

**Tumorstroma-Immuntherapie und spontane
Immunsuppression
im Grm1-transgenen Melanom-Modell**



Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Miriam Alb

aus Mutlangen

Würzburg 2012

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. J.C. Becker

Gutachter: Prof. Dr. M. Scharl

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

1	Einleitung	1
1.1	Das Melanom.....	1
1.2	Induktion von Immunantworten im Tumorgewebe.....	2
1.3	<i>Immune escape</i> Mechanismen im Tumorgewebe.....	5
1.3.1	Verminderte Expression von Tumorantigenen	5
1.3.2	Modulation der Immunantwort durch IL-10 und TGF- β 1	5
1.3.3	Regulatorische T-Lymphozyten	7
1.4	Das Tumorstroma und sein Einfluss auf die Tumorprogression	9
1.4.1	Endoglin (ENG; CD105).....	10
1.4.2	Fibroblast activation protein alpha (FAP; Seprase)	11
1.5	Das Grm1-transgene Melanom-Modell (TG-3).....	13
1.6	Fragestellungen.....	14
1.6.1	Immuntherapie mit vom Tumorstroma abgeleiteten Peptiden	14
1.6.2	Immunsuppressive Mechanismen im Grm1-transgenen Melanom-Modell.....	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Versuchstiere und Material.....	17
2.1.1	Versuchstiere	17
2.1.2	Gebrauchsfertige Kits.....	17
2.1.3	Chemikalien, Reagenzien und Fertiglösungen	18
2.1.4	Puffer, Lösungen und Medien	19
2.1.5	Antikörper	20
2.1.6	Primer	21
2.2	Methoden	22
2.2.1	Zellkultur	22
2.2.1.1	Zellzahlbestimmung	22
2.2.1.2	Zellkulturführung	22
2.2.2	Tierexperimente, DC-Vakzinierung und Zellisolationstechniken.....	22
2.2.2.1	Tumortransplantation bei C57Bl6/j Mäusen	22
2.2.2.2	Einteilung der Tumorgruppen für das LLA-TG-3 Modell.....	23
2.2.2.3	Isolierung von Dendritischen Zellen (DC) aus dem Knochenmark.....	23
2.2.2.4	DC-Vakzinierungsprotokoll	24
2.2.2.5	Isolierung von Lymphozyten aus Milz, Lymphknoten und Herzblut	25
2.2.2.6	Entnahme und Fixierung des Tumorgewebes	26
2.2.3	Durchflusszytometrie	27
2.2.4	Proliferationsassay (^3H -Thymidin-Inkorporationsassay)	27
2.2.5	Funktionelle Assays	28
2.2.5.1	Zytotoxizitäts-Assay ($^{51}\text{Chromium}$ Release Assay)	28
2.2.5.2	CFSE Zytotoxizitäts-Assay	29

2.2.5.3	ELISPOT Assay (<i>enzyme-linked immunosorbent spot assay</i>).....	29
2.2.6	Immunhistologie.....	30
2.2.7	Molekularbiologische Methoden.....	31
2.2.7.1	RNA-Isolation	31
2.2.7.2	cDNA-Synthese.....	31
2.2.7.3	<i>Real time</i> PCR für <i>Il-10</i> und <i>Tgf-β1</i>	32
2.2.8	Statistische Analysen.....	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Immuntherapie mit vom Tumorstroma abgeleiteten Peptiden	34
3.1.1	Prophylaktische Vakzinierung mit H2-K ^b -restringierten Endoglin-Peptiden....	34
3.1.1.1	Tumorwachstum nach prophylaktischer Endoglin-Peptid-Vakzinierung	34
3.1.1.2	Endoglin-Peptid-Vakzinierung induziert Peptid-reaktive T-Zellen <i>in vivo</i>	35
3.1.2	Prophylaktische Vakzinierung mit H2-K ^b -restringierten Fap-Peptiden.....	37
3.1.2.1	Tumorwachstum nach prophylaktischer Fap-Peptid-Vakzinierung.....	37
3.1.2.2	Fap-Peptid-Vakzinierung induziert Peptid-reaktive T-Zellen <i>in vivo</i>	38
3.2	Immunsuppressive Mechanismen im Grm1-transgenen Melanom-Modell	40
3.2.1	Zunahme aktivierter T-Zellen in tumortragenden LLA-TG-3 Mäusen <i>ex vivo</i> . 41	
3.2.2	Verminderte Proliferationskapazität nach Mitogenstimulation mit zunehmender Tumorlast in LLA-TG-3 Mäusen	44
3.2.3	Verminderte Expression von Aktivierungsmarkern nach Mitogenstimulation mit zunehmender Tumorlast in LLA-TG-3 Mäusen.....	45
3.2.4	Zunahme regulatorischer T-Zellen (CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺) in tumortragenden LLA-TG-3 Mäusen <i>ex vivo</i>	48
3.2.5	Erhöhte <i>Il-10</i> und <i>Tgf-β1</i> mRNA-Expression in LLA-TG-3 Mäusen mit hoher Tumorlast.....	49
4	Diskussion	51
4.1	Immuntherapie mit vom Tumorstroma abgeleiteten Peptiden	51
4.2	Immunsuppressive Mechanismen im Grm1-transgenen Melanom-Modell	56
4.3	Ausblick.....	61
4.3.1	Immuntherapie mit vom Tumorstroma abgeleiteten Peptiden.....	61
4.3.2	Immunsuppressive Mechanismen im Grm1-transgenen Melanom-Modell.....	62
5	Zusammenfassung.....	63
5.1	Immuntherapie mit vom Tumorstroma abgeleiteten Peptiden	63
5.2	Immunsuppressive Mechanismen im Grm1-transgenen Melanom-Modell	64
6	Summary.....	65
6.1	Immunotherapy with peptides derived from tumor stroma-associated antigens.....	65
6.2	Immunsuppressive mechanisms of Grm1-transgenic murine melanoma.....	66
7	Literaturverzeichnis.....	67

8	Abbildungsverzeichnis	80
9	Tabellenverzeichnis	81
10	Abkürzungen	82
11	Publikationen	86
12	Danksagung.....	87
13	Lebenslauf	89
14	Eidesstattliche Erklärung	90

1 Einleitung

Anmerkung zur Nomenklatur von Genen und Proteinen

Nach den offiziellen HUGO *Gene Nomenclature Committee* (HGNC; <http://www.genenames.org/>) Richtlinien werden die Abkürzungen für humane Gene kursiv und mit Großbuchstaben geschrieben (z.B. *MAGE*), Proteine entsprechend nicht kursiv (z.B. MAGE). Murine Gene werden analog nach den *International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice* (<http://www.informatics.jax.org/>) Richtlinien kursiv geschrieben, wobei hier nur der erste Buchstabe groß geschrieben wird (z.B. *Grm1*), Proteine entsprechend nicht kursiv (z.B. Grm1). Die Nomenklatur für murine Gene und Proteine wurde im Text, sofern es sich eindeutig um murine Gene oder Proteine handelt, angewandt, an allen anderen Stellen wurde die Nomenklatur für humane Gene und Proteine angewandt.

1.1 Das Melanom

Das Melanom ist ein maligner Tumor mit hohem Metastasierungspotential, welcher von den Melanozyten in der basalen Schicht der Epidermis ausgeht. Diese kutanen Melanome machen über 90 % aller Fälle aus, weitere Primärlokalisationen des Melanoms sind Uvea sowie Schleimhäute verschiedener Lokalisation und die Hirnhäute. Kutane Melanome entwickeln sich insbesondere an Stellen, die häufig ultravioletter (UV) Strahlung ausgesetzt sind [1]. In den letzten Jahrzehnten hat die Zahl der Neuerkrankungen und der Todesfälle weltweit stark zugenommen. In Deutschland erkranken jährlich ca. 26000 Menschen neu und ca. 3000 Menschen sterben jährlich am Melanom (Deutsche Krebshilfe; <http://www.krebshilfe.de/startseite-dkh.html>).

Etwa 50 % der Melanome sind mit bereits bestehenden Nävi assoziiert [2]. Für die Entstehung und Progression des Melanoms aus einem bestehenden Nävus wurden, basierend auf klinischen und histopathologischen Merkmalen, fünf Zwischenschritte postuliert: (1) Nävus mit normalen Melanozyten, (2) dysplastischer Nävus mit zytologischen Atypien, (3) radiale Wachstumsphase des primären Melanoms, (4) vertikale Wachstumsphase des primären Melanoms mit Metastasierungspotential und (5) Metastase (zusammengefasst aus [3]).

Etwa 90 % aller Melanome werden im Stadium des Primärtumors diagnostiziert. Die Zehn-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit liegt hier noch bei 75-85 %. Für Patienten mit Mikrometastasen liegt diese bei 30-70 %, bei Patienten mit Satelliten- und In-Transit-Metastasen liegt sie bei 30-50 % und bei Patienten mit regionären Lymphknoten-Metastasen nur noch bei 20-40 %. Liegen Fernmetastasen (Stadium IV) vor, so reduziert sich die mediane Überlebenszeit auf nur noch 6-9 Monate (zusammengefasst aus [4]).

1.2 Induktion von Immunantworten im Tumorgewebe

Das angeborene und adaptive Immunsystem ist nicht nur in der Lage fremde Pathogene, wie Bakterien oder Viren, zu erkennen und zu zerstören, sondern auch körpereigene Zellen, welche durch eine oder mehrere somatische Mutationen maligne entartet sind. In der Tat überwacht das Immunsystem ständig den Körper, um entartete Zellen zu zerstören oder unter Kontrolle zu halten [5]. Bei der Erkennung von malignen Zellen spielen die sogenannten Tumorantigene (TA) eine wichtige Rolle. Diese lassen sich grob in vier Kategorien unterteilen [6]:

- Einzigartige, durch Mutation entstandene Antigene (*altered self-antigen*), z.B. BRAFV600E [7]
- Keimbahnantigene, welche normalerweise nur von Keimzellen exprimiert werden, z.B. *melanoma antigen-encoding gene* (MAGE) [8]
- Differenzierungsantigene, welche auch in unveränderten Zellen desselben Gewebetyps vorkommen, z.B. *dopachrome tautomerase* (DCT; known as *tyrosinase-related protein 2* (TRP-2)) [9]
- Aberrant exprimierte Antigene, welche in anderen Zell- und Gewebetypen ebenfalls exprimiert werden, z.B. *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) [10]

Da somit die durch den Tumor ausgelösten Immunantworten großteils nicht auf hoch immunogenen Fremdanthigenen (z.B. Virusantigene), sondern auf nur gering immunogenen Selbstantigenen (z.B. Differenzierungsantigene) beruhen, ist für eine Induktion von TA-spezifischen T-Zellantworten eine Aktivierung der T-Zellen sowohl durch den T-Zellrezeptor (TCR) als auch durch kostimulatorische Signale unerlässlich.

Dieses Prinzip der Kostimulation für die Aktivierung von T-Zellen wurde bereits 1970 von Bretscher und Cohn postuliert [11]. So benötigen naive T-Zellen für die Aktivierung ihrer Effektorfunktionen zwei Signale: Das erste Signal wird durch die Erkennung von Peptid/MHC Komplexen (Erkennung eines an *major histocompatibility complex* (MHC) Moleküle gebundenen Peptids auf der Zellmembran der Zielzelle) durch den T-Zellrezeptor vermittelt, das zweite Signal wird durch die Bindung von CD28 auf der T-Zelle durch die kostimulatorischen B7-Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), welche in der Regel nur von professionell Antigen-präsentierenden Zellen (APC) exprimiert werden, vermittelt [12].

So werden exogene Proteine durch Phagozytose von professionell Antigen-präsentierenden Zellen (B-Zellen, Makrophagen, Monozyten, Dendritische Zellen [DC]) aufgenommen und anschließend durch lysosomale Enzyme im Endosom verdaut. Diese exogenen Peptide, die sowohl von abgestorbenen körpereigenen Zellen wie auch von internalisierten Bakterien oder Viren stammen können, werden dann gebunden an MHC Klasse II Moleküle auf der Oberfläche der APC CD4⁺ T-Zellen präsentiert (zusammengefasst aus [13]). Diese können sich dann zu T-Helferzellen differenzieren und abhängig von der Ausschüttung verschiedener Zytokine anschließend die zelluläre Immunantwort, vermittelt durch CD8⁺ T-Zellen, oder die humorale Immunantwort, vermittelt durch B-Zellen, unterstützen [14].

CD8⁺ T-Zellen hingegen erkennen endogen produzierte Peptide, welche über MHC Klasse I Moleküle auf der Oberfläche aller Zellen präsentiert werden. Hierbei werden endogen in der Zelle produzierte Proteine (Selbstantigene) nach Ubiquitin-abhängigem Verdau im Proteasom im endoplasmatischen Retikulum (ER) mit Hilfe des *transporter associated with antigen processing* (TAP) auf MHC Klasse I Moleküle geladen und den CD8⁺ T-Zellen präsentiert. Dadurch können z.B. auch virus-infizierte Zellen erkannt werden, da sie ausgelöst durch die Virusinfektion auch virale Antigene (Fremdantigene) produzieren und über MHC Klasse I Moleküle den CD8⁺ T-Zellen präsentieren. Dendritische Zellen können allerdings über den Prozess des *cross-primings* auch von anderen Zellen produzierte Antigene über MHC Klasse I Moleküle auf ihrer Oberfläche für CD8⁺ T-Zellen präsentieren, also auch von Tumorzellen exprimierte Tumorantigene. Dabei werden nach Internalisierung und Verdau der Tumorzellen im Endosom die Proteine der Tumorzelle ins Zytosol der DC transloziert und anschließend durch das Proteasom verdaut, um eine Präsentation durch MHC Klasse I Moleküle zu ermöglichen (zusammengefasst aus [13]).

Tatsächlich findet man beispielsweise bei Melanompatienten sowohl im Blut als auch im Tumorgewebe Tumorantigen-spezifische zytotoxische CD8⁺ T-Zellen (CTL) [15]. Bei verschiedenen Tumorentitäten konnte zudem eine positive Korrelation zwischen dem Vorkommen von tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) und der Überlebensrate von Patienten festgestellt werden (siehe Tab. 1) [16-19].

Tabelle 1: Tumorantigen-spezifische Lymphozyten / Lymphozyteninfiltrate bei ausgewählten Tumorentitäten

Tumorentität	TA-spezifische T-Zellen	TIL	Korrelation mit Überleben	Referenz
Melanom	Ja (Blut, Tumor)	Ja	Ja (positiv)	[15, 19]
Mammakarzinom	Ja (Blut, Tumor)	Ja	Nicht bestimmt	[15]
Chronisch lymphatische Leukämie	Ja (Blut)	-	-	[15]
Kolonkarzinom	Nicht bestimmt	Ja	Ja (positiv)	[16]
Ösophaguskarzinom	Nicht bestimmt	Ja	Ja (positiv)	[17]
Ovarialkarzinom	Nicht bestimmt	Ja	Ja (positiv)	[18]

Allerdings erliegen die meisten Patienten letztendlich ihrem Krebsleiden, obwohl Tumorantigen-spezifische CTL im Blut oder Tumor nachgewiesen werden können, da das Immunsystem selbstständig nicht in der Lage ist das Tumorwachstum zu stoppen oder den Tumor zu zerstören. Das gleichzeitige Vorkommen einer tumorspezifischen Immunantwort zusammen mit ungehindertem Tumorwachstum legt nahe, dass der Tumor in der Lage ist das Immunsystem in Schach zu halten bzw. eine Barriere zu schaffen, um CTL und andere Immunzellen wie z.B. natürliche Killerzellen (NK-Zellen) an der Zerstörung der Tumorzellen zu hindern („*immune escape*“; „*immunoediting*“) [20-22].

1.3 Immune escape Mechanismen im Tumorgewebe

1.3.1 Verminderte Expression von Tumorantigenen

Tumorzellen sind in der Lage, die Expression der für die Prozessierung und Präsentation von Antigenen wichtigen Proteine wie TAP oder MHC Klasse I Moleküle herunter zu regulieren oder zu unterdrücken [23-26]. Ebenso können sie die Expression einiger der in 1.2 beschriebenen Tumorantigene unterdrücken, da sie z.B. nicht auf die Expression von Differenzierungsantigenen angewiesen sind („*antigen loss variants*“) [27]. Auf diese Weise können sie für das adaptive Immunsystem, d.h. für Tumorantigen-spezifische T-Zellen, unsichtbar bleiben.

1.3.2 Modulation der Immunantwort durch IL-10 und TGF- β 1

Immunantworten gegen Tumore können auch durch hemmende Zytokine, die sowohl von Tumor- als auch Tumorstromazellen sezerniert werden, unterdrückt werden [28-33]. Die bekanntesten Zytokine stellen dabei das Interleukin 10 (IL-10) sowie der *transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1) dar.

Tatsächlich wurden bei vielen Krebspatienten erhöhte IL-10 und/oder TGF- β 1 Werte im Plasma gefunden (siehe Tab. 2) [34-40].

Tabelle 2: IL-10 / TGF- β 1 Expression und Plasmawerte bei ausgewählten Tumorentitäten

Tumorentität	IL-10 und / oder TGF-β1 Expression	IL-10 und / oder TGF-β1 im Plasma erhöht	Referenz
Melanom	IL-10 und TGF- β 1	IL-10 und TGF- β 1	[28, 29, 34, 35]
Mammakarzinom	TGF- β 1	TGF- β 1	[30, 38]
Nierenzellkarzinom	IL-10	IL-10	[36]
Leberkarzinom	Nicht bestimmt	IL-10	[37]
Magenkarzinom	Nicht bestimmt	TGF- β 1	[39]
HNSCC	Nicht bestimmt	IL-10	[40]

HNSCC: *head and neck squamous cell carcinoma*

IL-10 ist ein Typ II Zytokin (*long chain 4-a helical cytokine*), das unter anderem von T-Helfer Typ 2 (Th2) Zellen sezerniert wird und bei naiven $CD4^+$ T-Zellen die Differenzierung zu T-Helfer Typ 1 (Th1) Zellen unterdrückt [41]. Auf diese Weise wird die adaptive Immunantwort moduliert, denn Th1-Zellen fördern die durch zytotoxische T-Zellen vermittelte zelluläre Immunantwort, während Th2-Zellen die humorale Immunantwort, vermittelt durch B-Zellen, fördern [14]. Außerdem wirkt IL-10 indirekt inhibierend auf die T-Zellproliferation, indem es bei Antigen-präsentierenden Zellen (APC) die Expression von MHC Klasse II (MHC II) sowie von B7.1 und B7.2 Molekülen hemmt (siehe Abb. 1) [42, 43]. Zudem inhibiert es die Differenzierung von Dendritischen Zellen (DC) aus monozytären Vorläuferzellen, sowie die DC-Reifung [44]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass DC, welche mit IL-10 kultiviert wurden, gezielt Melanomantigen-spezifische zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen hemmen können [45]. Ebenso führt eine Vorbehandlung von Melanomzellen mit IL-10 zu einer verminderten Lyse durch Tumorantigen-spezifische CTL [46]. IL-10 kann T-Zellen auch direkt hemmen, indem es den CD28-Signalweg negativ beeinflusst [47].

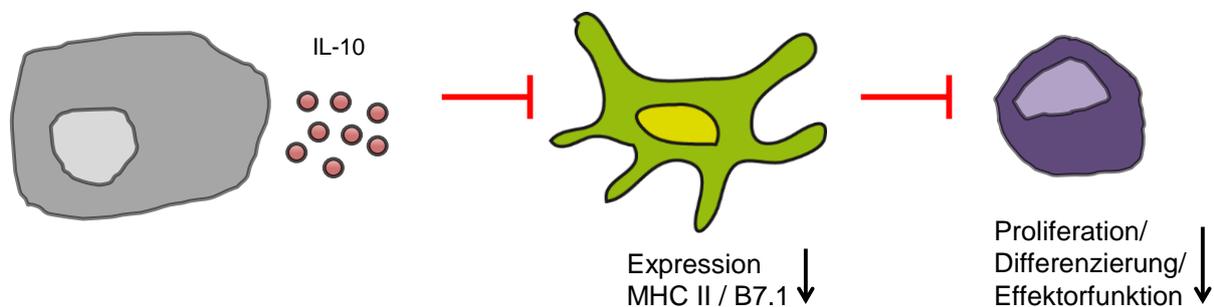


Abb. 1: Modulation der Immunantwort durch IL-10 im Tumorgewebe.

Vom Tumor (grau) sezerniertes IL-10 wirkt indirekt hemmend auf die Proliferation und Effektorfunktion von $CD8^+$ T-Zellen (violett), indem es z.B. die Expression kostimulatorischer Moleküle der B7-Familie bei Antigen-präsentierenden Zellen (grün) hemmt.

TGF- β 1 ist Mitglied der großen TGF- β Zytokinfamilie und hat in verschiedenen Zell- und Gewebetypen Einfluss auf Proliferation, Differenzierung, Migration und Überleben von Zellen [48]. Außerdem spielt es bei der T-Zellentwicklung eine wichtige Rolle: Im Thymus ist es an der Differenzierung von $CD4^+CD8^+$ Thymozyten zu $CD8^+$ T-Zellen, NKT-Zellen (natürliche Killer T-Zellen) und regulatorischen T-Zellen beteiligt [49]. In der Peripherie kann es die Differenzierung von naiven $CD4^+$ T-Zellen zu Th1 und Th2 Zellen verhindern [50, 51]. Darüber hinaus kann TGF- β 1 die Expression von Genen wie *Granzym A/B* und *Perforin* in $CD8^+$ T-Zellen negativ beeinflussen [52]. Diese können sich dann nicht zu CTL differenzieren und sind somit nicht in der Lage ihre Zielzellen zu lysieren (siehe Abb. 2).

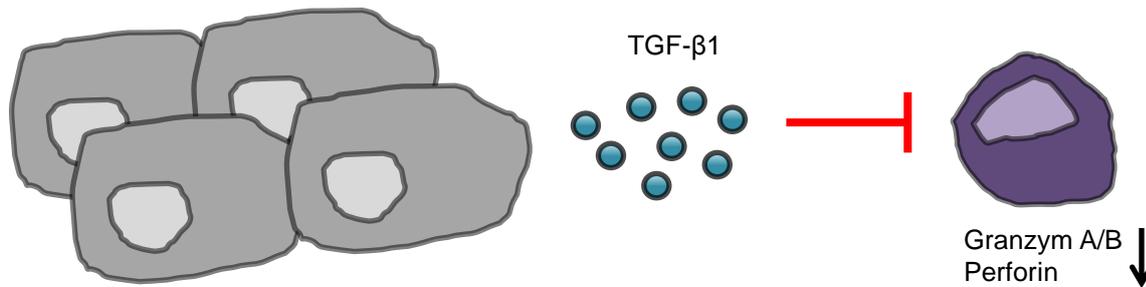


Abb. 2: Modulation der Immunantwort durch TGF-β1 im Tumorgewebe.

Bei CD8⁺ T-Zellen (violett) kommt es durch vom Tumor (grau) sezerniertes TGF-β1 zur Beeinträchtigung der Effektorfunktion, indem z.B. die Expression der lytischen Proteine Granzym A/B und Perforin gehemmt wird.

1.3.3 Regulatorische T-Lymphozyten

IL-10 und TGF-β1 können bei naiven CD4⁺ T-Zellen die Induktion des regulatorischen Phänotyps bewirken (sogenannte induzierte regulatorische T-Zellen (iT_{regs}); siehe Abb. 3) [53-55]. Diese induzierten regulatorischen T-Zellen können im Tumorgewebe eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort gezielt hemmen, indem sie die Proliferation und die Effektorfunktionen von TA-spezifischen CTL durch direkten Zell-Zell-Kontakt oder Ausschüttung immunsupprimierender Zytokine negativ beeinflussen [56-58].

Aber auch die vom Thymus abstammenden sogenannten „natürlichen“ regulatorischen T-Zellen (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺; T_{regs}), die eine Zerstörung von körpereigenem Gewebe durch auto-reaktive T-Zellen verhindern, können auf diese Weise eine effektive gegen den Tumor gerichtete Immunantwort unterdrücken (siehe Abb. 3) [59].

Tatsächlich findet man bei vielen Krebspatienten eine erhöhte Zahl von T_{regs} sowohl im Blut als auch im Tumorgewebe und den tumor-drainierenden Lymphknoten (tdLN; siehe Tab. 3) [60-66].

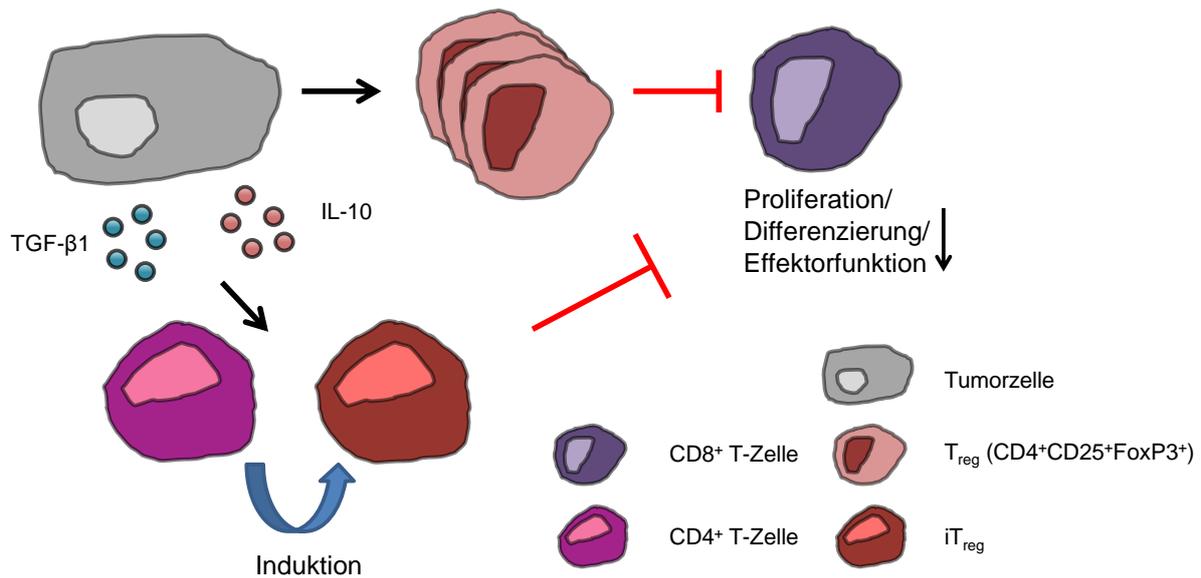


Abb. 3: Rekrutierung regulatorischer T-Zellen durch den Tumor.

Tumorzellen sezernieren häufig IL-10 und/oder TGF-β1, was bei CD4⁺ T-Zellen die „Umprogrammierung“ zu regulatorischen T-Zellen (iT_{reg}) bewirken kann. Zudem ist bei vielen Tumorentitäten die Frequenz an „natürlichen“ regulatorischen T-Zellen (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺; T_{regs}) stark erhöht. Regulatorische T-Zellen hemmen auto-reaktive T-Zellen, welche Selbstantigene erkennen. Da viele Tumore Selbstantigene wie z.B. TRP-2 exprimieren, wird eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort auf diese Weise gehemmt.

Tabelle 3: Frequenz und Lokalisation regulatorischer T-Zellen bei ausgewählten Tumorentitäten

Tumorentität	Frequenz T _{regs}	Lokalisation	Referenz
Melanom	Erhöht	Blut, Tumor, LN	[62-64]
Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom	Erhöht	Tumor	[60]
Ovarialkarzinom	Erhöht	Tumor	[60]
Pankreaskarzinom	Erhöht	Blut, Tumor, LN	[61]
Mammakarzinom	Erhöht	Blut, Tumor, LN	[61]
AML	Erhöht	Blut	[65]

AML: akute myeloische Leukämie

1.4 Das Tumorstroma und sein Einfluss auf die Tumorprogression

Häufig werden Tumore nur auf die Tumorzellen reduziert. Dabei setzen sich Tumore nicht nur aus Tumorzellen, sondern auch aus der sie umgebenden extrazellulären Matrix (EZM) sowie den Stromazellen wie z.B. Fibroblasten (*cancer-associated fibroblast*; CAF) und Endothelzellen (*tumor endothelial cell*; TEC) zusammen [67]. Da vom Tumorstroma Wachstumsfaktoren (z.B. *basic fibroblast growth factor*; bFGF), Angiogenesefaktoren (z.B. *vascular endothelial growth factor*; VEGF), Zytokine (z.B. *transforming growth factor beta*; TGF- β) und proteolytische Enzyme (z.B. Matrixmetalloproteinasen; MMPs) produziert werden, hat dieses einen entscheidenden Einfluss auf das Wachstum und die Progression eines Tumors (siehe Abb. 4; zusammengefasst aus [67]).

Da die Zellen des Tumorstromas sich von denen der normalen Gewebe durch Expression von sogenannten Tumorstroma-assoziierten Antigenen (TSAA) unterscheiden, bieten sie sich als Zielstrukturen immunologischer Therapien an. In der Tat finden sich solche spezifisch im Tumorstroma induzierten oder hochregulierten Antigene in zahlreichen soliden Tumoren (siehe Tab. 4) [68].

