INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologe Oliver Abschütz (geb. Speicher)

aus Edingen-Neckarhausen

Tag der mündlichen Prüfung: _____

Melanomantigen-spezifische Gedächtnis T-Zellen in einem transgenen Spontanmelanom-Mausmodell

Gutachter: PD. Dr. Viktor Umansky
Prof. Dr. Lutz Gissmann

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 1.4.2004 - 1.8.2007 am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg und am Universitätsklinikum Mannheim, Dermato-Onkologie in der Arbeitsgruppe von Dr. Viktor Umansky (Abteilung G300) angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen publiziert:

Speicher O., Thölke A., Schadendorf D., Umansky V. (2006) Gedächtnis T Zellen im spontan-Melanom-Mausmodell, *XXXIII. Jahrestagung der ADF*, 23.-25. März 2006, Aachen, Deutschland (Posterpräsentation)

Speicher O., Thölke A., Schadendorf D., Umansky V. (2006) Melanoma antigen specific $CD8^+$ Memory T cells in bone marrow of a ret transgenic mouse model developing spontaneous melanoma, *4th Annual Meeting of the Association for Immunotherapy of Cancer (CIMT),* 4.-5. Mai 2006, Mainz, Deutschland (Posterpräsentation)

Abschuetz O., Thölke A., Schadendorf D., Umansky V. (2006) Tumor antigen specific memory T cells in a transgenic mouse model of spontaneous melanoma*, 6th International Conference on Progress in Vaccination Against Cancer PIVAC-6,* 27.-29. September 2006, Granada, Spanien (Posterpräsentation)

Abschuetz O., Figl, A., Osen W., Schadendorf D., Umansky V. (2007) Immunotherapy with memory T cells using a transgenic mouse model of spontaneous melanoma, *5th Annual Meeting of the Association for Immunotherapy of Cancer (CIMT)*, 19.-21. April 2007, Würzburg, Deutschland (Posterpräsentation)

Folgende Publikationsmanuskripte sind in Vorbereitung:

Abschuetz O., Schadendorf D., Umansky V. Tumor antigen specific memory T cells in transgenic mouse spontaneous melanoma model, *in Vorbereitung*

Abschuetz O., Figl A., Osen W., Schadendorf D., Umansky V. Characterization of Ret transgenic mice, *in Vorbereitung*

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG 7

I. EINLEITUNG 9

1. Das Immunsystem und Anti-Tumor-Immunität 9
1.1 Antigenpräsentierende Zellen 10
1.2 Dendritische Zellen 11
1.3 T-Lymphozyten 12
1.3.1 $CD8^+$ T-Lymphozyten 13
1.3.2 $CD4^+$ T-Lymphozyten 13
1.3.3 regulatorische $CD4^+$ T-Zellen 13
1.4 NK-Zellen 14
1.5 Gedächtnis T-Lymphozyten 15
1.5.1 Das Knochenmark als Quelle für tumorspezifische Gedächtnis T-Zellen 17

2. Das maligne Melanom 19
2.1 Epidemiologie 19
2.2 Einteilung und Krankheitsverlauf 19
2.3 Konventionelle Melanom Therapien 21
2.3.1 Operativer Eingriff 21
2.3.2 Strahlentherapie 21
2.3.3 Chemotherapie 21
2.3.4 Adjuvante Therapie 22
2.4 Immuntherapeutische Ansätze beim Melanom und anderen Krebsarten 22
2.4.1 Melanom-assoziierte Differenzierungsantigene 23
2.4.2 Antikörpertherapie 23
2.4.4 Dendritische Zellen in der Immuntherapie 24
2.4.4.1 Mit RNA transfizierte DCs 24
2.4.4.2 Mit cDNA transfizierte DCs 24
2.4.4.3 Mit viralen Vektoren transduzierte DCs 25
2.4.4.4 Mit Protein beladene DCs 25
2.4.4.5 Mit Peptid beladene DCs 25
2.4.4.6 Mit Tumorlysat beladene DCs 26
2.4.5 Adoptiver Transfer von Tumorantigen-spezifischen T-Zellen 26

3. Spontanmelanom Mausmodelle 27
3.1 Das HGF/SF Modell 27
3.2 Das HGF/SF x INK4a/$ARF^{-/-}$ Modell 28
3.3 Das Ret-Mausmodell 29

II. FRAGESTELLUNG 30

III. MATERIAL UND METHODEN 31

4. Materialien 31
4.1 Tiere und Zelllinien 31
4.2 Chemikalien, Lösungen und Medien 32
4.2.1 Chemikalien 32
4.2.2 Lösungen/Puffer 36
4.2.3 Medien/Zellkultur 38
4.2.4 Antikörper 39
4.2.4.1 Antikörper für die Durchflusszytometrie 39
4.2.4.2 Tetramere 39
4.2.4.3 ELISPOT Antikörper 40

4.2.4.4 Imunhistochemie Antikörper ... 40
4.2.4.5 Sonstige Antikörper ... 40
4.2.5 Peptide ... 40
4.2.6 DNA Vektoren ... 41
4.2.7 Primer ... 41
4.3 Kits ... 41
4.4 Geräte und allgemeine Labormaterialien ... 42
4.4.1 Geräte ... 42
4.4.2 Allgemeine Labormaterialien ... 44

5. Methoden ... 46
5.1 Typisierung von Ret-tg Mäusen ... 46
5.2 Monitoring der Tumorentstehung ... 47
5.3 Immunisierung von Mäusen ... 47
5.3.1 DNA Immunisierung mit dem Modell-Antigen Ovalbumin ... 47
5.3.2 Peptid Immunisierung mit dem Melanom assoziierten Antigen TRP-2 ... 48
5.4 Organ- und Tumorpräparation ... 48
5.5 Herstellen einer Einzelzellsuspension ... 49
5.5.1 Milz ... 49
5.5.2 Lymphknoten ... 49
5.5.3 Knochenmark ... 50
5.5.4 Tumor ... 50
5.6 In vitro Stimulation von T-Zellen aus Milz und Lymphknoten ... 51
5.7 Generierung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark ... 52
5.7.1 Überprüfung der Reifung von DCs ... 52
5.7.2 Herstellung von Tumorlysaten ... 52
5.8 Negativselektion von T-Zellen aus dem Knochenmark ... 53
5.9 Durchflusszytometrie ... 54
5.9.1 FACS Färbung von Zelloberflächenmarkern ... 54
5.9.2 MHC-I Tetramerfärbung von Ovalbumin- oder TRP-2-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen ... 55
5.10 ELISA zum Nachweis von IFN-γ und IL-2 im Überstand kultivierter T-Zellen ... 56
5.11 IFN-γ ELISPOT ... 57
5.11.1 ex vivo IFN-γ ELISPOT zum Nachweis spezifischer T-Zellen nach DNA- Immunisierung ... 57
5.11.2 ex vivo IFN-γ ELISPOT zum Nachweis spezifischer T-Zellen nach Peptid-Immunisierung ... 58
5.11.3 Kokultur von antigenbeladenen DCs mit Gedächtnis T-Zellen aus dem Knochenmark ... 58
5.12 Immunhistochemische Färbung von Tumoren und Lymphknoten ... 60

IV. ERGEBNISSE ... 62

6. Typisierung von Ret-transgenen Mäusen ... 62

7. T-Zell - Antwort in Ret-tg Mäusen ... 62
7.1 unspezifische Stimulation von T-Zellen aus Ret-tg Mäusen in vitro ... 62
7.2 T-Zell vermittelte Immunantwort gegen Modell- (Ovalbumin) und Melanom- assoziierte (TRP-2) Antigene nach Immunisierung ... 65
7.2.1 Immunisierung mit Ovalbumin mittels pcDNA3.1-Ova ... 66
7.2.1.1 Ex vivo Nachweis Ova-spezifischer T-Zellen mittels Tetramer Färbung ... 66
7.2.1.2 Ex vivo Nachweis Ova-spezifischer T-Zellen mittels IFN-γ ELISPOT ... 67
7.2.2 Immunisierung mit TRP-2 Peptid ... 69
7.2.2.1 Ex vivo Nachweis TRP-2-spezifischer T-Zellen mittels Tetramerfärbung ... 69
7.2.2.2 Ex vivo Nachweis TRP-2-spezifischer T-Zellen mittels IFN-γ ELISPOT ... 70

8. Tumorentwicklung in Ret-tg Mäusen ... 71
8.1 Phänotypen von Ret-tg Mäusen ... 71
8.2 Statistiken ... 72
8.2 Expression melanomassoziierter Antigene in Tumoren von Ret-tg Mäusen ... 73
8.3 Expression melanomassoziierter Antigene in Lymphknoten von Ret-tg Mäusen ... 73

9. Gedächtnis T-Zellen in Ret-tg Mäusen 75
9.1 Gedächtnis T-Zellen im Knochenmark 76
9.2 Gedächtnis T-Zellen in der Milz 79
9.3 Gedächtnis T-Zellen im Tumor von Ret-tg Tumor tragenden Mäusen 80

10. TRP-2 spezifische Gedächtnis T-Zellen in Ret-tg Mäusen 81
10.1 TRP-2 spezifische Gedächtnis T-Zellen im Knochenmark von Ret-tg tu Mäusen 82
10.2 TRP-2 spezifische Gedächtnis T-Zellen im Knochenmark von Ret-tg tumorfreien Mäusen 84
10.3 Tumor infiltrierende TRP-2-spezifische Gedächtnis T-Zellen in Ret-tg tu Mäusen 85
10.4 TRP-2 spezifische Gedächtnis T-Zellen in der Milz von Ret-tg tu Mäusen 86

11. Funktion von Gedächtnis T-Zellen 88
11.1 Dendritische Zellen aus Knochenmark-Vorläuferzellen 88
11.2 Analyse von isolierten T-Zellen aus dem Knochenmark 90
11.3 Funktionalität Melanomantigen-spezifischer T-Zellen aus Ret-tg tu Mäusen 91
11.4 Kokultur von DCs mit T-Zellen aus dem Knochenmark Ret-tg Mäuse 93

V. DISKUSSION 96

12. Ret-tg Mäuse können Antigen-unspezifische und spezifische T-Zell-Antworten generieren. 96

13. Tumorentwicklung in Ret-tg Mäusen 97

14. Gedächtnis T-Zellen in Ret-tg Mäusen 98

15. Melanomantigen-spezifische Gedächtnis T-Zellen in Ret-tg Mäusen 100

VI. LITERATURVERZEICHNIS 105

VII. ANHANG 120

Abbildungsverzeichnis 120

Abkürzungsverzeichnis 123

Zusammenfassung

Das humane maligne Melanom spricht kaum auf gängige Therapien an was es notwendig macht, neue innovative Behandlungsstrategien zu entwickeln. Ein gutes Werkzeug hierfür ist die Verwendung von Spontanmelanom-Tiermodellen, die das humane Melanom hinsichtlich genetischer, histopathologischer und klinischer Situation kopieren. Für die vorliegende Arbeit wurde ein Spontanmelanom-Mausmodell herangezogen in dem das Ret-Transgen in Melanozyten unter der Kontrolle des Metallothionein-I Promotors überexprimiert wird (Ret-tg). Nach einer Latenzzeit von 20-150 Tagen entwickeln etwa 20% der transgenen Tiere (mit C57Bl/6 Hintergrund) Melanome in der Haut, die in Lymphknoten, Lunge und Gehirn metastasieren. Die entstandenen Tumoren exprimierten Melanom-assoziierte Antigene (MAA) wie *tyrosinase related protein* (TRP)-1, TRP-2 und gp100, die als Ziele für eine Immuntherapie herangezogen werden könnten. Ret-tg tumorfreie Mäuse konnten sowohl antigen-unspezifische als auch MAA-spezifische T-Zell-Antworten generieren, die in tumortragenden Tieren teilweise supprimiert waren. In der Literatur wurde gezeigt, dass im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen Tumorantigen-spezifische *central memory* (CM) und *effector memory* (EM) T-Zellen existieren. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CM T-Zellen im Knochenmark von melanomtragenden Ret-tg Mäusen im Vergleich zu tumorfreien Ret-tg Tieren und nicht-transgenen Kontrolltieren angereichert waren. Mit Hilfe von Tetramerfärbungen mit MHC-I Komplexen und gebundenem TRP-2 Peptid konnten in 80% der tumortragenden Ret-tg Mäusen Melanomantigen-spezifische T-Zellen im Knochenmark nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten in 68% der untersuchten Tiere TRP-2-spezifische tumorinfiltrierende (TILs) T-Lymphozyten gefunden werden. Die Mehrheit dieser Zellen im Knochenmark und Tumor zeigten einen Gedächtnis Phänotyp. In 43% makroskopisch tumorfreier Ret-tg Mäuse, die älter als 20 Wochen waren, konnten ebenfalls TRP-2-spezifische Gedächtnis T-Zellen nachgewiesen werden. Nach einer kurzzeit-Kokultur mit dendritischen Zellen, die aus Knochenmarkvorläuferzellen aus C57Bl/6 wildtyp Tieren generiert und mit Melanomlysat beladen wurden, konnten Gedächtnis T-Zellen aus dem Knochenmark von tumorfreien und tumortragenden Ret-tg Mäuse zur Produktion von IFN-γ reaktiviert werden. Bereits in der latenten Phase der Melanomentwicklung existieren also funktionelle Melanom-spezifische Gedächtnis T-Zellen im Knochenmark, die dort über lange Zeit gelagert werden. Eine effektive Melanom-Immuntherapie könnte daher auf einem adaptiven Transfer *in vitro* restimulierter Gedächtnis T-Zellen aus dem Knochenmark von Melanompatienten, zusammen mit MAA beladenen DCs basieren.

Summary

Poor response of human malignant melanoma to currently available therapeutics requires development of innovative treatment strategies based on animal models that resemble human melanoma with respect to genetics, histopathology and clinical features. For this work a recently developed mouse model of spontaneous skin melanoma was used, in which ret transgene (tg) is expressed in melanocytes under the control of metallothionein-I promoter (Ret-tg). After a short latency (1-3 months), around 19% of mice (C57Bl/6 background) develop skin melanoma metastasizing to lymph nodes, lungs and brain. In this work it was shown that tumors expressed melanoma associated antigens (MAA) tyrosinase, tyrosinase related protein (TRP)-1, TRP-2 and gp100, which could be applied as targets for the immunotherapy. Ret-tg mice without tumors could generate both antigen-unspecific and melanoma antigen-specific T-cell reactions, which were down-regulated in melanoma bearing mice. It was previously reported that the bone marrow (BM) of breast cancer patients contained tumor antigen-specific T cells with central (CM) or effector memory (EM) phenotype. Here it was shown that CM T cells were enriched in the BM of Ret-tg mice with visible skin melanoma lesions as compared to non-transgenic littermates or Ret-tg mice without tumors. Stainings with tetrameric complexes containing MHC class I H-2K^b and TRP-2 derived peptide (SVYDFFVWL) revealed that 80% of tumor bearing mice contained melanoma-specific T cells in the BM. In addition, TRP-2-specific tumor infiltrating T lymphocytes (TILs) were found in 68% of tumor bearing mice. Most of these cells in the BM or tumor showed memory phenotype. Moreover BM of 43% studied Ret-tg mice at the age of 20 weeks and older without macroscopically detectable melanoma also contained TRP-2-specific T cells predominantly with memory phenotype. After a short-term incubation with dendritic cells (DCs) generated from the BM of wild type mice and pre-pulsed with the melanoma lysate, these memory BM T cells from Ret-tg mice both with and without tumor could be reactivated to IFN-γ-producing effector cells. This data suggest that functionally active melanoma-specific memory T cells appeared in the BM of Ret-tg mice already at the latent stage of spontaneously developing melanoma and could be maintained there at more advanced melanoma stages. Thus, effective melanoma immunotherapy could be based on the adoptive transfer of specifically restimulated BM-derived T cells together with MAA-loaded DCs.

I. Einleitung

1. Das Immunsystem und Anti-Tumor-Immunität

Der menschliche Körper ist ein System genau aufeinander abgestimmter Prozesse, in dem jedes Organ und jedes Zellsystem genau definierte Aufgaben haben. Dieses System kann durch Krankheiten, welche z.B. über in den Körper eingedrungene Pathogene ausgelöst werden, gestört und zum Zusammenbrechen gebracht werden. Viele verschiedene Gewebe, Zellen und Zellprodukte wirken zusammen und bilden das körpereigene Immunsystem, das eingedrungene Krankheitserreger erkennt, bekämpft und beseitigt. Das Immunsystem kann in zwei Teile unterschieden werden, die angeborene (natürliche) und die adaptive (erworbene) Immunität (1-3).

Das angeborene Immunsystem wirkt unspezifisch. Es umfasst eine Reihe rasch wirkender Komponenten, wie das Komplementsystem, Granulozyten, Makrophagen, natürliche Killer (NK)-Zellen und dendritische Zellen (DCs). NK-Zellen sind lymphoiden Ursprungs und töten z.B. von Virus befallene Zellen durch Ausschüttung von lytischen Granulen. DCs sind entscheidend für eine T-Zell vermittelte Immunantwort und bilden so ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem.

Neben der angeborenen unspezifischen Immunantwort kann und muss der menschliche Körper spezifische Abwehrreaktionen gegen eingedrungene Pathogene entwickeln. Verantwortlich hierfür sind zwei Zellsysteme, die aus einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle hervorgehen, jedoch an unterschiedlichen Orten reifen und unterschiedliche Antigenrezeptoren aufweisen. Die sog. humorale Immunität wird durch B-Lymphozyten vermittelt, die im Knochenmark reifen und nach ihrer Aktivierung zu antikörperbildenden Plasmazellen differenzieren. Diese produzieren jeweils einen einzelnen, „monoklonalen“ Antikörper, der perfekt zu einem bestimmten Antigenepitop passt. T-Lymphozyten reifen indessen im Thymus und stellen den zellulären Teil der adaptiven Immunantwort.

1.1 Antigenpräsentierende Zellen

T-Lymphozyten werden durch Antigene aktiviert, die ihnen von antigenpräsentierenden Zellen über den „*major histocompatibility complex*“ (MHC) präsentiert werden. Man unterscheidet zwei MHC-Klassen, die von verschiedenen T-Zell Subtypen erkannt werden.
Alle zellkernhaltigen Körperzellen exprimieren MHC-Klasse-I Moleküle (MHC-I) auf ihrer Oberfläche. MHC-I bindet zelluläre oder virale Peptide, die im Zytosol der betroffenen Zelle synthetisiert und durch das Proteasom proteolytisch prozessiert werden. Die Peptidbeladung des MHC-I Komplex findet im endoplasmatischen Retikulum statt. Anschließend wird der beladene Komplex an die Zelloberfläche transportiert. T-Zell Rezeptor (TCR) und CD8 Korezeptor auf zytotoxischen T-Zellen ($CD8^+$ T-Zellen) erkennen und binden spezifisch beladene MHC-I Moleküle. Besitzt diese $CD8^+$ T-Zelle den zum präsentierten Antigen passenden TCR, führt dies zu einer Ausschüttung von Perforin und Granzym, wodurch die Zielzelle abgetötet wird. MHC-I Moleküle besitzen zudem die Fähigkeit, über sog. Kreuzpräsentation auch extrazellulär aufgenommene Peptide präsentieren zu können (4-6).
MHC-Klasse-II Moleküle (MHC-II) präsentieren Teile vesikulärer Proteine, die von Makrophagen oder DCs phagozytiert und proteolytisch durch die Fusion von Lysosomen und Phagosomen prozessiert wurden. So findet man MHC-II auch ausschließlich nur auf diesen Immunzellen. Er wird von einer weiteren Unterklasse der T-Lymphozyten, den T-Helfer Zellen ($CD4^+$ T-Zellen) erkannt.
Zu den professionellen antigenpräsentierenden Zellen zählt man Makrophagen, B-Lymphozyten und DCs. Sie werden nach Kontakt mit einem Pathogen oder durch inflammatorisch wirkende Substanzen wie Zytokine aktiviert und wandern in die T-Zell-Areale der regionalen Lymphknoten ein (7, 8). Auf diesem Weg durchlaufen sie einen Reifungsprozess, während dessen es zu einer stabilen Expression des MHC-Peptid-Komplexes, zur Hochregulation verschiedener kostimulatorischer Moleküle und zur Produktion verschiedener Chemokine und Zytokine kommt.
Makrophagen und B-Zellen exprimieren kostimulatorische Moleküle nicht konstitutiv. Erst nach Aktivierung kommt es zu einer Hochregulation der betreffenden Moleküle. Einzig DCs exprimieren bereits im unreifen Zustand kostimulatorische Moleküle konstitutiv, wenn auch in niedrigen Mengen (9, 10).

1.2 Dendritische Zellen

DCs sind die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen, da sie nicht nur primäre Immunantworten induzieren können, sondern auch für den Aufbau des immunologischen Gedächtnisses unabdingbar sind (7, 9-12). Einen Großteil der DCs stellen die sog. myeloiden DCs (mDCs) dar. Sie entstehen neben Makrophagen und Granulozyten aus $CD34^+$ myeloiden Vorläuferzellen (9). Einen wesentlich geringerer Anteil der DCs kann aus $CD14^+$ lymphoiden Vorläuferzellen hervorgehen und entwickelt sich zu den sog. Plasmazytoiden DCs (pDCs) (9). Die beiden Untergruppen unterscheiden sich durch die Expression der Markerproteine CD8α, DEC-205 und CD1d, die nur von pDCs exprimiert werden (9). pDCs produzieren im Vergleich zu mDCs größere Mengen an Interleukin-12 (IL-12), sind aber weniger phagozytotisch als diese (13, 14). mDCs lassen sich *in vitro* aus $CD34^+$ Knochenmark-Vorläuferzellen durch Zusatz des Zytokins *granulocyte / macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) generieren. pDCs reifen durch Zusatz von IL-3 und Interferon (IFN)-α.
mDCs wandern aus dem Knochenmark in peripheres Gewebe wie Lunge oder Haut ein, wo sie im unreifen Zustand verbleiben. Unreife DCs zeichnen sich durch vermehrtes Aufnehmen von Antigenen aus, wogegen sie im reifen Zustand die aufgenommenen Antigene prozessieren und präsentieren. DCs reifen durch die Aufnahme von Antigenen in der Peripherie und sekretieren dann große Mengen an Zytokinen (z.B. IFN-α und IL-12). Sie exprimieren verstärkt MHC Moleküle sowie die Aktivierungsmarker CD40, CD80 und CD86. Nach Aufnahme von Antigenen exprimieren DCs den Chemokin Rezeptor 7 (CCR7). Dessen Liganden CCL19 und CCL21 werden von den Lymphknoten produziert und ermöglichen so ein Einwandern der reifen DCs in die sekundären lymphatischen Organe (15), wo sie Antigen-spezifische T-Lymphozyten aktivieren (7, 9-12).
Auch für die Abwehr von Tumorzellen spielen DCs eine entscheidende Rolle. Sie phagozytieren abgestorbene Tumorzellen und präsentieren deren Antigene T-Lymphozyten, was sie zu potenten Zellen für immuntherapeutische Ansätze gegen Krebs macht (siehe 3.5.3). Tumoren haben Strategien entwickelt, der Erkennung durch DCs zu entgehen. Von Tumorzellen sezernierte Faktoren, wie der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und IL-10 führen zu einer abnormalen Differenzierung myeloider Zellen. Die Expression von MHC-II und kostimulatorischen Molekülen wird unterdrückt und die Maturierung der DCs verhindert.

Wenn solche tolerogenen DCs, im unreifen Zustand auf T-Lymphozyten treffen, produzieren sie immunsuppressive Agenzien, wie IL-10, *tumor growth factor* (TGF)-β oder exprimieren das Enzym indoleamin 2,3-dioxygenase (IDO), was wiederum zu einer Reifung regulatorischer T-Zellen (Treg) aus unreifen $CD4^+$ T-Zellen führt (16-18) und zytotoxische T-Zellen anergisch macht (19). Der Stat-3 Signalweg in Tumorzellen spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle in der Unterdrückung der adaptiven Immunantwort über die Blockade von DCs (20). Stat-3 reduziert einerseits in Tumorzellen die Expression von pro-inflammatorisch wirkenden Mediatoren und induziert andererseits die Produktion von Faktoren, die eine Reifung der $CD34^+$ Knochenmark-Vorläuferzellen über den Stat-3 Signalweg blockieren (20).

1.3 T-Lymphozyten

Hämatopoetische Vorläuferzellen wandern aus dem Knochenmark in den Thymus ein und reifen dort zu T-Zellen heran. Im Mikromilieu dieses lymphatischen Organs findet die T-Zell Entwicklung, „Reifung“ und die Bildung des T-Zell Rezeptorrepertoires statt. Dabei kommt es zunächst zu einer Positivselektion, wobei nur T-Zellen überleben, die in der Lage sind, körperspezifisches MHC zu binden. Darauf folgt eine Negativselektion, über die T-Zellen eliminiert werden, die an über den MHC Komplex präsentierte, körpereigene Antigene binden können. Die verbliebenen „gereiften“, aber naiven T-Lymphozyten verlassen den Thymus und wandern in die sekundären lymphatischen Organe ein, wo sie von professionell antigenpräsentierenden Zellen aktiviert werden können. Einmal aktiviert, proliferieren und differenzieren sie zu bewaffneten Effektorzellen.

Die Antigenerkennung erfolgt über ein hochvariables Molekül, den Antigen-spezifischen TCR. Der TCR ist mit dem CD3 Komplex und einem Homodimer aus ξ-Ketten assoziiert (21), über die die Signalübertragung ins Zytosol der Zelle vermittelt wird. Als Ligand für den TCR fungiert ein körperfremdes Peptid, das an MHC-I oder MHC-II gebunden ist. Damit naive T-Zellen aktiviert werden, benötigen sie zum einen die Erkennung eines MHC gebundenen Fremdantigens, zum anderen aber auch kostimulatorische Moleküle, wie CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2), die über CD28 auf naiven T-Zellen gebunden werden. Fehlt dieses kostimulatorische Signal, werden die T-Zellen anergisch (22, 23).

1.3.1 $CD8^+$ T-Lymphozyten

$CD8^+$ T-Zellen besitzen ein breites Spektrum an Effektormolekülen, wie Perforin und Granzyme, die nach ihrer Aktivierung freigesetzt werden können. Perforin permeabilisiert die Plasmamembran der betroffenen Zelle, wodurch Granzyme ins Zytoplasma eindringen und Apoptose auslösen (24). IFN-γ ist ein weiteres Effektormolekül von $CD8^+$ T-Zellen. Es aktiviert mit Pathogenen infizierte Makrophagen und fördert daneben die Reifung von T-Zellen und die Proliferation von $CD8^+$ T-Zellen. IFN-γ führt zu effizienter Antigenpräsentation über die gesteigerte Expression von MHC-I und MHC-II Molekülen auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen, sowie von Peptidtransportmolekülen (25).

1.3.2 $CD4^+$ T-Lymphozyten

Als Charakteristisches Merkmal tragen $CD4^+$ T-Lymphozyten den CD4 Korezeptor. Man unterscheidet T_H1- und T_H2, sowie regulatorische (Treg) $CD4^+$ T-Zellen.
T_H1 $CD4^+$ T-Zellen rekrutieren über Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine (IFN-γ, IL-2, TNF-α) Makrophagen und induzieren in diesen die Fusion von Lysosomen und Phagosomen, damit beschleunigen sie den Verdau und die Prozessierung neu phagozytierter pathogener Proteine und tragen zu einer Verstärkung der Immunantwort bei.
T_H2 $CD4^+$ T-Zellen regen B-Zellen über anti-inflammatorische Zytokine (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 und IL-13) zur Antikörperbildung an und induzieren damit eine humorale Immunantwort zur Eliminierung extrazellulärer Antigene; gleichzeitig produzieren sie IL-10 und Tumornekrosefaktor-β (TNF-β) womit sie die zelluläre Immunantwort inhibieren.

1.3.3 regulatorische $CD4^+$ T-Zellen

Eine weitere Untergruppe der $CD4^+$ Zellen stellen die regulatorischen T-Zellen (Treg) dar. Natürlich vorkommende Treg sind vor allem durch die konstitutive Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3, aber auch der Oberflächenmarker CD25, CTLA-4 und des Glukocortikoid-induzierten TNF Rezeptors (GITR) gekennzeichnet (26-29). Sie reifen im Thymus und stellen etwa 5-10% des peripheren $CD4^+$ T-Zell Repertoires in Mäusen (28).
Ihre Funktion besteht in der Unterdrückung einer Immunantwort durch potenziell autoreaktiven T-Zellen.

Neueste Forschungsergebnisse zeigten, dass Treg *in vitro* auf eine Vielzahl von Zellen des Immunsystems wirken können, darunter $CD4^+$ T-Zellen, $CD8^+$ T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und DCs (30). Die genauen inhibitorischen Mechanismen sind vielfältig und konnten noch nicht vollständig geklärt werden. Wichtig scheinen ein direkter Zell-Zell-Kontakt sowie die Ausschüttung inhibitorisch wirkender Stoffe wie IL-10 oder TGF-β zu sein (31). Treg produzieren z.B auch hohe Mengen von „*cyclic adenosine monophosphate*“ (cAMP), einem starken Proliferationsinhibitor, der über *gap junctions* in die Zielzelle gelangt (32). Auch die Expression der Oberflächenmoleküle CD39 und CD73 auf Treg können eine Suppression von Effektor T-Zellen auslösen (33). Fehlen, oder Fehlfunktion von Treg geht einher mit schweren Autoimmunerkrankungen (26). Auch in der Tumorentwicklung spielen Treg vermutlich eine Rolle. So wurde beispielsweise gezeigt, dass die Depletion von Treg zu einer verstärkten Immunantwort gegenüber Tumoren beiträgt (34).

1.4 NK-Zellen

Gesunde Körperzellen sind über bestimmte Markerproteine, wie z.B. MHC-I, an ihrer Oberfläche gekennzeichnet; fehlen diese, kommt es zur Erkennung durch NK-Zellen (*missing self recognition*). In vielen Tumorzellen geht während der malignen Transformation die Expression von MHC-I verloren, wodurch sie von NK-Zellen als „nicht-eigen“ erkannt werden können (35).

Erkannt werden ebenfalls Zellen mit der Expression von Molekülen die normalerweise nicht exprimiert werden. Diese Moleküle werden über den aktivierenden Rezeptor NKG2D gebunden, der redundant an verschiedene Oberflächenproteine, die weitläufig mit MHC-I verwandt sind, binden kann (36). Zu diesen Liganden gehören MICA/B (*MHC class I chain-related proteins A and B*) sowie UL16-bindende Proteine (ULBP1-4). Sie werden charakteristischerweise vermehrt von Zellen unter Stress (Hitzeschock, Transformation) oder nach Infektion mit Viren oder Mycobakterien produziert. Tumorzellen exprimieren ebenfalls Liganden für NKG2D, produzieren aber oft gleichzeitig Prostaglandin E2, das eine NK-Zell-Aktivität unterdrückt (37).

1.5 Gedächtnis T-Lymphozyten

Nach einer Immunantwort mit erfolgreicher Klärung des Fremdantigens, kommt es zur Apoptose eines Großteils der Effektorzellen. Einige Antigen-spezifische Lymphozyten sind allerdings von diesem Zelltod nicht betroffen und etablieren das sog. immunologische Gedächtnis. Gedächtniszellen zeichnen sich durch eine extreme Langlebigkeit aus und können im Falle eines erneuten Treffens auf ihr Antigen sehr schnell und effektiv reagieren (38). Sie benötigen im Gegensatz zu naiven T-Zellen nur geringe Antigenkonzentrationen, um zu reagieren (39) und sind weniger abhängig von kostimulatorischen Signalen (40). Zudem proliferieren sie schneller nach Stimulation und sezernieren ein breiteres Spektrum an Zytokinen (41).

Ein Großteil der Gedächtnis T-Zellen verbleibt in einem ruhenden Stadium; nur ein kleiner Anteil durchläuft zu definierten Zeitpunkten eine Proliferation (41, 42). Von verschiedenen Zellen und DCs sezerniertes IL-7 und IL-15 spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung Antigen-spezifischer Gedächtnis T-Zellen (43-45).

Gedächtnis T-Zellen können in zwei Subpopulationen unterschieden werden. Die sog. „*central memory*“ (CM) und „*effector memory*“ (EM) T-Zellen (46). CM T-Zellen exprimieren CD62L und CCR7, weswegen sie in den sekundären lymphatischen Organen zu finden sind. Sie besitzen ein hohes proliferatives Potenzial und zeigen wenig Effektorfunktion. Nach Stimulation produzieren sie zunächst IL-2, wodurch es zur raschen Proliferation von CM T-Zellen kommt. Erst nach einer sekundären Stimulation beginnen sie mit der Produktion von Effektormolekülen, wie IFN-γ oder IL-4 (47).

EM T-Zellen exprimieren keine *homing*-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche und zirkulieren hauptsächlich durch nicht-lymphatisches Gewebe. Sie reagieren auf einen primären Stimulus sehr schnell mit der Produktion von IFN-γ und IL-4 (47). Es wurde postuliert, dass CM T-Zellen als Quelle neuer EM T-Zellen dienen. Dafür kommt es z.B nach einem sekundären Stimulus zum Verlust von CD62L und CCR7, wodurch CM T-Zellen aus den Lymphknoten auswandern und zu EM T-Zellen differenzieren (47).

Gedächtnis T-Zellen und naive T-Zellen unterscheiden sich durch die Expression verschiedener Oberflächenmarker, wie CD45RB (Maus), CD45RA (Mensch), CD45RO (Mensch) CD44 (Maus), L-Selektin (CD62L) und des Chemokinrezeptors CCR7 (Maus / Mensch) (40, 48). Naive Zellen in der Maus exprimieren kein CD44, zeigen jedoch eine hohe Expression von CD45RB, CD62L und CCR7 (Tab. 1.1). Im humanen System exprimieren Gedächtnis T-Zellen CD45RA niedrig und CD45RO hoch.

CD62L und CCR7 sind wichtige Adhäsionsmoleküle, mit deren Hilfe die Lymphozyten in die Lymphknoten geleitet werden (*homing*) (49, 50).

Oberflächenmarker (Maus)	Naive T-Zellen	Central Memory T-Zellen	Effector Memory T-Zellen
CD45RB ($CD4^+$)	hoch	niedrig	niedrig
CD44 ($CD8^+$)	niedrig	hoch	hoch
CD62L ($CD4^+/CD8^+$)	hoch	hoch	niedrig
CCR7 ($CD4^+/CD8^+$)	hoch	hoch	niedrig

Tab.1.1 *Expression von Oberflächenmarkern auf Gedächtnis T-Zell Subpopulationen*

Der Entwicklungsweg von Gedächtnis T-Zellen konnte bislang nicht vollständig geklärt werden. Das zurzeit anerkannte Modell von Lanzavecchia und Sallusto (51) geht von Unterschieden in der Signalstärke von Antigen-präsentierenden Zellen aus.

Zirkulieren nur geringe Mengen Fremdantigen im Körper, kommt es nur zu einer schwachen Stimulation der naiven T-Lymphozyten, was zu einer unvollständigen Aktivierung führt. Die dann sog. „unfitten“ T-Zellen gehen nach kurzer Zeit apoptotisch ab. Es kommt zu keiner Bildung von Gedächtnis T-Zellen (Abb. 1.1 a).

Bei einer hohen Konzentration an zirkulierendem Fremdantigen kommt es im Laufe der Immunantwort zu einer Verstärkung des Signals über Rekrutierung von zusätzlichen antigenpräsentierenden Zellen und gleichzeitiger Hochregulation der MHC Moleküle auf deren Oberfläche. Dies führt zur vollständigen Aktivierung der naiven T-Zellen und letzten Endes zur Klärung des Antigens. Im Laufe der zunehmenden Signalstärke stoppen einige naive T-Zellen ihre Ausdifferenzierung zu Effektor T-Zellen. Sie entwickeln sich in Abhängigkeit von der Signalstärke entweder zu CM (schwaches Signal) oder EM T-Zellen (starkes Signal). CM T-Zellen erhalten mit IL-7 ein Überlebenssignal, verbleiben später unter Einwirkung von IL-15 dauerhaft im Körper und können bei Bedarf zu EM T-Zellen ausdifferenzieren. EM T-Zellen verbleiben für eine Weile im Körper und können gegebenenfalls bei erneutem Auftreten des Antigens schnell reagieren. Sie haben eine geringere Lebenserwartung als CM T-Zellen und sterben bei Ausbleiben eines erneuten Stimulus nach einiger Zeit über Apoptose (Abb. 1.1 b).

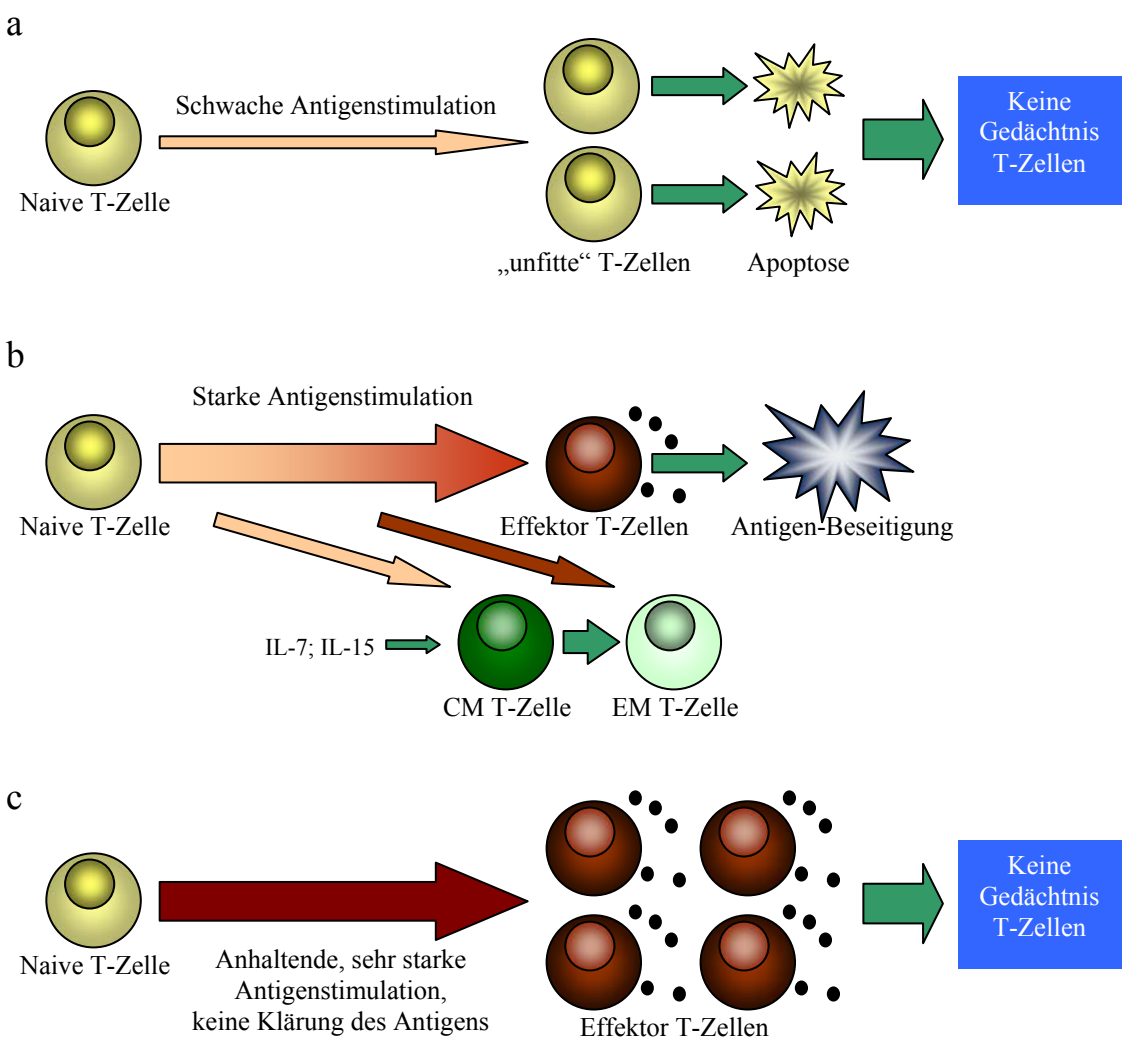

Abb. 1.1 *Differenzierungsmodell für Gedächtnis T-Zellen (nach (48))*

Bei anhaltender und sehr starker Antigenstimulation, bei der es zu keiner Klärung des Antigens kommt, differenzieren naive T-Zellen nur zu Effektor T-Zellen, ohne dass es zur Bildung eines T-Zell Gedächtnisses kommt. Dies ist beispielsweise bei einer chronischen Entzündung der Fall und soll den Körper vor einer übermäßigen Schädigung körpereigener Zellen durch das Immunsystem schützen (Abb. 1.1 c).

1.5.1 Das Knochenmark als Quelle für tumorspezifische Gedächtnis T-Zellen

Das Knochenmark ist ein stark durchblutetes lymphatisches Organ mit einem geeigneten Mikromilieu für Interaktionen zwischen Parenchymzellen, zirkulierenden Lymphozyten und antigenpräsentierenden Zellen (52).

