

Antitumorale Wirkungen von Typ I Interferon

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Birgit Susanne Roederstein

aus Bonn

August 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Blankenstein

2. Gutachter: Prof. Dr. Carsten Niemitz

Disputation am 04. Juni 2008

Diese Arbeit widme ich dem
KAKER OF THE UNIVERSE

Danksagung

Der Dank für das Mitwirken an dieser Dissertation geht an folgende Personen:

Großer Dank geht an Professor Blankenstein für die kritischen Diskussionen und für die Betreuung dieser Dissertation. Dr. Ulrich Kalinke und Dr. Thomas Hinz danke ich für die Bereitstellung eines exzellenten Arbeitsumfeldes in Langen. Besonderer Dank geht an Dich, Ulrich, da Du mit Ideen und unverwüstlichem Optimismus den größten Anteil am Gelingen dieser Arbeit hast. Danke für die Unterstützung auch in schwierigen Zeiten.

Dr. Thomas Schüler danke ich für die hilfreichen Diskussionen bezüglich dieser Arbeit.

Klaus Rajewski danke ich für die Bereitstellung der Cre-Deleter- und CD19-Cre Mäuse, Christopher B. Wilson für die CD4-Cre Mäuse, Michel Aguet für die IFNAR^{-/-} Mäuse, Gerd Sutter für die depletierenden Antikörper und Kay-Martin Hanschmann für die statistische Analyse der Daten, Dorothea Kreuz und Sabine Falk für die exzellente technische Betreuung.

An die Mädels im Labor: Mit Euch zu arbeiten war richtig schön, erst beim Zusammenschreiben kriegt man 'nen Fön. Nun zum Schluß such ich Euch heim mit einem vorbildlichen Reim – ihr bleibt der Forschung wirklich treu, dafür verdien ich bald Geld wie Heu. Haha!

Kathrin Schmale, Kika Roederstein, Tina Pieper und Martin Hamelmann danke ich für die tatkräftige und rücksichtslose Unterstützung.

Meinen Eltern, Annerose & Manfred Wilkening und Uschi & Kurt Hilger – danke.

Besonderer Dank geht an Ulrich Wilkening. Danke für die 10 wunderschönen Jahre Flonzmeister. Es war Dein gutes Recht. Gruß von BT.

Jule Roederstein, Anja Jenniches und Uschi Hilger, ihr seid eine Gabe Jehova Gottes. Danke, dass ihr mich in der schweren Zeit getragen habt.

Julchen, „de Kaker“, du bringst mich mit Deinem großen goldenen Herz, Deinem Humor, Deinem Verständnis und Deiner Aufrichtigkeit immer wieder an die Sonnenseite des Lebens! Du hast großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit und daher ist sie Dir, kleines Schwesterherz, gewidmet.

Dankeschön

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB432, B15) und der Volkswagen Stiftung gefördert.

Inhaltsverzeichnis

<i>Danksagung</i>	<i>I</i>
1 Einleitung	1
1.1 Erkennung von Tumorzellen durch Immunkomponenten	1
1.2 Interferone und Tumorthherapie	4
1.3 Experimentelle Modelle und Zielsetzung	6
2 Material	8
2.1 Versuchstiere	8
2.2 Antikörper	8
2.3 Oligonukleotide	9
2.4 Reaktionskits	9
3 Methoden	10
3.1 Tumorzelllinien	10
3.2 Tumorexperimente	10
3.3 Organpräparationen	11
3.4 Rekonstitution des Knochenmarks	11
3.5 Adoptiver Transfer	13
3.6 Depletion von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	14
3.7 Restimulation von Splenozyten und Chromfreisetzungstest	14
3.8 Detektion von Transkripten	14
3.9 Erstellung konditioneller IFNAR ^{flox/flox} Mäuse	15
3.10 Enzyme-Linked-ImmunoSorbentAssay (ELISA)	15
3.11 Statistik	16
4 Ergebnisse	17
4.1 Auswirkungen von IFN-I auf das maligne Melanom	17
4.2 Auswirkung von IFN-I auf das Lewis Lung Karzinom	34

5	<i>Diskussion</i>	42
5.1	Effekte von IFN-I auf das maligne Melanom	43
5.2	Effekte von IFN-I auf das Lewis Lung Karzinom	50
	<i>Zusammenfassung</i>	57
	<i>Summary</i>	58
	<i>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</i>	59
	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	61
	<i>Literatur</i>	62

1 Einleitung

1.1 Erkennung von Tumorzellen durch Immunkomponenten

1.1.1 Tumorantigene

Bereits Anfang des letzten Jahrhunderts vertrat Paul Ehrlich die Ansicht, Krebszellen könnten durch immunologische Mechanismen zerstört werden. Diese These wird durch die heutige Annahme gestützt, dass das Immunsystem die veränderte Struktur und Zusammensetzung der Tumorantigene erkennt.

Tumorzellen weisen eine andere Oberflächenstruktur (Antigene) als gesunde Zellen auf. In Krebszellen versagt die Kontrolle der inneren Zellvorgänge, was z.B. durch Strahlung, Chemikalien, fehlerhafte Reparaturmechanismen, angeborene Gendefekte oder durch eine Infektion mit Viren ausgelöst werden kann. Die Resultate sind unkontrolliertes Wachstum, Funktionsverlust der Zelle, Veränderung ihres Differenzierungsgrades und eine veränderte Zusammensetzung der Antigenstrukturen auf der Zelloberfläche. Bei den Antigenen der Tumorzelle kann es sich um überexprimierte und mutierte Produkte zellulärer Gene und auch um virale Genprodukte handeln [1]. Es wird angenommen, dass vor allem die veränderte Struktur und Zusammensetzung der Tumorantigene vom Immunsystem erkannt werden kann.

1.1.2 Komponenten der antigenspezifischen Erkennung

Die Erkennung der Antigene erfolgt durch spezialisierte Zellen des Immunsystems, den T-Zellen. Diese haben – wie alle Zellen des Immunsystems – ihren Ursprung im Knochenmark. T-Zellen reifen aus lymphoiden Vorläuferzellen über ein CD4-CD8 doppelpositives ($CD4^+ CD8^+$) Stadium im Thymus heran und differenzieren danach zu $CD4^+$ Helferzellen oder $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen (CTL).

CTL erkennen ihr spezifisches Antigen nach dem Schlüssel-Schloss Prinzip nur bei Präsentation durch ein MHC-Klasse I Molekül. $CD4^+$ -Helferzellen erkennen das Antigen nach Präsentation über MHC II Moleküle. Die Abstoßung MHC-Klasse I positiver, Klasse II negativer (MHC-Klasse I⁺ MHC-Klasse II⁻) Tumorzellen wird meist durch CTL vermittelt, wobei eine solche CTL-Antwort von spezifischen $CD4^+$ T-Zellen abhängt [2]. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass $CD4^+$ T-Zellen ebenfalls sehr effizient an der Tumorlyse von MHC-Klasse I⁺ MHC-Klasse II⁻ Tumore beteiligt sein können, wobei diese Wirkung indirekt über MHC-Klasse II⁺ Wirtszellen erfolgt [3]. Damit die von beiden T-Zelltypen abhängige

Immunantwort aktiviert werden kann, müssen Tumorantigene von professionell antigenpräsentierenden Zellen (APC) aufgenommen, prozessiert und über MHC-Moleküle gleichzeitig $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen präsentiert werden.

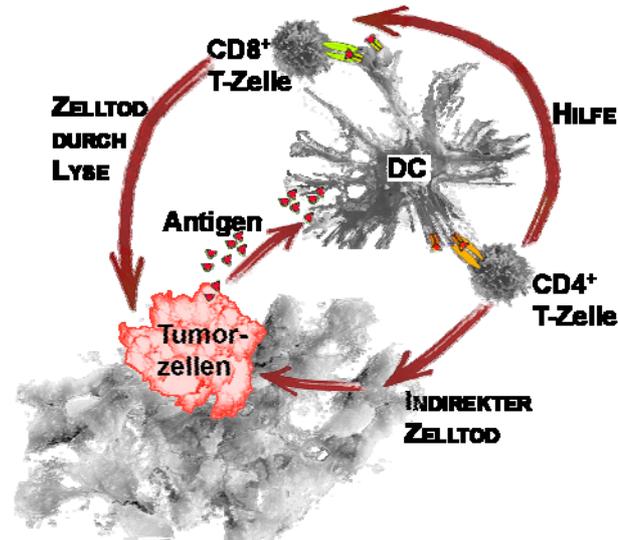


Abb. 1 Modell der antgenspezifischen Aktivierung von T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen

Für die Bildung von Tumorimmunität gegen MHC-Klasse I⁺ MHC-Klasse II⁻ Tumore werden antigenpräsentierende Zellen, hier dendritische Zellen (DC) benötigt, die Tumorantigene aufnehmen und sie T-Zellen über MHC-Klasse I und MHC-Klasse II Moleküle präsentieren. $CD4^+$ Zellen unterstützen die Aktivierung von $CD8^+$ T-Zellen und deren Differenzierung zu CTL, die zur MHC-Klasse I-restringierten Lyse von Tumorzellen befähigt sind. $CD4^+$ Zellen können ebenfalls als potente Effektorzellen bei der Lyse von MHC-Klasse I⁺ MHC-Klasse II⁻ Tumoren fungieren, wobei diese Wirkung indirekt über MHC-Klasse II⁺ Wirtszellen erfolgt.

Die angeborene und ebenfalls die adaptive Immunantwort werden durch dendritische Zelltypen (DC) moduliert. Diese gelten als die relevantesten antigenpräsentierenden Zellen (APC). Normalerweise werden die durch DC extrazellulär aufgenommenen Antigene über MHC II Moleküle präsentiert. Allerdings sind diese Zelltypen (DC) auch in der Lage, Peptide zusätzlich über MHC I Moleküle zu präsentieren. Durch dieses als Cross-Präsentation bezeichnete Phänomen können CTL und damit die spezifische Immunantwort gegen infizierte Zellen aktiviert werden, ohne dass die APC selbst infiziert ist. Virusinfizierte Zellen oder Tumorzellen präsentieren diese intrazellulären Antigene über MHC I Moleküle und werden daraufhin von spezifischen CTL abgetötet.

Die Immunaktivierung erfolgt nur nach einer vorherigen Stimulation der DC. Die Präsentation von Antigenen durch unstimulierte, unreife DC führt zu einer Toleranz durch das Immunsystem [4]. Dies kann sich durch fehlgeleitete Zerstörung von gesundem Gewebe in Autoimmunerkrankungen wie z.B. Lupus Erythematosus oder Multipler Sklerose äußern.

Die Stimulation der DC erfolgt in der angeborenen Immunität durch Detektion von Pathogenkomponenten über unterschiedliche Rezeptortypen wie NOD-like, Toll-like (TLR) oder

RIG-I. Vor allem die Detektion milieufremder Strukturen über TLR leitet in unstimulierten DC deren Reifung ein, die sich phänotypisch in der charakteristischen Ausbildung der Dendriten zeigt. DC entstehen sowohl über myeloide, als auch über plasmazytoide Entwicklungslinien. Dendritische Zellen der myeloiden Linie (mDC) gelten als professionelle APC zur Modulation der Immunantwort und Aktivierung von T-Zellen. Die plasmazytoiden (pDC) gelten als Hauptproduzenten der frühen Zytokine Interferon- α und - β (IFN-I). Vor allem nach Kontakt mit milieufremden Strukturen wie Pathogenen oder Zelltrümmern wird die IFN-I Ausschüttung durch pDC angeregt.

Die Expression ko-stimulatorischer Moleküle wie z.B. B7 und CD40 sind nach der Signalthypothese von Lafferty und Cohen wesentlich für eine Aktivierung von T-Zellen bei der adaptiven Immunität.

An dieser Stelle soll nun vermerkt werden, dass eine strikte Trennung von angeborener und adaptiver Immunantwort nicht mehr angebracht erscheint. Die an der Stimulation der angeborenen Immunität beteiligten Zytokine beeinflussen ebenfalls die adaptive Immunantwort.

1.1.3 Das Tumorstroma

Das Tumorstroma nimmt starken Einfluss auf das Tumorwachstum. Die Umgebung eines etablierten, soliden Tumors setzt sich neben Tumorzellen aus verschiedensten Wirtszellen wie z.B. versorgende Blutgefäße, Endothelzellen, einwandernde Immunzellen und Fibroblasten (Bindegewebszellen) zusammen, die zum Aufbau und Erhalt von Geweben notwendig sind. Dieses Gemisch wird als Stroma bezeichnet. Es stellt Wachstumsfaktoren, Blutversorgung, sowie die extrazelluläre Matrix und beseitigt Zelldebris. Bislang wurde angenommen, dass die Abstoßung transplantiertter Tumorzellen ausschliesslich über die direkte Lyse durch T-Zellen erfolgt. Es gibt jedoch vermehrt Hinweise, dass T-Zellen durch Zytokinausschüttung über das Tumorstroma wirken können, womit das Tumorstroma eine beachtenswerte Rolle bei der Tumorabstoßung erhält.

1.1.4 Die Immunogenität von Tumoren

Ein Tumor, der eine Immunantwort auslöst, wird als immunogen bezeichnet. Bei der Entstehung der Tumorzellen werden spontan entstandene Tumore von virusinduzierten Tumoren unterschieden. Virusinduzierte Tumore erweisen sich in der Regel als immunogener als spontan entstandene Tumore. Immunogenität als Eigenschaft einer Tumorzelle ist aller-

dings nicht absolut definierbar, da Modifikation der Tumorzelle mit immunstimulierenden Komponenten diese verändern kann.

Versuche mit Mäusen zeigen, dass Tumorantigene viralen Ursprungs protektive Immunität induzieren. Zudem ermöglicht eine Immunisierung mit lethal bestrahlten Tumorzellen oder den entsprechenden Tumorantigenen eine Abstoßung lebender Tumorzellen.

Genetisch modifizierte Tumorzellen, die Zytokine oder B7 exprimieren, verbessern die Tumorabwehr [5, 6]. Immunisierungen mit parentalen Tumorzellen oder die Mischung solcher Tumorzellen mit Adjuvantien, die Pathogenrückstände enthalten führen zu einer Erhöhung der Immunogenität [7]. Die Stimulation von APC durch Adjuvantien führt zur DC-Reifung, der Expression immunstimulatorischer Moleküle wie B7 oder zur Ausschüttung von Zytokinen wie IFN-I.

Die Verwendung *in vitro* aktivierter DC, die mit tumorspezifischen Antigenen beladen wurden, fördern die Immunantwort gegen schwach immunogene Tumore in Präsenz von Interferon- α [8]. Spontan entstandene Tumore sind im Gegensatz zu chemisch induzierten Tumoren nur schwach immunogen und führen in Vakzinierungsexperimenten kaum zur Bildung von Tumormunität.

Das durch Mausexperimente erlangte Wissen über Tumorantigene viralen Ursprungs führte dazu, dass es im Menschen neuerdings möglich ist, durch Impfung gegen Komponenten des Humanen Papillomavirus (HPV) vor Gebärmutterhalskrebs zu schützen, der hauptsächlich durch dieses Virus induziert wird [9].

1.2 Interferone und Tumorthherapie

Zwei Typen von Interferon werden unterschieden: Zu Typ I Interferon (IFN-I) zählen alle Varianten des Interferon- α (IFN- α) und Interferon - β (IFN- β). Das Interferon- γ wird als Typ II Interferon (IFN-II) bezeichnet, welches ebenfalls großen Einfluss auf das Tumorstadium nimmt.

IFN-I wird nach Erkennung von „Gefahrpotential“ (bakterielle, virale oder milieufremde Substanzen) mittels der spezialisierten plasmazytoiden DC in großen Mengen 12-18 h nach Detektion produziert.

Der Typ I Interferonrezeptor (IFNAR) erkennt sowohl alle IFN- α Varianten, als auch IFN- β und führt am Ende der Signalkette zur Regulation von weit über hundert Genen. Dies führt u.a. zu einem verlangsamtem Wachstum der Zelle, einer verstärkten Antigenprozessierung und erhöhter Antigenpräsentation.

Im Falle einer Virusinfektion dämpfen die antiproliferativen Effekte die Virusproduktion in der infizierten Zelle. Hinzu kommen ein wesentlich effizienterer Abbau von Virus-Bestandteilen und eine beschleunigte Präsentation an der Zelloberfläche. Dies fördert eine spezifische Erkennung und frühzeitige Elimination durch das Immunsystem.

1.2.1 Das maligne Melanom wird mit IFN- α therapiert

Der Einfluss von IFN-I bei einer Virusinfektion ist bereits eingehend erforscht. Seit 1980 rückt nun die Einflussnahme von IFN-I auf das Tumorwachstum in den Vordergrund [10, 11]. Gresser und Belardelli demonstrierten erstmals eine Verzögerung des Tumorwachstums durch IFN-I in Mäusen, die durch Antikörperbehandlung eine IFN-I Depletion aufwiesen [12]. Später zeigten IFNAR-defiziente (IFNAR^{-/-}) Mäuse ein beschleunigtes Wachstum transplantierter Melanome [13]. Es ist unklar, ob die Effekte durch konstitutiv exprimierte, geringe Mengen an IFN-I hervorgerufen werden [11], oder durch eine spontane, lokale Induktion von IFN-I z.B. durch nekrotische Tumorzellen oder weitere Mechanismen [14, 15].

Der antitumorale Einfluss wurde vorerst auf einen antiproliferativen Effekt auf die Tumorzellen zurückgeführt. Diese antiproliferative Effekt führte zum Einsatz von rekombinanten IFN- α 2 als Adjuvanz bei der Therapie des malignen Melanoms, in der es die Regression der Tumore unterstützt. Die Isolation IFN-I resistenter Melanomzellen aus Patienten erhärtete die These, dass sich die Tumorzellen dem direkten antiproliferativen Einfluss des IFN-I entzogen [16, 17]. Im Laufe der Jahre ergaben sich jedoch vermehrt Hinweise darauf, dass die antitumorale Wirkung des IFN-I weitaus vielfältiger ist und vor allem Effekte auf Zellen des Wirts ausübt.

Kürzlich wurde gezeigt, dass das Wachstum von immunogenen Sarkomen durch den Einfluss von IFN-I auf Immunzellen inhibiert wurde [18]. Transfizierte murine Tumorzellen, welche konstitutiv IFN-I exprimieren, zeigten nach Transplantation verlangsamte Wachstumskinetiken und seltenere Ausbildung von Tumoren [8, 19-21]. IFN-I wirkt blutgefäß-reduzierend (antiangiogenetisch), was das Wachstum solider Tumoren einschränkt. Weiterhin stimuliert IFN-I die Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Speziell die

Reifung und die Kreuzpräsentation (“*cross priming*”) von DC wird unterstützt [22, 23], während IFN-I ebenfalls direkten Einfluss auf T-Zellen [24-26] nimmt. Im Fall von IFN- α 2 produzierenden B16-F10 Mausmelanomzellen (B16mIFN) korrelierte ein verlangsamtes Wachstum mit auftretenden tumorspezifischen CTL Antworten [8]. Inwiefern IFN-I antitumorale Effekte über unspezifische, natürliche Killerzellen (NK) ausübt, bleibt zu klären [27].

Diese Fakten führten zu der Fragestellung, auf welche Weise IFN-I die antitumorale Wirkung im malignen Melanom entfaltet. Nur durch ein genaues Verständnis aller Vorgänge lassen sich Therapien optimieren. Daher konzentriert sich diese Arbeit auf die bislang unvollständig erforschte Wirkungsweise des zur Therapie von Melanompatienten genutzten IFN-I im Mausmodell. Für ein tieferes Verständnis des Einflusses von endogenem IFN-I auf spezifische CTL bei einer antitumoralen Immunantwort wurde als weiteres Modell das Lewis Lung Karzinom A9_{GP33} zu den Untersuchungen hinzugezogen.

1.3 Experimentelle Modelle und Zielsetzung

Die Arbeit wurde im experimentellen Maussystem durchgeführt. Hauptsächlich wurde eine definierte Menge von Tumorzellen zwei verschiedener Modelle in syngene WT, IFNAR-KO, Knochenmarkchimären und konditionelle Mäuse transplantiert. Das Wachstum, die Blutgefäßdichte und die Zytokinexpression der Tumore wurden verglichen und die antitumorale Wirkungsweise des IFN-I zelltypgenau entschlüsselt.

1.3.1 Das murine maligne Melanom B16

Das murine maligne Melanom B16 dient als Modell des schwach immunogenen humanen malignen Melanoms. Transgene murine B16-Melanomzellen (B16mIFN) exprimieren das therapeutisch genutzte Zytokin Interferon- α 2, so dass die Effekte von IFN- α bei einer therapieinduzierten Immunantwort analysiert werden können. B16mIFN dient zur Untersuchung der Auswirkung von lokal vorhandenem IFN-I im Tumor. Wachstumsanalysen und histologische Untersuchungen geben einen Einblick in die antitumorale Wirkungsweise des IFN-I im malignen Melanom.

1.3.2 Das GP33 exprimierende Lewis Lung Karzinom

In dieser Arbeit wird mittels der GP33 exprimierenden Variante A9_{GP33} des Lewis Lung Karzinoms A9 der Einfluss von endogen induziertem IFN-I auf spezifische T-Zellantworten untersucht. WT Mäuse stoßen transplantierte A9_{GP33} Zellen ab.

Diese transgene Variante exprimiert das H-2^b restringierte T-Zellepitop des Glykoproteins 33 (GP33) aus dem Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) als Neotumorantigen. Für das Peptid GP33 existieren etablierte Mausmodelle, die eine Analyse der GP33-spezifischen T-Zellantwort ermöglichen.

2 Material

2.1 Versuchstiere

Verwendet wurden verschiedene Mauslinien, die spezifisch pathogenfrei (SPF) in der Tierhaltung des Paul-Ehrlich-Instituts gezüchtet wurden. Alle in dieser Arbeit verwendeten Mäuse, bis auf die Linien SV129 und Balb/c, besaßen den C57BL/6 Genotyp (WT). Die IFNAR^{-/-} Mäuse von Aguet wurden 20x auf diesen C57BL/6 Genotyp zurückgekreuzt.

Für kongene Mäuse gilt per Definition: diejenigen Isoformen von Proteinen, welche in der verwendeten WT Standardmauslinie auftreten, erhalten die Kennung Punkt-zwei. Bsp.: Eine Mauslinie besitzt eine von zwei unterscheidbaren Varianten des T-Zelloberflächenproteins CD90. Die gängige Standard-Mauslinie exprimiert demnach per Definition die Variante CD90.2.

Tabelle 1 Zur Dissertation verwendete Mauslinien

Mausstamm	Besonderheiten	Hersteller/Referenz
C57BL/6	Standard C57BL/6 Mauslinie CD45.2 (Ly5.2), in dieser Arbeit als Wildtyp (WT) bezeichnet	Charles River
C57BL/6 Ly5.1 Cre-Deleter	Kongen zu WT, exprimieren CD45.1 (Ly5.1) Cre-Rekombinaseaktivität in allen Zellen	Charles River No. 002014 [28]
CD19-Cre	Cre-Rekombinase in B Zellen	[29]
CD4-Cre	Cre-rekombinase in CD4 ⁺ Zellen (Zellen CD4 ⁺ CD8 ⁺ doppelt positiv bei Thymusreifung)	[30]
H8	das LCMV-GP33 Peptid wird ubiquitär überexprimiert, gelten daher als GP33 tolerant	H.P. Pircher, Freiburg
IFNAR ^{-/-}	Interferon-Typ I Rezeptor-Defizienz auf allen Zellen	[31] Ulrich Kalinke, 20x rückgekreuzt auf C57BL/6
IFNAR ^{flox/flox}	Exon 10 gefloxt	Ulrich Kalinke
IFNAR-T	CD4Cre x IFNAR ^{flox/flox} Interferonrezeptor-Defizienz auf T-Zellen	Eigene Zucht, Kalinke
IFNAR-B	CD19Cre ^{+/-} x IFNAR ^{flox/flox} Interferonrezeptor-Defizienz auf B-Zellen	Eigene Zucht, Kalinke
IFNAR-BT	CD4CD19Cre x IFNAR ^{flox/flox} Interferonrezeptor-Defizienz auf T- und B-Zellen	Eigene Zucht, Kalinke
LysMCre	LysMCre x IFNAR ^{flox/flox} Interferonrezeptor-Defizienz auf der myeloiden Zelllinie	Eigene Zucht, Kalinke
P14 (127)	TCR-transgene Maus spezifisch für LCMV-Peptid GP33, T-Zelloberflächenprotein Thy1.1+	H.P. Pircher, Freiburg
RAG ^{-/-}	Entwickeln keine funktionsfähigen T- und B-Lymphoyten	[32]

2.2 Antikörper

Zur Detektion von Oberflächenantigenen per Durchflusszytometrie (FACS) im LSRII (BD) wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper von BD (Becton Dickinson) verwendet. Die jeweiligen Antikörper sind im Methodenteil im Absatz 3.4 und 3.6 beschrieben.

2.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide (Primer) zur Detektion von GAPDH-, CXCL10 (IP-10)- und CXCL11 (I-TAC)-Transkripten. Die Sequenzen für die Primer zur Detektion der Chemokine wurden freundlicherweise von Dr. Stefano Indraccolo, Padua, Italy bereitgestellt.

