

**Der Einfluss des Typ I Interferonsystems auf die Entstehung und
Progression primär kutaner Hgf-Cdk4^{R24C} Maus-Melanome**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Philipp Jansen

aus Gladbeck

2015

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Tüting
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Wolfgang Kastenmüller

Tag der Mündlichen Prüfung: 20.03.2015

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. ès. sci. Thomas Bieber

Meinen Eltern und meinem Bruder

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	8
1.1 Pathogenese und Klinik des Melanoms	8
1.2 Bedeutung des Immunsystems für die Melanompathogenese	10
1.2.1 Immunzellinfiltration des Melanoms	10
1.2.2 Die Theorie des Immunoediting	11
1.2.3 Die Bedeutung des Typ I Interferonsystems für die Tumorphogenese	14
1.3 Experimentelle Mausmodelle in der immunonkologischen Forschung	16
1.4 Hypothesen und Ziele	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Tierexperimentelle Methoden	19
2.2 Histologie, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	19
2.2.1 Herstellung von Gewebeschnitten	19
2.2.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung	20
2.2.3 Immunhistochemische Färbungen und Immunfluoreszenz	21
2.3 Durchflusszytometrie	23
2.3.1 Allgemeines Funktionsprinzip	23
2.3.2 FACS-Vorbereitung	24
2.3.3 Durchflusszytometrische Färbung und Analyse	24
2.4 Molekularbiologische Methoden	25
2.4.1 RNA Isolation aus Gewebe	25
2.4.2 Real Time PCR	25
2.5 Statistische Analysen	27
3. Ergebnisse	30
3.1 Das Typ I Interferonsystem hat keinen Einfluss auf die Entstehung und Progression von DMBA-induzierten Melanomen bei Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen	30

3.2	Ifnar1-kompetente und defiziente Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome werden von wenigen Immunzellen infiltriert.....	35
3.3	Eine therapeutische Aktivierung des Typ I Interferonsystems induziert eine zytotoxische Immunantwort, die das Melanomwachstum in Ifnar1-kompetenten Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen hemmt.....	38
4.	Diskussion	41
4.1	Immunzell-arme Melanome entgehen einer Typ I Interferon abhängigen Immunantwort.....	41
4.2	Eine therapeutische Aktivierung des Typ I Interferonsystems stimuliert die angeborene und adaptive Immunüberwachung.....	42
4.3	Bedeutung einer Aktivierung des Typ I Interferonsystems für die Melanomtherapie.....	44
5.	Zusammenfassung.....	46
6.	Literaturverzeichnis	48
7.	Danksagung.....	56

Abkürzungsverzeichnis

BCP	1-Bromo-3-chloropropane
BSA	bovines Serumalbumin
CTLA 4	zytotoxisches T-Zell Antigen 4
CCL	Chemokin mit dem Motiv C-C
CD	cluster of differentiation
Cdk4	cyclin dependent kinase 4
CXCL	Chemokin mit dem Motiv C-X-C
DAMP	Damage-associated molecular pattern molecules
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMBA	7,12-dimethylbenz(α)anthracene
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DC	Dendritische Zelle(n)
FoxP3	Forkhead Protein 3
Hgf	hepatocyte growth factor
IL	Interleukin
IDO	Indoleamine-2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
JAK	Januskinase
MHC	major histocompatibility complex
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD 1	programmed cell death
PD-L1	programmed death – ligand 1
Poly(I:C)	Polyinosin-Polycytidylsäure
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	reverse Transkriptase-Kettenreaktion
TGF- β	transforming growth factor beta

1. Einleitung

1.1 Pathogenese und Klinik des Melanoms

Das Melanom ist ein invasiv wachsender Tumor der Melanozyten, der von der Haut und der Schleimhaut ausgeht. Es stellt 4 % der Hauttumoren dar, ist jedoch aufgrund der frühzeitigen Metastasierung für ca. 80 % aller Todesfälle durch Hautkrebs verantwortlich. Die Inzidenz des primären Melanoms ist zwischen den Jahren 2000 und 2009 in der westlichen Welt von 22,8 auf 28,9/100.000 Menschen gestiegen (National Cancer Institute, 2012). Sowohl genetische als auch umweltbedingte Einflüsse können zur Pathogenese beitragen. Ein heller Hauttyp und multiple dysplastische Nävi gelten als Risikofaktoren für das maligne Melanom (Tsao et al., 2012). Genmutationen, die zu einem Verlust von Genen der Zellzykluskontrolle und zur Fehlregulationen von Wachstumsfaktoren führen, tragen zur Pathogenese des Melanoms bei. Als familiär gehäufte Suszeptibilitätsgene wurden die Cyclin-abhängige Kinase (CDK) 4 und CDKN2A entdeckt (Soufir et al., 2007; Tsao und Chin, 2012). Von hoher klinischer Relevanz war die Entdeckung von Mutationen in Genen, die für BRAF und cKIT kodieren. Der Nachweis einer BRAF Mutation zeigt sich bei 43 % aller Melanome (Colombino et al., 2012), wobei die Mutationen im Exon 15 (Val600E; Austausch von Valin durch Glutamat) am häufigsten vorkommen (Menzies et al., 2012). Eine aktivierende N-RAS-Mutation lässt sich in ca. 15 % aller Melanome nachweisen (Eggermont und Robert, 2011). Beide Mutationen führen zu einer konstitutiven Aktivierung des RAF-MEK-ERK Signaltransduktionsweges, der entscheidend für die Tumorentwicklung und -progression des Melanoms ist. Mutationen im Gen für cKIT hingegen werden in weniger als 1 % aller Melanome nachgewiesen. Diese kommen vermehrt in akralen und mukosalen Melanomen vor (Beadling et al., 2008). Diese Erkenntnisse haben zu neuen Therapieansätzen für das Melanom geführt. Eine mögliche therapeutische Intervention in dieser Kaskade ist derzeit Gegenstand vieler klinischer Studien.

Das Melanom kann durch regelmäßige Hautscreenings frühzeitig entdeckt und in frühen Stadien durch eine operative Resektion mit kurativer Intention behandelt werden. Derzeit gilt die vertikale Eindringtiefe nach Breslow als wichtigster prognostischer Faktor (Breslow, 1970). Bei Nachweis von Mikrometastasen in den lokalen Lymphknoten wird

leitliniengerecht eine vollständige Lymphknotendisektion angeboten (Balch et al., 2010), da das rezidivfreie Überleben so verlängert werden kann (Morton et al., 2014). Adjuvant wird diesen Patienten aufgrund des erhöhten Rezidiv- und Metastasierungsrisiko eine Therapie mit Interferon- α angeboten. Es konnte ein verlängertes rezidivfreies Überleben und in einigen Studien ein verlängertes Gesamtüberleben nachgewiesen werden (Petrella et al., 2012). Bei Fernmetastasierung ist bei isolierten Metastasen eine operative Therapie kurativ möglich. Zur Therapie des inoperablen und/oder fernmetastasierten Melanoms war bis 2011 lediglich eine chemotherapeutische Therapie mit dem Alkylanz Dacarbazin zugelassen. Aktuell ist die Therapie des metastasierten Melanoms abhängig vom Mutationsstatus. Seit 2012 stehen Patienten mit nachgewiesener BRAF-Mutation die Braf-Inhibitoren Vemurafenib (Zelboraf) und Dabrafenib (Tafinlar) zur Verfügung, die in der klinischen Anwendung eine Verlängerung des Gesamtüberlebens gezeigt haben. Patienten mit einer cKIT Mutation können als off-label Therapie Imatinib erhalten. Mit der Zulassung des „Immuncheckpointinhibitors“ Ipilimumab (Yervoy) im Jahr 2011 hat eine Immuntherapie zum ersten Mal eine Verlängerung des Gesamtüberlebens bei Patienten mit metastasiertem Melanom gezeigt. Ipilimumab ist ein humaner IgG1 monoklonaler Antikörper, der gegen CTLA 4 (zytotoxisches T-Zell-Antigen 4) auf T-Zellen gerichtet ist. CTLA 4 verhindert die Stimulation, Aktivierung und Proliferation von T-Zellen. Der Antikörper ermöglicht durch Hemmung des Einflusses von CTLA 4 die Stimulation von T-Zellen. Die Ansprechraten liegt nur zwischen 10 und 20 %, führt jedoch bei einigen Patienten zu einer langfristigen Remission (Hodi et al. 2010). Pembrolizumab ist ein weiterer Antikörper, der gegen PD1 (Programmed cell death) gerichtet ist. PD1 wird von aktivierten T-Zellen exprimiert. Der Antikörper verhindert die Interaktion von PD1/PD-L1, die zu einer Toleranz von Melanomzellen führt und die Zerstörung der Melanomzellen verhindert. Ungefähr 30 - 35 % der Patienten mit fortgeschrittenem Melanom sprachen in Studien auf die PD1-Antikörper Nivolumab bzw. Pembrolizumab an (Robert et al., 2015; Robert et al., 2014). Bisher sind keine eindeutigen prädiktiven Faktoren, die ein Ansprechen der Immuntherapie vorhersagen können, bekannt. Diskutiert wird, ob immunzellreiche Melanome, die PD-L1 exprimieren, besser auf eine anti-PD1-Therapie ansprechen (Tumeh et al., 2014). Pembrolizumab ist seit September 2014 von der FDA in den USA zugelassen; der PD1-Antikörper Nivolumab ist seit Dezember 2014 in den

USA zugelassen. Eine Zulassung in Deutschland wird in Kürze erwartet. Derzeit wird bei Patienten mit metastasiertem Melanom und adjuvant bei Patienten mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko die Wirksamkeit von Kombinationen aus Signaltransduktionsinhibitoren wie MEK-Inhibitoren und NRAS-Inhibitoren erprobt, die regulatorisch in die RAS-RAF-ERK-Signalkaskade eingreifen. Auch Kombinationstherapien mit CTLA4- und PD1/PD-L1-Antikörpern sowie die Kombination aus Signaltransduktionsinhibitoren mit Immuncheckpoint-Inhibitoren werden in klinischen Studien untersucht. Es wird in den nächsten Jahren mit weiteren Zulassungen von zunehmend individuellen Therapien gerechnet, die vor allem den Mutationstatus und die Melanom-Immunzell-Interaktion berücksichtigen werden.

1.2 Bedeutung des Immunsystems für die Melanompathogenese

1.2.1 Immunezellinfiltration des Melanoms

Die Infiltration von primären Melanomen mit Immunzellen wird als prognostisch günstig diskutiert. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten mit immunzellreichen Melanomen ein vermindertes Risiko zur Metastasierung und eine verbesserte Prognose gegenüber Patienten mit immunzellarmen Melanomen aufweisen (Clark et al., 1989; Clemente et al., 1996; Taylor et al., 2007). Das Fehlen von T-Zellen in primären Melanomen ist mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko in die regionalen Lymphknoten und einem verminderten Gesamtüberleben assoziiert (Azimi et al., 2012; Taylor und Patel, 2007). Tumorzellen können Antigene exprimieren, die von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden (Boon et al., 1995). Diese Antigene können z.B. im Rahmen der Zelltransformation durch Punktmutationen in regulären Genen entstehen (Robbins et al., 2013). Melanome können auch trotz T-Zell-Infiltration progressiv wachsen. Immunsuppressive Eigenschaften des Tumormikromilieus können der T-Zell-Effektorfunktion entgegen wirken. Regulatorische T-Zellen (T-regs) beispielsweise unterdrücken die zytotoxische T-Zell-Antwort und zeichnen sich durch vermehrte Forkhead Protein 3 (FoxP3) + Präsentation und erhöhte Expression von PD-L1 (programmed death ligand 1) aus. Ebenso sezernieren T-regs vermehrt Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO), ein Tryptophan katabolisierendes Enzym, das mit peripherer

Immuntoleranz assoziiert ist (Spranger et al., 2013). Neue Immuntherapeutika, wie z.B. die therapeutische Blockade der PD1-PD-L1-Signalkaskade sollen die gegen den Tumor gerichtete zytotoxische T-Zell-Antwort aktivieren.

1.2.2 Die Theorie des Immunoediting

Der Pionier der Tumorimmuntherapie war William Bradley Coley. Bereits Robert Koch und Louis Pasteur beschrieben die Heilung eines Tumorleidens nach einer Erysipelinfektion. Coley injizierte 1891 einem italienischen Immigranten Streptococcus pyogenes in dessen Sarkom nach zweimaligem Rezidiv. Nach einem Monat kam es zu einer Regression (Levine, 2008). Paul Ehrlich vermutete 1909, das Immunsystem könne die Entstehung von Tumoren unterdrücken (Ehrlich, 1909), indem Tumorzellen vom Immunsystem spezifisch angegriffen werden. Im Jahr 1957 griffen Burnet und Thomas die Hypothese von tumorspezifischen Immunantworten wieder auf. Sie prägten den Begriff der „Immunsurveillance“ : Tumorzellen werden durch das Immunsystem spezifisch erkannt und zerstört (Burnet, 1957). Um die Relevanz des Immunsystems zu verdeutlichen, wurden in den 1990er Jahren Versuche mit monoklonalen Antikörpern gegen Interferon gamma durchgeführt. Die Blockade von Interferon gamma führte zu einem schnelleren Wachstum von transplantierten Fibrosarkomen im Mausmodell (Dighe et al., 1994). In den folgenden Jahren ergaben genetisch veränderte immundefiziente Mausmodelle neue Erkenntnisse über die Relevanz des Immunsystems in der Entstehung und Progression von Malignomen. Die Experimente zeigten, dass Tumorzellen Antigene exprimieren, die spezifisch vom Immunsystem erkannt und zerstört werden können (Boon und Gajewski, 1995). Shankaran et al. erkannten im Jahr 2001, dass Sarkome nach Transplantation aus immunkompetenten und immundefizienten Rag^{-/-}-Mäusen unterschiedliche Wachstumskinetiken besitzen: Sarkome, die sich unter der Kontrolle des intakten Immunsystems in Wildtypmäusen entwickelt haben, konnten nach Transplantation in immunkompetente Wildtypmäuse und immundefiziente Rag^{-/-}-Mäuse progressiv wachsen. Sarkome, die in immundefizienten Rag^{-/-}-Mäusen ohne immunregulatorische Einflüsse von B- und T-Zellen gewachsen sind, konnten nach Transplantation in immundefiziente Rag^{-/-}-Mäuse ebenfalls progressiv wachsen. Nach Transplantation in immunkompetente Wildtypmäuse hingegen wurden diese Sarkome abgestoßen (Shankaran et al., 2001). Auch Sarkome aus

Interferon gamma Rezeptor 1 defizienten Tieren wurden von immun-kompetenten Mäusen abgestoßen (Dunn et al., 2005). Schreiber et al. folgerten aus diesen Beobachtungen, dass das Immunsystem Karzinome in der Entwicklung und Progression prägen kann. Tumorzellen mit hohem immunogenem Potential, d.h. Tumorzellen, die vom Immunsystem zum Beispiel durch Antigenstrukturen erkannt werden, werden zerstört. Tumorzellen mit geringem immunogenem Potential können proliferieren. Diese Phänomene werden unter dem Begriff Immunoediting, der eine Phase der Elimination, des Equilibriums und des Escapes beschreibt, zusammengefasst (Dunn et al., 2004).

In der Elimination werden transformierte Zellen durch verschiedene Mechanismen vom Immunsystem erkannt und zerstört. Matzinger et al. gingen von „danger signals“ aus, die eine Immunantwort stimulieren. Diese aktivieren dendritische Zellen und führen zu einer antitumoralen Antwort des erworbenen Immunsystems (Matzinger, 1994). Bereits in den frühen 1990er Jahren konnte erstmals gezeigt werden, dass Melanomzellen das spezifische Antigen MAGEA1 exprimieren können und dies von zytotoxischen T-Zellen erkannt wird (Boon et al., 2006; van der Bruggen et al., 1991; Wolfel et al., 1995). Im Laufe der Jahre wurden diverse Antigene gefunden, die auf Tumorzellen exprimiert werden und spezifisch vom Immunsystem erkannt werden. Eine weitere Möglichkeit stellen DAMP (damage molecular patterns) dar, die von nekrotischen Tumorzellen (high mobility group box 1 HMGB1) oder von nekrotischem Gewebe als Folge des invasiven Wachstums ausgeschüttet werden (Sims et al., 2010). Diese können Immunzellen aktivieren und so zu einer Immunantwort gegen den Tumor führen (Garg et al., 2012; Obeid et al., 2007). Weitere Vermutungen beziehen sich auf sogenannte Stressliganden wie RAE1 und MICA/B, die häufig auf der Tumoroberfläche exprimiert werden. Diese führen zu einer Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems und zur Ausschüttung von proinflammatorischen und immunmodulatorischen Zytokinen, die zu einer Zerstörung der Tumorzellen führen (Guerra et al., 2008). Hierzu zählen unter anderem NKT-Zellen, Makrophagen und T-Zellen (Girardi et al., 2001; Matzinger, 1994; Smyth et al., 2001).

