

Immuntherapie des hepatozellulären Karzinoms mit adenoviral transduzierten dendritischen Zellen und regulatorischem T-Zell-Inhibitor P60 in vivo

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Julia Seelemann

aus Wetzlar

2024

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: PD. Dr. med. Maria A. Gonzalez-Carmona
2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Hölzel

Tag der Mündlichen Prüfung: 28.02.2024

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
Direktor: Prof. Dr. med. Christian P. Strassburg

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	7
1.	Einleitung	10
1.1	Das hepatozelluläre Karzinom	10
1.1.1	Epidemiologie	10
1.1.2	Ätiologie und Hepatokarzinogenese	10
1.1.3	Diagnostik	11
1.1.4	Therapie und Prognose	12
1.1.4.1	Chirurgische Therapie	14
1.1.4.2	Lokal interventionelle Therapie	14
1.1.4.3	Systemische Therapie	15
1.2	Tumorimmunologie des hepatozellulären Karzinoms	16
1.3	Regulatorische T-Zellen in der Tumorgenese und -therapie	18
1.3.1	Definition und Funktion regulatorischer T-Zellen	18
1.3.2	Prognostische Bedeutung von regulatorischen T-Zellen im hepatozellulären Karzinom	19
1.3.3	Depletion und Inhibition regulatorischer T-Zellen	20
1.3.3.1	FOXP3-Inhibitorpeptid P60	23
1.4	Dendritische Zellen basierte Immuntherapie von Malignomen	24
1.4.1	Definition und Funktion von dendritischen Zellen	24
1.4.2	Tumorantigene	25
1.4.3	Immuntherapie von Malignomen mit Tumorantigen-beladenen dendritischen Zellen	26
1.5	Adenovirale Vektoren	27
1.6	Zielsetzung der Arbeit	28
2.	Material und Methoden	30
2.1	Material	30
2.1.1	Zelllinien	30
2.1.1.1	911-Zellen	30
2.1.1.2	Hepa129- und Hepa129 mAFP-Zellen	30
2.1.2	Adenovirale Vektoren	30

2.1.3	P60 und P301	31
2.1.4	Zytokine	31
2.1.5	Medien und Pufferlösungen	31
2.1.5.1	Zellkulturmedien	32
2.1.5.2	Amplifikation und Aufreinigung adenoviraler Vektoren	33
2.1.5.3	Titration adenoviraler Vektoren	33
2.1.5.4	Präparation und Transduktion der dendritischen Zellen	34
2.1.5.5	sonstige wiederholt genutzte Medien und Puffer	35
2.1.6	Mausmodell	35
2.1.6.1	Mausstamm (C3H/HeNCrI)	35
2.1.6.2	Narkotika	36
2.1.7	Verbrauchsmaterial	36
2.1.8	Geräte	37
2.2	Methoden	38
2.2.1	Zellkultur und Zellbiologie	38
2.2.1.1	Allgemeine Bedingungen der Zellkultur	38
2.2.1.2	Kultur und Passage von 911-Zellen	38
2.2.1.3	Kultur und Passage von Hepa129 (mAFP)-Zellen	39
2.2.1.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	39
2.2.1.5	Bestimmung von Zellzahl und -vitalität mittels Neubauer-Zählkammer	39
2.2.2	Amplifikation, Aufreinigung und Titerbestimmung adenoviraler Vektoren	40
2.2.2.1	Amplifikation adenoviraler Vektoren	40
2.2.2.2	Aufreinigung adenoviraler Vektoren	41
2.2.2.3	Bestimmung der Konzentration adenoviraler Vektoren	42
2.2.2.4	Bestimmung des Titers adenoviraler Vektoren	42
2.2.3	Präparation und Kultur muriner dendritischer Zellen	43
2.2.3.1	Präparation von Knochenmark	43
2.2.3.2	Separation dendritischer Zellen mittels Magnetic Activated Cell Sorting	44
2.2.3.3	Kultur und Passage dendritischer Zellen	44
2.2.4	Transduktion muriner dendritischer Zellen mit adenoviralen Vektoren	45
2.2.5	Proteinbiologie	46
2.2.5.1	Herstellung von Tumorlysat	46

2.2.5.2	Proteinbestimmung des Tumorlysats	46
2.2.6	Tierexperimentelle Methoden	46
2.2.6.1	Vorbereitung der Hepa129 (AFP)-Zellen für die Tumorinduktion	47
2.2.6.2	Induktion subkutaner HCC und Monitoring	47
2.2.6.3	Induktion orthotoper HCC und Monitoring	48
2.2.6.4	Vakzinierung mit adenoviral transduzierten dendritischen Zellen	48
2.2.6.5	Applikation von P60	48
2.2.7	Statistik	49
3.	Ergebnisse	49
3.1	Amplifikation und Aufreinigung adenoviraler Vektoren	49
3.2	Messung des Titers der Vektorenlösung	51
3.3	Herstellung adenoviral transduzierter dendritischer Zellen	56
3.3.1	Gewinnung und Kultivierung muriner dendritischer Zellen	56
3.3.2	Transduktion dendritischer Zellen mit adenoviralen Vektoren	57
3.3.2.1	Vitalitätskontrolle adenoviral transduzierter dendritischer Zellen	58
3.4	Tierexperimentelle Ergebnisse	59
3.4.1	Tumormodelle	59
3.4.1.1	Subkutaner Tumormodell	59
3.4.1.2	Orthotoper Tumormodell	59
3.4.2	Einfluss einer Therapie mit P60 auf Tumorwachstum und Überleben im subkutanen und orthotopen Tumormodell	60
3.4.3	Einfluss einer Therapie mit Ad-mAFP transduzierten dendritischen Zellen und P60 auf das Tumorwachstum und das Überleben im subkutanen Tumormodell	63
3.4.4	Einfluss einer Therapie mit Ad-mAFP transduzierten dendritischen Zellen und P60 auf das Überleben im orthotopen Tumormodell	66
3.4.5	Einfluss einer präventiven Therapie mit Ad-mAFP transduzierten DC und P60 auf das Überleben im orthotopen Tumormodell	67
3.4.6	Einfluss einer Therapie mit Ad-mCD40L transduzierten dendritischer Zelle und P60 auf das Überleben im orthotopen Tumormodell	69
4.	Diskussion	71
4.1	Eine Monotherapie mit P60 hat keinen Einfluss auf Tumorwachstum und Überleben im subkutanen und orthotopen Tumormodell	73

4.2	Antitumoraler Effekt einer Therapie mit Ad-mAFP transduzierten dendritischen Zellen und P60 im etablierten subkutanen und orthotopen Tumormodell	76
4.3	Einfluss einer präventiven Vakzinierung mit Ad-mAFP transduzierten dendritischen Zellen auf Tumorprogress und Überleben im orthotopen Tumormodell mit und ohne P60	77
4.4	Prolongiertes Überleben unter Therapie mit Ad-CD40L transduzierten DC im etablierten orthotopen Tumormodell	81
4.4.1	P60 scheint die antitumorale Wirkung einer Vakzinierung mit Ad-CD40L transduzierten DC im orthotopen Tumormodell zu inhibieren	82
4.5	Grenzen des genutzten Tumormodells	83
5.	Zusammenfassung	84
6.	Abbildungsverzeichnis	86
7.	Tabellenverzeichnis	90
8.	Literaturverzeichnis	92
9.	Danksagung	107

Abkürzungsverzeichnis

AdV	Adenoviraler Vektor
AFP	Alpha-Fetoprotein
AML-1	Acute Myeloid Leucemia 1
AP-1	Activator protein-1
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BCA	Bicinchoninsäure
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer Staging System
BSA	Bovines Serumalbumin
CCR	CC Chemokin Receptor
CD	Cluster of Differentiation
CsCl	Cäsiumchlorid
CT	Computertomographie
CTL	Cytotoxic Lymphocytes, zytotoxische Lymphozyten
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Protein 4
DC	Dendritic Cell, Dendritische Zelle
DGVS	Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EASL	European Association for the Study of the Liver
ECOG	Eastern Co-operative Oncology Group
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
ESMO	European Society for Medical Oncology
FCS	Fetal Calf Serum, Fötales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor, Granulozyten- Kolonie-stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GITR	Glucocorticoid-Induced TNFR-Related Protein

GPC3	Glypican 3
GS	Glutamin Synthetase
HBV	Hepatitis B-Virus
HCC	Hepatocellular Carcinoma, Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C-Virus
HSPA70	Hitzeschockprotein 70
IFN- γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
IPEX	Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked Syndrome
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intratumoral
L	Ligand
m	murin
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MDSC	Myeloid-derived Suppressor Cells, Myeloide Suppressorzellen
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOI	Multiplicity of Infection
MRT	Magnetresonanztomographie
NAFLD	Non-alcoholic Fatty Liver Disease, nicht alkoholische Fettleber-Erkrankung
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NF- κ B	Nuclear actor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
OD	Optische Dichte
opu	Optical particle units
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells, Mononukleäre Zellen des Peripheren Blutes
PBS	Phosphate-buffered Saline, Phosphat gepufferte Salzlösung
PD-1	Programmed Cell Death-1
PD-L1	Programmed Cell Death Ligand-1

pfu	Plaque forming units
RFA	Radiofrequenzablation
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfonat
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TGF- β	Transforming Growth factor beta
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
Treg	Regulatorische T-Zellen
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSA	Tumor-spezifische Antigene
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2

1. Einleitung

1.1 Das hepatozelluläre Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

Mit einem Anteil von ca. 75 % ist das hepatozelluläre Karzinom (HCC) das häufigste primäre Karzinom der Leber (McGlynn et al., 2021). Das HCC ist weltweit die zweithäufigste Tumorentität bei Männern und die sechsthäufigste Tumorentität bei Frauen (Bray et al., 2018). Dabei unterliegt die Inzidenz starken regionalen Unterschieden. Mehr als 80 % aller HCC treten in Subsahara-Afrika und Ostasien auf. Dort werden Inzidenzen von 20/100.000 Einwohnern angegeben (El-Serag, 2012). In Deutschland wurde für das Jahr 2016 eine altersstandardisierte Inzidenz aller Leberkarzinome von 3,5/100.000 Einwohnern für Frauen und 9,8/100.000 Einwohnern für Männer dokumentiert (Robert Koch-Institut, 2019). In vielen westlichen Ländern stieg die altersstandardisierte Inzidenz in den vergangenen Jahren jedoch deutlich an. Ursächlich dafür ist eine zunehmende Prävalenz chronischer Lebererkrankungen (s. Ätiologie und Hepatokarzinogenese). Hingegen ist die Inzidenz in vielen vormals stärker betroffenen Ländern infolge erfolgreicher Präventionsmaßnahmen (u.a. Vakzinierung gegen Hepatitis B-Virus, HBV) rückläufig (Akinyemiju et al., 2017; Galle et al., 2018; McGlynn et al., 2021). Aktuell ist das HCC die zweithäufigste tumorassoziierte Todesursache (McGlynn et al., 2021).

1.1.2 Ätiologie und Hepatokarzinogenese

HCC entwickeln sich mehrheitlich auf dem Boden einer vorbestehenden Lebererkrankung. Zu den häufigsten Ursachen des Leberkarzinoms gehören Infektionen mit dem Hepatitis B-Virus (HBV) und dem Hepatitis C-Virus (HCV) sowie Alkoholkonsum. Der Anteil der verschiedenen hepatischen Grunderkrankungen von Leberkarzinomen und der damit einhergehenden Mortalität differiert regional (Akinyemiju et al., 2017; El-Serag, 2012). Rund die Hälfte aller HCC weltweit sind auf eine chronische HBV-Infektion zurückzuführen. Aufgrund der hohen regionalen Prävalenz ist HBV vor allem in Asien und Subsahara-Afrika von ätiologischer Bedeutung und korreliert mit der Inzidenz des HCC (El-Serag, 2012; Ghouri et al., 2017; Robert Koch-Institut, 2019). Jedes vierte bis zehnte HCC ist auf eine Infektion mit HCV zurückzuführen. Das Risiko für ein HCC steigt bei

HCV-infizierten Patienten mit dem Grad der Fibrose bzw. Zirrhose und wird bei manifester Zirrhose mit 1 bis 4 % pro Jahr angegeben (El-Serag, 2012; Ghouri et al., 2017). Ein Alkoholabusus gilt als dritthäufigste Grunderkrankung, auf die ein HCC zurückzuführen ist (Ghouri et al., 2017). Zunehmend an Bedeutung gewinnt jedoch auch eine nicht alkoholische Fettleber-Erkrankung (NAFLD) u.a. infolge eines Diabetes mellitus Typ II im Speziellen oder allgemeiner eines metabolischen Syndroms. Mit einer Prävalenz von bis zu 30 % ist sie in einigen Ländern bereits die Hauptursache einer chronischen Lebererkrankung (Kulik und El-Serag, 2019). Als weitere Risikofaktoren für die Entwicklung eines HCC gelten die Exposition gegenüber Aflatoxin B1, ein Nikotinabusus sowie hereditäre Lebererkrankungen (u.a. Hämochromatose, Porphyrrie, Alpha-1-Antitrypsinmangel) (Kulik und El-Serag, 2019; Robert Koch-Institut, 2019).

Pathogenetisch liegen der Entstehung des HCC vererbte sowie erworbene Mutationen und exogene Einflussfaktoren zugrunde. Die oben aufgeführten Erkrankungen und Noxen bedingen einen metabolischen wie oxidativen Stress. Infolgedessen resultieren zyklische Entzündungsreaktionen sowie Nekrosen, der Umsatz von Hepatozyten wird gesteigert. Letztlich nimmt die Mutationsrate zu (bspw. Deletionen, Punktmutationen in TP53, AXIN1, CTNNB1, Veränderungen der Chromosomenanzahl und der Telomeren) und Protoonkogene wie RAS-MAPK und β -catenin werden aktiviert, sodass monoklonale Hepatozyten-Populationen entstehen. Virale Infektionen schädigen das Genom zudem direkt durch ihre Replikation in der Wirtszelle (Flecken et al., 2012a; Ghouri et al., 2017).

1.1.3 Diagnostik

Die European Association for the Study of the Liver (EASL) wie auch die European Society for Medical Oncology (ESMO) und die Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) empfehlen in ihren voneinander unabhängigen Leitlinien bei Patienten mit vorbestehender Leberzirrhose eine primär bildgebende Diagnosesicherung des HCC. Für Läsionen größer 1 cm wird eine Kontrastmittel-unterstützte Magnetresonanztomographie (MRT) empfohlen. Typische Kontrastmittelverhalten eines HCC sind ein Hyperenhancement in der arteriellen Phase sowie ein Wash-out in der portalvenösen Phase bzw. eine verzögerte portalvenöse Phase (Galle et al., 2018; Leitlinienprogramm Onkologie, 2022; Vogel et al., 2018; Vogel

und Martinelli, 2021). Die EASL und die deutsche S3-Leitlinie der DGVS beschreiben die zunehmende Bedeutung einer histopathologischen Diagnostik. Diese wird zur Diagnosesicherung bei potenziell kurativ behandelbaren Tumoren, die in der Schnittbildgebung nicht eindeutig als HCC klassifiziert werden können, und grundsätzlich bei Patienten, die palliativ oder im Rahmen einer Studie behandelt werden, sowie bei Patienten ohne Leberzirrhose empfohlen. Zusätzlich zu den Standardfärbungen soll eine immunhistologische Analyse erfolgen. Eine Kombination von drei verschiedenen Immunomarkern - Hitzeschockprotein 70 (HSPA70), Glypican 3 (GPC3) und Glutamin Synthetase (GS) - erreicht eine Spezifität von 100% bei einer Sensitivität von 72 %, ist aktuell jedoch noch kein Standard (Galle et al., 2018; Leitlinienprogramm Onkologie, 2022).

Sowohl die internationalen als die nationalen Leitlinien empfehlen eine Computertomographie (CT) des Thorax, Abdomen und Becken, um die Bildung von Fernmetastasen zu untersuchen. Zudem müssen der portalvenöse Druck, die Leberfunktion nach Child-Pugh und das Alpha-Fetoprotein (AFP) als Tumormarker bestimmt werden. Anschließend erfolgt die Klassifikation innerhalb eines Staging Systems. Unter sechs verschiedenen etablierten Klassifikationen hat sich das Barcelona Clinic Liver Cancer Staging System (BCLC) wiederholt bewährt und wird für die prognostische Vorhersage sowie die Behandlungszuweisung empfohlen. Es berücksichtigt neben dem Tumorstadium die Leberfunktion sowie den klinischen Zustand des Patienten. Die Therapie sollte dann im Rahmen eines interdisziplinären Tumorboards festgelegt werden (Galle et al., 2018; Leitlinienprogramm Onkologie, 2022; Vogel et al., 2018; Vogel und Martinelli, 2021).

1.1.4 Therapie und Prognose

Die EASL empfiehlt die Therapieentscheidung in Abhängigkeit von der Tumorausdehnung (Anzahl der Läsionen, Tumorgröße, Gefäßinvasion und Metastasierung), der Leberfunktion (Child-Pugh) sowie dem klinischen Zustand des Patienten (Eastern Co-operative Oncology Group, ECOG) zu treffen. Die bereits genannte BCLC Klassifikation unterscheidet unter Berücksichtigung eben dieser Punkte fünf Gruppen. Tabelle 1 zeigt diese Gruppen und die sich daraus ableitenden

Behandlungsoptionen sowie die Prognose im Überblick entsprechend den Empfehlungen der EASL aus 2018 und der DGVS aus 2022.

Tab. 1: Modifiziertes BCLC Staging System, Therapie und Prognose des HCC nach den Leitlinien der EASL aus 2018 und der DGVS aus 2022 (Galle et al., 2018; Leitlinienprogramm Onkologie, 2022).

Tumorstadium		Therapie	Überlebensprognose
A1	1 Tumor \leq 5 cm oder max. 3 Tumore \leq 3 cm, CHILD-Pugh A, PS 0	Transplantation	> 5 Jahre
		Resektion	
A2	1 Tumor > 5 cm oder max. 3 Tumore \leq 5 cm, CHILD-Pugh A, PS 0	Ablation +/-	
		Embolisation	
B	Multinodulär, Teilverschluss der Vena portae, nicht resektabel, CHILD-Pugh A, PS 0	Chemoembolisation	> 2,5 Jahre
C	Verschluss der Vena portae/ Fernmetastasen, CHILD-Pugh A, PS 1-2	Systemische Therapie	\geq 10 Monate
D	Nicht transplantabel, terminale Leberinsuffizienz, PS 3-4	Beste Symptomkontrolle	3 Monate

Therapien des HCC können in drei Gruppen – chirurgisch, lokoregionär bzw. lokal ablativ und systemisch – eingeteilt werden (Galle et al., 2018). Für die Mehrzahl der Patienten stehen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung jedoch nur palliative Therapiekonzepte zur Verfügung, da mehr als die Hälfte aller HCC erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium diagnostiziert werden und häufig eine begleitende Leberzirrhose besteht. Das durchschnittliche Überleben der palliativen Patienten wird mit 11 bis 20 Monaten angegeben (Giraud et al., 2021; Park et al., 2015).

1.1.4.1 Chirurgische Therapie

Die Resektion und die Lebertransplantation stellen als chirurgische Therapien kurative Ansätze dar. Sie werden für Patienten mit maximal einem Tumor bzw. maximal drei Tumoren nicht größer als 5 cm mit erhaltener Leberfunktion und gutem Allgemeinbefinden (ECOG 0) empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022; Vogel und Martinelli, 2021). Für die Evaluation einer Lebertransplantation sind die Mailand-Kriterien etabliert (maximal ein Tumor ≤ 5 cm oder maximal 3 Tumoren ≤ 3 cm). Aber auch außerhalb dieser Kriterien sollte eine Transplantation unter der Voraussetzung, dass keine Fernmetastasen oder eine Gefäßinvasion vorliegen, evaluiert werden. Durch die Lebertransplantation wird nicht nur das HCC, sondern auch eine zugrunde liegende Leberzirrhose therapiert. Im frühen Tumorstadium wird das 5-Jahresüberleben mit mehr als 70 % angegeben (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022).

Für Patienten ohne Leberzirrhose, die die Kriterien der BCLC-Klassifikation 0 oder A (Benennung je nach Leitlinie) erfüllen, ist die Resektion hingegen die Therapie der Wahl. Bei Patienten mit einer Leberzirrhose muss vor einer Resektion das Risiko für eine postoperative hepatische Dekompensation evaluiert werden, welches bei fortgeschrittener Zirrhose oft eine Kontraindikation darstellt (Galle et al., 2018; Leitlinienprogramm Onkologie, 2022). Bei mehr als der Hälfte der Patienten tritt innerhalb der ersten zwei Jahre nach Resektion ein Rezidiv auf. Die 5-Jahres-Überlebensraten werden mit 26 bis 68 % angegeben (Lang et al., 2007).

1.1.4.2 Lokal interventionelle Therapie

Zu den lokal interventionellen Verfahren zählen thermische und nichtthermische ablativ sowie intraarterielle Therapieverfahren. Sie werden bei Patienten bis einschließlich BCLC Stadium B angewandt (Galle et al., 2018; Leitlinienprogramm Onkologie, 2022; Vogel et al., 2018). Die Radiofrequenzablation (RFA) ist das vorrangig eingesetzte ablativ Verfahren. Dabei führen hochfrequente Wechselstromfelder (etwa 375 bis 500 kHz) zu einer Ionenbewegung und lokalen Hitzeentwicklung, die eine Nekrose des Tumorgewebes sowie des angrenzenden Leberparenchyms bedingt (Nault et al., 2018). Für Patienten im BCLC Stadium 0 bis A mit nicht operablem Tumor ist die thermale Ablation eine Standardtherapie und kann in kurativer Intention eingesetzt werden (Galle

et al., 2018).

Für Patienten im Stadium BCLC B der Erkrankung mit inoperablem HCC wird eine transarterielle Chemoembolisation (TACE) am häufigsten als Erstlinientherapie empfohlen. Das Verfahren kombiniert eine transarterielle Embolisation mit einer intraarteriellen Infusion von Chemotherapeutika. Kontraindikationen sind eine dekompenzierte Lebererkrankung, fortgeschrittene Leber- oder Niereninsuffizienz, extrahepatische Metastasen sowie eine makrovaskuläre Invasion der Pfortader. Für Patienten im BCLC Stadium B wird die Überlebensprognose mit mehr als 2,5 Jahren angegeben (Galle et al., 2018; Leitlinienprogramm Onkologie, 2022; Vogel et al., 2018).

1.1.4.3 Systemische Therapie

Für Patienten mit einem fortgeschrittenen HCC entsprechend BCLC Stadium C (Fernmetastasen, Invasion mit Verschluss der Vena portae, erhaltene Leberfunktion, reduzierter Allgemeinzustand) wird eine systemische Therapie empfohlen (Galle et al., 2018; Leitlinienprogramm Onkologie, 2022; Vogel et al., 2018; Vogel und Martinelli, 2021). Lange Zeit stand dafür lediglich Sorafenib, ein seit 2008 zugelassener Multityrosinkinaseinhibitor, zur Verfügung. Er ist weiterhin Therapie der Wahl für Patienten in gutem Allgemeinzustand und mit erhaltener Leberfunktion, die jedoch anderen Therapien nicht zugänglich sind (Galle et al., 2018; Llovet et al., 2008). Seit 2019 ist mit Lenvatinib ein zweiter Multityrosinkinaseinhibitor in der Erstlinientherapie der genannten Patientengruppe zugelassen (Kudo et al., 2018). Für Patienten mit einem Tumorprogress unter Behandlung mit Sorafenib, wurden 2017 Regorafenib und 2019 Cabozantinib, ebenfalls Multityrosinkinaseinhibitoren, zur Zweitlinientherapie zugelassen (Abou-Alfa et al., 2018; Bruix et al., 2017). Auch Ramucirumab, ein monoklonaler Antikörper gegen den VEGF-R2 (vascular endothelial growth factor receptor 2), erhielt 2019 die Zulassung als Zweitlinientherapie nach Sorafenib, jedoch nur für Patienten mit hohen AFP-Spiegeln (≥ 400 ng/ml) (Chau et al., 2017; Galle et al., 2018).

Erst 2020, mit der Zulassung von Atezolizumab, einem PD-L1 Antikörper, in Kombination mit Bevacizumab, einem VEGF-gerichteten Angiogenesehemmer, findet ein Paradigmenwechsel in der Erstlinientherapie des HCC statt (Finn et al., 2020a). Weitere Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICI) erhielten eine frühere Zulassung für die Erst- und

Zweitlinientherapie des HCC in den USA. Pembrolizumab, ein gegen Programmed Cell Death Ligand-1 (PD-L1) gerichteter Antikörper, erhielt 2018 die Zulassung durch die US-amerikanische Food and Drug Administration (FDA) für die Zweitlinientherapie des fortgeschrittenen HCC nach Sorafenib (Finn et al., 2020b). Im März 2020 wurde als weitere Zweitlinientherapie die Kombination aus Nivolumab und Ipilimumab, gegen Programmed Cell Death 1 (PD-1) und Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4 (CTLA-4) gerichtete Antikörper, durch die FDA zugelassen (Yau et al., 2020). Eine weitere Zulassung für eine ICI-Therapie in der Erstlinientherapie erfolgte 2023 für die Kombination Durvalumab und Tremelimumab. Die Evidenz dafür wurde in der Phase-III-Studie (HIMALAYA-Studie), in der PD-1-Inhibitor Durvalumab in Kombination mit dem CTLA-4-Inhibitor Tremelimumab in der Erstlinientherapie des HCC untersucht wurde, erbracht (Abou-Alfa et al., 2022). Weitere Immuntherapeutika werden aktuell als Mono- oder Kombinationstherapie in klinischen Studien untersucht. Die oben genannten Studien eröffneten ein Strategiewechsel in Richtung Immuntherapie für das HCC. Immuncheckpoint-Rezeptoren und -Liganden werden im Gesunden von Immunzellen exprimiert, um eine überschießende Immunantwort zu verhindern. Im Tumormilieu wird die Expression dieser Oberflächenmerkmale hochreguliert, sodass eine effektive T-Zellantwort inhibiert wird (Park et al., 2016). Das klinische Ansprechen auf diese neuen Therapieoptionen ist bei Patienten mit einem HCC zwar ein vielversprechender weiterer Schritt, jedoch noch sehr limitiert. Das objektive Therapieansprechen unter Therapie mit ICI bei Patienten mit fortgeschrittenem HCC beträgt nur etwa 20 % (Ziogas et al., 2020). Deshalb werden weitere immuntherapeutischen Strategien dringend untersucht und entwickelt.

1.2 Tumorimmunologie des hepatozellulären Karzinoms

Die Leber verfügt im Gegensatz zu den meisten anderen Organen über eine immuntolerante Mikroumgebung. Über die Pfortader erreichen sie eine Vielzahl von Fremdartigenen aus dem Gastrointestinaltrakt. Um eine anhaltende Inflammation infolge der permanenten Antigenexposition zu verhindern, ist das Immunmilieu der gesunden Leber auf Toleranz ausgerichtet (Brown und Greten, 2019; Makarova-Rusher et al., 2015). Kupffer-Zellen, die lokalen Makrophagen, und Endothelzellen der Lebersinusoide

sezernieren antiinflammatorische Zytokine, u.a. Interleukin-10 (IL-10) und Transforming Growth Factor-beta (TGF- β), die eine lokale Immunsuppression bewirken. Die Funktion antigenpräsentierender Zellen (APC) wird durch eine reduzierte Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle und eine gestörte Antigenpräsentation eingeschränkt. Hepatozyten, Sternzellen, Kupffer-Zellen und Endothelzellen exprimieren vermehrt Immuncheckpoint-Rezeptoren und -Liganden wie beispielsweise PD-L1. Gleichzeitig wird CTLA-4 auf regulatorischen T-Zellen (Treg) hochreguliert. Durch diese Mechanismen wird die T-Zell-vermittelte Immunantwort innerhalb des Lebermilieus geschwächt (Makarova-Rusher et al., 2015).

Wie zu Anfang beschrieben entstehen ca. 90 % der HCC auf dem Boden einer Leberzirrhose (Akinyemiju et al., 2017; El-Serag, 2012). Bereits die der Zirrhose vorausgehende Inflammation im Rahmen der infektiös oder toxisch vermittelten Hepatitis bedingt eine immunologische Gegenregulation im Sinne einer physiologischen Zunahme der lokalen Immunsuppression. Das Immunmilieu der zirrhotischen Leber ist noch einmal mehr geprägt von antiinflammatorischen Zytokinen (u.a. IL-10, TGF- β), dysfunktionalen APC und einer Infiltration immunsuppressiver Zellen (z.B. Treg) (Brown und Greten, 2019; Langhans et al., 2019; Makarova-Rusher et al., 2015; Prieto et al., 2015). Zeitgleich führt der lokale Gewebeschaden zu einer gesteigerten Expression von Wachstumsfaktoren, die die Zellproliferation beschleunigen und Geweberegeneration, Angiogenese sowie Produktion extrazellulärer Matrix vermitteln. Diese Vorgänge der inadäquaten Wundheilung überwiegen die antitumorale Immunantwort und tragen so zur Tumorgenese bei (Prieto et al., 2015).

Dennoch finden sich bei etwa der Hälfte der Patienten, die an einem HCC erkrankt sind, tumorspezifische zytotoxische Lymphozyten (CTL). Jedoch nimmt die Stärke dieser spezifischen zellulären Immunantwort mit dem Tumorprogress ab (Brown und Greten, 2019; Flecken et al., 2014). Das Phänomen der zunehmenden Immuntoleranz gegenüber Malignomen wird als „immunoediting“ bezeichnet. Die beschleunigte Zellteilung der genetisch instabilen Tumorzellen lässt unter dem Selektionsdruck des Immunsystems solche Tumorzellen proliferieren, die einer effektiven Immunantwort entgehen können (Prieto et al., 2015; Schmidt et al., 2012). Dabei sind die Mechanismen der Immuntoleranz vielfältig, stellen im Wesentlichen jedoch eine Fortführung der in der Leber bereits etablierten Toleranzmechanismen dar. Das Immunmilieu des HCC ist geprägt von

immunsuppressiven Zytokinen, u.a. IL-10, TGF- β , während die Expression immunstimulierender Zytokine wie IL-1 α/β , Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), IL-2 und Interferon-gamma (IFN- γ) runterreguliert wird (Makarova-Rusher et al., 2015; Prieto et al., 2015; Shen et al., 2010). Weiterhin zeigen APC eine reduzierte Expression von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen sowie der für die Antigenpräsentation wichtigen Major histocompatibility complex-(MHC-)Moleküle. Hingegen exprimieren Hepatozyten, Tumorzellen, Kupffer-Zellen und Sinusoidalzellen den Immuncheckpoint-Liganden PD-L1. Infolge wird die Immunantwort durch PD-1 exprimierende Tumorantigen-spezifische CTL gehemmt (Flecken et al., 2012b; Makarova-Rusher et al., 2015; Prieto et al., 2015; Schmidt et al., 2012). Während die Zahl antitumoraler Immunzellen wie CTL, CD4+ T-Helferzellen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) mit dem Progress des HCC abnimmt, prägen zunehmend immunsuppressive Zellen wie Treg und Myeloide Suppressorzellen (myeloid-derived suppressor cells, MDSC) das Tumormilieu (Makarova-Rusher et al., 2015; Schmidt et al., 2012; Shen et al., 2010). Im HCC sind dabei im Besonderen die Treg von prognostischer Bedeutung (Fu et al., 2007; Kobayashi et al., 2007; Li et al., 2020; Shen et al., 2010; Zhou et al., 2009). Diese Zellen sollen im Weiteren genauer betrachtet werden.

