier U-Test (Mann-Whitney): # $p < 0,05$ vs. Kontrolle, + $p < 0,05$ vs. Vehikel, o/* = Ausreißer

Somit zeigte die Analyse der spezifischen Effektorzellen, anhand der abfallenden B- und T-Zellen bei den mit SLS⁻ Bakterien behandelten Tieren, dass die vitalen Bakterien zunächst einen suppressiven Effekt auf das Immunsystem (eine systemische hämatotoxische Wirkung) vermitteln. Diese Ergebnisse werden unterstützt durch die bereits detektierte Erythro-, Thrombo- und Lymphopenie in den Blutbildanalysen der mit SLS⁻ Bakterien behandelten Tiere.

Dahingegen führte die Applikation des Lysates nur zu einer geringen Verschiebung der T-Zellen aus der Milz in das periphere Blut. Ebenso kam es zu keiner Abnahme der Anzahl systemischer Leukozyten. Ferner konnte eine massive und deutlichere Zunahme der T-Zellaktivierungsmarker bei mit Lysat behandelten Tieren verzeichnet werden.

Des Weiteren ließ sich anhand der Ergebnisse der untersuchten spezifischen Effektorzellpopulationen im Vergleich mit der Entwicklung des Tumorzellvolumens konstatieren, dass insbesondere die Anzahl der T-Zellen und deren Aktivierung mit der Tumorzellprogression (bei abnehmender T-Zellanzahl) bzw. der Tumorzellregression (bei steigender T-Zellanzahl) korrelierte.

3.3.5.5 Analyse des Proliferations- und Eisenstoffwechsellmarkers CD71 bei den Splenozyten

Ein weiteres untersuchtes Oberflächenmolekül bei den Splenozyten war das CD71 Transferrinrezeptorantigen. Seine Expression wird abhängig vom Zellbestreben, Eisen vermehrt oder vermindert aufzunehmen, reguliert. Eine Hochregulation findet vor allem bei erhöhtem Eisenbedarf z.B. im Rahmen der Entwicklung erythroider Zellen sowie nach mitogener Aktivierung von B- und T-Zellen statt.

Bei den Kontrolltieren lag der Anteil der CD71⁺ Zellen bei 20,41 % (9,42-48,15), bei den Vehikeltieren bei 10,25 % (2,44-22,69).

Nach i.t. Applikation der SLS⁻ Bakterien kam es im Verlauf zu einem massiven Anstieg an CD71⁺ Zellen, welcher an den Tagen 21 und 28 p.i. mit rund 70 % gegenüber beiden Kontrollgruppen statistisch signifikant war (Abb. 34 a, 35 a). Diese massive Zunahme CD71⁺ Zellen korrelierte mit dem Ausmaß der Splenomegalie und der erhöhten Anzahl an Splenozyten (s 3.3.3). Infolge der Lysatbehandlung hingegen trat keine Zunahme CD71 exprimierender Zellen ein (Abb. 34 b). Parallel dazu blieb die absolute Zellzahl konstant. Die Splenomegalie war weniger ausgeprägt.

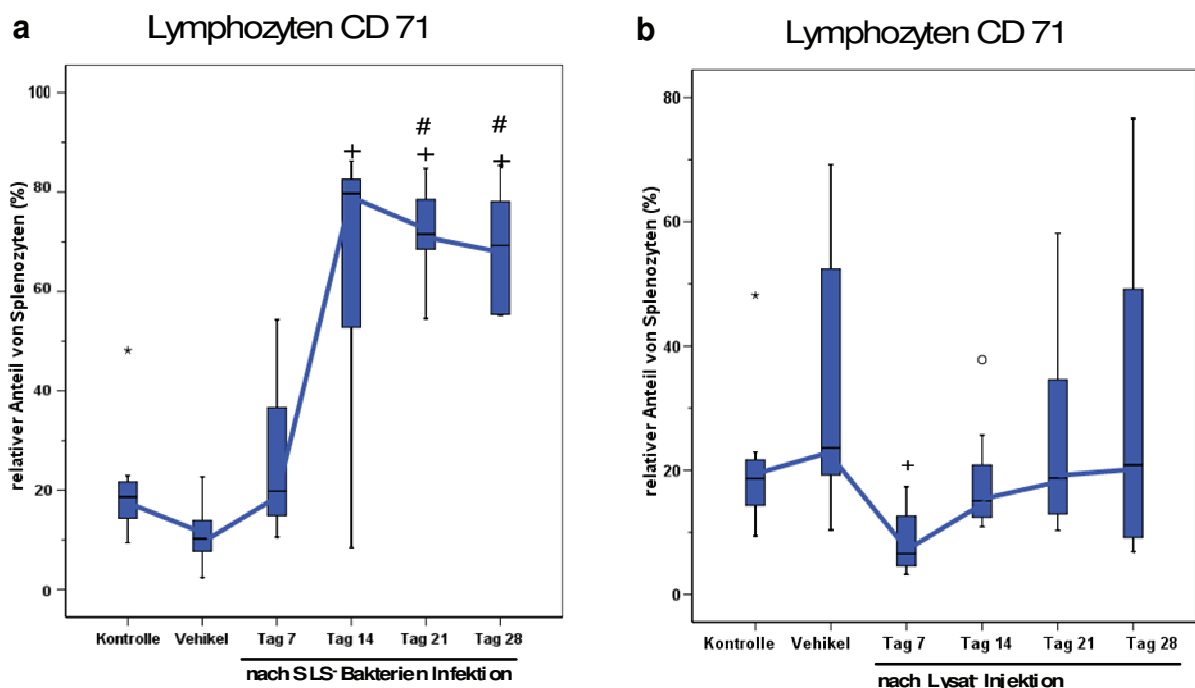


Abb. 34 a und b

Durchflusszytometrische Analyse der Splenozyten von mit SLS⁻ Bakterien und Lysat behandelten Tieren (n=7 pro Zeitpunkt) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Kontrolle n=7, Vehikel n=5 bzw. 7): Darstellung realitiver Anteile der Splenozyten, die den Transferrinrezeptor CD71 exprimierten, angegeben sind der Median und die Spannweite (x_{min}-x_{max}), parameterfreier U-Test (Mann-Whitney): # p<0,05 vs. Kontrolle, + p<0,05 vs. Vehikel, o/* Ausreißer

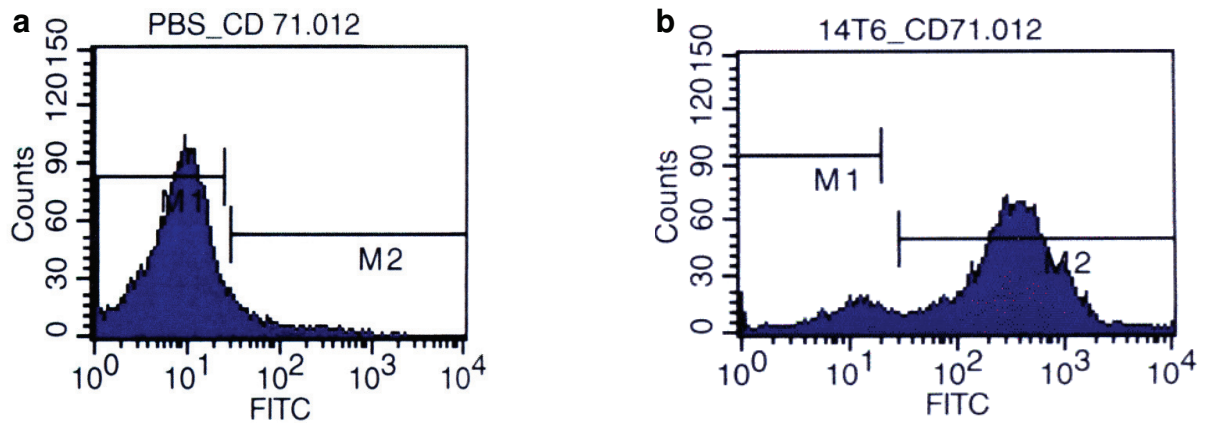
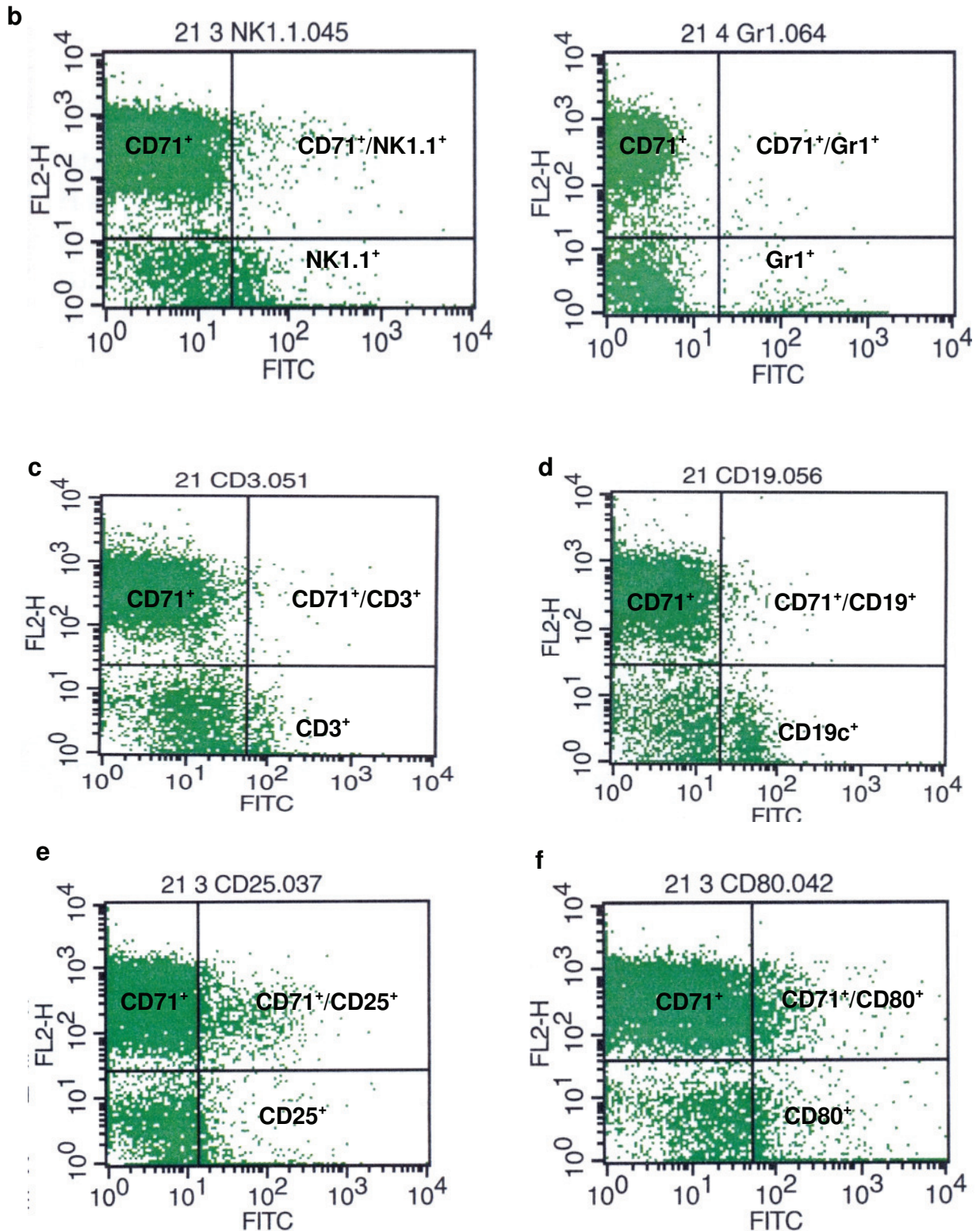


Abb. 35 a und b

Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse eines PBS-Vehikelkontrolltieres (a) und eines SLS⁻ Bakterien Therapietieres 2 Wochen nach Behandlung (b), Darstellung der Expression des Oberflächenmoleküls CD71: Der Peak unter M1 entspricht den CD71⁻ Zellen, der Peak unter M2 den CD71⁺ Zellen, nach therapeutischer Intervention zeigte sich ein deutlich stärkerer zweiter Peak der CD71⁺ Zellen

Da sich der massive Anstieg von CD71⁺ Zellen nach SLS⁻ Bakterieninjektion jedoch nicht in einer vergleichbar starken T- oder B- Zellproliferation widerspiegelte, wurden zusätzlich Doppelmarkierungen der Splenozyten jeweils mit einem CD71-PE Antikörper und je einem der anderen in dieser Arbeit verwendeten FITC-gelabelten Marker durchgeführt, um die Art der proliferierenden Zellen bestimmen zu können. Diese Untersuchungen brachten jedoch keine eindeutig positiven Ergebnisse für spezifische oder unspezifische Effektorzellen. Eine CD71 Expression wurde bei fast allen Zellpopulationen jeweils nur bei 0,2-2% der Zellen detektiert (Abb. 36 a – d). Lediglich CD25⁺ und CD80⁺ Zellen (generell aktivierte Zellen) zeigten eine etwas stärkere Expression von CD71 (ca. 5 %, Abb. 36 e und f), was zumindest auf eine verstärkte Eisenaufnahme aktivierter Zellen (Makrophagen, B-, T- Zellen) hinweist.

Auch eine Doppelmarkierung mit CD34, einem Marker für hämatopoetische Vorläuferzellen, zeigte keine positive Färbung für CD71. Somit konnte die massive Erhöhung der CD71⁺ Zellen bis auf einige aktivierte Zellen zunächst nicht eindeutig einer bestimmten Zellpopulation zugeordnet werden.

**Abb. 36 a - f**

Darstellung von Dot Plots der durchflusszytometrischen Analysen von Splenozyten eines SLS⁺ Bakterien Therapietieres mit Doppelfärbung durch CD71 PE-AK und NK1.1-, CD3-, CD19- bzw. Gr1-FITC-AK, bei den NK-Z (CD71/NK1.1 ca. 2%), bei den Granulozyten (CD71/Gr1 ca. 0,3%), bei den T-Zellen (CD71/CD3 ca. 0,5%) und bei den B-Zellen (CD71/CD19 ca. 1%) konnte keine starke Expression der Transferrinrezeptoren gefunden werden, ebenso nicht bei den Makrophagen (CD11b) hier nicht dargestellt, lediglich bei CD25⁺ und CD80⁺ Zellen ließen sich etwas vermehrt Transferrinrezeptoren detektieren (ca. 5%)

3.3.5.6 Analyse von Adhäsionsmolekülen bei Effektorzellen der Splenozyten

Als weitere Oberflächenmarker wurden die Adhäsionsmoleküle CD54 (= ICAM1) und CD62L untersucht. CD54 wird auf verschiedenen hämatopoetischen Zellen exprimiert und spielt sowohl bei der Interaktion zwischen APZ und T-Zellen, als auch bei der Interaktion von zytotoxischen T-Zellen und ihren Zielzellen eine Rolle. CD62L ist ein Adhäsionsmolekül, das vor allem zur endothelialen Leukozytenadhäsion von B-Zellen, T-Zellen, Monozyten und NK-Zellen und nachfolgender transendothelialer Migration notwendig ist (Janeway & Travers 1999).

In Splenozyten von Tumorkontrolltieren wurde CD54 auf 8,37 % (4,67-18,19) der Zellen und CD62L auf 21,38 % (21,18-61,2) der Zellen detektiert. Bei den PBS-Vehikeltieren waren beide Marker leicht erhöht, die PlyC₁-Vehikeltiere zeigten eine normale Expression der Marker (Tab. 7).

Tab. 7

Durchflusszytometrische Analysen der Splenozyten: Darstellung prozentualer Anteile der Splenozyten, die positiv für die angegebenen Oberflächenmoleküle gemessen wurden.

	CD54	CD62L
Kontrolle	8,37 (4,67-18,19)	21,38 (21,18-61,2)
Vehikel PBS	25,16 (13,99-49,83)	45,15 (10,47-48,65)
Vehikel PlyC₁	19,95 (11,03-28,83)	17,4 (8,27-47,65)
SLS⁻ Therapie		
Tag 7	18,18#+ (10,06-30,39)	21,95+ (22,86-64,09)
Tag 14	8,59#+ (4,11-22,75)	7,12#+ (3,31-29,84)
Tag 21	11,62#+ (9,48-15,44)	8,07 (1,42-20,41)
Tag 28	12,6#+ (5,16-26,55)	7,89 (0,82-29,23)
Lysat Therapie		
Tag 7	32,93#+ (22,65-44,62)	40,67+ (19,62-59,77)
Tag 14	30,69#+ (26,47-33,44)	48,96#+ (36,74-59,28)
Tag 21	28,84#+ (16,87-42,29)	45,92 (11,21-48,3)
Tag 28	38,87#+ (13,07-47,95)	38,05 (6,78-62,27)

Angegeben sind jeweils Median und Spannweite (x_{\min} - x_{\max}), parameterfreier U-Test (Mann-Whitney); # $p < 0,05$ vs. Kontrolle, + $p < 0,05$ vs. Vehikel

Bei den mit SLS⁻ Bakterien behandelten Tieren kam es im Verlauf zu einer Abnahme der Anzahl der Adhäsionsmoleküle, welche teilweise gegenüber der Vehikelgruppe mit 8 % (CD54) bzw. 7 % (CD62L) signifikant war und mit dem Verlauf der T- und B-Zell-Subpopulationen korrelierte (Abb. 37 a).

Bei den mit Lysat behandelten Tieren nahm die Größe beider Zellsubpopulationen, die die jeweiligen Adhäsionsmoleküle exprimierten, hingegen massiv und signifikant gegenüber der Kontroll- und Vehikelgruppe auf bis zu 38 % (CD54) bzw. 48 % (CD62L) zu (Abb. 37 b und 38 b). Dies könnte Ausdruck einer stärkeren Aktivierung immunkompetenter Zellen sein.