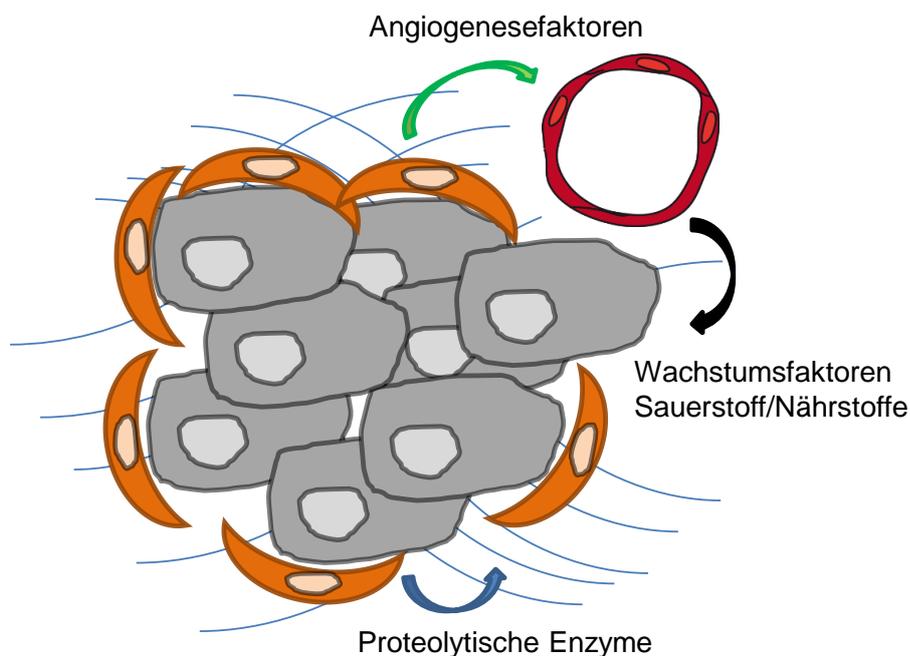


Abb. 4: Einfluss des Tumorstromas auf das Tumorwachstum.

Tumorzellen (grau) bilden zusammen mit Stromazellen wie Fibroblasten (orange) und Endothelzellen (rot) und der sie umgebenden extrazellulären Matrix (blau) ein komplexes Gewebe. Die Stromazellen haben durch die Produktion von Wachstums- und Angiogenesefaktoren sowie proteolytischer Enzyme Einfluss auf das Wachstum und das Metastasierungspotential der Tumorzellen. Abbildung modifiziert nach Hofmeister et al.[68].

Tabelle 4: Ausgewählte Tumorstroma-assoziierte Antigene (TSAA)

Antigen	Expression	Funktion
VEGF	Fibroblasten, Makrophagen, Tumorzellen	Angiogenesefaktor
Endoglin	Endothel- und Tumorzellen	TGF- β -Rezeptor (akzessorisch)
MMPs	Fibroblasten, Makrophagen, Endothel- und Tumorzellen	Endopeptidasen
FAP	Fibroblasten, Tumorzellen	Serinprotease
$\alpha\text{v}\beta\text{3}$ Integrin	Endothelzellen	Adhäsionsmolekül

Tabelle modifiziert nach Hofmeister et al. [68]

Auf zwei dieser Tumorstroma-assoziierten Antigene, nämlich Endoglin (ENG; CD105) und *fibroblast activation protein alpha* (FAP; Seprase), soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

1.4.1 Endoglin (ENG; CD105)

Endoglin (ENG; CD105) ist ein membranständiges Glykoprotein, welches geringfügig auf Endothelzellen exprimiert, und während der Wundheilung und der Tumorangiogenese auf aktivierten Endothelzellen stark hochreguliert wird. Funktionell moduliert es den TGF- β Signalweg, indem es mit den beiden TGF- β -Rezeptoren (Typ I und II) auf der Zelloberfläche interagiert [69-71]. Endoglin wird vielfach als sensitiver und spezifischer Marker für die *microvessel density* (MVD) in Tumoren eingesetzt, da es im Gegensatz zu anderen Endothelmarkern wie CD31 oder CD34 hauptsächlich auf neugebildeten Blutgefäßen exprimiert wird (zusammengefasst aus [69, 72]). Klinisch korreliert die Expression von Endoglin bei einigen Tumorentitäten wie z.B. dem Prostata- und dem Mammakarzinom mit der Überlebensrate, der Tumorprogression, der angiolymphatischen Invasion und der Metastasierung [73-78].

Die Expression von Endoglin ist jedoch nicht nur auf Endothelzellen beschränkt, sondern konnte auch für maligne Zellen beschrieben werden. So berichteten z.B. Pardali und Kollegen, dass aggressive Ewing-Sarkom- und Melanomzelllinien und Tumoren Endoglin exprimieren und dies mit der Überlebensrate korreliert [79].

Sowohl die bevorzugte Expression auf Blutgefäßen im Tumorgewebe als auch die Abhängigkeit des Tumors von Angiogenese für dessen Wachstum tragen dazu bei, dass Endoglin ein attraktives Zielmolekül für die Tumorthherapie ist. Folglich wurden bereits mehrere auf Endoglin basierende Tumorthapien präklinisch getestet. So konnte z.B. in einem Brustkrebs-Xenotransplantationsmodell in *severe combined immunodeficiency* (SCID) Mäusen eine langanhaltende Inhibition des Tumorwachstums durch Gabe eines Endoglin-Immuntoxins (Konjugat eines monoklonalen humanen ENG-Antikörpers mit der deglykosylierten Ricin A Kette) erreicht werden [80]. Im B16 Melanom-Modell zeigte eine xenogene Endoglin-Protein-Vakzinierung prophylaktische Effektivität. Hier konnte eine verminderte Metastasierung der Lunge beobachtet werden [81]. Ebenso konnten durch eine prophylaktische orale Endoglin-DNA-Vakzinierung in einem Brustkrebsmodell Lungenmetastasen gehemmt und das Überleben tumortragender Tiere verlängert werden [82].

Zudem wurde kürzlich eine Phase I Studie mit einem chimären (human/murin) Endoglin-Antikörper (TRC105) in Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren durchgeführt, wobei gezeigt werden konnte, dass dieser gut toleriert wird und klinische Aktivität zeigt [83].

1.4.2 *Fibroblast activation protein alpha (FAP; Seprase)*

Fibroblast activation protein alpha (FAP oder *surface expressed protease* [Seprase]) ist eine auf der Zelloberfläche von aktivierten Fibroblasten exprimierte Serinprotease mit Gelatinase-Aktivität [84]. FAP wird während der Wundheilung und im Tumorstroma induziert und kann dort durch seine proteolytische Funktion das invasive Wachstum von Tumorzellen fördern [84-88].

Allerdings beschränkt sich die Expression von FAP nicht nur auf aktivierte Fibroblasten, sondern wurde auch für Tumorzellen beschrieben. So wurde z.B. berichtet, dass eine hohe FAP-Expression auf Stroma- und Tumorzellen des Kolonkarzinoms mit der Häufigkeit einer Lymphknotenmetastasierung korreliert [89, 90]. Eine hohe FAP-Expression auf Stroma- und Tumorzellen beim Pankreaskarzinom korreliert ebenso mit einer schlechten Prognose [91].

Da FAP bei einigen Tumorentitäten wie z.B. auch dem Melanom [92, 93] sowohl auf Stroma- als auch auf Tumorzellen, nicht aber auf Zellen des gesunden Gewebes exprimiert wird, ist FAP ebenso wie Endoglin ein attraktives Zielmolekül für Tumorthérapien. Daher wurden bereits einige auf FAP basierende Therapieansätze sowohl in präklinischen Mausmodellen als auch in Patienten getestet. So konnte durch Gabe eines Dipeptidylpeptidase Inhibitors (PT-100; Val-boro-Pro; Talabostat) das Tumorwachstum verschiedener syngener Tumorzelllinien (u.a. B16 Melanom) in Mäusen verlangsamt und zum Teil auch ganz verhindert werden [94]. Ebenso konnte durch Vakzinierung mit murinen Fap-mRNA-transfizierten Dendritischen Zellen ein reduziertes Tumorwachstum syngener Tumorzelllinien (B16 Melanom, EL4 Lymphom und 4T1 Mammakarzinom) in Mäusen beobachtet werden [95]. Auch durch eine prophylaktische bzw. therapeutische orale Fap-DNA-Vakzinierung konnte in einem murinen Kolon- bzw. Mammakarzinom-Modell das Tumorwachstum sowie die Induktion von Lungenmetastasen gehemmt und das Überleben tumortragender Tiere verlängert werden [96].

Im klinischen Einsatz konnte allerdings mit einer FAP-basierten Therapie bisher kein Therapieerfolg erzielt werden. So konnte für das Kolonkarzinom in einer Phase I Studie [97] zwar die Verträglichkeit des humanisierten monoklonalen murinen FAP-Antikörpers F19 gezeigt werden, doch in einer anschließenden Phase II Studie [98] konnte kein therapeutischer Effekt erzielt werden. Ebenso konnte in einer Phase II Studie in Kolonkarzinompatienten kein Rückgang des Tumorwachstums durch Gabe des FAP-Inhibitors Talabostat erreicht werden [99]. Auch durch eine kombinierte Gabe von Talabostat mit Cisplatin in einer Phase II Studie bei Patienten mit fortgeschrittenem Melanom [100], bzw. durch eine kombinierte Gabe von Talabostat mit Docetaxel in einer Phase II Studie in Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom [101], konnte keine verbesserte Remissionsrate gegenüber einer Cisplatin bzw. Docetaxel Monotherapie erzielt werden.

1.5 Das Grm1-transgene Melanom-Modell (TG-3)

Die transgene Mauslinie TG-3 wurde ursprünglich als Modell zur Untersuchung der Adipositas generiert [102]. Die Insertion eines 2 kb großen DNA-Fragments (*clone B*) in diese transgene Mauslinie führte jedoch zur spontanen Bildung von kutanen Melanomen an Ohren, Schnauze, Augen und perianalem Bereich dieser Tiere im Alter von zwei bis vier Monaten [103]. In weiteren Experimenten stellte sich heraus, dass die zufällige Integration des Transgens in Intron 3 des metabotropen Glutamatrezeptor 1 (*Grm1*) Gens die Deletion eines ca. 70 kb großen DNA-Stücks bewirkt, was zur ektope Expression des Rezeptors führt [104].

Als *proof-of-concept* wurde eine weitere transgene Mauslinie etabliert (E-Linie), bei der die Expression des murinen *Grm1* unter der Kontrolle des Melanozyten-spezifischen Promotors *dopachrome tautomerase* (*Dct*) steht. Bei diesen Tieren kann man entsprechend eine ektope Expression von *Grm1* in Melanozyten nachweisen [104]. Phänotypisch verhalten sie sich ganz ähnlich wie das ursprüngliche TG-3-Modell mit der Entstehung von Melanomen an Ohren, Schwanz, Augen und perianalem Bereich im Alter von vier bis fünf Monaten.

Beide transgenen Linien basieren auf C57Bl/6j Mäusen. Dies hat den Nachteil, dass die sich entwickelnden Tumore dieser Tiere stark pigmentiert sind und somit deren histologische Untersuchung erschwert wird. Aus diesem Grund wurde die ursprüngliche TG-3-Linie mit Balb/c Mäusen (Albinotiere) gekreuzt. Aus dieser Kreuzung resultierte die LLA-TG-3-Linie. Nach der initialen Kreuzung wurden für die Verpaarung der F2-Generation Albinotiere verwendet, welche das Transgen tragen. Danach wurden die Tiere durch Geschwisterverpaarung weiter gezüchtet. Der genetische Hintergrund dürfte in diesen Tieren damit größtenteils auf den Balb/c Mäusen basieren [105]. Bei den LLA-TG3 Mäusen kommt es durch die ektope *Grm1*-Expression zur spontanen Bildung amelanotischer kutaner Melanome an Ohren, Augen und perianalem Bereich im Alter von 10 bis 12 Wochen.

1.6 Fragestellungen

1.6.1 Immuntherapie mit vom Tumorstroma abgeleiteten Peptiden

Tumorzellen exprimieren häufig sogenannte Tumorantigene (TA), welche von zytotoxischen T-Zellen (CTL) erkannt werden können. Allerdings entgehen sie häufig der Kontrolle durch das Immunsystem („*immune escape*“), indem sie beispielsweise die Expression dieser Tumorantigene herunterregulieren oder unterdrücken, da sie z.B. nicht auf die Expression von Differenzierungsantigenen angewiesen sind [5, 27]. Dies könnte erklären, warum Immuntherapien basierend auf Tumorantigenen bisher in der Klinik nur selten erfolgreich waren [20, 106].

Tumoren setzen sich allerdings nicht nur aus den Tumorzellen, sondern auch aus Stromazellen wie Fibroblasten (*cancer-associated fibroblast*; CAF) und Endothelzellen (*tumor endothelial cell*; TEC), sowie der sie umgebenden extrazellulären Matrix (EZM) zusammen. Daher bieten sich Tumorstromazellen als Zielstrukturen immunologischer Therapien an, da sie sich von den Stromazellen im normalen Gewebe durch die Expression von sogenannten Tumorstroma-assoziierten Antigenen (TSAA) unterscheiden [68]. Damit sollten Therapien, die auf TSAA abzielen, universell bei verschiedensten Tumorentitäten einsetzbar sein. Zudem ist zu erwarten, dass Anti-Tumorstroma-Therapien weniger anfällig gegenüber Resistenzentwicklungen sind, da Stromazellen im Gegensatz zu neoplastischen Zellen genetisch relativ stabil sind.

Daher verfolgten wir in der hier vorgelegten Arbeit den Ansatz einer Vakzinierung mit Peptiden, die von TSAA abstammen, um eine gegen das Tumorstroma gerichtete Immunantwort zu generieren, und somit eine effiziente Immuntherapie im Grm1-transgenen Melanom-Modell zu etablieren. Als Zielmoleküle wurden Fap und Endoglin ausgewählt, die auf Fibroblasten bzw. Endothelzellen im Tumormikromilieu induziert bzw. hochreguliert werden. Dabei war die Endoglin bzw. Fap mRNA-Expression in Organen bzw. Grm1-transgenen Tumoren von C57Bl/6j bzw. Grm1-transgenen Mäusen bereits von Herrn Thomas Benkert untersucht worden. Hierbei konnte eine Expression von Endoglin im Tumorgewebe und auch in gut durchbluteten Geweben wie Herz und Lunge beobachtet werden, während die Expression von Fap hauptsächlich im Tumorgewebe und in fibroblastenreichen Geweben wie der Haut festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Im B16 Melanom-Modell wurden bereits auf Endoglin bzw. Fap basierende Immuntherapien getestet [81, 95]. Jedoch spiegelt dieses Modell die Entstehung und die Progression eines heterogenen Tumorgewebes im Menschen nur unzureichend wider, da hier Tumore durch Injektion klonal expandierter Tumorzellen induziert werden.

Da der direkte Vergleich der Tumorlast im spontanen Grm1-transgenen Melanom-Modell allerdings durch die heterogene Tumorentwicklung erschwert ist, etablierten wir ein Modell, bei dem durch mehrmalige Replantation von Tumorstücken aus den Grm1-transgenen Mäusen in C57Bl/6j Mäuse standardisierte Tumorgrößen und Tumorlasten erreicht werden können. Die Transplantation von Tumorstücken sollte hierbei die Situation im Menschen besser widerspiegeln als ein herkömmliches Tumortransplantationsmodell, da hier im Gegensatz zur Transplantation klonal expandierter Tumorzellen ein voll ausgebildetes heterogenes Tumorgewebe transplantiert wird. Anhand dieses Tumormodells wollten wir die Auswirkungen prophylaktischer Vakzinierungen mit Endoglin- bzw. Fap-Peptiden untersuchen. Dabei sollte das Tumorwachstum sowie die funktionelle Aktivität Peptid-reaktiver T-Zellen adressiert werden.

1.6.2 Immunsuppressive Mechanismen im Grm1-transgenen Melanom-Modell

Als logische Konsequenz der Immunogenität von Tumoren wurden in den letzten Jahren immunmodulierende Therapien getestet, die das Immunsystem des Krebspatienten aktivieren und so zu der Zerstörung des Tumors beitragen sollen [107].

Bevor solche immunmodulierenden Therapieansätze bei Patienten eingesetzt werden können, werden diese präklinisch meist in Mausmodellen getestet. Bei Tumortransplantationsmodellen kann unter einer solchen experimentellen Therapie häufig ein Rückgang des Tumorwachstums bis hin zur vollständigen Tumorregression beobachtet werden [108, 109]. Ein solcher Therapieerfolg tritt aber in der klinischen Situation am Patienten nur selten ein [110-112]. Ein positives Beispiel einer wirksamen immunmodulierenden Therapie für das Melanom ist jedoch Ipilimumab, ein monoklonaler humaner anti-CTLA-4 Antikörper, der auch in größeren Studien eine klinische Verbesserung der Patienten sowie ein verlängertes Überleben erbrachte [113, 114]. Dies führte dazu, dass die Substanz Ipilimumab im März 2011 von der *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) und im Juli 2011 von der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) für Melanompatienten im fortgeschrittenen Stadium als *second line* Therapie zugelassen wurde.

Eine mögliche Erklärung für den geringen klinischen Therapieerfolg von zuvor erfolgreich in Mausmodellen getesteten Immuntherapien ist, dass die am häufigsten verwendeten Tumortransplantationsmodelle, z.B. das B16 Melanom-Modell, nicht die Tumorentstehung im Menschen widerspiegeln, da es sich hier um Tumore handelt, welche in der Regel durch Injektion klonal expandierter Tumorzellen induziert werden. Bei Krebspatienten hingegen entwickeln sich die Tumore häufig über einen längeren Zeitraum hinweg, wobei vielfältige Tumor-Wirt-Interaktionen das Tumorstadium sowohl negativ als auch positiv beeinflussen können (sog. „*immunoediting*“) [22]. Hier sei besonders die Bildung eines immunsupprimierenden Milieus im Tumor genannt.

Nachdem bisherige Transplantationsmodelle die Situation im Menschen scheinbar nur unzureichend widerspiegeln können, stellt sich die Frage, ob spontane Tumormodelle, bei denen Tumore ebenfalls schrittweise über mehrere prä-maligne Vorstufen entstehen, nicht besser geeignet wären, um immunmodulierende Therapieansätze präklinisch zu untersuchen.

Für die Untersuchung von spontanen Immunantworten bietet das Grm1-transgene LLA-TG-3 Modell also im Gegensatz zu standardisierten Transplantationsmodellen den Vorteil, dass hier die Tumorentwicklung ähnlich zur Melanomentstehung im Menschen über einen längeren Zeitraum hinweg stattfindet. Im Vergleich zu Transplantationsmodellen ist das Tumormonitoring in derartigen Modellen einer spontanen Tumorentwicklung wie bereits in 1.6.1 beschrieben schwerer zu handhaben. Da jedoch der zeitliche Verlauf der spontanen Entwicklung von amelanotischen kutanen Melanomen bei homozygot Grm1-transgenen Mäusen relativ ähnlich ist, kann man diese nach Alter und Gesamttumorlast in verschiedene Gruppen einteilen und so den Immunstatus dieser Tiere im Laufe der Tumorprogression untersuchen.

Dabei analysierten wir den Aktivierungsstatus und die funktionelle Aktivität von T-Lymphozyten, um herauszufinden, ob und welche Gemeinsamkeiten es mit dem Immunstatus in Melanompatienten gibt. Dies sollte entsprechend auch Aufschluss darüber geben, ob dieses Modell für präklinische Studien geeignet ist.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Material

2.1.1 Versuchstiere

Für die Tierexperimente wurden C57Bl/6j und LLA-TG-3 Mäuse verwendet. Die C57Bl/6j Mäuse stammen von der Firma Harlan Laboratories (Eystrup, Deutschland) und werden im Folgenden als Wildtypiere (wt) bezeichnet. Diese Tiere wurden mindestens zwei Wochen vor Versuchsbeginn an die hauseigene Tierhaltung akklimatisiert. Die LLA-TG-3 Mäuse wurden in der hauseigenen Tierhaltung per Geschwisterverpaarung gezüchtet. Alle Tiere wurden unter speziellen pathogenfreien (SPF) Bedingungen gehalten. Alle Experimente wurden den gültigen Anforderungen für Tierversuche gerecht.

2.1.2 Gebrauchsfertige Kits

BD™ CompBeads anti-Hamster/Rat Ig, κ/ <i>negative control (FBS) Compensation Particles Set</i>	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Cell Trace™ CFSE Proliferation Kit	Invitrogen Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
<i>LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain Kit,</i> Near IR-fluorescent reactive dye	Invitrogen Life Technologies
peqGOLD Total RNA Kit (Safety-Line)	Peqlab, Erlangen, Deutschland
<i>Regulatory T cell staining Kit</i>	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
Vector® NovaRED™ Substrate Kit for Peroxidase	Vector Laboratories, Wertheim, Deutschland

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Fertiglösungen

Alle Standardchemikalien wurden von den unten genannten Herstellern in Analysequalität bezogen.

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
2-Methyl-2-Butanol	Sigma-Aldrich
2,2,2-Tribromoethanol	Sigma-Aldrich
2 x PCR Mastermix for Probe Assays low ROX	Eurogentec, Köln, Deutschland
ABSolute QPCR SYBR low ROX (2 x)	Thermo Scientific GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Aceton	Sigma-Aldrich
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Concanavalin A <i>from Canavalia ensiformis</i> (Jack bean)	Sigma-Aldrich
CpG ODN 1826	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Histofine [®] Simple Stain Mouse MAX PO (Rat)	Nichirei Biosciences Inc., Tokio, Japan
Humanes Interleukin-2 (hIL-2; Proleukin)	Chiron GmbH, München, Deutschland
Lipopolysaccharide (LPS) <i>from Salmonella typhimurium</i>	Sigma-Aldrich
Liquemin [®] (Heparin)	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
Lympholyte M	Cedarlane Laboratories, Ontario, Kanada
Lympholyte Mammal	Cedarlane Laboratories
Mayer's Hematoxylin (Lillie's Modification)	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ ⁵¹ CrO ₄ (5 mCi / ml; 185 MBq / ml)	PerkinElmer, Rodgau, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (10000 U / ml; 10 mg / ml)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland

<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i> (PMA)	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
REAL™ Peroxidase-Blocking Solution	DAKO Deutschland GmbH
Shandon EZ-Mount, Xylene Base	Thermo Scientific GmbH
SuperScript® II, Reverse Transcriptase	Invitrogen Life Technologies
[6- ³ H]-Thymidin (1 mCi / ml; 37 MBq / ml)	GE Healthcare, München, Deutschland
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton-X 100	Merck KGaA
Trypanblau (0,4 % gelöst in 0,81 % Natriumchlorid / 0,06 % Kaliumphosphat)	Sigma-Aldrich
Tween® 20	Sigma-Aldrich
UltraPure™ DNase/RNase-free distilled water	Invitrogen Life Technologies
Xylene	Sigma-Aldrich

2.1.4 Puffer, Lösungen und Medien

- PBS (*phosphate buffered salt solution*):
Dulbecco's without Calcium and Magnesium (PAN Biotech)
- FACS-Puffer:
50 ml PBS
0,05 g BSA
- Waschpuffer (ELISPOT):
500 ml PBS
250 µl Tween® 20
- Verdünnungspuffer (ELISPOT):
500 ml PBS
5 g BSA
- Substratpuffer (ELISPOT):
2,9 g NaCl [0,1 M]
5,1 g MgCl₂ [50 mM]
6,1 g Tris [0,1 M]; pH 9,5
Ad 500 ml H₂O

- **Komplettmedium (CM):**
 - 500 ml RPMI 1640 + L-Glutamine, + 2 g / l NaHCO₃ (PAN Biotech)
 - 50 ml FCS (Biochrom AG)
 - 5 ml Penicillin [10000 U / ml] / Streptomycin [10 mg / ml] (PAN Biotech)
- **DC-Medium:**
 - 500 ml RPMI 1640 + L-Glutamine, + 2 g / l NaHCO₃ (PAN Biotech)
 - 25 ml FCS (Biochrom AG)
 - 5 ml Penicillin [10000 U / ml] / Streptomycin [10 mg / ml] (PAN Biotech)
 - 500 µl 2-Mercaptoethanol ([50 mM]; Sigma-Aldrich)

2.1.5 Antikörper

Tabelle 5: Anti-murine Antikörper für die Durchflusszytometrie

Zielstruktur	Fluorchrom	Isotyp	Klon	µg / 1 x 10 ⁶ Zellen	Hersteller
CD4	FITC	Ratte IgG2a	RM4-5	0,125	eBioscience
CD4	PerCP-Cy5.5	Ratte IgG2a	RM4-5	0,2	BD
CD8	PE	Ratte IgG2a	53-6.7	0,125	BD
CD25	APC	Ratte IgG1	PC61.5	0,3	eBioscience
CD69	FITC	A. Hamster IgG	H1.2F3	0,3	BD
FcR CD16/32	ohne	Ratte IgG2a	93	0,25	eBioscience
FoxP3	PE	Ratte IgG2a	FJK16s	0,25	eBioscience

Tabelle 6: Isotyp-Kontrollen für die Durchflusszytometrie

Isotyp	Fluorchrom	Klon	µg / 1 x 10 ⁶ Zellen	Hersteller
A. Hamster IgG	FITC	eBio299Arm	0,3	eBioscience
Ratte IgG1	APC	RTK2071	0,3	Biologend
Ratte IgG2a	FITC	Keine Angabe	0,125	Abd Serotec
Ratte IgG2a	PE	Keine Angabe	0,125	eBioscience
Ratte IgG2a	PerCP-Cy5.5	Keine Angabe	0,2	eBioscience

Tabelle 7: Anti-murine Antikörper für die Immunhistologie

Zielstruktur	Isotyp	Klon	Verdünnung	Hersteller
CD4	Ratte IgG2a	RM4-5	1 : 20000	BD
CD8	Ratte IgG2a	53-6.7	1 : 300	BD

2.1.6 Primer

Die *Hprt*-Primer und die *Hprt* TaqMan[®] Sonde wurden mit Hilfe von Primer Express 3 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) entworfen. Die Primersequenzen von *Il-10* und *Tgf-β1* wurden der öffentlich zugänglichen Webseite PrimerBank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) entnommen (Primer ID *Il-10*: 6754318a2; Primer ID *Tgf-β1*: 6755775a2).

Alle Primer wurden von Sigma-Aldrich, die *Hprt* TaqMan[®] Sonde von Eurogentec bezogen. Alle Primer und Sonden wurden als 100 μM Lösungen bei -20 °C aufbewahrt und als 5 μM bzw. 10 μM Arbeitslösungen verwendet.

Tabelle 8: Murine Primer für quantitative RT-PCR Analysen

Primer	Sequenz (5' → 3')
<i>Hprt</i> forward	GGG AAA GCA AAG TTT GCA TTG T
<i>Hprt</i> reverse	AGT TAT TGG TGG AGA TGA TCT
<i>Hprt</i> TaqMan [®] Sonde	6-FAM-CAATTATATCTTCAACAATCAAG-MGB
<i>Il-10</i> forward	CTG GAC AAC ATA CTG CTA ACC G
<i>Il-10</i> reverse	GGG CAT CAC TTC TAC CAG GTA A
<i>Tgf-β1</i> forward	ATC CTG TCC AAA CTA AGG CTC G
<i>Tgf-β1</i> reverse	ACC TCT TTA GCA TAG TAG TCC GC

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zahl lebender Zellen erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer und Trypanblau, welches sich in tote Zellen einlagert. Bei zehnfacher Vergrößerung wurden unter dem Mikroskop die ungefärbten Zellen in mindestens zwei Groß-Quadranten (entspricht 2 x 16 Klein-Quadranten) gezählt. Die Zellzahl pro ml ergab sich aus:

Anzahl der gezählten Zellen / Anzahl der gezählten Groß-Quadranten x Verdünnung x 10^4

2.2.1.2 Zellkulturführung

Die Kultivierung der murinen *transporter associated with antigen processing* (Tap)-defizienten RMA-S Zelllinie [115] und isolierter muriner Lymphozyten erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im CO₂-Brutschrank (*Function line incubator*; Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland).

2.2.2 Tierexperimente, DC-Vakzinierung und Zellisolationstechniken

2.2.2.1 Tumortransplantation bei C57Bl6/j Mäusen

Für die subkutane (s.c.) Transplantation von seriell propagierten Grm1-transgenen Tumoren (E-Linie) wurden die C57Bl/6j Mäuse mit 2,2,2-Tribromoethanol (gelöst in 2-Methyl-2-Butanol; Avertin[®]), welches intraperitoneal (je 1 mg / g Körpergewicht) appliziert wurde, anästhesiert. Für die Transplantation wurde der Tumor mit Hilfe eines Skalpellts geteilt (Volumen je Tumortransplantat ca. 6,5 mm³). Die entstandene Wunde wurde mit einem resorbierbaren Faden (Ethicon[®] coated vicryl 6-0; Johnson & Johnson GmbH, Neuss, Deutschland) wieder geschlossen.

2.2.2.2 Einteilung der Tumorgruppen für das LLA-TG-3 Modell

Bei den LLA-TG-3 Tieren erfolgte die Einteilung in die Gruppe der niedrigen bzw. hohen Tumorlast anhand der Größe der Tumoren an den Ohren, Augen und am Genitalbereich (siehe Tab. 9). Tiere, welche keine sichtbaren Läsionen aufwiesen, wurden als tumorfrei eingestuft. Die Lymphknoten wurden bei tumortragenden Tiere gemäß ihrer Größe und Lokalisation als tumor-drainierend (tdLN; tumornah) oder nicht tumor-drainierend (ndLN; tumorfern) eingestuft.

