

**Aufhebung der Immuntoleranz im Tumormikromilieu primärer Melanome im
Hgf-Cdk4^{R24C}-Mausmodell durch eine kombinierte Chemo-Immuntherapie**

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

**Judith Dorothee Kohlmeyer
aus Bonn**

2010

Angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Tüting
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Peter Brossart

Tag der Mündlichen Prüfung: 16. September 2010

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, Universitätsklinikum Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. ès. sci. Thomas Bieber

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	9
1.1. Experimentelle Grundlagen der Immunabwehr maligner Tumoren	9
1.2. Immunologie des malignen Melanoms beim Menschen	11
1.3. Melanomspezifische zytotoxische T-Zellen in Mausmodellen	13
1.4. Genetisch erzeugte Tumormodelle der Maus	15
1.5. Ziele und Hypothesen der Arbeit	17
2. Materialien und Methoden	18
2.1. Verwendete Substanzen	18
2.2. Mäuse und Zuchtverfahren	25
2.3. Induktion von autochthonen Melanomen in Hgf-Cdk4 ^{R24C} -Mäusen	26
2.4. Transplantationsexperimente	26
2.5. Adoptiver T-Zell-Transfer und Chemo-Immuntherapie	27
2.6. Isolation von Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten	27
2.7. Isolation und Aufreinigung von Tumorzellen	28
2.8. Durchflusszytometrische Färbungen und Analyse	28
2.9. Histologie und Immunhistochemie	29
2.10. Immunfluoreszenz	30
2.11. Quantitative Real-Time-PCR	30
2.12. Elispot	32
2.13. Digitale Fotodokumentation	33
2.14. Statistische Analysen	33
3. Ergebnisse	34
3.1. Immuntoleranz im Tumormikromilieu primärer Melanome	34
3.2. Aufhebung der lokalen Immuntoleranz durch Aktivierung des angeborenen Immunsystems nach dem Vorbild einer Virusinfektion	44
3.3. Zytotoxische Zerstörung primärer Melanome durch kombinierte Chemo- Immuntherapie	51
3.4. Komplettremission sporadischer primärer Melanome in Hgf-Cdk4 ^{R24C} -Mäusen	57
4. Diskussion	60
4.1. Analyse zytotoxischer T-Zell-Funktionen im Mikromilieu primärer Tumoren	60

4.2	Mechanismen der Immuntoleranz in primären Tumoren.....	61
4.3	Aktivierung des angeborenen Immunsystems	62
4.4	Tumorimmunität und Autoimmunität	64
4.5	Immun-Escape-Mechanismen.....	66
4.6	Perspektiven für die klinische Übertragung.....	66
5.	Zusammenfassung.....	68
6.	Literaturverzeichnis.....	69
7.	Danksagung.....	78

Abkürzungsverzeichnis

Ad	Adenovirus
A. dest.	destilliertes Wasser
Ad-hgp100	Rekombinanter hgp100 kodierender Adenovirus
as	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
Cdk4	cyclin dependent kinase 4
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
Cy	Cyclophosphamid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
DC	Dendritische Zelle(n)
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HGF	hepatocyte growth factor
HPV	humane Papillomviren
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
Lk	Lymphknoten
LZ	Lymphozyten
MDA5	melanoma-differentiation-associated gene 5
MHC	major histocompatibility complex
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
polyI:C	Polyinosin-Polycytidylsäure
RIG-I	retinoic-acid-inducible protein I
RT-PCR	reverse Transkriptase-Kettenreaktion
Rpm	Umdrehungen pro Minute
TGF- β	transforming growth factor beta

TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	Tumor-Nekrosefaktor alpha
Trp1/2	tyrosinase related protein 1 bzw. 2
TZR	T-Zell-Rezeptor
TZRtg	T-Zell-Rezeptor transgen

1. Einleitung

1.1. Experimentelle Grundlagen der Immunabwehr maligner Tumoren

Bereits Paul Ehrlich postulierte in seinem Vortrag „Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung“ 1908 in Amsterdam eine „Schutzvorrichtung des Organismus“ gegenüber Karzinomen und zog in selbigem auch den Schluss, dass der tierexperimentelle Ansatz „die kleinen Versuchstiere in einfacher und sicherer Weise gegen die Infektion mit Tumormaterial von kolossalster Virulenz zu schützen, (...) in gleicher Weise auch beim Menschen zu erzielen“ sei (Ehrlich, 1908). Die experimentelle Entwicklung einer effektiven immuntherapeutischen Strategie gegen maligne Tumoren hat zahlreiche Forscher im Verlauf der letzten 100 Jahre beschäftigt.

Transplantationsversuche mit viral oder chemisch induzierten Tumoren in Inzucht-Mausstämmen zeigten, dass das zelluläre Immunsystem prinzipiell in der Lage ist, maligne Tumoren zu erkennen und zu kontrollieren. Diese Beobachtungen führten zu dem von Lewis Thomas und Frank MacFarlane Burnet entwickelten und bis heute viel diskutierten Konzept der „immunological tumor surveillance“ (Thomas, 2009; Burnet, 1970). Spontan auftretende Maus-Tumoren erwiesen sich hingegen als weit weniger immunogen (Hewitt et al., 1976). Nicht zuletzt deshalb wurde die physiologische Bedeutung des Immunsystems für die Tumorabwehr sehr kontrovers diskutiert (Klein und Klein, 1977). Die Arbeitsgruppe von Boon zeigte jedoch durch Mutagenese-Experimente und Immunselektion *in vitro* auch bei spontanen, wenig immunogenen Maus-Tumoren zweifelsfrei eine auf T-Zellen basierende Immunerkennung (Boon und Maryanski, 1985). In weiterführenden Arbeiten gelang es, P1A als erstes, von T-Zellen erkanntes „Cancer-Testis“ Tumor-Antigen in der Maus molekular zu identifizieren (van der Bruggen et al., 1991). Die Übertragung der in der Maus etablierten Strategien zur Charakterisierung der von T-Zellen erkannten Antigene auf das humane System ermöglichte die Entdeckung des ersten humanen Tumorantigens „MAGE“ im malignen Melanom. MAGE zählt ebenfalls zu den „Cancer-Testis“ Antigenen, die außer in malignen Tumoren nur im Hodengewebe natürlicherweise exprimiert werden (van der Bruggen et al., 1991).

Die herausragende Bedeutung der zellulären Immunabwehr maligner Tumoren wurde durch Experimente mit genetisch veränderten Tumorzellen bestärkt. So bewirkt die Expression von

immunstimulierenden Zytokinen (i.e. GM-CSF, IFN-alpha, IL-2, IL-12) bzw. von kostimulatorischen Molekülen (i.e. B7.1) in wenig immunogenen Tumorzellen (i.e. B16 Melanomzellen) eine Immunerkennung und –abwehr in Tumortransplantations-Experimenten (Tüting et al., 1997; Musiani et al., 1997). Die überraschende Effektivität von GM-CSF, das nicht als Wachstumsfaktor für T-Zellen, sondern für myeloide (und insbesondere dendritische) Zellen wirkt (Dranoff et al., 1993), deutete auf die zentrale Rolle von antigen-präsentierenden Zellen für die Regulation der zellulären Immunabwehr hin. Dendritische Zellen (DC) stellen ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunabwehr dar. Heute ist klar, dass Tumorantigene von DC aufgenommen und zu Peptiden prozessiert werden, die an MHC-Moleküle gebunden und im drainierenden Lymphknoten naiven T-Zellen präsentiert werden. Eine der Voraussetzungen für die Stimulation einer spezifischen zellulären Immunabwehr ist eine Aktivierung der DC. Natürlicherweise erfolgt diese über die Erkennung von Pathogenen durch Rezeptoren der angeborenen Immunabwehr, den sogenannten „pattern recognition“-Rezeptoren. Dazu zählen beispielsweise Toll-like-Rezeptoren (TLR) und zytosolische Helikasen wie MDA5 und RIG-I (RLR, RIG-I-like Rezeptoren), deren Liganden virale Nukleinsäuren sind (Kato et al., 2006). Nach solch einer Rezeptorstimulation erfolgt die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, wie z.B. Typ-I Interferonen, die die Voraussetzung einer erfolgreichen T-Zell-Aktivierung ist (Longhi et al., 2009).

Die Erkenntnis, dass die Aktivierung des angeborenen Immunsystems für eine wirksame Stimulation von T-Zellen notwendig ist, versucht man sich heute bei der Induktion einer Tumorspezifischen T-Zell-Antwort zu Nutze zu machen: Nach dem Vorbild einer viralen Infektion werden so synthetische Liganden der „pattern recognition“-Rezeptoren eingesetzt, um dendritische Zellen zu aktivieren und eine Tumorerkennung einzuleiten. In Experimenten mit tumortragenden Mäusen erwiesen sich beispielsweise Doppelstrang-RNA (z.B. Poly I:C) und CpG-DNA als wirksame Adjuvantien zur Etablierung einer antitumoralen Immunantwort (Whitmore et al., 2004); Agonisten des RIG-I-Rezeptors trugen zur Regression von B16 Melanomen bei (Poeck et al., 2008).

In tierexperimentellen Studien wurden zahlreiche Strategien zur Aktivierung einer gegen spezifische Tumor-Antigene gerichteten zellulären Immunabwehr erprobt. Dabei fanden u.a. synthetische Peptide (Mandelboim et al., 1995), rekombinante Proteine (Mayordomo et al.,

1995), rekombinante Plasmid-DNA und rekombinante Viren Verwendung (Overwijk et al., 1999), die zum Teil mit kultivierten DC oder immunstimulierenden Nukleinsäuren (TLR-Agonisten) als Adjuvans kombiniert wurden (Steitz et al., 2001; Tormo et al., 2006a). Die präklinische Optimierung der spezifischen Immuntherapie durch eine Kombination komplementärer Ansätze stellt gegenwärtig ein zentrales Interesse der immuntherapeutischen Forschung dar.

1.2. Immunologie des malignen Melanoms beim Menschen

Das maligne Melanom ist ein bösartiger Tumor der Melanozyten, der fast 90% der Todesfälle durch Hautkrebs verursacht. Das häufigere Auftreten im mittleren Lebensalter und die frühzeitige Neigung zur Metastasierung stellen eine große Herausforderung in der Dermatologie dar (Beddingfield, 2003). Da das Melanom sich zumeist an der Haut manifestiert - seltener liegt der Primarius beispielsweise in der Schleimhaut oder der Uvea -, ist es prinzipiell der Früherkennung durch Hautscreening-Verfahren und somit auch der rechtzeitigen, kompletten operativen Entfernung zugänglich. Eine dauerhafte Heilung in frühen Tumorstadien ist deshalb häufig möglich. Knotig und invasiv wachsende Melanome haben eine deutlich schlechtere Prognose als superfiziell spreitende Melanome, da sie sich eher metastasierend ausbreiten. Als wegweisender prognostischer Marker gilt deshalb die vertikale Eindringtiefe (Breslow, 1970). Ist bei einer Fernmetastasierung ein kurativer chirurgischer Eingriff nicht mehr möglich, beträgt die Überlebenszeit im Mittel nur noch 6-9 Monate. Derzeit existiert in diesen fortgeschrittenen Stadien keine definitive Therapie mit Aussicht auf Heilung. Die Chemotherapie und die Radiatio sind nur als palliative Optionen anzusehen. Seit über 25 Jahren stellt die Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Dacarbazin ein Standardverfahren bei Patienten mit metastasiertem malignem Melanom dar. Diese Therapie kann jedoch die Überlebenszeit nur in geringem Ausmaß verlängern (Serrone et al., 2000).

Die Korrelation von spontan regredierenden, superfiziell spreitenden Melanomen mit lymphozytärer Infiltration wurde mit einer besseren Prognose dieser Patienten assoziiert (Clemente et al., 1996). Dass Melanomzellen prinzipiell von Effektorzellen des Immunsystems erkannt und zielgerichtet zerstört werden können, konnte durch *in vitro* Studien mit Melanomzell-Linien und autologen T-Zell-Kulturen schon vor über 20 Jahren bewiesen werden

(Knuth et al., 1989). Die bereits oben erwähnte Charakterisierung der von T-Zellen erkannten Antigene ebnete neuen immuntherapeutischen Strategien den Weg (Boon et al., 2006).

IFN- α war das erste rekombinante Zytokin, das in der Behandlung von Melanomen eingesetzt wurde. Aufgrund seiner therapeutischen Wirkung in der adjuvanten Behandlung bei Melanompatienten mit einem hohen Rezidiv-Risiko wurde es zu einem festen Bestandteil in der klinischen Routineversorgung (Kirkwood et al., 2008). Als wesentlicher Wirkmechanismus der IFN- α -Therapie gilt heute die Unterstützung der Immunabwehr gegen Tumorzellen. Auch die Ergebnisse der Hochdosis-Therapie mit dem rekombinanten Zytokin Interleukin-2 (IL-2), einem Wachstumsfaktor für T-Zellen, der bei einer kleinen Subgruppe von Patienten mit metastasiertem malignen Melanom zu vollständigen Tumor-Regressionen führen kann, unterstützte Bestrebungen, eine gegen den Tumor gerichtete zelluläre Immunantwort therapeutisch auszunutzen (Atkins et al., 2000). Allerdings ist diese Therapieoption derzeit nur in den USA zugelassen, sehr kostspielig und kann wegen hoher Toxizität nur einem ausgewählten Patientenkollektiv an wenigen Zentren zu Gute kommen (Kirkwood et al., 2008).

Die molekulare Identifikation der von T-Zellen erkannten Melanom-Antigene (van der Bruggen et al., 1991) hat die Entwicklung von Vakzinierungs-Strategien zur Induktion einer gegen spezifische Antigene gerichteten Tumor-Immunabwehr beflügelt. Theoretisch können Tumorstoffe als eine zielgerichtete und gut verträgliche Therapieform angesehen werden, die aufgrund der Ausprägung eines immunologischen Gedächtnisses nachhaltig wirken sollte. Eine Vielzahl von Therapieansätzen zur Stimulation und Expansion von tumorreaktiven T-Zellen wurde in klinischen Evaluationsstudien geprüft. Beispielhaft seien hier die Vakzinierung mit synthetischen Peptiden und dendritischen Zellen (Jonuleit et al., 2001; Thurner et al., 1999) oder TLR-Agonisten (Speiser et al., 2005) als biologisches Adjuvans, der adoptive Transfer Tumorspezifischer T-Zellen (Rosenberg und Dudley, 2009) und nicht zuletzt die Gabe von Zytokinen selbst genannt. In allen Studien konnten eindrucksvolle Ergebnisse bei einigen wenigen Patienten erzielt werden. Bei der überwiegenden Mehrzahl der Probanden zeigte sich leider trotz Nachweis von vakzin-induzierten Effektor-T-Zellen im Tumorgewebe zumeist ein progressives Wachstum des Melanoms (Kirkwood et al., 2008; Rosenberg et al., 2004).

Als alternative Möglichkeit zur spezifischen Vakzinierung wurden Verfahren für den adoptiven Transfer von *ex vivo* expandierten, tumorspezifischen T-Zellen etabliert. Die Erfolge der Arbeitsgruppe von Rosenberg am NCI in Washington, die durch autologe Infusion von melanominfiltrierenden T-Zellen und Gabe von IL-2 bei einem zunehmend größeren Anteil der Patienten mit metastasiertem Tumorleiden teilweise komplette, langanhaltende Tumor-Regressionen erzielen konnten, unterstreichen eindrucksvoll die prinzipielle therapeutische Wirkung von T-Zellen beim Menschen (Rosenberg und Dudley, 2009).

Eine Vielzahl von (molekularen) Mechanismen wird für das Versagen von Vakzinierungsstrategien beim humanen Melanom diskutiert. Im Zentrum der Überlegungen stehen „Immune-Escape“-Mechanismen, die die Tumorzelle selbst und das umgebende Tumormikromilieu einbeziehen: Hierzu zählen unter anderem eine niedrige Expression von MHC-Molekülen oder der Verlust von spezifischen Antigenen, welche die Erkennbarkeit des Tumors durch Immunzellen erschweren. Weiterhin seien Veränderungen im Zytokinprofil und tumorassoziierte Suppressorzellen, die eine T-Zell-Aktivierung verhindern bzw. die Funktion von DC beeinträchtigen (Mantovani et al., 2008), zu nennen. Ein besseres Verständnis der Regulationsmechanismen der Immunabwehr im Tumor-Mikromilieu erscheint deshalb geboten, um neue, erfolgreichere therapeutische Strategien zu entwickeln.

1.3. Melanomspezifische zytotoxische T-Zellen in Mausmodellen

Die Interaktion zwischen Tumor- und Immunzellen im lebenden Organismus ist ein komplexer biologischer Vorgang. Um die verschiedenen Mechanismen zu verstehen, die einerseits zur Immun-Erkennung und Tumor-Regression sowie andererseits zur Immun-Evasion und Tumor-Progression führen, reichen *in vitro* gewonnene Erkenntnisse über die molekularen Grundlagen der spezifischen Erkennung und Zerstörung von Tumorzellen durch T-Zellen nicht aus. Die Rekrutierung und Steuerung von T-Zell-Effektorfunktionen im Tumor-Mikromilieu und die Folgen der Immunselektion bis hin zu „Immune-Escape“-Varianten erfordern Studien *in vivo*. Tiermodelle eignen sich hierfür ganz besonders, da den experimentellen Möglichkeiten im menschlichen Organismus sowohl ethische als auch technische Grenzen gesetzt sind. Allerdings sollte nicht vergessen werden, jedwedes Tierexperiment einer genauen Nutzenabwägung zu unterziehen, um unnötiges Leid von den Tieren abzuwenden (Kolar, 2006).

Unter den zur Verfügung stehenden Tiermodellen nimmt die Labor-Maus einen besonderen Platz ein: Als Säugetier steht sie dem Menschen physiologisch sehr nahe. Dies zeigte sich auch bei der vergleichenden Analyse der Genome von Maus und Mensch, die erstaunliche Ähnlichkeiten aufweisen (Waterston et al., 2002).

Für die genetische Analyse der Gesetzmäßigkeiten, die der Akzeptanz bzw. Abstoßung transplantiert Tumoren zugrunde liegen, wurden schon Anfang des 20. Jahrhunderts Inzucht-Mausstämme erzeugt. Mit ihrer Hilfe konnten grundlegende Mechanismen der MHC-restringierten zellulären Immunabwehr sowohl von Virus- als auch von karzinogeninduzierten und spontanen Tumorzellen erarbeitet werden. Diese Experimente belegten die Bedeutung eines immunkompetenten Wirtes mit reproduzierbar wachsendem Tumor für die Analyse von tumorspezifischen T-Zell-Antworten. Die biotechnologische Entwicklung von „transgenen“ und „knockout“ bzw. „knock-in“ Mäusen ermöglicht heute die Analyse von Genfunktionen im Gesamtorganismus durch spezifische Manipulationen des Erbguts.

Die bekannteste und am häufigsten genutzte transplantierbare Melanomzell-Linie ist die aus einem C57BL/6-Mausmelanom entstammende Familie von B16-Melanomzell-Linien (Fidler, 1976). Subkutan eingebracht, entstehen in kurzer Zeit ortsständige, knotige, subkutane Melanome. Die intravenöse Verabreichung führt zu zahlreichen Lungenmetastasen. Die meisten B16 Melanomzell-Varianten weisen eine niedrige MHC-I-Expression auf und sind sehr wenig immunogen (Lim et al., 1998). Nachteilig für die Untersuchung der spezifischen zellulären Immunabwehr war zunächst, dass keine von T-Zellen erkannten Antigene bei B16 Melanomzellen bekannt waren. Deshalb arbeitete man mit B16-Zellen, die nach Transfektion Modellantigene wie z.B. Ovalbumin exprimierten (Celluzzi et al., 1996).

Diese Modifikation erscheint jedoch im Hinblick auf Tumoren beim Menschen recht artifiziell: Humane Neoplasien besitzen keine Fremdartigene, die nicht der Selbst-Toleranz als einer wichtigen Hürde bei der Immunerkennung unterliegen. Die Identifikation von Differenzierungsantigenen wie Trp-2 (Bloom et al., 1997) und gp100 (Overwijk et al., 1999), die natürlicherweise von Melanozyten exprimiert und von Melanomspezifischen T-Zellen erkannt werden können, erlaubte die vergleichende experimentelle Evaluation von Vakzinierungsstrategien mit einem klinisch relevanten Antigen. Kollektiv zeigten diese Arbeiten, dass die Selbst-Toleranz durch Vakzinierung mit rekombinanten Viren, aktivierten DC oder

immunstimulierenden Nukleinsäuren durchbrochen werden muss (Tormo et al., 2006a; Steitz et al., 2006).

Die Erzeugung von T-Zell-Rezeptor-transgenen (TZRtg) Mäusen ermöglichte ein genaueres Studium der Interaktionen zwischen Melanomzellen und T-Zellen *in vivo* in Mäusen mit fortgeschrittenen Tumor-Transplantaten. Für das Melanom entwickelte die Arbeitsgruppe von Restifo den Pmel-1 Mausstamm (Overwijk et al., 2003), bei dem ein transgener T-Zell-Rezeptor von den meisten CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten exprimiert wird. Diese T-Zellen erkennen das an H2-D^b-gebundene Peptid KVPRNQDWL, entsprechend Aminosäure 22 bis 35, des gp100/Pmel-17 Proteins. Pmel-1 TZRtg T-Zellen können B16 Melanomzellen, die natürlicherweise gp100 exprimieren, *in vitro* und *in vivo* zerstören (siehe auch Materialien und Methoden Abb. 2).