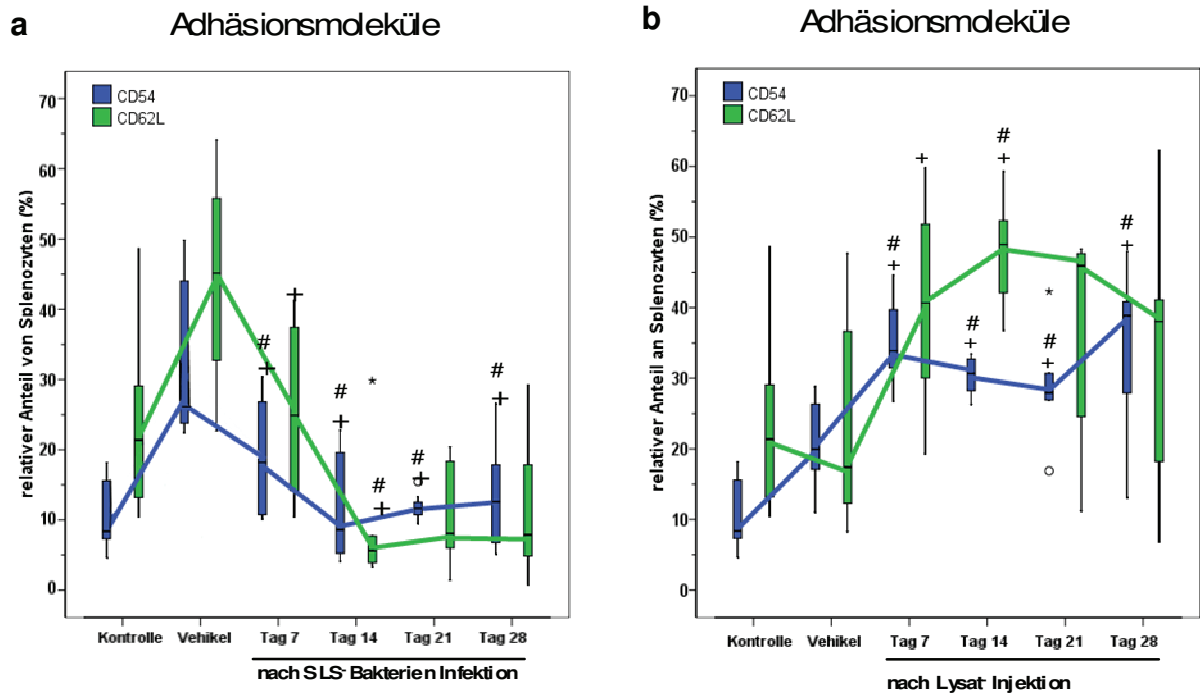


Abb. 37 a und b

Durchflusszytometrische Analyse der Splenozyten von mit SLS⁻ Bakterien (a) und Lysat behandelten Tieren (b) (n=7 pro Zeitpunkt) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Kontrolle n=7, Vehikel n=5 bzw. 7): Darstellung relativer Anteile der Splenozyten, die Adhäsionsmoleküle exprimierten, angegeben sind der Median und die Spannweite (x_{\min} - x_{\max}), parameterfreier U-Test (Mann-Whitney): # p<0,05 vs. Kontrolle, + p<0,05 vs. Vehikel, o/* Ausreißer

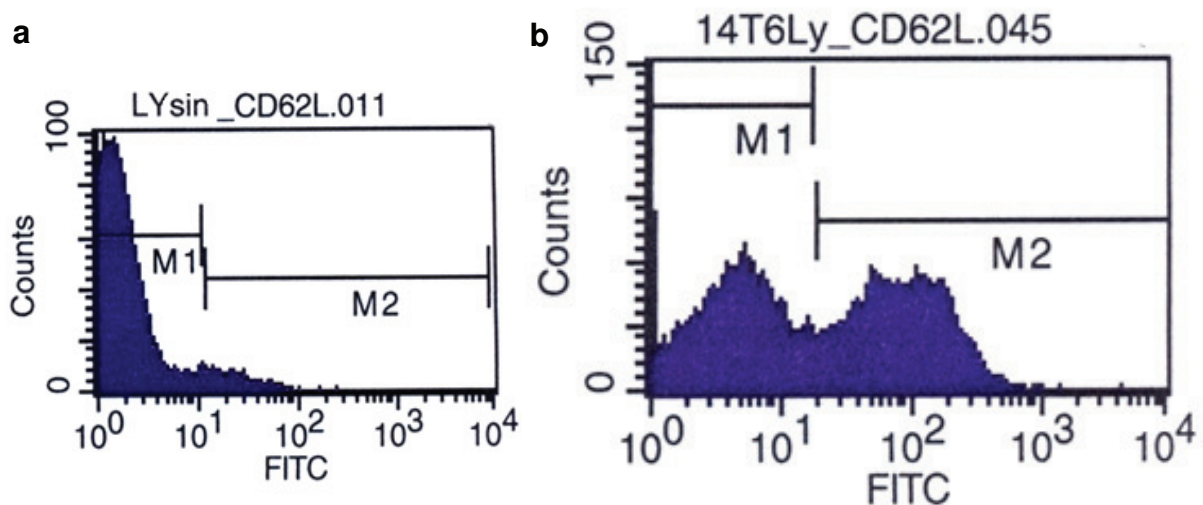


Abb. 38 a und b

Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse eines Vehikelkontrolltieres (a) und eines Thera-pietieres 2 Wochen nach Lysatbehandlung (b), Darstellung der Expression des Oberflächenmole-küls CD62L: Der Peak unter M1 entspricht CD62L⁻ Zellen, der unter M2 CD62L⁺ Zellen, bei den Kontrollgruppen waren nur ca. 17 % der Zellen positiv (M2 li), nach therapeutischer Intervention hingegen bis zu ca. 50 % (M2 re)

3.4 Untersuchungsergebnisse zum lokalen Effekt der Therapie

Um lokale Veränderungen im Tumorgewebe verfolgen und infiltrierende Zellen identifizieren zu können, wurden aus dem Tumorgewebe Gefrierschnitte angefertigt und diese anschließend histologisch auf Entzündungszellen bzw. immunhistologisch auf infiltrierende Immunzellen untersucht.

3.4.1 Histologie

Für die histologischen Untersuchungen wurden aus den Gefrierschnitten mit der HE Färbemethode Übersichtspräparate und mit der As-D Färbemethode Präparate zum Nachweis der Granulozyteninfiltration hergestellt.

Die HE Präparate zeigten ein undifferenziertes pleomorphkerniges Tumorgewebe mit wenig bindegewebigen Anteilen. Tumorzellnekrosen mit teilweise sichtbarer Leukozyteninfiltration waren vor allem bei Therapietieren identifizierbar, die schon makroskopisch deutliche Nekrosen aufgewiesen hatten (Abb. 39).

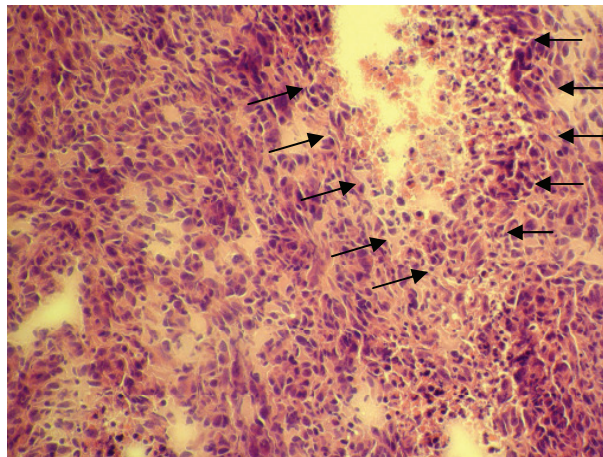


Abb. 39

HE-Präparat eines mit SLS⁻ Bakterien behandelten Tieres: Das Tumorgewebe besteht aus polymorphkernigen Zellen, um nekrotische Areale (Markierung) lassen sich Leukozytenakkumulationen erkennen

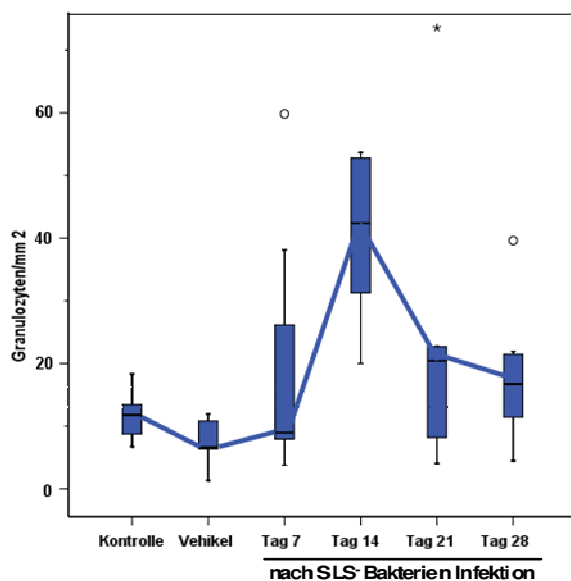
Die PBS-Vehikelkontrolltiere zeigten mit 12 infiltrierenden Granulozyten/mm² kaum Unterschiede gegenüber den Kontrolltieren (ca. 16 Zellen/mm²). Bei den PlyC₁-Vehikelkontrolltieren infiltrierten signifikant weniger Granulozyten (unter 5 Zellen/mm²) in das Tumorgewebe als bei den Kontrollgruppen. Die Applikation des Lysins induziert folglich lokal keine nachweisbare Inflammation.

Bei den mit SLS⁻ Bakterien behandelten Tieren jedoch konnte eine erhöhte Granulozyteninfiltration beobachtet werden, welche an Tag 14 mit über 40 Granulozyten/mm² am stärksten ausgeprägt und den Kontrollgruppen gegenüber signifikant erhöht war (Abb. 40 a, 41 b). Im Verlauf ging die Infiltration wieder zurück, blieb jedoch immer noch über dem Niveau

der Kontrolltiere. Diese granulozytäre Infiltration in das Tumorgewebe korrelierte dabei mit dem Anstieg der Granulozyten im peripheren Blut (s. Abb. 14 a und 3.3.5.2). Die vitalen Bakterien wirkten somit sowohl systemisch als auch lokal als starker proinflammatorischer Stimulus.

Bei den mit Lysat therapierten Tieren zeigte sich ähnlich wie auch bei den mit SLS⁻ Bakterien behandelten Tieren eine Granulozyteninfiltration initial bis Tag 14 (Abb. 42 b) im Sinne einer lokalen Inflammation. Dabei war die Anzahl infiltrierender Zellen mit bis zu 20 Zellen/mm² gegenüber den mit SLS⁻ Bakterien behandelten Tieren zwar geringer, jedoch im Vergleich zu den PlyC₁-Vehikelkontrolltieren auf das Vierfache erhöht (Abb. 40 b). Da im peripheren Blut hingegen keine entsprechende Granulozytose zu finden war (s. Abb. 14 b und 3.3.5.2), bleibt die proinflammatorische Wirkung des Lysates somit im Gegensatz zu der der vitalen Bakterien nur lokal begrenzt.

a i.t. Infiltration Granulozyten



b i.t. Infiltration Granulozyten

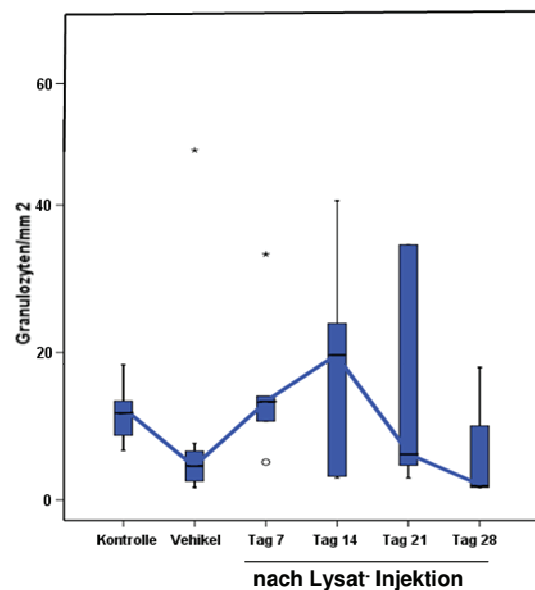


Abb. 40 a und b

Darstellung der Infiltration von Granulozyten pro mm² in das Tumorgewebe von mit SLS⁻ Bakterien behandelten Tieren (n=7 pro Zeitpunkt) (a) und Lysat behandelten Tieren (n=7 pro Zeitpunkt) (b) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Kontrolle n=7, Vehikel n= 7), angegeben sind der Median und die Spannweite (x_{min}-x_{max}), parameterfreier U-Test (Mann-Whitney):# p<0,05 vs. Kontrolle, +p<0,05 vs. Vehikel, o/*=Ausreißer

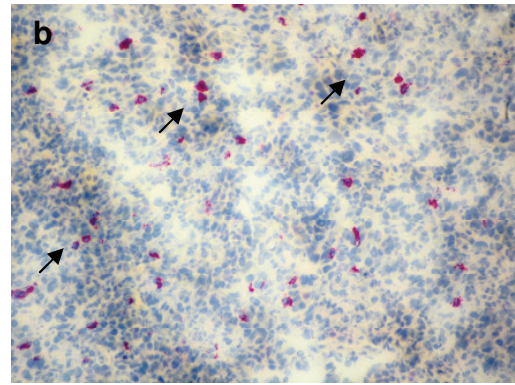
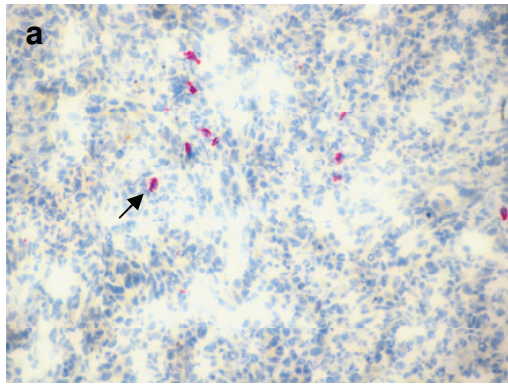


Abb. 41 a und b

Lichtmikroskopische Aufnahme (Original x 40) des Tumorgewebes eines PBS-Vehikelkontrolltieres (a) und eines Therapietieres 14 Tage SLS⁻ Bakterienbehandlung (b): Das Gewebe wurde als Gefrierschnitte mit Hilfe der As-D-Färbung aufgearbeitet, nach Therapie mit der SLS⁻ Mutante waren deutlich mehr Infiltrate nachweisbar als bei den Kontrolltieren (Pfeile)

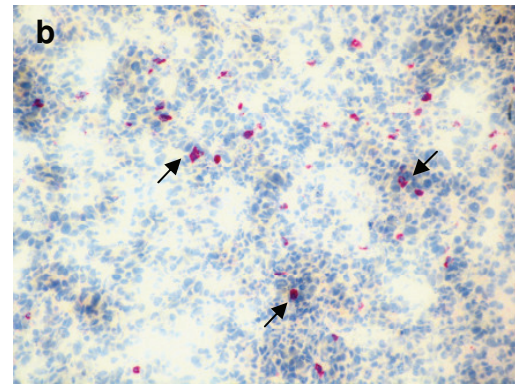
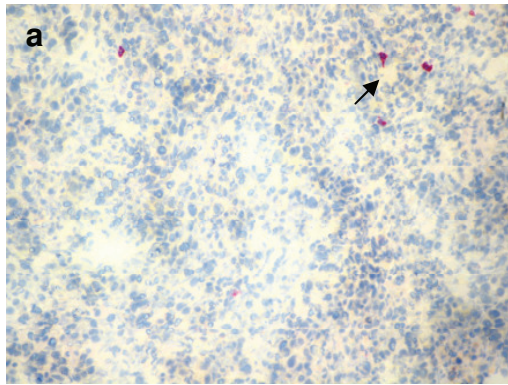


Abb. 42 a und b

Lichtmikroskopische Aufnahme (Original x 40) des Tumorgewebes eines PlyC₁-Vehikelkontrolltieres (a) und eines Therapietieres 14 Tage nach Lysatbehandlung (b): Das Gewebe wurde als Gefrierschnitte mit Hilfe der As-D-Färbung aufgearbeitet, nach Therapie mit dem Lysat waren mehr Infiltrate nachweisbar als bei den Kontrolltieren (Pfeile)

3.4.2 Immunhistologie

Der Nachweis infiltrierender CD4⁺ T-Helferzellen und CD8⁺ zytotoxischer T-Zellen erfolgte mit Hilfe der ABC-Methode.

Bei den mit SLS⁻ Bakterien behandelten Tieren war bei dem Verlauf der infiltrierenden Anzahl der CD4⁺ Zellen keine klare Tendenz und lediglich ein leichter initialer Anstieg auf ca. 40 Zellen/mm² zu erkennen. Darüber hinaus wurde jedoch ein konstanter Anstieg der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen beobachtet, welcher insbesondere an den Tagen 7 und 21 gegenüber den Kontrolltieren signifikant war. Im weiteren Verlauf konnte lediglich eine moderate zelluläre Infiltration nachgewiesen werden (Abb. 43 a, 44 b).

Bei den mit Lysat behandelten Tieren wurde zu allen Zeitpunkten eine leichte Erhöhung der infiltrierenden T-Helferzellen auf bis zu ca. 60 Zellen/mm² detektiert. Die Infiltration der

CD8⁺ Zellen war deutlich und teilweise gegenüber den Kontrolltieren signifikant auf bis zu ca. 90 Zellen/mm² erhöht und nahm erst gegen Ende des Beobachtungszeitraumes wieder ab (Abb. 79, 83).