1.3 Regulatorische T-Zellen in der Tumorgenese und -therapie

1.3.1 Definition und Funktion regulatorischer T-Zellen

Das Immunsystem soll den Körper vor Fremdartigen schützen, dabei jedoch überschießende Inflammation und Autoimmunität verhindern. Treg sind als immunsuppressive Zellen entscheidend an der Aufrechterhaltung dieses Gleichgewichts beteiligt. Dies verdeutlicht eine Autoimmunerkrankung infolge dysfunktionaler Treg, das IPEX-Syndrom (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, x-linked syndrome). Betroffene Patienten leiden unter Endokrinopathien wie Diabetes mellitus Typ I und Thyreoiditis, Colitis sowie Allergien (Sakaguchi und Powrie, 2007; Sakaguchi et al., 2008). Zwei Arten von Treg werden unterschieden: natürliche Treg (nTreg), die im Thymus entstehen, und induzierte (iTreg), die sich bei Antigenkontakt unter Einfluss von IL-10 und TGF- β aus naiven CD4+ T-Zellen in der Peripherie entwickeln. Alle Treg sind als CD4+, CD25+, FOXP3+ (Forkhead-Box-Protein P3) Zellen definiert (Byrne et al.,

2011; Li et al., 2020; Sakaguchi et al., 2008). CD25 besitzt als ein Teil des IL-2-Rezeptors eine entscheidende Bedeutung für die Übermittlung von IL-2 Signalen an Treg. Zudem fördert die Stimulation durch IL-2 die TGF- β -abhängige Differenzierung naiver T-Zellen in Treg. IL-2 wird vor allem von aktivierten T-Zellen produziert, die gleichsam ein IL-2-vermitteltes Wachstum zeigen. Die IL-2-abhängige Aktivierung der Treg stellt dahingehend einen negativen Feedbackmechanismus dar, der eine überschießende zelluläre Immunantwort verhindert (Sakaguchi et al., 2008). Der wesentliche Regulator der Treg-Entwicklung und -Funktion ist jedoch der Transkriptionsfaktor FOXP3, der aktuell als der spezifischste Marker für Treg gilt. Seine Funktion ist gebunden an die Interaktion mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT) und Nuclear Factor 'Kappa-Light-Chain-Enhancer' of Activated B-cells (NF- κ B). FOXP3 vermittelt in naiven T-Zellen die Expression von CD25 sowie der Immuncheckpoints CTLA-4 und Glucocorticoid-induced TNFR-Related Protein (GITR) während die immunstimulatorischen Zytokine IL-2, IL-4 und IFN- γ herabreguliert werden (Sakaguchi et al., 2008). Zudem inhibieren Treg u.a. LAG3-anhängig die Expression von MHCII- und costimulatorischen Molekülen auf dendritischen Zellen (DC) und somit die Induktion antigenspezifischer T-Zellen (Li et al., 2020; Sakaguchi et al., 2008). Darüber hinaus wirken Treg auch im direkten Zell-Zell-Kontakt immunsuppressiv. Durch Granzyme und Perforine wirken sie u.a. auf CTL zytotoxisch (Li et al., 2020; Sakaguchi et al., 2008).

1.3.2 Prognostische Bedeutung von regulatorischen T-Zellen im hepatozellulären Karzinom

In einer Vielzahl von Studien wurde eine Hochregulation von Treg im Tumorgewebe für das HCC beschrieben (Flecken et al., 2014; Fu et al., 2007; Kobayashi et al., 2007; Ormandy et al., 2005; Shen et al., 2010; Unitt et al., 2005). Zudem zeigte sich im übrigen Lebergewebe und peripheren Blut von Patienten mit diagnostiziertem HCC ein erhöhtes Vorkommen von Treg (Flecken et al., 2014; Langhans et al., 2019; Ormandy et al., 2005; Shen et al., 2010). Es konnte nicht nur eine positive Korrelation zwischen der Höhe der Treg und dem Tumorstadium sowie dem Grad der Entdifferenzierung nachgewiesen werden (Fu et al., 2007; Kobayashi et al., 2007; Shen et al., 2010), Patienten mit einer nachgewiesenen höheren Infiltration von Treg hatten auch eine schlechtere Prognose im

Hinblick auf das Gesamtüberleben (Fu et al., 2007; Kobayashi et al., 2007) sowie das rezidivfreie Überleben nach kurativer Tumorsektion (Zhou et al., 2009). Dabei war der Anstieg der Treg prognostisch entscheidender als die Depletion der CTL (Kobayashi et al., 2007), obgleich die Ratio aus Treg zu CTL als Prognosefaktor für das rezidivfreie und generelle Überleben nach Tumorsektion beschrieben wurde (Gao et al., 2007).

1.3.3 Depletion und Inhibition regulatorischer T-Zellen

Ihre prognostische Bedeutung macht Treg zu einem vielversprechenden Ziel in der Behandlung des HCC. Mögliche Ansätze zur Überwindung der immunsuppressiven Wirkung der Treg sind die Zelldepletion, die Hemmung der Chemotaxis und die funktionelle Inhibition der Treg. Diese Mechanismen wurden in präklinischen und klinischen Studien in verschiedenen Tumorentitäten untersucht. Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengefasst und die Vor- und Nachteile der jeweiligen Ansätze erläutert werden.

Eine Vielzahl von präklinischen und klinischen Studien untersuchten die Effekte einer Treg-Depletion in verschiedenen Tumorentitäten. Die am besten untersuchten Wirkstoffe sind CD25-Antikörper und das Alkylans Cyclophosphamid. CD25-Antikörper vermitteln indirekt durch den Entzug des für die Treg-Proliferation wichtigen IL-2 sowie direkt durch Antikörper-, Komplement- oder Toxin-vermittelt Zytotoxizität eine Depletion der Treg (Byrne et al., 2011). Eine Therapie mit CD25-Antikörpern verlängerte das Überleben in murinen Modellen solider und hämatoonkologischer Malignome (Golgher et al., 2002; Shimizu et al., 1999; Tan et al., 2013). In murinen HCC-Modellen wurden hingegen kein eindeutiger Vorteil einer Behandlung mit CD25-Antikörpern nachgewiesen. Die Ergebnisse differierten in Abhängigkeit vom eingesetzten Tumormodell. Während Tumoren der Zellreihe MH129 ein verzögertes Wachstum unter einer Therapie mit einem CD25-Antikörper zeigten, sprachen Tumoren der Zellreihe MH134 nicht auf die Therapie an. Dabei wurde jedoch kein Unterschied im Hinblick auf die Infiltration der Tumoren durch Treg beobachtet (Nagayama et al., 2007). In klinischen Studien wurden CD25-Antikörper vor allem in Kombination mit Vakzin-Therapien getestet. Auch dabei wurden teils deutlich differierende Therapieansprechen dokumentiert. Dannull und Rech berichteten eine verstärkte tumorspezifische T-Zellantwort im Vergleich zur alleinigen Vakzinierung bei an

Mamma-, Nierenzell- oder Ovarial-Karzinom erkrankten Patienten (Dannull et al., 2005; Rech et al., 2012). Hingegen konnten Morse, Jacobs, Luke und Baur keine gesteigerte T-Zellantwort bzw. kein verbessertes klinisches Ansprechen bei Patienten mit CEA-exprimierenden Karzinomen oder malignem Melanom nachweisen (Baur et al., 2013; Jacobs et al., 2010; Luke et al., 2016; Morse et al., 2008). Ebenso konnte bei Patienten mit malignem Melanom oder einem Nierenzellkarzinom durch eine Monotherapie mit Denileukin difitoxin, einem Fusionsprotein aus IL-2 und dem Diphtherie-Toxin, keine signifikante Treg-Depletion und kein klinisches Ansprechen beobachtet werden (Attia et al., 2005). Mögliche Limitationen der Therapien mit CD25-Antikörpern können in der unzureichenden Spezifität begründet sein. Der IL2-Rezeptor wird nicht allein von Treg exprimiert. Auch die Differenzierung naiver CD4+ Zellen zu Th1- und Th2-Zellen und die Proliferation von CTL sowie NK-Zellen erfolgen IL-2-abhängig (Sakaguchi et al., 2008). Zudem birgt die Therapie mit CD25-Antikörpern das Risiko von autoimmun vermittelten Nebenwirkungen (Shimizu et al., 1999). Diese Form der Nebenwirkungen führten dazu, dass die Europäische Arzneimittelagentur die Zulassung für den CD25-Antikörper Daclizumab, der vor allem in der Therapie der Multiplen Sklerose zum Einsatz kam, im Jahr 2018 zurückzog (Europäische Arzneimittelagentur, 05.04.2021). Auch die Alkylans Cyclophosphamid wurde in niedriger Dosierung zur Depletion von Treg eingesetzt. Dabei konnte im Tiermodell (Ratte) kolorektaler Karzinome wie auch im murinen HCC-Modell ein verzögertes Tumorwachstum beobachtet werden (Ghiringhelli et al., 2004; Ma et al., 2011). Diese positiven Ergebnisse konnten jedoch nicht in allen murinen HCC-Modellen reproduziert werden (Nagayama et al., 2007). In einer klinischen Studie wurde die Wirkung von niedrig-dosiertem Cyclophosphamid bei 13 Patienten mit einem fortgeschrittenen HCC untersucht. Sechs Patienten entwickelten eine tumorspezifische Immunantwort. Jedoch zeigte die Untersuchung, dass nicht nur Treg, sondern auch CD8+ CTL unter der Therapie mit Cyclophosphamid depletiert wurden (Greten et al., 2010). Chemokine und Integrine bewirken eine Allokation von Treg im Tumormilieu (Shen et al., 2010; Byrne et al., 2011). Ihre Inhibition soll zu einer verminderten Infiltration der Tumoren durch Treg führen. Mogamulizumab ist ein gegen CC chemokin receptor 4 (CCR4) gerichteter Antikörper, der bereits für die Therapie des T-Zell-Lymphoms zugelassen ist. In einer klinischen Studie wurde die Wirkung von Mogamulizumab in Kombination mit dem PD1-Antikörper Nivolumab bei Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren, darunter

auch das HCC, untersucht. Patienten mit einem HCC zeigten unter der Therapie eine reduzierte Zahl von Treg bei vermehrten CTL im Tumormilieu, jedoch in nur 27 % der Fälle ein klinisches Ansprechen. Die Rate unerwünschter Arzneimittelwirkungen betrug 29 % (Doi et al., 2019). Ähnliche Ergebnisse wurden unter Monotherapie mit Mogamulizumab bei Patienten mit Bronchial- und Ösophaguskarzinomen beobachtet. Die Patienten zeigten unter der Behandlung einen Abfall der Treg im peripheren Blut, in 40 % konnte ein Fortschreiten der Erkrankung verhindert werden. Jedoch wurden bei knapp einem Drittel der Patienten schwere Nebenwirkungen (Grad 3 und 4) dokumentiert (Kurose et al., 2015).

Weitere Ansätze zielen auf eine funktionelle Hemmung der Treg ab. Der Multityrosinkinaseinhibitor Sunitinib ist bereits für die Therapie des klarzelligen Nierenzellkarzinoms, von neuroendokrinen Tumoren und gastrointestinalen Stromatumoren zugelassen (Blumenthal et al., 2012; Liu et al., 2017). Sunitinib reduziert die Sekretion der immunsuppressiven Zytokine IL-10 und TGF- β durch Treg und führt ferner zu einer Depletion der Treg (Liu et al., 2017). In einer Phase III Studie bei Patienten mit einem HCC wurde bei höherer Rate unerwünschter Arzneimittelwirkungen jedoch keine Überlegenheit gegenüber einer Therapie mit Sorafenib beobachtet (Cheng et al., 2013). Der Immuncheckpoint-Rezeptor CTLA-4 wird von Treg, aber auch von aktivierten CD4+ und CD8+ T-Zellen exprimiert. Bindet CTLA-4 an seine Liganden CD80 und CD86 auf APC, werden diese inhibiert (Byrne et al., 2011; van Coillie et al., 2020). Gegen CTLA-4 gerichtete Antikörper können die durch Treg über diesen Immuncheckpoint induzierte Inhibition der APC aufheben. Der CTLA-4-Antikörper Ipilimumab in Kombination mit dem PD1-Antikörper Nivolumab ist seit März 2020 in den USA als Zweitlinientherapie des HCC zugelassen. In der Check Mate 040-Studie zeigten etwa ein Drittel der behandelten Patienten ein klinisches Therapieansprechen (Finn et al., 2020b; Yau et al., 2020). Eine weiteren Phase III Studie mit Ipilimumab/Nivolumab in der Erstlinientherapie des fortgeschrittenen HCC wird derzeit durchgeführt, die endgültigen Ergebnisse stehen aus. Ein effektiver, spezifischer und dabei gut verträglicher Wirkstoff zur Überwindung der immunsuppressiven Wirkung der Treg für den Einsatz in der Malignomtherapie fehlt weiterhin. Neue Therapieansätze werden daher dringend benötigt. Das im Folgenden beschriebene Treg-Inhibitor-Peptid P60 stellt dahingehend einen interessanten und vielversprechenden neuen Ansatz dar.

1.3.3.1 FOXP3-Inhibitorpeptid P60

Der Transkriptionsfaktor FOXP3 ist der Hauptregulator der Entwicklung und Funktion der Treg. Er gilt als Treg-spezifisch (Sakaguchi et al., 2008). Aufgrund dessen stellt FOXP3 ein interessantes Target in der Malignomtherapie dar. Casares et al. entwickelten ein FOXP3-spezifisches Inhibitor-Peptid, P60. Dieses Peptid überwindet die Zellmembran der Treg und bindet intrazellulär an FOXP3, sodass dessen Homodimerisation und nukleäre Translokation inhibiert werden (Casares et al., 2010). Das Inhibitor-Peptid bindet in der mittleren Region von FOXP3, zwischen den Aminosäuren 177 und 331. Darin enthalten sind die Zinkfinger-Domäne, das Leucin-Zipper-Motiv und die Acute Myeloid Leucemia 1 (AML-1-)interagierende Domäne. Dies sind essenzielle Regionen für den immunsuppressiven Phänotyp der Treg. Die Leucin-Zipper-Region wird für die Homodimerisation des FOXP3 benötigt, welche wiederum notwendig für dessen Funktion als Transkriptionsregulator ist. Die AML-1 interagierende Domäne reguliert die Expression von IL-2 und IFN- γ . Der Knockdown von AML-1 in nTreg führte zu einem Verlust ihrer immunsuppressiven Funktion in vitro (Lozano et al., 2017; Lozano et al., 2021; Sakaguchi et al., 2008). Casares et al. untersuchten zudem den Einfluss von P60 auf die Interaktion zwischen FOXP3 und NFAT sowie NF- κ B in vitro. Der Komplex der Transkriptionsfaktoren NFAT, NF- κ B und Activator protein-1 (AP-1) fördert u.a. durch die Expression von IL-2 und IL-4 die Aktivierung naiver T-Zellen und deren Differenzierung zu CTL. Durch die Interaktion von FOXP3 mit NFAT wird die Expression solcher Gene, die die Differenzierung zu CTL begünstigen gehemmt (Sakaguchi et al., 2008). Die Aktivität der Transkriptionsfaktoren NFAT und NF- κ B konnte in den Untersuchungen von Casares et al. durch P60 wiederhergestellt werden (Casares et al., 2010). Im Gegensatz zu den unter 1.3.3 genannten therapeutischen Ansätzen zur Überwindung der immunsuppressiven Wirkung der Treg, zeichnet sich P60 durch eine hohe Spezifität aus. Betrachtet man das zelluläre Immunsystem, wird FOXP3 von naiven CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors kurzzeitig exprimiert. Dauerhaft wird es jedoch ausschließlich von Treg exprimiert (Wang et al., 2007). So beobachteten Casares et al. keinen Einfluss von P60 auf die Funktion von CTL und APC (Casares et al., 2010).

Neben in vitro Untersuchungen erfolgten präklinische Studien mit P60 in murinen Tumormodellen. Im murinen Modell für das kolorektales Karzinom hatte eine alleinige Vakzinierung mit einem Tumorpeptid keinen positiven Einfluss auf Tumorprogress und

Überleben. Jedoch blieben 82 % der Mäuse, die eine Kombination aus Vakzin und P60 erhielten, tumorfrei (Casares et al., 2010). Moreno Ayala et al. untersuchten die Wirkung von P60 in Kombination mit einem DC-basierten Vakzin in zwei murinen Mammakarzinom-Modellen (LM3, 4T1). Auch hier wurde ein verbessertes Therapieansprechen unter der Kombinationstherapie beobachtet (Moreno Ayala et al., 2017). Translationale Untersuchungen sind bislang nicht erfolgt.

1.4 Dendritische Zellen basierte Immuntherapie von Malignomen

1.4.1 Definition und Funktion von dendritischen Zellen

DC sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC), die funktionell dem angeborenen Immunsystem zugeordnet werden. Gewebeständige interdigitierende DC, plasmazytoide DC im Blut und in den sekundären lymphatischen Organen angesiedelte folliculäre DC werden unterschieden. Ihre Aktivierung erfolgt durch den Kontakt zu Antigenen, welche sie dann in den lymphatischen Organen den Lymphozyten präsentieren (Schütt und Bröker, 2011). Die Aufnahme von Antigenen und Pathogenen durch die DC erfolgt durch die kontinuierliche Makropinozytose extrazellulärer Flüssigkeit sowie Rezeptor-vermittelte Endozytose und Phagozytose. Die Fremdantigene aber auch externe Stimuli durch proinflammatorische Zytokine regen die Reifung der DC an. Diese reifen DC können eine T-Zell-vermittelte Immunantwort induzieren. Die intrazellulär prozessierten Fremdantigene werden dabei über MHC-Moleküle an der Zelloberfläche präsentiert (Théry und Amigorena, 2001). Endogene Antigene werden primär über MHC I präsentiert, die Präsentation von exogenen Antigenen erfolgt vor allem über MHC II. Über den Vorgang des cross-priming können jedoch auch exogene Antigene via MHC I präsentiert werden (Guermonprez et al., 2002). In Abhängigkeit vom aufgenommenen Antigen führen veränderte Genexpressionsprofile zur Produktion verschiedener Zytokine durch die DC. So wird über eine vermehrte Synthese von IL-12 die Differenzierung von T-Helferzellen zu TH1-Zellen verstärkt. Die so vermittelte Immunreaktion ist proinflammatorisch, geprägt durch IFN γ , CTL und NK-Zellen. Ziel der Immuntherapie von Malignomen ist die Induktion einer solchen TH1-gewichtete antitumoralen Immunantwort zur Überwindung des immunsuppressiven Tumormilieus. Eine vermehrte Produktion von IL-4 fördert hingegen eine TH2-gewichtete Immunantwort, beispielsweise bei der Abwehr

parasitärer Erkrankungen. Unreife DC schaffen ein antiinflammatorisches Milieu, geprägt durch die IL-10 und TGF β . T-Zellen ist unter diesen Umständen keine Differenzierung zu TH1- oder TH2-Zellen möglich, sie werden zu immunsuppressiven Treg (Schütt und Bröker, 2011).

1.4.2 Tumorantigene

Unter den Tumorantigenen werden drei Gruppen, Tumor-spezifische Antigene (TSA), Cancer/Testis-Antigene und Tumor-assoziierte Antigene (TAA), unterschieden. TSA sind solche Antigene, die ausschließlich von Tumorzellen exprimiert werden. Sie entstehen durch Neumutationen der Tumorzellen. Cancer/Testis-Antigene werden von Tumorzellen, aber auch von gesunden Zellen der Keimbahnen exprimiert. TAA werden mehrheitlich von Tumoren, aber auch von gesunden Zellen exprimiert. AFP ist ein solches TAA und der primäre Tumormarker für das HCC (Brown und Greten, 2019; Prieto et al., 2015). AFP wurde erstmal 1964 im Serum von HCC-Patienten entdeckt. Das ca. 70 kDa große Glykoprotein wird physiologisch in der fetalen und neonatalen Entwicklung exprimiert. Es wird deswegen zu den onkofetalen Antigenen gezählt. Die Produktion von AFP erfolgt durch den Dottersack, die Leber und den Gastrointestinaltrakt und erreicht ihre höchste Konzentration in der 12. bis 16. Woche der fetalen Entwicklung, bevor die Serum-Spiegel wieder abfallen. Die Tumorzellen des HCC, aber auch des Magens, des Pankreas und des Hodens können die Funktion zur Expression von AFP wiedererlangen. Rund 60 % der HCC exprimieren AFP (Schmidt et al., 2012; Tsuchiya et al., 2015; Wang und Wang, 2018). Obwohl es sich nicht um ein Fremdanigen handelt, können bei Patienten, die an einem AFP-exprimierenden HCC erkrankt sind, teilweise AFP-spezifische CTL gefunden werden (Butterfield et al., 2007; Evdokimova et al., 2007). Dabei korreliert die Höhe des Tumormarkers im Serum jedoch nicht mit der Stärke der Immunantwort (Butterfield et al., 2007). Neben AFP sind GPL-3, NY-ESO1 und MAGE-11 als TAA bzw. Cancer/Testis-Antigen des HCC bekannt (Flecken et al., 2012b; Schmidt et al., 2012). Das progressionsfreie Überleben korreliert mit der Stärke der natürlichen antitumoralen Immunantwort gegen diese Tumorantigene. Gegen das häufigste HCC-assoziierte Antigen AFP zeigt sich jedoch zumeist die schwächste Immunantwort (Flecken et al., 2012b).

1.4.3 Immuntherapie von Malignomen mit Tumorantigen-beladenen dendritischen Zellen

DC-basierte Immuntherapien sind ein vielversprechender und bereits *in vitro* wie *in vivo* gut untersuchter Therapieansatz zur Induktion einer antitumoralen Immunantwort. Die Möglichkeiten der Antigen-Beladung der DC sind dabei vielfältig, unterscheiden sich jedoch in ihrer Effektivität (s. 1.5). Beschrieben sind Methoden der Tumorfusion, der Beladung mit Tumorlysate oder aufgereinigten Tumorproteinen, mit langen Proteinen oder MHC-restringierten kurzen Proteinen, sowie die Transduktion mit viralen Vektoren, in der Regel Adenoviren-basiert (Pardee et al., 2015). Durch adenovirale Transduktion mit TAA beladene DC konnte eine spezifische T-Zellantwort *in vitro* gegen HCC-Zellen induziert werden (Blalock et al., 2012; González-Carmona et al., 2006). Das Ansprechen auf DC-basierte Tumorthérapien in klinischen Studien blieb bislang jedoch limitiert. Wiederholt wurden DC-basierte Therapien in klinischen Studien bei an fortgeschrittenen HCC erkrankten Patienten untersucht, ohne dass eine signifikante Remission der Tumoren dokumentiert werden konnte. Ladhams et al. therapierten zwei Patienten mit autologen DC, die mit Tumorzellantigenen gepulst wurden. Das klinische Ansprechen wurde nach der Entwicklung der Tumormarker und der Tumorausdehnung in der Schnittbildgebung beurteilt. Dabei wurde bei einem Patienten ein verzögertes Tumorwachstum dokumentiert (Ladhams et al., 2002). Iwashita et al. behandelten zehn Patienten mit DC, die zuvor mit Tumorlysate gepulst wurden. Auch hier wurde das klinische Ansprechen anhand der Entwicklung der Tumormarker und der Tumorausdehnung in der CT beurteilt. Zwei Patienten zeigten ein Ansprechen in Form eines Abfalls der Tumormarker, bei einem Patienten konnte in der Bildgebung ein Tumorregress dokumentiert werden (Iwashita et al., 2003). Eine weitere klinische Studie mit Tumorlysate-gepulsten DC schloss 31 Patienten ein. Ein Therapieansprechen wurde hier bei 21 Patienten beobachtet. Siebzehn Patienten zeigten in den Verlaufsuntersuchungen stabile Befunde, bei vier Patienten wurde eine partielle Remission festgestellt. Dabei wurde eine prolongierte Behandlung als vorteilhaft beschrieben (Lee et al., 2005). Palmer et al. schlossen 35 Patienten in eine klinische Studie ein, in der die Behandlung mit HepG2-Lysate gepulsten DC erfolgte. Die Daten von 25 Patienten wurden ausgewertet. In 28 % der Fälle konnte ein Fortschreiten der Erkrankung innerhalb des Beobachtungszeitraums verhindert werden (Palmer et al., 2009).

Ursächlich für das unzureichende Ansprechen der HCC auf Therapien mit TAA-gepulsten DC ist wahrscheinlich die mit dem immunoediting einhergehende Immuntoleranz. Weiterentwicklungen der DC-basierten Immuntherapien zielen daher darauf ab, diese Escape-Mechanismen zu überwinden. Durch die adenovirale Transduktion können DC nicht nur mit Tumorantigenen beladen werden, auch eine Transduktion mit adenoviralen Vektoren (AdV), die andere Transgene kodieren, ist möglich. Auf diese Weise können DC generiert werden, die beispielsweise inflammatorische Zytokine oder Immuncheckpoints exprimieren. Entsprechende DC wurden bereits in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe im murinen HCC-Modell untersucht. Der zur TNF-Familie gehörenden Rezeptor CD40 wird von APC, sein Ligand, CD40L, u.a. von aktivierten CD4+ T-Zellen exprimiert. Die CD40/CD40L-Interaktion führt zur Aktivierung und Reifung von APC und ist essenziell für die T-Helferzell-abhängige Aktivierung von CTL. Zudem bedingt die Interaktion eine Hochregulation proinflammatorischer Zytokine, v.a. von IL-12 (Chand Dakal et al., 2020). Humane DC gesunder Probanden wurden mit Tumorlysat gepulst und zusätzlich mit Ad-hCD40L, einem humanen CD40L kodierenden AdV, transduziert. Infolge zeigten sie eine erhöhte Expression ko-stimulierender Oberflächenmerkmale und des Chemokin-Rezeptors CCR7. Zudem wurde ein Anstieg proinflammatorischer Zytokine dokumentiert (Sadeghlar et al., 2020; Hillebrand et al., 2019). Im murinen HCC-Modell führte die Therapie mit Ad-mCD40L transduzierten DC zu einem verzögerten Tumorwachstum und prolongierten Überleben (Gonzalez-Carmona et al., 2008).

1.5 Adenovirale Vektoren

Virale Vektoren sind Viruspartikel, die zum Transfer von genetischen Informationen genutzt werden können. Humane Adenoviren können sich ausschließlich in menschlichen Zellen sowie in Zellen von Schimpansen und Baumwollratten replizieren, jedoch werden sie häufig als Vektoren zur Transduktion eines Gentransfers in Zellen anderer Arten verwendet. Zur Transduktion werden rekombinante AdV eingesetzt. Häufig werden AdV der 1. Generation mit fehlenden DNA-Sequenzen E1 und E3 verwendet. Durch den Verlust der E1-Sequenz sind die Vektoren weiterhin infektiös, jedoch nicht mehr replikationsfähig. Eine Vermehrung der Vektoren ist nur dann möglich, wenn die Zielzelle die fehlende Sequenz exprimiert (z.B. embryonale Nieren-, oder Lungenzellen sowie

Retinoblasten) (Fallaux et al., 1996).

AdV können zur Transduktion von DC genutzt werden. Das Verfahren zeichnet sich durch eine hohe Effektivität aus, mit einer Genexpression in mehr als 90 % der Zielzellen. Die Effektivität ist dabei abhängig vom Verhältnis der Anzahl der infektiösen Vektoren zur Anzahl der Zielzellen (MOI, Multiplizität der Infektion). Durch eine höhere MOI wird eine höhere Expressionsrate erzielt, allerdings steigt darunter auch die Zelltod-Rate der Zielzellen (Zhong et al., 1999).

In vitro Untersuchungen stellten Vorteile der adenoviralen Transduktion von DC gegenüber anderen Wegen des Antigentransfers heraus. Schumacher et al. beobachteten eine verbesserte Reifung der DC sowie eine stärkere antigenspezifische Immunantwort durch CTL, u.a. infolge einer reduzierten Freisetzung von IL-10, nach adenoviraler Transduktion im Vergleich zu anderen Methoden des Antigentransfers (Schumacher et al., 2004). Pardee et al. beschrieben zudem eine höhere Expression von MHC I- und MHC II- sowie ko-stimulierender Moleküle auf DC nach adenoviraler Transduktion im Vergleich zu unreifen DC bzw. DC, die mit Lipopolysaccharid und IFN γ stimuliert wurden (Pardee et al., 2015). Eine stärkere Aktivierung von NK-Zellen bei gleichzeitig reduzierter Anzahl von Treg berichteten Bray et al. im in vitro Vergleich adenoviral transduzierter DC und Peptid-beladener DC (Bray et al., 2011). Auch in vivo Untersuchungen stellten den Vorteil der adenoviralen Transduktion heraus. Evdokimova et al. verglichen die Immunantwort gesunder Probanden und an einem HCC-erkrankter Patienten auf eine Vakzinierung mit DC, die mit AFP-Protein beladen wurden oder mit einem AFP-kodierenden AdV transduziert wurden. Während die Protein beladenen DC keine signifikante Immunantwort induzierten, zeigten erkrankte Patienten wie gesunde Probanden eine stärkere CD4 $^{+}$ T-Zell-Immunantwort nach Vakzinierung mit adenoviral transduzierten DC (Evdokimova et al., 2007).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das HCC ist aktuell die zweithäufigste tumorassoziierte Todesursache weltweit (McGlynn et al., 2021). Aufgrund der häufig erst späten Diagnosestellung und der zugrundeliegenden Leberzirrhose stehen für die Mehrzahl der Erkrankten nur palliative Therapiekonzepte zur Verfügung. DC-basierte Tumorstoffe sind ein vielversprechender

Ansatz in der HCC-Therapie. Sie induzieren eine antigenspezifische Immunantwort *in vitro* und *in vivo* und verlangsamen das Tumorstadium im murinen HCC-Modell (Blalock et al., 2012; González-Carmona et al., 2006). In klinischen Studien konnte bislang jedoch kein positiver Einfluss auf das Überleben HCC erkrankter Patienten belegt werden (Iwashita et al., 2003; Ladhams et al., 2002; Lee et al., 2005; Palmer et al., 2009). Ursächlich für das geringe Therapieansprechen in klinischen Studien ist vermutlich die Entwicklung eines immunsuppressiven Tumormilieu (immunoediting) (Prieto et al., 2015; Schmidt et al., 2012). Dabei ist die Hochregulation der Treg im HCC von besonderer Bedeutung (Fu et al., 2007). Die Suche nach effektiven Möglichkeiten der Treg-Inhibition ist daher ein beachtenswerter Ansatz, um die spezifische antitumorale Immunantwort im HCC zu verstärken. Die bisherigen Ansätze zur Inhibition der Treg sind vielfältig, jedoch unspezifisch (Byrne et al., 2011). Der Peptid-Inhibitor P60 hingegen bindet an den Treg-spezifischen Transkriptionsfaktor FOXP3, der essentiell für deren immunsuppressiven Effekte ist (Sakaguchi et al., 2008). P60 bietet daher die Möglichkeit einer spezifischen Treg-Inhibition, wie im murinen Modell des kolorektalen Karzinoms bereits gezeigt (Casares et al., 2010).