1.4. Genetisch erzeugte Tumormodelle der Maus

Die in experimentellen Mausmodellen entwickelten immuntherapeutischen Strategien zeigten in klinischen Studien beim Menschen oftmals nur eine sehr geringe antitumorale Wirkung. Neben dem grundsätzlichen Zweifel an der Aussagekraft von Experimenten im Mausmodell werden zwei wesentliche methodische Schwachpunkte diskutiert: Erstens, die Verwendung von immunogenen Modellantigenen und, zweitens, die Fähigkeit zur Abstoßung eines transplantierten Tumors als Zielparame-ter der Analysen. Besonders kritisch wiegt die Tatsache, dass Transplantationsmodelle weder die autochthone Entstehungsweise humaner Tumoren noch deren Fähigkeit zur Metastasierung in lokoregionäre Lymphknoten und entfernte Organe berücksichtigen. Die Entwicklung genetisch erzeugter Mausmodelle, bei denen primäre Tumoren *in vivo* im Gewebe entstehen, progressiv wachsen und metastasieren, ist deshalb ein wichtiges Ziel der experimentellen Forschung.

Mit Hilfe verschiedener „transgener“ bzw. „knockout“ oder „knock-in“ Mausstämme wurden die bei Melanompatienten entdeckten genetischen Veränderungen in den letzten Jahren *in vivo* funktionell untersucht. Diese Arbeiten haben nicht nur grundlegende Vorstellungen zur molekularen Pathogenese des Melanoms experimentell bestätigt, sondern auch die Etablierung neuer, klinisch relevanter Tumormodelle ermöglicht (Larue und Beermann, 2007).

Zusammenfassend haben Experimente im Mausmodell die Auffassung unterstützt, dass eine Deregulation der von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen abhängigen Signaltransduktion in Kooperation mit einer Hemmung der von p16/Ink4a abhängigen Zellzyklus-Kontrolle für die Entstehung maligner Melanome wesentlich ist. Dies wurde z.B. durch transgene Über-Expression eines melanozytären Wachstumsfaktors wie Hgf/Scf (Noonan et al., 2001) oder eines mutierten Ras-Gens (Chin et al., 1999) einerseits und durch einen Knockout des Tumorsuppressor-Gens p16/Ink4a (Krimpenfort et al., 2001) oder einen Knock-in eines mutierten (und dadurch von p16 unabhängigen) Cdk4-Gens (Sotillo et al., 2001) andererseits erreicht.

Im Idealfall sollten auch im experimentellen Maussystem primäre Melanome der Haut spontan auf der Grundlage klinisch relevanter genetischer Veränderungen entstehen, progressiv wachsen und schließlich metastasieren. Diese Anforderungen erfüllt der in dieser Arbeit verwendete Hgf-Cdk4^{R24C}-Mausstamm, bei dem eine Über-Expression von Hgf/Scf mit einem Knock-in des mutierten Cdk4^{R24C}-Gens kombiniert wurde (Tormo et al., 2006b). Dieses Modell bietet den zusätzlichen Vorteil, dass sich die Melanomentstehung durch eine UVB-Bestrahlung bzw. durch eine Karzinogenbehandlung kurz nach der Geburt deutlich beschleunigen lässt. Karzinogeninduzierte primäre Melanome wachsen nahezu zeitgleich (ca. 10 Wochen) in allen Mäusen und bieten ideale experimentelle Voraussetzungen, um die Mechanismen der Immuntoleranz bei der Melanomentwicklung, die Regulation von tumorspezifischen T-Zell-Antworten und die Etablierung (immun-)therapeutischer Strategien in einem wirklichkeitsnahen primären Tumormodell *in vivo* untersuchen zu können.

1.5. Ziele und Hypothesen der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktion zwischen Melanomzellen und melanomspezifischen T-Zellen in einem neuen genetischen Mausmodell *in vivo* zu untersuchen. Dabei sollten insbesondere die Resistenzmechanismen primärer Tumoren gegenüber einer durch T-Zellen vermittelten zytotoxischen Zerstörung analysiert und - auf diesen Erkenntnissen aufbauend - neue therapeutische Kombinationsstrategien zur Verstärkung der zellulären Immunabwehr entwickelt werden. Bei den Experimenten wurde von folgenden Hypothesen ausgegangen:

1. Primäre kutane Melanome im genetischen Hgf-Cdk4^{R24C}-Mausmodell entstehen in einem „immunprivilegierten“ Mikromilieu und entgehen der Erkennung und Zerstörung durch tumorspezifische Effektor-T-Zellen.
2. Die „immunologische Toleranz“ im Tumorgewebe kann durch eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems nach dem Vorbild einer akuten Virusinfektion teilweise aufgehoben werden.
3. Die Verstärkung sowohl der angeborenen als auch der erworbenen Immunabwehr durch eine geeignete Kombinationstherapie ermöglicht die zytotoxische Zerstörung der Tumorzellen durch spezifische T-Zellen.

2. Materialien und Methoden

2.1. **Verwendete Substanzen**

2.1.1. *Lösungen und Puffer*

1 M Kalziumchloridlösung (1M CaCl ₂)	5,53g CaCl ₂ in 50 ml Aqua dest.
DEPC-Wasser	1ml Diethylpyrocarbonat In 1l Aqua dest., autoklaviert
DMBA-Lösung	40µg DMBA in 10 µl Aceton gelöst
Elispot-Assaypuffer	0,5% BSA 0,01% Timerosal 0,05% Tween 20 in PBS
Elispot-Waschpuffer	0,1% Tween 20 in PBS
Ery-Lyse-Puffer (pH 7,3)	155 mM Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl) 10mM Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃) 0,1 mM Na-EDTA
FACS-Puffer	0,2% Na-EDTA 1% FCS in PBS gelöst
Kollagenase-Verdau-Lösung	1 mg Kollagenase D pro ml PBS 5% FCS 0,02mg DNase 1 pro ml PBS in PBS gelöst

PBS (pH 6,6) 1,375 M NaCl
 113 mM NaH₂PO₄·xH₂O
 in Aqua dest. gelöst und autoklaviert
 in 1 zu 10 Verdünnung mit Aqua dest. genutzt

TRIS-Puffer 16,6g TRIS-Pulver (DAKO)
 0,5 ml Tween 20 (Roth)
 in 1l Aqua dest.

2.1.2. Chemikalien und Reagentien

2-Mercaptoethanol	Amersham
2-Propanolol	
Aceton	
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma
BCP	
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Merck
DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol)	Roche
Diethylpyrocarbonat	
DMBA (7,12-dimethylbenz[a]anthrazen)	
DMEM-Trockenpulver	GIBCO
DNase I	Sigma
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Roth
Ethanol	
FCS (hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum)	PAA
Formalinfreie Zinkfixierung	BD Pharmingen
Glycerin	
GolgiPlug	BD Pharmingen
GolgiStop	BD Pharmingen
Haemotoxinilin	
HEPES	Roth
Kaliumhydrogenkarbonat(KHCO ₃)	Roth

Kollagenase D	Roche
L-Glutamin	Gibco
Natrium-EDTA	Roth
Penicillin	Gibco
TRIS (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan- 1,3-diol) C ₄ H ₁₁ NO ₃	Roth
Thimerosal	
Trypanblaulösung 0,4%	Sigma
Tween 20	
Saponin from Quillaja bark	Sigma
Streptomycin	Invitrogen
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)35%	Merck

2.1.3. Zellkulturmedien

DMEM (Dulbecco`s modified Eagle Medium)

DMEM-Trockenpulver (für 5 l)

2g/l Natriumhydrogenkarbonat

0,1 mM HEPES

50 µM 2-Mercaptoethanol

mit Aqua bidest auf 5 l auffüllen, pH auf 7,3

einstellen und steriltrfiltrieren, Lagerung 4° C

vor Gebrauch zugeben:

100U/ml Penicillin

100µg/ml Streptomycin

2mM L-Glutamin

10% (v/v) FCS

RPMI 1640

RPMI 1640 Pulver für 5 l

(Roswell Park Memorial Institute Medium)

2g/l Natriumhydrogenkarbonat

0,1 mM HEPES

50 µM 2-Mercaptoethanol

mit Aqua bidest auf 5 l auffüllen, pH auf 7,3

einstellen und steriltrfiltrieren, Lagerung 4° C

vor Gebrauch zugeben:

100U/ml Penicillin

100µg/ml Streptomycin

2mM L-Glutamin

10% (v/v) FCS

1mM Natriumpyruvat

0,1mM nicht-essentielle Aminosäuren

2.1.4. Antikörper Durchflusszytometrie

Antigen	Konjugat	Isotyp	Klon	Firma	Verdünnung
Maus CD3	FITC	Armenischer Hamster IgG1, κ	145- 2C11	BD	1:2
Maus CD8a	APC-Cy7	Ratte IgG2a, λ	53-6.7	BD	1:100
Maus CD8a	PerCp	Ratte IgG2a, κ	53-6.7	BD	1:250
Maus CD11b	FITC	Ratte IgG2b, κ	M1/70	Bio Legend	1:250
Maus CD11c	Alexa 647	Ratte IgG2b, κ	30-F11	BD	1:100
Maus CD16/32 („Fc-Block“)	Unkonjugiert	Ratte IgG2a, λ	93	Bio Legend	1: 300
Maus CD19	Alexa 647	Ratte, IgG2a, κ	1D3	BD	1:200
Maus CD 45	FITC	Ratte IgG2b, κ	30-F11	BD	1:500
Maus MHC I	PE	Maus IgG2a, κ	AF6- 88.5		1:100
Maus MHC II	FITC	Maus IgG2a, κ	AF6- 120.1	BD	1:250
Maus Gr-1	PE	Ratte IgG2b, κ	RB6- 8C5	BD	1:100
Maus IFN γ	Alexa 647	Ratte IgG, κ	XMG1.2	eBioscience	1:100
Maus V β 13	FITC	Maus IgG1, κ	MR12-3	BD	1:25
Maus Thy1.1	PE	Maus IgG1, κ	OX-7	BD	1:500

2.1.5. Antikörper Immunhistochemie

Antigen	Konjugat	Donor	Firma	Verdünnung
Maus CD3	unkonjugiert	Ratte	BD	1:100
Maus CD45	unkonjugiert	Ratte	BD	1:50
Maus Trp2	unkonjugiert	Kaninchen	*	1:200
Ratte	Biotin	Ziege	Invitrogen	1:100
Kaninchen	Biotin	Ziege	Invitrogen	1:100

*freundlicherweise von Vincent Hearing, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland zur Verfügung gestellt

2.1.6. Antikörper Immunfluoreszenz

Antigen	Konjugat	Donor	Firma	Verdünnung
Trp2	unkonjugiert	Kaninchen	*	1:200
CD8	unkonjugiert	Ratte	BD	1:25
Ratte	Alexa 488	Ziege	BD	1:100
Kaninchen	Alexa 488	Ziege	BD	1:100

*freundlicherweise von Vincent Hearing, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland zur Verfügung gestellt

2.1.7. Peptide

Humanes gp100 (aa₂₅₋₃₃) KVPRNQDWL, bezogen von der Universitätsklinik Leiden, Niederlande

2.1.8. Kits und gebrauchsfertige Reagentien

LSAB-AP Kit

Oligo-dT-18 Primer

Power Sybr Green Master Mix

RNase-free DNase Set

RNeasy Mini Kit

Taqman Universal PCR Master Mix

Trizol Reagens

DAKO Cytomation

Invitrogen

Applied Biosystems

Quiagen

Quiagen

Applied Biosystems

Invitrogen

2.2. Mäuse und Zuchtverfahren

$Cdk4^{R24C}$ -Mäuse wurden ursprünglich in 129SV x CD1 Mäusen mittels „knock-in“ Strategie generiert, was eine physiologische Regulation der mutanten $Cdk4$ gewährt. Das Hgf -Transgen wurde in FVB-Mäusen eingefügt; hierbei steht Hgf unter der Kontrolle des Metallothionin-Promoters. Sowohl Hgf - als auch $Cdk4^{R24C}$ -Mäuse wurden über mindestens fünf Generationen mit C57BL/6-Mäusen zurückgekreuzt. Hgf -Männchen wurden dann mit $Cdk4^{R24C}$ Weibchen gekreuzt (s. Abb. 1), da das Hgf -Transgen bei weiblichen Tieren zu Infertilität führt. Die Überexprimierung von HGF auf dem BL/6-Hintergrund führt zum sogenannten „chocolate-point“ Phänotyp (schwarze Pfoten, schwarze Schnauze und schwarze Ohren), sodass Hgf - $Cdk4^{R24C}$ -Mäuse leicht von ihren $Cdk4^{R24C}$ -Geschwistertieren unterschieden werden können.

C57BL/6 Mäuse (H-2^b) wurden entweder bei Charles Rivers Laboratories (Sulzfeld) erworben oder der eigenen Zucht entnommen.

Pmel-1 Zuchtpaare wurden bei Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine) erstanden und heterozygot mit BL/6 Mäusen gekreuzt. Pmel-1 Mäuse exprimieren auf einem Großteil der CD8+ Lymphozyten einen transgenen T-Zell-Rezeptor (Tcr α -V1/Tcr β -V13), der die Aminosäuren 22 bis 35 (KVPRNQDWL) von Pmel-17 - dem Maus-Homolog von gp100 – MHC I - D^b-restringiert erkennt (s. Abb. 2). Pmel-17 ist ein Enzym der Pigment-Synthese, das in Melanozyten und in Melanomzellen exprimiert wird. Zusätzlich sind Pmel-1 Mäuse homozygot für das T-lymphozytenspezifische Thy1.1-Allel (CD90), sodass ihre T-Zellen von den Thy1.2-positiven T-Zellen der BL/6-Mäuse durchflusszytometrisch unterschieden werden können.

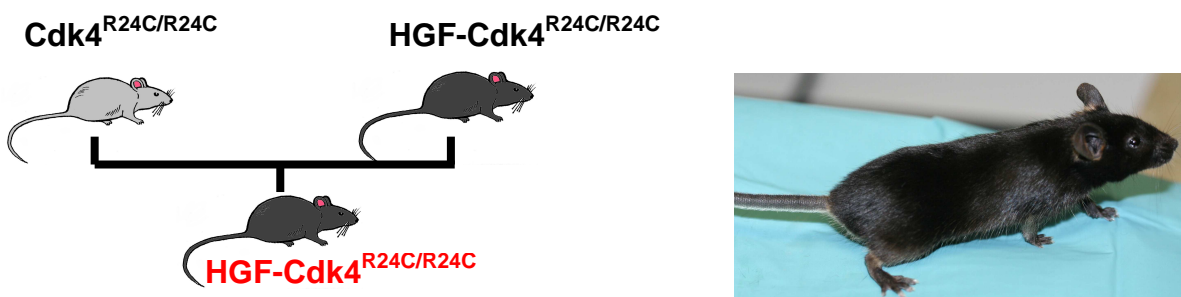


Abb. 1: Zuchtschema: Homozygote $Cdk4^{R24C/R24C}$ -Weibchen wurden mit ebenfalls $Cdk4^{R24C/R24C}$ -homozygoten Männchen, die zusätzlich transgen für Hgf waren, verpaart. Der resultierende Wurf enthielt etwas weniger als die Hälfte $Hgf-Cdk4^{R24C}$ -Mäuse und $Cdk4^{R24C}$ -Mäuse (nicht dargestellt). $Hgf-Cdk4^{R24C}$ -Mäuse lassen sich durch ihren Phänotyp mit dunklen Ohren, Pfoten und Schwanz gut von $Cdk4^{R24C}$ -Mäuse unterscheiden.

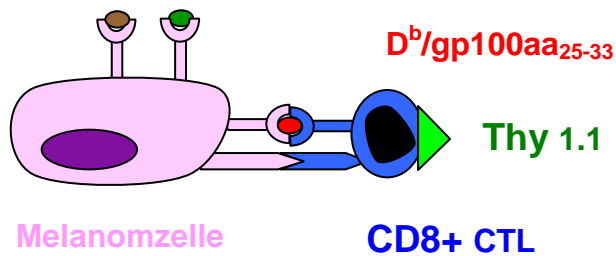


Abb. 2: Erkennung von Melanomzellen durch spezifische T-Zellen: Anhand des durch MHC-I an der Zelloberfläche exprimierten Antigens Pmel-17 können CD-8-Lymphozyten aus T-Zell-Rezeptor-transgenen Pmel-1 Mäusen Melanozyten und Melanomzellen detektieren. Thy1.1 dient als Erkennungsmarker.

Alle Mausexperimente wurden im Haus für Experimentelle Therapie der Universität Bonn nach den Richtlinien für Versuchstierhaltung und dem Tierschutzgesetz durchgeführt.

2.3. Induktion von autochthonen Melanomen in Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäusen

Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäuse und ihre Cdk4^{R24C}-Geschwistertiere wurden vier Tage nach der Geburt dorsal mit 40 µg 7,12-dimethylbenz(α)anthracene (DMBA) bestrichen. In den darauffolgenden Wochen erfolgte eine genaue Beobachtung und Dokumentation des Tumorwachstums: Melanome wurden gezählt, vermessen und fotografiert. Wenn progressiv wachsende Melanome 100 mm² überschritten oder die Mäuse Zeichen von Kachexie zeigten, wurden die Tiere geopfert, sorgfältig obduziert und die Organe weiteren Analysen zugeführt.

2.4. Transplantationsexperimente

Transplantation von primären Melanomen: Frische präparierte Melanome aus Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäusen wurden mechanisch zerkleinert und mittels Kolben einer 1 ml Spritze durch ein steriles Nylonsieb (Maschengröße 100 µm) passiert und mit 1 ml PBS gespült. 200 µl der so entstandenen Suspension wurden den jeweiligen Mäusen subkutan oberhalb der Flanke injiziert.

Transplantation von B16-Melanomen: In DMEM kultivierte B16-Melanomzellen wurden bei konfluentem Wachstum durch Inkubation mit Trypsin EDTA abgelöst und zweimal mit PBS gewaschen. Nach Bestimmung der vitalen Zellen in der Neubauer-Zählkammer mittels Trypan-

Blau-Exklusion wurden pro Maus 1×10^6 vitale B16-Zellen in 100 μ l PBS subkutan oberhalb der Flanke injiziert. Das Tumorwachstum transplantiert primärer Tumoren und der B16-Tumoren wurde zweimal wöchentlich mittels Schieblehre bestimmt. Bei Überschreiten einer Gesamtgröße von 100 mm^2 wurden die Mäuse euthanasiert und einer sorgfältigen Obduktion unterzogen. Milz, Lymphknoten und Tumoren wurden entnommen und weiteren Untersuchungen zugeführt.

2.5. Adoptiver T-Zell-Transfer und Chemo-Immuntherapie

Der prozentuale Anteil an melanomspezifischen zytotoxischen Leukozyten (positiv für die Oberflächenmarker CD3/CD8/V β 13/Thy1.1) in aufgereinigten Milzzellen aus Pmel-1 Mäusen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und die absolute Anzahl dieser Zellen in den jeweiligen Milzen kalkuliert. Bei einer Konzentration von 1×10^7 Zellen pro ml PBS wurden jeder zu therapierenden Maus 200 μ l dieser Suspension intravenös verabreicht, was einer absoluten Anzahl von 2×10^6 Pmel-1 zytotoxischen T-Lymphozyten entspricht.

Nach Injektion der Pmel-1 Zellen wurden die Mäuse mit 5×10^8 PFU rekombinanten hgp100 kodierenden Adenoviren in 100 μ l PBS intraperitoneal immunisiert. Diese Viren waren bereits im Vorfeld in unserem Labor durch Cre-loxP Rekombination hergestellt worden.

Je nach Randomisierung wurden die Mäuse 24 Stunden vor Gabe der Pmel-1 Zellen und Immunisierung chemotherapeutisch behandelt: 100 μ l einer 2 mg Cyclophosphamid (Endoxan[®], Baxter Oncology) enthaltenden PBS-Lösung wurden intraperitoneal gespritzt.

Randomisierte Gruppen von Mäusen erhielten außerdem an Tag 3,6 und 9 nach adoptivem Transfer der Pmel-1 Zellen peritumorale Injektionen von TLR-Agonisten: polyI:C (Sigma) und CpG (TIB Molbiol) wurden mit PBS auf eine Konzentration von 1 mg pro ml eingestellt. Jeweils 50 μ g polyI:C und 50 μ g CpG wurden zusammen mit einer Gesamtmenge von 100 μ l PBS subkutan peritumoral injiziert.

2.6. Isolation von Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten

Frisch entnommenen Milzen wurde in einer sauberen Petrischale mittels 1 ml Spritzen und 27G Kanülen 1-2 ml Kollagenaseverdaulösung injiziert, anschließend wurden sie mit einer Schere zerkleinert und in 7 ml Kollagenaseverdaulösung eingebracht. Lymphknoten wurden von Fettgewebe gesäubert, mittels Schere zerkleinert und in 3 ml Kollagenaseverdaulösung eingelegt. Auf einem beheizbaren Magnetrührer erfolgte eine 30-minütige (Milzen) bzw. 45-minütige

Inkubation im Wasserbad bei 37° C unter beständigem Rühren. Die Inkubation wurde mit 2 ml 0,1 M EDTA- Lösung und weiteren 10 Minuten in 37° C warmem Wasserbad abgestoppt. Die so entstandenen Suspensionen wurden mit dem Kolben einer 1 ml Spritze durch ein steriles Nylonsieb (Maschengröße 100µm) gerieben und nach Zugabe von 10 ml sterilem PBS bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und das verbleibende Pellet in 3 ml Ery-Lyse-Puffer resuspendiert und für ca. eine Minute bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 10 ml PBS hinzugefügt, die Suspension wurde bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Resuspension des Pellets in PBS wurde die Zellsuspension nochmals durch ein steriles Nylonsieb (Maschengröße 100µm) gefiltert und die Anzahl lebender Zellen in der Neubauer-Zählkammer durch Exklusion mit Trypan-Blau bestimmt.

2.7. Isolation und Aufreinigung von Tumorzellen

Nach Entnahme wurden die Tumoren von Fett- und Bindegewebe freipräpariert und in einer sterilen Petrischale mittels Spritze und 27 G Kanüle mit 1-2 ml Kollagenaseverdaulösung injiziert. Danach erfolgte die mechanische Zerkleinerung mittels Schere und eine 45-minütige Inkubation in 37° C warmem Wasserbad unter beständigem Rühren auf einem beheizbaren Magnetrührer. Die Reaktion wurde mit 2 ml 0,1 M EDTA-Lösung abgestoppt und das Gemisch weitere 10 Minuten im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Suspension durch ein steriles Nylonsieb (Maschengröße 100µm) gefiltert, verbleibende Tumorstücke mit dem Kolben einer 1 ml Spritze zerrieben und mit 10 ml PBS gespült. Nach Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 Minuten wurde der Überstand abgeschüttet, das verbleibende Pellet in 10 ml PBS resuspendiert und die vitalen von avitalen Zellen mittels Trypan-Blau-Färbung unterschieden und in der Neubauer-Zählkammer quantifiziert.