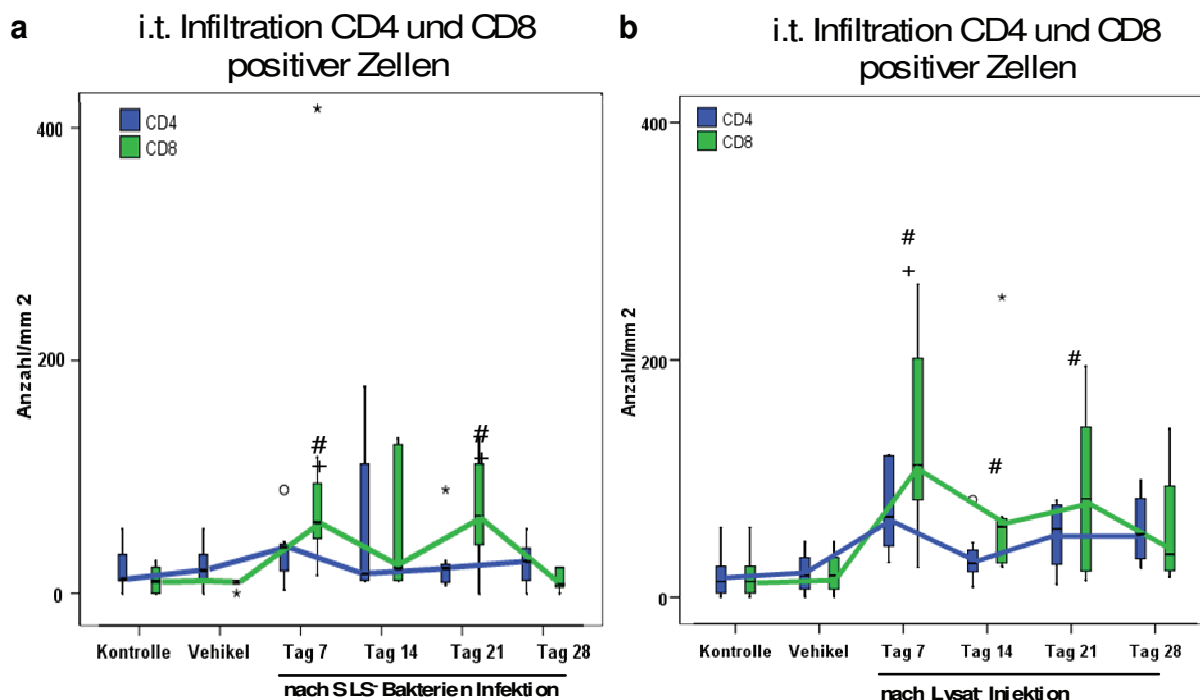


Abb. 43 a und b

Darstellung der Infiltration von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen pro mm² in das Tumorgewebe von Tieren (n=7 pro Zeitpunkt) nach SLS⁻ Bakterieninjektion (a) und nach Lysatinjektion (b) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Kontrolle n=7, Vehikel n=7), angegeben sind der Median und die Spannweite (x_{min}-x_{max}), parameterfreier U-Test (Mann-Whitney): # p< 0,05 vs. Kontrolle, +p< 0,05 vs. Vehikel, o/*=Ausreißer

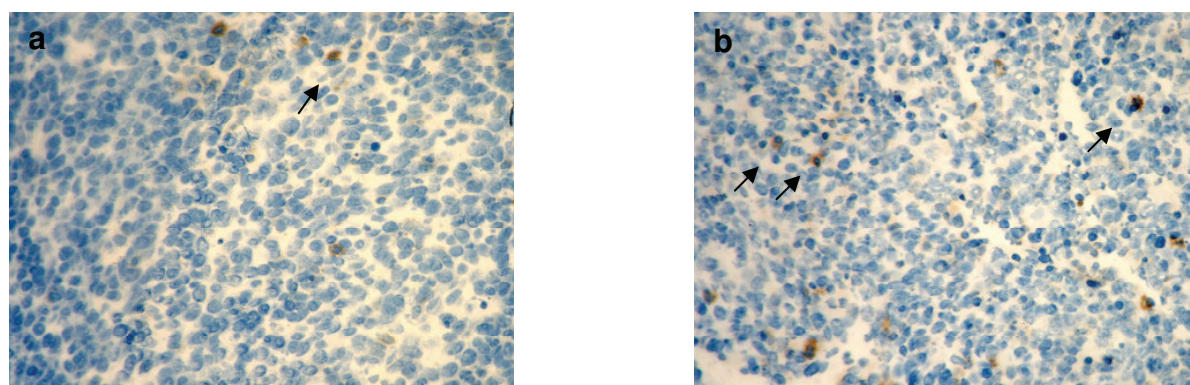


Abb. 44 a und b

Lichtmikroskopische Aufnahme (Original x 40) des Tumorgewebes eines PBS-Vehikelkontrolltieres (a) und eines Therapietieres am Tag 21 nach SLS⁻ Bakterienbehandlung (b): Das Gewebe wurde als Gefrierschnitt mittels der ABC Färbemethode immunhistochemisch auf CD8⁺ Zellen untersucht, nach Behandlung kam es zu einer Zunahme braun gefärbter CD8⁺ infiltrierender T-Zellen (Pfeile)

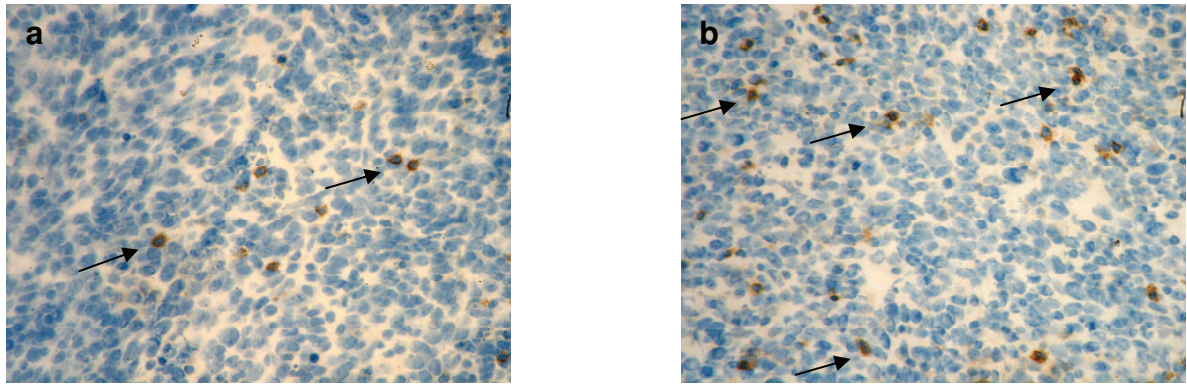


Abb. 45 a und b

Lichtmikroskopische Aufnahme (Original x 40) des Tumorgewebes eines PlyC₁-Vehikelkontrolltters (a) und eines Therapietieres 21 Tage nach Lysatbehandlung (b): Das Gewebe wurde als Gefrierschnitt mittels der ABC Färbemethode immunhistochemisch auf CD8⁺ Zellen untersucht, nach der Behandlung mit dem Lysat kam es zu einer deutlichen Zunahme braun gefärbter CD8⁺ infiltrierender T-Zellen (Abb. 45 b) im Vergleich zu den Kontrolltieren

Die immunhistologischen Analysen der Tumorgewebe zeigten somit, dass die Applikation des Lysates eine stärkere Infiltration von zytotoxischen (CD8⁺) und T-Helferzellen (CD4⁺) induzierte als die SLS⁻ Mutante. Das Ausmaß der Infiltration korrelierte außerdem direkt mit der beobachteten Tumorregression *in vivo*.

4 Diskussion

Das humane duktales Pankreaskarzinom zeichnet sich durch eine ausgeprägte Resistenz gegenüber den etablierten Behandlungsmethoden aus (Muerköster et al. 2004, Hochster et al. 2006) und zählt daher zu den Tumorerkrankungen mit äußerst schlechter Prognose (Gudjonsson 1987, Löhr et al. 2003, GEKID/RKI 2006). Um eine prognostisch günstigere chirurgische Therapie durchführen zu können, erfolgt die Diagnose meist zu spät (Richter et al. 2003). Es ist daher dringend erforderlich, neue Therapieansätze zu entwickeln, die zu einer Tumorregression und damit zu einer besseren Prognose der Patienten führen.

Die bereits bei anderen Tumorentitäten sowohl tierexperimentell (Berendt et al. 1978, Agrawal et al. 2004) als auch schon im klinischen Alltag beim superfiziellen Blasenkarzinom (Bassi et al. 2002, Böhle et al. 2003) angewandte bakterielle Immuntherapie stellt hierbei einen viel versprechenden Ansatz dar. Ihre Anwendung beim Pankreaskarzinom wurde bislang jedoch noch nicht untersucht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher basierend auf den bereits erfolversprechenden Vorarbeiten mit dem Wildtyp des Bakteriums der Gattung *S. pyogenes* die Therapiestrategie eines bakteriolytischen Immuntherapieansatzes weiterführend untersucht. Es ist nötig, weitere Informationen über die pathogenen und antitumoral wirksamen Bestandteile des Bakteriums *S. pyogenes* zu gewinnen, um zukünftig eine möglichst effektive und nebenwirkungsarme, klinisch anwendbare Therapieform entwickeln zu können. Daher erfolgte in dieser Arbeit gezielt die Analyse des therapeutischen Einsatzes einer für das Exotoxin Streptolysin S negativen Mutante von *S. pyogenes* und eines bakteriellen avitalen Lysates des Wildtyps von *S. pyogenes* in einem experimentellen murinen Pankreastumormodell.

4.1. Diskussion des Tiermodells

Da experimentelle Analysen nicht am Menschen durchgeführt werden können, müssen Tiermodelle herangezogen werden. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde ein murines syngenes heterotopes (s.c.) Pankreastumormodell mit der Zelllinie Panc02 eingesetzt, das bereits 1984 von Corbett et al. entwickelt worden war.

Mehrere vorteilhafte Gründe führten zur Wahl dieses Modells. So ist es ein bereits gut etabliertes Modell und wurde schon im Rahmen verschiedener Studien zum Pankreaskarzinom eingesetzt (Clary et al. 1997, K. Morikane et al. 2001, Tseng et al. 2002, Kim et al. 2006, Nagaraj et al. 2006, Yan et al. 2006, Bauer et al. 2007). Durch seine Wahl ist somit eine hohe Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit mit anderen Studien gegeben. Ein bedeutender Vorteil im Vergleich zu alternativen Modellen liegt darin, dass die Isolation

der verwendeten Tumorzellen (Panc02 Zellen) aus einem duktalem Adenokarzinom eines *syngen* (artgleichen) Mausstammes (C57Bl/6) erfolgt. Dadurch ist es möglich, direkte Rückschlüsse auf die immunologische Reaktion der Tiere zu ziehen im Gegensatz zu den etablierten xenogenen Tumormodellen. Xenogene Tumormodelle sind Modelle, welche auf der Implantation speziesfremder (z.B. humaner) Karzinomzellen in Tiere beruhen. Um Abwehrreaktionen auf Grund der artfremden Zellen zu vermeiden, müssen bei Studien mit xenogenen Modellen immundefiziente SCID-Mäuse (Severe Combined Immunodeficiency) verwendet werden oder als weitere Möglichkeit Mausmodelle mit etabliertem humanem Immunsystem. Letztere sind jedoch sehr aufwendig und in ihrer Entwicklung noch sehr jung, so dass noch keine langjährige Erfahrung besteht und ihre Repräsentabilität teils noch untersucht wird (Lilienfeld et Seebach 2004). Ein Vorteil von xenogenen Modellen ist zwar, dass der Effekt der untersuchten Therapie am implantierten humanen und somit direkt am eigentlichen Zieltumor beobachtet werden kann. Die Induktion repräsentativer Immunreaktionen im SCID-Modell und in Mausmodellen mit humanem Immunsystem wird jedoch kontrovers diskutiert bzw. muss sich erst noch beweisen (Hendrickson 1993, Lilienfeld et Seebach 2004). Da ein funktionsfähiges Immunsystem nun ein entscheidendes Kriterium zur Interpretation des in dieser Arbeit untersuchten immuntherapeutischen Therapieansatzes darstellt, wurde das syngene Pankreastumormodell einem xenogenen Modell vorgezogen.

Ein weiterer Vorteil des gewählten Tumormodells besteht in der Möglichkeit der s.c. Injektion. Durch die einfache Handhabung bei der s.c. Injektion können unspezifische Effekte, die beispielsweise durch Fehlinjektionen oder durch kompliziertere chirurgische Techniken bei orthotopen Modellen entstehen können, weitgehend minimiert werden. Das schnelle Wachstum des Flankentumors ermöglicht zusätzlich, den Therapieeffekt unmittelbar anhand des Tumorwachstums zu erfassen. Einer der wichtigsten Nachteile des heterotopen Modells ist allerdings, dass die reale klinische Situation von Pankreaskarzinomen nur bedingt abgebildet werden kann. Orthotope Modelle, bei denen der Tumor an physiologischer (orthotoper) Stelle des Körpers wächst, sind hierbei im Bezug auf die Lokalität des Tumors aussagekräftiger. Die Tumoren wachsen dabei entweder infolge von Mutationen spontan (Mukherjee et al. 2001, Gendler 2001, Mc Connell et al. 2002) oder es werden Tumorzellen sonographiegesteuert in das Pankreas injiziert (Schmidt et al. 2003). Diese Modelle sind jedoch aufwendiger, komplizierter und kostspielig in ihrer Durchführung. So erfordern sie beispielsweise eine kontinuierliche sonographische Kontrolle oder eine kostspielige Imaging Technik, um den Verlauf des Tumorwachstums beurteilen zu können. Außerdem sind sie so vermehrt unspezifischen Effekten bzw. Fehlerquellen ausgesetzt. Dies erschwert ihre Reproduzierbarkeit.

Ein weiterer Grund für die Wahl des durch Panc02 Zellen induzierten Mausmodells sind die deutlichen Parallelen, die der etablierte Tumor zu dem humanen Pankreaskarzinom aufweist: Humane Pankreaskarzinomzellen zeigen häufig Alterationen des Ras Onkogens, von p53, des Her2 Rezeptors und der CDK (Takaori et al. 2004, Schneider et al. 2005). Diese Genmutationen finden sich ebenfalls bei den Panc02 Zellen (Schneider et al. 2004). Ein weiteres Charakteristikum humaner Pankreastumoren ist deren geringe Immunogenität, welche u.a. durch eine verminderte MHC-Klasse I Expression, sowie ein Fehlen kostimulatorischer Moleküle (insbesondere B7.1) vermittelt wird. Beides ist ebenfalls für die Panc02 Zellen beschrieben worden (Clary et al. 1997). Darüber hinaus bilden die Zellen, genau wie humane Adenokarzinome, schlecht differenzierte aggressive Karzinome in Mäusen aus (Pützer et al 2002, Bauer et al. 2007).

Das syngene Panc02-Modell stellt damit ein gutes Modell für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten, immunologisch orientierten Forschungsarbeiten dar.

4.2 Diskussion des Therapieansatzes

Immuntherapeutische Ansätze werden schon seit längerer Zeit intensiv untersucht. Bislang durchgeführte immuntherapeutische Studien beim Pankreaskarzinom konnten auch schon teilweise Erfolge bezüglich antitumoraler Effekte aufweisen, die zu einer retardierten Tumorprogression führten. So konnten in verschiedenen Studien die Generierung tumorspezifischer ZTL (Jaffee et al. 2001, Laheru et Yeo 2001), erniedrigte Tumorzellmarker und verlängerte Überlebenszeiten (Kobari et al. 2000, Gjertsen et al. 2001) erreicht werden. Hinsichtlich einer markanten Tumorregression und des Einsatzes an Patienten jedoch zeigten sich keine befriedigenden Ergebnisse (Pecher et al. 2002, Hochster et al. 2006). Die immuntherapeutischen Therapieansätze basierten dabei zumeist auf Vakzinierungsstrategien (Goydos et al. 1996, Jaffee et al. 2001, Laheru et Yeo 2001, Pecher et al. 2002) oder einem adoptiven Transfer von T-Lymphozyten (Kobari et al. 2000). Sie zielten damit besonders auf die spezifischen Effektorzellen (T-Zellen) ab. Es scheint jedoch nicht ausreichend zu sein, nur die systemische Anzahl von ZTL zu erhöhen, um eine suffiziente Bekämpfung des Tumors zu erreichen (Rosenberg et al. 2004). Entscheidend ist die Anzahl lokal tumorinfiltrierender und aktiv wirksamer Effektorzellen, die einer systemischen Zellexpansion nicht immer folgt auf Grund verschiedener Infiltrationsschwerender Faktoren. So ist bekannt, dass im duktalem humanen Pankreaskarzinom - insbesondere bei denjenigen Pankreastumoren mit schlechter Überlebenszeit - kaum reaktive T-Zellen im Tumor zu finden sind (Fukunaga et al. 2003) neben ebenso spärlich vorhandenen NK-Zellen (Ademmer et al. 1998) und DZ. Eine Infiltration in zentrale Tumorregionen wird den Effektorzellen zum einen vermutlich durch das umgebende fibrotische Gewebe, zum anderen durch das im Tumorgewebe

immunsuppressive Milieu (IL-10, TGF β) erschwert (Gress et al. 1998, Apte et al. 2004, Bachem et al. 2005). Es ist daher notwendig, einen Weg zu finden, intratumoral eine höhere Konzentration tumorspezifischer Lymphozyten zu erreichen, um auch eine suffiziente Tumorregression zu erzielen. Eine Möglichkeit hierfür stellt eine lokale Injektion des Therapeutikums dar. Im Rahmen einer murinen Vakzinierungsstudie zeigte eine Arbeitsgruppe um Schmidt bereits die Vorteile einer lokalen Injektion. Die Arbeitsgruppe injizierte DZ direkt intratumoral und konnte damit eine deutliche Tumorregression erzielen. Demgegenüber konnte mit einer systemischen (i.v.) oder s.c. Applikation kein vergleichbar starker antitumoraler Effekt erreicht werden (Schmidt et al. 2003).