Aufbauend auf die dargestellten Vorarbeiten wurde in dieser Arbeit der Effekt einer spezifischen Treg-Inhibition mit P60 - als Monotherapie und in Kombination mit adenoviral transduzierten DC - auf das Tumorstadium und das Überleben im *s.c.* und orthotopen murinen HCC-Modell untersucht. Die Zielsetzung der Arbeit war es, zu überprüfen, ob die antitumorale Wirkung der DC-basierten Immuntherapien durch die spezifische Treg-Inhibition verstärkt werden kann. Untersucht wurde der Einfluss der Therapie auf den Tumorstadium und das Überleben bei etablierten murinen HCC und im präventiven Setting. In den Beobachtungsstudien kamen mit Ad-mAFP und Ad-mCD40L transduzierte DC zur Anwendung.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

2.1.1.1 911-Zellen

Die Zelllinie 911 wurde aus humanen embryonalen Retinoblasten zur Vermehrung rekombinanter, replikationsdefizienter AdV entwickelt. Zu diesem Zweck wurden sie mit der E1-Sequenz des humanen Adenovirus Serotyp 5 (Basenpaare 79-5789) stabil transfiziert. Die Zellen zeigen ein einschichtiges, adhärentes Wachstum (Abou-Alfa et al., 2018; Fallaux et al., 1996).

2.1.1.2 Hepa129- und Hepa129 mAFP-Zellen

Hepatoma129 (Hepa129) sind eine murine HCC-Zelllinie, die ursprünglich aus HCC von C3H-Mäusen gewonnen wurden. Die Tumoren wurden vom NCI-Frederick Cancer Research and Development Center, USA bezogen. Hepa129-Zellen wurden in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe generiert. Hepa129-Zellen wachsen als Suspensionszellen. Zudem wurden Hepa129 mAFP-Zellen zur Tumorinduktion genutzt. Dies sind Hepa129 Zellen, die stabil mit BMG-neo-AFP transfiziert wurden, sodass sie murines mAFP exprimieren. Die Selektion der transfizierten Zellen erfolgt durch Zugabe von Geneticin (G418) in das Zellkulturmedium, für das sie durch die Transfektion resistent sind (Hanke et al., 2002).

2.1.2 Adenovirale Vektoren

Die im Rahmen dieser Arbeit zur Transduktion der DC genutzten AdV Ad-mAFP, Ad-CD40L sowie die Kontroll-Vektoren Ad-LacZ und Ad-Mock waren bereits aus vorausgehenden Arbeiten in der eigenen Arbeitsgruppe vorhanden. Ad-mAFP kodiert murines AFP, Ad-CD40L den murinen CD40L. Ad-LacZ kodiert die β -Galaktosidase des *E. coli*, Ad-Mock ist ein Leervektor.

Wie unter 1.5 beschrieben handelt es sich um AdV der ersten Generation. Das heißt sie waren aufgrund der Deletion der E1- und E3-Gene replikationsdefizient.

2.1.3 P60 und P301

Das FOXP3-Inhibitorpeptid sowie das Kontrollpeptid P301 wurden uns von Dr. Noelia Casares von der Universität Navarra, Spanien zur Verfügung gestellt. P60 (RDFQSFRKMWPFFAM) wurde auf Basis der Phagen-Display-Technologie aus einer 15-mer Peptid-Bibliothek ausgewählt. Die Selektion erfolgt aufgrund der spezifischen Bindung an FOXP3. P301 (RPGNKTVLBITLMSG) enthält die Aminosäuren 301-315 des Glycoproteins gp120 des HIV-1 (Casares et al., 2010; Setiawan et al., 2019).

2.1.4 Zytokine

mGM-CSF (200 U/ml)	PeptoTech Germany, Hamburg
mIL-4 (100 U/ml bzw. 20 U/ml)	PeptoTech Germany, Hamburg

2.1.5 Medien und Pufferlösungen

Agarose Typ VII	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumchlorid	Fluka AG, Schweiz
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH, Österreich
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, USA
Cäsiumchlorid (CsCl)	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Eagle's Minimum Essential Medium (10x) w/o L-Glutamin/NaHCO ₃	Gibco by life technologies, USA
Ethanol (100 %)	Merck, Darmstadt
Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA)	Fluka AG, Schweiz
Fötale Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Geneticin (G418) 50 mg/ml	Gibco by life technologies, USA
Glycerol	Fluka AG, Schweiz
Hefeextrakt	Becton, Dickinson & Co., USA
Kaliumchlorid	Fluka AG, Schweiz

Kaliumhydrogencarbonat	Fluka AG, Schweiz
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	Fluka AG, Schweiz
Natriumdodecylsulfonat (SDS)	Serva GmbH, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat (8,4 %)	Delta Select GmbH, Pfullingen
Natriumhydrogenphosphat	Delta Select GmbH, Pfullingen
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml, 10.000 µg/ml)	Gibco by life technologies, USA
Pferdeserum	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco by life technologies, USA
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium mit L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris/Cl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.5.1 Zellkulturmedien

Komplettes Zellkulturmedium für 911-Zellen:

DMEM + L-Glutamin	500 ml
Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
FCS (hitzeinaktiviert)	10 % (v/v)

Das Zellkulturmedium wurde bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt.

Komplettes Zellkulturmedium für Hepa129-Zellen:

RPMI 1640 + Glutamin	500 ml
Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
FCS (hitzeinaktiviert)	10 % (v/v)

Das Zellkulturmedium wurde bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt.

Komplettes Zellkulturmedium für Hepa129 mAFP-Zellen:

RPMI 1640 + Glutamin	500 ml
Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
FCS (hitzeinaktiviert)	10 % (v/v)
G418	1 % (v/v)

Das Zellkulturmedium wurde bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt.

Komplettes Zellkulturmedium für DC:

RPMI 1640 + Glutamin	500 ml
Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
FCS (hitzeinaktiviert)	10 % (v/v)

Das Zellkulturmedium wurde bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt.

2.1.5.2 Amplifikation und Aufreinigung adenoviraler Vektoren

Transduktionsmedium für 911-Zellen:

DMEM + L-Glutamin	500 ml
Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
FCS (hitzeinaktiviert)	2 % (v/v)

Das Medium wurde bei 4°C gelagert und vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt.

Cäsiumchlorid- (CsCl)-Lösungen für die Virusaufreinigung:

TE-Puffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 8,1)	50 ml
CsCl, entsprechend der angestrebten Dichte	
1,2 g/ml:	13,85 g
1,33 g/ml:	22,5 g
1,45 g/ml:	30,5 g

2.1.5.3 Titration adenoviraler Vektoren

Agarose 1,5 % (m/v):

Agarose Typ VII	0,75 g
Aqua bidest	50 ml

Die Agarose wurde im Aqua bidest gelöst. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Eagle's Minimum Essential Medium (2x) (MEM 2x)

Eagle's Minimum Essential Medium (10x) w/o L-Glutamin/NaHCO ₃	20 ml
Aqua bidest	65 ml
Penicillin/Streptomycin	2 ml
L-Glutamin	2 ml
Hefe Extrakt (5 %)	2 ml
Natriumhydrogencarbonat (8,4 %)	7-10 ml

Das MEM 2x wurde unter sterilen Bedingungen angesetzt und auf einen pH 7,4 eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Überschichtungsmedium (Overlay):

MEM 2x	19,6 ml
Pferdeserum	0,8 ml
Agarose Typ VII 1,5 % (m/v)	19,6 ml

Optische Dichte (OD)-Puffer:

SDS	0,1 % (m/v)
Tris/Cl	10 mM
EDTA	1 mM
Aqua bidest	

Die Lösung wurde unmittelbar vor Gebrauch angesetzt.

2.1.5.4 Präparation und Transduktion der dendritischen Zellen

Erythrozyten-Lyse-Puffer

Aqua bidest	250 ml
Ammoniumchlorid	2,3 g
Kaliumhydrogencarbonat	0,28 g
EDTA	70 µl

Die nicht sterilen Bestandteile wurden in 20 ml Aqua bidest gelöst und sterilfiltriert. Das Filtrat wurde mit sterilem Aqua bidest auf 250 ml aufgefüllt und bei 4 °C gelagert.

Magnetic Activated Cell Sorting-(MACS-)Puffer

PBS	489,7 ml
EDTA	2 ml
BSA	8,3 ml

Die Pufferlösung wurde steril angesetzt und bei 4 °C gelagert.

Transduktionsmedium für DC

RPMI 1640 + Glutamin	500 ml
Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
FCS (hitzeinaktiviert)	2 % (v/v)

Das Medium wurde bei 4°C gelagert und vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt.

2.1.5.5 sonstige wiederholt genutzte Medien und Puffer

Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)

Natriumhydrogenphosphat	1,44 g
Natriumchlorid	8 g
Kaliumchlorid	0,2 g
Aqua bidest	800 ml

2.1.6 Mausmodell

2.1.6.1 Mausstamm (C3H/HeNCrl)

Die in vivo Untersuchungen wurden mit männlichen Tieren des Mausstamms C3H/HeNCrl durchgeführt. Dieser Stamm ging 1920 aus einer Kreuzung von „Bagg Albino“ Weibchen und „DBA“ Männchen hervor. Die Tiere wurden von der Firma Charles River Laboratories bezogen (<https://www.criver.com/products-services/find-model/c3h-mouse?region=23>, 1. Juli 2021). Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Tumorinduktion 10 Wochen alt. Für die Präparation der DC wurden Mäuse im Alter von 8 Wochen bezogen. Die Mäuse wurden

unter standardisierten pathogenfreien Bedingungen gehalten. Sämtliche tierexperimentelle Untersuchungen fanden unter Beachtung geltender Tierschutzbestimmungen statt und wurden im Vorfeld durch die Bezirksregierung Köln genehmigt (50.203.2-BN 22).

2.1.6.2 Narkotika

Ketamin (Ketavet 100 mg/ml)	Pharmacia, Erlangen
Xylazin (Rompun 100 mg/ml)	Bayer, Leverkusen
Isofluran	Abbot, Wiesbaden

2.1.7 Verbrauchsmaterial

Chirurgische Instrumente	Aesculap AG, Tuttlingen
Deckgläser (18 x 18 mm)	Menzel Gläser, Braunschweig
Dilaysekammer	Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn
Einmalkanülen	B. Braun AG, Melsungen
Einmalspritzen (2 ml, 5 ml, 20 ml)	B. Braun AG, Melsungen
Glaswaren (Kolben, Pipetten, Standzylinder, etc.)	Schott, Mitterteich
Insulin-Spritzen (40 U/ml)	B. Braun AG, Melsungen
Latex-Handschuhe	Ansell, Belgien
MACS LD Columns	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
6-Well-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde
Polyallomer Ultrazentrifugen-Röhrchen	Beckman Coulter, Krefeld
Polypropylenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Polystyrol-Röhrchen, GLKL 5 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipetten (Costar Stripette, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Corning, USA
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg

Skalpelle Cutfix Nr. 22	Aesculap, Tuttlingen
Sterilfilter (0,2 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturschalen (Ø 100 mm, 145 mm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellschaber (1,8 cm, 3 cm)	BD Biosciences, Heidelberg
Zellsieb 100 µm	BD Biosciences, Heidelberg

2.1.8 Geräte

Ausschwingrotor, SW41Ti	Beckman Coulter, Krefeld
Autoklav (Varioklav)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
CO ₂ -Inkubator	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Festwinkelrotor SW50Ti	Beckman Coulter, Krefeld
Gefrierschrank	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
MACS Separation Unit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Magnetrührer	Labor Brand, Gießen
Mikroskop (DM IL)	Leica, Wetzlar
Mikrowellengerät	Panasonic, Hamburg
Minischüttler	Works, USA
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
pH-Elektrode	Hannah Instruments, Kehl a. Rhein
Photometer	Pharmacia, Freiburg
Pipetten	Gilson, Bad Camberg Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe (Accu-Jet)	Baacklab, Schwerin
Pipettierhilfe (PipetBoy Acu)	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Präzisionsküvette aus Quarzglas	Hellma, Mühlheim
Schüttler (PROMAX2000)	Heidolph, Kehlheim
Sterilwerkbank (LaminAir)	Heraeus Sepatech, Osterode
Sterilwerkbank (Microflow)	Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden

Tiefkühlschrank (Colora E80)	Colora Messtechnik GmbH, Lorch
Waage (SBA52)	Scaltec, Heiligenstadt
Wasserbad	Köttermann, Uetze-Hänningen
Zentrifuge (Biofuge 13R)	Heraeus Sepatech, Osterode
Zentrifuge (Megafuge) 1.0R	Heraeus Sepatech, Osterode
Zentrifuge (Tischzentrifuge, Microfuge Lite)	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge (Ultrazentrifuge, Optima LE 80K)	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge (Varifuge 3.0R)	Heraeus Sepatech, Osterode

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur und Zellbiologie

2.2.1.1 Allgemeine Bedingungen der Zellkultur

Die Kultivierung aller Zellreihen erfolgte in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit.

2.2.1.2 Kultur und Passage von 911-Zellen

Die Kultur der 911-Zellen erfolgte in komplettem Zellkulturmedium in Zellkulturflaschen unter regelmäßiger lichtmikroskopischer Kontrolle der Zelldichte. Bei einer Konfluenz von mehr als 90 %, erfolgte die Passage der Zellen. Dazu wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die adhärennten Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und anschließend durch Hinzugabe von Trypsin-EDTA gelöst. Die gelösten Zellen wurden in komplettem Zellkulturmedium resuspendiert und im Verhältnis 1:10 auf neue Kulturflaschen bzw. in Vorbereitung der adenoviralen Transduktion auf Zellkulturplatten verteilt. Komplettes Zellkulturmedium wurde entsprechend der Größe der Zellkulturfläche ergänzt.

2.2.1.3 Kultur und Passage von Hepa129 (mAFP)-Zellen

Die Zellvermehrung wurde regelmäßig lichtmikroskopisch kontrolliert. Bei einer Konfluenz von 90 % oder mehr wurde die Zellsuspension in 15 ml Polypropylen-Röhrchen überführt und bei 21 °C für 10 min mit 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in komplettem Zellkulturmedium resuspendiert und im Verhältnis von 1:5 bis 1:10 auf neue Kulturflaschen verteilt. Komplettes Zellkulturmedium wurde entsprechend der Größe der Zellkulturfläche ergänzt.

2.2.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellsuspensionen aus den Zellkulturflaschen in Polypropylen-Röhrchen überführt und bei 17 °C für 5 min mit 800 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einer Lösung aus FCS und 10 % (v/v) DMSO resuspendiert, anschließend je 10^6 Zellen/ml in Reaktionsgefäßen aliquotiert. Die Aliquots wurden in einer Styroporbox über 24 Stunden auf -80 °C gekühlt, bevor sie in die Gasphase des flüssigen Stickstoffs überführt wurden.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem Stickstofftank entnommen und zunächst im Wasserbad bei 37 °C angetaut. Anschließend wurden sie in 10 ml komplettem Medium resuspendiert und zentrifugiert, um das DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden dann in komplettem Medium in eine Zellkulturflasche überführt und im Inkubator bei 37 °C kultiviert. Am darauffolgenden Tag erfolgte ein Wechsel des Zellkulturmediums.

2.2.1.5 Bestimmung von Zellzahl und -vitalität mittels Neubauer-Zählkammer

Die Bestimmung der Zellzahl und -vitalität erfolgte lichtmikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Zuvor wurden die Zellen mit Trypanblau angefärbt. Dazu wurden 10 µl einer homogenen Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit dem Farbstoff gemischt. Trypanblau kann die Membranen vitaler Zellen nicht überwinden, jedoch in das Zytosol abgestorbener Zellen vordringen und dort an intrazelluläre Proteine binden.

10 µl der gefärbten Zellsuspension wurden in die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Diese besteht aus einem Glasobjektträger mit einem Zählgitter aus vier Quadraten, die jeweils 16 Felder von je 1 mm² umfassen, und einem Deckglas. Der Hohlraum zwischen

Objektträger und Deckglas hat eine definierte Höhe von 0,1 mm. Bei 40-facher Vergrößerung wurden die vitalen Zellen jedes Großquadrats gezählt und summiert. Die Anzahl der vitalen Zellen pro Milliliter der Ausgangssuspension ergab sich aus der mittleren Anzahl der vitalen Zellen multipliziert mit dem Faktor zwei (Verdünnung) und 10^4 (/ml): $\text{Summe vitaler Zellen aller Großquadrate}/4 \times 2 \times 10^4 = \text{vitale Zellen/ml Zellsuspension}$. Bei großen Zellzahlen wurde die Ausgangssuspension mit Zellkulturmedium verdünnt.

2.2.2 Amplifikation, Aufreinigung und Titerbestimmung adenoviraler Vektoren

2.2.2.1 Amplifikation adenoviraler Vektoren

Die Amplifikation der AdV erfolgte mit Hilfe der Verpackungszelllinie 911. Erreichten die auf Zellkulturplatten ausgebrachten 911-Zellen eine Konfluenz von mehr als 90 %, wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Es erfolgte die Bestimmung der Zellzahl zweier repräsentativer Zellkulturplatten, aus der die Gesamtzellzahl angenähert wurde. Die AdV waren als Vektorenlösungen im Labor bereits vorhanden und deren Konzentration infektiöser Vektorenpartikel als pfu/ml (pfu = plaque forming unit) bekannt (s. 2.2.1.6.4). Die MOI wurde in der Regel mit 1 festgelegt, d.h. das Ziel war eine Transduktion mit einer pfu/Zelle. Die Vektormenge wurde aus der errechneten Gesamtzellzahl und der pfu/ml berechnet und in 5 ml Transduktionsmedium pro Zellkulturplatte überführt. Die Virussuspension wurde zu den gewaschenen 911-Zellen pipettiert. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 37 °C im CO₂-Inkubator für zwei Stunden unter regelmäßigem manuellem Schwenken der Zellkulturplatten, bevor 20 ml komplettes Zellkulturmedium pro Zellkulturplatte hinzupipettiert und die Zellen weiter inkubiert wurden.

In der Regel zeigte sich nach rund 48 bis 72 Stunden eine Zellyse in der lichtmikroskopischen Kontrolle. Die noch adhärennten Zellen wurden dann mit Hilfe eines Zellschabers gelöst, abgespült und die Zellsuspension in ein Polypropylenröhrchen überführt. Diese Zellsuspension wurde für 5 min bei 21 °C mit 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der zellfreie Überstand abgesaugt und das Zellpellet in PBS/Glycerol 10 % resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde dreimal in flüssigem Stickstoff gefroren und im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut, um die viralen Vektoren aus den Zellen

freizusetzen. Das Zelllysat wurde im Anschluss an die drei Einfrier-Auftau-Zyklen für 10 min bei 4 °C mit 3000 rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung und Konzentration des virushaltigen Überstandes. Erfolgte die Aufreinigung nicht gleich im Anschluss, wurde der Überstand bei -80 °C gelagert.

2.2.2.2 Aufreinigung adenoviraler Vektoren

Die Aufreinigung der AdV erfolgte mittels Cäsiumchlorid-(CsCl-) Dichtegradienten-Zentrifugation in zwei Schritten und anschließender Dialyse. Im ersten Schritt wurde ein diskontinuierlicher Dichtegradient erzeugt. Dazu wurden in zwei Polyallomerröhrchen 3 ml CsCl mit einer Dichte von 1,45 g/ml mit 4,5 ml CsCl einer Dichte von 1,2 g/ml überschichtet. Darauf wurden ca. 4 ml der Virussuspension aufgebracht. Die beiden Röhrchen wurden exakt austariert, bevor sie in den Ausschwingrotor SW41TI eingesetzt wurden. Die Ultrazentrifugation erfolgte in der Beckmann LE.80K Ultrazentrifuge bei 17 °C für eine Stunde mit 32.000 rpm im Vakuum ohne Bremse. Anschließend zeigte sich an der Phasengrenze eine Bande, die den AdV entsprach. Diese Bande wurde mit einer Aufziehkanüle aspiriert und in ein neues Optiseal-Röhrchen überführt. Im zweiten Schritt wurden die Vektoren in einem kontinuierlichen Dichtegradienten weiter aufgereinigt und konzentriert. Dazu wurde das Optiseal-Röhrchen mit CsCl der Dichte 1,33 g/ml aufgefüllt, erneut gegen ein weiteres Röhrchen austariert und in den Festwinkelrotor 50TI eingesetzt. Da der kontinuierliche Gradient sich erst während der Ultrazentrifugation ausbildet, benötigt der Vorgang mehr Zeit als die Aufreinigung im diskontinuierlichen Gradienten. Die Ultrazentrifugation erfolgte bei 17 °C mit 30.000 rpm und schwacher Bremse über 21 Stunden. Erneut reicherten sich die AdV in der Mitte des Gradienten als Bande an, die mit einer Injektionskanüle aspiriert wurde. Um Reste von CsCl zu entfernen, wurde die Virussuspension in eine Dialysekammer überführt. Es erfolgten vier Dialysezyklen à 30 Minuten, jeweils gegen das 100-fache Volumen PBS. Um ein Ausfällen des CsCl zu verhindern, wurden die ersten beiden Zyklen bei Raumtemperatur, erst die beiden weiteren bei 4 °C im Kühlschrank durchgeführt. Ein fünfter Dialysezyklus erfolgte gegen das 100-fache Volumen PBS/Glycerol 10 % (v/v) bei 4 °C über 30 Minuten. Anschließend wurden die aufgereinigten und konzentrierten Virusvektoren mit einer Aufziehkanüle aus der Dialysekammer aspiriert und steril filtriert. Die sterile Vektorsuspension wurde in

Reaktionsgefäßen zu je 20 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.2.3 Bestimmung der Konzentration adenoviraler Vektoren

Die Messung der optischen Dichte dient der Bestimmung der Vektorenkonzentration in einer Suspension. Da sowohl infektiöse als auch defekte AdV erfasst werden, ist lediglich eine quantitative Aussage, jedoch kein qualitativer Rückschluss auf die biologische Aktivität möglich. Die zu testende Viruspräparation wurde im Verhältnis 1:25 mit frisch angesetztem OD-Puffer verdünnt. Anschließend wurde die Probe für 10 min bei 56 °C mit 800 rpm zentrifugiert, um die Vektoren zu inaktivieren. Die optische Dichte wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. OD-Puffer diente als Referenz. Das Ergebnis berechnete sich nach der Formel: $OD_{260\text{ nm}} \times 25$ (Verdünnung) $\times 1,1 \times 10^{12}$. Die optische Dichte wird mit der Einheit opu/ml (opticle particle units) angegeben. Das Ergebnis wurde bei der Festlegung der Verdünnungsstufen des Plaque Assays berücksichtigt.

2.2.2.4 Bestimmung des Titers adenoviraler Vektoren

Der Plaque Assay ist die Standardmethode zur Bestimmung der Konzentration infektiöser Vektorenpartikel in einer Suspension. 911-Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 90 % kultiviert. Die Zellen wurden dann einmal mit Transduktionsmedium gewaschen, bevor in je mindestens drei Wells 1 ml einer Vektorensuspension definierter Verdünnung (10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10}) gegeben wurde. In eine Kontrollreihe wurde vektorenfreies Transduktionsmedium gegeben. Die 6-Well-Platten wurden für zwei Stunden bei 37 °C im CO₂-Inkubator gelagert, dabei regelmäßig manuell geschwenkt. Währenddessen wurde das Überschichtungsmedium vorbereitet. Dazu wurde Agarose in der Mikrowelle aufgekocht, um sie zu verflüssigen, und anschließend im Wasserbad auf 37 °C abgekühlt. Die Agarose wurde im Verhältnis 1:1 mit MEM 2x sowie 4 % Pferdeserum gemischt. Nach Ablauf der zwei Stunden wurde das Transduktionsmedium abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit 4 ml Überschichtungsmedium pro Well überschichtet. Nach ca. 15 min bei Raumtemperatur war das Überschichtungsmedium ausreichend fest, dass die 6-Well-Platten zur weiteren Inkubation für 12 Tage im CO₂-Inkubator gelagert werden konnten. Die verwendeten AdV

sind wie bereits beschrieben replikationsdefizient. Die Verpackungszelllinie 911 ist mit der fehlenden E1-Region stabil transfiziert. Wird sie mit einem infektiösen AdV transduziert, kann sich dieser in ihr replizieren. Infolge kommt es zur Zellyse, wodurch die replizierten Vektoren freigesetzt werden und angrenzende 911-Zellen infizieren können. Beim Plaque Assay bewirkt das Überschichtungsmedium, dass ausgehend von einem infektiösen Vektor nur benachbarte und keine weiter entfernten Zellen infiziert werden können. Durch die lokal begrenzte Zellyse entstehen Leerstellen im Zellrasen. Diese „Plaques“ können nach 12 Tagen lichtmikroskopisch beurteilt und ausgezählt werden. Der Titer der infektiösen Vektorenpartikel wird dann mit folgender Formel berechnet: Anzahl Plaques/Well x Verdünnungsstufe (Volumen⁻¹) = pfu/ml.

2.2.3 Präparation und Kultur muriner dendritischer Zellen

2.2.3.1 Präparation von Knochenmark

Die Isolation von DC-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von C3H/HeNCrI-Mäusen erfolgte nach Inaba et al. (Inaba et al., 1992). Dafür wurden 8 Wochen alte männliche C3H/HeNCrI Mäuse mit Isofluran betäubt und schließend durch cervikale Dislokation getötet. Die Hinterbeine wurden präpariert und in gekühltem DC-Medium gelagert. Die weitere Präparation erfolgt unter der Sterilwerkbank. Dort wurden die Knochen zunächst von Geweberesten gesäubert, Femur und Tibia getrennt. Die Knochen wurden anschließend für zwei Minuten in 70 % Ethanol desinfiziert und dann bis zur weiteren Bearbeitung in DC-Medium gelagert. Der Markraum wurde durch Abtrennen der Epiphysen eröffnet, sodass das Knochenmark mit Hilfe einer Injektionskanüle mit gekühltem DC-Medium ausgespült werden konnte. Das Knochenmark wurde über einem 50 ml Polypropylenröhrchen in einem sterilen Zellsieb der Porengröße 100 µm aufgefangen. Im Zellsieb verbliebenes Knochenmark wurde mit einem sterilen Stempel und durch Spülen in das Polypropylenröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 4 °C über 7 min mit 1300 rpm zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, das Zellpellet zur Entfernung von Erythrozyten in Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension erneut mit den genannten Einstellungen zentrifugiert, der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden nun in 10 ml PBS gewaschen. Während die

Zellsuspension erneut zentrifugiert wurde, erfolgte die Bestimmung der Zellzahl wie in 2.2.1.5 beschrieben. Dabei erfolgte stets eine Doppelbestimmung.

2.2.3.2 Separation dendritischer Zellen mittels Magnetic Activated Cell Sorting

Die weiteren Schritte dienten der Selektion der DC-Vorläuferzellen aus der Suspension medullärer Zellen. Dazu wurden das Zellpellet in 50 µl PBS resuspendiert und zusammen mit einer Antikörper-Lösung für 30 min auf Eis inkubiert. Diese Mischung von Ratte-anti-Maus-Antikörpern enthält solche Antikörper, die Oberflächenstrukturen von Lymphozyten markieren. Bei vorgegebener prozentualer Zusammensetzung wird die Menge durch die zuvor bestimmte Gesamtzellzahl festgelegt:

6 µl Antikörper-Mischung pro 1×10^6 Zellen, davon

40 % anti-LY6G

30 % anti-CD45R

10 % anti-MHC II

10 % anti-CD4

10 % anti-CD8

Anschließend wurden die Zellen nach Zugabe von PBS bei 4 °C für 5 min mit 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt. Das Zellpellet wurde nun mit 80 µl MACS-Puffer und 20 µl/ 10^7 Zellen Ziege-anti-Ratte-Microbeads resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Diese Antikörper binden spezifisch an die Fc-Region der primären Antikörper. Sie haben Microbeads, Magnetpartikel, gebunden. Die antikörpermarkierte Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert und in MACS-Puffer resuspendiert. Trennsäulen wurden in einem starken Magnetfeld platziert und mit MACS-Puffer äquilibriert. Die Zellsuspension wurde dann auf die Trennsäulen aufgebracht und der Durchlauf in Polypropylen-Röhrchen aufgefangen. Im Sinne einer negativen Selektion wurden dabei die antikörpermarkierten Zellen in den Trennsäulen zurückgehalten. Der Durchlauf mit den selektierten DC wurde in einem Polypropylen-Röhrchen vereinigt und unter den genannten Bedingungen zentrifugiert.

2.2.3.3 Kultur und Passage dendritischer Zellen

Das Zellpellet wurde in DC-Medium resuspendiert, anschließend erfolgte die Bestimmung

der Zellzahl wie unter 2.2.1.5 beschrieben. Die Zellsuspension wurde auf eine Zielkonzentration von $0,375 \times 10^6$ DC/ml DC-Medium verdünnt und mit $1,5 \mu\text{l/ml}$ (50 U/ml) mGM-CSF und $0,5 \mu\text{l/ml}$ (2,5 U/ml) mIL-4 versetzt. Die Zellen wurden dann zu je $0,75 \times 10^6$ Zellen/Well auf 6-Well-Platten ausplattiert und bei 37°C im CO_2 -Inkubator kultiviert. Nach 96 Stunden wurde das Medium erneuert. Dafür wurden $1,5 \text{ ml/Well}$ abgenommen, zentrifugiert und mit 2 ml frischem, mit mGM-CSF und m-IL-4 versetztem DC-Medium pro Well resuspendiert.

Zu solchen DC, die für die Transduktion mit Ad-mCD40L bzw. die Kontrollvakzinierung in der gleichen Untersuchung vorgesehen waren, wurde am fünften Tag nach der Präparation Tumorlysat von Hepa129-Zellen in einer Konzentration von $100 \mu\text{g/ml}$ Medium hinzugefügt. Dies diente dem Beladen der DC mit Tumorantigenen (Gonzalez-Carmona et al., 2008; Vogt et al., 2014).