2.8. Durchflusszytometrische Färbungen und Analyse

Für die extrazelluläre Färbung wurden 1 Million frisch isolierte Zellen in 5 ml FACS-Röhrchen überführt, mit FACS-Puffer gewaschen und bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das verbleibende Pellet wurde in 100 µl CD16/32 („Fc-Block“) enthaltenden FACS-Puffer resuspendiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um

unspezifische Bindungen zu blockieren. Danach wurden die Zellen abermals mit FACS-Puffer gewaschen und abzentrifugiert. Die Zellen wurden nach Zugabe von 20 µl der jeweiligen Antikörperlösung für 20 Minuten bei 7 °C inkubiert. Dieser und auch alle folgenden Inkubationsschritte erfolgten unter Abdunkelung der Röhrchen. Es folgte ein Wasch- und Zentrifugationsschritt. Wenn eine intrazelluläre IFN γ -Färbung folgen sollte, wurden die Zellen vor dem ersten Färben mit 1 µg/ml humanem gp100 und 800 U rekombinanten IL-2 pro ml RPMI-Medium für viereinhalb Stunden restimuliert. Nach Waschen der Zellen wurden diese mit je 0,8 µl GolgiStopTM und GolgiPlugTM/ml FACS-Puffer behandelt, um den Proteintransport zu blockieren. Nach der vorbeschriebenen extrazellulären Färbung wurden die Zellen dann mit 100 µl 2%iger Paraformaldehydlösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Die Permeabilisierung erfolgte mit 100 µl FACS-Saponin-Puffer für 20 Minuten bei Raumtemperatur, dann wurden 50 µl einer IFN γ -antikörperhaltigen FACS-Saponin-Pufferlösung für 30 Minuten zugesetzt.

2.9. Histologie und Immunhistochemie

Frisch präparierte Proben von Haut, Lymphknoten, Milzen und Tumoren wurden über Nacht in Zink fixiert, anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in Paraffin eingebettet. Mittels eines Mikrotoms (Leica RM 2155) wurden Schnitte von 4 µm Dicke angefertigt, die auf einem Objektträger über Nacht bei 37° C getrocknet wurden. Am nächsten Tag wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffinisiert und rehydriert. Die stark pigmentierten Tumoren wurden vor der Färbung mit 3% H₂O₂ für 45 Minuten bei 37 ° C gebleicht und die Reaktion durch 1%ige Essigsäure abgestoppt.

Zur Beurteilung der Morphologie wurden von allen Präparaten Schnitte mit H.E. gefärbt: Nach Spülen mit Aqua dest. wurden die Schnitte für 2 Minuten mit Mayers Hämalaunlösung bedeckt und anschließend für 5 Minuten mit Leitungswasser gespült. 1%ige Eosinlösung wurde für 5 Minuten auf das Präparat aufgebracht und mit Aqua dest. abgespült. Abschließend erfolgte die Eindeckelung der Schnitte wässrig mit Corbitt-Balsam.

Vor immunhistochemischen Färbungen wurden die Präparate 10 Minuten in TRIS-Puffer gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 5 % BSA enthaltendem PBS inkubiert, um unspezifischen Bindungen zu verhindern. Nach zwei weiteren Waschschritten mit TRIS-Puffer erfolgte das vollständige Benetzen der Präparate mit dem jeweiligen Primärantikörper, der

eine Stunde bei Raumtemperatur einwirkte. Auf zwei Waschschritte mit TRIS-Puffer folgte dann die Zugabe von 100 µl des biotinylierten Sekundärantikörpers, der nach 15 Minuten durch zweimaliges Waschen mit TRIS-Puffer wieder entfernt wurde. Nun wurden 100µl LSAB-AP (LSAB-AP Kit, Dako Cytomation) auf den Schnitt gegeben und für 15 Minuten darauf belassen. Nach abermaligen Waschen wurden 100µl Fast Red (ebenfalls LSAB-AP Kit, Dako Cytomation) auf den Schnitt gegeben und für 10 Minuten inkubiert. Nach weiterem zweimaligem Waschen in TRIS-Puffer und Spülen in Aqua dest. erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin (30 Sekunden Einwirkzeit). Nachdem der Schnitt nochmals gründlich gewaschen wurde, konnte er anschließend mit Glycerin eingedeckelt werden.

2.10. Immunfluoreszenz

Frisch präparierte Proben von Haut, Tumoren, Milzen und Lymphknoten wurden, wie oben bereits beschrieben, in Paraffin eingebettet, mittels Mikrotom geschnitten, getrocknet und anschließend entparaffinisiert. Dann wurden die unspezifischen Bindungen durch einstündige Inkubation mit 10% BSA in PBS blockiert und die Schnitte zweimal mit TRIS-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Auftragung von 100 µl des Primärantikörpers, der nach 30-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur durch zwei Waschschritte wieder entfernt wurde. Der Schnitt wurde dann mit 100 µl des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers bedeckt und für 20 Minuten im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zwei weiteren Waschungen mit TRIS-Puffer erfolgte die Kernfärbung mit 300 µl DAPI pro Objektträger für 5 Minuten bei Raumtemperatur unter Abdunkelung. Nach sorgfältigem Waschen des Schnitts wurde das Präparat mit Immunfluoreszenzmedium (Biomeda) eingedeckelt.

Die Beurteilung der Präparate erfolgte an einem Leica DMLB Mikroskop, die mikroskopischen Bilder wurden mittels Digitalkamera (JVC KY-F75U) aufgenommen.

2.11. Quantitative Real-Time-PCR

Frisch präpariertes Tumorgewebe wurde in flüssigem Stickstoff direkt nach Entnahme schockgefroren und bei -80° C gelagert. Mittels Mörser und Pistille, die zur RNase-Inaktivierung bei 200° C autoklaviert wurden, wurden die Proben in flüssigem Stickstoff zermahlen und in 1 ml Trizol suspendiert. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 12000g bei 4° C wurde dem Überstand 100µl BCP zugefügt und das Gemisch für 3 Minuten inkubiert. Im

Anschluss an einen weiteren Zentrifugationsschritt (30 Minuten bei 12000g) folgte die Fällung der RNA aus der oberen wässrigen Phase durch Zugabe von 500µl Isopropanol für 10 Minuten. Durch 10-minütige Zentrifugation bei 12000g konnte nach Verwerfen des Überstands das Präzipitat mit 75% Ethanol gewaschen werden und nach einem weiteren Waschschrift an der Luft getrocknet werden. Dann wurde das Präzipitat in RNase-freiem Wasser gelöst und für 10 Minuten bei 58° C im Hitzeblock inkubiert. Nach Bestimmung der RNA-Konzentration mittels Nanodrop konnten die Proben bei -20° C gelagert oder direkt weiterverarbeitet werden. Die RNA wurde mit einem Qiagen RNeasy Mini Kit nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Anschließend erfolgte die reverse Transkription in cDNA mit Superscript II und oligo-dT18 Primern (beides Invitrogen) in einem Eppendorf Mastercycler. Die quantitative PCR wurde mit den jeweiligen Primern und dem Sybr Green Mastermix bzw. mit den jeweiligen Taqman Sonden und dem entsprechenden Taqman Mastermix in einem ABI 7300 Real Time PCR System nach den Angaben der Hersteller ausgeführt.

Verwendete Primer für die quantitative RT-PCR:

Gen-Name (Genprodukt)	Primersequenz von 5` nach 3`
IFNG (Ifn γ)	forward CTCTTCTTGGATATCTGGAGG reverse CCTGATTGTCTTTCAAGACTTC
GZMB (Granzym B)	forward CTCCAATGACATCATGCTGC reverse TGGCTTCACATTGACATTGC
PRF (Perforin)	forward TGAGAAGACCTATCAGGACC reverse AAGTCAAGGTGGAGTGGAGG

Verwende Taqman Sonden für qRT-PCR

	ID
CXCL-10	Mm00445235_m1
CXC12	Mm00436450_m1
IL-6	Mm00446190_m1
Trp2	Mm00494456_m1
Spp1 (Osteopontin)	Mm00436767_m1
SILV (Gp 100)	Mm00498996_m1

2.12. Elispot

Eine über Nacht mit 4 μ g/ml IFN γ -Detektionsantikörper beschichtete HA Millipore 96-well Platte wurde nach dreimaligem Waschen mit RPMI Medium mit FCS-haltigem RPMI Medium beschichtet und für eine Stunde inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blocken. Anschließend wurden frisch isolierte Splenozyten in verschiedenen Konzentrationen in den "wells" ausgesät und mit 30 IU/ml rekombinantem humanem IL-2 und 1 μ g/ml gp100 Peptid (KVPRNQDWL) oder mittels Kokultivation mit Melanomzellen restimuliert. Als Positivkontrolle wurde das Peptid durch 10 μ g/ml Concanavalin A ersetzt, bei der Negativkontrolle wurde das Peptid weggelassen. Nach einer mehrstündigen Inkubationszeit bei 37° C wurden die Zellen am nächsten Tag dreimal mit RPMI gewaschen und anschließend mit biotinyliertem Detektionsantikörper (2 μ g/ml)

überschichtet. Nach zweistündiger Inkubationszeit und nochmaligem Waschen wurde streptavidingekoppelte Peroxidase hinzugegeben. Nach kurzer Einwirkzeit erfolgte schließlich die Detektion mittels Elispot Detection Kit nach Angaben des Herstellers und die Auszählung der Spots unter einem Binokular.

2.13. Digitale Fotodokumentation

Unbehandelte und DMBA-exponierte Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäuse wurden einmal wöchentlich auf Tumorentwicklung überprüft: Zu diesem Zweck wurde das Fell rasiert, die Haut palpiert und sichtbare makroskopische Veränderung mittels digitaler Fotografie (Canon Eos) unter Verwendung eines höhenverstellbaren Stativs standardisiert dokumentiert.

2.14. Statistische Analysen

Statistische Signifikanzanalysen wurden unter Zuhilfenahme des SPSS 11 Computerprogramms mit dem Student-t-Test berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Immuntoleranz im Tumormikromilieu primärer Melanome

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass primäre Melanome in Hgf-Cdk4^{R24C}- Mäusen ein aggressives Wachstum aufweisen, spontan in drainierende Lymphknoten und Lungen metastasieren und im Verlauf keinerlei Zeichen von Regression zeigen, sodass die Mäuse bei progredientem Tumorleiden getötet werden müssen. Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäuse mit spontan entstandenen Melanomen hatten eine mediane Überlebenszeit von 391 ±62 Tagen, während Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäuse, bei denen die Melanomentstehung durch neonatale Behandlung mit DMBA beschleunigt worden war, aufgrund einer höheren Tumorlast nur 94 ± 8 Tagen alt wurden. Bei der histologischen und durchflusszytometrischen Aufarbeitung der primären Tumoren fiel auf, dass die Melanome kaum von Immunzellen infiltriert waren. Im drainierenden Lymphknoten schienen die Melanomzellen von der Peripherie her die T-Zell-reichen Areale diffus zu durchwandern. Die zur weiteren Charakterisierung herangezogene molekularbiologische Untersuchung spontaner Melanome mittels quantitativer Real-Time-PCR gab Hinweise auf ein immunsuppressives Tumormilieu mit einer niedrigen relativen Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. IL-6, IFN- γ und CXCL-10. Dem gegenüber stand eine erhöhte Expression von immunregulatorischen Faktoren wie z.B. TGF- β oder CXCL-2, dem Mausomolog des humanen proangiogenetischen IL-8. Es konnte außerdem eine niedrige Expression von MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche der Tumorzellen nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse konnten auch für DMBA-induzierte Melanome und seriell transplantierte primäre Melanome erzielt werden. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass Hgf-Cdk4^{R24C}-Melanome immunsuppressive Eigenschaften besitzen und die intrinsischen Abwehr- und Erkennungsmechanismen des Immunsystems wirksam umgehen können.

Zur Charakterisierung der Interaktion zwischen primären Hgf-Cdk4^{R24C}-Melanomen und Antigen-spezifischen T-Zellen wurde der adoptive Transfer und die Aktivierung von TZR-transgenen T-Zellen aus Pmel-1 Mäusen etabliert. Diese CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen erkennen ein xenogenes H2-D^b-restringiertes Epitop des humanen gp100 und kreuzreagieren mit dem fast identischen Mausepitop (gp100 – aa25-33). Der Marker Thy1.1 (CD90) auf adoptiv transferierten Pmel-1 T-Zellen ermöglicht die Unterscheidung von den Thy1.2⁺ T-Zellen des Empfängers und damit die genaue Analyse der Differenzierung und Funktion *in vivo* (siehe auch schematische Darstellung im Methodenteil Abb. 2). Nach der intravenösen Injektion werden Pmel-1

Lymphozyten *in vivo* durch Vakzinierung mit einem rekombinanten adenoviralen Vektor für das humane gp100 aktiviert und können dann prinzipiell Melanomzellen (und Melanozyten) erkennen und zerstören, wie Overwijk et al. dies bereits im B16 Modell demonstrierten (Overwijk et al. 2003).

Zur Analyse der Interaktion zwischen adoptiv transferierten TZR-transgenen T-Zellen und autochthonen Melanomen wurden DMBA-behandelte Hgf-Cdk4^{R24C} Mäuse gewählt, da hier Tumoren durch die neonatale Karzinogenbehandlung frühzeitig und in großer Zahl synchron entstehen. So trugen Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäuse an Tag 70 ihres Lebens zwischen 5-15 primäre Melanome mit Durchmessern von 4 bis 6 mm auf der Rückenhaut. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte bei randomisierten Gruppen von tumortragenden Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäusen die intravenöse Injektion von 2×10^6 Pmel-1 T-Lymphozyten sowie die simultane intraperitoneale Vakzination mit dem gp100 kodierenden Adenovirus (Lymphozyten und Vakzination = LV), wie im Behandlungsschema (Abb. 3) gezeigt.

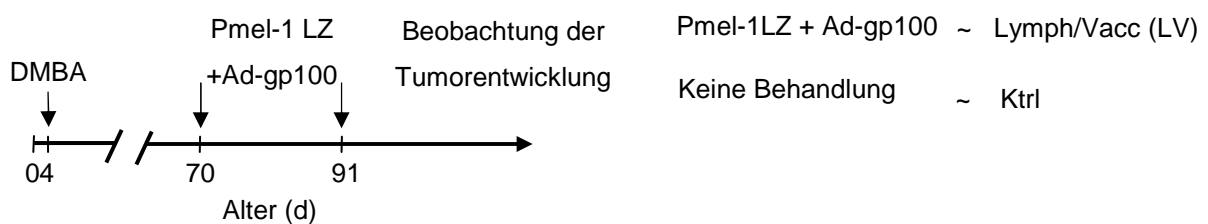


Abb. 3: Schematische Darstellung eines Behandlungszyklus: Neonatal mit DMBA-behandelte Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäuse, die zu Therapiebeginn progressiv wachsende Melanome trugen, wurden zufällig in Kontroll- (Ktrl) und Behandlungsgruppe (LV) randomisiert. Die Mäuse der LV-Gruppe erhielten an Tag 70 und 91 intravenös 2×10^6 Pmel-1 Lymphozyten und die intraperitoneale Vakzinierung mit gp100-kodierendem Adenovirus. In Behandlungs- und Kontrollgruppe wurde das Tumorstadium beobachtet und quantifiziert.

Abbildung 4 stellt den Wachstumsverlauf der DMBA-induzierten Tumoren in Abhängigkeit vom Lebensalter der Mäuse in der jeweiligen Behandlungsgruppe dar (mit n=5 pro Gruppe):

In der Behandlungsgruppe und in der Kontrollgruppe war progressives Tumorwachstum ohne nennenswerte Verzögerung zu verzeichnen, obwohl die Mäuse der Behandlungsgruppe drei Wochen später einen weiteren Zyklus „LV“ erhielten. Daher mussten sowohl die Mäuse des Kontrollkollektivs als auch die „LV“-behandelten Tiere mit nahezu gleich hoher Tumorlast und einzelnen Tumoren, die 10 mm im Durchmesser überschritten, bei rund 90 bzw. 120 Tagen Gesamtüberleben getötet werden. Die Ähnlichkeit innerhalb beider Gruppen hinsichtlich Größe und Wachstumstendenz der Melanome zeigt sich auch in den makroskopischen Bildern einzelner Melanome zu Beginn der Behandlung an Tag 70 und während der Behandlung an Tag 91. Ähnliche Resultate wurden in zwei weiteren unabhängigen Experimenten erzielt.

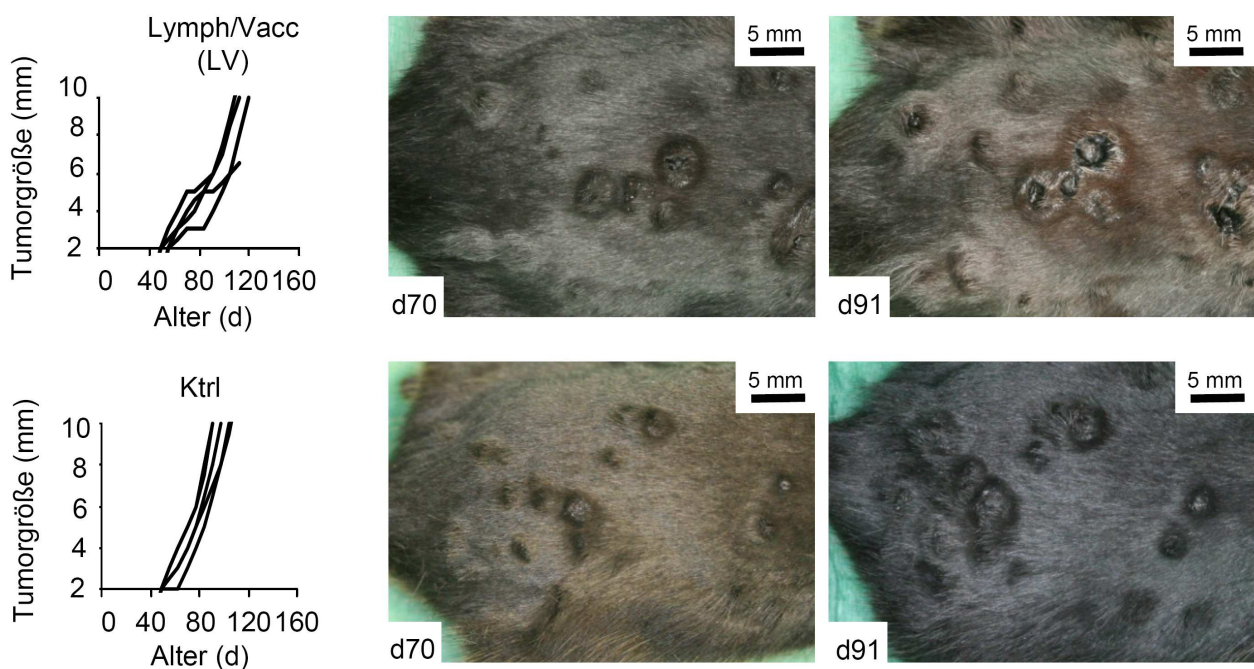


Abb. 4: Das Tumorwachstum in der Behandlungsgruppe (LV) und in der unbehandelten Kontrollgruppe (jeweils n=5) wurde mittels Schieblehnmessung quantifiziert und altersabhängig dargestellt (Graphen linksseitig). Korrespondierend dazu die makroskopische Darstellung beispielhafter Therapieverläufe in Behandlungs- (obere Reihe) und Kontrollgruppe (untere Reihe) an den Lebenstagen 70 und 91.

Diese ersten Ergebnisse weisen auf eine Aufrechterhaltung der Tumortoleranz in primären Hgf-Cdk4^{R24C}-Melanomen hin, da anscheinend auch eine große Anzahl von tumorspezifischen, aktivierten adoptiv transferierten T-Zellen nicht in der Lage war, das Wachstum wesentlich zu verlangsamen.

Zur Analyse, wie in Hgf-Cdk4^{R24C}-Melanomen eine Immunerkennung und Zerstörung durch spezifischen T-Zellen umgangen wird, opferten wir Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäuse mit primären DMBA-induzierten Melanomen 10 Tage nach Erhalt der adoptiv transferierten Pmel-1 Lymphozyten – wie im abgebildeten Schema illustriert (Abb. 5) – und untersuchten die herauspräparierten Tumoren und Milzen mittels Durchflusszytometrie, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz.

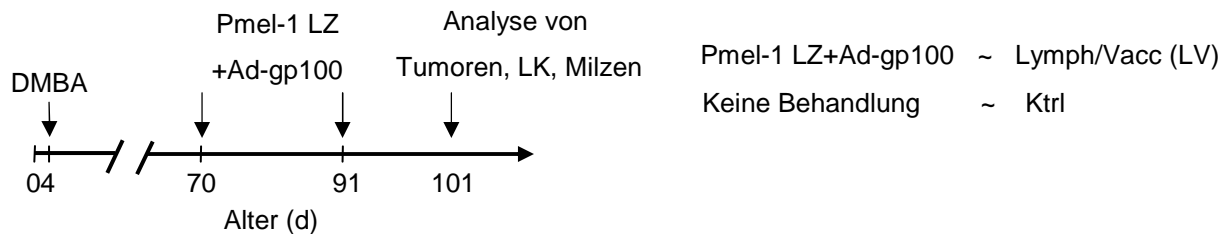


Abb. 5: Schematische Darstellung der Untersuchung: Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäuse, die DMBA-induzierte Tumoren trugen, wurden an Tag 70 in eine Behandlungsgruppe (LV) und in eine Kontrollgruppe (Ktrl) eingeteilt. Die Kontrollgruppe erhielt keine Therapie, die Behandlungsgruppe erhielt an den Tagen 70 und 91 2×10^6 Pmel-1 Lymphozyten und eine intraperitoneale Vakzinierung mit gp100-kodierenden Adenoviren. Nach 101 Lebenstagen wurden die Mäuse beider Gruppen geopfert und die Tumoren, Lymphknoten und Milzen weiteren Analysen unterzogen.