Die Hypothese bei der in der vorliegenden Arbeit angewendeten bakteriellen Immuntherapie begründet sich darin, dass diese Therapiestrategie zu einer intratumoralen Akkumulation von Effektorzellen führt, die effektiver ist als eine Vakzinierung. Im Unterschied zur Vakzinierung kommt es schon initial durch die intratumorale Injektion von Bakterien direkt zu einer bakterienvermittelten Tumorzellnekrose als zusätzliches antitumorales Therapieprinzip. Dies kann durch die Gewebeerstörung per se (Rovere-Querini et Manfredi 2004) und insbesondere durch nekrotische Tumorzellen zu einer verstärkten antitumoralen Reaktion beitragen. So zeigten Sauter et al. 2000 in *in vitro* Analysen verschiedener muriner und humaner Tumorzelllinien, dass die nekrotische, jedoch nicht die apoptotische Tumorzellschädigung zur Aktivierung von Makrophagen und einer Reifung der DZ führt. Ferner wiesen weitere Studien auf, dass die nekrotischen Tumorbestandteile als kostimulatorische Signale eine mehrfach verstärkte T-Zellaktivierung bewirken können. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Tumorzellen endogene Adjuvantien freisetzen. Dadurch werden DZ zur Reifung stimuliert und ZTL sowohl lokal als auch systemisch aktiviert (Gallucci et al. 1999, Shi et al. 2000). Weiterhin bewirkt die intratumorale Inokulation der Bakterien eine unspezifische Inflammation, in deren Folge vermehrt unspezifische Effektorzellen in das Tumoreal rekrutiert werden (Pezzuto 1998). Nekrotische Tumorfremde können somit anschließend von APZ phagozytiert und prozessiert werden. Dies geschieht vermutlich wie von Sauter beschrieben insbesondere durch DZ, die durch nekrotische Tumorzellen aktiviert werden (Sauter et al 2000). Dadurch kann eine suffiziente Antigenpräsentation *verschiedener* autologer Tumorantigene mit nachfolgender Generierung spezifischer ZTL gegen die Tumorzellen erfolgen, welches einen entscheidenden Vorteil gegenüber der Peptidvakzinierung gegen ein spezifisches AG darstellt.

Zusätzlich wurde bereits mehrfach anhand von Studien vermutet, dass die pathogeninduzierte Inflammation eine Alteration des immunsuppressiven Tumormilieus bewirken kann (Rovere-Querini & Manfredi, 2004, Berendt et al. 1978). Dadurch kann eine

Anergisierung von intratumoralen DZ oder ZTL, welche im intratumoralen Milieu erfolgt (Ghiringhelli et al. 2007), verhindert werden (Bonham et al. 1996).

Erfolgreiche bakteriolytische Studien an syngenesischen Mausmodellen mit verschiedenen Tumorentitäten wurden bereits von Forschungsgruppen um Dang et al. 2001 und Agrawal et al. 2004 durchgeführt. Die Autoren applizierten den Tieren dabei systemisch attenuierte anaerobe Clostridiensporen, die in hypoxischen Regionen des Tumors akkumulierten. In ihren Untersuchungen konnten sie zwar eine deutliche Tumorregression durch die lytische Wirkung der Clostridien sowie tumorzellspezifische ZTL nachweisen, es kam jedoch zu starken systemischen Nebenwirkungen der Clostridien. Darüber hinaus wurden normoxische Tumorrandbereiche nicht beeinflusst (van Mellaert et al. 2006). Mit den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Bakterien werden diese Probleme umgangen, da es sich um fakultativ anaerobe Keime handelt.

Die Injektion einer attenuierten bzw. avitalen Form der Bakterien ist außerdem ein weiterer Schritt in Richtung der Minimierung systemischer Nebenwirkungen für eine potentielle spätere klinische Anwendung. Sollte dennoch der Fall einer Sepsis eintreten, ist die hohe Empfindlichkeit gegenüber Penicillin von Vorteil.

Die Wahl von attenuierten Formen von *S. pyogenes* M49 als fakultativ aerobes Bakterium für die vorliegenden Untersuchungen erfolgte außerdem, da der Einsatz dieses Bakteriums bereits erfolgreich im murinen syngenesischen Pankreaskarzinommodell von Maletzki et al. durchgeführt worden war (Maletzki et al. 2008).

4.3 Diskussion der Ergebnisse

Zunächst festzuhalten bleibt, dass bei den vorliegenden Analysen nachgewiesen werden konnte, dass diese attenuierten Bakterien (SLS⁻ Mutante) bzw. das avitale Bakterienlysate von *S. pyogenes* M49 eine signifikante Tumorregression vermitteln können.

Der Einsatz der zwei verschiedenen Formen des Bakteriums erfolgte wie bereits erwähnt mit dem Ziel, in folgenden Studien eine effektive therapeutische Variante der bakteriellen Immuntherapie entwickeln zu können, die am Patienten mit möglichst geringem Nebenwirkungen jedoch einem ausreichend spezifischem antitumoralen Potential einsetzbar ist. Die Untersuchungen mit den beiden Varianten sollten dazu beitragen, ein besseres Verständnis darüber zu erlangen, welche pathogenen Komponenten den antitumoralen Effekt medieren.

Ausgehend von der Frage, ob unter anderem insbesondere das Streptolysin S für die Tumorregression in den von Maletzki et al. 2008 durchgeführten Experimenten verantwortlich sein könnte, wurde daher zunächst die antitumorale Wirkung einer SLS⁻ Mutante von *S. pyogenes* M49 untersucht. Des Weiteren erfolgte der Einsatz des Lysates von M49, mit der Frage, ob die Vitalität der Bakterien, neben dem Streptolysin S, eine

bedeutende Rolle spielt und ob auch andere Bestandteile des Bakteriums noch von Bedeutung sind.

4.3.1 Rolle des Streptolysins S

Die Untersuchungen zeigten, dass die SLS⁻ Mutante eine weitaus geringere antitumorale Potenz aufwies, als der streptolysinhaltige Wildtyp (Maletzki et al. 2008) und das streptolysinhaltige Bakterienlysate des Wildtyps. Während die Applikation des Lysates und des Wildtyps in den Vorarbeiten zu einer deutlichen und teilweise sogar kompletten Tumorregression führte, kam es infolge der SLS⁻ Bakterieninjektion nur zu einer Teilremission. Ebenso wurde histologisch die intratumorale Infiltration von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen geringer als nach Lysatapplikation nachgewiesen.

Die Ergebnisse deuten damit darauf hin, dass das Toxin Streptolysin S eine entscheidende Rolle in der Vermittlung des antitumoralen Effektes spielt. Vermutlich begründet sich diese Rolle in der starken zytolytischen Potenz von Streptolysin S. Diese führt initial bereits zu einer starken Tumorzellzerstörung und trägt vermutlich wesentlich zur Tumorlastsenkung sowie zu der sich anschließenden Kaskade der Freisetzung endogener Adjuvantien, der Milieualteration und der daraus resultierenden Effektorzellrekrutierung und -aktivierung (s. 4.2) bei. Dies geht einher mit bisherigen Untersuchungsergebnissen der Toxine von *S. pyogenes*. So ist bekannt, dass Streptolysin S unter den zytotoxischen Enzymen und Toxinen von *S. pyogenes* wesentlich zur Vermittlung von zytolytischen Effekten gegenüber eukaryoten Zellen beiträgt und daher vermutlich auch in der Lage ist, eine Lyse von humanen Pankreastumorzellen zu induzieren (Sierig et al. 2003, Datta et al. 2005). Die Arbeitsgruppe um Betschel konnte bereits eine verminderte Virulenz der SLS⁻ Mutante im Vergleich zu dem Wildtyp in Nacktmausmodellen demonstrieren (Betschel et al. 1998).

Da die SLS⁻ Mutante in den vorliegenden Analysen jedoch immer noch einen deutlichen antitumorösen Effekt zeigte, lässt sich daraus schließen, dass andere teils schon beschriebene (Kreikemeyer et al. 2003, Nakata et al. 2005) bakterielle Bestandteile wie z.B. andere Toxine oder Oberflächenmoleküle von *S. pyogenes* ebenso antitumorales Potential besitzen. So kann vermutlich erst durch das Zusammenwirken einzelner Bestandteile des Bakteriums ein ausreichender antitumoraler Effekt vermittelt werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Immunantwort auf Erreger durch verschiedene Bestandteile der Pathogene (RNA, LPS, Endotoxine) ausgelöst werden kann (Janeway et al. 2002) und anschließend über ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Komponenten (Opsonine, Mediatoren, kostimulierende Moleküle etc.) vermittelt wird (Vilmos et al. 1998). Auf Grund dieser Komplexität wird es somit schwer sein, gleichwertige immunologische Effekte einer Bakterieninfektion ausschließlich durch eine einzelne Komponente wie das Streptolysin S herbeizuführen.

Bereits in anderen immuntherapeutischen Studien wurde versucht, Erfolge mit einzelnen Bestandteilen von Bakterien zu erzielen. Berendt et al. behandelten verschiedene syngene Tumoren von Mäusen mit bakteriellen Endotoxinen. Dabei wurde jedoch nur bei besonders immunogenen Tumorentitäten eine zufrieden stellende Regression und eine deutliche T-Zell-vermittelte Immunität induziert. (Berendt et al. 1978, A/B). McConnell et al. 2002 wiederum setzten Enterotoxin B von Staphylokokken und ein MUC1-Vakzin bei einem murinen Pankreastumormodell ein. Sie erreichten damit signifikant verlängerte Überlebenszeiten, die Tumorprogression war jedoch nicht aufzuhalten.

Somit waren die bisherigen Versuche, Tumoren mit einzelnen bakteriellen Bestandteilen zu eliminieren nur teilweise wirksam. Da die Analysen dieser Arbeit zeigen, dass auf Grund der noch immer vermittelten Tumorregression durch die SLS⁻ Mutante neben dem stark antitumoral wirkenden Streptolysin S noch weitere pathogene Faktoren des Bakteriums bzw. deren Zusammenwirken von Bedeutung für die antitumorale Potenz sind, ist bei einer alleinigen Applikation des Streptolysins S ebenso wie bei den Agenzien in den zuvor beschriebenen Studien ein durchschlagender Erfolg fraglich.

4.3.2 Induktion eines spezifischen antitumoralen Effektes nach immuntherapeutischer Intervention

In den durchgeführten Analysen sollte untersucht werden, ob durch die eingesetzten Therapieschemata eine spezifische Immunabwehr induziert werden konnte. Dabei wurden Leukozytensubpopulationen systemisch und lokal analysiert. Aus Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe ist bekannt, dass infolge der Applikation des Wildtyps von *S. pyogenes* tumorspezifische ZTL generiert werden können und es zur Infiltration von CD8⁺ Zellen in den Tumor kommt (Maletzki et al. 2008).

Es zeigte sich, dass die SLS⁻ Mutante vornehmlich eine massive granulozytäre Infiltration induzierte, die mit einer geringen systemischen und nur leicht erhöhten lokalen Reaktion einherging. Es konnte also keine starke spezifische Immunreaktion intratumoral induziert werden. Dies könnte unter anderem auf die nur einmalig durchgeführte intratumorale Injektion im Gegensatz zu der zweimaligen Injektion beim Lysat zurückgeführt werden. Da jedoch in den Vorarbeiten mit dem Wildtyp auch eine deutliche lokale spezifische Reaktion nach einmaliger Injektion beobachtet wurde (Maletzki et al. 2008), ist die verminderte Lymphozyteninfiltration bei der Mutante eher auf das Fehlen des Toxins Streptolysin S zurückzuführen, welches durch eine aktive Tumorlyse stark zu einer effektiveren spezifischen antitumoralen Immunreaktion beitragen kann (s. 1.3.2.3 und 4.3.1). Diese Hypothese wird unterstützt durch die Tatsache, dass infolge der Lysatbehandlung eine deutliche und stärkere systemische und lokale spezifische Immunantwort vermittelt wurde. So konnte ein kontinuierlicher Anstieg der Expression von T-Zellaktivierungsmarkern

nachgewiesen werden, der auf eine Entwicklung von ZTL hindeutet. Zusätzlich wurde vor allem bei den lysatbehandelten Tieren eine erhöhte Expression von Oberflächenmolekülen (CD54) nachgewiesen, die sowohl bei der Interaktion zwischen APZ und T-Zellen, als auch bei der Interaktion zwischen ZTL und ihren Zielzellen erforderlich sind (Janeway & Travers 1999). Ebenso zeigte sich eine vermehrte Expression von L-Selektin (CD62L), welches für die Leukozytenmigration notwendig ist. Das Tumorgewebe wies nach Lysatapplikation eine Infiltration von zytotoxischen (CD8⁺) und T-Helfer (CD4⁺) Zellen auf, die im Vergleich zur jener nach SLS⁻ Applikation deutlich stärker war. Somit belegen auch hier die tumorinfiltrierenden Lymphozyten - als Teil der induzierten spezifischen Immunabwehr - das therapeutische Potential des Lysates. Dass dieses Ergebnis wesentlich ist, wird durch eine Studie von Fukunaga et al. untermauert. Die Autoren untersuchten Tumorgewebe von Patienten auf die Anwesenheit von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen und konnten zeigen, dass Patienten, welche intratumoral beide Zellpopulationen aufwiesen, eine signifikant längere Überlebenszeit erreichten gegenüber Patienten, die intratumoral nur eine der beiden Populationen oder gar keine aufwiesen (Fukunaga et al. 2003).

Hinsichtlich des antitumoralen Potentials des Lysates und auch der Mutante sind allerdings die CD8⁺ Zellen die wichtigste Zellpopulation. So zeigte sich jeweils konkordant zum durchflusszytometrisch und histologisch detektierten Anstieg oder Abfall der T-Zellen eine entsprechende makroskopisch zu beobachtende Tumorregression bzw. -progression. Diese Beobachtung wird unterstützt durch verschiedene Arbeiten, bei denen gezeigt werden konnte, dass insbesondere CD8⁺ T-Zellen bei der Tumorbekämpfung eine Rolle spielen (Wahab et al. 1991, Sivinski et al. 2002). So zeigte die Arbeitsgruppe um Sivinski ebenfalls am Panc02-Pankreastumormodell, dass CD8-defiziente Mäuse deutlich kürzer überlebten als für CD4-defiziente bzw. Wildtypmäuse und dass insbesondere Th1 Zytokine für die Tumorzellelimination verantwortlich waren.

Dennoch sollte ebenso beachtet werden, dass sich nach der Lysatinjektion neben der starken intratumoralen Infiltration zytotoxischer T-Zellen auch ein Anstieg der Infiltration von CD4⁺ Zellen zeigte, wenn auch deutlich schwächer ausgeprägt. Es ist bekannt, dass die intratumorale Anwesenheit von CD4⁺ Zellen, welche die adaptive Abwehr in Richtung der humoralen (Th2) oder zytotoxische (Th1) Immunantwort lenken können, ebenfalls zu einer besseren Prognose bei Tumoren beiträgt (Fukunaga et al. 2003, Morikane et al. 2001). So konnte eine Arbeitsgruppe um Ratliff 1993 zeigen, dass im Mausmodell des Blasenkarzinoms sowohl die Anwesenheit von CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen erforderlich ist, um mit einer Applikation von BCG ein erfolgreiches therapeutisches Ergebnis zu erzielen (Ratliff et al. 1993). In weiteren Untersuchungen zeigten Thanhäuser et al. wiederum jedoch, dass CD8⁺/CD56⁺ T-Zellen als BCG aktivierte Killerzellen für den tumortoxischen Effekt verantwortlich waren (Thanhäuser et al. 1993, 1995). Die Rolle der

CD4⁺ Zellen kann für die vorliegenden Untersuchungen jedoch nicht abschließend beurteilt werden. Hierzu wären noch weitere Analysen wie beispielsweise Zytokinbestimmungen zur genaueren Erfassung der immunologischen Reaktionskaskade hilfreich.

Eine weitere Beobachtung bei der Behandlung mit dem Lysat in der vorliegenden Arbeit war eine systemisch kontinuierliche Zunahme von NK-Zellen. NK-Zellen spielen neben der unmittelbaren Immunabwehr von Tumorzellen auch bei der spezifischen Abwehr eine Rolle, indem sie vor allem - neben der Beteiligung an der Generierung von Gedächtnis T-Zellen (Kelly et al. 2002) - über eine antikörpervermittelte Zytotoxizität (ADCC) gegen Tumorzellen wirken (Coupland et al. 2000). Somit weisen die Befunde auch hier auf eine Entwicklung in Richtung einer spezifischen Immunreaktion hin. Demgegenüber kam es nach der SLS⁻ Bakterieninfektion nur zu einer transienten Zunahme der NK-Zellen, welche vermutlich auf unspezifische Abwehrmechanismen zurückzuführen ist, denn damit einhergehend zeigten Makrophagen und Granulozyten einen konkordanten Verlauf.