2.2.4 Transduktion muriner dendritischer Zellen mit adenoviralen Vektoren

Die Transduktion der DC mit AdV erfolgte an Tag 6 nach der Zellpräparation. Dazu wurden die adhärennten DC mittels eines Zellschabers gelöst und zusammen mit dem Überstand in Polypropylen-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde bei 37°C für 5 min mit 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in Polypropylen-Röhrchen verwahrt. Das Zellpellet wurde in DC-Transduktionsmedium resuspendiert und anschließend die Zellzahl bestimmt. Erneut erfolgte eine Doppelbestimmung. Die Zellsuspension wurde dann mit DC-Transduktionsmedium auf eine Zielzellkonzentration von 1×10^6 Zellen/ $0,5 \text{ ml}$ aufgefüllt. Die AdV wurden entsprechend einer MOI von 100 hinzugefügt. Die infizierte Zellsuspension wurde zu je $0,5 \text{ ml}$ in Polypropylenröhrchen überführt und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Währenddessen wurde in 6-Well-Platten in jedes Well 1 ml neues DC-Medium mit Zusatz von mGM-CSF und mIL-4 und $0,5 \text{ ml}$ altes Medium vorgelegt. Nach zwei Stunden wurde die Zellsuspension abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Die transduzierten DC wurden in je $0,5 \text{ ml}$ altem Medium resuspendiert, in die vorbereiteten Wells überführt und anschließend für 48 Stunden bei 37°C im CO_2 -Inkubator inkubiert (Vogt et al., 2014).

2.2.5 Proteinbiologie

2.2.5.1 Herstellung von Tumorlysat

Lysat von Hepa129-Zellen wurde zum Antigentransfer in den Untersuchungen mit Ad-CD40L-transduzierten DC eingesetzt. Zur Herstellung von Tumorlysat wurden die Suspensionen der Hepa129-Zellen in 50 ml Polypropylen-Röhrchen überführt und bei 21 °C für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellpellets in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschprozess wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen erneut resuspendiert und zu je 5 ml auf Polypropylen-Röhrchen verteilt. Diese wurden dreimal in flüssigem Stickstoff gefroren und im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Durch diesen thermischen Stress wurden die Zellen zerstört. Die infolge entstandenen Zelllysate wurden bei 4 °C für 15 min mit 4000 rpm zentrifugiert. Der die Tumorproteine enthaltende Überstand wurde in Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.5.2 Proteinbestimmung des Tumorlysats

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Tumorlysate erfolgte mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits der Firma Thermo Fisher Scientific entsprechend den Herstellerangaben. Das Messprinzip basiert auf der Proteinbestimmung nach Lowry et al. (Lowry et al., 1951). Proteine bilden im alkalischen Milieu mit dem in dem Reagenz enthaltenen Kupfer einen hellblauen Komplex. Dabei werden Kupferkationen frei, die in einem zweiten Schritt mit Bicinchoninsäure (BCA) ein violettes Reaktionsprodukt bilden. Die Konzentration dieses violetten Komplexes wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen. Als Referenz dient eine Standardreihe mit vorgegebenen Konzentrationen von Albumin (Thermofisher, 03.02.2022).

2.2.6 Tierexperimentelle Methoden

Der Einfluss der Vakzinierung mit adenoviral transduzierten DC zusammen mit dem FOXP3-Inhibitor P60 wurde im s.c. und orthotopen murinen HCC-Modell untersucht. Die Tumoren wurden mit Hepa129- bzw. Hepa129 mAFP-Zellen in syngenen Mäusen des Stamms C3H/HeNCrI induziert. Zum Zeitpunkt der Tumorinduktion waren die Mäuse 10

Wochen alt. Aufgrund der einfacheren Handhabung erfolgten die ersten Untersuchungen zunächst im s.c. Tumormodell. Spätere Untersuchungen wurden im orthotopen Tumormodell durchgeführt, um den Einfluss des hepatischen Immunmilieus abzubilden. Die tierexperimentellen Untersuchungen zur Wirkung einer Monotherapie mit P60 auf etablierte s.c HCC wurden bereits vor Beginn dieser Arbeit durchgeführt. Die Auswertung dieser Vorarbeiten der Arbeitsgruppe sowie die praktische Durchführung und Auswertung aller weiteren tierexperimentellen Studien erfolgten im Rahmen dieser Dissertation.

Die Größe der Therapie- und Kontrollgruppen variieren in den einzelnen Untersuchungen. Ursächlich dafür ist, dass die Menge der für die Vakzinierung zur Verfügung stehenden DC nur angenähert werden konnte. Zum Zeitpunkt der Tumorinduktion konnte entsprechend noch keine Differenzierung der Gruppen erfolgen. Diese erfolgte erst am Tag der Vakzinierung, nach Bestimmung der Zellzahl vitaler transduzierter DC.

2.2.6.1 Vorbereitung der Hepa129 (AFP)-Zellen für die Tumorinduktion

Die Hepa129 (mAFP)-Zellen wurden aus den Zellkulturflaschen in Polypropylenröhrchen überführt und bei Raumtemperatur für 5 min mit 800 rpm zentrifugiert, anschließend vier Mal in RPMI gewaschen. Vor der letzten Zentrifugation erfolgte die Bestimmung der Zellzahl. Nach dem letzten Waschen wurden die Zellen auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/100 μ l bzw. $1 \times 10^5/50 \mu$ l in RPMI verdünnt.

2.2.6.2 Induktion subkutaner HCC und Monitoring

Für die Induktion s.c. HCC wurden die Mäuse zunächst narkotisiert. Dafür wurde den Tieren 100 μ l einer Mischung aus Xylacain 2 %, Ketamin und NaCl 0,9 % im Verhältnis 1:2:2 intraperitoneal (i.p.) appliziert. Nach Wirkeintritt wurde die rechte Flanke rasiert, bevor dort 1×10^6 Tumorzellen in 100 μ l RPMI1640 s.c. injiziert wurden. Die Mäuse wurden bis zum vollständigen Abklingen der Narkose engmaschig beobachtet.

Bereits nach wenigen Tagen konnten lokal s.c. Knoten getastet werden. Deren Größe wurde mit Hilfe einer Schiebleere alle 48 Stunden bestimmt. Dabei wurden Länge und Breite ausgemessen. Die Tumorgöße wurde dann mit folgender Formel berechnet: Länge (mm) x Breite (mm) x 0,52 = Tumolvolumen (mm^3).

2.2.6.3 Induktion orthotoper HCC und Monitoring

Für die Induktion orthotoper Tumoren wurden die Mäuse wie unter 2.2.6.1 beschrieben narkotisiert. Unter sterilen Kautelen erfolgte eine Längslaparotomie. Die Leber wurde mobilisiert, sodass der linke Leberlappen gut zugänglich war. 1×10^5 Hepa129- bzw. Hepa129 mAFP-Zellen gelöst in 50 μ l RPMI 1640 wurden vorsichtig subkapsulär in den linken Leberlappen appliziert. Blutungen an der Einstichstelle wurden durch lokale Kompression gestoppt. Peritoneum, Muskulatur und Haut wurden jeweils durch eine fortlaufende Naht mit resorbierenden Fäden verschlossen. Die Tiere wurden bis zum vollständigen Abklingen der Narkose beobachtet. Das Tumorwachstum wurde nach indirekten Kriterien beurteilt. Dabei wurden ein infolge von Aszites zunehmender Bauchumfang und exulzierend wachsende Tumoren dokumentiert. Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe war bereits bekannt, dass auch nach orthotoper Tumorzellapplikation bereits nach wenigen Tagen sonographisch darstellbare Tumoren entstehen (Schmitz et al., 2004).

2.2.6.4 Vakzinierung mit adenoviral transduzierten dendritischen Zellen

Achtundvierzig Stunden nach der adenoviralen Transduktion wurden die adhären DC mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturplatten gelöst und zusammen mit dem Überstand in Polypropylen-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur für 7 min mit 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in RPMI 1640 resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die transduzierten DC mit RPMI1640 auf eine Zielkonzentration von 1×10^6 Zellen/100 μ l verdünnt und auf Eis gelagert.

Die Mäuse wurden wie in 2.2.3.1 beschrieben narkotisiert. Nach lokaler Desinfektion wurden jedem Tier 1×10^6 adenoviral transduzierte DC in 100 μ l RPMI1640 s.c. in die linke Flanke injiziert. Die Mäuse wurden bis zum vollständigen Abklingen der Narkose beobachtet.

2.2.6.5 Applikation von P60

P60 wie auch das Kontrollpeptid P301 wurden vor der Applikation bei Raumtemperatur

aufgetaut. Die Applikation erfolgt i.p. durch Injektion im Bereich des Unterbauchs. Dabei wurde die Injektionsstelle täglich gewechselt. Mäuse mit s.c. HCC erhielten täglich 50 µg P60 bzw. P301, solche mit orthotopen HCC wurde täglich 100 µg P60 bzw. P301 injiziert.

2.2.7 Statistik

Für die deskriptive Statistik wurde der Mittelwert mit der Standardabweichung bzw. dem Standardfehler angegeben. Die statistische Signifikanz wurde durch einen ungepaarten T-Test überprüft. Ein P-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant erachtet. Die Überlebensraten wurden als Kaplan-Maier-Kurven dargestellt. Die statistische Auswertung und die Anfertigung der Graphiken erfolgten mit SPSS, GraphPad Prism 8.0 software package (GraphPad Prism, San Diego California, USA) und Origin.

3. Ergebnisse

3.1 Amplifikation und Aufreinigung adenoviraler Vektoren

Sämtliche verwendeten AdV (Ad-mAFP, Ad-CD40L, Ad-Mock und Ad-LacZ) waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden. Die Amplifikation der infektiösen, aber replikationsdefizienten Vektoren erfolgte in der Verpackungszelllinie 911 (s. 2.2.1.6.1). Die zytopathischen Effekte wurden lichtmikroskopisch beurteilt. Bereits nach 24 bis 48 Stunden konnte beobachtet werden, dass sich die 911 Zellen abrundeten und teilweise vom Boden der Zellkulturplatte lösten (Abbildung 1). Sobald mind. 90 % der Zellen diese zytopathischen Veränderungen zeigten, erfolgte die Zellernte.

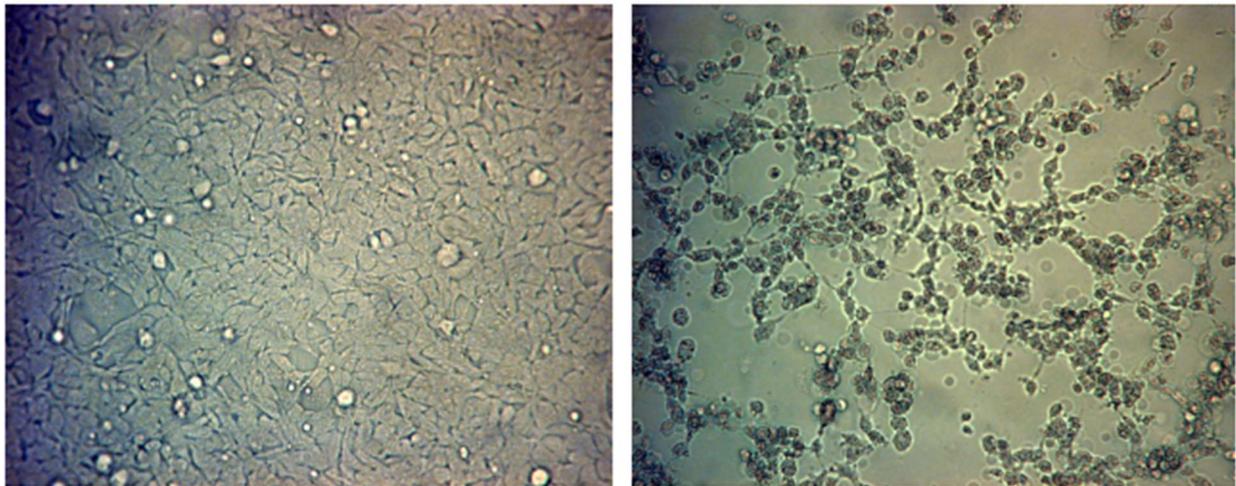


Abb. 1: 911 Zellen vor (links) und 72 Stunden nach der Transduktion mit einem adenoviralen Vektor (rechts). Bilder freundlich zur Verfügung gestellt von Dr. Annabelle Vogt.

Die Aufreinigung und Konzentration der AdV erfolgte in drei Stufen wie unter 2.2.2.2 beschrieben. Am Ende der ersten Ultrazentrifugation im diskontinuierlichen CsCl-Gradienten zeigten sich zwei gut abgrenzbare Banden sowie darüber eine dritte, diffuse Bande (Abbildung 2). Die untere Bande, unmittelbar an der Phasengrenze, entsprach den AdV mit einer Dichte von 1,3 g/ml. In der darüber liegenden Bande waren defekte Vektoren enthalten. Die diffuse Bande enthielt Zelltrümmer und andere Proteine.

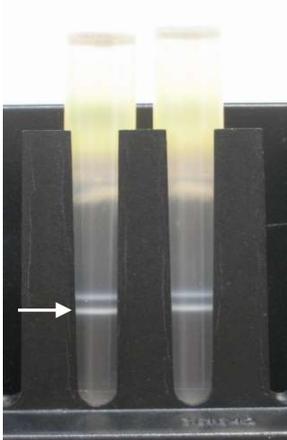


Abb. 2: Anreicherung adenoviraler Vektoren nach Ultrazentrifugation im diskontinuierlichen CsCl-Dichtegradienten. Nach der Ultrazentrifugation im diskontinuierlichen CsCl-Dichtegradienten reicherten sich die adenoviralen Vektoren an der Phasengrenze an (weißer Pfeil). Die gut abzugrenzende darüberliegende Bande enthielt defekte Vektoren, eine weitere diffuse Bande enthielt Zelltrümmer und andere Proteine.

Nach anschließender Ultrazentrifugation der untersten Bande, der AdV, im kontinuierlichen CsCl-Gradienten konnten wiederum eine distinkte Bande in der Mitte des Röhrchens sowie darüber eine diffuse Bande abgegrenzt werden (Abbildung 3). Die untere Bande entsprach dabei den konzentrierten AdV. Sie wurde mit einer Kanüle abgenommen, zur Entfernung des CsCl viermal dialysiert, bevor die konzentrierten und gereinigten AdV aliquotiert und bei -80 °C gelagert wurden.

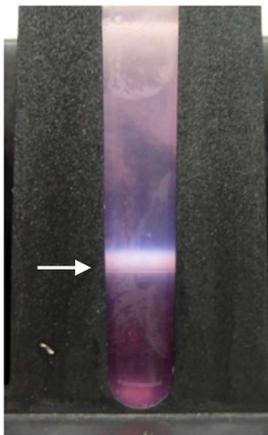


Abb. 3: Anreicherung adenoviralen Vektoren nach Ultrazentrifugation im kontinuierlichen CsCl-Gradienten. Nach der zweiten Ultrazentrifugation, die im kontinuierlichen CsCl-Dichtegradienten erfolgte, reicherten sich die konzentrierten und aufgereinigten adenoviralen Vektoren in der Mitte des Gradienten an (weißer Pfeil). Bild freundlich zur Verfügung gestellt von Dr. Annabelle Vogt.

3.2 Messung des Titers der Vektorenlösung

Jede Vektorenlösung wurde auf die Gesamtzahl AdV sowie auf die Anzahl infektiöser Vektorenpartikel untersucht. Die Bestimmung der Gesamtzahl AdV unabhängig von ihrer Funktionalität erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm wie unter 2.2.2.3 beschrieben. Die ermittelte OD wird in der Einheit opu/ml angegeben. Bestimmung der infektiösen Vektorenpartikel einer Suspension erfolgte durch einen Plaque Assay (s. 2.2.2.4). In 6-Well-Platten ausgesäte 911-Zellen wurden für zwei Stunden bei 37 °C mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen des zu testenden AdV transduziert, anschließend mit Überschichtungsmedium überschichtet und bei 37 °C im CO₂-Inkubator kultiviert. Nach 12 Tagen wurden die Plaques lichtmikroskopisch ausgezählt. Dabei wurde die Verdünnungsstufe als repräsentativ gewertet, in der die einzelnen Plaques noch gut

voneinander abgegrenzt waren. Abbildung 4 zeigt exemplarisch eine Plaque an Tag 12 nach adenoviraler Transduktion der 911-Zellen. Es wurden regelhaft mindestens drei Wells ausgezählt. Die mittlere Anzahl der Plaques multipliziert mit der Verdünnungsstufe ergab die Konzentration infektiöser Vektoren in der Einheit pfu/ml.

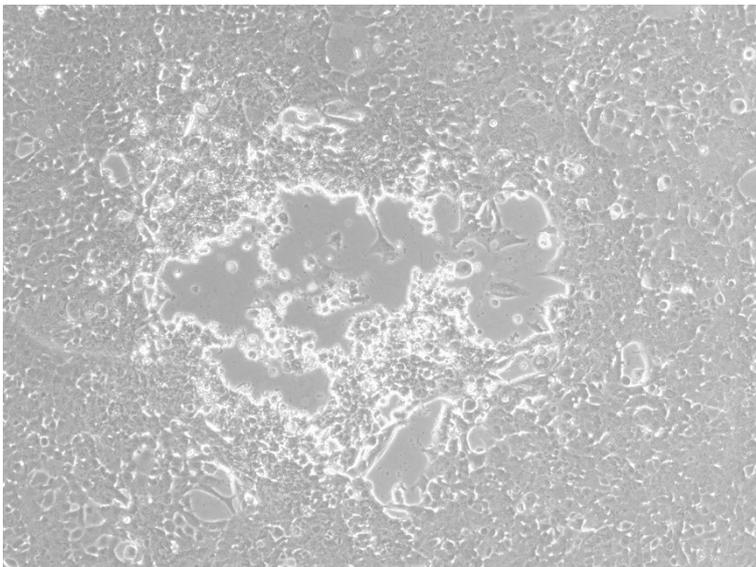


Abb. 4: Plaques Assay an Tag 12 nach Transduktion mit einem adenoviralen Vektor, Verdünnungsstufe 10^{-8} .

Die folgenden Tabellen 2 bis 10 geben die ermittelten Konzentrationen in opu/ml bzw. pfu/ml für die amplifizierten Vektoren wieder. Das Verhältnis von opu zu pfu stellt die Gesamtzahl aller Vektorenpartikel in Relation zu dem Anteil funktionaler, also infektiöser Vektoren. Ad-CD40L waren in der Arbeitsgruppe in ausreichendem Maß vorhanden, sodass auf eine weitere Amplifikation für die Transduktion der DC verzichtet wurde.

Tab. 2: Vektorenpartikel in opu/ml in verschiedenen Präparationen des Vektors Ad-mAFP nach Bestimmung der OD.

Vektorenpräparation	opu/ml
Ad-mAFP (Präparation 1)	$3,29 \times 10^{12}$
Ad-mAFP (Präparation 2)	$1,27 \times 10^{12}$
Ad-mAFP (Präparation 3)	$2,24 \times 10^{12}$

Tab. 3: Infektiöse Vektorenpartikel in pfu/ml in verschiedenen Präparationen des Vektors Ad-mAFP nach Auswertung des Plaque Assays.

Vektorenpräparation	Verdünnung	Plaques/Well						pfu/ml
Ad-mAFP (Präparation 1)	10^{-9}	17		24		19		$2,00 \times 10^{10}$
Ad-mAFP (Präparation 2)	10^{-9}	6	13	6	6	10	13	$9,00 \times 10^9$
Ad-mAFP (Präparation 3)	10^{-9}	22	26	22	17	20	14	$2,02 \times 10^{10}$

Tab. 4: Das Verhältnis der Gesamtzahl an Vektorenpartikel zur Anzahl infektiöser Vektorenpartikel in Suspensionen von Ad-mAFP.

Vektorenpräparation	Verhältnis pfu/ml zu opu/ml
Ad-mAFP (Präparation 1)	164,50
Ad-mAFP (Präparation 2)	141,11
Ad-mAFP (Präparation 3)	110,89

Tab. 5: Vektorenpartikel in opu/ml in verschiedenen Präparationen des Vektors Ad-LacZ nach Bestimmung der OD.

Vektorenpräparation	opu/ml
Ad-LacZ (Präparation 1)	$3,03 \times 10^{12}$
Ad-LacZ (Präparation 2)	$2,39 \times 10^{12}$
Ad-LacZ (Präparation 3)	$3,91 \times 10^{12}$

Tab. 6: Infektiöse Vektorenpartikel in pfu/ml in verschiedenen Präparationen des Vektors Ad-LacZ nach Auswertung des Plaque Assays.

Vektorenpräparation	Verdünnung	Plaques/well						pfu/ml
Ad-LacZ (Präparation 1)	10^{-9}	46	38	40	36	44	29	$3,88 \times 10^{10}$
Ad-LacZ (Präparation 2)	10^{-9}	31	27	28	31	26	31	$2,90 \times 10^{10}$
Ad-LacZ (Präparation 2)	10^{-9}	53		52		47		$5,07 \times 10^{10}$

Tab. 7: Das Verhältnis der Gesamtzahl an Vektorenpartikel zur Anzahl infektiöser Vektorenpartikel einer Suspension von Ad-LacZ.

Vektorenpräparation	Verhältnis pfu/ml zu opu/ml
Ad-LacZ (Präparation 1)	78,09
Ad-LacZ (Präparation 2)	82,41
Ad-LacZ (Präparation 2)	77,12

Tab. 8: Vektorenpartikel in opu/ml in verschiedenen Präparationen des Vektors Ad-Mock nach Bestimmung der OD.

Vektorenpräparation	opu/ml
Ad-Mock (Präparation 1)	$3,95 \times 10^{10}$
Ad-Mock (Präparation 2)	$9,99 \times 10^{11}$

Tab. 9: Infektiöse Vektorenpartikel in pfu/ml in verschiedenen Präparationen des Vektors Ad-Mock nach Auswertung des Plaque Assays.

Vektorenpräparation	Verdünnung	Plaques/well						pfu/ml
Ad-Mock (Präparation 1)	10^{-8}	62		45		44		$5,03 \times 10^9$
	10^{-9}	2		4		3		$3,00 \times 10^9$
Ad-Mock (Präparation 2)	10^{-9}	6	4	6	3	7	5	$5,17 \times 10^9$
	10^{-8}	38		32		32		$3,40 \times 10^9$

Tab. 10: Das Verhältnis der Gesamtzahl an Vektorenpartikel zur Anzahl infektiöser Vektorenpartikel einer Suspension des Leervektors Ad-Mock.

Vektorenpräparation	Verhältnis pfu/ml zu opu/ml
Ad-Mock (Präparation 1)	9,85 (angegeben für die gemittelte pfu/ml = $4,01 \times 10^9$)
Ad-Mock (Präparation 2)	232,87 (angegeben für die gemittelte pfu/ml = $4,29 \times 10^9$)

3.3 Herstellung von Tumorlysat

Für die tierexperimentellen Untersuchungen mit Ad-CD40L transduzierten DC wurden die DC fünf Tage nach der Präparation mit Tumorantigenen beladen. Dafür wurden sie mit 100 µg Tumorlysat aus Hepa129-Zellen pro ml Medium kultiviert. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass DC, die auf diese Weise mit TAA gepulst wurden, eine spezifische T-Zellantwort in vitro vermitteln können (Gonzalez-Carmona et al., 2008; Vogt et al., 2014). Das Tumorlysat wurde wie unter 2.2.5.1 beschrieben durch drei Einfrier-

Auftau-Zyklen hergestellt. Die Proteinkonzentration des Zelllysats wurde anschließend mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits bestimmt (s 2.2.5.2). Der durchschnittliche Proteingehalt der Tumorslysate betrug $6,61 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($\pm 0,78$, s. Tabelle 11).

Tab. 11: Proteinkonzentration verschiedener Lysate von Hepa129-Zellen nach photometrischer Bestimmung.

Lysat Hepa129-Zellen	Proteinkonzentration
Proteinlysate 1 Hepa129	$7,74 \mu\text{g}/\mu\text{l}$
Proteinlysate 2 Hepa129	$5,58 \mu\text{g}/\mu\text{l}$
Proteinlysate 3 Hepa129	$6,79 \mu\text{g}/\mu\text{l}$
Proteinlysate 4 Hepa129	$6,32 \mu\text{g}/\mu\text{l}$
Durchschnitt	$6,61 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($\pm 0,78$)

3.3 Herstellung adenoviral transduzierter dendritischer Zellen

3.3.1 Gewinnung und Kultivierung muriner dendritischer Zellen

Die Präparation der DC-Vorläuferzellen erfolgte aus dem Knochenmark ca. 8 Wochen alter C3H/HeNCrI Mäuse nach Inaba et al. wie unter 2.2.3.1 beschrieben (Inaba et al., 1992). In Abhängigkeit von der angestrebten Größe der Therapiegruppen und der zu erwartenden Zellreduktion nach der Transduktion (s. 3.3.2.1) wurde das Knochenmark aus Femora und Tibiae von vier bis fünf Tieren präpariert. Tabelle 12 fasst die durchschnittlichen Zellzahlen nach der Präparation und Aufreinigung sowie der Kultivierung zusammen. Durchschnittlich konnten nach Erythrozytenlyse und negativer Selektion im Magnetfeld $20,76 \times 10^6$ DC-Vorläuferzellen/Maus ($\pm 3,98 \times 10^6$) kultiviert werden. In den sechs Tagen bis zur Transduktion proliferierten die Zellen in Anwesenheit von mGM-CSF und mIL-4 um den Faktor 2,3 ($\pm 0,7$), sodass durchschnittlich insgesamt $215,08 \times 10^6$ ($\pm 82,38 \times 10^6$) bzw. pro präparierter Maus $48,34 \times 10^6$ ($\pm 19,78 \times 10^6$) DC zur Transduktion zur Verfügung standen.

Tab. 12: Anzahl der medullären Zellen nach Depletion von Erythrozyten, der DC-Vorläuferzellen nach negativer Selektion sowie der DC nach Kultivierung über 6 Tage in Anwesenheit von mIL-4 und mGM-CSF. Angegeben sind jeweils die durchschnittlichen Zellzahlen pro Maus (Gesamtzahl Mäuse n = 54).

Medulläre Zellen nach Erythrozytenlyse	25,97 x 10 ⁶ (± 5,09 x 10 ⁶)
DC-Vorläuferzellen nach MACS-Separation	20,76 x 10 ⁶ (± 3,98 x 10 ⁶)
DC vor Transduktion	48,34 x 10 ⁶ (± 19,78 x 10 ⁶)

3.3.2 Transduktion dendritischer Zellen mit adenoviralen Vektoren

Die Transduktion der DC erfolgte sechs Tage nach deren Präparation wie unter 2.2.4 beschrieben. Die ausgereiften DC wurden aus den 6-Well-Platten in Polypropylenröhrchen überführt, gewaschen und anschließend mit einer MOI von 100 mit den entsprechenden AdV für zwei Stunden bei 37 °C transduziert. Anschließend wurden sie bis zur Injektion für zwei weitere Tage kultiviert.

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde die Ausreifung der DC nach erfolgter adenoviraler Transduktion beschrieben. Dabei war nach einer Transduktion mit Ad-CD40L die Expression von CD80 und CD86 an der Oberfläche der DC signifikant gesteigert (Gonzalez-Carmona et al., 2008). Ebenso wurde die sichere Transgen-Expression der DC nach adenoviraler Transduktion in Vorarbeiten nachgewiesen (Gonzalez-Carmona et al., 2008; Vogt et al., 2014). Auf eine erneute Untersuchung der Oberflächenmerkmale und der Transgen-Expression wurde daher in der aktuellen Arbeit verzichtet. Als indirektes Zeichen der Transgenexpression konnte bei den mit Ad-mCD40L transduzierten DC bereits 24 Stunden nach der Transduktion eine typische Agglutination zu Clustern beobachtet werden (Abbildung 5). Die mit Ad-mAFP, Ad-Mock oder Ad-LacZ transduzierten DC zeigten hingegen unverändert das typische überwiegend adhärente Wachstum in Form eines Zellrasens. Ursächlich für die Zellagglutination ist die CD40/CD40L-Interaktion, da die DC nach erfolgter Transduktion sowohl Rezeptor als auch Ligand exprimieren (Hillebrand et al., 2019).

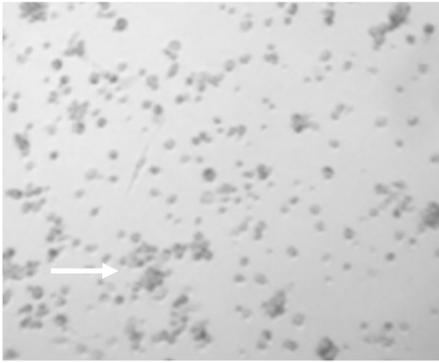


Abb. 5: DC zwei Tage nach der Transduktion mit Ad-mCD40L unter dem Lichtmikroskop. Die Zellen zeigen neben dem typischen teilweise adhärennten, teilweise suspendierten Wachstum eine Cluster-Bildung (exemplarisch weißer Pfeil). Diese ist auf die CD40/CD40L-Bindung zwischen den DC zurückzuführen. (modifiziert nach Gonzalez-Carmona et al., 2008)

3.3.2.1 Vitalitätskontrolle adenoviral transduzierter dendritischer Zellen

Aus unveröffentlichten Vorarbeiten der Arbeitsgruppe war bekannt, dass die Transgenexpression mit Steigerung der MOI zunimmt. Jedoch nimmt die Anzahl vitaler DC nach der Transduktion ab, wenn eine höhere MOI gewählt wird. Auf Grundlage dieser Vorarbeiten wurde eine MOI von 100 gewählt. Bei der Zählung der vitalen DC zwei Tage nach der Transduktion, unmittelbar vor der Applikation konnte die Reduktion vitaler Zellen nachvollzogen werden. Dabei wurden Unterschiede in Abhängigkeit vom verwendeten Vektor beobachtet (s. Tabelle 13). Nach Transduktion mit den AdV für mAFP, LacZ bzw. dem Leervektor Ad-Mock betrug die durchschnittliche Reduktion vitaler Zellen ca. 80 %. Die Transduktion mit Ad-CD40L bedingte eine geringere Reduktion vitaler DC. In der Vitalitätskontrolle vor Injektion der Zellen betrug der Anteil vitaler Zellen durchschnittlich noch 31,57 %.

Tab. 13: Reduktion vitaler DC nach adenoviraler Transduktion in Abhängigkeit vom verwendeten adenoviralen Vektor. Angegeben sind die durchschnittlichen Zellzahlen vor und nach der Transduktion zusammen mit der Standardabweichung sowie die relative Zahl vitaler Zellen nach der Transduktion in Prozent (Anzahl der Transduktionen: Ad-mAFP n = 10, Ad-CD40L n = 2, Ad-Mock n = 12, Ad-LacZ n = 2).

Adenoviraler Vektor	Vitale DC vor der Transduktion absolut	Vitale DC nach der Transduktion absolut	Vitale DC nach der Transduktion relativ
Ad-mAFP	109,35 x 10 ⁶ (± 47,69)	19,72 x 10 ⁶ (± 9,00)	18,28 %
Ad-CD40L	194,00 x 10 ⁶ (± 46,00)	62,97 x 10 ⁶ (± 21,76)	31,57 %
Ad-Mock	77,75 x 10 ⁶ (± 31,61)	15,15 x 10 ⁶ (± 6,04)	19,86 %
Ad-LacZ	60,50 x 10 ⁶ (± 13,50)	11,70 x 10 ⁶ (± 1,80)	20,00 %

3.4 Tierexperimentelle Ergebnisse

3.4.1 Tumormodelle

3.4.1.1 Subkutaner Tumormodell

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass durch s.c. Injektion von Hepa129-Zellen bei Tieren des syngenen Mausstamms C3H/HeNCrI zuverlässig Tumoren induziert werden können (Gonzalez-Carmona et al., 2008; Vogt et al., 2014). Auch in den Untersuchungen dieser Arbeit entwickelten alle Tiere bereits wenige Tage nach der Tumorinduktion palpable s.c. Knoten. Die Tiere wurden bei einer Tumorgroße von 1500-2000 mm³ getötet. Das durchschnittliche Überleben unbehandelter Tiere nach Induktion s.c. Tumoren betrug 19,78 Tage (± 4,24, n =23).