Tabelle 2 Primersequenzen

Primer	Transkript	Sequenz
GAPDH for GAPDH rev	GAPDH	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'
muIP10 for muIP10 rev	murines IP-10, CXCL10	5'-ACCATGAACCCAAGTGCTGCCGTC-3' 5'-GCTTCACTCCAGTTAAGGAGCCCT-3'
muITAC for muITAC rev	murines I-TAC, CXCL11	5'-AGGAAGGTCACACCATAGC-3' 5'-CAGGTTCTCGGCACAGAGTT-3'

2.4 Reaktionskits

Tabelle 3 Reaktionskits

Reaktionskit	Hersteller
ELISA Mouse Interferon- α (#42100-1)	PBL Biomedical Laboratories
Superscript reverse transcription kit (#18064-014)	Invitrogen
VenorGeM Mycoplasma PCR Detection Kit (#VGM-100)	Minerva Biolabs
PCR Kit HotStar Taq DNA Polymerase (#203205)	Qiagen

3 Methoden

3.1 Tumorzelllinien

Während dieser Arbeit wurde mit zwei Tumorzelllinien gearbeitet, dem malignem Melanom B16 und dem Lewis Lung Karzinom A9. Für beide Linien stand zusätzlich jeweils eine transgene Variante zur Verfügung, die Interferon- α 2 exprimierende B16 Variante B16mIFN und die GP33 exprimierende A9 Variante A9_{GP33}. Beide Tumorzelllinien wurden in DMEM (GIBCO #31966-021, Natriumpyruvat, Glucose und Glutamax bereits enthalten) und 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FCS) unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) in Zellkulturflaschen (Greiner) kultiviert. Die transgene B16mIFN Zelllinie wurde durch Zusatz von 1250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Geneticin (GIBCO #10131-019), die Tumorzelllinie A9_{GP33} mit 800 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Geneticin selektiert. Die Zellen wurden bei Erreichen einer Konfluenz von 95 % durch Ablösen mit 0,5 % Trypsin (Medienküche PEI) in PBS (Medienküche PEI) geteilt.

3.2 Tumorexperimente

Tumorzellen wurden ca. 7-10 Tage vor Injektion in die Mäuse durch tropfenweises Zugeben von 37 °C warmem Medium aufgetaut, in PBS gewaschen (1100 rpm 3 min) und je nach Bedarf unter G418 Selektion kultiviert und expandiert. 2-3 Tage vor Injektion wurden die Zellen ohne Antibiotika inkubiert, mit 0,5 % Trypsin (Medienküche PEI) abgelöst, die Reaktion mit serumhaltigem Medium abgestoppt und die Zellen mit PBS (Gibco #100 10-015) gewaschen (1100 rpm 3 min). Das Pellet wurde in 10 ml PBS aufgenommen, gezählt und auf die gewünschte Konzentration in PBS eingestellt. 10^5 oder 10^6 B16 oder B16mIFN Tumorzellen, und 10^6 oder 10^7 A9 oder A9_{GP33} Tumorzellen wurden in einem Volumen von 50 μl oder 100 μl intradermal in 8-16 Wochen alte, rasierte Mäuse (Tabelle 1) injiziert. Mäuse wurden dazu mit dem Inhalationsnarkotikum Isofluran (Curamed) betäubt.

3.2.1 Immunisierungen

Für Immunisierungsexperimente wurden 10^5 B16mIFN oder 10^7 bestrahlte A9_{GP33} Tumorzellen in die linke Flanke injiziert und fünf - sieben Tage später eine identische Menge des entsprechenden zweiten Tumors in die rechte Flanke. Die Tumordurchmesser wurde alle 2-3 Tage erhoben und das Tumolvolumen [V] nach folgender Formel berechnet:

$V[\text{mm}^3] = \text{Durchmesser1}[\text{mm}] (\text{Durchmesser2}[\text{mm}])^2 \times 0,5$. Der grössere Durchmesser wurde als Durchmesser1 definiert.

3.3 Organpräparationen

3.3.1 Milz

Die durch Genickbruch getötete Maus wurde auf der rechten Seite liegend mit Präparierbesteck (Hauptner/Herberholz) eröffnet. Die Milz wurde entnommen, zur Erstellung einer Einzelzellsuspension mechanisch zerkleinert und in PBS aufgenommen. Nach Zählen der Zellen in 0,4 %iger Trypanblaulösung in der Thomakammer konnten die Zellen je nach Bedarf weiterverwendet werden.

3.3.2 Knochenmark

Femur und Tibia eines Beines wurden steril entnommen, in 70% Ethanol kurz sterilisiert und die Knochenenden entfernt. Das Knochenmark wurde über eine Spritze (Braun, 25 G Kanüle Henke Sass Wolf) mit ca. 4-5 ml PBS pro Knochen ausgespült und durch pipettieren suspendiert. Nach Pelletieren (1100 rpm, 6 min) wurde eine Erythrozytenlyse mit 1,5 ml RBC-Lysepuffer (Sigma-Aldrich) pro Bein 1 min bei RT durchgeführt. Nach Waschen und zählen eines Aliquots der Zellen in 0,4 %iger Trypanblaulösung in der Thomakammer wurden die Zellen für weitere Verwendung auf die gewünschte Konzentration in PBS eingestellt.

3.3.3 Tumore

Tumore wurden aus der getöteten Maus isoliert und für histologische Untersuchungen in Tissue Tek (Miles Inc., Elkhart, USA# 4583) luftblasenfrei eingebettet, in flüssigen Stickstoff gefroren und für spätere Schnitte bei -80 °C verwahrt.

3.4 Rekonstitution des Knochenmarks

Das Immunsystem von Organismen kann durch Knochenmarkrekonstitution ausgetauscht werden da dieses im Knochenmark gebildet wird. Durch sorgfältige Wahl und durch Kombinationen verschiedenen Knochenmarks können Einflüsse von Zytokinen, Rezeptoren, aber auch ganzer Zelltypen des Immunsystems auf das jeweilige zu untersuchende (Krankheits-) Modell analysiert werden. Zusätzlich werden Einblicke gewonnen, inwieweit Nicht-Immun-

zellen des Körpers Einfluss auf Krankheitsverläufe nehmen, und von welchen Faktoren dieser Einfluss abhängt.

Für eine Rekonstitution wurden acht bis zehn Wochen alte Rezipienten-Mäuse lethal mit 11 Gy (1100 rad) bestrahlt, wodurch die sich teilenden Zellen im Knochenmark absterben. 24 h später wurden Knochenmarkszellen aus unbehandelten, gleichgeschlechtlichen und CD45-congenen Donormäusen isoliert (Tabelle 1). $5 \cdot 10^6$ in 200-300 μ l PBS (Gibco #100 10-015) gelösten Knochenmarkszellen wurden nach Erythrozytenlyse intavenös in die Schwanzvene der Rezipienten injiziert. Während der folgenden sechs bis acht Wochen wächst das transplantierte Knochenmark an, wobei die Tiere in dieser Zeit und vor allem während der ersten Woche generell sehr empfänglich für Infektionen waren. Häufig wird aus diesem Grund zusätzlich Antibiotikum ins Trinkwasser gegeben, das zusätzlich die Darmflora schädigt und dessen Dosierung nicht überprüft werden kann. Durch den Hygienestandard der Maushaltung am Paul-Ehrlich-Institut konnte auf die zusätzliche Gabe von Antibiotikum verzichtet werden.

So genannte „Mix-Knochenmarkchimären“ wurden erstellt, indem $2,5 \cdot 10^6$ Zellen aus RAG^{-/-} Knochenmark mit der gleichen Menge C57BL/6 oder IFNAR^{-/-} Knochenmark gemischt und dann in bestrahlte RAG^{-/-} Rezipienten injiziert wurde. Dadurch wurden Mäuse generiert, die den später gezüchteten konditionellen IFNAR-T Mäusen ähneln (siehe 2.1).

Nach sechs bis acht Wochen wurde die Effizienz der Rekonstitution per durchflusszytometrischer (FACS) Analyse ermittelt.

3.4.1 Die Analyse der Rekonstitutionseffizienz

Zur Analyse der Rekonstitutionseffizienz per FACS wurde den Mäusen (Tabelle 1) anschließend an die Knochenmarkstransplantationen retroorbital Blut entnommen (BD Microtainer LH #365966) und in der Kombination CD3, CD45.1, CD45.2 und CD45R/B220 (BD) gefärbt. Dazu wurden 10 μ l Vollblut pro Tier in FACS Röhrchen (Becton Dickinson) mit den vorher titrierten Mengen an CD45.2-FITC (Becton Dickinson #553772) CD45.1-PE (Becton Dickinson #553776), CD3e-Alexa-Fluor647 (Becton Dickinson #557869), und CD45R/B220-PerCP #553093) 20 min bei 4 °C gefärbt. Überschüssige Antikörper wurden durch Waschen mit FACS Puffer [% (w/v) BSA, 0,03 % (w/v) Natriumazid, 20 mM EDTA pH 8,0 in PBS (Gibco #100 10-015)] und anschließendem Pelletieren der gefärbten Zellen bei 1100 rpm 3 min entfernt. Die Zellen waren nach Lyse der Erythrozyten und gleichzeitiger Fixierung der Zellen durch Inkubation mit 500 μ l BD FACS-Lysis solution (BD #340202) im Dunkeln bei

RT, zweimaligen Waschen und Aufnahme in ca. 100 µl FACS Puffer bereit zur Analyse. Die Rekonstitutionseffizienz lag bei ca. 93-97 %. Die verbleibenden 3-7 % vom Rezipienten abstammenden, bestrahlungsresistenten Immunzellen sind zu 98 % CD3 positive T-Zellen.

3.5 Adoptiver Transfer

Als adoptiven Transfer bezeichnet man die Injektion von Zellen in einen Organismus, die oftmals durch Oberflächenproteine oder Farbstoffmarkierung im Blut wiederauffindbar sind. Die Funktion dieser Zellen oder die Reaktion des Immunsystems kann auf diese Weise untersucht werden. Während dieser Arbeit wurden 5×10^7 CFSE markierte, GP33 exprimierende Splenozyten einer H8 Maus in verschiedene Linien von A9_{GP33} Tumor tragenden Mäusen injiziert. Die Reaktion des Immunsystems wurde erfasst, indem zu verschiedenen Zeitpunkten der Verbleib der CFSE markierten Zellen im Blut analysiert wurde.

3.5.1 Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimid Ester (CFSE-) Markierung

Über eine CFSE Markierung kann man die Teilung und die Präsenz von Zellen per durchflusszytometrischer FACS Analyse verfolgen. Bei der funktionellen Gruppe des CFSE (Molecular Probes # C-1157) handelt es sich um Succinimidylester. Eine Spaltung des in die Zelle diffundierten CFSE durch eine intrazelluläre Esterase bewirkt eine transiente Färbung der Zelle, die im FACS Gerät (BD LSRII oder BD FACScan) im FITC-Detektionsbereich gemessen werden kann. 2×10^7 Zellen·ml⁻¹ wurden in 37 °C warmem Färbepuffer (0,1 % BSA in PBS) inkubiert. Die Färbung erfolgt für 10 min mit 1,5 µl einer 0,5 mM CFSE-Stocklösung bei 37 °C. Nach extensivem Waschen mit kaltem Färbepuffer und anschließendem Pelletieren bei 1600 rpm für 6 min können die Zellen im FACS-Gerät (BD LSRII oder BD FACScan) analysiert oder intravenös transferiert (Spritzen: Braun Omnican F 0,3x12 mm) werden.

3.5.2 Analyse der CFSE⁺ Zellen im Blut von Mäusen

Zur Analyse des Anteils von CFSE⁺ Lymphozyten im Blut per Durchflusszytometrie wurden den Mäusen (Tabelle 1) retroorbial Blut entnommen (BD Microtainer LH #365966) und 20µl mit FACS Puffer [% (w/v) BSA, 0,03 % (w/v) Natriumazid, 20 mM EDTA pH 8,0 in PBS (Gibco #100 10-015)] gewaschen. Die Zellen waren nach Lyse der Erythrozyten und gleichzeitiger Fixierung der Zellen durch Inkubation mit 500 µl BD FACS-Lysis solution (BD #340202) im Dunkeln bei RT, zweimaligen Waschen bei 1100 rpm für 3 min und

Aufnahme in ca. 100 μ l FACS Puffer bereit zur Analyse. Der prozentuale Anteil von CFSE⁺ Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation wurde durch eine Quadrantenanalyse bestimmt.

3.6 Depletion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Zur Depletion von CD4 und CD8 positiven T-Zellen (CD4⁺, CD8⁺) wurden 500 μ g eines CD4⁺ depletierenden Antikörpers (GK1.4, Harlan) oder eines CD8⁺ depletierenden Antikörpers (2.43, Harlan) intraperitoneal zwei Tage vor und sechs Tage nach Tumordinjektion injiziert. Die T-Zellen sind für mindestens 20 weitere Tage nach der letzten Injektion quantitativ depletiert, was durch eine FACS Analyse von Vollblut verifiziert wurde.

3.7 Restimulation von Splenozyten und Chromfreisetzungstest

Mäusen wurden subcutan 10^7 A9_{GP33} Tumorzellen injiziert. Sechs bzw. acht Tage später wurden die Milzen dieser Mäuse isoliert. Zusätzlich wurden Milzen aus LCMV-immunen Mäusen zehn Wochen nach Infektion isoliert. Je 4×10^6 Splenozyten·ml⁻¹ der tumortragenden oder LCMV-immunen Mäuse wurden als Effektorzellen mit 2×10^6 antigenbeladenen B6-Splenozyten in 1,5 ml IMDM Medium (life technologies) und 10 % FCS und 2-Mercaptoethanol fünf Tage zur Restimulation der Effektorzellen kokultiviert. Für die Antigenbeladung wurden die eingesetzten B6 Splenozyten vorher mit 10^{-6} M GP33 Peptid oder mit irrelevantem E1-A Peptid 234-243 (SGPSNTPPEI) aus Adenovirus kultiviert.

Zur Durchführung des Chromfreisetzungstests wurden E1-4 Zielzellen mit 10^{-6} M GP33 oder E1-A Peptid beladen und für 1,5 h mit $1 \text{ mCi} \cdot \text{ml}^{-1}$ Na₂⁵¹Cr₄ unter Standardbedingungen inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden 10^4 Zielzellen mit seriell verdünnten Mengen restimulierter Milzzellen unter Standardbedingungen kokultiviert. Die durchschnittliche Menge an Radioaktivität im Zellkulturüberstand wurde durch Dreifachbestimmung in einem Gamma-Zähler ermittelt. Die prozentuale Lyse der Zielzellen wurde wie folgt berechnet: [(experimentelle cpm-spontane cpm)/(maximale cpm – spontane cpm)] x 100 %.

3.8 Detektion von Transkripten

Die Chemokine CXCL10 (IP10) und CXCL11 (I-TAC) sollten im Stroma des Tumors nachgewiesen werden. 10 bis 14 Tage alte Tumoren wurden aus der Maus isoliert und gemäß Herstellerempfehlung in TRIzol (Invitrogen) aufgenommen. Die RNA wurde standardmässig über Phenol-Chloroform Extraktion isoliert, in DEPC-Wasser aufgenommen (0,1 % (v/v))

Diethylpyrocarbonat in Wasser) und anschließend mit Hilfe des Enzyms Superscript II (2.4) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Von jeder cDNA wurden Verdünnungsreihen in log₅ Stufen in Wasser bis zu einer Verdünnung von 1:3125 erstellt. Jede Verdünnung wurde in einer PCR Reaktion mittels spezifischer Oligonukleotide (Tabelle 2) auf Präsenz von GAPDH, CXCL10 (IP-10) und CXCL11 (I-TAC) untersucht. Zum späteren quantitativen Vergleich der Transkripte wurden die Verdünnungen über ähnliche Bandenintensitäten des GAPDH-Produktes abgeglichen.

3.9 Erstellung konditioneller IFNAR^{flox/flox} Mäuse

Durch Ulrich Kalinke wurde Exon 10 des *ifnar1* Gens mittels *Gene-targeting* von embryonalen Stammzellen mit *loxP* Sequenzen flankiert. Nach Transfer des Vektors in IB10 embryonale Stammzellen (ES-Zellen) wurde die Neomycin-Kassette durch transiente CRE-Expression deletiert. Durch Blastocysteninjektion wurden chimäre IFNAR^{flox} Mäuse generiert, die zu homozygoten IFNAR^{flox/flox} Mäusen verkreuzt wurden. Durch Kreuzung mit Cre-Deletermäusen [28] entstanden Mäuse mit ubiquitärer Exon10-Deletion (IFNAR^{Δ10/Δ10}) und damit IFNAR-defiziente Mäuse. Weitere Kreuzungen der IFNAR^{flox/flox} Mäuse mit entsprechenden konditionellen, CRE-exprimierenden Mäusen (siehe 2.1) ergaben zelltypspezifische IFNAR-Deletionen. Ubiquitäre IFNAR^{-/-} Mäuse wurden durch Kreuzung mit Cre-Deleter Mäusen hergestellt, IFNAR-B Mäuse durch Kreuzung mit CD19-Cre Mäusen. Beide Mauslinien wurden freundlicherweise von Klaus Rajewski zur Verfügung gestellt. IFNAR-T Mäuse wurden durch Kreuzung mit CD4-Cre Mäusen generiert, die freundlicherweise von Christopher B. Wilson zur Verfügung gestellt wurden. Die IFNAR-BT Mäuse wurden generiert, indem die CD19-Cre und CD4-Cre Mäuse zuerst miteinander verkreuzt und CD19CD4-Cre Mäuse generiert wurden. Diese wurden dann mit den IFNAR^{flox/flox} Mäusen gepaart. Die F1-Generationen wurden untereinander verkreuzt, um homozygote Mäuse zu erhalten. Analysen auf genomischer DNA wurden durch Southern Blot, Analysen auf funktioneller Ebene durch Infektionsversuche überprüft.

3.10 Enzyme-Linked-ImmunoSorbentAssay (ELISA)

Zur Detektion von murinem Interferon-α wurde ein ELISA-Kit (2.4) nach Herstellerangaben verwendet. Vollblut wurde in Serumröhrchen (BD MicrotainerSST #365968) 10 min bei 8000 rpm zentrifugiert, überstehendes Serum 1:5 verdünnt und Zellkulturüberstände unver-

dünnt gemessen. Die Platten wurden über ein ELISA-Lesegerät (Tecan, Sunrise) ausgelesen und mit Hilfe des Programmes EXCEL ausgewertet.

3.11 Statistik

Kaplan-Meyer Überlebenskurven wurden über log-rank und Wilcoxon Tests mittels einer SAS Software (SAS/STAT® Software, SAS 9.1 TS Level 1M3) analysiert. Wachstumskurven von Tumoren wurden statistisch über die Volumenänderung durch F-Test (Bonferroni-Holm) analysiert. P-Werte geringer als 0.05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Statistiken wurden durch Statistiker des Paul-Ehrlich-Instituts angefertigt.

4 Ergebnisse

Zurzeit ist Typ I Interferon (IFN-I) für die Therapie von unterschiedlichen Tumoren zugelassen, wobei der Wirkmechanismus weitgehend unbekannt ist. In dieser Arbeit wurde der antitumorale Effekt von IFN-I in zwei Tumormodellen der Maus untersucht, dem B16-F10 malignen Melanom und dem Lewis Lungen Karzinom (A9). Das B16-F10 Melanom (B16) ist ein C57BL/6 syngener, schnell wachsender Tumor, der sich durch eine geringe Immunogenität auszeichnet. Eine konstitutiv Interferon- $\alpha 2$ (IFN- $\alpha 2$) produzierende B16 Transfektante mit der Bezeichnung B16mIFN wurde eingesetzt, um den Einfluss von lokal produziertem Interferon- $\alpha 2$ im Tumor zu untersuchen. Als zweites Tumormodell diente das Lewis Lung Karzinom A9 und dessen Transfektante A9_{GP33}, die ein H-2^b restringiertes Epitop zytotoxischer T-Zellen aus dem Glykoprotein 33 (GP33) des Lympozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) exprimiert. Dieses Modell eignet sich durch das Vorhandensein von transgenen Mausmodellen, die im Zusammenhang mit dem GP33 Epitop stehen, besonders zur Analyse von tumorspezifischen T-Zellantworten. Die Ergebnisse beider Tumormodelle bezüglich der Rolle des IFN-I auf das Tumorwachstum werden im Folgenden betrachtet.

4.1 Auswirkungen von IFN-I auf das maligne Melanom

4.1.1 *Das Wachstum des B16 Melanoms setzt in syngenem IFNAR^{-/-} Mäusen früher als in wildtyp Mäusen ein.*

Um den Einfluss von IFN-I auf den Verlauf des Melanomwachstums zu untersuchen, wurden Zellen des murinen malignen Melanoms B16 oder der IFN- $\alpha 2$ -produzierenden Transfektante B16mIFN intradermal in IFNAR^{-/-} und C57BL/6 wildtyp (WT) Mäuse transplantiert. Zur Dokumentation des Tumorwachstums wurden drei Kriterien untersucht: (i) die erste Palpierbarkeit des Tumors als ein Maß für die Zeit bis progressives Tumorwachstum einsetzt (Ertastbarkeit, ca. 1 mm Tumordurchmesser), (ii) die Wachstumskinetik der Tumore und (iii) der Zeitpunkt bei Erreichen eines Tumordurchmessers von 1 cm.

Nach dem Kriterium der ersten Palpierbarkeit ergab sich, dass das Tumorwachstum von B16 Tumorzellen in IFNAR^{-/-} Mäusen signifikant früher als in WT Mäusen einsetzte (Abb. 2a, Pfeil). Während bei IFNAR^{-/-} Mäusen die ersten Tumoren zwischen Tag fünf und sechs palpiert werden konnten, zeigten WT Mäuse durchschnittlich erst nach acht Tagen tastbare Tumoren (Tag 5.6 vs. Tag 7.9, $p=0,0039$). Die Tumore beider Gruppen zeigten vergleichbar

hohe Wachstumsgeschwindigkeiten (Abb. 1a), so dass die Tumorgöße von 1 cm Durchmesser zu ähnlichen Zeitpunkten erreicht wurde (Abb. 2b).

In Gegenwart eines funktionellen IFN-I Systems setzte das B16-Tumorwachstum etwas später ein als bei Abwesenheit dieses Systems (IFNAR^{-/-}). Die Wachstumsgeschwindigkeit der progressiv wachsenden Tumorzellen wurde nicht durch eine Interferonkompetenz des Wirts beeinflusst, da das Erreichen eines Tumordurchmessers von 1 cm sich nicht signifikant zwischen WT und IFNAR^{-/-} Mäusen unterschied. Da nicht bekannt war, ob B16 Tumorzellen *in vivo* eine ausreichende Menge an endogenem IFN-I induzieren, wurde in den folgenden Experimenten die IFN- α 2-produzierende Variante B16mIFN verwendet, um die Effekte des IFN-I auf die Tumorentwicklung zu verstehen.

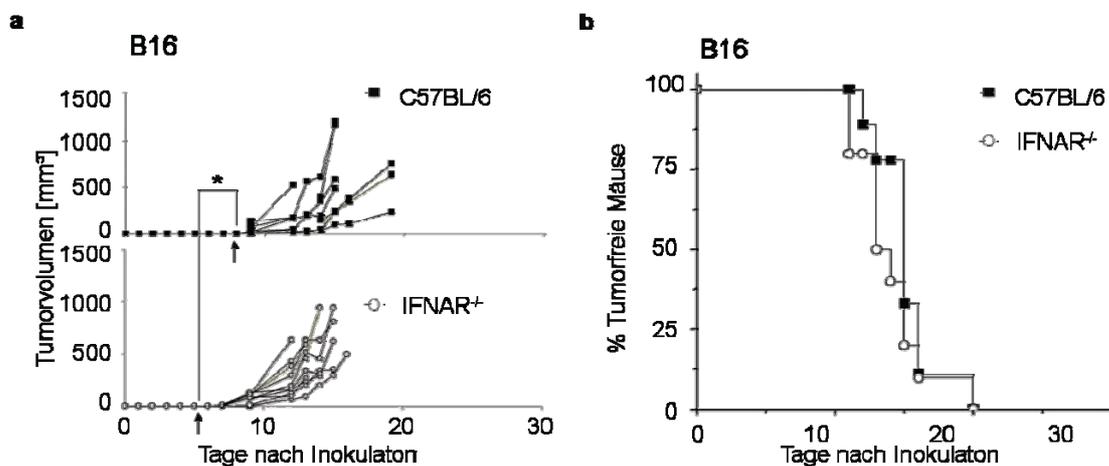


Abb. 2 Das Wachstum des malignen B16 Melanoms setzt in Typ I Interferonrezeptor-defizienten Mäusen früher als in wildtyp Mäusen ein

10⁵ B16 Melanomzellen wurden intradermal in wildtyp (C57BL/6, ausgefüllte Symbole) und Typ I Interferonrezeptor-defiziente (IFNAR^{-/-}) Mäuse (leere Symbole) injiziert. Gruppen von 8-10 Mäusen wurden untersucht, eines von mehr als sechs ähnlichen Experimenten ist gezeigt. (a) Dargestellt ist das Tumorvolumen der in WT oder IFNAR^{-/-} Mäusen gewachsenen B16 oder B16mIFN Tumore. Die Pfeile markieren den durchschnittlichen Tag der ersten Palpierbarkeit (Tastbarkeit) der Tumore. In (b) ist das Erreichen eines Tumordurchmessers von 1 cm derselben Mäuse wie in (a) dargestellt. Unterschiede wurden bei einem P-Wert <0.05 als statistisch signifikant angesehen (*).