Nach gängiger immunologischer Lehrmeinung findet die Aktivierung naiver antigenspezifischer T-Zellen ausschließlich in den sekundären lymphatischen Organen wie Lymphknoten und Milz statt. Neuere Forschungsergebnisse widersprechen dem und postulieren, das Knochenmark spiele als sekundäres lymphatisches Organ gleichfalls eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von naiven Antigen-spezifischen Zellen (53). Zudem wurde gezeigt, dass das Knochenmark als Hauptreservoir für Gedächtnis T-Zellen anzusehen ist, die sich dort in Follikel-ähnlichen Strukturen ansammeln (54-57). Die Rekrutierung von Gedächtnis T-Zellen aus dem Blut in das Knochenmark erfolgt über verschiedene Mechanismen wie die Interaktion von *very late activation antigen* (VLA)-4, das auf Gedächtnis T-Zellen exprimiert wird, mit dem im Knochenmark konstitutiv exprimierten Adhäsionsmolekül *vascular cell adhesion molecule* (VCAM)-1. Ein weiterer Mechanismus funktioniert über die Bindung von *mucosal addressin cell adhesion molecule* (MAdCAM)-1, an $\alpha_4\beta_7$ Integrin Moleküle, die auf Gedächtnis T-Zellen stark exprimiert werden (56, 58-60).
EM T-Zellen zeigen eine erhöhte Expression der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5, sowie eine verminderte Expression von CXCR1. CXCL12, der Ligand des Rezeptors CXCR4, wird sowohl von Stromazellen als auch auf dem Endothel von Mikrogefäßen im Knochenmark konstitutiv exprimiert (61, 62). CCL3 und CCL5, beides Liganden für CCR5, werden von Knochenmarksfibroblasten produziert (63). CXCL8, der Rezeptor für CXCR1, dagegen induziert die Auswanderung von hemopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark. Dieses Expressionsmuster begünstigt die Einwanderung von EM T-Zellen ins Knochenmark (64).
Lange persistierende Tumorantigen-spezifische Gedächtnis T-Zellen wurden auch im Knochenmark von mit Tumorzellen vakzinierten Mäusen nachgewiesen (65). Gleichzeitig wurde die Existenz vereinzelter ruhender Tumorzellen im Knochenmark beschrieben. Dieser Ruhezustand wird als „*tumordormancy*“ bezeichnet und aktiv von Knochenmark-ansässigen Tumor-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen aufrechterhalten (65). Ein Verlust dieser T-Zellfunktion kann selbst nach langer Latenzzeit zum Auswachsen von Metastasen führen (65).
Im Knochenmark von Patienten mit Pankreaskarzinom, Brustkrebs und Melanom konnten ebenfalls Tumor-spezifische Gedächtnis T-Zellen nachgewiesen werden (58, 66-68). In 60% konnten solche Tumor-spezifischen Gedächtnis T-Zellen aus dem Knochenmark *in vitro* über Stimulation mit Tumorlysat-beladenen DCs sowohl zur Produktion von IFN-γ angeregt werden, und zeigten als auch eine gute Zytotoxizität gegen Tumorzellen *in vitro* (58, 69).

2. Das maligne Melanom

Das maligne Melanom, der sog. „schwarze Hautkrebs“ entsteht durch Transformation pigmentbildender Hautzellen (Melanozyten) und manifestiert sich vor allem in der Haut, aber auch im Auge (Uvea und Retina), den Hirnhäuten und den Schleimhäuten (70-72). Melanome können sich spontan auf normaler Haut oder auf dem Boden eines vorbestehenden Nävus entwickeln. Das Melanom ist ein äußerst aggressiver Tumor, der schon bei geringer Tumormasse eine Tendenz zur Metastasierung in verschiedene Organe wie Lunge, Leber, Haut oder Gehirn zeigt (70, 71).

2.1 Epidemiologie

Die Inzidenz für Hautkrebserkrankungen ist innerhalb der letzten Jahrzehnte dramatisch angestiegen. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) erkranken weltweit jedes Jahr zwischen 2 und 3 Millionen Menschen an Hautkrebs, davon ca. 132.000 an malignem Melanom. Die Inzidenz in Westeuropa liegt zwischen 7-15 Fällen, in Australien sogar bei über 80 Fällen pro 100.000 Einwohnern und Jahr (73, 74).
Mit 90% stellt das maligne Melanom die häufigste Todesursache an Hauttumoren weltweit dar. Die Ursachen der Melanomentstehung konnten noch nicht hinreichend geklärt werden. Als Risikofaktoren für die Entwicklung eines Melanoms werden unter anderem: eine hohe Anzahl an Muttermalen und dysplastischen Nävi, ein heller Hauttyp, schwere Sonnenbrände in der Kindheit und familiäre Vorbelastung eingestuft (75). Durchschnittlich treten Erkrankungen am malignen Melanom im Alter von 50-55 Jahren auf, wobei immer häufiger auch junge Menschen zu den Betroffenen zählen (76, 77).

2.2 Einteilung und Krankheitsverlauf

Das maligne Melanom kann in vier Grundtypen unterteilt werden, die sich in ihrer Häufigkeit, dem Verlauf und der Invasivität unterscheiden (Abb. 2.1): das superfiziell spreitende Melanom (SSM) das noduläre Melanom (NM), das Lentigo-maligna Melanom (LMM) und das akrolentiginöse Melanom (ALM) (78). Die am häufigsten auftretende Variante ist das SSM.

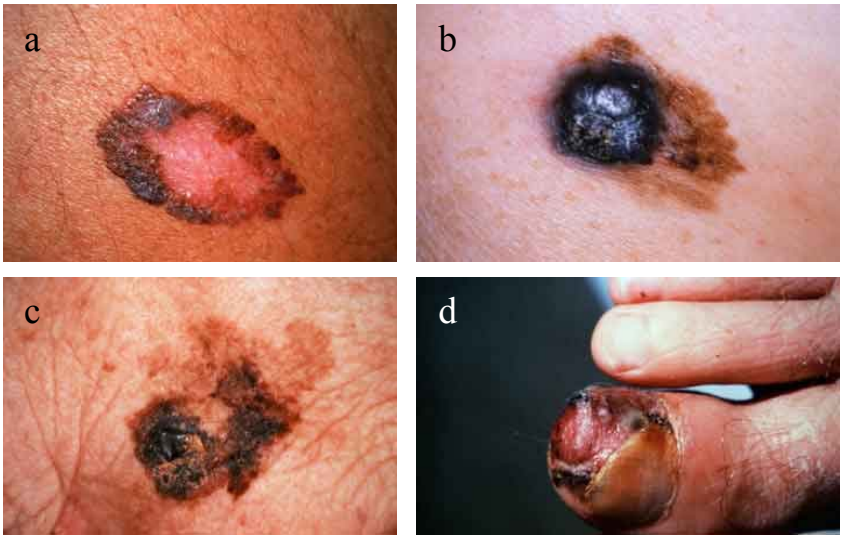

Abb. 2.1 *Melanomtypen: SSM (a), NM (b), LMM (c) und ALM (d) (Quelle: www.melanom.net)*

Der Krankheitsverlauf des malignen Melanoms wird in vier Stadien unterteilt, die auf der sog. TNM-Klassifikation beruhen: Tumordicke (T), Lymphknotenbeteiligung (N) und Fernmetastasen (M) (entsprechend der aktuellen Einteilung durch das *American Joint Committee on Cancer*, AJCC, 2002). In den Stadien I bis III findet ein lokal begrenztes Tumorwachstum statt. Zunächst breiten sich die Melanomzellen horizontal-intraepidermal aus (Lentigo-Maligna, *in situ* Melanom), durchdringen dann durch vertikales Wachstum die Basalmembran, und dringen in die Dermis oder bereits die Subkutis ein (Stadium I/II). Es kann dann eine lymphogene oder hämatogene Metastasierung erfolgen, bei der zunächst lokal angrenzende Lymphknoten befallen werden (Stadium III), oder durch die Verbreitung über die Blutbahn sich Melanomzellen in der Lunge, Leber, Haut, Knochen und dem Gehirn ansiedeln (Stadium IV). Man spricht dann von einer systemischen Erkrankung (79). Die Metastasierung des Melanoms über das Blut, oder das Lymphatische System verschlechtert gleichzeitig die Überlebensprognose des Patienten (80).

Zu den prognostischen Faktoren zählt auch das Geschlecht, wobei für Männer die Prognose signifikant schlechter ist, als für Frauen (81). Die 10-Jahres-Überlebensrate ist abhängig vom Stadium des Melanoms. Bei dünnen Primärtumoren liegt sie bei 88-95%, sinkt bei Satelliten und In-transit-Metastasen auf 30-50% und bei klinisch manifestierten regionären Lymphknoten Metastasen auf 20-40%. Hat das Melanom bereits Fernmetastasen gebildet, liegt die mediane Überlebenszeit bei 6-9 Monaten. Nur 6% der Patienten überleben länger als 5 Jahre (82).

2.3 Konventionelle Melanom Therapien

2.3.1 Operativer Eingriff

Als erster wichtiger Punkt in der Melanomtherapie steht die operative Entfernung des Melanoms. Dabei wird darauf geachtet, dass um den Tumor herum ein ausreichend großes Stück gesunden Gewebes mit herausgeschnitten wird, um sicherzustellen, dass alle entarteten Zellen entfernt werden. Ferner werden alle Hautschichten unter dem Tumor herausgenommen (83).

2.3.2 Strahlentherapie

Charakteristisch für das Melanom ist die große Potenz zur Reparatur des sublethalen Strahlenschadens der Tumorzellen. Der Effekt der Strahlentherapie hängt auch beim malignen Melanom wie allgemein in der Strahlentherapie vom Tumorvolumen, von der Gesamtdosis und von der Fraktionierung ab. Die Rückbildung des Tumors oder der Metastasen erfolgt typischerweise sehr langsam.

2.3.3 Chemotherapie

In den letzten 30 Jahren gab es praktisch keinen Fortschritt in der medikamentösen Behandlung von Melanompatienten im Stadium IV. Das metastasierte Melanom spricht auf derzeit verfügbare konventionelle Therapiemethoden wie Chemo- und Strahlentherapie kaum an (84). Zum heutigen Zeitpunkt muss davon ausgegangen werden, dass die Chemotherapie beim Melanom rein palliativ ist. Die zurzeit am häufigsten verwendeten Substanzen sind Dacarbacin und Temozolomid. Diese können einzeln als Monotherapie oder in einer Kombination als Polychemotherapie angewandt werden. Die Ansprechrate einer Monotherapie mit Dacarbacin liegt bei 5,3-28,6% mit einer Rückbildung der Tumormassen um mehr als 50%, was einer partiellen Remission entspricht. Komplette Remissionen werden in bis zu 8% der Patienten erzielt, wobei die Remissionsdauer mit meist nur 3-6 Monaten kurz ist (85). Temozolomid zeigt ein erhöhtes Ansprechen von Gehirnmetastasen, hat aber keine signifikanten Auswirkungen auf die Überlebensrate (84). Andere angewandte Chemotherapeutika zeigen ebenfalls keine signifikant lebensverlängernde Wirkung.

Polychemotherapien auch in Kombination mit einer IFN-α Behandlung, konnten ebenso keine Verlängerung der Gesamtüberlebensrate bewirken (86-88).

Die zugrundeliegenden zellulären Mechanismen für die Resistenz von Melanomzellen gegenüber Chemotherapeutika konnten bis heute nicht vollständig geklärt werden. Vorgeschlagene Mechanismen sind beispielsweise Defekte im Stofftransport, Entgiftung von Wirkstoffen und Apoptoseresistenz (89).

2.3.4 Adjuvante Therapie

Bei Melanomen mit einer vertikalen Tumordicke > 1,5mm wird eine adjuvante Therapie empfohlen. Am gängigsten ist hier zurzeit eine Therapie mit IFN-α, das einen antiproliferativen Effekt auf Tumorzellen hat, Onkogene herunterregulieren kann, Tumorsuppressor Gene induziert, die Expression von MHC-I auf Tumorzellen hochreguliert NK Zellen aktiviert (90, 91).

2.4 Immuntherapeutische Ansätze beim Melanom und anderen Krebsarten

Zahlreiche Hinweise sprechen dafür, dass immunologische Behandlungsstrategien erfolgversprechender sein könnten als konventionelle Therapien, da das maligne Melanom durch eine hohe intrinsische Immunogenität gekennzeichnet ist (92, 93).

In vielen Fällen konnte man spontane Tumor-Remissionen beobachten. Weiterhin ist auffällig, dass bei immunsupprimierten Patienten die Tumorentwicklung sehr aggressiv verläuft. Auch treten bei Melanompatienten häufig Fälle von Vitiligo auf, einer Autoimmunerkrankung, bei der das körpereigene Immunsystem Melanozyten in der Haut angreift und zerstört (94, 95). Die Entwicklung neuer effektiverer Behandlungskonzepte im Bereich der Immuntherapie unter Verwendung der vorhandenen körpereigenen Abwehr ist daher von größter Bedeutung.

2.4.1 Melanom-assoziierte Differenzierungsantigene

Differenzierungsantigene werden außer im Tumor auch in Geweben synthetisiert, aus denen der Tumor hervorgegangen ist. Beispiele hierfür sind die Antigene Tyrosinase, die sowohl in Melanozyten, als auch in Melanomzellen exprimiert wird (96), „*tyrosinase related protein-1*“ (TRP-1), TRP-2 (97) sowie gp100 (98). Diese gewebespezifischen Proteine werden normalerweise ausschließlich in den Melanozyten der Haut oder der Retina exprimiert und sind an der Synthese des Farbstoffs Melanin (Melanogenese) beteiligt. Tyrosinase katalysiert die Umwandlung von L-Tyrosin, einer Aminosäure, zu den Melaninvorstufen 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) und Dopachinon (99). TRP-1 und TRP-2 katalysieren anschließend die Bildung des Pigments Eumelanin. Weitere Beispiele sind das Differenzierungsantigen Melan-A. und die „*cancer testis*“ Antigene MAGE-1, MAGE-3 und NY-ESO-1 (100).

2.4.2 Antikörpertherapie

Die Antikörpertherapie verfolgt das Ziel Tumorzellen durch die systemische Verabreichung monoklonaler Antikörper, die gegen Tumor-assoziierte Antigene gerichtet sind, zu zerstören. Zur Behandlung des metastasierenden Mammakarzinoms wird z.B. Herceptin® gegen den Her2/neu-Rezeptor eingesetzt, der in einigen Mammakarzinomen überexprimiert ist. Die Bindung des Antikörpers an die Krebszelle induziert einerseits Apoptose (101) und andererseits eine NK-Zell-vermittelte Zytolyse der Zelle (102-104)

2.4.3 Peptidvakzinierung

Die Verwendung von Peptiden für Vakzinierungen gegen Tumorantigene zeigt einige Vorteile. Peptide sind einfach und kostengünstig herzustellen, ihre chemische Stabilität ist hoch, und zudem sind sie weder kanzerogen noch infektiös (105, 106). Sie werden zusammen mit starken Adjuvanzien (z.B Freund`s inkomplettes Adjuvanz oder CpG) oder Zytokinen (IL-2, GM-CSF oder IL-12) dem Patienten subkutan injiziert (106, 107). Die Adjuvanzien sorgen für eine starke inflammatorische Reaktion an der Injektionsstelle wodurch antigenpräsentierende Zellen angelockt werden. Der Nachteil einer Peptidvakzinierung liegt einerseits in der Notwendigkeit der Verwendung von starken Adjuvanzien und andererseits in der oftmals geringen Immunogenität der verwendeten Peptide (105, 108). Die geringe

Immunogenität lässt sich aus der Abstammung der meisten Peptide aus körpereigenen Proteinen ableiten (109, 110). Gegen diese Peptide gerichtete spezifische T-Zellen sind häufig anergisch oder nicht voll funktionsfähig (106). Um dies zu umgehen hat man versucht einige Aminosäuren der Peptide zu ersetzen, was in einer starken Proliferation spezifischer T-Zellen resultierte, die allerdings das natürliche von Tumorzellen exprimierte Antigen nicht mehr erkennen konnten (109). In einigen Studien konnte nach Peptidvakzinierung in Patienten eine gute Proliferation spezifischer T-Zellen nachgewiesen werden, die Anzahl der Patienten mit einer messbaren Tumorregression blieb allerdings sehr gering (111, 112).

2.4.4 Dendritische Zellen in der Immuntherapie

Beim Einsatz von DCs in einer Immuntherapie sollen Tumor-gerichtete T-Zellantworten im Patienten generiert werden. Eine häufige Variante dabei ist die Vakzinierung mit autologen DCs, die zuvor mit Tumor-assoziierten Antigenen beladen wurden (113-116). Für die Beladung der DCs mit Antigen gibt es mittlerweile zahlreiche Protokolle.

2.4.4.1 Mit RNA transfizierte DCs

Autologe DCs aus den Patienten können mit autologer Melanom mRNA transfiziert werden, womit ein möglichst breites Spektrum an Melanom-assoziierten Antigenen abgedeckt und dadurch möglichst viele T-Zellen verschiedener Spezifitäten angesprochen werden (117-119). Da sich die RNA nicht ins Genom integriert, kann sie nicht durch zelluläre Promotoren kontrolliert werden, was den Vorteil hat, dass die Expression der Proteine nicht blockiert werden kann. Der Nachteil dieser Methode ist, dass die produzierten Peptide relativ kurzlebig sind (120) und die Antigene ausschließlich über MHC-I präsentiert werden (121). Es konnte jedoch bereits in einer klinischen Phase I/II Studie in der Mehrheit der Patienten mit Prostatakrebs eine Antigen-spezifische $CD8^+$ T-Zell-Antwort nach Vakzinierung mit RNA-transfizierten DCs nachgewiesen werden (119).

2.4.4.2 Mit cDNA transfizierte DCs

Die Transfektion von DCs mit cDNA erlaubt die Kombination verschiedener Tumor-spezifischer Antigene auf einem DNA-Strang. Die DNA wird durch Elektroporation in die DCs gebracht. Dort werden die kodierten Proteine exprimiert, prozessiert und den T-Zellen präsentiert, was zu einer Aktivierung Tumor-spezifischer T-Zellen führen soll (118, 122, 123). Da die Proteine intrazellulär produziert werden, findet die Präsentation über MHC-I

statt und induziert eine $CD8^+$ T-Zell-Antwort. Der Nachteil gegenüber einer RNA-Transfektion ist, dass DNA schwieriger in den Zellkern zu bekommen ist, und die Kernmembran dabei häufig schwerwiegend beschädigt wird. Es wurde weiterhin gezeigt, dass RNA-transfizierte DCs effizienter T-Zellen stimulieren können, als DNA-transfizierte DCs (124).

2.4.4.3 Mit viralen Vektoren transduzierte DCs

DCs können mit Hilfe von viralen Vektoren, wie rekombinante Adenoviren (125), Pox Viren (126), Retroviren (127) und Lentiviren (128) transduziert werden. Im Allgemeinen induzieren virale Vektoren in höherem Maße die Expression des Transgens als nackte RNA oder cDNA. Adenoviren transduzieren DCs mit einer hohen Effizienz, ohne dass es zu einer Beeinträchtigung der Zellviabilität kommt (129). Jedoch könnten adenovirale Proteine die Immunantwort dominieren womit die Reaktion gegen das eigentliche Transgen ineffizient wird. Demgegenüber werden retrovirale Proteine nach der Integration des Transgens ins Genom der Wirtszelle nicht exprimiert. Weiterhin können retroviral transduzierte DCs sowohl $CD8^+$ als auch $CD4^+$ Antworten auslösen (127, 130). Retroviren können allerdings nur sich teilende Zellen transduzieren und sind daher nicht für aus Monozyten gereifte DCs geeignet. Hier muss ein Umweg über $CD34^+$ hematopoetische Stammzellen gegangen werden, die nach Beladung dazu gebracht werden, zu DCs zu differenzieren. Lentiviren können für sich nicht teilende Zellen eingesetzt werden. Die Expression des Transgens in der Wirtszelle ist allerdings schwächer als bei Verwendung anderer Vektoren (128).

2.4.4.4 Mit Protein beladene DCs

Hierbei werden DCs direkt mit rekombinanten Proteinen wie dem Differenzierungsantigen gp100 beladen. Ein Nachteil dieser Methode gegenüber der RNA-Transfektion oder der DNA Vakzinierung ist, dass die Proteine exogen aufgenommen und so vornehmlich über MHC-II präsentiert werden. Um eine $CD8^+$ T-Zell-Antwort zu stimulieren, muss es also zu einer Kreuzpräsentation der Peptide über MHC-I kommen (131, 132). Es gestaltet sich zudem schwierig, für Proteine eine klinische Zulassung zubekommen.

2.4.4.5 Mit Peptid beladene DCs

Um eine Immunantwort effizient gegen ein bestimmtes Antigen zu richten, kann man DCs auch mit einem synthetischen und an den individuellen MHC des Patienten angepassten Peptid beladen. Solche Peptide lassen sich einfach und kostengünstig für den klinischen

Gebrauch produzieren. Bei dieser Strategie muss man allerdings den MHC Haplotyp des individuellen Patienten berücksichtigen, da nicht alle MHC Moleküle bestimmte Peptide gleich gut binden können.
Zudem kann man nur auf bereits identifizierte Tumorantigene zurückgreifen, die eventuell nur schwach immunogen sind. Die Stabilität von Peptid-MHC-Komlexen ist dabei auch nur für eine kurze Zeit gewährleistet (118). Für Vakzinierungsstudien mit Peptid beladenen DCs wurden unter anderem die Melanom-assoziierten Antigene MART-1, gp100 und MAGE-1 verwendet (122, 123, 133).

2.4.4.6 Mit Tumorlysat beladene DCs

Ein häufig verwendeter Ansatz ist die Beladung von autologen DCs mit autologem Tumorlysat aus dem Tumor des Patienten. Der Vorteil dieser individualisierten Behandlung liegt zum einen in der hohen Variabilität der präsentierten Tumorantigene und einer somit breit gefächerten Tumor-spezifischen Immunantwort. Zum anderen werden durch die Verwendung von Lysaten aus den Tumoren der Patienten dem Immunsystem nur Antigene präsentiert, die der Tumor auch tatsächlich exprimiert. Allerdings kommt es vor, dass die benötigten Tumorlysate nicht zur Verfügung stehen, da der Tumor oder die Metastasen nicht operativ entfernt werden kann. Ein weiterer Nachteil ist der hohe Kostenaufwand. Verschiedene Studien konnten mit dieser Behandlung bereits Teilerfolge erzielen, von denen allerdings keiner einen entscheidenden Durchbruch erreichen konnte (114, 134)

2.4.5 Adoptiver Transfer von Tumorantigen-spezifischen T-Zellen

Tumorantigen-spezifische T-Zellen können aus dem Patienten isoliert, *ex vivo* expandiert und über adoptiven Transfer in den Patienten zurückgegeben werden. Diese T-Zellen stammen entweder aus dem peripheren Blut oder direkt aus dem Tumorgewebe und werden unter Einsatz hoher Zytokindosen, wie IL-2, expandiert (135, 136). Bei einigen Patienten konnte mit Hilfe diese Behandlung eine partielle Regression der Tumormetastasen erreicht werden (137). Am Beispiel des Mammakarzinoms konnte gezeigt werden, dass Tumor-reaktive Gedächtnis T-Zellen, aus dem Knochenmark der betreffenden Patienten, eine wirksame Waffe gegen den Tumor darstellen können (58, 69).
Die meisten Patientinnen zeigten Tumorantigen-spezifische T-Zellen im Knochenmark. Diese Zellen wurden zusammen mit autologen DCs kultiviert, die zuvor mit Tumorlysat beladen wurden, und führten in NOD/SCID Mäusen zu einem Rückgang autologer menschlicher Tumortransplante (58, 69).

3. Spontanmelanom Mausmodelle

Ein Mausmodel, das humane Melanome imitiert, bietet die Möglichkeit der Entwicklung und Untersuchung sowohl neuer immuntherapeutischer als auch immunprophylaktischer Verfahren. Es können exogene Risikofaktoren, wie z.B. UV-Strahlung, oder endogene Prädispositionsfaktoren, wie die Inaktivierung von Tumorsuppressoren, simuliert und deren Auswirkung auf die Tumorprogression untersucht werden.
Die bisher verwendeten Mausmodelle waren in der Mehrheit Transplantationsmodelle, die jedoch nur bedingt mit der Physiologie des humanen Melanoms vergleichbar sind, da die Tumoren meist nur in der Dermis lokalisiert sind und weder von Blutgefäßen infiltriert werden noch über eine Tumormatrix verfügen, die essenziell für das immunsuppressorische Milieu des Tumors ist (138). Einen Durchbruch bildete die Entwicklung transgener Mausmodelle mit einer spontanen Tumorentwicklung, welche die genetische, histopathologische und klinische Situation humaner Melanome widerspiegeln (139-141).

3.1 Das HGF/SF Modell

Das HGF/SF Modell zeichnet sich durch die Überexpression des „*Hepatocyte Growth Factor / Scatter Factor*“ (HGF/SF) aus, dem Liganden der Rezeptor-Tyrosinkinase c-Met, die vornehmlich auf Epithelzellen und Melanozyten exprimiert wird (142). HGF/SF stimuliert die Proliferation von Melanozyten und löst die Adhesion zwischen Melanozyten und Keratinozyten durch Herunterregulieren von E-Cadherin und Desmoglein-1. Es kommt zu einer Entkopplung von Melanozyten und Keratinozyten, was eine unkontrollierte Proliferation der Melanozyten und deren Metastasierung fördert (143). Zusätzlich kommt es einerseits zur verstärkten Aktivierung Cyklin-abhängiger Kinasen, die den Eintritt der Zelle in die S-Phase regulieren, und andererseits zur Unterdrückung des p27 Kontrollmechanismus. p27 inhibiert die Zyklin-abhängigen Kinasen, die den Eintritt der Zelle in die S-Phase vorantreiben und löst so einen Wachstumsstopp aus (144, 145).

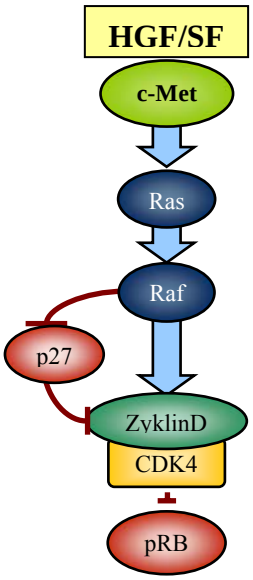

Abb. 3.1 *Vereinfachte Darstellung der HGF/SF c-Met Signalkaskade*

Mit dem Ausschalten des p27 Tumorsuppressor-Proteins erfolgt ein wichtiger Schritt in Richtung Transformation der Zelle. Mutationen können sich nun unkontrolliert im Genom der Wirtszelle etablieren (146). Eine erhöhte Expression von c-Met konnte auch in metastasierenden Melanomen nachgewiesen werden (147, 148). Die spontan entwickelnden malignen Melanome in diesem Mausmodell treten vorzugsweise in der Epidermis, an der dermoepithelialen Junktionszone und in der Dermis auf (139-141, 149). Die Tumorinzidenz in diesem Model ist allerdings gering und die Latenzzeit lang. Nur 20% der erkrankten Tiere bilden Metastasen.

Es konnte ein Zusammenhang zwischen UV-Einwirkung in der Kindheit und der späteren Entstehung maligner Melanome nachgewiesen werden, wogegen UV-Einstrahlung im Erwachsenenalter eher zur Entstehung von epithelialen Hauttumoren führt (150). In Übereinstimmung dazu führt die UV-Bestrahlung neugeborener Tiere (3-5 Tage nach Geburt) zu einer erhöhten Tumorinzidenz und Verkürzung der Latenzzeit (9 Monate) (139, 140, 149).

3.2 Das HGF/SF x INK4a/ARF$^{-/-}$ Modell

Analog zum Melanomgewebe in Patienten konnte in den Melanomzellen des HGF/SF Mausmodells häufig eine Inaktivierung des Tumorsuppressorgens INK4a/ARF beobachtet werden (139, 140). Von diesem Gen werden zwei potente Zellzyklusinhibitoren kodiert, p16 (INK4a) und p19 (ARF). Das Protein p16 wirkt inhibitorisch auf zyklinabhängige Kinasen und arretiert den Zellzyklus in der frühen G_1-Phase, während p19 indirekt das Tumorsuppressor-Protein p53 stimuliert. Die Kreuzung des transgenen HGF/SF Mausstammes mit INK4a/ARF$^{-/-}$ Mäusen verkürzt die Latenzzeit der UV-induzierten Melanomentstehung in der Nachkommenschaft (50-150 Tage) und erhöht die Tumorinzinzidenz auf ca. 70% (139, 149, 151).

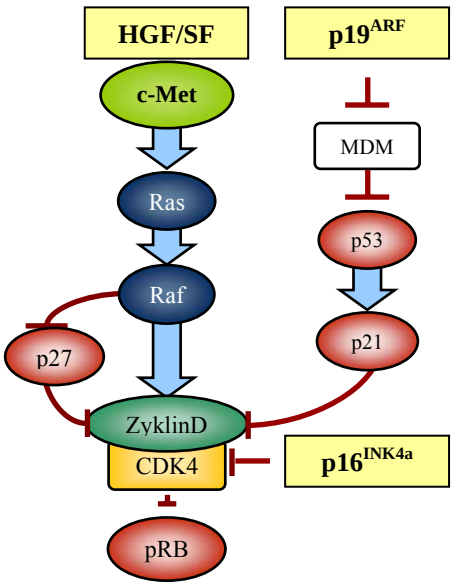

Abb. 3.2 *Vereinfachte Darstellung der p16 und p19 Signalkaskade*

3.3 Das Ret-Mausmodell

Ein weiteres Beispiel muriner Modelle ist das Ret-transgene Mausmodell (Ret-tg), bei dem die Rezeptor-Tyrosinkinsase Ret, ein Schwestermolekül von c-Met, unter der Kontrolle eines Metallothionein Promotors vor allem in den Melanozyten der Haut überexprimiert wird (152, 153). Die Melanome entstehen nach kurzer Latenz spontan und entwickeln sich schrittweise von einem benignen Stadium hin zum malignen Melanom mit Metastasenbildung in Lymphknoten, Milz, Lunge, Leber, Nieren und Gehirn (70). Die Verteilung der Metastasen korreliert dabei gut mit der beim humanen Melanom, wo sich Tochtergeschwülste bevorzugt in Lymphknoten und Lunge manifestieren (70, 153).

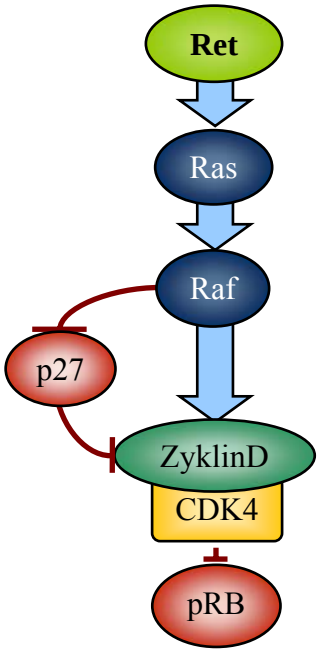

Abb. 3.1 *Vereinfachte Darstellung der Ret-Signalkaskade*

Die Aktivität von Ret steigt während des Transformationsprozesses vom Nävus zum Melanom stetig an und ist assoziiert mit der Aktivierung weiterer Kinasen wie ERK2 und c-jun sowie Matrix Metalloproteinasen (152). Von Tumorzellen exprimierte Matrix Metalloproteinasen unterstützen den Abbau von Basalmembranen der extrazellulären Matrix und den Aufbau tumoreigener Blutgefäße. Die Überexpression von Ret hat unter anderem vergleichbare Auswirkungen auf die Ras/Raf- Signalkaskade wie HGF/SF im transgenen Modell (148). Ret-tg Mäuse entwickeln spontan maligne Melanome, die von ihrer Histologie, Lage und genetischen Defekten sehr gut mit dem menschlichen Melanom vergleichbar sind.

II. Fragestellung

Ziel dieser Doktorarbeit war es, die Verteilung von Gedächtnis T-Zellen im Ret-Mausmodell zu untersuchen und deren Funktionsstatus während der Melanomentwicklung zu klären. Dazu sollte zunächst die Funktionalität des Immunsystems mit Fokus auf T-Zell-Antwort untersucht werden. Gedächtnis T-Zellen stellen einen interessanten Ansatzpunkt für Immuntherapien dar. Im Hauptteil dieser Arbeit sollte daher ihr Vorkommen sowie ihre Verteilung innerhalb verschiedener lymphatischer Organe, dem Knochenmark sowie in den Tumoren von Ret-tg Mäusen näher analysiert werden. Ferner sollten Melanomantigen-spezifische Gedächtnis T-Zellen in verschiedenen Organen von tumortragenden Ret-tg Mäusen identifiziert und auf ihre Funktionalität hin überprüft werden. Zudem sollte die Frage geklärt werden, in welchem Stadium der Melanomentwicklung sie erstmals auftreten.

III. Material und Methoden

4. Materialien

4.1 Tiere und Zelllinien

Für die experimentellen Arbeiten wurden Mäuse folgender Stämme verwendet, die im Tierstall des DKFZ Heidelberg gehalten wurden:

- C57Bl/6 wildtyp (im Weiteren stets C57Bl/6 wt genannt), von Elevage Janvier (Frankreich) bezogen

- MT/ret transgen 304/B6; genetischer Hintergrund H-2b (im Weiteren stets Ret-tg genannt), von I. Nakashima, Nagoya University, Nagoya, Japan bezogen (153)

Zur Zucht wurde jeweils ein Ret-tg Tier mit zwei C57Bl/6 wt Tieren verpaart.

Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet

- Ova ZTL — Zytotoxische T-Zell Linie, spezifisch für Ovalbumin (Ova), von W.Osen (DKFZ, Abt. Schadendorf) zur Verfügung gestellt. Genetischer Hintergrund: Bl/6

- TRP-2 ZTL — Zytotoxische T-Zell Linie, spezifisch für Tyrosinase related protein 2 (TRP-2), bekommen von W.Osen (DKFZ, Abt. Schadendorf) Genetischer Hintergrund: Bl/6

- EL4 — T-Lymphom Linie, Stimulator Zellen; in C57BL/6 Maus durch 9,10-dimethyl-1,2-bezanthracen induziert (Shevach et al., 1972)

- EG7 — T-Lymphom Linie, Stimulator Zellen; mit pAc-neo-OVA transfizierte EL4 Zellen (Moore et al., 1991)

4.2 Chemikalien, Lösungen und Medien

Allgemeine Laborchemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Steinheim), GERBU (Gaiberg), AppliChem (Darmstadt) Roth (Karlsruhe) und neoLab (Heidelberg) bezogen.

4.2.1 Chemikalien

AEC Tabletten	3-Amino-9-ethyl-carbazol (Sigma) Cat. A6926
Agarose	NEEO, Ultra-Qualität (Roth) Cat. 2267.2
Ammoniumchlorid	NH_4Cl, rein (Merck) Cat. 101141
Bromphenol Blau	(Merck) Cat. L456422
BSA	Albumin, Bovine Serum, 98% (Sigma) Cat. 7030-50G
Cardiotoxin	95% (Latoxan) Cat. L8102
Concanavalin A	(Amersham Biosciences) Cat. 170450-01
Dimethylsulfoxid	DMSO (Merck) Cat. 109678
DNA-Marker	GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas) Cat. SM0321

EDTA Disodium	99% (GERBU) Cat. 1034
EDTA	0,5M; pH 8.0; UltraPure (GIBCO) Cat. 15575-098
Eindeckmedium	Fluoromount-G (Southern Biotech) Cat. 0100-01
Essigsäure	CH_3COOH, Eisessig 100% (Merck) Cat. 100063
Ethidiumbromid	1% in H_2O (Merck) Cat. 111608
FBS	Fötales Bovine Serum (PAN Biotech GmbH) Cat. 3702-P260718
FITC-Dextran	(Sigma) Cat. FD20
Glyzerol	Rotipuran® ≥ 99,5%; wasserfrei (Roth) Cat. 3785.1
Hydrogenperoxid	H_2O_2, 30%, (Sigma) Cat. H1009
Isofluran	(DeltaSelect)
IFA	Incomplete Freund`s Adjuvant (Sigma) Cat. F5506
Kaliumhydrogencarbonat	$KHCO_3$; ≥ 99,5%, p.a. (Roth) Cat. P748

Klebstoff	Fixo gum; elastischer Montagekleber (Marabu) Cat. 2901 17000
Liquemin N	(Roche) Cat. 25000
Natriumacetat	CH_3COONa, wasserfrei, (neoLab) Cat. 4720
Natriumazid	NaN_3, 99%, p.a., (Roth) Cat. K305
Natriumcarbonat	Na_2CO_3, wasserfrei (AppliChem) Cat. A3900
Natriumchlorid	NaCl (Fluka) Cat. 71379
Natriumhydrogencarbonat	$NaHCO_3$ (AppliChem) Cat. A3084
N,N – Dimethylformamid	(Sigma) Cat. D-4551
1x PBS	(PAA) Cat. H15-002
Penicillin / Streptomycin	100x (PAA) Cat. P11-010
Phenol / Chloroform	Roti-Phenol; Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol 25:24:1 (Roth) Cat. A156-1
Potassiumbicarbonat	KHCO3, 99,5% (Sigma) Cat. P9144

Sodium Dodecylsulfat	SDS (Gerbu) Cat. 1212
Proteinase K	aus Tritirachium album (Sigma) Cat. P6556
Tris	99,9%; (Roth) Cat. 4855.1
Trizol	(Invitrogen) Cat. 15596-026
Trypanblau	Trypan Blue Solution, 0,4% (Sigma) Cat. T8154
Tween20	(Sigma) Cat. P-2287
Xylol	Histo grade (J.T. Baker) Cat. 3410
Ziegenserum	(GIBCO) Cat. PCN5000

4.2.2 Lösungen/Puffer

ELISA

ELISA-Assay Diluent	1x PBS	
	BSA	0,5% (w/v)
ELISA-Waschlösung	1x PBS	
	Tween20	0,25% (v/v)

ELISPOT

AEC-Lösung	1 AEC Tablette (20mg)	
	Dimethylformamid	2,5ml
	0,2M Natriumacetat	8,4ml
	0,2M Essigsäure	3,5ml
	H_2O bidest.	35,6ml
	Hydrogenperoxid	25µl
ELISPOT-Arbeitslösung	1x PBS	
	BSA	0,5% (w/v)
ELISPOT-coating buffer	Lösung A: 1,59g Na_2CO_3 auf 100ml H_2O	
	Lösung B: 2,93g NaH_2CO_3 auf 100ml H_2O	
	1ml A + 1ml B + 8ml H_2O; pH 9.6	
ELISPOT-Waschpuffer	1x PBS	
	Tween 20	0,25% (v/v)

FACS

FACS-Puffer	1x PBS	
	FCS	2% (v/v)
	NaN_3	0,2% (v/v)

FACS-Blut-Puffer		1x PBS	
		FCS	2% (v/v)
		NaN_3	0,2% (v/v)
		Liquemin N	0,02% (v/v)
Lysepuffer		Ammoniumchlorid	8,29g
		Kaliumhydrogencarbonat	1g
		EDTA, Disodium	37,2mg
		auf 1l mit H_2O	
		pH (7.2-7.4)	

Gelelektrophorese

DNA-Ladepuffer	6x	Bromphenol Blau	0,25% (w/v)
		Glyzerol	30% (v/v)
		verdünnt in H_2O	
TAE-Puffer	50x	Tris	242g
		0,5M EDTA	100ml
		Eisessig	57,1ml
		auf 1l mit H_2O	

Immunhistochemie

Blockierungs-Puffer		1x PBS	
		Ziegen Serum	10% (v/v)
		BSA	2% (w/v)
		Tween20	0,05% (v/v)
Verdünnungspuffer		1x PBS	
		Ziegen Serum	2% (v/v)
		BSA	2% (w/v)
		Tween20	0,05% (v/v)

Waschpuffer	1x PBS		
	Tween20	0,05% (v/v)	

PCR

PCR-Mix	10x Reaction Puffer	5µl	(Bioron) Cat.10105
	dNTPs 10mM	1µl	(Bioron) Cat. 110011
	Primer 10mM	je 2µl	
	Taq Polymerase	0,5µl	(Bioron) Cat. 10105
	mit ddH_2O auf 47µl		

Verdauungspuffer	Tris	50mM
	NaCl	20mM
	EDTA	1mM
	SDS	1% (v/v)
	in H_2O	

4.2.3 Medien/Zellkultur

RPMI 1640		mit L-Glutamin und Phenolrot (PAA)	
		Cat. E15-840	
DC-Medium		400ml RPMI 1640 (PAA)	
		50ml hitzeinaktiviertes FCS (56°C; 45min)	
		200U/ml GM-CSF	
Trypsin / EDTA	10x	1x PBS	
		Trypsin	5g/l
		EDTA	2g/l
		(PAA) Cat. L11-003	

4.2.4 Antikörper

4.2.4.1 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Konjugat	Spezies	Firma / Bestellnummer
anti-Maus CD8a	FITC	Ratte IgG2a κ	BD 553150
	PE-Cy5	Ratte IgG2a κ	BD 553034
	APC-Cy7	Ratte IgG2a κ	BD 557654
anti-Maus CD45RB	FITC	Ratte IgG2a κ	BD 553100
anti-Maus CD62L	FITC	Ratte IgG2a κ	BD 553150
	APC	Ratte IgG2a κ	BD 553152
anti-Maus I-A/I-E	FITC	Ratte IgG2a κ	BD 553623
anti-CD4	PE	Ratte IgG2b κ	BD 553730
anti-CD40	PE	Ratte IgG2a κ	BD 553791
anti-CD44	PE	Ratte IgG2b κ	BD 553134
anti-CD80 (B7-1)	PE	Hamster IgG2 k	BD 553769
anti-CD86 (B7-2)	PE	Ratte IgG2a κ	BD 553692
anti-CD3	PerCP-Cy5.5	Ratte IgG2a κ	BD 555276
anti-CD11c	Biotin	Hamster IgG1 λ2	BD 553800

4.2.4.2 Tetramere

Ovalbumin K^b SIINFEKL -APC

TRP-2 K^b SVYDFFVWL -APC

Die Tetramere stammten von Ton Schumacher aus Amsterdam, Niederlande

4.2.4.3 ELISPOT Antikörper

	gerichtet gegen	Spezies	Klon	Firma/ Bestellnummer
Primärantikörper	IFN-γ	Ratte-anti-Maus	RMMG-1	Biosource Europe AMC 4834
Sekundärantikörper	IFN-γ	Ratte-anti-Maus	XMG1.2	Pharmingen 554410

4.2.4.4 Immunhistochemie Antikörper

	gerichtet gegen	Spezies	Verdünnung
Primärantikörper	TRP-2 Protein anti-PEP8	Kaninchen-anti-Maus	1:4000
Sekundärantikörper	IgG (Vektor Laboratories)	Ziege-anti-Kaninchen	1:200

4.2.4.5 Sonstige Antikörper

anti-CD3 / anti-CD28 (BD) Cat. 553294

Fc-Block (anti-Maus CD16/CD32) (BD) Cat. 553142

Streptavidin (BD) Cat. 554067

4.2.5 Peptide

Ovalbumin SIINFEKL

TRP-$2_{180-188}$ SVYDFFVWL

HBV core $antigen_{128-140}$ TPPAYRPPNAPIL

Die verwendeten Peptide wurden von der zentralen Einheit für Genom- und Proteomforschung am DKFZ Heidelberg synthetisiert.