Tabelle 9: Einteilung der Tumorgruppen für das LLA-TG-3 Modell

Bezeichnung	Alter	Tumor (Anzahl / Volumen pro Tumor und Maus)
C57Bl/6j (Wildtyp)	2-8 Monate	-
LLA-TG-3 ohne Tumore	4-8 Wochen	-
LLA-TG-3 niedrige Tumorlast	5-7 Monate	2-3 / 60-100 mm ³
LLA-TG-3 hohe Tumorlast	7-10 Monate	2-5 / 100-160 mm ³

2.2.2.3 Isolierung von Dendritischen Zellen (DC) aus dem Knochenmark

Für die Herstellung von Dendritischen Zellen wurde das Knochenmark aus den Röhrenknochen der Hinterbeine (Femur und Tibia) von C57Bl/6j Mäusen mit Hilfe einer mit DC-Medium gefüllten Spritze in ein 50 ml Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) ausgespült. Das Knochenmark wurde anschließend mit Hilfe einer 10 ml serologischen Pipette (Greiner Bio-One GmbH) resuspendiert und durch einen 100 µm Zellfilter (BD Biosciences) in ein neues 50 ml Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH) filtriert. Die Zellsuspension wurde dann bei 400 x g und Raumtemperatur (RT) für 10 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Zellpellet in 10 ml DC-Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Dann wurden je 5 x 10⁶ Zellen in 10 ml DC-Medium (+ 10 ng / ml GM-CSF und 10 ng / ml IL-4 aus Hybridomaüberständen) in Petrischalen (ø 10 cm; Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Deutschland) ausgesät. Drei Tage später wurde das Medium durch je 10 ml frisches DC-Medium (+ 10 ng / ml GM-CSF und 10 ng / ml IL-4) ersetzt. Nach weiteren drei Tagen wurden die Zellen aus allen Petrischalen vereint, die Zellzahl bestimmt und danach wieder pro Schale 5 x 10⁶ Zellen in 10 ml DC-Medium (+ 10 ng / ml GM-CSF und 10 ng / ml IL-4) ausgesät.

Im Anschluss wurden die Zellen mit LPS (1 $\mu\text{g} / \text{ml}$) für ca. 24 h stimuliert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für die Vakzinierung geerntet, vereint sowie die Zellzahl bestimmt.

2.2.2.4 DC-Vakzinierungsprotokoll

Die aus dem Knochenmark gewonnenen DC wurden gleichmäßig aufgeteilt ($1 \times 10^6 / \text{ml}$) und mit je einem der in Tab. 10 und 11 aufgeführten MHC Klasse I (H-2K^b)-restringierten Endoglin- bzw. Fap-Peptide (je Peptid 25 μM) für zwei Stunden bei 37 °C im CO₂-Brutschrank inkubiert (Kontrollgruppe: DC ohne Peptid). Die Peptidsequenzen stammen aus *in silico* Vorhersagen für eine Bindungsaffinität zu H-2K^b. Die tatsächliche Affinität der Peptide war in einem durchflusszytometrischen Kompetitions-Assay von Frau Dr. Valeska Müller bestimmt worden. Anschließend wurden die mit Endoglin- bzw. Fap-Peptiden beladenen DC wieder vereint und in PBS aufgenommen. Die C57Bl/6j Mäuse wurden jeweils an Tag 0, Tag 3, Tag 6 sowie Tag 14 mit je 1×10^6 Peptid-gepulsten DC (Kontrollgruppe: DC ohne Peptid) + 5 μg CpG ODN 1826 (Toll-like Rezeptor (TLR) 9 Agonist) intradermal (i.d.) immunisiert. An den Tagen 15 bis 18 wurden dann jeweils 2-mal täglich 40000 IU humanes IL-2 (hIL-2) intraperitoneal (i.p.) appliziert. Drei Tage später wurden die Tumore transplantiert und eine Woche danach nochmals vier Tage hintereinander je 2-mal täglich 40000 IU hIL-2 i.p. appliziert (siehe Abb. 5; Vakzinierungsprotokoll modifiziert nach Kochenderfer et al. [116]).

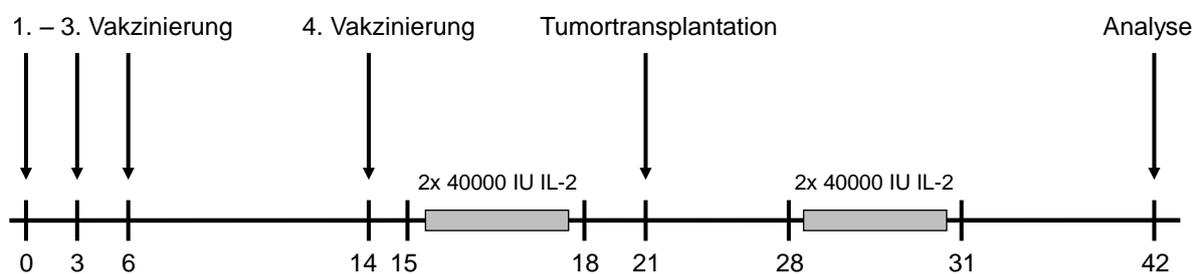


Abb. 5: Vakzinierungsprotokoll.

Tabelle 10: Murine H-2K^b-restringierte Endoglin-Peptide

Peptid	Aminosäuresequenz	Affinität (H-2K ^b)
Eng 68-75	LFLDFPGM	+
Eng 68-75 72Y 75L	LFLDY PGL	++
Eng 93-100	TREVFLVL	+
Eng 93-100 97Y	TREVYLVL	-
Eng 310-317	IVTSFVEL	+++
Eng 310-317 314Y	IVTSYVEL	+++
Eng 526-533	GDP RFSFL	+
Eng 526-533 530Y	GDP RYSFL	+
Eng 605-612	LWYIYSHT	-
Eng 605-612 609F 612L	LWYIFSHL	+

-/+ niedrige Affinität, + - ++ mittlere Affinität, +++ hohe Affinität

Tabelle 11: Murine H-2K^b-restringierte Fap-Peptide

Peptid	Aminosäuresequenz	Affinität (H-2K ^b)
Fap 83-90	TRESYIIL	-/+
Fap 107-114	PDRQFVYL	+
Fap 114-121	LESDYSKL	-/+
Fap 289-296	SDYYFSWL	+++
Fap 457-464	YKAKYYAL	-/+
Fap 530-537	RSKKYPLL	+++
Fap 585-592	LHAVYRKL	++
Fap 660-667	YSERFMGL	-/+
Fap 685-692	RAEYFRNV	++

-/+ niedrige Affinität, + - ++ mittlere Affinität, +++ hohe Affinität

2.2.2.5 Isolierung von Lymphozyten aus Milz, Lymphknoten und Herzblut

Den getöteten Versuchstieren wurden die Milz sowie Lymphknoten (axillar, cervical, inguinal, lumbal und poplietal) entnommen und in eiskaltes PBS überführt. Das Blut der Tiere wurde mit Hilfe einer Insulinspritze (Omnican[®] 40, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) direkt aus dem Herzen der Tiere entnommen und in ein 15 ml Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH) überführt, welches bereits 20 µl Liquemin[®] (Heparin) enthielt, um die Blutgerinnung zu verhindern.

Das Blut wurde anschließend mit PBS auf 4 ml aufgefüllt, vorsichtig auf 3 ml Lympholyte Mammal transferiert und für 20 min bei 720 x g und RT ohne Bremse zentrifugiert. Die nach der Zentrifugation sich in der Interphase befindenden Lymphozyten wurden vorsichtig mit einer 5 ml serologischen Pipette (Greiner Bio-One GmbH) abgesaugt und einmal mit mindestens der doppelten Menge CM gewaschen.

Die Lymphknoten wurden in Petrischalen (\varnothing 5 cm; Nunc GmbH & Co. KG) mit einem Skalpell zerkleinert und mit einem Spritzenstempel kleingerieben. Die Zellsuspension wurde in 5 ml BD™ Falcons mit Zellfilteraufsatz filtriert und mit CM gewaschen. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 400 x g und 4 °C wurde das so entstandene Zellpellet in CM aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

Die Milz wurde in einer Petrischale (\varnothing 10 cm; Nunc GmbH & Co. KG) mit Hilfe zweier Pinzetten zerkleinert. Anschließend wurde die zerkleinerte Milz in 5 ml CM aufgenommen und durch einen 100 μ m Zellfilter (BD Biosciences) in ein 50 ml Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH) filtriert, wobei die Gewebestücke durch Zerreiben mit einem Spritzenstempel in Einzelsuspension gebracht wurden. Danach wurde nochmals 5 ml CM zugegeben, um noch anhaftende Zellen aus dem Filter zu waschen. Die Zellsuspension wurde bei 400 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet in 5 ml CM aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend vorsichtig auf 2 ml Lympholyte M transferiert und für 20 min bei 720 x g und RT ohne Bremse zentrifugiert. Die nach der Zentrifugation sich in der Interphase befindenden Lymphozyten wurden vorsichtig mit einer 5 ml serologischen Pipette (Greiner Bio-One GmbH) abgesaugt und einmal mit mindestens der doppelten Menge CM gewaschen und anschließend in 5 ml frischem CM aufgenommen sowie die Zellzahl bestimmt.

2.2.2.6 Entnahme und Fixierung des Tumorgewebes

Die Entnahme des Tumorgewebes fand am selben Tag wie die Entnahme der Milz und Lymphknoten statt. Bei LLA-TG-3 Mäusen wurden meist Tumore von zwei verschiedenen Lokalisationen (wenn möglich z.B. vom linken und vom rechten Ohr) entnommen, bei C57Bl/6j Mäusen wurden die transplantierten Grm1-transgenen Tumore mit einem Skalpell geteilt. Es wurde jeweils ein Tumorstück in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert und ein Tumorstück in 4 % Formalin für 24 h fixiert und in Paraffin ausgegossen.

2.2.3 Durchflusszytometrie

Aus Milz bzw. Lymphknoten isolierte Lymphozyten wurden mit Hilfe von Fluorchrom-markierten Antikörpern gefärbt, um die Frequenz von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie von regulatorischen T-Zellen zu bestimmen. Als Aktivierungsmarker wurden CD69 (*very early activation antigen*, [117]) und CD25 (IL-2 Rezeptor α Kette, [118]) herangezogen. Die regulatorischen T-Zellen wurden als CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ definiert.

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Waschschrte durch Zugabe von 500 μ l FACS-Puffer (PBS + 0,1 % BSA) und anschließender Zentrifugation bei 400 x g und 4 °C in einer Heraeus Megafuge 1.0R (Heraeus Instruments) durchgeführt. Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt.

Es wurden für alle Färbungen mind. 2×10^5 Zellen in einem Volumen von ca. 100 μ l FACS-Puffer verwendet. Fc Bindungsstellen wurden durch Zugabe von anti-FcR Antikörpern für mind. 5 min bei 4 °C auf Eis blockiert. Anschließend wurden die Zellen mit 500 μ l PBS gewaschen. Nach diesem Waschschrte wurden die Zellen mit den entsprechenden Antikörperkombinationen für 30 min bei 4 °C auf Eis inkubiert. Das Invitrogen *LIVE/DEAD*[®] *Fixable Dead Cell Stain* Kit (Near IR-fluorescent reactive dye) wurde für die Lebendzellfärbung verwendet. Es wurde pro Färbung 1 μ l einer 1:10 Verdünnung (in PBS) des Farbstoffs (gelöst in DMSO) zusammen mit den Antikörpern zugegeben. Danach wurden die Zellen gewaschen und bis zur Messung auf Eis gelagert. Die Färbung von regulatorischen T-Zellen wurde nach Anleitung des *Regulatory T cell staining* Kits (eBioscience) durchgeführt. Fluorchromkompensationseinstellungen wurden mit Hilfe des BD[™] CompBeads Anti-Hamster/Rat Ig, κ /*negative control (FBS) Compensation Particles* Sets durchgeführt und alle Proben mit einem FACSCanto Durchflusszytometer (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Für die Auswertung der erhaltenen Daten wurde die Software FlowJo (Tree Star, Ashland, USA) verwendet.

2.2.4 Proliferationsassay (³H-Thymidin-Inkorporationsassay)

Es wurden für jede untersuchte Bedingung jeweils 1×10^5 Zellen in Triplikaten in einer 96-well U-bottom Zellkulturplatte (Greiner Bio-One GmbH) in einem Endvolumen von 150 μ l CM, welches mit 500 IU / ml hIL-2 versetzt wurde, ausgesät. Zusätzlich wurden 200 nM PMA bzw. 5 μ g / ml ConA zugegeben.

Die Zellen wurden anschließend für vier Tage inkubiert und ca. 18 Stunden vor der Analyse mit 0,5 μCi ^3H -Thymidin / well versetzt. Die Zellen wurden mit einem Mach 2 Semi-Automatic Cell Harvester (TomTec Imaging Systems GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) geerntet und das inkorporierte radioaktive ^3H -Thymidin mit einem Wallac 1450 Microbeta Trilux Scintillation Counter (PerkinElmer) gemessen.

2.2.5 Funktionelle Assays

2.2.5.1 Zytotoxizitäts-Assay ($^{51}\text{Chromium}$ Release Assay)

Um die Lyse von Zielzellen durch zytotoxische T-Zellen *in vitro* nachzuweisen, wurde der 4 h $^{51}\text{Chromium}$ Release Assay angewandt. Hierfür wurden je 5×10^5 Zielzellen (RMA-S) pro 96-well V-bottom Zellkulturplatte (Greiner Bio-One GmbH) je zur Hälfte ohne und je zur Hälfte mit den in Tab. 10 bzw. 11 aufgeführten Endoglin- bzw. Fap-Peptiden (je $5 \mu\text{M}$ pro Peptid) inkubiert. Gleichzeitig wurden die Zielzellen mit je $100 \mu\text{Ci}$ $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ für 30 min bei 37°C im CO_2 -Brutschrank radioaktiv markiert. Anschließend wurden die Zellen einmal vorsichtig resuspendiert und für weitere 30 min bei 37°C im CO_2 -Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen 2-mal mit CM gewaschen und in je 10 ml CM aufgenommen. Pro well wurden dann 5000 Zellen (entspricht $100 \mu\text{l}$ der Zellsuspension) ausgesät. Die Effektorzellen (Milzzellen der Peptid- und Kontroll-vakzinierten C57Bl/6j Mäuse) wurden zuvor in Triplikaten in der 96-well V-bottom Platte in je $100 \mu\text{l}$ CM vorgelegt (5×10^5 , $2,5 \times 10^5$, $1,25 \times 10^5$ und $6,25 \times 10^4$; dies entspricht einem Verhältnis von 100:1, 50:1, 25:1 und 12,5:1 zu den Zielzellen). Für die Bestimmung der Spontanlyse wurden die Zielzellen nur mit $100 \mu\text{l}$ / well CM versetzt; für die Bestimmung der maximalen Lyse wurden die Zielzellen mit $100 \mu\text{l}$ / well PBS + 2 % Triton-X 100 versetzt. Die Platte wurde dann für 4 Stunden bei 37°C im CO_2 -Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden je well $40 \mu\text{l}$ Überstand abgenommen, in eine LumaPlate-96 (Perkin Elmer) pipettiert und über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag wurde das aus den lysierten Zielzellen freigesetzte radioaktive $^{51}\text{Chrom}$ mit einem Wallac 1450 Microbeta Trilux Scintillation Counter (PerkinElmer) gemessen. Die Zytotoxizität (% spezifische Lyse) berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Spezifische Lyse (\%)} = \left[\frac{\text{Lyse im Versuchswell} - \text{Spontanlyse}}{\text{Maximale Lyse} - \text{Spontanlyse}} \right]$$

2.2.5.2 CFSE Zytotoxizitäts-Assay

Um die Lyse von Zielzellen durch zytotoxische T-Zellen *in vivo* nachzuweisen, wurde der CFSE Zytotoxizitäts-Assay angewandt (Protokoll modifiziert nach Horne et al. [119]). Hierfür wurden frisch isolierte C57Bl/6j Milzzellen (siehe 2.2.2.5) je zur Hälfte ohne und je zur Hälfte mit den in Tab. 10 bzw. 11 aufgeführten Endoglin- bzw. Fap-Peptiden (je 5 µM pro Peptid) für 2 h bei 37 °C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Peptid-gepulsten Milzzellen in vorgewärmten PBS mit 0,4 µM CFSE (Stammlösung mit PBS auf 50 µM verdünnt) und die nicht gepulsten Milzzellen in vorgewärmten PBS mit 0,02 µM CFSE (Stammlösung mit PBS auf 50 µM verdünnt) für 10 min bei 37 °C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen einmal mit vorgewärmten CM und einmal mit vorgewärmten PBS gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Die mit 0,4 µM CFSE markierten, Peptid-gepulsten Milzzellen wurden dann zu gleichen Teilen mit den mit 0,02 µM CFSE markierten, nicht gepulsten Milzzellen gemischt und das Mischungsverhältnis im Durchflusszytometer kontrolliert. Anschließend wurden Peptid- und Kontroll-vakzinierten C57Bl/6j Mäusen je 2 x 10⁷ Zellen intravenös (i.v.) über die Schwanzvene appliziert. Nach etwa 18 h wurden die Tiere geopfert, die Lymphozyten aus Milz und Herzblut isoliert (siehe 2.2.2.5), die Verteilung der CFSE markierten Zellen im Durchflusszytometer analysiert und die Zytotoxizität (% spezifische Lyse) nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Spezifische Lyse (\%)} = \left[\frac{\left(\frac{CFSE^{high} con}{CFSE^{high} con + CFSE^{low} con} \right) - \left(\frac{CFSE^{high} exp}{CFSE^{high} exp + CFSE^{low} exp} \right)}{\left(\frac{CFSE^{high} con}{CFSE^{high} con + CFSE^{low} con} \right)} \right] \times 100$$

CFSE^{high} entspricht den mit 0,4 µM CFSE markierten, Peptid-gepulsten Milzzellen, CFSE^{low} den mit 0,02 µM CFSE markierten, nicht gepulsten Milzzellen, *con* entspricht den Milzzellen aus Tieren der Kontrollgruppe und *exp* entspricht den Milzzellen aus Tieren der Peptid-vakzinierten Gruppe.

2.2.5.3 ELISPOT Assay (*enzyme-linked immunosorbent spot assay*)

Im ELISPOT Assay wird die Fähigkeit von T-Zellen gemessen auf ein bestimmtes Antigen mit der Ausschüttung von Zytokinen zu reagieren. Im konkreten Fall wurde der Interferon-gamma (IFN-γ) ELISPOT Assay durchgeführt.

Dazu wurden zuerst 96-well Filterplatten (MultiScreen-IP; Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland) mit einem murinen anti-Ifn- γ -Antikörper (BD Biosciences; mit PBS auf 6 $\mu\text{g} / \text{ml}$ verdünnt; je 0,45 $\mu\text{g} / \text{well}$) beschichtet und über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Platten 6-mal mit je 200 μl PBS / well gewaschen und mit 200 μl CM / well für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. In der Zwischenzeit wurden die zu untersuchenden Zellen verdünnt, so dass die gewünschten Zellzahlen (1×10^6 , 5×10^5 , $2,5 \times 10^5$ und $1,25 \times 10^5$ pro well) in 200 μl Medium vorlagen. Nach Abkippen des *Blocking*-Mediums wurden 200 μl der jeweiligen Zellkonzentrationen zusammen mit einem Cocktail aus Endoglin- bzw. Fap-Peptiden (je 5 μM pro Peptid) über Nacht inkubiert. In der Negativkontrolle wurden keine Peptide zugegeben. Am nächsten Tag wurde jedes well 6-mal mit 200 μl Waschpuffer (PBS + 0,05 % Tween[®] 20) gewaschen. Es folgte eine 2-stündige Inkubation mit einem murinen biotinylierten anti-Ifn- γ -Antikörper (BD Biosciences; mit PBS + 1 % BSA auf 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ verdünnt; je 75 ng / well) bei RT. Nach erneutem Waschen mit Waschpuffer (6 x 200 μl) wurden je well 75 μl Streptavidin-Alkalische Phosphatase (ALP; Mabtech AB, Hamburg, Deutschland; 1:1000 mit PBS + 1 % BSA verdünnt) zugegeben und für eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Platte 6-mal mit 200 $\mu\text{l} / \text{well}$ Waschpuffer und einmal mit 200 $\mu\text{l} / \text{well}$ Substrat-Puffer (0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, 0,1 M Tris; pH 9,5) gewaschen. Die Farbentwicklung erfolgte nach Zugabe von je 75 $\mu\text{l} / \text{well}$ BCIP/NBT Substrat (Mabtech AB). Das BCIP/NBT Substrat wurde vor Zugabe 1:10 mit dem Substratpuffer verdünnt. Die Farbreaktion wurde bei entsprechender Färbung mit Leitungswasser abgestoppt.

2.2.6 Immunhistologie

Von dem zu untersuchenden Material wurden mittels eines Kryostaten (Cryostat 1720 Digital; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) Gefrierschnitte von 6 μm Dicke hergestellt. Diese wurden über Nacht getrocknet und am nächsten Tag für 10 min in Aceton bei RT fixiert. Nicht verwendete Schnitte wurden bei -20 °C gelagert. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte mit einem spezifischen Puffer (REAL[™] Peroxidase-Blocking Solution; DAKO) für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte zweimal für 5 min in PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte mit dem gewünschten Primärantikörper für 20 min bei RT inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten in PBS wurden die Schnitte mit einem HRP-markierten Sekundärantikörper für 15 min bei RT inkubiert. Nachfolgend wurde nochmals mit PBS gewaschen und mit

Vector[®] NovaRED[™] (Substrate Kit for Peroxidase; Vector Laboratories) als Chromogen für 15 min bei RT entwickelt. Die Farbreaktion wurde durch 5-minütige Inkubation in destilliertem Wasser abgestoppt. Die Zellkerne wurden durch 1-minütige Inkubation in Mayer's Hematoxylin (Lillie's Modification; DAKO) angefärbt und die Schnitte mind. 5 min in fließendem Leitungswasser gewässert. Nach einem kurzen Waschschrift in destilliertem Wasser wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % Ethanol, 96 % Ethanol, 2 x 100 % Ethanol, 2 x Xylene) wieder entwässert und anschließend mit Shandon EZ-Mount (Thermo Scientific GmbH) eingedeckt.

2.2.7 Molekularbiologische Methoden

2.2.7.1 RNA-Isolation

RNA wurde aus bei -80 °C gelagerten Zellpellets (mind. 5×10^5 bis max. 1×10^7 Zellen) oder aus ca. 25 Schnitten (je 6 μm) von kryokonserviertem Tumormaterial mit Hilfe des peqGOLD Total RNA Kits (Safety-Line; Peqlab) nach Anleitung isoliert (inklusive optionalen DNase I Verdau). Die so gewonnene RNA wurde in 30-50 μl RNase-freiem H_2O eluiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.7.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit dem SuperScript[®] II Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen Life Technologies) durchgeführt. Im Kit sind zusätzlich der 5 x *First-Strand Buffer* und 100 mM DTT enthalten.

Für die cDNA Synthese wurde zuerst pro 10 μl cDNA folgender Mix angesetzt:

- 1,9 μl H_2O
- 2,0 μl 5 x *First-Strand Buffer*
- 1,0 μl DTT (100 mM)
- 0,5 μl dNTP (jede Base 10 mM) (Invitrogen)
- 0,5 μl Oligo(dT) Primer (10 pmol / μl) (Invitrogen)
- 0,5 μl Random Primer (20 pg / μl) (Invitrogen)
- 0,6 μl Superscript II (200 Units / μl) [als letztes]

Pro 10 μl cDNA wurden dann 7 μl dieses Mixes mit 3 μl RNA der Probe in ein PCR Reaktionsgefäß gemischt. Für die Analysen wurden üblicherweise 30 μl cDNA angesetzt. Der Ansatz wurde in eine PCR-Maschine (GeneAmp 9700; Applied Biosystems) transferiert und durchlief folgendes thermales Profil: 30 min bei 42 °C, 30 min bei 45 °C, 2 min bei 72 °C und anschließend bei 4 °C bis die cDNA aus der PCR-Maschine entnommen wurde. Die cDNA wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.7.3 Real time PCR für *Il-10* und *Tgf- β 1*

Die relative Expression von *Il-10* und *Tgf- β 1* wurde mittels Taqman[®] *real time* PCR und der vergleichenden $\Delta\Delta\text{Cq}$ Methode bestimmt. Als endogene Kontrolle diente das *housekeeping* Gen *hypoxanthine phosphoribosyltransferase (Hprt)*, wobei für dieses eine TaqMan[®] Sonde eingesetzt wurde, bei *Il-10* und *Tgf- β 1* hingegen der Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green (Primer bzw. Sonde siehe Tab. 8).

Die relative Expression von *Il-10* bzw. *Tgf- β 1* im Verhältnis zum Kalibrator (bei Geweben relativ zu wt Milz bzw. LN; bei Zelllinien relativ zu B10.BR Melanozyten), normalisiert zu *Hprt*, wurde mit $2^{-\Delta\Delta\text{Cq}}$ berechnet, wobei $\Delta\Delta\text{Cq} = (\text{Cq Zielgen, Probe} - \text{Cq } Hprt, \text{ Probe}) - (\text{Cq Zielgen, Kalibrator} - \text{Cq } Hprt, \text{ Kalibrator})$. Dabei ist Cq (*quantification cycle*) als der Zyklus definiert, bei dem der Schwellenwert an Fluoreszenz überschritten wird.

Die PCR wurde in Duplikaten für jede Probe durchgeführt. Für *Hprt* wurde folgender Ansatz pipettiert:

- 10 μl 2 x PCR Mastermix for Probe Assays low ROX (Eurogentec)
- 0,8 μl 5 μM Forward Primer (Endkonzentration: 200 nM)
- 0,8 μl 5 μM Reverse Primer (Endkonzentration: 200 nM)
- 0,4 μl Probe *Hprt* (Endkonzentration: 100 nM)
- 7 μl H₂O
- 1 μl cDNA

Für *Il-10* und *Tgf-β1* wurde folgender Ansatz pipettiert:

10 µl 2 x ABsolute QPCR SYBR low ROX (Thermo Scientific GmbH)
1,8 µl 10 µM Forward Primer (Endkonzentration: 900 nM)
1,8 µl 10 µM Reverse Primer (Endkonzentration: 900 nM)
5,4 µl H₂O
1 µl cDNA

Die Amplifikationen erfolgten im 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) mit dem Standard thermalen Profil:

95°C 10'	hold	
<hr/>		
95°C 15"	} 45 Zyklen	
60°C 60"		

2.2.8 Statistische Analysen

Für statistische Analysen wurde die Software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, LaJolla, USA) verwendet. Die Daten wurden je nach Größe der Stichprobe mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov Tests oder des D'Agostino und Pearson omnibus Normalitätstests auf Normalität geprüft. Normal verteilte Daten wurden anschließend mit dem ungepaarten zweiseitigen Student's *t* Test zum Vergleich zweier Gruppen bzw. zum Vergleich mehrerer Gruppen mit dem *one-way* ANOVA Test mit *Dunnnett's Multiple Comparison post-hoc test*, um die tumorfreie LLA-TG-3 Gruppe mit der Gruppe der niedrigen bzw. hohen Tumorlast zu vergleichen, analysiert. Nicht normal verteilte Daten wurden mit nicht-parametrischen Tests analysiert, d.h. mit dem Mann-Whitney *U* Test zum Vergleich zweier Gruppen bzw. zum Vergleich mehrerer Gruppen mit dem Kruskal-Wallis Test mit *Dunn's Multiple Comparison post-hoc test*, um die tumorfreie LLA-TG-3 Gruppe mit der Gruppe der niedrigen bzw. hohen Tumorlast zu vergleichen. Ein *p*-Wert < 0,05 wurde für einen statistisch signifikanten Unterschied angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Immuntherapie mit vom Tumorstroma abgeleiteten Peptiden

3.1.1 Prophylaktische Vakzinierung mit H2-K^b-restringierten Endoglin-Peptiden

3.1.1.1 Tumorwachstum nach prophylaktischer Endoglin-Peptid-Vakzinierung

Als erstes wurde untersucht, ob eine prophylaktische Vakzinierung mit H-2K^b-restringierten Peptiden des Tumorstroma-assoziierten Antigens (TSSA) Endoglin einen Vorteil wie die Verzögerung des Wachstums von Tumoren bieten kann. Dazu wurden naive C57Bl/6j Mäuse mit diesen Peptiden mit einem nach Kochenderfer et al. [116] modifizierten Protokoll immunisiert und anschließend Grm1-transgene Tumore transplantiert. Beim Vergleich der Tumolvolumina zwischen der Endoglin-Peptid- und Kontroll-vakzinierten Gruppe konnte jedoch kein signifikanter Unterschied des Tumorwachstums festgestellt werden ($p > 0,05$; ungepaarter zweiseitiger Student's t Test; Abb. 6).