In der Eliminationsphase verbleiben Tumorzellen in einer „Dormancy“ (Aguirre-Ghiso, 2007): Sie werden vom Immunsystem nicht zerstört und zeigen keine Proliferation. In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass immunkompetente Mäuse

nach Karzinogenbehandlung okkulte Tumorzellen aufweisen können, die erst nach Transplantation in immundefiziente Tiere proliferieren können (Koebel et al., 2007).

In der sog. Escape-Phase entgehen Tumorzellen der Immunerkennung und -zerstörung und wachsen progressiv. Es gibt viele Vermutungen, wie Malignome einer Zerstörung durch das Immunsystem entgehen: Veränderungen der Tumorzellmorphologie (z.B. durch Verlust von Antigenen) und erhöhter Widerstand gegenüber zytotoxischen Einflüssen des Immunsystems (z.B. Induktion von antiapoptotischen Mechanismen wie eine permanente Stimulation des pro-onkotischen Transkriptionsfaktors STAT3) können das Tumorstadium begünstigen. Auch ein Verlust von MHC I (major histocompatibility complex I), der Verlust von antigenprozessierenden Schritten in der Tumorzelle durch genetische Instabilität oder die Proliferation von Tumorzellen mit schwach immunogenen Antigenen können zur geringen Immunogenität des Tumors führen (Dunn et al., 2002; Dunn und Old, 2004; Khong und Restifo, 2002). Zusätzlich können Tumorzellen eigenständig immunsuppressive Zytokine bilden (VEGF, TGF- β , Galectin und Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) und PD-L1) und immunsuppressive Zellen wie z.B. regulatorische T-Zellen (Treg), Myeloid-derived Suppressor Cells (MDSC) und Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) rekrutieren (Vesely et al., 2011), sodass keine Abstoßung der Tumorzellen durch das Immunsystem erfolgen kann. Regulatorische T-Zellen (Tregs) sind CD4 positive Zellen, die durch die Expression von CD25 und FOXP3 charakterisiert werden. Sie verhindern die Aktivierung von tumorspezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten. Außerdem regulieren sie die Expansion und Aktivierung von B- und T-Zellen (Gasteiger et al., 2013). MDSCs (myeloid-derived suppressor cells; physiologische immunsuppressive, unreife myeloide Zellen) infiltrieren Tumore (Talmadge und Gabrilovich, 2013), verhindern die Antigenpräsentation durch dendritische Zellen (Gabrilovich et al., 2012) und die T-Zell-Aktivierung (Gabrilovich et al., 2001; Mazzoni et al., 2002), die für eine Abstoßung von Tumorzellen erforderlich sind. Die Depletion dieser MDSCs durch monoklonale Antikörper führt in Tiermodellen zu einer Verminderung der Metastasierung (Talmadge und Gabrilovich, 2013). Makrophagen besitzen eine unterschiedliche Relevanz in der Tumorentstehung und können ihre Polarisierung durch Einflüsse des Mikromilieus ändern: klassische M1-Makrophagen produzieren proinflammatorische Zytokine, stimulieren eine vermehrte Antigenpräsentation und verhindern die Tumorentstehung. M2-Makrophagen fördern

antiinflammatorische Schritte und fördern die Tumorentstehung (Biswas und Mantovani, 2010).

Es ergibt sich eine Dualität des Immunsystems: Auf der einen Seite können Tumorzellen von Immunzellen erkannt und zerstört werden. Auf der anderen Seite werden Tumorzellen mit schwach immunogenem Potential selektioniert und können proliferieren.

1.2.3 Die Bedeutung des Typ I Interferonsystems für die Tumorphathogenese

Im Jahr 1957 transfizierten Alick Isaacs und Jean Lindenmann einen durch Hitze inaktivierten Influeza Stamm in eine Chorionallantoismembran eines Hühnerembryos. Anschließend gaben sie einen aktiven Influeza Stamm hinzu und fanden erstmals eine „Interferenz“, die das Wachstum des aktiven Stamms verhinderte (Isaacs und Lindenmann, 1957). In den letzten Jahren wurden unterschiedliche Interferone gefunden und in verschiedene Klassen eingeteilt. Derzeit sind 13 Interferon alpha Gene im humanen System (14 Interferon alpha Gene im murinen System), 1 Interferon beta Gen und weitere weniger charakterisierte Interferone bekannt, die alle zu den Typ I Interferonen gezählt werden (Decker et al., 2005). Interferon gamma repräsentiert das Typ II Interferonsystem (Young und Bream, 2007). Das Typ III Interferonsystem setzt sich aus den Interferonen lambda 1, lambda 2 und lambda 3 zusammen. Es wird vorwiegend von epithelialen Zellen exprimiert (Uze und Monneron, 2007). Nahezu jede kernhaltige Zelle kann Typ I Interferone produzieren. Hauptproduzenten von Typ I Interferonen sind pDCs (plasmacytoide dendritische Zellen) (Asselin-Paturel et al., 2001). In den meisten Zelltypen erfolgt die Stimulation zur Expression des Typ I Interferon über zytosolische Rezeptoren, die virale bzw. xenogene doppelsträngige RNA erkennen. Ebenso kann das Interferonsystem über die Toll-like Rezeptoren 3 und 4 (TLR) aktiviert werden (Kawai und Akira, 2010). Durch positive Feedback-Mechanismen kann das Typ I Interferonsystem seine eigene Produktion stimulieren (Hata et al., 2001). Gough et al. vermuteten, dass eine ständige basale Interferon beta Konzentration produziert wird. Sie zeigten, dass eine kontinuierliche Expression von STAT1 vorliegt und so ein optimales Ansprechen der Zelle auf Typ I Interferon, Typ II Interferon und IL-6 gewährleistet ist (Gough et al., 2010; Takaoka et al., 2000). Jede Interferonklasse besitzt einen eigenen Rezeptor. Der Typ I Rezeptor besteht aus einer Interferonrezeptorkette 1 und

einer Interferonrezeptorkette 2, die zwei verschiedene Januskinasenfamilien (Tyk2 und Jak1) phosphorylieren. Nach der Aktivierung lagern sich STAT1 (Signal Transducers and Activators of Transcription) und STAT2 an die Rezeptorketten und bilden einen Heterodimer. Dieser Dimer wandert in den Nucleus und vereinigt sich dort mit dem Transkriptionsfaktor IRF (Interferon regulatory factor) 9 zu dem ISGF (Interferon stimulated gene factor) 3, der darauffolgend die Interferongenprodukte zur Transkription anregt. Zusätzlich kann sich neben dem genannten Heterodimer aus STAT1 und STAT2 ein Homodimer aus STAT1 bilden, der jedoch nicht mit den Interferon-I-Gensequenzen interagiert, sondern sich dem Promoter des Interferon gamma Gens anlagert (Decker und Muller, 2005; Horvath et al., 1996; Shuai et al., 1994). Im Rahmen der Aktivierung des Typ I Interferonsystems werden zugleich SOCS-Proteine (suppressor of cytokine signalling) freigesetzt. Diese vermindern die Aktivität der JAKs, bewirken so eine Negativregulation und die Einschränkung der Interferonantwort (Starr et al., 1997). Das Typ I Interferonsystem wirkt auf unterschiedliche Weisen antiproliferativ. In Anwesenheit von p21 (auch CyclinDependentKinase-Inhibitor 1), das durch Stimulation von Typ I Interferon hergestellt wird, werden zyklinabhängige Kinasen deaktiviert und darauffolgend das Retinoblastom Genprodukt (pRb) nicht phosphoryliert (Matsuoka et al., 1998; Sangfelt et al., 1999). Dephosphoryliertes pRb bindet an die Transkriptionsfaktoren der E2F Familie. Diese ist essentiell für die Produktion von Proteinen für den weiteren Zellzyklus. Als Folge können viele Gene, die für den Übergang von der G1 in die S-Phase benötigt werden, nicht transkribiert werden und der Zellzyklus wird folglich blockiert (Kirch et al., 1997). In Studien konnte bereits eine positive Korrelation zwischen der vermehrten Sekretion von Typ I Interferon abhängigen Genen und einer vermehrten Immunzellinfiltration in das Melanom nachgewiesen werden (Fuentes et al., 2011). Dennoch ist nicht bekannt, wie sich das Typ I Interferonsystem und die Immunzellinfiltration einander beeinflussen. Das Typ I Interferonsystem kann von allen kernhaltigen Zellen und insbesondere von plasmazytoiden dendritischen Zellen im Tumor sezerniert werden. Es stimuliert eine verstärkten Präsentation von Tumorantigenen durch MHC Moleküle, sodass eine vermehrte CD8-T-Zell abhängige Immunantwort induziert wird (den Haan et al., 2000; Lou et al., 2007). Die Überlebenszeit der T-Zellen wird durch Typ I Interferonstimulation verlängert (Raig et al., 2008). Die Sensibilisierung von T-Zellen zur Zerstörung von Tumorzellen scheint nach einer

lokalen Bestrahlung von Typ I Interferon stimuliert zu werden (Burnette et al., 2011). Neben T-Zellen kann das Typ I Interferonsystem auch die Zellen des angeborenen Immunsystems aktivieren. Es stimuliert dendritische Zellen und führt so zu einer vermehrten Aktivierung von Makrophagen (Diamond et al., 2011). Gemeinsam mit anderen Zytokinen wie IL-12, IL-18 und IL-15 erhöht das Typ I Interferonsystem die Funktionalität von antitumorigenen NK-Zellen (Waldhauer und Steinle, 2008). Aktuelle Ergebnisse zeigen, dass das Typ I Interferon nicht nur die Aktivität der anti-tumorigen wirkenden Immunzellen stimuliert, sondern auch die Infiltration von immunsuppressiven TAMs in den Tumor verhindert (U'Ren et al., 2010). Diese Interaktionen unterstreichen die Relevanz des Typ I Interferonsystems als Schnittstelle zwischen der angeborenen und erworbenen Immunantwort um eine Zerstörung von Tumorzellen zu induzieren.

1.3 Experimentelle Mausmodelle in der immunonkologischen Forschung

In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche genetische Mausmodelle etabliert, die die Pathogenese der Melanomentstehung und -progression imitieren. Diese haben zu einem besseren Verständnis der molekularen Pathogenese beigetragen. Einige der Modelle wurden auch zur Analyse der Tumor-Immunzell-Interaktion genutzt. Zu Beginn der 1990er Jahre wurden die ersten syngenen Mausmodelle entwickelt. Es gibt nur wenige Maus-Melanom-Modelle, die eine spontane Immunzellinfiltration zeigen. Hierzu zählte das Ret-Mausmodell, in dem das humane Ret-Onkogen mit einem murinen Metallothioneinpromoter fusioniert wurde. Mäuse, die sowohl transgen für das Ret-Onkogen als auch für das chimäre MHC Klasse I Molekül AAD ($\alpha 1$ - $\alpha 2$ Domäne der HLA-A2 verlinkt mit einer $\alpha 3$ Domäne von H3-D^d) sind, das HLA-A2 restriktive Peptide präsentiert, entwickeln spontan Vitiligo und zeigen spontan entstandene Anti-Tumor CD8⁺ T-Zell Antworten (Lengagne et al., 2004). Kürzlich konnte in diesem Modell eine Tumorkontrolle durch zytotoxische T-Zellen gezeigt werden, da nach Depletion der CD8⁺ T-Zellen verstärkt viszerale Metastasen auftraten (Eyles et al., 2010). „TiRP-Mäuse“, in denen HrasG12V und eine Deletion von p16INK4a/P19Arf durch eine Tamoxifen-induzierte Cre Rekombinase Aktivität spezifisch in den Melanozyten induziert werden kann, entwickeln sowohl immunzell-arme pigmentierte Melanome als

auch immunzell-reiche amelanotische Melanome (Huijbers et al., 2006). In diesen Mäusen konnte gezeigt werden, dass aggressive Melanome von T-Zellen mit einer starken Expression von PD-1 und myeloiden Zellen infiltriert werden, die den Effekt von adoptiv transferierten T-Zellen unterdrücken. Im Hgf/Sf Mausmodell, in dem die Expression des Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor von einem Metallothionein-promoters kontrolliert wird, führt die Stimulation der Rezeptor-Tyrosinkinase c-Met zur Entwicklung spontaner Melanome (Noonan et al., 2001; Recio et al., 2002). Diese Mäuse wurden von unserer Arbeitsgruppe mit Cdk4^{R24C} Mäusen gekreuzt. Die Cdk4^{R24C} Mutation wurde als Angriffspunkt von Melanom-spezifischen zytotoxischen T-Zellen beim Menschen gefunden (Eyles und Puaux, 2010; Wolfel und Hauer, 1995). Cdk4 ist eine Zyklin abhängige Kinase, die mit p16^{INK4a} interagiert und so den Zellzyklus kontrolliert. Die R24C Mutation der Kinase im Bereich der Bindungsstelle für p16^{INK4a} führt zu einer fehlenden Regulation des Zellzyklus. Hgf-Cdk4^{R24C} Mäuse entwickeln spontan und nach einmaliger Applikation des Kanzerogens DMBA immunzell-arme Melanome (Kohlmeyer et al., 2009; Landsberg et al., 2010; Tormo et al., 2006). Adoptiv transferierte Melanom-spezifische T-Zellen können primär kutane Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome zerstören. Einige persistierende Tumorzellen entgehen jedoch der Immunzellkontrolle und führen zu einem lokalen Rezdiv. Der Verlust der T-Zell-Effektorfunktion und eine reversibel Dedifferenzierung in einem inflammatorischen Mikromilieu tragen dabei zur Resistenzbildung gegen die adoptiv transferierten T-Zellen bei (Kohlmeyer und Cron, 2009; Landsberg et al., 2012). Diese Mausmodelle können zum weiteren Verständnis der Tumor-Immunzell-Interaktion beitragen und für präklinische Fragestellungen genutzt werden. In dieser Arbeit verpaarten wir Hgf-Cdk4^{R24C} Mäuse mit Typ I Interferon defizienten C57BL/6 Maus und erhielten Interferon Rezeptor alpha 1 defiziente Hgf-Cdk4^{R24C} Mäuse. Die Defizienz des Rezeptors führt zu einem funktionellen Verlust des Typ I Interferonsystems, sodass eine endogene Stimulation ausbleibt. Da es sich um eine vollständige „knock-out-Maus“ handelt, sind alle Zellen des Organismus ohne Interferon alpha Rezeptor und können folglich nicht auf die Stimulation durch das endogene Typ I Interferonsystem reagieren.

1.4 Hypothesen und Ziele

Die Infiltration von Melanomen mit zytotoxischen T-Zellen korreliert mit einer Aktivierung des Typ I Interferonsystems und wird als prognostisch günstig diskutiert. Dabei ist die biologische Signifikanz der endogenen Aktivierung des Typ I Interferonsystems nicht vollständig geklärt.

Folgende Hypothesen liegen der Arbeit zu Grunde:

(1) Eine Aktivierung des Typ I Interferonsystems stimuliert die angeborene und die erworbene Immunüberwachung und hemmt so die Entstehung und Progression von kutanen Melanomen.

(2) In Melanomen, die der Immunüberwachung entgehen, kann eine Tumor-protective zytotoxische Immunantwort durch eine therapeutische Stimulation des Typ I Interferonsystems induziert werden.