4.2.6 DNA Vektoren

pcDNA3.1-Ova freundlicherweise zur Verfügung gestellt von L. Gissmann (DKFZ)

4.2.7 Primer

Ret-5: 5`-AAA ATG CAG TCA GAT ATG GA-3`
Ret-3: 5`-ACT CGG GGA GGG GTT C-3`
β-m-1: 5`-CAC CGG AGA ATG GGA AGC CGA A-3`
β-m-2: 5`-TCC ACA CAG ATG GAG CGT CCA G-3`
Die Primer wurden von der Firma MWG synthetisiert

4.3 Kits

Enzyme - linked immunosorbent Assay (ELISA)
BD OptEIA Mouse IFN-γ ELISA Set
Cat. 555138
BD OptEIA Mouse IL-2 ELISA Set
Cat. 555148

T-Zell Selektion Dynal Mouse T Cell Negative Isolation Kit
Cat. 114.13

Immunhistochemie Vectastain ABC-AP Kit (Vector Laboraties)
Cat. AK-5000

Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit
Cat. SK-5100

4.4 Geräte und allgemeine Labormaterialien

4.4.1 Geräte

Abzug	STA 120 1297 (Prutscher)
ELISA Reader	Rainbow Thermo (SLT)
ELISPOT Reader	Bioreader 3000 (Biosys)
FACS Geräte	FACSCalibur 4-Farben (BD) FACSArray 4-Farben (BD) FACSLSRII 6-Farben (BD)
Gefrierschrank (-80°C)	HeraFreeze (Heraeus)
Gelkammer	40-1214 (PeqLab)
Gelkammer-Netzgerät	EC105 (Apparatus Corporation)
Gel Fotokammer	Gel Jet Imager INTAS (UV Systems)
Heizblock	Thermomixer compact (Eppendorf)
Inkubator	HeraCell (Heraeus)
Kühl-Gefrier-Kombination (-20°C)	Premium (LiebHerr)
Magnetrührer	RCT basic (Kika Werke)
Mikroskope	DMIL (Leica) DMRE (Leica)

Mikroskop Kamera	DC500 (Leica)
Mikrotom	RM 2125 RT (Leica)
Mikrotom Wasserbad	HI 1210 (Leica)
Mikrowelle	R-352 (Sharp)
PCR-System	DNA-Engine DYAD (MJ Research)
pH-Meter	766 (Calimatic)
Photometer	UltroSpec 3100pro (Amersham)
Pipettierhilfe	Accu-Jet (Brand)
Sterilbank	Hera Safe (Thermo Electron Cooperation)
Stickstoffbehälter	Isotherm (KGW)
Stickstofftank	Biosafe MD (Messer)
Stoppuhr	(Oregon Scientific)
Über-Kopf-Mixer	MACSmix (MACS)
Vortex	REAX top (Heidolph) Vortex Genie 2 (Scientific Industries)
Waage	BP 3100P (Sartorius)
Wasserbad	DC3 (HAAKE / GFL)

Zentrifugen	Labofuge 400R (Heraeus)
	Biofuge pico (Heraeus)
	Biofuge primo R (Heraeus)
	Varifuge K (Heraeus)
	RT 7 Plus (Thermo Electron Cooperation

4.4.2 Allgemeine Labormaterialien

ELISA Platten	MaxiSorp 96-well (Nunc)
	Cat. 442404
ELISPOT Platten	Silent Screen Plate 96-well clear w/o Lid
	Biodyne B Membrane N/Str PS
	(Nunc) Cat. 256154
Kanülen	0,4x19mm Mikrolance (BD)
	0,3x13mm Mikrolance (BD)
Kryoröhrchen	Cryo.s (Greiner)
Luftverdrängungs-Pipetten mit adjustierbarem Volumen	
	0,5-10µl, 2-20µl, 20-200µl, 200-1000µl;
	pipet lite (Rainin)
Objektträger	76x26mm SuperFrostPlus
	(Menzel-Gläser) Cat. J1800AMNZ
	76x26mm (R. Langenbrinck)
Deckgläser 24x24mm	(Roth)

Probenröhrchen 15ml / 50ml	konisch, mit Schraubverschluss, Polypropylen (Falcon)	
0,5ml Reaktionsgefäße	(Eppendorf)	
1,5ml Reaktionsgefäße	(Eppendorf)	
2ml Reaktionsgefäße	(Eppendorf)	
200µl PCR-Reaktionsgefäße	(Brand)	
Spritzen	1ml	Plastipak (BD)
	5ml	(Terumo)
	50ml	(Terumo)
Sterilfilter	0,45µm Rotilabo Spritzenfilter Steril (Roth)	
Zellkulturplatten	96-well-Platte (Greiner)	
	24-well-Platte (TPP)	
	6-well-Platte (Greiner)	
Zellsieb	100µm; Nylon (BD Falcon)	

5. Methoden

5.1 Typisierung von Ret-tg Mäusen

Für die genotypische Typisierung der Ret-tg Mäuse wurde zunächst ein Stück des Schwanzes biopsiert und anschließend in 20µl Proteinase K-Verdauungslösung bei 56°C für 3h verdaut. Anschließend wurde der Ansatz mit 300µl ddH_2O versetzt, für 3min bei 99°C inaktiviert und auf Eis gestellt.
3µl der im Verdau freigesetzten DNA wurden dann mit 47µl PCR-Mix versetzt und eine „polymerase chain reaction“ (PCR) nach folgendem Programm durchgeführt:

- Schritt 1: 95°C 5min
- Schritt 2: 94°C 1min
- Schritt 3: 58°C 1min
- Schritt 4: 72°C 1,5min
- Schritt 5: zurück zu Schritt 1 für 35 Zyklen
- Schritt 6: 72°C 10min
- Schritt 7: 4°C bis zur Entnahme der Proben

Im PCR-Mix wurden folgende Primer verwendet: Ret-5, Ret-3 (spezifisch für das Ret-Gen)
βm-1, βm-2 (Positivkontrolle, spezifisch für das β-Aktin-Gen)

Anschließend wurden die Proben auf einem Agarose-Gel analysiert (1,5%)

Für die Gel Elektrophorese wurde 1-2g (je nach Prozentigkeit) Agarose in 100ml TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht mit 4µl Ethidiumbromid versetzt und in eine Elektrophorese Gel-Kammer gegossen.
10µl der PCR-Proben wurden jeweils mit 3µl 6x Ladepuffer versetzt und zusammen mit einem DNA-Marker auf das Gel aufgetragen. Nach 1h Laufzeit bei 100V wurde das Gel in einer Gel Fotokammer fotografiert.

5.2 Monitoring der Tumorentstehung

Die Ret-tg Mäuse wurden zweimal wöchentlich auf die Entstehung von Tumoren hin untersucht. Das Datum der Tumorentstehung und deren Lokalisation wurden festgehalten und einzelne Stadien der Tumorausbreitung notiert.

5.3 Immunisierung von Mäusen

5.3.1 DNA Immunisierung mit dem Modell-Antigen Ovalbumin

Prinzip der Methode

Die in den Muskel applizierte Plasmid-DNA wird von lokalen Wirtszellen wie z.B. Myozyten, Keratinozyten und antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen, exprimiert, prozessiert und die Peptide über MHC-Klasse-I/II Moleküle präsentiert. Myozyten exprimieren keine kostimulatorische Moleküle und spielen bei der eigentlichen Induktion der Immunantwort wohl keine Rolle. Sie dienen vermutlich hauptsächlich als Antigendepot. Das initiale „Priming“ erfolgt im lokal angrenzenden lymphatischen Gewebe durch Antigen-präsentierende Zellen, welche die DNA am Injektionsort aufgenommen haben. Alternativ ist auch ein sog. „cross priming“ möglich bei dem von Myozyten freigesetzte Proteine von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen und prozessiert werden.

Für die DNA Immunisierungen mussten die zu behandelnden Tiere zunächst immobilisiert werden. Hierzu wurde Isofluran, ein Inhalationsanästhetikum verwendet. Isofluran hat eine gute hypnotische und muskelrelaxierende Wirkung, wirkt jedoch nur schwach analgetisch.
Fünf Tage vor der eigentlichen Immunisierung wurden die Tiere mit Cardiotoxin vorbehandelt. Cardiotoxin ist ein aus Schlangen gewonnenes Muskelgift, das die Zellmembran von Muskelzellen depolarisiert und somit die Aufnahme der injizierten DNA fördert (154). Nach einer Rasur der Hinterbeine wurden je Bein 50µl einer 10µM Lösung pro musculus tibialis anterior appliziert.
Nach fünf Tagen erhielten die Tiere erneut eine Narkose und die Injektion von je 100µg pcDNA3.1-Ova pro musculus tibialis anterior (155).

5.3.2 Peptid Immunisierung mit dem Melanom assoziierten Antigen TRP-2

Prinzip der Methode

Freunds Adjuvans ist eine Wasser-in-Öl Emulsion, die abgetötete Mikroorganismen enthält. Es dient als Hilfsstoff, um eine durch Immunisierung hervorgerufene Immunreaktion zu verstärken. IFA (incomplete Freunds Adjuvans) enthält keine Mykobakterien.

Das applizierte Peptid wird am Entzündungsherd von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen, prozessiert und über MHC-I/II im lokalen Lymphgewebe präsentiert.

Am Tag der Immunisierung wurde eine Peptidmischung, wie nachfolgend beschrieben, unter der Sterilbank hergestellt. Für jede Maus wurden 100µg des TRP-$2_{180-188}$ Epitops (SVYDFFVWL) zusammen mit 140µg des T-Helfer Epitops (HBV core $antigen_{128-140}$; TPPAYRPPNAPIL; I-A^b restringiert) gemischt und 1:1 mit IFA emulgiert (156).

Die Peptidimmunisierung erfolgte über eine subkutane Injektion der Peptid-IFA-Mischung in die Schwanzwurzel des Tieres (156). Hierbei wurden die Tiere durch eine spezielle Halterung immobilisiert.

5.4 Organ- und Tumorpräparation

Die zu präparierende Maus wurde zunächst durch Zervikale Dislokation (Genickbruch) getötet. Anschließend wurde das Tier auf einer Präparierplatte fixiert, und das Fell mit 70% Ethanol desinfiziert. Bauch- und Brusthöhle wurden entlang der Linea Alba bis hinauf zum Kehlkopf geöffnet. Die mandibularen, axilaren und inguinalen Lymphknoten wurden vorsichtig aus dem umliegenden Gewebe gelöst und in 2ml Kryoröhrchen überführt, welche sofort in flüssigen Stickstoff transferiert wurden, um eine Degradierung der RNA zu verhindern.

Die Milz wurde ebenfalls möglichst schnell, aber vorsichtig entfernt und in ein15ml Röhrchen mit 1x PBS auf Eis überführt.

Die Maus wurde komplett auf Tumoren in der Haut untersucht und diese, soweit möglich, vollständig entfernt. Die entfernten Tumoren wurden ebenfalls in ein 15ml Röhrchen mit 1x PBS überführt und auf Eis gestellt.

Zur Freilegung von Femur und Tibia wurde mit einer Schere die Haut in Höhe des Knöchels um den Fuß herum kreisrund aufgeschnitten und in Richtung Körper weggezogen.

Die Muskeln wurden vom Fuß her vom Knochen abgelöst, die Sehnen durchtrennt und in Richtung Knie geschoben. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Mausbein gebeugt blieb. Dann wurde das Bein vorsichtig an der Hüfte hinter dem Gelenkkopf aus der Gelenkpfanne gelöst. Das Knie und das Fußgelenk wurde durch Überstrecken gebrochen, Femur und Tibia vorsichtig voneinander getrennt und anschließend das Muskelgewebe mit einem Papiertuch entfernt. Die blanken Knochen wurden in ein 15ml Röhrchen mit 1x PBS auf Eis überführt.

5.5 Herstellen einer Einzelzellsuspension

Je nachdem, ob die Zellen kultiviert werden sollten oder direkt in einem Versuch verwendet wurden, wurde die Präparation unter der Sterilbank oder unsteril auf der Werkbank durchgeführt.

5.5.1 Milz

Zunächst wurde eine 10cm Petrischale mit ca. 8-10ml kaltem 1x PBS gefüllt und ein Stück quadratisch gefaltete Gaze (60µm) hineingelegt. Die Milz wurde in die entstandene Tasche in der Gaze geschoben und mit dem Kolben einer 5ml Spritze zerdrückt. Die Milz - Zellen - Suspension wurde anschließend in ein 15ml Röhrchen auf Eis überführt. Auf eine Zentrifugation der Zellen für 10min bei 1500rpm und 4°C folgte das Verwerfen des Überstandes und die Resuspension des Zellpellets in 1ml Lysepuffer. Dadurch wurden selektiv die Erythrozyten lysiert, während die anderen Zellen unbeschadet blieben. Nach 5min Inkubation wurde die Lyse durch Zugabe von 10ml Medium (RPMI 1640; 10% FCS; 0,1% Pen/Strep) gestoppt. Daraufhin wurden die Zellen zweimal abzentrifugiert (10min; 1500rpm; 4°C) und in 10ml Medium resuspendiert. Makroskopisch gewinnt das Zellpellet eine hellgelbe Farbe, wodurch sich der Erfolg der Erylyse kontrollieren lässt.

5.5.2 Lymphknoten

Die Lymphknoten wurden in eine mit 8-10ml kaltem 1x PBS gefüllten Petrischale überführt und zwischen 2 Objektträgern zerrieben. Das 1x PBS samt Lymphknoten-Zellen wurde daraufhin in ein 15ml Röhrchen auf Eis überführt, abzentrifugiert (10min; 1500rpm; 4°C) und in 5ml Medium (RPMI 1640; 10% FCS; 0,1% Pen/Strep) resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt.

5.5.3 Knochenmark

Um zu verhindern, dass Keime von außen an das Knochenmark gelangen wurden Femur- und Tibia-Knochen für ca. 30 Sekunden in einer Petrischale mit eiskaltem 70% Ethanol desinfiziert und anschließend in eiskaltes 1x PBS überführt.

Die Knochen wurde an beiden Enden aufgeschnitten und das Knochenmark unter Verwendung einer 0,45mm Kanüle mit eiskaltem 1x PBS ausgespült. Die Zellsuspension wurde in einem 15ml Röhrchen aufgefangen. Nach 10min zentrifugieren bei 1500rpm und 4°C wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert. Die Lyse wurde nach 5min durch Zugabe von 10ml Medium (RPMI 1640; 10% FCS; 0,1% Pen/Strep) gestoppt, die Zellen zweimal gewaschen und anschließend in 10ml Medium resuspendiert.

5.5.4 Tumor

Die Tumoren wurden zunächst gewogen um das Stadium der Tumorentwicklung zu bestimmen und anschließend mit dem Stempel einer 5ml Spritze durch ein Metallsieb gedrückt. In einer Petrischale mit 10ml eiskaltem 1x PBS wurden die Zellen aufgefangen und dann durch einen Zellsieb in ein 50ml Röhrchen überführt. Daraufhin wurden die Zellen abzentrifugiert (7min; 1500rpm; 4°C) und in 1ml Lysepuffer resuspendiert. Nach einer fünf minütigen Inkubation bei RT wurde die Erythrozyten-Lyse durch Zugabe von 20ml 1x PBS gestoppt und die Zellen erneut zentrifugiert. Das Zell-Pellet wurde in 10ml 1x PBS aufgenommen und die Zellen ausgezählt.

Die Konzentration der Zellen der jeweiligen Suspensionen wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Eine kleine Probe (10µl) aus der jeweiligen Zellsuspension wurde 1:100 mit Trypanblau verdünnt und Anschließend unter dem Mikroskop die Zellzahl / Eckquadrat (n) bestimmt. Hierfür wurde folgende Formel verwendet:

$n \times 10^4 \times$ Verdünnungsfaktor (10) = Zellzahl / ml

Trypanblau färbt nur tote Zellen, wohingegen lebende ungefärbt bleiben. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden nur lebende Zellen in Betracht gezogen. Man erkennt sie leicht anhand ihrer homogenen, kugelförmigen Struktur, wogegen tote Zellen kantig und unregelmäßig geformt sind.

5.6 *In vitro* Stimulation von T-Zellen aus Milz und Lymphknoten

Die Zellen wurden wie unter 5.5.1 und 5.5.2 beschrieben gewonnen. Um zu testen, ob T-Lymphozyten *in vitro* stimulierbar sind, wurden sie jeweils mit Medium (RPMI 1640; 10% FCS, 0,1% Pen/Strep; 2,75µg/l β-Mercapto-Ethanol) auf eine Konzentration von $1x10^6$ Zellen/ml eingestellt und in einer 24-well-Platte ausgesät. Daraufhin wurden die Zellen mit Concanavalin A oder anti-CD3/anti-CD28 Antikörpern stimuliert. Concanavalin A ist ein Mitogen, das T-Lymphozyten unspezifisch stimuliert. Es wurde in einer Konzentration von 1,25µg/ml eingesetzt.

Antikörper gegen CD3 und CD28 binden direkt an diese Oberflächenmoleküle und bewirken eine Stimulation der T-Lymphozyten. Sie wurden in einer Konzentration von 1µg/ml eingesetzt.

Nach 24h, 48h und 72h wurden von jedem Ansatz je zwei Wells abgeerntet, die Zellen in 15ml Röhrchen überführt, abzentrifugiert (1500rpm; 10min; 4°C) und der Überstand bei -20°C eingefroren, bzw. mittels „*enzyme linked immunosorbend assay*“ (ELISA) direkt auf Produktion von IFN-γ und IL-2 untersucht (Abb. 5.1).

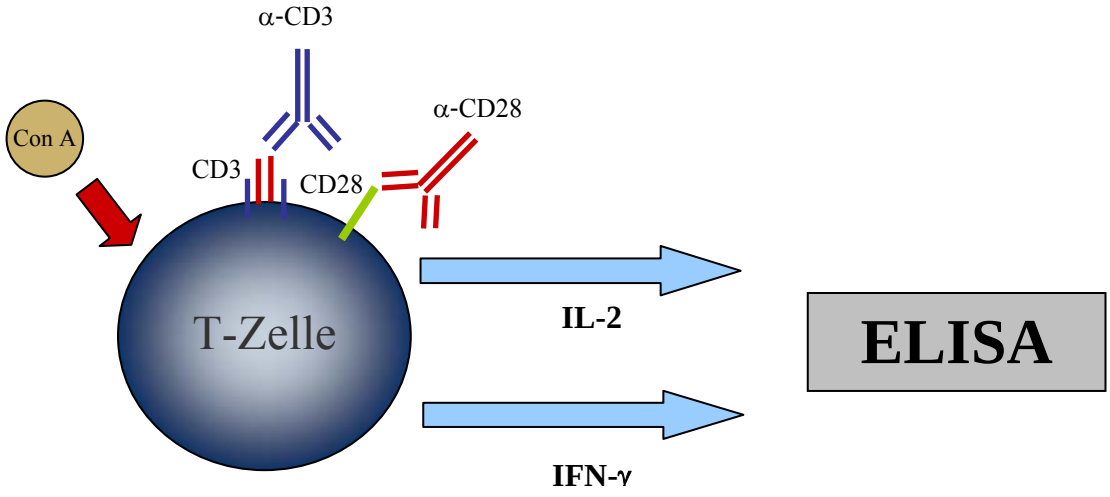

Abb. 5.1 *Schematische Darstellung der T-Zell Stimulation mit Con A oder anti-CD3/anti-CD28 Antikörpern*

5.7 Generierung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark

Für die Kultur von dendritischen Zellen (DCs) wurden nach der Methode von Inaba et al. (157) $CD34^+$ Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von C57Bl/6 wt Mäusen verwendet. Die Herstellung der Einzelzellsuspension erfolgte wie unter 5.5.3 beschrieben, mit dem Unterschied, dass die Resuspension der Zellen nach dem letzten Waschschritt statt mit RPMI 1640 mit DC-Medium erfolgte. Jeweils $1x10^6$ Zellen wurden auf 30mm Petrischalen gegeben und mit DC-Medium auf 3ml aufgefüllt. Die Schalen wurden bei 37°C und 5% CO_2 belassen. An Tag 3 der Kultur wurden den Petrischalen weitere 3ml DC-Medium zugegeben, um den Zellen neue Nährstoffe zuzuführen. An Tag 6 wurden jeweils 3ml Medium abgenommen, in ein 15ml Röhrchen überführt, abzentrifugiert (1500rpm; 7min; 4°C) in 3ml frischem DC-Medium resuspendiert und wieder vorsichtig auf die Schalen gegeben. An Tag 8 fand wie für Tag 6 beschrieben noch einmal ein Mediumwechsel statt. 6h später erfolgte die Reifung der DCs durch Zugabe von 3µg/ml CpG und gleichzeitig die Beladung von jeweils 2 Petrischalen mit:

1.) Tumorlysat (500µg/Schale)

2.) DC-Medium

Die Inkubation der Zellen fand über Nacht im Inkubator statt (37°C; 5% CO_2). Am folgenden Tag wurden die DCs vorsichtig durch mehrmaliges auf-und-ab Pipettieren von der Petrischale gelöst und in ein 15ml Röhrchen überführt.

5.7.1 Überprüfung der Reifung von DCs

Um zu testen, welcher Zeitpunkt der Kultur am besten geeignet ist, um DCs mit Antigen zu beladen, wurden sie an Tag 7, 8, 9 und 10 mit 1mg/ml fluoreszierendem FITC-Dextran versetzt und für 45min bei 37°C inkubiert. Nach 2 Waschschritten mit FACS Puffer wurde die Effektivität der Aufnahme, sowie der Reifungszustand mittels Durchflusszytometrie überprüft (158)

5.7.2 Herstellung von Tumorlysaten

Um DCs beispielsweise mit Tumor Antigenen zu beladen, mussten die Tumorzellen zunächst lysiert werden, um auch intrazelluläre Proteine zugänglich zu machen.

Das Prinzip der angewandten Methode war für alle Gewebe, bzw. kultivierten Zellen gleich. Die Lyse wurde durch wechselseitiges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37°C im Wasserbad erreicht (nach Feuerer et al. (58))

Die Tumoren wurden wie unter 5.5.4 beschrieben durch ein Metallsieb gedrückt und die Suspension in einer Petrischale mit 2ml eiskaltem 1x PBS aufgefangen. Durch das Passieren des Siebs wurde schon ein Großteil der Tumorzellen zerstört und ein großer Teil der intrazellulären Proteine freigesetzt; weswegen die Suspension in einem möglichst kleinen Volumen an Flüssigkeit aufgenommen wurde (1-2ml je nach Größe des Tumors), um später eine möglichst hohe Konzentration an Proteinen zu gewährleisten. Die Suspension wurde in ein 15ml Röhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach 10min wurden die Zellen bei 37°C aufgetaut und nach weiteren 10min erneut in flüssigen Stickstoff gegeben. Dieser Zyklus wurde insgesamt 4 Mal wiederholt. Anschließend wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (2000rpm; 7min; 4°C), der proteinhaltige Überstand in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren. Die Proteinkonzentration wurde über einen Bradford Test, nach Angaben des Herstellers, bestimmt.

5.8 Negativselektion von T-Zellen aus dem Knochenmark

Prinzip der Methode

Bei einer negativselektion von T-Zellen werden alle nicht- T-Zellen wie B-Zellen, Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen, Dendritische Zellen, Erythrozyten und Granulozyten mit Hilfe von zelltypspezifischen, monoklonalen Antikörpern depletiert. An diese Antikörper sind eisenhaltige Beads gebunden, die man inklusive der gebundenen Zellen mit Hilfe eines Magneten aus der Zellmischung herausziehen kann und damit die T-Zellen in der Suspension stark anreichert. Diese Methode hat den Vorteil, dass die gewonnen T-Zellen völlig unberührt bleiben und es zu keiner ungewollten Stimulierung beispielsweise über den T-Zell Rezeptor kommt.

Um eine ausreichende Menge an T-Zellen zu erhalten, musste das Knochenmark aus mindestens vier Mäusen vereint werden. Die Herstellung einer Einzelzellsuspension erfolgte wie unter 5.5.3 beschrieben. Die negativ - Selektion von T-Zellen wurde mit Hilfe eines speziellen Kits (Dynal Mouse T Cell Negative Isolation Kit) nach Angaben des Herstellers

durchgeführt. Am Ende wurden die Zellen erneut gezählt und direkt in der Kokultur mit DCs eingesetzt.

5.9 Durchflusszytometrie

Prinzip der Methode

Die Duchflusszytometrie erlaubt die Analyse von Zellsuspensionen auf Einzelzellniveau. Das Prinzip beruht auf der Emission optischer Signale seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Die in der Lösung befindlichen Zellen werden durch eine Kapillare gesaugt und im Zentrum der Messkammer fokussiert (hydrodynamische Fokussierung). Dabei werden Zellaggregate durch die starke Beschleunigung aufgetrennt, und die Zellen passieren einzeln einen Laserstrahl. Die Zelle emittiert beim Durchwandern des Laserstrahls Streulicht, welches durch Zellgröße, Struktur der Zellmembran und intrazelluläre Bestandteile beeinflusst wird. Das Streulicht lässt sich in Vorwärtsstreulicht (forward scatter FSC) und Seitwärtsstreulicht (side scatter SSC) unterscheiden. Das FSC dient als Maß für die Zellgröße das SSC als Maß für Granularität (159).

Darüber hinaus ist es mit Hilfe von Fluorochrom-konjugierten Antikörpern möglich, extrinsische Eigenschaften der Zellen zu beschreiben, da die von den Farbstoffen emittierte Lichtmenge proportional zur Zahl der mit Antikörpern markierten Epitope ist. Die Lichtemission einer einzelnen Zelle ist umso höher, je mehr entsprechende Antigene auf der Oberfläche exprimiert werden. Die Eigenschaft der Fluorochrome über unterschiedliche Absorptions- und Emissionsspektren zu verfügen, bietet die Möglichkeit verschiedene Epitope einer Zelle gleichzeitig zu markieren. Diese Daten in Verbindung mit den Informationen des FSC und SSC, erlauben eine exakte Charakterisierung der untersuchten Zellpopulation.

5.9.1 FACS Färbung von Zelloberflächenmarkern

Von Einzelzellsuspensionen aus Milz, Knochenmark und Tumor (siehe 5.5) wurden jeweils $2x10^6$ Zellen in ein FACS Röhrchen überführt und abzentrifugiert (1500rpm; 7min; 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 50µl Fc-Block aufgenommen. Nach 20min bei 4°C wurden die Zellen mit 1ml FACS Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert (1500rpm; 7min; 4°C). Anschließend wurde das Pellet in 50µl FACS Puffer durch vortexen resuspendiert, und jeweils mit 0,5µl entsprechendem Antikörper für 20min bei 4°C gefärbt.

Verwendet wurden fluoreszenzmarkierte oder biotinylierte Antikörper (siehe 4.2.4.1). Zellen, die mit biotinylierten Antikörper gefärbt wurden mussten anschließend mit 1:100 in FACS Puffer verdünntem, fluorochrom gekoppelten Streptavidin gefärbt werden. Die Inkubation erfolgte für 10min bei 4°C. Danach wurden die Zellen zwei Mal in FACS-Puffer gewaschen, bevor sie über Durchflusszytometrie am FACSCalibur, FACSLSR II oder FACSArray analysiert werden konnten.

5.9.2 MHC-I Tetramerfärbung von Ovalbumin- oder TRP-2-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen

Prinzip der Methode

Diese von Altman et al. 1996 (160) entwickelte Technik ermöglicht eine direkte *ex vivo* Detektion antigenspezifischer T-Zellen. Das MHC-Klasse-I Tetramer besteht aus vier biotinylierten MHC-I Molekülen, die ein Peptid gebunden haben (aus Ova Protein: SIINFEKL oder aus TRP-2 Protein: SVYDFFVWL) und über Biotin an einem Streptavidin Molekül verankert sind. Zusätzlich ist dieser Komplex an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt (z.B. APC) der es erlaubt CD8 T-Zellen, die den Komplex spezifisch über ihren T-Zell Rezeptor gebunden haben, mittels Durchflusszytometrie nachzuweisen (siehe Abb. 5.2).

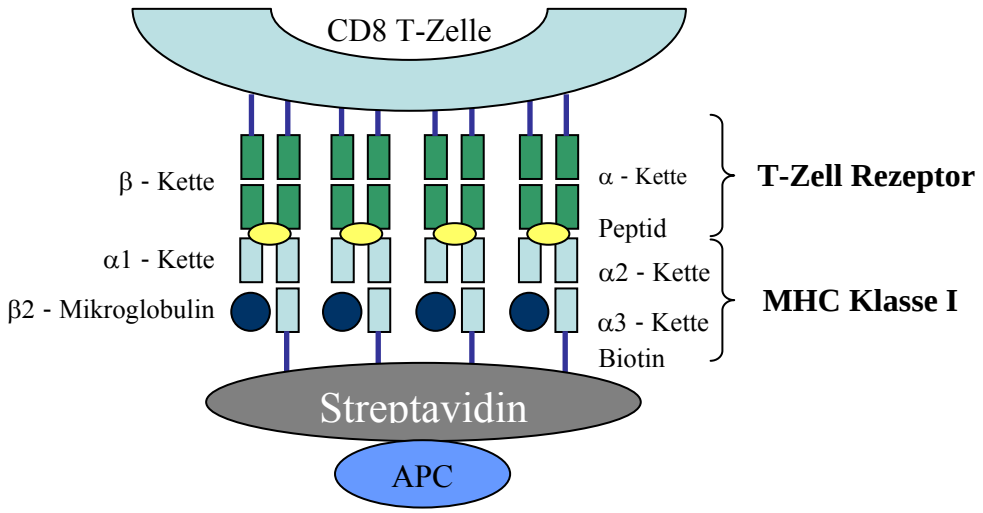

Abb. 5.2 *Schematische Darstellung eines MHC-I Tetramers in Interaktion mit dem T-Zell Rezeptor einer $CD8^+$ T-Zelle*

Für die Färbung wurden je $1x10^6$ Zellen in FACS - Röhrchen überführt und abzentrifugiert (7min; 1500rpm; 4°C). Die Zellpellets wurden in je 50µl FACS -Puffer resuspendiert und mit jeweils 0,5µl anti-CD8 FITC und anti-CD3 PerCP-Cy5.5 Antikörpern versetzt.

Zusätzlich wurden 5µl Ovalbumin- oder TRP-2 Tetramer zu den Proben gegeben. Als Nachweis der Tetramerspezifität wurden Ova- oder TRP-2-spezifische T-Zell Klone verwendet. Die Proben wurden für 40min bei 4°C inkubiert, im Anschluss mit 1ml FACS-Puffer aufgefüllt und abzentrifugiert (7min; 1500rpm; 4°C). Darauf wurden die Zellen zwei Mal mit jeweils 1ml FACS-Puffer gewaschen und am Ende in 500µl FACS-Puffer resuspendiert.
Die Analyse der Zellen erfolgte über Durchflusszytometrie am FACSCalibur, FACSLSR II oder FACSArray.

5.10 ELISA zum Nachweis von IFN-γ und IL-2 im Überstand kultivierter T-Zellen

Prinzip der Methode

Ein sog. „capture antibody“ gegen das gewünschte Antigen (hier IFN-γ und IL-2) wird zunächst an eine feste Phase (MaxiSorp; 96-well Platte) gebunden. Der zu analysierende Überstand wird dazugegeben. Befindet sich in der Probe IFN-γ oder IL-2, so bindet dieses an den „capture antibody“ und wird anschließend über einen weiteren IFN-γ oder IL-2 spezifischen „detection antibody“ nachgewiesen. Dieser „detection antibody“ ist biotinyliert und wird über ein Avidin-HRP-Konjugat detektiert. Über die Substratreaktion der Peroxidase kann der Gehalt an gesuchtem Zytokin in der Probe bestimmt werden.
Dies geschieht über eine Farbreaktion. Durch Vergleich mit einer IFN-γ oder IL-2 Standardreihe kann die Probe genau quantifiziert werden.

Der „capture antibody“ wurde in 1x PBS nach Angaben des Herstellers verdünnt, je 100µl/Well in eine Maxisorp 96-well Platte pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Antikörperlösung abgekippt und die Platte fünf Mal mit 200µl Waschpuffer/Well gewaschen. Nach einstündigem Blockieren der Wells mit je 200µl „assay diluent“ wurde die Platte erneut fünf Mal gewaschen und anschließend mit 100µl Probe je Well beladen. Parallel dazu wurde je Platte eine Standardreihe mit Konzentrationen von 2000 pg/ml bis 31,3 pg/ml (IFN-γ) oder 200 pg/ml bis 3,1 pg/ml (IL-2) eingesetzt. Nach 2h Inkubation wurden die Wells fünf Mal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Platte für 1h mit 100µl/Well der vorgeschriebenen „Working Detector“ Verdünnung („detection antibody“ + Streptavidin-HRP) inkubiert. Nach siebenmaligem Waschen wurde dann 100µl/Well Substrat (TMB) zugegeben und in der Dunkelheit inkubiert.

Die Enzymreaktion wurde nach 10-20min durch Zugabe von 50µl/Well 1M H_3PO_4 gestoppt und die Platte am ELISA Reader bei 450nm gelesen (161).

5.11 IFN-γ ELISPOT

Prinzip der Methode

Ziel des Assays ist der Nachweis einzelner funktionsfähiger IFN-γ sezernierender Zellen. Ähnlich wie der ELISA beruht der „*enzyme linked immunospot*“ (ELISPOT) ebenfalls auf einer spezifischen Antikörper-Antigen-Bindung. Auch hier bindet zunächst ein monoklonaler, sog. „*capture antibo*dy“ gegen das gewünschte Antigen (hier IFN-γ) mit seinem Fc-Teil an eine feste Phase (Nylon-Membran; 96-well Platte). Im Unterschied zum ELISA wird die Platte nun aber nicht mit einem Zellüberstand beladen, sondern die Zellen direkt in den Wells inkubiert. Überall dort, wo eine Zelle beispielsweise nach Stimulation IFN-γ produziert, bindet das Zytokin an die anti-IFN-γ Antikörper Beschichtung. Nach der Inkubation werden die Zellen aus dem Well gewaschen und zum Nachweis ein IFN-γ spezifischer „*detection antibody*“ hinzugegeben. Es ist wichtig, dass der „*coating antibody*“ und der „*detection antibody*“ aufeinander abgestimmt sind, d.h. sie müssen unterschiedliche Epitope des IFN-γ Moleküls binden, um zu gewährleisten, dass sie an ein und das selbe IFN-γ gleichzeitig binden können ohne sich dabei gegenseitig zu behindern.

Der „detection antibody“ ist biotinyliert und wird über ein Streptavidin-HRP-Konjugat detektiert. Die Substratreaktion der Peroxidase erzeugt an den Stellen der Membran rote „Spots“, an denen sich IFN-γ produzierende Zellen angesetzt hatten (162).

5.11.1 *ex vivo* IFN-γ ELISPOT zum Nachweis spezifischer T-Zellen nach DNA-Immunisierung

Die ELISPOT Platten wurden mit 50µl/Well „coating antibody“ (10µg/ml) beladen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Antikörperlösung abgekippt und die Platte vier Mal mit je 200µl/Well ddH_2O gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurde die Platte mit 200µl Medium/Well (RPMI 1640; 10% FCS; 0,1% Pen/Strep) für 1h bei 37°C blockiert.

In dieser Zeit wurden die immunisierten Mäuse getötet und die Milzen entnommen. Aus jeder Milz wurde jeweils eine Einzelzellsuspension hergestellt (siehe 5.5.1) und die Zellen auf eine Konzentration von $5x10^6$/ml eingestellt.

Die ELISPOT Platten wurden mit 100µl/Well der Zellsuspension beladen. Als Positivkontrolle diente eine Ovalbumin-spezifische zytotoxische T-Zelllinie, die nach Stimulation mit Ovalbumin IFN-γ produziert. Die Ova T-Zellen wurden in verschiedenen Verdünnungen ($1x10^4$/Well bis $1x10^3$/Well) auf die Platte aufgebracht.
Als Stimulatorzellen wurden EG7, bzw. EL4 Zellen + Ovalbumin Peptid (100ng/ml) verwendet. Als Negativkontrolle dienten EL4 Zellen ohne Peptid. Sie wurden in einer Konzentration von $1x10^4$/Well in 50µl Medium auf die entsprechenden Wells verteilt.
Als Nachweis, dass die eingesetzten T-Zellen prinzipiell IFN-γ produzieren können wurde Concanavalin A in einer Konzentration von 1,25µg/ml verwendet. Die Inkubation der Platte erfolgte über Nacht im Inkubator bei 37°C und 5% CO_2.
Am nächsten Tag wurde die Platte fünf Mal mit ELISPOT-Waschpuffer und ein Mal mit 1x PBS gewaschen. Nach kräftigem Ausklopfen der Platte wurde der „detection antibody“ 1:500 in ELISPOT - Arbeitslösung verdünnt und 50µl je Well pipettiert. Nach 2h Inkubation bei RT wurde die Platte erneut fünf Mal mit ELISPOT-Waschpuffer gewaschen und mit 50µl Streptavidin-HRP in einer Verdünnung von 1:250 in ELISPOT-Arbeitslösung beladen. Nach 2h Inkubation bei RT, wurde die Platte zunächst vier Mal mit 300µl Waschpuffer/Well gewaschen, gefolgt von weiteren vier Waschschritten mit 1x PBS. Anschließend wurde 50µl/Well Substrat (AEC-Lösung) aufgebracht und 5-20min in Dunkelheit inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Platte unter fließendem Wasser gut ausgespült und über Nacht getrocknet.

5.11.2 *ex vivo* IFN-γ ELISPOT zum Nachweis spezifischer T-Zellen nach Peptid-Immunisierung

Die technische Durchführung dieses Versuchs verlief, wie unter 5.11.1 beschrieben. Im Unterschied zur DNA-Immunisierung wurden zur Stimulation der T-Zellen jedoch keine Stimulatorzellen verwendet, sondern nur TRP-2 Peptid (100ng/ml).

5.11.3 Kokultur von antigenbeladenen DCs mit Gedächtnis T-Zellen aus dem Knochenmark

Prinzip der Methode

Um zu zeigen, dass Melanomantigen-spezifische Gedächtnis T-Zellen aus dem Knochenmark funktionell sind, wurde eine Kurzzeit Kokultur mit DCs durchgeführt, die zuvor mit spezifischem Antigen beladen und aktiviert wurden (siehe 5.7). Innerhalb von 40h können nur

solche T-Zellen stimuliert werden, die zuvor schon spezifisch gegen das von den DCs präsentierte Antigen sind. Die Kokultur wurde in einer ELISPOT Platte durchgeführt, um aktivierte T-Zellen über IFN-γ Sekretion nachzuweisen.