In der durchflusszytometrischen Untersuchung der Milz von tumortragenden Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäusen war die Expansion von melanomspezifische CD8⁺ Lymphozyten - leicht identifizierbar durch die Marker Vβ13 (TZR) und Thy1.1 – und die Produktion von IFN-γ durch diese Zellen zu erkennen (Abb. 6): Etwa ein Drittel der zytotoxischen Lymphozyten war anhand ihrer Marker als melanomspezifisch anzusehen, von denen etwas mehr als ein Drittel auch IFN-γ produzierte.

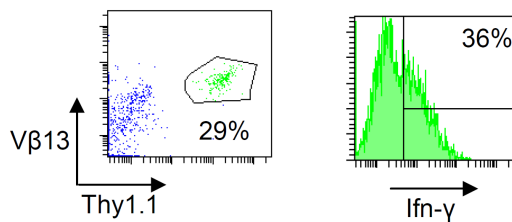


Abb. 6: Durchflusszytometrische Analyse von Splenozyten einer LV-behandelten Maus 7 Tage nach adoptivem Transfer: Der Dot-Plot zeigt den Anteil Vβ13⁺Thy1.1⁺ Pmel-1 Lymphozyten an CD8⁺ Splenozyten. Im nebenstehenden Histogramm ist die intrazelluläre IFN-γ-Expression auf CD8⁺ Vβ13⁺Thy1.1⁺ Pmel-1 Zellen zu sehen.

Bei der Analyse der primären Hgf-Cdk4^{R24C}-Melanome mittels Immunfluoreszenz zeigte sich, dass die Tumoren diffus von Immunzellen durchsetzt waren (Abb. 7): So findet sich in „LV“-behandelten Melanomen gegenüber unbehandelten Tumoren ein deutliches Infiltrat von CD45⁺ Immunzellen. In dieser Färbung fluoreszieren die Melanomzellen, dargestellt mit dem spezifischen melanozytären Marker Trp1, grün, die mit dem Pan-Leukozytenmarker CD45 dargestellten Immunzellen erscheinen rot, und die Kerne leuchten durch die DAPI-Färbung blau. Die Quantifizierung des Infiltrats anhand der Durchflusszytometrie ergab ebenfalls ein gehäuftes Auftreten von CD45⁺ Immunzellen in „LV“-behandelten Tumoren im Gegensatz zu unbehandelten Tumoren, die kaum Infiltrat hatten. Etwa ein Drittel der das Melanom infiltrierenden zytotoxischen T-Zellen konnte anhand ihrer Marker durchflusszytometrisch als tumorspezifisch eingeordnet werden (Abb. 8, links). Die Immunhistochemie zeigte außerdem, dass T-Zellen (das CD3-Antigen ist hier rot angefärbt) sich im engen Kontakt mit den größeren, hellen Melanomzellen befanden (Abb. 8, rechts). So waren primäre Hgf-Cdk4^{R24C}-Melanome zwar für tumorspezifische T-Zellen prinzipiell zugänglich, ihre zytotoxische Wirkung konnte sich im Tumor selbst und in seinem Mikromilieu aber nicht entfalten.

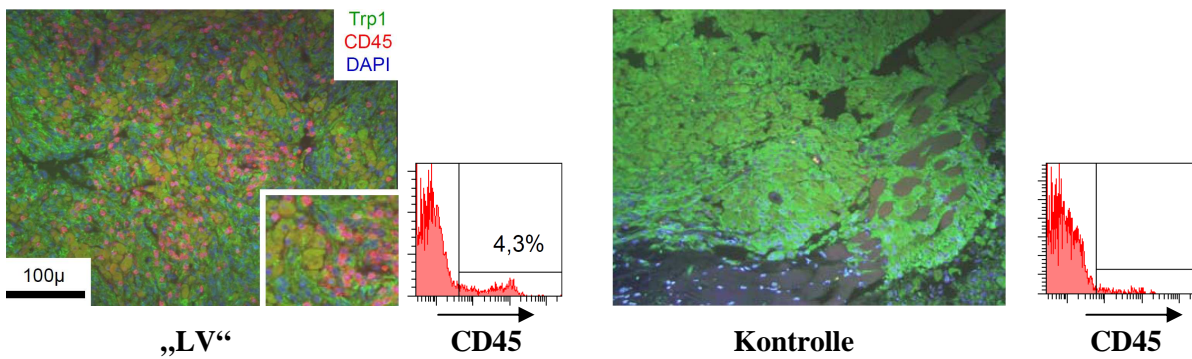


Abb. 7: Immunfluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie von „LV“ behandelten (links) und unbehandelten (rechts) primären Hgf-Cdk4^{R24C}-Melanomen 7 Tage nach adoptivem Transfer: Die Trp1-Färbung stellt Melanomzellen grün dar, CD45⁺ Zellen in rot, Kernfärbung in blau mit DAPI. Die nebenstehenden korrespondierenden Histogramme zeigen den durchflusszytometrisch ermittelten Anteil CD45⁺ Zellen an den jeweiligen primären Melanomen.

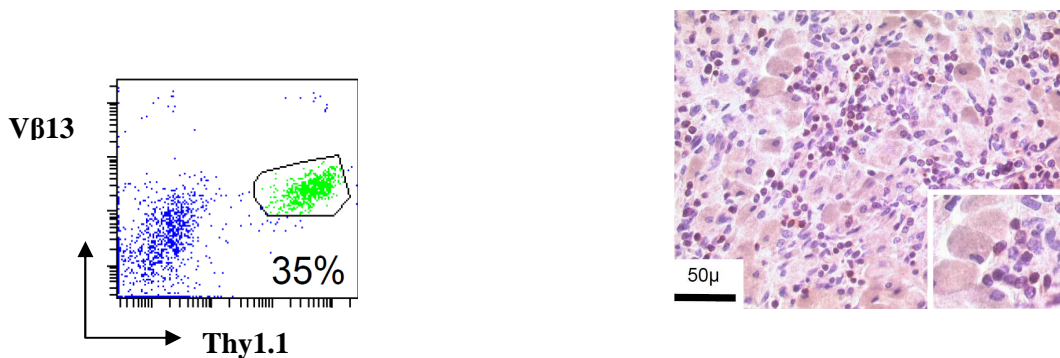


Abb. 8: Durchflusszytometrische Analyse tumorinfiltrierender Lymphozyten im primären Melanom einer „LV“-behandelten Maus (linke Bildhälfte) und die entsprechende Immunhistologie (rechte Bildhälfte): Der Anteil tumorspezifischer Vβ13⁺Thy1.1⁺ Pmel-1 Zellen an tumorinfiltrierenden CD8⁺ Lymphozyten wurde durchflusszytometrisch ermittelt. In der korrespondierenden Immunhistologie sind die CD3⁺ T-Zellen rot eingefärbt und liegen in engem Kontakt zu den helleren, größeren Melanomzellen.

Ähnliche Ergebnisse, die auf eine „Nichterkenntnis“ bzw. Resistenz gegenüber melanomspezifischen T-Zellen hinweisen, konnten auch mit seriell transplantierten primären Hgf-Cdk4^{R24C}-Melanomen erbracht werden: Frisch isolierte Tumorzellen wurden subkutan in die Flanken von C57BL/6-Mäusen injiziert. Die Tiere wurden nach 14 Tagen, wenn die Tumoren eindeutig palpabel waren, zufällig in Behandlungs- oder Kontrollgruppe randomisiert und gemäß dem abgebildeten Schema mit Pmel-1 Lymphozyten und Vakzinierung („LV“) behandelt oder nicht (Abb. 9). Auch hier zeigte sich trotz LV-Behandlung 14 Tage nach Tumoringokulation ein progressives Tumorstadium, was sich kaum von der unbehandelten Kontrollgruppe unterschied (Abb. 10).

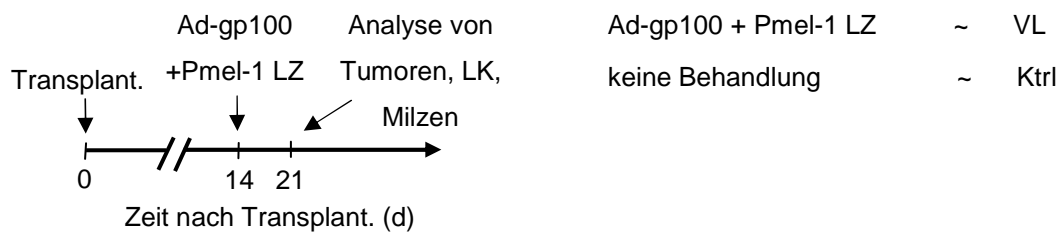


Abb. 9: Behandlungsschema: C57BL/6-Mäusen wurden zu Experimentbeginn 200µl einer frisch erstellten Zellsuspension aus primären Hgf-Cdk^{4R24C}-Melanomen subkutan injiziert. Nach 14 Tagen erhielten die Tiere eine intraperitoneale Vakzinierung mit Ad-gp100 und intravenös 2x10⁶ Pmel-1 Lymphozyten, eine Kontrollgruppe blieb unbehandelt. Es erfolgte entweder eine Analyse von Lymphknoten, Tumoren und Milzen sieben Tage nach Transfer oder aber eine Beobachtung des Tumorstadiums.

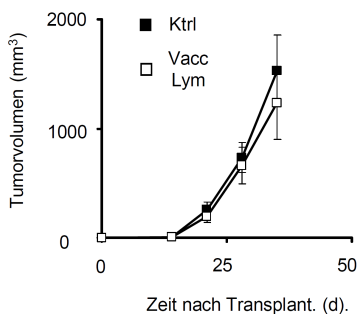


Abb. 10: Wachstumskinetik transplantiertes Hgf-Cdk^{4R24C}-Tumoren: Dargestellt ist das Tumorstadium in Abhängigkeit von der Zeit nach Transplantation in unbehandelten (Ktrl) sowie mit Lymphozytentransfer und Vakzinierung behandelten (LV) C57BL/6-Mäusen.

Eine Expansion von Pmel-1 Lymphozyten in der Milz war ebenfalls aufzufinden (Abb. 11), genauso eine in der Durchflusszytometrie und in der Immunfluoreszenz nachzuweisende diffuse leukozytäre Infiltration des Tumors, dessen Zellen sich überwiegend als negativ für MHC I erwiesen (Abb. 12). Auch hier stellten spezifische Pmel-1 Zellen etwa ein Drittel der tumorinfiltrierenden Population der zytotoxischen T-Zellen (Abb. 13, linke Seite). In der Immunhistochemie war abermals zu erkennen, dass T-Zellen (rot für CD3) in engem Kontakt zu Melanomzellen stehen (Abb. 13, rechte Seite).

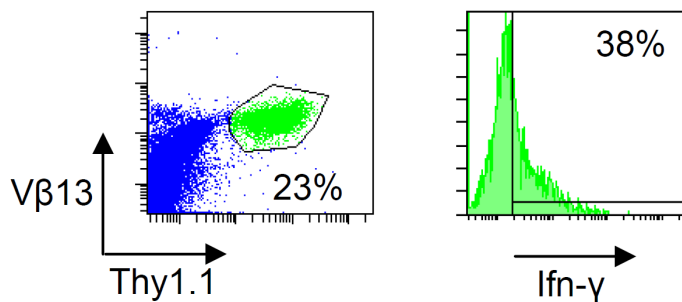


Abb. 11: Durchflusszytometrische Analyse von Splenozyten einer LV-behandelten C57BL/6-Maus mit transplantiertem Melanom 7 Tage nach adoptivem Transfer: Der Dot-Plot zeigt den Anteil $V\beta 13^+Thy1.1^+$ Pmel-1 Lymphozyten an $CD8^+$ Splenozyten. Im nebenstehenden Histogramm ist die intrazelluläre IFN- γ -Expression auf $CD8^+ V\beta 13^+Thy1.1^+$ Pmel-1 Zellen zu sehen.

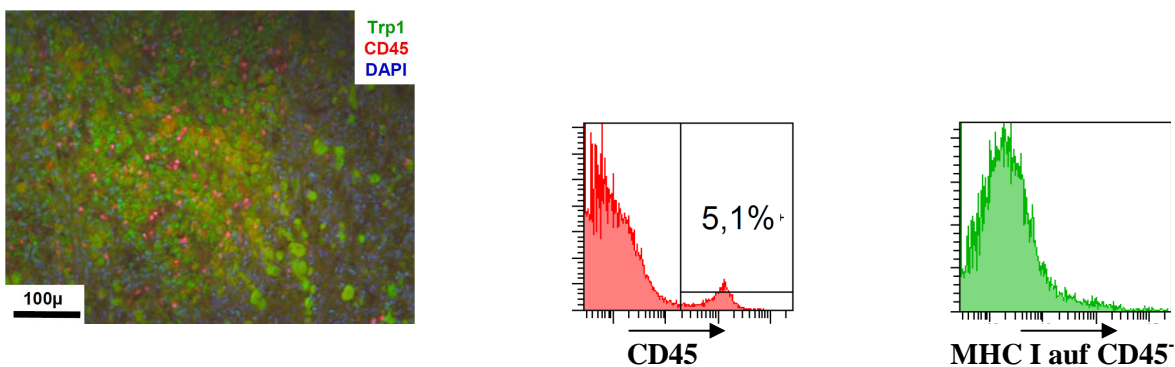


Abb. 12: Immunfluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie eines „LV“ behandelten transplantierten Melanoms einer C57BL/6-Maus 7 Tage nach adoptivem Transfer: Die Trp1-Färbung stellt Melanomzellen grün dar, $CD45^+$ Zellen sind rot dargestellt, Kernfärbung in blau mit DAPI. Die nebenstehenden korrespondierenden Histogramme zeigen den durchflusszytometrisch ermittelten Anteil an $CD45^+$ Zellen (mittleres Bild) bzw. die Expression von MHC-I auf $CD45^-$ Zellen (Bild rechts) im Melanom.

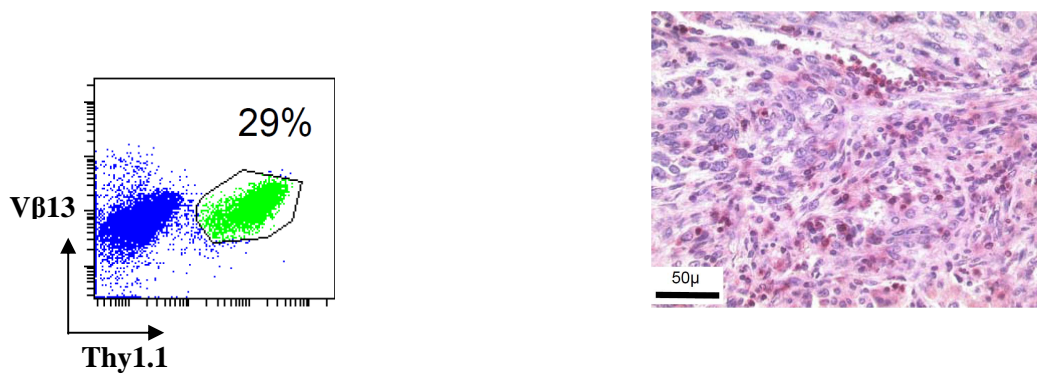


Abb. 13: Durchflusszytometrische Analyse tumorinfiltrierender Lymphozyten im transplantierten Melanom einer „LV“-behandelten C57BL/6-Maus (linke Bildhälfte) und die entsprechende Immunhistologie (rechte Bildhälfte): Der Anteil tumorspezifischer $V\beta 13^+Thy1.1^+$ *Pmel-1* Zellen an tumorinfiltrierenden $CD8^+$ Lymphozyten wurde durchflusszytometrisch ermittelt. In der korrespondierenden Immunhistologie sind die $CD3^+$ T-Zellen rot eingefärbt und liegen in engem Kontakt zu den helleren, größeren Melanomzellen.

Auch in diesem durch Transplantation des primären Melanoms etwas artifizielleren experimentellen System zeigt sich eine ausgeprägte Resistenz der Melanomzellen im Hgf-Cdk4^{R24C}-Modell gegenüber der zytotoxischen Wirkung von adoptiv transferierten melanomspezifischen T-Zellen.

Weiterführend stellte sich die Frage, wie effizient adoptiv transferierte melanomspezifische T-Zellen Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomzellen erkennen und zerstören können. Zur Sichtbarmachung der Tumorerkennung *in vitro* kam das Elispot-Verfahren zum Einsatz, bei dem kultivierte Hgf-Cdk4^{R24C}-Melanomzellen (Abb. 14) und zum Vergleich B16-Melanomzellen eingesetzt wurden, deren immunsuppressive Eigenschaften bekannt sind. Wie in Abbildung 15 an den ausgezählten Spots pro 10^5 Milzzellen zu sehen, ist es den melanomspezifischen zytotoxischen T-Zellen prinzipiell möglich, beide Arten von Melanomzellen zu erkennen.

Die Hgf-Cdk4^{R24C}-Melanomzellen zeigten sowohl *in vivo* (vgl. Abb.12) als auch *in vitro* (Abb. 14) eine niedrige Expression von MHC-I-Molekülen an ihrer Zelloberfläche, was ein Grund für ihre schlechte Erkennbarkeit sein könnte. Die Behandlung mit Interferon- α bewirkt eine Aufregulation des oberflächlichen MHC I (Abb.14), so dass Hgf-Cdk4^{R24C}- und B16-Melanomzellen, die mit IFN- α vorbehandelt waren, im Elispot von melanomspezifischen

zytotoxischen T-Zellen deutlich besser erkannt werden konnten. Dies wird in Abb. 15 an der Anzahl der ausgezählten Spots im Vergleich zu den unbehandelten Melanomzellen deutlich. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass eine niedrige MHC-I-Expression sowie das Fehlen einer Aktivierung des IFN-Systems zur Immuntoleranz von Melanomzellen beitragen.

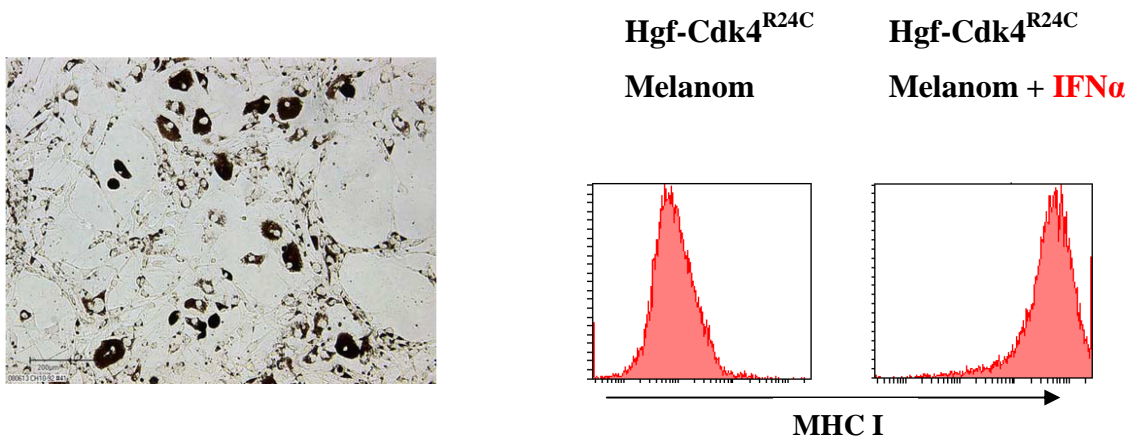


Abb. 14: Mikroskopisches Bild *in vitro* kultivierter Hgf-Cdk4^{R24C}-Melanomzellen (linke Seite) sowie ihre durchflusszytometrisch ermittelte MHC-I Expression ohne (Histogramm Mitte) und mit Zugabe von IFN- α (Histogramm rechts).

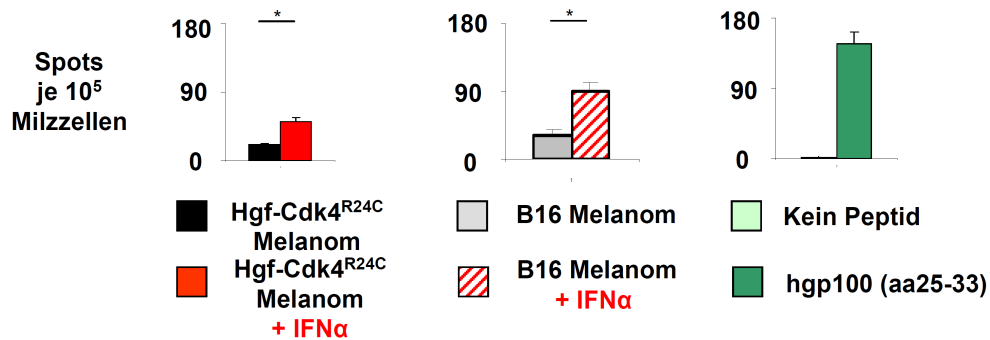


Abb. 15: Immunerkennung von Hgf-Cdk4^{R24C}-Melanomzellen durch Pmel-1 Lymphozyten und der Einfluss von rekombinantem IFN- α : Elispot mit Pmel-1 Lymphozyten und Hgf-Cdk4^{R24C}-Melanomzellen (links), Pmel-1 Lymphozyten und B16-Melanomzellen zum Vergleich (Mitte), Positiv- und Negativkontrollen (rechts).