Anhand der systemischen und lokalen Untersuchungen lässt sich somit zusammenfassend schließen, dass die intratumorale Immuntherapie mit dem Lysat zu einer lokalen und systemisch messbaren Immunantwort gegen die Tumorzellen führte, die SLS⁻ Mutante hingegen nur in geringem Maße einen im Vergleich zu Kontrolltieren nachweisbaren Effekt zeigte. Die beobachtete Tumorregression wurde dabei vor allem durch ZTL (CD8⁺) vermittelt, die Beteiligung humoraler Komponenten (ADCC Aktivierung via NK-Zellen) könnte jedoch auch eine Rolle dabei spielen.

4.3.3 Bedeutung der Applikationsart

Durch die lokale Applikation der Bakterien sollten systemische Nebenwirkungen minimiert und eine maximale lokale antitumorale Wirkung erzielt werden. Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, dass die Vermeidung septischer Nebenwirkungen bei dem Lysat, jedoch nur bedingt bei der Mutante, erfolgreich war (s. 4.3.2). Dagegen trug die lokale Injektion zu einer starken lokalen antitumoralen Wirkung bei, die nicht ausschließlich auf einen unspezifischen, durch die Injektion bedingten Stimulus zurückzuführen ist. Denn bei den Vehikeltieren zeigte sich kein intratumoraler Anstieg von Granulozyten oder spezifischen Effektorzellen. Durch diese Ergebnisse können Beobachtungen aus anderen Studien untermauert werden, wonach eine pathogen-induzierte lokale Inflammation zu einem Milieu führt, welches die Infiltration von CD8⁺ und CD4⁺ Zellen begünstigt (Rovere-Querini et Manfredi 2004, Berendt et al 1978, B).

Weiterhin konnte in dieser Arbeit beobachtet werden, dass die Anzahl der Injektionen einen Einfluss auf den Therapieverlauf hat. Da sich nach einmaliger Lysatinjektion zunächst keine Erfolge zeigten, wurde eine zweite Injektion im Abstand von 4 Tagen durchgeführt. Daraufhin kam es zu einer massiven Tumorregression. Der nach zunächst nur einmaliger

Applikation geringe antitumorale Effekt kann darauf zurückzuführen sein, dass der lokale inflammatorische Reiz zunächst nicht stark genug war. Dies erklärt auch die geringe granulozytäre Tumordinfiltration, die vermutlich auf der fehlenden Keimvermehrung als zusätzlichen Stimulus beruht. Die Inflammation resultierte demnach nur aus der durch die Toxine verursachten Tumorzellnekrose. Durch die einmalige Stimulation kam es zwar zu einer Infiltration von Effektorzellen, diese allein war jedoch nicht effektiv genug, um einen nachhaltigen antitumoralen Effekt zu mediieren. Bezieht man sich nun auf die bereits erwähnten Studien von Gallucci et al. 1999 und Sauter et al. 2000 (s. 4.2) so ist folgender Ablauf denkbar: Bei der zweiten Injektion trafen nun erneut aus nekrotisierten Tumorzellen freigesetzte endogene Aktivator auf bereits infiltrierte Effektorzellen und verstärkten deren Aktivierung ebenso wie sie eine verstärkte Präsentation von Tumorantigenen auf APZ hervorriefen. Ferner wurden durch die Fernwirkung dieser endogenen Aktivator (Shi et al. 2000) sowie der Bakterientoxine bereits syntetisierte ZTL aktiviert. Demnach ist der starke antitumorale Effekt insbesondere auf die Aktivierung dieser ZTL zurückzuführen. Diese Hypothese wird unterstützt durch die bei den Analysen nachweisbaren ansteigenden aktivierten T-Zellen und den hohen Anteil an intratumoralen ZTL und des Weiteren auch seitens der Literatur. So beobachtete die Arbeitsgruppe um Berendt et al., dass bei einer systemischen Endotoxinbehandlung muriner Tumoren nur eine deutliche Tumorregression erreicht wurde, wenn bereits tumorspezifische T-Zellen vorhanden waren (Berendt et al. 1978, A/B). Ebenso erwies sich in einer Vakzinierungsstudie mit tumorspezifischen beladenen DZ, dass insbesondere eine wiederholte Injektion des Vakzins zu einer Verdopplung der IFN- γ Sekretion bei ZTL führte und die antitumorale Immunität dadurch anstieg (Kim et al. 2006). Somit ist das Konzept der bakteriellen Immuntherapie als mehrfache lokale intratumorale Bakterieninjektion vielversprechend.

Zu erwähnen sei an dieser Stelle noch, dass die Untersuchungen mit der SLS⁻ Mutante nach nur einmaliger Injektion erfolgten, um eine entsprechende Vergleichbarkeit mit dem vitalen Wildtyp aus den Vorarbeiten zu erhalten und so die Rolle des Streptolysin S im Rahmen der antitumoralen Wirkung beurteilen zu können. Denn auch bei den Analysen mit dem Wildtypstamm von Maletzki et al. 2008 war nur eine Injektion durchgeführt worden, da diese bereits zu einer kompletten Tumorregression führte.

4.3.4 Bedeutung der Vitalität der Bakterien

Auf Grund des schwächeren, aber dennoch deutlich nachweisbaren antitumoralen Effektes, den die SLS⁻ Mutante von *S. pyogenes* in den vorliegenden Analysen erzielte, ergibt sich natürlich die Frage, welche weiteren pathogenen Faktoren des Bakteriums für die zu beobachtenden antitumoralen Effekte verantwortlich sind. Um diese genau identifizieren zu können, müssten weitere funktionelle Studien mit anderen Mutanten oder

einzelnen Bakterienbestandteilen erfolgen. Sie können im Rahmen dieser Arbeit daher nicht näher bestimmt werden. Allerdings kann anhand der in den vorliegenden Analysen demonstrierten antitumoralen Potenz des Lysates als avitales Agens aufgezeigt werden, dass die Vitalität der Bakterien und somit ihre Vermehrung, die bei anderen bakteriellen Immuntherapiestudien (Dang et al. 2001, Agrawal et al. 2004) strategisch wichtig war (hypoxische Vermehrung), bei *S. pyogenes* M49 nicht zwingend notwendig ist, um einen antitumoralen Effekt zu vermitteln. Da die Vitalität als fehlender pathogener Faktor (Vermehrungspotenz) des Lysates allerdings erforderte, dass die Injektion beim Lysat zweimal erfolgte (s. 4.3.4) und die antitumorale Potenz bei dem vitalen Wildtyp aus den Vorarbeiten schon bei einmaliger Injektion deutlichen zu erzielen war (Maletzki et al. 2008), spielt die Vitalität sicher eine Rolle bezüglich einer schnelleren und effektiv aktivierbaren Immunreaktion. Dieser antitumorale Effekt kann bei dem avitalen Lysat nur auf Kosten eines höheren Aufwandes (mehrfache Injektion mit höherer Konzentration an lysierten Bakterien) erreicht werden. Allerdings geschieht dies dann auch zum Nutzen der Minimierung von Nebenwirkungen, die vitale Bakterien mit sich bringen.

So erwies sich im Rahmen dieser Arbeit die Vitalität der Bakterien eher als ungünstig für die behandelten Tiere. Zum einen war nach der Injektion der Mutante wie bereits erwähnt eine systemische proinflammatorische Reaktion im peripheren Blut (Differentialblutbild, Durchflusszytometrie) nachweisbar. Da eine solche Reaktion nach der Lysatinjektion nicht auftrat, ist die Ursache dieser systemischen Inflammation bei den vitalen Bakterien vermutlich in einer Makrophagen-vermittelten Prävention einer systemischen Bakteriendissemination zu suchen, wie sie für Streptokokken bekannt ist (Goldmann et al. 2003, Agrawal et al. 2004). Diese Hypothese wird unterstützt durch die durchflusszytometrischen Beobachtungen. Nach der Therapie mit den SLS⁻ Bakterien wurden vermehrt Monozyten, Makrophagen und Granulozyten (CD11b⁺) im Blut nachgewiesen. Des Weiteren verursachten die vitalen Bakterien initial eine stärkere lokale inflammatorische Reaktion und damit verbunden auch eine ausgeprägtere Tumornekrose. So wurde nach lokaler Applikation der SLS⁻ Mutante im Tumorgewebe (As-D-Färbung) eine stärkere Granulozyteninfiltration nachgewiesen als nach Lysatinjektion. Generell ist dies zwar wünschenswert im Rahmen der Immunreaktionsinduktion. Diese primäre Inflammation vermochte es jedoch nicht, zu einer stärkeren antitumoralen, spezifischen Immunreaktion zu führen als die Applikation avitaler Bakterien, da die intratumorale Infiltration von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen nach Lysatapplikation ausgeprägter war.

Die Vitalität der Mutante ist an dieser Stelle somit nicht von Vorteil, da ihre Potenz bezüglich einer Induktion einer Immunreaktion vermutlich durch das fehlende Streptolysin S gemindert ist (s.4.3.1) und dennoch die Nebenwirkungen in Kauf genommen werden müssen.

Vergleicht man die Tumorregression aus den Vorarbeiten nach der Therapie mit dem Wildtyp mit dem Lysat, so zeigt sich ein besseres Ergebnis bei dem vitalen Wildtyp, da es hierbei generell zur kompletten Tumorregression kam (Maletzki et al. 2008) und nach Lysatapplikation nur in zwei Fällen. Das Lysat bewirkte jedoch, nachdem es zunächst nur zu einem verzögerten Tumorwachstum führte, gegen Ende des Beobachtungszeitraumes noch eine deutliche Tumorregression, so dass fraglich ist, ob es bei entsprechend längerer Beobachtung der Tiere nicht auch zu einer kompletten Tumorregression kommen würde und die Immunreaktion an sich auf Grund der zweiten späteren Injektion leicht verzögert stattgefunden hat. Bei beiden Therapiegruppen, sowohl nach vitaler als auch avitaler Wildtypapplikation, resultierte im Endeffekt eine deutliche spezifische Immunreaktion. Somit ist wie bereits erwähnt die Vitalität der Bakterien bezüglich der Induktion einer schnelleren effektiven Immunreaktion nicht von der Hand zu weisen. Allerdings ist mit Hinblick auf eine klinische Anwendung die Nutzen/Risiko Relation des vitalen Bakteriums wohl zu erwägen.

Als gravierende Nebenwirkung sind insbesondere die hämatologischen Befunde, die für einen sepsisähnlichen Zustand sprechen, aufzuführen. So wurde eine deutliche Erythro- Lympho- und Thrombozytopenie im Verlauf detektiert. Diese Befunde zeigen, dass eine systemische Dissemination der vitalen Bakterien nicht ausgeschlossen werden kann. Der Nachweis von bakteriellen Disseminationen mittels Organhomogenat- und Blutaussstrichen auf Agarplatten, wie er in dieser Arbeit durchgeführt wurde, stellt zwar eine etablierte Methode dar. Es ist jedoch möglich, dass eine sehr geringe bakterielle Anzahl in den Organen nicht erfasst wird (Domínguez-Punaro et al. 2007). Die im Rahmen der Ausstriche erhobenen Ergebnisse belegen daher nur, dass nach i.t. Applikation keine starke Dissemination der vitalen Bakterien in den Organen bzw. dem Blut nachweisbar war. Somit läßt sich zwar eine grobe systemische, jedoch nicht eine geringe und in diesem Fall dann symptomatische, bakterielle Streuung ausschließen. Allerdings zeigten sich ansonsten keine weiteren Anzeichen einer Sepsis im Allgemeinzustand oder Verhalten der Tiere. Eine Erklärung für die Erythrozytämie ist die Inflammation und/oder ein Eisenmangel, verursacht durch den erhöhten Eisenkonsum der Bakterien. Über *S. pyogenes* ist bekannt, dass die Bakterien das Eisen als Nährsubstanz nicht nur aus dem Serum, sondern unter anderem zu einem Großteil aus dem Hämoglobin der Erythrozyten mittels Zytolyse gewinnen (Eichenbaum et al. 1996). Da das MCH bei den mit vitalen Bakterien behandelten Tieren im Verlauf ebenso wie das Hämoglobin abnahm, ist eine durch *S. pyogenes* verursachte Anämie mit Eisenentzug tatsächlich anzunehmen.

Eine weitere Auffälligkeit nach der Applikation vitaler Bakterien ist die massive hyperplastische Splenomegalie, welche in mit SLS⁻ Bakterien infizierten Tieren (und auch bei dem Wildtyp in den Vorarbeiten) beobachtet wurde. Da diese Splenomegalie zum einen

mit einer erhöhten Splenozytenanzahl und zum anderen mit dem deutlichen Anstieg des Proliferationsmarkers CD71 (Transferrinrezeptor) einherging, könnte sie somit als eine reaktiv hyperplastische Splenomegalie auf die hämatotoxische und inflammatorische Wirkung der vitalen Bakterien angesehen werden. Demnach resultierte sie unter anderem aus der reaktiven Nachbildung der nach der Bakterieninjektion reduzierten Zellpopulationen. In den Untersuchungen wurde daher versucht, Zellpopulationen, welche insbesondere CD71 hochregulierten, mittels Doppelmarkierungen in der Durchflusszytometrie zu erfassen. Dabei gelang es jedoch nicht, den zuvor gemessenen Anstieg des Transferrinrezeptors anhand der nun doppelmarkierten untersuchten Zellen widerzuspiegeln. Lediglich generell aktivierte Zellen (CD25⁺ und CD80⁺ Zellen) waren mit je ca. 5 % etwas stärker vertreten. Die Begründung für diese Ergebnisse liegt vermutlich in einem methodischen Fehler. Denn der für die Doppelmarkierungen verwendete PE gelabelte Anti-CD71 AK stammte von einem anderen Hersteller mit anderem Clon und Isotyp als der FITC gelabelte Anti-CD71 AK, mit welchem zuvor die hohen Werte gemessen worden waren. Somit ist eine unterschiedliche ausgeprägte Affinität auf Grund einer Ausrichtung gegen verschiedene Epitope eine mögliche Erklärung für die unterschiedlich starken Detektionen (aus den Datenblättern der AK war keine Information über die Epitope zu gewinnen). Die Untersuchungen hätten somit erneut mit anderen AK und einem komplett neuen Durchgang aller Therapiegruppen wiederholt werden müssen. Da die Beobachtung des erhöhten Transferrinrezeptors jedoch als Zufallsbefund im Rahmen der Untersuchungen einen derartigen Aufwand nicht rechtfertigten, können daher nur anhand der sonstigen Ergebnisse dieser Arbeit Vermutungen bezüglich der Ursache des Transferrinrezeptoranstieges geäußert werden:

So ist eine mögliche Erklärung für seinen gemessenen Anstieg eine reaktive T- und B-Zellnachbildung auf die vermutlich hämatotoxische Reduktion derselben Zellpopulation durch die SLS⁻ Mutante. Für diese These sprechen die inversen Verlaufsformen der abfallenden T- und B-Zellpopulationen gegenüber den in gleicher Weise zunehmenden transferrinrezeptorexprimierenden Zellen in der Durchflusszytometrie. Des Weiteren ist aus der Literatur bekannt, dass der Transferrinrezeptor generell bei proliferierenden Zellen und nach mitogener Stimulation von Lymphozyten hochreguliert wird (Lok & Loh 1998).

Eine weitere Möglichkeit könnte die Erhöhung der CD71⁺ Zellen ebenso als unspezifische immunologische Schutzreaktion auf die bakterielle Infektion hin gewertet werden: Wichtig hierbei ist die Erzeugung eines möglichst eisenarmen Milieus, so dass das Eisen den Bakterien als Nährsubstanz entzogen wird (Bullen et al. 2006) mittels vermehrter Eisenaufnahme (Hochregulation des Transferrinrezeptors) in körpereigene Zellen. Unterstützend kann hier seitens der Ergebnisse aufgeführt werden, dass insbesondere aktivierte Zellen eine höhere Expression des CD71 Rezeptors aufwiesen.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Vitalität der Bakterienmutante nahezu das Bild einer septisch-hämatotoxischen Reaktion vermittelte. Somit kann anhand der Analysen und auch der Ergebnissen aus den Arbeiten mit dem vitalen Wildtyp (Maletzki et al. 2008) geschlussfolgert werden, dass ein vitales Bakterium von *S. pyogenes* zwar eine Tumorregression medieren kann, jedoch als immuntherapeutischer Therapieansatz auf Grund seiner systemischen Auswirkungen viele Risiken birgt. Das Lysat zeigt trotz seiner Avitalität nach zweimaliger Injektion ein antitumorales Potential und ist deutlich weniger toxisch. Die Vitalität kann bezüglich der Induktion einer spezifischen Immunreaktion (s. auch 4.3.2) bei dem Lysat mit einer zweimaligen Injektion quasi ersetzt werden (s. auch 4.3.3).

Somit belegen die Untersuchungen diese Arbeit, dass die Vitalität des Bakteriums *S. pyogenes* für eine effektive antitumorale Wirkung im Rahmen einer bakteriellen Immuntherapie am untersuchten Mausmodell nicht notwendig ist und insbesondere mit Hinblick auf die Nebenwirkungen die Lysattherapie als avitale Therapiestrategie zu bevorzugen ist.

4.4 Weiterführende Untersuchungen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass attenuierte bakterielle Formen der Gattung *S. pyogenes* prinzipiell antitumorales Potential besitzen. Durch den Einsatz des wenig virulenten attenuierten Bakteriums, welches kein funktionelles Exotoxin (Streptolysin S) produziert, sowie des Lysates von *S. pyogenes* konnten deutliche Unterschiede in der Wirksamkeit der beiden Bakterienformen herausgearbeitet werden.