Der Einfluss des Typ I Interferonsystems auf die Entstehung und Progression von primär kutanen Melanomen soll in dieser Arbeit experimentell in einem genetisch hergestellten Hgf-Cdk4^{R24C} Maus-Melanom-Modell analysiert werden. Durch die Verpaarung von Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen mit Ifnar1-defizienten Mäusen soll die Relevanz des Typ I Interferonsystems für die Inzidenz, Latenz, Multiplizität und die Metastasierung von DMBA-induzierten Melanomen untersucht werden. Immunhistochemische und molekular-biologische Analysen des Tumormikromilieus sollen die Interaktion des Tumors mit dem Immunsystem charakterisieren. Inwieweit sich eine Aktivierung des Typ I Interferonsystems auf die Entstehung und Progression der Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome auswirkt, soll experimentell durch eine repetitive peritumorale Injektion von Poly(I:C) herausgearbeitet werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen eine Grundlage bilden, um weitere zelluläre und molekulare Mechanismen zu untersuchen, die das endogene Typ I Interferonsystem stimulieren und so die Tumorentwicklung beeinflussen können. Diese können für zukünftige therapeutische Zielsetzungen nutzbar gemacht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Tierexperimentelle Methoden

Ifnar1-defiziente Mäuse wurden mit Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen (Tormo und Ferrer, 2006) gekreuzt. Alle Experimente entsprachen den Richtlinien für Versuchstierhaltung und dem Tierschutzgesetz und wurden im Haus für Experimentelle Therapie der Universität Bonn durchgeführt. Die Genotypen der Tiere wurden durch genomische PCR bestätigt (Kamphuis et al., 2006; Tormo und Ferrer, 2006). Melanome wurden durch eine einmalige Applikation von 100 nmol 7,12-Dimethylbenzanthrazene DMBA (Sigma) auf die Rücken von Ifnar1-defizienten und kompetenten Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen erzeugt. Das Tumorstadium wurde durch wöchentliche Inspektionen der Tumorgöße und digitale Fotografie dokumentiert. Die Tiere wurden geopfert, sobald entweder das größte Melanom einen Durchmesser von 10 mm erlangt hatte oder die Maus Krankheitszeichen aufwies. Es erfolgte eine sorgfältige Autopsie mit besonderer Beachtung auf makroskopische Lymphknoten- und Lungenmetastasen. Es wurde Gewebe für histopathologische Untersuchungen in Zinkfixans fixiert, für molekularbiologische Untersuchungen bei -80 °C und für durchflusszytometrische Analysen direkt weiterverarbeitet.

Mäuse, die im Alter von 6-8 Wochen einmalig mit DMBA behandelt worden waren, erhielten ab dem 70. Tag nach DMBA-Behandlung im Abstand von 3 bzw. 4 Tagen über einen Zeitraum von 11 Tagen (Tag 70 - Tag 81 nach DMBA-Behandlung) bzw. von 73 Tagen (Tag 70 - Tag 143 nach DMBA Behandlung) peritumorale Injektionen eines TLR-Agonisten. Hierbei handelte es sich um Poly(I:C) (Invivogen). Dieser wurde in PBS zu einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst. Es wurden 50 µg Poly(I:C) nach Lösen in 100 µl PBS subkutan peritumoral injiziert.

2.2 Histologie, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

2.2.1 Herstellung von Gewebeschnitten

Die während der Obduktion entnommenen Gewebeproben wurden 24 h in Zink fixiert und anschließend entwässert. Am nächsten Tag wurden diese in Paraffin eingebettet.

Es konnten nun 4 µm dicke Schnitte mit einem Leica RM 2155 Mikrotom bei Bedarf angefertigt und auf einen beschichteten Objektträger aufgebracht werden. Die angefertigten Präparate verblieben über Nacht in einem Brutschrank bei 37 °C.

Am nächsten Tag wurden diese im Tissue Stainer TST33 fixiert:

Paraffin entfernen in Xylol (2x2 Minuten), Rehydratation in einer Ethanolreihe mit abnehmender Konzentration (2x45 Sekunden 100 % Alkohol, 30 Sekunden 96 % Alkohol, 30 Sekunden 70 % Alkohol) und in Wasser überführen.

Falls die Gewebeproben stark pigmentiert waren, wurden die Präparate 20 - 40 Minuten (in Abhängigkeit von der Pigmentierung) in 3 % H₂O₂ mit KOH-Tabletten geblichen, zum Abstoppen der Reaktion in 1 % Essigsäure überführt und abschließend in TRIS Puffer für 2x5 Minuten gewaschen.

2.2.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Um die histologische Morphologie und mögliche Metastasen untersuchen zu können, wurde von jedem entnommenen Gewebe eine Hämatoxylin-Eosin Färbung angefertigt. Durch das Hämatoxylin werden alle basophilen Strukturen (z. B. Zellkern, endoplasmatische Retikulum) angefärbt. Die Kombination mit Eosin ermöglicht zugleich die Färbung der eosinophilen Strukturen wie Zytoplasmaproteine. Mit Hämatoxylin gefärbte Strukturen erscheinen bei der mikroskopischen Beurteilung blau, mit Eosin gefärbte Strukturen erscheinen rot. Diese Färbung wurde in einem Färbeautomaten Tissue Stainer TST33 gemäß folgendem Programm angefertigt:

1. entparaffinierte Gewebeschnitte für 2 Minuten in Hämalaunlösung
2. Spülen mit Leitungswasser (erzeugt einen Farbumschlag)
3. Färbung des Zytoplasmas mit 1 % Eosinlösung für 5 Minuten
4. Spülen in einer Alkoholreihe mit aufsteigender Konzentration (70 %, 96 %, 2x100%)
5. Spülen mit Xylol

Anschließend wurde das Präparat mit Corbitt-Balsam bedeckt und ein Glasplättchen aufgelegt.

2.2.3 Immunhistochemische Färbungen und Immunfluoreszenz

Um Gewebe und Zellantigene auf histologischen Gewebeschnitten darzustellen, werden in dieser Arbeit zwei verschiedene Methoden verwendet: die LSAB-Färbung und die Fluoreszenzmarkierung.

Die verwendeten Antikörper

Durch Titrierung erhält man die Konzentrationen folgender Antikörper:

CD 45	(Verdünnung 1:50)	von BD Bioscience (#550539)	mA, Ratte
Trp1	(Verdünnung 1:200)	von Vincent Hearing, NIH, Bethesda	pA, Kaninchen
Meca32	(Verdünnung 1:50)	von BD Bioscience (#553849)	mA, Ratte

(mit Antigen retrieval für 15 Minuten in pH 6)

Zusätzlich zu den zu untersuchenden Präparaten haben wir regelmäßig Positivkontrollen hergestellt. Dabei handelte es sich um Lymphknoten-, Milz- und Melanomgewebe. Zusätzlich wurde ein lediglich mit Sekundärantikörpern behandeltes Präparat angefertigt, um die Funktionalität des Primärantikörpers beurteilen zu können (Negativkontrolle). Der Primärantikörper wurde in diesem Fall durch PBS Lösung ersetzt.

Vorbehandlung der histologischen Präparate

Bei der Behandlung mit einigen der genannten Antikörper wurden die Präparate zuvor einer „Antigendemaskierung“ zugeführt. Für dieses Verfahren werden die Gewebeschnitte 15 Minuten in Citratpuffer (pH 6) bei ca. 95 - 99 °C im Dampfgerätkubikler inkubiert. Es wird vermutet, dass Verknüpfungen des Zinks mit Proteinen durch dieses Verfahren gelöst werden und potentielle Blockierungen der Antigene entfernt werden (Shi et al., 1999).

LSAB (labelled StreptAvidin-Biotin-Methode)

Dieses Verfahren zählt zu den indirekten Nachweisen in der Immunhistochemie. Ein unkonjugierter Primärantikörper, der spezifisch an Antigene der Gewebeprobe bindet, wird durch einen mit Biotin markierten Sekundärantikörper gebunden. StreptAvidin weist eine

sehr hohe Affinität gegenüber Biotin auf. An das StreptAvidin ist eine alkalische Phosphatase gebunden. Das StreptAvidin interagiert spezifisch mit dem Biotin des Sekundärantikörpers, der wiederum mit dem zuvor an dem Gewebe spezifisch gebundenem Primärantikörper interagiert. Nachdem diese einzelnen Antikörper auf den Gewebeschnitt aufgetragen wurden, wird zusätzlich Naphtholphosphatester hinzugegeben. Naphtholphosphatester wird durch die alkalische Phosphatase zu Phenolphosphatkomponenten und Phosphaten hydrolysiert. Die Phenole reagieren anschließend mit Diazoniumsalzen (Chromogenen) zu Azofarbstoffen. Überall dort, wo ein sekundärer Antikörper über dessen StreptAvidin das Biotin eines primären Antikörpers gebunden hat, wird das Chromogen Fuchsin zu einem roten Reaktionsprodukt umwandelt. Da das Produkt in organischen Lösungsmitteln löslich sein kann, werden nicht-alkoholische Gegenfärbemethoden und das wasserlösliche Glycerin zum Auftragen des Deckgläschens verwendet. Die auf dem Objektträger vorliegenden Gewebeproben werden (nach dem Bleichen) mit 5 % BSA (bovine serum albumine) in PBS für 30 Minuten behandelt, um die für den Primärantikörper potentiell unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Im Anschluss wird das Präparat 2x5 Minuten gewaschen. Nach einstündiger Inkubation mit dem Primärantikörper (100 µl) (oder bei 4 °C im Kühlschrank für 24 h) wird wieder mit TRIS-Puffer für 2x5 Minuten gewaschen und der Sekundärantikörper (100 µl) für 30 Minuten aufgetragen. Anschließend wird wiederholt für 2x5 Minuten mit TRIS-Puffer gewaschen. Nun wird die alkalische Phosphatase Lösung (LSAB-AP-Kit von Dako Cytomation) für 20 Minuten auf das Gewebe gebracht. Nach einem weiteren Waschschrift mit TRIS-Puffer (2x5 Minuten) wird Fast Red, das ebenfalls aus dem genannten Kit stammt, für 15 Minuten aufgetragen. Es wird im Anschluss wieder für 2x5 Minuten mit TRIS-Puffer gewaschen und dann mit Hämatoxylin für 20 Sekunden gefärbt. Als Letztes wird das Glasplättchen mit Glycerin (Kaisers Glyceringelatine) auf das Präparat fixiert.

Fluoreszenzmarkierungen

Die ersten Schritte dieser Methode sind denen der beschriebenen LSAB-Methode identisch. Dennoch wird anstelle des mit alkalischer Phosphatase kombinierten Sekundärantikörpers ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper verwendet. Dieser wird für

60 Minuten bei Raumtemperatur auf das Gewebe gebracht, ohne dass dieser dem Licht während dieser Zeit ausgesetzt wird. Im Folgenden wird der Sekundärantikörper vom Präparat gewaschen (2x5 Minuten in TRIS-Puffer) und 300 µl DAPI für 5 Minuten ebenfalls unter Verdunkelung auf den Objektträger aufgebracht. Abschließend wird das Präparat mit Immunfluoreszenzmedium (Biomeda) bedeckt und ein Deckglas aufgelegt.

2.3 Durchflusszytometrie

2.3.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Um die Oberflächenantigene, die Größe und die Granularität einzelner Zellen analysieren zu können, bedient man sich der FACS-(fluorescence-activated cell sorting) Methode. Die unterschiedlichen Antigene einer Zelle werden selektiv und spezifisch von Antikörpern erkannt. An diesen Antikörpern sind Fluorochrome adaptiert, die während der Bestrahlung mit monochromatischem Licht (Laser) wiederum Licht bestimmter Wellenlänge emittieren. Die Zellen werden einzeln in einem Flüssigkeitsstrom an einer Messkante vorbeigeführt, die die Emission quantifiziert: Unterschiedliche Charakteristika der Zelle wie Größe, Form, intrazelluläre Granula, und oberflächliche Antigene führen zu einer Lichtstreuung des Lasers. Diese Streuung wird durch zwei Photodetektoren registriert. Dabei wird zum einen das in Verlaufsrichtung des Lasers gestreute Licht (Vorwärtsstreulicht) und zum anderen das orthogonal zum Lichtstrahl gestreute Licht (Seitwärtsstreulicht) gemessen. Das gestreute Licht wird mit Photomultipliern in ein elektrisches Signal umgewandelt und gemessen. Die beiden genannten Photodetektoren messen aufgrund ihrer unterschiedlichen Lokalisation verschiedene Eigenschaften der Zelle. So wird durch das Vorwärtsstreulicht die Größe bestimmt, durch das Seitwärtsstreulicht hingegen die intrazelluläre Granularität gemessen. Relevant für die mit einem Durchgang zu messenden Oberflächenantigene ist die Anzahl der Laser, mit dem das Durchflusszytometer ausgestattet ist. Das für diese Arbeit verwendete BD FACS Canto II besitzt zwei Laser. Es handelt sich um einen Argonlaser, der Licht der Wellenlänge 488 nm, und einen Diodenlaser, der Licht der Wellenlänge 635nm erzeugt. Die Lichtquanten, die von den durch die Laser bestrahlten Fluorochrome emittiert werden, werden gemäß der Wellenlänge auf verschiedene Photodetektoren aufgetrennt. Auf diese Weise werden Signale verschiedener Wellen-

länge voneinander separiert. Es gilt, dass die gemessene Fluoreszenz proportional zu der Zahl pro Zelle gebundenen Antikörper gegen das jeweilige Antigen ist.

2.3.2 FACS-Vorbereitung

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Das mit der FACS Methode zu untersuchende Gewebe wurde von Fettgewebe befreit und in 5 ml Collagenase-Lösung für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Inkubation durch Zugabe von 1 ml 0,1 % EDTA-Lösung für weitere 10 Minuten gestoppt. Die so entstandene Gewebesuspension wurde mit Hilfe eines Kolben einer 2 ml Spritze durch ein steriles Nylonsieb (Maschengröße 100 µm) gerieben. Zusätzlich wurden 10 ml PBS hinzugefügt und diese Suspension wiederum für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Pellet der verwendeten Milzen wurde nun zusätzlich mit 3 ml Ery-Lyse-Puffer behandelt und für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das verbleibende Pellet wurde jeweils in 10 ml PBS resuspendiert. Unter dem Mikroskop wurde anschließend die Anzahl der vitalen Zellen bestimmt. Hierfür nutzen wir die Trypan-Blau Färbung, die lediglich tote Zellen anfärbt, und konnten diese in der Neubauer-Kammer zählen.

2.3.3 Durchflusszytometrische Färbung und Analyse

Für die weiteren FACS Analysen haben wir jeweils mit 10^6 Zellen gearbeitet. Diese wurden in 5 ml FACS Röhren überführt, mit FACS Puffer resuspendiert und bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Zu dem verbliebenen Zellpellet haben wir „FC-Block“ (anti-CD16/32) in einer Verdünnung von 1:300 zu 50 µl FACS Puffer hinzugegeben, um unspezifische Bindungen zu blockieren und hierdurch im Folgenden zu verhindern. Diese Suspension inkubierte 15 Minuten bei Raumtemperatur. Noch einmal wurde FACS Puffer hinzugegeben und die Suspension gewaschen, um im Anschluss 20 µl der jeweiligen Lösung aus Antikörper und FACS-Puffer hinzuzugeben. Diese Suspension blieb 20 Minuten bei 4 °C im abgedunkelten Kühlschrank. Im Weiteren wurden die Zellen ein letztes Mal mit FACS-Puffer gewaschen, abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert, um es im FACS Canto einmessen zu können.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 RNA Isolation aus Gewebe

Bei der Obduktion der Mäuse wurde das zu untersuchende Gewebe direkt nach Entnahme in flüssigen Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert. Die Proben wurden mit einem Mörser und Pistil zermahlen. Für die weitere Verarbeitung der Lymphknoten benutzten wir das Nucleospin RNA II Kit von Machery Nagel (Düren, Deutschland). Bei der Aufreinigung der Haut und der Melanome konnten wir durch diese Methode jedoch nicht ausreichend RNA gewinnen und mussten eine Phenol-Chloroform-Extraktion anwenden. Bestandteil dessen war ein chaotropes Denaturierungsmittel (TRIzol von Invitrogen), das denaturierend wirkt und zur Inaktivierung von RNAsen beiträgt. In 1 ml Trizol wurde das zuvor in Stickstoff zermahlene Gewebe suspendiert und 10 Minuten bei 4 °C und 12000 rpm zentrifugiert. Weiter wurde dem Überstand nun 100 µl BCP hinzugegeben, für 3 Minuten inkubiert und bei 12000 rpm 15 Minuten zentrifugiert. Da die RNA noch in der wässrigen Phase gelöst war, musste diese durch Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt werden. Nach weiteren 10 Minuten Zentrifugation bei 12000 rpm wurde der Überstand verworfen und die gelöste RNA mit 75 % Ethanol gewaschen. Abschließend trocknete die RNA, wurde in 200 µl RNase freiem Wasser resuspendiert und die RNA-Konzentration im Nanodrop bestimmt. Die Proben wurden anschließend bei -80 °C gelagert. Die RNA wurde mit einem Macherey-Nagel Nucleospin RNA II Kit nach den Anweisungen des Herstellers aufgereinigt.