3.2 Aufhebung der lokalen Immuntoleranz durch Aktivierung des angeborenen Immunsystems nach dem Vorbild einer Virusinfektion

Die therapeutische Stimulation des angeborenen Immunsystems könnte die Erkennbarkeit von Tumorzellen durch antigen-spezifische T-Zellen im Tumormikromilieu verbessern und auf diese Weise die lokale Immuntoleranz aufheben. In Vorarbeiten (Tormo et al., 2006a) wurden die immunstimulierenden Nukleinsäuren CpG-Oligonukleotid-DNA (CpG) und Polyinosin-Polycytidyl-Säure (pI:C) verwendet, die über eine Aktivierung von viralen „pattern-recognition“-Rezeptoren das Typ-I-IFN System stimulieren und so eine virale Infektion imitieren (Barchet et al., 2008). Die Verstärkung der anti-tumoralen Effektorfunktionen von adoptiv transferierten Pmel-1 T-Zellen durch adjuvante Injektionen von immunstimulierenden Nukleinsäuren wurde deshalb experimentell untersucht. Als eine alternative Strategie wurde die chemotherapeutische Konditionierung mit Cyclophosphamid zur Unterstützung des adoptiven T-Zell Transfers eingesetzt. Cyclophosphamid fördert die Expansion der T-Zellen unter anderem durch Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie IL-7 und IL-15, durch Elimination von regulatorischen T-Zellen und durch Stimulation des IFN-Systems (Bracci 2007).

Die Etablierung kombinatorischer Therapiestrategien erfolgte zunächst im transplantierbaren B16-Melanommodell, das den Vorteil der schnellen Generierung von wenig immunogenen, schnell wachsenden Tumoren in einem relativ homogenen Kollektiv bietet. Wie aus dem Schema ersichtlich (Abb. 16), erhielten Wildtypmäuse (C57BL/6) an Tag null des Experiments eine subkutane Injektion von 2×10^5 aus Zellkultur gewonnenen B16 Zellen in die Flanke. Nach etwa neun Tagen waren die Tumoren palpabel und die Mäuse wurden in sechs Experimentgruppen mit jeweils fünf Mäusen randomisiert. Die Kontrollgruppe erhielt keine Behandlung, die „LV“-Gruppe erhielt an Tag zehn nach Tumorinokulation - wie bereits beschrieben - adoptiv transferierte Pmel-1 T-Zellen und Ad-gp100. Eine weitere Gruppe erhielt an Tag neun *post iniectioem* im Sinne einer „Präkonditionierung“ Cyclophosphamid und am nächsten Tag Lymphozyten und Ad-gp100 („C+LV“). Eine dritte Gruppe erhielt Lymphozyten und Vakzinierung sowie an den Tagen 14, 17 und 21 peritumorale Injektionen von immunstimulierenden Nukleinsäuren („LV+I“). Eine vierte Gruppe wurde mit Cyclophosphamid, Ad-gp100 und immunstimulierenden Nukleinsäuren behandelt („C+V+I“) und schließlich erhielt die „C+LV+I“-Gruppe alle bereits erwähnten Komponenten an den aus dem Schema ersichtlichen Zeitpunkten.

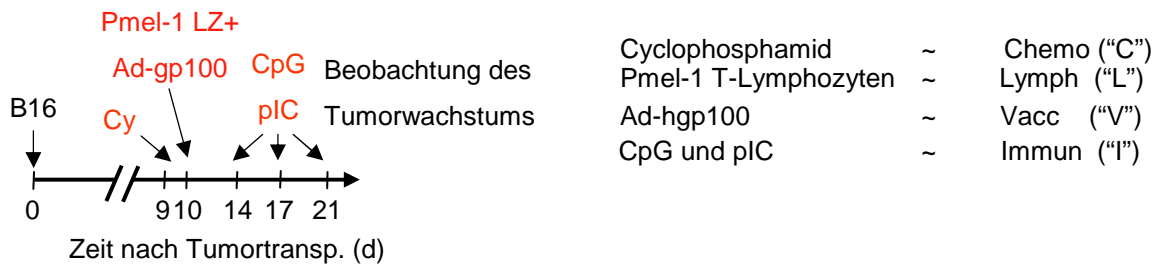


Abb. 16: Behandlungsschema: C57BL/6-Mäusen wurden 2×10^5 B16-Melanomzellen subkutan injiziert. Die Behandlung erfolgte an den in der Abbildung angegebenen Tagen entweder als Monotherapie oder in (Mehrfach-)Kombination.

Anschließend wurde die Tumorentwicklung in allen Gruppen beobachtet und das Tumorwachstum mittels Schieblehrenmessung erfasst (Abb. 17). Hierbei unterschieden sich die Kontrollgruppe und die „LV“-Gruppe wie auch schon in den Experimenten mit primären Melanomen kaum voneinander, sondern zeigten progressives Tumorwachstum, so dass die Tiere ca. 25 Tage nach Beginn des Experiments geopfert werden mussten. Die Kombination von adoptiv transferierten T-Zellen, Vakzinierung und Injektion von immunstimulatorischen Nukleinsäuren („LV+I“) zeigte hingegen nicht nur eine Wachstumsverzögerung der Tumoren bis hin zum Zustand des „stable disease“, sondern in einzelnen Fällen auch partielle Regression der Melanome, was in dieser Gruppe zu einem deutlich längeren Überleben gegenüber der Kontroll- und „LV“-Gruppe führte.

Die Präkonditionierung mit Cyclophosphamid gefolgt von adoptivem T-Zell-Transfer, Vakzinierung mit Ad-gp100 und Injektion von immunstimulierenden Nukleinsäuren („C+LV+I“) führte zu einer kompletten Regression von bereits etablierten, sichtbaren B16-Melanomen bei allen Mäusen der Gruppe. Alle vier komplementären Komponenten der Kombinationstherapie waren erforderlich. Die nur mit Cyclophosphamid, adoptivem T-Zell Transfer und Vakzinierung („C+LV“) bzw. die nur mit Cyclophosphamid, Vakzinierung und immunstimulierenden Nukleinsäuren („C+V+I“) behandelten Gruppen zeigten ähnlich wie die „LV+I“-behandelte Gruppe nur eine Verzögerung des Tumorwachstums sowie eine verlängerte Überlebenszeit, aber keine komplette Tumor-Regression. Die „C+LV+I“-behandelten Tiere blieben auch über einen Beobachtungszeitraum von mehreren Monaten rezidivfrei, so dass man von einer Heilung durch die „C+LV+I“-Behandlung sprechen kann. Ähnliche Ergebnisse konnten in zwei weiteren, unabhängigen Experimenten erzielt werden.

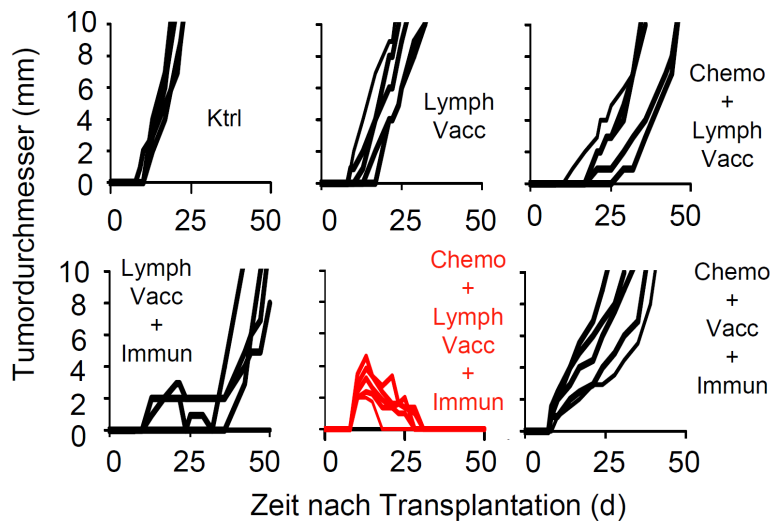


Abb. 17: Wachstumskinetik der B16-Tumoren: Dargestellt ist der Tumordurchmesser in Millimetern in Abhängigkeit von der Zeit nach Tumorinokulation: Repräsentative Gruppen (n=5) mit den in der Abbildung angegebenen Behandlungsmodalitäten.

Außerdem war auffällig, dass die „C+LV+I“-behandelten Mäuse an den Stellen der vormaligen Melanome eine vitiligoartige Depigmentierung des Fells, aber keine weiteren Zeichen von Autoimmunität aufwiesen (Abb. 18). Dies deutet darauf hin, dass unter diesen Vorbedingungen („C+LV+I“) die adoptiv transferierten T-Zellen, die doch ein körpereigenes melanozytenspezifisches Antigen erkennen, präferentiell entartete Melanomzellen gegenüber „normalen“ Melanozyten zerstören.



Abb. 18: C57BL/6-Mäuse, deren B16-Melanome unter „C+LV+I“-Kombinationstherapie zur Regression gebracht wurden, zeigen eine auf die nähere Umgebung des vormaligen Tumors beschränkte Depigmentation des Fells als Ausdruck einer limitierten Autoimmunreaktion.

Zur Beurteilung der Langzeiteffekte der Behandlung wurden einer Gruppe von Mäusen vier Monate nach erfolgreicher „C+LV+I“-Therapie erneut B16 Zellen injiziert: Bei intravenöser Gabe von B16 Zellen (2×10^4 Zellen) in die Schwanzvenen unbehandelter Mäuse, bildeten sich innerhalb von 14 Tagen mehrere hundert makroskopisch erkennbare Melanometastasen in der Lunge. In den vor vier Monaten mit „C+LV+I“-behandelten Mäusen hingegen zeigten sich 14 Tage nach i.v. Gabe der B16 Zellen bei der Obduktion keine makroskopisch sichtbaren Metastasen (Abb. 19, links). Die durchflusszytometrische Untersuchung der Milz ergab, dass zu diesem Zeitpunkt immer noch melanomspezifische zytotoxische Pmel-1 T-Zellen zu finden waren (Abb. 19, rechts).

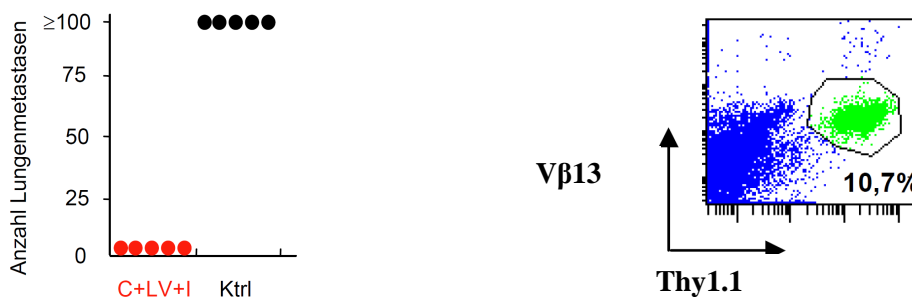


Abb. 19: Persistierende Effekte der „C+LV+I“-Therapie: Linke Bildseite: Auszählung von Lungenmetastasen 14 Tage nach intravenöser Injektion von B16-Zellen in C57BL/6-Mäusen 4 Monate nach Kombinationstherapie (rote Punkte) und Vergleich mit unbehandelter Kontrollgruppe (schwarze Punkte), n pro Gruppe = 5. Rechte Bildseite: Durchflusszytometrische Analyse von Splenozyten einer vor 4 Monaten mit „C+LV+I“ behandelten Maus: Der Dot-Plot zeigt den Anteil $V\beta 13^+ Thy1.1^+$ Pmel-1 Lymphozyten an $CD8^+$ Splenozyten.

Das so im B16-Modell erarbeitete „C+LV+I“-Protokoll wurde anschließend gegen bereits etablierte, makroskopisch sichtbare, transplantierte Hgf-Cdk4^{R24C}-Primärmelanome in der Haut von Wildtypmäusen eingesetzt (siehe Schema in Abb. 20): Die Ergebnisse zeigten, dass auch diese Melanome durch die kombinierte Chemo-Immuntherapie zur kompletten Regression gebracht werden konnten (Abb. 21).

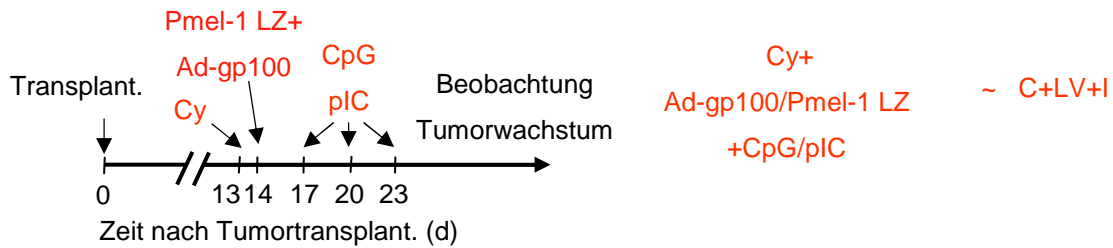


Abb. 20: Therapieprotokoll: Sequentielle Anwendung von Chemotherapie mit Cyclophosphamid, Vakzinierung mit Ad-gp100, adoptivem Pmel-1 T-Zell-Transfer und peritumorale Injektion von immunstimulierenden Nukleinsäuren zu den angegebenen Zeitpunkten nach Tumoringokulation.

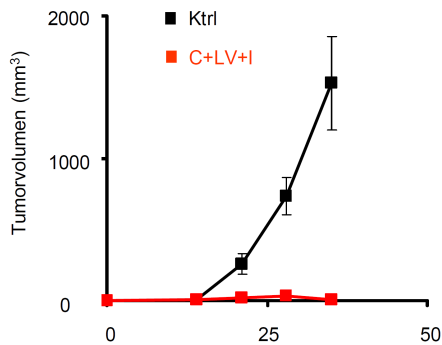


Abb. 21: Wachstumskinetik transplantierte Hgf-Cdk4^{R24C}-Melanome: Dargestellt ist das Tumorstadium in mm³ in Abhängigkeit von der Zeit nach Inokulation in einer Behandlungsgruppe mit „C+LV+I“-Therapie (n=5) und in einer unbehandelten Kontrollgruppe (n=5, Ktrl).

Es stellte sich nun die Frage, ob die bei transplantierbaren Melanomen erfolgreiche Behandlungsstrategie sich auch gegenüber autochthon gewachsenen, über einen längeren Zeitraum etablierten Melanomen als wirksam erweisen würde. Zu diesem Zweck wurden Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäuse im Alter von ca. 70 Tagen, die aufgrund neonataler DMBA-Exposition bereits multiple, makroskopisch sichtbare Melanome trugen, mit zwei aufeinanderfolgenden Zyklen gemäß des vorab etablierten „C+LV+I“-Protokolls behandelt (Abb. 22). Als Kontrollgruppen dienten Mäuse mit DMBA-induzierten Melanomen, die entweder nur adoptiv transferierte T-Lymphozyten und Vakzinierung („LV“), nur Cyclophosphamid und TLR-Agonisten („C+I“) oder gar keine Behandlung erhielten.

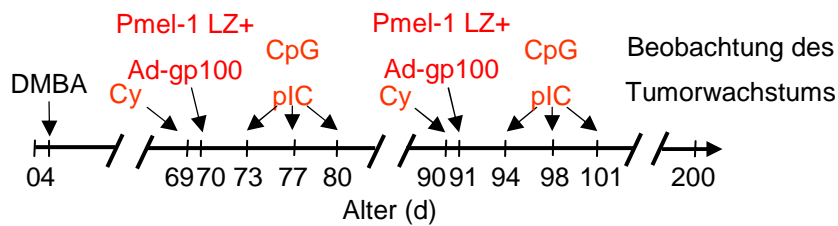


Abb. 22: Behandlungsprotokoll: Sequentielle Anwendung in zwei Zyklen von Chemotherapie mit Cyclophosphamid, Vakzinierung mit Ad-gp100, adoptivem Pmel-1 Transfer und peritumoraler Injektion synthetischer Nucleinsäuren zu den angegebenen Zeitpunkten bei karzinogenbehandelten, tumortragenden Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäusen. Als Kontrollgruppen dienten ebensolche Tiere, die entweder keine Behandlung, nur Vakzinierung und Lymphozytentransfer oder nur Cyclophosphamid und Nucleinsäuren erhielten.

Wie aus den Wachstumskinetiken individueller Tumoren und der Kaplan-Meier-Kurve ersichtlich, unterschieden sich die „LV“- und „C+I“-behandelten Gruppen nicht signifikant von der unbehandelten Kontrollgruppe (Abb. 23): Sowohl die Tumorprogression als auch das Gesamtüberleben blieb in diesen Gruppen unbeeinflusst. In der Gruppe, die zwei aufeinanderfolgende Zyklen des „C+LV+I“-Protokolls erhielt, konnte jedoch in einigen Mäusen eine komplette Regression der Melanome beobachtet werden, bei anderen Mäusen zeigte sich eine Stabilisierung des Krankheitsverlaufs mit Stagnation des Tumorwachstums. Insgesamt wurde eine Gesamtzahl von 15 Mäusen in sechs unabhängigen Experimenten mit Gruppen von zwei bis fünf Mäusen jeweils über 200 Tage lang beobachtet: Hierbei zeigten sieben von ihnen eine komplette Remission. Nach etwa 160 Tagen war ein erneutes Auftreten von primären Melanomen auf der karzinogenbehandelten Rückenhaut zu verzeichnen. Im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe war die Überlebenszeit der „C+LV+I“-behandelten Mäuse signifikant verlängert: Sie lebten im Mittel 165 ± 32 Tage lang, gegenüber 92 ± 10 Tagen. Bei den „C+LV+I“-behandelten Mäusen stellte sich im Verlauf besonders an den Stellen der vormaligen Melanome eine örtlich begrenzte Depigmentierung der Haut und des Fells ein, wie dies auch aus der Verlaufsdokumentation mittels digitaler Fotografie deutlich wird (Abb. 24). Weitere Autoimmunphänomene konnten nicht beobachtet werden.

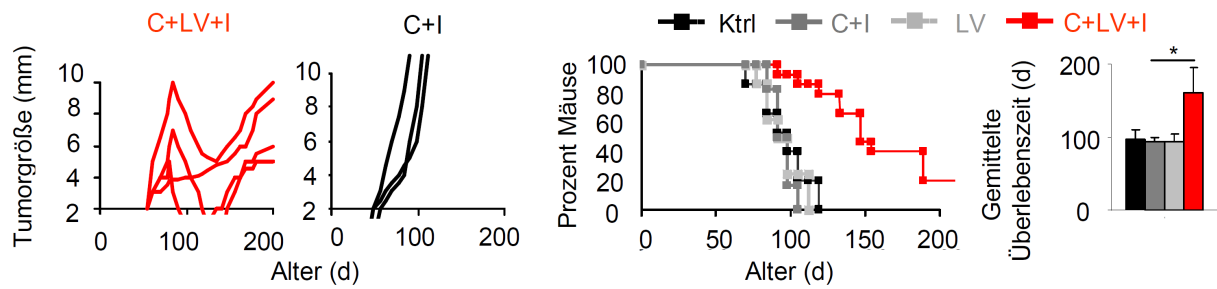


Abb. 23: Evaluation der Kombinationstherapie: Linke Bildhälfte: Wachstumskinetiken primärer Melanome in $Hgf-Cdk4^{R24C}$ -Mäusen in den angegebenen Behandlungsgruppen. Rechte Bildhälfte: Kaplan-Meier-Graph mit dem kumulativen Überleben in den angegebenen Behandlungsgruppen (Ktrl $n=15$; C+I $n=10$, LV $n=10$, C+LV+I $n=16$), ganz rechts gemittelte Überlebenszeit in Tagen in den angegebenen Behandlungsgruppen (* $P<0,01$).

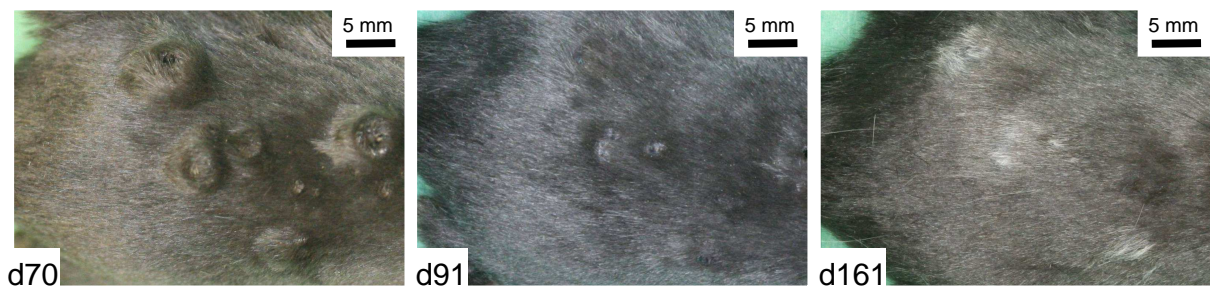


Abb. 24: Regression primärer Melanome in $Hgf-Cdk4^{R24C}$ -Mäusen nach „C+LV+I“-Therapie: Repräsentative Fotostrecke.

3.3 Zytotoxische Zerstörung primärer Melanome durch kombinierte Chemo-Immuntherapie

Um zu verstehen, wie die chemotherapeutische Präkonditionierung mit Cyclophosphamid und die nachfolgende Aktivierung des angeborenen Immunsystems mit immunstimulierenden Nucleinsäuren die Interaktion zwischen Tumor und adoptiv transferierten tumorspezifischen T-Zellen bis hin zur Aufhebung von Tumortoleranz beeinflussen, wurden die Anzahl und der funktionelle Status der Pmel-1 T-Zellen in tumortragenden Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäusen untersucht. Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäuse mit primären, makroskopisch sichtbaren DMBA-induzierten Melanomen erhielten an Tag 70 ihres Lebens entweder adoptiv transferierte Pmel-1 Lymphozyten und Vakzinierung alleine („LV“), zusätzlich eine chemotherapeutische Präkonditionierung mit Cyclophosphamid („C+LV“) oder einen kompletten Behandlungszyklus mit „C+LV+I“ bestehend aus Cyclophosphamid-Vorbehandlung, adoptivem T-Zell Transfer, Vakzinierung und dreimaliger Injektion von immunstimulierenden Nucleinsäuren über neun Tage. Elf Tage nach dem adoptiven Lymphozyten-Transfer wurden die Mäuse getötet und die drainierenden Lymphknoten, Milzen und Tumoren weiteren Analysen zugeführt (Abb. 25).