Es bleiben aber noch weitere Fragen zu klären, da die vorliegende Studie nur bedingt Aussagen über den Ablauf der Immunreaktionen liefern kann. Weiterführende Untersuchungen sollten daher vor allem auf die Charakterisierung der immunologischen Reaktionen *in vivo* abzielen. Dabei stellt der Lymphozytentransfer eine valide Methode dar, um die Spezifität der ZTL zu untersuchen. Hierbei wird untersucht, ob Mäuse durch eine Transfusion von Lymphozyten, die aus Therapietieren isoliert wurden, vor einem Tumorwachstum durch s.c. injizierte Panc02 Zellen geschützt werden können. Zum anderen kann das Potential der therapieinduzierten Immunität mittels eines „rechallenge“ Modells untersucht werden, indem bereits erfolgreich therapierte Tiere erneut eine s.c. Injektion der Panc02 Zellen erhalten und anschließend ein potentiell Tumorwachstum überprüft wird (Berendt et al. 1978 A/B, Clary et al. 1997, Morikane et al. 2001, Pützer et al. 2002, Agrawal et al. 2004, Bauer et al. 2007).

Darüber hinaus könnte in nachfolgenden Untersuchungen gezielt untersucht werden, ob eine Steigerung der Zahl der Injektionen zu einem noch besseren Therapieerfolg führt, indem durch mehrfache Boosterungen eine größere ZTL-Population erreicht wird.

Es erscheint ebenfalls notwendig, weitere Untersuchungen zum Bakteriophagenlysin PlyC₁ durchzuführen, um dessen Wirkung *in vivo* genauer charakterisieren zu können. Obwohl das Lysin bereits intensiv untersucht wurde (Nelson et al. 2001, Nelson et al. 2006), ist eine Anwendung wie in dieser Arbeit neu. Effekte gegen bakterielle Zellen wurden bisher zwar nicht nachgewiesen (Nelson et al. 2001), nach PlyC₁ Applikation kam es jedoch zu einer leichten Wachstumsverzögerung der Tumoren im Vergleich zu den PBS Vehikeltieren. Eine dies erklärende lokale oder systemische Immunreaktion konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Eine nähere Charakterisierung der Substanz bezüglich einer Anwendung in der bakteriellen Immuntherapie ist daher sinnvoll.

Auch wenn noch weiterführende Analysen notwendig sein werden, lässt sich zusammenfassend sagen, dass die bakterielle Immuntherapie mit dem Bakterienlysat von *S. pyogenes* M49 auf Grund ihres eindrucksvollen antitumoralen Erfolges im murinen Modell zum Pankreaskarzinom eine viel versprechende Therapieoption darstellt. Die in dieser Arbeit erzielten Effekte einer tumorspezifischen Immunreaktion weisen auf eine kostengünstige und effektive Therapiestrategie bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms hin, die in ferner Zukunft alleine oder in Kombination mit anderen Maßnahmen (als adjuvante Therapie) erfolgreich sein könnte.

5 Zusammenfassung

Wie bereits in Fallbeispielen berichtet und in mehreren experimentellen Studien gezeigt werden konnte, stellt die bakterielle Immuntherapie eine viel versprechende Möglichkeit zur Therapie von Malignomen dar. In einem murinen syngeneten heterotopen Tumormodell des Pankreaskarzinoms konnte bereits die starke antitumorale und immunstimulierende Wirkung von lokal applizierten Bakterien der Gattung *S. pyogenes* gezeigt werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, eine vergleichende Analyse hinsichtlich des antitumoralen Potentials von zwei attenuierten Formen von *S. pyogenes* als immuntherapeutischen Ansatz für das therapieresistente Pankreaskarzinom durchzuführen. Hierbei sollten Informationen über antitumoral wirksame Bestandteile des Bakteriums gesammelt werden, so dass die Entwicklung einer klinisch anwendbaren Therapieform ermöglicht wird.

Dazu wurde an tumortragenden C57Bl/6 Mäusen das antitumorale Potential einer für das Exotoxin Streptolysin S negativen attenuierten Mutante analysiert und mit der Wirksamkeit eines avitalen Lysates des Wildtyps verglichen. Hierbei sollten insbesondere Hinweise zu der Rolle des Streptolysins S und der Vitalität der Bakterien hinsichtlich der antitumoralen Potenz gefunden werden.

Die Beurteilung der systemischen Immunreaktion erfolgte anhand von Untersuchungen des Differentialblutbildes sowie von durchflusszytometrischen Lymphozyten- und Blutleukozytenpopulationsbestimmungen. Die lokale intratumorale Immunreaktion wurde anhand histologischer (Granulozytennachweis) und immunhistochemischer (Nachweis von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen) Untersuchungen erfasst.

Die Analysen ergaben, dass das Streptolysin S einen wesentlichen Beitrag zur Vermittlung des antitumoralen Effektes leistet, jedoch noch andere Bestandteile von *S. pyogenes* daran beteiligt sind, denn die Applikation der attenuierten Form erzielte zwar eine signifikante, aber nur partielle Tumorregression. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die zur Vermittlung des antitumoralen Effektes injizierten Bakterienbestandteile nicht vital sein müssen, denn das Lysat führte zu einer teils kompletten und deutlich stärkeren Tumorregression als die Mutante. Wenn auch die Tumorregression mit dem vitalen Wildtyp aus den Vorarbeiten noch eindrucksvoller war, so wurde nach der Lysatapplikation ebenso eine hinreichende systemische und lokal nachweisbare Rekrutierung spezifischer Effektorzellen erzielt. Die Vitalität als pathogener Faktor des Bakteriums konnte hierbei bezüglich seiner Effektivität, eine spezifische Immunreaktion zu induzieren, durch eine wiederholte Injektion ersetzt werden. So wurde nach zunächst einmaliger Injektion des Lysates keine, nach zweifacher Injektion jedoch eine teils sogar komplette Tumorregression erzielt. Durch den Einsatz des Lysates können somit toxische Nebeneffekte insbesondere mit Hinblick auf eine klinische Anwendung minimiert werden. Denn nach der Applikation der vitalen Bakte-

rien wurden im Gegensatz zum Lysat neben septisch-hämatotoxischen Auswirkungen im Blutbild, auch eine massive reaktive Splenomegalie, sowie eine starke systemische Granulozytose beobachtet.

Des Weiteren zeigte sich, dass die tumorinfiltrierenden Zellen bei den Lysat-Therapietieren im Rahmen der durchflusszytometrischen und immunhistochemischen Analysen als aktivierte T-Zellen, die einen vornehmlich CD8⁺ Phänotyp aufwiesen, identifizierbar waren. Die Infiltration dieser zytotoxischen T-Zellen in das Tumorgewebe korrelierte hierbei deutlich mit der Tumorregression. Somit kann von einer entscheidenden Rolle der T-Zellen im Rahmen der antitumoralen Potenz ausgegangen werden.

Anhand der vorliegenden Arbeit kann damit geschlossen werden, dass das Lysat als attenuierte Form des Bakteriums *S. pyogenes M49* eine viel versprechende Substanz in der Behandlung des Pankreaskarzinoms darstellt, dessen potentieller therapeutischer Einsatz in weiterführenden Untersuchungen analysiert werden sollte.

6 Anhang

6.1 Verwendete Chemikalien

Mayers Hämalan	Merck, Darmstadt
Tissue Tek	Sakura, Zoeterwoude
Tris	ROTH, Karlsruhe
Aquatex	Merck, Darmstadt
Methanol	LAB-SCAN, Dublin
DMEM	Biochrom AG, Berlin
Ketaminhydrochlorid 10%	Essex Pharma, München
Xylazinhydrochlorid 2%	Bayer, Leverkusen
Diethylether	J.T. Baker, Deventer

6.2 Geräte und Hilfsmittel

Blutanalysegerät:	Sysmex SE-9000	SysmexGmbH
Kryostat:	LEICA CM 1850	LEICA, Solms
Mikroskope:	Axiophot	Zeiss, Jena
	Wilovert S	hund, Wetzlar
Zentrifugen:	Avanti [™] 30 Centrifuge	Beckmann, Krefeld
	Varifuge 3,0R	Heraeus, Hannover
	Biofuge pico	Heraeus, Hannover
	Smart Spec [™] 3000	Bio Rad, München
Laminarbox	Mikroflow	NUNC, Wiesbaden
Durchflusszytometer:	FACSCalibur	BD Pharmingen, Heidelberg
Schüttler:	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Sonstiges:	Pipetten	Eppendorf, Hamburg
	elektrischer Pipetboy	Eppendorf, Hamburg
	Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
	Präparierbesteck	Aesculap
	(anatomische/chirurgische Pinzette, Schere)	
Staining Kit		Santa Cruz, Heidelberg
OD Kuvetten		Sarstedt, Nürnberg
adhäsive, geschliffene Objektträger		Histobond, Marienfeld
Deckgläser		Menzel-Gläser, Braunschweig
FACS Lysing solution		BD Pharmingen, Heidelberg

EDTA Röhrchen	Sarstedt, Nürnberg
Blutkapillaren 20µl	Sarstedt, Nürnberg
Kanülen 20G	BD Microlance, Heidelberg
Kompressen	Hartmann, Heidenheim
Insulinspritzen	BD Micro.Fine, Heidelberg
Nylonsieb 70 µm	BD Falcon, Heidelberg
FACS- Röhrchen 5 ml Rundboden	BD Falcon, Heidelberg
Zentrifugengefäße (14ml, 50ml)	Greiner, Frickenhausen
PS-Tube, steril (14 ml)	Greiner, Frickenhausen
Einmalpipetten, steril (5ml, 10ml)	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
Cryomold-schalen (15x15x5mm)	Sakura, Zoeterwoude
Zellkulturflaschen (50ml, 250ml)	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (1,0-2,0ml)	Eppendorf, Hamburg

6.3 Antikörper

6.3.1 FACS

FITC anti mouse CD3	BD Pharmingen, Heidelberg
FITC anti mouse CD4	Miltenyi Biotec, Bergisch
Gladbach	
FITC anti mouse CD8a	Miltenyi Biotec, Bergisch
Gladbach	
FITC anti mouse CD11b	Miltenyi Biotec, Bergisch
Gladbach	
FITC anti mouse CD11c	Miltenyi Biotec, Bergisch
Gladbach	
FITC anti mouse CD19	BD Pharmingen, Heidelberg
FITC anti mouse CD71	BD Pharmingen, Heidelberg
FITC anti mouse Gr1	Miltenyi Biotec, Bergisch
Gladbach	
FITC anti mouse NK1.1	BD Pharmingen, Heidelberg
FITC anti mouse IgG κ	BD Pharmingen, Heidelberg
(Isotypekontrolle)	
FITC anti mouse CD34	eBioscience, San Diego
PE anti mouse CD71PE	eBioscience, San Diego

6.3.2 Immunhistologie

Primär AK

Ratte anti CD4 mouse (FITC)	1:50	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
-----------------------------	------	------------------------------------

Ratte anti CD8-β mouse	1:200	Santa Cruz, Heidelberg
------------------------	-------	------------------------

Sekundär AK

anti-Ratte biotyliniert	1: 200	ABC-Staining Kit, Santa Cruz, Heidelberg
-------------------------	--------	--

6.4 Media, Agar

Media:

Zellkulturen	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) + 10 % FCS + 1 % P/S
--------------	--

Einfriermedium	DMSO (Dimethylsulfoxid) + 15 % FCS
----------------	------------------------------------

M49 Wildtyplysat S. pyogenes	THY (Todd Hewitt Broth, Yeast Extract)
SLS ⁻ Mutante S. pyogenes	THY+ Chloramphenicol/Erythromycin

Agar:

M49 Wildtyplysat S. pyogenes	THY (Todd Hewitt Broth, Yeast Extract)
SLS ⁻ Mutante S. pyogenes	THY– cm ² /e ² (Chloramphenicol/Erythromycin)

6.5 Puffer und Lösungen

6.5.1 allgemein

PBS Puffer

Für 10L 1x PBS:

KH ₂ PO ₄	2 g KH ₂ PO ₄
NaCl	80 g NaCl
Na ₂ HPO ₄	21,6 g Na ₂ HPO ₄
KCl	2 g KCl
	ad 10L A. dest.

6.5.2 FACS

FACS Puffer

Für 400ml:

NaN ₃ (0,1 %)	2 ml NaN ₃ (20 %)
FCS (1 %)	4 ml FCS (1 %)
PBS	394 ml PBS

FACS Lysing Solution

FACS Lysing Solution	1:10 verdünnt mit A. dest.
----------------------	----------------------------

Lysepuffer Splenozyten

Pro Milz:

0,17 M Trisbase	10 ml Trisbase
0,16 M NH ₄ CL	90 ml NH ₄ CL
	frisch und steril angesetzt

6.5.3 Histologie

6.5.3.1 HE Färbung

Mayer's Hämalan	1:5 verdünnt mit A. dest.
Eosin G (0,5 %)	0,5 g Eosin G ad 100 ml A. dest.

6.5.3.2 As-D Färbung

Echtgranatsalzkonzentrat (10 mg in 100 ml PBS)	5 ml Konzentrat ad 95 ml A. dest.
Naphtol-As-D-Chlorazetat	16 mg Naphtol-As-D-Chlorazetat ad
Dimethylsulfoxid	2 ml DMSO Schütteln und filtrieren

6.5.4 Immunhistochemie

ABC-Staining Kit (Santa Cruz, Heidelberg)

Mayer's Hämalan	1:5 verdünnt mit A. dest.
-----------------	---------------------------

7 Abkürzungen

ADCC	Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity
AK	Antikörper
APZ	antigen präsentierende Zellen
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
CD	Cluster of differentiation
cfu	colony forming units
DZ	dendritische Zellen
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DPC4	deleted in pancreatic cancer-4
EGFR	epidermal growth factor receptor
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	fluorescence activated cell sorting
FAMMM–Syndrome	familiäres atypisches multiple Molen-Melanom–Syndrome
FAP-Syndrom	familiäres adenomatöses Polyposesyndrom
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GF	Gesichtsfeld
GM-CSF	Granulocyte macrophage-colony stimulating factor
HE	Hämalaun Eosin
HER2	Herceptin 2
HNPCC-Syndrom	hereditäres nicht polypöses Kolonkarzinom-Syndrom
i.t	intratumoral
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LAK	Lymphokin-aktivierten Killerzellen
min	Minuten
MCH	Mean corpuscular haemoglobin
MCV	Mean corpuscular volume
MUC	Mucin
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PE	Phycoerythrin
p.i.	post infectionem
PlyC ₁	Phagenlysin C1
PSZ	pankreatische Sternzellen

rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
s.c.	subkutan
SLS ⁽⁻⁾	Streptolysin S ^(negativ)
SPSS	Statistical Product and Service Solutions
TAA	Tumorassoziierte Antigene
TGF	Transforming growth factor
THY	Todd Hewitt Broth Yeast Extract
TNF	Tumornekrosefaktor
TSA	tumorspezifische Antigene
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZTL	zytotoxische T-Lymphozyten

8 Literaturverzeichnis

- 1) Abbas AK, Lichtmann AH, 2005, 5. Auflage, Cellular and molecular immunology, Elsevier Saunders, Chapter 17: Imunity to Tumors, 391-410
- 2) Ademmer K, Ebert M, Müller-Ostermeyer F, Friess H, Büchler MW, Schubert W, Malfertheiner P, 1998, Effector T lymphocyte subsets in human pancreatic cancer: detection of CD8⁺CD18⁺ cells and CD8⁺CD103⁺ cells by multi-epitope imaging, Clin Exp Immunol, 112:21-26
- 3) Agrawal N, Bettgowda C, Cheong I, Geschwind JF, Drake CG, Hipkiss EL, Tatsumi M, Dang LH, Diaz LA, Pomper M, Abusedera M, Wahl RL, Kinzler KW, Zhou S, Huso DL, Vogelstein B, 2004, Bacteriolytic therapy can generate a potent immune response against experimental tumors, PNAS, 101:42, 15172-12177
- 4) Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS, 1998, Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture, GUT, 43:128-133
- 5) Apte MV, Park S, Phillips PA, Santucci N, Goldstein D, Kumar RK, Ramm GA, Buchler M, Friess H, McCarroll JA, Keogh G, Merrett N, Pirola R, Wilson JS, 2004, Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells, Pancreas, 9:179-187
- 6) Bachem MG, Schneider E, Gross H, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Siech M, Beger H, Grünert A, Adler G, 1998, Identification, culture and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans, Gastroenterology, 115:421-432
- 7) Bachem MG, Schünemann M, Ramadani M, Siech M, Beger H, Buck A, Zhou S, Schmid-Kotsas A, Adler G, 2005, Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells, Gastroenterology, 128:907-921
- 8) Bassi P, 2002, BCG therapy of high-risk superficial bladder cancer, Surg Oncol, 11:77-83
- 9) Bauer CA, Bauernfeind F, Sterzik A, Orban M, Schnurr M, Lehr HA, Endres S, Eigler A, Dauer M, 2007, Dendritic cell-based vaccination combined with gemcitabine invreases survival in a murine pancreatic carcinoma model, Gut, 56:1275-1282.
- 10) Berendt MJ, North RJ, Kirstein DP, 1978 A, The immunological basis of endotoxin-induced tumor regression. Requirement for T-cell-mediated immunity, J Exp Med, 148:1550-1559