4.1.2 Lokal produziertes IFN-I verzögert die Melanomentwicklung in syngen C57BL/6 Mäusen

Im Vergleich zu B16 Tumorzellen zeigte die konstitutiv IFN- α 2 produzierende Transfektante B16mIFN in WT Mäusen eine verzögert einsetzende und stark verlangsamte Tumorentwicklung (Abb. 3a). Weiterhin waren in IFNAR^{-/-} Mäusen die Tumore durchschnittlich an Tag 7 und in WT Mäusen durchschnittlich erst ab Tag 17 (Tag 7.2 vs 17.6 p=0,0002 log rank test, Abb. 3a, Pfeil) tastbar. Im Gegensatz zu WT Mäusen wuchsen in allen IFNAR^{-/-} Mäusen die Tumore progressiv. Dementsprechend wurde ein Tumordurchmesser von 1 cm in

IFNAR^{-/-} Mäusen wesentlich schneller erreicht als in WT Mäusen (Tag 15.2 vs. Tag 31.3 p<0,0001 log rank test Abb. 3b). Am Ende der Experimente (>60 d) waren 20-25 % der WT Mäuse tumorfrei und wiesen keine palpierbaren Tumore auf.

Diese Daten zeigten, dass die B16mIFN Tumore durch die Produktion von IFN- α 2 später ertastet werden konnten, sich verlangsamt entwickelten und sogar von einem gewissen Teil der WT Mäuse abgestoßen wurden. Das progressive Wachstum in IFNAR^{-/-} Mäusen ließ darauf schließen, dass das IFN- α nicht antiproliferativ auf die Tumorzellen selbst, sondern auf Wirtszellen wirkte, welche den in WT Mäusen beobachteten antitumoralen Effekt vermittelten.

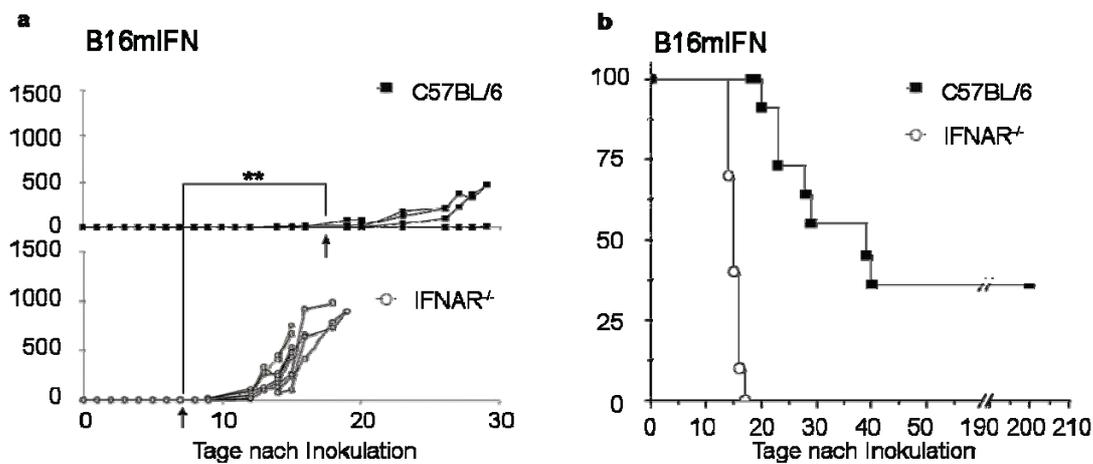


Abb. 3 Im Vergleich zu IFNAR^{-/-} Mäusen wachsen Interferon- α 2 produzierende Melanomzellen in C57BL/6 wildtyp Mäusen stark verlangsamt

10⁵ murine Interferon- α 2 exprimierende Melanomzellen (B16mIFN) wurden intradermal in wildtyp (C57BL/6, ausgefüllte Symbole) und IFNAR^{-/-} Mäuse (leere Symbole) injiziert. Gruppen von 8-10 Mäusen wurden untersucht, eines von mehreren ähnlichen Experimenten ist gezeigt. Dargestellt ist das Tumolvolumen der in WT oder IFNAR^{-/-} Mäusen gewachsenen Tumore (a). Die Pfeile markieren den durchschnittlichen Tag der ersten Palpierbarkeit (Tastbarkeit) der Tumore. In (b) ist das Erreichen eines Tumordurchmessers von 1 cm derselben Mäuse wie in (a) dargestellt. Unterschiede wurden bei einem P-Wert <0.05 als statistisch signifikant angesehen (*).

4.1.3 Die Produktion von IFN- α 2 führt zu keinem Wachstumsnachteil der Tumorzellen

In vitro produzierten 10⁵ der B16mIFN Tumorzellen 54 ± 9,4 pg·ml⁻¹, und 10⁶ Zellen 674 ± 73,4 pg·ml⁻¹ IFN- α , während die nicht transfizierte B16 Linie keine im ELISA detektierbaren Mengen dieses Zytokins bildete (Abb. 5b). Beide Linien wiesen *in vitro* mit einer Verdopplungszeit von 22 h bis 24 h eine ähnliche Wachstumsrate auf (Abb. 5a). Das von B16mIFN produzierte IFN- α schien daher *in vitro* keinen autokrinen Einfluss auf die Proliferation der transfizierten Tumorzellen zu besitzen. Das ähnliche *in vitro* Wachstum beider Tumorzelllinien und das progressive Wachstum der IFN- α produzierenden Variante B16mIFN in IFNAR^{-/-} Mäusen deuten darauf hin, dass der bereits zuvor erkannte antiproliferative Effekt von IFN-I nicht direkt das Tumorstadium inhibiert. Das stark verlang-

samte *in vivo* Wachstum von B16mIFN deutet auf eine IFN- α 2 vermittelte Stimulation von wirtseigenen Zellen hin, welche das Tumorwachstum inhibieren.

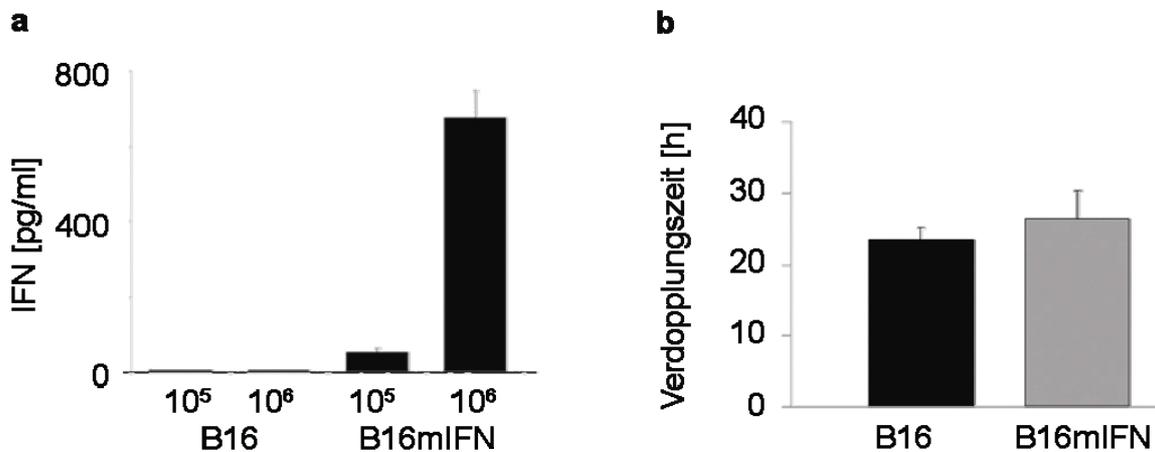


Abb. 4 Durch die Produktion von IFN- α 2 entsteht für B16mIFN *in vitro* kein Wachstumsnachteil

(a) $2,5 \cdot 10^5$ B16 und B16mIFN-Tumorzellen aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden ausplattiert und nach 24 h Inkubation wurde die Zellzahl bestimmt. 10^5 oder 10^6 *in vitro* kultivierte B16 Tumorzellen sekretierten keine detektierbaren Mengen an IFN-I, während 10^5 oder 10^6 B16mIFN Tumorzellen innerhalb von 24 h $54 \pm 9,4$, bzw. $674 \pm 73,4$ $\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$ IFN-I produzierten. (b) B16 und B16mIFN Tumorzellen zeigten ähnliche Generationszeiten *in vitro*. Gleiche Zellzahlen wurden in 6-Lochplatten ausplattiert, zu bestimmten Zeiten je 3 bewachsene Vertiefungen abgelöst und die durchschnittliche Zellzahl durch Zählung mit Hilfe der Thomakammer bestimmt.

4.1.4 Lokal produziertes IFN- α 2 ist *in vivo* nicht systemisch nachweisbar

Um der Frage nachzugehen, ob die IFN-I vermittelten Effekte von der Dosis der Tumorzellen abhängen, wurden die beschriebenen Experimente auch mit einer Injektionsdosis von 10^6 B16 oder B16mIFN Tumorzellen durchgeführt. Die Wachstumsexperimente mit den verschiedenen Zellkonzentrationen führten zu ähnlichen Ergebnissen wie in Abb. 4 dargelegt (Daten nicht gezeigt). Das heißt, dass unabhängig von den genannten Zellmengen eine vergleichbare Immunantwort erfolgte. Um zu untersuchen, ob das vom Tumor produzierte IFN- α 2 lokal eine Rolle spielte, oder durch eine Verteilung über das Blut im ganzen Organismus wirken konnte, wurden Mäusen 10^6 B16mIFN Tumorzellen injiziert. Nach 1 und 7 Tagen erfolgte eine Blutentnahme retroorbital und das Serum wurde mittels einer ELISA-Methode auf die Präsenz von IFN- α getestet (Abb. 5). Im Vergleich zu unbehandelten WT Mäusen war kein erhöhter IFN- α Spiegel im Serum der B16mIFN tragenden WT Mäuse feststellbar. Lediglich in IFNAR^{-/-} Mäusen war nach 7 Tagen mit ca. $90\text{-}100$ $\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$ eine geringe Menge IFN- α im Serum detektierbar. Diese Ergebnisse zeigten, dass in WT Mäusen IFN-I lokal von IFNAR-kompetenten Zellen gebunden wurde, während bei Abwesenheit des IFNAR geringe IFN- α Mengen im Blut nachgewiesen werden konnten. Weiterhin deuteten diese Ergebnisse darauf

hin, dass B16mIFN Tumorzellen eine kontinuierliche IFN- α Produktion für mindestens sieben Tage nach Injektion zeigten.

Zusammengenommen zeigen die bis hier beschriebenen Daten einen lokalen Effekt von IFN-I auf Wirtszellen und keinen autokrinen antiproliferativen Effekt auf Tumorzellen.

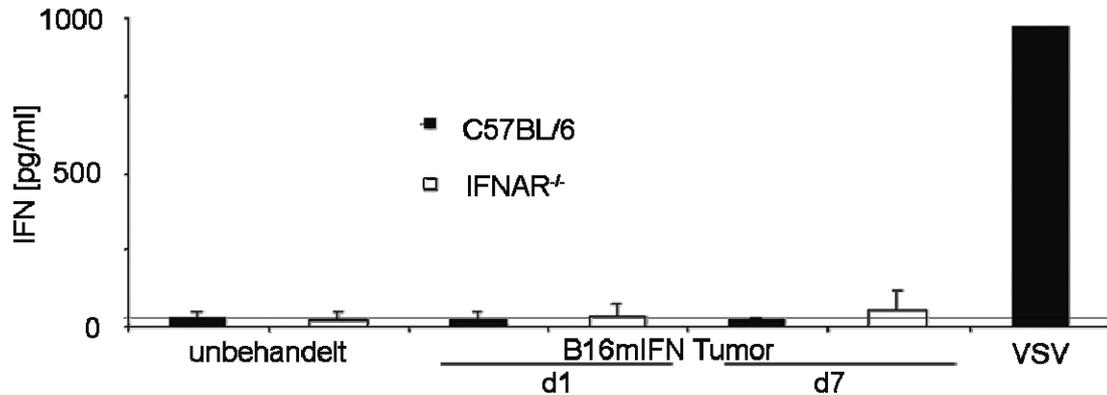


Abb. 5 Das von B16mIFN produzierte Interferon- α ist nicht im Serum von B16mIFN tragenden WT Mäusen nachweisbar und wirkt somit lokal

C57BL/6 und IFNAR^{-/-} Mäuse wurden intradermal 10^6 B16mIFN Tumorzellen injiziert (B16mIFN Tumor) oder blieben unbehandelt. 1 Tag (d1) bzw. 7 Tage (d7) nach Tumorzellinjektion wurde allen Mäusen Blut entnommen und das Serum mit einer ELISA Methode auf Präsenz von IFN- α untersucht. Als Positivkontrolle wurde Serum von mit $2 \cdot 10^7$ pfu VSV infizierten C57BL/6 Mäusen (VSV) analysiert.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der Abb. 2 bis Abb. 5, dass die Produktion von IFN-I in WT Mäusen nicht nur in einem verzögerten Einsetzen des Tumorwachstums, sondern zusätzlich in einer Verlangsamung der weiteren Melanomentwicklung resultierte. 20-25 % der WT Mäuse waren in der Lage, die injizierten Tumorzellen völlig abzustößen. Diese Wirkung des IFN-I konnte auf eine lokale Wirkung auf Wirtszellen, und nicht auf eine autokrine Wirkung auf die Tumorzellen selbst zurückgeführt werden.

4.1.5 Der antitumorale Einfluss von IFN-I wird sowohl über bestrahlungssensitive Immunzellen, als auch über bestrahlungsresistente Zellen des Wirtes vermittelt

Der Einfluss von IFN- α auf das Tumorwachstum ließ die Frage aufkommen, über welche Zellen dieser Einfluss vermittelt wurde. Zur Klärung dieser Frage wurden Knochenmarkchimären generiert (3.4). Durch Knochenmarkchimären lässt sich der Einfluss von IFN-I auf die im Knochenmark gebildeten Immunzellen von dem Einfluss auf sonstige Zellen unterscheiden. Mäuse wurden einen Tag nach letaler Bestrahlung mit 11 Gy mit $2 \cdot 10^6$ kongenen Knochenmarkzellen rekonstituiert. Sechs Wochen nach Rekonstitution zeigten diese Mäuse eine normale Verteilung von T- und B-Zellen im Blut. Die Analyse der CD45.1 und CD45.2 Allotypmarker auf den Lymphozyten rekonstituierter Mäuse zeigte, dass typischerweise 2 % bis 8 % der T-Zellen von dem Empfängertier stammten, während die restlichen 92-98 % der

T-Zellen und praktisch alle B-Zellen aus dem transplantierten Knochenmark hervorgegangen waren (Abb. 6). Als Kontrollen wurden $IFNAR^{-/-}$ Mäuse mit $IFNAR^{-/-}$ Knochenmark ($IFNAR^{-/-}>IFNAR^{-/-}$) und C57BL/6 (B6) wildtyp Mäuse mit kongenem B6 Knochenmark rekonstituiert (B6>B6).

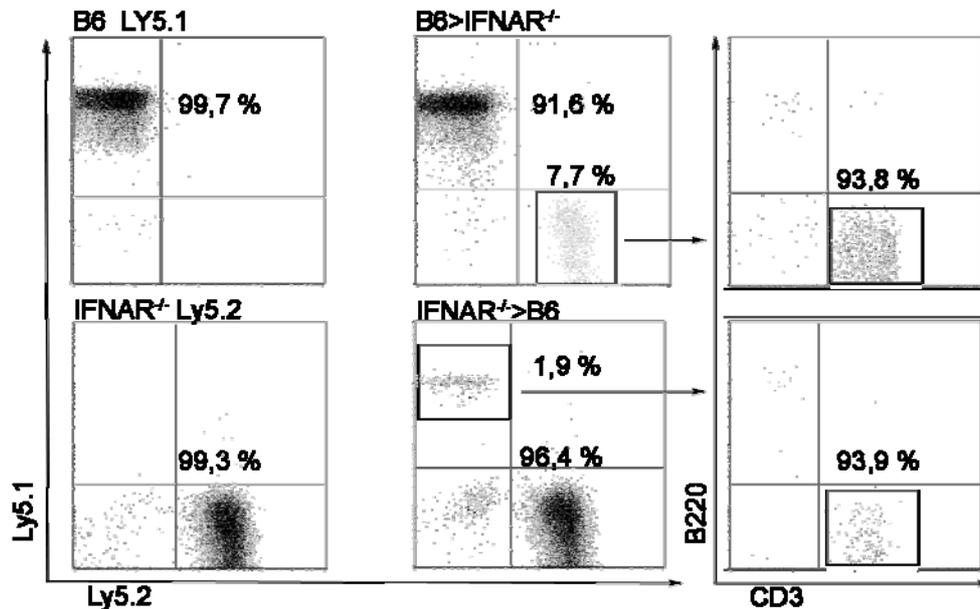


Abb. 6 Analyse des Immunstatus knochenmarkchimärer Mäuse

Dargestellt sind beispielhafte durchflusszytometrische (FACS) Analysen der Antigene CD45.1 (Ly5.1) und CD45.2 (Ly5.2) von Blutproben aus Donormäusen vor der Rekonstitution (B6 Ly5.1 und $IFNAR^{-/-}$ Ly5.2) und von Knochenmarkchimären acht Wochen nach Rekonstitution (B6> $IFNAR^{-/-}$ und $IFNAR^{-/-}$ >B6). Residuale bestrahlungsresistente Immunzellen der Chimären (in Kästen) wurden auf die Marker B220 und CD3 getestet. Prozenzte der ersten vier Darstellungen sind bezogen auf die Lymphozytenpopulation. Prozenzte der CD3 positiven Zellen der Chimären sind auf die residualen bestrahlungsresistenten Zellen der Chimären bezogen. Jede Maus wurde getestet, dargestellt ist beispielhaft die Analyse je einer Maus pro Gruppe.

Acht Wochen nach der Rekonstitution wurden 10^6 B16mIFN Tumorzellen in die linke Flanke injiziert. Generell erfolgte Tumorstadium in Chimären etwas langsamer als in nicht-rekonstituierten Mäusen. In den Knochenmarkchimären ließ sich der Befund, dass in Gegenwart eines IFN-I Systems ein verlangsamtes Tumorstadium zu beobachten ist (vgl. 4.1.5), bestätigen. B6>B6 Mäuse zeigten gegenüber der $IFNAR^{-/-}>IFNAR^{-/-}$ Gruppe ein stark verlangsamtes Tumorstadium (Abb. 7a,b). Zudem wurden mit $IFNAR^{-/-}$ Knochenmark rekonstituierte WT Mäuse ($IFNAR^{-/-}$ >B6) und $IFNAR^{-/-}$ Mäuse, die wildtyp Knochenmark erhielten (B6> $IFNAR^{-/-}$), untersucht.

Interessanterweise waren die Tumore in der B6> $IFNAR^{-/-}$ Gruppe am Tag zwei nach Inokulation – und damit deutlich früher – palpierbar als in der $IFNAR^{-/-}$ >B6 Gruppe (Tag 10). Dies wies darauf hin, dass die Etablierung des Tumors besonders von Nicht-Immunzellen der Tumorumgebung in Abhängigkeit vom $IFNAR$ verzögert wurde.

Im weiteren Verlauf der Tumorentwicklung zeigten sowohl B6>IFNAR^{-/-}, als auch IFNAR^{-/-}>B6 Chimären intermediäres Tumorwachstum (Abb. 7c,d). Dies zeigte, dass sowohl die IFN-I Stimulation von Immunzellen, als auch von Nicht-Immunzellen der Maus einen Einfluss auf das Tumorwachstum nahm.

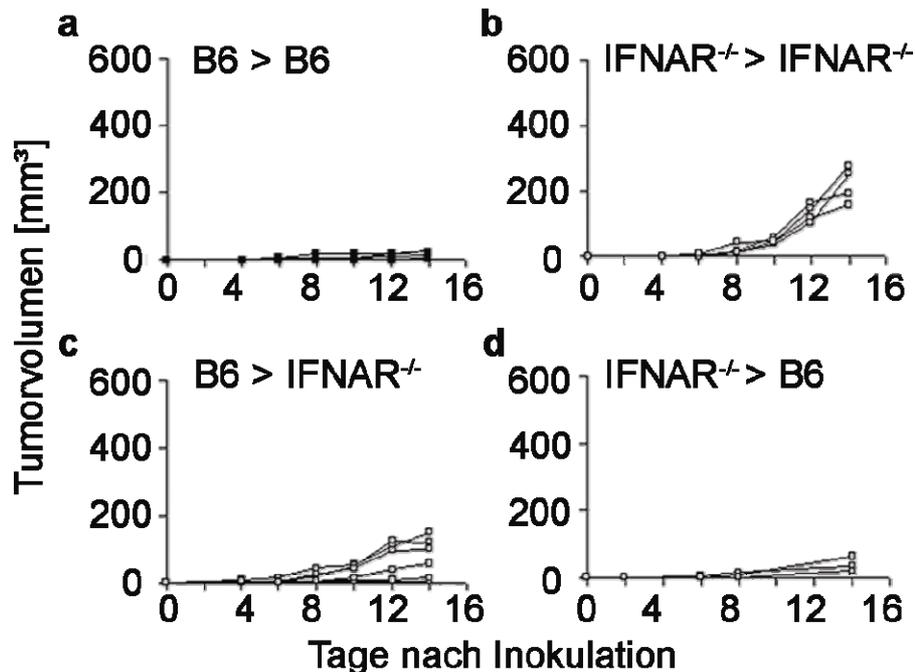


Abb. 7 IFN-I entfaltet seine antitumorale Aktivität über Stimulation von Immun- und Nicht-Immunzellen

Dargestellt ist die Zunahme des Tumorvolumens in B6>B6 (a), IFNAR^{-/-}>IFNAR^{-/-} (b), B6>IFNAR^{-/-} (c) und IFNAR^{-/-}>B6 (d) Knochenmarkchimären, denen 10⁶ B16mIFN Tumorzellen intradermal injiziert wurde. Die Gruppen bestanden aus 3-6 Mäusen, dargestellt ist eines von drei Experimenten. Nach 14 Tagen wurden die Tumore für histologische Untersuchungen isoliert.

Zusammenfassend bewiesen die in Abb. 7 dargestellten Experimente einen starken Einfluss des vom Tumor produzierte IFN- α auf das Melanomwachstum. Weiterhin zeigten diese Experimente eine direkte Wirkung des IFN- α sowohl auf Immunzellen, als auch auf Nicht-Immunzellen in der Umgebung des Tumors. Die Zellen in der direkten Umgebung des Tumors schienen das Einsetzen des Wachstums Interferon-abhängig beeinflussen zu können. Das produzierte IFN-I wirkte direkt ebenfalls direkt auf Immunzellen, die das Tumorwachstum so weit reduzierten, dass in 20 % bis 25 % der untersuchten Tiere die Tumoren vollständig abgestoßen wurden.

4.1.6 In IFNAR^{-/-} Mäusen etablierte B16mIFN Tumore zeigen eine verstärkte Blutgefäßbildung und weniger Transkription der Chemokine CXCL10 und CXCL11

Es wurde gezeigt, dass das IFN- α über bestrahlungsresistente Zellen Einfluss auf das Tumorstromawachstum nahm (vgl. Abb. 7c). Zur genauen Analyse erfolgten daher Untersuchungen des Tumorstromas bezüglich der Blutgefäßdichte. 14 Tage nach Injektion von B16 oder B16mIFN Tumorzellen in WT, IFNAR^{-/-} Mäuse und Knochenmarkchimären wurden Tumoren isoliert und immunhistochemisch mittels einer anti-CD31 Färbung auf die Blutgefäßdichte untersucht. IFNAR^{-/-} Mäuse wiesen eine höhere Blutgefäßdichte in B16 Tumoren als WT Mäuse auf (Abb. 8a). Dieser Effekt war in Interferon- α 2-produzierenden B16mIFN Tumoren bedeutend ausgeprägter zu erkennen (Abb. 8b).

Des Weiteren wurden Tumore der in Abschnitt 4.1.5 genannten Chimären untersucht. Das Tumorstroma von B6>IFNAR^{-/-} Chimären wies eine höhere Blutgefäßdichte auf als das aus IFNAR^{-/-}>B6 Chimären. Somit entfaltete IFN-I im Stroma von WT Mäusen antiangiogenetische Effekte.