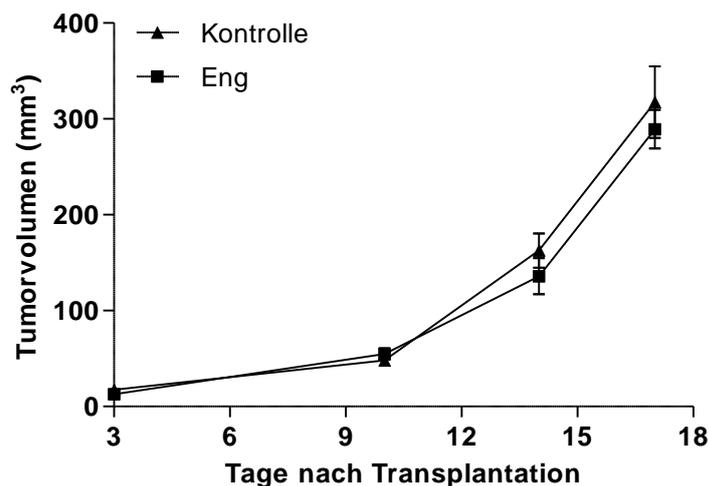


Abb. 6: Wachstum von Grm1-transgenen Tumoren nach prophylaktischer Endoglin-Peptid-Vakzinierung.

Acht Tage nach der vierten Vakzinierung mit je 1×10^6 Peptid-gepulsten (Eng) oder nicht gepulsten DC (Kontrolle) + $5 \mu\text{g}$ CpG ODN 1826 wurden subkutan (s.c.) Grm1-transgene Tumore in C57Bl/6j Mäuse transplantiert ($n = 8$ pro Gruppe). Die Tumolvolumina wurden mit der Formel $V = a^2 \times b \times \pi/6$ berechnet, wobei a der größere und b der kleinere Tumordurchmesser ist. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM.

3.1.1.2 Endoglin-Peptid-Vakzinierung induziert Peptid-reaktive T-Zellen *in vivo*

Nachdem die prophylaktische Vakzinierung keinen Effekt auf das Tumorwachstum hatte, wurde als nächstes untersucht, ob die prophylaktische Endoglin-Peptid-Vakzinierung Auswirkungen auf Peptid-reaktive CD8⁺ T-Zellen hat. Dazu wurden entsprechend vakzinierter Tiere an Tag 22 nach Tumortransplantation geopfert und Lymphozyten aus Milz und Herzblut (periphere Blutlymphozyten; PBL) für funktionelle Analysen isoliert.

Mit einem *ex vivo* ELISPOT Assay sollte die Anzahl an T-Zellen, die nach Inkubation mit Endoglin-Peptiden mit der Ausschüttung von Ifn- γ reagieren, bestimmt werden. Diese Analysen ergaben jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl an Ifn- γ produzierenden Zellen nach Stimulation mit Endoglin-Peptiden zwischen der Endoglin-Peptid- und der Kontroll-vakzinierten Gruppe (Abb. 7).

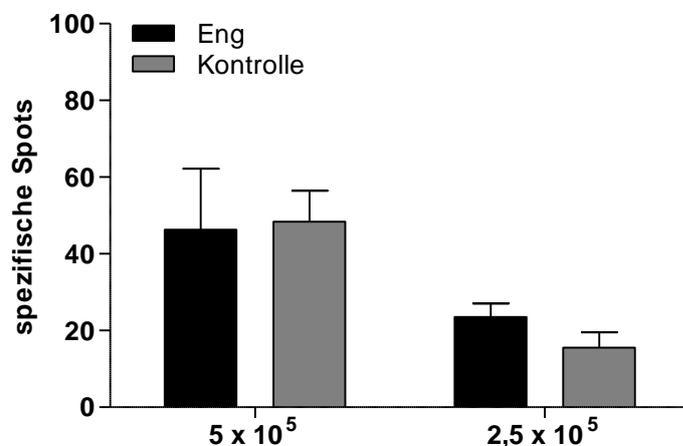


Abb. 7: Ifn- γ produzierende Milzzellen nach Endoglin-Peptidstimulation.

Quantifizierung von Ifn- γ produzierenden Endoglin-reaktiven Milzzellen aus C57Bl/6j Mäusen nach Vakzinierung mit Peptid-gepulsten (Eng; schwarze Balken) oder nicht gepulsten DC (Kontrolle; graue Balken) mit Hilfe des ELISPOT Assays. Der Versuch wurde in Triplikaten mit zwei unterschiedlichen Zellkonzentrationen, nämlich 5×10^5 / well (Eng: $n = 3$; Kontrolle $n = 8$) und $2,5 \times 10^5$ / well (Eng: $n = 2$; Kontrolle: $n = 4$) durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM.

Da die Ausschüttung von Ifn- γ nicht unbedingt mit der Lysisaktivität korrelieren muss, wurde sowohl ein *in vivo* Zytotoxizitäts-Assay (CFSE Zytotoxizitäts-Assay) als auch ein *in vitro* Zytotoxizitäts-Assay (⁵¹Chromium Release Assay) durchgeführt.

Beim *in vivo* CFSE Zytotoxizitäts-Assay zeigte sich, dass bei den Endoglin-Peptid-vakzinierten Tieren eine Lyse der syngenen, Endoglin-Peptid-gepulsten Milzzellen zu beobachten ist. Diese war vor allem im Blut und zu einem deutlich geringeren Ausmaß in der Milz der entsprechenden Tiere nachweisbar (Abb. 8).

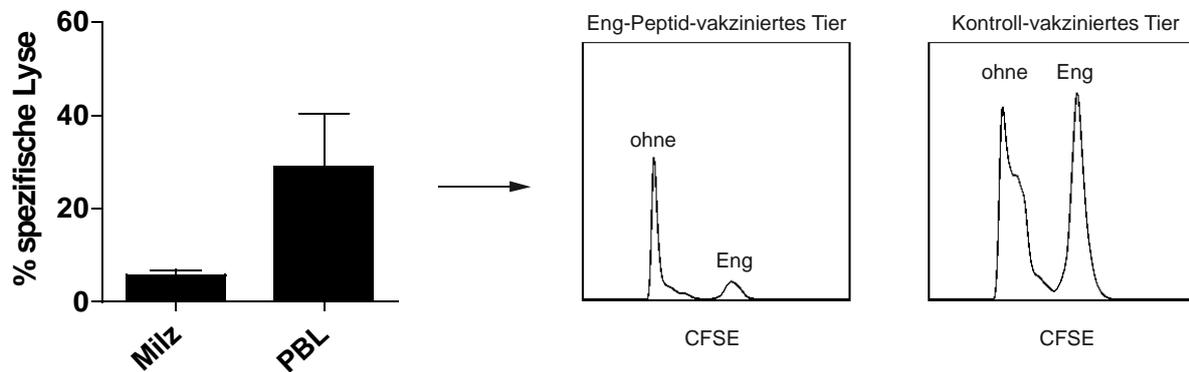


Abb. 8: Lyse von syngenen, Endoglin-Peptid-gepulsten Milzzellen.

Die prozentuale Lyse von CFSE markierten, syngenen, Endoglin-Peptid-gepulsten (Eng) Milzzellen durch Eng-reaktive Zellen in Milz bzw. Blut (PBL: periphere Blutlymphozyten) aus C57Bl/6j Mäusen nach Vakzinierung mit Endoglin-Peptid-gepulsten DC im Vergleich zu den Kontrolltieren (Milz: $n = 2$; PBL: $n = 3$). Der mittlere Graph zeigt die Lyse der CFSE^{high} markierten, Eng-Peptid-gepulsten Milzzellen aus einer Endoglin-Peptid-vakzinierten Maus. Der rechte Graph zeigt das Verhältnis von CFSE^{high} markierten, Endoglin-Peptid-gepulsten Milzzellen und CFSE^{low} markierten, nicht gepulsten Milzzellen aus einer Kontroll-vakzinierten Maus. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM. Für die Berechnung der Zytotoxizität siehe 2.2.5.2.

Beim *in vitro* ⁵¹Chromium Release Assay hingegen konnte keine spezifische Lyse der Endoglin-Peptid-gepulsten RMA-S Zellen durch Milzzellen aus Endoglin-Peptid-vakzinierten C57Bl/6j Mäusen gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden ($p > 0,05$; Mann-Whitney *U* Test; Abb. 9). Die Fähigkeit Endoglin-Peptid-gepulste RMA-S Zellen zu lysieren war bei den Milzzellen der Kontrollgruppe sogar gegenüber der Endoglin-Peptid-vakzinierten Gruppe leicht erhöht.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine prophylaktische DC-Vakzinierung mit vom TSAA Endoglin abgeleiteten Peptiden zwar die *in vivo* Lysisaktivität gegenüber Endoglin-Peptid-präsentierenden Zellen erhöht, das Wachstum von transplantierten Grm1-transgenen Tumoren in C57Bl/6j Mäusen dadurch aber nicht verlangsamt wird.

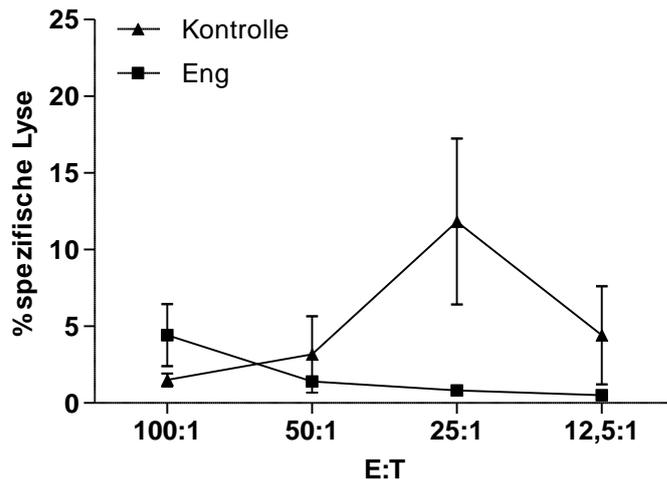


Abb. 9: Lyse von Endoglin-Peptid-gepulsten RMA-S Zellen.

Die prozentuale Lyse von Endoglin-Peptid-gepulsten RMA-S Zellen durch Endoglin-reaktive Milzzellen aus C57Bl/6j Mäusen nach Vakzinierung mit Peptid-gepulsten (Eng: $n = 6$; schwarze Quadrate) oder nicht gepulsten DC (Kontrolle: $n = 8$; schwarze Dreiecke) ist gegen das Effektor:Target Verhältnis (E: Milzzellen; T: RMA-S Zellen) aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM. Für die Berechnung der Zytotoxizität siehe 2.2.5.1.

3.1.2 Prophylaktische Vakzinierung mit H2-K^b-restringierten Fap-Peptiden

3.1.2.1 Tumorwachstum nach prophylaktischer Fap-Peptid-Vakzinierung

Die eher enttäuschenden Ergebnisse der Endoglin basierten Vakzinierung (siehe 3.1.1.), könnten natürlich auf einer geringen Immunogenität von Endoglin begründet sein. Daher wurden analog auch Experimente mit Peptiden des Tumorstroma-assoziierten Antigens Fap durchgeführt. Zunächst wurde dabei der Einfluss einer prophylaktischen Vakzinierung mit H-2K^b-restringierten Fap-Peptiden auf das Tumorwachstum untersucht. Überraschenderweise zeigte sich, dass bei der Fap-Peptid-vakzinierten Gruppe ein gesteigertes Tumorwachstum gegenüber der Kontrollgruppe zu beobachten ist (Abb. 10A). Dieses Ergebnis wurde durch ein weiteres Vakzinierungsexperiment, bei dem drei Tage nach Tumorinduktion eine weitere DC-Vakzinierung erfolgte, bestätigt (Abb. 10B).

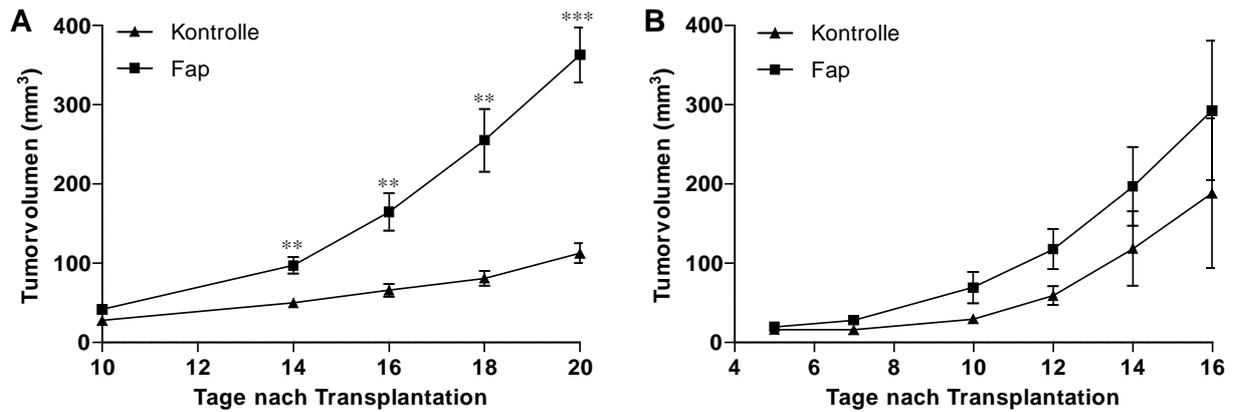


Abb. 10: Wachstum von Grm1-transgenen Tumoren nach prophylaktischer Fap-Peptid-Vakzinierung.

(A) Acht Tage nach der vierten Vakzinierung mit je 1×10^6 Peptid-gepulsten (Fap) oder nicht gepulsten DC (Kontrolle) + $5 \mu\text{g}$ CpG ODN 1826 wurden Grm1-transgene Tumore in C57Bl/6j Mäuse transplantiert (Fap: $n = 8$; Kontrolle: $n = 7$). (B) Acht Tage nach der vierten Vakzinierung mit je 1×10^6 Peptid-gepulsten (Fap) oder nicht gepulsten DC (Kontrolle) + $5 \mu\text{g}$ CpG ODN 1826 wurden Grm1-transgene Tumore in C57Bl/6j Mäuse transplantiert. Drei Tage später wurden die Tiere erneut immunisiert (Fap: $n = 6$; Kontrolle: $n = 4$). Die Tumolvolumina wurden mit der Formel $V = a^2 \times b \times \pi/6$ berechnet, wobei a der größere und b der kleinere Tumordurchmesser ist. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM. **, $p < 0,005$, ***, $p < 0,0001$; Mann-Whitney U Test (Tag 16), ungepaarter zweiseitiger Student's t Test (Tag 14, 18 und 20).

3.1.2.2 Fap-Peptid-Vakzinierung induziert Peptid-reaktive T-Zellen *in vivo*

Als nächstes wurde die *in vivo* und die *in vitro* Lysisaktivität gemessen. Dazu wurden die Tiere an Tag 22 nach Tumortransplantation geopfert und Lymphozyten aus Milz und Herzblut (periphere Blutlymphozyten; PBL) für funktionelle Analysen isoliert.

Beim *in vivo* CFSE Zytotoxizitäts-Assay konnte eine Lyse der CFSE markierten, syngenen, Fap-Peptid-gepulsten Milzzellen beobachtet werden. Diese konnte im Blut und zu einem geringeren Ausmaß auch in der Milz der Fap-Peptid-vakzinierten Tiere nachgewiesen werden. Es konnte jedoch auch bei Kontroll-vakzinierten Tieren eine Lyse der CFSE markierten, syngenen, Fap-Peptid-gepulsten Milzzellen beobachtet werden, allerdings zu einem geringeren Anteil als bei Fap-Peptid-vakzinierten Tieren (Abb. 11).

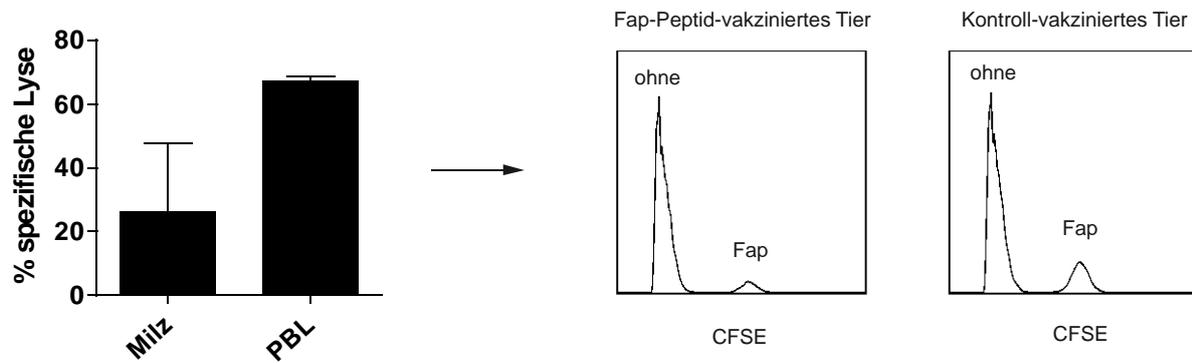


Abb. 11: Lyse von syngenem, Fap-Peptid-gepulsten Milzzellen.

Die prozentuale Lyse von CFSE markierten, syngenem, Fap-Peptid-gepulsten Milzzellen durch Fap-reaktive Zellen aus Milz bzw. PBL aus C57Bl/6j Mäusen nach Vakzinierung mit Peptid-gepulsten DC im Vergleich zu den Kontrolltieren (Milz: $n = 2$; PBL: $n = 2$). Der mittlere Graph zeigt die Lyse der CFSE^{high} markierten, Fap-Peptid-gepulsten Milzzellen aus einer Fap-Peptid-vakzinierten Maus. Der rechte Graph zeigt das Verhältnis von CFSE^{high} markierten, Fap-Peptid-gepulsten Milzzellen und CFSE^{low} markierten, nicht gepulsten Milzzellen aus einer Kontroll-vakzinierten Maus. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM. Für die Berechnung der Zytotoxizität siehe 2.2.5.2.

Beim *in vitro* ⁵¹Chromium Release Assay hingegen konnte kein wesentlicher Unterschied in der spezifischen Lyse der Fap-Peptid-gepulsten RMA-S Zellen durch Milzzellen aus Fap-Peptid-vakzinierten C57Bl/6j Mäusen gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abb. 12).

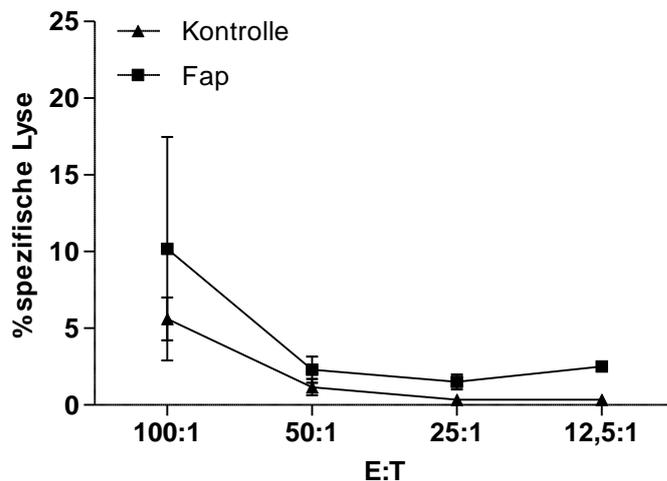


Abb. 12: Lyse von Fap-Peptid-gepulsten RMA-S Zellen.

Die prozentuale Lyse von Fap-Peptid-gepulsten RMA-S Zellen durch Peptid-reaktive Milzzellen aus C57Bl/6j Mäusen nach Vakzinierung mit Peptid-gepulsten (Fap: $n = 6$; schwarze Quadrate) oder nicht gepulsten DC (Kontrolle: $n = 5$; schwarze Dreiecke) ist gegen das Effektor:Target Verhältnis (E: Milzzellen; T: RMA-S Zellen) aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM. Für die Berechnung der Zytotoxizität siehe 2.2.5.1.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine prophylaktische DC-Vakzinierung mit vom TSAA Fap abgeleiteten Peptiden zwar die *in vivo* Lysisaktivität gegenüber Fap-Peptid-präsentierenden Zellen erhöht, aber ein gegenüber der Kontrollgruppe gesteigertes Wachstum von transplantierten Grm1-transgenen Tumoren in C57Bl/6j Mäusen beobachtet werden kann.

Toes und Kollegen konnten ebenfalls ein gesteigertes Tumorstadium nach Peptidvakzinierung in einem murinen Tumormodell beobachten. In diesem Modell wurde das gesteigerte Tumorstadium durch eine Peptid-spezifische Toleranzinduktion in Peptid-reaktiven CTL hervorgerufen [120]. Aus diesem Grund wollten wir durch Etablierung einer Fap-Peptid-reaktiven T-Zelllinie aus dem naiven T-Zell-Repertoire von C57Bl/6j Mäusen überprüfen, ob durch adoptiven Transfer dieser Peptid-reaktiven T-Zellen in tumortragende Tiere analog zur Fap-Peptidvakzinierung ein gesteigertes Tumorstadium zu beobachten ist und die Peptid-induzierten T-Zellen somit eine tumorstadiumfördernde Wirkung haben.

Die Etablierung einer Fap-Peptid-reaktiven T-Zelllinie sollte hierbei durch retrovirale Transduktion mit einem hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*) kodierenden Vektor erreicht werden [121]. Dabei macht man sich zu Nutze, dass manche retrovirale Viruspartikel nur proliferierende Zellen infizieren können [122]. Stimuliert man also naive Lymphozyten mit einem H2-K^b-restringierten Fap-Peptid und gibt anschließend den retroviralen hTERT Vektor zu, so werden nur jene Zellen transduziert, die durch spezifische Bindung des Peptids an ihren TCR aktiviert wurden und auf diesen Stimulus hin proliferieren. Allerdings mussten wir diese Versuchsreihe einstellen, da wir trotz mehrfacher Modifikation des Transduktionsprotokolls keine Fap-Peptid-reaktive T-Zelllinie etablieren konnten.

3.2 Immunsuppressive Mechanismen im Grm1-transgenen Melanom-Modell

Die Entstehung und Progression der Tumore im spontanen Grm1-transgenen LLA-TG-3 Melanom-Modell ähnelt der Melanomentstehung beim Menschen. Aus diesem Grund analysierten wir in diesem Modell Immunantworten im Laufe der Tumorstadiumprogression, um herauszufinden, ob dieses Modell Gemeinsamkeiten mit dem Immunstatus von Melanompatienten zeigt, und somit auch zur präklinischen Testung von immunmodulierenden Therapien geeignet sein könnte.

3.2.1 Zunahme aktivierter T-Zellen in tumortragenden LLA-TG-3 Mäusen *ex vivo*

Wir untersuchten zunächst die Frequenz von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie deren Aktivierungsstatus *ex vivo* in Milz und Lymphknoten von wt und LLA-TG-3 Mäusen mittels Durchflusszytometrie, sowie das Vorhandensein von T-Zell-Infiltraten in LLA-TG-3 Tumoren mittels Immunhistologie. Hierfür wurden die LLA-TG-3 Mäuse in drei Gruppen eingeteilt, nämlich (a) ohne Tumore, (b) niedrige sowie (c) hohe Tumorlast. Die Lymphknoten wurden gemäß ihrer Lokalisation relativ zum Tumorgewebe als tumor-drainierend (tdLN) bzw. als nicht tumor-drainierend (ndLN) eingestuft.

Die immunhistologische Untersuchung der T-Zell-Infiltrate in LLA-TG-3 Tumoren ergab, dass das Tumorgewebe hauptsächlich von CD4⁺ T-Zellen sowie von einigen wenigen CD8⁺ T-Zellen an der Peripherie des Tumorgewebes infiltriert wurde (Abb. 13).

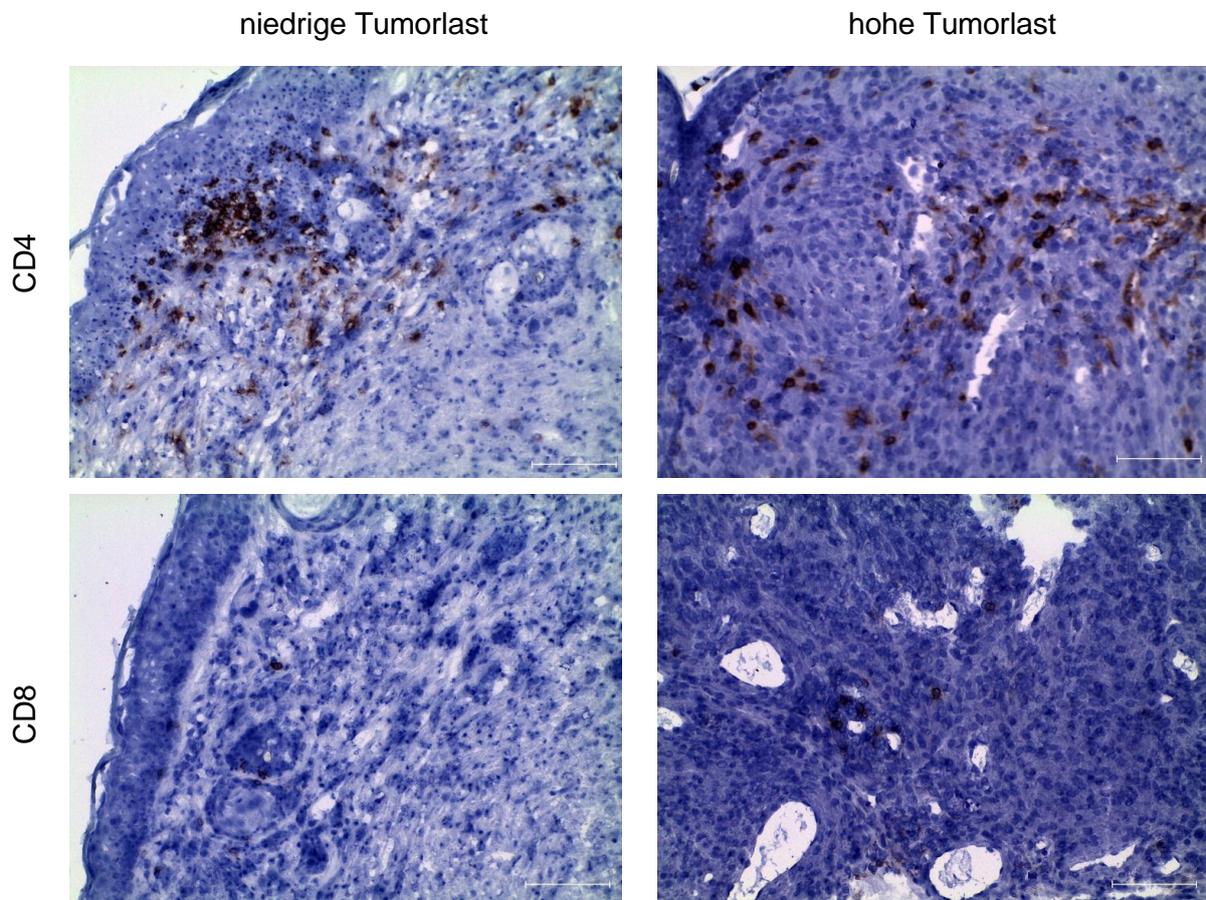


Abb. 13: Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL) in LLA-TG-3 Tumoren.

(A) und (B) zeigen CD4⁺ T-Zellen in LLA-TG-3 Tumoren (rote Färbung); (C) und (D) zeigen CD8⁺ T-Zellen in LLA-TG-3 Tumoren (rote Färbung). Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gefärbt. Maßstab: 100 µm. (A) und (C) niedrige Tumorlast; (B) und (D) hohe Tumorlast.

Als Nächstes wurden die Lymphozytenpopulationen in den peripheren lymphatischen Organen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die für alle durchflusszytometrischen Experimente angewandte Gatingstrategie ist in Abbildung 14 dargestellt.

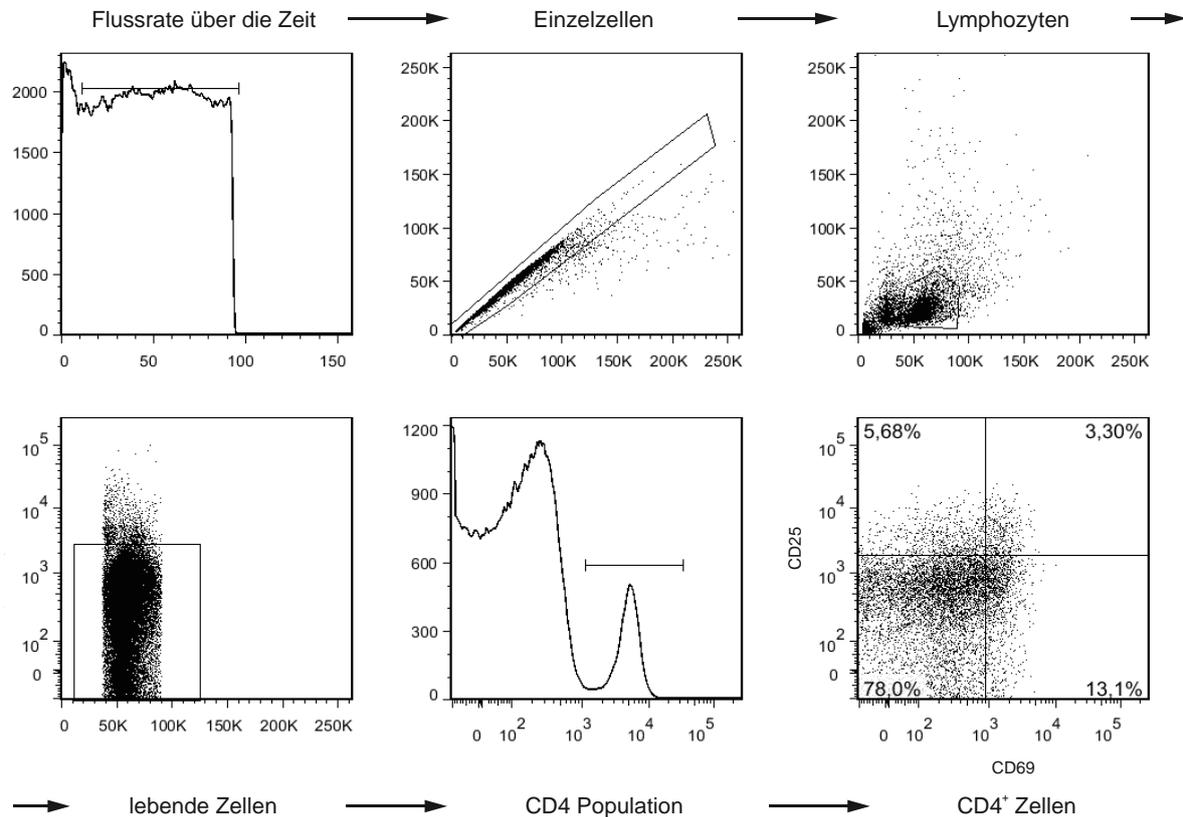


Abb. 14: Gatingstrategie.