- 11) Berendt MJ, North RJ, Kirstein DP, 1978 B, The immunological basis of endotoxin-induced tumor regression. Requirement for a pre-existing state of concomitant anti-tumor immunity, *J Exp Med*, 148:1560-1569
- 12) Betschel SD, Borgia SM, Barg NL, Low DE, De Azavedo JC, 1998, Reduced virulence of group A streptococcal Tn916 mutants that do not produce streptolysin S, *Infect Immun*, 66:1671-1679
- 13) Böhle A, Jocham D, Bock PR, 2003, Intravesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity, *J Urol*, 169:90-95
- 14) Bonham, Lu L, Banas RA, Fontes P, Rao AS, Starzl TE, Zeevi A, Thomson AW, 1996, TGF-beta 1 pretreatment impairs the allostimulatory function of human bone marrow-derived antigen-presenting cells for both naive and primed T cells, *Transpl Immunol*, 4:186-191
- 15) Bullen JJ, Rogers HJ, Spalding PB, Ward CG, 2006, Natural resistance, iron and infection: a challenge for clinical medicine, *J Med Microbiol*, 55: 251-258
- 16) Clary BM, Coveney EC, Philip R, Blazer DG, Morse M, Gilboa E, Lysterly HK, 1997, Inhibition of established pancreatic cancers following specific active immunotherapy with interleukin-2 gene-transduced tumor cells, *Cancer Gene Ther*, 4:97-104
- 17) Coley W, 1991 (1893), The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases, *Clin Orthop Relat Res*. (1991), 262:3-11
- 18) Corbett TH, Roberts BJ, Leopold WR, Peckham JC, Wilkoff LJ, Griswold DP, Schabel FM, 1984, Induction of the chemotherapeutic response of two transportable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice, *Cancer research*, 44:717-725
- 19) Coupland SE, Hummel M, Stein H, 2000, Lymphatisches System und Differenzierung von B- und T-Lymphozyten, *Pathologe*, 21:106-112
- 20) Courtney HS, Hasty DL, Dale JB, 2002, Molecular mechanisms of adhesion, colonization and invasion of group A streptococci, *Ann Med*, 34:77-87
- 21) Cunningham MW, 2000, Pathogenesis of group A streptococcal infections, *Clin Microbiol Rev*, 13: 470-511
- 22) Dang LH, Bettgowda C, Huso DL, Kinzler KW, Vogelstein B, 2001, Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors, *PNAS*, 98,26:15155-15160

- 23) Datta V, Myskowski SM, Kwinn LA, Chiem DN, Varki N, Kansal RG, Kotb M, Nizet V, 2005, Mutational analysis of the group A streptococcal operon encoding streptolysin S and its virulence role in invasive infection, *Molecular Microbiology*, 56:681-695
- 24) Domínguez-Punaro MC, Segura M, Plante MM, Lacouture S, Rivest S, Gottschalk M, 2007, *Streptococcus suis* serotype 2, an important swine and human pathogen, induces strong systemic and cerebral inflammatory responses in a mouse model of infection, *J Immunol*, 179:1842-1854
- 25) Eichenbaum Z, Muller E, Morse SA, Scott JR, 1996, Acquisition of iron from host proteins by the group A streptococcus, *Infect Immun*, 64:5428-5429
- 26) Engels B, Cam H, Schuler T, Indraccolo S, Gladow M, Baum C, Blankenstein T, Uckert W, 2003, Retroviral vectors for high-level transgene expression in T lymphocytes, *Hum Gene Ther*, 14:1155-11568
- 27) Everhart J, Wright D, 1995, Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis, *JAMA*, 273:1605-1609
- 28) Fukunaga A, Miyamoto M, Cho Y, Murakami S, Kawarada Y, Oshikiri T, Kato K, Kurokawa T, Suzuoki M, Nakakubo Y, Hiraoka K, Itoh T, Morikawa T, Okushiba S, Kondo S, Katoh H, 2003, CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma, *Pancreas*, 28:e26-31
- 29) Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P, 1999, Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells, *Nat med*, 5:1249-1255
- 30) Gendler SJ, Mukherjee P, 2001, Spontaneous adenocarcinoma mouse models for immunotherapy, *Trends Mol Med*, 7:471-475
- 31) Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. und Robert-Koch-Institut, 2006, Krebs in Deutschland , Häufigkeiten und Trends
- 32) Ghiringhelli F, Apetoh L, Housseau F, Kroemer G, Zitvogel L, 2007, Links between innate and cognate tumor immunity, *Current Opinion in Immunol*, 19:224-231
- 33) Gjertsen MK, Bakka A, Breivik J, Saeterdal I, Solheim BG, Søreide O, Thorsby E, Gaudernack G, 1995, Vaccination with mutant ras peptides and induction of T cell responsiveness in pancreatic carcinoma patients carrying the corresponding ras mutation, *Lancet*, 346:1399-1400
- 34) Gjertsen MK, Bjorheim J, Saeterdal I, Myklebust J, Gaudernack G, 1997, Cytotoxic CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, generated by mutant p21-ras (12Val) peptide vaccination of a patient, recognize 12Val-dependent nested epitopes present within the vaccine peptide and kill autologous tumour cells carrying this mutation, *Int J Cancer*, 72:784-790

- 35) Gjertsen MK, Buanes T, Rosseland AR, Bakka A, Gladhaug I, Søreide O, Eriksen JA, Møller M, Baksaas I, Lothe RA, Saeterdal I, Gaudernack G, 2001, Intradermal ras peptide vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjuvant: Clinical and immunological responses in patients with pancreatic adenocarcinoma, *Int J Cancer*, 92:442-450
- 36) Goldmann O, Rohde M, Chhatwal GS, Medina E, 2003, Role of macrophages in host resistance to group A streptococci, *Infect Immun*, 72:2956-2963
- 37) Goydos JS, Elder E, Whiteside TL, Finn OJ, Lotze MT, 1996, A phase I trial of a synthetic mucin peptide vaccine. Induction of specific immune reactivity in patients with adenocarcinoma, *J Surg Res*, 63:298-304
- 38) Gress TM, Menke A, Bachem M, Muller-Pillasch F, Ellenrieder V, Weidenbach H, Wagner M, Adler G, 1998, role of extracellular matrix in pancreatic disease, *Digestion*, 59:625-637
- 39) Gudjonsson B, 1987, Cancer of the Pancreas: 50 years of surgery, *Cancer* 60:2284
- 40) Hendrickson EA, 1993, The SCID mouse: relevance as an animal model system for studying human disease, *Am J Pathol*, 143:1511-1522
- 41) Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S, 2006, Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions, *Clin Cancer Res*, 12:5423-5434
- 42) Hochster HS, Haller DG, de Gramont A, Berlin JD, Philip PA, Moore MJ, Ajani JA, 2006, Consensus report of the international society of gastrointestinal oncology on therapeutic progress in advanced pancreatic cancer, *Cancer*, 107:676-685
- 43) Hopt UT, 2006, Therapie des Pankreaskarzinoms, *Zentralbl Chir*, 131:115-120
- 44) Hoption Cann SA, van Netten JP, van Netten C, 2003, Dr William Coley and tumor regression: a place in history or in the future, *Postgrad Med J*, 79:672-680
- 45) Imamura T, Iguchi H, Manabe T, Ohshio G, Yoshimura T, Wang ZH, Suwa H, Ishigami S, Imamura M, 1995, Quantitative analysis of collagen and collagen subtypes I, III, and V in human pancreatic cancer, tumor-associated chronic pancreatitis, and alcoholic chronic pancreatitis, *Pancreas*, 11:357-364
- 46) Jaffee EM, Hruban RH, Biedrzycki B, Laheru D, Schepers K, Sauter PR, Goemann M, Coleman J, Grochow L, Donehower RC, Lillemoe KD, O'Reilly S, Abrams RA, Pardoll DM, Cameron JL, Yeo CJ, 2001, Novel allogeneic granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor vaccine for pancreatic cancer: a phase I trial of safety and immune activation, *J Clin Oncol*, 19:145-156
- 47) Janeway CA Jr and Medzhitov R, 2002, Innate immune recognition, *Annu Rev Immunol*, 20:197-216

- 48) Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD, 1999, Immunobiology - The immunsystem in health and disease, Chapter 2: The study of Lymphocytes/Chapter 14: Using the immune response to attack tumors (14.1)/Chapter 8: T-Cell Mediated Immunity/Chapter 10: Adaptive immunity to infection, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing
- 49) Kelly JM, Darcy PK, Markby JL, Godfrey DI, Takeda K, Yagita H, Smyth MJ, 2002, Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection, Nat Immunol, 3:83-90
- 50) Kim HS, Choo YS, Koo T, Bang S, Oh TY, Wen J, Song SY, 2006, Enhancement of antitumor immunity of dendritic cells pulsed with heat-traeted tumor lysate im murine pancreatic cancer, Immunol Lett,103:142-148
- 51) Kobari M, Egawa S, Shibuya K, Sunamura M, Saitoh K, Matsuno S, 2000, Effect of intraportal adoptive immunotherapy on liver metastases after resection of pancreatic cancer, Br J Surg, 87:43-48
- 52) Kreikemeyer B, Mclver KS, Podbielski A, 2003, Virulence factor regulaion and regulatory networks in streptococcus pyogenes and their impact on pathogen-host interactions, Trends in Microbiol, 11:224-232
- 53) Laheru D, Yeo CJ, 2001, Immunologic approaches to the Managment of pancreatic Cancer, The Cancer Journal, 7:324-337
- 54) Leemhuis T, Wells S, Scheffold C, Edinger M, Negrin RS, 2005, A phase I trial of autologous cytokine-induced killer cells for the treatment of relapsed Hodgkin disease and non-Hodgkin lymphoma, Biol Blood Marrow Transplant,11:181-187
- 55) Lilienfeld BG, Seebach JD, 2004, Of mice and men - Mäuse mit humanem Immunsystem, Schweiz Med Forum, 4: 1122
- 56) Linn YC, Hui KM, 2003, Cytokine-induced killer cells: NK-like T cells with cytolytic specificity against leukemia Leuk Lymphoma, 44:1457-1462
- 57) Löhr JM, Heinemann V, Friess H, 2003, Pankreaskarzinom, aktuelle Diagnostik und Therapie, UNI-MED SCiENCE, Bremen, Kapitel 1-3/5-7/8.1/8.6/8.7
- 58) Löhr M, Trautmann B, Gottler M, Peters S, Zauner I, Maillet B, Kloppel G, 1994, Human ductal adenocarcinomas of the pancreas express extracellular matrix proteins, Br J Cancer, 49:144-151
- 59) Lok CN, Loh TT, 1998, Regulation of transferrin function and expression: review and update, Biol Signals Recept, 7:157-178
- 60) Maletzki C, Linnebacher M, Kreikemeyer B, Emmrich J, 2008, Pancreatic cancer regression by intratumoral injection of live Streptococcus pyogenes in a syngeneic mouse model, Gut. 2008, 57:483-91

- 61) Märten A, von Lilienfeld-Toal M, Büchler MW, Schmidt J, 2006, Soluble MIC is elevated in the serum of patients with pancreatic carcinoma diminishing gammadelta T cell cytotoxicity, *Int J Cancer*, 15;119:2359-2365
- 62) Massagué J, Blain SW, Lo RS, 2000, TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders, *Cell*, 103:295-309
- 63) Masuzawa M, Mochida N, Amano T, Fujimura T, Hamada Y, Tamauchi H, Sakurai Y, Nishiyama S, Katsuoka K, 2001, Evaluation of recombinant interleukin-2 immunotherapy for human hemangiosarcoma in a SCID mice model (WB-SCID), *J Dermatol Sci*, 27:88-94
- 64) McConnell EJ, Pathangey LB, Madsen CS, Gendler SJ, Mukherjee P, 2002, Dendritic cell-tumor cell fusion and staphylococcal enterotoxin B treatment in pancreatic tumor model, *J Of Surgical Reserach*, 107:196-202
- 65) Mitchell MS, 1992, Chemotherapy in combination with biomodulation: a 5-year experience with cyclophosphamide and interleukin-2, *Semin Oncol*, 19:80-87
- 66) Morikane K, Tempero R, Sivinski CL, Kitajima S, Gendler SJ, Hollingsworth MA, 2001, Influence of organ site and tumor cell type on MUC1-specific tumor immunity, *Intern Immun*, 3:233-240
- 67) Muerköster S, Wegehenkel K, Arlt A, Witt M, Sipos B, Kruse ML, Sebens T, Klöppel G, Kalthoff H, Fölsch UR, Schäfer H, 2004, Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta, *Cancer Res*, 64:1331-1337
- 68) Mukherjee P, Ginardi AR, Madsen CS, Tinder TL, Jacobs F, Parker J, Agrawal B, Longenecker BM, Gendler SJ, 2001, MUC1-spezifische CTLs are non-functional within a pancreatic tumor environment, *Glycokonjugate Journal*, 18:931-942
- 69) Nagaraj S, Ziske C, Strehl J, Messmer D, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG, 2006, Dendritic cells pulsed with alpha-galactosylceramide induce anti-tumor immunity against pancreatic cancer in vivo, *Int Immunol*, 18:1279-1283
- 70) Nakata M, Podbielski A, Kreikemeyer B, 2005, MsmR, a specific positive regulator of the *Streptococcus pyogenes* FCT pathogenicity region and cytolysin-mediated translocation system genes, *Mol Microbiol*, 57:786-803
- 71) Nelson D, Loomis L, Fischetti VA, 2001, Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme, *PNAS*, 98:4107-4112
- 72) Nelson D, Schuch R, Chahales P, Zhu S, Fischetti VA, 2006, PlyC: A multimeric bacteriophage lysin, *PNAS*, 103:10765-10770

- 73) Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D, 1998, vaccination of Melanoma Patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells, *Nat Med*, 4:328-332
- 74) Nielsen SE, Zeuthen J, Lund B, Persson B, Alenfall J, Hansen HH, 2000, Phase I study of single, escalating doses of a superantigen-antibody fusion protein (PNU-214565) in patients with advanced colorectal or pancreatic carcinoma, *J Immunother*, 23:146-153
- 75) Nishihara T, Sawada T, Yamamoto A, Yamashita Y, Ho JJ, Kim YS, Chung KH, 2000, Antibody-dependent cytotoxicity mediated by chimeric monoclonal antibody Nd2 and experimental immunotherapy for pancreatic cancer, *Jpn J Cancer Res*, 91:817-824
- 76) Nizet V, Beall B, Bast DJ, Datta V, Kilburn L, Low DE, De Azavedo JC, 2000, Genetic Locus for Streptolysin S Production by Group A Streptococcus, *Infection and Immunity*, 68:4245- 4254
- 77) Pecher G, Häring A, Kaiser L, Thiel E, 2002, Mucin gene (MUC1) transfected dendritic cells as vaccine: results of a phase I/II clinical trial, *Cancer Immunol Immunother*, 51:669-673
- 78) Pezzutto A, 1998, Immuntherapie: Zytokine und Tumorzellvakzine, *Internist*, 38:1131-1138
- 79) Pützer BM, Rödicker F, Hitt MM, Stiewe T, Esche H, 2002, Improved treatment of pancreatic cancer by IL-12 and B7.1 Costimulation: antitumor efficacy and immunoregulation in a nonimmunogenic tumor model, *Mol Ther*, 5:405-412
- 80) Ratliff TL, Ritchey JK, Yuan JJ, Andriole GL, Catalona WJ, 1993, T-cell subsets required for intravesical BCG immunotherapy for bladder cancer, *J Urol*, 150: 1018
- 81) Richter A, Niedergethmann M, Sturm JW, Lorenz D, Post S, Trede M, 2003, Long-term results of partial pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreatic head: 25-year experience, *World J Surg*, 27:324-329
- 82) Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP, 2004, Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines, *Nt. Med*, 10:909-915
- 83) Rovere-Querini P, Manfredi AA, 2004, Tumor destruction and in situ delivery of antigen presenting cells promote anti neoplastic immune responses: Implication for the immunotherapy of pancreatic cancer, *J Pancreas*, 5:308-314
- 84) Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N, 2000 Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells, *J. Exp Med*, 191:423-434

- 85) Saur D, Schneider G, Schmid RM, 2006, Pankreaskarzinom- State of the Art, Kompendium Gastroenterologie 2: 41-44
- 86) Schneider G und Schmid RM, 2003, Genetic alterations in pancreatic carcinoma, *Molecular Cancer*, 2:15
- 87) Schneider C, Schmidt T, Ziske C, Tiemann K, Lee KM, Uhlinsky V, Behrens P, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG, Mühlradt PF, Schmidt J, Märten A, 2004, Tumor suppression induced by the macrophage activating lipopeptide MALP-2 in an ultrasound guided pancreatic carcinoma mouse model, *GUT*, 53: 355-361
- 88) Schneider G, Lorsch C, Schmid RM, 2005, Pathogenese des Pankreaskarzinoms, *Internist*, 46:157-165
- 89) Schmidt T, Ziske C, Märten A, Endres S, Tiemann K, Schmitz V, Gorschlüter M, Schneider C, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG, 2003, Intratumoral immunization with tumor RNA-pulsed dendritic cells confers antitumor immunity in a C57BL/6 pancreatic murine tumor model, *Cancer Research*, 63, 8962-8967
- 90) Shi Y, Zheng W, Rock KL, 2000, Cell injury releases endogenous adjuvants that stimulate cytotoxic T cell responses, 97:14590-14595
- 91) Sierig G, Cywes C, Wessels MR, Ashbaugh CD, 2003, Cytotoxic effects of streptolysin o and streptolysin s enhance the virulence of poorly encapsulated group a streptococci, *Infect Immun*, 71:446-455
- 92) Sivinski CL, Kohlgraf KG, VanLith ML, Morikane K, Tempero RM, Hollingsworth MA, 2002, Molecular requirements for CD8-mediated rejection of a MUC1-expressing pancreatic carcinoma: implications for tumor vaccines, *Cancer Immunol Immunother*, 51:327-340
- 93) Staib L, Link KH, Beger HG, 1999, Immunotherapy in pancreatic cancer- current status and future, *Langenbeck's Arch Surg*, 384:396-404
- 94) Staib L, Birebent B, Somasundaram R, Purev E, Braumüller H, Leeser C, Küttner N, Li W, Zhu D, Diao J, Wunner W, Speicher D, Beger HG, Song H, Herlyn D, 2001, Immunogenicity of recombinant GA733-2E antigen (CO17-1A, EGP, KS1-4, KSA, Ep-CAM) in gastro-intestinal carcinoma patients, *Int J Cancer*, 1;92:79-87
- 95) Takaori K, Hruban RH, Maitra A, Tanigawa N, 2004, Pancreatic Intraepithelial Neoplasia, *Pancreas*, 28:257-262
- 96) Taketo Y, Taketo A, 1966, Cytolytic effect of SLS on Ehrlich ascites tumor cells, *J Biochem*, 60:357-362
- 97) Thanhäuser A, Bohle A, Flad HD, Ernst M, Mattern T, Ulmer AJ, 1993, Induction of bacillus-Calmette-Guérin-activated killer cells from human peripheral blood mononuclear cell against human bladder carcinoma cells lines in vitro, *Cancer Immunol Immunother*, 37:105