2.4.2 Real Time PCR

Durch das PCR (polymerase chain reaction) Verfahren können geringe Mengen DNA eines DNA Abschnittes vervielfältigt werden. Hierzu werden die Doppelstränge der DNA bei 95 °C voneinander getrennt (Denaturierung). Primer - das sind den Basen der DNA komplementäre Basen - lagern sich spezifisch an die zu amplifizierende DNA an, sobald die Temperatur auf 45 - 75 °C reduziert wird (Anlagerung). Durch diesen „Startpunkt“ kann die DNA-Synthese nun mit Hilfe der Taq-DNA-Polymerase (ein hitzestabiles Enzym des *Thermus aquaticus*) hinter dem Primer beginnen. Diese Zyklen werden 25 - 35 Mal durchlaufen, sodass die Menge der DNA exponentiell zunimmt. Dieses Verfahren kann nicht nur zur Vervielfachung der DNA genutzt werden, sondern auch

erweitert werden, sodass mit Fluoreszenzsignalen die DNA Mengen zugleich quantifiziert werden können. Der Nukleinsäure interkalierender Farbstoff SYBR-Green I bindet dsDNA. Dieser gebildete Komplex kann durch Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge 494 nm angeregt werden, sodass grünes Licht der Wellenlänge 521nm emittiert wird. Eine Unterscheidung zwischen Fluoreszenzsignalen der amplifizierten DNA und Signalen von Artefakten wie z. B. Primerdimeren ist nicht zu erreichen. Daher wird bei diesem Verfahren eine Schmelzkurve angefertigt, die eine Unterscheidung zwischen spezifischen und unspezifischen Produkten möglich macht. Durch einen schrittweisen Temperaturanstieg werden die DNA-Doppelstränge entsprechend ihrer Schmelzpunkte zu unterschiedlichen Zeitpunkten voneinander getrennt.

Verwendete Primer Sybr Green RT-PCR		Primersequenz von 5` nach 3`
IRF 7	Forward	CCAGTTGATCCGCATAAGGT
	Reverse	AGCATTGCTGAGGCTCACTT
CXCL 10	Forward	GCCGTCATTTTCTGCCTCAT
	Reverse	GCTTCCCTATGGCCCTCATT
CCL 5	Forward	TGCCTCACCATATGGCTCG
	Reverse	GCACTTGCTGCTGGTGTAGA
MITF2	Forward	GAGGACTAAGTGGTCTGCCG
	Reverse	GTGGGTCTGCACCTGGTAGT
gp 100	Forward	AACCACAGAGGGTCCAGATG
	Reverse	CACAAGCATTATGGTGTCCG
IFN beta	Forward	TTACACTGCCTTTGCCATCC
	Reverse	TTACACTGCCTTTGCCATCC
IFN gamma	Forward	CTCTTCTTGGATATCTGGAGG
	Reverse	CCTGATTGTCTTTCAAGACTTC
Tgf beta	Forward	ACCATGCCAACTTCTGTCTG
	Reverse	CGGGTTGTGTTGGTTGTAGA
Oasl2	Forward	AGCTGAAGGGAGACCGGCC
	Reverse	TCGCTGGGGCCTACAGTCGT
Ubiquitin	Forward	AGGCAAGACCATCACCTTGGACG
	Reverse	CCATCACACCCAAGAACAAGCACA

Die ermittelten Rohdaten wurden wie folgt ausgewertet.

Der delta-Ct Wert, $Ct_{\text{Ziel-Gen}} - Ct_{\text{Referenz-Gen}} = \Delta Ct$ wurde für jedes einzelne Ziel-Gen bestimmt. Im Anschluss wurde der $2^{-\Delta Ct} * 1000$ berechnet. Der aus dieser Formel berechnete Wert konnte nun als relative Expression * 1000 dargestellt werden.

2.5 Statistische Analysen

Alle Daten werden als unabhängige Mehrfachbestimmungen betrachtet. Statistische Signifikanzanalysen wurden mit dem Student-t-Test berechnet. Die Nullhypothese wurde bei einem Signifikanzniveau von 5 % abgelehnt ($p < 0,05$). Für die Abbildungen gilt: *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$. Die PCR-Werte wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

2.6 Verwendete Substanzen

Lösungen und Puffer

1 M Kalziumchloridlösung (1M CaCl ₂)	5,53 g CaCl ₂ in 50 ml Aqua dest.
DEPC-Wasser	1 ml Diethylpyrocarbonat In 1 l Aqua dest., autoklaviert
DMBA-Lösung	100 nm DMBA in 200 μ l Aceton gelöst
Ery-Lyse-Puffer (pH 7,3)	155 mM Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl) 10 mM 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, 0,02 mg DNase 1 pro ml PBS in PBS (Gibco) gelöst
TRIS-Puffer	16,6 g TRIS-Pulver (DAKO) 0,5 ml Tween 20 (Roth) in 1 l Aqua dest.

Chemikalien und Reagentien

2-Mercaptoethanol	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
2-Propanolol	
Aceton	
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma, München

Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, München
1-Bromo-3-chloropropane (BCP)	Sigma, München
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol)	Roche, Prenzberg
DMBA (7,12-dimethylbenz[a]anthrazen)	
DNase1	Sigma, München
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe
Ethanol	
FCS (hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum)	PAA
Formalinfreie Zinkfixierung	BD Pharmingen, Heidelberg
Haemotoxilin	
HEPES	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenkarbonat (KHCO ₃)	Roth, Karlsruhe
Kollagenase D	Roche, Prenzberg
TRIS	
(2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol) C ₄ H ₁₁ NO ₃	Roth, Karlsruhe
Tween 20	
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)30 %	Merck, Darmstadt
Zinkfixans	

Antikörper Durchflusszytometrie

Antigen	Konjugat	Isotyp	Klon	Firma	Verdünnung
Maus CD3	FITC	ArmenischerHamster IgG1,κ	145-2C11	BD	1:200
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

Kits und gebrauchsfertige Reagentien

LSAB-AP Kit

DAKO, Hamburg

Oligo-dT-18 Primer

Invitrogen, Karlsruhe

Power Sybr Green Master Mix

Applied Biosystems

RNase-free DNase Set

Quiagen, Düsseldorf

RNeasy Mini Kit

Quiagen, Düsseldorf

3. Ergebnisse

3.1 Das Typ I Interferonsystem hat keinen Einfluss auf die Entstehung und Progression von DMBA-induzierten Melanomen bei Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen

Die transgene Überexpression des Hepatozytenwachstumsfaktors (HGF) und die Keimbahnmutation in der zyklin-abhängigen Kinase 4 führen in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen sowohl spontan (Landsberg und Gaffal, 2010) als auch nach einmaliger Applikation von DMBA zur Entwicklung von nodulären Melanomen (Tormo und Ferrer, 2006). Um den Einfluss des Typ I Interferonsystems auf die Entstehung und Progression von primär kutanen Melanomen zu untersuchen, kreuzten wir Hgf-Cdk4^{R24C} Mäuse in Ifnar1-defiziente Mäuse. Im Alter von 6 - 8 Wochen wurde die Rückenhaut von Ifnar1-defizienten (n=9) und kompetenten Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen (n=9) einmalig mit 100 nmol DMBA behandelt. Wöchentlich wurde das Auftreten von Melanomen kontrolliert. Alle Ifnar1-defizienten Hgf-Cdk4^{R24C} Mäuse entwickelten nach 63±2 Tage und alle Hgf-Cdk4^{R24C} Mäuse nach 67±2 Tagen progressiv wachsende, noduläre Melanome auf dem Rücken (Abb. 1).

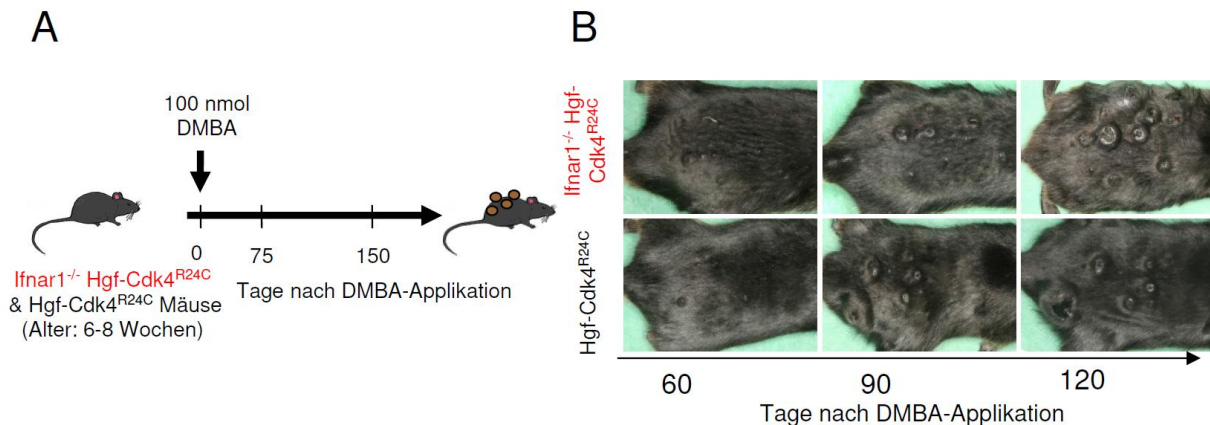


Abb. 1 Entstehung von DMBA-induzierten Melanomen in Ifnar1-defizienten und kompetenten Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen

A. Schematische Darstellung des experimentellen Vorgehens zur Induktion von primären Melanomen durch eine einmalige Applikation des Karzinogens DMBA in Ifnar1-defizienten und -kompetenten Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen. **B.** Repräsentative makroskopische Aufnahmen zu drei verschiedenen Zeitpunkten von einer Ifnar1-defizienten (oben) und einer Ifnar1-kompetenten Hgf-Cdk4^{R24C} Maus (unten).

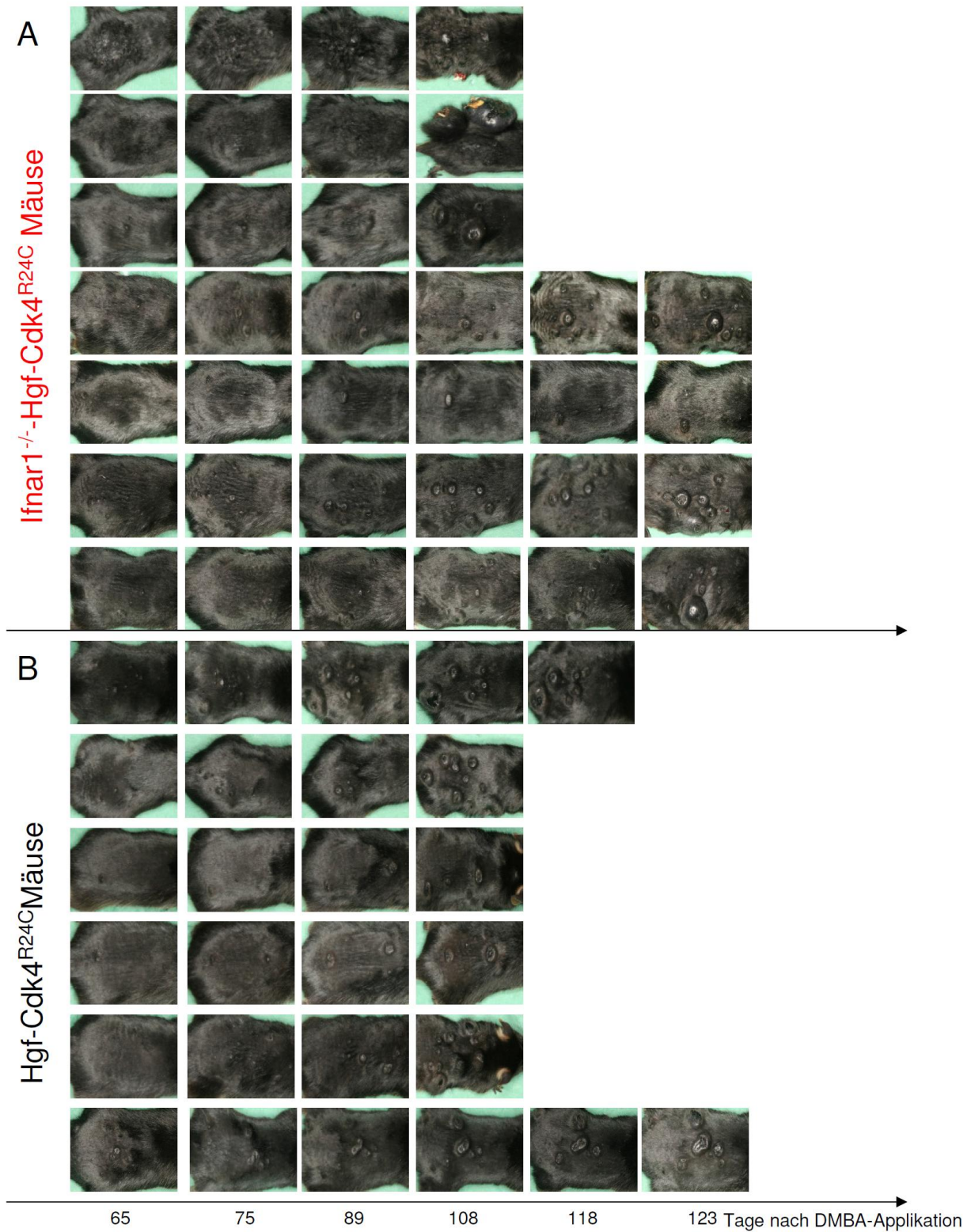


Abb. 2: Repräsentative makroskopische Bilder der Rücken von (A) Ifnar1-defizienten (n=7) und (B) Ifnar1-kompetenten (n=6) Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten (Tage nach DMBA-Applikation).

Abbildung 2 zeigt beispielhaft die Entstehung von Nävi und Melanomen bei 7 repräsentativen *lfnar1*-defizienten *Hgf-Cdk4^{R24C}* Mäusen bzw. bei 6 repräsentativen *Hgf-Cdk4^{R24C}* Mäusen über die Zeit. Um einen möglichen antiproliferativen Effekt des Typ I Interferonsystems zu untersuchen, wurde die Inzidenz, die Latenzzeit, die Wachstumskinetik und die Anzahl von DMBA-induzierten Melanomen bei *lfnar1*-defizienten und -kompetenten *Hgf-Cdk4^{R24C}* Mäusen untersucht. Die Defizienz des *lfnar1*-Rezeptors führte initial zu einem tendenziell, jedoch nicht signifikant schnelleren Wachstum, früheren Auftreten und erhöhten Vorkommen von Melanomen im Vergleich zu Melanomen bei *lfnar1*-kompetenten *Hgf-Cdk4^{R24C}* Mäusen. Im Verlauf glichen sich diese Parameter zwischen beiden Genotypen einander an (Abb. 3). Daraus ergibt sich eine ähnliche Wachstumskinetik von *lfnar1*-defizienten und -kompetenten Melanomen.

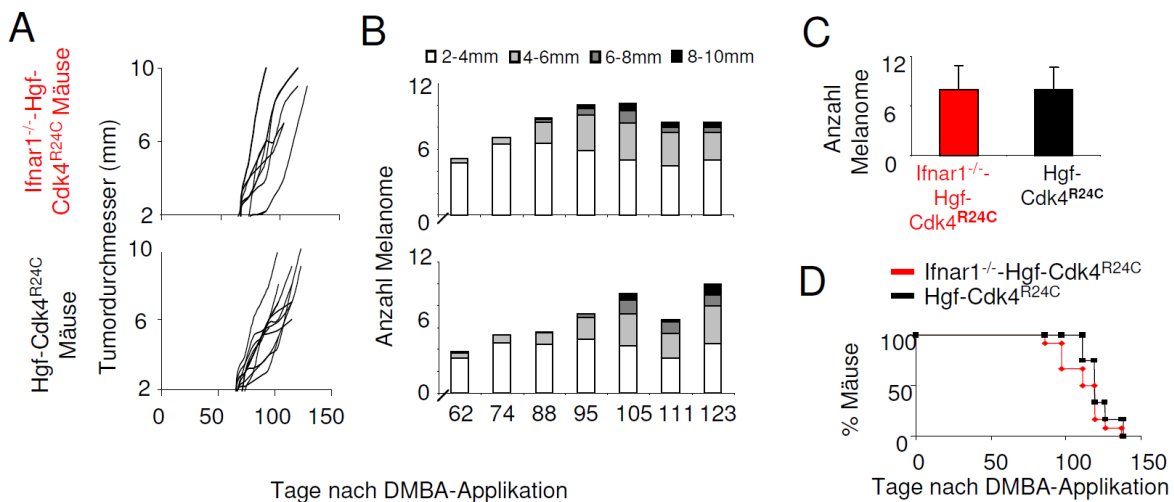


Abb. 3: Das Typ I Interferonsystem hat keinen Einfluss auf die Inzidenz, Latenzzeit, Wachstumskinetik und die Anzahl von DMBA-induzierten Melanomen in *Hgf-Cdk4^{R24C}* Mäusen.