Die Frequenz von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zeigte eine ähnliche Verteilung in allen Gruppen (Abb.15A/E). Die Untersuchung des Aktivierungsstatus anhand der beiden Marker CD69 und CD25 ergab jedoch, dass der Anteil an aktivierten T-Zellen in tumortragenden Tieren gegenüber tumorfreien LLA-TG-3 Mäusen *ex vivo* generell erhöht war. Hierbei konnte durch statistischen Vergleich der Gruppe ohne Tumore mit der Gruppe der niedrigen bzw. hohen Tumorlast signifikante Unterschiede festgestellt werden und zwar für CD69⁺ CD4⁺ T-Zellen in der Milz und CD25⁺ CD8⁺ T-Zellen sowie CD69⁺/CD25⁺ CD4⁺ T-Zellen im nicht tumor-drainierenden Lymphknoten (alle $p < 0,05$; Kruskal-Wallis Test).

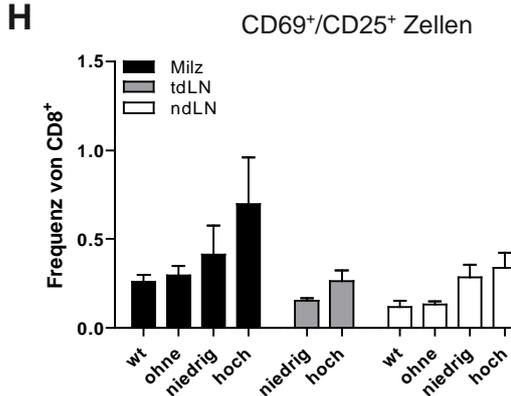
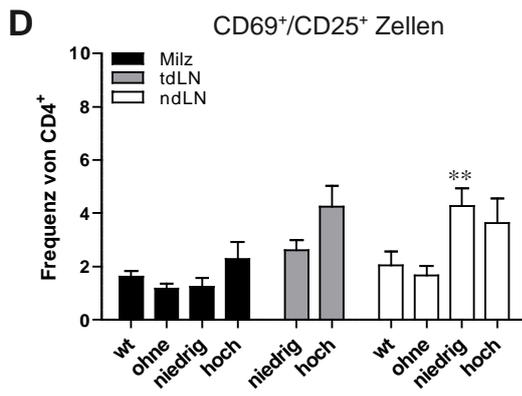
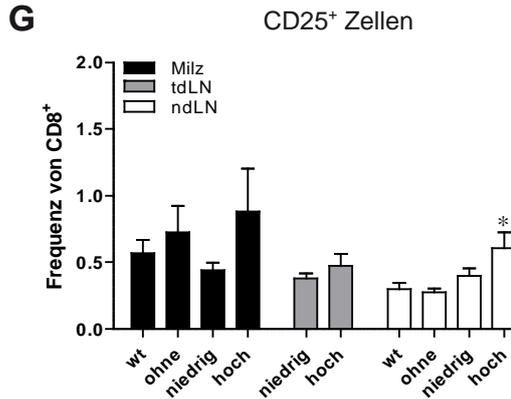
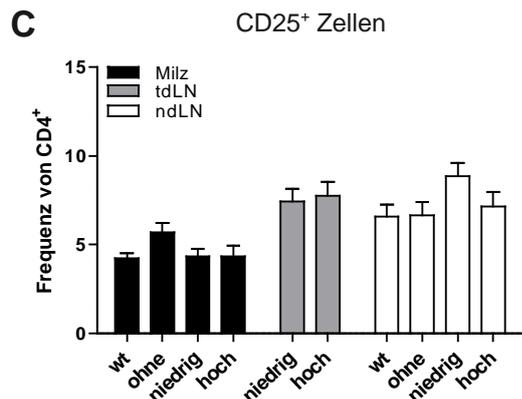
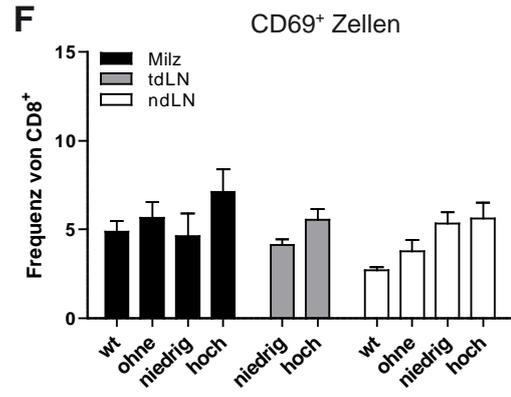
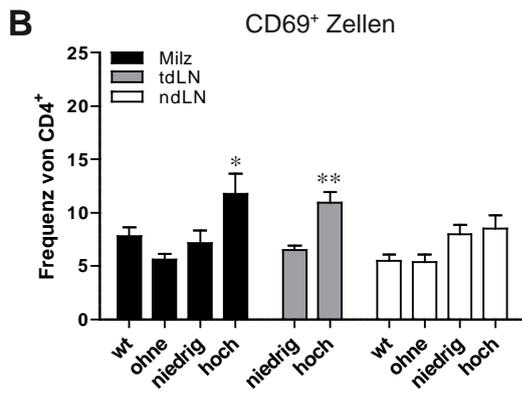
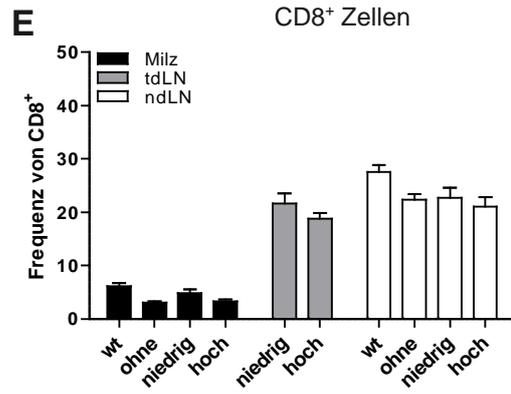
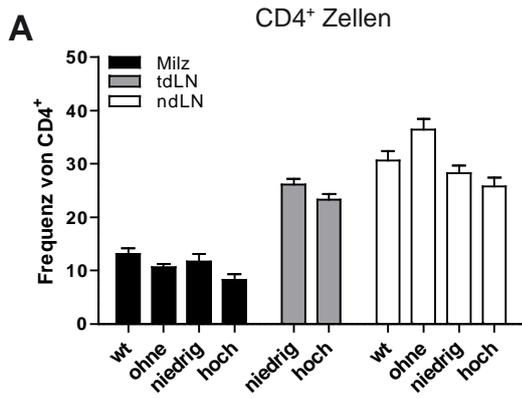


Abb. 15: CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulationen *ex vivo*.

(A - D) Frequenz aktivierter CD4⁺ T-Zellpopulationen in Milz und Lymphknoten von Wildtyp (wt) und LLA-TG-3 Mäusen; (E - H) Frequenz aktivierter CD8⁺ T-Zellpopulationen in Milz und Lymphknoten von wt und LLA-TG-3 Mäusen; $n = 14$ für wt Mäuse; $n = 10$ für LLA-TG-3 Tiere ohne Tumore und LLA-TG-3 Tiere mit niedriger Tumorlast; $n = 13$ für LLA-TG-3 Tiere mit hoher Tumorlast. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$; Kruskal-Wallis Test für Milz und ndLN, ungepaarter Student's t Test für tdLN.

Im Detail war die Frequenz an CD69⁺ CD4⁺ T-Zellen in der Gruppe der hohen Tumorlast höher als in der Gruppe ohne Tumore ($p < 0,05$; Abb. 15B), ebenso der Anteil an CD25⁺ CD8⁺ T-Zellen ($p < 0,05$; Abb. 15G). Die Frequenz an CD69⁺/CD25⁺ CD4⁺ T-Zellen war in der Gruppe der niedrigen Tumorlast höher als bei Tieren ohne Tumore ($p < 0,005$; Abb. 15D; alle *Dunn's Multiple Comparison post-hoc test*). Ebenso war der Anteil an CD69⁺ CD4⁺ T-Zellen im tumor-drainierenden LN der Gruppe der hohen Tumorlast signifikant höher als in der Gruppe der niedrigen Tumorlast ($p < 0,005$; Abb. 15B; ungepaarter zweiseitiger Student's t Test;).

Zusammenfassend konnten wir eine Zunahme an aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten in Milz und Lymphknoten tumortragender Tiere im Vergleich zu tumorfreien LLA-TG-3 Mäusen zeigen.

3.2.2 Verminderte Proliferationskapazität nach Mitogenstimulation mit zunehmender Tumorlast in LLA-TG-3 Mäusen

Nachdem die *ex vivo* T-Zellanalyse eine erhöhte Frequenz aktivierter T-Lymphozyten bei zunehmender Tumorlast gezeigt hatte, untersuchten wir danach die Proliferationskapazität der Lymphozyten von LLA-TG-3 Mäusen. Dafür wurden die Lymphozyten für vier Tage in Medium, welches entweder nur mit IL-2 (500 IU / ml; Kontrollbedingung) oder zusätzlich mit den Stimulatoren PMA (200 nM) bzw. Con A (5 µg / ml) versetzt worden war, kultiviert. Die Proliferation der Zellen wurde mittels eines ³H-Thymidin-Inkorporationsassays gemessen. Die Proliferationsrate wurde relativ zur Proliferationsrate in IL-2-haltigem Medium berechnet. Im Allgemeinen konnte eine stärkere Proliferation unter PMA- als unter Con A-Stimulation beobachtet werden. Die Proliferationsrate in Milzen und nicht tumor-drainierenden LN zeigte bereits einen Trend hin zur reduzierten Proliferation in der Gruppe der hohen Tumorlast (Abb. 16, linke und mittlere Graphik).

In den tumor-drainierenden LN wurde eine signifikante Reduktion der Proliferationskapazität nach PMA- und Con A-Stimulation gegenüber der Gruppe der niedrigen Tumorlast offensichtlich ($p < 0,05$; Mann-Whitney U Test; Abb. 16, *rechte Graphik*). Dies lässt auf eine insbesondere im tumor-drainierenden Lymphknoten wirksame Immunsuppression schließen.

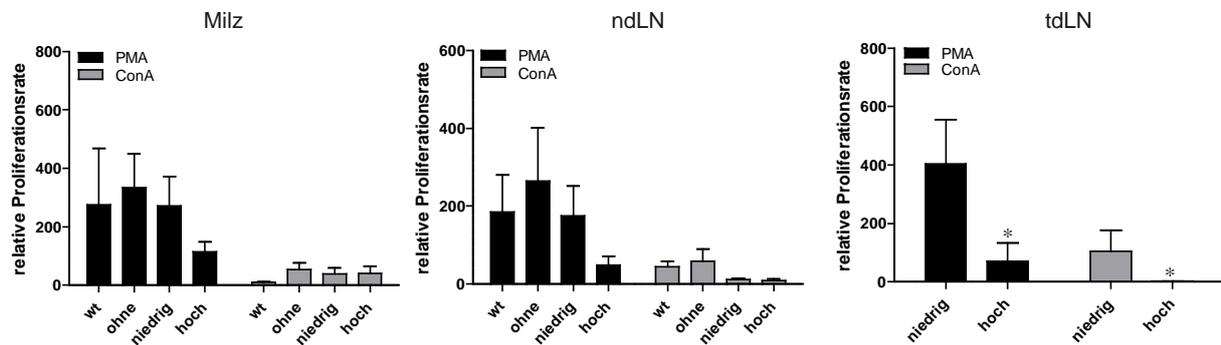


Abb. 16: Proliferation nach Stimulation mit PMA und Con A.

Die Proliferationsrate wurde mittels eines ^3H -Thymidin-Inkorporationsassays nach vier Tagen Inkubation in IL-2 und PMA-haltigem Medium (500 IU / ml IL-2; 200 nM PMA) bzw. in IL-2 und Con A-haltigem Medium (500 IU / ml IL-2; 5 μg / ml Con A) bestimmt; $n = 11$ für wt Mäuse; $n = 9$ für tumorfreie LLA-TG-3 Mäuse und $n = 10$ für LLA-TG-3 Mäuse mit niedriger und hoher Tumorlast. Die Proliferationsrate wurde relativ zur Proliferation in IL-2-haltigem Medium berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM. *, $p < 0,05$; Mann-Whitney U Test.

3.2.3 Verminderte Expression von Aktivierungsmarkern nach Mitogenstimulation mit zunehmender Tumorlast in LLA-TG-3 Mäusen

Um festzustellen, ob die reduzierte Proliferationsrate nach PMA-Stimulation mit einer verminderten T-Zellaktivierung in Zusammenhang steht, analysierten wir den Aktivierungsstatus von T-Lymphozyten nach *in vitro* Stimulation mittels Durchflusszytometrie. Dabei zeigten Lymphozyten, welche in IL-2-haltigem Medium kultiviert wurden, nur geringe Frequenzunterschiede bei CD4^+ und CD8^+ T-Zellen in allen Gruppen (Daten nicht gezeigt). Stimulation mit PMA erhöhte hauptsächlich die Frequenz der CD8^+ T-Zellen, nicht aber die der CD4^+ T-Zellen (Abb. 17A/B). Der Anteil an CD4^+ T-Zellen, welche CD69 und CD25 exprimierten, erhöhte sich allerdings um das bis zu Zehnfache nach PMA-Stimulation in Milzen und Lymphknoten bei allen Gruppen (Abb. 17C).

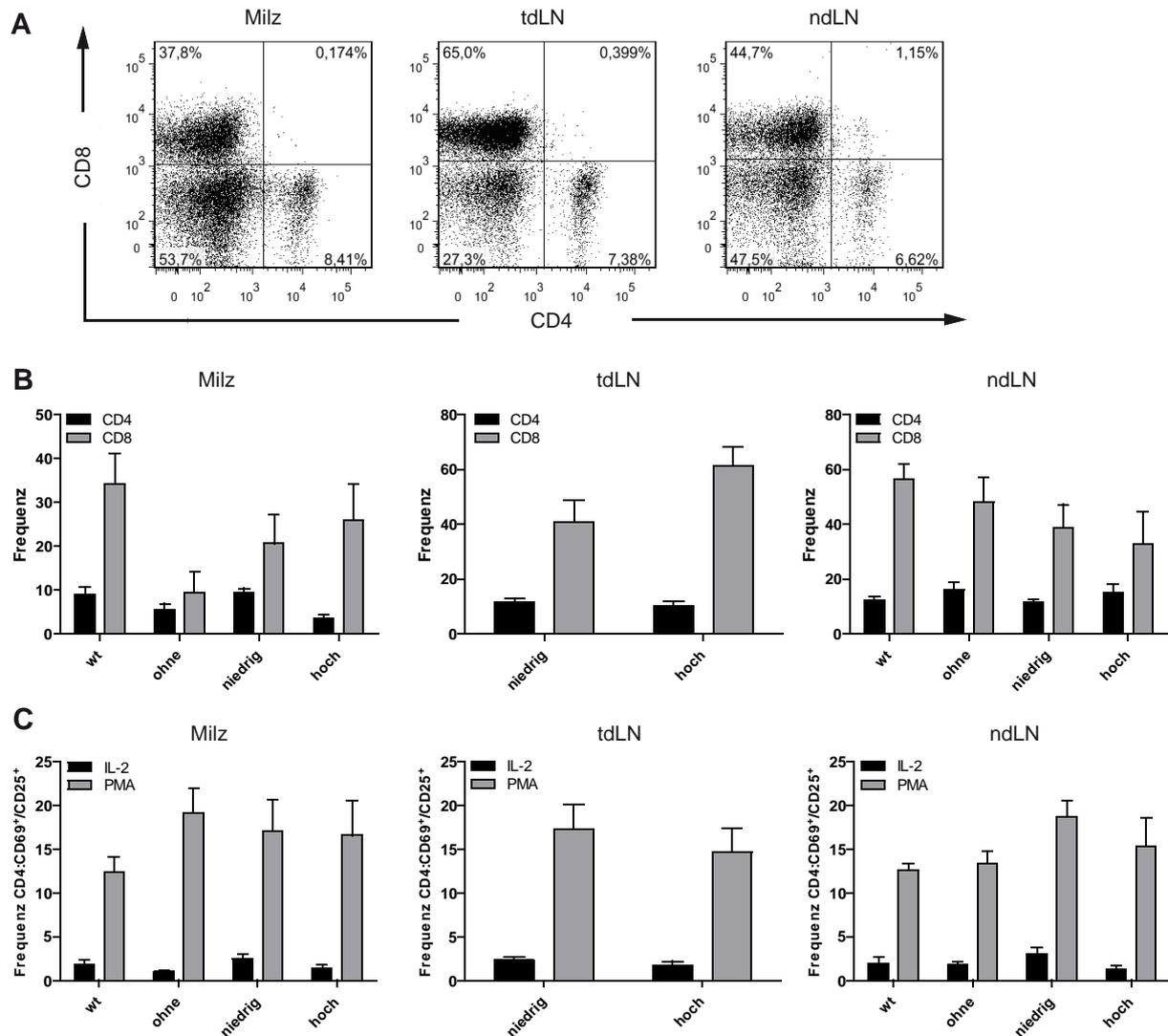


Abb. 17: Frequenz von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach IL-2 und PMA-Stimulation.

(A) Repräsentative Dot plots von CD4 und CD8 Färbungen in Milz, tumor-drainierenden (tdLN) und nicht tumor-drainierenden (ndLN) Lymphknoten einer LLA-TG-3 Maus mit hoher Tumorlast nach IL-2/PMA-Stimulation; (B) Die Frequenz von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen in Milz, tdLN und ndLN von wt und LLA-TG-3 Mäusen nach IL-2/PMA-Stimulation wurde wie in (A) analysiert; (C) Die Frequenz von CD69⁺/CD25⁺ CD4⁺ T-Zellen in Milz, tdLN und ndLN von wt und LLA-TG-3 Mäusen nach IL-2 bzw. IL-2/PMA-Stimulation wurde wie in Abb. 14 gezeigt analysiert; $n = 10$ für wt Mäuse; $n = 6$ für LLA-TG-3 Tiere ohne Tumore und mit niedriger Tumorlast; $n = 8$ für LLA-TG-3 Tiere mit hoher Tumorlast. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM.

Im Gegensatz dazu konnten wir eine signifikante Abnahme von CD69⁺/CD25⁺ CD8⁺ T-Zellen in tumor-drainierenden Lymphknoten (tdLN) der Gruppe der hohen Tumorlast im Vergleich zur Gruppe der niedrigen Tumorlast beobachten ($p < 0,005$; Mann-Whitney U Test; Abb. 18A/B). In Milz und nicht tumor-drainierenden LN nahm die Frequenz an CD8⁺ T-Zellen, welche sowohl CD69 und CD25 exprimierten, nach PMA-Stimulation in allen Gruppen jedoch zu (Abb. 18B).

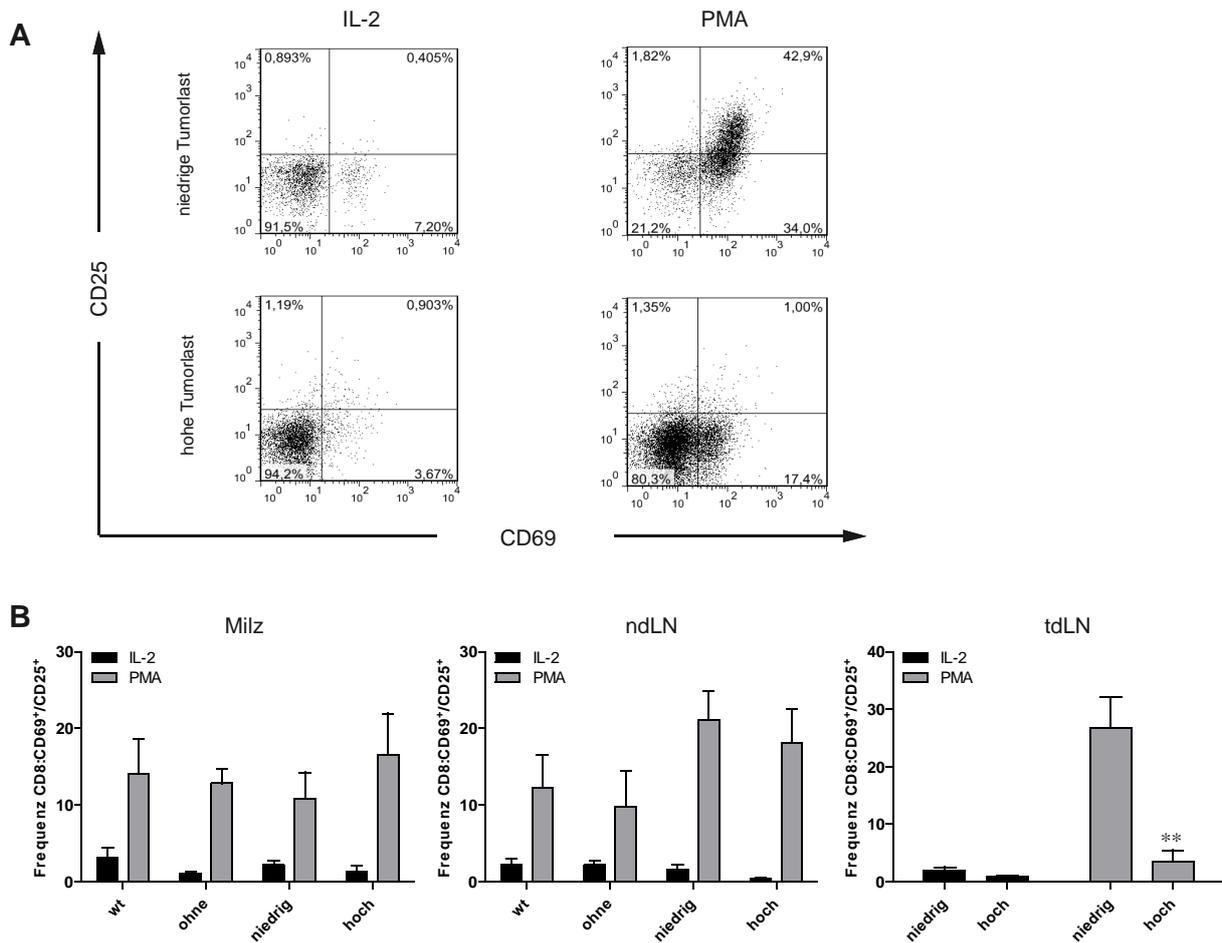


Abb. 18: Frequenz aktivierter CD8⁺ T-Zellen nach IL-2 und PMA-Stimulation.

(A) Repräsentative durchflusszytometrische Analyse von CD8⁺ T-Zellen in tumor-drainierenden LN von LLA-TG-3 Mäusen mit niedriger und hoher Tumorlast nach Stimulation mit IL-2 (500 IU / ml) oder IL-2 und PMA (200 nM). Die Zahlen im oberen rechten Quadranten zeigen den Anteil an CD69⁺CD25⁺ CD8⁺ T-Zellen. (B) Die Frequenz CD69⁺CD25⁺ CD8⁺ T-Zellen in Milz, tdLN und ndLN von wt und LLA-TG-3 Mäusen wurde wie in (A) analysiert; $n = 10$ für wt Mäuse; $n = 6$ für LLA-TG-3 Tiere ohne Tumore und mit niedriger Tumorlast; $n = 8$ für LLA-TG-3 Tiere mit hoher Tumorlast. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM. **, $p < 0,005$; Mann-Whitney U Test.

Zusammenfassend konnten wir eine Hochregulierung der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 in CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten nach *in vitro* Stimulation mit PMA in Milz und Lymphknoten von wt und LLA-TG-3 Mäusen beobachten. LLA-TG-3 Tiere mit hoher Tumorlast zeigten jedoch eine reduzierte Frequenz an aktivierten CD8⁺ T-Zellen in tumor-drainierenden Lymphknoten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die verminderte Proliferationskapazität, welche im tumor-drainierenden Lymphknoten beobachtet wurde, durch eine verminderte Aktivierung von CD8⁺ T-Lymphozyten hervorgerufen wird.

3.2.4 Zunahme regulatorischer T-Zellen ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) in tumortragenden LLA-TG-3 Mäusen *ex vivo*

Regulatorische T-Zellen ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$; T_{regs}) hemmen nicht nur auto-reaktive T-Zellen, um die immunologische Selbsttoleranz aufrechtzuerhalten, sondern auch gegen den Tumor gerichtete Immunantworten im Tumormikromilieu [59]. Da bereits berichtet wurde, dass eine erhöhte Frequenz an T_{regs} in Blut, Tumor und Lymphknoten von Melanompatienten gefunden wurde, und diese die Effektorfunktionen von T-Zellen beeinflussen können [62-64], analysierten wir die Frequenz von T_{regs} in den lymphatischen Organen von wt und LLA-TG-3 Mäusen. In den Milzen konnten wir keine signifikante Änderung der Frequenz an T_{regs} feststellen ($p > 0,05$; *one-way ANOVA Test mit Dunnett's Multiple Comparison post-hoc test* Abb. 19B). Im Gegensatz dazu fanden wir eine signifikant erhöhte Frequenz an $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T-Zellen in den nicht tumor-drainierenden Lymphknoten der tumortragenden Tiere im Vergleich zu den tumorfreien LLA-TG-3 Mäusen ($p < 0,0001$ sowohl für die Gruppe der niedrigen als auch für die Gruppe der hohen Tumorlast im Vergleich zur Gruppe ohne Tumore; *one-way ANOVA Test mit Dunnett's Multiple Comparison post-hoc test*; Abb. 19A/B).

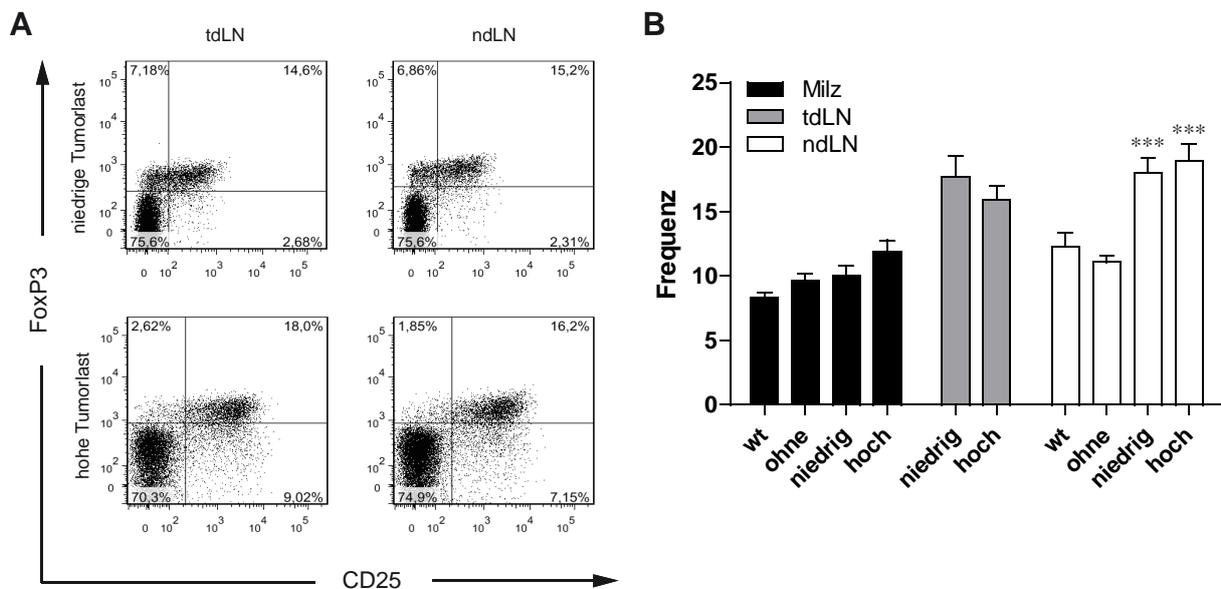


Abb. 19: Frequenz der regulatorischen T-Zellen *ex vivo* ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$).