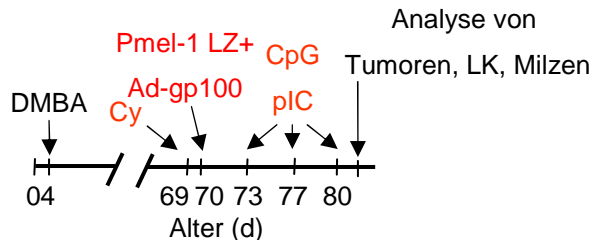


Abb. 25: Behandlungsprotokoll: : Sequentielle Anwendung von Chemotherapie mit Cyclophosphamid, Vakzinierung mit Ad-gp100, adoptivem Pmel-1 T-Zell-Transfer und peritumorale Injektion immunstimulierender Nucleinsäuren zu den angegebenen Zeitpunkten bei karzinogen behandelten, tumortragenden Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäusen. Entnahme und Analyse von Tumoren, Milzen und Lymphknoten 11 Tage nach adoptivem Transfer.

Durchflusszytometrische Untersuchungen der entnommenen Milzen (Abb. 26) zeigen im Vergleich zwischen „LV“- und „C+LV“-behandelten Tieren, dass die Gabe von Cyclophosphamid vor dem adoptivem Pmel-1 Transfer die Expansion der tumorspezifischen T-Zellen verbessert, die Produktion von IFN- γ dieser Zellen aber weitgehend unbeeinflusst lässt. Die zusätzliche Gabe von den das angeborene Immunsystem stimulierenden TLR-Agonisten

(„C+LV+I“) lässt im Vergleich zu den anderen Behandlungsstrategien nicht nur eine höhere Expansion der tumorspezifischen Pmel-1 Lymphozyten in der Milz erkennen, sondern scheint auch eine stärkere Differenzierung zu zytotoxischen Effektorzellen zu bewirken, da signifikant mehr IFN- γ -positive Zellen nachzuweisen sind.

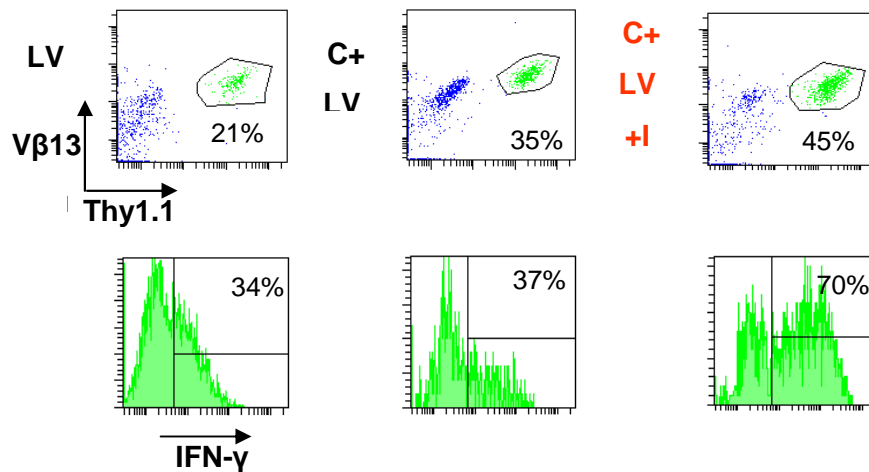


Abb. 26: Durchflusszytometrische Analyse von Splenozyten 11 Tage nach adoptivem Transfer: Der Dot-Plot zeigt den Anteil $V\beta 13^+Thy1.1^+$ Pmel-1 T-Lymphozyten an $CD8^+$ Milzzellen. Im untenstehenden Histogramm ist die intrazelluläre IFN- γ -Expression auf $CD8^+V\beta 13^+Thy1.1^+$ Pmel-1 T-Zellen zu sehen (Behandlungsgruppen wie angegeben).

Abbildung 27 verdeutlicht dies noch einmal graphisch: Mäuse mit transplantierten B16 Melanomen wurden wie bereits oben beschrieben behandelt („LV“, „C+LV“, „C+LV+I“) und die Milzzellen einzelner Tiere wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten – fünf, acht und zwölf Tage nach adoptivem Transfer - hinsichtlich der Expansion von Pmel-1 T-Zellen und hinsichtlich der IFN- γ -Produktion der spezifischen T-Zellen untersucht: Sowohl die Expansion der Pmel-1 Lymphozyten als auch ihre IFN- γ -Produktion war zwölf Tage nach adoptivem Transfer in B16-tragenden Mäusen, die die „C+LV+I“-Behandlung erhielten, signifikant höher als in den beiden Vergleichsgruppen. Dies unterstützt die Annahme, dass präkonditionierende Chemotherapie zusammen mit Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch immunstimulierende Nucleinsäuren die Expansion, die Effektorzellendifferenzierung und das Überleben von adoptiv transferierten, tumorspezifischen Pmel-1 T-Lymphozyten *in vivo* signifikant verbessert.

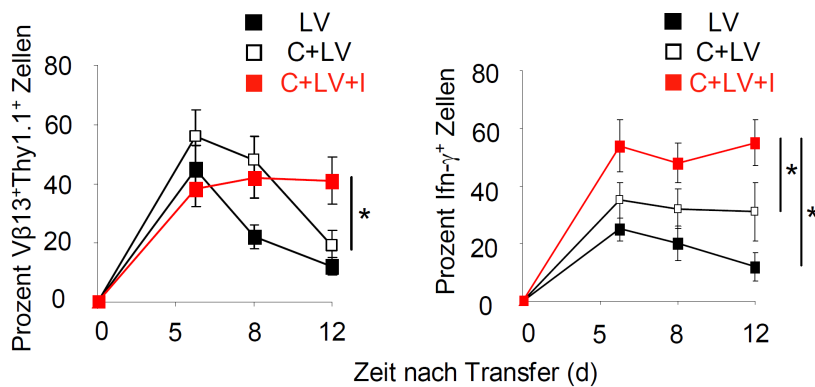


Abb. 27: Zeitlicher Verlauf von T-Zell-Expansion und Effektorzellendifferenzierung von transferierten Pmel-1 T-Zellen in B16-tragenden C57BL/6-Mäusen: Links: Durchschnittlicher prozentualer Anteil von Pmel-1 T-Zellen an $CD8^+$ Milzzellen in den angegebenen Behandlungsgruppen. Rechts: Anteil von intrazellulär $IFN-\gamma$ exprimierenden $CD8^+ V\beta 13^+Thy1.1^+$ Pmel-1 T-Zellen in der Milz. Daten aus sechs verschiedenen Mäusen zu den angegebenen Zeitpunkten (* $P < 0,05$).

Untersuchungen der DMBA-induzierten Melanome von $Hgf-Cdk4^{R24C}$ -Mäusen ergaben, dass sich die kombinierte Wirkung der Komponenten des „C+LV+I“-Protokolls bis auf die Ebene des Tumormikromilieus erstreckt: Analysen mittels Immunfluoreszenz (Abb. 28) zeigten eine dichte Infiltration des Tumors – das melanozytäre Antigen Trp1 ist hier grün gefärbt – mit Leukozyten (CD 45 in rot, Kernfärbung blau mit DAPI).

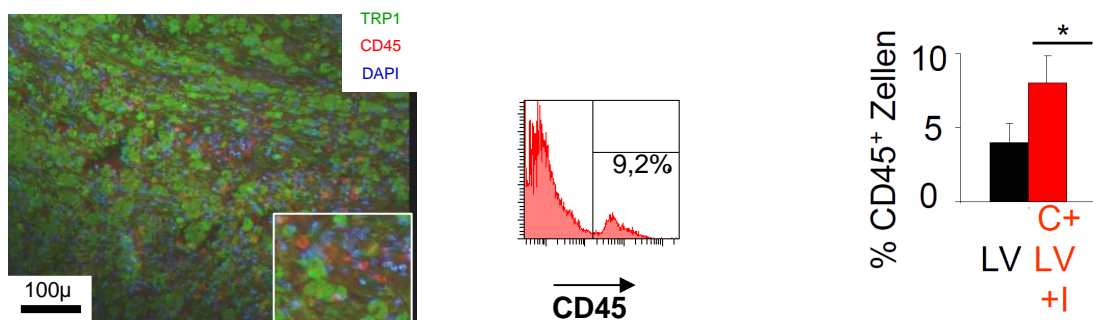


Abb. 28: Immunfluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie eines „C+LV+I“ behandelten primären $Hgf-Cdk4^{R24C}$ -Melanoms 11 Tage nach adoptivem Transfer: Die Trp1-Färbung stellt Melanomzellen grün dar, $CD45^+$ Zellen in rot, Kernfärbung in blau mit DAPI. Das nebenstehende korrespondierende Histogramm zeigt den durchflusszytometrisch ermittelten Anteil $CD45^+$ Zellen im primären Melanom. Ganz rechts: Quantifizierung des Anteils $CD45^+$ Zellen in den angegebenen Gruppen (n pro Gruppe = 6, * $P < 0,05$).

Das vermehrte Vorkommen von Leukozyten im Tumor bestätigte sich auch in der Durchflusszytometrie: Ein Vergleich der durchflusszytometrischen Quantifizierung der Leukozytenzahl ergab eine signifikant höhere Infiltration des Tumorgewebes in „C+LV+I“-behandelten Mäusen (8% der Zellen) als in Mäusen mit „LV“-Behandlung (4% der Zellen, Abb. 28, ganz rechts). In die Graphik gingen Untersuchungen von jeweils sechs Mäusen pro Gruppe in drei unabhängigen Experimenten ein.

In der in Abbildung 29 dargestellten beispielhaften immunhistochemischen Aufarbeitung eines Melanoms nach „C+LV+I“-Behandlung zeigten sich die großen, eosinophilen Tumorzellen in engem Kontakt mit den rot angefärbten CD3⁺ Lymphozyten. Die HE-Färbung des Tumors enthüllte darüber hinaus einen massiven Untergang der Tumorzellen.

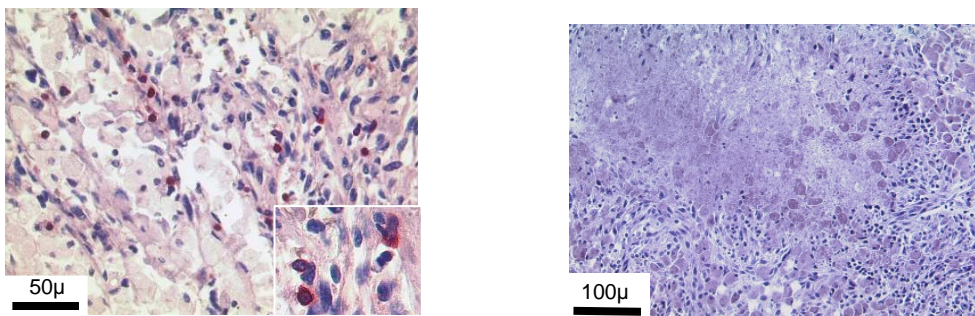


Abb. 29: Mikroskopische Darstellung eines primären Melanoms nach „C+LV+I“-Behandlung: Links: Die immunhistochemische Färbung für CD3 stellt T-Lymphozyten (in rot) in engem Kontakt zu den größeren, helleren Melanomzellen dar. Die HE-Färbung desselben Melanoms zeigt eine ausgedehnte Nekrosezone.

Die beispielhafte durchflusszytometrische Untersuchung des Immuninfiltrats eines „C+LV+I“-behandelten DMBA-Tumors (Abb. 30) zeigte, dass sich ein Großteil der tumorinfiltrierenden Lymphozyten aus tumorspezifischen Pmel-1 T-Zellen (50% der tumorinfiltrierenden T-Zellen) zusammensetzt. Der Gesamtanteil von Pmel-1 T-Zellen im Tumorgewebe war insgesamt in der „C+LV+I“-Gruppe mit 3,4% signifikant höher als mit 1,2% in der „LV“-Kontrollgruppe (Daten aus drei unabhängigen Experimenten mit je sechs Mäusen pro Gruppe).

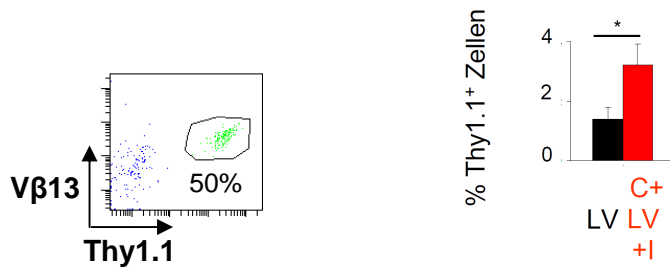


Abb. 30: Durchflusszytometrische Analyse eines primären Melanoms nach „C+LV+I“-Behandlung: Links: Repräsentativer Dot Plot: Anteil von $V\beta 13^+ Thy1.1^+$ Pmel-1 T-Zellen an tumorinfiltrierenden $CD8^+$ Zellen. Rechts: Quantifizierung des Anteils von Pmel-1 T-Zellen im Tumorgewebe in den angegebenen Gruppen (n pro Gruppe =6).

Die Analyse der Tumoren auf molekularer Ebene mittels quantitativer RT-PCR (Abb. 31) legte eine signifikante Veränderung des Tumormikromilieus durch die „C+LV+I“-Behandlung nahe: Dargestellt ist die x-fache Zu- bzw. Abnahme der Expression der angegebenen Gene in den Tumoren der jeweiligen Gruppen gegenüber Tumoren von unbehandelten Mäusen, wobei jede Gruppe fünf Mäuse umfasste. Als signifikant war hier die Zunahme der Expression von Genen in der „C+LV+I“-Gruppe anzusehen, deren Genprodukte eine Rolle in der zytotoxischen Aktivität von T-Zellen spielen (GranzymB, Perforin) und ihre Effektorzelldifferenzierung betreffen (IFN- γ , CXCL10). Eine signifikante Verringerung hinsichtlich der Expression fand sich in der „C+LV+I“-Gruppe bei Genen, die den melanozytären Ursprung des Gewebes anzeigen, wie hier mit gp100 und Trp2 dargestellt, was für einen Untergang des entarteten melanozytären Gewebes durch die Kombinationsbehandlung sprechen könnte. Bei zwei hier untersuchten Genen (Tgf β , CXCL2), deren Produkte immunsuppressive und proangiogenetische Eigenschaften vermitteln, konnte keine signifikante Veränderung des Expressionmusters gefunden werden.

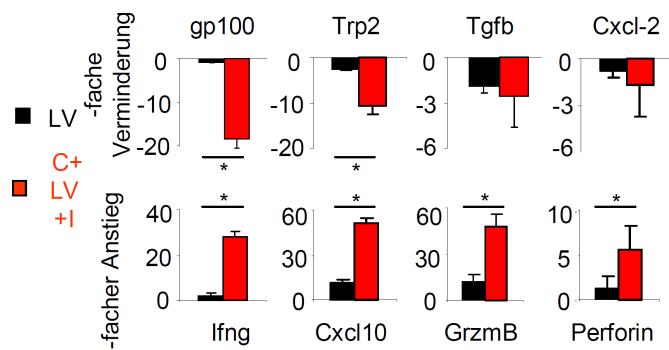


Abb. 31: Molekulare Charakterisierung primärer Melanome der jeweiligen Behandlungsgruppe: Resultate der quantitativen RT-PCR für die angegebenen Gene, dargestellt als x-fache Änderung der Expression in Relation zu Melanomen von unbehandelten Tieren (n pro Gruppe = 5, $*P < 0,05$).

In der Zusammenschau unterstützen diese Untersuchungen des Tumorf infiltrats und des Tumormikromilieus die Hypothese, dass durch die kombinierte „C+LV+I“-Chemotherapie über eine Aktivierung des IFN-Systems eine zytotoxische Entzündungsreaktion innerhalb des Tumorgewebes gefördert wird, die zu einer Zerstörung und Regression des Tumors selbst führt. Dies deutet auf eine therapeutisch induzierte Veränderung des Tumormikromilieus hin, die zu einer Aufhebung der Tumortoleranz und zu einer „Tumor-Immun-Erkennung“ und Tumorerstörung führt.

3.4 Komplettremission sporadischer primärer Melanome in Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäusen

Die Induktion von Melanomen durch Karzinogene wie DMBA erschafft zwar in relativ kurzer Zeit ein recht homogenes Kollektiv an Versuchstieren mit multiplen Melanomen, es kann jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass durch die neonatale Karzinogenbehandlung eine wie auch immer geartete Beeinflussung des Immunsystems oder der Tumorantigene selbst erfolgen könnte. Auch kann man nicht unterscheiden, ob es sich bei den nach erfolgreicher Behandlung wieder auftretenden Tumoren um eine Rezidivsituation handelt oder die Tumoren *de novo* durch Langzeiteffekte des DMBA auf die Haut entstehen. Das Hgf-Cdk4^{R24C}-Mausmodell bietet hier allerdings - wie bereits erwähnt - den Vorteil, dass primäre Melanome auch spontan in der zweiten Hälfte des ersten Lebensjahres mit nahezu vollständiger Penetranz auftreten, wie dies in Vorarbeiten schon demonstriert werden konnte: Innerhalb eines Jahres entwickeln unbehandelte Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäuse mehrere dunkel pigmentierte Naevi und einzelne progressiv und invasiv wachsende Melanome. Das Auftreten der sporadischen primären Melanome unterliegt einer gewissen zeitlichen Streuung (8.-16. Lebensmonat). Makroskopisch sind die sporadischen, primären Melanome kaum von den durch DMBA-induzierten Melanomen zu unterscheiden. Vorangegangene Experimente konnten außerdem zeigen, dass die Melanome sich auch hinsichtlich der histologischen Morphologie, des fehlenden Immunzellinfiltrats und des Vorkommens von Metastasen ähneln. Jedoch treten im Unterschied zum „DMBA-Modell“ die Melanome bei unbehandelten Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäusen nur vereinzelt auf.

Es stellte sich nun die Frage, ob sich auch sporadische primäre Melanome durch „C+LV+I“-Behandlung therapeutisch beeinflussen lassen. Um dies beantworten zu können, wurden Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäuse, deren sporadische Tumoren in der Haut ca. 5mm maßen und eine Wachstumsprogression aufwiesen, in zwei Gruppen randomisiert. Eine Gruppe erhielt keine Behandlung, die andere wurde gemäß dem „C+LV+I“-Protokoll (Abb. 32) mit zwei Therapiezyklen behandelt. Bei beiden Gruppen wurde das Tumorwachstum beobachtet.

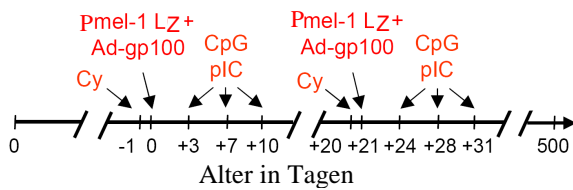


Abb. 32: Behandlungsprotokoll: Sequentielle Anwendung in zwei Zyklen von Chemotherapie mit Cyclophosphamid, Vakzinierung mit Ad-gp100, adoptivem Pmel-1 T-Zell-Transfer und peritumorale Injektion immunstimulierender Nukleinsäuren zu den angegebenen Zeitpunkten bei Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäusen mit sporadischen primären Melanomen. Die Kontrollgruppe erhielt keine Behandlung.

Bisher konnte die Effektivität der „C+LV+I“-Behandlung an vier Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäusen mit spontanen Tumoren über mehr als sechs Monate dokumentiert werden (Abb. 33): Bei zweien der vier behandelten Mäuse fand sich eine komplette Regression der spontanen Melanome, sodass die Tiere auch sechs Monate nach Behandlungsbeginn noch am Leben waren. Bei den beiden anderen Mäusen zeigten sich eine partielle Regression der Tumoren und eine Stabilisierung des Krankheitsverlaufs über einige Monate, gefolgt von einer langsamen Progression des Tumorwachstums. Im Gegensatz dazu mussten die Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäuse, deren spontane Melanome nicht behandelt wurden, wenige Wochen nach der Randomisierung aufgrund der progressiv wachsenden Melanome getötet werden.

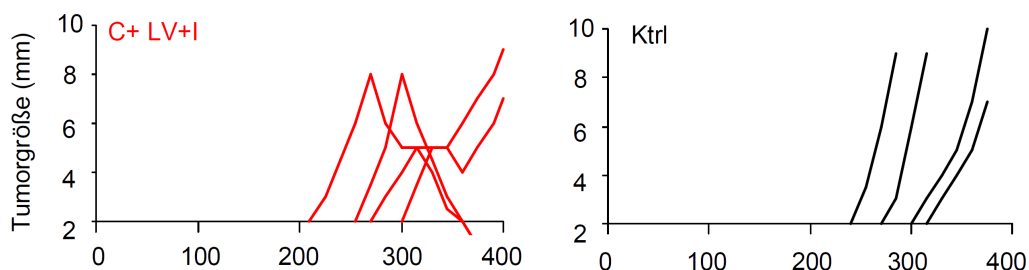


Abb. 33: Wachstumskinetik spontaner, primärer Melanome von Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäusen: Dargestellt ist die Tumorgröße in mm³ in Abhängigkeit vom Lebensalter in der Behandlungsgruppe und der Kontrollgruppe (jeweils n=4)

Der Erfolg der „C+LV+I“-Behandlung bei sporadischen Melanomen wird durch die Fotodokumentation des Behandlungsverlaufs noch einmal eindrücklich demonstriert (Abb. 34): Am Tag des Behandlungsbeginns (hier Tag 301) maß das spontane Melanom an der Flanke der Maus etwas mehr als 5mm im Durchmesser. Bereits während des zweiten Behandlungszyklus am 329. Lebenstag zeigte sich eine deutliche Regression des Tumors und eine zentrale Ulzeration sowie eine lokalisierte Depigmentierung des Fells waren zu beobachten. Zwei Monate nach Behandlungsbeginn (Tag 357) konnte eine vollkommene Regression des Melanoms verzeichnet werden.