A. Tumorstadiumskinetik. Dargestellt ist der Tumordurchmesser des größten Tumors einzelner *lfnar1*-defizienter (oben, n=9) und *lfnar1*-kompetenter (unten, n=9) *Hgf-Cdk4^{R24C}* Mäuse. **B.** Durchschnittliche Melanomanzahl und durchschnittlicher Melanomdurchmesser der *lfnar1*-defizienten (oben, n=9) und *lfnar1*-kompetenten *Hgf-Cdk4^{R24C}* (unten, n=9) Mäuse nach DMBA-Applikation. **C.** Durchschnittliche Melanomanzahl von *lfnar1*-defizienten (n=9) und -kompetenten *Hgf-Cdk4^{R24C}* (n=9) Mäusen zum Todeszeitpunkt. **D.** Kaplan-Meier-Überlebens-Kurve der *lfnar1*-defizienten (n=6) und -kompetenten *Hgf-Cdk4^{R24C}* (n=6) Mäuse.

Der Typ I Interferon Rezeptor scheint keinen Einfluss auf die Inzidenz und Multiplizität der durch DMBA induzierten Melanome in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen zu haben. Ebenso wird das Gesamtüberleben der Mäuse durch die Defizienz des Typ I Interferon Rezeptors nicht beeinflusst. Durchschnittlich lebten die Ifnar1-defizienten 108±10 Tage und die Ifnar1-kompetenten Hgf-Cdk4^{R24C} Mäuse 119±9 nach DMBA Behandlung.

Die nodulären Melanome von Ifnar1-defizienten und -kompetenten Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen bestehen histopathologisch aus stark pigmentierten, epitheloiden und weniger pigmentierten, spindeligen Zellen. Die Zellkerne sind polymorph und hyperchromatisch. Die Melanome wachsen invasiv, neigen zur Ulzeration und zeigen kaum Tumorstroma. Die dermo-epidermale Junctionszone ist mit Tumorzellen durchsetzt. Sowohl Melanome der Ifnar1-kompetenten als auch der Ifnar1-defizienten Hgf-Cdk4^{R24C} Mäuse zeigen besonders im Tumorrandbereich eine deutliche Vaskularisierung. Immunfluoreszenzuntersuchungen von Meca32 positiven Blutgefäßen in primär kutanen differenzierten Melanomen, die das melanozytäre Protein Trp1 exprimieren, konnten keinen Unterschied der Vaskularisierung zwischen Ifnar1-kompetenten und defizienten Melanomen zeigen (Abb. 4). Das Fehlen des Typ I Interferonsystem scheint demnach die Histomorphologie primär kutaner Melanome von Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen nicht zu beeinflussen.

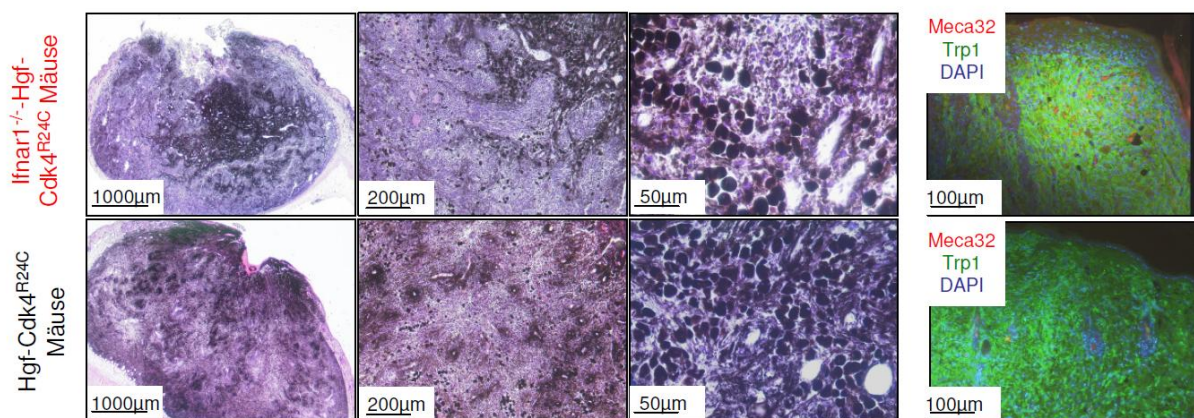


Abb. 4: Histomorphologie von DMBA-induzierten Ifnar1-defizienten und -kompetenten Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen.

Repräsentative H&E Aufnahmen eines Ifnar1-defizienten und eines Ifnar1-kompetenten Hgf-Cdk4^{R24C} Melanoms in 25-, 100-, und 400-facher Vergrößerung (von links nach rechts) und eine Immunfluoreszenzaufnahme gegen Meca 32 positive Gefäße (rot), Trp1 positive Melanomzellen (grün) (Kernfärbung mit DAPI (blau)).

Um einen möglichen Einfluss des Interferonsystems auf die Metastasierung zu analysieren, wurden die tumordrainierenden Lymphknoten und die Lungen von *Ifnar1*-defizienten und -kompetenten *Hgf-Cdk4*^{R24C} Mäusen makroskopisch und histologisch untersucht. Alle *Ifnar1*-defizienten und -kompetenten Melanome metastasieren in die drainierenden Lymphknoten. Diese sind makroskopisch vergrößert und zeigen histologisch deutliche Tumorzellinfiltrate (Abb. 5). Besonders in der Randzone (T-Zellzone) erkennt man in der HE-Färbung im Gegensatz zu den Lymphfollikeln (B-Zellzone) vermehrt stark pigmentierte, epitheloide Melanomzellen, die *Trp1* exprimieren (Daten nicht dargestellt). Lymphknoten von Melanom-tragenden *Ifnar1*-defizienten und kompetenten *Hgf-Cdk4*^{R24C} Mäusen sind mit einem Durchmesser von 6 mm (± 0) bzw. 4,5 mm ($\pm 0,5$) signifikant größer als die Lymphknoten tumorfreier Kontrolltiere mit 1,5 mm ($\pm 0,5$). Es ergibt sich jedoch kein signifikanter Größenunterschied zwischen Melanom-drainierenden Lymphknoten von *Ifnar1*-defizienten und -kompetenten *Hgf-Cdk4*^{R24C} Mäusen, sodass das Interferonsystem I in diesem experimentellen System keinen Einfluss auf die lymphogene Metastasierung zu haben scheint.

Makroskopisch sichtbare Lungenmetastasen zeigen 66 % (6/9) der *Ifnar1*-defizienten und 33 % (3/9) der *Ifnar1*-kompetenten Mäuse. Durchschnittlich weisen *Ifnar1*-defiziente $3 \pm 0,5$ und *Ifnar1*-kompetente *Hgf-Cdk4*^{R24C} Mäuse $2 \pm 0,5$ makroskopisch sichtbare Metastasen auf. Histopathologisch bestehen die Lungenmetastasen - wie der Primärtumor - aus stark pigmentierten, epitheloiden und weniger pigmentierten spindelzelligen Melanomzellen. *Ifnar1*-defiziente Mäuse zeigen nach einmaliger DMBA-Applikation eine tendenziell höhere Inzidenz und Anzahl von Lungenmetastasen als *Ifnar1*-kompetente *Hgf-Cdk4*^{R24C} Mäuse. Metastasen in anderen viszerale Organen wie Leber, Nieren oder Gehirn konnten nicht beobachtet werden.

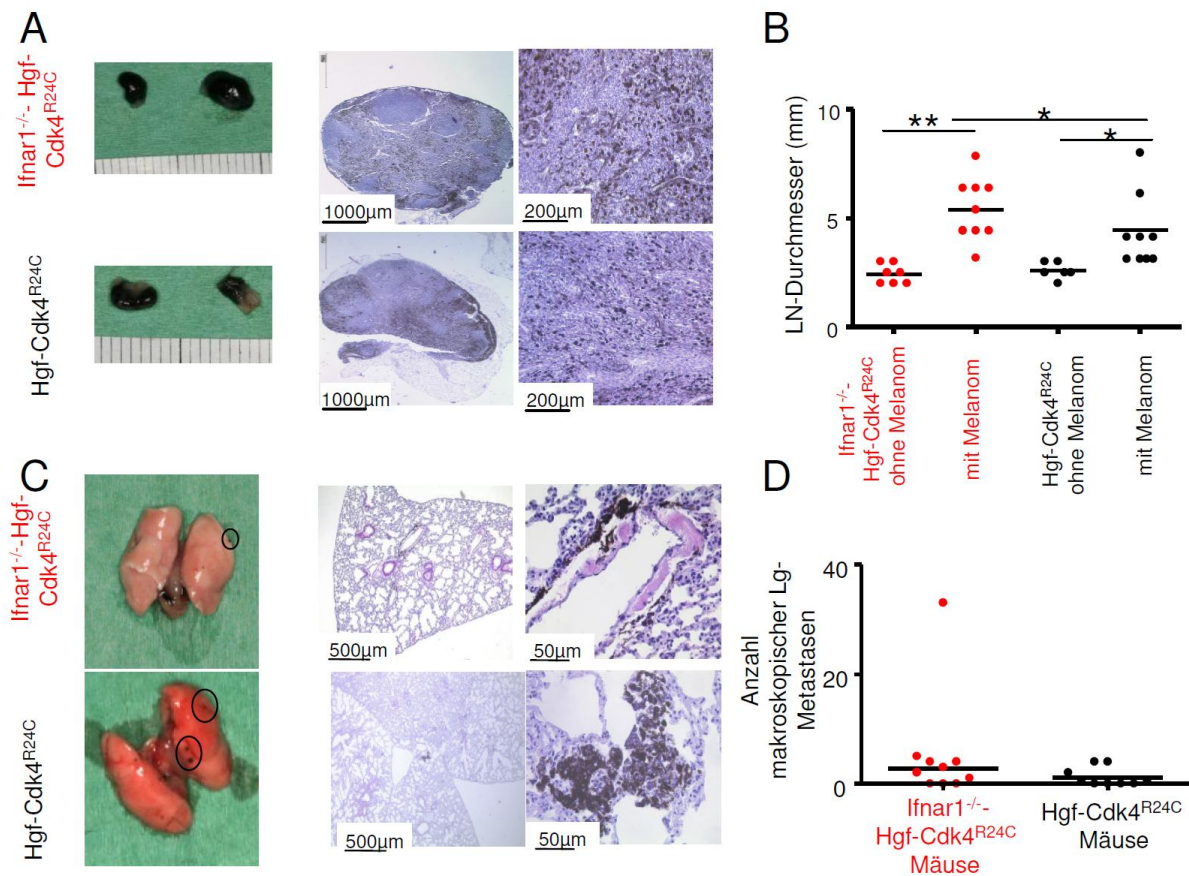


Abb. 5: DMBA induzierte Melanome metastasieren in *Ifnar1*-defizienten und -kompetenten Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen in die Lymphknoten und in die Lunge.

A. Repräsentative makroskopische Bilder inguinaler Lymphknoten einer Melanom tragenden *Ifnar1*-defizienten (oben) und einer *Ifnar1*-kompetenten Hgf-Cdk4^{R24C} Maus (unten) mit korrespondierenden HE-Aufnahmen (2,5x (links) und 10x (rechts) Vergrößerung). **B.** Darstellung der Durchmesser der inguinalen Lymphknoten (in mm) von tumorfreien und tumortragenden *Ifnar1*-defizienten und -kompetenten Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen (*p < 0,1; **p > 0,001). **C.** Repräsentative makroskopische Bilder von den Lungen einer Melanom tragenden *Ifnar1*-defizienten (oben) und einer *Ifnar1*-kompetenten Hgf-Cdk4^{R24C} Maus (unten). **D.** Anzahl makroskopisch sichtbarer Metastasen in Lungen von *Ifnar1*-defizienten- und -kompetenten Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen.

3.2 *Ifnar1*-kompetente und -defiziente Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome werden von wenigen Immunzellen infiltriert

Das Typ I Interferonsystem stimuliert die Rekrutierung von Immunzellen in primäre Melanome. Um zu überprüfen, ob das Fehlen des Typ I Interferonsystems zu einer Reduktion und/oder Veränderung der Zusammensetzung der tumor-infiltrierenden Immunzellen führt, führten wir vergleichende Immunfluoreszenz-Färbungen und durch-

flusszytometrische Analysen durch. Immunfluoreszenz-Färbungen für CD45-positive Immunzellen bestätigten die histomorphologische Beobachtung, dass sowohl *Infar1*-defiziente als auch *Infar1*-kompetente *Hgf-Cdk4*^{R24C} Melanome kaum von Immunzellen infiltriert werden (Abb. 6). Durchflusszytometrische Analysen von Melanomlysaten ergaben einen Anteil von ca. 3 % CD45-positiven Immunzellen sowohl in *Infar1*-defizienten als auch in *Infar1*-kompetenten *Hgf-Cdk4*^{R24C} Melanomen. Die überwiegende Subpopulation der CD45-positiven Zellen setzt sich bei beiden Genotypen aus ca. 75 % CD11b⁺Gr1⁺ und ca. 18 % CD11b⁺Gr1⁻ myeloiden Zellen zusammen. Der Anteil der CD11b⁺Gr1⁺ Zellen korreliert mit dem Grad der Ulzeration. Im Ulzerationsbereich finden sich histopathologisch vorwiegend neutrophile Granulozyten (histochemische Untersuchung nicht dargestellt). Der Anteil der CD8⁺, CD4⁺ T-Zellen und der CD19⁺ B-Zellen liegt bei beiden Genotypen bei weniger als 10 % aller CD45-positiven Immunzellen. Zusammenfassend kommt es weder in *Infar1*-kompetenten noch in *Infar1*-defizienten Melanomen zu einer wesentlichen Rekrutierung von CD45⁺ Immunzellen. Auch lässt sich kein Unterschied in der Verteilung der Immunzellsubpopulationen zwischen *Infar1*-kompetenten und -defizienten Melanomen feststellen. Aus diesen Daten lässt sich folgern, dass sowohl *Infar1*-kompetente als auch *Infar1*-defiziente Melanome nicht durch das Immunsystem erkannt werden. Die Charakterisierung des Tumormikromilieus erfolgte durch Gen-Expressionsanalysen mittels qPCR. Untersucht wurden Gene der zytotoxischen und der Typ I Interferon abhängigen Immunantwort repräsentativer *Infar1*-defizienter und -kompetenter *Hgf-Cdk4*^{R24C} Melanome. Die Genexpression von *gp100* und *mitf* (*microphthalmia-associated transcription factor*) 2 bestätigt den hohen Anteil von Melanomzellen im untersuchten Tumorslysat. Die chemotaktisch wirkenden Zytokine CXCL10 und CCL5, die die zytotoxische Immunantwort repräsentieren, und Interferon-beta und Interferon-gamma werden in den Melanomen beider Genotypen ähnlich stark exprimiert. Ebenso zeigen die Typ I Interferon abhängigen Gene *Tgfb*, *Oasl2* und *Irf7* keine signifikanten Unterschiede in der Expression. Diese Daten unterstützen die Beobachtung, dass sowohl *Infar1*-defiziente als auch *Infar1*-kompetente *Hgf-Cdk4*^{R24C} Melanome in einem Tumormikromilieu ohne zytotoxische Immunantwort wachsen und damit der Immunsurveillance entgehen.