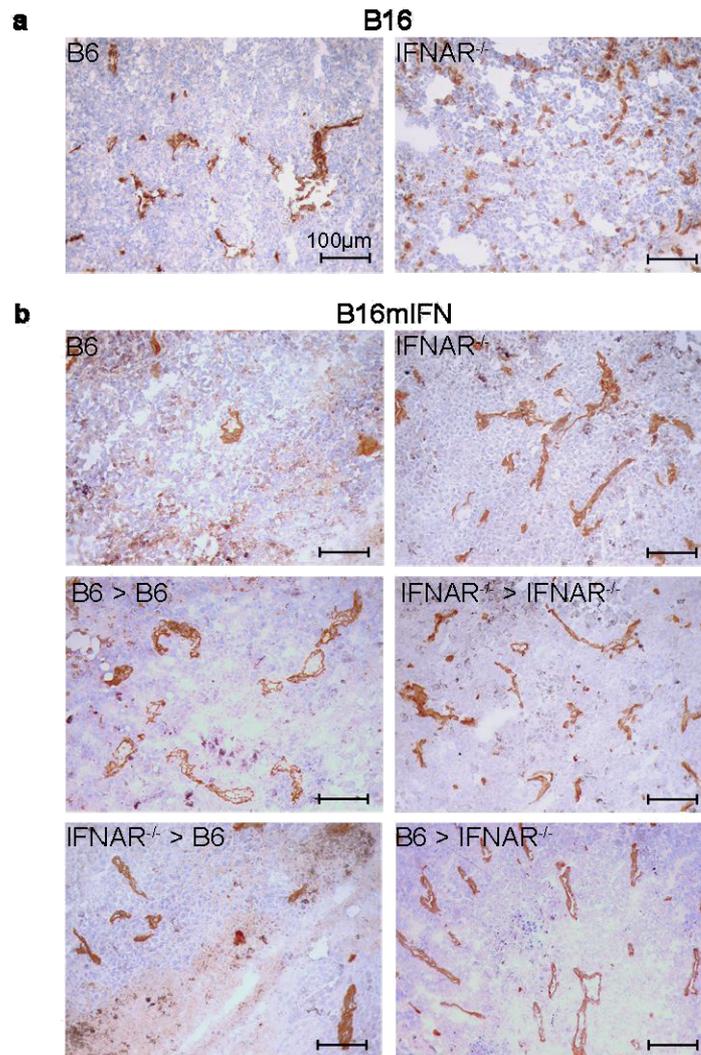


Abb. 8 IFNAR^{-/-} Mäuse weisen eine verstärkte Angiogenese auf

Dargestellt sind CD31-spezifische Färbungen von Gefrierschnitten von B16 (a) und B16mIFN (b) Tumoren 14 Tage nach Transplantation. 3-6 Tumorproben pro Gruppe wurden analysiert. Es ist ein repräsentativer von 5 Bildausschnitten pro Gefrierschnitt (Vergrößerung 20x) pro Gruppe und Tumor aus 3 ähnlichen Experimenten dargestellt.

4.1.7 In IFNAR^{-/-} Mäusen gewachsene B16mIFN Tumore zeigen eine geringere Transkription der Chemokine CXCL10 und CXCL11

Von den Chemokinen CXCL10 (IP-10) und CXCL11 (I-TAC) ist bekannt, dass sie durch IFN-I induziert werden, Einfluss auf die Blutgefäßbildung (Angiogenese) nehmen und Zellen anlocken, die den CXC-Rezeptor3 (CXCR3) exprimieren. Zu diesen Zellen gehören z.B. dendritische Zellen (DC) und aktivierte T-Zellen. Zusätzlich zu der Blutgefäßdichte wurden daher die isolierten Tumoren per RT-PCR auf Transkription der Chemokine IP-10 und I-TAC getestet. Wie aus Abb. 9 ersichtlich wird, wurden in Tumoren aus IFNAR^{-/-} Mäusen die Chemokine IP-10 und I-TAC in kaum detektierbaren Mengen transkribiert. In Tumoren, die sich in WT Mäusen entwickelt haben, waren diese Chemokine hingegen deutlich nachweis-

bar. Der histologische Nachweis auf Proteinebene ist aus technischen Gründen leider nicht gelungen (Daten nicht gezeigt).

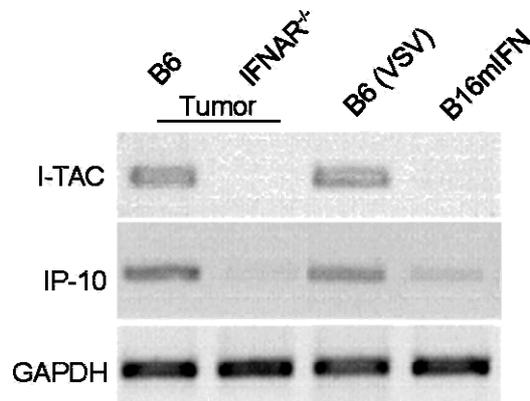


Abb. 9 IFNAR^{-/-} Mäuse weisen eine geringere Transkription der Chemokine CXCL10 (IP-10) und CXCL11 (I-TAC) im Stroma von soliden B16mIFN Tumoren auf

Dargestellt ist die Auftrennung von GAPDH-, IP-10- und I-TAC spezifischen Nukleinsäureprodukten einer RT-PCR Analyse von Transkripten aus 14-Tage in WT und IFNAR^{-/-} Mäusen gewachsenen Tumoren. Zur Kontrolle wurden Splenozyten von VSV-infizierten C57BL/6 Mäusen [B6(VSV)] und *in vitro* kultivierte B16mIFN Tumorzellen (B16mIFN) herangezogen. Die PCR Produkte wurden anhand der Produktintensität der GAPDH-Bande aus derselben Probe abgeglichen. Die Daten repräsentieren 5-6 analysierte Tumore pro Gruppe.

Zusammenfassend korrelierte das verstärkte Tumorwachstum in IFNAR^{-/-} Mäusen mit einer erhöhten Blutgefäßdichte und einer verringerten Transkription der Chemokine IP-10 und I-TAC. Da die Tumorzellen selbst keine Chemokine produzierten, erfolgte die Transkription über tumorumgebende Stromazellen. Es zeigte sich, dass diese Chemokinproduktion nur bei IFNAR-kompetenten Zellen detektierbar war und damit direkt von IFN-I abhing. Die nachfolgende Abb. 10 stellt die bis zu diesem Zeitpunkt gefundene Wirkung des IFN-I auf die Mikroumgebung des malignen Melanoms dar.

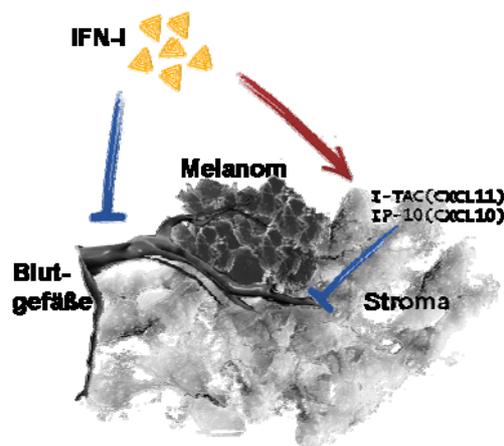


Abb. 10 Modell der Wirkung von IFN-I auf Blutgefäße und Tumorstroma

IFN-I verhindert die Blutgefäßneubildung (blauer Pfeil) und fördert die Expression der Chemokine CXCL10 (IP-10) und CXCL11 (I-TAC) im Tumorstroma. IP-10 wirkt zusätzlich reduzierend auf die Blutgefäße.

4.1.8 CD8⁺ T-Zellen vermitteln Immunität gegen das maligne Melanom

Die Experimente mit Knochenmarkchimären (4.1.5) zeigten ein IFN-I abhängiges Melanomwachstum, welches von Immunzellen beeinflusst wurde. Durch Immunisierung mit Tumorzellen kann generell eine spezifische Immunantwort generiert werden, die einen gleichartigen, später injizierten Tumor abstoßen kann. Es sollte gezeigt werden, welchen Einfluss T-Zellen auf das Melanomwachstum hatten. Dafür wurden Wildtyp und immundefiziente RAG1^{-/-} Mäuse durch Injektion von 10⁵ B16mIFN Tumorzellen in die linke Flanke immunisiert. Sieben Tage später wurde eine identische Menge B16 Tumorzellen als Zweitumor in die rechte Flanke appliziert. Ohne vorherige B16mIFN Behandlung wuchs der sieben Tage später transplantierte B16 Tumor ungehindert in allen fünf wildtyp oder RAG1^{-/-} Mäusen (Abb. 11a). Wurde dagegen zuvor mit B16mIFN immunisiert, wurde der Zweitumor in acht von zehn wildtyp Mäusen abgestoßen (Abb. 11b). In acht von neun immunisierten RAG1^{-/-} Mäusen, die keine T- oder B-Zellen besitzen, wuchs der Zweitumor dagegen ungehindert (Abb. 11c). Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass Lymphozyten die Tumorabstoßung spezifisch vermittelten.

In Depletionsexperimenten wird die Funktion bestimmter Zelltypen durch Injektion eines spezifischen Antikörpers ausgeschaltet. Durch die Depletion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sollte geklärt werden, welcher dieser Zelltypen für die Tumorabstoßung benötigt wurde. Dazu wurden nach Immunisierung von WT Mäusen mit B16mIFN Tumorzellen an zwei Zeitpunkten spezifische anti-CD4 oder anti-CD8 Antikörper injiziert und unterdessen der Zweitumor appliziert. In allen neun immunisierten WT Mäusen wuchs nach CD8⁺ T-Zell-Depletion der Zweitumor progressiv (Abb. 11e). In acht dieser Mäuse wuchs der zur Immunisierung verwendete B16mIFN Tumor ebenfalls unkontrolliert, obwohl die Depletion erst fünf Tage nach Injektion erfolgte. Zum direkten Vergleich wird hier auf Abb. 3a und Abb. 11b verwiesen, die zeigen, dass in nicht depletierten WT Mäusen der IFN- α 2-produzierende Tumor ein stark verlangsamtes Wachstum aufwies und der Zweitumor abgestoßen wurde. Dies zeigte, dass CD8⁺ T-Zellen kritisch zur Kontrolle des Wachstums des malignen Melanoms beitrugen.

Im Gegensatz dazu resultierte die Depletion der CD4⁺ T-Zellen in einer wesentlich verbesserten Abstoßung der Erst- und Zweittumore. Vier von zehn WT Mäusen stießen den B16 Zweitumor nach Immunisierung und Depletion der CD4⁺ T-Zellen ab (Abb. 11d).

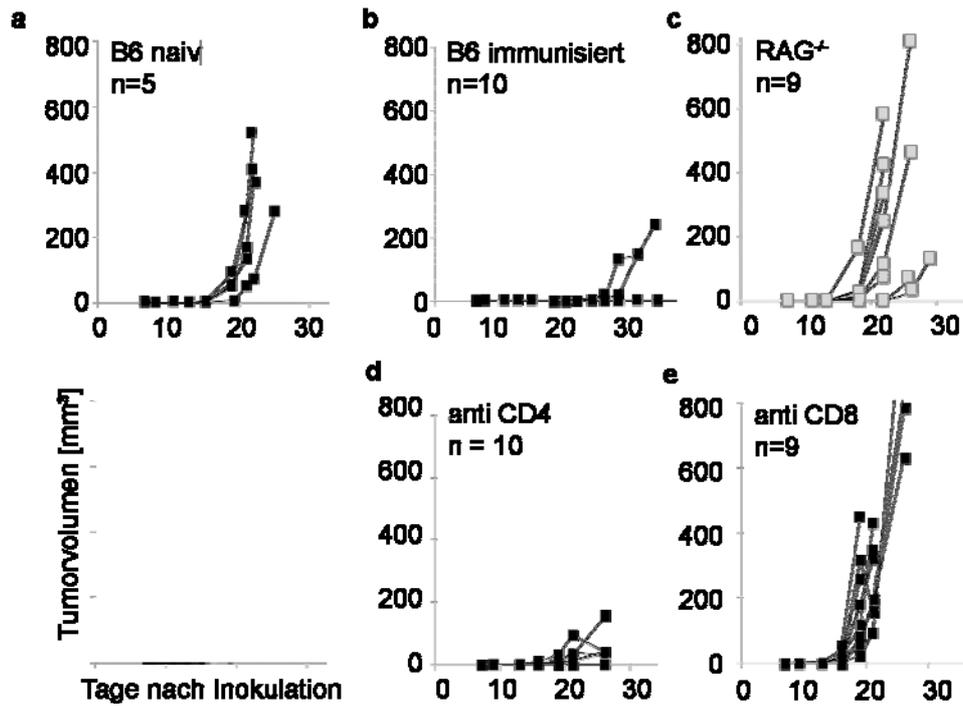


Abb. 11 T-Zellen vermitteln generell B16-spezifische Immunität

Dargestellt ist das Wachstum von 10^5 in die rechte Flanke injizierten B16 Zellen. Das B16 Wachstum wurde in unbehandelten (a) oder in zuvor mit 10^5 lebenden B16mIFN-Zellen immunisierten Mäusen (b-e) analysiert. Ergebnisse für 10 immunisierte B6 (b), 9 immunisierte RAG^{-/-} (c) und 5 nicht immunisierte B6 Mäuse (B6 naive, a) sind gezeigt. Die Depletion von CD4⁺ T-Zellen förderte (d), während die Depletion von CD8⁺ T-Zellen (e) die Tumorabstoßung verhinderte. Gruppen von 9-10 B6 Mäusen wurden analysiert. Die Depletion wurde wie in Abschnitt 3.6 beschrieben durchgeführt.

Obwohl die Depletion der CD4⁺ T-Zellen erst fünf Tage nach Immunisierung erfolgte, wuchs in keiner der zehn WT Mäuse der zur Immunisierung verwendete B16mIFN Tumor aus (Daten nicht gezeigt). Diese Befunde wiesen darauf hin, dass CD4⁺ T-Zellen, zu denen auch die regulatorischen T-Zellen gerechnet werden, die Immunabwehr gegen das Melanom unterdrücken konnten. Fehlten CD4⁺ T-Zellen, war eine verbesserte B16 Abstoßung möglich. In IFNAR^{-/-} Mäusen konnten B16mIFN Immunisierungsexperimente mit anschließender B16 Behandlung nicht durchgeführt werden, da bereits der zu Beginn injizierte B16mIFN Tumor so schnell wuchs, dass fünf bis sieben Tage später das Experiment abgebrochen werden musste, wodurch das Wachstum des B16 Tumors auf der rechten Flanke nicht mehr analysiert werden konnte. Um dieses Problem zu umgehen, wurde eine B16 Injektion bereits vier Tage nach B16mIFN Behandlung getestet (Daten nicht gezeigt). Diese Bedingungen führten jedoch weder in WT Mäusen noch in IFNAR^{-/-} Mäusen zu einer Immunisierung gegen die B16 Zweitumoren. Somit eignete sich das hier beschriebene Modell nicht, um die Interferonabhängigkeit der T-Zellantwort zu analysieren. Die Interferonabhängigkeit der T-Zellaktivität wurde daher vorerst in Knochenmarkchimären, dann in neu generierten konditionellen Mäusen untersucht.

4.1.9 IFN-I scheint direkt auf B- oder T-Zellen zu wirken

Wie aus Abb. 7 ersichtlich wurde, wirkte IFN-I ebenfalls über Immunzellen. Zur Analyse des Einflusses von IFN-I auf diese Immunzellen wurden weitere Knochenmarkchimären erstellt und wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben, analysiert. Diese Knochenmarkchimären sollten konditionellen Mäusen ähneln, welche eine IFNAR-Defizienz auf B- und T-Zellen aufweisen. Daher wurden RAG1^{-/-} Mäuse (2.1), denen B- und die CD3 positiven T-Zellen fehlten, für Rekonstitutionsexperimente benutzt. Mit dieser Methode vermied man auch die 2-8 % residualen, IFNAR kompetenten CD3⁺ T-Zellen, die in Knochenmarkchimären typischerweise auffindbar sind und die einen Einfluss auf das Tumorwachstum haben können (Abb. 6). RAG1^{-/-} Mäusen wurden mit einer Mischung aus RAG1^{-/-} und WT oder RAG1^{-/-} und IFNAR^{-/-} Knochenmark rekonstituiert (3.4) Der Übersichtlichkeit halber wird die Mischung aus RAG^{-/-} und B6 Knochenmark als mixB6, die Mischung aus RAG^{-/-} und IFNAR^{-/-} Knochenmark als mixIFNAR^{-/-} Knochenmark bezeichnet. Alle Immunzellen der mit mixB6 Knochenmark rekonstituierten RAG^{-/-} Mäuse (mixB6>RAG^{-/-}) exprimierten den IFN-I Rezeptor. In den mit mixIFNAR^{-/-} Knochenmark rekonstituierten RAG^{-/-} Mäusen (mixIFNAR^{-/-}>RAG^{-/-}) konnten sich alle B- und T-Zellen nur aus IFNAR^{-/-} Knochenmark entwickeln. Die B- und T-Zellen exprimierten daher den Rezeptor nicht, während alle anderen Zelltypen durch den RAG^{-/-} Knochenmarkanteil den IFNAR exprimierten. Es wurde davon ausgegangen, dass IFNAR kompetente hämatopoetische Zellen des RAG^{-/-} Knochenmarks die Funktion von gleichartigen vorhandenen IFNAR^{-/-} Immunzellen ausgleichen konnten, so dass das Tumorwachstum in diesen Mäusen dem von konditionellen Mäusen ähneln sollte. Wie aus Abb. 12 ersichtlich, zeigten mixB6>RAG^{-/-} Mäuse erwartungsgemäß ein später einsetzendes, und in den ersten 20 Tagen stark verlangsamtes Melanomwachstum. Sechs von acht Mäusen stießen den Tumor vollständig ab. Hingegen zeigten sieben von neun mixIFNAR^{-/-}>RAG^{-/-} Mäusen starkes Tumorwachstum (Abb. 12) was darauf hindeutete, dass B- oder T-Lymphozyten das Melanomwachstum in Abhängigkeit von einer IFN-I Stimulation kontrollierten.

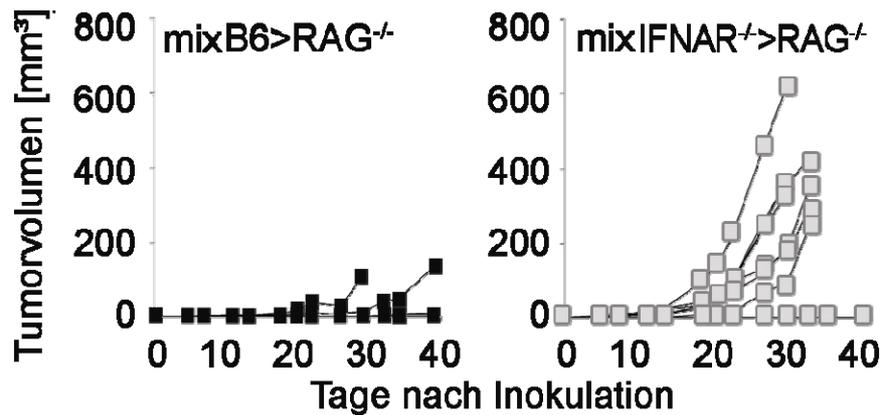


Abb. 12 IFN-I entfaltet seine antitumorale Aktivität über Stimulation von B- und T-Zellen

Dargestellt ist die Zunahme des Tumorzellvolumens in Knochenmarkchimären, welche mit einer Mischung aus RAG^{-/-} und B6 Knochenmark (mixB6>RAG^{-/-}) oder einer Mischung aus RAG^{-/-} und IFNAR^{-/-} Knochenmark (mixIFNAR^{-/-}>RAG^{-/-}) rekonstituiert wurden. 10⁶ B16mFN Tumorzellen wurden in 8 mixB6>RAG^{-/-} und 9 mixIFNAR^{-/-}>RAG^{-/-} Chimären injiziert. 7 von 9 mixIFNAR^{-/-}>RAG^{-/-} Mäusen wiesen progressiv wachsende Tumore auf. Die Rekonstitutionseffizienz der Knochenmarkchimären wurde 6-8 Wochen nach Rekonstitution per FACS Analyse ermittelt und die Tumorexperimente wurden 10-12 Wochen nach Rekonstitution durchgeführt.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die antitumorale Wirkung von IFN-I bei transplantierten malignen Melanomzellen über Immunzellen des Wirts, und genauer, über direkte Stimulation von B- oder T-Zellen erfolgte. Da die hier gezeigten Knochenmarkchimären lediglich eine Annäherung an konditionelle Mäuse sind, und in diesem System nicht zwischen der Wirkung von IFN-I auf B- oder T-Zellen unterschieden werden konnte, wurden eigens konditionelle Mäuse generiert, die eine IFNAR-Defizienz spezifisch auf B- und/oder T-Zellen aufwiesen.

4.1.10 Charakterisierung einer konditionellen Maus, die zelltypspezifische Deletionen des Typ I Interferonrezeptors aufweist

Wie oben dargelegt, spielten T-Zellen bei der Kontrolle des Melanomwachstums eine zentrale Rolle. Um die Abhängigkeit der T-Zell-vermittelten Tumorabstoßung von IFN-I zu untersuchen, wurden von Dr. Ulrich Kalinke Mäuse generiert, die eine Lymphozyten-spezifische IFNAR-Deletion aufweisen. Dies wurde durch Kreuzen von CD19-Cre [29] oder CD4-Cre [30]-Mäusen mit den von ihm hergestellten konditionellen IFNAR^{flox/flox} Mäusen erreicht.

Die α -Kette des Typ I Interferonrezeptors (IFNAR) wird vom *ifnar1* Gen, die Transmembranregion der α -Kette von Exon 10 codiert. Zur Herstellung von IFNAR^{flox/flox} Mäuse wurde dieses Exon 10 in embryonalen Stammzellen per *gene-targeting* mit loxP Sequenzen flankiert. Die loxP Sequenzen ermöglichen eine Deletion des Exons 10 durch die Rekombinase Cre. Die Deletion resultiert weiterhin in einer Leserasterverschiebung, so dass Exon 11 anstelle der Signaldomäne für eine kurze funktionslose Aminosäuresequenz codiert. Ein

Exon 10 deletiertes *ifnar1* Allel resultiert daher in einem vollständigen Funktionsverlust des Rezeptors.

Die Existenz vieler verschiedener transgener Mauslinien, die Cre in bestimmten Zelltypen oder induzierbar exprimieren, ermöglicht durch Kreuzen mit IFNAR^{flox/flox} Mäusen die Herstellung von Mauslinien mit einer zelltypspezifischen Inaktivierung des IFNAR. Die Cre-vermittelte Deletion des konditionellen IFNAR^{flox/flox} Locus wurde auf genomischer Ebene mit Southern-Blot Analyse untersucht. Aus Abb. 13b wird ersichtlich, dass die Deletion des loxP flankierten Gensegmentes von Exon 10 bei Cre-Expression erfolgreich verlief. Zur funktionellen Analyse der IFNAR-Deletion wurden Infektionsexperimente mit dem Vesiculären Stomatitis Virus (VSV) durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass homozygote IFNAR^{flox/flox} Mäuse ähnlich wie WT Mäuse in der Lage waren, eine VSV Infektion unter Kontrolle zu bringen (Abb. 13c). Somit exprimierten die geflochten Mäuse einen funktionsfähigen IFNAR. Durch Verpaaren von IFNAR^{flox/flox} Mäusen mit Cre-Deleter Mäusen [28] wurden Mäuse mit einer ubiquitären Exon 10 Deletion hergestellt (IFNAR^{Δ10/Δ10}). Als Kontrolle für den Funktionsverlust des IFNAR nach ubiquitärer Deletion dienten IFNAR^{-/-} Mäuse, bei denen die α-Kette durch konventionelle Insertion einer NEO Kasette in das Exon 3 inaktiviert worden war (Abb. 13c). Sowohl nach einer Infektion mit 2x10⁶ pfu VSV, als auch nach Infektion mit der sehr geringen VSV Dosis von 200 pfu verstarben IFNAR^{Δ10/Δ10} Mäuse ebenso schnell wie IFNAR^{-/-} Mäuse. Dies zeigte, dass die Cre-medierte Deletion des Exon 10 auf der Ebene der genomischen DNA effektiv erfolgte und in der vollständigen Inaktivierung der Rezeptorfunktion resultierte.

Um die IFNAR^{flox/flox} Mäuse für eine Analyse des Einflusses von IFN-I auf T- und B-Zellen zu züchten, wurden IFNAR^{flox/flox} Mäuse mit CD19-Cre [29] oder CD4-Cre [30] Mäusen verkreuzt um CD-19^{+/-}IFNAR^{flox/flox} (IFNAR-B) oder CD4-Cre^{+/-}IFNAR^{flox/flox} (IFNAR-T) Mäuse herzustellen. IFNAR-B Mäuse wiesen IFNAR-defiziente B-Zellen auf, in IFNAR-T war der IFNAR sowohl auf CD4⁺, als auch auf CD8⁺ T-Zellen deletiert, da die T-Zellentwicklung über CD4⁺CD8⁺ doppelt positive Lymphozyten im Thymus erfolgt. Abb. 13d zeigt, dass die zelltypspezifische Deletion des IFNAR in IFNAR-B und IFNAR-T Mäusen auf Ebene genomischer DNA erfolgreich verlief. In der Analyse der T-Zellfraktion zeigte sich eine gewisse Menge undeletierter Sequenz. Dies ist damit zu erklären, dass die aufgereinigte T-Zellfraktion bei der Analyse der IFNAR-T Mäuse lediglich eine Reinheit von 90 % besaß. In den restlichen 10 % verunreinigenden nicht-T-Zellen lag die geflochte IFNAR Sequenz undeletiert vor und erschien in der Southern Analyse als zusätzliches Signal.