(A) Repräsentative durchflusszytometrische Analyse von CD4⁺ T-Zellen in tumor-drainierenden (tdLN) und nicht tumor-drainierenden (ndLN) Lymphknoten tumortragender LLA-TG-3 Mäuse. Die Zahlen im oberen rechten Quadranten zeigen den Anteil an CD25⁺FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen. (B) Die Frequenz der regulatorischen T-Zellen in Milz und Lymphknoten von wt sowie LLA-TG-3-Tieren wurde wie in (A) gezeigt *ex vivo* analysiert; $n = 13$ für wt Mäuse; $n = 10$ für LLA-TG-3 Tiere ohne Tumore und Tiere mit niedriger Tumorlast; $n = 11$ für LLA-TG-3 Tiere mit hoher Tumorlast. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM. ***, $p < 0,0001$; *one-way* ANOVA Test.

3.2.5 Erhöhte *Il-10* und *Tgf-β1* mRNA-Expression in LLA-TG-3 Mäusen mit hoher Tumorlast

Da bereits bei der Gruppe der niedrigen Tumorlast die Frequenz an T_{regs} erhöht ist, stellt dies bei diesem Modell ein frühes Ereignis im Laufe der Tumorentstehung dar, welches die verminderte Proliferationskapazität der Lymphozyten bei Tieren mit hoher Tumorlast nicht erklären kann. Aus diesem Grund überprüften wir, ob der immunsupprimierte Status mit der Expression von *Il-10* und *Tgf-β1* zusammenhängen könnte. Tatsächlich ergab die Analyse der *Il-10* und *Tgf-β1* mRNA-Expression mittels qRT-PCR, dass diese in den tumor-drainierenden Lymphknoten der Gruppe der hohen Tumorlast im Vergleich zur Gruppe der niedrigen Tumorlast erhöht waren (Abb. 20A). Im Tumorgewebe hingegen fanden wir eine erhöhte *Tgf-β1* Expression, während *Il-10* nur moderat exprimiert wurde (Abb. 20B). Diese Beobachtung stimmt mit der mRNA-Expression von *Il-10* und *Tgf-β1* in den LLA-TG-3 Tumorzelllinien überein, nämlich einer hohen *Tgf-β1* und einer nur moderaten *Il-10* Expression (Abb. 20B).

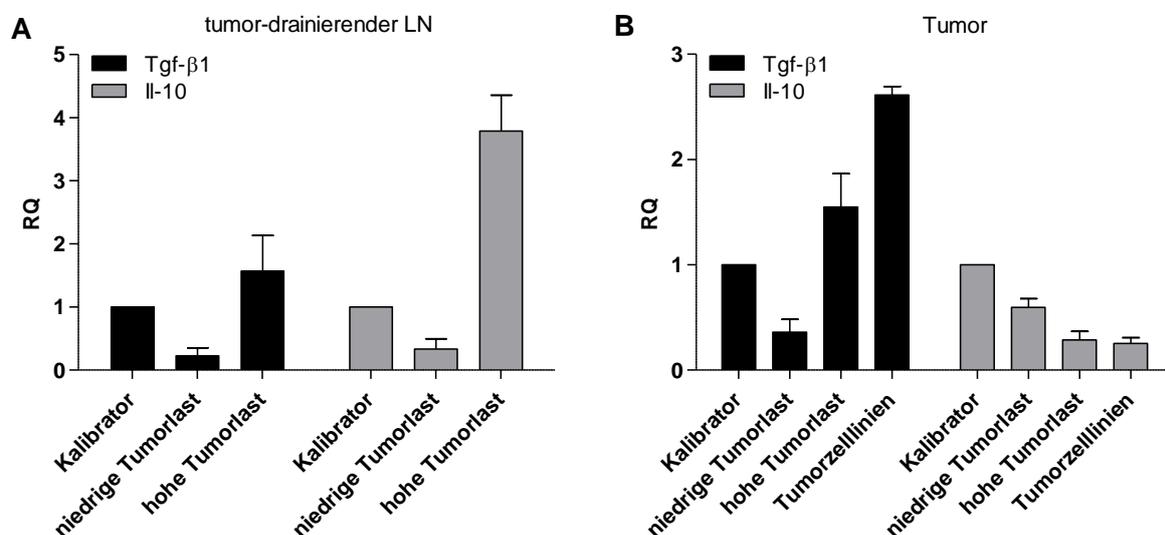


Abb. 20: Relative mRNA-Expression von *Tgf-β1* und *Il-10*.

(A) Die Expressionsrate (RQ) von Tgf- β 1 und Il-10 im tumor-drainierenden LN relativ zum wt LN (Kalibrator) wurde mittels qPCR und cDNA aus Lymphknotenzellen von Wildtyp- und LLA-TG-3 Tieren bestimmt; $n = 1$ für wt LN; $n = 3$ für LLA-TG-3 Tiere mit niedriger Tumorlast; $n = 4$ für LLA-TG-3 Tiere mit hoher Tumorlast. (B) Die Expressionsrate von Tgf- β 1 und Il-10 in Tumorgewebe und Tumorzelllinien relativ zur wt Milz (Kalibrator Tumorgewebe) bzw. zur immortalisierten Melanozytenzelllinie B10.BR (Kalibrator Zelllinien) wurde mittels qPCR und cDNA von B10.BR und der beiden LLA-TG-3 Tumorzelllinien Nu2 und 4046T sowie cDNA aus Tumorgewebe der Gruppe der niedrigen bzw. der hohen Tumorlast (je $n = 3$) bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM.

4 Diskussion

4.1 Immuntherapie mit vom Tumorstroma abgeleiteten Peptiden

Tumore sind komplexe Gewebe, die sich nicht nur aus den Tumorzellen, sondern auch aus der sie umgebenden extrazellulären Matrix (EZM) und den Stromazellen wie Fibroblasten (*cancer-associated fibroblast*; CAF) und Endothelzellen (*tumor endothelial cell*; TEC) zusammensetzen. Diese unterscheiden sich von den Stromazellen der normalen Gewebe durch die Expression von sogenannten Tumorstroma-assoziierten Antigenen (TSAA) und haben durch die Ausschüttung von Zytokinen, proteolytischen Enzymen, Wachstums- und Angiogenesefaktoren großen Einfluss auf die Progression und das Metastasierungspotential des Tumors [67, 68].

In der vorliegenden Arbeit wurden für eine gegen das Tumorstroma gerichtete Immuntherapie die TSAA Endoglin und Fap, welche auf Endothelzellen bzw. Fibroblasten des Tumorstromas induziert bzw. hochreguliert werden, ausgewählt. Um die Auswirkungen einer derartigen Immuntherapie auf das Tumorwachstum und die Induktion Peptid-reaktiver Zellen zu analysieren, wurden prophylaktische DC-Vakzinierungen mit von Endoglin bzw. Fap abgeleiteten Peptiden in C57Bl/6j Mäusen mit transplantierten Grm1-transgenen Tumoren durchgeführt.

Dabei konnte sowohl für Vakzinierungen mit H-2K^b-restringierten Endoglin-Peptiden als auch für Vakzinierungen mit H-2K^b-restringierten Fap-Peptiden *in vivo* eine verstärkte Lyse von syngenem, Peptid-gepulsten Milzzellen im Blut und zu einem deutlich geringeren Anteil auch in der Milz von Peptid-vakzinieren Tieren gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Allerdings konnte *in vitro* nur eine sehr geringe Lyse von Peptid-gepulsten RMA-S Zellen durch Milzzellen Peptid-vakzinierter Tiere beobachtet werden. Ebenso konnte im ELISPOT Assay kein wesentlicher Unterschied in der Zahl der Ifn- γ produzierenden Endoglin-Peptid-reaktiven Lymphozyten aus der Milz zwischen der Endoglin-Peptid-vakzinieren Gruppe und der Kontrollgruppe festgestellt werden.

Die *in vivo* beobachtete Lysisaktivität gegenüber intravenös applizierten syngenem, Peptid-gepulsten Milzzellen zusammen mit gegenüber der Kontrollgruppe unverändertem (Endoglin) bzw. sogar gesteigertem Tumorwachstum (Fap) könnte verschiedene Ursachen haben.

So konnten Kraman und Kollegen in einem transgenen Mausmodell zeigen, dass die Expression von Fap im Tumorstroma großen Einfluss auf die Progression des Tumors hat. In diesem Modell können Fap-exprimierende Stromazellen selektiv depletiert werden, was eine Ifn- γ und *tumor necrosis factor alpha* (Tnf) abhängige Nekrose von Tumor- und Stromazellen induzierter immunogener Lungentumore (Expression des Modell-Antigens Ovalbumin [OVA]) zur Folge hat [123]. Zudem bewirkte die Kombination einer Peptid-Vakzinierung und anschließender Depletion Fap-exprimierender Zellen in einem Pankreasadenokarzinom-Modell eine immunologische Kontrolle des Tumorwachstums [123].

Auch Spiotto und Kollegen berichteten, dass das Tumorstroma großen Einfluss auf eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort hat. Sie konnten zeigen, dass nur jene Tumoren durch Antigen-spezifische T-Zellen abgestoßen werden konnten, welche eine hohe Antigenexpression aufwiesen. Dies war darauf zurückzuführen, dass die Tumorzellen nicht in die tumor-drainierenden Lymphknoten einwandern konnten, in denen die Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen stattfindet. Jedoch konnten Antigen-präsentierende Zellen (APC) bei ausreichender Antigenexpression im Tumor Antigenfragmente aufnehmen und im Lymphknoten diese Antigene zytotoxischen T-Zellen präsentieren (sog. „*cross-presentation*“) [124, 125]. Außerdem zeigten die Autoren, dass Tumorzellen, welche das entsprechende Antigen nicht mehr präsentieren (Antigen-Verlustvarianten), nur indirekt durch Antigen-spezifische T-Zellen getötet werden können, indem diese Tumorstromazellen, welche das Antigen von den Tumorzellen aufgenommen hatten, eliminierten („*bystander elimination*“). Werden die entsprechenden Antigene im Tumorgewebe allerdings nur sehr schwach exprimiert, so kann der Tumor trotz einer Expansion Antigen-spezifischer T-Zellen im Blut weiterwachsen, da die Menge an Antigen nicht ausreicht, um eine effektive Präsentation des Antigens durch Stromazellen im Tumorgewebe zu gewährleisten und die verbleibenden, nicht getöteten Tumorzellen das entsprechende Antigen nicht mehr exprimieren [126]. Zudem berichteten die Autoren in einer weiteren Arbeit, dass eine Zerstörung des Tumors nur durch Kooperation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen erreicht werden konnte [127].

In einem ähnlichen murinen Tumormodell, bei dem der Tumor das Modellantigen Hämagglutinin (HA) exprimierte, konnten Lyman und Kollegen zeigen, dass ein niedrig affiner HA-spezifischer CD8⁺ T-Zellklon nur bei hoher Antigenpräsentation im Tumorgewebe durch im Lymphknoten präsentiertes Antigen aktiviert werden kann.

Allerdings zeigte dieser nur geringe Effektoraktivität und konnte das Tumorwachstum nicht beeinflussen. Erst durch Kotransfer von HA-spezifischen CD4⁺ T Helferzellen konnten diese HA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen das Tumorwachstum einschränken [128].

Die Tatsache, dass sowohl in Endoglin- als auch in Fap-Peptid-vakzinierten Tieren kein Rückgang des Tumorwachstums trotz einer erhöhten Lysisaktivität gegenüber Peptid-präsentierenden Zellen *in vivo* beobachtet werden konnte, könnte also darauf hindeuten, dass Peptid-reaktive Zellen entweder durch immunsuppressive Mechanismen im Tumorstroma an der Tumordinfiltration gehindert oder dort funktionell beeinträchtigt wurden [110, 129]. Da es sich sowohl bei Endoglin als auch bei Fap um Selbstantigene handelt, könnten z.B. regulatorische T-Zellen, die entweder über Zell-Zell-Kontakte oder über Ausschüttung immunsupprimierender Zytokine verhindern, dass auto-reaktive T-Zellen körpereigenes Gewebe zerstören, Endoglin- bzw. Fap-reaktive T-Zellen inhibieren [59, 130]. Tatsächlich wurde analog zu den Ergebnissen von Lyman und Kollegen auch in anderen murinen Vakzinierungsmodellen gezeigt, dass CD4⁺ T-Helferzellen die Expansion und die Tumordinfiltration von Tumor-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zwar begünstigen können, allerdings häufig eine Depletion von regulatorischen CD4⁺ T-Zellen nötig ist, um einen Rückgang des Tumorwachstums zu erzielen [131-133].

Allerdings berichteten Beyer und Kollegen, dass in einer Peptidvakzinierungsstudie mit dem Tumorantigen NY-ESO-1 (Keimbahnantigen) in Melanompatienten Peptid-spezifische, aber nicht Tumor-reaktive CD8⁺ T-Zellklone nachgewiesen werden konnten. So waren diese T-Zellklone zwar in der Lage NY-ESO-1 Peptid-gepulste T2-Zellen (TAP-defiziente humane Zelllinie) zu lysieren, nicht aber Melanomzelllinien, welche NY-ESO-1 exprimieren. Dabei konnten sie zeigen, dass sich die Tumor- und nicht Tumor-reaktiven T-Zellklone in der Expression verschiedener Proteine, welche für die Effektorfunktion wichtig sind, unterscheiden [134].

Zudem wurde auch schon bei anderen Vakzinierungsstudien an metastasierten Melanompatienten gezeigt, dass der Nachweis von Peptid-reaktiven T-Zellen in der Peripherie nicht mit einem klinischen Erfolg korreliert [20, 135]. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Peptid-reaktiven T-Zellen zwar funktionell aktiv sind, aber das Tumorgewebe eine Einwanderung der Lymphozyten verhindert, da es nicht die entsprechenden Chemokinrezeptoren, welche für eine Lymphozyteninfiltration nötig sind, exprimiert [136].

Zudem berichteten Appay und Kollegen, dass in ihrer Vakzinierungsstudie die CD8⁺ TIL sich funktionell von jenen im Blut unterscheiden und zudem ein signifikanter Anstieg von FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen im Tumorgewebe beobachtet werden konnte [110].

Außerdem zeigten Rosenberg und Kollegen, dass bei einer Vakzinierung mit einer Mischung von Peptiden der zwei Melanozytendifferenzierungsantigene gp100 und Tyrosinase, welche unterschiedlich stark immunogen sind, bei Melanompatienten die Induktion Peptid-spezifischer T-Zellen gegenüber einer Vakzinierung mit nur jeweils einem der beiden Peptide vermindert ist [137]. Dies könnte darauf hindeuten, dass auch im Falle der Endoglin- bzw. Fap-Peptide, welche ebenfalls unterschiedliche Affinitäten aufweisen, eine Vakzinierung mit nur einem Peptid oder eine zeitlich gestaffelte Vakzinierung mit jeweils unterschiedlichen Endoglin- bzw. Fap-Peptiden die Induktion Peptid-reaktiver T-Zellen verbessern könnte.

Die Tatsache, dass bei der Endoglin-Peptid-Vakzinierung kein reduziertes Tumorwachstum in entsprechend vakzinierten Tieren gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet werden konnte, könnte auch darauf hindeuten, dass die eingesetzten Endoglin-Peptide nicht ausreichend immunogen sind bzw. einer starken peripheren Toleranz unterliegen. Dies könnte dazu führen, dass Zellen, welche viel Antigen präsentieren (z.B. Peptid-gepulste Zellen) zwar lysiert werden, aber Zellen, welche das Antigen „natürlich“ exprimieren, einer Lyse durch Peptid-reaktive Lymphozyten entgehen können.

So konnten Tan und Kollegen mit einer xenogenen Endoglin-Protein-Vakzinierung, nicht aber mit einer murinen Endoglin-Protein-Vakzinierung, sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch eine Unterdrückung bzw. eine Verlangsamung des Tumorwachstums beobachten [81]. Allerdings konnten Lee und Kollegen mit einem murinen Endoglin-DNA-Vakzin die pulmonale Metastasierung durch Mammakarzinomzellen in einem murinen Modell auch prophylaktisch unterdrücken [82]. In diesem Fall werden nicht *in vitro* etablierte, aktivierte und Peptid-gepulste DC verwendet, sondern die natürlicherweise in den Peyer-Plaques (sekundäre Lymphorgane im Darm) vorkommenden DC werden direkt *in vivo* durch das DNA-Vakzin aktiviert. Dies legt nahe, dass das murine Endoglin tatsächlich nur sehr schwach immunogen ist bzw. einer starken peripheren Toleranz unterliegt, diese aber durch Aktivierung von nicht künstlich etablierten, natürlichen DC *in vivo* überwunden werden kann.

Laouar und Kollegen konnten z.B. zeigen, dass in Stat3-defizienten Mäusen die Entwicklung von konventionellen CD8 α ⁻ bzw. CD8 α ⁺ DC *in vivo* beeinträchtigt ist, nicht aber die *in vitro* Etablierung von DC aus dem Knochenmark [138]. Deshalb repräsentieren die *in vitro* aus dem Knochenmark etablierten DC (GM-CSF/IL-4 DC) möglicherweise nicht die *in vivo* vorkommenden Dendritischen Zellen. Daher könnte es nötig sein, die Etablierung von DC aus dem Knochenmark zu modifizieren, um eine *in vivo* Aktivierung von T-Zellen durch natürliche DC besser zu imitieren, und so effizientere Immunantworten zu induzieren. So konnten Naik und Kollegen durch Kultivierung mit *Fms-Like Tyrosine Kinase 3 (flt3) ligand* DC aus dem Knochenmark etablieren, welche phänotypisch und funktionell äquivalent zu den *in vivo* vorkommenden DC sind [139].

Zudem könnte auch die Gabe der hohen und wiederholten IL-2 Dosen in unserem Vakzinierungsprotokoll statt der erwünschten Expansion der Peptid-reaktiven CD8⁺ T-Zellen eine Beeinträchtigung dieser Zellen zur Folge haben. So berichteten Shrikant und Mescher, dass der Nutzen einer IL-2 Therapie sowohl vom Zeitpunkt als auch der Dauer der IL-2 Gabe abhängt. Da CD8⁺ T-Zellen häufig bereits einige Tage nach Aktivierung die Fähigkeit selbst IL-2 zu produzieren und somit ihre eigene Proliferation aufrechtzuerhalten verlieren (*activation-induced non-responsiveness*; AINR), sind sie auf exogenes IL-2 angewiesen [140]. Shrikant und Kollegen konnten nun zeigen, dass sich in einem murinen Tumormodell die Gabe von IL-2 an Tag 4 und 5 nach adoptiven CD8⁺ T-Zelltransfer positiv auf die Proliferation dieser Zellen und dadurch auch auf die Kontrolle des Tumorwachstums auswirkt. Zudem berichteten sie, dass dieser therapeutische Effekt durch Gabe von IL-2 über sechs Tage nicht verbessert werden konnte, sondern die Apoptose der transferierten CD8⁺ T-Zellen zur Folge hatte [140]. Außerdem berichteten Jackaman und Kollegen, dass in einem murinen Tumormodell bei niedriger, nicht aber bei hoher Tumorlast, die Applikation von IL-2 direkt in den Tumor durch Aktivierung Tumor-spezifischer zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen die Regression des Tumors bewirken kann. Eine intraperitoneale Gabe von IL-2 hatte in diesem Modell jedoch keinen Effekt auf das Tumorwachstum [141]. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Applikation hoher IL-2 Dosen sich möglicherweise auch in unserem Modell negativ auf die Expansion Peptid-induzierter CD8⁺ T-Zellen auswirkt, und damit eine Kontrolle des Tumorwachstums durch diese Zellen negativ beeinflusst werden kann. Daher könnte eine Modifikation der IL-2 Applikation möglicherweise den Erfolg einer Peptid-basierten DC-Vakzinierung verbessern.

Alternativ könnte sich auch ein Einsatz von IL-7 bzw. IL-15 oder eine kombinierte Gabe beider Zytokine positiv auf die Induktion Peptid-reaktiver Zellen durch eine DC-Vakzinierung auswirken. So berichteten Melchionda und Kollegen, dass sich die Gabe von IL-7 und IL-15 sowohl positiv auf Antigen-spezifische CD8⁺ T-Effektor- als auch Gedächtniszellen in immunisierten Mäusen auswirkt [142].

Schließlich kann das Immunsystem selbst auch zur Tumorprogression beitragen. So konnten Lengagne und Kollegen zeigen, dass in einem spontanen murinen Melanom-Modell T-Zellen im Tumorgewebe die tumorpromovierenden Eigenschaften von Gr1⁺CD11b⁺ *myeloid derived suppressor cells* (MDSC) fördern [143]. Zudem beobachteten Kmiecik und Kollegen, dass eine Anti-Tumor Immunantwort in einem murinen Her-2/neu-exprimierenden Mammakarzinom-Modell zur Selektion von Tumorzellen, welche das Antigen nicht mehr exprimieren (Antigen-Verlustvarianten), führt und somit das Wachstum des Tumors fördert [144]. Wie bereits in 3.1.2.2 ausgeführt, konnten wir die Hypothese, ob auch in unserem Modell Fap-Peptid-spezifische T-Zellen tumorpromovierend wirken, nicht überprüfen, da wir nicht in der Lage waren eine solche Fap-Peptid-spezifische T-Zelllinie zu etablieren.

Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass das Wachstum der transplantierten Grm1-transgenen Tumore (mit bereits ausgebildetem Tumorstroma) zu schnell voran schreitet, und die Induktion einer gegen das Tumorstroma gerichteten Immunantwort dem Tumorwachstum quasi „hinterher hinkt“. Allerdings konnten Hwang und Kollegen zeigen, dass ein adoptiver Transfer von gp100-spezifischen T-Zellen in Kombination mit einer gp100-Vakzinierung und IL-2 Gabe zur Regression bereits etablierter B16 Melanome führen kann [145]. Dies deutet darauf hin, dass für eine effektive anti-tumorale Immuntherapie eine durch Vakzinierung induzierte Immunantwort nicht hinreichend sein könnte.

4.2 Immunsuppressive Mechanismen im Grm1-transgenen Melanom-Modell

Die meisten immunmodulierenden Therapieansätze werden präklinisch in Mausmodellen getestet. Allerdings können die am häufigsten verwendeten Transplantationsmodelle, wie z.B. das B16 Melanom-Modell, die Situation im Menschen nur bedingt widerspiegeln, da hierbei klonal expandierte Tumorzellen injiziert werden. Bei Krebspatienten hingegen kommt es im Laufe der Tumorentstehung zu vielfältigen Interaktionen zwischen Tumor und Wirt, welche dem Tumor ein Überleben trotz intakter Immunabwehr ermöglichen [22, 146].

Aus diesem Grund könnten spontane Tumormodelle möglicherweise besser geeignet sein, um die Wirksamkeit von Immuntherapien präklinisch zu überprüfen.

In der vorliegenden Arbeit analysierten wir spontan auftretende Immunantworten im Laufe der Melanomprogression in Grm1-transgenen LLA-TG-3 Mäusen. Die spontane, stufenweise und heterogene Entwicklung von amelanotischen kutanen Melanomen in diesen Mäusen ähnelt der Melanomentstehung beim Menschen. Da alle homozygot Grm1-transgenen LLA-TG-3 Mäuse im Alter von ca. 10 bis 12 Wochen erste Tumorerkrankungen entwickeln, kann man die Tiere nach Alter und Tumormasse in verschiedene Gruppen einteilen und so den Immunstatus dieser Tiere im Verlauf der Tumorentstehung untersuchen.

Wir fanden *ex vivo* eine erhöhte Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 auf T-Lymphozyten in tumortragenden LLA-TG-3 Mäusen im Vergleich zu tumorfreien Tieren. Dies konnte hauptsächlich in nicht tumor-drainierenden Lymphknoten, aber für CD69⁺ CD4⁺ T-Zellen auch in Milzen und tumor-drainierenden Lymphknoten beobachtet werden, was auf eine systemische Immunantwort ausgelöst durch das Tumorstadium hindeutet. Die Tumore selbst wurden hauptsächlich von CD4⁺ T-Zellen infiltriert. Auch bei Melanompatienten findet man eine Infiltration von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Tumorgewebe und eine erhöhte Zahl aktivierter und TA-reaktiver T-Zellen [19, 147, 148].

Aus den vorliegenden Daten können wir nicht zweifelsfrei ableiten, ob die beobachteten Immunantworten gegen den Tumor gerichtet sind oder durch den Tumor ausgelöst werden (tumorinduzierte Entzündung) bzw. die Tumorentstehung sogar fördern [149]. Allerdings wird eine Messung von spontanen Tumor-spezifischen Immunantworten dadurch erschwert, dass man z.B. um die Produktion von Ifn- γ durch Tumor-spezifische T-Zellen im ELISPOT Assay messen zu können, die Zellen mit Peptiden stimulieren muss. Dies bedeutet wiederum, dass man bei Stimulation der T-Zellen mit schon bekannten Tumor-spezifischen MHC Klasse I-restringierten Peptiden möglicherweise keine Immunantworten messen kann. Dennoch könnten Tumor-spezifische T-Zellen vorhanden sein, welche aber eine unbekannte Antigen-spezifität aufweisen. Zudem könnte die absolute Zahl eines T-Zellklons, welcher ein Selbstantigen wie z.B. Trp-2 erkennt, auch so gering sein, dass man ihn *ex vivo* nicht nachweisen kann [150]. Außerdem können auch periphere Toleranzmechanismen wie die Induktion von regulatorischen T-Zellen die Aktivierung und Expansion von CTL, welche Selbstantigene erkennen, verhindern und so die Messung spontaner TA-spezifischer Immunantworten erschweren [59].

Interessanterweise waren die Lymphozyten aus tumortragenden Mäusen *in vitro* in ihrer Proliferationskapazität nach PMA-Stimulation eingeschränkt. Die Analyse der aktivierten T-Zellpopulationen nach *in vitro* Stimulation zeigte eine signifikante Abnahme der aktivierten CD8⁺ T-Zellen in tumor-drainierenden Lymphknoten der hohen Tumorlastgruppe. Im Gegensatz dazu war die Expression von Aktivierungsmarkern in der Milz und den nicht tumor-drainierenden LN nach PMA-Stimulation in allen Gruppen vergleichbar. Diese Ergebnisse legen eine aktive Immunsuppression durch den Tumor selbst oder durch tumorinduzierte regulatorische Mechanismen nahe und stimmen ebenfalls mit dem immunsupprimierten Status von Lymphozyten im Tumorgewebe, in den tumor-drainierenden LN und/oder peripherem Blut von Krebspatienten überein [151-155]. Russ und Kollegen berichteten zudem, dass in Mäusen mit B16F10 Tumoren eine Hemmung der T-Zellproliferation unabhängig von der Antigenpezifität der T-Zellen beobachtet werden konnte [156].

Die Fähigkeit des Immunsystems, Pathogene und maligne Zellen zu erkennen und zu zerstören, sowie die Fähigkeit der T-Zellen auf Mitogenstimulation zu reagieren, nimmt auch bei gesunden Tieren und Menschen im Laufe des Lebens ab („*immune senescence*“) [157-159]. Die Ergebnisse der PMA-Stimulation machen eine altersabhängige Beeinträchtigung des Immunsystems in den tumortragenden Tieren jedoch unwahrscheinlich: Einerseits exprimierten die Lymphozyten aus den nicht tumor-drainierenden Lymphknoten nicht aber jene aus den tumor-drainierenden Lymphknoten der Tiere mit hoher Tumorlast Aktivierungsmarker nach PMA-Stimulation, andererseits erhielten wir auch bei Auswahl von altersgleichen Wildtyp- sowie LLA-TG-3 Mäusen mit niedriger und hoher Tumorlast dieselben Ergebnisse wie für alle Tiere (Daten nicht gezeigt).

Eingeschränkte T-Zell-Effektorfunktionen werden häufig mit einer erhöhten Frequenz an regulatorischen T-Zellen in tumor-drainierenden LN und Tumorgewebe in Zusammenhang gebracht [56, 62]. Natürliche vom Thymus abstammende CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen (nT_{regs}) wurden in den vergangenen Jahren intensiv untersucht und ihre entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der peripheren Selbst-Toleranz beschrieben [130]. Da viele Tumorantigene auch Selbstantigene sind (z.B. das Differenzierungsantigen TRP-2), können Tumore auf diese Weise der Kontrolle des Immunsystems entgehen, indem sie nT_{regs} rekrutieren oder naive bzw. Effektor T-Zellen durch Ausschüttung von IL-10 und TGF-β1 zu sogenannten induzierten regulatorischen T-Zellen (iT_{regs}) „umprogrammieren“ [53, 55].

Vor kurzem wurde auch berichtet, dass die Abwesenheit der *gamma-IFN-inducible lysosomal thiol reductase* (GILT), welche in der MHC II-restringierten Prozessierung involviert ist, zu einer Erhöhung von *tyrosinase-related protein 1* (Trp-1) spezifischen T_{regs} und einer Toleranzinduktion von Trp-1-spezifischen T-Zellen führt [160]. Tatsächlich konnten wir zeigen, dass die Frequenz an CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen in den Lymphknoten der tumortragenden LLA-TG-3 Mäusen im Vergleich zu den tumorfreien LLA-TG-3 Mäusen erhöht war. Dies stimmt auch mit der Situation in Krebspatienten überein, nämlich einer erhöhten Frequenz an T_{regs} in tumor-drainierenden Lymphknoten [61, 62, 66].

Da der Anteil an regulatorischen T-Zellen bereits bei Tieren der Gruppe der niedrigen Tumorlast erhöht ist und diese Tiere keine verminderte Expression von Aktivierungsmarkern oder eine eingeschränkte Proliferationskapazität nach Mitogenstimulation zeigen, kommen diese als alleinige Ursache der beobachteten Immunsuppression in diesem Modell nicht in Frage. Zudem konnten Zhou und Kollegen zeigen, dass sich aktivierte T-Zellen und Tumorzellen im Laufe der Tumorprogression wechselseitig beeinflussen. So führt eine frühe Aktivierung der T-Zellen zur Selektion von Tumorzellen, welche nur wenig Antigen präsentieren und letztendlich zur Induktion von Toleranz in den aktivierten T-Zellen [161].