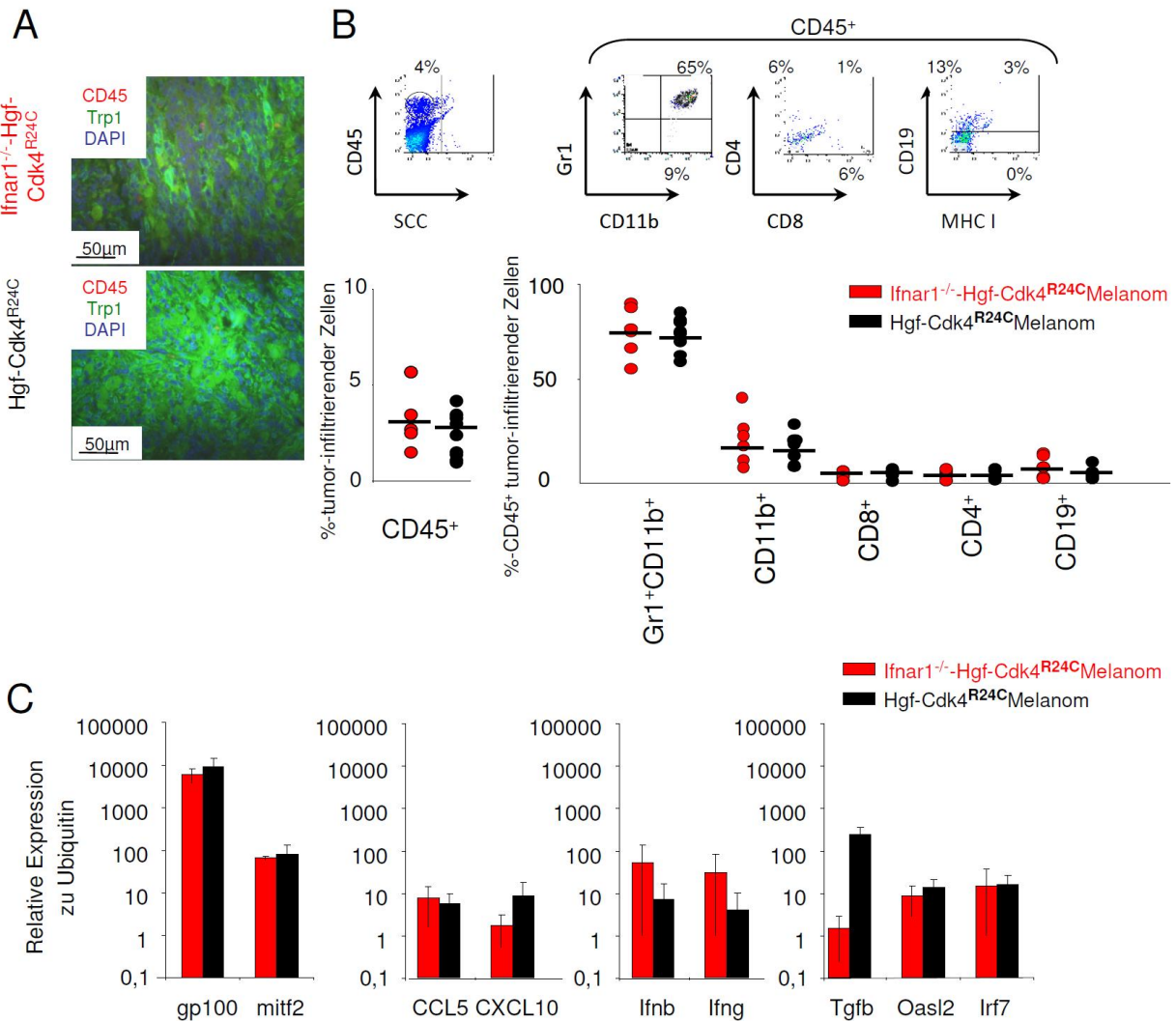


Abb. 6: Eine geringe Anzahl von Immunzellen infiltriert DMBA induzierte *Ifnar1*-defiziente und -kompetente *Hgf-Cdk4*^{R24C} Melanome. **A.** Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahme für CD45⁺ Immnzellen (rot), Trp1 positive Melanomzellen (grün) und DAPI (blau) eines primären DMBA-induzierten *Ifnar1*-defizienten (oben) und -kompetenten *Hgf-Cdk4*^{R24C} Melanoms (unten) in 40facher Vergrößerung. **B.** Oben: Repräsentative Abbildungen der durchflusszytometrischen Analyse von Melanom-infiltrierenden Immunzellen. Dargestellt ist die Messung für Gr1⁺CD11b⁺ Granulozyten, CD11b⁺ Makrophagen, CD8⁺ und CD4⁺T- und CD19⁺ B-Zellen bezogen auf CD45⁺ Immunzellen eines DMBA-induzierten *Ifnar1*-defizienten *Hgf-Cdk4*^{R24C} Melanoms. Unten: Anteil der Gr1⁺CD11b⁺ Granulozyten, CD11b⁺ Makrophagen, CD8⁺ und CD4⁺T- und CD19⁺ B-Zellen an CD45⁺ Immunzellen in Prozent im Melanomlysate von *Ifnar1*-defizienten (n=5) und -kompetenten (n=6) *Hgf-Cdk4*^{R24C} Mäusen. **C.** Mittlere Expression der angezeigten Gene relativ zur Ubiquitin-Expression, gemessen mittels RT-PCR, von DMBA induzierten *Ifnar1*-defizienten (n=4, rot) und -kompetenten (n=4, schwarz) *Hgf-Cdk4*^{R24C} Melanomen.

3.3 Eine therapeutische Aktivierung des Typ I Interferonsystems induziert eine zytotoxische Immunantwort, die das Melanomwachstum in Ifnar1-kompetenten Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen hemmt

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass sowohl Ifnar1-kompetente als auch Ifnar1-defiziente primär kutane Melanome in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen einer Immunantwort entgehen. Wir vermuten, dass aufgrund der fehlenden Aktivierung des endogenen Typ I Interferonsystems in primären Ifnar1-kompetenten Melanomen, der Verlust des Typ I Interferonsystems nicht zum Tragen kommt. Daher überprüften wir, ob eine therapeutische Aktivierung des Typ I Interferonsystems von primären Ifnar1-kompetenten Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen prinzipiell die angeborene Immunsurveillance aktivieren und damit das Tumorwachstum verlangsamen kann. Als experimentelle Strategie nutzten wir die immunstimulatorische RNA polyinosinic:polycytidylic (Poly(I:C)), die über die Rezeptoren TLR3 und MDA5 zu einer Stimulation des Typ I Interferonsystems führt (Gitlin et al., 2006; Akazawa et al., 2007). Es wurden sechs Hgf-Cdk4^{R24C} Mäuse im Alter von 6 - 8 Wochen einmalig mit 100 nmol DMBA behandelt. 70 Tage später erfolgte die repetitive, zweimal wöchentliche, peritumorale Injektion von Poly(I:C). An Tag 81 erfolgten Analysen der Melanome mittels RT-PCR auf die Expression von Typ I Interferon-abhängigen Genen und durchflusszytometrische Quantifizierungen der Tumor-infiltrierenden Immunzellen. Die repetitive Poly(I:C)-Injektion führte zu einem 16fachen Anstieg der IRF7 (Interferon-regulatory-factor 7) Expression, sowie zu einer bis zu 50fachen bzw. 35fachen Zunahme der Expressionslevel von CXCL10 bzw CCL5 im Vergleich zu unbehandelten Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen. Diese Chemokine dienen der chemotaktischen Rekrutierung von dendritischen Zellen, Makrophagen, T-Zellen und NK Zellen. Als Konsequenz aus der signifikanten Zunahme der chemotaktischen Proteine ergaben durchflusszytometrische Messungen der Tumorsate von Poly(I:C) - behandelten Melanomen einen bis zu sieben-fachen Anstieg der CD45-positiven Zellen, dreifachen Anstieg der CD8-positiven Zellen und einen bis zu vierfachen Anstieg der NK-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Melanomen (Abb. 7).

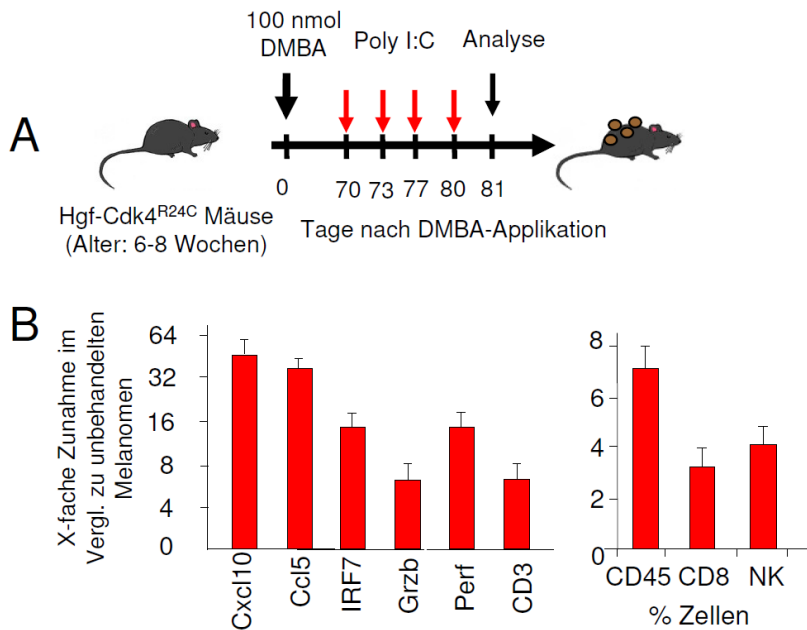


Abb. 7: Die peritumorale Injektion von Poly(I:C) induziert eine vom Typ I Interferonsystem abhängige zytotoxische Immunantwort in primären Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen.

A. Schematische Darstellung des experimentellen Vorgehens. **B.** Verhältnismäßige Zunahme der mRNA Expression für die angegebenen Gene und die prozentuale Zunahme der Tumor-infiltrierenden CD45+ Immunzellen in Melanom-tragenden Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen nach repetitiver, peritumoraler Poly(I:C) Injektion verglichen mit unbehandelten Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen (n=6).

Um zu überprüfen, ob die Rekrutierung von Immunzellen und die damit verbundene Immunantwort nach Stimulation des Typ I Interferonsystems durch Poly(I:C) eine Ifnar1-abhängige Immunsurveillance induziert und das Melanomwachstum beeinflusst, analysierten wir das Tumorwachstum von primären Melanomen nach repetitiver, peritumoraler Poly(I:C) Injektion in Ifnar1-defizienten und -kompetenten Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen. Wie in den vorherigen Experimenten entwickelten alle Mäuse spätestens 70 Tage nach DMBA-Behandlung mindestens ein Melanom. Eine repetitive, peritumorale Injektion durch Poly(I:C) führte bei Ifnar1-kompetenten Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen zu einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums und dadurch zu einer signifikanten Verlängerung des Gesamtüberlebens (Abb. 8). In Melanom-tragenden Ifnar1-defizienten Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen zeigte sich durch die Poly(I:C) Behandlung kein Effekt auf die Wachstumskinetik oder die Überlebenszeit. Diese Daten zeigen, dass die

peritumorale Injektion von Poly(I:C) eine vom Typ I Interferonsystem abhängige zytotoxische Immunantwort induzieren und das Wachstum von primären Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen verzögern kann.

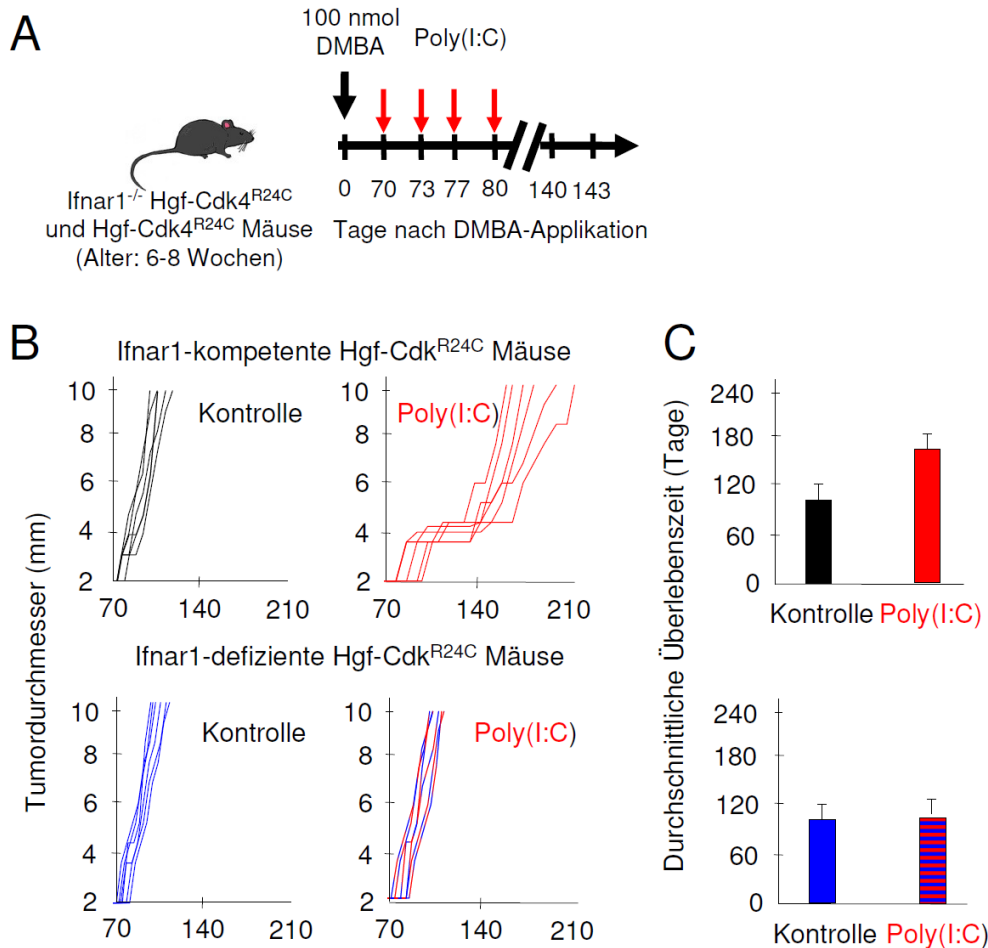


Abb. 8: Die repetitive, peritumorale Injektion von Poly(I:C) verzögert das Wachstum von primären Melanomen in Ifnar1-kompetenten Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen.

A. Schematische Darstellung des experimentellen Vorgehens. **B.** Tumorstadiumskinetik. Dargestellt ist der Tumordurchmesser des größten Tumors einzelner Ifnar1-kompetenten (oben, n=6) und Ifnar1-defizienten (unten, n=6) Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen unbehandelt bzw. nach repetitiver, peritumorale Poly(I:C) Injektion. **C.** Durchschnittliche Überlebenszeit von Ifnar1-kompetenten (n=6) und Ifnar1-defizienten (n=9) Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen ohne bzw. mit repetitiven, peritumoralen Poly(I:C) Injektionen.

4. Diskussion

4.1 Immunzell-arme Melanome entgehen einer Typ I Interferon abhängigen Immunantwort

Durch Verpaarung von Ifnar1-defizienten Mäusen mit Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen konnte der Einfluss einer funktionellen Defizienz des Typ I Interferonsystems auf die Entstehung und Progression primärer Melanome experimentell untersucht werden. Entgegen unserer Erwartung konnten wir keinen Unterschied in der Inzidenz, Anzahl und Wachstumskinetik zwischen DMBA-induzierten Melanomen in Ifnar1-defizienten und -kompetenten Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen finden. Einerseits ist es möglich, dass das Typ I Interferonsystem grundsätzlich keine Relevanz für die Entwicklung und Progression von DMBA induzierten Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen hat. Andererseits könnte eine fehlende endogene Aktivierung des Typ I Interferonsystems in der Entstehung und Progression primärer Melanome im Hgf-Cdk4^{R24C} Mausmodell erklären, warum das Fehlen des funktionellen Typ I Interferonsystems keinen Einfluss auf die Melanompathogenese in Ifnar1-defizienten Mäusen zeigt. Die Vermutung, dass das Typ I Interferonsystems essentiell für eine antitumorigene Immunantwort ist, ergibt sich aus einigen Beobachtungen von humanen Melanomen. In 14 regressiven primären Melanomen konnte histopathologisch eine Assoziation zwischen einer lokalen Aktivierung des Typ I Interferonsystems gemessen an der Expression des Interferon-regulierten Proteins MxA und der Infiltration von zytotoxischen Granzym B exprimierenden T-Zellen gezeigt werden (Wenzel et al., 2005). Die T-Zellinfiltration von Melanomen ist mit einer erhöhten Sekretion der Chemokine CCL2-CCL5, CXCL 9 und CXCL 10 assoziiert. Einige dieser Zytokine werden durch die Stimulation von Typ I Interferon vermehrt produziert (Dengel et al., 2010; Harlin et al., 2009). Durch Genexpressionsstudien von primären humanen Melanomen konnte eine positive Korrelation zwischen der endogenen Induktion von Typ I Interferon und einer T-Zell-Infiltration nachgewiesen werden (Harbst et al., 2012). Unsere eigene Arbeitsgruppe konnte durch Genexpressionsanalysen von 223 primären Melanomen kürzlich zeigen, dass Patienten mit primären Melanomen, die eine hohe Typ I Interferonsignatur zeigen, ein verlängertes Gesamtüberleben haben, im Vergleich zu Patienten mit Melanomen mit einer niedrigen Interferonsignatur. Auch eine vermehrte Expression von T-Zell abhängigen Genen erwies sich in diesem Kollektiv aus

primären Melanomen als prognostisch günstig (Bald et al., 2014). Unklar ist, ob die infiltrierten T-Zellen eine vermehrte Sekretion von Typ I Interferon induzieren oder ob die Aktivierung des Typ I Interferonsystems zu einer vermehrten Infiltration von zytotoxischen T-Zellen führt. Es wird jedoch deutlich, dass die Aktivierung des Typ I Interferonsystems und die Infiltration mit zytotoxischen T-Zellen einander bedingen. Hgf-Cdk4^{R24C} Melanome imitieren die Pathogenese von immunzellarmen humanen Melanomen und zeigen eine geringe Expression von Typ I Interferon abhängigen Genen. Eine mögliche Erklärung für die fehlende endogene Aktivierung des Typ I Interferonsystems und der fehlenden T-Zellinfiltration im Mausmodell könnten die immun-suppressiven Eigenschaften von Hgf sein. Yamamura et al. konnten zeigen, dass Hgf eine akute und chronische Abstoßungsreaktion in einem allogenen Herztransplantations-Mausmodell unterdrücken kann (Yamamura et al., 2004). Wir konnten jedoch durch die Induktion von Methylcholanthren (MCA) induzierten Sarkomen in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen zeigen, dass Hgf nicht für die mangelnde Immunzellinfiltration verantwortlich sein kann, da primäre Sarkome in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen genau wie in Wildtypmäusen eine ausgeprägte Infiltration von Immunzellen zeigen. Die Geneexpressionslevel von Hgf unterscheiden sich nicht zwischen beiden Tumorentitäten. Es scheint, dass die Art der malignen Transformation der jeweiligen Tumorzelle die Interaktion mit dem Immunsystem und damit die Immunogenität des Tumors bestimmt. Sarkomzellen exprimieren im Vergleich zu Melanomzellen vermehrt MHC I Moleküle und sezernieren verstärkt proinflammatorische Chemokine und Zytokine, die das Mikroenvironment beeinflussen (Bald und Landsberg, 2014). In Zusammenschau unterstreichen die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse im Melanommausmodell, dass eine fehlende endogene Aktivierung des Typ I Interferonsystems mit einer fehlenden zytotoxischen T-Zell Infiltration einhergeht. Unklar bleibt, durch welche malignen Transformationen von Tumorzellen eine spontane antitumorale Immunantwort induziert werden kann.