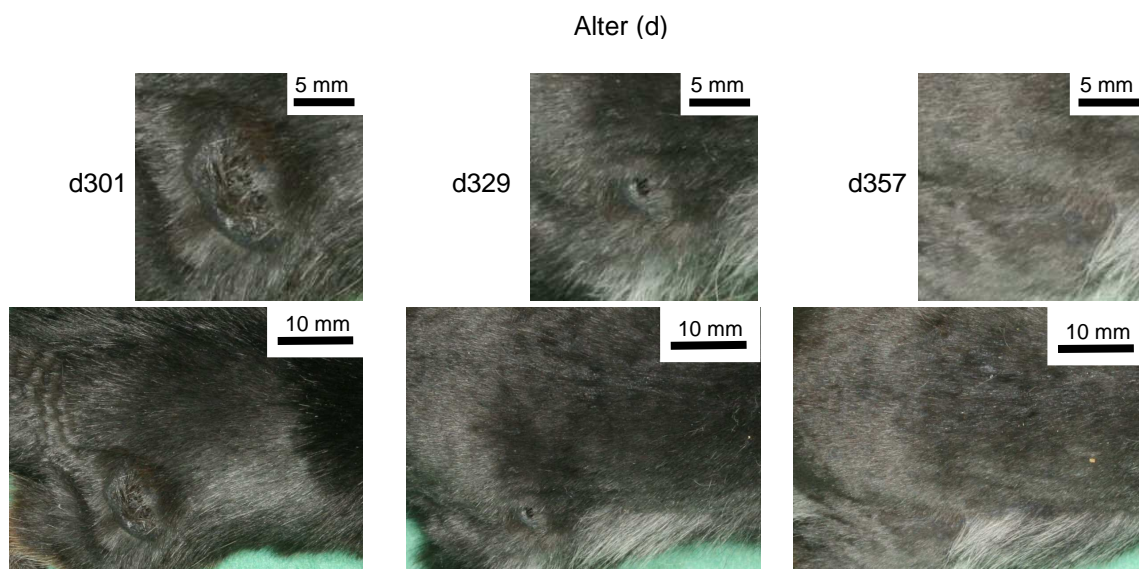


Abb. 34: Regression spontaner, primärer Melanome in Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäusen nach „C+LV+I“-Therapie: Repräsentative Fotostrecke.

Diese Ergebnisse unterstreichen noch einmal die Effektivität der kombinierten Chemo-Immuntherapie: Auch in einer der klinischen Relevanz am ehesten angemessenen experimentellen Situation, in der Tumoren sporadisch, ohne Induktion durch Karzinogen auftreten, konnte durch die „C+LV+I“-Behandlung eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit von Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäusen mit spontanen Melanomen erzielt werden.

4. Diskussion

4.1 Analyse zytotoxischer T-Zell-Funktionen im Mikromilieu primärer Tumoren

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion zwischen primären Melanomzellen und melanomspezifischen zytotoxischen T-Zellen *in vivo* untersucht. Neu waren dabei zwei wesentliche Aspekte:

1. die Verwendung eines genetisch erzeugten Mausstamms, bei dem primäre Melanome *in vivo* in der Haut entstehen, progressiv wachsen und metastasieren und
2. die Verwendung von adoptiv transferierten, *in vivo* aktivierten TZRtg CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen, die ein von Melanozyten und Melanomzellen natürlicherweise exprimiertes Differenzierungsantigen erkennen.

Dieses experimentelle System imitiert die klinische Situation bei Patienten sowohl aus tumor- als auch aus immunbiologischer Sicht, indem es einerseits die molekulare Pathogenese humaner Melanome und andererseits die lymphozytäre Immunabwehr gegen ein klinisch relevantes Melanomantigen abbildet. Dabei wird ein Brückenschlag zwischen diesen beiden, in der Vergangenheit häufig isolierten Disziplinen der Tumorforschung möglich, dessen Notwendigkeit immer mehr betont wird (Prendergast und Jaffee, 2007).

Ähnliche Experimente wurden in der Vergangenheit in Mausmodellen durchgeführt, bei denen sich primäre Tumoren durch gewebespezifische, transgene Expression von SV40 Large-T-Antigen als viralem Onkogen entwickelten. Hierbei wurden TZRtg T-Zellen verwendet, die das entsprechende virale Onkoprotein erkennen (Speiser et al., 1997; Garbi et al., 2004; Willimsky und Blankenstein, 2005; Savage et al., 2008). Diesen Modellen gegenüber bietet das Hgf-Cdk4^{R24C}-Mausmodell einige wichtige Vorzüge: Primärtumoren entstehen ohne ein immunogenes virales Onkoprotein und metastasieren in drainierende Lymphknoten und innere Organe. Außerdem werden T-Zellen verwendet, die ein melanozytäres Protein erkennen, das nicht an der malignen Transformation beteiligt ist und natürlich - und nicht als Transgen - exprimiert wird. Dies entspricht viel eher der klinischen Situation bei Patienten mit Melanom, bei denen häufig eine antitumorale zelluläre Immunreaktivität gegen Differenzierungs-Antigene beobachtet wird.

4.2 Mechanismen der Immuntoleranz in primären Tumoren

Primäre kutane Melanome in Hgf-Cdk4^{R24C}- Mäusen zeigen nur eine geringe Expression von MHC-Klasse-I Molekülen auf der Zelloberfläche. Prinzipiell wird auf diese Weise die Erkennung und Zerstörung primärer kutaner Melanome durch tumorspezifische Effektor-T-Zellen erschwert. Die Untersuchungen mit tumorspezifischen Pmel-1 T-Zellen zeigten, dass das Wachstum primärer Tumoren *in vivo* nicht beeinträchtigt ist (Abb. 4), obwohl die Tumorzellen *in vitro* erkannt werden (Abb. 15). Die niedrige MHC-I Expression könnte deshalb zur Immuntoleranz im Tumormikromilieu beitragen. Weiterführende Analysen zeigten, dass die injizierten Pmel-1 T-Zellen auch in tumortragenden Tieren nach einer adenoviralen Vakzinierung *in vivo* expandierten und zu Effektorzellen differenzierten (Abb. 6). Pmel-1 T-Zellen waren auch in der Lage, primäre Hgf-Cdk4^{R24C}-Melanome in der Haut diffus zu infiltrieren (Abb. 7+8). Ein Rekrutierungsdefekt von Lymphozyten, den Garbi et al. für primäre SV40-induzierte Insulinome im Pankreas und adoptiv transferierte SV40-spezifische T-Zellen beobachteten (Garbi et al., 2004), erscheint als Ursache für die Immuntoleranz daher nicht wahrscheinlich.

In verschiedenen Modellen wurden eine Reihe weiterer Mechanismen für die Tumor-Immuntoleranz beschrieben (Rabinovich et al., 2007). In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte insbesondere die lokale Aktivität von regulatorischen T-Zellen oder von tumorinfiltrierenden Makrophagen (Coffelt et al., 2009) weitestgehend ausgeschlossen werden, da diese Zellen in den primären Melanomen nicht gefunden werden konnten. Allerdings zeigten die Tumoren eine variable Infiltration mit Gr1⁺CD11b⁺ Zellen, die histomorphologisch am ehesten neutrophilen Granulozyten und deren unreife Vorstufen entsprechen. Diese Zellpopulation, die auch sogenannte „myeloid-derived suppressor cells“ beinhalten kann, wurde in verschiedenen anderen Tiermodellen für immunsuppressive Wirkungen verantwortlich gemacht (Kusmartsev und Gabrilovich, 2002).

Letztlich müssen auch die Wirkungen des transgen überexprimierten Wachstumsfaktors Hgf berücksichtigt werden: Okunishi et al. konnten eine Beeinträchtigung der Antigenpräsentation durch DC unter Hgf-Supplementierung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachweisen (Okunishi et al., 2005). Zudem konnte von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass Hgf über den Protein-Kinase-B/Akt-Signalweg das Überleben von c-met exprimierenden Zellen fördern kann (Fiaschi-Taesch et al., 2007; Yamaura et al., 2004). Die transgene Überexpression von Hgf

könnte im hier vorliegenden Hgf-Cdk4^{R24C}-Melanommodell sowohl die immunologische Tumorerkennung durch seine immunsuppressiven Eigenschaften als auch das Überleben von Tumorzellen beeinflussen.

4.3 Aktivierung des angeborenen Immunsystems

Untersuchungen *in vitro* zeigten, dass die Expression von MHC-I Molekülen auf der Oberfläche von Hgf-Cdk4^{R24C}-Melanomzellen durch rekombinantes IFN- α hochreguliert und auf diese Weise die Erkennung durch Pmel-1 T-Zellen wesentlich erleichtert werden konnte (Abb. 14+15). Zur effektiven Aktivierung des IFN-Systems *in vivo* wurde die lokale Injektion von immunstimulierenden Nukleinsäuren etabliert, um eine akute Virusinfektion im Tumor-Mikromilieu zu imitieren. Basierend auf den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurden polyI:C und CpG-Oligonukleotide als definierte Liganden für TLR3 und TLR9 (sowie MDA-5) verwendet, die physiologischerweise als Rezeptoren für virale RNA bzw. DNA eine akute Infektion signalisieren und das angeborene Immunsystem stimulieren (Kawai und Akira, 2006). Über die Produktion von Typ-I Interferonen kann es einerseits zu einer besseren Immunerkennung des Tumors kommen. Andererseits können Interferone dendritische Zellen aktivieren, die Kreuzpräsentation von Antigen fördern, das Überleben von T-Zellen verlängern und die zytotoxische Aktivität unterstützen (Hiroishi et al., 2000; Dunn et al., 2005). Darüber hinaus hemmen Interferone die Tumor-Angiogenese und verstärken die Tumorzell-Apoptose (Dunn et al., 2005; Qin et al., 2003).

Die antitumorale zytotoxische Wirkung der adoptiv transferierten T-Zellen ließ sich durch eine zusätzliche präkonditionierende Chemotherapie mit Cyclophosphamid weiter verstärken. Nicht-myeloablative Dosen von Cyclophosphamid werden seit vielen Jahren zur Optimierung eines Lymphozyten-Transfers eingesetzt (Greenberg et al., 1981). Cyclophosphamid unterstützt sowohl die homöostatische Expansion der infundierten T-Zellen als auch ihre zytotoxische Differenzierung durch Induktion von Zytokinen wie IL-7, IFN- α und IL-15 (Bracci et al., 2007). Außerdem kommt es zur Depletion von regulatorischen T-Zellen, die physiologischerweise zytotoxische T-Zellen in ihrer Aktivität begrenzen (van der Most et al., 2009). Die Chemotherapie beeinflusst eventuell auch den Tumor selbst, indem Tumorgefäße geschädigt werden können. Durch eine Veränderung der Zell-Stroma-Interaktion wird die Invasion zytotoxischer, gegen den Tumor gerichteter Lymphozyten erleichtert (Ibe et al., 2001).

Alle vier Komponenten der in dieser Arbeit entwickelten Kombinationstherapie waren erforderlich, um die immunologische „Toleranz“ im Tumorgewebe aufzuheben und eine komplette Regression primärer Melanome zu bewirken (Abb. 23+24). Bei der weiteren Analyse des Wirkmechanismus zeigte sich, dass die Vorbehandlung mit Cyclophosphamid und die adjuvante Gabe von immunstimulierenden Nukleinsäuren gemeinsam eine lang anhaltende Expansion von adoptiv transferierten T-Zellen bewirken (Abb. 26+27). Dabei wirkten sich polyI:C und CpG-ODN insbesondere auf die Effektorzell-Differenzierung aus (Abb. 27). Dies führte zu einer zytotoxischen Entzündung im Tumor-Mikromilieu - verbunden mit einer Zerstörung primärer Melanomzellen.

In jüngster Zeit konnten weitere mögliche Wirkungen von immunstimulierenden Nukleinsäuren als Bestandteil von Kombinationstherapien aufgezeigt werden: Verdeil et al. demonstrierten den Effekt von Zytokinkomplexen in Kombination mit polyI:C (Verdeil et al., 2008): Antikörper-komplexiertes IL-2 verbesserte die Aktivierung und die Effektorfunktion von tumorspezifischen, adoptiv transferierten T-Zellen, die allein aber nicht in der Lage waren, Tumoren vollständig zu zerstören. Erst die Kombination mit polyI:C, das zu einer erhöhten Expression von Granzym B in tumorspezifischen T-Zellen führte, konnte eine Eradikation des Tumors durch die adoptiv transferierten Zellen bewirken.

Ein weiterer Effekt der sequentiellen Gabe einer präkonditionierenden Chemotherapie und einer adjuvanten Immunstimulation mit TLR-Agonisten wurde durch Salem et al. kürzlich nachgewiesen: Die Vorbehandlung mit Cyclophosphamid führte zu einer schnelleren und quantitativ höheren Generation von kompetenten DC aus Vorläuferzellen im Knochenmark. Die anschließende Gabe des TLR3-Agonists polyI:C als Vakzinadjuvans, bewirkte eine verstärkte Ausdifferenzierung und Aktivierung der DC und so eine verbesserte T-Zell-Aktivierung *in vivo* (Salem et al., 2010). Die Arbeit von Paulos et al. zeigte, dass auch bei einer konditionierenden Ganzkörper-Röntgenbestrahlung vor einem adoptiven T-Zell-Transfer die resultierende Immunantwort durch eine Stimulation des angeborenen Immunsystems über TLR-Rezeptoren unterstützt wird. Diese TLR-Stimulation kommt durch eine bestrahlungsbedingte Darmschädigung zustande, die zu einer kurzfristigen systemischen Invasion von Darmbakterien mit nachfolgender TLR4-abhängiger Endotoxin-Reaktion führt (Paulos et al., 2007).

In der Zusammenschau könnte die Anwendung von immunstimulierenden Nukleinsäuren im Rahmen von kombinierten Chemo-Immuntherapien in Zukunft eine wirkungsvolle, gezielte und gut steuerbare Therapieoption darstellen.

4.4 Tumorimmunität und Autoimmunität

Ein wesentlicher Bestandteil der kombinierten Chemo-Immuntherapie von Hgf-Cdk4^{R24C}-Melanomen war die Aktivierung der spezifischen Pmel-1 Lymphozyten durch eine adenovirale Vakzinierung mit Adgp100. Das von den zytotoxischen Pmel-1 Lymphozyten erkannte gp100 stellt allerdings kein tumorspezifisches Antigen dar. Als Differenzierungsantigen ist es vielmehr auf allen Zellen melanozytären Ursprungs - also sowohl auf Melanozyten als auch auf Melanomzellen - gleichermaßen vorhanden. Die zytotoxische Inflammation mit nachfolgender Zerstörung der Tumorzellen zog jedoch interessanterweise nur eine relativ lokalisierte Depigmentierung von Haut und Fell im Bereich der primären Tumoren nach sich. Schwerwiegende Autoimmunität gegen Pigmentzellen - etwa in Form ausgedehnter vitiligoartiger Felldepigmentierung - war nicht zu beobachten. Die Kombinationstherapie scheint also präferentiell die Erkennung und Zerstörung von entarteten gegenüber normalen Pigmentzellen zu fördern.

Die Basis dieser Selektivität mag in dem komplementären Zusammenspiel der einzelnen - jede für sich unverzichtbaren - Komponenten begründet liegen, die sowohl auf Zellen des Immunsystems als auch auf Tumorzellen direkt wirken können: Cyclophosphamid hat einerseits eine präkonditionierende Wirkung auf den Lymphozytentransfer und kann andererseits auch die Proliferation von Tumorzellen inhibieren und damit die Integrität des Tumorgewebes verändern (Ibe et al., 2001). Die Imitation einer akuten viralen Infektion im Tumormikromileu durch adjuvante Injektionen von immunstimulierenden Nukleinsäuren trägt einerseits zur Aktivierung von DC sowie zur Aktivierung, Differenzierung und Expansion von T-Zellen bei und wirkt andererseits auch direkt auf Melanomzellen, die ebenfalls TLR3 und MDA5 als virale Nukleinsäure-Rezeptoren exprimieren. Die jeweilige Bedeutung der einzelnen therapeutischen Wirkmechanismen muss in zukünftigen Experimenten geklärt werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte „C-LV-I“-Behandlung von malignen Melanomen hat gegenüber anderen immunologisch ausgerichteten kombinierten Therapie-Strategien den Vorteil, dass unerwünschte autoimmune Nebenwirkungen im Vergleich zu anderen Behandlungsansätzen weniger ausgeprägt ausfallen. So führte der von Palmer et al. beschriebene Lymphozytentransfer in Verbindung mit hohen Dosen von IL-2 zu starken Autoimmunphänomenen bei den behandelten melanomtragenden Mäusen (Palmer et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass die aus der Therapie resultierende, das Augenlicht der Tiere bedrohende Panuveitis unabhängig von Typ-1 Interferonen war. Eine ausgeprägte autoimmune Uveitis tritt unter der „C-LV-I“-Behandlung nicht auf. Fallberichte von Patienten mit fortgeschrittenen Melanomen, die mit adoptiv transferierten, gegen das Differenzierungsantigen MART-1 gerichteten Lymphozyten und IL-2 therapiert wurden, zeigen ebenfalls starke autoimmune Reaktionen gegen Pigmentzellen - auch in immunprivilegierten Kompartimenten wie Auge und Ohr (Yeh et al., 2009).

Derartige autoimmune Nebenwirkungen könnten vermieden werden, wenn die als Ziel ausgewählten Tumorantigene nur in entarteten Zellen exprimiert würden. Hierfür eignen sich insbesondere die eingangs erwähnten Cancer-Testis-Antigene, zu denen unter anderem auch MAGE1, das erste molekular definierte Tumorantigen beim Menschen zählt. Bis dato sind mehr als 100 solcher Antigene bei verschiedenen Formen von Krebs - darunter auch beim malignen Melanom - beschrieben. Ihre physiologische Rolle in Keimzellgeweben ist bis heute noch weitgehend ungeklärt (Caballero und Chen, 2009). Eine Reihe verschiedener klinischer Vakzinierungs-Studien werden gegenwärtig mit MAGE-A3 und NY-ESO-1 Antigenen durchgeführt. Erste Ergebnisse dieser Studien haben bereits einige Hinweise auf den Nutzen und die Verträglichkeit dieser Antigenkandidaten ergeben.

Auch die Induktion einer Immunantwort gegen Antigene, die durch Neumutationen entstanden sind, ist denkbar. Diese Antigene sind jedoch für jeden einzelnen Patienten hochspezifisch und eignen sich daher nicht für eine molekular definierte Vakzinierungsstrategie. Als alternative Möglichkeit bietet sich der adoptive Transfer von autologen, tumorspezifischen Lymphozyten an, die aus chirurgisch exzidierten Metastasen eines Patienten isoliert und *in vitro* expandiert werden können. Eine solche Therapie ist jedoch sehr aufwändig und wird gegenwärtig nur an einigen wenigen Zentren in den USA, insbesondere am National Cancer Institute in Bethesda, MD, durchgeführt (Rosenberg und Dudley, 2009).

4.5 Immun-Escape-Mechanismen

Hgf-Cdk4^{R24C}-Mäuse, die unter der kombinierten Chemo-Immuntherapie eine komplette Tumorregression aufwiesen, zeigten unter Langzeitbeobachtung ab einem Alter von 150 Tagen – d.h. etwa zwei Monate nach dem letzten Therapiezyklus - ein erneutes Auftreten pigmentierter Melanome auf der karzinogenbehandelten Rückenhaut (s.a. Abb. 23). Histomorphologisch zeigten diese in erfolgreich behandelten Mäusen neu aufgetretenen Melanome ein ähnliches Bild wie Melanome in unbehandelten Kontrolltieren im Alter von 90 Tagen. Es konnte nur eine geringe Anzahl tumorinfiltrierender Lymphozyten gefunden werden. Allerdings waren Pmel-1 Gedächtniszellen in allen Tieren nachweisbar, die sich durch eine erneute adenovirale Vakzinierung expandieren und zu Effektorzellen differenzieren ließen. In weiterführenden Experimenten muss untersucht werden, ob diese reaktivierten Pmel-1 Gedächtnis-T-Zellen erneut dazu fähig sind, eine Regression der neu aufgetretenen Melanome zu bewirken. Gleichzeitig müssen die neu aufgetretenen Melanome im Hinblick auf mögliche Immunescape-Mechanismen untersucht werden. Hierzu zählen beispielsweise ein Antigen- oder MHC-Verlust.

4.6 Perspektiven für die klinische Übertragung

Einige immuntherapeutische Strategien zur Bekämpfung von Krebs haben sich in den letzten Jahren auch im klinischen Alltag etablieren können. Zielgerichtete Therapien mit Antikörpern können heute beispielsweise auf dem Gebiet hämatologischer Erkrankungen beachtliche Erfolge erzielen (z.B. Rituximab). Nachhaltigere Konzepte, wie z.B. Vakzinierungen, die die aktive und dauerhafte Einbeziehung des Immunsystems im Kampf gegen Tumoren beinhalten, haben ihren Weg in die klinische Anwendung außerhalb von Studien bisher noch nicht finden können. Gegenwärtig kommt der Kombination dieser immuntherapeutischen Ansätze mit bereits etablierten Strategien wie der Chemo- oder Bestrahlungstherapie besondere Bedeutung zu. Dabei wird das Ziel verfolgt, komplementäre bzw. synergistische Effekte zu erzielen und so eine wirkungsvollere, länger anhaltende Kontrolle maligner Tumoren zu ermöglichen (Siegmond-Schultze, 2009).

Bei der Entwicklung kombinierter, zielgerichteter Therapieformen muss eine Vielzahl von Einflussfaktoren berücksichtigt werden. Neben tumorbiologischen Besonderheiten der jeweiligen Tumorentität, ihrer Immunogenität oder Lokalisation muss auch das Erkrankungsstadium und die individuelle Suszeptibilität für eine Immuntherapie erfasst werden (Siegmond-Schultze, 2009). Moderne Methoden der molekularen Diagnostik wie z.B. Genexpressionsanalysen sind

prinzipiell in der Lage, die Auswahl einer patientenspezifischen Therapiestrategie zu unterstützen. Mit ihrer Hilfe können Tumoren nicht nur hinsichtlich ihrer molekularen Pathogenese (i.e. der Aktivierung onkogener Signaltransduktionskaskaden) eingruppiert werden, sondern auch hinsichtlich ihrer Immunogenität (i.e. der Expression von Tumorantigenen und von immunmodulierenden Zytokinen im Tumormikromilieu).