3.4.1.2 Orthotopes Tumormodell

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnte auch durch die Injektion von Hepa129 (mAFP)-Zellen in den linken Leberlappen zuverlässig ein Tumorwachstum induziert werden (Schmitz et al., 2004). Abbildung 6 zeigt einen durch Inokulation von Hepa129 mAFP-Zellen in den linken Leberlappen induzierten Tumor 16 Tage nach der Induktion. Ein direktes Monitoring des Tumorwachstums war nicht möglich. Jedoch konnten eine Bauchumfangszunahme der Tiere aufgrund von

malignem Aszites und im Verlauf teilweise ein exophytisches Tumorstadium beobachtet werden. Moribunde Tiere wurden getötet. Das durchschnittliche Überleben der unbehandelten Tiere nach Induktion orthotoper Tumoren mit Hepa129-Zellen bzw. Hepa129 mAFP-Zellen betrug 20,71 Tage ($\pm 5,48$, $n = 14$).



Abb. 6: Orthotoper Tumor im linken Leberlappen 16 Tage nach Tumorinduktion durch Injektion von 1×10^5 Hepa129 mAFP-Zellen.

3.4.2 Einfluss einer Therapie mit P60 auf Tumorstadium und Überleben im subkutanen und orthotopen Tumormodell

Der Einfluss einer Monotherapie mit dem FOXP3-Inhibitorpeptid P60 auf das Tumorstadium und Überleben wurde zunächst im s.c., anschließend im orthotopen Tumormodell untersucht. Die Durchführung der Untersuchungen im s.c. Modell wurden vor Beginn dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe ausgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse dieser Untersuchungen war Teil der hier vorgestellten Arbeit. Die Durchführung und Auswertung aller weiteren Untersuchungen, eingeschlossen der Wirkung von P60 auf das Wachstum orthotoper HCC, erfolgten im Rahmen der hier dargestellten Arbeit.

Für die Untersuchung der Wirkung von P60 auf das Wachstum s.c. Tumoren wurden Therapiebeginn und -dauer variiert. Die erste Behandlungsgruppe (frühes Tumorstadium) erhielt P60 täglich für 10 Tage ab der Tumorinduktion. Die Behandlung mit P60 der beiden weiteren Gruppen wurde bei einer Tumorstadiumgröße von $52,3 \text{ mm}^3$ ($\pm 44,19 \text{ mm}^3$, intermediäres Tumorstadium) bzw. $112,6 \text{ mm}^3$ ($\pm 75,53 \text{ mm}^3$, fortgeschrittenes Tumorstadium) begonnen und bis zum Versterben der Tiere fortgeführt. Durch keines der Therapieprotokolle konnte ein im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe signifikant

verlängertes Überleben erzielt werden (Abbildung 7). Tumoren von Mäusen, die erst ab einem fortgeschrittenem Tumorwachstum therapiert wurden, waren an Tag 12 nach Tumorinduktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe kleiner, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant ($p = 0,13$; Abbildung 8).

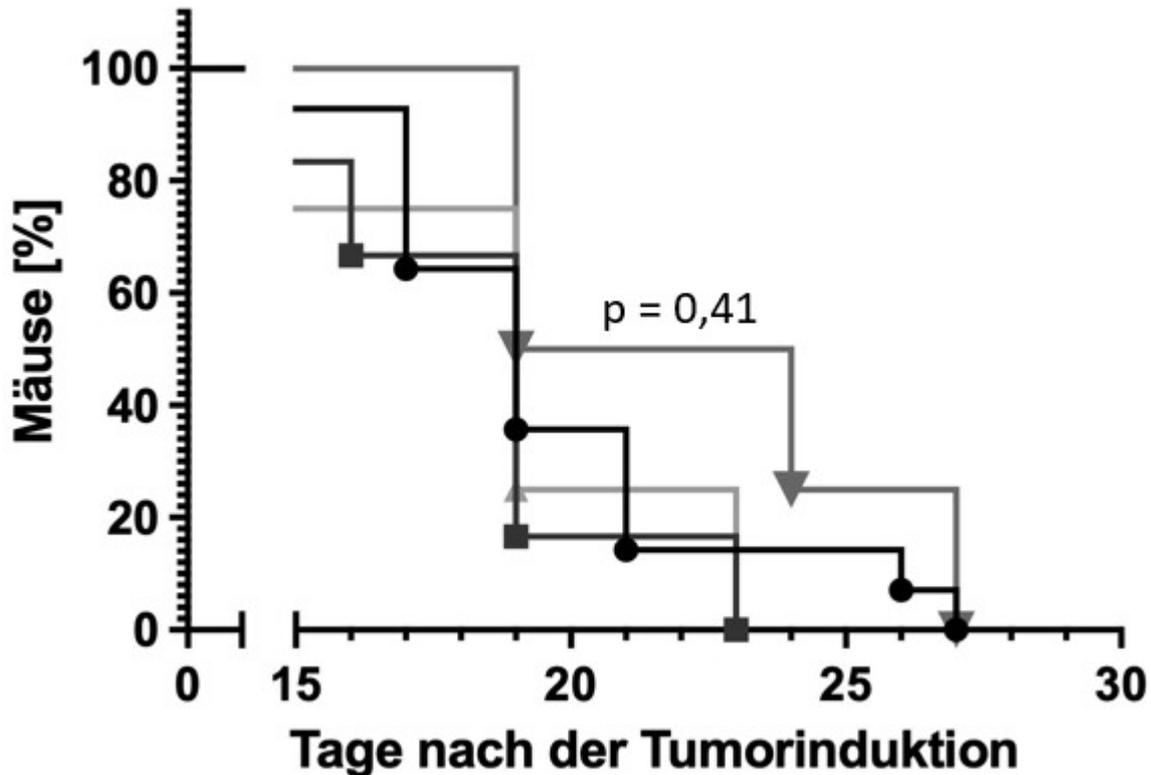


Abb. 7: Überleben von Mäusen nach s.c. Tumorinduktion durch Inokulation von Hepa129-Zellen in die rechte Flanke unter Therapie mit P60 dargestellt als Kaplan-Meier-Kurve. Therapiebeginn und -dauer wurden variiert: Die tägliche i.p. Applikation von P60 erfolgte über 10 Tage ab dem Tag der Tumorinduktion (frühes Tumorstadium, Quadrat, $n = 6$) oder ab einer Tumorgroße von $52,3 \text{ mm}^3 (\pm 44,19 \text{ mm}^3)$, intermediäres Tumorstadium, aufrechtes Dreieck, $n = 4$) bzw. $112,6 \text{ mm}^3 (\pm 75,53 \text{ mm}^3)$, fortgeschrittenes Tumorstadium, umgedrehtes Dreieck, $n = 4$) bis zum Versterben der Tiere. Die Kontrollgruppe erhielt keine Therapie (Kreis, $n = 12$). Das Überleben unter Therapie mit P301 wird aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht abgebildet. Unter keinem der Therapieprotokolle konnte ein im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe verlängertes Überleben beobachtet werden.

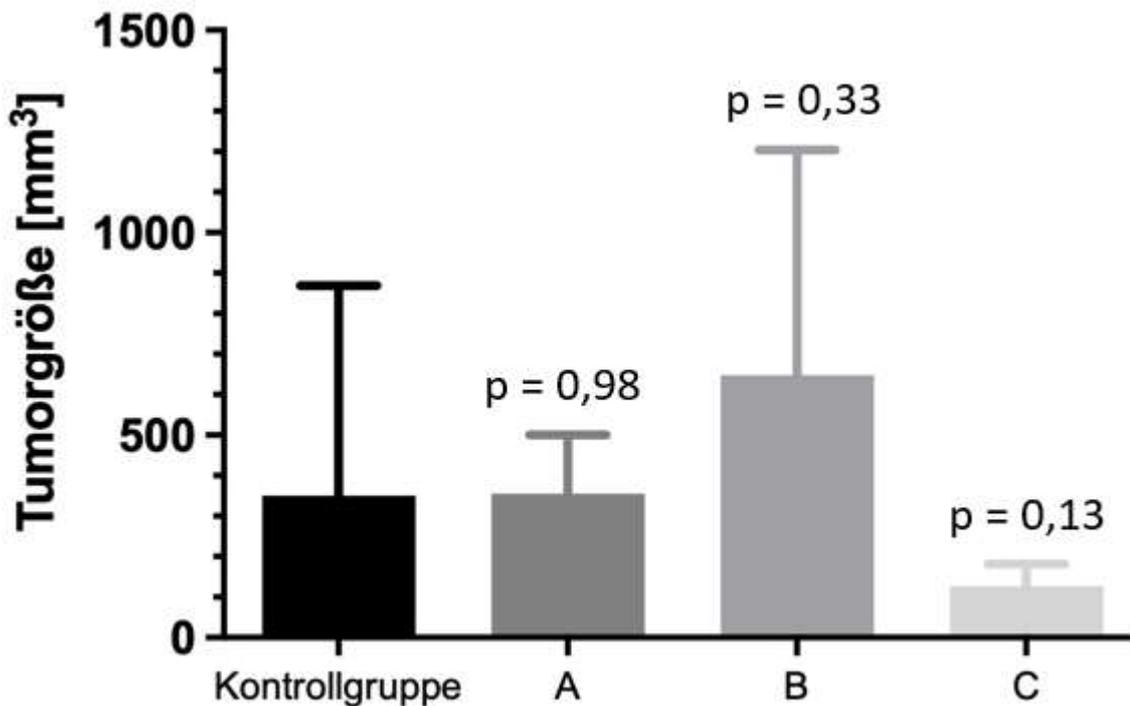


Abb. 8: Größe s.c. Tumoren an Tag 13 nach der Induktion durch Inokulation von Hepa129-Zellen in die rechte Flanke unter Therapie mit P60. Darstellung als Mittelwert mit SEM. Die tägliche i.p. Applikation von P60 erfolgte über zehn Tage ab dem Tag der Tumorinduktion (A, frühes Tumorstadium) oder ab einer Tumorgöße von 52,3 mm³ (\pm 44,19 mm³, B, intermediäres Tumorstadium) bzw. 112,6 mm³ (\pm 75,53 mm³, C, fortgeschrittenes Tumorstadium) bis zum Versterben der Tiere. Die Kontrollgruppe erhielt keine Therapie. Mäuse, die erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium behandelt wurden, zeigten an Tag 12 tendenziell kleinere Tumoren. Dieser Vorteil war gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe jedoch nicht signifikant ($p = 0,13$).

Aufgrund der besonderen immunologischen Rolle der Leber wurde die Untersuchung im orthotopen Tumormodell wiederholt. Begründet mit dem schnelleren Tumorprogress der orthotopen Tumore wurde die Therapie trotz des Trends in den Untersuchungen im s.c. Modell bereits am dritten Tag nach der Tumorinduktion begonnen und bis zum Versterben der Tiere fortgeführt. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten keine Therapie. Erneut konnte kein Vorteil der Therapiegruppe im Hinblick auf das Überleben beobachtet werden (medianes Überleben 22 bzw. 21 Tage nach Tumorinduktion, Abbildung 9).

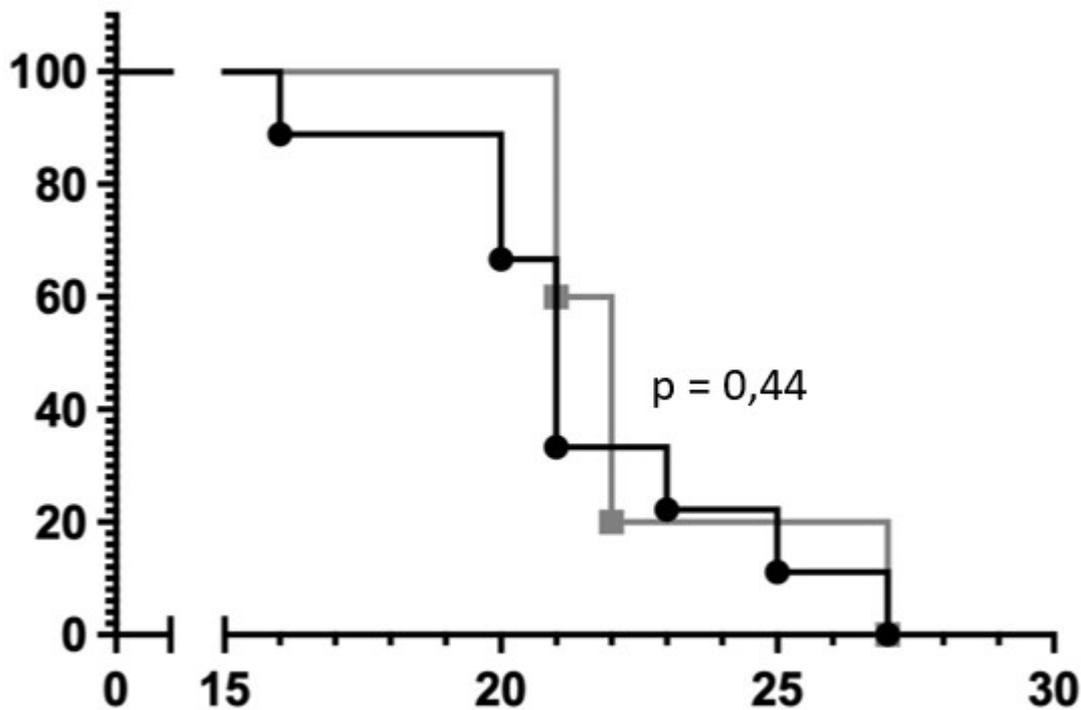


Abb. 9: Überleben von Mäusen nach orthotoper Tumorinduktion durch Inokulation von Hepa129 mAFP-Zellen in den linken Leberlappen unter Therapie mit P60 dargestellt als Kaplan-Meier-Kurve. Die Tiere der Behandlungsgruppe wurden ab dem dritten Tag nach der Tumorinduktion bis zum Versterben täglich mit P60 behandelt (Quadrat, n = 5). Die Kontrollgruppe erhielt keine Therapie (n = 7). Unter Monotherapie mit P60 konnte kein positiver Einfluss auf das Überleben beobachtet werden (medianes Überleben 22 bzw. 21 Tage nach der Tumorinduktion).

3.4.3 Einfluss einer Therapie mit Ad-mAFP transduzierten dendritischen Zellen und P60 auf das Tumorstadium und das Überleben im subkutanen Tumormodell

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass Ad-mAFP transduzierte DC eine antigenspezifische Immunantwort *in vitro* induzieren können und das Tumorstadium s.c. HCC im murinen HCC-Modell bremsen (González-Carmona et al., 2006; Vogt et al., 2021). Im HCC korreliert der Tumorstadium mit einem Anstieg der Treg (Fu et al., 2007; Kobayashi et al., 2007; Shen et al., 2010), dies wurde auch in bislang unveröffentlichten Vorarbeiten der Arbeitsgruppe für das genutzte Tumormodell belegt. Zudem wurde in früheren Untersuchungen ein Anstieg der Treg infolge DC-basierter Therapien beschrieben (Vogt et al., 2014). Daher sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob eine Therapie mit P60 das Ansprechen auf eine Vakzinierung mit Ad-mAFP

transduzierten DC steigern kann. Die Behandlungsgruppe erhielt zwei Vakzinierungen mit Ad-mAFP transduzierten DC sowie tägliche i.p. Gaben von 50 µg P60. Die erste Vakzinierung erfolgte bei einer Tumorgröße von $110 \text{ mm}^3 \pm 64 \text{ mm}^3$, die zweite Vakzinierung fünf Tage später. Die Therapie mit P60 wurde drei Tage nach der Tumorinduktion begonnen und bis zum Versterben der Tiere fortgeführt. Mit Ad-LacZ transduzierte DC wurden als Kontroll-Vakzin verwendet. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten keine Therapie.

Die Kombinationstherapie aus mAFP-exprimierenden DC und P60 bewirkte ein signifikant verlängertes Überleben im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ($p = 0,01$; Abbildung 10). Zudem wurde ein signifikant verlangsamtes Tumorwachstum verglichen mit der Kontrollgruppe beobachtet. Die Tumoren der Therapiegruppe waren am Tag 13 nach Tumorinduktion durchschnittlich $92,19 \text{ mm}^3 \pm 47,86 \text{ mm}^3$ groß, die Kontrolltumoren $191,20 \text{ mm}^3 \pm 118,72 \text{ mm}^3$ ($p = 0,03$, Abbildung 11). Der Effekt einer Therapie mit Ad-LacZ transduzierten DC und P60 auf das Tumorwachstum verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe war hingegen nicht signifikant ($p = 0,11$).

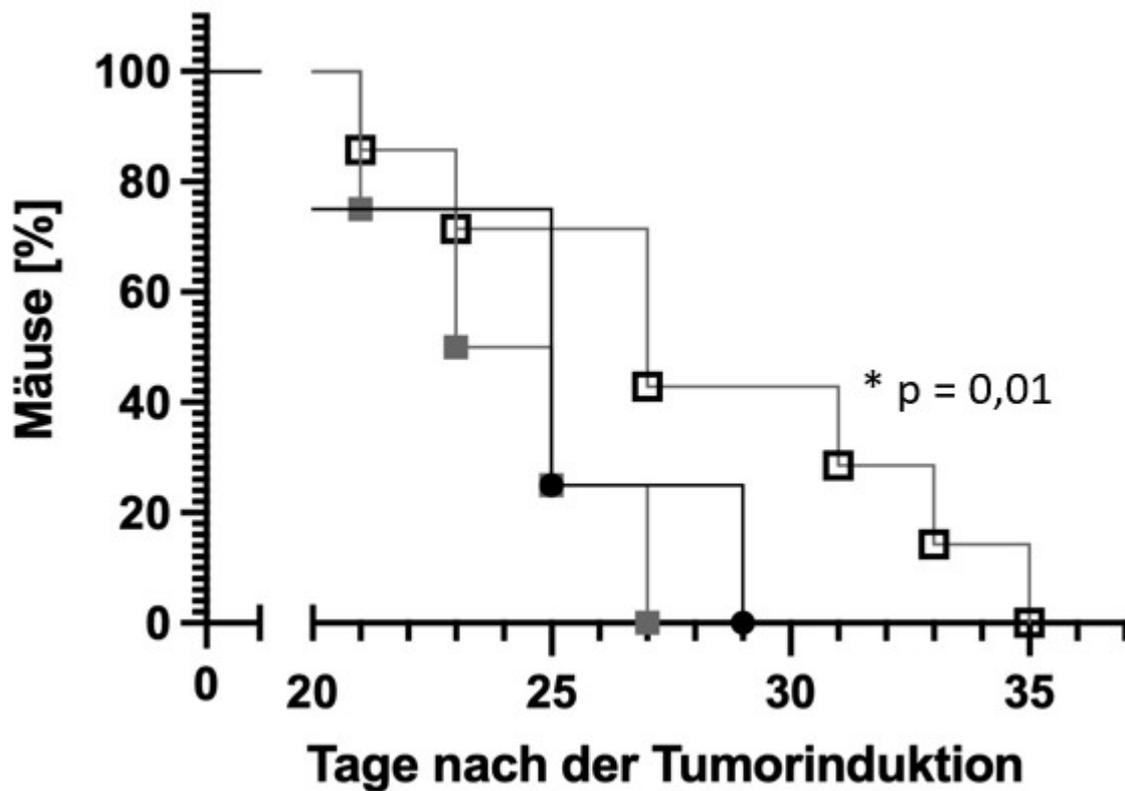


Abb. 10: Überleben von Mäusen nach s.c. Tumorinduktion durch Inokulation von Hepa129 mAFP-Zellen in die rechte Flanke unter Therapie mit Ad-mAFP transduzierten DC und P60. Darstellung als Kaplan-Meier-Kurve. Tiere der Therapiegruppe (leeres Quadrat, $n = 7$) erhielten zwei Vakzinierungen mit Ad-mAFP transduzierten DC, an Tag 5 und Tag 6 nach der Tumorinduktion, sowie tägliche i.p. Injektionen von P60 ab Tag 3 nach der Tumorinduktion bis zum Versterben. Eine Kontrollgruppe wurde mit Ad-LacZ transduzierten DC und P60 behandelt (gefülltes Quadrat, $n = 4$), eine weitere Kontrollgruppe erhielt keine Therapie (Kreis, $n = 4$). Tiere, die mit einer Kombination aus mAFP-exprimierenden DC und P60 behandelt wurden, überlebten signifikant länger als die unbehandelte Kontrollgruppe ($p = 0,01$).

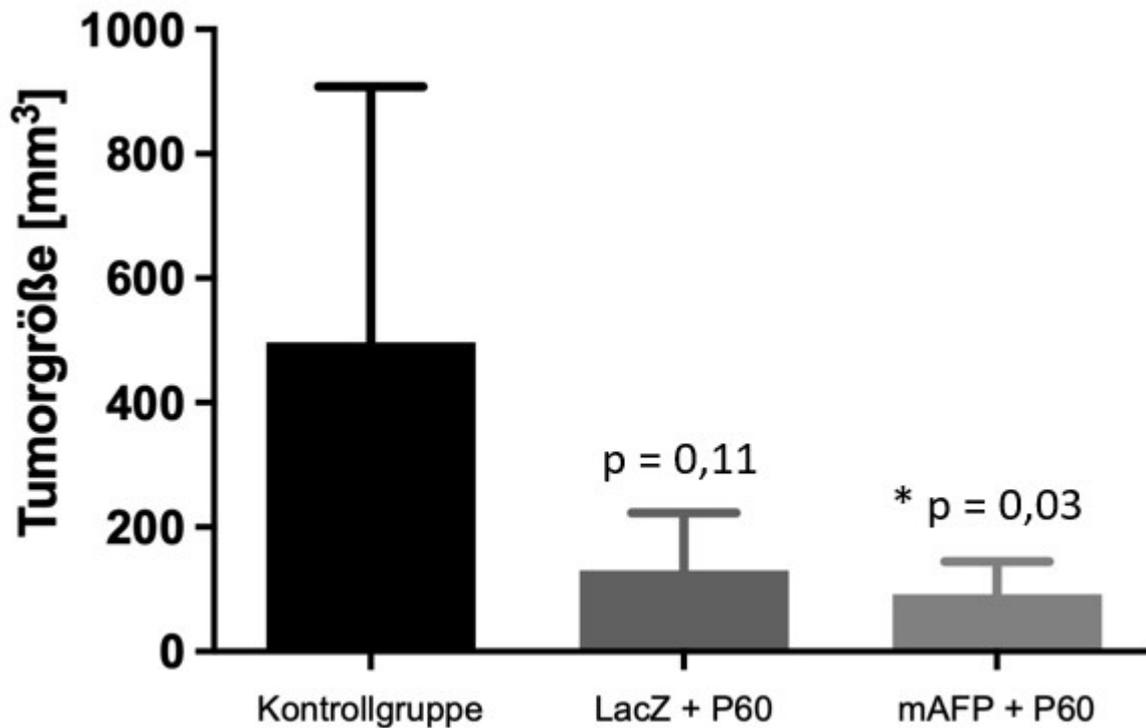


Abb.11: Größe s.c. Tumoren an Tag 13 nach Tumorinduktion durch Inokulation von Hepa129 mAFP-Zellen in die rechte Flanke nach Behandlungsgruppe dargestellt als Mittelwert + SEM. Tiere, die mit Ad-mAFP bzw. Ad-LacZ transduzierten DC und P60 behandelt wurden, zeigten durchschnittlich deutlich kleinere Tumoren als die Mäuse der unbehandelten Kontrollgruppe. Jedoch war der Vorteil nur für die Kombinationstherapie aus mit Ad-mAFP transduzierten DC und P60 signifikant ($p = 0,03$).

3.4.4 Einfluss einer Therapie mit Ad-mAFP transduzierten dendritischen Zellen und P60 auf das Überleben im orthotopen Tumormodell

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die kombinierte Therapie mit Ad-mAFP transduzierten DC und P60 auch im orthotopen HCC-Modell den Tumorprogress verlangsamt. Aufgrund des schnellen orthotopen Tumorwachstums wurden die Vakzinierungen mit mAFP-exprimierenden DC bereits am dritten und sechsten Tag nach der Tumorinduktion durchgeführt. Die täglichen i.p. Gaben von 100 µg P60 wurden am Tag der ersten Vakzinierung begonnen und bis zum Versterben der Tiere fortgeführt. Ad-Mock diente als Kontrollvektor, P301 als Kontrollpeptid.

Erneut wurde für die Therapiegruppe ein signifikant verlängertes Überleben gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe beobachtet ($p = 0,02$; Abbildung 12). Die Mäuse, die mit Ad-mAFP transduzierten DC und P301 behandelt wurden überlebten hingegen nicht

länger als die Tiere der Kontrollgruppe (medianes Überleben 22 vs. 21). Interessanterweise überlebten auch die Tiere, die das Kontrollvakzin zusammen mit P60 erhalten hatten, länger. Der Vorteil war jedoch statistisch nicht signifikant ($p = 0,06$).

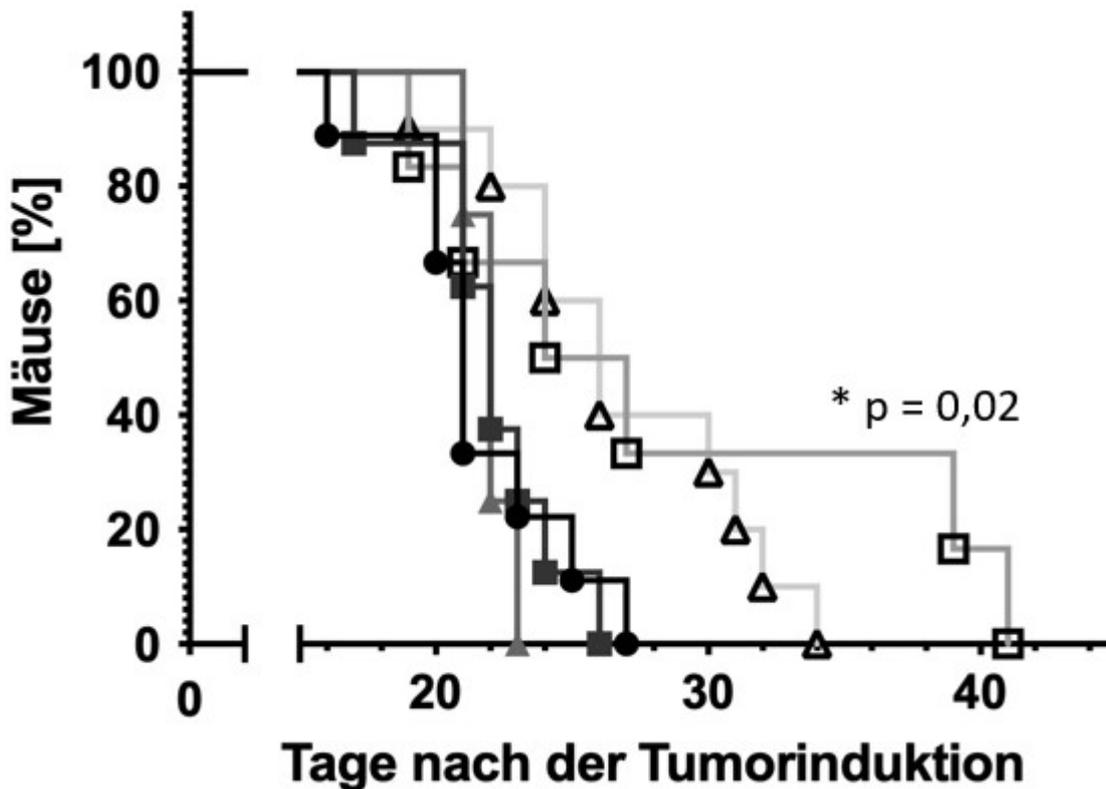


Abb. 12: Überleben von Mäusen nach orthotoper Tumorinduktion durch Inokulation von Hepa129 mAFP-Zellen in den linken Leberlappen unter Therapie mit adenoviral transduzierten DC und P60. Darstellung als Kaplan-Meier-Kurve. Die Vakzinierungen erfolgten an den Tagen 3 und 6 nach der Tumorinduktion, ab dem Tag der ersten Vakzinierung erhielten die Mäuse zudem täglich P60 bzw. das Kontrollpeptid P301 i.p. Fünf Behandlungs- bzw. Kontrollgruppen wurden gebildet: Ad-mAFP-DC + P60 (leeres Dreieck, $n = 10$), Ad-Mock-DC + P60 (leeres Quadrat, $n = 4$), Ad-mAFP-DC + P301 (gefülltes Dreieck, $n = 4$), Ad-Mock-DC + P301 (gefülltes Quadrat, $n = 5$), unbehandelte Kontrollgruppe (Kreis, $n = 7$). Eine additive Therapie mit P60 führte unabhängig vom Vakzin zu einem gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe verlängerten Überleben. Der Effekt war jedoch nur für die Therapie mit Ad-mAFP transduzierten DC statistisch signifikant ($p = 0,02$ für Ad-mAFP, $p = 0,06$ für Ad-Mock).

3.4.5 Einfluss einer präventiven Therapie mit Ad-mAFP transduzierten DC und P60 auf das Überleben im orthotopen Tumormodell

Die Mehrzahl der HCC entsteht auf dem Boden einer Leberzirrhose (Akinyemiju et al.,

2017). Tumorpräventive Therapieansätze sind daher für das HCC von besonderer Bedeutung. Deswegen sollte auch der Einfluss einer präventiven Vakzinierung auf die Etablierung und den Progress orthotoper Tumoren untersucht werden. Die Mäuse der Behandlungsgruppe erhielten zehn und fünf Tage vor der Induktion orthotoper Tumoren eine s.c. Vakzinierung mit Ad-mAFP transduzierten DC. Die täglichen i.p. Gaben von 100 µg P60 wurden mit der ersten Vakzinierung begonnen und bis zum fünften Tag nach der Tumorinduktion fortgeführt. Als Kontrollvektor wurde Ad-Mock eingesetzt, P310 als Kontrollpeptid. Die Tiere wurden täglich auf Zeichen eines Tumorprogress untersucht. Interessanterweise überlebten mit Ausnahme der unbehandelten Kontrollgruppe einzelne Tiere aller Behandlungsgruppen über das Ende des Beobachtungszeitraums (115 Tage nach der Tumorinduktion) hinaus. Verglichen mit den Mäusen der unbehandelten Kontrollgruppe zeigten jedoch allein die Tiere nach zweimaliger präventiver Vakzinierung mit Ad-mAFP transduzierten DC ein signifikant verlängertes Überleben nach orthotoper Tumorinduktion ($p = 0,03$; Abbildung 13). Eine zusätzliche Gabe von P60 führte in diesem präventiven Setting zu keinem weiteren Vorteil im Hinblick auf Tumorprogress und Überleben.