4.2 Eine therapeutische Aktivierung des Typ I Interferonsystems stimuliert die angeborene und adaptive Immunüberwachung

In dieser Arbeit konnte dargestellt werden, dass die repetitive peritumorale Injektion von Poly(I:C) zu einer vermehrten Rekrutierung von CD45-positiven Immunzellen in

Melanome von Ifnar1-kompetenten Mäusen führt. Das Melanomwachstum wurde dadurch gegenüber Ifnar1-defizienten Melanomen signifikant verzögert und das Gesamtüberleben signifikant verlängert. Die immunstimulatorische RNA Poly(I:C) induziert das Typ I Interferonsystem durch Stimulation der Rezeptoren TLR 3 und MDA 5 (Akazawa et al., 2007; Gitlin et al., 2006). Die fehlende Wirkung von Poly(I:C) in Ifnar1-defizienten Mäusen zeigt, dass Poly(I:C) das zelluläre Immunsystem durch eine Stimulation des Typ I Interferonsystems in kutanen Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen aktivieren kann. In unserem experimentellen Ifnar1-defizienten Hgf-Cdk4^{R24C} Mausmodell weisen alle Zellen eine Defizienz des funktionellen Typ I Interferonrezeptor auf. Es ist daher nicht möglich zu evaluieren, in welchen Zellen das Typ I Interferonsystem maßgeblich das Tumorwachstum beeinflusst. Auf der einen Seite könnte das Typ I Interferon die Tumorzelle direkt beeinflussen und das Wachstum durch zum Beispiel antiproliferative und pro-apoptische Effekte verhindern. Auf der anderen Seite könnte das Typ I Interferonsystem das Tumorwachstum indirekt durch den Einfluss von hämatopoetischen Zellen beeinflussen, die eine antitumorale Immunantwort induzieren. Durch Transplantationsversuchen mit Sarkomen im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass das Tumorwachstum durch das Typ I Interferon in hämatopoetischen Zellen beeinflusst wird (Dunn und Bruce, 2005). Dendritische Zellen sezernieren nach Stimulation durch Typ I Interferon Chemokine wie IL15, die die NK-Zellen stimulieren, und exprimieren vermehrt MHC I zur Stimulation von zytotoxischen Zellen (Beuneu et al., 2011). Die zytotoxische Wirkung von NK-Zellen wird zusätzlich durch direkte Stimulation von Typ I Interferon erhöht (Wu und Lanier., 2003). Auch die klonale Expansion und das Überleben von zytotoxischen T-Zellen wird durch Typ I Interferon gefördert (Curtsinger et al., 2005; Murrack et al., 1999). Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit wurde durch Transplantationsexperimente mit der Melanomzelllinie HCmel3, die aus einem Ifnar1-kompetenten Hgf-Cdk4^{R24C} Melanom etabliert wurde und die Wachstumskinetik und Histomorphologie der primären Melanome imitiert, der therapeutische Effekt von Poly(I:C) in Abhängigkeit von einem funktionellen Typ I Interferonsystem in myeloiden, dendritischen, CD4-positiven und NK-Zellen näher untersucht. Dazu wurden Zell-Typ spezifische Knock-out Mäuse verwendet. Der therapeutische Effekt repetitiver peritumoraler Poly(I:C) Injektionen von transplantierten HCmel3 Melanomen blieb in Mäusen mit Ifnar1-defizienten myeloiden (Ifnar1^{ΔLysM}),

dendritischen ($\text{Ifnar1}^{\Delta\text{CD11c}}$), T-Zellen ($\text{Ifnar1}^{\Delta\text{CD4}}$) oder NK-Zellen ($\text{Ifnar1}^{\Delta\text{Nc1r}}$) aus. Diese Daten demonstrieren, dass Poly(I:C) durch Koordination des Typ I Interferonsystems in myeloiden, dendritischen, T-Zellen und NK-Zellen das Wachstum von Melanomen hemmen kann. Das gleiche experimentelle Protokoll mit einem anti-Interferon-gamma Antikörper ergab weiterhin, dass die Immunsurveillance durch die Aktivierung des Typ I Interferonsystems mit der Produktion von Interferon-gamma einhergeht (Bald und Landsberg, 2014). Immunzell-arme $\text{Hgf-Cdk4}^{\text{R24C}}$ Melanome scheinen einer Immunantwort aufgrund eines fehlenden endogenen Stimulus zur Induktion des Typ I Interferonsystems zu entgehen. Neben der experimentellen Aktivierung des endogenen Typ I Interferonsystems durch Poly(I:C) können DAMPs (damage-associated molecular patterns) zu einer vom Typ I Interferon abhängigen Immunantwort führen. Kürzlich wurde der STING (stimulator of Interferon gene) Signalweg als maßgeblich für die Aktivierung des Typ I Interferons in Tumoren identifiziert. Das Adaptormolekül STING kann zytosolische DNA, z. B. aus Tumorzellen erkennen und das Typ I Interferonsystem aktivieren (Deng et al., 2010; Woo et al., 2014). In STING-defizienten Mausmodellen konnte im Gegensatz zu Wildtypmäusen eine fehlende antitumorale Immunantwort mit fehlender zytotoxischer T-Zellantwort nachgewiesen werden (Woo und Fuertes., 2014). Als Grund, warum diese DNA nicht regelmäßig zu einer Immunstimulation führt, wird die Präsenz von extrazellulärer DNase I diskutiert. Diese Vermutung unterstreicht, dass die Tumorzellen selbst die Stimulation einer Typ I Interferon abhängigen antitumoralen Immunantwort induzieren können.

4.3 Bedeutung einer Aktivierung des Typ I Interferonsystems für die Melanomtherapie

In humanen Melanomen konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte Immunzellinfiltration mit einer verstärkten Expression von Typ I Interferon abhängigen Genen korreliert und Patienten mit immunzellreichen Melanomen eine bessere Prognose aufweisen (Harbst und Staaf, 2012; Kholmanskih et al., 2010). Die Arbeitsgruppe von Toni Ribas konnte zeigen, dass die Infiltration von zytotoxischen T-Zellen in humanen Melanomen mit der Aktivierung der immunsuppressiven PD-1/PD-L1 Signalkaskade assoziiert ist (Tumeh und Harview, 2014). Diese Patienten scheinen besonders von einer therapeutischen Blockade der PD-1/PD-L1 Signalkaskade zu

profitieren (Herbst et al., 2014) Diese Arbeiten legen nahe, dass vermutlich Immunzellarme Melanome schlechter auf die neuen Immuntherapeutika ansprechen. Eine therapeutische Aktivierung des Typ I Interferonsystems könnte in diesen Melanomen ähnlich wie in immunzellarmen Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen eine Immunantwort mit einhergehender Immunzellinfiltration induzieren und damit evtl. auch diese Melanome für eine therapeutische Blockade der PD-1/PD-L1 Signalkaskade zugänglich machen. Unser Melanommausmodell eignet sich, die Relevanz einer durch Stimulation des Typ I Interferon induzierten Immunzellinfiltration für eine Therapie mit anti-PD1 zu evaluieren. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass eine anti-PD1-Therapie keinen Effekt in immunzellarmen Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen zeigt. Nach Aktivierung des Typ I Interferonsystems durch repetitive, peritumorale Injektion von Poly(I:C) verzögert eine anti-PD1-Therapie das Wachstum von Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen (Bald und Landsberg, 2014). Aktuell läuft bereits eine Phase I Studie (NCT02112032) bei Patienten mit metastasiertem Melanom um den Effekt einer Interferontherapie in Kombination mit dem anti-PD1 Antikörper Pembrolizumab zu untersuchen. Die Entdeckung des STING-Signalweges für die Induktion einer Typ I Interferonantwort eröffnet diesen Signalweg als neue Zielstruktur für zukünftige Medikamente. Erste Substanzen, die präklinisch in Mausmodellen untersucht wurden, konnten bisher nicht auf den Menschen übertragen werden, da diese nur das murine jedoch nicht das human STING aktivieren (Conlon et al., 2013). Weitere Substanzen befinden sich aktuell in der Entwicklung und bieten neue Therapiestrategien, die in Kombination mit der Blockade der PD-1/PD-L1 Signalkaskade auf eine Optimierung der Ansprechrate und Wirkdauer der neuen Immuntherapeutika hoffen lassen.

5. Zusammenfassung

Das kutane Melanom ist aufgrund seines aggressiven Wachstums und der Tendenz zur frühzeitigen Metastasierung der bösartigste Hauttumor. Die Behandlung des metastasierten Melanoms wird aktuell durch die therapeutische Blockade der PD-1/PD-L1 Signalkaskade, die zu einer Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen führt, revolutioniert. Bisher profitiert jedoch nur ein Teil der Patienten von dieser Therapie. Viele primäre Melanome und Metastasen werden von zytotoxischen T-Zellen infiltriert. Dabei korreliert diese lymphozytäre Infiltration mit einer Aktivierung des Typ I Interferonsystem und wird als prognostisch günstig diskutiert. Die biologische Signifikanz der endogenen Aktivierung des Typ I Interferonsystems ist jedoch nicht vollständig geklärt. Um die Bedeutung des Typ I Interferonsystems in der Melanomentstehung und -progression experimentell zu untersuchen, haben wir Hgf-Cdk4^{R24C} Mäuse, die die humane Pathogenese imitieren, in Ifnar1-defiziente Mäuse gekreuzt, sodass der biologische Effekt des Typ I Interferonsystem sowohl in den Melanomzellen als auch im Tumormikromilieu ausbleibt. Überraschenderweise zeigte sich kein Unterschied in der Inzidenz, Latenz, Multiplizität, Metastasierung und dem Gesamtüberleben von DMBA-induzierten Melanomen in Ifnar1-defizienten gegenüber Ifnar1-kompetenten Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen. Immunhistochemische, durchflusszytometrische und molekularbiologische Untersuchungen zur näheren Charakterisierung der Melanomzellinteraktion mit dem Immunsystem zeigten in beiden Genotypen eine geringe Infiltration von Immunzellen und eine fehlende zytotoxische T-Zell Antwort. Ifnar1-kompetente und Ifnar1-defiziente primäre kutane Melanome in Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen entgehen damit einer Immunantwort. Durch repetitive peritumorale Injektionen von Poly(I:C) konnten wir experimentell beweisen, dass eine Aktivierung des Typ I Interferonsystems in Ifnar1-kompetenten Hgf-Cdk4^{R24C} Melanomen eine zytotoxische Immunantwort induzieren kann und dadurch zu einem verzögerten Melanomwachstum und einer signifikanten Verlängerung des Gesamtüberlebens führen kann. In Ifnar1-defizienten Mäusen blieb der Poly(I:C) Effekt aus. Die Ergebnisse in genetisch veränderten Hgf-Cdk4^{R24C} Mäusen zeigen, dass Poly(I:C) durch die Stimulation des Typ I Interferonsystems das zelluläre Immunsystem für primäre immunzellarme Melanomzellen sensibilisieren und das Melanomwachstum verzögern kann. Diese experimentellen Erkenntnisse legen nahe, dass Immuntherapien

für immunzellarme Melanome von einer vorherigen Aktivierung des Typ I Interferon-systems profitieren können. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind Teil der Publikation „Immune cell-poor melanomas benefit from PD-1 blockade after targeted Typ I IFN activation“ im Journal Cancer Discovery (Bald und Landsberg, 2014).

6. Literaturverzeichnis

Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 834-846

Akazawa T, Ebihara T, Okuno M, Okuda Y, Shingai M, Tsujimura K, Takahashi T, Ikawa M, Okabe M, Inoue N, Okamoto-Tanaka M, Ishizaki H, Miyoshi J, Matsumoto M, Seya T. Antitumor NK activation induced by the Toll-like receptor 3-TICAM-1 (TRIF) pathway in myeloid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 252-257

Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, Durand I, Yessaad N, Dezutter-Dambuyant C, Vicari A, O'Garra A, Biron C, Briere F, Trinchieri G. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* 2001; 2: 1144-1150

Azimi F, Scolyer RA, Rumcheva P, Moncrieff M, Murali R, McCarthy SW, Saw RP, Thompson JF. Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2012; 30: 2678-2683

Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Ding S, Byrd DR, Cascinelli N, Cochran AJ, Coit DG, Eggermont AM, Johnson T, Kirkwood JM, Leong SP, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Ross MI, Sondak VK. Multivariate analysis of prognostic factors among 2,313 patients with stage III melanoma: comparison of nodal micrometastases versus macrometastases. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2452-2459

Bald T, Landsberg J, Lopez-Ramos D, Renn M, Glodde N, Jansen P, Gaffal E, Steitz J, Tolba R, Kalinke U, Limmer A, Jonsson G, Holzel M, Tuting T. Immune cell-poor melanomas benefit from PD-1 blockade after targeted type I IFN activation. *Cancer Discov* 2014; 4: 674-687

Beadling C, Jacobson-Dunlop E, Hodi FS, Le C, Warrick A, Patterson J, Town A, Harlow A, Cruz F 3rd, Azar S, Rubin BP, Muller S, West R, Heinrich MC, Corless CL. KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 6821-6828

Beuneu H, Deguine J, Bouvier I, Di Santo JP, Albert ML, Bousso P. Cutting Edge: A dual role for type I IFNs during polyinosinic-polycytidylic acid-induced NK cell activation. *J Immunol* 2011; 187: 2084-2088

Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 2010; 11: 889-896

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, Gajewski TF, Coulie PG. From defined human tumor antigens to effective immunization. *Immunol Today* 1995; 16: 334-336

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

Burnet M. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J* 1957; 1: 779-786

Burnette BC, Liang H, Lee Y, Chlewicki L, Khodarev NN, Weichselbaum RR, Fu YX, Auh SL. The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type I interferon-dependent innate and adaptive immunity. *Cancer Res* 2011; 71: 2488-2496

Clark WH Jr, Elder DE, Guerry DT, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, Synnestvedt M, Halpern AC. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 1893-1904

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

Colombino M, Capone M, Lissia A, Cossu A, Rubino C, De Giorgi V, Massi D, Fonsatti E, Staibano S, Nappi O, Pagani E, Casula M, Manca A, Sini M, Franco R, Botti G, Caraco C, Mozzillo N, Ascierto PA, Palmieri G. BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. *J Clin Oncol* 2012; 30: 2522-2529