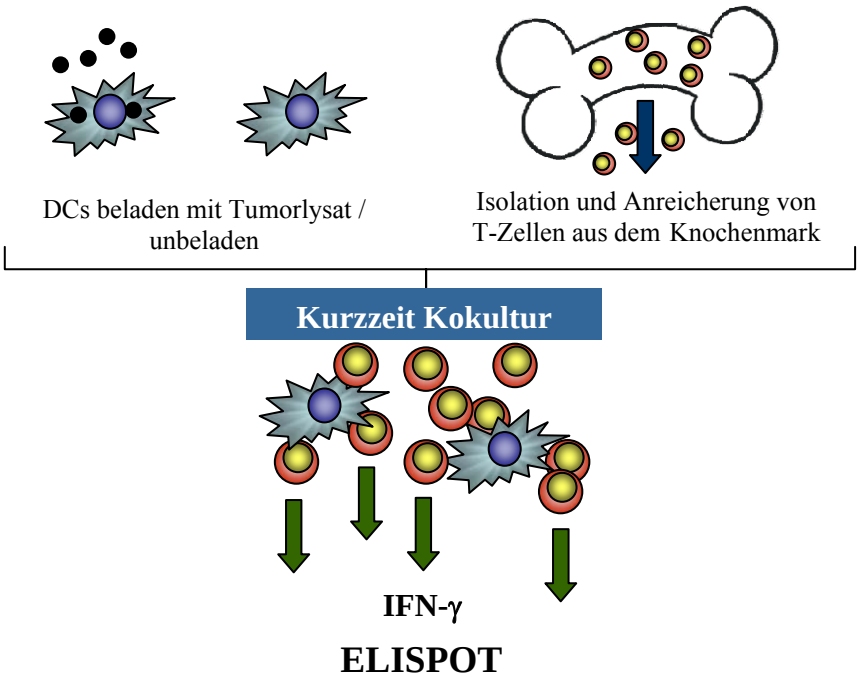

Abb. 5.3 *Schematische Darstellung einer Kokultur von Tumorlysat beladenen DCs und T-Zellen aus dem Knochenmark von Ret-tg oder Ret-tg tu Mäusen*

Die ELISPOT Platten wurden wie unter 5.11.1 beschrieben vorbereitet. Die T-Zellen aus der negativen Selektion wurden auf eine Konzentration von $5x10^6$/ml eingestellt und nach dem Blockieren der Platte jeweils 100µl/Well verteilt. Die DCs aus 5.7 wurden jeweils auf eine Konzentration von $2x10^6$/ml eingestellt und jeweils 50µl zu den T-Zellen in den Wells gegeben, so dass ein Verhältnis T-Zellen : DCs = 5 : 1 vorlag (58).

Die Kultur der Zellen erfolgte für 40h im Brutschrank. Anschließend wurde die ELISPOT Platte wie unter 5.11.1 beschrieben entwickelt und die Spots im ELISPOT Reader quantifiziert.

5.12 Immunhistochemische Färbung von Tumoren und Lymphknoten

Prinzip der Methode

Die Angewandte Methode war die sog. LSAB-Methode (labeled streptavidin-biotin). Sie zählt zu den indirekten immunhistologischen Techniken, bei denen die Primärantikörper unmarkiert sind. Das anzufärbende Antigen wird mit einem spezifischen Antikörper markiert. Ein biotinylierter Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper und bildet über den Biotinrest eine Brücke zu einem Streptavidin - Peroxidase Konjugat. Die Peroxidase kathalysiert nach Zugabe eines Chromogens eine Farbreaktion, die das gesuchte Antigen indirekt sichtbar macht (Siehe Abb. 5.4).

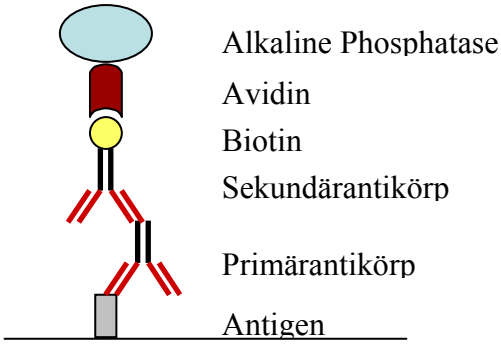

Abb. 5.4 *Prinzip der LSAB Methode in der Immunhistochemie*

Zur Vorbereitung wurden die immunhistochemisch zu untersuchenden Gewebe in 4% Formalinlösung für mindestens 24h bei 4°C fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden 5µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden in einem 42°C warmen Wasserbad gestreckt und auf Objektträger übertragen. Diese wurden im Trockenschrank bei 37°C getrocknet und anschließend bis zur immunhistologischen Färbung bei RT sicher verwahrt.

Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte zweimal für 10min mit Xylol behandelt. Es folgte eine absteigende Alkoholreihe, die der Rehydrierung des Gewebes diente. Hierzu wurden die Schnitte für 2min in absolutes Ethanol, je 2min in 96 Vol%, 80 Vol%, 70 Vol% Ethanol und abschließend für 2min in H_2O getaucht.

Durch die Formalinfixierung kommt es zur Eiweißvernetzung über Methylbrücken innerhalb des Gewebes. Dies führt zu einer sog. Maskierung der Antigene, was potenziell dazu führen kann, dass ein Antikörper sein spezifisches Antigen nicht mehr binden kann. Daher wurden die Präparate zur Demaskierung der Antigene vorbehandelt.

Dazu wurden die Schnitte zunächst in 1x PBS gespült, in eine 1mM EDTA Lösung überführt und 12min in der Mikrowelle gekocht. Nach 20min Abkühlen und 1min in 1x PBS Spülen wurde das Gewebe auf dem Objektträger mit einem Montagekleber umrundet, um die später aufgebrachten Lösungen auf dem Gewebe zu halten. Zusätzlich durfte das Gewebe nicht

austrocknen, was durch eine Überführung der Objektträger in eine sog. „Feuchte Kammer“ gewährleistet wurde, die mit feuchten Papiertüchern ausgelegt war. Das Blockieren unspezifischer Bindungsstellen auf dem Gewebe erfolgte mittels 100µl Blockierungspuffer, für 30min bei 37°C. Nach Spülen der Objektträger in 1x PBS wurde 100µl des jeweiligen Primärantikörpers (anti-TRP-1, anti-TRP-2, anti-Tyrosinase und anti-gp100) in einer Verdünnung von 1:4000 in Verdünnungspuffer auf das Gewebe aufgebracht und bei 4°C über Nacht inkubiert (163-170). Am nächsten Tag wurden die Schnitte vier Mal für 2min in Waschpuffer gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper für 30min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation folgte erneut ein Waschschritt, bei dem die Objektträger drei Mal für jeweils 2min in Waschpuffer getaucht wurden. Für die Behandlung der Schnitte mit Alkalischer Phosphatase und die anschließende Substratreaktion wurden jeweils Kits von Vector Laboratories verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die gefärbten Schnitte wurden abschließend mit Eindeckmedium unter Deckgläschen eingedeckt und nach 2-3h mit Nagellack versiegelt. Die Beurteilung der Färbungen erfolgte am Licht-Mikroskop.

IV. Ergebnisse

6. Typisierung von Ret-transgenen Mäusen

Ret-transgene (Ret-tg) Mäuse wurden mit C57Bl/6 wildtyp (C57Bl/6 wt) Mäusen gekreuzt, was dazu führte, dass das Ret-Transgen heterozygot vererbt wurde. Dadurch waren ca. 50% der Nachkommen Ret-tg. Um zwischen Ret-tg und C57Bl/6 wt Tieren zu unterscheiden wurde eine DNA-Typisierung aller Nachkommen durchgeführt (siehe 5.1).

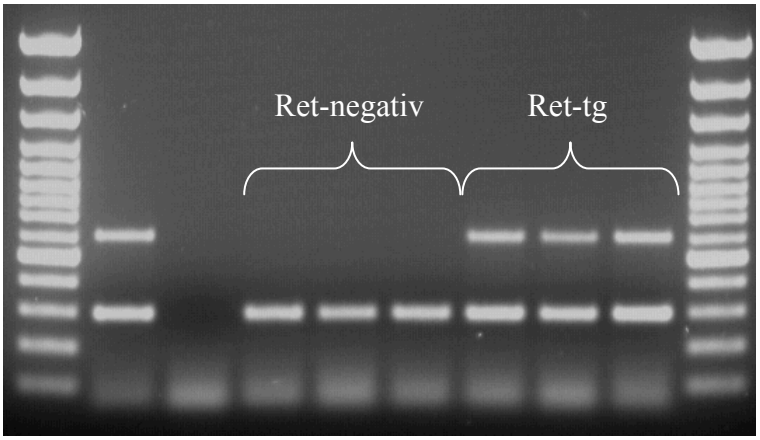

Abb. 6.1 *DNA-Typisierung der Nachkommen von Ret-tg Mäusen*

Abb. 6.1 zeigt das repräsentative Ergebnis einer solchen DNA-Typisierung. Das Produkt der Ret-Primer hat eine Größe von 600 Basenpaaren (bp), das Produkt der Positivkontrolle (β-Aktin) für eine intakte DNA liegt bei 293bp. Drei der analysierten Tiere zeigten in diesem Beispiel nur die Bande der Positivkontrolle. Diese Tiere waren also nicht Ret-tg.

7. T-Zell -Antwort in Ret-tg Mäusen

Die Tiere des Modells wurden zuvor nie auf die Funktionalität ihrer T-Zellen hin untersucht. Dies sollte mit den folgenden Experimenten geklärt werden.

7.1 unspezifische Stimulation von T-Zellen aus Ret-tg Mäusen *in vitro*

Zunächst wurde getestet, ob isolierte Milz- und Lymphknotenzellen aus Ret-tg Mäusen (siehe 5.5.1 und 5.5.2) *in vitro* durch einen unspezifischen Stimulus zur Zytokinproduktion angeregt

werden können, und ob die Menge der produzierten Zytokine mit der von Milz- und Lymphknotenzellen aus C57Bl/6 wt Mäusen vergleichbar ist.

Die IFN-γ Produktion nach Stimulation von T-Zellen aus Ret-tg Mäusen mit Con A stieg nach 24h stark an und erreichte seinen durchschnittlichen Höchstwert von 1190 ± 391pg/ml 48h Stunden nach Stimulation (Abb. 7.1 a).

Der Verlauf der IFN-γ Produktion von C57Bl/6 wt Zellen war gut vergleichbar mit dem in den Experimenten mit Ret-tg Zellen: Die IFN-γ Konzentration im Medium stieg nach 48 Stunden stark an, auf einen Mittelwert von 760 ± 131pg/ml, im Unterschied zu den Ret-tg Zellen wurde der Höchststand hier von 830 ± 129pg/ml aber erst nach 72h erreicht. Auch wenn die Mittelwerte der C57Bl/6 Zellen deutlich unter denen der Ret-tg Zellen lagen, war die Differenz zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant.

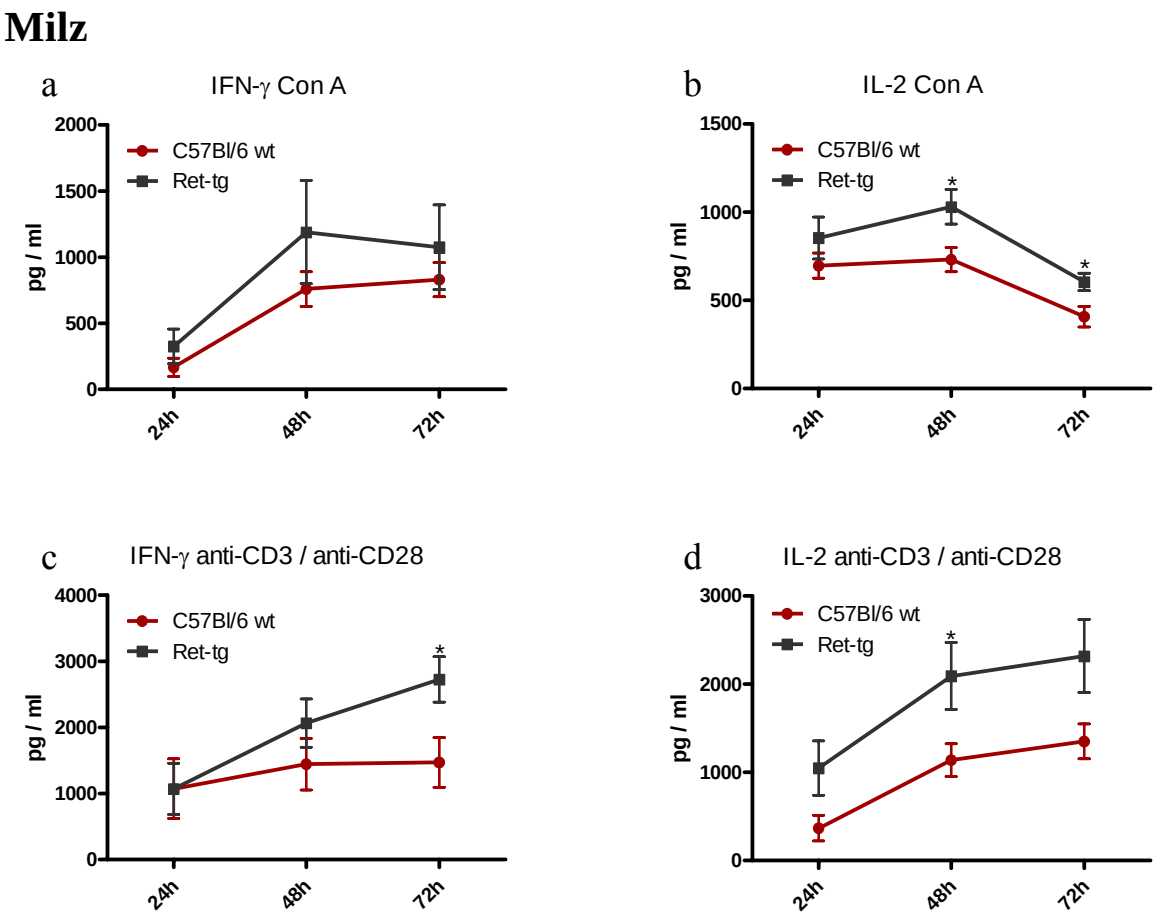

Abb. 7.1 *IFN-γ und IL-2 Produktion von Milzzellen nach unspezifischer Stimulation*
** p < 0,05 C57Bl/6 wt gegen Ret-tg,*
(a,b) C57Bl/6 wt und Ret tg n=5; (c,d) C57Bl/6 wt n=5, Ret-tg n=4

Die IFN-γ Produktion von Ret-tg- und C57Bl/6 wt Zellen nach Stimulation mit anti-CD3 / anti-CD28 Antikörpern war im Vergleich zur Stimulation mit Con A zu jedem Zeitpunkt deutlich höher. Bei Ret-tg und C57Bl/6 wt Zellen wurden bereits nach 24h ein Mittelwert von 1073 ± 387pg/ml, bzw 1073 ± 451pg/ml respektive erreicht, der nach 48h jeweils weiter anstieg. Während die Konzentration von IFN-γ im Medium von C57Bl/6 wt Zellen nach 72h nur noch schwach zugenommen hatte (1470 ± 374pg/ml), erreichte die IFN-γ Konzentration im Überstand von Ret-tg Zellen ihren Spitzenwert von 2726 ± 343pg/ml ($p<0,05$; Abb. 7.1 b).
Die Kinetik der Produktion von IL-2 bei Ret-tg und C57Bl/6 wt Zellen nach Stimulation mit Con A war miteinander vergleichbar. Die Konzentration an IL-2 im Medium erreichte nach 24h 854 ± 119pg/ml (Ret-tg) und 697 ± 72pg/ml (C57Bl/6 wt), stieg nach 48h leicht an, auf 1031 ± 98pg/ml (Ret-tg) und 732 ± 68pg/ml (C57Bl/6 wt) um nach 72h unter den Ausgangswert zu sinken, auf 605 ± 50pg/ml (Ret-tg) und 408 ± 58 pg/ml (C57Bl/6 wt). Die Differenz der Mittelwerte von Ret-tg und C57Bl/6 Zellen war nach 48h ($p=0,04$) und 72h ($p=0,04$) statistisch signifikant (Abb. 7.1 c).
Wie schon für die IFN-γ Produktion, war die Konzentration an IL-2 nach Stimulation der Zellen mit anti-CD3 / anti-CD28 Antikörpern nach 48 und 72h höher als bei Stimulation mit Con A. Nach 24h lag der Mittelwert der C57Bl/6 wt Zellen mit 367 ± 147pg/ml noch unter dem Wert der Con A Stimulation; ganz im Gegensatz zu den Ret-tg Zellen, die nach 24h schon eine mittlere IL-2 Konzentration von 1049 ± 307pg/ml erreicht hatten (Abb. 7.1 d).
Nach 48h stieg der Wert bei beiden Zellen weiter an, auf 1139 ± 186pg/ml (C57Bl/6 wt) und 2092 ± 378pg/ml (Ret-tg) und erreichte nach 72h Konzentrationen von 1351 ± 197pg/ml (C57Bl/6 wt) und 2319 ± 414pg/ml (Ret-tg).
Statistisch signifikant war nur die Differenz der Mittelwerte nach 48h ($p = 0,046$). Nach 72h war die Differenz mit $p = 0,057$ nur annähernd signifikant (Abb. 7.1 d).

Die IFN-γ Produktion von Ret-tg und C57Bl/6 wt Zellen aus Lymphknoten nach Stimulation mit anti-CD3 / anti-CD28 Antikörpern war hinsichtlich des kinetischen Verlaufs als auch der durchschnittlichen Werte recht gut mit der aus Milzzellen vergleichbar.
Die Werte erreichten nach 48h ein Niveau von 1802 ± 461pg/ml (Ret-tg) bzw. 1462 ± 395pg/ml (C57Bl/6 wt) und stiegen bei Ret-tg Zellen nach 72h weiter an auf 2406 ± 333pg/ml, wogegen der IFN-γ Spiegel im Medium von C57Bl/6 wt Zellen einen leichten Rückgang auf 1429 ± 273pg/ml zeigte (7.2 a).

Die IL-2 Messung ergab nach 24h bereits eine mittlere Konzentration von 1156 ± 327pg/ml (Ret-tg), bzw. 614 ± 58pg/ml, die nach nach 72h ein Niveau von 2448 ± 452pg/ml (Ret-tg), bzw. 1558 ± 133pg/ml erreichte.

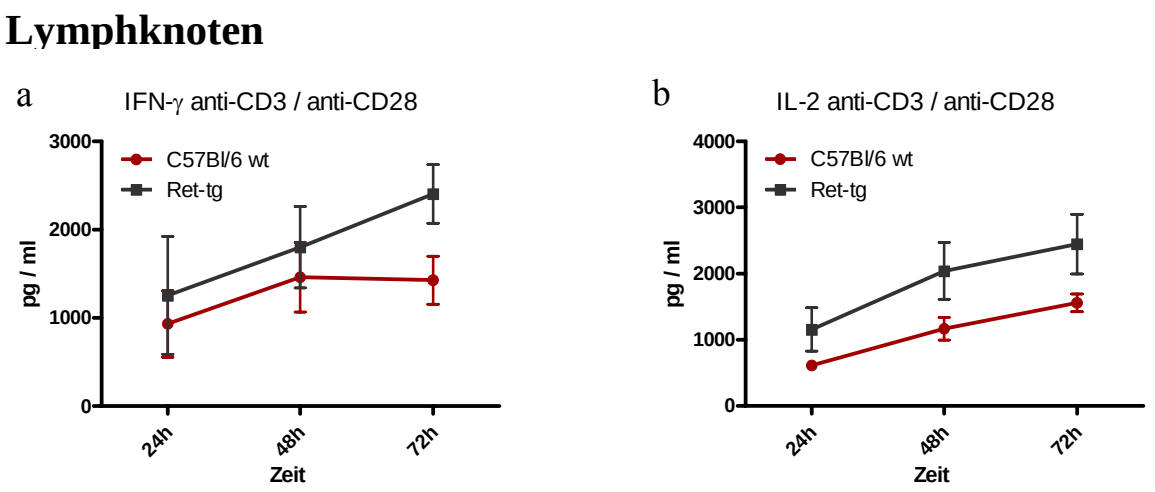

Abb. 7.2 *IFN-γ und IL-2 Produktion von Lymphknotenzellen nach unspezifischer Stimulation,*
(a) C57Bl/6 wt und Ret-tg n=5, (b) C57Bl/6 wt n=5, Ret-tg n=4

Mit Hilfe der Experimente konnte nachgewiesen werden, dass T-Zellen aus Ret-tg Mäusen unspezifisch *in vitro* stimulierbar waren. Dabei war die IFN-γ und IL-2 Sekretion, im Vergleich zu T-Zellen aus C57Bl6 wt Tieren, nicht vermindert.

7.2 T-Zell vermittelte Immunantwort gegen Modell- (Ovalbumin) und Melanom-assoziierte (TRP-2) Antigene nach Immunisierung

Um zu zeigen, dass Ret-tg Mäuse auch spezifische T-Zell-Antworten generieren können, wurden C57Bl/6 wt und Ret-tg Mäuse mit Ovalbumin (Ova) oder TRP-2 immunisiert (siehe 5.3.1 bzw. 5.3.2) und die Reaktivität der T-Zellen *ex vivo* mittels Tetramerfärbung (siehe 5.9.2) und IFN-γ ELISPOT (5.11) überprüft. Als Negativkontrolle wurden Mäuse beider Gruppen anstelle von Ovalbumin oder TRP-2 mit PBS behandelt und die T-Zellen ebenfalls auf ihre Reaktivität hin analysiert.

Die Spezifität der verwendeten Tetramere wurde zunächst auf Zellen einer Ova-spezifischen und einer TRP-2-spezifischen CD8$^+$ T-Zelllinie überprüft (Abb. 7.3).

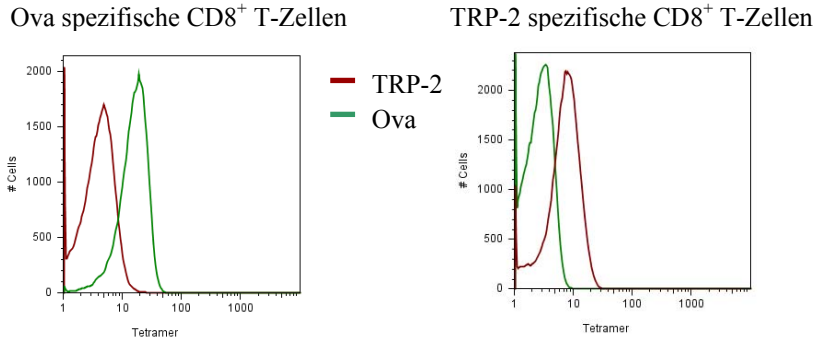

Abb. 7.3 *Ova- und TRP-2 Tetramerfärbung auf spezifischen CD8$^+$ T-Zelllinien*

TRP-2 Tetramer band auf Ova-spezifischen T-Zellen nicht an den T-Zell Rezeptor, im Gegensatz zu Ova Tetramer. Umgekehrt war auf TRP-2-spezifischen T-Zellen nur eine Bindung von TRP-2 Tetramer zu beobachten, nicht jedoch von Ova Tetramer. Damit waren die Spezifität der Ova- und TRP-2 Tetramere nachgewiesen.

7.2.1 Immunisierung mit Ovalbumin mittels pcDNA3.1-Ova

7.2.1.1 Ex vivo Nachweis Ova-spezifischer T-Zellen mittels Tetramer Färbung

Abb. 7.4 zeigt repräsentative FACS-Analysen der gefärbten Milzzellen aus C57Bl/6 wt (a,b) und Ret-tg Mäusen (c,d). Die immunisierte C57Bl/6 wt Maus (b) zeigte mit 1,21% der CD8$^+$ Population im Gegensatz zum mit PBS behandelten Kontrolltier mit einem Hintergrund von 0,09% (a) einen geringen, aber deutlichen Anteil an Ova- spezifischen CD8$^+$ T-Zellen. Dies konnte für insgesamt zwei immunisierte Tiere gezeigt werden (0,22-1,21%).
Von den beiden verwendeten mit PBS behandelten Kontrollmäusen wies keine Ova-spezifische T-Zellen auf.

Abb. 7.4 c und d zeigt ein repräsentatives Ergebnis der Ova Immunisierung in Ret-tg Mäusen. Während die PBS behandelte Maus (c) einen Hintergrund von 0,12%, gemessen an der CD8$^+$ T-Zell Population aufwies, waren im immunisierten Tier (d) 4,4% spezifisch für Ova. Insgesamt konnten in vier immunisierten Ret-tg Tieren Ova-spezifische CD8$^+$ T-Zellen nachgewiesen werden (0,5-7,4% der CD8$^+$ T-Zellen).

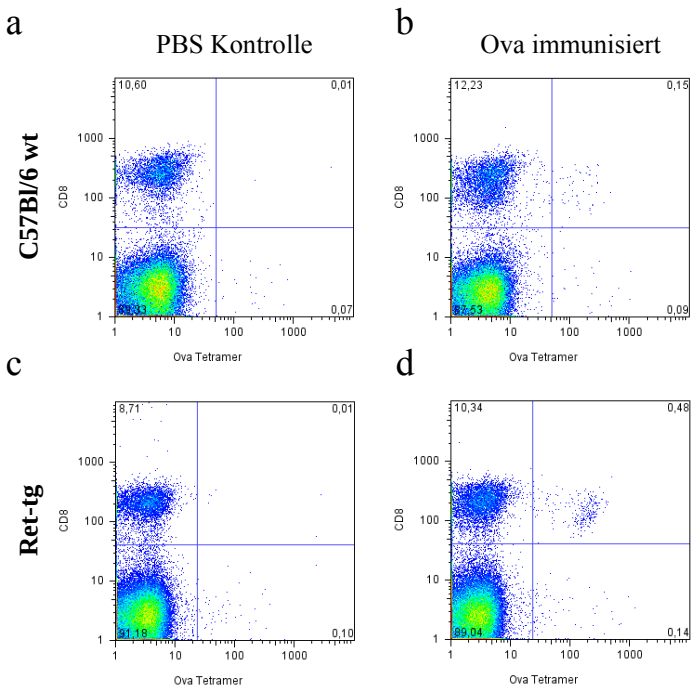

Abb. 7.4 *Tetramerfärbung nach DNA Immunisierung von C57Bl/6 wt (a) und Ret-tg (b) Mäusen mit Ovalbumin*

7.2.1.2 Ex vivo Nachweis Ova-spezifischer T-Zellen mittels IFN-γ ELISPOT

Um zu zeigen, dass die Ova-spezifischen T-Zellen reaktiv sind, sollte die IFN-γ Sekretion über einen ELISPOT nachgewiesen werden.

Die Einzelzellsuspensionen aus den Milzen der immunisierten- und Kontrollmäuse (siehe 5.5.1) wurden im ELISPOT mit EG7 Zellen, EL4 Zellen oder EL4 Zellen plus Ova Peptid stimuliert (5.12). Als Positivkontrolle diente eine Ova-spezifische T-Zelllinie.

Abb. 7.5 a zeigt die Ergebnisse nach der Ova Immunisierung in C57Bl/6 wt Mäusen. Die Mittelwerte wurden aus 3 unabhängigen Experimenten errechnet.

Im Durchschnitt waren 40 ± 6 T-Zellen aus der Milz von mit Ova immunisierten C57Bl/6 wt Mäusen in der Lage nach Stimulation mit EG7 Zellen IFN-γ zu produzieren. Im Vergleich dazu zeigten 4 ± 1 Zellen aus den mit PBS behandelten Kontrollmäusen einen geringen Hintergrund ($p<0,0001$). Ein stärkerer Effekt wurde nach Stimulation mit EL4 und dem zugesetzten Ova Peptid erzielt. Hier reagierten 52 ± 15 T-Zellen. Die mit PBS behandelten Kontrollmäusen lieferten einen Hintergrund von 3 ± 1 T-Zellen ($p<0,01$). EL4 alleine zeigte sowohl in den immunisierten Tieren und den mit PBS behandelten Kontrollmäusen nur einen geringen Hintergrund, ein Beleg für die Ova-spezifische IFN-γ Sekretion nach Stimulation mit EG7 oder EL4 zusammen mit Ova Peptid.

Die Medium Kontrolle, die nur Milzzellen enthielt und der keine Stimulanzen zugesetzt wurden, lieferte sowohl für die immunisierten Mäuse, als auch für die mit PBS behandelten Kontrolltiere nur einen vernachlässigbaren Hintergrund.

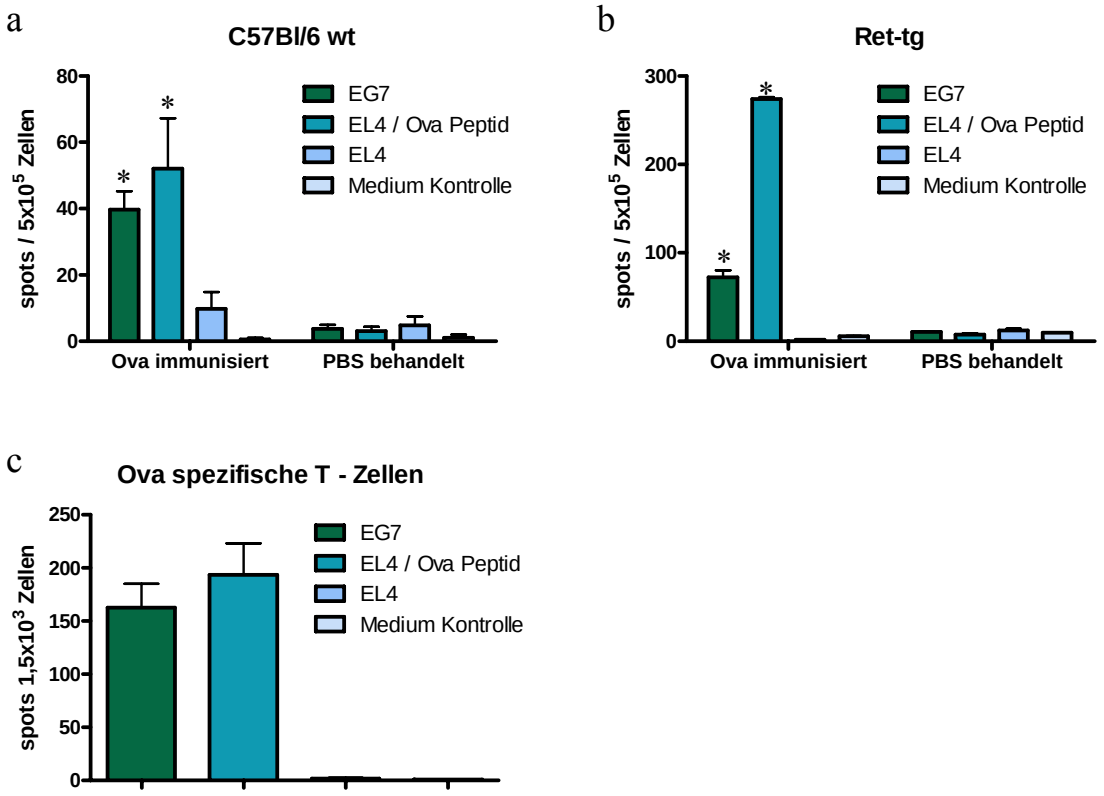

Abb. 7.5 *Ex vivo ELISPOT nach Immunisierung mit Ova in C57Bl6 wt Mäusen (a) und Ret-tg Mäusen (b). Als Positivkontrolle für die Stimulation diente eine Ova-spezifische T-Zelllinie (c).*

Abb. 7.5 b zeigt die Ergebnisse für die Immunisierung von Ret-tg Mäusen. Die Mittelwerte errechneten sich aus zwei unabhängigen Experimenten. Ret-tg Tiere reagierten in vergleichbarer Weise wie C57Bl/6 wt Tiere: Die Stimulation mit EL4 und zugesetztem Ova Peptid regte durchschnittlich mehr T-Zellen (274 ± 2) zur IFN-γ Sekretion an als die EG7 Stimulation (72 ± 8 T-Zellen). Verglichen mit den Hintergrundsignalen für T-Zellen aus den mit PBS behandelten Kontrolltieren und den internen Kontrollen (8.5 b) wird die Spezifität der reaktiven Zellen für Ova deutlich (EG7: Ova/PBS $p<0,02$; EL4/Ova Peptid: Ova/PBS $p<0,0001$).

Die Frequenz an Ova-reaktiven T-Zellen betrug in C57Bl/6 wt Tieren $7,2/10^5$ Zellen und in Ret-tg Mäusen $12,3/10^5$ Zellen, bezogen auf die Stimulation mit EG7 Zellen.

Die Ergebnisse des Immunisierungs-Experiments zeigten eine deutliche T-Zell vermittelte Immunantwort gegen das Modellantigen Ova in Ret-tg Mäusen.

7.2.2 Immunisierung mit TRP-2 Peptid

Die Immunisierung mit Melanom-assoziiertem Antigen TRP-2 sollte zeigen, dass das Ret-tg Mausmodell auch eine T-Zell-Antwort gegen ein Melanom-relevantes und gleichzeitig weniger immunogenes Antigen als Ova generieren kann.

7.2.2.1 Ex vivo Nachweis TRP-2-spezifischer T-Zellen mittels Tetramerfärbung

Die in Abb. 7.6 gezeigte, repräsentative, mit TRP-2 Peptid immunisierte C57Bl/6 wt Maus (b) zeigte mit 1,2% TRP-2- spezifischer $CD8^+$ T-Zellen in der Milz einen deutlich höheren Anteil als die dargestellte mit PBS behandelte Kontrollmaus (a) mit 0,16%, was unter dem maximalen Hintergrundwert in C57Bl/6 wt Mäusen von 0,2% lag (vergleiche Abb. 10.2).

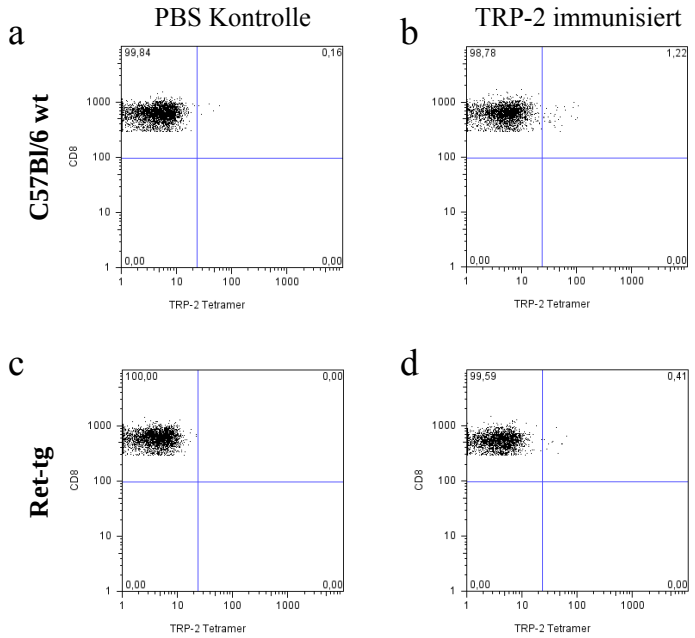

Abb. 7.6 *Tetramer Färbung nach Peptid Immunisierung von C57Bl/6 wt (a) und Ret-tg Mäusen (b) mit TRP-2*

In der Milz der dargestellten mit TRP-2 immunisierten Ret-tg Maus waren 0,4% der $CD8^+$ T-Zellen TRP-2-spezifisch (Abb 7.6 d).

Insgesamt konnten in je zwei immunisierten C57Bl/6 wt (0,3% und 1,2%) und Ret-tg Tieren (0,3% und 0,4%) TRP-2-spezifische $CD8^+$ T-Zellen nachgewiesen werden.

7.2.2.2 Ex vivo Nachweis TRP-2-spezifischer T-Zellen mittels IFN-γ ELISPOT

Die Einzelzellsuspensionen aus den Milzen der immunisierten und der mit PBS behandelten Kontrollmäuse (siehe 5.5.1) wurden im ELISPOT mit TRP-2 Peptid stimuliert. Als Negativkontrolle diente Ova Peptid (siehe 5.11.2). Als Postivkontrolle wurde eine TRP-2-spezifische T-Zelllinie verwendet.

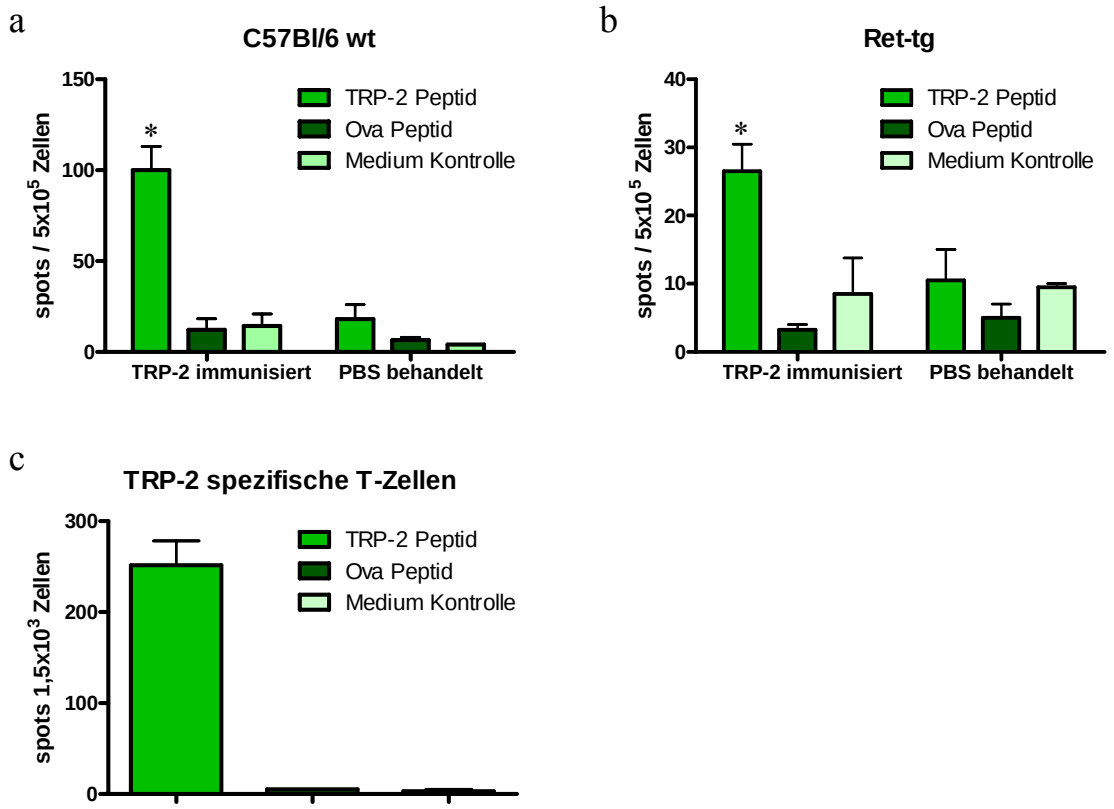

Abb. 7.7 *Ex vivo ELISPOT nach Immunisierung mit TRP-2 Peptid in C57Bl6 wt Mäusen (a) und Ret-tg Mäusen (b). Als Positivkontrolle für die Stimulation diente eine TRP-2-spezifische T-Zelllinie (c).*

Abb. 7.7 zeigt für die jeweilige Stimulation die mittlere Anzahl der IFN-γ sekretierenden T-Zellen und den zugehörigen Standardfehler aus zwei TRP-2 immunisierten Mäusen und einer mit PBS behandelten Kontrollmaus.

T-Zellen aus TRP-2 immunisierten C57Bl/6 wt Mäusen zeigten eine deutliche Antwort nach Stimulation mit TRP-2 Peptid (61 ± 23 IFN-γ sekretierenden Zellen).

Im Gegensatz dazu zeigten die internen Negativkontrollen (Ova Peptid, Medium) sowie die mit PBS behandelten Kontrolltiere nur Hintergrundsignale (12-18 Zellen; $p<0,02$; Abb. 7.7 a).

Die Zahl an TRP-2-spezifischen Zellen war in immunisierten Ret-tg Tieren niedriger als in C57Bl/6 wt Mäusen (27 ± 4 Zellen). Trotzdem war die Anzahl an positiven Zellen höher als im mit PBS behandelten Kontrolltier, mit 11 ± 5 Spots ($p<0,04$; Abb. 7.7 b).
Die Frequenz an TRP-2-reaktiven T-Zellen betrug in C57Bl/6 wt Tieren $16,4/10^5$ Zellen und in Ret-tg Mäusen $3,2/10^5$ Zellen, bezogen auf die Stimulation mit EG7 Zellen.
Dass die zur Stimulation eingesetzten Peptide spezifisch waren belegte eine Kontrolle mit TRP-2-spezifischen T-Zellen, die nur auf Stimulation mit TRP-2 Peptid reagierten (Abb. 7.7 c).

Zusammenfassend konnte eindeutig gezeigt werden, dass Ret-tg Mäuse sowohl Antigen unspezifische, als auch spezifische T-Zell vermittelte Immunreaktionen gegen ein Modelantigen und ein Melanom-assoziiertes Antigen generieren können.

8. Tumorentwicklung in Ret-tg Mäusen

8.1 Phänotypen von Ret-tg Mäusen

Ret-tg Mäuse wiesen drei unterschiedliche bisher nicht beschriebene Phaenotypen auf (vergleiche Abb. 8.1). 7,6% der transgenen Mäuse zeigte an Ohren und Schwanz eine Schwarzfärbung der Haut (Maus 2), 3,5% hatten an diesen Stellen eine etwas weniger pigmentierte, grau erscheinende Haut (nicht gezeigt). 88,9%, der Mäuse wies einen hellen, wenig pigmentierten Hauttyp auf (Maus 1). Alle drei Phänotypen wurden positiv auf das Ret-tg getestet.