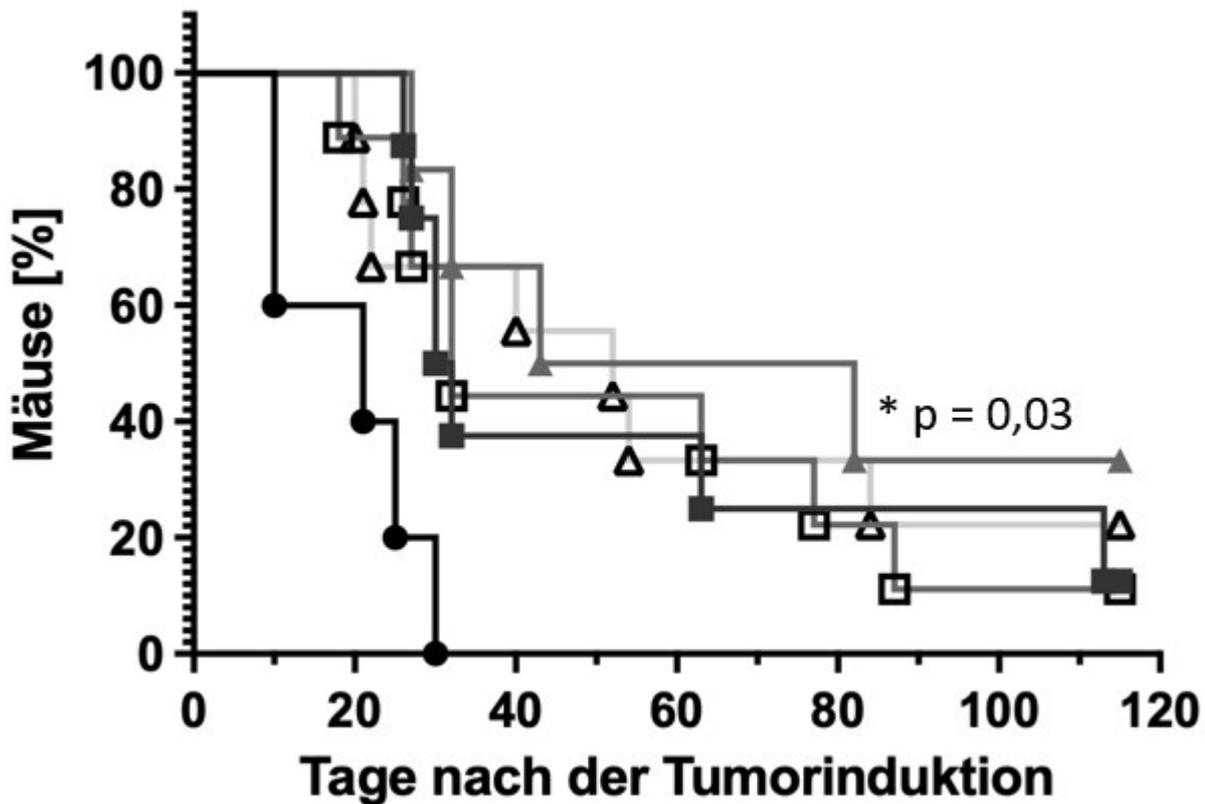


Abb. 13: Überleben von Mäusen nach orthotoper Tumorinduktion durch Inokulation von Hepa129 mAFP-Zellen in den linken Leberlappen nach vorheriger Vakzinierung mit adenoviral transduzierten DC und Therapie mit P60 bzw. dem Kontrollpeptid P301. Darstellung als Kaplan-Meier-Kurve. Die Tiere der Behandlungsgruppen erhielten an Tag 10 und Tag 5 vor der Tumorinduktion Vakzinierungen mit adenoviral transduzierten DC. Die täglichen Applikationen von P60 bzw. P301 erfolgten ab dem ersten Tag der Vakzinierung bis fünf Tage nach der Tumorinduktion. Fünf Gruppen wurden beobachtet: Ad-mAFP-DC + P60 (leeres Dreieck, n = 9), Ad-Mock-DC + P60 (leeres Quadrat, n = 9), Ad-mAFP-DC + P301 (gefülltes Dreieck, n = 6), Ad-Mock-DC + P301 (gefülltes Quadrat, n = 6), unbehandelte Kontrollgruppe (Kreis, n = 5). Jede Form der Vakzinierung führte zu einem Vorteil gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe. Eine signifikante Verlängerung des Überlebens konnte jedoch nur unter Therapie mit mAFP-exprimierenden DC zusammen mit P301 erreicht werden ($p = 0,03$). Der Vorteil der Vakzinierung in Kombination mit P60 war statistisch nicht signifikant ($p = 0,09$).

3.4.6 Einfluss einer Therapie mit Ad-mCD40L transduzierten dendritischer Zelle und P60 auf das Überleben im orthotopen Tumormodell

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte der Progress s.c. HCC durch Vakzinierung mit Ad-CD40L transduzierten DC verlangsamt werden. Insbesondere unter intratumoraler Vakzin-Applikation wurde ein signifikant verlängertes Überleben im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe beobachtet (Gonzalez-Carmona et al., 2008). Daher sollte

auch hier ein möglicher Synergismus einer kombinierten Behandlung mit P60 untersucht werden. Die Untersuchung erfolgte im orthotopen Tumormodell. Da hier eine intratumorale Vakzin-Applikation nicht möglich ist, erhielt eine der Behandlungsgruppen i.p. Vakzinierungen. Am dritten und sechsten Tag nach der Induktion orthotoper Tumoren erhielten die Mäuse der Behandlungsgruppen eine s.c. oder i.p. Vakzinierung mit Ad-CD40L transduzierten DC. Ad-Mock wurde als Kontrollvektor verwendet. Die täglichen i.p. Gaben von 100 µg P60 bzw. des Kontrollpeptids P301 wurden mit der ersten Vakzinierung begonnen und bis zum Versterben der Tiere fortgeführt.

Entsprechend der Ergebnisse der Voruntersuchungen zeigten die Mäuse, die eine i.p. Vakzinierungen mit CD40L-exprimierenden DC erhielten, ein im Vergleich zur nicht therapierten Kontrollgruppe signifikant verlängertes Überleben ($p = 0,01$; Abbildung 14). Vier Wochen nach der Tumorinduktion waren bereits alle Tiere der Kontrollgruppe verstorben. Zu diesem Zeitpunkt lebten noch 50 % der mit Ad-CD40L transduzierten DC und P301 behandelten Mäuse. Überraschenderweise zeigte sich keine Verbesserung des Therapieansprechens in Kombination mit P60. Im Gegenteil, die mit CD40L-exprimierenden DC und P60 behandelten Mäuse überlebten nicht länger als die Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe (medianes Überleben nach Tumorinduktion 21 bzw. 24,8 Tage).

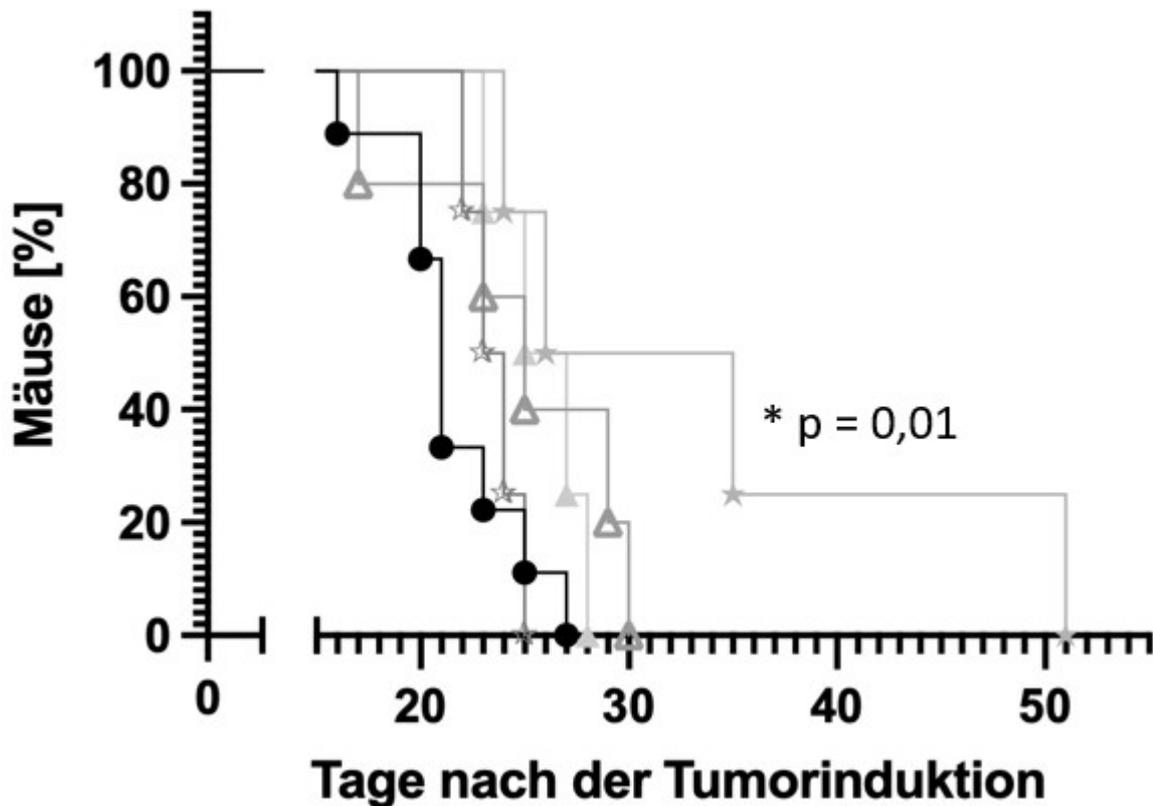


Abb.14: Überleben von Mäusen nach orthotoper Tumorinduktion durch Inokulation von Hepa129-Zellen in den linken Leberlappen unter Therapie mit adenoviral transduzierten DC und P60. Darstellung als Kaplan-Meier-Kurve. Die Vakzinierungen erfolgten an den Tagen 3 und 6 nach der Tumorinduktion, ab dem Tag der ersten Vakzinierung erhielten die Mäuse zudem täglich P60 bzw. das Kontrollpeptid P301 i.p. Sieben Behandlungs- bzw. Kontrollgruppen wurden gebildet: Ad-CD40L DC s.c. + P60 (leeres Dreieck, n = 5), Ad-CD40L DC s.c. + P301 (gefülltes Dreieck, n = 5), Ad-CD40L DC i.p. + P60 (leerer Stern, n = 4), Ad-CD40L DC i.p. + P301 (gefüllter Stern, n = 4), Ad-Mock-DC s.c. + P60 (zur besseren Übersicht nicht dargestellt), Ad-Mock-DC s.c. + P301 (zur besseren Übersicht nicht dargestellt), unbehandelte Kontrollgruppe (Kreis, n = 2). Eine Therapie mit Ad-CD40L transduzierten DC i.p. und P301 verlängerte das Überleben signifikant ($p = 0,01$). In Kombination mit P60 wurde dieser positive Einfluss jedoch vollständig aufgehoben.

4. Diskussion

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit wurde der Einfluss einer spezifischen Treg-Hemmung durch das Inhibitor-Peptid P60 in Kombination mit DC-basierten Tumorstimmungen auf das Tumorstadium und Überleben im s.c. und orthotopen murinen HCC-Modell untersucht. Dabei wurde ein Tumormodell eingesetzt, von dem bekannt war, dass es progressiv von Treg infiltriert wird (Vogt et al., 2021). Es wurde gezeigt, dass P60

in Kombination mit mAFP-exprimierenden DC das Wachstum etablierter s.c. und orthotoper HCC signifikant reduziert. Der tumorprotektive Effekt einer präventiven Vakzinierung mit Ad-mAFP transduzierten DC konnte in Kombination mit P60 hingegen nicht gesteigert werden (Sadeghlar et al., 2023). Durch eine Behandlung mit Ad-CD40L transduzierten DC konnte das Überleben im orthotopen HCC-Modell ebenfalls signifikant verlängert werden. Eine additive Therapie mit P60 hob diesen antitumoralen Effekt einer Vakzinierung mit Ad-CD40L transduzierten DC jedoch auf, sodass die kombinierte Behandlung keinen Vorteil gegenüber der Kontrollgruppe erbrachte.

Das HCC ist weltweit das zweithäufigste Malignom bei Männern und das sechsthäufigste Malignom bei Frauen mit zuletzt steigender Inzidenz in den westlichen Ländern (Bray et al., 2018). Für die Mehrzahl der Patienten stehen aufgrund einer begleitenden Leberzirrhose sowie eines fortgeschrittenen Tumorstadiums zum Zeitpunkt der Diagnose nur palliative Behandlungen zur Verfügung. Trotz in den letzten Jahren zugelassener neuer Systemtherapien u.a. mit ICI wird die Überlebensprognose für diese Patienten weiterhin mit lediglich 11 bis 20 Monaten ab Diagnosestellung angegeben (Giraud et al., 2021). Neue Therapieansätze werden daher dringend benötigt. Vakzinierungen mit adenoviral transduzierten DC induzieren eine TAA-spezifische Immunantwort in vitro und in vivo (González-Carmona et al., 2006; Vogt et al., 2014; Vogt et al., 2021). Unter Behandlung mit Ad-mAFP- bzw. Ad-CD40L transduzierten DC wurde ein verlangsamtes Tumorstadium und prolongiertes Überleben im murinen HCC-Modell beobachtet. Dabei konnte auch in fortgeschrittenen Tumorstadien noch ein gutes Therapieansprechen bis hin zur kompletten Remission dokumentiert werden (Gonzalez-Carmona et al., 2008; Vogt et al., 2021). DC-basierte Immuntherapien könnten daher eine vielversprechende Option in der Behandlung des fortgeschrittenen HCC darstellen. Dennoch, in klinischen Studien mit TAA-exprimierenden DC konnten diese Erfolge bislang nicht reproduziert werden (Iwashita et al., 2003; Ladhams et al., 2002; Lee et al., 2005; Palmer et al., 2009). Das geringe immunologische und folglich klinische Ansprechen des HCC auf DC-basierte Therapien ist vermutlich auf dessen immunsuppressives Tumormilieu zurückzuführen. Die Leber nimmt aufgrund der ständigen Exposition gegenüber Fremdanitigenen aus dem Gastrointestinaltrakt über die Pfortader bereits im Gesunden eine immunologische Sonderstellung ein. Ihr Immunmilieu ist auf Toleranz ausgerichtet (Makarova-Rusher et al., 2015). Diese Mechanismen der Toleranz nehmen schon in der entzündlich

veränderten Leber zu und zeigen sich umso deutlicher im HCC. Durch eine vermehrte Expression antiinflammatorischer Zytokine, eine Hochregulation von Immuncheckpoint-Liganden und -Rezeptoren sowie eine gestörte Reifung und Funktion von APC wird eine effektive Immunantwort durch CTL im HCC gehemmt. Während die Zahl tumorspezifischer CD4+ und CD8+ T-Zellen abnimmt, dominieren immunsuppressive Zellen wie Treg und MDSC das Tumormilieu im HCC (Makarova-Rusher et al., 2015; Prieto et al., 2015). Dabei sind die Treg im HCC von besonderer prognostischer Bedeutung. Die Höhe der Treg im peripheren Blut und Tumorgewebe korreliert bei Patienten, die an einem HCC erkrankt sind, negativ mit dem generellen Überleben und dem rezidivfreien Überleben nach einer Tumorsektion (Fu et al., 2007; Kobayashi et al., 2007; Shen et al., 2010). Die Inhibition der Treg könnte daher ein vielversprechender Ansatz zur Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort im HCC darstellen. Bisherige Untersuchungen zur Überwindung der immunsuppressiven Wirkung der Treg erfolgten in der Regel mit Wirkstoffen, die eine Zelldepletion bewirken. Die Ergebnisse dieser präklinischen und klinischen Untersuchungen sind nicht eindeutig, wiederholt wurde eine unzureichende Spezifität als Ursache des begrenzten Therapieansprechens beschrieben (Byrne et al., 2011). Der Transkriptionsfaktor FOXP3 ist der einzige spezifische Treg-Marker und zudem entscheidend für die immunsuppressive Wirkung dieser Zellen (Sakaguchi et al., 2008). Das Inhibitor-Peptid P60 bindet spezifisch an FOXP3 und verhindert so dessen Homodimerisation und nukleäre Translokation. Auf diese Weise vermittelt P60 eine effektive funktionelle Inhibition der Treg. Casares et al. zeigten, dass P60 das Ansprechen auf eine Tumorpeptid-Vakzinierung im murinen Modell des kolorektalen Karzinoms signifikant verbessert (Casares et al., 2010).

4.1 Eine Monotherapie mit P60 hat keinen Einfluss auf Tumorwachstum und Überleben im subkutanen und orthotopen Tumormodell

In dieser Arbeit wurde zunächst der Einfluss einer Monotherapie mit P60 im s.c. murinen HCC-Modell ausgewertet. Aus Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe war bereits bekannt, dass in die durch s.c. und orthotope Applikation von Hepa129- bzw. Hepa129 mAFP-Zellen induzierten Tumoren Treg rekrutiert werden (Vogt et al., 2021). Wir vermuteten daher, dass unter Treg-Inhibition mit P60, die endogene antitumorale

Immunantwort gestärkt und das Tumorwachstum verzögert werden kann. Jedoch konnte unabhängig vom Beginn und der Dauer der Behandlung mit P60 kein signifikanter Einfluss auf das Tumorwachstum und Überleben im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Wurden die täglichen i.p. Gaben von P60 erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium begonnen und bis zum Versterben der Tiere fortgeführt, zeigte sich ein tendenziell, jedoch statistisch nicht signifikant verlängertes Überleben der behandelten Tiere verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe. Ein früherer Behandlungsbeginn, ebenfalls bis zum Versterben der Tiere fortgeführt, hatte hingegen keinen Einfluss auf den Tumorprogress. Dies deckt sich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Lozano et al. untersuchten den Einfluss einer durch Punktmutationen optimierten Variante des Inhibitor-Peptids P60 im s.c. Hepa129-Tumormodell. Die Behandlung erfolgte von Tag 9 bis Tag 16 nach der Tumorinduktion. Dabei wurde ebenfalls kein signifikanter Effekt auf das Tumorwachstum und Überleben im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet (Lozano et al., 2017). Casares et al. konnten unter Monotherapie mit P60 auch im murinen s.c. Modell des kolorektalen Karzinoms keine antitumoralen Effekte beobachten. Die Therapie erfolgte prophylaktisch über neun Tage und wurde nach der Tumorinduktion nicht fortgeführt (Casares et al., 2010). Möglicherweise ursächlich ist die kurze Halbwertszeit des Inhibitor-Peptids P60, die durch die Arbeitsgruppe von Frau Dr. Casares mit 20 Minuten angegeben wird (unveröffentlichte Daten). Casares et al. beendeten die Behandlung mit P60 am Tag der Tumorinduktion. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit bewirkte P60 darüber hinaus vermutlich keine relevante Treg Inhibition. Dennoch, auch unter einer prolongierten Behandlung mit P60 konnte in den hier dargestellten Untersuchungen kein signifikantes Therapieansprechen dokumentiert werden, sodass zusätzliche Einflussfaktoren diskutiert werden müssen. Dahingehend fehlen immunologische Daten aus den zitierten Veröffentlichungen wie auch der eigenen Arbeit. Dass eine Inhibition der Treg grundsätzlich einen antitumoralen Effekt bewirken kann, wurde in Untersuchungen mit anderen Wirkstoffen belegt. Für das gleiche murine Modell des kolorektalen Karzinoms, das Casares et al. einsetzten, wurde der Einfluss einer prophylaktischen Therapie mit anti-CD25-Antikörpern auf das Tumorwachstum und Überleben untersucht. Dabei wurde eine in 73 % der Mäuse ein antitumoraler Effekt beobachtet. Ergänzende immunologische Untersuchungen wiesen eine TAA-spezifische Immunantwort nach. Die Zeit bis zur Normalisierung der Treg-Level im Blut der Tiere wird

mit 35 Tagen angegeben (Golgher et al., 2002). Vergleichbare immunologische Daten aus den in vivo Untersuchungen von Casares et al. fehlen. Nagayama et al. untersuchten den Einfluss einer Treg-Depletion mit dem CD25-Antikörper PC61 bzw. Cyclophosphamid in zwei weiteren HCC-Modellen (murine Zelllinien: MH129, MH134). Dabei sprachen die Tumoren der beiden Zelllinien unterschiedlich gut auf die Therapie an. Die mit MH129-Zellen induzierten Tumoren zeigten ein signifikant reduziertes Tumorstadium unter Treg-Depletion. Die Tumoren, die mit MH134 induziert wurden, sprachen hingegen nicht auf die Therapie an. Interessanterweise konnte für die beiden Zelllinien kein Unterschied im Hinblick auf die Hochregulation der Treg beobachtet werden. Weitere immunologische Untersuchungen, um das unterschiedliche Therapieansprechen in den beiden Tumormodellen einordnen zu können, fehlen (Nagayama et al., 2007). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass nicht allein die Halbwertszeit und Behandlungsdauer, sondern auch das Tumormodell das Ansprechen auf eine Treg-Inhibition bzw. -Depletion beeinflussen. Dabei scheint das Ausmaß der Treg-Infiltration der Tumoren nicht mit dem Therapieerfolg zu korrelieren. In diesem Zusammenhang wären weitere Studien mit CD25-Antikörpern oder auch niedrig-dosiertem Cyclophosphamid im Hepa129-Tumormodell wie auch mit P60 in anderen murinen HCC-Modellen interessant. Zudem fehlen ergänzende immunologische Untersuchungen, die den Einfluss von P60 auf das Immunmilieu des in dieser Arbeit verwendeten Tumormodells über die Zeit charakterisieren, insbesondere hinsichtlich des Ausmaßes der Infiltration durch Treg.

Im Hinblick auf eine mögliche Translation in klinische Studien konnte für das HCC bislang keine Prognoseverbesserung unter alleiniger Treg-Depletion beobachtet werden. Greten et al. untersuchten den Einfluss einer Therapie mit niedrig dosiertem Cyclophosphamid auf die Immunantwort und das Überleben bei Patienten mit fortgeschrittenem HCC. Nur sechs der 13 behandelten Patienten entwickelten eine AFP-spezifische CD4⁺ T-Zell-Immunantwort (Greten et al., 2010). Entscheidender erscheint für einen Therapieerfolg daher ein multimodaler Ansatz, der die antitumorale Immunantwort nicht allein durch die Inhibition der Treg stärkt.

4.2 Antitumoraler Effekt einer Therapie mit Ad-mAFP transduzierten dendritischen Zellen und P60 im etablierten subkutanen und orthotopen Tumormodell

Im etablierten s.c. und orthotopen HCC-Modell führte eine Behandlung mit Ad-mAFP transduzierten DC zu einem verlangsamten Tumorwachstum und prolongierten Überleben verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe. Dies bestätigt Ergebnisse aus vorherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe (Vogt et al., 2021). Dieser Vorteil wurde durch eine additive Therapie mit P60 verstärkt. Mäuse, die zwei Vakzinierungen mit Ad-mAFP transduzierten DC erhielten und fortgeführt mit P60 behandelt wurden, überlebten signifikant länger als die unbehandelte Kontrollgruppe. Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe hatten in *in vitro* Untersuchungen eine sichere Transgenexpression der DC nach adenoviraler Transduktion mit Ad-mAFP nachgewiesen und belegten eine durch diese DC vermittelte AFP-spezifische Zytotoxizität (González-Carmona et al., 2006; Vogt et al., 2021). Im s.c. wie orthotopen HCC-Modell konnte bereits nach einmaliger Vakzinierung mit Ad-mAFP transduzierten DC intratumoral ein Anstieg von proinflammatorischen Th1-Zytokinen (IL-2, IL-12, IFN- γ) sowie eine vermehrte Infiltration mit CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich auch ein Anstieg der intratumoralen Treg (Vogt et al., 2021).

Es erscheint daher wahrscheinlich, dass die Vakzinierung mit Ad-mAFP-transduzierten DC und die Treg-Inhibition mit P60 zusammen synergistisch wirken. Ob der vermutete Synergismus tatsächlich auf eine funktionelle Treg-Inhibition zurückzuführen ist, sollte durch ergänzende Untersuchungen überprüft werden. Weitere Untersuchungen der tumorinfiltrierenden Zellen mittels FACS-Analyse sowie Treg-Funktions- und IFN γ -Assays zur Beurteilung der Funktion der Treg und CTL zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Tumorinduktion sollten zur Klärung dieses Synergismus geplant und durchgeführt werden.

Der Einfluss einer Treg-Inhibition auf das Ansprechen TAA-basierter Vakzine wurde in klinischen Studien bei Patienten mit verschiedenen fortgeschrittenen Tumorleiden untersucht. Dabei wurden anti-CD25-Antikörper zur Treg-Depletion eingesetzt. Die berichteten Ergebnisse sind nicht einheitlich. Rech und Dannull beobachteten bei Patienten mit einem fortgeschrittenen Mammakarzinom, Nierenzell- oder Ovarialkarzinom eine verstärkte Immunantwort, wenn einer Vakzinierung eine Treg-Depletion mit Daclizumab bzw. Denileukin difitoxin (anti-CD25-Antikörper) vorausging. In diesen

Untersuchungen zeigten 60 % der Patientinnen mit einem Mammakarzinom unter der Behandlung keinen Progress (Rech et al., 2012; Dannull et al., 2005). In zwei klinischen Studien, die Patienten mit einem metastasierten Melanom einschlossen, wurde unter Therapie mit Daclizumab bzw. Denileukin difitoxin vor Vakzinierung hingegen keine verbesserte T-Zellantwort beobachtet (Baur et al., 2013; Jacobs et al., 2010). Morse et al. beobachteten sogar einen Progress CEA-exprimierender Tumore unter Therapie mit Denileukin difitoxin und DC-basiertem Tumorstimmungsinducer (Morse et al., 2008). Somit ist auf Grundlage der aktuellen Studienergebnisse keine generelle Aussage zum Nutzen einer Treg-Inhibition in Kombination mit Tumorstimmungsinducern in der klinischen Anwendung zu treffen. Vermutlich ist eine generelle Aussage dazu in Anbetracht des unterschiedlichen Stellenwerts der Treg im Immunmilieu verschiedener Malignome aber auch nicht möglich. Studien deuten auf eine prognostisch günstige Rolle der Treg in einigen Malignomen wie Kopf-Hals-Tumoren hin, während die Rolle für andere Karzinome wie das kolorektale Karzinom noch nicht vollständig geklärt ist bzw. sich mutmaßlich im Verlauf der Tumorentstehung wandelt (Whiteside, 2012).

Für das HCC ist die prognostische Bedeutung der Treg jedoch wiederholt und übereinstimmend beschrieben worden. Patienten mit einer höheren Infiltration von Treg im Tumorgewebe hatten eine schlechtere Prognose, sodass die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse auch im Hinblick auf eine Translation des Therapieregimes in die klinische Anwendung vielversprechend erscheinen (Fu et al., 2007; Kobayashi et al., 2007; Shen et al., 2010).

4.3 Einfluss einer präventiven Vakzinierung mit Ad-mAFP transduzierten dendritischen Zellen auf Tumorprogress und Überleben im orthotopen Tumormodell mit und ohne P60

Das HCC entwickelt sich regelhaft auf dem Boden einer vorbestehenden Lebererkrankung. In 90 % der Fälle besteht eine Leberzirrhose (Akinyemiju et al., 2017). Im Jahr 2017 betrug die Prävalenz der Leberzirrhose in Europa im Median 833/100.000 Einwohner. Die jährliche Inzidenz für das HCC in dieser Gruppe wird mit 1-4 % angegeben (Moon et al., 2020). Für diese Patienten stellt sich die Frage nach Möglichkeiten der Tumorprävention.

Nicht erst im HCC, auch bei Patienten mit einer hepatischen Grunderkrankung kann eine Hochregulation der Treg nachgewiesen werden (Langhans et al., 2019). Zudem ist bekannt, dass bereits in der entzündeten Leber antiinflammatorische Zytokine dominieren und Checkpoint-Rezeptoren sowie -Liganden vermehrt exprimiert werden, während die Funktion von APC gestört ist (Makarova-Rusher et al., 2015; Prieto et al., 2015). Angesichts dessen ist die Kombination aus einem DC-basierten Vakzin zur Induktion einer TAA-spezifischen Immunantwort mit einem Inhibitor der Treg-vermittelten Immunsuppression ein vielversprechender Ansatz in der Tumorprävention. Darüber hinaus ist der Einsatz DC-basierter Immuntherapien als adjuvante Therapie des HCC nach primär kurativer Resektion oder lokal ablativer Therapie denkbar. Auch hier erscheint eine Kombination mit einem Treg-Inhibitor sinnvoll angesichts der negativen Korrelation der Höhe der Treg-Infiltration mit dem Tumor-freien Überleben nach einer primär kurativen Tumoresektion (Gao et al., 2007).

Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe ist bekannt, dass durch DC-basierte TumortheraPIen nicht nur kurzfristig, sondern auch langanhaltend eine antitumorale Immunantwort induziert werden kann. So konnte in Mäusen, die nach einer i.t. Behandlung mit Tumorlysat gepulsten und mit Ad-CD40L bzw. Ad-IL12 transduzierten DC tumorfrei waren, nach einer erneuten s.c. oder orthotopen Exposition gegenüber Hepa129-Zellen kein Tumorwachstum beobachtet werden (Gonzalez-Carmona et al., 2008; Vogt et al., 2014). In der hier vorgestellten Arbeit zeigte sich ein protektiver Effekt nach einer zweimaligen s.c. Vakzinierung mit Ad-mAFP transduzierten DC vor der Tumorinduktion. Die vakzinieren Tiere überlebten signifikant länger als die unbehandelte Kontrollgruppe. Immunologische Daten im Rahmen der aktuellen Untersuchung liegen nicht vor. In Anbetracht der Ergebnisse vorheriger Untersuchungen, die die AFP-spezifische Zytotoxizität nach Vakzinierung mit Ad-mAFP transduzierten DC nachwiesen (Vogt et al., 2021), ist dennoch anzunehmen, dass die aktuellen Beobachtungen auf die Induktion einer TAA-spezifischen Immunantwort zurückzuführen sind. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Irie et al. im spontanen orthotopen HCC-Modell in Mäusen des Stamms C3H/HeNCrj. Nach viermaliger Vakzinierung mit DC, die mit bestrahlten Tumorzellen beladen waren, entwickelten die Mäuse signifikant weniger Tumoren als die unbehandelte Kontrollgruppe (11,1 % vs. 77,8 %) (Irie et al., 2004). In klinischen Studien wurden Tumorvakzine als adjuvante Therapie untersucht. Lee et al. behandelten zwölf

Patienten in einer Phase I/IIa Studie, nach kurativer Therapie eines HCC, adjuvant mit TAA-gepulsten autologen DC. Verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe war das progressionsfreie Überleben signifikant verlängert (11,8 Monate vs. 36,6 Monate) (Lee et al., 2015). In einer weiteren randomisierten Studie, die insgesamt 156 Patienten nach kurativer Therapie eines HCC einschloss, entwickelten ca. 60 % der 77 Patienten, die sechs Vakzinierungen mit rekombinanten TAA-gepulsten DC erhalten hatten, eine spezifische T-Zell-Antwort. Jedoch zeigte sich kein Vorteil der Behandlungsgruppe gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens (Lee et al., 2017). Nicht DC-basierte Vakzine erbrachten ebenso divergierende Ergebnisse. Eine Vakzinierung mit autologen HCC-Fragmenten nach kurativer Resektion führte in einem Follow-Up über drei Jahre zu einem verlängerten rezidivfreien Intervall verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe (Peng et al., 2005). Taniguchi et al. beobachteten in einer Phase II Studie unter adjuvanter Therapie mit einem GPC3-Vakzin keinen über das erste Beobachtungsjahr hinausgehenden Vorteil der Behandlungsgruppe im Hinblick auf die Rezidivrate. Jedoch war das Gesamtüberleben der therapierten Patienten unabhängig von einem Rezidiv signifikant verlängert im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe (Taniguchi et al., 2020). Adjuvante Vakzinierungen mit personalisierten Tumor-Neoantigenen erbrachten in einer Untersuchung, die allerdings nur zehn Patienten einschloss, keinen Vorteil. Achtzig Prozent der Patienten entwickelten ein Rezidiv des HCC, teilweise noch vor Abschluss der Therapie. Eine spezifische T-Zellantwort ließ sich nur bei 50 % der Patienten nachweisen (Cai et al., 2021). Leider wurde in keiner der genannten Untersuchungen die Höhe der Treg im Blut und Tumorgewebe der Patienten untersucht.

Casares et al. beschreiben nach einer präventiven Vakzinierung mit dem Peptid AH1 und Behandlung mit P60 eine verstärkte antigenspezifische Immunantwort und eine Tumorfreiheit von 82 % der behandelten Mäuse im s.c. Modell des kolorektalen Karzinoms (Casares et al., 2010). Aufgrund des aus Vorstudien bekannten Anstiegs der Treg unter der DC-basierten Vakzinierung und der Ergebnisse von Casares et al., vermuteten wir einen positiven synergistischen Effekt in Kombination mit P60. Jedoch zeigte sich kein Vorteil durch die kombinierte Therapie gegenüber der alleinigen Vakzinierung im Hinblick auf das Überleben der Tiere. In der hier dargestellten Untersuchung erfolgte die Behandlung mit P60 vom Tag der ersten Vakzinierung bis fünf

Tage nach der Tumorinduktion, die Vakzinierungen mit adenoviral transduzierten DC erfolgten zehn und fünf Tage vor der Tumorinduktion. Aus Voruntersuchungen ist zwar bekannt, dass Hepa129 mAFP-Tumoren von Treg infiltriert werden (Vogt et al., 2021), es wurde bislang jedoch nicht untersucht wie sich die Infiltration über die Zeit verhält. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit des P60 von 20 min ist anzunehmen, dass die inhibitorische Wirkung des Peptids nicht über den Tag der letzten Anwendung hinaus fortbestand. Es ist denkbar, dass zu diesem Zeitpunkt noch kein Target vorlag, da die Tumoren erst später in relevanter Anzahl von Treg infiltriert werden. Hier zeigt sich die Limitierung des eingesetzten Tumormodells im präventiven Setting. Die Tumorgenese des HCC im Menschen ist von einer zunehmenden Veränderung des hepatischen Immunmilieus Richtung Toleranz geprägt, unter anderem bedingt durch eine Hochregulation von Checkpoint-Rezeptoren und -Liganden, eine vermehrte Expression immunsuppressiver Zytokine und die Infiltration immunsuppressiver Zellen wie Treg. Diese Komplexität wird durch die Injektion von Tumorzellen in nicht vorerkrankte Lebern nicht abgebildet. Um die verbliebenen Fragen zu klären, wären weitere Untersuchungen notwendig. So wäre es von Interesse, die Infiltration der Hepa129 mAFP-Tumoren durch Treg über die Zeit zu untersuchen und aufbauend darauf das Therapieprotokoll gegebenenfalls durch eine prolongierte Behandlung mit P60 anzupassen. Eine Untersuchung in einem anderen murinen Modell des HCC, das eine medikamentös-toxische Tumorinduktion als Grundlage hat, könnte zudem eine bessere Annäherung an die Tumorgenese im Menschen darstellen.

Zusammenfassend konnte in Übereinstimmung mit Daten aus weiteren präklinischen und klinischen Studien gezeigt werden, dass DC-basierte Vakzine auch in der Tumorprävention ein vielversprechender Ansatz sind. Ihr Einsatz in der Primär- wie Sekundärprävention ist auf Grundlage der dargestellten Untersuchungen denkbar. Daten zur Beurteilung der Rolle der Treg in diesem Zusammenhang sind aktuell jedoch unzureichend. Auch wenn die zusätzliche Therapie mit P60 in der hier dargestellten Arbeit das Ansprechen auf die präventive Vakzinierung nicht verbessern konnte, ist ein Vorteil durch eine gleichzeitige Treg-Inhibition aufgrund theoretischer Überlegungen weiterhin denkbar. Bislang fehlen jedoch dahingehend aussagekräftige Untersuchungsergebnisse.

4.4 Prolongiertes Überleben unter Therapie mit Ad-CD40L transduzierten DC im etablierten orthotopen Tumormodell

In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe wurde wiederholt ein antitumoraler Effekt nach Vakzinierung mit Ad-CD40L transduzierten DC im s.c. HCC-Modell beobachtet. Die Therapie mit CD40L-exprimierenden DC verlangsamte unabhängig vom Tumorstadium das Tumorwachstum und verlängerte das Überleben. Der stärkste antitumorale Effekt konnte durch i.t. Applikation des Vakzins erzielt werden (Gonzalez-Carmona et al., 2008; Vogt et al., 2021). Die Interaktion zwischen CD40 und seinem Liganden CD40L ist ein entscheidender Immuncheckpoint in der Ausbildung einer effektiven zellulären wie humoralen Immunantwort. CD40 wird primär als ko-stimulierender Rezeptor von APC exprimiert. Sein Ligand findet sich an den Oberflächen von aktivierten B- und T-Zellen, DC, Monozyten, NK-Zellen sowie Mastzellen und basophilen Granulozyten. Durch die Rezeptor-Ligand-Interaktion wird u.a. die Aktivierung und Reifung von APC stimuliert, die Expression proinflammatorischer Zytokine aktiviert und eine zelluläre Immunantwort durch Aktivierung von CTL wie auch NK-Zellen getriggert. Darüber hinaus wird eine antigenspezifische humorale Immunantwort durch die Aktivierung von B-Zellen stimuliert (Chand Dakal et al., 2020). In der hier vorgestellten Arbeit wurde der Effekt einer zweimaligen Vakzinierung mit Tumorlysat gepulsten und mit Ad-CD40L transduzierten DC auf das Tumorwachstum und Überleben nach orthotoper Tumorinduktion untersucht. Das Vakzin wurde entweder s.c. oder i.p. appliziert. Erhielten die Mäuse zusätzlich das Kontrollpeptid P301, wurde unabhängig vom Applikationsweg des Vakzins ein prolongiertes Überleben im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe beobachtet. Dieser Vorteil war für die Mäuse, die die Vakzinierung i.p. erhielten, signifikant. Die hier diskutierten Daten bestätigen somit die Ergebnisse aus den vorherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe auch im orthotopen Tumormodell (Vogt et al., 2021). Immunologische Untersuchungen zur aktuellen Arbeit fehlen. Jedoch liegen Ergebnisse aus früheren Arbeiten vor. FACS-Analysen des Tumorgewebes zeigten dabei eine stärkere Infiltration durch CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie NK-Zellen nach Vakzinierung mit Ad-CD40L transduzierten DC. Dabei war die Anzahl CD4⁺ Treg reduziert. Zudem konnte eine Hochregulation von IL-12 im Tumormilieu und von ko-stimulatorischen Oberflächenmarkern wie CD86 auf DC nachgewiesen werden. Verglichen mit dem Effekt einer Vakzinierung mit Ad-mAFP transduzierten DC, entwickelte sich eine deutlich länger

anhaltende TH1-gewichtete Immunantwort (Gonzalez-Carmona et al., 2008; Vogt et al., 2021).

Auch in einigen wenigen klinischen Studien wurde die Aktivierung des CD40-CD40L-Checkpoints untersucht. In einer Phase I/IIa Studie von Malmström et al. führte eine neoadjuvante Therapie mit Ad-CD40L in Form einer intravesikalen Instillation bei Patienten mit Harnblasenkarzinomen vor Cystektomie zu einer vermehrten Infiltration der Tumoren mit CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Die Zahl CD4⁺ Treg nahm im peripheren Blut ab, die Ergebnisse der Gewebebiopsien waren im Hinblick auf die Infiltration durch Treg inkongruent. In gesundem Gewebe wurde teilweise sogar ein Anstieg der Treg beobachtet, intratumoral blieb die Anzahl infiltrierender Treg hingegen konstant oder fiel ab (Malmström et al., 2010). Dessureault et al. behandelten 21 Patienten mit metastasierten soliden Tumoren mit bestrahlten autologen Tumorzellen und Bystanderzellen, die mit GM-CSF und CD40L transfiziert wurden. Nur bei vier Patienten konnte eine spezifische T-Zellantwort nachgewiesen werden. Das beste Therapieansprechen entsprach lediglich einer stable disease (Dessureault et al., 2007). Diese Ergebnisse decken sich mit den Berichten von Rüter et al., die 27 Patienten mit ebenfalls fortgeschrittenen soliden Tumoren wöchentlich mit einem agonistischen CD40-Antikörper therapierten. Rund ein Viertel der Patienten zeigte unter der Behandlung einen stabilen Verlauf, die Tumoren der übrigen Patienten waren progredient. Immunologische Untersuchungen erbrachten keine eindeutigen Ergebnisse (Rüter et al., 2010).

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Arbeit im Mausmodell heben dennoch den Stellenwert des CD40-CD40L-Checkpoints als vielversprechendes Target zukünftiger Malignomtherapien, auch in primär wenig immunogenen Tumoren wie dem HCC hervor.

4.4.1 P60 scheint die antitumorale Wirkung einer Vakzinierung mit Ad-CD40L transduzierten DC im orthotopen Tumormodell zu inhibieren

Ergänzend zur s.c. bzw. i.p. Vakzinierung mit Ad-CD40L transduzierten DC erhielten die Mäuse der Behandlungsgruppe ab dem Tag der ersten Vakzinierung tägliche i.p. Injektionen mit P60. Aufgrund der Beobachtungen im s.c. und orthotopen Modell unter der Behandlung mit Ad-mAFP transduzierten DC und P60, erwarteten wir auch unter dieser Kombination einen Synergismus. Die Therapie mit P60 verbesserte das

Therapieansprechen jedoch nicht. Im Gegenteil, unter der kombinierten Behandlung mit CD40L-exprimierenden DC und P60 zeigte sich kein Vorteil gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe. Auf Grundlage aktueller Daten lässt sich diese Beobachtung nicht schlüssig erklären. Jedoch beschrieben Lozano et al. unter Einfluss eines FOXP3-Inhibitors, der eine Weiterentwicklung von P60 darstellt, einen Anstieg von CD40L mit einer konsekutiv verbesserten DC-Reifung und gesteigerter Produktion von IL-12. Als ursächlich wurde die gestörte Bindung von FOXP3 an NFAT benannt. Hinweise auf Interaktionen unter gesteigerter CD40L-Expression finden sich in den Untersuchungen nicht (Lozano et al., 2015). Da die aktuellen Daten keine Hinweise auf eine mögliche Erklärung dafür geben, dass P60 die antitumorale Wirkung Ad-CD40L transduzierter DC aufhebt, sollte die Untersuchung zunächst auf ihre Reproduzierbarkeit untersucht werden.

4.5 Grenzen des genutzten Tumormodells

Mögliche Limitationen der hier dargestellten Untersuchungen ergeben sich aus dem Tumormodell. Die Karzinogenese des HCC beruht in der Regel wie in der Einleitung erläutert auf chronischen Entzündungsprozessen der Leber (Akinyemiju et al., 2017). Im Blut von Patienten mit einer chronischen Leberschädigung ist die Anzahl von Treg verglichen mit gesunden Probanden bereits erhöht (Langhans et al., 2019). Für die hier diskutierten Untersuchungen wurden hingegen Tumorzellen s.c. bzw. orthotop in gesundes Lebergewebe injiziert. Es ist daher denkbar, dass unmittelbar nach der Tumorinduktion ein Target für P60 fehlt, da Treg erst im Verlauf hochreguliert werden. Möglicherweise begründet dies auch den fehlenden Effekt einer Therapie mit P60 im präventiven Setting. Für diese Hypothese spricht, dass eine Monotherapie mit P60 bei einem späten Therapiebeginn zu einem tendenziell verlängerten Überleben verglichen mit der Kontrollgruppe führte. Dagegen spricht jedoch, dass ein früherer Therapiebeginn, mit fortgeführter täglicher Applikation von P60 bis zum Versterben der Tiere keinen Einfluss auf das Tumorstadium und Überleben hatte. Letztlich sind die Limitationen des verwendeten Tumormodells nicht allein auf die Hochregulation der Treg beschränkt. Wie einleitend erläutert, beeinflussen eine Vielzahl von hepatischen Zellen und Mediatoren die Tumorgenese. Auch die durch Hepa129 (mAFP)-Zellen induzierten Tumoren zeigen

analog zu humanen HCC eine reduzierte Immunogenität. In den s.c. und orthotopen Tumoren sind immunsuppressive Zytokine und Zellen hochreguliert, die Anzahl CD4+ und CD8+ Zellen hingegen reduziert (Vogt et al., 2021). Die Komplexität des Immunmilieus im Rahmen der Tumorgenese in einer zirrhotischen Leber wird durch das hier genutzte Tumormodell dennoch nicht vollständig abgebildet.

5. Zusammenfassung

Das HCC ist die zweithäufigste Tumorentität des Mannes und die sechsthäufigste Tumorentität der Frau, mit steigender Inzidenz in der westlichen Welt. Die Mehrzahl der Patienten können aufgrund eines fortgeschrittenen Tumorstadiums zum Zeitpunkt der Diagnosestellung oder Komorbiditäten nur einer palliativen Therapie zugeführt werden. Die immunologische Sonderstellung der Leber, deren Immunmilieu auf Toleranz ausgerichtet ist, stellt besondere Herausforderungen an die Behandlung. Dennoch konnten seit 2020 mehrere ICI für die palliative Behandlung des HCC zugelassen werden, die das Überleben signifikant verlängerten. Jedoch wird die Überlebensprognose ab Diagnosestellung weiterhin mit maximal 20 Monaten angegeben, sodass weitere Therapieansätze dringend gesucht werden.

In der hier vorgestellten Arbeit wurde der antitumorale Effekt einer Vakzinierung mit adenoviral transduzierten DC in Kombination mit einer spezifischen funktionellen Inhibition von Treg durch das FOXP3-Inhibitorpeptid P60 untersucht. Die Experimente stützen sich auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, in denen gezeigt wurde, dass adenoviral transduzierte DC eine tumorspezifische und langanhaltende Immunantwort induzieren können, jedoch zu einer intratumoralen Infiltration durch toleranzinduzierende Treg beitragen. Eine Monotherapie mit P60 führte weder im s.c. noch im orthotopen murinen HCC-Modell zu einem signifikant reduzierten Tumorwachstum bzw. verlängerten Überleben. Jedoch wurde in Kombination mit Ad-mAFP-transduzierten DC im etablierten s.c. und orthotopen Tumormodell ein signifikant verlangsamtes Tumorwachstum und verlängertes Überleben verglichen mit der Kontrollgruppe beobachtet. Der signifikante Effekt einer präventiven Vakzinierung mit Ad-mAFP-transduzierten DC vor Induktion orthotoper HCC auf Tumorwachstum und Überleben konnte durch eine Kombination mit P60 hingegen nicht gesteigert werden. Ebenso konnte allein unter Therapie mit Ad-

CD40L-transduzierten DC ein verlängertes Überleben im orthotopen HCC-Modell beobachtet werden. Dieser Effekt war statistisch signifikant bei i.p. Vakzinapplikation. Eine Kombination mit P60 hob diesen antitumoralen Effekt auf und hatte keinen Vorteil verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe.

Zusammenfassend stellen DC-basierte Immuntherapien einen vielversprechenden Ansatz in der Therapie und Prävention des HCC dar. In Kombination mit einer spezifischen Inhibition von Treg durch P60 konnte in Abhängigkeit vom verwendeten AdV und Zeitpunkt der Vakzinierung ein Synergismus beobachtet werden, der zu einer signifikanten Verlängerung des Überlebens und Reduktion des Tumorwachstums führte. Weiterführende immunologische Untersuchungen sind notwendig, um den Einfluss von P60 auf das immunologische Milieu der murinen HCC unter Therapie mit adenoviralen DC zu verstehen.

6. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** 911 Zellen vor (links) und 72 Stunden nach der Transduktion mit einem adenoviralen Vektor (rechts). Bilder freundlich zur Verfügung gestellt von Dr. Annabelle Vogt. 50
- Abb. 2:** Anreicherung adenoviraler Vektoren nach Ultrazentrifugation im diskontinuierlichen CsCl-Gradienten. Nach der Ultrazentrifugation im diskontinuierlichen CsCl-Dichtegradienten reicherten sich die adenoviralen Vektoren an der Phasengrenze an (weißer Pfeil). Die gut abzugrenzende darüberliegende Bande enthielt defekte Vektoren, eine weitere diffuse Bande enthielt Zelltrümmer und andere Proteine. 50
- Abb. 3:** Anreicherung adenoviralen Vektoren nach Ultrazentrifugation im kontinuierlichen CsCl-Gradienten. Nach der zweiten Ultrazentrifugation, die im kontinuierlichen CsCl-Dichtegradienten erfolgte, reicherten sich die konzentrierten und aufgereinigten adenoviralen Vektoren in der Mitte des Gradienten an (weißer Pfeil). Bild freundlich zur Verfügung gestellt von Dr. Annabelle Vogt. 51
- Abb. 4:** Plaques Assay an Tag 12 nach Transduktion mit einem adenoviralen Vektor, Verdünnungsstufe 10^{-8} . 52
- Abb. 5:** DC zwei Tage nach der Transduktion mit Ad-mCD40L unter dem Lichtmikroskop. Die Zellen zeigen neben dem typischen teilweise adhären, teilweise suspendierten Wachstum eine Cluster-Bildung (exemplarisch weißer Pfeil). Diese ist auf die CD40/CD40L-Bindung zwischen den DC zurückzuführen. (Quelle: (Gonzalez-Carmona et al., 2008) 58
- Abb. 6:** Orthotoper Tumor im linken Leberlappen 16 Tage nach Tumorinduktion durch Injektion von 1×10^5 Hepa129 mAFP-Zellen. 60
- Abb. 7:** Überleben von Mäusen nach s.c. Tumorinduktion durch Inokulation von Hepa129-Zellen in die rechte Flanke unter Therapie mit P60 dargestellt als Kaplan-Meier-Kurve. Therapiebeginn und -dauer wurden variiert: Die tägliche i.p. Applikation von P60 erfolgte über 10 Tage ab dem Tag der Tumorinduktion (frühes Tumorstadium, Quadrat, $n = 6$) oder ab einer Tumorgöße von $52,3 \text{ mm}^3 (\pm 44,19 \text{ mm}^3$,

intermediäres Tumorstadium, aufrechtes Dreieck, $n = 4$) bzw. $112,6 \text{ mm}^3 (\pm 75,53 \text{ mm}^3)$, fortgeschrittenes Tumorstadium, umgedrehtes Dreieck, $n = 4$) bis zum Versterben der Tiere. Die Kontrollgruppe erhielt keine Therapie (Kreis, $n = 12$). Das Überleben unter Therapie mit P301 wird aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht abgebildet. Unter keinem der Therapieprotokolle konnte ein im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe verlängertes Überleben beobachtet werden. 61

Abb. 8: Größe s.c. Tumoren an Tag 13 nach der Induktion durch Inokulation von Hepa129-Zellen in die rechte Flanke unter Therapie mit P60. Darstellung als Mittelwert mit SEM. Die tägliche i.p. Applikation von P60 erfolgte über zehn Tage ab dem Tag der Tumorinduktion (A, frühes Tumorstadium) oder ab einer Tumorgöße von $52,3 \text{ mm}^3 (\pm 44,19 \text{ mm}^3)$, B, intermediäres Tumorstadium) bzw. $112,6 \text{ mm}^3 (\pm 75,53 \text{ mm}^3)$, C, fortgeschrittenes Tumorstadium) bis zum Versterben der Tiere. Die Kontrollgruppe erhielt keine Therapie. Mäuse, die erst in einem fortgeschritteneren Tumorstadium behandelt wurden, zeigten an Tag 12 tendenziell kleinere Tumoren. Dieser Vorteil war gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe jedoch nicht signifikant ($p = 0,13$). 62

Abb. 9: Überleben von Mäusen nach orthotoper Tumorinduktion durch Inokulation von Hepa129 mAFP-Zellen in den linken Leberlappen unter Therapie mit P60 dargestellt als Kaplan-Meier-Kurve. Die Tiere der Behandlungsgruppe wurden ab dem dritten Tag nach der Tumorinduktion bis zum Versterben täglich mit P60 behandelt (Quadrat, $n = 5$). Die Kontrollgruppe erhielt keine Therapie ($n = 7$). Unter Monotherapie mit P60 konnte kein positiver Einfluss auf das Überleben beobachtet werden (medianes Überleben 22 bzw. 21 Tage nach der Tumorinduktion). 63

Abb. 10: Überleben von Mäusen nach s.c. Tumorinduktion durch Inokulation von Hepa129 mAFP-Zellen in die rechte Flanke unter Therapie mit Ad-mAFP transduzierten DC und P60. Darstellung als Kaplan-Meier-Kurve. Tiere der Therapiegruppe (leeres Quadrat, $n = 7$) erhielten zwei Vakzinierungen mit Ad-mAFP transduzierten DC, an Tag 5 und Tag 6 nach der Tumorinduktion, sowie tägliche i.p. Injektionen von P60 ab Tag 3 nach der Tumorinduktion bis zum Versterben. Eine Kontrollgruppe wurde mit Ad-LacZ transduzierten DC und P60 behandelt (gefülltes Quadrat, $n = 4$), eine weitere Kontrollgruppe erhielt keine

Therapie (Kreis, n = 4). Tiere, die mit einer Kombination aus mAFP-exprimierenden DC und P60 behandelt wurden, überlebten signifikant länger als die unbehandelte Kontrollgruppe ($p = 0,01$). 65

Abb.11: Größe s.c. Tumoren an Tag 13 nach Tumorinduktion durch Inokulation von Hepa129 mAFP-Zellen in die rechte Flanke nach Behandlungsgruppe dargestellt als Mittelwert + SEM. Tiere, die mit Ad-mAFP bzw. Ad-LacZ transduzierten DC und P60 behandelt wurden, zeigten durchschnittlich deutlich kleinere Tumoren als die Mäuse der unbehandelten Kontrollgruppe. Jedoch war der Vorteil nur für die Kombinationstherapie aus mit Ad-mAFP transduzierten DC und P60 signifikant ($p = 0,03$). 66

Abb. 12: Überleben von Mäusen nach orthotoper Tumorinduktion durch Inokulation von Hepa129 mAFP-Zellen in den linken Leberlappen unter Therapie mit adenoviral transduzierten DC und P60. Darstellung als Kaplan-Meier-Kurve. Die Vakzinierungen erfolgten an den Tagen 3 und 6 nach der Tumorinduktion, ab dem Tag der ersten Vakzinierung erhielten die Mäuse zudem täglich P60 bzw. das Kontrollpeptid P301 i.p. Fünf Behandlungs- bzw. Kontrollgruppen wurden gebildet: Ad-mAFP-DC + P60 (leeres Dreieck, n = 10), Ad-Mock-DC + P60 (leeres Quadrat, n = 4), Ad-mAFP-DC + P301 (gefülltes Dreieck, n = 4), Ad-Mock-DC + P301 (gefülltes Quadrat, n = 5), unbehandelte Kontrollgruppe (Kreis, n = 7). Eine additive Therapie mit P60 führte unabhängig vom Vakzin zu einem gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe verlängerten Überleben. Der Effekt war jedoch nur für die Therapie mit Ad-mAFP transduzierten DC statistisch signifikant ($p = 0,02$ für Ad-mAFP, $p = 0,06$ für Ad-Mock). 67

Abb. 13: Überleben von Mäusen nach orthotoper Tumorinduktion durch Inokulation von Hepa129 mAFP-Zellen in den linken Leberlappen nach vorheriger Vakzinierung mit adenoviral transduzierten DC und Therapie mit P60 bzw. dem Kontrollpeptid P301. Darstellung als Kaplan-Meier-Kurve. Die Tiere der Behandlungsgruppen erhielten an Tag 10 und Tag 5 vor der Tumorinduktion Vakzinierungen mit adenoviral transduzierten DC. Die täglichen Applikationen von P60 bzw. P301 erfolgten ab dem ersten Tag der Vakzinierung bis fünf Tage nach der Tumorinduktion. Fünf Gruppen wurden beobachtet: Ad-mAFP-DC + P60 (leeres Dreieck, n = 9), Ad-

Mock-DC + P60 (leeres Quadrat, $n = 9$), Ad-mAFP-DC + P301 (gefülltes Dreieck, $n = 6$), Ad-Mock-DC + P301 (gefülltes Quadrat, $n = 6$), unbehandelte Kontrollgruppe (Kreis, $n = 5$). Jede Form der Vakzinierung führte zu einem Vorteil gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe. Eine signifikante Verlängerung des Überlebens konnte jedoch nur unter Therapie mit mAFP-exprimierenden DC zusammen mit P301 erreicht werden ($p = 0,03$). Der Vorteil der Vakzinierung in Kombination mit P60 war statistisch nicht signifikant ($p = 0,09$). 69

Abb.14: Überleben von Mäusen nach orthotoper Tumorinduktion durch Inokulation von Hepa129-Zellen in den linken Leberlappen unter Therapie mit adenoviral transduzierten DC und P60. Darstellung als Kaplan-Meier-Kurve. Die Vakzinierungen erfolgten an den Tagen 3 und 6 nach der Tumorinduktion, ab dem Tag der ersten Vakzinierung erhielten die Mäuse zudem täglich P60 bzw. das Kontrollpeptid P301 i.p. Sieben Behandlungs- bzw. Kontrollgruppen wurden gebildet: Ad-CD40L DC s.c. + P60 (leeres Dreieck, $n = 5$), Ad-CD40L DC s.c. + P301 (gefülltes Dreieck, $n = 5$), Ad-CD40L DC i.p. + P60 (leerer Stern, $n = 4$), Ad-CD40L DC i.p. + P301 (gefüllter Stern, $n = 4$), Ad-Mock-DC s.c. + P60 (zur besseren Übersicht nicht dargestellt), Ad-Mock-DC s.c. + P301 (zur besseren Übersicht nicht dargestellt), unbehandelte Kontrollgruppe (Kreis, $n = 2$). Eine Therapie mit Ad-CD40L transduzierten DC i.p. und P301 verlängerte das Überleben signifikant ($p = 0,01$). In Kombination mit P60 wurde dieser positive Einfluss jedoch vollständig aufgehoben. 71

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Modifiziertes BCLC Staging System, Therapie und Prognose des HCC nach den Leitlinien der EASL aus 2018 und der DGVS aus 2022 (Galle et al., 2018; Leitlinienprogramm Onkologie, 2022).	13
Tab. 2: Vektorenpartikel in opu/ml in verschiedenen Präparationen des Vektors Ad-mAFP nach Bestimmung der OD.	53
Tab. 3: Infektiöse Vektorenpartikel in pfu/ml in verschiedenen Präparationen des Vektors Ad-mAFP nach Auswertung des Plaque Assays.	53
Tab. 4: Das Verhältnis der Gesamtzahl an Vektorenpartikel zur Anzahl infektiöser Vektorenpartikel in Suspensionen von Ad-mAFP.	53
Tab. 5: Vektorenpartikel in opu/ml in verschiedenen Präparationen des Vektors Ad-LacZ nach Bestimmung der OD.	54
Tab. 6: Infektiöse Vektorenpartikel in pfu/ml in verschiedenen Präparationen des Vektors Ad-LacZ nach Auswertung des Plaque Assays.	54
Tab. 7: Das Verhältnis der Gesamtzahl an Vektorenpartikel zur Anzahl infektiöser Vektorenpartikel einer Suspension von Ad-LacZ.	54
Tab. 8: Vektorenpartikel in opu/ml in verschiedenen Präparationen des Vektors Ad-Mock nach Bestimmung der OD.	55
Tab. 9: Infektiöse Vektorenpartikel in pfu/ml in verschiedenen Präparationen des Vektors Ad-Mock nach Auswertung des Plaque Assays.	55
Tab. 10: Das Verhältnis der Gesamtzahl an Vektorenpartikel zur Anzahl infektiöser Vektorenpartikel einer Suspension des Leervektors Ad-Mock.	55
Tab. 11: Proteinkonzentration verschiedener Lysate von Hepa129-Zellen nach photometrischer Bestimmung.	56
Tab. 12: Anzahl der medullären Zellen nach Depletion von Erythrozyten, der DC-Vorläuferzellen nach negativer Selektion sowie der DC nach Kultivierung über 6	

Tage in Anwesenheit von mIL-4 und mGM-CSF. Angegeben sind jeweils die durchschnittlichen Zellzahlen pro Maus (Gesamtzahl Mäuse n = 54). 57

Tab. 13: Reduktion vitaler DC nach adenoviraler Transduktion in Abhängigkeit vom verwendeten adenoviralen Vektor. Angegeben sind die durchschnittlichen Zellzahlen vor und nach der Transduktion zusammen mit der Standardabweichung sowie die relative Zahl vitaler Zellen nach der Transduktion in Prozent (Anzahl der Transduktionen: Ad-mAFP n = 10, Ad-CD40L n = 2, Ad-Mock n = 12, Ad-LacZ n = 2). 59

8. Literaturverzeichnis

Abou-Alfa GK, Meyer T, Cheng A-L, El-Khoueiry AB, Rimassa L, Ryoo B-Y, Cicin I, Merle P, Chen Y, Park J-W, Blanc J-F, Bolondi L, Klümper H-J, Chan SL, Zagonel V, Pressiani T, Ryu M-H, Venook AP, Hessel C, Borgman-Hagey AE, Schwab G, Kelley RK. Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma. *N. Eng. J. Med.* 2018; 379: 54–63