Präklinische Untersuchungen in geeigneten experimentellen Tiermodellen ähnlich dem in dieser Arbeit verwendeten Hgf-Cdk4^{R24C}-Mausmodell, die sowohl die klinische Situation als auch die Pathogenese des Tumors möglichst wirklichkeitstreu abbilden, können möglicherweise helfen, die Wirksamkeit neuer Therapieprinzipien und die Effektivität von kombinierten Therapiestrategien im Vorfeld von kosten- und zeitaufwändigen klinischen Studien einzuschätzen.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, in einem neuen genetisch erzeugten Mausmodell die Interaktion zwischen Melanomzellen und melanomspezifischen T-Zellen zu untersuchen. Dabei wurden Resistenzmechanismen primärer Tumoren gegenüber einer durch T-Zellen vermittelten zytotoxischen Zerstörung ergründet und - auf diesen Erkenntnissen aufbauend – eine neue therapeutische Kombinationsstrategie zur Aufhebung der Immuntoleranz im Tumormikromilieu entwickelt. Das im Labor etablierte Hgf-Cdk4^{R24C}-Mausmodell ist als experimentelles System von besonderer klinischer Relevanz, da es die molekulare Pathogenese humaner Melanome imitiert. Die Verwendung eines TZRtg Mausstammes, bei dem CD8⁺ zytotoxische T-Zellen ein von Melanozyten und Melanomzellen natürlicherweise exprimiertes Differenzierungsantigen erkennen, erlaubte die Untersuchung der spezifischen zellulären Tumorabwehr. Die experimentellen Ergebnisse zeigen, dass primäre und metastasierte Melanome von adoptiv transferierten, tumorspezifischen Effektor-T-Zellen infiltriert, aber nicht erkannt und zerstört werden. Als mögliche Ursachen für diese Tumortoleranz wurde eine niedrige Expression von MHC-I Molekülen auf Tumorzellen und das Fehlen von proinflammatorischen Zytokinen im Tumor-Mikromilieu nachgewiesen. Um die zytotoxische Immunabwehr zu verstärken, wurde das angeborene Immunsystem nach dem Vorbild einer Virusinfektion durch adjuvante Injektionen mit immunstimulierenden Nukleinsäuren aktiviert. Zusammen mit einer präkonditionierenden Chemotherapie konnte auf diese Weise eine präferentielle Zerstörung von Melanomzellen durch tumorspezifische T-Zellen *in vivo* erreicht werden. Die vier verschiedenen Wirkprinzipien der Kombinationstherapie (i.e. Chemotherapie, adoptiver Lymphozytentransfer, adenovirale Vakzinierung und immunstimulierende Nukleinsäuren als Adjuvans) führten gemeinsam zu einer zytotoxischen Entzündung im Tumorgewebe mit nachfolgender Tumorregression. Autoimmune Nebenwirkungen beschränkten sich auf lokale Felldepigmentierungen. Als Fazit ergibt sich, dass die klinische Übertragung ähnlicher Strategien für die kombinierte Aktivierung des angeborenen und des erworbenen Immunsystems bei Patienten mit fortgeschrittenem malignem Melanom eine neue, erfolgversprechende Therapieoption sein könnte.

6. Literaturverzeichnis

Atkins MB, Kunkel L, Sznol M, Rosenberg SA. High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update. *Cancer J Sci Am* 2000; 6: Suppl 11-14

Barchet W, Wimmenauer V, Schlee M, Hartmann, G. Accessing the therapeutic potential of immunostimulatory nucleic acids. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 389-395

Beddingfield FC. The melanoma epidemic: res ipsa loquitur. *Oncologist* 2003; 8: 459-465

Bloom MB, Perry-Lalley D, Robbins PF, Li Y, el-Gamil M, Rosenberg SA, Yang, JC. Identification of tyrosinase-related protein 2 as a tumor rejection antigen for the B16 melanoma. *J Exp Med* 1997; 185: 453-459

Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 175-208

Boon T, Maryanski, J. Tumour cell variants with increased immunogenicity obtained by mutagen treatment. *Cancer Surv* 1985; 4: 135-148

Bracci L, Moschella F, Sestili P, La Sorsa V, Valentini M, Canini I, Baccarini S, Maccari S, Ramoni C, Belardelli F, Proietti E. Cyclophosphamide enhances the antitumor efficacy of adoptively transferred immune cells through the induction of cytokine expression, B-cell and T-cell homeostatic proliferation, and specific tumor infiltration. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 644-653

Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970; 172: 902-908

Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 1970; 13:1-27

Caballero OL, Chen YT. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci* 2009; 100: 2014-2021

Celluzzi CM, Mayordomo JI, Storkus WJ, Lotze MT, Falo, LD. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J Exp Med* 1996; 183: 283-287

Chin L, Tam A, Pomerantz J, Wong M, Holash J, Bardeesy N, Shen Q, O'Hagan R, Pantginis J, Zhou H, Horner JW, Cordon-Cardo C, Yancopoulos GD, DePinho, RA. Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature* 1999; 400: 468-472

Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 1996; 77: 1303-1310

Coffelt SB, Hughes R, Lewis CE. Tumor-associated macrophages: effectors of angiogenesis and tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1796: 11-18

Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, Jackson V, Hamada H, Pardoll D, Mulligan, RC. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3539-3543

Dunn GP, Bruce AT, Sheehan KC, Shankaran V, Uppaluri R, Bui JD, Diamond MS, Koebel CM, Arthur C, White JM, Schreiber RD. A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat Immunol* 2005; 6: 722-729

Ehrlich P. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk* 1908; 5: 273-290

Fiaschi-Taesch N, Stewart AF, Garcia-Ocana A. Improving islet transplantation by gene delivery of hepatocyte growth factor (HGF) and its downstream target, protein kinase B (PKB). *Akt. Cell Biochem Biophys* 2007; 48: 191-199

Fidler, IJ. Characterization in Vivo and in Vitro of Tumor Cells Selected for Resistance to Syngeneic Lymphocyte-mediated Cytotoxicity. *Cancer Res* 1976; 36: 3160-3165

Garbi N, Arnold B, Gordon S, Hammerling GJ, Ganss R. CpG motifs as proinflammatory factors render autochthonous tumors permissive for infiltration and destruction. *J Immunol* 2004; 172: 5861-5869

Greenberg PD, Cheever MA, Fefer A. Eradication of disseminated murine leukemia by chemoimmunotherapy with cyclophosphamide and adoptively transferred immune syngeneic Lyt-1+2- lymphocytes. *J Exp Med* 1981; 154: 952-963

Hewitt HB, Blake ER, Walder AS. A critique of the evidence for active host defence against cancer, based on personal studies of 27 murine tumours of spontaneous origin. *Br J Cancer* 1976; 33: 241-259

Hiroishi K, Tüting T, Lotze MT. IFN-alpha-expressing tumor cells enhance generation and promote survival of tumor-specific CTLs. *J Immunol* 2000; 164: 567-572

Ibe S, Qin Z, Schuler T, Preiss S, Blankenstein T. Tumor rejection by disturbing tumor stroma cell interactions. *J Exp Med* 2001; 194: 1549-1559

Jonuleit H, Giesecke-Tuettenberg A, Tüting T, Thurner-Schuler B, Stuge TB, Paragnik L, Kandemir A, Lee PP, Schuler G, Knop J, Enk, AH. A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer* 2001; 93: 243-251

Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh CS, Reis e Sousa C, Matsuura Y, Fujita T, Akira S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006; 441: 101-105

Kawai T, Akira, S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* 2006; 7: 131-137

Kirkwood JM, Tarhini AA, Panelli MC, Moschos SJ, Zarour HM, Butterfield LH, Gogas HJ. Next generation of immunotherapy for melanoma. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3445-3455

Klein G, Klein, E. Immune surveillance against virus-induced tumors and nonresectability of spontaneous tumors: contrasting consequences of host versus tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 2121-2125

Knuth A, Wolfel T, Klehmann E, Boon T, Meyer zum Buschenfelde KH. Cytolytic T-cell clones against an autologous human melanoma: specificity study and definition of three antigens by immunoselection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2804-2808

Kolar R. Animal experimentation. *Sci Eng Ethics* 2006; 12: 111-122

Krimpenfort P, Quon KC, Mooi WJ, Loonstra A, Berns A. Loss of p16Ink4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. *Nature* 2001; 413: 83-86

Kusmartsev S, Gabrilovich, DI. Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51: 293-298

Larue L, Beermann, F. Cutaneous melanoma in genetically modified animals. *Pigment Cell Res* 2007; 20: 485-497

Lim YS, Kang BY, Kim EJ, Kim SH, Hwang SY, Kim TS. Augmentation of therapeutic antitumor immunity by B16F10 melanoma cells transfected by interferon-gamma and allogeneic MHC class I cDNAs. *Mol Cells* 1998; 8: 629-636

Longhi MP, Trumpfheller C, Idoyaga J, Caskey M, Matos I, Kluger C, Salazar AM, Colonna M, Steinman RM. Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4⁺ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. *J Exp Med* 2009; 206: 1589-1602

Mandelboim O, Vadai E, Fridkin M, Katz-Hillel A, Feldman M, Berke G, Eisenbach L. Regression of established murine carcinoma metastases following vaccination with tumour-associated antigen peptides. *Nat Med* 1995; 1: 1179-1183

Mantovani A, Romero P, Palucka AK, Marincola FM. Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. *Lancet* 2008; 371: 771-783

Mayordomo JI, Zorina T, Storkus WJ, Zitvogel L, Celluzzi C, Falo LD, Melief CJ, Ildstad ST, Kast WM, Deleo AB. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat Med* 1995; 1: 1297-1302

Musiani P, Modesti A, Giovarelli M, Cavallo F, Colombo MP, Lollini PL, Forni G. Cytokines, tumour-cell death and immunogenicity: a question of choice. *Immunol Today* 1997; 18: 32-36

Noonan FP, Recio JA, Takayama H, Duray P, Anver MR, Rush WL, De Fabo EC, Merlino, G. Neonatal sunburn and melanoma in mice. *Nature* 2001; 413: 271-272

Okunishi K, Dohi M, Nakagome K, Tanaka R, Mizuno S, Matsumoto K, Miyazaki J, Nakamura T, Yamamoto K. A novel role of hepatocyte growth factor as an immune regulator through suppressing dendritic cell function. *J Immunol* 2005; 175: 4745-4753

Overwijk WW, Lee DS, Surman DR, Irvine KR, Touloukian CE, Chan CC, Carroll MW, Moss B, Rosenberg SA, Restifo NP. Vaccination with a recombinant vaccinia virus encoding a "self" antigen induces autoimmune vitiligo and tumor cell destruction in mice: requirement for CD4(+) T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 2982-2987

Overwijk WW, Theoret MR, Finkelstein SE, Surman DR, de Jong LA, Vyth-Dreese FA, DelleMijn TA, Antony PA, Spiess PJ, Palmer DC, Heimann DM, Klebanoff CA, Yu Z, Hwang LN, Feigenbaum L, Kruisbeek AM, Rosenberg SA, Restifo NP. Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8+ T cells. *J Exp Med* 2003; 198: 569-580

Palmer DC, Chan CC, Gattinoni L, Wrzesinski C, Paulos CM, Hinrichs CS, Powell DJ, Klebanoff CA, Finkelstein SE, Fariss RN, Yu Z, Nussenblatt RB, Rosenberg SA, Restifo NP. Effective tumor treatment targeting a melanoma/melanocyte-associated antigen triggers severe ocular autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 8061-8066

Paulos CM, Wrzesinski C, Kaiser A, Hinrichs CS, Chieppa M, Cassard L, Palmer DC, Boni A, Muranski P, Yu Z, Gattinoni L, Antony PA, Rosenberg SA, Restifo NP. Microbial translocation augments the function of adoptively transferred self/tumor-specific CD8+ T cells via TLR4 signaling. *J Clin Invest* 2007; 117: 2197-2204

Poeck H, Besch R, Maihoefer C, Renn M, Tormo D, Morskaya SS, Kirschnek S, Gaffal E, Landsberg J, Hellmuth J, Schmidt A, Anz D, Bscheider M, Schwerd T, Berking C, Bourquin C, Kalinke U, Kremmer E, Kato H, Akira S, Meyers R, Hacker G, Neuenhahn M, Busch D, Ruland J, Rothenfusser S, Prinz M, Hornung V, Endres S, Tüting T, Hartmann G. 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma. *Nat Med* 2008; 14: 1256-1263

Prendergast GC, Jaffee EM. Cancer immunologists and cancer biologists: why we didn't talk then but need to now. *Cancer Res* 2007; 67: 3500-3504

Qin Z, Schwartzkopff J, Pradera F, Kammertoens T, Seliger B, Pircher H, Blankenstein T. A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells. *Cancer Res* 2003; 63: 4095-4100

Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 267-296

Rosenberg SA, Dudley ME. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr Opin Immunol* 2009; 21: 233-240

Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004; 10: 909-915

Salem ML, El-Naggar SA, Cole DJ. Cyclophosphamide induces bone marrow to yield higher numbers of precursor dendritic cells in vitro capable of functional antigen presentation to T cells in vivo. *Cell Immunol* 2010; 261: 134-143

Savage PA, Vosseller K, Kang C, Larimore K, Riedel E, Wojnoonski K, Jungbluth AA, Allison JP. Recognition of a ubiquitous self antigen by prostate cancer-infiltrating CD8+ T lymphocytes. *Science* 2008; 319: 215-220

Serrone L, Zeuli M, Sega FM, Cognetti F. Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. *J Exp Clin Cancer Res* 2000; 19: 21-34

Siegmund-Schultze, N. Immuntherapien gegen Krebs: Die klinische Anwendung rückt näher. *Dtsch Arztebl* 2009; 48: 2403-2408

Sotillo R, Garcia JF, Ortega S, Martin J, Dubus P, Barbacid M, Malumbres M. Invasive melanoma in Cdk4-targeted mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13312-13317

Speiser DE, Lienard D, Rufer N, Rubio-Godoy V, Rimoldi D, Lejeune F, Krieg AM, Cerottini JC, Romero P. Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J Clin Invest* 2005; 115: 739-746

Speiser DE, Miranda R, Zakarian A, Bachmann MF, Kall-Faienza K, Odermatt B, Hanahan D, Zinkernagel RM, Ohashi PS. Self antigens expressed by solid tumors do not efficiently stimulate naive or activated T cells: implications for immunotherapy. *J Exp Med* 1997; 186: 645-653

Steitz J, Britten CM, Wolfel T, Tüting T. Effective induction of anti-melanoma immunity following genetic vaccination with synthetic mRNA coding for the fusion protein EGFP.TRP2. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 246-253

Steitz J, Bruck J, Lenz J, Knop J, Tüting T. Depletion of CD25(+) CD4(+) T cells and treatment with tyrosinase-related protein 2-transduced dendritic cells enhance the interferon alpha-induced, CD8(+) T-cell-dependent immune defense of B16 melanoma. *Cancer Res* 2001; 61: 8643-8646

Thomas, L. Reactions to homologous tissue antigens in relation to hypersensitivity. Cellular and Humoral in relation to hypersensitivity. In: Lawrence HS, ED. *Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive State*. New York: Hoebner-Harper, 1959: 529-532

Turner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch P, Brocker EB, Steinman RM, Enk A, Kampgen E, Schuler G. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* 1999; 190: 1669-1678

Tormo D, Ferrer A, Bosch P, Gaffal E, Basner-Tschakarjan E, Wenzel J, Tüting T. Therapeutic efficacy of antigen-specific vaccination and toll-like receptor stimulation against established transplanted and autochthonous melanoma in mice. *Cancer Res* 2006a; 66: 5427-5435

Tormo D, Ferrer A, Gaffal E, Wenzel J, Basner-Tschakarjan E, Steitz J, Heukamp LC, Gutgemann I, Buettner R, Malumbres M, Barbacid M, Merlino G, Tüting T. Rapid growth of invasive metastatic melanoma in carcinogen-treated hepatocyte growth factor/scatter factor-transgenic mice carrying an oncogenic CDK4 mutation. *Am J Pathol* 2006b; 169: 665-672

Tüting T, Storkus WJ, Lotze MT. Gene-based strategies for the immunotherapy of cancer. *J Mol Med* 1997; 75: 478-491

Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; 254: 1643-1647

Van der Most RG, Currie AJ, Mahendran S, Prosser A, Darabi A, Robinson BW, Nowak AK, Lake RA. Tumor eradication after cyclophosphamide depends on concurrent depletion of regulatory T cells: a role for cycling TNFR2-expressing effector-suppressor T cells in limiting effective chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58: 1219-1228

Verdeil G, Marquardt K, Surh CD, Sherman LA. Adjuvants targeting innate and adaptive immunity synergize to enhance tumor immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 16683-16688

Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birnbaum E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P, Botcherby M, Bray N, Brent MR, Brown DG, Brown SD, Bult C, Burton J, Butler J, Campbell RD, Carninci P, Cawley S, Chiaromonte F, Chinwalla AT, Church DM, Clamp M, Clee C, Collins FS, Cook LL, Copley RR, Coulson A, Couronne O, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Daly M, David R, Davies J, Delehaunty KD, Deri J, Dermitzakis ET, Dewey C, Dickens NJ, Diekhans M, Dodge S, Dubchak I, Dunn DM, Eddy SR, Elnitski L, Emes RD, Eswara P, Eyas E, Felsenfeld A, Fewell GA, Flicek P, Foley K, Frankel WN, Fulton LA, Fulton RS, Furey TS, Gage D, Gibbs RA, Glusman G, Gnerre S, Goldman N, Goodstadt L, Grafham D, Graves TA, Green ED, Gregory S, Guigo R, Guyer M, Hardison RC, Haussler D, Hayashizaki Y, Hillier LW, Hinrichs A, Hlavina W, Holzer T, Hsu F, Hua A, Hubbard T, Hunt A, Jackson I, Jaffe DB, Johnson LS, Jones M, Jones TA, Joy A, Kamal M, Karlsson EK, Karolchik D, Kasprzyk A, Kawai J, Keibler E, Kells C, Kent WJ, Kirby A, Kolbe DL, Korf I, Kucherlapati RS, Kulbokas EJ, Kulp D, Landers T, Leger JP, Leonard S, Letunic I, Levine R, Li J, Li M, Lloyd C, Lucas S, Ma B, Maglott DR, Mardis ER, Matthews L, Mauceli E, Mayer JH, McCarthy M, McCombie WR, McLaren S, McLay K, McPherson JD, Meldrim J, Meredith B, Mesirov JP, Miller W, Miner TL, Mongin E, Montgomery KT, Morgan M, Mott R, Mullikin JC, Muzny DM, Nash WE, Nelson JO, Nhan MN, Nicol R, Ning Z, Nusbaum C, O'Connor MJ, Okazaki Y, Oliver K, Overton-Larty E, Pachter L, Parra G, Pepin KH, Peterson J, Pevzner P, Plumb R, Pohl CS, Poliakov A, Ponce TC, Ponting CP, Potter S, Quail M, Raymond

A, Roe BA, Roskin KM, Rubin EM, Rust AG, Santos R, Sapojnikov V, Schultz B, Schultz J, Schwartz MS, Schwartz S, Scott C, Seaman S, Searle S, Sharpe T, Sheridan A, Shownkeen R, Sims S, Singer JB, Slater G, Smit A, Smith DR, Spencer B, Stabenau A, Stange-Thomann N, Sugnet C, Suyama M, Tesler G, Thompson J, Torrents D, Trevaskis E, Tromp J, Ucla C, Ureta-Vidal A, Vinson JP, Von Niederhausern AC, Wade CM, Wall M, Weber RJ, Weiss RB, Wendl MC, West AP, Wetterstrand K, Wheeler R, Whelan S, Wierzbowski J, Willey D, Williams S, Wilson RK, Winter E, Worley KC, Wyman D, Yang S, Yang SP, Zdobnov EM, Zody MC, Lander ES. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 2002; 420: 520-562

Whitmore MM, DeVeer MJ, Edling A, Oates RK, Simons B, Lindner D, Williams BR. Synergistic activation of innate immunity by double-stranded RNA and CpG DNA promotes enhanced antitumor activity. *Cancer Res* 2004; 64: 5850-5860

Willimsky G, Blankenstein T. Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. *Nature* 2005; 437: 141-146

Yamaura K, Ito K, Tsukioka K, Wada Y, Makiuchi A, Sakaguchi M, Akashima T, Fujimori M, Sawa Y, Morishita R, Matsumoto K, Nakamura T, Suzuki J, Amano J, Isobe M. Suppression of acute and chronic rejection by hepatocyte growth factor in a murine model of cardiac transplantation: induction of tolerance and prevention of cardiac allograft vasculopathy. *Circulation* 2004; 110: 1650-1657

Yeh S, Karne NK, Kerkar SP, Heller CK, Palmer DC, Johnson LA, Li Z, Bishop RJ, Wong WT, Sherry RM, Yang JC, Dudley ME, Restifo NP, Rosenberg SA, Nussenblatt RB. Ocular and systemic autoimmunity after successful tumor-infiltrating lymphocyte immunotherapy for recurrent, metastatic melanoma. *Ophthalmology* 2009; 116: 981-989

7. Danksagung

An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. med. Thomas Tüting, meinem Doktorvater, für die unermüdliche Betreuung der vorgelegten Arbeit und für die Möglichkeit, auch weiterhin in seiner Arbeitsgruppe wissenschaftlich tätig sein zu können.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe für experimentelle Dermatologie für die erfahrene Unterstützung und hilfreiche Diskussionen bedanken. Besonders hervorzuheben seien an dieser Stelle Mira Cron, Evelyn Gaffal und Jennifer Landsberg. Für die technische Einweisung und Unterstützung möchte ich Stefanie Büchs und Petra Speuser danken.

Dankbar bin ich dem BONFOR Forschungsförderungsprogramm für die Möglichkeit, mich während des Studiums ein Jahr lang komplett der wissenschaftlichen Arbeit widmen zu können.

Abschließend danke ich meinen Eltern, die mir das Studium der Medizin ermöglichten und mir jeden erdenklichen Rückhalt gaben.