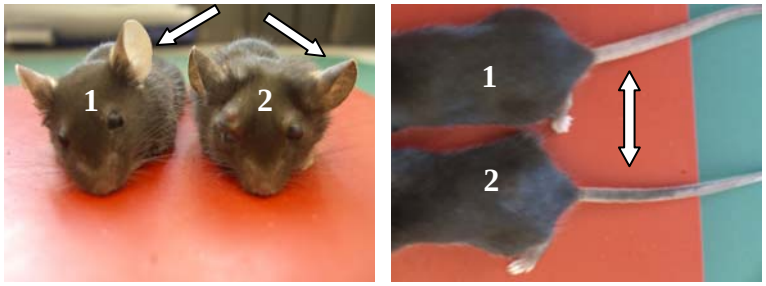

Abb. 8.1 *Phaenotypen von Ret-tg Mäusen*

Maus 1 ist eine Ret-tg tumorfreie Maus (im Folgenden immer als **Ret-tg** bezeichnet) und Maus 2 ist eine Ret-tg Maus mit Tumor (im Folgenden immer als **Ret-tg tu** bezeichnet).

8.2 Statistiken

Die Tumorinzidenz der Ret-tg Mäuse ungeachtet deren Phänotyps lag bei 19%. 50% der Tiere, entwickelten Tumoren innerhalb von 40 Tagen (Abb. 8.2 a).

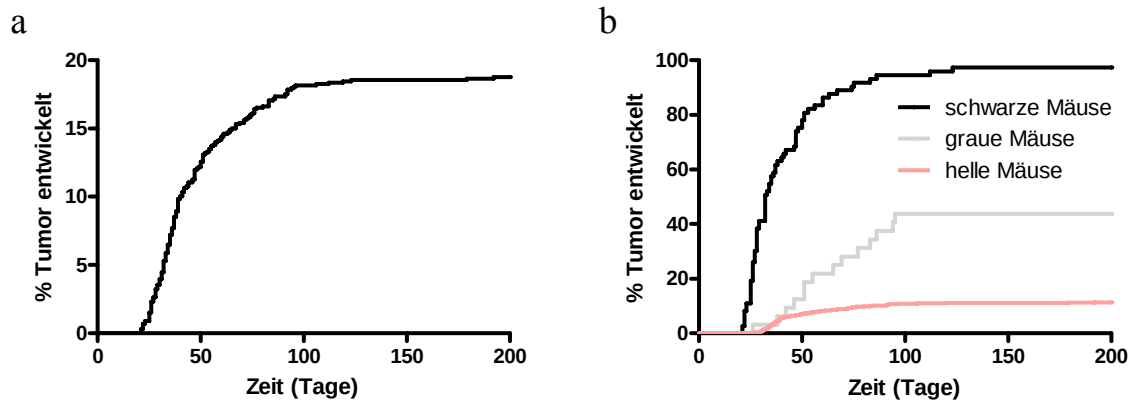

Abb. 8.2 *Analyse der Tumorentwicklung und Inzidenz in allen Ret-tg Mäusen (a) und den phänotypischen Subgruppen (b)*

Getrennt zeigten die drei phänotypischen Subgruppen allerdings eine unterschiedliche Tumorentwicklung (Abb. 8.2 b).

Mäuse mit einem schwarzen Phänotyp zeigten eine Tumorinzidenz von 97%, wobei bereits nach 32 Tagen 50% der Tiere ein Melanom entwickelt hatten. Die äußerst selten auftretenden Mäuse mit einem grauen Phänotyp hatten eine Tumorinzidenz von 42% mit einer medianen Latenzzeit von 51 Tagen. Mäuse mit einem unauffälligen hellen Phänotyp wiesen mit nur 11% die geringste Tumorinzidenz auf, wobei sie mit 88,9% den größten Anteil an Ret-tg Mäusen stellten. Der Median der Latenzzeit lag bei 39 Tagen.

Erste Anzeichen einer Tumorentwicklung zeigten sich meistens im Bereich der Augen. Am häufigsten manifestierten sich die Tumoren im Gesicht und Nacken der Ret-tg Mäuse, seltener an den Flanken oder am Schwanz. Oft finden sich auch kleinere Tumoren im Bereich der Lymphbahnen oder am Rücken (Abb. 8.3).

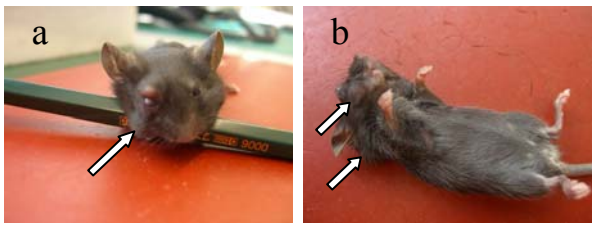

Abb. 8.3 *Tumorlokalisation in Ret-tg tu Mäusen am Auge (a), in der rechten Gesichtshälfte und im Nacken (b)*

8.2 Expression melanomassoziierter Antigene in Tumoren von Ret-tg Mäusen

Die immunhistochemische Färbung von Paraffin-Schnitten aus den spontan entwickelnden Tumoren von Ret-tg Mäusen sollte zeigen, dass es sich um Melanome handelte. Hierfür wurden die Schnitte wie unter 5.13 beschrieben mit Antikörpern gegen die Melanom-assoziierten Antigene (MAA) TRP-1, TRP-2, gp100 und Tyrosinase gefärbt.

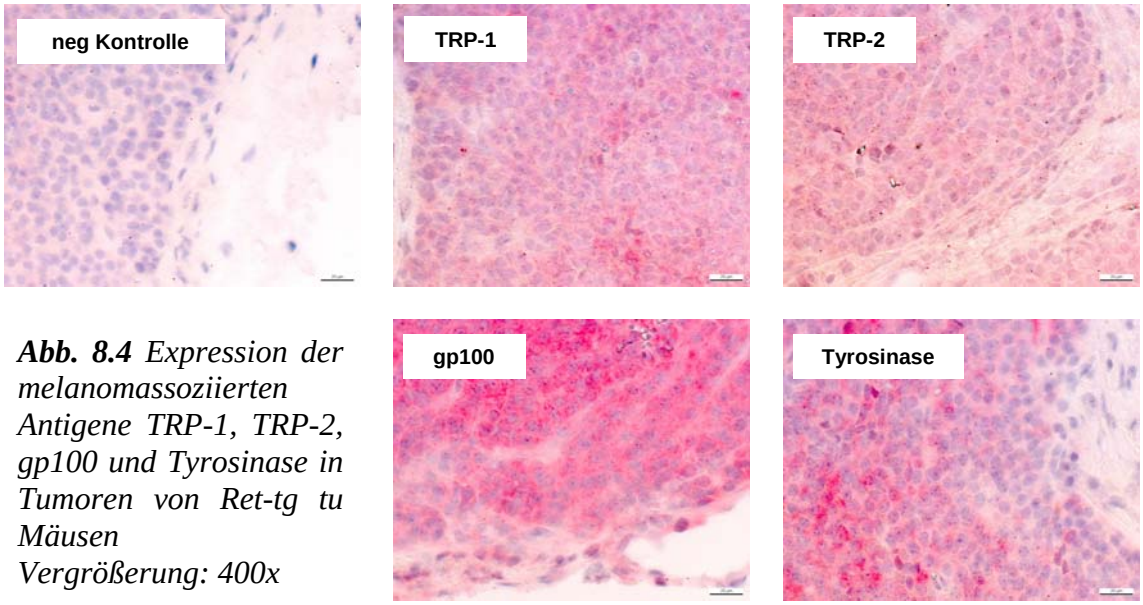

Abb. 8.4 *Expression der melanomassoziierten Antigene TRP-1, TRP-2, gp100 und Tyrosinase in Tumoren von Ret-tg tu Mäusen*
Vergrößerung: 400x

Der Vergleich zur Negativkontrolle, ohne Primärantikörper, zeigt die eindeutige Expression der untersuchten Antigene im Tumorgewebe Ret-tg Mäuse. TRP-1 und TRP-2 zeigten eine gleichmäßige Anfärbung des Gewebes, wobei gp100- und Tyrosinase-positive Zellen oft in Clustern gefunden wurden, in denen die Expression des Antigens besonders stark war (Abb. 8.4). 90% aller untersuchten Tumoren exprimierten mindestens eines der ausgewählten MAA.

8.3 Expression melanomassoziierter Antigene in Lymphknoten von Ret-tg Mäusen

Die immunhistochemische Färbung von Lymphknoten aus tumortragenden Mäusen (Ret-tg tu) sollte klären, ob die Melanomzellen in andere Gewebe einwandern und dort Metastasen bilden können.

Makroskopisch erschienen bei der Entnahme die Lymphknoten von Ret-tg tu Tieren in den meisten Fällen schwarz (Abb 8.5 a), was für die Anwesenheit Melanin produzierender Zellen sprach. Lymphknoten von C57Bl/6 wt Tieren waren dagegen niemals schwarz.

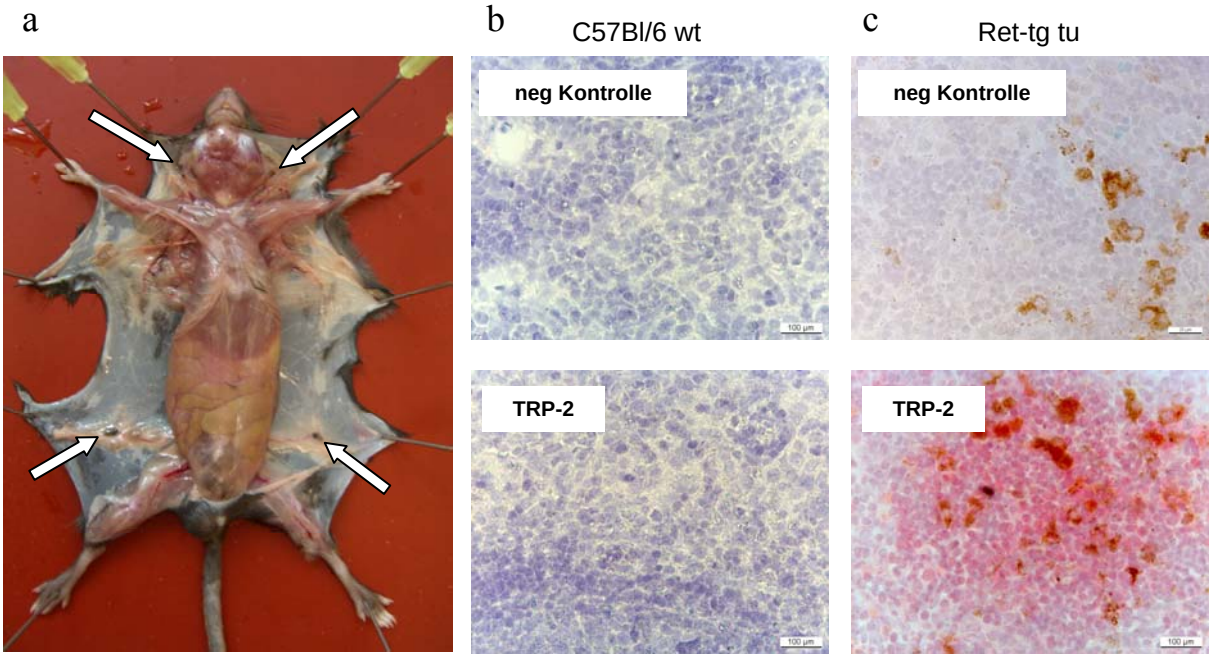

Abb. 8.5 *Phänotyp der Lymphknoten in Ret-tg tu Mäusen (a) und Expression von TRP-2 in Lymphknoten von C57Bl/6 wt (b) und Ret-tg tu Mäusen (c)*

Als Beispiel der Expression von MAA in Lymphknoten von Ret-tg tu Mäusen wurde TRP-2 gewählt, da sich die vorliegende Arbeit auch im weiteren Verlauf auf dieses Antigen konzentrierte. Die Expression von TRP-2 (Abb. 8.5 c) konnte in 90% der untersuchten Lymphknoten aus Ret-tg tu Tieren nachgewiesen werden, wogegen C57Bl/6 Lymphknoten immer negativ waren (Abb. 8.5 b). Die Negativontrolle des Lymphknotens aus der gezeigten Ret-tg tu Maus wies braune Zellen auf (Abb 8.5 b), bei denen es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um eingewanderte Melanomzellen handelte, wofür auch die makroskopische Schwarzfärbung der Lymphknoten sprach.

Zusätzlich zu den Lymphknoten aus Ret-tg tu Tieren wurden auch Lymphknoten aus makroskopisch Tumor freien transgenen Mäusen (Ret-tg), die älter waren als 20 Wochen, auf die Anwesenheit von MAA hin untersucht (Abb. 8.6). Auch hier konnten TRP-2 positive Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 8.6), obwohl die Mäuse auch nach 6 Monaten keine sichtbaren Tumoren entwickelten.

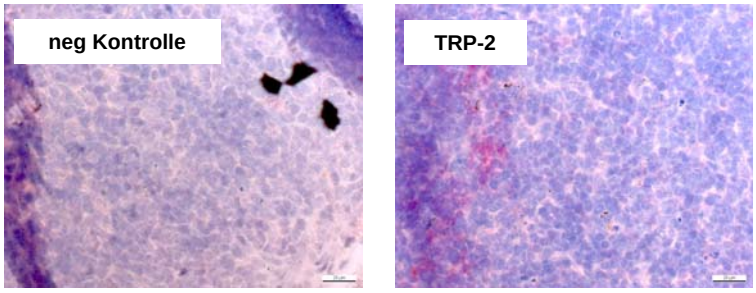

Abb. 8.6 *Expression von TRP-2 in Lymphknoten von Ret-tg Mäuse*

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es sich bei Tumoren aus Ret-tg tu Mäusen eindeutig um Melanome handelte. Melanomzellen konnten auch in den Lymphknoten von Ret-tg tu Mäusen nachgewiesen werden, was die Fähigkeit dieser Zellen zur Metastasierung untermauert. Ferner konnte durch den Fund TRP-2 positiver Zellen in Lymphknoten von Ret-tg Mäusen gezeigt werden, dass es vereinzelte Tumorzellen in diesen Tieren gibt, deren Proliferation und Ausbreitung aber gehemmt zu sein scheint.

9. Gedächtnis T-Zellen in Ret-tg Mäusen

Die phänotypische Analyse der T-Zellen aus Ret-tg tu Mäusen im Vergleich mit Ret-tg und C57Bl/6 wt Mäusen sollte aufklären, ob es Unterschiede in der Menge und Zusammensetzung der Gedächtnis T-Zellen zwischen den einzelnen Mausgruppen gibt. Der Fokus lag hier vor allem auf dem Vergleich der beiden Subpopulationen der „*central memory*“ (CM) und der „*effector memory*“ (EM) T-Zellen.

Die Analyse erfolgte über FACS-Färbung von Zellen aus der Milz, dem Knochenmark und Tumor der zu vergleichenden Mausgruppen (siehe 5.10.1). Für die Charakterisierung der relevanten CD4 Subpopulationen wurden anti-CD4, anti-CD3, anti-CD45RB und anti-CD62L Antikörper eingesetzt, für die Charakterisierung der CD8 Subpopulationen kamen anti-CD8, anti-CD3, anti-CD44 und anti-CD62L Antikörper zum Einsatz.

Die Gating-Strategie war für die Analyse der gemessenen Daten in der Durchflusszytometrie für alle Organe und Tumoren gleich. Durch ein Gate auf die Population der Mononukleären Zellen (MNC) wurden tote Zellen, Zellschrott und Dubletten ausgeschlossen. Innerhalb dieser Population wurden dann $CD4^+$ oder $CD8^+$ Zellen gegen $CD3^+$ Zellen aufgetragen und ein weiteres Gate auf die jeweils doppelt positive $CD4^+/CD3^+$ oder $CD8^+/CD3^+$ Population gelegt. Innerhalb dieser Zellgruppe wurde dann CD45RB ($CD4^+/CD3^+$) oder CD44 ($CD8^+/CD3^+$) auf der Y-Achse eines Dot Plots gegen CD62L auf der X-Achse aufgetragen (vergleiche Abb. 10.1). Der Prozentuale Anteil der naiven, CM und EM Population wurde dann nicht nur auf die $CD4^+$ oder $CD8^+$ Zellen, sondern auch auf die Gesamtanzahl der MNC bezogen (Abb. 9.2 und 9.3).

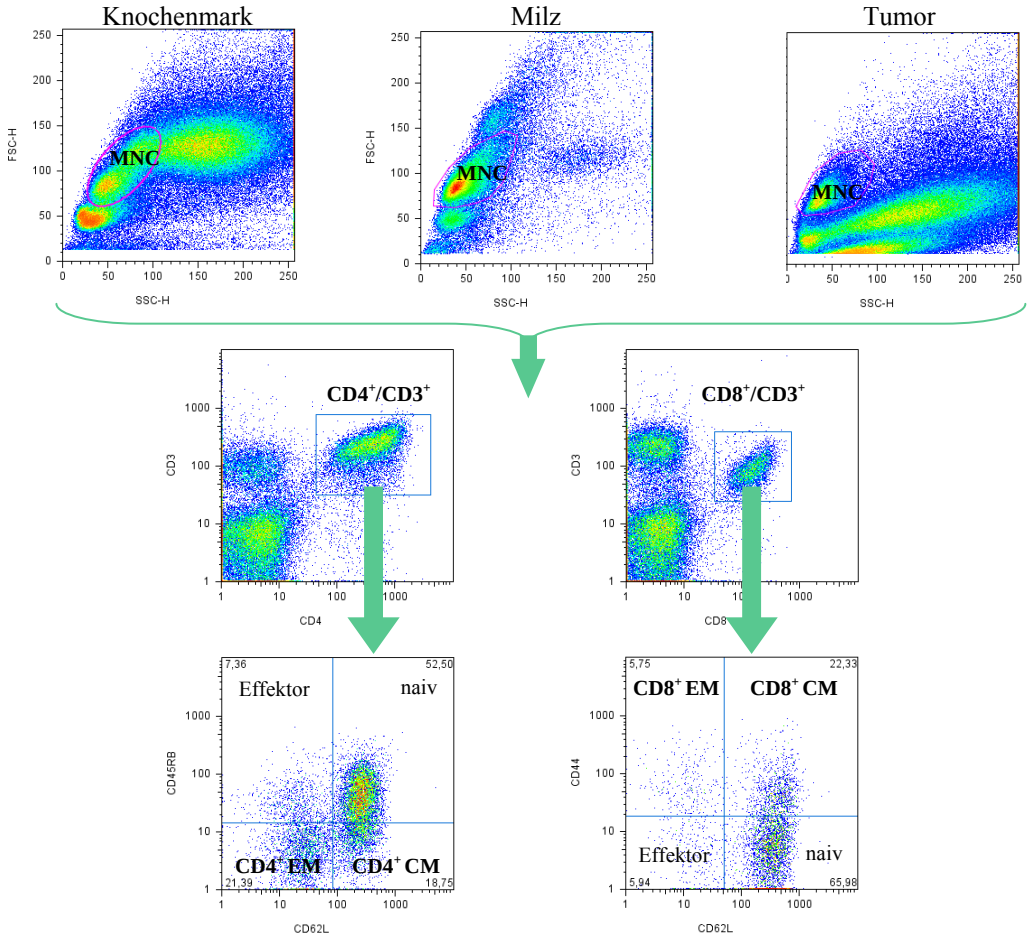

Abb. 9.1 *Gating-Strategie für Zellen aus Knochenmark, Milz und Tumor*

Einzige Ausnahme waren die Gedächtnis T-Zellen im Tumor, die ausschließlich auf ihre parentale Population bezogen wurden, um einen Vergleich mit den Organen zu ermöglichen. Dies war notwendig, da im MNC Gate auch Tumorzellen enthalten waren, und diese die Werte im Vergleich mit den Organen verfälscht hätten (siehe Abb. 9.4).

9.1 Gedächtnis T-Zellen im Knochenmark

Die $CD4^+$ T-Zell Subpopulationen (CM, EM und naiv) im Knochenmark der drei untersuchten Mausgruppen wiesen innerhalb der $CD4^+/CD3^+$ Population eine unterschiedliche Verteilung auf (Abb. 9.2 a).

Der Vergleich der CM T-Zellen zeigte keine Abweichung innerhalb der drei Tiergruppen, wogegen der Anteil der EM T-Zellen mit 31,0% ± 2,7% an der $CD4^+/CD3^+$ Population in Ret-tg tu Mäusen signifikant (p<0,0001) geringer war als in Ret-tg (50,2% ± 1,2%) und C57Bl/6 wt (51,4% ± 1,6%) Tieren (vergleiche Abb. 9.2 a).

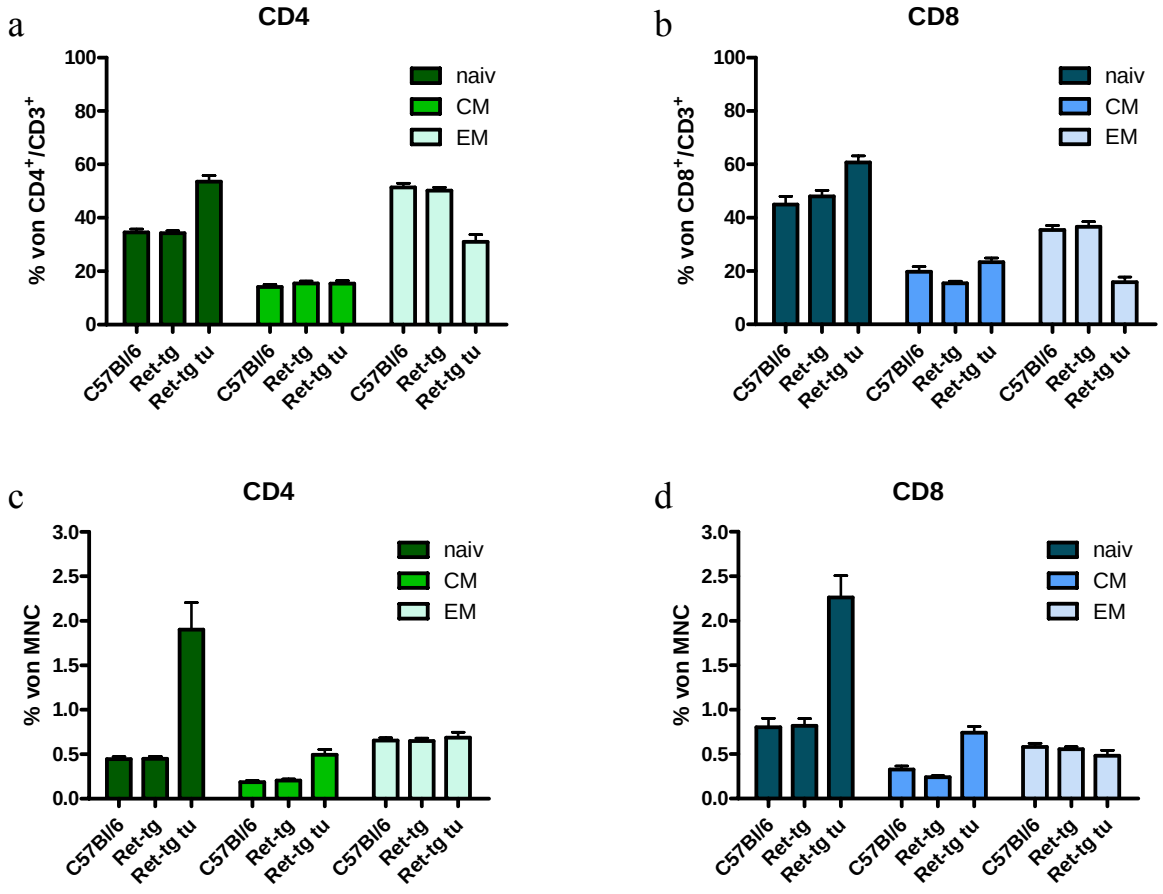

Abb. 9.2 *$CD4^+$ (a,c) und $CD8^+$ (b,d) Gedächtnis T-Zellen aus dem Knochenmark von C57Bl/6 (n=17), Ret-tg (n=33) und Ret-tg tu Mäusen (n=44)*

Im Schnitt waren 53,5% ± 2,4% der $CD4^+/CD3^+$ T-Zellen in Tumor tragenden Mäusen naiv, wogegen es in C57Bl/6 wt Mäusen 34,5% ± 1,3% und Ret-tg Tieren 34,2% ± 0,9% waren. Dabei war der erhöhte Anteil an naiven $CD4^+$ T-Zellen in Ret-tg tu Mäusen im Vergleich zu Ret-tg und C57Bl/6 wt statistisch signifikant (p<0,0001). Effektor T-Zellen wurden nicht gesondert betrachtet und daher mit den naiven T-Zellen unter „naiv“ zusammengefasst, da der Fokus in dieser Arbeit auf den Gedächtnis T-Zellen lag.

Ein vergleichbares Bild zeigte sich innerhalb der $CD8^+/CD3^+$ Population, wo in Ret-tg tu Tieren ebenfalls ein signifikanter Verlust von EM T-Zellen zu verzeichnen war (Ret-tg tu 15,8% ± 2,0%; Ret-tg 36,6% ± 1,9%; C57Bl/6 wt 35,3% ± 1,8%; $p<0,0001$) und mit 60,7% ± 2,5% ein signifikant erhöhter Anteil an naiven T-Zellen (Ret-tg 48,0% ± 2,2%; C57Bl/6 wt 45,0% ± 3,1%; $p<0,0005$; Abb. 9.2 b).

Diese Darstellung legte auf den ersten Blick die Vermutung nahe, dass an Tumor erkrankte Tiere im Knochenmark weniger Gedächtnis T-Zellen hatten als die beiden anderen Mausgruppen und dies zurückzuführen war, auf den Verlust von EM T-Zellen.

Setzte man aber den prozentualen Anteil der Subpopulationen in Relation zur gesamten Population der MNC, so ergab sich ein vollständig anderes Bild (siehe Abb. 9.2 c und d).

Im Unterschied zu dem vermuteten Verlust von $CD4^+$ EM T-Zellen, zeigte sich hier, dass deren tatsächliche Anzahl in den erkrankten Tieren sich nicht von den anderen beiden Gruppen unterschied (Abb 9.2 c). Dafür wiesen Ret-tg tu Tiere eine signifikant erhöhte Anzahl an $CD4^+$ CM T-Zellen im Knochenmark auf (0,49% ± 0,06%), im Vergleich zu Ret-tg und C57Bl/6 Tieren (0,21% ± 0,02%; 0,19% ± 0,02%; $p<0,005$). Die Anzahl an naiven $CD4^+$ T-Zellen war im Vergleich zu den anderen beiden Mausgruppen (Ret-tg 0,45% ± 0,03%; C57Bl/6 wt 0,45% ± 0,03%), in erkrankten Tieren drastisch erhöht (1,9% ± 0,31%; $p<0,005$).

Der prozentuale „Verlust“ an $CD4^+$ EM T-Zellen innerhalb der $CD4^+/CD3^+$ Population kam also durch eine tatsächliche Zunahme an naiven und CM T-Zellen zustande.

Dies galt auch für die $CD8^+$ Subpopulationen wie in Abb. 9.2 d dargestellt ist. Auch hier wurde in Ret-tg tu Mäusen eine tatsächliche Zunahme an CM (0,74% ± 0,07%) und naiven (2,26% ± 0,25%) T-Zellen festgestellt, im Vergleich zu Ret-tg Mäusen, die 0,24% ± 0,02% CM und 0,82% ± 0,08% naive T-Zellen aufwiesen, und C57Bl/6 wt Tieren mit 0,8% ± 0,1% naiven und 0,33% ± 0,04% CM T-Zellen. Die Differenz in der Anzahl der CM T-Zellen war statistisch signifikant ($p<0,001$).

Ein Vergleich der Verteilung von $CD4^+$ und $CD8^+$ Gedächtnis-Subpopulationen in Ret-tg tu Mäusen unterschiedlichen Phänotyps zeigte keine Unterschiede im Knochenmark, hatte sich ein Tumor erstmal etabliert. Auch eine Korrelation mit dem Tumorstadium, das anhand des gemessenen Tumorgewichts bestimmt wurde, konnte nicht beobachtet werden. Ebenfalls konnte keine Abhängigkeit im Bezug auf das Tumoralter nachgewiesen werden. Das Tumoralter ergab sich aus der Differenz in Tagen zwischen der Entdeckung des Tumors und der vorgenommenen Messung der T-Lymphozyten im Knochenmark. Auch das Alter der Mäuse spielte keine Rolle (Daten nicht gezeigt).

9.2 Gedächtnis T-Zellen in der Milz

Der Trend, der sich im Knochenmark (siehe Kap. 9.1) gezeigt hatte, konnte auch in der Milz beobachtet werden. Der Vergleich der einzelnen T-Zell Untergruppen innerhalb der $CD4^+/CD3^+$ Population (Abb 9.3 a) zeigte in Ret-tg tu Mäusen einen tendenziellen ($p<0{,}08$) Anstieg des Anteils der CM T-Zellen (21,3% ± 1,6% im Vergleich mit Ret-tg 16,7% ± 0,9% und C57Bl/6 wt 17,0% ± 0,8%) und gleichzeitig einen leichten, nicht signifikanten Rückgang der EM T-Zellen (Ret-tg tu 18,1% ± 1,6%; Ret-tg 22,9% ± 2,2% und C57Bl/6 wt 21,8% ± 2,0%; $p=0{,}15$).

Der Anteil der CM und EM Gedächtnis T-Zellen an der $CD8^+/CD3^+$ Population reduzierte sich signifikant ($p<0{,}0005$) gegenüber den beiden anderen Mausgruppen (Abb 9.3 b). CM T-Zellen machten nur noch 18,4% ± 0,9% der parentalen Population aus im Vergleich zu 24,5% ± 1,1% (Ret-tg) und 26,4% ± 0,8% (C57Bl/6 wt).

Der Anteil an EM T-Zellen war mit 5,2 % ± 0,6% (Ret-tg tu) gegenüber 10,6% ± 1,5% (Ret-tg) und 8,9% ± 0,8% (C57Bl/6 wt) ebenfalls signifikant ($p<0{,}002$) reduziert.

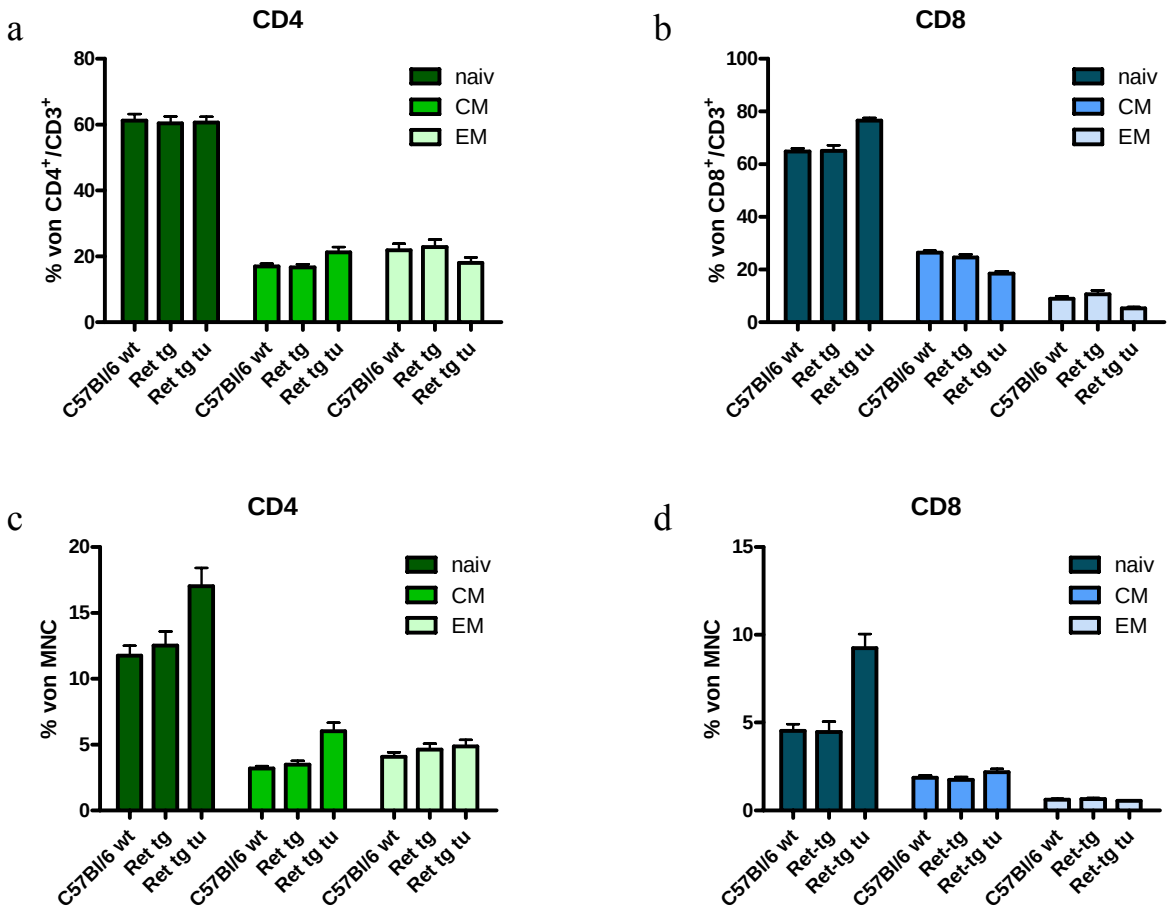

Abb. 9.3 *$CD4^+$ (a,c) und $CD8^+$ (b,d) Gedächtnis T-Zellen aus der Milz von C57Bl/6 (n=10), Ret-tg (n=9) und Ret-tg tu Mäusen (n=20)*

In Relation zur Gesamtpopulation der MNC gesehen, ergab sich wie schon im Knochenmark (siehe Kap. 9.1) für die T-Zellen der jeweiligen Subpopulationen ein anderes Bild. So gab es einen tatsächlichen Anstieg der Zellzahl naiver und CM $CD4^+$, als auch $CD8^+$ T-Zellen in Ret-tg tu Tieren, wogegen die Zahl der EM T-Zellen weitgehend konstant blieb (Abb. 0.3 c und d). Bei den $CD4^+$ T-Zellen war die Zunahme von CM mit 6,0% ± 0,6% im Vergleich zu 3,5% ± 0,3% (Ret-tg) und 3,2% ± 0,16% (C57Bl/6 wt) statistisch signifikant ($p<0,05$), wogegen bei den $CD8^+$ CM T-Zellen (Ret-tg tu 2,2% ± 0,2%, Ret-tg 1,7% ± 0,2% und C57Bl/6 wt 1,9% ± 0,15%) keine signifikante Zunahme zu beobachten war ($p=0,15$).
Wie schon im Knochenmark konnte keine Korrelation mit dem Phänotyp, dem Tumorstadium, Tumoralter oder Mausalter nachgewiesen werden.

9.3 Gedächtnis T-Zellen im Tumor von Ret-tg Tumor tragenden Mäusen

In der folgenden Analyse sollte zunächst die Verteilung der Gedächtnis T-Zell Subpopulationen innerhalb des Tumors untersucht und dann mit der in den bereits gezeigten Organen von Ret-tg tu Mäusen (Abb. 9.2 a,b und Abb.9.3 a,b) verglichen werden.
Wie Abb. 9.4 a zeigt, war der Anteil an $CD4^+$ EM T-Zellen mit 27,9% ± 5,7% im Tumor signifikant ($p<0,02$) höher, als der an CM T-Zellen (12,6% ± 1,5%) und entsprach damit ungefähr der Verteilung im Knochenmark (EM 31,0% ± 2,7% und CM 15,4% ± 1,0%). In der Milz lag der Anteil an $CD4^+$ CM (21,3% ± 1,6%) und EM T-Zellen (18,1% ± 1,6%) im gleichen Bereich.

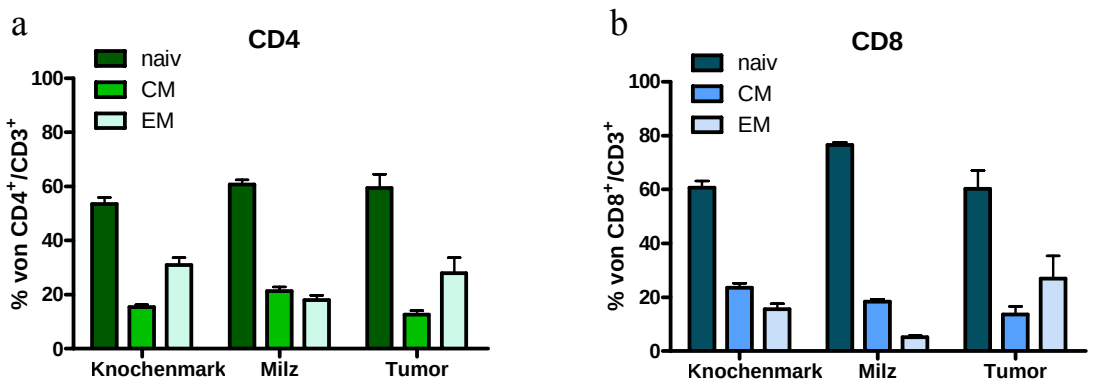

Abb. 9.4 *Vergleich von $CD4^+$ (a) und $CD8^+$ (b) Gedächtnis T-Zellen im Tumor mit denen in den lymphatischen Organen aus Ret-tg tu Mäusen (n=9)*

Im Tumor war die Verteilung der $CD8^+/CD3^+$ Subpopulationen analog zu der Verteilung innerhalb der $CD4^+/CD3^+$ Population. Die EM T-Zellen machten 26,4% ± 8,4% und die CM T-Zellen 13,6% ± 3,0% der $CD8^+/CD3^+$ Gesamtpopulation aus, wobei die Abweichungen in den Werten der EM T-Zellen so groß waren, dass keine statistische Signifikanz erreicht wurde (p=0,15). Trotzdem scheint es, dass sowohl $CD4^+$ EM, als auch $CD8^+$ EM im Tumor den größeren Teil der Gedächtnis T-Zellen stellten.
Bei den $CD8^+$ Gedächtnis T-Zellen in der Milz (Abb. 9.4 b) war der Anteil an CM T-Zellen (18,4% ± 0,9%) im Vergleich zu EM T-Zellen (5,2% ± 0,6%) signifikant (p<0,0001) erhöht. Im Knochenmark machten im Unterschied zur $CD4^+/CD3^+$ Population die CM T-Zellen (23,5% ± 1,8%) den signifikant (p<0,006) größeren Teil der $CD8^+$ Gedächtnis T-Zellen aus. Die EM T-Zellen kamen auf 15,6% ± 2,0%.
In den Tumoren gab es keine Korrelation der Gedächtnis T-Zell-Verteilung mit dem Phänotyp der Mäuse, dem Tumorstadium, dem Tumoralter oder dem Mausalter.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass Ret-tg tu Mäuse im Vergleich mit Ret-tg Tieren und C57Bl/6 wt Mäusen sowohl im Knochenmark als auch in der Milz eine erhöhte Anzahl an CM T-Zellen innerhalb der MNC Population aufwiesen.
Weiterhin wurde gezeigt, dass anteilig mehr EM T-Zellen in den Tumor einwanderten, als CM T Zellen.

10. TRP-2 spezifische Gedächtnis T-Zellen in Ret-tg Mäusen

In folgenden Experimenten sollte geklärt werden, ob im Knochenmark von Ret-tg Mäusen Melanomantigen-spezifische T-Zellen gefunden werden können, ob sie in den Tumor einwandern und welchen Phänotyp diese spezifischen T-Zellen aufweisen.
Da bereits durch immunhistochemische Färbung (siehe Abb. 8.1) nachgewiesen werden konnte, dass TRP-2 in den Tumoren von Ret-tg tu Mäusen exprimiert wird, konzentrierten sich die nachfolgenden Experimente auf den Nachweis TRP-2-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen im Knochenmark, dem Tumor und der Milz von Ret-tg tu und Ret-tg Mäusen. Um den Phänotyp dieser T-Zellen zu bestimmen, wurden in der Durchflusszytometrie zusätzlich Antikörper gegen CD8, CD3 und CD44 eingesetzt. Damit konnte bestimmt werden, ob es sich bei den Tetramer positiven Zellen um $CD8^+$ Gedächtnis T-Zellen handelte.

Es wurde weiterhin in ausgewählten Experimenten mit Hilfe von anti-CD62L Antikörpern der Anteil der Subpopulationen CM und EM bestimmt.

Die Gating Strategie bei der Analyse der gemessenen Daten basierte auf der unter 8 beschriebenen Vorgehensweise. Das erste Gate im FSC / SSC beinhaltete die MNC, das zweite wurde auf die $CD8^+/CD3^+$ Population gelegt und diese anschließend im Dot Plot CD8 gegen TRP-2 Tetramer dargestellt. Hier wurde dann, sofern vorhanden, die Population der $CD8^+$/TRP-2 spezifischen T-Zellen ausgewählt und der SSC gegen CD44 (4-Farben - Färbung), oder CD44 gegen CD62L (5-Farben - Färbung) aufgetragen (vergleiche Abb. 10.1).