- 98) Thanhäuser A, Bohle A, Schneider B, Reiling N, Mattern T, Ernst M, Flad HD, Ulmer AJ, 1995, The induction of bacillus-Calmette-Guérin-activated killer cells requires the presence of monocytes and T-helper type1 cells, *Cancer Immunol Immunother*, 40:103-108
- 99) Trede M, Richter A, Wendl K, 2001, Personal observations, opinions, and approaches to cancer of the pancreas and the periampullary area, *Surg Clin North Am*, 81:595-610
- 100) Tseng JF, Farnebo FA, Kisker O, Becker CM, Kuo CJ, Folkman J, Mulligan RC, 2002, Adenovirus-mediated delivery of a soluble form of the VEGF receptor Flk 1 delays the growth of murine and human pancreatic adenocarcinoma in mice, *Surgery*, 132, 5:857-865
- 101) Van Laethem JL, Robberecht P, Résibois A, Devière J, 1996, Transforming growth factor beta promotes development of fibrosis after repeated courses of acute pancreatitis, *Gastroenterology*, 110:567-582
- 102) Van Mellaert L, Barbé S, Anné J, 2006, Clostridium spores as anti-tumour agents, *Trends in Microbiology*, 14 :190-196
- 103) Vilmos P, Kurucz E, 1998, Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system, *Immunol Lett*, 62:59-66
- 104) Wahab ZA, Metzgar RS, 1991, Human cytotoxic lymphocytes reactive with pancreatic adenocarcinoma cells, *Pancreas*, 6:307-317
- 105) Watanabe I, Hasebe T, Sasaki S, Konishi M, Inoue K, Nakagohri T, Oda T, Mukai K, Kinoshita T, 2003, Advanced pancreatic ductal cancer: fibrotic focus and beta-catenin expression correlate with outcome, *Pancreas*, 26:326-333
- 106) Wiemann B, Starnes CO, 1994, Coley's toxin, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective, *Pharmac Ther*, 64:529-564
- 107) Yan Y, Rubinchik S, Wood AL, Gillanders WE, Dong JY, Watson DK, Cole DJ, 2006 Bystander effect contributes to the antitumor efficacy of CaSm antisense gene therapy in a preclinical model of advanced pancreatic cancer, *Mol Ther* 13:357
- 108) Zalatnai A, 2006, Familial pancreatic cancer, *Magy Onkol*, 50:163-168, (A)

9 Danksagung

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei einer Vielzahl von Helfern bedanken, ohne die diese Arbeit so nie zustande gekommen wäre.

Ich danke zu allererst Prof. Emmrich für die Möglichkeit, dieses Promotionsthema zu wählen und für seine Betreuung und Beratung bei dieser Arbeit. Frau Dr. Sparmann möchte ich für ihre hilfreichen inhaltlichen Hinweise und ihre Unterstützung bei Problemen mit methodischen Arbeiten aufrichtig danken. Ebenso möchte ich mich herzlich bei Dr. Jaster und Dr. Brit Fitzner bedanken, die durch ihre Beratung, Tipps und Anmerkungen ebenfalls zur Durchführung dieser Arbeit beitrugen. Generell danke ich allen Mitarbeitern des ExFos für die angenehme Atmosphäre im Labor, die nicht unbedingt selbstverständlich ist und mich immer gerne dort arbeiten lassen hat. Hierbei möchte ich noch besonders Fr. Prestin erwähnen, die mir immer hilfsbereit und geduldig in vielen Situationen weiterhalf und Dr. Grit Waitz für ihre Geduld, ihre Motivations- und Beratungsarbeit, sowie die Teilhabe an ihrem Erfahrungsschatz in Laborarbeiten, der bei einigen Einbahnstrassen noch eine weitere Möglichkeit offerieren konnte. Frau Giers danke ich herzlich für ihre Hilfsbereitschaft bei Gefrierschnittfragestellungen. Fr. Prof. Vollmar möchte ich für die Bereitstellung der Räume für die tierexperimentellen Untersuchungen danken, Dr. Steiner für die Möglichkeit der Nutzung seines Labors, die Färbungen der Blutaussstriche, sowie seiner Beratung bei hämatologischen Fragestellungen und Prof. Nizze für die Möglichkeit, histologische Färbungen in seinem Labor anfertigen zu lassen und insbesondere seinen MTAs für die stets freundliche Hilfe und Beratung bei Fragestellungen zu histologischen Färbungen.

Zu allermeist jedoch möchte ich mich ganz herzlich bei Dipl. Biol. Claudia Maletzki bedanken, die es überhaupt erst möglich machte, dass ich diese Doktorarbeit durchführen konnte. Ich möchte mich für ihre unendliche Geduld, die intensive Betreuung, Beratung und ihre permanente Hilfsbereitschaft in jeglicher Hinsicht bedanken, sowie die ganze Energie, die sie immer wieder in unsere Arbeiten gesteckt hat.

Aus meinem privaten Umfeld möchte ich insbesondere meinen Eltern danken, die es mir ermöglichten, mir die Zeit für diese Arbeit zu nehmen und mir stets zur Seite standen, sei es mit Aufmunterungen, fachlichem Rat oder fleißigen Lektortätigkeiten.

Und ein ganz inniger Dank gilt natürlich meinem Freund für seine unentbehrliche „technische“ Beratung, ganz besonders jedoch für seine Geduld, Ruhe und Motivationsarbeit.

10 Referenzen

Kongressbeitrag

Maletzki C, Charrier F, Linnebacher M, Kreikemeyer B, Liebe S, Emmrich J: Immuntherapie des Pankreaskarzinoms am Mausmodell mit *S. pyogenes*. Jahrestagung des Deutschen Pankreasclub (DPC), Greifswald, 23.-25. November 2006.

Abstracts und Poster

Maletzki C, Linnebacher M, Kreikemeyer B, Charrier F, Emmrich J: Regression of pancreatic carcinoma by intratumoral injection of a streptococcal lysate in mice. 5th Annual CIMT Meeting, Würzburg, 12-14. April 2007, P05

Maletzki C, Charrier F, Kreikemeyer B, Linnebacher M, Liebe S, Emmrich J: Regression of pancreatic carcinoma in mice after intratumoral injection of attenuated *S. pyogenes* and a streptococcal lysate. Digestive Disease Week (DDW), Washington, May, 19-24, 2007, M2025

C. Maletzki, F. Charrier, M. Linnebacher, B. Kreikemeyer, J. Emmrich: Pancreatic tumor growth delay in mice by intratumoral application of a streptococcal lysate, Joint Meeting of European Pancreatic Club (EPC) and International Association of Pancreatology (IAP), Lodge (Poland), June, 25-28, 2008, B III/6

Maletzki C, Linnebacher M, Charrier F, Kreikemeyer B, Emmrich J. Induktion einer spezifischen Immunreaktion gegen murine Pankreaskarzinomzellen durch *ein S. pyogenes* Lysat. 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Berlin, 1.-4. Oktober 2008, Z Gastroenterol 2008

11 Curriculum vitae

PERSÖNLICHE DATEN:

Name: Franziska Magdalena Charrier
Geburtsdatum- und Ort: 13.08.1981 in Frankfurt am Main
Familienstand: ledig

SCHULAUSBILDUNG:

Grundschule 1988 - 1992 Geschwister Scholl Schule in Steinbach a. Taunus
Gymnasium 1992 - 2001 Althumanistisches Lessing- Gymnasium in
am Frankfurt

STUDIUM:

2001 - 2004 Friedrich Schiller Universität Jena, 2003 Physikum
seit 2004 Universität Rostock
04-06/2008 2. Staatsexamen, Approbation

FAMULATUREN:

2004 Rehabilitationsklinik für Kardiologie, Angiologie und
Gastroenterologie, Falkensteinklinik in Bad Schandau
2005 Allgemeinmedizin, Arztpraxis in Rostock
2005 Chirurgie, Hospital St. Maria in Lissabon (Portugal)
2006 Infektiologie und Radiologie, Universitätsklinikum Rostock

PRAKTISCHES JAHR:

02/2007 Anästhesie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Rostock
06/2007 Innere Medizin, Kantonspital Liestal (Schweiz)
10/2007 Unfall - und Allgemeinchirurgie, Spital Wetzikon (Schweiz)

DISSERTATION:

2006 - Herbst 2008 Analyse zum antitumoralen Potential eines attenuierten Bakteriums
& eines bakteriellen Lysates von *S. pyogenes* im experimentellen
Modell des Pankreaskarzinoms

FACHARZTAUSBILDUNG:

06/2008-10/2008 Assistenzärztin in der Abteilung für Gastroenterologie am
Universitätsklinikum Rostock
seit 07/2010 Assistenzärztin in der Klinik für Innere Medizin in den Bodden-
Kliniken Ribnitz Damgarten

12 Thesen

1. Das Pankreaskarzinom gehört zu den Malignomen mit äußerst schlechter Prognose. Die 5 Jahres-Überlebensrate beträgt ca. 5 % und die mittlere Überlebenszeit nach Diagnose 3-6 Monate. Der Tumor weist eine hohe Therapieresistenz gegenüber etablierten Behandlungsformen auf. Gegenwärtig sind in Deutschland die Operation, die Chemotherapie mit Gemcitabin sowie palliative Maßnahmen Standardtherapien.
2. Eine kurative Therapie ist lediglich mit einer Operation erreichbar. Da das Pankreaskarzinom jedoch aufgrund unspezifischer und später Symptome zumeist erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird, ist eine RO-Resektion nur bei sehr wenigen Patienten möglich. Neue Therapieansätze haben bisher nur unwesentlich zur Lebensverlängerung und verbesserter Lebensqualität beitragen können.
3. Zu der Malignität und raschen Progredienz des Pankreaskarzinoms tragen eine aggressive Tumorbilogie und eine schwache Immunogenität bei. So weist das Pankreaskarzinom multiple Mutationen und diverse Tumorescapemechanismen auf. Sein erhöhter Anteil an fibrotischem Gewebe erschwert die Infiltration und die Aktivität von Immunzellen und trägt zu Resistenzen gegen Chemotherapeutika bei.
4. Ziel der Immuntherapie ist es, eine tumorgerichtete Immunreaktion zu initiieren und somit die Tumorescapemechanismen und die schwache Immunogenität von Tumoren zu überwinden. Dies kann einerseits über eine Verstärkung der körpereigenen Immunreaktion gegen den Tumor (aktiv) und andererseits durch Applikation von Antikörpern, um das Immunsystem zu unterstützen (passiv), geschehen.
5. In Vorarbeiten wurde kürzlich an einem murinen Tumormodell des Pankreaskarzinoms die starke antitumorale und immunstimulierende Wirkung von lokal applizierten *Streptococcus pyogenes* Bakterien des Wildtypstammes M49 nachgewiesen. Dabei handelt es sich um eine aktive bakterielle Immuntherapie, deren Ziel die Induktion einer unspezifischen Immunreaktion mittels lokaler Inflammation und Tumorzellnekrose sowie einer daraus resultierenden spezifischen antitumoralen Immunantwort ist.
6. *S. pyogenes* weist durch mehrere Enzyme und Toxine zytolytische Effekte gegenüber eukaryoten Zellen auf und ist ein antibiotisch gut beherrschbarer Keim.

7. In der vorliegenden Arbeit wurde in dem gleichen Tumormodell eine vergleichende Analyse hinsichtlich des antitumoralen Potentials zweier attenuierter Formen von *S. pyogenes* durchgeführt. Zum Einsatz kamen eine für das Toxin Streptolysin S negative Mutante (SLS⁻) und ein Bakterienlysate des Wildtyps. Die Ergebnisse sollten Informationen über die antitumoral wirksamen pathogenen Komponenten des Bakteriums liefern, um in Zukunft die Entwicklung einer klinisch anwendbaren Therapieform zu ermöglichen. Hierbei sollten insbesondere Aussagen zu dem Streptolysin S und der Vitalität der Bakterien gefunden werden.
8. Immunkompetenten BL6N/C57 Mäusen wurde s.c. ein Flankentumor aus syngen Panc02 Zellen induziert und dieser anschließend mit einer intratumoralen Injektion einer der zwei attenuierten Bakterienformen behandelt (Injektion der SLS⁻ Mutante einmalig (angelehnt an die Vorarbeiten), Injektion des Lysates zweimal im Abstand von 4d). Im wöchentlichen Abstand erfolgte die Euthanasie von je 7 Mäusen pro Therapiegruppe.
9. Untersucht wurden über einen Zeitraum von 4 Wochen die Entwicklung des Tumorumfanges, die systemische Auswirkungen der Therapie auf Lymphozyten- und Blutzellpopulationen mittels Durchflusszytometrie und Differentialblutbildbestimmung sowie lokale Auswirkungen auf den Tumor mittels Histologie (Granulozytennachweis) und Immunhistochemie (Nachweis von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen).
10. Die SLS⁻ Mutante führte zu einer signifikanten, aber nur partiellen Tumorregression, welche deutlich geringer als bei dem Wildtyp aus den Vorarbeiten und dem Lysat ausfiel. Das Lysat vermittelte einen stärkeren teils sogar kompletten Tumorrückgang.
11. Die spezifische Immunreaktion fiel bei der Mutante ebenfalls schwächer aus als bei dem Lysat. Intratumoral und durchflusszytometrisch wurden deutlich weniger spezifische Effektorzellen detektiert. Streptolysin S trägt somit bedeutend zum antitumoralen Effekt bei. Jedoch auch andere pathogene Faktoren von *S. pyogenes* müssen vermutlich daran beteiligt sein, so dass erst durch das Zusammenwirken einzelner Bestandteile des Bakteriums ein ausreichender antitumoraler Effekt vermittelt wird.
12. Die vitale Mutante wies septisch-hämatotoxischen Auswirkungen (Erythro-, Lympho- und Thrombopenie sowie Hämatokritreduktion) auf und führte zu einer massiven reaktiven Splenomegalie sowie einer starken systemischen und lokalen Granulozytose. Des Weiteren wiesen die Milzlymphozyten einen deutlichen Anstieg des Transferrinrezeptors und Proliferationsmarkers CD71 auf. Ähnliche Ergebnisse hatten sich auch bei dem vitalen Wildtyp aus den Vorarbeiten gezeigt.

13. Nach der Lysatinjektion traten diese Beobachtungen nicht auf. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen somit erkennen, dass die vitalen Bakterien, nicht aber das Lysat, eine erhebliche Gefahr systemischer septisch-hämatotoxischer Nebenwirkungen bergen.
14. Das Lysat führte nach einmaliger Injektion zunächst zu keiner Tumorregression, nach einer zweiten Injektion nach 4 Tagen jedoch zu einem nahezu kompletten Tumorrückgang. Zusätzlich wurden systemisch und lokal vermehrt spezifische Effektorzellen nachgewiesen.
15. Der vitale Wildtyp aus den Vorarbeiten hatte zwar ein besseres und schnelleres Ergebnis bezüglich der Tumorregression erzielt, eine spezifische Immunreaktion wurde jedoch gleichsam bei vitaler und avitaler Wildtypapplikation erreicht. Die Vitalität ist somit bezüglich der Induktion einer schnelleren effektiven Immunreaktion von Vorteil, dies jedoch auf Kosten des erhöhten Nebenwirkungsrisikos.
16. Da die Vitalität bezüglich der Induktion einer spezifischen Immunreaktion bei dem Lysat als pathogener Faktor des Bakteriums mit einer mehrfachen Injektion quasi ersetzt werden kann (s. These 14), ist diese nicht für die erwünschte antitumorale Potenz erforderlich. Durch den Einsatz des Lysates können so toxische Nebenwirkungen minimiert werden.
17. Bei der Analyse der spezifischen Effektorzellen zeigte sich zwischen der systemischen und lokalen Anwesenheit von CD8⁺ Lymphozyten und der Tumorregression eine deutliche Konkordanz. Somit sind insbesondere zytotoxische T-Zellen für die antitumorale Wirkung von Bedeutung.
18. Abschließend kann anhand der vorliegenden Arbeit geschlussfolgert werden, dass das Bakterienlysate von *S. pyogenes* M49 eine viel versprechende Substanz für eine bakterielle Immuntherapie als kostengünstige und effektive Therapiestrategie für das Pankreaskarzinoms darstellt.
19. Weitere Analysen sollten rechallenge-Modelle und Lymphozytentransfer-Modelle betreffen, um die Nachhaltigkeit der antitumoralen Immunreaktion beurteilen zu können. Ebenso könnte untersucht werden, ob eine Steigerung der Zahl der Lysatinjektionen zu einem noch besseren Therapieerfolg führt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt und sie noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt habe.

Rostock, im November 2008

Franziska Charrier