Kreuzungen von IFNAR-B und IFNAR-T Mäusen ergaben $CD4\text{-Cre}^{+/-}CD19\text{-Cre}^{+/-}$ IFNAR^{flox/flox} Mäuse (IFNAR-BT), bei denen der IFNAR sowohl auf B-Zellen, als auch auf T-Zellen deletiert wurde.

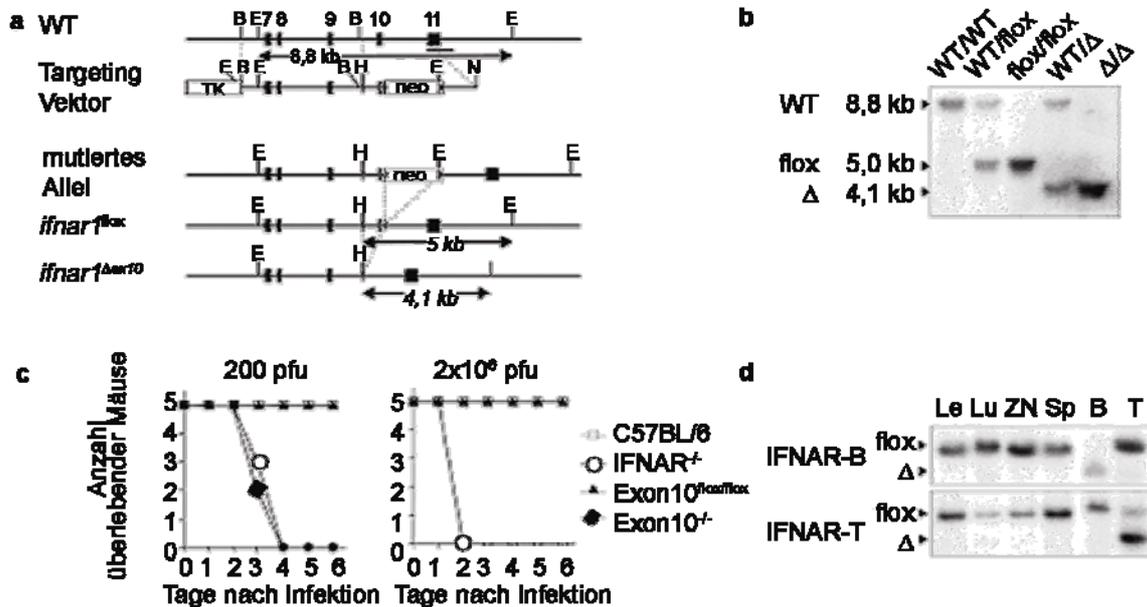


Abb. 13 Erstellung konditioneller IFNAR^{-/-} Mäuse

(a) Mäuse mit einem konditionellen IFNAR-locus wurden durch U. Kalinke generiert. (b) Die Überprüfung auf genomischer Ebene von Mäusen mit unmutierten Allelen (WT/WT), heterozygot (WT/flox) oder homozygot (flox/flox) gefloxtem Exon10, heterozygot (WT/Δ) oder homozygot (Δ/Δ) deletiertem Exon10 erfolgte durch Southern Blot Analyse. (c) C57BL/6, IFNAR^{-/-}, Exon10 gefloxt (Exon10^{flox/flox}) und Exon10 deletierte wildtyp Mäuse (Exon10^{-/-}) wurden mit 200 pfu (linke Darstellung) oder 2x10⁶ pfu VSV (rechte Darstellung) intravenös infiziert. Die Überlebensrate von 5 Mäusen aus einem von zwei Experimenten ist jeweils dargestellt. (d) Aus perfundierten (blutleeren) Mäusen wurde DNA aus Leber (Le), Lunge (Lu), Gehirn (ZN), Niere (Sp) und aus >90 % reiner T- und B-Zellenanreicherungen aus der Milz isoliert und mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI (B) und *Eco*RI (E) restringiert. Diese DNA wurde mit Exon10 flankierenden Sonden per Southern Blot analysiert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass konditionelle IFNAR^{flox/flox} Mäusen mit einer effizienten zelltypspezifischen Deletion hergestellt werden konnten.

4.1.11 Die Kontrolle der Melanomentwicklung hängt von direkter IFN-I Stimulation der T-Zellen ab

Zur Untersuchung des Einflusses von IFN-I auf spezielle Zelltypen bei der Tumorentwicklung wurden Tumorexperimente in den oben beschriebenen neu generierten konditionellen IFNAR^{-/-} Mäusen durchgeführt. Nach intradermaler Injektion von 10⁶ B16mIFN Tumorzellen in die linke Flanke von IFNAR-BT, IFNAR-B und IFNAR-T Mäusen wurde das Tumorentwicklung analysiert. In IFNAR-B Mäusen wuchs das Interferon-produzierende Melanom B16mIFN ebenso verlangsamt wie in WT Mäusen. Im Gegensatz dazu wuchsen diese Tumore in IFNAR-BT und IFNAR-T Mäusen ähnlich schnell wie in IFNAR^{-/-} Mäusen (Abb. 14).

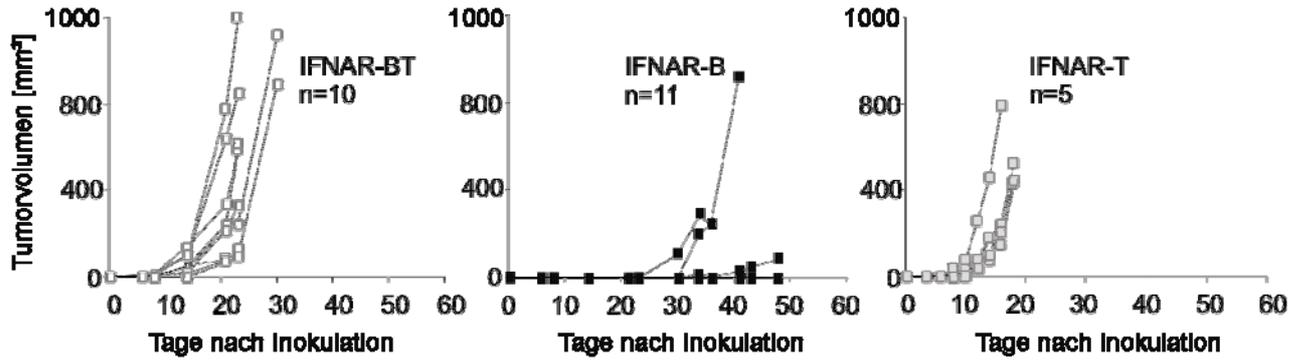


Abb. 14 Die Kontrolle des Melanomwachstums hängt von der direkten IFN-I Stimulation von T-Zellen ab

IFN-I wirkt direkt auf T-Zellen. Mäuse mit einer B- und T-Zellspezifischen IFNAR-Deletion (IFNAR-BT), einer B-Zellspezifischen (IFNAR-B) und T-Zellspezifischen (IFNAR-T) IFNAR-Deletion wurden intradermal mit 10^6 B16mIFN Tumorzellen injiziert. 5-11 Mäuse wurden pro Gruppe analysiert, dargestellt ist eines von 2-3 ähnlichen Experimenten.

Diese Ergebnisse zeigten, dass das Melanomwachstum durch IFN-I vermittelte Aktivierung von T-Zellen beeinflusst wurde. Die folgende Abb. 15 zeigt eine graphische Darstellung der Wirkung von IFN-I auf das maligne Melanom durch den direkten Einfluss auf T-Zellen.

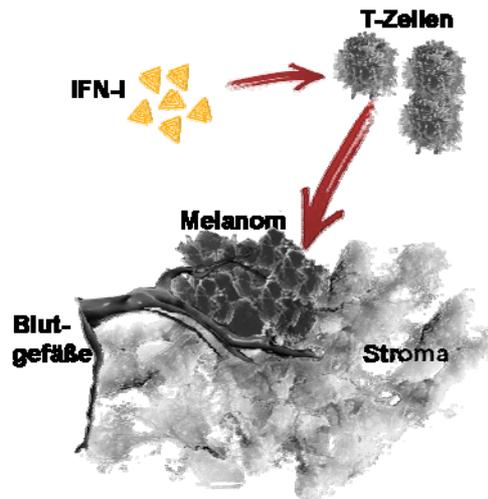


Abb. 15 Modell der direkten Wirkung von IFN-I auf T-Zellen im Modell des malignen Melanoms

IFN-I wirkt im Melanommodell direkt auf T-Zellen, welche möglicherweise daraufhin die Melanomzellen spezifisch lysieren und somit das Tumorwachstum verhindern.

4.2 Auswirkung von IFN-I auf das Lewis Lung Karzinom

In den vorherigen Experimenten mit dem malignen Melanom wurde gezeigt, dass T-Zellen einen wesentlichen Beitrag zur Kontrolle des Melanomwachstums beitrugen und dabei die IFN-I Stimulation von T-Zellen eine zentrale Rolle spielte. Dieser direkte Einfluss der IFN-I Stimulation von T-Zellen wurde auch in dem geeigneten Lewis Lung Karzinom Modell (A9_{GP33}) untersucht, von dem bekannt ist, dass es von zytotoxischen T-Zellen spontan abgestoßen wird. Weiterhin ist dieses Modell für immunologische Studien besonders geeignet, da A9_{GP33} das gut zu untersuchende T-Zellepitop GP33 des LCMV exprimiert.

1.1.1 In Mäusen ohne ein funktionelles IFN-I System erfolgt keine spontane Abstoßung des GP33 exprimierenden Lewis Lung Karzinoms A9_{GP33}

Um die Frage zu klären, ob der für das Melanom gefundene kritische Einfluss von IFN-I auf T-Zellen auch in anderen Tumormodellen eine Rolle spielt, wurde die Variante A9_{GP33} des Lewis Lung Karzinoms untersucht, welche das T-Zellepitop GP33 exprimiert. Die hier gezeigten Tumorwachstumsexperimente bestätigten, dass nach Injektion von 10^6 oder 10^7 A9_{GP33} in acht von neun WT Mäusen Tumore bis zu einer palpierbaren Größe heranwuchsen, dann aber wie zuvor beschrieben [33] abgestoßen wurden. Im Gegensatz dazu wuchsen in allen IFNAR^{-/-} Mäusen, und vereinzelt auch in WT Mäusen, A9_{GP33} Tumore progressiv (Abb. 16a). Das Wachstum der A9_{GP33} Tumor könnte i) an der fehlenden Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen, ii) an einer ineffektiven Tumorzelllyse oder iii) an der Selektion von „antigen-loss“ Varianten liegen. Da aus vorherigen Studien bekannt war, dass sich die in z.B. IFN- γ -Rezeptor defizienten Mäusen auswachsenden Tumore der spezifischen T-Zellerkennung durch Verlust des GP33 Peptid entzogen und demzufolge „antigen-loss“ Varianten selektiert wurden [33] sollten die in sporadisch in WT und regelmäßig in IFNAR^{-/-} Mäusen ausgewachsenen Tumore auf deren GP33 Expression untersucht werden.

Dazu wurden Tumore aus WT und IFNAR^{-/-} Mäusen isoliert, und 10^7 dieser *in vitro* expandierten Tumorzellen wieder in WT Mäuse reinjiziert. Wie in Abb. 16b gezeigt, wurden aus IFNAR^{-/-} reisierte Tumorzellen spontan von WT Mäusen abgestoßen, während die aus WT Mäusen isolierten Tumore unvermindert zu Tumoren heranwuchsen.

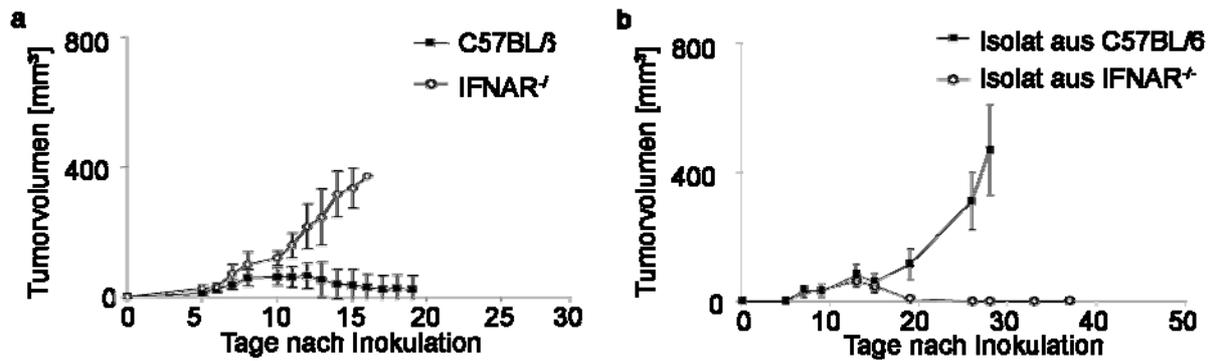


Abb. 16 Ohne endogenes IFN-I erfolgt keine Abstoßung und Editierung des GP33 exprimierenden Lewis Lung Karzinoms A9_{GP33}

In C57BL/6 wildtyp (schwarze Kästen) und IFNAR^{-/-} Mäuse (weisse Kreise) wurden intradermal 10⁶ A9_{GP33} Tumorzellen injiziert. (a) Dargestellt ist das mittlere Wachstum von 8-10 Mäusen pro Gruppe aus einem von zwei Experimenten. (b) In WT und IFNAR^{-/-} Mäusen gewachsene A9_{GP33} Tumore wurden reisoliert, *in vitro* mit und ohne Selektion kultiviert und mit einer Zellzahl von 10⁷ Zellen in Gruppen von 4-6 WT Mäuse reinjiziert. Gezeigt ist das repräsentative mittlere Wachstum je eines von 3 Isolaten aus einem Experiment. Eine *in vitro* Selektion der reisolierten Zellen mit Geneticin ergab ähnliche Daten wie nicht selektierte reisolierte Tumorzellen.

Diese Resultate zeigten, dass aus IFNAR^{-/-} Mäusen isolierte Tumorzellen ihre immunogenen Eigenschaften beibehalten hatten, während es sich bei den aus WT Mäusen isolierten Tumoren wahrscheinlich um GP33-loss Varianten handelte. Diese Befunde zeigen, dass IFN-I auch in dem hier beschriebenen Tumormodell des Lewis Lung Karzinoms einen kritischen Einfluss auf das Tumorgeschehen nimmt.

4.2.1 IFN-I wirkt über Immun- und nicht-Immunzellen

Nachdem gezeigt wurde, dass IFN-I einen kritischen Einfluss auf das Tumorwachstum des Lewis Lung Karzinoms ausübte, sollte in weiteren Experimenten untersucht werden, auf welche Wirtszellen das endogene IFN-I seine Wirkung entfaltet. Analog zu der Vorgehensweise im Modell des malignen Melanoms wurden Experimente mit Knochenmarkchimären durchgeführt. 10⁷ A9_{GP33} Tumorzellen wurden in je 3-6 Mäuse der Chimärengruppen B6>B6, IFNAR^{-/-}>IFNAR^{-/-}, IFNAR^{-/-}>B6 und B6>IFNAR^{-/-} injiziert. Im Gegensatz zu den Kontrollen zeigte sich mittleres Wachstum der Tumore in den IFNAR^{-/-}>B6 und B6>IFNAR^{-/-} Knochenmarkchimären. In beiden Gruppen war erkennbar, dass das Wachstum zu einem gewissen Grad kontrolliert werden konnte, jedoch reichte es für eine Abstoßung der Tumore nicht aus. Dargestellt sind diese Ergebnisse in Abb. 17. Wie bereits für transplantierte Melanomzellen beschrieben (siehe 4.1.5), wirkte IFN-I auch nach Transplantation von Lewis Lung Karzinomzellen sowohl auf nicht-Immun-, als auch auf Immunzellen des Organismus.

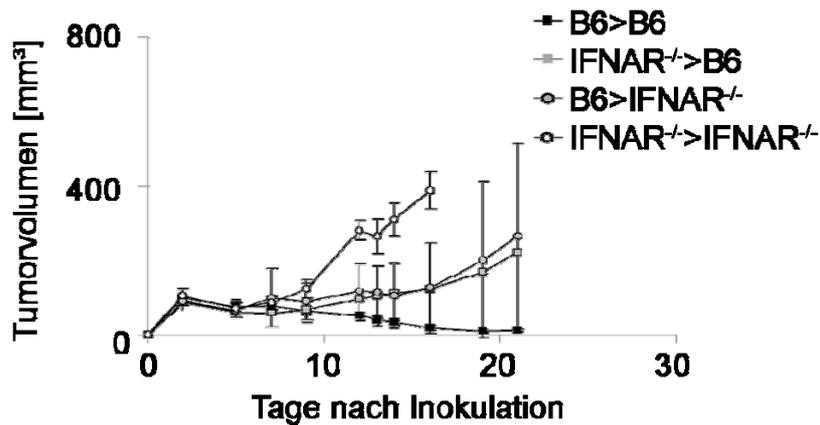


Abb. 17 Das Tumorwachstum variiert stark wenn endogenes IFN-I nur auf Immun oder nicht-Immune Zellen wirkt

Dargestellt ist das mittlere Wachstum von 10^7 in Gruppen von 3-6 Knochenmarkchimären injizierten $A9_{GP33}$ Tumorzellen. B6>B6 (schwarze Kästen), IFNAR^{-/-}>IFNAR^{-/-} (weisse Kreise), B6>IFNAR^{-/-} (graue Kreise) und IFNAR^{-/-}>B6 (graue Kästen). Experiment einmal durchgeführt.

In den nächsten Abschnitten wird der Einfluss des IFN-I insbesondere auf die zytotoxischen T-Zellen (CTL) untersucht.

4.2.2 In IFNAR^{-/-} Mäusen werden spezifische T-Zellen aktiviert

Es wurde bisher gezeigt, dass WT im Gegensatz zu IFNAR^{-/-} Mäusen in der Lage waren, Tumorwachstum zu kontrollieren. Zuvor wurde bewiesen, dass die Injektion von Tumorzellen in WT Mäuse zur Aktivierung GP33-spezifischer CTL führte, die die Tumorabstoßung vermittelten. Da in IFNAR^{-/-} Mäusen keine Tumorabstoßung zu beobachten war stellte sich die Frage, ob in IFNAR^{-/-} Mäusen keine GP33-spezifischen CTLs aktiviert wurden. Um dieser Frage nachzugehen wurde analysiert, ob in tumortragenden WT und IFNAR^{-/-} Mäusen restimulierbare, tumorspezifische CTL in der Milz auffindbar waren. In Zusammenarbeit mit Dr. Peter Aichele, Freiburg, wurde die Zytotoxizität der tumorreaktiven Zellen nach *in vitro* Restimulation in einem Standard-Chromfreisetzungstest analysiert (3.7). Dazu wurden $A9_{GP33}$ Tumorzellen in WT und IFNAR^{-/-} Mäuse injiziert. Nach sechs und acht Tagen wurden die Milzen dieser Mäuse isoliert und mit GP33-Peptid oder Kontrollpeptid-beladenen APC für eine Restimulation tumorreaktiver T-Zellen kokultiviert. Die Fähigkeit der tumorreaktiven CTL-Effektorzellen, EL-4-Zielzellen in einem *in vitro* Test antigenspezifisch zu lysieren wurde anschließend durch Chromfreisetzung der lysierten Zielzellen ermittelt. Als Positivkontrolle dienten Splenozyten von LCMV infizierten WT Mäusen, die effiziente GP33-spezifische CTL generierten.

Wie in Abb. 18 dargestellt, zeigten restimulierte Milzzellen aus WT Mäusen sechs Tage nach Injektion der Tumorzellen eine GP33-spezifische Lyse von Zielzellen. Mit irrelevantem

Peptid beladene EL-4 Zielzellen wurden dagegen nicht lysiert. In IFNAR^{-/-} generierte Effektorzellen aus der Milz waren ebenfalls sechs Tage nach Injektion der A9_{GP33} Tumorzellen in der Lage, GP33-spezifisch Zielzellen zu lysieren. Ähnliche Ergebnisse lieferten auch Milzzellen von WT und IFNAR^{-/-} Mäusen, welche acht Tage nach GP33-Injektion analysiert wurden (Daten nicht gezeigt).

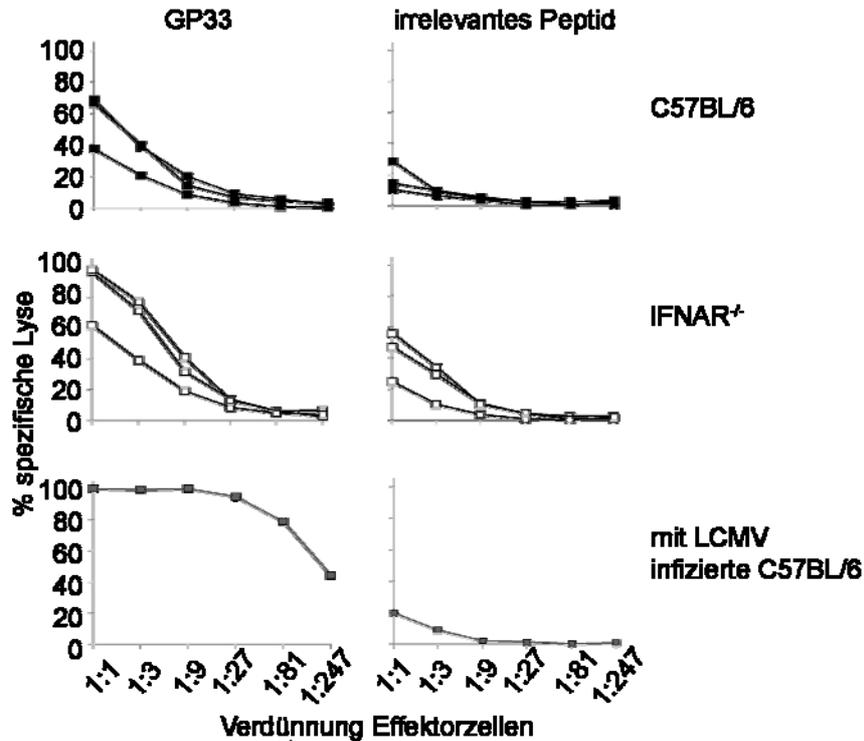


Abb. 18 IFNAR^{-/-} Mäuse generieren spezifische zytotoxische T-Zellen (CTL)

Dargestellt ist der durch einen Chromfreisetzungstest ermittelte Prozentsatz spezifischer Lyse von Zielzellen durch restimulierte CTL tumortragender Mäuse. C57BL/6 und IFNAR^{-/-} Mäuse wurden 10⁷ A9_{GP33} Tumorzellen zur Aktivierung GP33 spezifischer CTL injiziert. Als Positivkontrolle dienten Splenozyten LCMV-infizierter Mäuse. Sechs Tage später wurden die Splenozyten (Effektorzellen) dieser Mäuse isoliert und *in vitro* mit GP33- oder irrelevantem Peptid beladenen, IFNAR-kompetenten Milzzellen tumorfreier Mäuse restimuliert. Zur Durchführung des Chromfreisetzungstests wurden EL-4 Zielzellen mit 10⁻⁶M GP33 oder irrelevantem E1-A Peptid beladen und 10⁴ dieser Zielzellen mit seriell verdünnten Mengen der restimulierten Effektorzellen kokultiviert. Die spezifische Lyse wurde durch die durchschnittliche Menge an Radioaktivität im Zellkulturüberstand berechnet. Das Experiment wurde zweimal mit 3 Mäusen pro Gruppe durchgeführt.

Diese Ergebnisse zeigten, dass sowohl in WT, als interessanterweise auch in IFNAR^{-/-} Mäusen durch Injektion der A9_{GP33} Tumorzellen tumorspezifische T-Zellen generiert wurden.

4.2.3 GP33-spezifische T-Zellen aus A9_{GP33} behandelten IFNAR^{-/-} Mäusen entfalten *in vivo* keine zytotoxische Aktivität

Da IFNAR^{-/-} Mäuse trotz Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen nicht in der Lage waren, das Tumorstadium zu kontrollieren, wurde die *in vivo* Funktionsfähigkeit dieser CTL untersucht. Es bestand zum einen die Möglichkeit, dass die T-Zellen lokal im Tumor außer Funktion gesetzt wurden, oder zum Anderen, dass die tumorspezifischen T-Zellen in IFNAR^{-/-}

Mäusen *in vivo* generell keine Funktion mehr aufwiesen. Dazu wurden spezifische T-Zellen durch Injektion von A9_{GP33} Tumorzellen in WT und IFNAR^{-/-} Mäuse aktiviert und anschließend CFSE-farbmarkierte, GP33 exprimierende Splenozyten aus H8 Mäusen (2.1) als Zielzellen intravenös in die tumortragenden Mäuse injiziert. Durch die Menge CFSE-positiver Zielzellen in analysierten Blutproben konnte im Verlauf des Experimentes auf die *in vivo* Eliminierung der Zielzellen durch aktivierte CTL geschlossen werden (Abb. 19).

Es soll vermerkt werden, dass während dieses Experimentes die injizierten Tumore in WT Mäusen wie erwartet abgestoßen wurden. Dagegen war in IFNAR^{-/-} Mäusen nach Injektion der GP33 exprimierenden, CFSE markierten Splenozyten als Zielzellen ein untypischer Verlauf des Tumorwachstums zu verzeichnen; die Tumore verkleinerten sich transient, um später wieder progressiv auszuwachsen (Daten nicht gezeigt).