Conlon J, Burdette DL, Sharma S, Bhat N, Thompson M, Jiang Z, Rathinam VA, Monks B, Jin T, Xiao TS, Vogel SN, Vance RE, Fitzgerald KA. Mouse, but not human STING, binds and signals in response to the vascular disrupting agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid. *J Immunol* 2013; 190: 5216-5225

Curtsinger JM, Valenzuela JO, Agarwal P, Lins D, Mescher MF. Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J Immunol* 2005; 174: 4465-4469

Decker T, Muller M, Stockinger S. The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 675-687

den Haan JM, Lehar SM, Bevan MJ. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* 2000; 192: 1685-1696

Deng L, Zhou JF, Sellers RS, Li JF, Nguyen AV, Wang Y, Orlofsky A, Liu Q, Hume DA, Pollard JW, Augenlicht L, Lin EY. A novel mouse model of inflammatory bowel disease links mammalian target of rapamycin-dependent hyperproliferation of colonic epithelium to inflammation-associated tumorigenesis. *Am J Pathol* 2010; 176: 952-967

Dengel LT, Norrod AG, Gregory BL, Clancy-Thompson E, Burdick MD, Strieter RM, Slingluff CL Jr, Mullins DW. Interferons induce CXCR3-cognate chemokine production by human metastatic melanoma. *J Immunother* 2010; 33: 965-974

Diamond MS, Kinder M, Matsushita H, Mashayekhi M, Dunn GP, Archambault JM, Lee H, Arthur CD, White JM, Kalinke U, Murphy KM, Schreiber RD. Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J Exp Med* 2011; 208: 1989-2003

Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* 1994; 1: 447-456

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3: 991-998

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

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 329-360

Eggermont AM, Robert C. New drugs in melanoma: it's a whole new world. *Eur J Cancer* 2011; 47: 2150-2157

Eyles J, Puaux AL, Wang X, Toh B, Prakash C, Hong M, Tan TG, Zheng L, Ong LC, Jin Y, Kato M, Prevost-Blondel A, Chow P, Yang H, Abastado JP. Tumor cells disseminate early, but immunosurveillance limits metastatic outgrowth, in a mouse model of melanoma. *J Clin Invest* 2010; 120: 2030-2039

Fuertes MB, Kacha AK, Kline J, Woo SR, Kranz DM, Murphy KM, Gajewski TF. Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+ T cell responses through CD8 α + dendritic cells. *J Exp Med* 2011; 208: 2005-2016

Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 253-268

Gabrilovich DI, Velders MP, Sotomayor EM, Kast WM. Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *J Immunol* 2001; 166: 5398-5406

Garg AD, Krysko DV, Verfaillie T, Kaczmarek A, Ferreira GB, Marysael T, Rubio N, Firczuk M, Mathieu C, Roebroek AJ, Annaert W, Golab J, de Witte P, Vandenabeele P, Agostinis P. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *EMBO J* 2012; 31: 1062-1079

Gasteiger G, Hemmers S, Firth MA, Le Floch A, Huse M, Sun JC, Rudensky AY. IL-2-dependent tuning of NK cell sensitivity for target cells is controlled by regulatory T cells. *J Exp Med* 2013; 210: 1167-1178

Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R, Hobby P, Sutton B, Tigelaar RE, Hayday AC. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 2001; 294: 605-609

Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell RA, Diamond MS, Colonna M. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 8459-8464

Gough DJ, Messina NL, Hii L, Gould JA, Sabapathy K, Robertson AP, Trapani JA, Levy DE, Hertzog PJ, Clarke CJ, Johnstone RW. Functional crosstalk between type I and II interferon through the regulated expression of STAT1. *PLoS Biol* 2010; 8: e1000361

Guerra N, Tan YX, Joncker NT, Choy A, Gallardo F, Xiong N, Knoblaugh S, Cado D, Greenberg NM, Raulet DH. NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* 2008; 28: 571-580

Harbst K, Staaf J, Lauss M, Karlsson A, Masback A, Johansson I, Bendahl PO, Vallon-Christersson J, Torngren T, Ekedahl H, Geisler J, Hoglund M, Ringner M, Lundgren L, Jirstrom K, Olsson H, Ingvar C, Borg A, Tsao H, Jonsson G. Molecular profiling reveals low- and high-grade forms of primary melanoma. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 4026-4036

Harlin H, Meng Y, Peterson AC, Zha Y, Tretiakova M, Slingluff C, McKee M, Gajewski TF. Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8+ T-cell recruitment. *Cancer Res* 2009; 69: 3077-3085

Hata N, Sato M, Takaoka A, Asagiri M, Tanaka N, Taniguchi T. Constitutive IFN-alpha/beta signal for efficient IFN-alpha/beta gene induction by virus. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285: 518-525

Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, Sosman JA, McDermott DF, Powderly JD, Gettinger SN, Kohrt HE, Horn L, Lawrence DP, Rost S, Leabman M, Xiao Y, Mokatrini A, Koeppen H, Hegde PS, Mellman I, Chen DS, Hodi FS. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014; 515: 563-567

Horvath CM, Stark GR, Kerr IM, Darnell JE Jr. Interactions between STAT and non-STAT proteins in the interferon-stimulated gene factor 3 transcription complex. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 6957-6964

Huijbers IJ, Krimpenfort P, Chomez P, van der Valk MA, Song JY, Inderberg-Suso EM, Schmitt-Verhulst AM, Berns A, Van den Eynde BJ. An inducible mouse model of melanoma expressing a defined tumor antigen. *Cancer Res* 2006; 66: 3278-3286

Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957; 147: 258-267

Kamphuis E, Junt T, Waibler Z, Forster R, Kalinke U. Type I interferons directly regulate lymphocyte recirculation and cause transient blood lymphopenia. *Blood* 2006; 108: 3253-3261

Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11: 373-384

Kholmanskikh O, van Baren N, Brasseur F, Ottaviani S, Vanacker J, Arts N, van der Bruggen P, Coulie P, De Plaen E. Interleukins 1alpha and 1beta secreted by some melanoma cell lines strongly reduce expression of MITF-M and melanocyte differentiation antigens. *Int J Cancer* 2010; 127: 1625-1636

Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 2002; 3: 999-1005

Kirch HC, Putzer B, Brockmann D, Esche H, Kloke O. Formation of the early-region-2 transcription-factor-1-retinoblastoma-protein (E2F-1-RB) transrepressor and release of the retinoblastoma protein from nuclear complexes containing cyclin A is induced by interferon alpha in U937V cells but not in interferon-alpha-resistant U937VR cells. *Eur J Biochem* 1997; 246: 736-744

Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, Smyth MJ, Schreiber RD. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 2007; 450: 903-907

Kohlmeyer J, Cron M, Landsberg J, Bald T, Renn M, Mikus S, Bondong S, Wikasari D, Gaffal E, Hartmann G, Tuting T. Complete regression of advanced primary and metastatic mouse melanomas following combination chemoimmunotherapy. *Cancer Res* 2009; 69: 6265-6274

Landsberg J, Gaffal E, Cron M, Kohlmeyer J, Renn M, Tuting T. Autochthonous primary and metastatic melanomas in Hgf-Cdk4 R24C mice evade T-cell-mediated immune surveillance. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010; 23: 649-660

Landsberg J, Kohlmeyer J, Renn M, Bald T, Rogava M, Cron M, Fatho M, Lennerz V, Wolfel T, Holzel M, Tuting T. Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature* 2012; 490: 412-416

Levine DB. The Hospital for the Ruptured and Crippled: William Bradley Coley, third Surgeon-in-Chief 1925-1933. *HSS J* 2008; 4: 1-9

Lou Y, Liu C, Kim GJ, Liu YJ, Hwu P, Wang G. Plasmacytoid dendritic cells synergize with myeloid dendritic cells in the induction of antigen-specific antitumor immune responses. *J Immunol* 2007; 178: 1534-1541

Marrack P, Kappler J, Mitchell T. Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med* 1999; 189: 521-530

Matsuoka M, Tani K, Asano S. Interferon-alpha-induced G1 phase arrest through up-regulated expression of CDK inhibitors, p19Ink4D and p21Cip1 in mouse macrophages. *Oncogene* 1998; 16: 2075-2086

Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 991-1045

Mazzoni A, Bronte V, Visintin A, Spitzer JH, Apolloni E, Serafini P, Zanovello P, Segal DM. Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *J Immunol* 2002; 168: 689-695

Menzies AM, Haydu LE, Visintin L, Carlino MS, Howle JR, Thompson JF, Kefford RF, Scolyer RA, Long GV. Distinguishing clinicopathologic features of patients with V600E and V600K BRAF-mutant metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 3242-3249

Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N, Nieweg OE, Roses DF, Hoekstra HJ, Karakousis CP, Puleo CA, Coventry BJ, Kashani-Sabet M, Smithers BM, Paul E, Kraybill WG, McKinnon JG, Wang HJ, Elashoff R, Faries MB. Final trial report of sentinel-node biopsy versus nodal observation in melanoma. *N Engl J Med* 2014; 370: 599-609

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

Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, Metivier D, Larochette N, van Endert P, Ciccocanti F, Piacentini M, Zitvogel L, Kroemer G. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 2007; 13: 54-61

Petrella T, Verma S, Spithoff K, Quirt I, McCreedy D. Adjuvant interferon therapy for patients at high risk for recurrent melanoma: an updated systematic review and practice guideline. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2012; 24: 413-423

Raig ET, Jones NB, Varker KA, Benniger K, Go MR, Biber JL, Lesinski GB, Carson WE 3rd. VEGF secretion is inhibited by interferon-alpha in several melanoma cell lines. *J Interferon Cytokine Res* 2008; 28: 553-561

Recio JA, Noonan FP, Takayama H, Anver MR, Duray P, Rush WL, Lindner G, De Fabo EC, DePinho RA, Merlino G. Ink4a/arf deficiency promotes ultraviolet radiation-induced melanomagenesis. *Cancer Res* 2002; 62: 6724-6730

Robbins PF, Lu YC, El-Gamil M, Li YF, Gross C, Gartner J, Lin JC, Teer JK, Cliften P, Tycksen E, Samuels Y, Rosenberg SA. Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat Med* 2013; 19: 747-752

Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, Hassel JC, Rutkowski P, McNeil C, Kalinka-Warzocha E, Savage KJ, Hernberg MM, Lebbe C, Charles J, Mihalcioiu C, Chiarion-Sileni V, Mauch C, Cognetti F, Arance A, Schmidt H, Schadendorf D, Gogas H, Lundgren-Eriksson L, Horak C, Sharkey B, Waxman IM, Atkinson V, Ascierto PA. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med* 2015; 372: 320-330

Robert C, Ribas A, Wolchok JD, Hodi FS, Hamid O, Kefford R, Weber JS, Joshua AM, Hwu WJ, Gangadhar TC, Patnaik A, Dronca R, Zarour H, Joseph RW, Boasberg P, Chmielowski B, Mateus C, Postow MA, Gergich K, Ellassaiss-Schaap J, Li XN, Iannone R, Ebbinghaus SW, Kang SP, Daud A. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet* 2014; 384: 1109-1117

- Sangfelt O, Erickson S, Castro J, Heiden T, Gustafsson A, Einhorn S, Grander D. Molecular mechanisms underlying interferon-alpha-induced G0/G1 arrest: CKI-mediated regulation of G1 Cdk-complexes and activation of pocket proteins. *Oncogene* 1999; 18: 2798-2810
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001; 410: 1107-1111
- Shuai K, Horvath CM, Huang LH, Qureshi SA, Cowburn D, Darnell JE Jr. Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* 1994; 76: 821-828
- Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol* 2010; 28: 367-388
- Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2001; 2: 293-299
- Soufir N, Ollivaud L, Bertrand G, Lacapere JJ, Descamps V, Vitoux D, Lebbe C, Wolkenstein P, Dupin N, Saiag P, Basset-Seguin N, Grandchamp B. A French CDK4-positive melanoma family with a co-inherited EDNRB mutation. *J Dermatol Sci* 2007; 46: 61-64
- Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, Williams J, Meng Y, Ha TT, Gajewski TF. Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells. *Sci Transl Med* 2013; 5: 200ra116
- Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 1997; 387: 917-921
- Takaoka A, Mitani Y, Suemori H, Sato M, Yokochi T, Noguchi S, Tanaka N, Taniguchi T. Cross talk between interferon-gamma and -alpha/beta signaling components in caveolar membrane domains. *Science* 2000; 288: 2357-2360
- Talmadge JE, Gabilovich DI. History of myeloid-derived suppressor cells. *Nat Rev Cancer* 2013; 13: 739-752
- Taylor RC, Patel A, Panageas KS, Busam KJ, Brady MS. Tumor-infiltrating lymphocytes predict sentinel lymph node positivity in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2007; 25: 869-875
- Tormo D, Ferrer A, Bosch P, Gaffal E, Basner-Tschakarjan E, Wenzel J, Tuting T. Therapeutic efficacy of antigen-specific vaccination and toll-like receptor stimulation against established transplanted and autochthonous melanoma in mice. *Cancer Res* 2006; 66: 5427-5435
- Tsao H, Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev* 2012; 26: 1131-1155

Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, Chmielowski B, Spasic M, Henry G, Ciobanu V, West AN, Carmona M, Kivork C, Seja E, Cherry G, Gutierrez AJ, Grogan TR, Mateus C, Tomasic G, Glaspy JA, Emerson RO, Robins H, Pierce RH, Elashoff DA, Robert C, Ribas A. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 2014; 515: 568-571

U'Ren L, Guth A, Kamstock D, Dow S. Type I interferons inhibit the generation of tumor-associated macrophages. *Cancer Immunol Immunother* 2010; 59: 587-598

Uze G, Monneron D. IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family. *Biochimie* 2007; 89: 729-734

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

Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* 2011; 29: 235-271

Waldhauer I, Steinle A. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* 2008; 27: 5932-5943

Wenzel J, Bekisch B, Uerlich M, Haller O, Bieber T, Tuting T. Type I interferon-associated recruitment of cytotoxic lymphocytes: a common mechanism in regressive melanocytic lesions. *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 37-48

Wolfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wolfel C, Klehmann-Hieb E, De Plaen E, Hankeln T, Meyer zum Buschenfelde KH, Beach D. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 1995; 269: 1281-1284

Woo SR, Fuertes MB, Corrales L, Spranger S, Furdyna MJ, Leung MY, Duggan R, Wang Y, Barber GN, Fitzgerald KA, Alegre ML, Gajewski TF. STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors. *Immunity* 2014; 41: 830-842

Wu J, Lanier LL. Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res* 2003; 90: 127-156

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

Young HA, Bream JH. IFN-gamma: recent advances in understanding regulation of expression, biological functions, and clinical applications. *Curr Top Microbiol Immunol* 2007; 316: 97-117

7. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Thomas Tüting für die Überlassung des Dissertationsthemas und seine Betreuung meiner Promotion. Er hat mich in den vergangenen Jahren stetig gelehrt, Probleme in der klinischen Tätigkeit und in der Forschung kritisch zu hinterfragen und als Herausforderung anzunehmen. Ebenso möchte ich mich für die unermüdliche Unterstützung von Frau Dr. med. Jennifer Landsberg bedanken. Frau Dr. Landsberg hat in den vergangenen 4 Jahren durch zahlreiche motivierende Gespräche entscheidend zu meiner Entwicklung als Arzt und wissenschaftlicher Mitarbeiter beigetragen. Ich möchte ihr daher auch für die tiefe Freundschaft ganz herzlich danken. Ganz besonders möchte ich mich ebenfalls bei Frau Dr. med. Judith Kohlmeyer, Frau PD Dr. med. Evelyn Gaffal und Prof. Dr. med. Jörg Wenzel für die Unterstützung im Labor und die hilfreichen Diskussionen bedanken. Eine große Freude war die Zusammenarbeit mit Herrn Dr. rer. nat. Marcel Renn und Herrn Dr. rer. nat. Tobias Bald. Vielfach haben mir ihre kritischen Anmerkungen geholfen, wissenschaftliche Hürden zu überwinden und meine Ergebnisse differenziert zu evaluieren. Herrn Alexander Sporleder danke ich für seine Geduld, mit der er mir verschiedene molekularbiologische Arbeitsmethoden erklärt hat.

Neben der gesamten AG Tüting möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden für die jahrelange Unterstützung bedanken. Ohne die Unterstützung meiner Eltern und meines Bruders hätte ich mein Studium und meine Dissertation nicht in dieser Form absolvieren können. Ein ganz besonderer Dank gilt Maximilian Seier und Daniel Kütting für die jahrelange Freundschaft und die Unterstützung beim Verfassen der Promotion.

Abschließend möchte ich dem BONFOR-Forschungsförderungsprogramm für die großzügige Förderung und der wissenschaftlichen Ausbildung im SciMed-Programm danken.