10.1 TRP-2 spezifische Gedächtnis T-Zellen im Knochenmark von Ret-tg tu Mäusen

Abb. 10.1 a zeigt die TRP-2 Tetramer Färbungen im Knochenmark einer repräsentativen Ret-tg tu Maus und einer C57Bl/6 wt Maus, die als Negativkontrolle diente. In der Ret-tg tu Maus war eine deutliche Population an $CD8^+$/TRP-2 spezifischen Zellen zu finden.

Dies bestätigte sich auch im Vergleich mit der gezeigten C57Bl/6 wt Maus, bei der keine $CD8^+$ T-Zelle das TRP-2 Tetramer gebunden hatte. Im gezeigten Beispiel exprimiert ein Großteil der TRP-2-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen CD44 sehr hoch und zeigt damit einen Gedächtnis Phänotyp.

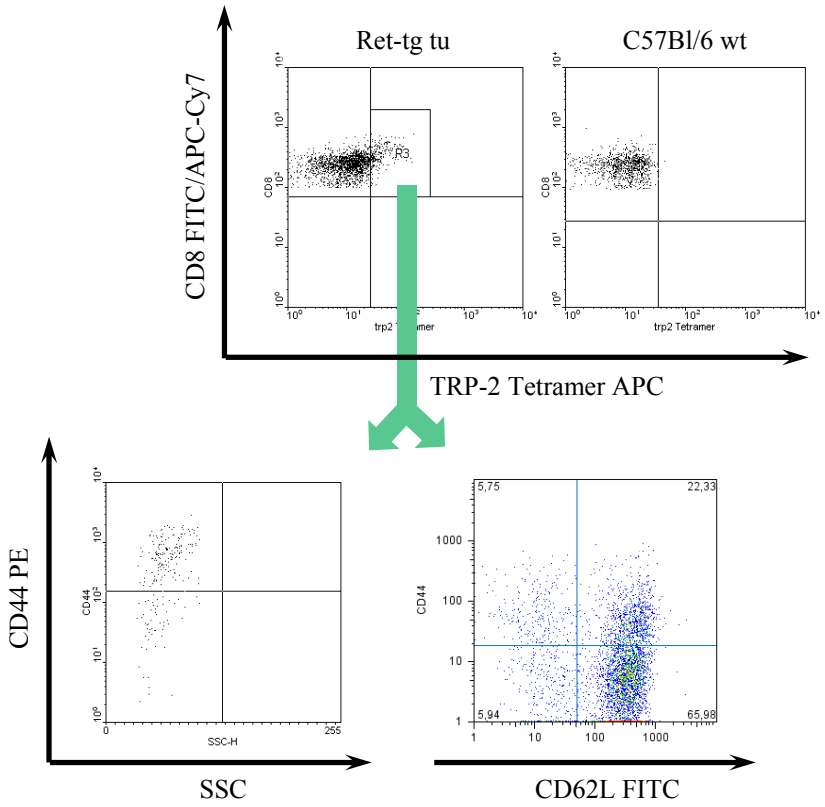

Abb. 10.1 *Gating-Strategie für TRP-2-spezifische Gedächtnis T-Zellen*

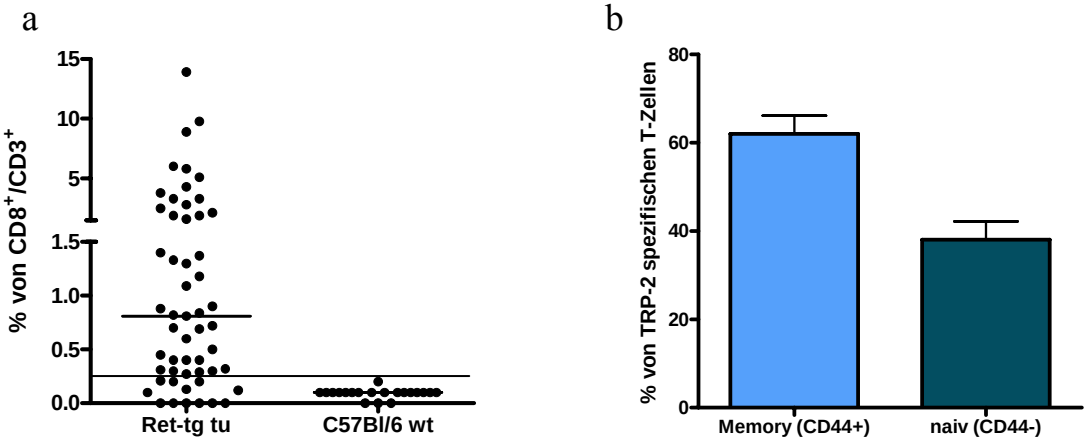

Abb. 10.2 *TRP-2-spezifische T-Zellen im Knochenmark von Ret-tg tu (a) n=55, (b) n=25 und C57Bl/6 wt Mäusen (n=20)*

In 80% der untersuchten Ret-tg tu Mäuse konnten TRP-2-spezifische $CD8^+$ T-Zellen nachgewiesen werden, wobei der prozentuelle Anteil der spezifischen Zellen an der gesamten $CD8^+$ Population zwischen 0,21% und 13,9% und der Median bei 0,8% lag. Wie bereits unter 7.2.2.1 beschrieben, wurden alle Werte unter 0,2% als Hintergrund betrachtet, da dies der höchste gemessene Wert aus 20 C57Bl/6 wt Mäusen war (vergleiche Abb. 10.2 a).
Im Durchschnitt zeigten 62% ± 4,1% der TRP-2-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen einen Gedächtnis Phänotyp (Abb. 10.2 b), was im Vergleich zum naiven Phänotyp eine statistisch signifikante Mehrheit darstellte ($p<0,0005$).

Die Analyse der TRP-2-spezifischen T-Zellen im Knochenmark mit Hilfe einer 5-Farben FACS Färbung konnte aufdecken, dass die signifikante ($p<0,0001$) Mehrheit der $CD44^+$ Gedächtnis T-Zellen CD62L negativ war (42,8% ± 3,8%) und damit einen EM Phänotyp aufwies (Abb. 10.3). Im Vergleich zur gesamten $CD8^+/CD3^+$ Population in der die EM T-Zellen 15,6% ± 2,0% ausmachten, war der größere Anteil dieser Subpopulation innerhalb der TRP-2-spezifischen Zellen ebenfalls statistisch signifikant ($p<0,0001$).

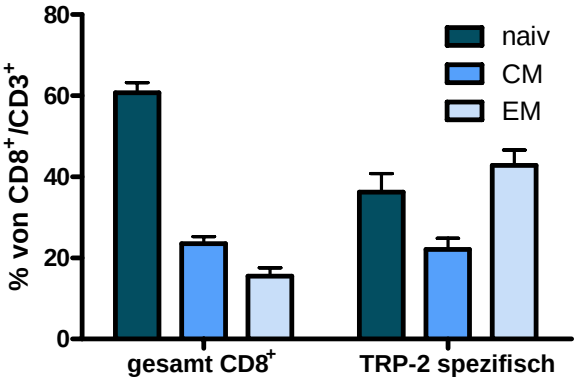

Abb. 10.3 *Vergleich der $CD8^+$ Subpopulationen von TRP-2-spezifischen Gedächtnis T-Zellen (n=20) mit denen der gesamten $CD8^+$ Population (n=38)*

Der Anteil an CM T-Zellen blieb in beiden Populationen etwa gleich ($CD8^+$/TRP-2-spezifisch 22,1% ± 2,7%, $CD8^+$ gesamt 23,5% ± 1,8%) wogegen der Anteil an naiven Zellen innerhalb der spezifischen Population signifikant (p<0,0001) reduziert war (Vergleiche Abb. 10.3).
Eine Korrelation der Anzahl TRP-2-spezifischer Gedächtnis T-Zellen im Knochenmark von Ret-tg tu Mäusen mit dem Phänotyp, Tumorstadium, Tumoralter oder Mausalter gab es nicht.

10.2 TRP-2 spezifische Gedächtnis T-Zellen im Knochenmark von Ret-tg tumorfreien Mäusen

Im folgenden Experiment sollte getestet werden, ob im Knochenmark von Ret-tg Mäusen die makroskopisch tumorfrei waren ebenfalls TRP-2-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden konnten. Zunächst wurden 100 Ret-tg Mäuse im Alter von 5-19 Wochen untersucht, bei denen allerdings in keinem Fall TRP-2-spezifische T-Zellen detektierbar waren.
Erst ab einem Alter von 20 Wochen konnten diese Zellen in 43% der Ret-tg Mäuse nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil der spezifischen Zellen an der gesamten $CD8^+$ Population lag zwischen 0,7% und 6,9% (Abb.10.4 a).

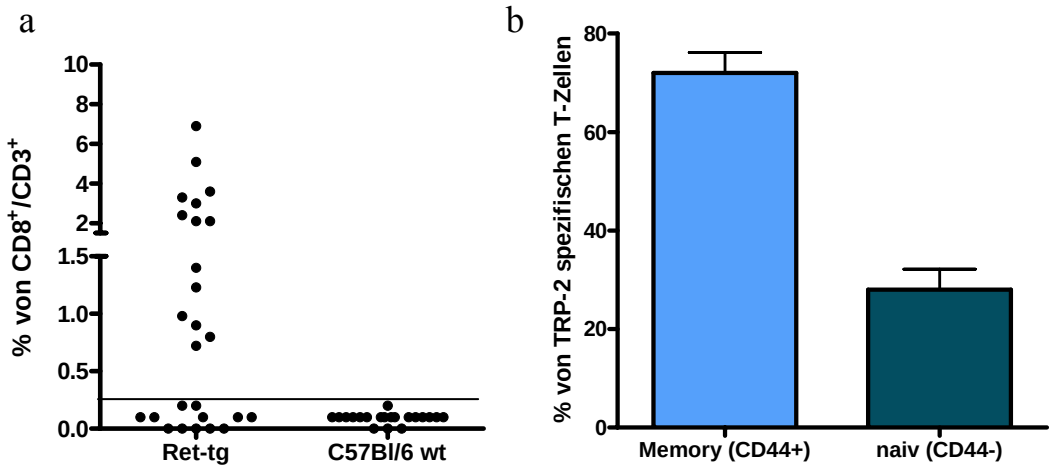

Abb. 10.4 *Frequenz (a) und Verteilung (b) TRP-2-spezifischer T-Zellen im Knochenmark von Ret-tg (n=26) und C57Bl/6 wt Mäusen (n=20)*

Im Durchschnitt zeigten 72% ± 4,2% der TRP-2 spezifischen $CD8^+$ T-Zellen einen Gedächtnis Phänotyp (Abb. 10.4 b), was bei insgesamt 14 gemessenen Mäusen, im Vergleich zum naiven Phänotyp eine statistisch signifikante Mehrheit darstellte (p<0,0001).

Die Analyse des jeweiligen Anteils der Subpopulationen von TRP-2- spezifischen $CD8^+$ T-Zellen zeigte wie schon in Ret-tg tu Tieren einen signifikant höheren Anteil ($p<0,05$) an EM T-Zellen (51,9% ± 3,4%) im Vergleich zur $CD8^+/CD3^+$ Gesamt-population (38,7% ± 2%; Abb. 10.5). Ebenfalls signifikant erhöht ($p<0,0001$) war der Anteil der CM T-Zellen, der in TRP-2 spezifischen $CD8^+$ T-Zellen 26,5% ± 4,1% ausmachte, und in der $CD8^+/CD3^+$ Gesamtpopulation 14,6% ± 0,8% (Abb. 11.5). Dagegen waren die naiven T-Zellen mit 21,6% ± 6,7% (TRP-2 spezifisch) gegen 46,8% ± 2,1% ($CD8^+/CD3^+$) signifikant reduziert ($p<0,0005$).

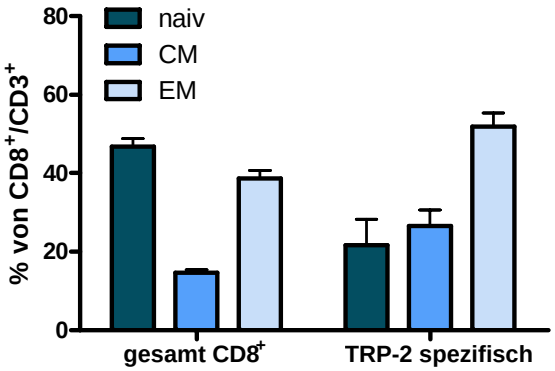

Abb. 10.5 *Vergleich der $CD8^+$ Subpopulationen von TRP-2-spezifischen Gedächtnis T-Zellen (n=5) mit denen der gesamten $CD8^+$ Population (n=38)*

10.3 Tumor infiltrierende TRP-2-spezifische Gedächtnis T-Zellen in Ret-tg tu Mäusen

Auch in den Tumoren von Ret-tg tu Mäusen konnten mit Hilfe der Durchflusszytometrie TRP-2-spezifische T-Zellen detektiert werden. 68% der untersuchten Tumoren waren hier positiv. Der prozentuelle Anteil der spezifischen Zellen an der gesamten $CD8^+$ Population lag zwischen 0,26% und 12,5% (siehe Abb. 10.6 a).

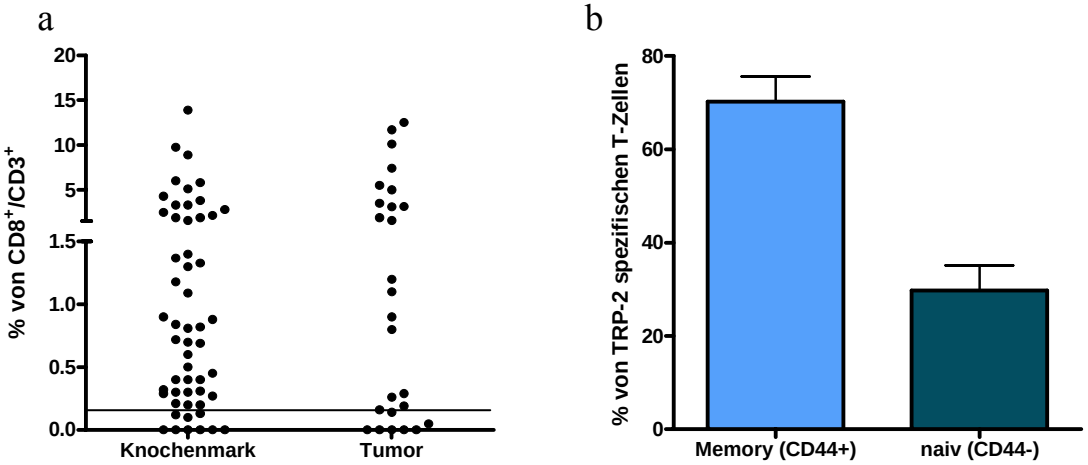

Abb. 10.6 *TRP-2-spezifische Gedächtnis T-Zellen im Vergleich zwischen Knochenmark und Tumor (a). Anteil der Gedächtnis T-Zellen an der TRP-2-spezifischen Population im Tumor (b)*

Im Durchschnitt zeigten 70,2% ± 5,4% der TRP-2-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen einen Gedächtnis Phänotyp (Abb. 10.6 b), was bei insgesamt 18 gemessenen Mäusen im Vergleich zum naiven Phänotyp eine statistisch signifikante Mehrheit darstellte ($p<0,0001$).

TRP-2-spezifische $CD8^+$ T-Zellen im Tumor hatten zu 53% ± 10,9 einen EM Phänotyp, was im Vergleich zur $CD8^+/CD3^+$ Gesamtpopulation mit 26,9% ± 8,4 EM T-Zellen eine statistisch signifikante Erhöhung darstellte ($p<0,05$). Ebenfalls statistisch signifikant ($p<0,05$) war der deutlich reduzierte Anteil an TRP-2-spezifischen CM T-Zellen im Tumor, der nur 2,7% ± 1,8 der spezifischen $CD8^+/CD3^+$ Population ausmachte, im Vergleich zu 13,6% ± 3 in der $CD8^+/CD3^+$ Gesamtpopulation (Abb. 10.7).

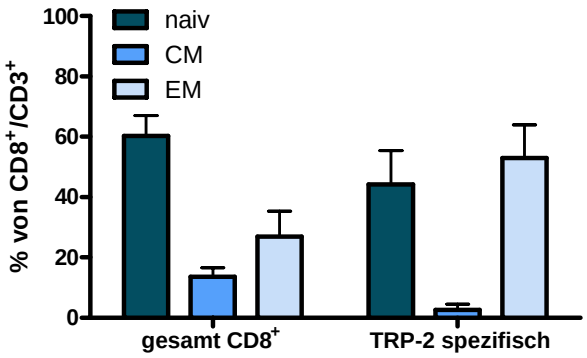

Abb. 10.7 *Vergleich der $CD8^+$ Subpopulationen von TRP-2-spezifischen Gedächtnis T-Zellen (n=8) mit denen der gesamten $CD8^+$ Population in Tumoren (n=9)*

Die Reduktion des Anteils an naiven T-Zellen mit 44,2% ± 11,2 (TRP-2-spezifisch) gegen 60,3% ± 6,7 ($CD8^+/CD3^+$) war nicht signifikant.

Wie schon zuvor gab es keine Abhängigkeit der Anzahl an TRP-2-spezifischen Gedächtnis T-Zellen mit Phänotyp der Mäuse, Tumorstadium, Tumoralter oder Mausalter.

10.4 TRP-2 spezifische Gedächtnis T-Zellen in der Milz von Ret-tg tu Mäusen

Auch in Milzen von Ret-tg tu Tieren konnten in 58% der untersuchten Tiere TRP-2-spezifische $CD8^+$ T-Zellen nachgewiesen werden. Der Anteil der spezifischen Zellen an der gesamten $CD8^+$ Population lag zwischen 0,22% und 0,77% (siehe Abb. 10.8 a).

Ein Vergleich der Mediane von TRP-2-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen im Knochenmark, Tumor und Milz von Ret-tg tu Mäusen zeigte, dass der Anteil an der $CD8^+/CD3^+$ Population in der Milz am geringsten war (0,26%) und damit in der Milz prozentual weniger TRP-2-spezifische Zellen zu finden waren, als im Tumor (1,2%) oder Knochenmark (0,81%; Abb 10.8 a).

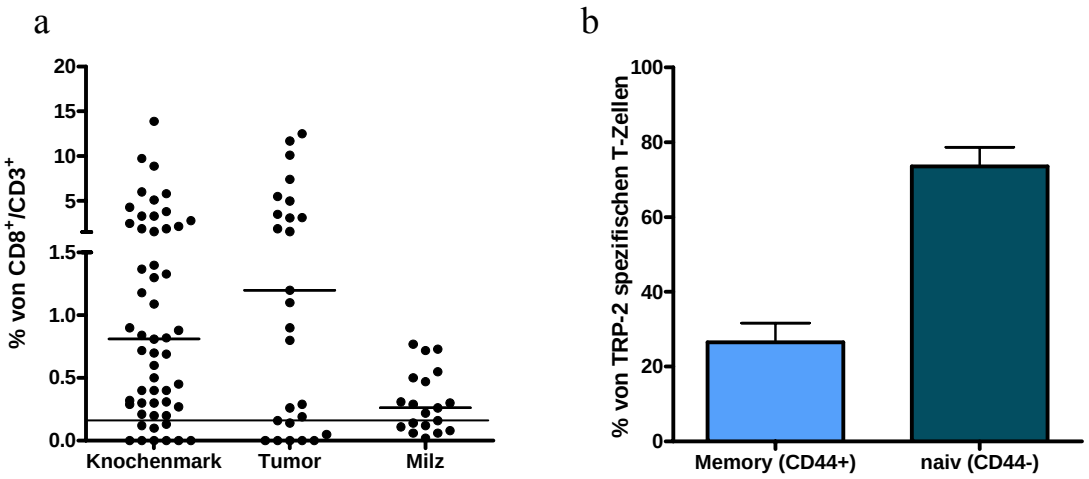

Abb. 10.8 *TRP-2-spezifische Gedächtnis T-Zellen im Vergleich zwischen Knochenmark, Tumor und Milz (a). Anteil der Gedächtnis T-Zellen an der TRP-2-spezifischen Population in der Milz (b)*

26,5% ± 5,2% der TRP-2-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen aus der Milz zeigten einen Gedächtnis Phänotyp (Abb. 10.8 b), was bei insgesamt 10 gemessenen Mäusen, im Vergleich zum naiven Phänotyp (73,5% ± 5,2%) eine statistisch signifikante Minderheit darstellte ($p<0,0001$). Dieses Ergebnis stand im Gegensatz zu den Beobachtungen im Knochenmark oder Tumor von Ret-tg tu Mäuse, wo TRP-2-spezifische $CD8^+$ T-Zellen mehrheitlich einen Gedächtnis Phänotyp aufwiesen (Vergleiche Abb. 10.2 b und Abb. 10.6 b).

Im Gegensatz zum Knochenmark (siehe Abb. 10.5) oder Tumor (Abb. 10.7) von Ret-tg tu Mäusen, ist in der Milz der Anteil an TRP-2-spezifischen CM T-Zellen (16% ± 1,7%) im Vergleich mit der $CD8^+$ Gesamt-population (10,9% ± 0,9%) signifikant erhöht ($p<0,02$; Abb. 10.9), wogegen es keine Unterschiede in den EM T-Zell Populationen gibt (TRP-2-spezifisch: 10,5% ± 3,8%; $CD8^+$ gesamt: 10,2% ± 2,4%; p=.0,9)

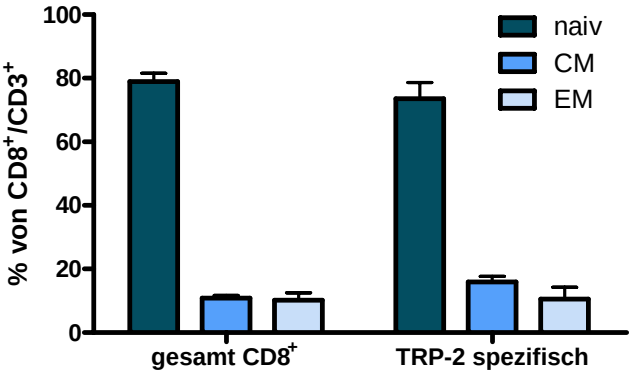

Abb. 10.9 *Vergleich der $CD8^+$ Subpopulationen von TRP-2 spezifischer Gedächtnis T-Zellen mit denen der gesamten $CD8^+$ Population in der Milz von Ret-tg tu Mäusen (n=10)*

<u>Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Ret-tg tu Mäuse Melanomantigen-spezifische $CD8^+$ T-Zellen generierten, im untersuchten Fall gegen TRP-2 gerichtet.</u>

Diese TRP-2- spezifischen T-Zellen konnten im Knochenmark, Tumor und Milz erkrankter Tiere nachgewiesen werden, wobei sie im Knochenmark und Tumor mehrheitlich einen EM Phänotyp aufwiesen und in der Milz größtenteils naiv waren.
TRP-2-spezifische $CD8^+$ T-Zellen konnten ebenfalls im Knochenmark von Ret-tg Tieren nachgewiesen werden, die keinen sichtbaren Tumor etabliert hatten und mindestens 20 Wochen alt waren.

11. Funktion von Gedächtnis T-Zellen

In diesem Kapitel sollte der Frage nachgegangen werden, ob die in Kapitel 10 im Knochenmark von Ret-tg und Ret-tg tu Mäusen gefundenen Melanomantigen-spezifischen Gedächtnis T-Zellen funktionsfähig sind. Hierfür wurden mit Lysat aus frisch isolierten Tumoren beladene Dendritische Zellen (DCs) mit T-Zellen aus dem Knochenmark von Ret-tg und Ret-tg tu Mäusen für 40h kultiviert (siehe 5.9). Diese kurze Zeit der Kokultur verhinderte, dass naive T-Zellen von den DCs stimuliert werden konnten. Aktiviert wurden nur bereits Melanomantigen-spezifische Gedächtnis T-Zellen.

11.1 Dendritische Zellen aus Knochenmark-Vorläuferzellen

Nachdem die dendritischen Zellen (DCs) aus dem Knochenmark von C57Bl/6 wt Mäusen 10 Tage lang kultiviert worden waren (siehe 5.8.1), wurde die Effizienz der Kultur mit Hilfe der Durchflußzytometrie überprüft. Zum Bestimmen des Anteils an DCs in der Kultur wurden Antikörper gegen die Oberflächenmarker CD11c und MHC-II verwendet, die von DCs exprimiert werden.
Um zu überprüfen, ob die generiertem DCs in der Lage sind T-Zellen zu stimulieren, wurde die Expression der für die Stimulation notwendigen kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 gemessen (Abb 11.1).

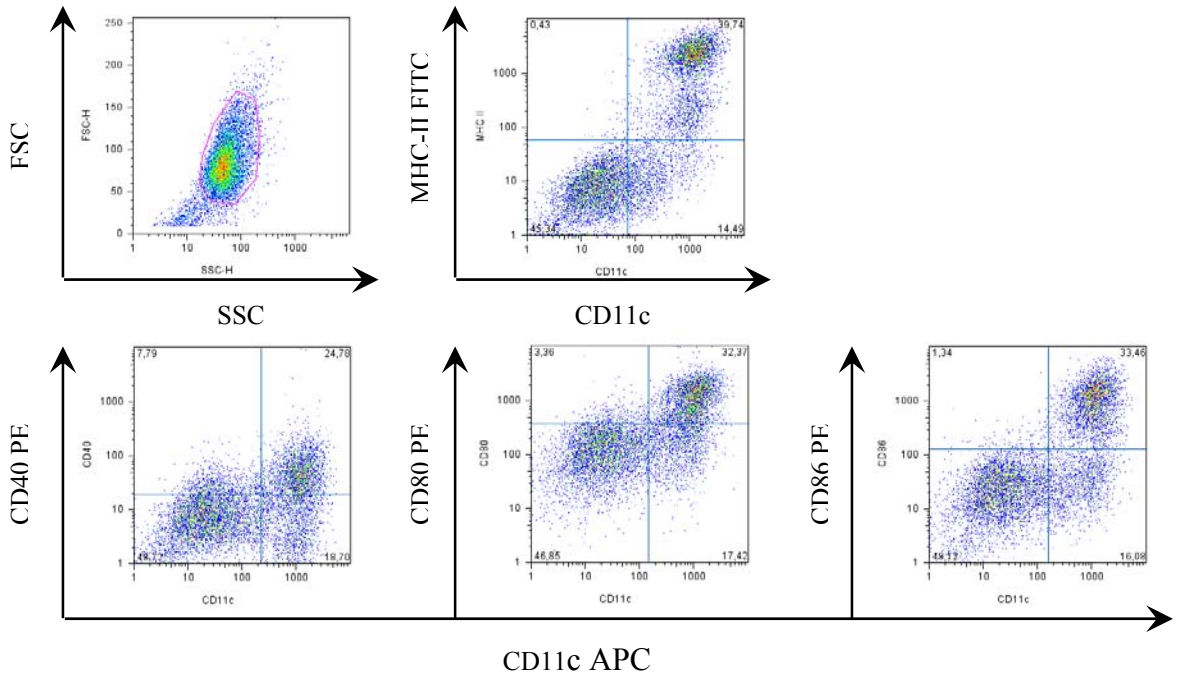

Abb. 11.1 *Expression der Oberflächenmoleküle CD11c, MHC-II, CD40 und CD86 auf DCs, die aus Knochenmark-Vorläuferzellen generiert wurden (Tag 10 nach Anlegen der Kultur*

Im gezeigten Beispiel (Abb. 11.1) waren nach 10 Tagen knapp 40% der Zellen in der Kultur doppelt positiv für CD11c und MHC-II, wobei diese Zellen CD11c sehr stark exprimierten. Diese Beobachtung wurde für die Analyse der anderen gemessenen Oberflächenmoleküle berücksichtigt und nur solche Zellen als reife DCs betrachtet, bei denen die Expression von CD11c entsprechend hoch war. 57% der DCs exprimierten CD40, 65% CD80 und 68% CD86. Damit exprimierte die Mehrheit der DCs Kostimulatorische Moleküle, die für die Aktivierung von T-Zellen wichtig sind.

Um den besten Zeitpunkt zu bestimmen, wann DCs am effektivsten mit Tumorlysat beladen werden konnten, wurde zunächst eine Kinetik durchgeführt, in der DCs an drei aufeinander folgenden Tagen mit FITC-Dextran beladen und die Effizienz der Aufnahme am FACS überprüft wurde.

Gleichzeitig wurden die Zellen auch mit anti-CD11c Antikörpern angefärbt, um den Reifungsgrad der DCs zu bestimmen. Gesucht wurde das ideale Verhältnis zwischen hoher Expression von CD11c und hoher Aufnahme Effizienz von FITC-Dextran.

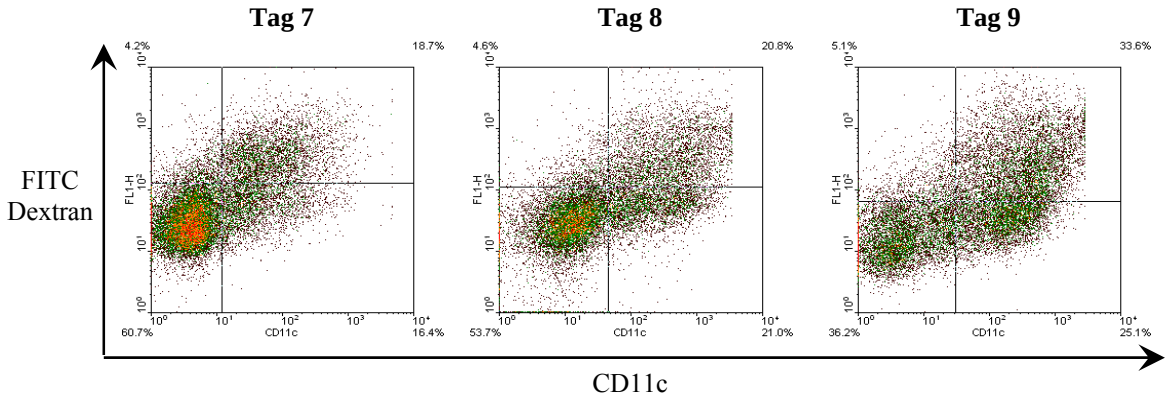

Abb. 11.2 *Aufnahme Effizienz von FITC Dextran durch DCs an Tag7, Tag8 und Tag 9 nach Anlegen einer DC Kultur aus Knochenmark Vorläuferzellen*

An Tag 7 waren 35% der Zellen in der Kultur CD11c positiv, wobei 53,3% dieser Zellen FITC-Dextran aufgenommen hatten (Abb. 11.2). An Tag 8 waren 41,8% der Zellen CD11c positiv und 49,8% der DCs mit FITC-Dextran beladen. An Tag 9 erhöhte sich der Prozentsatz von DCs in der Kultur noch einmal auf 58,7%, von denen 57,2% positiv für FITC-Dextran waren. Zusätzlich war an Tag 9 die Expression von CD11c am stärksten. Die höchste Aufnahme Effizienz und die höchste Expression von CD11c an Tag 9 sprach damit für die Beladung der DCs mit Tumorlysat an Tag 9 nach Ansetzen der DC Kultur (siehe 5.7.2).

11.2 Analyse von isolierten T-Zellen aus dem Knochenmark

Der T-Zell Anteil im Knochenmark von Tumor tragenden Tieren lag durchschnittlich bei 6-7% und war damit sehr niedrig. Die Gesamt-Zellzahlen im Knochenmark aus Femur und Tibia der beiden Hinterbeine einer Maus betrugen durchschnittlich $3x10^7$ Zellen. Die Zahl der T-Zellen pro Maus betrug demzufolge etwa $2x10^6$.

Um auf eine ausreichende Anzahl von T-Zellen für eine Kokultur mit DCs zu kommen, mussten die Zellen von mindestens 4 Mäusen vereint, und mit Hilfe einer T-Zell negativ Selektion angereichert werden (siehe 5.8). Um zu überprüfen, ob diese Anreicherung erfolgreich war, wurden die Zellen nach der Selektion im FACS auf ihre CD3 Expression hin überprüft (Abb. 11.3).

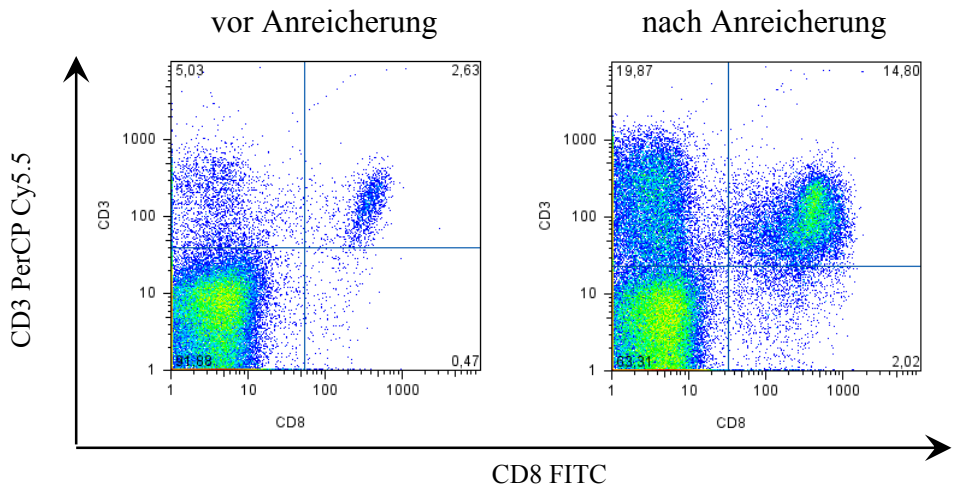

Abb. 11.3 *Anreicherung von T-Zellen aus dem Knochenmark mit Hilfe von negativer Selektion*

Mit Hilfe der Methode der negativen Selektion von T-Zellen, bei der ein Antikörpermix gegen einen Großteil aller nicht-T-Zellen eingesetzt wurde (Vergleiche 5.8.4), konnte der Anteil der T-Zellen aus dem Knochenmark der untersuchten Mäuse im gezeigten Beispiel von 7,7% auf 34,7% erhöht werden. Dies entspricht einer 4,5 fachen Anreicherung.

11.3 Funktionalität Melanomantigen-spezifischer T-Zellen aus Ret-tg tu Mäusen

Abb. 11.4 zeigt 6 unabhängige Experimente mit T-Zellen aus je 5 Ret-tg tu Mäusen (insgesamt 30 Mäuse).

Im Schnitt reagierten 120 ± 6 T-Zellen auf den Stimulus der beladenen DCs, wogegen unbeladene DCs einen Hintergrund von 87 ± 11 Zellen lieferten. Die Differenz zum Hintergrund war statistisch signifikant ($p<0,05$). Damit reagierten in diesen Mäusen 6,6 T-Zellen aus 10^5 spezifisch gegen melanomassoziierte Antigene.

Der Graph in Abb. 11.4 b zeigt 266 ± 7 IFN-γ Spots, was im Vergleich zur Negativkontrolle mit unbeladenen DCs (64 ± 6,5 Zellen) eine signifikante Mehrheit ($p<0,002$) darstellte.

Die Frequenz der aktivierbaren Melanomantigen-spezifischen Zellen im Knochenmark der untersuchten Tiere war in diesem Versuch 40,4 aus 10^5.

Abb. 11.4 c zeigte ebenfalls eine signifikant größere Mehrheit ($p<0,01$) Melanomantigen-spezifisch reagierender T-Zellen (73 ± 0,5), gegenüber der Kontrolle mit unbeladenen DCs (4 Spots ± 1). 13,8 aus 10^5 Zellen reagierten Melanomantigen-spezifisch.

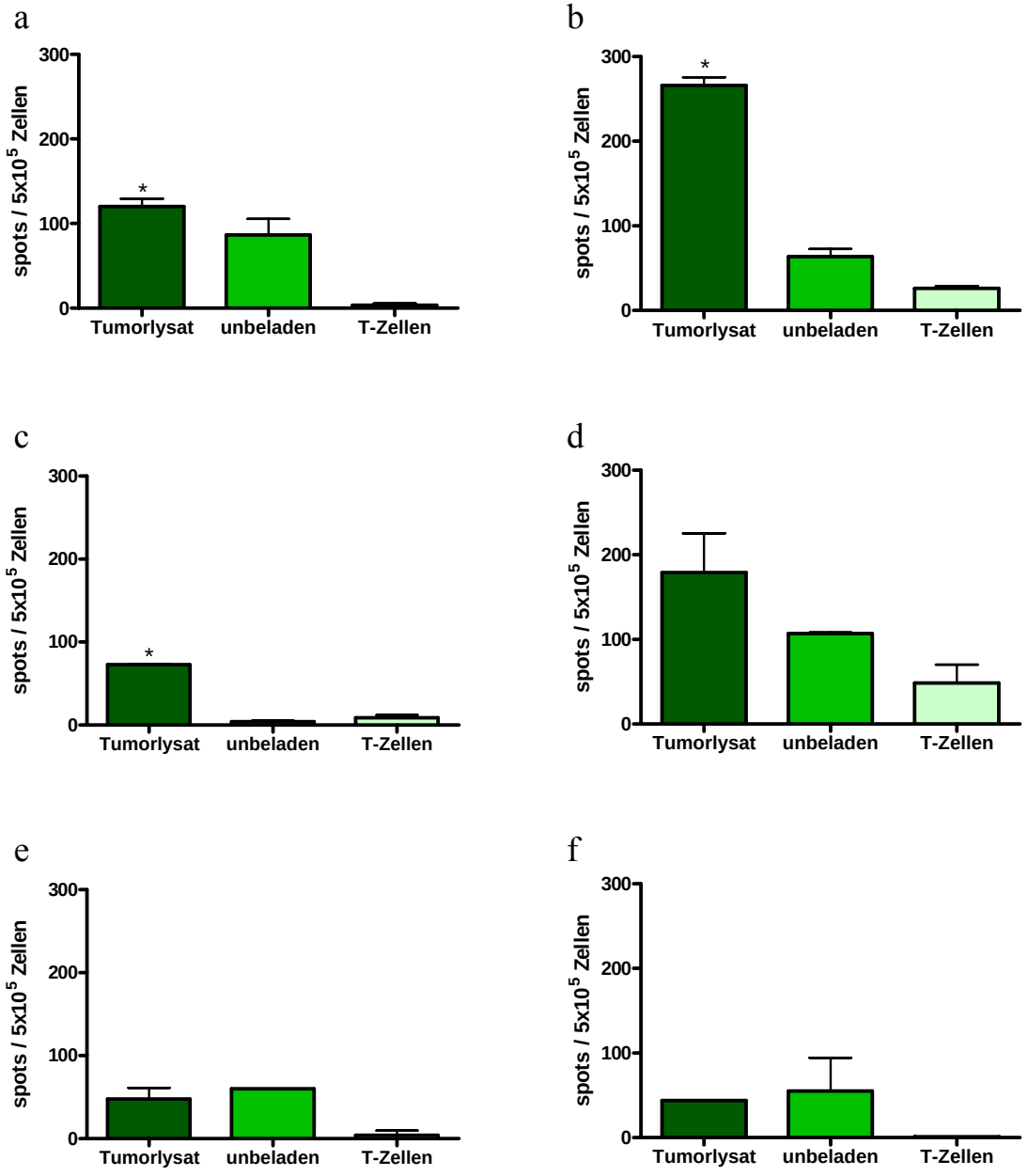

Abb. 11.4 *IFN-γ Produktion von T-Zellen aus dem Knochenmark von Ret-tg tu Mäusen nach Stimulation mit Tumorantigen beladenen DCs*
(a-c) Responder; (d-f) Nicht-Responder

Der Graph in Abb. 11.4 d zeigt, dass hier mit durchschnittlich 179 ± 33 Zellen nach Stimulation mit Tumor Antigen beladenen DCs, im Vergleich zu 107 Zellen nach Stimulation mit unbeladenen DCs tendenziell mehr Zellen zur Ausschüttung von IFN-γ angeregt wurden, diese Mehrheit aber nicht signifikant war ($p = 0,08$).

Abb 11.4 e und f zeigt zwei Versuche, in denen keine spezifisch-aktivierbaren Gedächtnis T-Zellen nachweisbar waren. Die Differenz in der Anzahl an IFN-γ produzierenden Zellen zwischen der Melanomantigen-spezifischen Stimulation und der Negativkontrolle mit unbeladenen DCs war nicht signifikant.

Von 6 durchgeführten Experimenten in der Gruppe Ret-tg tu Mäuse, konnte in 3 eine signifikante Reaktivierung von Tumorantigen-spezifischen T-Zellen nachgewiesen werden. In einem Experiment war eine Tendenz zu beobachten, die allerdings nicht signifikant war. Damit konnte gezeigt werden, dass im Knochenmark von mindestens 50% der Ret-tg tu Tiere Tumorantigen-spezifische Gedächtnis T-Zellen existierten, die *in vitro* reaktiviert werden konnten.

11.4 Kokultur von DCs mit T-Zellen aus dem Knochenmark Ret-tg Mäuse

Abb. 11.5 zeigt 6 unabhängige Experimente mit T-Zellen aus dem Knochenmark von je 5 Ret-tg Mäusen (insgesamt 30 Mäuse).