Die Eliminierung der Zielzellen ist als Prozentsatz CFSE⁺ Zellen der Blutlymphozyten in Abb. 19 dargestellt. Während die aktivierten CTL der A9_{GP33} tumortragenden WT Mäuse die injizierten Zielzellen innerhalb von vier Tagen vollständig eliminierten, waren die Zielzellen in IFNAR^{-/-} Mäusen vergleichbar zur Negativkontrolle über einen Zeitraum von zwei Wochen im Blut nachweisbar. Als Negativkontrolle zu GP33 spezifischer Lyse der Zielzellen wurden A9 Tumorzellen in wildtyp Mäuse injiziert, die kein GP33 Peptid exprimieren und somit keine GP33-spezifischen T-Zellen aktivierten.

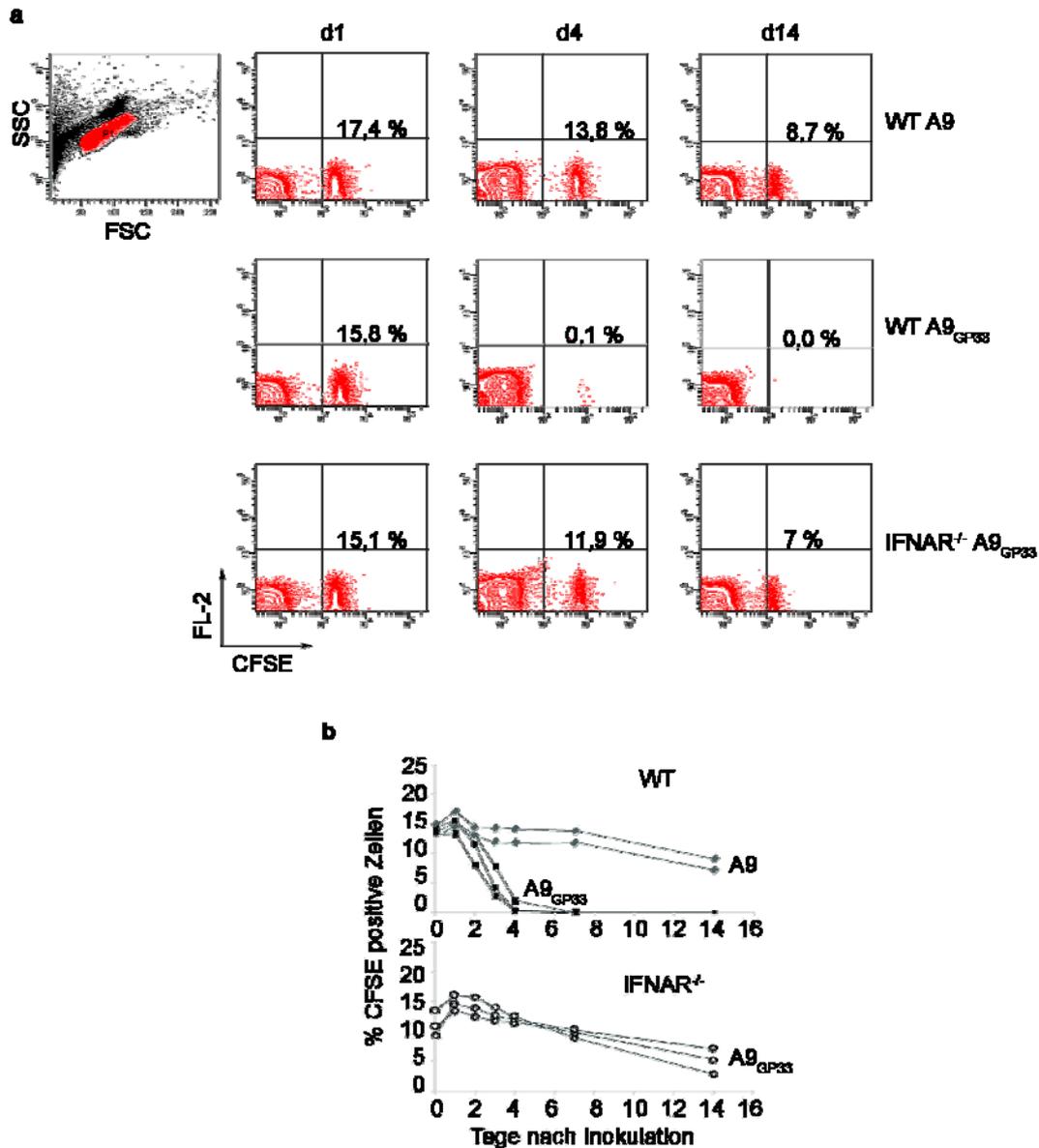


Abb. 19 IFNAR⁻ Mäuse generieren spezifische T-Zellen, die jedoch *in vivo* nicht effektiv sind

Zur Induktion von GP33 spezifischen CTL wurden A9_{GP33} Tumorzellen in Gruppen von je 2-3 C57BL/6 (WT) oder IFNAR⁻ Mäusen injiziert. Als Negativkontrolle wurden WT Mäuse parentale A9 Tumorzellen injiziert. $5 \cdot 10^7$ GP33 exprimierende H8-Splenozyten wurden als Zielzellen 5 Tage nach Transplantation der Tumorzellen mit CFSE markiert und in die Mäuse injiziert. Zum Nachweis von GP33 spezifischen CTL *in vivo* wurde den Mäusen über einen Zeitraum von 14 Tagen Blut entnommen und der Anteil verbleibender Zielzellen per FACS Analyse bestimmt (3.5.2). a) Dargestellt sind exemplarisch durchflusszytometrische Primärdaten, die den prozentualen Anteil von CFSE markierten Zielzellen im Blut der Mäuse über einen Zeitraum von 14 Tagen zeigt. Durch die Zugabe einer bestimmten Anzahl Beads (BD) wurde jeweils das gleiche Volumen Blut gemessen. b) Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CFSE-positiven Zellen an Blutlymphozyten in A9_{GP33} tragenden WT- (schwarze Kästen) oder IFNAR⁻ Mäusen (Kreise) und A9 tragenden WT Mäusen (graue Rauten) im Verlauf von 14 Tagen.

Diese Resultate zeigten, dass in WT Mäusen durch die Injektion von A9_{GP33} Tumorzellen lytisch aktive Zellen aktiviert wurden, die spezifisch und effektiv Zielzellen eliminierten. Die in IFNAR⁻ Mäusen aktivierten Zellen waren hingegen generell nicht in der Lage, diese Zielzellen GP33-spezifisch *in vivo* zu eliminieren.

4.2.4 Die Abstoßung transplantiertes Lewis Lung Karzinomzellen erfolgt nicht durch die direkte IFN-I Stimulation von T-Zellen

In A9_{GP33} behandelten IFNAR^{-/-} Mäusen wurden GP33-spezifische CTLs induziert, die Zielzellen *in vivo* nicht effektiv lysieren konnten. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Frage aufgeworfen, ob die Funktion der CTL von einer direkten IFN-I Stimulation abhängt, wie es bei den transplantierten Melanomzellen beobachtet wurde (4.1.11). Zur Klärung dieser Frage wurden A9_{GP33} Tumorzellen in IFNAR-T (3.9) Mäuse injiziert. Wie aus Abb. 20 ersichtlich wird, wurden im Verlaufe des Experimentes die Tumore vollständig abgestoßen. Im Gegensatz zu den Melanomzellen war die Abstoßung des Lewis Lung Karzinoms somit nicht von einer direkten IFN-I-Stimulation der T-Zellen abhängig.

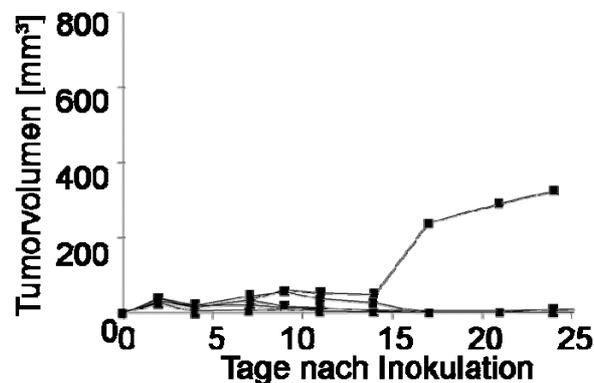


Abb. 20 Die Abstoßung von A9_{GP33} erfolgt nicht über die direkte IFN-I Stimulation von T-Zellen

Dargestellt ist das Wachstum von A9_{GP33} Lewis Lung Karzinomzellen in konditionellen IFNAR-T Mäusen. Die Abstoßung von A9_{GP33} ist nicht von direkter Typ I Interferon-Stimulation der T-Zellen abhängig. 10⁷ A9_{GP33} Tumorzellen wurden intradermal in die linke Flanke von 5 IFNAR-T Mäusen injiziert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von zweien.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Abstoßung von transplantierten GP33 exprimierenden A9_{GP33} Tumorzellen stark von endogenem IFN-I abhängt. Das endogene IFN-I wirkte bei transplantierten Karzinomzellen sowohl auf Immun-, als auch auf nicht-Immunzellen. Trotz der Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen in IFNAR^{-/-} Mäusen wuchsen alle Tumore progressiv. Die tumorinduzierten, GP33 spezifischen T-Zellen waren in Abwesenheit eines funktionellen IFN-I Systems nicht in der Lage, Zielzellen mit gleicher Antigenexpression *in vivo* zu eliminieren. Die antitumorale Wirkung von IFN-I erfolgte in diesem Modell nicht wie bei den wenig immunogenen, transplantierten Melanomzellen über den direkten Einfluss auf T-Zellen (vergleiche 4.1.11).

Die Ergebnisse aus der Untersuchung des malignen Melanoms und des Lewis Lung Karzinoms zeigten übereinstimmend, dass IFN-I einen kritischen Einfluss auf das Tumorstadium besitzt, ungeachtet ob durch IFN-I Produktion eine

therapieinduzierte Immunantwort hervorgerufen, oder endogenes IFN-I induziert wird. In der therapieinduzierten Immunantwort gegen die transplantierten Melanomzellen hinderte IFN-I die Blutgefäßbildung zur Versorgung des Tumors. Chemokine, die eine Auswirkung auf die Blutgefäßbildung und das Anlocken von Immunzellen haben, wurden im Tumor nur bei Präsenz des IFNAR transkribiert. Weiterhin wirkte IFN-I direkt auf T-Zellen, die das Wachstum des Melanoms kontrollierten. Untersuchungen der Lewis Lung Karzinom Variante A9_{GP33} zeigten, dass tumorspezifische T-Zellen zwar unabhängig von IFN-I aktiviert werden konnten, dass diese jedoch ohne IFN-I nicht in der Lage waren, *in vivo* effektiv Zielzellen zu lysieren. Trotzdem war die antigenvermittelte Abstoßung des Lewis Lung Karzinoms nicht abhängig von einem direkten Einfluss des IFN-I auf T-Zellen.

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit analysiert den Einfluss des Typ-I Interferons (IFN-I) auf das Tumorstadium. Die Untersuchungen basieren auf zwei verschiedenen Tumormodellen: Dem wenig immunogenen malignen Melanom B16 und dem stark immunogenen Lewis Lung Karzinom A9. In beiden Modellen wurden transgene Varianten der Tumorzellen in Mäuse transplantiert.

Transgene maligne Melanomzellen (B16mIFN) exprimieren das therapeutisch genutzte Zytokin Interferon- α 2, und so lassen sich die Effekte von IFN- α bei einer therapieinduzierten Immunantwort analysieren. Im zweiten Modell exprimiert die transgene Variante A9_{GP33} des Lewis Lung Karzinoms ein H-2^b restringiertes Peptid aus dem Glykoprotein GP33 des Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) als Neotumorantigen. GP33 ist ein gut charakterisiertes T-Zellantigen, für das mehrere transgene Mausmodelle zur Analyse antigenspezifischer Immunantworten zur Verfügung stehen. Mit diesem Modell lässt sich der Einfluss von endogenem IFN-I bei der T-Zell-vermittelten Tumorabstoßung untersuchen.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen, dass IFN-I generell einen kritischen Einfluss auf das Tumorstadium transplantierte Melanom- und Karzinomzellen ausübt. Dabei ist es unerheblich, ob das IFN-I von den Tumorzellen produziert oder endogenes IFN-I induziert wird. Nach Transplantation von B16mIFN Melanomzellen fördert therapeutisch eingeführtes IFN-I die Angiostase und die Chemokintranskription innerhalb des Tumorstromas.

Einen unerwarteten Befund ergibt die vergleichende Tumorstadiumsuntersuchung mit gentechnisch veränderten Mäusen: Sowohl Mäuse mit einer IFN-I Rezeptor Deletion im gesamten Organismus (IFNAR^{-/-}), als auch Mäuse mit einer T-Zell-spezifischen IFN-I Rezeptor Deletion (IFNAR-T) zeigen im Gegensatz zu wildtyp Tieren ein progressives Tumorstadiumwachstum. Das Melanomwachstum wird demnach direkt durch IFN-I über die Wirkung auf T-Zellen kontrolliert.

Endogenes IFN-I zeigt nach Transplantation von A9_{GP33} Karzinomzellen ebenfalls einen starken antitumoralen Einfluss. Die Verminderung des Tumorstadiums wird jedoch nicht wie bei den B16mIFN Melanomzellen durch direkte IFN-I Stimulation von T-Zellen vermittelt: Tatsächlich stoßen wildtyp und auch IFNAR-T Mäuse spontan transplantierte A9_{GP33} Tumorzellen ab. Offensichtlich sind bei der IFN-I kontrollierten Abstoßung der A9_{GP33} Tumorzellen nicht die T-Zellen, sondern weitere Wirtszellen ausschlaggebend. Das

Tumorstroma übt großen antitumoralen Einfluss aus, das wahrscheinlich durch die Interaktion mit T-Zellen oder alternativ durch Faktoren wie der Immunogenität der Tumorzellen oder deren Antigendichte aktiviert wird. Die IFNAR-Kompetenz des Stroma ist dabei essentiell für eine effiziente Tumorabwehr.

Wie die unterschiedliche Datenlage in beiden Tumormodellen zeigt, moduliert IFN-I die antitumoralen Aktivitäten über verschiedene Effektormechanismen.

5.1 Effekte von IFN-I auf das maligne Melanom

Wachstumsexperimente mit transplantierten murinen Melanomzellen B16 in syngen C57BL/6 wildtyp (WT) und Interferonrezeptor-defizienten (IFNAR^{-/-}) Mäusen zeigen ein früher einsetzendes Tumorstadium in IFNAR^{-/-} Mäusen (Abb. 2a).

Sowohl in WT als auch IFNAR^{-/-} Mäusen findet sich eine ähnliche Wachstumskinetik der B16 Tumorzellen, und ein Tumordurchmesser von 1 cm wird in IFNAR^{-/-} Mäusen nicht signifikant schneller erreicht als in WT Mäusen (Abb. 2b). Diese Daten belegen ein schnelleres Einsetzen des Tumorstadiums bei defektem Typ I-Interferonsystem. In der Literatur ist dies für Interferon-depletierte [34] und später auch für Interferonrezeptor-defiziente (IFNAR^{-/-}) Mäuse beschrieben [13, 18]. In C3H Mäusen wachsen syngene Melanomzellen langsamer als in IFNAR^{-/-} Tieren [13].

Da IFN-I einen Einfluss auf die Wachstumskontrolle des Tumors zu nehmen scheint, findet in der weiteren Analyse die Interferon- α 2 (IFN- α 2) produzierende Variante B16mIFN Verwendung. Hier werden Effekte untersucht, die durch lokal produziertes IFN-I hervorgerufen werden.

Wachstumsexperimente von B16mIFN in WT und IFNAR^{-/-} Mäusen zeigen bei WT Mäusen eine Verzögerung der Wachstumsgeschwindigkeit des Melanoms durch lokal produziertes IFN- α 2 (Abb. 3 und Abb. 5). Die IFN-I produzierenden B16mIFN Tumorzellen wachsen in WT Mäusen signifikant später, die Tumore zeigen ein stark verlangsamtes Wachstum und erreichen einen Durchmesser von 1 cm erst später als parentale B16 Tumore (Abb. 3b und [8]). 20 % der mit B16mIFN injizierten WT Mäuse bleiben unabhängig von der untersuchten Injektionsdosis am Ende des Experimentes vollkommen tumorfrei, während IFNAR^{-/-} Mäuse in allen Tumor-behandelten Mäusen ein progressives Tumorstadium verzeichnen. Dies

zeigt, dass IFN-I die Tumorentwicklung verringert. Auf welche Weise IFN-I diese Wirkung entfaltet, wird im folgenden diskutiert.

IFN-I nimmt in gewissem Maße auch Einfluss auf die Tumorzellen [11, 16, 17], doch neuere Arbeiten belegen, dass die antitumorale Effekte von IFN-I hauptsächlich auf einer Stimulation der Immunzellen beruhen [18]. Das ähnliche Wachstumsverhalten von B16 und B16mIFN *in vitro* (Abb. 4b) schließt ebenfalls antiproliferative autokrine Effekte des IFN-I auf Tumorzellen in dieser Arbeit aus. Da sowohl B16, als auch transgene B16mIFN Tumorzellen in IFNAR^{-/-} Mäusen ähnlich progressiv wachsen, kann das verlangsamte Wachstum von B16mIFN in WT Mäusen nicht auf der Interferonproduktion oder sonstigen Defekten der transgenen Variante beruhen.

Möglicherweise erhöht eine stärkere MHC-I Expression die Immunogenität bei IFN-I-produzierenden Tumorzellen. Die Zellen wachsen jedoch in IFNAR^{-/-} Mäusen progressiv, so dass eine eventuell erhöhte MHC I Expression keinerlei Auswirkung auf die Immunantwort zeigt. Die IFN-I-abhängige Tumorabstoßung erfolgt demnach über IFNAR-kompetente Wirtszellen des adaptiven Immunsystems.

Nachdem der Einfluss des IFN-I auf das Tumorstadium belegt ist, stellt sich die Frage, ob die Wirkung über lokale oder systemische Effekte erfolgt.

Das durch den Tumor produzierte IFN- α 2 ist systemisch nicht in WT Mäusen detektierbar, wie Analysen von Blutseren zeigen (Abb. 5). Der gezeigte Einfluss auf das Tumorstadium beruht daher auf einer lokalen Aktivität des IFN-I. Diese lokal begrenzte Wirkung könnte in der Bindung durch Rezeptoren und der kurzen Halbwertszeit von IFN-I [35] begründet sein.

Da in IFNAR^{-/-} Mäusen innerhalb von sieben Tagen nach Injektion von IFN- α 2-produzierenden Tumorzellen leicht erhöhte Interferonspiegel im Serum detektierbar sind, kann davon ausgegangen werden, dass die Tumorzellen das Zytokin für mindestens eine Woche weiterhin *in vivo* produzieren. Fehlende IFN-I Rezeptoren in den IFNAR^{-/-} Mäusen sind vermutlich die Ursache, dass produziertes IFN- α 2 nicht lokal gebunden wird sondern mit der Zeit im Blutserum nachweisbar wird.

Mithilfe von gentechnisch veränderten Mäusen - deren Zellen nach Kontakt mit IFN-I das fluoreszierende Protein GFP exprimieren - könnten genauere Untersuchungen bezüglich der lokalen Effekte von IFN-I wie Wirkungsort und reagierende Zelltypen durchgeführt werden. Diese Mäuse standen jedoch zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit noch nicht zur

Verfügung. Stattdessen werden die an der antitumoralen Immunantwort beteiligten Zelltypen über Knochenmarkchimären analysiert.

Wachstumstests mit B16mIFN in Knochenmarkchimären belegen einen Einfluss von IFN-I auf das Tumorstroma durch die Wirkung auf bestrahlungssensitive und bestrahlungsresistente Zellen (Abb. 7). Auffällig ist das generell verlangsamte Tumorstroma in Chimären verglichen mit unbestrahlten Tieren. Innerhalb der unterschiedlichen Chimärengruppen und Kontrollen sind jedoch große Wachstumsunterschiede zu verzeichnen, so dass Rückschlüsse auf die Wirkung von IFN-I auf Zellgruppen möglich sind. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark durch die Bestrahlung der Mäuse zerstört und damit die Immunzellen durch Knochenmarktransplantation ersetzt werden.

B16mIFN-Wachstumsanalysen in den Chimären zeigen, dass IFN-I nicht nur Immunzellen, sondern auch nicht-Immunzellen direkt beeinflusst. Das Tumorstroma setzt in B6>IFNAR^{-/-} Chimären früher ein als in IFNAR^{-/-}>B6 Chimären. Vermutlich nehmen bestrahlungsresistente Zellen im Tumorstroma IFN-I abhängig Einfluss auf das Tumorstroma. Im Folgenden wird sowohl die Wirkung von IFN-I auf das Tumorstroma, als auch auf die Immunzellen genauer analysiert.

Analysen vom Tumorstroma aus WT und IFNAR^{-/-} Mäusen zeigen bei IFNAR-kompetenten Mäusen eine geringere Blutgefäßdichte in der Tumormasse (Abb. 8). Ähnliche Befunde werden sowohl mit Tumoren gleicher Größe, als auch mit Tumoren gleicher Wachstumsdauer erhoben. IFN-I wird eine antiangiogenetische (blutgefäßreduzierende) Wirkung zugesprochen [36, 37], die sich durch eine geringere Blutgefäßdichte und einer damit verringerten Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff auszeichnet. Die IFNAR-Defizienz von Mäusen korreliert tatsächlich mit erhöhter Blutgefäßdichte im Tumorgewebe und progressivem Melanomwachstum. Einer Reduktion der Blutgefäßdichte durch IFN-I kann sowohl die Inhibition der Blutgefäßneubildung (Neovaskularisierung), als auch die Zerstörung bereits bestehender Blutgefäße zugrunde liegen [38-42]. Diese Daten stützen die Theorie, dass das Tumorstroma einen großen Einfluss auf die Entwicklung eines Tumors ausübt [43].

Weiterführende Untersuchungen vom Tumorstroma aus IFNAR^{-/-} Mäusen belegen eine geringere Transkription der Chemokine CXCL10 (IP-10) und CXCL11 (I-TAC, beta-R1) verglichen mit WT Mäusen (Abb. 9): Die durch Interferone induzierbaren Chemokine IP-10

und I-TAC werden in interferonkompetenter Tumorumgebung transkribiert, während das Fehlen des IFN-I Rezeptors mit einer kaum detektierbaren Chemokintranskription, erhöhter Blutgefäßdichte und progressivem Tumorwachstum korreliert.

Bestimmte Zytokine besitzen eine antitumorale Wirkung, die mit antiangiogenetischen Effekten und der Expression des Chemokins CXCL10 (IP-10) einhergehen [38]. IP-10 wird durch Interferon-gamma (IFN- γ , IFN-II) und LPS induziert. Die Bildung erfolgt in Splenozyten athymischer Mäuse, in aktivierten Monozyten und in humanen Endothelzellen [38, 44]. IP-10 inhibiert die Neovaskularisation *in vivo* und fördert die Zerstörung bestehender Blutgefäße in Tumoren von athymischen Mäusen [38, 45, 46].

Das Chemokin CXCL11 (I-TAC, beta-R1) ist besonders durch Interferon- β induzierbar und fungiert als Chemoattraktant. Im Gegensatz zu IP-10 besitzt es keinen Einfluss auf die Blutgefäßdichte. Gemeinsam mit IP-10 und einem weiteren Chemokin, CXCL9 (MxA) bildet es eine Gruppe von CXC-Chemokinen, die spezifisch den CXC-Rezeptor 3 (CXCR3) binden. Dieser Rezeptor wird auf plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) [47], aktivierten T-Zellen [48] und sogar auf murinen B16-F10 Melanomzellen [49] exprimiert, deren Migration durch diese Chemokingruppe angeregt wird. Der Nachweis der Chemokine auf Proteinebene oder eine vermehrte T-Zellinfiltration in das interferonproduzierende, IP-10 und I-TAC transkribierende Tumorstroma konnte jedoch bislang aus technischen Gründen in dieser Arbeit nicht erbracht werden.

Neben dem Einfluss auf das Stroma weisen unsere Experimente mit Knochenmarkchimären auf eine direkte Wirkung des IFN-I auf Immunzellen hin. Zu ähnlichen Ergebnissen kam Dunn *et al.* [18], der in einem Sarkom-Modell ebenfalls einen direkten Einfluss des IFN-I auf Immunzellen zeigt, jedoch keine detaillierten Analysen bezüglich des Typs dieser Immunzellen wie z.B. B-Zellen, T-Zellen [8, 50] oder NK Zellen [27] vorstellt.

Die weiteren Untersuchungen in dieser Arbeit befassen sich nun mit der Beteiligung von T-Zellen bei der Immunantwort gegen Melanomzellen und dem Einfluss von IFN-I auf diese Zellen. Zuerst wird die generelle Beteiligung von T-Zellen an der Kontrolle des Melanomwachstums bestätigt; eine Depletion von CD8 positiven (CD8⁺) T-Zellen verstärkt das Wachstum des Tumors (Abb. 11e). Im Gegensatz zu CD8⁺ T-Zellen; hier führt eine Depletion zu einer signifikanten Verminderung des Tumorwachstums (Abb. 11d).