Akinyemiju T, Abera S, Ahmed M, Alam N, Alemayohu MA, Allen C, Al-Raddadi R, Alvis-Guzman N, Amoako Y, Artaman A, Ayele TA, Barac A, Bensenor I, Berhane A, Bhutta Z, Castillo-Rivas J, Chitheer A, Choi J-Y, Cowie B, Dandona L, Dandona R, Dey S, Dicker D, Phuc H, Ekwueme DU, Zaki MES, Fischer F, Fürst T, Hancock J, Hay SI, Hotez P, Jee SH, Kasaeian A, Khader Y, Khang Y-H, Kumar A, Kutz M, Larson H, Lopez A, Lunevicius R, Malekzadeh R, McAlinden C, Meier T, Mendoza W, Mokdad A, Moradi-Lakeh M, Nagel G, Nguyen Q, Nguyen G, Ogbo F, Patton G, Pereira DM, Pourmalek F, Qorbani M, Radfar A, Roshandel G, Salomon JA, Sanabria J, Sartorius B, Satpathy M, Sawhney M, Sepanlou S, Shackelford K, Shore H, Sun J, Mengistu DT, Topór-Mądry R, Tran B, Ukwaja KN, Vlassov V, Vollset SE, Vos T, Wakayo T, Weiderpass E, Werdecker A, Yonemoto N, Younis M, Yu C, Zaidi Z, Zhu L, Murray CJL, Naghavi M, Fitzmaurice C. The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level: Results From the Global Burden of Disease Study 2015. *JAMA Oncol.* 2017; 3: 1683–1691

Attia P, Maker AV, Haworth LR, Rogers-Freezer L, Rosenberg SA. Inability of a fusion protein of IL-2 and diphtheria toxin (Denileukin Diftitox, DAB389IL-2, ONTAK) to eliminate regulatory T lymphocytes in patients with melanoma. *J. Immunother.* 2005; 28: 582–592

Baur AS, Lutz MB, Schierer S, Beltrame L, Theiner G, Zinser E, Ostalecki C, Heidkamp G, Haendle I, Erdmann M, Wiesinger M, Leisgang W, Gross S, Pommer AJ, Kämpgen E, Dudziak D, Steinkasserer A, Cavalieri D, Schuler-Thurner B, Schuler G. Denileukin diftitox (ONTAK) induces a tolerogenic phenotype in dendritic cells and stimulates survival of resting Treg. *Blood* 2013; 122: 2185–2194

Blalock LT, Landsberg J, Messmer M, Shi J, Pardee AD, Haskell R, Vujanovic L, Kirkwood JM, Butterfield LH. Human dendritic cells adenovirally-engineered to express three defined tumor antigens promote broad adaptive and innate immunity. *Oncoimmunology* 2012; 1: 287–357

Blumenthal GM, Cortazar P, Zhang JJ, Tang S, Sridhara R, Murgu A, Justice R, Pazdur R. FDA approval summary: sunitinib for the treatment of progressive well-differentiated locally advanced or metastatic pancreatic neuroendocrine tumors. *Oncologist* 2012; 17: 1108–1113

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: Cancer J. Clin.* 2018; 68: 394–424

Bray SM, Vujanovic L, Butterfield LH. Dendritic cell-based vaccines positively impact natural killer and regulatory T cells in hepatocellular carcinoma patients. *Clin. Dev. Immunol.* 2011; 2011: 249281

Brown ZJ, Greten TF. *Hepatocellular Carcinoma: Translational Precision Medicine Approaches* 2019

Bruix J, Qin S, Merle P, Granito A, Huang Y-H, Bodoky G, Pracht M, Yokosuka O, Rosmorduc O, Breder V, Gerolami R, Masi G, Ross PJ, Song T, Bronowicki J-P, Ollivier-Hourmand I, Kudo M, Cheng A-L, Llovet JM, Finn RS, LeBerre M-A, Baumhauer A, Meinhardt G, Han G. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2017; 389: 56–66

Butterfield LH, Ribas A, Potter DM, Economou JS. Spontaneous and vaccine induced AFP-specific T cell phenotypes in subjects with AFP-positive hepatocellular cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 2007; 56: 1931–1943

Byrne WL, Mills KHG, Lederer JA, O'Sullivan GC. Targeting regulatory T cells in cancer. *Cancer Res.* 2011; 71: 6915–6920

Cai Z, Su X, Qiu L, Li Z, Li X, Dong X, Wei F, Zhou Y, Luo L, Chen G, Chen H, Wang Y, Zeng Y, Liu X. Personalized neoantigen vaccine prevents postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients with vascular invasion. *Mol. Cancer* 2021; 20: 164

Casares N, Rudilla F, Arribillaga L, Llopiz D, Riezu-Boj JI, Lozano T, López-Sagaseta J, Guembe L, Sarobe P, Prieto J, Borrás-Cuesta F, Lasarte JJ. A peptide inhibitor of FOXP3 impairs regulatory T cell activity and improves vaccine efficacy in mice. *J. Immunol.* 2010; 185: 5150–5159

Chand Dakal T, Dhabhai B, Agarwal D, Gupta R, Nagda G, Meena AR, Dhakar R, Menon A, Mathur R, Mona, Yadav V, Sharma A. Mechanistic basis of co-stimulatory CD40-CD40L ligation mediated regulation of immune responses in cancer and autoimmune disorders. *Immunobiology* 2020; 225: 151899

Chau I, Peck-Radosavljevic M, Borg C, Malfertheiner P, Seitz JF, Park JO, Ryoo B-Y, Yen C-J, Kudo M, Poon R, Pastorelli D, Blanc J-F, Chung HC, Baron AD, Okusaka T, Bowman L, Cui ZL, Girvan AC, Abada PB, Yang L, Zhu AX. Ramucirumab as second-line treatment in patients with advanced hepatocellular carcinoma following first-line therapy with sorafenib: Patient-focused outcome results from the randomised phase III REACH study. *Eur. J. Cancer* 2017; 81: 17–25

Cheng A-L, Kang Y-K, Lin D-Y, Park J-W, Kudo M, Qin S, Chung H-C, Song X, Xu J, Poggi G, Omata M, Pitman Lowenthal S, Lanzalone S, Yang L, Lechuga MJ, Raymond E. Sunitinib versus sorafenib in advanced hepatocellular cancer: results of a randomized phase III trial. *J. Clin. Oncol.* 2013; 31: 4067–4075

Dannull J, Su Z, Rizzieri D, Yang BK, Coleman D, Yancey D, Zhang A, Dahm P, Chao N, Gilboa E, Vieweg J. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J. Clin. Invest.* 2005; 115: 3623–3633

Dessureault S, Noyes D, Lee D, Dunn M, Janssen W, Cantor A, Sotomayor E, Messina J, Antonia SJ. A phase-I trial using a universal GM-CSF-producing and CD40L-expressing bystander cell line (GM.CD40L) in the formulation of autologous tumor cell-based vaccines for cancer patients with stage IV disease. *Ann. Surg. Oncol.* 2007; 14: 869–884

Doi T, Muro K, Ishii H, Kato T, Tsushima T, Takenoyama M, Oizumi S, Gemmoto K, Suna H, Enokitani K, Kawakami T, Nishikawa H, Yamamoto N. A Phase I Study of the Anti-CC Chemokine Receptor 4 Antibody, Mogamulizumab, in Combination with Nivolumab in Patients with Advanced or Metastatic Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* 2019; 25: 6614–6622

El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol.* 2012; 142: 1264-1273.e1

Europäische Arzneimittelagentur. EMA review of Zinbryta confirms medicine's risks outweigh its benefits. Verfügbar unter <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-review-zinbryta-confirms-medicines-risks-outweigh-its-benefits> (Zugriffsdatum: 05.04.2021)

Evdokimova VN, Liu Y, Potter DM, Butterfield LH. AFP-specific CD4+ helper T-cell responses in healthy donors and HCC patients. *J. Immunother.* 2007; 30: 425–437

Fallaux FJ, Kranenburg O, Cramer SJ, Houweling A, van Ormondt H, Hoeben RC, van der Eb AJ. Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 1996; 7: 215–222

Finn RS, Qin S, Ikeda M, Galle PR, Ducreux M, Kim T-Y, Kudo M, Breder V, Merle P, Kaseb AO, Li D, Verret W, Xu D-Z, Hernandez S, Liu J, Huang C, Mulla S, Wang Y, Lim HY, Zhu AX, Cheng A-L. Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N. Eng. J. Med.* 2020a; 382: 1894–1905

Finn RS, Ryoo B-Y, Merle P, Kudo M, Bouattour M, Lim HY, Breder V, Edeline J, Chao Y, Ogasawara S, Yau T, Garrido M, Chan SL, Knox J, Daniele B, Ebbinghaus SW, Chen E, Siegel AB, Zhu AX, Cheng A-L. Pembrolizumab As Second-Line Therapy in Patients With

Advanced Hepatocellular Carcinoma in KEYNOTE-240: A Randomized, Double-Blind, Phase III Trial. *J. Clin. Oncol.* 2020b; 38: 193–202

Flecken T, Schmidt N, Hild S, Gostick E, Drognitz O, Zeiser R, Schemmer P, Bruns H, Eiermann T, Price DA, Blum HE, Neumann-Haefelin C, Thimme R. Immunodominance and functional alterations of tumor-associated antigen-specific CD8⁺ T-cell responses in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2014; 59: 1415–1426

Flecken T, Schmidt N, Spangenberg HC, Thimme R. Das hepatozelluläre Karzinom - von der Immunbiologie zur Immuntherapie. *Z. Gastroenterol.* 2012a; 50: 47–56

Flecken T, Spangenberg HC, Thimme R. Immunobiology of hepatocellular carcinoma. *Langenbeck's Arch. Surg.* 2012b; 397: 673–680

Fu J, Xu D, Liu Z, Shi M, Zhao P, Fu B, Zhang Z, Yang H, Zhang H, Zhou C, Yao J, Jin L, Wang H, Yang Y, Fu Y-X, Wang F-S. Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterol.* 2007; 132: 2328–2339

Galle, Alejandro Forner, Josep M. Llovet, Vincenzo Mazzaferro, Fabio Piscaglia, Jean-Luc Raoul, Peter Schirmacher, Valérie Vilgrain, European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatology*. 2018; 69: 182–236

Gao Q, Qiu S-J, Fan J, Zhou J, Wang X-Y, Xiao Y-S, Xu Y, Li Y-W, Tang Z-Y. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25: 2586–2593

Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, Parcellier A, Cathelin D, Garrido C, Chauffert B, Solary E, Bonnotte B, Martin F. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur. J. Immunol.* 2004; 34: 336–344

Ghouri YA, Mian I, Rowe JH. Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis. *J. Carcinog.* 2017; 16: 1

Giraud J, Chalopin D, Blanc J-F, Saleh M. Hepatocellular Carcinoma Immune Landscape and the Potential of Immunotherapies. *Frontiers in Immunology* 2021; 12: 655697

Golgher D, Jones E, Powrie F, Elliott T, Gallimore A. Depletion of CD25+ regulatory cells uncovers immune responses to shared murine tumor rejection antigens. *Eur. J. Immunol.* 2002; 32: 3267–3275

Gonzalez-Carmona MA, Lukacs-Kornek V, Timmerman A, Shabani S, Kornek M, Vogt A, Yildiz Y, Sievers E, Schmidt-Wolf IGH, Caselmann WH, Sauerbruch T, Schmitz V. CD40ligand-expressing dendritic cells induce regression of hepatocellular carcinoma by activating innate and acquired immunity in vivo. *Hepatology.* 2008; 48: 157–168

González-Carmona MA, Märten A, Hoffmann P, Schneider C, Sievers E, Schmidt-Wolf IGH, Sauerbruch T, Caselmann WH. Patient-derived dendritic cells transduced with an a-fetoprotein-encoding adenovirus and co-cultured with autologous cytokine-induced lymphocytes induce a specific and strong immune response against hepatocellular carcinoma cells. *Liver Int.* 2006; 26: 369–379

Greten TF, Ormandy LA, Fikuart A, Höchst B, Henschen S, Hörning M, Manns MP, Korangy F. Low-dose cyclophosphamide treatment impairs regulatory T cells and unmasks AFP-specific CD4+ T-cell responses in patients with advanced HCC. *J. Immunother.* 2010; 33: 211–218

Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2002; 20: 621–667

Hanke P, Serwe M, Dombrowski F, Sauerbruch T, Caselmann WH. DNA vaccination with AFP-encoding plasmid DNA prevents growth of subcutaneous AFP-expressing tumors

and does not interfere with liver regeneration in mice. *Cancer Gene Ther* 2002; 9: 346–355

Hillebrand RM, Vogt A, Strassburg CP, Gonzalez-Carmona MA, Schmidt-Wolf IGH. Immune Check Point CD40-CD40L Activates Dendritic and Effector Cells Against Human Renal Carcinoma Cells. *Anticancer Res.* 2019; 39: 4643–4652

Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 1992; 176: 1693–1702

Irie M, Homma S, Komita H, Zeniya M, Kufe D, Ohno T, Toda G. Inhibition of spontaneous development of liver tumors by inoculation with dendritic cells loaded with hepatocellular carcinoma cells in C3H/HeNCRJ mice. *Int. J. Cancer* 2004; 111: 238–245

Iwashita Y, Tahara K, Goto S, Sasaki A, Kai S, Seike M, Chen C-L, Kawano K, Kitano S. A phase I study of autologous dendritic cell-based immunotherapy for patients with unresectable primary liver cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 2003; 52: 155–161

Jacobs JFM, Punt CJA, Lesterhuis WJ, Suttmuller RPM, Brouwer HM-LH, Scharenborg NM, Klasen IS, Hilbrands LB, Figdor CG, Vries IJM de, Adema GJ. Dendritic cell vaccination in combination with anti-CD25 monoclonal antibody treatment: a phase I/II study in metastatic melanoma patients. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16: 5067–5078

Kobayashi N, Hiraoka N, Yamagami W, Ojima H, Kanai Y, Kosuge T, Nakajima A, Hirohashi S. FOXP3⁺ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 902–911

Kudo M, Finn RS, Qin S, Han K-H, Ikeda K, Piscaglia F, Baron A, Park J-W, Han G, Jassem J, Blanc JF, Vogel A, Komov D, Evans TRJ, Lopez C, Dutcus C, Guo M, Saito K, Kraljevic S, Tamai T, Ren M, Cheng A-L. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment

of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* 2018; 391: 1163–1173

Kulik L, El-Serag HB. Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterol.* 2019; 156: 477-491.e1

Kurose K, Ohue Y, Wada H, Iida S, Ishida T, Kojima T, Doi T, Suzuki S, Isobe M, Funakoshi T, Kakimi K, Nishikawa H, Uono H, Oka M, Ueda R, Nakayama E. Phase Ia Study of FoxP3+ CD4 Treg Depletion by Infusion of a Humanized Anti-CCR4 Antibody, KW-0761, in Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* 2015; 21: 4327–4336

Ladhams A, Schmidt C, Sing G, Butterworth L, Fielding G, Tesar P, Strong R, Leggett B, Powell L, Maddern G, Ellem K, Cooksley G. Treatment of non-resectable hepatocellular carcinoma with autologous tumor-pulsed dendritic cells. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2002; 17: 889–896

Lang H, Sotiropoulos GC, Brokalaki EI, Schmitz KJ, Bertona C, Meyer G, Frilling A, Paul A, Malagó M, Broelsch CE. Survival and recurrence rates after resection for hepatocellular carcinoma in noncirrhotic livers. *J. Am. Coll. Surg.* 2007; 205: 27–36

Langhans B, Nischalke HD, Krämer B, Dold L, Lutz P, Mohr R, Vogt A, Toma M, Eis-Hübinger AM, Nattermann J, Strassburg CP, Gonzalez-Carmona MA, Spengler U. Role of regulatory T cells and checkpoint inhibition in hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2019; 68: 2055–2066

Lee J-H, Lee Y, Lee M, Heo MK, Song J-S, Kim K-H, Lee H, Yi N-J, Lee K-W, Suh K-S, Bae Y-S, Kim YJ. A phase I/IIa study of adjuvant immunotherapy with tumour antigen-pulsed dendritic cells in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2015; 113: 1666–1676

Lee J-H, Tak WY, Lee Y, Heo M-K, Song J-S, Kim H-Y, Park SY, Bae SH, Lee JH, Heo J, Kim K-H, Bae Y-S, Kim YJ. Adjuvant immunotherapy with autologous dendritic cells for

hepatocellular carcinoma, randomized phase II study. *Oncoimmunology* 2017; 6: e1328335

Lee W-C, Wang H-C, Hung C-F, Huang P-F, Lia C-R, Chen M-F. Vaccination of advanced hepatocellular carcinoma patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells: a clinical trial. *J. Immunother.* 2005; 28: 496–504

Leitlinienprogramm Onkologie. 2022. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome Langversion 3.0, 2022, AWMF-Registernummer: 032/053OL, <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/hcc-und-biliaere-karzinome/> (Zugriffsdatum: 15.04.2023)

Li C, Jiang P, Wei S, Xu X, Wang J. Regulatory T cells in tumor microenvironment: new mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects. *Mol. Cancer* 2020; 19: 116

Liu D, Li G, Avella DM, Kimchi ET, Kaifi JT, Rubinstein MP, Camp ER, Rockey DC, Schell TD, Staveley-O'Carroll KF. Sunitinib represses regulatory T cells to overcome immunotolerance in a murine model of hepatocellular cancer. *Oncoimmunology* 2017; 7: e1372079

Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc J-F, Oliveira AC de, Santoro A, Raoul J-L, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz J-F, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N. Eng. J. Med.* 2008; 359: 378–390
Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol. Chem.* 1951; 193: 265–275

Lozano T, Casares N, Martil-Otal C, Anega B, Gorraiz M, Parker J, Ruiz M, Belsúe V, Pineda-Lucena A, Oyarzabal J, Lasarte JJ. Searching for Peptide Inhibitors of T

Regulatory Cell Activity by Targeting Specific Domains of FOXP3 Transcription Factor. *Biomedicines* 2021; 9

Lozano T, Gorraiz M, Lasarte-Cía A, Ruiz M, Rabal O, Oyarzabal J, Hervás-Stubbs S, Llopiz D, Sarobe P, Prieto J, Casares N, Lasarte JJ. Blockage of FOXP3 transcription factor dimerization and FOXP3/AML1 interaction inhibits T regulatory cell activity: sequence optimization of a peptide inhibitor. *Oncotarget* 2017; 8: 71709–71724

Lozano T, Villanueva L, Durántez M, Gorraiz M, Ruiz M, Belsúe V, Riezu-Boj JI, Hervás-Stubbs S, Oyarzábal J, Bandukwala H, Lourenço AR, Coffey PJ, Sarobe P, Prieto J, Casares N, Lasarte JJ. Inhibition of FOXP3/NFAT Interaction Enhances T Cell Function after TCR Stimulation. *J. Immunol.* 2015; 195: 3180–3189

Luke JJ, Zha Y, Matijevich K, Gajewski TF. Single dose denileukin diftitox does not enhance vaccine-induced T cell responses or effectively deplete Tregs in advanced melanoma: immune monitoring and clinical results of a randomized phase II trial. *J. Immunother. Cancer* 2016; 4: 35

Ma X, Liu Z, Yang X, Gao Q, Zhu S, Qin C, Liu K, Zhang B, Han D, Wang F, Tian J. Dual-modality monitoring of tumor response to cyclophosphamide therapy in mice with bioluminescence imaging and small-animal positron emission tomography. *Mol. Imaging* 2011; 10: 278–283

Makarova-Rusher OV, Medina-Echeverez J, Duffy AG, Greten TF. The yin and yang of evasion and immune activation in HCC. *J. Hepatol.* 2015; 62: 1420–1429

Malmström P-U, Loskog ASI, Lindqvist CA, Mangsbo SM, Fransson M, Wanders A, Gårdmark T, Tötterman TH. AdCD40L immunogene therapy for bladder carcinoma--the first phase I/IIa trial. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16: 3279–3287

McGlynn KA, Petrick JL, El-Serag HB. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatol.* 2021; 73 Suppl 1: 4–13

Moon AM, Singal AG, Tapper EB. Contemporary Epidemiology of Chronic Liver Disease and Cirrhosis. *Clin Gastroenterol. Hepatol.* 2020; 18: 2650–2666

Moreno Ayala MA, Gottardo MF, Imsen M, Asad AS, Bal de Kier Joffé E, Casares N, Lasarte JJ, Seilicovich A, Candolfi M. Therapeutic blockade of Foxp3 in experimental breast cancer models. *Breast Cancer Res. Treat.* 2017; 166: 393–405

Morse MA, Hobeika AC, Osada T, Serra D, Niedzwiecki D, Lyerly HK, Clay TM. Depletion of human regulatory T cells specifically enhances antigen-specific immune responses to cancer vaccines. *Blood* 2008; 112: 610–618

Nagayama Y, Hase W, Motoyoshi Y, Saitoh O, Sogawa R, Nakao K. Distinct responses of two hepatocellular carcinoma cell lines of a similar origin to immunotherapies targeting regulatory or effector T cells. *Oncol. Rep.* 2007; 17: 1269–1273

Nault J-C, Sutter O, Nahon P, Ganne-Carrié N, Séror O. Percutaneous treatment of hepatocellular carcinoma: State of the art and innovations. *J. Hepatol.* 2018; 68: 783–797

Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2005; 65: 2457–2464

Palmer DH, Midgley RS, Mirza N, Torr EE, Ahmed F, Steele JC, Steven NM, Kerr DJ, Young LS, Adams DH. A phase II study of adoptive immunotherapy using dendritic cells pulsed with tumor lysate in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatol.* 2009; 49: 124–132

Pardee AD, Yano H, Weinstein AM, Ponce AAK, Ethridge AD, Normolle DP, Vujanovic L, Mizejewski GJ, Watkins SC, Butterfield LH. Route of antigen delivery impacts the immunostimulatory activity of dendritic cell-based vaccines for hepatocellular carcinoma. *J. Immunother. Cancer* 2015; 3: 32

Park J, Kwon M, Shin E-C. Immune checkpoint inhibitors for cancer treatment. *Arch. Pharm. Res.* 2016; 39: 1577–1587

Park J-W, Chen M, Colombo M, Roberts LR, Schwartz M, Chen P-J, Kudo M, Johnson P, Wagner S, Orsini LS, Sherman M. Global patterns of hepatocellular carcinoma management from diagnosis to death: the BRIDGE Study. *Liver Int.* 2015; 35: 2155–2166

Peng B-G, Liang L-J, He Q, Kuang M, Lia J-M, Lu M-D, Huang J-F. Tumor vaccine against recurrence of hepatocellular carcinoma. *World. J. Gastroenterol.* 2005; 11: 700–704

Prieto J, Melero I, Sangro B. Immunological landscape and immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2015; 12: 681–700

Rech AJ, Mick R, Martin S, Recio A, Aqui NA, Powell DJ, Colligon TA, Trosko JA, Leinbach LI, Pletcher CH, Tweed CK, DeMichele A, Fox KR, Domchek SM, Riley JL, Vonderheide RH. CD25 blockade depletes and selectively reprograms regulatory T cells in concert with immunotherapy in cancer patients. *Sci. Transl. Med.* 2012; 4: 134ra62

Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland | 2015/2016 | Leber C22 2019

Rüter J, Antonia SJ, Burris HA, Huhn RD, Vonderheide RH. Immune modulation with weekly dosing of an agonist CD40 antibody in a phase I study of patients with advanced solid tumors. *Cancer Biol. Ther.* 2010; 10: 983–993

Sadeghlar F, Seelemann J, Vogt A, Möhring C, Zhou T, Mahn R, Kornek M, Lukacs-Kornek V, Casares N, Lasarte JJ, Sarobe P, van Beekum C, Matthaei H, Manekeller S, Kalff J, Schmidt-Wolf IGH, Strassburg CP, Gonzalez-Carmona MA. Regulatory T Cell Inhibition by P60 Combined with Adenoviral AFP Transduced Dendritic Cells for Immunotherapy of Hepatocellular Carcinoma. *Immunological Investigations* 2023; 52: 966–984

Sadeghlar F, Vogt A, Mohr RU, Mahn R, van Beekum K, Kornek M, Weismüller TJ, Branchi V, Matthaei H, Toma M, Schmidt-Wolf IGH, Kalff JC, Strassburg CP, González-Carmona MA. Induction of cytotoxic effector cells towards cholangiocellular, pancreatic, and colorectal tumor cells by activation of the immune checkpoint CD40/CD40L on dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 2020: 1–14

Sakaguchi S, Powrie F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science (New York, N.Y.)* 2007; 317: 627–629

Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133: 775–787

Schmidt N, Neumann-Haefelin C, Thimme R. Cellular immune responses to hepatocellular carcinoma: lessons for immunotherapy. *Dig. Dis.* 2012; 30: 483–491

Schmitz V, Tirado-Ledo L, Tiemann K, Raskopf E, Heinicke T, Ziske C, González-Carmona MA, Rabe C, Wernert N, Prieto J, Qian C, Sauerbruch T, Caselmann WH. Establishment of an orthotopic tumour model for hepatocellular carcinoma and non-invasive in vivo tumour imaging by high resolution ultrasound in mice. *J. Hepatol.* 2004; 40: 787–791

Schumacher L, Ribas A, Dissette VB, McBride WH, Mukherji B, Economou JS, Butterfield LH. Human dendritic cell maturation by adenovirus transduction enhances tumor antigen-specific T-cell responses. *J. Immunother.* 2004; 27: 191–200

Schütt C, Bröker B. *Grundwissen Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 2011

Setiawan MF, Rudan O, Vogt A, Gonzalez-Carmona MA, Langhans B, Schmidt-Wolf R, Garofano F, Strassburg CP, Lasarte JJ, Casares N, Lozano T, Weiher H, Schmidt-Wolf IGH. FOXP3 Inhibitory Peptide P60 Increases Efficacy of Cytokine-induced Killer Cells Against Renal and Pancreatic Cancer Cells. *Anticancer Res.* 2019; 39: 5369–5374

Shen X, Li N, Li H, Zhang T, Wang F, Li Q. Increased prevalence of regulatory T cells in the tumor microenvironment and its correlation with TNM stage of hepatocellular carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2010; 136: 1745–1754

Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J. Immunol.* 1999; 163: 5211–5218

Tan C, Reddy V, Dannull J, Ding E, Nair SK, Tyler DS, Pruitt SK, Lee WT. Impact of anti-CD25 monoclonal antibody on dendritic cell-tumor fusion vaccine efficacy in a murine melanoma model. *J. Transl. Med.* 2013; 11: 148

Taniguchi M, Mizuno S, Yoshikawa T, Fujinami N, Sugimoto M, Kobayashi S, Takahashi S, Konishi M, Gotohda N, Nakatsura T. Peptide vaccine as an adjuvant therapy for glypican-3-positive hepatocellular carcinoma induces peptide-specific CTLs and improves long prognosis. *Cancer Sci* 2020; 111: 2747–2759

ThermoFisher. Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Verfügbar unter <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225> (Zugriffsdatum: 03.02.2022)

Théry C, Amigorena S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 2001; 13: 45–51

Tsuchiya N, Sawada Y, Endo I, Saito K, Uemura Y, Nakatsura T. Biomarkers for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 2015; 21: 10573–10583

Unitt E, Rushbrook SM, Marshall A, Davies S, Gibbs P, Morris LS, Coleman N, Alexander GJM. Compromised lymphocytes infiltrate hepatocellular carcinoma: the role of T-regulatory cells. *Hepatol.* 2005; 41: 722–730

van Coillie S, Wiernicki B, Xu J. Molecular and Cellular Functions of CTLA-4. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2020; 1248: 7–32

Vogel A, Cervantes A, Chau I, Daniele B, Llovet JM, Meyer T, Nault J-C, Neumann U, Ricke J, Sangro B, Schirmacher P, Verslype C, Zech CJ, Arnold D, Martinelli E. Hepatocellular carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 2018; 29: iv238-iv255

Vogel A, Martinelli E. Updated treatment recommendations for hepatocellular carcinoma (HCC) from the ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2021; 32: 801–805

Vogt A, Sadeghlar F, Ayub TH, Schneider C, Möhring C, Zhou T, Mahn R, Bartels A, Praktiknjo M, Kornek MT, Toma M, Schmidt-Wolf IGH, Branchi V, Matthaei H, Kalff JC, Strassburg CP, Gonzalez-Carmona MA. Alpha-Fetoprotein- and CD40Ligand-Expressing Dendritic Cells for Immunotherapy of Hepatocellular Carcinoma. *Cancers* 2021; 13: 3375

Vogt A, Sievers E, Lukacs-Kornek V, Decker G, Raskopf E, Meumann N, Büning H, Sauerbruch T, Strassburg CP, Schmidt-Wolf IGH, Gonzalez-Carmona MA. Improving immunotherapy of hepatocellular carcinoma (HCC) using dendritic cells (DC) engineered to express IL-12 in vivo. *Liver Int.* 2014; 34: 447–461

Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EIH, Huizinga TWJ, Toes REM. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37: 129–138

Wang X, Wang Q. Alpha-Fetoprotein and Hepatocellular Carcinoma Immunity. *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2018; 2018: 9049252

Whiteside TL. What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why? *Semin. Cancer Biol.* 2012; 22: 327–334

Yau T, Kang Y-K, Kim T-Y, El-Khoueiry AB, Santoro A, Sangro B, Melero I, Kudo M, Hou M-M, Matilla A, Tovoli F, Knox JJ, Ruth He A, El-Rayes BF, Acosta-Rivera M, Lim H-Y, Neely J, Shen Y, Wisniewski T, Anderson J, Hsu C. Efficacy and Safety of Nivolumab Plus

Ipilimumab in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma Previously Treated With Sorafenib: The CheckMate 040 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2020; 6

Zhong L, Granelli-Piperno A, Choi Y, Steinman RM. Recombinant adenovirus is an efficient and non-perturbing genetic vector for human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29: 964–972

Zhou J, Ding T, Pan W, Zhu L-Y, Li L, Zheng L. Increased intratumoral regulatory T cells are related to intratumoral macrophages and poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients. *Int. J. Cancer* 2009; 125: 1640–1648

Ziogas IA, Evangeliou AP, Giannis D, Hayat MH, Mylonas KS, Tohme S, Geller DA, Elias N, Goyal L, Tsoulfas G. The Role of Immunotherapy in Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review and Pooled Analysis of 2,402 Patients. *Oncologist* 2020

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Fertigstellung der Promotion unterstützt haben.

Für die Betreuung dieser Arbeit danke ich Frau PD Dr. med. M. A. Gonzalez-Carmona. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Annabelle Vogt, die mir ab dem ersten Tag bis zum Abschluss der Arbeit stets kompetent und freundlich bei Fragen und Problemen weiterhalf und mich bei der Durchführung der Experimente unterstützt hat, wie auch Frau Dr. Farsaneh Sardeglar, die insbesondere im Endspurt zur Fertigstellung dieser Arbeit unterstützend zur Seite stand. Bedanken möchte ich mich auch bei Michael Gentz für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Vielen Dank an meine Eltern, Großeltern und meinen Partner sowie alle Freunde, die mir stets unterstützend zur Seite standen.