Abb. 11.5 a zeigt eine signifikante Mehrheit ($p<0,0005$) an T-Zellen (71 ± 0,5), die durch Stimulation mit Tumorantigen-beladenen DCs zur Produktion von IFN-γ angeregt werden konnten, verglichen mit der Stimulation durch unbeladene DCs (4,5 ± 1,5). Die Frequenz der aktivierbaren Gedächtnis T-Zellen in diesem Versuch war 13,2 von 100.000 Zellen.

Im zweiten Experiment (Abb. 11.5 b) konnte ebenfalls eine Tumorantigen-spezifische Stimulation nachgewiesen werden. Hier reagierten 97 Zellen ± 10,3 auf den Stimulus mit Tumor Antigen, was im Vergleich zu 29 Zellen ± 8,5 nach unspezifischer Stimulation eine signifikante Mehrheit darstellte ($p<0,01$). Bezogen auf 100.000 Zellen konnten 13,6 Melanomantigen-spezifische Gedächtnis T-Zellen zur Produktion von IFN-γ angeregt werden.

Die übrigen 4 Graphen (Abb. 11.5 c-f) zeigten keine Melanomantigen-spezifische Reaktivierung von Gedächtnis T-Zellen. Hier gab es keine signifikanten Differenzen in der Anzahl IFN-γ produzierender Zellen zwischen mit Tumorlysat beladenen DCs und unbeladenen DCs kokultivierten T-Zellen.

Von 6 durchgeführten Experimenten in der Gruppe der Tumor freien Ret-tg Mäuse, konnte in 2 eine signifikante Reaktivierung von Tumor Antigen spezifischen T-Zellen nachgewiesen werden. Damit hatten 33% der Tumor freien Tiere, die älter waren als 20 Wochen, Tumor spezifische Gedächtnis T-Zellen im Knochenmark, die *in vitro* reaktiviert werden konnten.

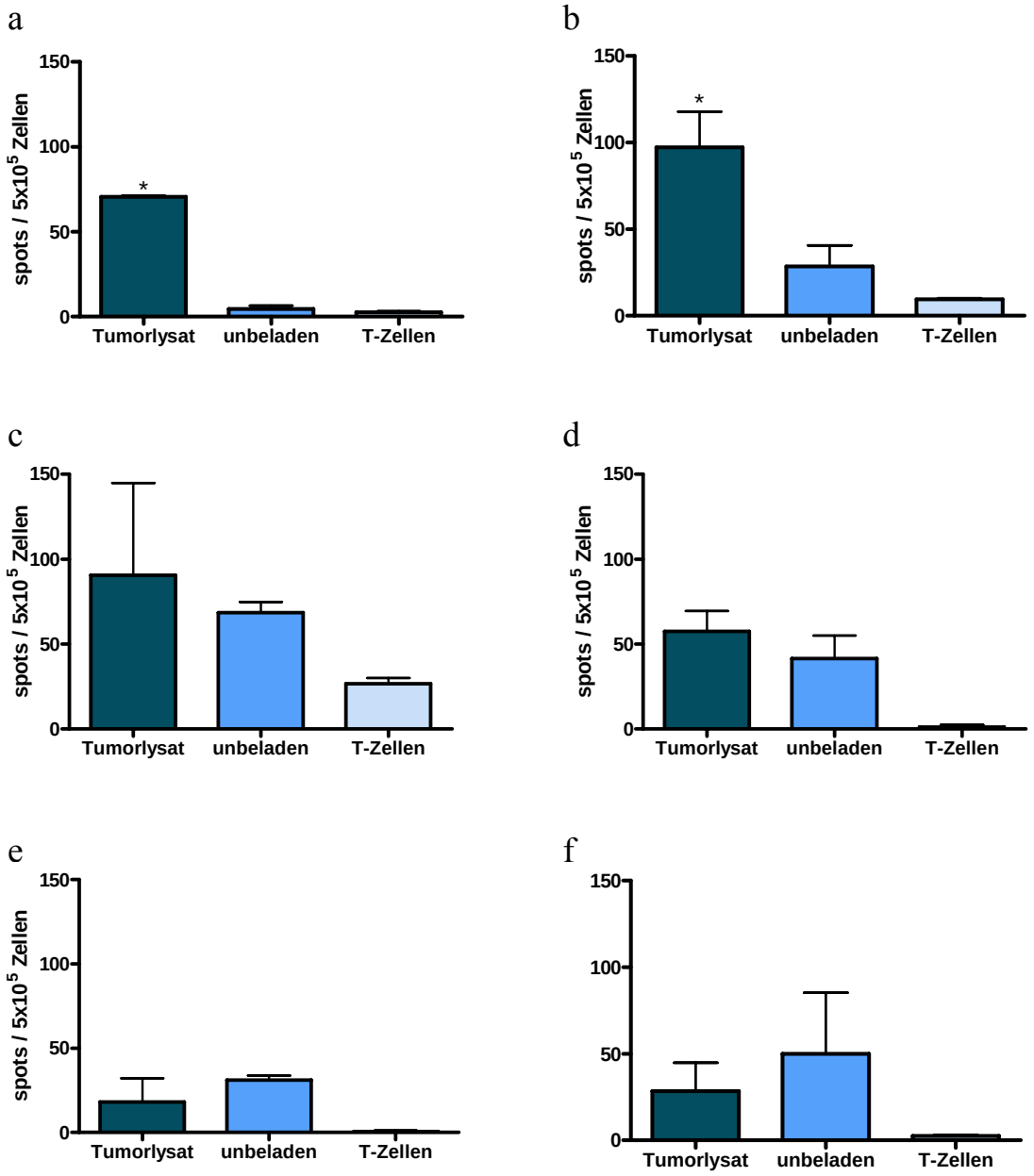

Abb. 11.5 *IFN-γ Produktion von T-Zellen aus dem Knochenmark von Ret-tg Mäusen nach Stimulation mit Tumor Antigen beladenen DCs*
(a,b) Responder; (c-f) Nicht-Responder

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die in 10.1 und 10.2 gefundenen Melanomantigen-spezifischen Gedächtnis T-Zellen im Knochenmark, sowohl aus Ret-tg tu, als auch aus Ret-tg Mäusen, *in vitro* zur Produktion von IFN-γ angeregt werden konnten und somit funktionsfähig waren.

V. Diskussion

12. Ret-tg Mäuse können Antigen-unspezifische und spezifische T-Zell-Antworten generieren

Das Ret Mausmodell wurde vor dieser Arbeit nie bezüglich immunologischer Funktionaltität, eventuell verursacht durch das eingefügte Ret-Gen, untersucht. Dies sollte hinsichtlich der T-Zell-Antwort im Zuge dieser Arbeit überprüft werden.

Die Produktion von IFN-γ und IL-2 von Milz T-Zellen aus Ret-tg Mäusen verlief nach unspezifischer Stimulation mit Concanavalin A (Con A) und auch anti-CD3/anti-CD28 Antikörpern ähnlich wie bei Zellen aus C57Bl/6 wt Mäusen (Kap. 7.1). Dabei war die Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28 Antikörpern zu jedem gemessenen Zeitpunkt ungefähr doppelt so effektiv, bezogen auf die Menge von IFN-γ und IL-2 im Medium, wie die Con A Stimulation. T-Zellen aus der Milz (Abb. 7.1), und T-Zellen aus den Lymphknoten (Abb. 7.2) reagierten mit gleichem Verlauf und gleicher Stärke auf die Stimulation. Auffällig bei den Ergebnissen war, dass T-Zellen aus Ret-tg Mäusen immer tendenziell stärker stimulierbar waren als T-Zellen aus C57Bl/6 wt Mäusen, was für eine allgemein erhöhte Aktivität des Immunsystems in Ret-tg Mäusen spricht.

Eine Stimulation von T-Zellen aus Milz und Lymphknoten von Ret-tg tu Tieren zeigte dagegen eine signifikant schwächere Aktivierbarkeit im Vergleich mit Ret-tg und C57Bl/6 wt Mäusen (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse korrelieren mit der bereits beschriebenen Anergie von T-Zellen in Melanompatienten (106, 171, 172). Die Stimulation von T-Zellen aus Melanompatienten und gesunden Donoren mit anti-CD3/anti-CD28 Antikörpern führte in Melanompatienten zu einer verminderten Expression von Aktivierungsmarkern wie CD69, CD25 und CD71, sowie einer verringerten Produktion an IL-2 und IFN-γ, womit die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konform gehen (172).

Die Immunisierung mit dem starken Modellantigen Ovalbumin führte in Ret-tg Mäusen zu einer vergleichsweise stärkeren Reaktion auf das Fremdantigen, als in C57Bl/6 wt Mäusen. Das konnte einerseits in der Färbung mit K^b/SIINFEKL Tetrameren zur Identifizierung Ova-spezifischer T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 7.4) und zeigte sich andererseits auch in der etwa doppelt höheren Frequenz funktionaler T-Zellen im ELISPOT Assay (Abb. 8.5). Diese Resultate stützten die Ergebnisse der unspezifischen Stimulation, wo die T-Zellen aus

Ret-tg Tieren gleichfalls reaktiver waren und unterstrichen zusätzlich die These, dass das Immunsystem in Ret-tg Mäusen verstärkt aktiv ist, oder zumindest in „Alarmbereitschaft“ steht.
Im Gegensatz dazu standen die Ergebnisse nach einer Immunisierung mit dem Melanom-assoziierten Antigen TRP-2. Hier zeigten Ret-tg Mäuse sowohl in der Tetramerfärbung als auch im ELISPOT etwa die Hälfte funktionaler TRP-2-spezifischer T-Zellen, als C57Bl/6 wt Mäuse (Abb. 7.6 und 7.7).
Zusammengefasst ließ sich zeigen, dass die T-Zell-Antwort in Ret-tg Mäusen durch das Ret-tg nicht beeinträchtigt wurde.

13. Tumorentwicklung in Ret-tg Mäusen

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass es drei verschiedene Subgruppen an Ret-tg Mäusen gibt, die sich phänotypisch anhand der Hautfarbe unterscheiden lassen. Diese phänotypischen Unterschiede wurden zuvor nicht beschrieben, weder von den Entwicklern des Ret-tg Mausmodells (153) noch von anderen Arbeitsgruppen, die mit diesem Mausmodell arbeiten (173). Die Erklärung für diese Diskrepanz zwischen der vorliegenden Arbeit und den vorangegangenen Arbeiten anderer Gruppen liegt nicht darin, dass diese Gruppen die phänotypischen Unterschiede unterschlagen hätten, sondern vielmehr in deren Typisierungsmethode. Neugeborene Tiere lassen sich phänotypisch anhand der Hautfarbe sehr gut voneinander unterscheiden. Dabei sind Tiere mit schwarzer Haut immer transgen und lassen sich zuverlässig aussortieren. Mit dieser Sortierungsmethode spart man sich einerseits zwar eine genotypische Typisierung, schließt aber andererseits transgene Tiere mit einer hellen Haut von weitergehenden Untersuchungen aus.

19% der in dieser Arbeit verwendeten Ret-tg Mäuse entwickelten im Laufe ihres Lebens einen oder mehrere Tumoren. Die in der Literatur beschriebene Tumorinzidenz dieses Mausstamms liegt dem widersprechend bei 65% (153, 173). Mäuse mit einem schwarzen Phänotyp zeigten eine Tumorinzidenz von 97%, was deutlich über den angegebenen Literaturwerten liegt. Die drei Ret-tg nach Phänotyp unterteilten Mausgruppen unterschieden sich in ihrer Tumorinzidenz und Entwicklungsgeschwindigkeit stark voneinander (Abb. 8.2). Tiere mit schwarzem Phänotyp zeigten die aggressivste Tumorentwicklung, wogegen der hellhäutige Phänotyp nur in sehr seltenen Fällen und vergleichsweise langsam einen Tumor

entwickelte. Die Ursache dieses Phänomens konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden. Eine unterschiedlich starke Expression des Ret-Proteins in melanintragenden Zellen innerhalb der einzelnen phänotypisch ungleichen Gruppen könnte hierbei eine Rolle spielen. Hinsichtlich der immunologischen Untersuchungen konnten allerdings keine Abweichungen zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden.

Die immunhistologische Untersuchung von Tumoren aus Ret-tg Mäusen aller Phänotypen zeigte eine gute Expression melanomassoziierter Antigene wie TRP-1, TRP-2, Tyrosinase und gp100, die auch im humanen Melanom exprimiert werden (100). Die Metastasenverteilung stimmte ebenfalls gut mit der im humanen System überein, wo zunächst die lokalen Lymphknoten befallen werden und dann Metastasen vor allem in Lunge, Leber und Gehirn einwandern (70).

Prevost-Blondel et al. (173) beschrieben eine spontane T-Zell vermittelte Immunreaktion gegen Melanozyten der Haut in Ret-tg Mäusen, in deren Folge eine Entwicklung von Vitiligo zu beobachten war. Eine solche Immunreaktion zeigten die in dieser Arbeit verwendeten Ret-tg Mäuse allerdings nicht.

14. Gedächtnis T-Zellen in Ret-tg Mäusen

Die Phänotypisierung von T-Zellen zeigte einen starken Anstieg der Zahl an $CD3^+$ T-Zellen im Knochenmark von Ret-tg tu Mäusen im Vergleich zu Ret-tg und C57Bl/6 wt Mäusen. Das Phänomen einer massiven Auswanderung von Zellen aus dem Thymus in die Milz in tumortragenden Mäusen wurde bereits 1987 von Tanaka et al. beschrieben (174). Untersuchungen des Knochenmarks diesbezüglich hat es bis heute nicht gegeben.

Seit einigen Jahren steht auch das Knochenmark mehr und mehr im Fokus von Untersuchungen. Vergleichbar mit der Milz ist es stark durchblutet und enthält keine lymphatischen Gefäße (52). Milliarden von Lymphozyten passieren es täglich (175). Zusätzlich weist das Parenchym strukturelle und funktionelle Eigenschaften eines sekundären lymphatischen Organs auf (53, 56, 176). In follikelartigen Strukturen, vergleichbar mit denen der Milz und Lymphknoten, finden sich Ansammlungen von antigenbeladenen DCs und T-Zellen, was eine gute Vorraussetzung für eine primäre Stimulation von naiven T-Zellen darstellt (53). Die Stimulation von naiven T-Zellen im Knochenmark hat gegenüber der Stimulation in Lymphknoten den Vorteil, dass durch die hohe Durchflussrate an Lymphozyten systemische Krankheiten bekämpft werden können, wogegen stimulierte T-

Zellen aus Lymphknoten eher lokal gegen Pathogene vorgehen (53). Diese Beobachtungen liefern eine gute Erklärung für die in dieser Arbeit beschriebene drastische Anreicherung an naiven T-Zellen im Knochenmark von Ret-tg tu Mäusen im Vergleich zu Ret-tg und C57Bl/6 wt Tieren (Abb. 9.2 c,d).

In das Knochenmark eingewanderte T-Zellen zeigten innerhalb der $CD3^+$ Population mehrheitlich einen Gedächtnis Phänotyp (Abb. 9.2 a,b), was auf die Kapazität der Knochenmarkstromazellen zurückzuführen ist, die für Gedächtnis T-Zellen überlebens-notwendigen Zytokine IL-7 und IL-15 bereitzustellen (177-180). Eine solche Anreicherung von Gedächtnis T-Zellen im Parenchym des Knochenmarks konnte auch bereits von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden (53, 58, 69, 176).

Die Anzahl an CM T-Zellen innerhalb der MNC Population im Knochenmark von Ret-tg tu Mäusen war wie die Anzahl an naiven T-Zellen im Vergleich zu Ret-tg und C57Bl/6 wt Tieren erhöht (Abb 9.2 c,d). Dies spricht für eine massive Immunantwort mit vermehrter Bildung von CM T-Zellen im Verlauf der Tumorentwicklung in Ret-tg tu Mäusen (47, 56). Trotz dieser vermehrten Bildung von CM T-Zellen war innerhalb der Gedächtnis T-Zell-Population der Anteil an EM T-Zellen mit ca. 70% signifikant höher, als der an CM T-Zellen (Abb. 9.2 a,b). EM T-Zellen exprimieren keine „*homing*“ Rezeptoren für sekundäre lymphatische Organe (CD62L, CCR7). Eine Erklärung für die Akkumulierung von EM T-Zellen im Knochenmark könnte allerdings eine durch erhöhte Expression der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 sowie durch verminderte Expression von CXCR1 stimulierte Einwanderung sein (64, 181). Ein anderer bereits beschriebener Mechanismus basiert auf der Interaktionen von VLA-4 und $\alpha_4\beta_7$ Integrin auf EM T-Zellen mit ICAM-1 und MAdCAM-1 auf Zellen des Knochenmarks (58).

In der Milz war der Großteil der T-Zellen in Ret-tg Mäusen im Gegensatz zum Knochenmark naiv (Abb. 9.3 a,b). Die Verteilung der Gedächtnis Subpopulationen war innerhalb der $CD4^+$ T-Zell Population ausgewogen, innerhalb der $CD8^+$ T-Zellen überwog dagegen der Anteil an CM T-Zellen. Auch hier konnte korrelierend zum Knochenmark in Ret-tg tu Mäusen eine erhöhte Anzahl an $CD4^+$ CM T-Zellen im Vergleich zu Ret-tg und C57Bl/6 wt Tieren beobachtet werden, wobei dies für $CD8^+$ CM T-Zellen nicht der Fall war (Abb. 9.3 c,d). Bei der erhöhten Anzahl an $CD4^+$ T-Zellen könnte es sich überwiegend um regulatorische T-Zellen handeln, deren Vermehrung in Krebspatienten bereits gezeigt werden konnte und die eine entscheidende Rolle in der Suppression einer tumorgerichteten T-Zell-Antwort spielen (31, 182).

Der reduzierte Anteil an Gedächtnis T-Zellen innerhalb der $CD4^+/CD3^+$ und $CD8^+/CD3^+$ Population im Vergleich zum Knochenmark in Ret-tg Mäusen bildete einen weiteren Hinweis auf die Wichtigkeit des Knochenmarks als Quelle für Gedächtnis T-Zellen.
Im Tumor von Ret-tg Mäusen war der Anteil an EM T-Zellen sowohl innerhalb der $CD4^+$ als auch der $CD8^+$ Population größer als der an CM T-Zellen. Dies ist auch sinnvoll, da CM T-Zellen größtenteils in den sekundären lymphatischen Organen lokalisiert sind und EM T-Zellen vorwiegend in nicht-lymphatische Organe einwandern, wo sie ihre potente Effektorfunktion ausführen können (46, 69, 183).
Eine Studie an Patienten mit kolorektalem Karzinom zeigte eine bessere Überlebensprognose wenn der Tumor in einem frühen Stadium mit einer erhöhten Anzahl an Gedächtnis T-Zellen infiltriert war (184).

15. Melanomantigen-spezifische Gedächtnis T-Zellen in Ret-tg Mäusen

Im Knochenmark von Patienten mit Brustkrebs, Pankreaskrebs, multiplem Myelom und malignen Melanom konnten bislang Tumor-spezifische Gedächtnis T-Zellen nachgewiesen werden (58, 66, 67, 69, 185). Die Untersuchung von Knochenmarkzellen aus tumortragenden Ret-tg Mäusen lieferte diesbezüglich in 80% der Fälle Tumorantigen-spezifische $CD8^+$ T-Zellen gegen das Differenzierungsantigen TRP-2. Die Mehrheit dieser Zellenzeigte einen Gedächtnis Phänotyp, 66% dieser Gedächtnis T-Zellen waren EM T-Zellen. Damit unterschied sich die Verteilung innerhalb der TRP-2 spezifischen $CD8^+$ Population von der innerhalb der gesamten $CD8^+$ Population, wo CM T-Zellen die Mehrheit der Gedächtnis T-Zellen bildeten. Diese Ergebnisse korrelieren gut mit der von Beckhove et al. gezeigten Akkumulierung von Tumorantigen-spezifischen EM T-Zellen im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen (69) und sind ein wichtiger Hinweis darauf, dass im Knochenmark entweder zusätzlich zur gezeigten Proliferation von CM $CD8^+$ T-Zellen auch eine Umwandlung von TRP-2-spezifischen CM $CD8^+$ T-Zellen hin zum EM Phänotyp stattfand, oder TRP-2-spezifische EM $CD8^+$ T-Zellen aus der Peripherie massiv ins Knochenmark einwanderten, um von Antigen-beladenen DCs stimuliert zu werden (47, 53, 57, 186). Welche der beiden Möglichkeiten zutreffend ist, konnte anhand der erzielten Ergebnisse nicht geklärt werden.

Ein Vergleich mit TRP-2-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen aus der Milz unterstreicht sehr gut die postulierte hohe Bedeutung des Knochenmarks für die Stimulation einer sekundären Immunantwort über Gedächtnis T-Zellen. In der Milz von Ret-tg tu Mäusen konnte einerseits nur eine niedrige Frequenz TRP-2-spezifischer T-Zellen innerhalb der $CD8^+$ Population nachgewiesen werden, wobei sie andererseits in der großen Mehrheit naiv waren (Abb. 10.8). Auch gab es hier keine Unterschiede in der Verteilung von EM und CM $CD8^+$ T-Zellen innerhalb der spezifischen und der gesamten $CD8^+$ Population (Abb. 10.9). Diese Ergebnisse korrelieren gut mit der beschriebenen signifikant erhöhten Frequenz Tumorantigen-spezifischer Gedächtnis T-Zellen im Knochenmark im Vergleich zum peripheren Blut in Melanom- und Brustkrebspatienten (57, 58, 69).

Im Tumor war die Frequenz an TRP-2-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen am höchsten, wobei 70% dieser Zellen $CD8^+$ Gedächtnis T-Zellen waren (Abb. 10.6). Beckhove et al. beschrieben bereits eine erhöhte Infiltration von Tumoren durch Gedächtnis T-Zellen aber nicht durch naive T-Zellen (69). Diese Infiltration war dabei mit der Expression von P-Selectin Glycoprotein Ligand (PSGL)-1 auf Gedächtnis T-Zellen und deren Kolokalisation mit P-Selektin-positiven Tumorendothelzellen assoziiert (69). EM $CD8^+$ T-Zellen in Tumoren des Ret-Mausmodells bildeten mit 95% der Gedächtnis T-Zellen eine eindeutige Mehrheit gegenüber den CM $CD8^+$ T-Zellen (Abb. 10.7). Dies konnte bereits für Tumorantigen-spezifische $CD8^+$ Gedächtnis T-Zellen in Darmkrebstumoren gezeigt werden (184, 187). Die beschriebenen Ergebnisse weisen auf die Abstammung der tumorinfiltrierenden $CD8^+$ EM T-Zellen aus dem Knochenmark hin, da dort ebenfalls eine signifikant erhöhte Ansammlung von TRP-2-spezifischen $CD8^+$ EM T-Zellen nachgewiesen werden konnte.
Tumorinfiltrierende T-Zellen des Kolonkarzinoms zeigten überwiegend einen EM T-Zell-Phänotyp, produzierten allerdings im Vergleich zu EM T-Zellen aus dem peripheren Blut deutlich weniger Perforin und waren somit in ihrer Effektorfunktion gehemmt (187). Auch Melanom infiltrierende T-Zellen wiesen *ex vivo* Defekte in Antigen-spezifischer Proliferation, Zytokinproduktion, zytolytischer Aktivität und ebenfalls in der Perforin Produktion auf (188-190). Verantwortlich dafür sind eine Reihe von Faktoren, die es dem Tumor ermöglichen einer effektiven Immunantwort zu entgehen. Dazu gehören beispielsweise Treg (31, 191), tolerogene DCs (17), von myeloiden Vorläuferzellen abstammende Suppressorzellen (192) und von Tumorzellen exprimierte inhibitorische Faktoren wie PD-1 (193) und Stat-3 (20), sowie wie das Enzym IDO (19, 194, 195).

Durch das inhibitorische Mikomillieu innerhalb des Tumorgewebes werden auch hocheffiziente, im Tumor angereicherte Effektorzellen, wie EM $CD8^+$ T-Zellen, in ihrer zytotoxischen Aktivität unterdrückt. Der Tumor kann sich so weiter etablieren, was auch in Ret-tg tu Mäusen der Fall sein könnte.

Die tumorinduzierte Suppression einer effektiven T-Zell-Antwort betrifft vor allem Tumorantigen-spezifische Zellen, die in den Tumor einwandern oder in lokalen Lymphknoten lokalisiert sind, nicht aber Gedächtnis T-Zellen aus dem Knochenmark, wie für Brustkrebs eindrücklich gezeigt werden konnte (58, 69). Hier wurden Tumor-spezifische Gedächtnis T-Zellen aus dem Knochenmark *in vitro* mit Hilfe von autologen, mit Tumorlysat beladenen DCs erfolgreich restimuliert und zeigten sowohl eine gute Produktion von IFN-γ als auch zytolytische Effektorfunktionen. Dies traf nicht auf spezifische T-Zellen aus dem peripheren Blut zu, die wahrscheinlich unter dem negativen Einfluss des suppressiven Tumormilieus standen. Ein einfacher Transfer dieser restimulierten Gedächtnis T-Zellen aus dem Knochenmark von Patientinnen in NOD/SCID Mäuse mit autologem xenotransplantiertem Tumor reichte aus, diesen vollständig zurückzubilden (58). Damit konnte nachgewiesen werden, dass Tumor-reaktive Gedächtnis T-Zellen aus dem Knochenmark, nicht aber aus dem Tumor oder peripherem Blut, eine gute Möglichkeit für ein neues immuntherapeutisches Behandlungskonzept darstellen könnten (58, 69, 196).

Damit einhergehend konnten Melanomantigen-spezifische T-Zellen aus dem Knochenmark von tumortragenden Ret-tg Mäusen in 50% ebenfalls *in vitro* mit Hilfe von Tumorlysat beladenen DCs erfolgreich zur Produktion von IFN-γ stimuliert werden (Abb. 12.4). Diese Ergebnisse bilden eine gute Grundlage, dieses Behandlungskonzept auch beim malignen Melanom anzuwenden. Simultan dazu werden aber auch Konzepte benötigt, die darauf abzielen das immunsuppressorische Mikromilieu der Tumoren zu neutralisieren, um eine effektive Gedächtnis T-Zell-Antwort zu unterstützen.

Die Untersuchung von Ret-tg Mäusen, die keinen Tumor entwickelt hatten, zeigte im Knochenmark von Tieren im Alter von bis zu 20 Wochen keine TRP-2-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen. Bei 43% der Tiere, die älter waren als 20 Wochen, konnten jedoch TRP-2-spezifische $CD8^+$ T-Zellen nachgewiesen werden, die vornehmlich einen Gedächtnis Phänotyp zeigten und in der Mehrheit EM $CD8^+$ T-Zellen waren (Abb 11.4 und 11.5). In 33% der Fälle konnten die Zellen zur Produktion von IFN-γ stimuliert werden (Abb. 12.5). Ihr Nachweis ging dabei einher mit dem Fund von einzelnen Melanomzellen in Lymphknoten tumorfreier Ret-tg Mäuse (Abb. 9.3). Sämtliche dieser Tiere hatten einen hellhäutigen Phänotyp und entwickelten nur in 11% einen oder mehrere makroskopische Tumoren.

Auch in hellhäutigen Mäusen findet also eine Transformation von Melanozyten zu Melanomzellen statt, die aber langsam vonstatten geht und damit dem Immunsystem eine Chance lässt, die Tumorentwicklung in den meisten Fällen zu kontrollieren. Hatte sich der Tumor allerdings etabliert, gab es keine Unterschiede in der Anzahl und Zusammensetzung TRP-2-spezifischer Gedächtnis T-Zellen in den untersuchten Organen im Vergleich zu Mäusen mit einem grauen oder schwarzen Phänotyp.

Die Beobachtungen in hellhäutigen Mäusen passen gut zu dem Konzept des sog. „*Immunoediting*“ (197). Demnach kann sich in der ersten Phase der sog. „*immunosurveillance*“ noch kein solider Tumor etablieren, da vereinzelte Tumorzellen rechtzeitig vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden. In der folgenden „*equilibrium*“-Phase existieren bereits einzelne Tumorzellen, deren Ausbreitung vom Immunsystem jedoch kontrolliert wird. Immunantwort und Tumorentwicklung stehen dabei im Gleichgewicht zueinander, das in der dritten Phase, dem sog. „*immunoescape*“ zugunsten der Tumoretablierung verschoben wird. Den Tumorzellen gelingt es mit Hilfe verschiedener oben genannter Mechanismen, sich der Kontrolle des Immunsystems zu entziehen (197). In der Literatur wurden auch sog. „schlafende“ („dormant“) Tumorzellen beschrieben, die einerseits von Tumor-spezifischen Gedächtnis T-Zellen im Knochenmark kontrolliert werden und andererseits von diesen auch Antigen-spezifische Überlebenssignale erhalten (65, 198). Für das humane Melanom konnten bereits Knochenmark-ansässige mikrometastatische Tumorzellen nachgewiesen werden (199-201).

Mahnke et al. zeigten in einem Modellsystem, dass Tumor-spezifische Gedächtnis T-Zellen auch ohne direkten Kontakt zu ihrem Antigen lange Zeit im Knochenmark überleben. Die Frequenz der Zellen ist allerdings in Gegenwart des Antigens höher (198). Die Persistenz von Antigen-spezifischen Gedächtnis T-Zellen ohne Kontakt zum Antigen war bisweilen für Virusantigene bekannt, die stark immunogen sind, da sie vom Immunsystem als fremd angesehen werden. Tumorantigene sind nur schwach immunogen, da sie körpereigen sind (154). Mahnke et al. verwendeten für ihre Untersuchungen das Modelantigen LacZ, das ebenfalls stark immunogen ist und somit vergleichbar mit einem viralen Antigen ein Langzeitüberleben von Antigen-spezifischen Gedächtnis T-Zellen induzieren kann. Der Fund von *dormant* Tumorzellen in Lymphknoten von Ret-tg tumorfreien Mäusen zusammen mit TRP-2-spezifischen Gedächtnis T-Zellen im Knochenmark gibt einen Hinweis auf die Notwendigkeit einer andauernden Stimulation der Tumor-spezifischen Gedächtnis T-Zellen mit ihrem Antigen, um ein Langzeitüberleben zu sichern. Die Frage, ob Tumorantigen-spezifische Gedächtnis T-Zellen auch ohne Kontakt zu ihrem Antigen alleine unter

Einwirkung von IL-7 und IL-15 im Knochenmark überleben können, wurde allerdings noch nicht eindeutig geklärt.
Der Nachweis von TRP-2-spezifischen T-Zellen in Tieren, die über 20 Wochen alt waren, legt nahe, dass die Entwicklung des immunologischen T-Zell Gedächtnisses erst relativ spät oder nur sehr langsam während der ersten 19 Wochen eintritt. Letzteres ist wahrscheinlicher, da in tumortragenden Ret-tg Mäusen TRP-2-spezifische Gedächtnis T-Zellen schon im Alter von 5 Wochen nachgewiesen werden konnten.
Die Frequenz dieser Zellen ist in tumorfreien Mäusen im Alter von 5-19 Wochen mit hoher Wahrscheinlichkeit niedriger, so dass sie unter der Nachweisgrenze der angewandten Methoden liegen.
Die Existenz von Melanom-reaktiven Gedächtnis T-Zellen im Knochenmark von tumorfreien Mäusen hinterlässt einen „Fingerabdruck“ von bereits existenten aber unentdeckten Tumorzellen im Organismus und kann nach einem Vorschlag von Finn et al. (202) als neuer prognostischer Faktor für die Früherkennung von Melanomerkrankungen dienen. Bisher wurde für die Diagnose von Tumoren vor allem der Nachweis von Tumorzellen herangezogen. Die hier gezeigten Ergebnisse sind ein neuer Schritt in Richtung einer frühen Tumordiagnose über Nachweis von Tumor-reaktiven T-Zellen, die eher detektiert werden können als Tumorantigene (202).

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit bestätigt, dass Melanomantigen-spezifische EM T-Zellen ein wichtiger Faktor in der Bekämpfung von Tumoren sind, aber unter Einwirkung eines suppressiven Mikromilieus im Tumor stehen und daher anergisch sind.
Das Knochenmark unterliegt diesen suppressorischen Einflüssen nicht und eignet sich daher besonders gut als Quelle für reaktive Melanomantigen-spezifische Gedächtnis T-Zellen für den Einsatz in einer adaptiven Therapie.
Um diese Zellen allerdings wirksam gegen einen Tumor einsetzen zu können, bedarf es einer Kombination von Therapien, die parallel zum adaptiven Transfer von Melanom-reaktiven Gedächtnis T-Zellen auch ein Neutralisieren des suppressorischen Tumormikromilieus beinhalten sollte. Dies scheint nötig, um zu gewährleisten, dass die transferierten Zellen im Tumor nicht anergisch werden.
Zudem lieferte die vorliegende Arbeit neue Erkenntnisse über die mögliche Verwendung von Melanom-spezifischen Gedächtnis T-Zellen für eine frühe Tumordiagnose noch in der latenten Phase der Tumorentwicklung.

VI. Literaturverzeichnis

1. Fearon, D.T., and R.M. Locksley. 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272:50-53.

2. Hoffmann, J.A., F.C. Kafatos, C.A. Janeway, and R.A. Ezekovitz. 1999. Phylogenic perspectives in innate immunity. *Science* 284:1313-1318.

3. Medzhitov, R., and C.A. Janeway. 1997. Innate immunity: the virtues of a non-clonal system of recognition. *Cell* 91:295-298.

4. Heath, W.R., and F.R. Carbone. 2001. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 19:47-64.

5. Pfeifer, J.D., M.J. Wick, R.L. Roberts, K. Findlay, S.J. Normark, and C.V. Harding. 1993. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 361:559-362.

6. Kovacsovics-Bankowski, M., and K.L. Rock. 1995. A phagosome-to-cytosol pathway for exogeneous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267:243-246.

7. Steinmann, R.M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-296.

8. E. Reis, C.S. 2004. Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin Immunol* 16:27-34.

9. Banchereau, J. 2000. Immunbiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767-811.

10. Bell, D., J.W. Young, and J. Banchereau. 1999. Dendritic cells. *Adv Immunol* 72:255-324.

11. Banchereau, and Steinmann. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.

12. Hart, D.N. 1997. Dendritic Cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90:3245-3287.

13. Pulendran, B., J. Lingappa, M.K. Kennedy, J. Smith, M. Teepe, A. Rudensky, C.R. Maliszewski, and E. Maraskovsky. 1997. Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *J Immunol* 159:2222-2231.

14. Leenen, P.J., K. Radosevic, J.S. Voermann, B. Salomon, N. van Rooijen, D. Klatzmann, and W. van Evijk. 1998. Heterogenity of mouse spleen dendritic cells: in vivo phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover. *J Immunol* 2166-2173:

15. Randolph, G.J., V. Angeli, and M.A. Swartz. 2005. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol* 5:617-628.

16. Enk, A.H. 2005. Dendritic cells in tolerance induction. *Immunol Lett* 99:8-11.

17. Mahnke, K., T.S. Johnson, S. Ring, and A.H. Enk. 2007. Tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells: a two-way relationship. *J Dermatol Sci* 46:159-167.

18. Floess, S., J. Freyer, C. Siewert, U. Baron, S. Olek, J. Polansky, K. Schlawe, H.D. Chang, T. Bopp, E. Schmitt, S. Klein-Hessling, E. Serfling, A. Hamann, and J. Huehn. 2007. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* 5:e38.

19. Gabrilovitsch, D. 2004. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol* 4:941-952.

20. Wang, T., G. Niu, M. Kortylewski, L. Burdelya, K. Shain, S. Zhang, R. Bhattacharya, D. Gabrilovitsch, R. Heller, D. Coppola, W. Dalton, R. Jove, D. Pardoll, and H. Yu. 2004. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med* 10:48-54.

21. Weissman, A.M., M. Baniyash, D. Hou, L.E. Samelson, W.H. Burgess, and R.D. Klausner. 1988. Molecular cloning of the zeta chain of the T cell antigen receptor. *Science* 239:1018-1021.

22. Freeman, G.J., J.G. Gribben, V.A. Boussiotis, J.W. Ng, V.A. Restivo, Jr., L.A. Lombard, G.S. Gray, and L.M. Nadler. 1993. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 262:909-911.

23. Larsen, C.P., S.C. Ritchie, R. Hendrix, P.S. Linsley, K.S. Hathcock, R.J. Hodes, R.P. Lowry, and T.C. Pearson. 1994. Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells. *J Immunol* 152:5208-5219.

24. Shresta, S., C.T.N. Pham, D.A. Thomas, T.A. Graubert, and T.J. Ley. 1998. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol* 10:581-587.

25. Romagnani, S. 2006. Regulation of the T cell response. *Clin Exp All* 36:1357-1366.

26. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programms the development and function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330-336.

27. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription faczor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.

28. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-1164.

29. Shimizu, J., T. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, and S. Sakaguchi. 2002. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T-cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3:135-142.

30. Suri-Payer, E., and B. Fritzsching. 2006. Regulatory T cells in experimental autoimmune disease. *Springer Semin Immunopathol* 28:3-16.

31. Miyara, M., and S. Sakaguchi. 2007. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med* 13:108-116.

32. Bopp, T., C. Becker, M. Klein, S. Klein-Hessling, A. Palmetshofer, E. Serfling, V. Heib, M. Becker, J. Kubach, S. Schmitt, S. Stoll, H. Schild, M.S. Staege, M. Stassen, H. Jonuleit, and E. Schmitt. 2007. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 204:1303-1310.

33. Deaglio, S., K.M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J.F. Chen, K. Enjyoji, J. Linden, M. Oukka, V.K. Kuchroo, T.B. Strom, and S.C. Robson. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204:1257-1265.

34. Sutmuller, R.P., L.M. van Duivenvoorte, A. van Elsas, T.N. Schumacher, M.E. Wildenberg, J.P. Allison, R.E. Toes, R. Offringa, and C.J. Melief. 2001. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25+ regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 194:823-832.

35. Karre, K. 2002. NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scand J Immunol* 55:221-228.

36. Cerwenka, A., and L.L. Lanier. 2001. Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity. *Immunol Rev* 181:158-169.

37. Yakar I. 2003. Prostaglandin e(2) suppresses NK activity in vivo and promotes postoperative tumor metastasis in rats. *Ann Surg Onc* 10:469-479.

38. Tanchot C., and B. Rocha. 1997. Peripheral selection of T cell repertoires: the role of continuous thymus output. *J Exp Med* 186:1099-1106.

39. Zinkernagel, R.M., and M.F. Bachmann. 1996. On immunological memory. *Annu Rev Immunol* 14:333-367.

40. Lanzavecchia A., and F. Sallusto. 2000. From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation. *Curr Opin Immunol* 12:92-98.

41. Goldrath, A.W., and M.J. Bevan. 1999. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402:255-262.

42. Westermann J, Ehlers EM, Exton MS, Kaiser M, and B. U. 2001. Migration of naive, effector and memory T cells: implications for the regulation of immune responses. *Immunol Rev* 184:20-37.

43. Seder, R.A., and R. Ahmed. 2003. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nature Immunol* 4:835-842.

44. Geginat, J., F. Sallusto, and A. Lanzavecchia. 2003. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory and effector memory CD4+ T cells. *Pathol Biol (Paris)* 51:64-66.

45. Zhang X, Sun S, Hwang I, Tough DF, and S. J. 1998. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by interleukin-15. *Immunity* 8:591-599.

46. Sallusto, F., D. Lening, F. R., M. Lipp, and L. A. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 402:708-712.

47. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia. 2004. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22:745-763.

48. Veiga-Fernandes H, Walter U, Bourgeois C, McLean A, and R. B. 2000. Response of naive and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nature Immunol* 1:47-53.

49. Butcher E.C., Williams M., Youngman K., Rott L., and B. M. 1999. Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv Immunol* 72:209-253.

50. Forster R., Schubel A., Breitfeld D., Kremmer E., Renner-Muller I., Wolf E., and L. M. 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99:23-33.

51. Lanzavecchia, A., and F. Sallusto. 2005. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol* 17:326-332.

52. Osmond, D.G. 1994. Production and selection of B lymphocytes in bone marrow: lymphostromal interactions and apoptosis in normal, mutant and transgenic mice. *Adv Exp Med Biol* 355:15-20.

53. Feuerer, M., P. Beckhove, N. Garbi, Y. Mahnke, A. Limmer, M. Hommel, G.J. Hammerling, B. Kyewski, A. Hamann, V. Umansky, and V. Schirrmacher. 2003. Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood-borne antigen. *Nat Med* 9:1151-1157.

54. Bain, B.J., and D.M. Clark. 2001. Bone marrow pathology. *3rd edition. Blackwell, Oxford:* 30-115.

55. Feuerer, M., P. Beckhove, Y. Mahnke, M. Hommel, B. Kyewski, A. Hamann, V. Umansky, and V. Schirrmacher. 2004. Bone marrow microenvironment facilitating dendritic cell: CD4 T cell interactions and maintenance of CD4 memory. *Int J Oncol* 25:867-876.

56. Mazo, I.B., M. Honczarenko, et al. . 2005. Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8+ T cells. *Immunity* 22:259-270.

57. Feuerer, M., M. Rocha, L. Bai, V. Umansky, E.F. Solomayer, G. Bastert, I.J. Diel, and V. Schirrmacher. 2001. Enrichment of memory T cells and other profound immunological changes in the bone marrow from untreated breast cancer patients. *Int J Cancer* 92:96-105.