Bezüglich der CD4⁺ T-Zellen sind regulatorisch fungierende Zellen identifiziert [51] und aus zeitlichen Gründen wurde dieser Zelltyp nicht vertieft betrachtet. Es ergibt sicher ein interessantes Projekt, die Abhängigkeit dieser wichtigen regulatorischen Funktion vom Typ I Interferon aufzuzeigen.

Bisher zeigen die Daten einen Einfluss von IFN-I auf Immunzellen und eine Kontrolle des Melanomwachstums durch T-Zellen. Es wird daher untersucht, ob IFN-I die beteiligten T-Zellen direkt beeinflusst. Es ist bekannt, dass die Behandlung mit IFN-I die CD8⁺ T-Zell-abhängige Immunantwort und eine lang anhaltende Tumormunität fördert [50]. Der Einfluss wird nun erst mit aufwändigen Knochenmarkchimären, anschließend zelltypgenau mit eigens dafür generierten konditionellen Knockoutmäusen gezeigt.

Durch Knochenmarktransplantationen mit RAG^{-/-} Mäusen (3.4) werden Chimären generiert, bei denen spezifisch der IFNAR auf B- und T-Zellen deletiert ist. Ein Kotransfer von RAG^{-/-} Knochenmark zusammen mit wildtyp- (mixB6) oder IFNAR^{-/-} (mixIFNAR^{-/-}) Knochenmark in bestrahlte RAG^{-/-} Mäuse (mixB6>RAG^{-/-} oder mixIFNAR^{-/-}>RAG^{-/-}) macht dies möglich. Der Anteil von RAG^{-/-} Knochenmark generiert IFNAR-kompetente Immunzellen, aber keine B- und T-Zellen. Die B- und T-Zellen werden in den mixIFNAR^{-/-}>RAG^{-/-} ausschließlich durch den Anteil des IFNAR^{-/-} Knochenmarks generiert. Diese Chimären sollten daher spezifisch auf B- und T-Zellen IFNAR-defizient sein und Eigenschaften von konditionellen Mäusen aufweisen. Diese Rekonstitution setzt voraus, dass die Knochenmarkanteile annähernd gleichmäßig rekonstituieren und die sich entwickelnden IFNAR-kompetenten Immunzellen die Funktion der IFNAR^{-/-} Immunzellen ausgleichen können.

Tatsächlich zeigen die Daten aus Abb. 12, dass die IFNAR-Defizienz von T-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle des malignen Melanoms spielt. In mixIFNAR^{-/-}>RAG^{-/-} Mäusen wachsen Tumore progressiv. Bei den herkömmlichen IFNAR^{-/-}>B6 Chimären aus Abb. 7d war jedoch das Tumorstadium sehr viel stärker kontrolliert, obwohl in beiden Gruppen B- und T-Zellen IFNAR-defizient sind. Diese unterschiedlichen Befunde müssen erklärt werden. Das unterschiedliche Wachstum der Tumore könnte daran liegen, dass generell 4 % bis 8 % residuale interferonkompetente CD3⁺ Zellen in den herkömmlichen Chimären vorhanden sind, die nicht rekonstituiert werden (vgl. Abb. 6). Möglicherweise ist bereits diese Menge IFNAR-kompetenter T-Zellen für eine Veränderung des Tumorstadiums ausreichend. Die Interaktion von T-Zellen mit dem Tumorstroma erfolgt zytokin-abhängig, wobei das Stroma letztendlich die antitumorale Aktivität entfaltet [52, 53]. Die hier gezeigten Chimären weisen bereits darauf hin, dass IFN-I notwendig bei der T-Zell-Stroma-

Interaktion zur Entfaltung der antitumoralen Aktivität des Stromas ist. Möglicherweise entstehen synergistische Effekte, wenn sowohl T-Zellen, als auch Stroma IFNAR-kompetent sind. Gezüchtete konditionelle Knockoutmäuse, in denen die IFNAR-Defizienz zelltypspezifisch kontrolliert ist, schließen die Nachteile der Chimären aus.

Die neu erstellten IFNAR-flox Mäuse von U. Kalinke bieten die Möglichkeit, durch Kreuzung mit entsprechenden Cre-Mäusen den IFNAR auf spezifischen Zelltypen der Nachkommen zu deletieren. Durch die daraus resultierenden konditionellen Knockoutmäuse werden die erwähnten Nachteile von Knochenmarkchimären umgangen. Für diese Arbeit wird in den konditionellen Mäusen der Interferonrezeptor spezifisch auf T-Zellen (IFNAR-T) oder B-Zellen (IFNAR-B) oder auf beiden Zelltypen (IFNAR-BT) durch die in Kapitel 3.9 beschriebene Kreuzungen deletiert. So kann der direkte Einfluss von IFN-I auf B- und T-Zellen während der Immunantwort gegen die Melanomzellen untersucht werden.

IFN-I übt den beobachteten Effekt direkt über T-Zellen aus (Abb. 14). Dies stellt einen neuen Aspekt in der Immunantwort gegen Melanome dar. Da in den hier verwendeten IFNAR-T Mäusen der IFN-I-Rezeptor sowohl auf CD4⁺, als auch auf CD8⁺ T-Zellen deletiert ist, bleibt die Frage bis auf weiteres offen, über welche der T-Zellsubtypen IFN-I seinen Effekt ausübt.

Interessanterweise schien in den IFNAR-T Mäusen das Stroma keine antitumoralen Effekte auszuüben, ebenso wie in den in Abb. 12 gezeigten Chimären. Es wird oft angenommen, dass die Tumorabstoßung hauptsächlich durch zytotoxische T-Zellen erfolgt. Es gibt vermehrt Hinweise, dass die Tumorabstoßung nicht generell auf die direkte Lyse durch CTL reduziert werden kann. Einen großen Einfluss spielen Interaktionen von T-Zellen mit tumorumgebenden Stromazellen, wobei der eigentliche antitumorale Effekt durch das Stroma erfolgt [52, 53]. Zytokine kontrollieren diese Vorgänge. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte wäre es zu simpel, den Einfluss der T-Zellen und des IFN-I auf das maligne Melanom zwingend auf direkte Lyse durch CTL zurückzuführen. Es ist plausibel, dass T-Zellen mit Hilfe von IFN-I einen Einfluss auf das Stroma ausüben, welches die eigentlichen antitumoralen Effekte ausübt. Wenn die fehlende IFN-I Kompetenz der T-Zellen die Interaktion mit dem Stroma unterbindet, wachsen die Tumorzellen progressiv aus. Es ist daher notwendig, die Interaktionsfähigkeit der IFNAR-defizienten T-Zellen mit dem Stroma zu verstehen. Sehr interessant ist dabei, ob IFN-I die Expression des Effektormoleküls IFN- γ in T-Zellen beeinflusst.

Es soll nicht ausgeschlossen werden, dass weitere, unbekannte Mechanismen dazu führen, dass das Tumorstroma auf das wenig immunogene maligne Melanom keine antitumorale Effekte ausübt. Es scheinen keine Faktoren vorzuliegen, die die IFNAR-Defizienz der T-Zellen kompensieren. Möglicherweise aktivieren die sehr schwach immunogenen Tumorzellen keine antitumorale Reaktion des Tumorstromas. Eine Untersuchung der Vaskularisierung und Chemokinexpression von Tumoren aus IFNAR-T Mäusen hilft sicherlich, diesen Sachverhalt besser zu verstehen.

Die folgende Abbildung stellt modellhaft die bisher in der Arbeit gezeigten IFN-I-abhängigen Geschehnisse im malignen Melanom graphisch dar:

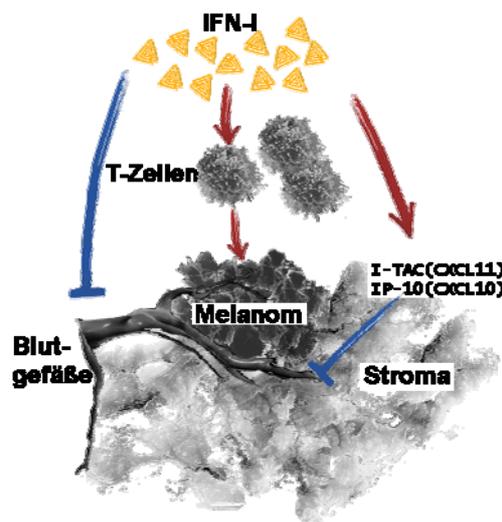


Abb. 21 Modell der Wirkung von IFN-I im malignen Melanom

Im Modell des malignen Melanoms wirkt lokal produziertes IFN- α hemmend auf die Blutgefäßbildung. Zusätzlich fördert es die Chemokinexpression von IP-10 und I-TAC im Tumorstroma, welche u.a. als T-Zellattraktoren funktionieren. IP-10 wirkt ebenfalls antiangiogenetisch. Es erfolgt eine direkte Wirkung des IFN-I auf T-Zellen, die daraufhin die Melanomzellen spezifisch lysieren.

Die Aktivierung von T-Zellen, die klonale Expansion, die Bildung von Gedächtnis-T-Zellen und die Reaktionsfähigkeit nach Antigenstimulation können durch Interaktionspartner wie z.B. antigenpräsentierende Zellen (APC) moduliert werden. Der Einfluss von IFN-I auf die T-Zellaktivierung durch APC ist beschrieben [54]. Zusätzlich wird gezeigt, dass IFN-I die T-Zell-Differenzierung [55], -Expansion [56, 57] und -Rekrutierung [24], sowie die Effektorfunktionen von zytotoxischen T-Zellen (CTL) [25, 26] beeinflusst. Kontroverse Daten zeigen hingegen, dass IFN-I die Länge und Intensität der Immunantwort reduziert und die T-Zellaktivierung nicht beeinflusst [58].

Das Modell des IFN- α -produzierenden malignen Melanoms kann eine lokale Therapie mit Interferon- α oder eine Rekrutierung von IFN-I-produzierenden pDC in den Tumor simu-

lieren. In humanen Melanomen konnte die Präsenz von IFN-I-produzierenden pDC, die Expression der durch IFN-I induzierten Chemokine MxA und IP-10, sowie die Rekrutierung von CXCR3-positiven Lymphozyten in das Melanom mit einer spontanen Regression des Tumors gezeigt werden [59]. Die Expression von CXCR3 auf aktivierten CD8⁺ T-Zellen korreliert mit einer verbesserten Überlebensrate von Melanompatienten [60]. Diese Daten weisen darauf hin, dass die im Mausmodell erhobenen Befunde auch auf die Situation im Menschen anwendbar sind.

Bezüglich der Melanomtherapie mit IFN- α 2 stellt sich die Frage, ob eine lokale Applikation von IFN- α 2 eine Alternative zu der bislang systemisch durchgeführten Injektion sein könnte. Eine Rekrutierung von Liposomen, welche mit IFN-I-induzierendem CpG beladen sind oder von IFN-I-produzierenden, aktivierten plasmazytoiden dendritischen Zellen in das Melanom könnte eine lokale IFN-I-Ausschüttung begünstigen. Ein besseres Verständnis der antitumoralen Wirkung von IFN-I kann helfen, optimierte Behandlungsmethoden für Melanompatienten zu entwickeln. Der kritische Einfluss von IFN-I auf T-Zellen legt eine erneute Evaluierung der T-Zellantworten im Rahmen von Krankheiten nahe, die mit IFN-I behandelt werden, wie z.B. das maligne Melanom.

5.2 Effekte von IFN-I auf das Lewis Lung Karzinom

Im vorherigen Abschnitt wird der Einfluss von IFN-I bei der therapieinduzierten Immunantwort diskutiert. Ob die antitumorale Immunantwort auch durch endogen induziertes IFN-I aktiviert wird, wird im Lewis Lung Karzinommodell untersucht. Die Befunde in diesem Modell bestätigen den für das maligne Melanom beschriebenen kritischen Einfluss von IFN-I auf die Tumorentwicklung transplantierter Tumore. Auch in diesem Modell erfolgt der antitumorale Effekt über eine Stimulation von bestrahlungssensitiven (Immun-) und bestrahlungsresistenten (nicht-Immun-) Zellen. Durch die Verwendung von A9_{GP33} kann speziell der Einfluss von IFN-I auf GP33 spezifische T-Zellen untersucht werden. Diese T-Zellen werden in IFNAR^{-/-} Mäusen aktiviert, jedoch entfalten sie in IFNAR-defizienter Umgebung *in vivo* keine Perforin-medierte, zytotoxische Aktivität. In konditionellen IFNAR-T Mäusen erfolgt eine Eliminierung von A9_{GP33} *in vivo*, so dass die spezifische Tumorabstoßung nicht von einer direkten IFN-I-Stimulation der T-Zellen abhängt.

Die in dieser Arbeit verwendete Tumorzell-Transfektante A9_{GP33} wurde von WT Mäusen [33], nicht jedoch von IFNAR^{-/-} Mäusen abgestoßen (Abb. 16). Dies beweist den kritischen

Einfluss von endogenem IFN-I auf die Tumorabstoßung. Weiterhin führt dies zu der Fragestellung, über welche Zellen das endogene IFN-I seinen antitumoralen Einfluss ausübt.

Untersuchungen mit A9_{GP33} in Knochenmarkchimären (Abb. 17) zeigen, dass endogenes IFN-I antitumorale Effekte über Immunzellen entfaltet. Durch die Befunde im malignen Melanom liegt die Vermutung nahe, dass IFN-I direkt über T-Zellen wirkt. Aus diesem Grund wurde im Folgenden untersucht, ob spezifische T-Zellen in IFNAR^{-/-} Mäusen überhaupt aktiviert werden oder diese nicht funktionsfähig sind.

Die Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen wird sechs- und acht Tage nach Tumorzellinjektion in WT- und IFNAR^{-/-} Mäuse mittels einem Chromfreisetzungstest *in vitro* untersucht (Abb. 18). Sowohl in tumortragenden WT, als auch in IFNAR^{-/-} Mäusen sind sechs und acht Tage nach Injektion von A9_{GP33}-Tumorzellen GP33-spezifische T-Zellen vorhanden. Die mit WT Zellen restimulierten GP33-spezifischen IFNAR^{-/-} T-Zellen sind demnach unter diesen gewählten Bedingungen funktionsfähig. IFNAR-defiziente T-Zellen weisen keinen Entwicklungsdefekt auf und das progressive Wachstum der Tumorzellen in IFNAR^{-/-} Mäusen beruht nicht auf einer fehlerhaften T-Zellaktivierung.

Die GP33 spezifischen T-Zellen in tumortragenden IFNAR^{-/-} Mäusen sind vielmehr *in vivo* funktionslos, da intravenös injizierte GP33-exprimierende Zielzellen nicht eliminiert werden (Abb. 19). Diese T-Zellen sind in IFNAR-defizienter Umgebung nicht in der Lage, eine Perforin-medierte Lyse durchzuführen. A9_{GP33} tragende WT Mäuse hingegen eliminieren die Zielzellen innerhalb von drei Tagen. Das durch die Tumorzellinjektion induzierte endogene IFN-I reicht aus, um direkt oder indirekt GP33-spezifische CTL zu aktivieren. Ob IFN-I direkten Einfluss auf die lytische Aktivität nimmt, ist bislang unbekannt. Es ist zu beachten, dass die Vorgänge bei der Perforin-medierte Lyse von Zielzellen nicht unbedingt gleichzusetzen sind mit Tumormunität. Die Mechanismen hinter der Eliminierung von Ziel- und Tumorzellen kann durchaus unterschiedlicher Natur sein. Es gibt mehrere mögliche Mechanismen; entweder, die Tumorzellen werden durch CTL direkt lysiert, oder durch Interaktion von spezifischen T-Zellen mit dem Tumorstroma wird die antitumorale Aktivität des Stromas aktiviert. Auf jeden Fall ist für eine erfolgreiche Tumoreliminierung IFN-I zwingend notwendig.

Konditionelle IFNAR-T Mäuse, deren T-Zellen IFNAR-defizient sind, stoßen A9_{GP33} Tumore ebenso gut ab wie WT Mäuse (Abb. 20). Dies beweist erneut, dass IFNAR^{-/-} T-Zellen keinen generellen Entwicklungsdefekt aufweisen. Die Funktionalität der T-Zellen in den konditionel-

len IFNAR-T Mäusen beweist weiterhin, dass kein direkter Einfluss von IFN-I auf T-Zellen für die Eliminierung von A9_{GP33} nötig ist. Anders als im Malignen Melanom scheinen hier alternative Faktoren für die Tumorelimination eine Rolle zu spielen, die im Folgenden diskutiert werden.

Es bestehen verschiedene Möglichkeiten, warum die Tumoreliminierung unabhängig von einem direkten IFN-I-Einfluss auf T-Zellen erfolgt, anders als im malignen Melanom. Im Falle einer direkten Lyse der Tumorzellen durch CTL könnte Zell-Zell-Kontakt von IFNAR-defizienten T-Zellen mit IFNAR-kompetenten Zellen für die lytische Aktivität der T-Zellen eine Rolle spielen. Die unspezifische Abstoßung durch Interferon-kompetente Effektorzellen wie NK-Zellen oder Makrophagen ist als Hauptursache der A9_{GP33} Eliminierung unwahrscheinlich, da dessen Abstoßung antigenspezifisch erfolgt, wie die Toleranz von H8 Mäusen (2.1) gegenüber A9_{GP33} zeigt. Die Beteiligung dieser Zellen soll jedoch nicht generell ausgeschlossen werden. Durch die Verwendung konditioneller Mäuse, die eine IFNAR-Defizienz auf z.B. NK, DC oder Makrophagen aufweisen, könnte deren Beteiligung entschlüsselt werden.

Schüler hat gezeigt, dass die Erkennung des Tumorantigens zwar durch CTL erfolgt, die antitumorale Aktivität jedoch nach Stroma-T-Zell-Interaktion IFN- γ abhängig durch das Stroma ausgeübt wird [52]. Dieser Mechanismus kann hier vorliegen. Im Falle des malignen Melanoms war die IFNAR-Kompetenz der T-Zellen essentiell, während sie bei den A9_{GP33} Tumorzellen unwichtig erscheint. Anscheinend kann die antitumorale Aktivität des Stroma durch alternative Faktoren aktiviert werden. Biologisch macht dies Sinn, denn dadurch wird die antitumorale Aktivität sichergestellt. Bei Fehlen des IFNAR auf T-Zellen kommen als alternative Aktivatoren die starke Immunogenität der Tumorzellen oder die Antigendichte in Frage. Da diese Aktivatoren beim malignen Melanom nicht vorhanden sind und dort zusätzlich die IFNAR-Defizienz der T-Zellen vorlag, könnte dies eine Erklärung für die veränderte Datenlage des anderen Tumormodells sein (vgl. S. 48f).

Ob eine direkte Lyse durch CTL oder das Tumorstroma für die A9_{GP33}-Elimination verantwortlich sind, konnte bislang nicht geklärt werden. Ein Ansatzpunkt wäre, die Antigenexpression der ausgewachsenen Tumore zu analysieren. Im Falle einer direkten spezifischen CTL-Lyse müssten die Tumore „antigen-loss“-Varianten darstellen, während bei einer Kontrolle durch das Stroma das Antigen weiterhin exprimiert werden müsste. Aus zeitlichen Gründen konnten diese Arbeiten leider nicht mehr durchgeführt werden.

Es soll erwähnt werden, dass die Injektion von IFNAR-kompetenten H8-Splenozyten als Zielzellen unerwarteterweise zu einer unvollständigen, transienten A9_{GP33}-Eliminierung in IFNAR^{-/-} Mäusen führt (Daten nicht gezeigt). Ob eine Interaktion von endogenen IFNAR^{-/-}-Immunzellen mit transferierten IFNAR-kompetenten Splenozyten stattfindet, oder ob die transferierten Splenozyten allein diese Immunantwort auslösen, war nicht analysierbar. Für eine vollständige Abstoßung ist ein IFNAR-kompetentes Stroma unbedingt nötig, da die anti-tumoralen Effekte sonst lediglich vorübergehend sind. Dies verdeutlicht, dass erst die Interaktion von T-Zellen und Stroma zu einer effizienten Tumorabwehr führen. IFN-I ist dabei ein notwendiger Faktor.

Sporadisch in WT Mäusen auswachsende A9_{GP33} Tumore erweisen sich als Tumorzellvarianten, die keine Expression des GP33 Peptids mehr zeigen und damit so genannte „antigen-loss“ Varianten darstellen. Dieses Phänomen wird in Perforin defizienten und Interferon- γ defizienten Mäusen ebenfalls beobachtet [33].

Im Gegensatz dazu wachsen in IFNAR^{-/-} Mäusen die Tumorzellen progressiv und ohne Expressionsverlust des Tumorantigens. Aus IFNAR^{-/-} Mäusen isolierte Tumorzellen wurden nach Reinjektion in WT Mäuse abgestoßen. H8 Mäuse, die ubiquitär GP33 exprimieren und damit als GP33-tolerant gelten, stoßen diese Tumorisolate aus IFNAR^{-/-} Mäusen nicht ab. Damit muss die Abstoßung in WT Mäusen anhand der vorhandenen GP33-Expression erfolgen. Das Auswachsen von antigentragenden Tumoren wird ebenfalls in TNF- α -defizienten Mäusen beobachtet [61].

Die Entstehung von „antigen-loss“ Varianten wird kontrovers diskutiert. Die „immune-surveillance“ Theorie führt die Tumoreliminierung lediglich auf direkte Lyse durch CTL zurück, wobei Daten bezüglich der genannten Stromaeffekte unberücksichtigt bleiben. Gemäß dieser Theorie entziehen sich antigentragende Tumorzellen dem Selektionsdruck der spezifischen T-Zellen durch Bildung von „antigen-loss“ Varianten, welche zu editierten Tumoren auswachsen. Daraus ergibt sich die Frage, ob in TNF- α oder IFNAR-defizienten Mäusen keine „immune-surveillance“ stattfindet, da Tumore unkontrolliert und uneditiert auswachsen können. Sollte die Editierung direkt von der Funktion zytotoxischer T-Zellen abhängen, müssten TNF- α - und IFNAR-defiziente T-Zellen funktionslos sein, während Perforin- und IFN- γ defiziente T-Zellen funktionsfähig wären.

Wie folgende Daten in dieser Arbeit zeigen (Abb. 18 und Abb. 20), sind IFNAR^{-/-} T-Zellen bei der tumorinduzierten Immunantwort im Falle des A9_{GP33} Modells in IFNAR-defizienter

Umgebung tatsächlich funktionslos. Jedoch ist eine vollständige Eliminierung des Tumors in IFNAR-T Mäusen möglich, so dass i) entweder die IFNAR^{-/-} T-Zellen in interferonkompetenter Umgebung funktionsfähig sind, oder ii) die Elimination nicht von T-Zellen, sondern von möglichen anderen Faktoren wie z.B. dem interferonkompetenten Tumorstroma abhängt. Eine Untersuchung der Antigenexpression von Tumorisolaten aus IFNAR-T Mäusen trägt zur Klärung dieser Frage bei. Diese Arbeit zeigt deutlich, dass das endogen induzierte Zytokin IFN-I stark die Eliminierung und Selektion von Tumorzellen beeinflusst.

Gegenüber der „*immune-surveillance*“ Theorie stehen die Befunde, dass das Tumorstroma Einfluss ausübt und spontan entstandene Tumorzellen Toleranz induzieren [62]. In diesem Fall werden T-Zellen nicht aktiviert oder die Funktion bereits aktivierter T-Zellen unterdrückt, sodass Tumorzellen ohne Verlust des Antigens zu Tumoren auswachsen können. In IFNAR^{-/-} Mäusen wachsen alle transplantierten Tumore ebenfalls progressiv und ohne Antigenverlust. Es besteht daher theoretisch die Möglichkeit, dass auch transplantierte Tumorzellen in IFNAR^{-/-} Mäusen Toleranz induzieren. IFN-I ist daher entweder für die Aktivierung des Immunsystems oder zur Toleranzunterdrückung absolut notwendig. Im letzteren Fall müsste die Toleranz in IFNAR^{-/-} Mäusen, wie auch in TNF- α defizienten Mäusen, leichter induzierbar sein. Die Tumoreditierung führt zum Auswachsen von „*antigen-loss*“ Varianten, während die Induktion der Toleranz in einem progressiven Tumorwachstum bei gleichzeitiger Antigenexpression führt. Hinweise zu den ausschlaggebenden Mechanismen können daher anhand der Antigenexpression des ausgewachsenen Tumors ermittelt werden. Auch die Präsenz von möglichen Toleranz-induzierenden Zytokinen wie IL-10 oder TGF- β liefert Hinweise auf den zugrunde liegenden Mechanismus.