Da die beobachtete Immunsuppression in den LLA-TG-Mäusen nicht nur mit der erhöhten Frequenz an T_{regs} zusammenhängen kann, untersuchten wir die Expressionslevel von Il-10 und Tgf-β1 in den tumor-drainierenden LN und Tumoren der LLA-TG-3 Mäuse, da diese Zytokine sowohl mit der Melanomentstehung als auch der Induktion von regulatorischen T-Zellen in Zusammenhang gebracht werden [33, 53, 55, 162].

Tatsächlich konnten wir eine erhöhte Il-10 und Tgf-β1 mRNA-Expression in den tumor-drainierenden LN der LLA-TG-3 Mäuse nachweisen. In den Tumoren hingegen war nur die Tgf-β1 Expression erhöht. Dasselbe Expressionsmuster, nämlich eine hohe Tgf-β1 mRNA-Expression gepaart mit einer nur moderaten Expression von Il-10, fanden wir ebenfalls bei den LLA-TG-3 Tumorzelllinien. Diese Ergebnisse lassen eine komplexere Regulation der Il-10 Expression in diesem Melanom-Modell vermuten und legen einen Tgf-β1 und/oder Il-10-abhängigen *immune escape* Mechanismus im Tumormikromilieu dieser Mäuse nahe, der auch Lymphozyten im tumor-drainierenden Lymphknoten beeinflusst. Außerdem bestätigen sie ebenfalls frühere Berichte über TGF-β1 und/oder IL-10 abhängige *immune escape* Mechanismen bei Melanompatienten: So konnten Steinbrink und Kollegen zeigen, dass eine Kultivierung von DC in IL-10-haltigem Medium zur Anergie Melanomantigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen führt [45].

Eine Vorbehandlung von Melanomzellen mit IL-10 bewirkt ebenfalls eine verminderte Lyse durch Tumorantigen-spezifische CTL [46]. Außerdem zeigten Ahmadzadeh und Kollegen, dass TGF- β 1 die Effektorfunktionen humaner gp100-spezifischer CD8⁺ Gedächtnis T-Zellen negativ beeinflusst [163]. Zudem fanden Lee und Kollegen eine erhöhte IL-10 mRNA-Expression in tdLN von Melanompatienten [164]. Polak und Kollegen wiesen ebenso eine erhöhte IL-10 sowie TGF- β 1 mRNA-Expression in tdLN von Melanompatienten nach [165].

Eine Beeinträchtigung der gegen den Tumor gerichteten Immunantwort wird auch bei anderen Tumorentitäten wie dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom und dem Leberkarzinom mit erhöhter IL-10- und/oder TGF- β 1-Expression in Verbindung gebracht [31, 37, 166-168]. Darüber hinaus können sowohl TGF- β 1 als auch IL-10 Lymphozyten direkt negativ beeinflussen: Es konnte gezeigt werden, dass TGF- β 1 direkt die Expression von zytotoxischen Genen in CTL zu unterdrücken vermag [52] und IL-10 die T-Zellproliferation durch Hemmung des CD28 Signalwegs beeinflussen kann [47]. Jedoch wurde die Produktion dieser immunsupprimierenden Zytokine nicht nur in Tumorzellen, sondern auch in tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) nachgewiesen [169], eine Beobachtung die auch durch unsere Ergebnisse gestützt wird. So fanden wir sowohl im Tumorgewebe, welches sowohl von CD4⁺ als auch von CD8⁺ T-Zellen infiltriert wurde, als auch bei Lymphozyten im tumor-drainierenden Lymphknoten der LLA-TG-3 Mäuse eine erhöhte Expression dieser Zytokine.

All diese Ergebnisse eröffnen verschiedene mögliche Erklärungen für den beobachtenden immunsupprimierten Status in den tumor-drainierenden Lymphknoten dieser Mäuse: (i) Vom Tumor freigesetztes Tgf- β 1 könnte aktiv die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen in LN unterdrücken und/oder (ii) Tgf- β 1 und Il-10 in tumor-drainierenden LN könnten regulatorische T-Zellen oder andere regulatorische Leukozyten induzieren, welche die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen durch direkten Zell-Zell Kontakt oder durch Freisetzung weiterer immunsuppressiver Zytokine verhindern könnten oder (iii) Il-10 könnte die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen durch Suppression von APC mittels Herunterregulierung bzw. Hemmung der Expression von B7 (keine Kostimulation) oder MHC Klasse II Molekülen (verringerte Th1 Antwort) verhindern (siehe Abb. 21) [42, 43].

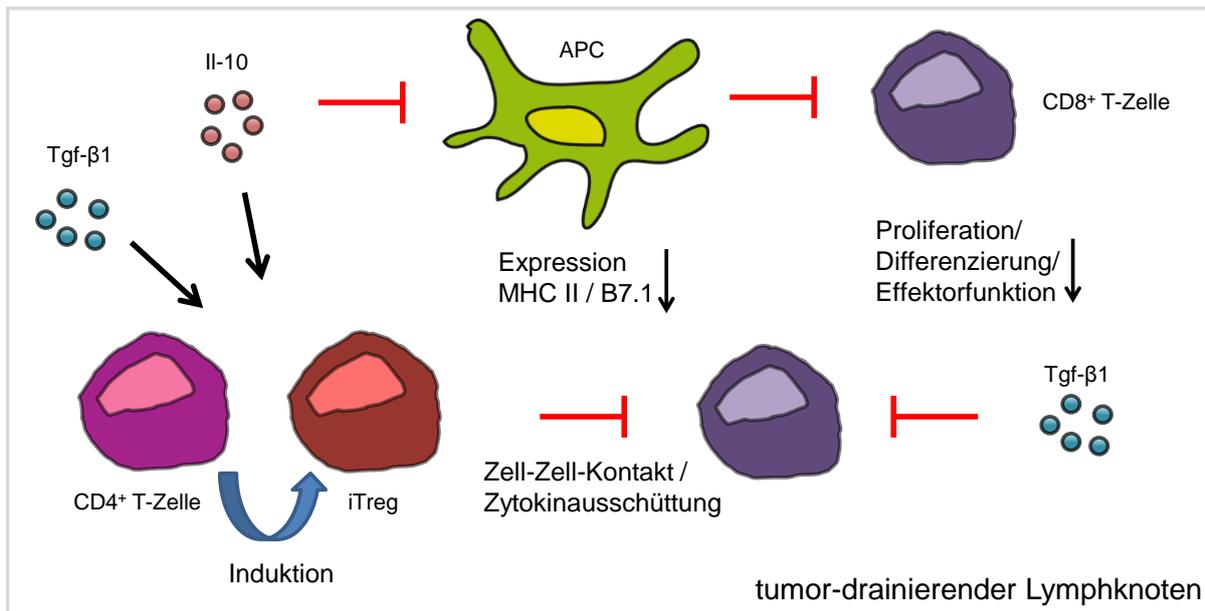


Abb. 21: Mögliche Auswirkungen der Il-10 und Tgf-β1 Expression auf eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort im tdLN bei LLA-TG-3 Mäusen.

Zusammengefasst konnten wir zeigen, dass in Grm-1-transgenen LLA-TG-3 Mäusen im Laufe der Melanomentstehung sowohl zelluläre als auch zytokinabhängige Mechanismen mit dem immunsupprimierten Status tumortragender Tiere assoziiert sind. Wir konnten hierbei viele Gemeinsamkeiten zum immunsupprimierten Status in Melanompatienten, wie z.B. die funktionelle Beeinträchtigung von T-Lymphozyten, erhöhte Anzahl an T_{regs} und starke Il-10- sowie Tgf-β1-Expression in den tumor-drainierenden Lymphknoten zeigen. Deshalb scheint dieses Melanom-Modell zur Überprüfung immunologischer Therapieansätze in einem präklinischen Rahmen geeignet zu sein.

4.3 Ausblick

4.3.1 Immuntherapie mit vom Tumorstroma abgeleiteten Peptiden

Prinzipiell könnte man entweder durch Modifikation des Vakzinierungsprotokolls selbst und/oder durch Kombination mit anderen Immuntherapeutika versuchen, eine erhöhte bzw. effizientere Induktion von Endoglin- bzw. Fap-reaktiven T-Zellen, und somit möglicherweise auch eine Regression der Tumore zu erreichen. Wie bereits angedeutet, könnte sowohl eine modifizierte Etablierung der DC aus dem Knochenmark sowie die Auswahl nur eines Peptids für die Vakzinierung die Induktion Peptid-spezifischer T-Zellen verbessern.

Zudem berichteten Bijker und Kollegen, dass eine Vakzinierung mit 30 Aminosäuren langen Peptiden (statt der üblichen acht bis neun Aminosäuren) zusammen mit CpG ODN 1826 (TLR-9 Agonist) die Induktion von Anti-Tumor Immunantworten deutlich verbessern kann [170]. Außerdem könnte auch eine gleichzeitige Vakzinierung mit MHC Klasse II-restringierten Peptiden, welche Antigen-spezifische CD4⁺ T-Helferzellen induzieren können, die Induktion und Expansion von Endoglin- bzw. Fap-spezifischen CD8⁺ T-Zellen erhöhen. Man könnte ebenfalls, wie bereits beschrieben, die Gabe von IL-2 anpassen bzw. durch eine Gabe von IL-7 und/oder IL-15 ersetzen. Im Falle von Endoglin könnte man auch parallel dazu die Verwendung eines DNA-Vakzins (Aktivierung der DC direkt *in vivo*) in Betracht ziehen, um periphere Toleranzmechanismen zu durchbrechen. Hier bietet sich natürlich auch die Kombination mit einer Depletion regulatorischer T-Zellen bzw. der Gabe eines anti-CTLA-4 Antikörpers an. Auch die Gabe eines anti-CD137 Antikörpers könnte einer Toleranzinduktion von Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen entgegen wirken [171, 172]. Alle diese Ansätze müssen aber noch in entsprechenden vorausgehenden Experimenten getestet werden.

4.3.2 Immunsuppressive Mechanismen im *Grm1*-transgenen Melanom-Modell

Im *Grm1*-transgenen Melanom-Modell könnten neben den in 4.2 beschriebenen Mechanismen auch andere Zelltypen und/oder Zytokine an der beobachteten Immunsuppression beteiligt sein. So könnten z.B. Gr1⁺CD11b⁺ *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) [173] oder CD8⁺CD122⁺ T-Zellen (regulatorische CD8⁺ T-Zellen) zum immunsupprimierten Status der tumor-drainierenden Lymphknoten in diesem Modell beitragen. Für letztere wurde berichtet, dass sie die IFN- γ Produktion und Proliferation von CD8⁺CD122⁻ T-Zellen IL-10 abhängig inhibieren können [174]. Zudem könnte auch die Expression des Tryptophan abbauenden Enzyms *indoleamine 2,3 dioxygenase* (IDO) zum immunsupprimierten Status der tumortragenden *Grm1*-transgenen Tiere beitragen [175]. Dies müsste in weiteren Experimenten noch untersucht werden.

5 Zusammenfassung

5.1 Immuntherapie mit vom Tumorstroma abgeleiteten Peptiden

Tumore bestehen nicht nur aus Tumorzellen, sondern auch aus der sie umgebenden extrazellulären Matrix (EZM), und Stromazellen wie Fibroblasten (*cancer-associated fibroblast*; CAF) und Endothelzellen (*tumor endothelial cell*; TEC). Diese Stromazellen haben durch die Ausschüttung von Zytokinen, proteolytischen Enzymen, Wachstums- und Angiogenesefaktoren einen entscheidenden Einfluss auf die Tumorprogression. Sie unterscheiden sich von den Stromazellen der normalen Gewebe durch die Expression von sogenannten Tumorstroma-assoziierten Antigenen (TSAA). Damit sollten Therapien, die auf TSAA abzielen, universell einsetzbar und weniger anfällig gegenüber Resistenzentwicklungen (*immune escape* Mechanismen) sein, da Stromazellen im Gegensatz zu neoplastischen Zellen genetisch relativ stabil sind. Für eine Immuntherapie mit vom Tumorstroma abgeleiteten Peptiden wählten wir die TSAA Endoglin und Fap, welche während der Wundheilung und im Tumorstroma induziert werden. Dabei sollte überprüft werden, ob prophylaktische Vakzinierungen in C57Bl/6j Mäusen Peptid-reaktive T-Zellen induzieren können, und das Wachstum von transplantierten Grm1-transgenen Tumoren reduziert werden kann. In der Tat konnten wir sowohl bei Endoglin- als auch bei Fap-Peptid-vakzinieren Tieren *in vivo* Peptid-reaktive Lymphozyten im Blut und zu einem geringeren Anteil auch in der Milz nachweisen, welche Peptid-gepulste syngene Milzzellen lysieren konnten. Allerdings konnte in beiden Fällen keine Reduktion des Tumorwachstums gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet werden. Bei der Fap-Peptid-vakzinieren Gruppe war das Tumorwachstum gegenüber der Kontrollgruppe sogar gesteigert. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Induktion Fap-Peptid-reaktiver T-Zellen tumorpromovierend wirkt. Möglicherweise könnte aber durch eine Modifikation des Vakzinierungsprotokolls bzw. durch eine Kombination mit anderen Immuntherapeutika ein verbessertes Ansprechen auf eine Endoglin bzw. Fap basierte Immuntherapie erzielt werden.

5.2 Immunsuppressive Mechanismen im Grm1-transgenen Melanom-Modell

Grm1-transgene Mäuse entwickeln spontan kutane Melanome. Dieses Modell erlaubte es uns in der vorliegenden Arbeit spontane Immunantworten im Laufe der Melanomentstehung zu untersuchen. Hierfür analysierten wir sowohl *ex vivo* als auch *in vitro* aus Milz und Lymphknoten gewonnene Lymphozyten von Mäusen, welche keine Tumorerkrankungen bzw. eine niedrige oder hohe Tumorerkrankung aufwiesen. Dabei konnten wir *ex vivo* einen Anstieg der Frequenz aktivierter CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten mit zunehmender Tumorerkrankung zeigen. Bei tumortragenden Tieren exprimierten jedoch hauptsächlich CD4⁺ T-Zellen Aktivierungsmarker nach *in vitro* Stimulation. Interessanterweise waren diese Zellen tumortragender Tiere auch funktionell beeinträchtigt, was sich in einer verminderten Proliferationskapazität nach *in vitro* Stimulation zeigte. Weitere Analysen ergaben, dass die erhöhte Frequenz regulatorischer T-Zellen bei tumortragenden Tieren ein frühes Ereignis im Laufe der Tumorentstehung ist. Gleichzeitig konnte auch ein starker Anstieg der immunsupprimierenden Zytokine Tgf-β1 und Il-10 sowohl in den Lymphknoten als auch im Tumorgewebe beobachtet werden. Dabei war die Tgf-β1-Expression sowohl im Tumor als auch im tumor-drainierenden Lymphknoten erhöht, während Il-10 im Tumor nur moderat exprimiert wurde, was eine komplexere Regulation der Il-10-Expression nahe legt. Dies bedeutet, dass in Grm1-transgenen Mäusen ähnlich wie auch bei Melanompatienten zelluläre und zytokinabhängige Mechanismen zur Tumorentstehung beitragen und dieses Modell daher geeignet ist, um präklinisch immunmodulierende Therapieansätze zu testen.

6 Summary

6.1 Immunotherapy with peptides derived from tumor stroma-associated antigens

Tumors do not only comprise tumor cells but also stromal cells like fibroblasts (cancer-associated fibroblast; CAF) and endothelial cells (tumor endothelial cell; TEC) and the surrounding extracellular matrix (ECM). These stromal cells impact on progression and invasion of tumors through release of cytokines, ECM-degrading enzymes, growth factors, and angiogenic factors. They differ from their normal counterparts through expression of so-called tumor stroma-associated antigens (TSAA). Therefore, therapies targeting the tumor stroma should be universally applicable. Furthermore, such therapies should be less prone to resistance mechanisms as stromal cells are genetically more stable than neoplastic cells. We selected the TSAA Endoglin and Fap, which are both specifically induced during wound healing and in the tumor stroma, to test if vaccination with peptides derived from these TSAA induced peptide-reactive T cells, and could reduce the growth of transplanted Grm1-transgenic tumors in C57Bl/6j mice in a prophylactic setting. In mice vaccinated with Endoglin- and Fap-peptides, respectively, peptide-reactive lymphocytes from peripheral blood and spleen were able to lyse peptide-loaded syngeneic splenocytes *in vivo*. However, vaccination with Endoglin- and Fap-peptides, respectively, did not affect the growth of transplanted Grm1-transgenic tumors. In fact, tumor growth was enhanced in Fap-peptide-vaccinated mice compared to the control group. This suggests that Fap-peptide-reactive T-cells promote tumor progression. Modification of the vaccination protocol or a combination with an immune-modulatory therapy could, however, increase the efficacy of an anti-Endoglin or anti-Fap therapy, respectively.

6.2 Immunosuppressive mechanisms of Grm1-transgenic murine melanoma

Grm1-transgenic mice spontaneously develop cutaneous melanoma. This model allowed us to scrutinize the generic immune responses over the course of melanoma development. To this end, lymphocytes obtained from spleens, unrelated lymph nodes and tumor-draining lymph nodes of mice with no evidence of disease, low or high tumor burden were analyzed *ex vivo* and *in vitro*. Thereby, we could demonstrate an increased frequency of activated CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in the respective organs with increasing tumor burden. However, mainly CD4⁺ T cells, which could constitute both T helper as well as immune suppressive regulatory T cells, but not CD8⁺ T cells expressed activation markers upon *in vitro* stimulation when obtained from tumor-bearing mice. Interestingly, these cells from tumor-burdened animals were also functionally hampered in their proliferative response when subjected to strong *in vitro* stimulation. Further analyses revealed that the increased frequency of regulatory T cells in tumor-bearing mice is an early event present in all lymphoid organs. Additionally, expression of the immunosuppressive cytokines Tgf-β1 and Il-10 became more evident with increased tumor burden. Notably, Tgf-β1 is strongly expressed in both the tumor and the tumor-draining lymph node, whereas Il-10 expression is more pronounced in the lymph node, suggesting a more complex regulation of Il-10. Thus, similar to the situation in melanoma patients both cytokines as well as cellular immune escape mechanisms seem to contribute to the observed immune suppressed state of tumor-bearing Grm1-transgenic mice, suggesting that this model is suitable for preclinical testing of immune-modulatory therapies.

7 Literaturverzeichnis

1. Houghton AN, Polsky D (2002) Focus on melanoma. *Cancer Cell* 2: 275-278
2. Skender-Kalnenas TM, English DR, Heenan PJ (1995) Benign melanocytic lesions: risk markers or precursors of cutaneous melanoma? *J Am Acad Dermatol* 33: 1000-1007
3. Meier F, Satyamoorthy K, Nesbit M, et al. (1998) Molecular events in melanoma development and progression. *Front Biosci* 3: D1005-D1010
4. Garbe C, Peris K, Hauschild A, et al. (2012) Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2012. *Eur J Cancer* 48: 2375-2390
5. Topfer K, Kempe S, Muller N, et al. (2011) Tumor evasion from T cell surveillance. *J Biomed Biotechnol* 2011: 918471
6. Ramirez-Montagut T, Turk MJ, Wolchok JD, Guevara-Patino JA, Houghton AN (2003) Immunity to melanoma: unraveling the relation of tumor immunity and autoimmunity. *Oncogene* 22: 3180-3187
7. Andersen MH, Fensterle J, Ugurel S, et al. (2004) Immunogenicity of constitutively active V599EBRaf. *Cancer Res* 64: 5456-5460
8. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. (1991) A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254: 1643-1647
9. Wang RF, Appella E, Kawakami Y, Kang X, Rosenberg SA (1996) Identification of TRP-2 as a human tumor antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 184: 2207-2216
10. Burdelya L, Kujawski M, Niu G, et al. (2005) Stat3 activity in melanoma cells affects migration of immune effector cells and nitric oxide-mediated antitumor effects. *J Immunol* 174: 3925-3931
11. Bretscher P, Cohn M (1970) A theory of self-nonsel self discrimination. *Science* 169: 1042-1049
12. Riha P, Rudd CE (2010) CD28 co-signaling in the adaptive immune response. *Self Nonsel self* 1: 231-240
13. Udono H (2012) Heat shock protein magic in antigen trafficking within dendritic cells: implications in antigen cross-presentation in immunity. *Acta Med Okayama* 66: 1-6
14. Agnello D, Lankford CS, Bream J, et al. (2003) Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J Clin Immunol* 23: 147-161
15. Andersen MH, Pedersen LO, Capeller B, Brocker EB, Becker JC, Straten P (2001) Spontaneous cytotoxic T-cell responses against survivin-derived MHC class I-restricted T-cell epitopes in situ as well as ex vivo in cancer patients. *Cancer Res* 61: 5964-5968

16. Naito Y, Saito K, Shiiba K, et al. (1998) CD8⁺ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* 58: 3491-3494
17. Schumacher K, Haensch W, Roefzaad C, Schlag PM (2001) Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res* 61: 3932-3936
18. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, et al. (2003) Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 348: 203-213
19. van Houdt IS, Sluijter BJ, Moesbergen LM, et al. (2008) Favorable outcome in clinically stage II melanoma patients is associated with the presence of activated tumor infiltrating T-lymphocytes and preserved MHC class I antigen expression. *Int J Cancer* 123: 609-615
20. Rosenberg SA, Sherry RM, Morton KE, et al. (2005) Tumor progression can occur despite the induction of very high levels of self/tumor antigen-specific CD8⁺ T cells in patients with melanoma. *J Immunol* 175: 6169-6176
21. Harlin H, Kuna TV, Peterson AC, Meng Y, Gajewski TF (2006) Tumor progression despite massive influx of activated CD8(+) T cells in a patient with malignant melanoma ascites. *Cancer Immunol Immunother* 55: 1185-1197
22. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ (2011) Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331: 1565-1570
23. Korkolopoulou P, Kaklamanis L, Pezzella F, Harris AL, Gatter KC (1996) Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. *Br J Cancer* 73: 148-153
24. Vitale M, Rezzani R, Rodella L, et al. (1998) HLA class I antigen and transporter associated with antigen processing (TAP1 and TAP2) down-regulation in high-grade primary breast carcinoma lesions. *Cancer Res* 58: 737-742
25. Meissner M, Reichert TE, Kunkel M, et al. (2005) Defects in the human leukocyte antigen class I antigen processing machinery in head and neck squamous cell carcinoma: association with clinical outcome. *Clin Cancer Res* 11: 2552-2560
26. Mizukami Y, Kono K, Maruyama T, et al. (2008) Downregulation of HLA Class I molecules in the tumour is associated with a poor prognosis in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 99: 1462-1467
27. Jager E, Ringhoffer M, Karbach J, Arand M, Oesch F, Knuth A (1996) Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8⁺ cytotoxic-T-cell responses: evidence for immunoselection of antigen-loss variants in vivo. *Int J Cancer* 66: 470-476
28. Kruger-Krasagakes S, Krasagakis K, Garbe C, et al. (1994) Expression of interleukin 10 in human melanoma. *Br J Cancer* 70: 1182-1185
29. Berking C, Takemoto R, Schaidt H, et al. (2001) Transforming growth factor-beta1 increases survival of human melanoma through stroma remodeling. *Cancer Res* 61: 8306-8316

30. Desruisseau S, Palmari J, Giusti C, Romain S, Martin PM, Berthois Y (2006) Determination of TGFbeta1 protein level in human primary breast cancers and its relationship with survival. *Br J Cancer* 94: 239-246
31. Ito M, Minamiya Y, Kawai H, et al. (2006) Tumor-derived TGFbeta-1 induces dendritic cell apoptosis in the sentinel lymph node. *J Immunol* 176: 5637-5643
32. Bierie B, Moses HL (2006) Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 506-520
33. Javelaud D, Alexaki VI, Mauviel A (2008) Transforming growth factor-beta in cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 21: 123-132
34. Dummer W, Becker JC, Schwaaf A, Leverkus M, Moll T, Brocker EB (1995) Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma. *Melanoma Res* 5: 67-68
35. Krasagakis K, Tholke D, Farthmann B, Eberle J, Mansmann U, Orfanos CE (1998) Elevated plasma levels of transforming growth factor (TGF)-beta1 and TGF-beta2 in patients with disseminated malignant melanoma. *Br J Cancer* 77: 1492-1494
36. Wittke F, Hoffmann R, Buer J, et al. (1999) Interleukin 10 (IL-10): an immunosuppressive factor and independent predictor in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 79: 1182-1184
37. Beckebaum S, Zhang X, Chen X, et al. (2004) Increased levels of interleukin-10 in serum from patients with hepatocellular carcinoma correlate with profound numerical deficiencies and immature phenotype of circulating dendritic cell subsets. *Clin Cancer Res* 10: 7260-7269
38. Ivanovic V, Demajo M, Krtolica K, et al. (2006) Elevated plasma TGF-beta1 levels correlate with decreased survival of metastatic breast cancer patients. *Clin Chim Acta* 371: 191-193
39. Li X, Yue ZC, Zhang YY, et al. (2008) Elevated serum level and gene polymorphisms of TGF-beta1 in gastric cancer. *J Clin Lab Anal* 22: 164-171
40. Alhamarneh O, Agada F, Madden L, Stafford N, Greenman J (2011) Serum IL10 and circulating CD4(+) CD25(high) regulatory T cell numbers as predictors of clinical outcome and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 33: 415-423
41. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR (1989) Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170: 2081-2095
42. de Waal MR, Haanen J, Spits H, et al. (1991) Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 174: 915-924

43. Willems F, Marchant A, Delville JP, et al. (1994) Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur J Immunol* 24: 1007-1009
44. Mosser DM, Zhang X (2008) Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* 226: 205-218
45. Steinbrink K, Jonuleit H, Muller G, Schuler G, Knop J, Enk AH (1999) Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 93: 1634-1642
46. Matsuda M, Salazar F, Petersson M, et al. (1994) Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. *J Exp Med* 180: 2371-2376
47. Joss A, Akdis M, Faith A, Blaser K, Akdis CA (2000) IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. *Eur J Immunol* 30: 1683-1690
48. Santibanez JF, Quintanilla M, Bernabeu C (2011) TGF-beta/TGF-beta receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 121: 233-251
49. Li MO, Flavell RA (2008) TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell* 134: 392-404
50. Gorelik L, Constant S, Flavell RA (2002) Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J Exp Med* 195: 1499-1505
51. Gorelik L, Fields PE, Flavell RA (2000) Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *J Immunol* 165: 4773-4777
52. Thomas DA, Massague J (2005) TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 8: 369-380
53. Seo N, Hayakawa S, Takigawa M, Tokura Y (2001) Interleukin-10 expressed at early tumour sites induces subsequent generation of CD4(+) T-regulatory cells and systemic collapse of antitumour immunity. *Immunology* 103: 449-457
54. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF (2004) Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* 172: 5149-5153
55. Liu VC, Wong LY, Jang T, et al. (2007) Tumor evasion of the immune system by converting CD4+ CD25- T cells into CD4+ CD25+ T Regulatory Cells: Role of Tumor-Derived TGF-beta. *J Immunol* 178: 2883-2892
56. Woo EY, Yeh H, Chu CS, et al. (2002) Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol* 168: 4272-4276
57. Chen ML, Pittet MJ, Gorelik L, et al. (2005) Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 419-424

58. Strauss L, Bergmann C, Szczepanski M, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL (2007) A unique subset of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res* 13: 4345-4354
59. Nishikawa H, Sakaguchi S (2010) Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer* 127: 759-767
60. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, et al. (2001) Regulatory CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 61: 4766-4772
61. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, et al. (2002) Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 169: 2756-2761
62. Viguier M, Lemaître F, Verola O, et al. (2004) Foxp3 expressing CD4⁺CD25^(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* 173: 1444-1453
63. Vence L, Palucka AK, Fay JW, et al. (2007) Circulating tumor antigen-specific regulatory T cells in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 20884-20889
64. Ahmadzadeh M, Felipe-Silva A, Heemskerk B, et al. (2008) FOXP3 expression accurately defines the population of intratumoral regulatory T cells that selectively accumulate in metastatic melanoma lesions. *Blood* 112: 4953-4960
65. Szczepanski MJ, Szajnik M, Czystowska M, et al. (2009) Increased frequency and suppression by regulatory T cells in patients with acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 15: 3325-3332
66. Wilke CM, Wu K, Zhao E, Wang G, Zou W (2010) Prognostic significance of regulatory T cells in tumor. *Int J Cancer* 127: 748-758
67. Lorusso G, Ruegg C (2008) The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol* 130: 1091-1103
68. Hofmeister V, Schrama D, Becker JC (2008) Anti-cancer therapies targeting the tumor stroma. *Cancer Immunol Immunother* 57: 1-17
69. Perez-Gomez E, Del CG, Juan FS, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C, Quintanilla M (2010) The role of the TGF-beta coreceptor endoglin in cancer. *ScientificWorldJournal* 10: 2367-2384
70. Li C, Hampson IN, Hampson L, Kumar P, Bernabeu C, Kumar S (2000) CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J* 14: 55-64
71. Li C, Issa R, Kumar P, et al. (2003) CD105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells. *J Cell Sci* 116: 2677-2685