58. Feuerer, M., P. Beckhove, L. Bai, E.F. Solomayer, G. Bastert, I.J. Diel, C. Pedain, M. Oberniedermayr, V. Schirrmacher, and V. Umansky. 2001. Therapy of human tumors in NOD/SCID mice with patient-derived reactivated memory T cells from bone marrow. *Nat Med* 7:452-458.

59. Berlin, C. 1993. α4β7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 74:185-195.

60. Erle, D.J. Expression and function of the MAdCAM-1 receptor, integrin α4β7, on human leucocytes. *J Immunol* 153:517-528.

61. Bleul, C.C., R.C. Fuhlbrigge, J.M. Casasnovas, A. Aiuti, and T.A. Springer. 1996. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 184:1101-1109.

62. Peled, A., V. Grabovsky, L. Habler, J. Sandbank, F. Arenzana-Seisdedos, I. Petit, H. Ben-Hur, T. Lapidot, and R. Alon. 1999. The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of $CD34^+$ cells on vascular endothelium under shear flow. *J Clin Invest* 104:1199-1211.

63. Brouty-Boye, D., C. Doucet, D. Clay, M.C. Le Bousse-Kerdiles, T.J. Lampidis, and B. Azzarone. 1998. Phenotypic diversity in human fibroblasts from myelometaplasic and non-myelometaplasic hematopoietic tissues. *Int J Cancer* 76:767-773.

64. Zhang, X., H. Dong, W. Lin, S. Voss, L. Hinkley, M. Westergren, G. Tian, D. Berry, D. Lewellen, R.G. Vile, L. Chen, D.L. Farber, and S.E. Strome. 2006. Human bone marrow: a reservoir for "enhanced effector memory" $CD8^+$ T cells with potent recall function. *J Immunol* 177:6730-6737.

65. Muller, M., F. Gounari, et al. . 1998. EblacZ tumor dormancy in bone marrow and lymph nodes: active control of proliferating tumor cells by CD8+ immune T cells. *Cancer Res* 58:5439-5446

66. Schmitz-Winnenthal, F.H., C. Volk, K. Z'Graggen, L. Galindo, D. Nummer, Y. Ziouta, M. Bucur, J. Weitz, V. Schirrmacher, M.W. Buchler, and P. Beckhove. 2005. High frequencies of functional tumor-reactive T cells in bone marrow and blood of pancreatic cancer patients. *Cancer Res* 65:10079-10087.

67. Muller-Berghaus, J., K. Ehlert, S. Ugurel, V. Umansky, M. Bucur, V. Schirrmacher, P. Beckhove, and D. Schadendorf. 2006. Melanoma-reactive T cells in the bone marrow of melanoma patients: association with disease stage and disease duration. *Cancer Res* 66:5997-6001.

68. Schirrmacher, V., M. Feuerer, P. Beckhove, T. Ahlert, and V. Umansky. 2002. T cell memory, anergy and immunotherapy in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7:201-208.

69. Beckhove, P., M. Feuerer, M. Dolenc, F. Schuetz, C. Choi, N. Sommerfeldt, J. Schwendemann, K. Ehlert, P. Altevogt, G. Bastert, V. Schirrmacher, and V. Umansky. 2004. Specifically activated memory T cell subsets from cancer patients recognize and reject xenotransplanted autologous tumors. *J Clin Invest* 114:67-76.

70. Houghton, A.N., and D. Polsky. 2002. Focus on melanoma. *Cancer Cell* 2:275-280.

71. Hurst, R., D.E. White, J. Heiss, D.S. Lee, S.A. Rosenberg, and D.J. Schwartzentruber. 1999. Brain metastasis after immunotherapy in patients with metastatic melanoma or renal cell cancer: is craniotomy indicated? *J Immunother (1997)* 22:356-362.

72. Rahimi-Movaghar, V., and M. Karimi. 2003. Meningeal melanocytoma of the brain and oculodermal melanocytosis (nevus of Ota): case report and literature review. *Surg Neurol* 59:200-210.

73. Coory, M., P. Baade, J. Aitken, M. Smithers, G.R. McLeod, and I. Ring. 2006. Trends for in situ and invasive melanoma in Queensland, Australia, 1982-2002. *Cancer Causes Control* 17:21-27.

74. Garbe, C., and A. Blum. 2001. Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14:280-290.

75. Tucker, M.A., and A.M. Goldstein. 2003. Melanoma etiology: where are we? *Oncogene* 22:3042-3052.

76. Pearce, M.S., L. Parker, S.J. Cotterill, P.M. Gordon, and A.W. Craft. 2003. Skin cancer in children and young adults: 28 years' experience from the Northern Region Young Person's Malignant Disease Registry, UK. *Melanoma Res* 13:421-426.

77. Jemal, A., S.S. Devesa, P. Hartge, and M.A. Tucker. 2001. Recent trends in cutaneous melanoma incidence among whites in the United States. *J Natl Cancer Inst* 93:678-683.

78. Reed, R.J., and P. Martin. 1997. Variants of melanoma. *Semin Cutan Med Surg* 16:137-158.

79. Balch, C.M. 2002. Surgical margins for melanoma: is 2 cm too much? *ANZ J Surg* 72:251-252.

80. Garbe, C., U. Ellwanger, M. Tronnier, E.B. Brocker, and C.E. Orfanos. 2002. The New American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma: a critical analysis based on data of the German Central Malignant Melanoma Registry. *Cancer* 94:2305-2307.

81. Lomuto, M., P. Calabrese, and A. Giuliani. 2004. Prognostic signs in melanoma: state of the art. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 18:291-300.

82. Barth, A., L.A. Wanek, and D.L. Morton. 1995. Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases. *J Am Coll Surg* 181:193-201.

83. Landthaler, M., O. Braun-Falco, A. Leitl, B. Konz, and D. Holzel. 1989. Excisional biopsy as the first therapeutic procedure versus primary wide excision of malignant melanoma. *Cancer* 64:1612-1616.

84. Soengas, M.S., and S.W. Lowe. 2003. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 22:3138-3151.

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

86. Dorval, T., S. Negrier, C. Chevreau, M.F. Avril, D. Baume, D. Cupissol, R. Oskam, R. de Peuter, J. Vinke, A. Herrera, and B. Escudier. 1999. Randomized trial of treatment with cisplatin and interleukin-2 either alone or in combination with interferon-alpha-2a in patients with metastatic melanoma: a Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer Multicenter, parallel study. *Cancer* 85:1060-1066.

87. Falkson, C.I., J. Ibrahim, J.M. Kirkwood, A.S. Coates, M.B. Atkins, and R.H. Blum. 1998. Phase III trial of dacarbazine versus dacarbazine with interferon alpha-2b versus dacarbazine with tamoxifen versus dacarbazine with interferon alpha-2b and tamoxifen in patients with metastatic malignant melanoma: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol* 16:1743-1751.

88. Keilholz, U., C.J. Punt, M. Gore, W. Kruit, P. Patel, D. Lienard, J. Thomas, T.M. Proebstle, A. Schmittel, D. Schadendorf, T. Velu, S. Negrier, U. Kleeberg, F. Lehman, S. Suciu, and A.M. Eggermont. 2005. Dacarbazine, cisplatin, and interferon-alfa-2b with or without interleukin-2 in metastatic melanoma: a randomized phase III trial (18951) of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Melanoma Group. *J Clin Oncol* 23:6747-6755.

89. Rockmann, H., and D. Schadendorf. 2003. Drug resistance in human melanoma: mechanisms and therapeutic opportunities. *Onkologie* 26:581-587.

90. Bracci, L., E. Proietti, and F. Belardelli. 2007. IFN-{alpha} and novel strategies of combination therapy of cancer. *Ann N Y Acad Sci*

91. Mohr, P., M. Weichenthal, et al. 2003. Adjuvant therapy in melanoma. *Onkologie* 26:227-233.

92. Lonchay, C., P. van der Bruggen, T. Connerotte, T. Hanagiri, P. Coulie, D. Colau, S. Lucas, A. Van Pel, K. Thielemans, N. van Baren, and T. Boon. 2004. Correlation between tumor regression and T cell responses in melanoma patients vaccinated with a MAGE antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 14631-14638.

93. Schadendorf, D. 2002. Gene-based therapy of malignant melanoma. *Semin Oncol* 29:503-512.

94. Arpaia, N., N. Cassano, and G.A. Vena. 2006. Regressing cutaneous malignant melanoma and vitiligo-like depigmentation. *Int J Dermatol* 45:952-956.

95. Satzger, I., F. Schenck, A. Kapp, and R. Gutzmer. 2006. Spontaneous regression of melanoma with distant metastases - report of a patient with brain metastases. *Eur J Dermatol* 16:454-455.

96. Brichard, V. 1993. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 178:489-495.

97. Nishioka, E., et al. 1999. Expression of tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 in ultraviolet-irradiated human melanomas and melanocytes: TRP-2 protects melanoma cells from ultraviolet B induced apoptosis. *Melanoma Res* 9:433-443.

98. Bakker, A.B. 1994. Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 179:1005-1009.

99. Korner, A., and J. Pawelek. 1982. Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science* 217:1163-1165.

100. Hodi, F.S. 2006. Well-defined melanoma antigens as progression markers for melanoma: insights into differential expression and host response based on stage. *Clin Cancer Res* 12:673-678.

101. Wang, S.C., and L. Zhang. 2001. Targeting HER2: recent developments and future directions for breast cancer patients. *Semin Oncol* 28:21-29.

102. Zighelboim, J., R.P. Gale, A. Chiu, B. Bonavida, R.C. Ossorio, and J.L. Fahey. 1974. Antibody dependent cellular cytotoxicity: cytotoxicity mediated by non t-lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 3:193-200.

103. Zeng, Y., S. Fest, R. Kunert, H. Katinger, V. Pistoia, J. Michon, G. Lewis, R. Ladenstein, and H.N. Lode. 2005. Anti-neuroblastoma effect of ch14.18 antibody produced in CHO cells is mediated by NK-cells in mice. *Mol Immunol* 42:1311-1319.

104. Chan, J.K., C.A. Hamilton, M.K. Cheung, M. Karimi, J. Baker, J.M. Gall, S. Schulz, S.H. Thorne, N.N. Teng, C.H. Contag, L.G. Lum, and R.S. Negrin. 2006. Enhanced killing of primary ovarian cancer by retargeting autologous cytokine-induced killer cells with bispecific antibodies: a preclinical study. *Clin Cancer Res* 12:1859-1867.

105. Naz, R.K., and P. Dabir. 2007. Peptide vaccines against cancer, infectious diseases, and conception. *Front Biosci* 12:1833-1844.

106. Coulie, P.G., V. Karanikas, C. Lurquin, D. Colau, T. Connerotte, T. Hanagiri, A. Van Pel, S. Lucas, D. Godelaine, C. Lonchay, M. Marchand, N. Van Baren, and T. Boon. 2002. Cytolytic T-cell responses of cancer patients vaccinated with a MAGE antigen. *Immunol Rev* 188:33-42.

107. Schuster, M., A. Nechansky, and R. Kircheis. 2006. Cancer immunotherapy. *Biotechnol J* 1:138-147.

108. Meijer, S.L., A. Dols, S.M. Jensen, H.M. Hu, W. Miller, E. Walker, P. Romero, B.A. Fox, and W.J. Urba. 2007. Induction of circulating tumor-reactive CD8+ T cells after vaccination of melanoma patients with the gp100 209-2M peptide. *J Immunother (1997)* 30:533-543.

109. Zaks, T.Z., and S.A. Rosenberg. 1998. Immunization with a peptide epitope (p369-377) from HER-2/neu leads to peptide-specific cytotoxic T lymphocytes that fail to recognize HER-2/neu+ tumors. *Cancer Res* 58:4902-4908.

110. Rosenberg, S.A., J.C. Yang, D.J. Schwartzentruber, P. Hwu, F.M. Marincola, S.L. Topalian, N.P. Restifo, M.E. Dudley, S.L. Schwarz, P.J. Spiess, J.R. Wunderlich, M.R. Parkhurst, Y. Kavakami, C.A. Seipp, J.H. Einhorn, and D.E. White. 1998. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 4:321-327.

111. Parmiani, G., C. Castelli, P. Dalerba, R. Mortarini, L. Rivoltini, F.M. Marincola, and A. Anichini. 2002. Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: what have we achieved? Where are we going? *J Natl Cancer Inst* 94:805-818.

112. Rosenberg, S.A., J.C. Yang, and N.P. Restifo. 2004. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10:909-915.

113. Perez-Diez, A., and F.M. Marincola. 2002. Immunotherapy against antigenic tumors: a game with a lot of players. *Cell Mol Life Sci* 59:230-240.

114. Nestle, F.O., S. Alijagic, M. Gilliet, Y. Sun, S. Grabbe, R. Dummer, G. Burg, and D. Schadendorf. 1998. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 4:328-332.

115. Schadendorf D., and F.O. Nestle. 2001. Autologous dendritic cells for treatment of advanced cancer - an update. *Recent Results Cancer Res* 158:236-248.

116. Banchereau, J., and A.K. Palucka. 2005. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 5:296-306.

117. Kyte, J.A., G. Kvalheim, K. Lislerud, P. Straten, S. Dueland, S. Aamdal, and G. Gaudernack. 2007. T cell responses in melanoma patients after vaccination with tumor-mRNA transfected dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 56:659-675.

118. Gilboa, E. 2007. DC-based cancer vaccines. *J Clin Invest* 117:1195-1203.

119. Gilboa, E., and J. Vieweg. 2004. Cancer-immunptherapy with mRNA transfected dendritic cells. *Immunol Rev* 199:251-263.

120. Bonehill, A., C. Heirman, and S. Tuyaerts. 2004. Messenger RNA electroporated dendritic cells presenting MAGE-A3 simultaneously in HLA class I and class II mole. *J Immunol* 172:6649-6657.

121. Yewdell, J.W., N.C. C., and J.R. Bennink. 1999. Mechanisms of exogenous antigen presentation by MHC class I molecules in vitro and in vivo: implications for generating CD8+ T cell responses to infectious agents, tumors, transplants, and vaccines. *Adv Immunol* 73:1-77.

122. Nestle, F.O., A. Farkas, and C. Conrad. 2005. Dendritic-cell-based therapeutic vaccination against cancer. *Curr Opin Immunol* 17:163-169.

123. Schuler, G., B. Schuler-Thurner, and R.M. Steinmann. 2003. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 15:

124. Strobel, I., S. Berchtold, and A. Gotze. 2000. Human dendritic cells transfected with either RNA or DNA encoding influenza matrix protein M1 differ in their ability to stimulate cytotoxic T lymphocytes. *Gene Ther* 7:2028-2035.

125. Linette, G.P., S. Shankara, and S. Longerich. 2000. In vitro priming with adenovirus/gp100 antigen-transduced dendritic cells reveals the epitope specificity of HLA-A*0201-restricted CD8+ T cells in patients with melanoma. *J Immunol* 164:3402-3412.

126. Bonini, C., S.P. Lee, and S.R. Riddell. 2001. Targeting antigen in mature dendritic cells for simultaneous stimulation of CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 166:5250-5257.

127. Lapointe, R., R.E. Royal, and M.E. Reeves. 2001. Retrovirally transduced human dendritic cells can generate T cells recognizing multiple MHC class I and class II epitopes from the melanoma antigen glycoprotein 100. *J Immunol* 167:4758-4764.

128. Lizee, G., M.I. Gonzales, and S.L. Topalian. 2004. Lentivirus vector-mediated expression of tumor-associated epitopes by human antigen presenting cells. *Hum Gene Ther* 15:393-404.

129. Dietz, A.B., and S. Vuk-Pavlovic. 1998. High efficiency adenovirus-mediated gene transfer to human dendritic cells. *Blood* 91:392-398.

130. Batchu, R.B., A.M. Moreno, and S. Szmania. 2003. High-level expression of cancer/testis antigen NY-ESO-1 and human granulocytemacrophage colony-stimulating factor in dendritic cells with a bicistronic retroviral vector. *Hum Gene Ther* 14:1333-1345.

131. Shen, Z., G. Reznikoff, and G. Dranoff. 1997. Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol* 158:2723-2730.

132. Larsson, M., J.F. Fonteneau, and N. Bhardwaj. 2001. Dendritic cells resurrect antigens from dead cells. *Trends Immunol* 22:141-148.

133. Schadendorf, D., S. Ugurel, B. Schuler-Thurner, F.O. Nestle, A. Enk, E.B. Brocker, S. Grabbe, W. Rittgen, L. Edler, A. Sucker, C. Zimpfer-Rechner, T. Berger, J. Kamarashev, G. Burg, H. Jonuleit, A. Tuttenberg, J.C. Becker, P. Keikavoussi, E. Kampgen, and G. Schuler. 2006. Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG. *Ann Oncol* 17:563-570.

134. Schadendorf, D., and F.O. Nestle. 2001. Autologous dendritic cells for treatment of advanced cancer - an update. *Recent Results Cancer Res* 158:236-248.

135. Yee, C., and J.A. Thompson. 2002. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16168-16173.

136. Dudley, M.E., and J.R. Wunderlich. 2002. A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 25:243-251.

137. Dudley, M.E., and S.A. Rosenberg. 2003. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat Rev Cancer* 3:666-675.

138. Polak, M.E., N.J. Borthwick, F.G. Gabriel, P. Johnson, B. Higgins, J. Hurren, D. McCormick, M.J. Jager, and I.A. Cree. 2007. Mechanisms of local immunosuppression in cutaneous melanoma. *Br J Cancer* 96:1879-1887.

139. Jhappan, C., F.P. Noonan, and G. Merlino. 2003. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene* 22:3099-3112.

140. Noonan, F.P., J.A. Recio, H. Takayama, P. Duray, M.R. Anver, W.L. Rush, E.C. De Fabo, and G. Merlino. 2001. Neonatal sunburn and melanoma in mice. *Nature* 413:271-272.

141. Takayama, H., W.J. LaRochelle, R. Sharp, T. Otsuka, P. Kriebel, M. Anver, S.A. Aaronson, and G. Merlino. 1997. Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:701-706.

142. Bottaro, D.P., J.S. Rubin, D.L. Faletto, A.M. Chan, T.E. Kmiecik, G.F. Vande Woude, and S.A. Aaronson. 1991. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 251:802-804.

143. Li, G., H. Schaider, K. Satyamoorthy, Y. Hanakawa, K. Hashimoto, and M. Herlyn. 2001. Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. *Oncogene* 20:8125-8135.

144. Mani, A., and E.P. Gelmann. 2005. The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. *J Clin Oncol* 23:4776-4789.

145. Nakayama, K., S. Hatakeyama, and K. Nakayama. 2001. Regulation of the Cell Cycle at the G1–S Transition by Proteolysis of Cyclin E and p27Kip1. *Biochem Biophys Res Com* 282:853-860.

146. White A.E., L.E.M., Tlisty T.D. . 1994. Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes Dev.* 8:666-677.

147. Natali, P.G., M.R. Nicotra, M.F. Di Renzo, M. Prat, A. Bigotti, R. Cavaliere, and P.M. Comoglio. 1993. Expression of the c-Met/HGF receptor in human melanocytic neoplasms: demonstration of the relationship to malignant melanoma tumour progression. *Br J Cancer* 68:746-750.

148. Otsuka, T., H. Takayama, R. Sharp, G. Celli, W.J. LaRochelle, D.P. Bottaro, N. Ellmore, W. Vieira, J.W. Owens, M. Anver, and G. Merlino. 1998. c-Met autocrine activation induces development of malignant melanoma and acquisition of the metastatic phenotype *Cancer Res* 58:5157-5162.

149. Merlino, G., and F.P. Noonan. 2003. Modelling gene-environment interactions in malignant melanoma. *Trends Mol Med* 9:102-108.

150. Kricker, A., B.K. Armstrong, and D.R. English. 1994. Sun exposure and non-melanocytic skin cancer. *Cancer Causes Control* 5:367-392.

151. Recio, J.A., F.P. Noonan, H. Takayama, M.R. Anver, P. Duray, W.L. Rush, G. Lindner, E.C. De Fabo, R.A. DePinho, and G. Merlino. 2002. Ink4a/arf deficiency promotes ultraviolet radiation-induced melanomagenesis. *Cancer Res* 62:6724-6730.

152. Kato, M., W. Liu, H. Yi, N. Asai, A. Hayakawa, K. Kozaki, M. Takahashi, and I. Nakashima. 1998. The herbal medicine Sho-saiko-to inhibits growth and metastasis of malignant melanoma primarily developed in ret-transgenic mice. *J Invest Dermatol* 111:640-644.

153. Kato, M., M. Takahashi, A.A. Akhand, W. Liu, Y. Dai, S. Shimizu, T. Iwamoto, H. Suzuki, and I. Nakashima. 1998. Transgenic mouse model for skin malignant melanoma. *Oncogene* 17:1885-1888.

154. Rosato, A., A. Zoso, G. Milan, B. Macino, S. Dalla Santa, V. Tosello, E. Di Carlo, P. Musiani, R.G. Whalen, and P. Zanovello. 2003. Individual Analysis of Mice Vaccinated against a Weakly Immunogenic Self Tumor-Specific Antigen Reveals a Correlation between CD8 T Cell Response and Antitumor Efficacy1. *J Immunol* 171:5172-5179.

155. Osen, W., T. Peiler, P. Ohlschlager, S. Caldeira, S. Faath, N. Michel, M. Muller, M. Tommasino, I. Jochmus, and L. Gissmann. 2001. A DNA vaccine based on a shuffled E7 oncogene of the human papillomavirus type 16 (HPV 16) induces E7-specific cytotoxic T cells but lacks transforming activity. *Vaccine* 19:4276-4286.

156. Paschen, A., M. Song, W. Osen, X.D. Nguyen, J. Mueller-Berghaus, D. Fink, N. Daniel, M. Donzeau, W. Nagel, H. Kropshofer, and D. Schadendorf. 2005. Detection of spontaneous CD4+ T-cell responses in melanoma patients against a tyrosinase-related protein-2-derived epitope identified in HLA-DRB1*0301 transgenic mice. *Clin Cancer Res* 11:5241-5247.

157. Inaba, K. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176:1693-1702.

158. Wells, J.W., D. Darling, F. Farzaneh, and J. Galea-Lauri. 2005. Influence of interleukin-4 on the phenotype and function of bone marrow-derived murine dendritic cells generated under serum-free conditions. *Scand J Immunol* 61:251-259.

159. Baumgarth, N., and M. Roederer. 2000. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J Immunol Methods* 243:77-97.

160. Altman, J.D., P.A. Moss, P.J. Goulder, D.H. Barouch, M.G. McHeyzer-Williams, J.I. Bell, A.J. McMichael, and M.M. Davis. 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274:94-96.

161. Engvall, E., and P. Perlman. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8:871-874.

162. Czerkinsky, C.C., L.A. Nilsson, H. Nygren, O. Ouchterlony, and A. Tarkowski. 1983. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 65:109-121.

163. Jimenez, M., K. Kameyama, W.L. Maloy, Y. Tomita, and V.J. Hearing. 1988. Mammalian tyrosinase: biosynthesis, processing, and modulation by melanocyte-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:3830-3834.

164. Jimenez, M., W.L. Maloy, and V.J. Hearing. 1989. Specific identification of an authentic clone for mammalian tyrosinase. *J Biol Chem* 264:3397-3403.

165. Jimenez, M., K. Tsukamoto, and V.J. Hearing. 1991. Tyrosinases from two different loci are expressed by normal and by transformed melanocytes. *J Biol Chem* 266:1147-1156.

166. Aroca, P., K. Urabe, T. Kobayashi, K. Tsukamoto, and V.J. Hearing. 1993. Melanin biosynthesis patterns following hormonal stimulation. *J Biol Chem* 268:25650-25655.

167. Tsukamoto, K., I.J. Jackson, K. Urabe, P.M. Montague, and V.J. Hearing. 1992. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase. *Embo J* 11:519-526.

168. Kroumpouzos, G., K. Urabe, T. Kobayashi, C. Sakai, and V.J. Hearing. 1994. Functional analysis of the slaty gene product (TRP2) as dopachrome tautomerase and the effect of a point mutation on its catalytic function. *Biochem Biophys Res Commun* 202:1060-1068.

169. Zhou, B.K., T. Kobayashi, P.D. Donatien, D.C. Bennett, V.J. Hearing, and S.J. Orlow. 1994. Identification of a melanosomal matrix protein encoded by the murine si (silver) locus using "organelle scanning". *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7076-7080.

170. Kobayashi, T., K. Urabe, S.J. Orlow, K. Higashi, G. Imokawa, B.S. Kwon, B. Potterf, and V.J. Hearing. 1994. The Pmel 17/silver locus protein. Characterization and investigation of its melanogenic function. *J Biol Chem* 269:29198-29205.

171. Staveley-O'Carroll, K., E. Sotomayor, J. Montgomery, I. Borrello, and L. Hwang. 1998. Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1178-1183.

172. Critchley-Thorne, R.J., N. Yan, S. Nacu, J. Weber, S.P. Holmes, and P.P. Lee. 2007. Down-regulation of the interferon signaling pathway in T lymphocytes from patients with metastatic melanoma. *PLoS Med* 4:897-911.

173. Lengagne, R., F.A. Le Gal, M. Garcette, F. Laurence, P. Ave, M. Kato, J.P. Briand, C. Massot, I. Nakashima, L. Renia, J.G. Guillet, and A. Prevost-Blondel. 2004. Spontaneous vitiligo in an animal model for human melanoma: role of tumor-specific CD8+ T cells. *Cancer Res* 64:1496-1501.

174. Tanaka, K., Y. Koga, K. Taniguchi, and K. Nomoto. 1987. T-cell recruitment from the thymus to the spleen in tumor bearing mice: phenotypical alteration and recruitment of thymocytes raised in a tumor bearing state. *Cancer Res* 47:2136-2141.

175. Koni, P.A. 2001. Conditional vascular cell adhesion molecule 1 deletion in mice: impaired lymphocyte migration to bone marrow. *J Exp Med* 193:741-753.

176. Becker, T.C., S.M. Coley, E.J. Wherry, and R. Ahmed. 2005. Bone marrow is a preferred site for homeostatic proliferation of memory CD8 T Cells. *J Immunol* 174:1269-1273.

177. Di Rosa, F., and A. Santoni. 2003. Memory T cell competition for bone marrow seeding. *Immunology* 108:296-304.

178. Baccala, R., and A.N. Theofilopoulos. 2005. The new paradigm of T cell homeostatic proliferation-induced autoimmunity. *Trends Immunol* 26:5-8.

179. Alpdogan, Ö., and M.R.M. van der Brink. 2005. IL-7 and IL-15: therapeutic cytokines for immunodeficiency. *Trends Immunol* 26:56-64.

180. Di Rosa, F., and R. Pabst. 2005. The bone marrow: a nest for migratory memory T cells. *Trends Immunol* 26:360-366.

181. Letsch, A., U. Keilholz, G. Assfalg, V. Mailander, E. Thiel, and C. Scheibenbogen. 2003. Bone marrow contains melanoma-reactive CD8+ effector T cells and, compared with peripheral blood, enriched numbers of melanoma-reactive CD8+ memory T cells. *Cancer Res* 63:5582-5586.

182. Wolf, A.M., D. Wolf, M. Steurer, G. Gastl, E. Gunsilius, and B. Grubeck-Loebenstein. 2003. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* 9:606-612.

183. Masopust, D., V. Vezys, A.L. Marzo, and L. Lefrancois. 2001. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* 2413-2417.

184. Pages, F., A. Berger, M. Camus, F. Sanchez-Cabo, A. Costes, R. Molidor, B. Mlecnik, A. Kirilovsky, M. Nilsson, D. Damotte, T. Meatchi, P. Bruneval, P.H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W.H. Fridmann, and J. Galon. 2005. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 353:2654-2666.

185. Choi, C., M. Witzens, M. Bucur, M. Feuerer, N. Sommerfeldt, A. Trojan, A. Ho, V. Schirrmacher, H. Goldschmidt, and P. Beckhove. 2005. Enrichment of functional CD8 memory T cells specific for MUC1 in bone marrow of patients with multiple myeloma. *Blood* 105:2132-2134.

186. Geginat, J., A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2003. Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood* 101:4260-4266.

187. Ye, S.W., Y. Wang, D. Valmori, M. Ayyoub, Y. Han, X.L. Xu, A.L. Zhao, L. Qu, S. Gnjatic, G. Ritter, L.J. Old, and J. Gu. 2006. Ex-vivo analysis of CD8+ T cells infiltrating colorectal tumors identifies a major effector-memory subset with low perforin content. *J Clin Immunol*

188. Guilloux, Y., C. Viret, and N. Gervois. 1994. Defective lymphokine production by most CD8+ and CD4+ tumor-specific T cell clones derived from human melanoma-infiltrating lymphocytes in response to autologous tumor cells in vitro. *Eur J Immunol* 24:1966-1973.

189. Mortarini, R., A. Piris, and A. Maurichi. 2003. Lack of terminally differentiated tumor-specific CD8+ Tcells at tumor site in spite of antitumor immunity to selfantigens in human metastatic melanoma. *Cancer Res* 63:2535-2545.

190. Zippelius, A., P. Batard, and V. Rubio-Godoy. 2004. Effector function of human tumor-specific CD8 Tcells in melanoma lesions: a state of local functional tolerance. *Cancer Res* 64:2865-2873.

191. Viguier, M., F. Lemaitre, and O. Verola. 2004. Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating Tcells. *J Immunol* 173:1444-1453.

192. Serafini, P., I. Borello, and V. Bronte. 2006. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin Cancer Biol* 16:53-65.

193. Zha, Y.Y., C. Blank, and T.F. Gajewski. 2004. Negative regulation of T-cell function by PD-1. *Crit Rev Immunol* 24:229-238.

194. Uyttenhove, C., L. Pilotte, and I. Theate. 2003. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 1269-1274:

195. Grohmann, U., F. Fallarino, and P. Puccetti. 2003. Tolerance, DCs and tryptophan:much ado about IDO. *Trends Immunol* 24:242-248.

196. Bai, L., P. Beckhove, M. Feuerer, V. Umansky, C. Choi, F.S. Solomayer, I.J. Diel, and V. Schirrmacher. 2003. Cognate interactions between memory T cells and tumor antigen-presenting dendritic cells from bone marrow of breast cancer patients: bidirectional cell stimulation, survival and antitumor activity in vivo. *Int J Cancer* 103:73-83.

197. Dunn, G.P., A.T. Bruce, H. Ikeda, L.J. Old, and R.D. Schreiber. 2002. Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3:991-998.

198. Mahnke, Y.D., J. Schwendemann, P. Beckhove, and V. Schirrmacher. 2005. Maintenance of long-term tumour-specific T-cell memory by residual dormant tumour cells. *Immunology* 115:325-336.

199. Schadendorf, D., A. Dorn-Beineke, S. Borelli, G. Riethmuller, and K. Pantel. 2003. Limitations of the immunocytochemical detection of isolated tumor cells in frozen samples of bone marrow obtained from melanoma patients. *Exp Dermatol* 12:165-171.

200. Ghossein, R.A., D. Coit, M. Brennan, Z.F. Zhang, Y. Wang, S. Bhattacharya, A.N. Houghton, and J. Rosai. 1998. Prognostic significance of peripheral blood and bone marrow tyrosinase messenger RNA in malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 4:419-428.

201. Blaheta, H.J., T. Paul, K. Sotlar, M. E., B. Schittek, A. Paul, M. Moehrle, H. Breuninger, B. Bueltmann, G. Rassner, and C. Garbe. 2001. Detection of melanoma cells in sentinel lymph nodes, bone marrow and peripheral blood by a reverse transcription-polymerase chain reaction assay in patients with primary cutaneous melanoma: association with Breslow`s tumour thickness. *Br J Dermatol* 145:195-202.

202. Finn, O.J. 2005. Immune response as a biomarker for cancer detection and a lot more. *N Engl J Med* 353:1288-1290.

VII. Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Beschreibung	Seite
Abb. 1.1	Differenzierungsmodell für Gedächtnis T-Zellen	17
Abb. 2.1	Melanomtypen	20
Abb. 3.1	HGF/SF c-Met Signalkaskade	27
Abb. 3.2	p16 und p19 Signalkaskade	28
Abb. 3.1	Ret-Signalkaskade	29
Abb. 5.1	T-Zell Stimulation mit Con A oder anti-CD3/anti-CD28 Antikörpern	51
Abb. 5.2	MHC-I Tetramer in Interaktion mit dem T-Zell Rezeptor einer $CD8^+$ T-Zelle	55
Abb. 5.3	Kokultur von Tumorlysat beladenen DCs mit T-Zellen aus dem Knochenmark von Ret-tg oder Ret-tg tu Mäusen	59
Abb. 5.4	Prinzip der LSAB Methode in der Immunhistochemie	60
Abb. 6.1	DNA-Typisierung der Nachkommen von Ret-tg Mäusen	62
Abb. 7.1	IFN-γ und IL-2 Produktion von Milzzellen nach unspezifischer Stimulation	63
Abb. 7.2	IFN-γ und IL-2 Produktion von Lymphknotenzellen nach unspezifischer Stimulation	65
Abb. 7.3	Ova- und TRP-2 Tetramerfärbung auf spezifischen $CD8^+$ T-Zelllinien	66
Abb. 7.4	Ovalbumin Tetramerfärbung von Milzzellen aus C57Bl/6 wt und Ret-tg Mäusen	67
Abb. 7.5	Ex vivo ELISPOT nach Immunisierung mit Ova in C57Bl6 wt und Ret-tg Mäusen	68
Abb. 7.6	TRP-2 Tetramerfärbung von Milzzellen aus C57Bl/6 wt und Ret-tg Mäusen	69
Abb. 7.7	Ex vivo ELISPOT nach Immunisierung mit TRP-2 in C57Bl6 wt und Ret-tg Mäusen	70

Abbildung	Beschreibung	Seite
Abb. 8.1	Phaenotypen von Ret-tg Mäusen	71
Abb. 8.2	Tumorentwicklung und Inzidenz in Ret-tg Mäusen	72
Abb. 8.3	Tumorlokalisation in Ret-tg tu Mäusen	72
Abb. 8.4	Expression von melanomassoziierten Antigenen in Tumoren von Ret-tg tu Mäusen	73
Abb. 8.5	Phänotyp der Lymphknoten in Ret-tg tu Mäusen und Expression von TRP-2 in Lymphknoten von C57Bl/6 wt und Ret-tg tu Mäusen	74
Abb. 8.6	Expression von TRP-2 in Lymphknoten von Ret-tg Mäuse	74
Abb. 9.1	Gating-Strategie für Zellen aus Knochenmark, Milz und Tumor	76
Abb. 9.2	$CD4^+$ und $CD8^+$ Gedächtnis T-Zellen aus dem Knochenmark von C57Bl/6, Ret-tg und Ret-tg tu Mäusen	77
Abb. 9.3	$CD4^+$ und $CD8^+$ Gedächtnis T-Zellen aus der Milz von C57Bl/6, Ret-tg und Ret-tg tu Mäusen	79
Abb. 9.4	Vergleich von $CD4^+$ und $CD8^+$ Gedächtnis T-Zellen im Tumor mit denen in den lymphatischen Organen aus Ret-tg tu Mäuse	80
Abb. 10.1	Gating-Strategie für TRP-2-spezifische Gedächtnis T-Zellen	82
Abb. 10.2	TRP-2-spezifische T-Zellen im Knochenmark von Ret-tg und C57Bl/6 wt Mäusen	83
Abb. 10.3	Vergleich der $CD8^+$ Subpopulationen von TRP-2-spezifischen Gedächtnis T-Zellen mit denen der gesamten $CD8^+$ Population	83
Abb. 10.4	Frequenz und Verteilung TRP-2-spezifischer T-Zellen im Knochenmark von Ret-tg und C57Bl/6 wt Mäusen	84
Abb. 10.5	Vergleich der $CD8^+$ Subpopulationen von TRP-2-spezifischen Gedächtnis T-Zellen mit denen der gesamten $CD8^+$ Population	85
Abb. 10.6	TRP-2-spezifische Gedächtnis T-Zellen im Vergleich zwischen Knochenmark und Tumor und Anteil der Gedächtnis T-Zellen an der TRP-2- spezifischen Population im Tumor	85
Abb. 10.7	Vergleich der $CD8^+$ Subpopulationen von TRP-2-spezifischen Gedächtnis T-Zellen mit denen der gesamten $CD8^+$ Population in Tumoren	86

Abbildung	Beschreibung	Seite
Abb. 10.8	TRP-2-spezifische Gedächtnis T-Zellen im Vergleich zwischen Knochenmark, Tumor und Milz und Anteil der Gedächtnis T-Zellen an der TRP-2-spezifischen Population in der Milz	87
Abb. 10.9	Vergleich der $CD8^+$ Subpopulationen von TRP-2-spezifischer Gedächtnis T-Zellen mit denen der gesamten $CD8^+$ Population in der Milz von Ret-tg tu Mäusen	87
Abb. 11.1	Expression der Oberflächenmoleküle CD11c, MHC-II, CD40 und CD86 auf DCs	89
Abb. 11.2	Aufnahme Effizienz von FITC Dextran durch DCs	90
Abb. 11.3	Anreicherung von T-Zellen aus dem Knochenmark mit Hilfe von negativer Selektion	91
Abb. 11.4	IFN-γ Produktion von T-Zellen aus dem Knochenmark von Ret-tg tu Mäusen nach Stimulation mit Tumorantigen beladenen DCs	92
Abb. 11.5	IFN-γ Produktion von T-Zellen aus dem Knochenmark von Ret-tg Mäusen nach Stimulation mit Tumor Antigen beladenen DCs	94

Abkürzungsverzeichnis

A

Abb.	Abbildung
ADCC	Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität

B

BSA	Bovine serum albumin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise

C

cAMP	cyclic adenosine monophosphate
Cat.	Katalognummer
CCL	Chemokin Ligand
CCR	Chemokin Rezeptor
CD	cluster of differentiation
cdk	cyclin-dependent kinase
cm	Zentimeter
CM	central memory
Con A	Concanavalin A
CTL	cytotoxic T lymphocyte
CTLA	cytotoxic T lymphocyte associated
°C	Grad Celsius

D

DC	dendritische Zelle
dd	doppelt destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure

E

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ELISPOT	Enzyme linked immunospot
EM	effector memory

F

FACS	fluorescent activated cell sorting
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Floureszin-Isothiocyanat
FSC	forward scatter

G

g	Gramm
g	Erdbeschleunigung, $g = 9{,}81 m/s^2$
GITR	Glukocortikoid induzierter TNF Rezeptor
GM-CSF	granulocyte/macrophage colony stimulating factor

H

h	Stunde
HGF/SF	hepatocyte growth factor/ scatter factor
HRP	Meerrettich Peroxidase
H_2O	Wasser

I

ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IDO	indoleamin 2,3-dioxygenase
IFA	incomplete Freund`s adjuvant
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

L

l	Liter

M

MAA	Melanom-assoziiertes Antigen
mDCs	myeloide dendritische Zellen
MHC	major histocompatibility complex
MIC	MHC class I chain-related protein
min	Minute
M	Molar (mol/l)
mM	Millimolar
ml	Milliliter
mg	Milligramm
mm	Millimeter
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
MNC	Mononukleäre Zellen
mRNA	messenger RNA

N

NK-Zelle	natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
n	Anzahl

O

Ova	Ovalbumin

P

%	Prozent
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pDCs	plasmazytoide dendritische Zellen
pg	Pikogramm

R

Ret tg	Ret transgen tumorfrei
Ret tg tu	Ret transgen tumortragend
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur

S

SSC	Side scatter

T

Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
tg	transgen
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Treg	regulatorische T-Zellen
TRP	tyrosinase related protein

U

U	Unit
ULBP	UL16 bindende Proteine
UV	Ultraviolett

V

VEGF	vascular endothelial growth factor
vgl.	vergleiche
V	Volt
v/v	volume per volume

W

WHO	Weltgesundheits-organisation
wt	Wildtyp
w/v	weight per volume

Z

z.B.	zum Beispiel

Für die Unterstützung während der Zeit meiner Doktorarbeit möchte ich mich ganz herzlich bein folgenden Personen bedanken:

- Als erstes gilt mein Dank natürlich Dr. Viktor Umansky, der mir das Projekt zur Verfügung gestellt und mich über die letzten 3 ½ Jahre hinweg unermüdlich betreut hat. Danke für die Geduld, die moralische Unterstützung und die vielen anregenden Diskussionen
- Danke auch an Prof. Dr. Dirk Schadendorf der mit vielen konstruktiven Vorschlägen meine Arbeit bereichert hat.
- Ich danke auch Prof. Dr. Lutz Gissmann für die Übernahme des Zweitgutachtens

Weiterhin vielen Dank an:

- Kathrin Frank für die kompetente Unterstützung bei den immunhistochemischen Färbungen und der anfallenden Mausarbeit
- Dem gesamten Team, für eine gute Atmosphäre in und außerhalb des Labors und eine stetige Hilfsbereitschaft: Silvia Kimpfler, Christiane Meyer, Fang Zhao und Hiltrud Schönhaber
- Dr. Wolfram Osen für die Bereitstellung wichtiger Materialien und Protokolle und die bereitwillige Beantwortung vieler Fragen.
- Dr. Jan Müller-Berghaus für viele anregende Diskussionen zum Thema FACS
- Meine Frau Anette Abschütz für die moralische Unterstützung und die viele Geduld