Die Literatur beschreibt das IFN- γ (IFN-II) als relevantes Zytokin mit antitumoralen Effekten [63]. Sowohl IFN-II, als auch IFN-I spielen in der angeborenen, antiviralen Immunantwort eine Rolle. Während der Einfluss von IFN- γ auch in der adaptiven Immunantwort gut untersucht und bestätigt ist, wird der Einfluss von IFN-I nun intensiver erforscht. Die antitumorale Aktivität beider Zytokintypen wird vorwiegend über Wirtszellen vermittelt [18, 52]. Die mit IFN- γ defizienten Mäusen erhobenen Befunde bezüglich der Angiogenese ähneln den in dieser Arbeit erhobenen Befunden mit IFNAR-defizienten Mäusen. Beide Zytokintypen üben Einfluss auf das Tumorstroma aus, z.B. indem sie eine Reduktion der Blutgefäßdichte im Tumor verursachen [39]. Andere Befunde unterscheiden sich stark. So ist die Bildung von „*antigen-loss*“ Varianten abhängig von der Präsenz von IFN-I [diese Arbeit], jedoch unabhängig von IFN-II [33]. IFN-I ist ein sehr früh hauptsächlich durch pDC exprimiertes

Zytokin bei der angeborenen Immunität, während IFN- γ von verschiedenen Zellen vorwiegend während der adaptiven Immunantwort gebildet wird.

Möglicherweise besteht eine wechselseitige Abhängigkeit der beiden Interferontypen, ein Fehlen des einen beeinträchtigt die Funktion des anderen. Dies würde das Auftreten ähnlicher Befunde erklären. Tatsächlich ist eine Abhängigkeit zwischen IFN-I und IFN- γ diskutiert worden [64]. Der IFN- γ Signalweg scheint abhängig von IFN-I Signalweg zu sein, umgekehrt ist dies allerdings nicht der Fall. Als Ursache wird diskutiert, dass eine Signalgebende Untereinheit des IFN-I Rezeptors, IFNAR1, mit einer Untereinheit des Interferon- γ -Rezeptors, IFNGR2, assoziiert. Trotz der Abhängigkeit des IFN- γ Signalweges von IFN-I besitzen beide Zytokintypen nicht die gleiche Funktion im Organismus, was z.B. an der unterschiedlichen Ausprägung von „antigen-loss“ Varianten ersichtlich ist.

Die Antigenpräsentation, T-Zellaktivierung, Immunmodulation und die Produktion von IFN-I wird durch verschiedene DC-Subtypen kontrolliert. Die Kompetenz dieser DC bei der IFN-I abhängigen Tumorabwehr stellt ein interessantes Forschungsgebiet dar. Das Paul-Ehrlich-Institut züchtet aktuell CD11c-Cre Mäuse, aus denen durch Kreuzung mit IFNAR^{flox/flox} Mäusen in der Nachkommenschaft konditionelle Mäuse (IFNAR-DC) entstehen. In diesen Mäusen ist der IFNAR spezifisch auf CD11c-exprimierenden Zellen deletiert. Untersuchungen an diesen Mäusen vertiefen die Erkenntnis über den Einfluss von IFN-I auf DC und die daraus resultierenden Auswirkungen auf die antitumorale Effizienz von T-Zellen.

Die gewonnene Erkenntnis in dieser Arbeit – lokale antitumorale Effekte des IFN-I werden über Stroma-T-Zell-Interaktion und Tumorzelleigenschaften vermittelt – führt zu weiteren Fragestellungen und damit zu einem zusätzlichen Projekt: Eine genaue Spezifikation der am Tumorkontakt beteiligten Zellen. Im Rahmen einer durch die VW Stiftung geförderten Arbeit wird diese Untersuchung in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Adriano Aguzzi durchgeführt

Das Projektmodell beruht auf einer Delta-Notch-Interaktion, die zur Apoptose der rezeptortragenden Zelle führen soll. Das zytotoxisch wirkende Pertussistoxin wird anstelle der Signaldomäne an den Rezeptor Notch gekoppelt. Dieser chimäre Rezeptor wird spezifisch auf Immunzellen exprimiert. Die Interaktion des Rezeptors mit seinem Liganden Delta führt zur Freisetzung des Toxins, so dass die Immunzellen absterben. Delta-exprimierende Tumorzellen führen somit zum Absterben aller Immunzellen, welche direkten Kontakt mit den

Tumorzellen hatten. Die Verminderung der Immunzellen und die Spezifizierung erfolgt über FACS-Analyse.

Im Rahmen dieses Projektes wurden während dieser Dissertation mehrere stabil transfizierte Delta-B16 Transfektanten erstellt (Daten nicht gezeigt). Da jedoch bereits in *in vitro* Experimenten eine zu hohe spontane Apoptoserate von Immunzellen induziert wurde, wurden die Versuche an diesem Projekt eingestellt.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit belegen die notwendige Rolle von IFN-I für eine effiziente Kontrolle des Tumorwachstums. Sowohl die Produktion von rekombinantem, therapeutisch wirksamen IFN α 2, als auch die Induktion von endogenem IFN-I führen zu massiven Auswirkungen auf die untersuchten Tumormodelle. Lokal produziertes IFN- α wirkt antiangiogenetisch auf das Tumorstroma und modifiziert die Chemokinexpression von IP-10 und I-TAC. Die direkte IFN-I Stimulation von T-Zellen ist bei der Eliminierung von B16mIFN, nicht aber von A9_{GP33} ausschlaggebend. Dies verdeutlicht die Wichtigkeit von Alternativen bei einer effizienten Immunantwort. Vor allem die Interaktion von T-Zellen mit dem Tumorstroma rückt dabei in den Fokus. Diese Arbeit unterstützt die Annahme, dass T-Zellen das Antigen erkennen und die antitumorale Aktivität zytokinabhängig über das Tumorstroma induzieren. Die IFNAR-Kompetenz der T-Zellen ist dafür ein wichtiger Bestandteil, der aber anscheinend durch alternative Faktoren ersetzt werden kann. Solche Faktoren können möglicherweise die Immunogenität oder Antigendichte der Tumorzelle sein. Das Tumorstroma kann somit aktiviert werden, selbst wenn die T-Zellen keine IFNAR-Kompetenz besitzen. Die Qualität der Immunantwort beruht damit ebenfalls auf den mit der Tumorzelle einhergehenden Stimuli und wird möglicherweise durch die Menge des induzierten IFN-I determiniert. Eine genaue Erkenntnis über die IFN-I Wirkungsweise bei verschiedenen Tumormodellen und der Einflussnahme Adjuvantien kann die Entwicklung effizienter Therapien für Tumorerkrankungen unterstützen.

Zusammenfassung

Der starke Anstieg dezidierter Forschungsprojekte belegt: Die Rolle des Immunsystems in der körpereigenen Tumorabwehr hat in den letzten Jahren zunehmend an wissenschaftlicher Bedeutung gewonnen. So konnte z. B. gezeigt werden, dass Tumorzellen durch die Zellen des Immunsystems erkannt und anschließend eliminiert werden. Bei dieser Abwehrreaktion übernehmen insbesondere Zytokine eine äußerst wichtige regulierende Funktion. Bereits heute ist eines dieser Zytokine, das Interferon-alpha2 (IFN- α 2) zur adjuvanten Therapie des malignen Melanoms zugelassen. Doch die genaue Wirkungsweise des Therapeutikums ist bislang noch weitestgehend unbekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Wirkungsmechanismen von IFN- α 2 bei der antitumoralen Immunantwort zelltypgenau untersucht werden. Hierfür wurden murine Tumorzellen des malignen Melanoms in verschiedene transgene Mauslinien transplantiert und mit syngen Wildtyp-Kontrollen verglichen. Während der Untersuchungen von Stroma und T-Zellen konnte die essentielle Bedeutung des IFN- α 2 bei der funktionierenden Tumorabwehr bestätigt werden. Die Resultate zeigen, dass lokal produziertes IFN- α 2 die Blutgefäßdichte im Tumorstroma und damit die Versorgung der Tumorzellen verringert. Dies resultiert in einem verminderten Tumorwachstum. Zudem exprimiert das Stroma unter Einfluss von IFN- α 2 spezielle Proteine, die als Chemokine bekannt sind. Diese wiederum rekrutieren Immunzellen, welche aktiv an der Tumorabwehrreaktion beteiligt sind.

Ein völlig neuer Aspekt zeigt sich in dem Befund, dass IFN- α 2 T-Zellen tatsächlich auf direktem Weg kontrolliert und von dieser Kontrolle die gesamte Melanomabwehr abhängt. Die vertiefte Erkenntnis über die zelltypgenaue Wirkungsweise des IFN- α 2 kann die Entwicklung effizienter Therapien für Tumorerkrankungen unterstützen. So könnten neue therapeutische Ansätze die Interaktion von T-Zellen und Stroma stärker berücksichtigen.

Summary

In the last few years the role of the immune system in the body's own tumour defence has been increasingly appreciated. Many studies have shown that the immune system can recognise and eliminate tumour cells, with cytokines secreted playing a central role. Indeed, one of these cytokines interferon- α 2, is used therapeutically as adjuvant treatment against malignant melanoma. However, despite its efficacy, its anti-tumour mechanism of action remains largely unclear.

The aim of the work in this thesis is to investigate how IFN- α 2 affects the anti-tumour immune response, specifically through its interaction with various cell types. In order to study this, mouse malignant melanoma cells were transplanted into transgenic mice lacking the Interferon type I receptor, using wild mice as controls. The results show that locally produced IFN- α 2 reduces the blood vessel density in the tumour stroma, and thus the blood supply of tumour cells, resulting in reduced tumour growth. Additionally, under the influence of IFN- α 2 the stroma produces chemokines, which play a role in recruiting immune cells to the tumour. Furthermore, IFN- α 2 also directly controls T cell activity and the entire anti-melanoma defence is dependent on this action.

The new knowledge gained from these studies about the role of IFN- α 2 on the anti-tumour immune response will aid in the development of more efficient therapies for human cancers, by focusing on the interaction between T cells and the surrounding tissues.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

ABB. 1	MODELL DER ANTIGENSPEZIFISCHEN AKTIVIERUNG VON T-ZELLEN DURCH ANTIGENPRÄSENTIERENDE ZELLEN.....	2
ABB. 2	DAS WACHSTUM DES MALIGNEN B16 MELANOMS SETZT IN TYP I INTERFERONREZEPTOR-DEFIZIENTEN MÄUSEN FRÜHER ALS IN WILDTYP MÄUSEN EIN	18
ABB. 3	IM VERGLEICH ZU IFNAR ^{-/-} MÄUSEN WACHSEN INTERFERON- α 2 PRODUZIERENDE MELANOMZELLEN IN C57BL/6 WILDTYP MÄUSEN STARK VERLANGSAMT	19
ABB. 4	DURCH DIE PRODUKTION VON IFN- α 2 ENTSTEHT FÜR B16MIFN <i>IN VITRO</i> KEIN WACHSTUMSNACHTEIL	20
ABB. 5	DAS VON B16MIFN PRODUZIERTE INTERFERON- α IST NICHT IM SERUM VON B16MIFN TRAGENDEN WT MÄUSEN NACHWEISBAR UND WIRKT SOMIT LOKAL.....	21
ABB. 6	ANALYSE DES IMMUNSTATUS KNOCHENMARKCHIMÄRER MÄUSE	22
ABB. 7	IFN-I ENTFALDET SEINE ANTITUMORALE AKTIVITÄT ÜBER STIMULATION VON IMMUN- UND NICHT-IMMUNZELLEN	23
ABB. 8	IFNAR ^{-/-} MÄUSE WEISEN EINE VERSTÄRKTE ANGIOGENESE AUF	25
ABB. 9	IFNAR ^{-/-} MÄUSE WEISEN EINE GERINGERE TRANSKRIPTION DER CHEMOKINE CXCL10 (IP-10) UND CXCL11 (I-TAC) IM STROMA VON SOLIDEN B16MIFN TUMOREN AUF	26
ABB. 10	MODELL DER WIRKUNG VON IFN-I AUF BLUTGEFÄßE UND TUMORSTROMA	26
ABB. 11	T-ZELLEN VERMITTELN GENERELL B16-SPEZIFISCHE IMMUNITÄT.....	28
ABB. 12	IFN-I ENTFALDET SEINE ANTITUMORALE AKTIVITÄT ÜBER STIMULATION VON B- UND T-ZELLEN.	30
ABB. 13	ERSTELLUNG KONDITIONELLER IFNAR ^{-/-} MÄUSE.....	32
ABB. 14	DIE KONTROLLE DES MELANOMWACHSTUMS HÄNGT VON DER DIREKTEN IFN-I STIMULATION VON T-ZELLEN AB	33
ABB. 15	MODELL DER DIREKTEN WIRKUNG VON IFN-I AUF T-ZELLEN IM MODELL DES MALIGNEN MELANOMS	33
ABB. 16	OHNE ENDOGENES IFN-I ERFOLGT KEINE ABSTOßUNG UND EDITIERUNG DES GP33 EXPRIMIERENDEN LEWIS LUNG KARZINOMS A9 _{GP33}	35
ABB. 17	DAS TUMORWACHSTUM VARIERT STARK WENN ENDOGENES IFN-I NUR AUF IMMUN ODER NICHT-IMMUNZELLEN WIRKT	36
ABB. 18	IFNAR ^{-/-} MÄUSE GENERIEREN SPEZIFISCHE ZYTOTOXISCHE T-ZELLEN (CTL)	37
ABB. 19	IFNAR ^{-/-} MÄUSE GENERIEREN SPEZIFISCHE T-ZELLEN, DIE JEDOCH <i>IN VIVO</i> NICHT EFFEKTIV SIND	39
ABB. 20	DIE ABSTOßUNG VON A9 _{GP33} ERFOLGT NICHT ÜBER DIE DIREKTE IFN-I STIMULATION VON T-ZELLEN	40
ABB. 21	MODELL DER WIRKUNG VON IFN-I IM MALIGNEN MELANOM	49

TABELLE 1	ZUR DISSERTATION VERWENDETE MAUSLINIEN	8
TABELLE 2	PRIMERSEQUENZEN	9
TABELLE 3	REAKTIONSKITS	9

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
CFSE	Carboxy-Fluorescein Succinimidyl Ester
CTL	<i>cytotoxic T lymphocytes</i> , zytotoxische T-Lymphozyten
Gy	Grey
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FACS	Fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie
IFNAR	Typ I Interferonrezeptor
IFN-I	Typ I Interferon (Interferon- α Varianten und Interferon- β)
IFN- α	Interferon alpha
IFN- γ	Interferon gamma
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
MHC I, II	Haupthistokompatibilitätskomplexe des Typs I oder II
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
PerCP	Peridinin chlorophyll protein
RT	Raumtemperatur
TGF- β	Tumor growth factor beta
TNF- α	Tumor Nekrosefaktor alpha
vs.	versus
WT	Wildtyp, hier: C57BL/6 Mäuse

Literatur

1. Van den Eynde, B.J. and P. van der Bruggen, *T cell defined tumor antigens*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(5): p. 684-93.
2. Ossendorp, F., et al., *Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors*. J Exp Med, 1998. **187**(5): p. 693-702.
3. Perez-Diez, A., et al., *CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells*. Blood, 2007.
4. Probst, H., et al., *Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4*. Nature Immunology, 2005. **6**(3): p. 280-6.
5. Cayeux, S., et al., *Tumor cells cotransfected with interleukin-7 and B7.1 genes induce CD25 and CD28 on tumor-infiltrating T lymphocytes and are strong vaccines*. Eur J Immunol, 1995. **25**(8): p. 2325-31.
6. Ramarathnam, L., et al., *T cell costimulation by B7/BB1 induces CD8 T cell-dependent tumor rejection: an important role of B7/BB1 in the induction, recruitment, and effector function of antitumor T cells*. J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1205-14.
7. Hock, H., et al., *Vaccinations with tumor cells genetically engineered to produce different cytokines: effectivity not superior to a classical adjuvant*. Cancer Research, 1993. **53**: p. 714-716.
8. Steitz, J., et al., *Depletion of CD25(+) CD4(+) T cells and treatment with tyrosinase-related protein 2-transduced dendritic cells enhance the interferon alpha-induced, CD8(+) T-cell-dependent immune defense of B16 melanoma*. Cancer Res, 2001. **61**(24): p. 8643-8646.
9. Olsson, S.E., et al., *Induction of immune memory following administration of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (HPV) types 6/11/16/18 L1 virus-like particle (VLP) vaccine*. Vaccine, 2007.
10. Belardelli, F., et al., *Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(2): p. 119-134.
11. Gresser, I. and F. Belardelli, *Endogenous type I interferons as a defense against tumors*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(2): p. 111-118.
12. Gresser, I., et al., *Injection of mice with antibody to interferon enhances the growth of transplantable murine tumors*. J.Exp.Med, 1983. **158**(6): p. 2095-2107.
13. Picaud, S., et al., *Enhanced tumor development in mice lacking a functional type I interferon receptor*. J.Interferon Cytokine Res, 2002. **22**(4): p. 457-462.
14. Melief, C.J., *Cancer immunology: cat and mouse games*. Nature, 2005. **437**(7055): p. 41-42.

15. Seong, S.Y. and P. Matzinger, *Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses*. Nat.Rev.Immunol, 2004. **4**(6): p. 469-478.
16. Pansky, A., et al., *Defective Jak-STAT signal transduction pathway in melanoma cells resistant to growth inhibition by interferon-alpha*. Int.J.Cancer, 2000. **85**(5): p. 720-725.
17. Wellbrock, C., et al., *STAT5 contributes to interferon resistance of melanoma cells*. Curr.Biol, 2005. **15**(18): p. 1629-1639.
18. Dunn, G.P., et al., *A critical function for type I interferons in cancer immunoediting*. Nat.Immunol, 2005. **6**(7): p. 722-729.
19. Ferrantini, M., et al., *IFN-alpha 1 gene expression into a metastatic murine adenocarcinoma (TS/A) results in CD8+ T cell-mediated tumor rejection and development of antitumor immunity. Comparative studies with IFN-gamma-producing TS/A cells*. J.Immunol, 1994. **153**(10): p. 4604-4615.
20. Belardelli, F., et al., *The induction of in vivo proliferation of long-lived CD44hi CD8+ T cells after the injection of tumor cells expressing IFN-alpha1 into syngeneic mice*. Cancer Res, 1998. **58**(24): p. 5795-5802.
21. Hiroishi, K., T. Tuting, and M.T. Lotze, *IFN-alpha-expressing tumor cells enhance generation and promote survival of tumor-specific CTLs*. J.Immunol, 2000. **164**(2): p. 567-572.
22. Le Bon, A., et al., *Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon*. Nat.Immunol, 2003. **4**(10): p. 1009-1015.
23. Montoya, M., et al., *Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation*. Blood, 2002. **99**(9): p. 3263-3271.
24. Kamphuis, E., et al., *Type I interferons directly regulate lymphocyte recirculation and cause transient blood lymphopenia*. Blood, 2006. **108**(10): p. 3253-61.
25. Guillot, B., et al., *The expression of cytotoxic mediators is altered in mononuclear cells of patients with melanoma and increased by interferon-alpha treatment*. Br.J.Dermatol, 2005. **152**(4): p. 690-696.
26. Portales, P., et al., *Perforin expression in T cells and virological response to PEG-interferon alpha2b in HIV-1 infection*. AIDS, 2003. **17**(4): p. 505-511.
27. Lesinski, G.B., et al., *The antitumor effects of IFN-alpha are abrogated in a STAT1-deficient mouse*. J.Clin.Invest, 2003. **112**(2): p. 170-180.
28. Schwenk, F., U. Baron, and K. Rajewsky, *A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(24): p. 5080-5081.
29. Rickert, R.C., J. Roes, and K. Rajewsky, *B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(6): p. 1317-1318.

30. Lee, P.P., et al., *A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival*. *Immunity*, 2001. **15**(5): p. 763-774.
31. Muller, U., et al., *Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense*. *Science*, 1994. **264**(5167): p. 1918-1921.
32. Mombaerts, P., et al., *RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes*. *Cell*, 1992. **68**(5): p. 869-877.
33. Prévost-Blondel, A., et al., *Crucial Role of TNF-alpha in CD8 T Cell-Mediated Elimination of 3LL-A9 Lewis Lung Carcinoma Cell In Vivo*. *Journal of Immunology*, 2000. **164**: p. 3645-3651.
34. Gresser, I., et al., *Antibody to mouse interferon alpha/beta abrogates resistance to the multiplication of Friend erythroleukemia cells in the livers of allogeneic mice*. *J.Exp.Med*, 1988. **168**(4): p. 1271-1291.
35. Heremans, H., A. Billiau, and P. De Somer, *Interferon in experimental viral infections in mice: tissue interferon levels resulting from the virus infection and from exogenous interferon therapy*. *Infect.Immun*, 1980. **30**(2): p. 513-522.
36. Indraccolo, S., et al., *Interferon-alpha gene therapy by lentiviral vectors contrasts ovarian cancer growth through angiogenesis inhibition*. *Hum.Gene Ther*, 2005. **16**(8): p. 957-970.
37. Sidky, Y.A. and E.C. Borden, *Inhibition of angiogenesis by interferons: effects on tumor- and lymphocyte-induced vascular responses*. *Cancer Res*, 1987. **47**(19): p. 5155-5161.
38. Sgadari, C., A.L. Angiolillo, and G. Tosato, *Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10*. *Blood*, 1996. **87**(9): p. 3877-3882.
39. Qin, Z., et al., *A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells*. *Cancer Res*, 2003. **63**(14): p. 4095-4100.
40. Qin, Z. and T. Blankenstein, *CD4+ T cell--mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells*. *Immunity*, 2000. **12**(6): p. 677-686.
41. Volpert, O.V., et al., *Inhibition of angiogenesis by interleukin 4*. *J.Exp.Med*, 1998. **188**(6): p. 1039-1046.
42. Ibe, S., et al., *Tumor rejection by disturbing tumor stroma cell interactions*. *J.Exp.Med*, 2001. **194**(11): p. 1549-1559.
43. Kammertoens, T., T. Schuler, and T. Blankenstein, *Immunotherapy: target the stroma to hit the tumor*. *Trends Mol.Med*, 2005. **11**(5): p. 225-231.
44. Luster, A.D., J.C. Unkeless, and J.V. Ravetch, *Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins*. *Nature*, 1985. **315**(6021): p. 672-676.

45. Luster, A.D. and P. Leder, *IP-10, a -C-X-C- chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo*. J.Exp.Med, 1993. **178**(3): p. 1057-1065.
46. Angiolillo, A.L., et al., *Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo*. J.Exp.Med, 1995. **182**(1): p. 155-162.
47. Kohrgruber, N., et al., *Plasmacytoid dendritic cell recruitment by immobilized CXCR3 ligands*. J.Immunol, 2004. **173**(11): p. 6592-6602.
48. Cole, K.E., et al., *Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3*. J.Exp.Med, 1998. **187**(12): p. 2009-2021.
49. Kawada, K., et al., *Pivotal role of CXCR3 in melanoma cell metastasis to lymph nodes*. Cancer Res, 2004. **64**(11): p. 4010-4017.
50. Wenzel, J., et al., *Type I interferon-associated recruitment of cytotoxic lymphocytes: a common mechanism in regressive melanocytic lesions*. Am.J.Clin.Pathol, 2005. **124**(1): p. 37-48.
51. Turk, M.J., et al., *Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells*. J.Exp.Med, 2004. **200**(6): p. 771-782.
52. Schuler, T. and T. Blankenstein, *Cutting edge: CD8+ effector T cells reject tumors by direct antigen recognition but indirect action on host cells*. J.Immunol, 2003. **170**(9): p. 4427-4431.
53. Schuler, T., S. Kornig, and T. Blankenstein, *Tumor rejection by modulation of tumor stromal fibroblasts*. J.Exp.Med, 2003. **198**(10): p. 1487-93.
54. Le Bon, A., et al., *Direct stimulation of T cells by type I IFN enhances the CD8+ T cell response during cross-priming*. J.Immunol, 2006. **176**(8): p. 4682-4689.
55. Tough, D.F., P. Borrow, and J. Sprent, *Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo*. Science, 1996. **272**(5270): p. 1947-1950.
56. Kolumam, G.A., et al., *Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection*. J.Exp.Med, 2005. **202**(5): p. 637-650.
57. Aichele, P., et al., *CD8 T cells specific for lymphocytic choriomeningitis virus require type I IFN receptor for clonal expansion*. J.Immunol, 2006. **176**(8): p. 4525-4529.
58. Dikopoulos, N., et al., *Type I IFN negatively regulates CD8+ T cell responses through IL-10-producing CD4+ T regulatory 1 cells*. J.Immunol, 2005. **174**(1): p. 99-109.
59. Wenzel, J., et al., *Enhanced type I interferon signaling and recruitment of chemokine receptor CXCR3-expressing lymphocytes into the skin following treatment with the TLR7-agonist imiquimod*. J Cutan Pathol., 2005. **32**(4): p. 257-262.

60. Mullins, I.M., et al., *CXC chemokine receptor 3 expression by activated CD8+ T cells is associated with survival in melanoma patients with stage III disease*. *Cancer Res*, 2004. **64**(21): p. 7697-7701.
61. Prevost-Blondel, A., et al., *Differential requirement of perforin and IFN-gamma in CD8 T cell-mediated immune responses against B16.F10 melanoma cells expressing a viral antigen*. *Eur J Immunol*, 2000. **30**(9): p. 2507-2515.
62. Willimsky, G. and T. Blankenstein, *Sporadic immunogenic tumors avoid destruction by inducing T-cell tolerance*. *Nature*, 2005. **437**: p. 141-146.
63. Ikeda, H., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting*. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2002. **13**(2): p. 95-109.
64. Takaoka, A., et al., *Cross talk between interferon-gamma and -alpha/beta signaling components in caveolar membrane domains*. *Science*, 2000. **288**(5475): p. 2357-60.