72. Minhajat R, Mori D, Yamasaki F, Sugita Y, Satoh T, Tokunaga O (2006) Organ-specific endoglin (CD105) expression in the angiogenesis of human cancers. *Pathol Int* 56: 717-723
73. Wikstrom P, Lissbrant IF, Stattin P, Egevad L, Bergh A (2002) Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer. *Prostate* 51: 268-275
74. Saad RS, Liu YL, Nathan G, Celebrezze J, Medich D, Silverman JF (2004) Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. *Mod Pathol* 17: 197-203
75. Dales JP, Garcia S, Andrac L, et al. (2004) Prognostic significance of angiogenesis evaluated by CD105 expression compared to CD31 in 905 breast carcinomas: correlation with long-term patient outcome. *Int J Oncol* 24: 1197-1204
76. Saad RS, El Gohary Y, Memari E, Liu YL, Silverman JF (2005) Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in esophageal adenocarcinoma. *Hum Pathol* 36: 955-961
77. Kyzas PA, Agnantis NJ, Stefanou D (2006) Endoglin (CD105) as a prognostic factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 448: 768-775
78. Yang LY, Lu WQ, Huang GW, Wang W (2006) Correlation between CD105 expression and postoperative recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 6: 110
79. Pardali E, van der Schaft DW, Wiercinska E, et al. (2011) Critical role of endoglin in tumor cell plasticity of Ewing sarcoma and melanoma. *Oncogene* 30: 334-345
80. Seon BK, Matsuno F, Haruta Y, Kondo M, Barcos M (1997) Long-lasting complete inhibition of human solid tumors in SCID mice by targeting endothelial cells of tumor vasculature with antihuman endoglin immunotoxin. *Clin Cancer Res* 3: 1031-1044
81. Tan GH, Wei YQ, Tian L, et al. (2004) Active immunotherapy of tumors with a recombinant xenogeneic endoglin as a model antigen. *Eur J Immunol* 34: 2012-2021
82. Lee SH, Mizutani N, Mizutani M, et al. (2006) Endoglin (CD105) is a target for an oral DNA vaccine against breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 55: 1565-1574
83. Rosen LS, Hurwitz HI, Wong MK, et al. (2012) A Phase I First-in-Human Study of TRC105 (Anti-Endoglin Antibody) in Patients with Advanced Cancer. *Clin Cancer Res* 18: 4820-4829
84. O'Brien P, O'Connor BF (2008) Seprase: an overview of an important matrix serine protease. *Biochim Biophys Acta* 1784: 1130-1145
85. Garin-Chesa P, Old LJ, Rettig WJ (1990) Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 7235-7239

86. Park JE, Lenter MC, Zimmermann RN, Garin-Chesa P, Old LJ, Rettig WJ (1999) Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts. *J Biol Chem* 274: 36505-36512
87. Chen D, Kennedy A, Wang JY, et al. (2006) Activation of EDTA-resistant gelatinases in malignant human tumors. *Cancer Res* 66: 9977-9985
88. Lee HO, Mullins SR, Franco-Barraza J, Valianou M, Cukierman E, Cheng JD (2011) FAP-overexpressing fibroblasts produce an extracellular matrix that enhances invasive velocity and directionality of pancreatic cancer cells. *BMC Cancer* 11: 245
89. Iwasa S, Okada K, Chen WT, et al. (2005) 'Increased expression of seprase, a membrane-type serine protease, is associated with lymph node metastasis in human colorectal cancer'. *Cancer Lett* 227: 229-236
90. Henry LR, Lee HO, Lee JS, et al. (2007) Clinical implications of fibroblast activation protein in patients with colon cancer. *Clin Cancer Res* 13: 1736-1741
91. Shi M, Yu DH, Chen Y, et al. (2012) Expression of fibroblast activation protein in human pancreatic adenocarcinoma and its clinicopathological significance. *World J Gastroenterol* 18: 840-846
92. Monsky WL, Lin CY, Aoyama A, et al. (1994) A potential marker protease of invasiveness, seprase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells. *Cancer Res* 54: 5702-5710
93. Huber MA, Kraut N, Schweifer N, et al. (2006) Expression of stromal cell markers in distinct compartments of human skin cancers. *J Cutan Pathol* 33: 145-155
94. Adams S, Miller GT, Jesson MI, Watanabe T, Jones B, Wallner BP (2004) PT-100, a small molecule dipeptidyl peptidase inhibitor, has potent antitumor effects and augments antibody-mediated cytotoxicity via a novel immune mechanism. *Cancer Res* 64: 5471-5480
95. Lee J, Fassnacht M, Nair S, Boczkowski D, Gilboa E (2005) Tumor immunotherapy targeting fibroblast activation protein, a product expressed in tumor-associated fibroblasts. *Cancer Res* 65: 11156-11163
96. Loeffler M, Kruger JA, Niethammer AG, Reisfeld RA (2006) Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake. *J Clin Invest* 116: 1955-1962
97. Scott AM, Wiseman G, Welt S, et al. (2003) A Phase I dose-escalation study of sibrotuzumab in patients with advanced or metastatic fibroblast activation protein-positive cancer. *Clin Cancer Res* 9: 1639-1647
98. Hofheinz RD, al Batran SE, Hartmann F, et al. (2003) Stromal antigen targeting by a humanised monoclonal antibody: an early phase II trial of sibrotuzumab in patients with metastatic colorectal cancer. *Onkologie* 26: 44-48
99. Narra K, Mullins SR, Lee HO, et al. (2007) Phase II trial of single agent Val-boroPro (Talabostat) inhibiting Fibroblast Activation Protein in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 6: 1691-1699

100. Eager RM, Cunningham CC, Senzer NN, et al. (2009) Phase II assessment of talabostat and cisplatin in second-line stage IV melanoma. *BMC Cancer* 9: 263
101. Eager RM, Cunningham CC, Senzer N, et al. (2009) Phase II trial of talabostat and docetaxel in advanced non-small cell lung cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 21: 464-472
102. Colon-Teicher L, Wise LS, Martino JJ, et al. (1993) Genomic sequences capable of committing mouse and rat fibroblasts to adipogenesis. *Nucleic Acids Res* 21: 2223-2228
103. Chen S, Zhu H, Wetzel WJ, Philbert MA (1996) Spontaneous melanocytosis in transgenic mice. *J Invest Dermatol* 106: 1145-1151
104. Pollock PM, Cohen-Solal K, Sood R, et al. (2003) Melanoma mouse model implicates metabotropic glutamate signaling in melanocytic neoplasia. *Nat Genet* 34: 108-112
105. Cohen-Solal KA, Reuhl KR, Ryan KB, Roberts KG, Chen S (2001) Development of cutaneous amelanotic melanoma in the absence of a functional tyrosinase. *Pigment Cell Res* 14: 466-474
106. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP (2004) Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10: 909-915
107. Lesterhuis WJ, Haanen JB, Punt CJ (2011) Cancer immunotherapy--revisited. *Nat Rev Drug Discov* 10: 591-600
108. Overwijk WW, Theoret MR, Finkelstein SE, et al. (2003) Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8+ T cells. *J Exp Med* 198: 569-580
109. Curran MA, Montalvo W, Yagita H, Allison JP (2010) PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 4275-4280
110. Appay V, Jandus C, Voelter V, et al. (2006) New generation vaccine induces effective melanoma-specific CD8+ T cells in the circulation but not in the tumor site. *J Immunol* 177: 1670-1678
111. Lee KH, Wang E, Nielsen MB, et al. (1999) Increased vaccine-specific T cell frequency after peptide-based vaccination correlates with increased susceptibility to in vitro stimulation but does not lead to tumor regression. *J Immunol* 163: 6292-6300
112. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, et al. (2002) Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298: 850-854
113. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. (2010) Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363: 711-723
114. Mellman I, Coukos G, Dranoff G (2011) Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480: 480-489

115. Sadovnikova E, Stauss HJ (1996) Peptide-specific cytotoxic T lymphocytes restricted by nonself major histocompatibility complex class I molecules: reagents for tumor immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13114-13118
116. Kochenderfer JN, Chien CD, Simpson JL, Gress RE (2007) Maximizing CD8+ T cell responses elicited by peptide vaccines containing CpG oligodeoxynucleotides. *Clin Immunol* 124: 119-130
117. Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR (1994) The activation antigen CD69. *Stem Cells* 12: 456-465
118. Lowenthal JW, Zubler RH, Nabholz M, MacDonald HR (1985) Similarities between interleukin-2 receptor number and affinity on activated B and T lymphocytes. *Nature* 315: 669-672
119. Horne PH, Koester MA, Jayashankar K, Lunsford KE, Dziema HL, Bumgardner GL (2007) Disparate primary and secondary allospecific CD8+ T cell cytolytic effector function in the presence or absence of host CD4+ T cells. *J Immunol* 179: 80-88
120. Toes RE, Blom RJ, Offringa R, Kast WM, Melief CJ (1996) Enhanced tumor outgrowth after peptide vaccination. Functional deletion of tumor-specific CTL induced by peptide vaccination can lead to the inability to reject tumors. *J Immunol* 156: 3911-3918
121. Barsov EV, Andersen H, Coalter VJ, Carrington M, Lifson JD, Ott DE (2006) Capture of antigen-specific T lymphocytes from human blood by selective immortalization to establish long-term T-cell lines maintaining primary cell characteristics. *Immunol Lett* 105: 26-37
122. Roe T, Reynolds TC, Yu G, Brown PO (1993) Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J* 12: 2099-2108
123. Kraman M, Bambrough PJ, Arnold JN, et al. (2010) Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein-alpha. *Science* 330: 827-830
124. Spiotto MT, Yu P, Rowley DA, et al. (2002) Increasing tumor antigen expression overcomes "ignorance" to solid tumors via crosspresentation by bone marrow-derived stromal cells. *Immunity* 17: 737-747
125. Spiotto MT, Schreiber H (2005) Rapid destruction of the tumor microenvironment by CTLs recognizing cancer-specific antigens cross-presented by stromal cells. *Cancer Immun* 5: 8
126. Spiotto MT, Rowley DA, Schreiber H (2004) Bystander elimination of antigen loss variants in established tumors. *Nat Med* 10: 294-298
127. Schietinger A, Philip M, Liu RB, Schreiber K, Schreiber H (2010) Bystander killing of cancer requires the cooperation of CD4(+) and CD8(+) T cells during the effector phase. *J Exp Med* 207: 2469-2477
128. Lyman MA, Nugent CT, Marquardt KL, Biggs JA, Pamer EG, Sherman LA (2005) The fate of low affinity tumor-specific CD8+ T cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* 174: 2563-2572

129. Janicki CN, Jenkinson SR, Williams NA, Morgan DJ (2008) Loss of CTL function among high-avidity tumor-specific CD8⁺ T cells following tumor infiltration. *Cancer Res* 68: 2993-3000
130. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M (2008) Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133: 775-787
131. Antony PA, Piccirillo CA, Akpınarli A, et al. (2005) CD8⁺ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4⁺ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol* 174: 2591-2601
132. Ercolini AM, Ladle BH, Manning EA, et al. (2005) Recruitment of latent pools of high-avidity CD8(+) T cells to the antitumor immune response. *J Exp Med* 201: 1591-1602
133. Wong SB, Bos R, Sherman LA (2008) Tumor-specific CD4⁺ T cells render the tumor environment permissive for infiltration by low-avidity CD8⁺ T cells. *J Immunol* 180: 3122-3131
134. Beyer M, Karbach J, Mallmann MR, et al. (2009) Cancer vaccine enhanced, non-tumor-reactive CD8(+) T cells exhibit a distinct molecular program associated with "division arrest anergy". *Cancer Res* 69: 4346-4354
135. Haanen JB, Baars A, Gomez R, et al. (2006) Melanoma-specific tumor-infiltrating lymphocytes but not circulating melanoma-specific T cells may predict survival in resected advanced-stage melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 55: 451-458
136. Weishaupt C, Munoz KN, Buzney E, Kupper TS, Fuhlbrigge RC (2007) T-cell distribution and adhesion receptor expression in metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 13: 2549-2556
137. Rosenberg SA, Sherry RM, Morton KE, et al. (2006) Altered CD8(+) T-cell responses when immunizing with multiepitope peptide vaccines. *J Immunother* 29: 224-231
138. Laouar Y, Welte T, Fu XY, Flavell RA (2003) STAT3 is required for Flt3L-dependent dendritic cell differentiation. *Immunity* 19: 903-912
139. Naik SH, Proietto AI, Wilson NS, et al. (2005) Cutting edge: generation of splenic CD8⁺ and CD8⁻ dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. *J Immunol* 174: 6592-6597
140. Shrikant P, Mescher MF (2002) Opposing effects of IL-2 in tumor immunotherapy: promoting CD8 T cell growth and inducing apoptosis. *J Immunol* 169: 1753-1759
141. Jackaman C, Bundell CS, Kinnear BF, et al. (2003) IL-2 intratumoral immunotherapy enhances CD8⁺ T cells that mediate destruction of tumor cells and tumor-associated vasculature: a novel mechanism for IL-2. *J Immunol* 171: 5051-5063
142. Melchionda F, Fry TJ, Milliron MJ, McKirdy MA, Tagaya Y, Mackall CL (2005) Adjuvant IL-7 or IL-15 overcomes immunodominance and improves survival of the CD8⁺ memory cell pool. *J Clin Invest* 115: 1177-1187

143. Lengagne R, Pommier A, Caron J, et al. (2011) T cells contribute to tumor progression by favoring pro-tumoral properties of intra-tumoral myeloid cells in a mouse model for spontaneous melanoma. *PLoS One* 6: e20235
144. Kmiecik M, Knutson KL, Dumur CI, Manjili MH (2007) HER-2/neu antigen loss and relapse of mammary carcinoma are actively induced by T cell-mediated anti-tumor immune responses. *Eur J Immunol* 37: 675-685
145. Hwang LN, Yu Z, Palmer DC, Restifo NP (2006) The in vivo expansion rate of properly stimulated transferred CD8+ T cells exceeds that of an aggressively growing mouse tumor. *Cancer Res* 66: 1132-1138
146. Chin L, Garraway LA, Fisher DE (2006) Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev* 20: 2149-2182
147. Ladanyi A, Somlai B, Gilde K, Fejos Z, Gaudi I, Timar J (2004) T-cell activation marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 10: 521-530
148. Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P (2006) Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 24: 175-208
149. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM (2006) Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 6: 24-37
150. Rizzuto GA, Merghoub T, Hirschhorn-Cymerman D, et al. (2009) Self-antigen-specific CD8+ T cell precursor frequency determines the quality of the antitumor immune response. *J Exp Med* 206: 849-866
151. Hoon DS, Korn EL, Cochran AJ (1987) Variations in functional immunocompetence of individual tumor-draining lymph nodes in humans. *Cancer Res* 47: 1740-1744
152. Elliott LH, Brooks WH, Roszman TL (1990) Inability of mitogen-activated lymphocytes obtained from patients with malignant primary intracranial tumors to express high affinity interleukin 2 receptors. *J Clin Invest* 86: 80-86
153. Reichert TE, Strauss L, Wagner EM, Gooding W, Whiteside TL (2002) Signaling abnormalities, apoptosis, and reduced proliferation of circulating and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with oral carcinoma. *Clin Cancer Res* 8: 3137-3145
154. Bose A, Chakraborty T, Chakraborty K, Pal S, Baral R (2008) Dysregulation in immune functions is reflected in tumor cell cytotoxicity by peripheral blood mononuclear cells from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cancer Immunol* 8: 10
155. Baitsch L, Baumgaertner P, Devere E, et al. (2011) Exhaustion of tumor-specific CD8 T cells in metastases from melanoma patients. *J Clin Invest* 121: 2350-2360
156. Russ AJ, Xu K, Wentworth L, et al. (2011) Melanoma-induced suppression of tumor antigen-specific T cell expansion is comparable to suppression of global T cell expansion. *Cell Immunol* 271: 104-109
157. Miller RA, Garcia G, Kirk CJ, Witkowski JM (1997) Early activation defects in T lymphocytes from aged mice. *Immunol Rev* 160: 79-90

158. Messaoudi I, Lemaoult J, Guevara-Patino JA, Metzner BM, Nikolich-Zugich J (2004) Age-related CD8 T cell clonal expansions constrict CD8 T cell repertoire and have the potential to impair immune defense. *J Exp Med* 200: 1347-1358
159. Derhovanessian E, Solana R, Larbi A, Pawelec G (2008) Immunity, ageing and cancer. *Immun Ageing* 5: 11
160. Rausch MP, Hastings KT (2012) GILT modulates CD4+ T-cell tolerance to the melanocyte differentiation antigen tyrosinase-related protein 1. *J Invest Dermatol* 132: 154-162
161. Zhou G, Lu Z, McCadden JD, Levitsky HI, Marson AL (2004) Reciprocal changes in tumor antigenicity and antigen-specific T cell function during tumor progression. *J Exp Med* 200: 1581-1592
162. Itakura E, Huang RR, Wen DR, Paul E, Wunsch PH, Cochran AJ (2011) IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence. *Mod Pathol* 24: 801-809
163. Ahmadzadeh M, Rosenberg SA (2005) TGF-beta 1 attenuates the acquisition and expression of effector function by tumor antigen-specific human memory CD8 T cells. *J Immunol* 174: 5215-5223
164. Lee JH, Torisu-Itakara H, Cochran AJ, et al. (2005) Quantitative analysis of melanoma-induced cytokine-mediated immunosuppression in melanoma sentinel nodes. *Clin Cancer Res* 11: 107-112
165. Polak ME, Borthwick NJ, Gabriel FG, et al. (2007) Mechanisms of local immunosuppression in cutaneous melanoma. *Br J Cancer* 96: 1879-1887
166. Lee JC, Lee KM, Kim DW, Heo DS (2004) Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *J Immunol* 172: 7335-7340
167. Yang L, Huang J, Ren X, et al. (2008) Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. *Cancer Cell* 13: 23-35
168. Szkaradkiewicz A, Karpinski TM, Drews M, Borejsza-Wysocki M, Majewski P, Andrzejewska E (2010) Natural killer cell cytotoxicity and immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF-beta1) in patients with gastric cancer. *J Biomed Biotechnol* 2010: 901564
169. Jarnicki AG, Lysaght J, Todryk S, Mills KH (2006) Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGF-beta-producing T cells infiltrating the growing tumor: influence of tumor environment on the induction of CD4+ and CD8+ regulatory T cells. *J Immunol* 177: 896-904
170. Bijker MS, van den Eeden SJ, Franken KL, Melief CJ, van Der Burg SH, Offringa R (2008) Superior induction of anti-tumor CTL immunity by extended peptide vaccines involves prolonged, DC-focused antigen presentation. *Eur J Immunol* 38: 1033-1042

171. Wilcox RA, Flies DB, Zhu G, et al. (2002) Provision of antigen and CD137 signaling breaks immunological ignorance, promoting regression of poorly immunogenic tumors. *J Clin Invest* 109: 651-659
172. Wilcox RA, Tamada K, Flies DB, et al. (2004) Ligation of CD137 receptor prevents and reverses established anergy of CD8+ cytolytic T lymphocytes in vivo. *Blood* 103: 177-184
173. Umansky V, Sevko A (2012) Overcoming immunosuppression in the melanoma microenvironment induced by chronic inflammation. *Cancer Immunol Immunother* 61: 275-282
174. Endharti AT, Rifa'i M, Shi Z, et al. (2005) Cutting edge: CD8+CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells. *J Immunol* 175: 7093-7097
175. Katz JB, Muller AJ, Prendergast GC (2008) Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. *Immunol Rev* 222: 206-221

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Modulation der Immunantwort durch IL-10 im Tumorgewebe.....	6
Abb. 2: Modulation der Immunantwort durch TGF- β 1 im Tumorgewebe.....	7
Abb. 3: Rekrutierung regulatorischer T-Zellen durch den Tumor.....	8
Abb. 4: Einfluss des Tumorstromas auf das Tumorwachstum.....	9
Abb. 5: Vakzinierungsprotokoll.....	24
Abb. 6: Wachstum von Grm1-transgenen Tumoren nach prophylaktischer Endoglin-Peptid-Vakzinierung.....	34
Abb. 7: Ifn- γ produzierende Milzzellen nach Endoglin-Peptidstimulation.....	35
Abb. 8: Lyse von syngenen, Endoglin-Peptid-gepulsten Milzzellen.....	36
Abb. 9: Lyse von Endoglin-Peptid-gepulsten RMA-S Zellen.....	37
Abb. 10: Wachstum von Grm1-transgenen Tumoren nach prophylaktischer Fap-Peptid-Vakzinierung.....	38
Abb. 11: Lyse von syngenen, Fap-Peptid-gepulsten Milzzellen.....	39
Abb. 12: Lyse von Fap-Peptid-gepulsten RMA-S Zellen.....	39
Abb. 13: Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL) in LLA-TG-3 Tumoren.....	41
Abb. 14: Gatingstrategie.....	42
Abb. 15: CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellpopulationen <i>ex vivo</i>	44
Abb. 16: Proliferation nach Stimulation mit PMA und Con A.....	45
Abb. 17: Frequenz von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen nach IL-2 und PMA-Stimulation.....	46
Abb. 18: Frequenz aktivierter CD8 ⁺ T-Zellen nach IL-2 und PMA-Stimulation.....	47
Abb. 19: Frequenz der regulatorischen T-Zellen <i>ex vivo</i> (CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺).....	48
Abb. 20: Relative mRNA-Expression von Tgf- β 1 und Il-10.....	49
Abb. 21: Mögliche Auswirkungen der Il-10 und Tgf- β 1 Expression auf eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort im tdLN bei LLA-TG-3 Mäusen.....	61

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tumorantigen-spezifische Lymphozyten / Lymphozyteninfiltrate bei ausgewählten Tumorentitäten	4
Tabelle 2: IL-10 / TGF- β 1 Expression und Plasmawerte bei ausgewählten Tumorentitäten	5
Tabelle 3: Frequenz und Lokalisation regulatorischer T-Zellen bei ausgewählten Tumorentitäten	8
Tabelle 4: Ausgewählte Tumorstroma-assoziierte Antigene (TSAA)	10
Tabelle 5: Anti-murine Antikörper für die Durchflusszytometrie	20
Tabelle 6: Isotyp-Kontrollen für die Durchflusszytometrie	20
Tabelle 7: Anti-murine Antikörper für die Immunhistologie.....	21
Tabelle 8: Murine Primer für quantitative RT-PCR Analysen	21
Tabelle 9: Einteilung der Tumorgruppen für das LLA-TG-3 Modell.....	23
Tabelle 10: Murine H-2K ^b -restringierte Endoglin-Peptide	25
Tabelle 11: Murine H-2K ^b -restringierte Fap-Peptide.....	25

10 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AINR	<i>activation-induced non-responsiveness</i>
ALP	alkalische Phosphatase
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin bzw. Antigen-präsentierende Zelle
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
Bq	Bequerel
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAF	<i>cancer-associated fibroblast</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
Ci	Curie
CM	Komplettmedium
Con A	Concanavalin A
Cq	<i>quantification cycle</i>
CTL	zytotoxische CD8 ⁺ T-Zelle
CTLA-4	<i>cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4</i>
Cy5.5	<i>reactive derivate from dibenzoindodicarbocyanine</i>
Cy7	<i>reactive indotricarbocyanine</i>
DC	Dendritische Zelle
DCT	<i>dopachrome tautomerase</i>
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EMA	Europäische Arzneimittelagentur
ENG	Endoglin
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii (und andere)
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FAP	<i>fibroblast activation protein alpha</i>
Fc(R)	<i>fragment constant (receptor)</i>
FCS	fötales Kälberserum
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flt3	<i>Fms-Like Tyrosine Kinase 3</i>
FoxP3	<i>forkhead/winged-helix transcription factor box P3</i>
g	Erdbeschleunigung
GILT	<i>gamma-IFN-inducible lysosomal thiol reductase</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
Grm1	metabotroper Glutamatrezeptor 1
h	Stunde(n)
HA	Hämagglutinin
hIL-2	humanes Interleukin-2
HNSCC	<i>head and neck squamous cell carcinoma</i>
HPRT	<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
hTERT	<i>human telomerase reverse transcriptase</i>
i.d.	intradermal
IDO	<i>indoleamine 2,3-dioxygenase</i>
IFN- γ	Interferon-gamma
IL-10	Interleukin-10
i.p.	intraperitoneal
IU	<i>international unit</i>
i.v.	intravenös
kb	Kilobasenpaare
LN	Lymphknoten

LPS	Lipopolysaccharide
μ	mikro
m	milli
M	Molar
MDSC	<i>myeloid-derived suppressor cell</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute(n)
mind.	mindestens
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MVD	<i>microvessel density</i>
n	nano
nd	nicht tumor-drainierend
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NKT-Zelle	natürliche Killer T-Zelle
ODN	Oligodesoxynukleotide
OVA	Ovalbumin
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	<i>phosphate buffered salt solution</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	<i>Peridinin chlorophyll protein</i>
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
s.c.	subkutan
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
sog.	sogenannt
SPF	<i>specific pathogen-free</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TA	Tumorantigen(e)

Tab.	Tabelle
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TCR	T-Zellrezeptor
td	tumor-drainierend
TEC	<i>tumor endothelial cell</i>
TGF- β 1	<i>transforming growth factor beta 1</i>
TIL	tumor-infiltrierende Lymphozyten
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
TRP-1/2	<i>tyrosinase-related protein 1/2</i>
TSAA	Tumorstroma-assoziierte Antigene
UV	ultraviolett
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

11 Publikationen

Originalarbeiten:

Alb M, Sie C, Adam C, Chen S, Becker JC, Schrama D

Cellular and cytokine-dependent immunosuppressive mechanisms of grml-transgenic murine melanoma

Cancer Immunol. Immunother. 2012 Jun 7. Epub ahead of print

Willmes C, Adam C, **Alb M**, Völkert L, Houben R, Becker JC, Schrama D

Type I and type II interferons impact viability of Merkel cell carcinoma cell lines via modulation of the Merkel cell polyomavirus T-antigens

Cancer Res. 2012; 72(8): 2120-2128

Kurzbericht/Letter:

Houben R, Schrama D, **Alb M**, Pföhler C, Trefzer U, Ugurel S, Becker JC

Comparable expression and phosphorylation of the retinoblastoma protein in Merkel cell polyoma virus-positive and negative Merkel cell carcinoma

Int J Cancer. 2010; 126(3): 796-798

Konferenzbeiträge:

Willmes C, Adam C, **Alb M**, Völkert L, Houben R, Becker JC, Schrama D

Interferons affect cellular viability and class I major histocompatibility complex expression in both MCV positive and negative merkel cell carcinoma cell lines

EXP DERMATOL. 2011; 20(2): P212

Alb M, Müller-Hofmeister V, Benkert T, Becker JC

CD105 (endoglin) as immunotherapeutic target in a murine melanoma model

EXP DERMATOL. 2009; 18(3): P250

12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Jürgen C. Becker für die Bereitstellung des interessanten Themas, seiner steten Förderung, seinem Interesse am Fortgang der Arbeit und seiner steten Bereitschaft, wissenschaftliche Probleme und Ergebnisse zu diskutieren.

Mein großer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. M. Scharl, da er sich als Vertreter der Biologischen Fakultät für die Betreuung dieser Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

An dieser Stelle sei auch Frau Prof. Dr. E.-B. Bröcker, der ehemaligen Direktorin der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, gedankt.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei David bedanken, der mir als ständiger Ansprechpartner in allen Belangen eine sehr große Hilfe und Stütze war.

Mein großer Dank gilt auch Valeska für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung insbesondere zu Beginn des Projekts und ihrem Interesse am Fortgang der Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Roland für seine Hilfe und Unterstützung bedanken, ebenso bei Heike für ihre hervorragende Einführung ins tierexperimentelle Arbeiten.

Christian, ohne Dich wäre meine Zeit an der Hautklinik nur halb so schön gewesen. An unsere Tierstallsessions werde ich immer gerne zurückdenken. Und wer hätte schon gedacht, dass ich mal jemanden treffe, der es mit meinem Redefluss und meiner Redegeschwindigkeit tatsächlich aufnehmen kann!

Christoph, und damit komme ich zu unserem Dritten im Bunde der Doktoranden, danke für Deine unerschütterliche Ruhe und Gelassenheit und die gute Zusammenarbeit!

Katharina und Kerstin, ihr beide habt mir, besonders in der Anfangsphase des Projekts, mit euren Ratschlägen und eurer Tatkraft sehr geholfen. Danke Euch beiden!

Ebenso möchte ich mich bei Claudia, Sonja, Lena, Eva-Maria, Michelle, Sue, Uli und Uli Flohr, den aktuellen und ehemaligen fleißigen Bienchen des Labors, ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit bedanken!

Rita, Anne, Cathrin und Sabrina, die aktuelle und ehemalige „Biologinnen-Front“, auch Euch gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit während unserer gemeinsamen Zeit an der Hautklinik!

Bedanken möchte ich mich auch bei der Tierpflegerin Susan Schellworth für die hervorragende Pflege der Mäuse. Mein Dank geht auch an das IZKF Würzburg sowie an die DFG, die für die finanzielle Absicherung des Projekts und meiner Arbeitskraft gesorgt hatten.

Meinen Eltern, meiner ganzen Familie und meinen Freunden danke ich ganz besonders dafür, dass sie mich während meiner gesamten Studien- und Promotionszeit unterstützt haben und immer für mich da waren.

14 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe und dabei keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsantrag urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg,

Miriam Alb