Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
(Prof. Dr. med. M. P. Schön)
im Zentrum Arbeits-, Sozial-, Umweltmedizin und Dermatologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Lokale Stimulation des pulmonalen Immunsystems mit dem TLR2/6-Agonisten MALP-2 und deren Auswirkung auf pulmonale Melanommetastasierung im Maus-Modell

INAUGURAL –DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Tillmann Oldwig Schill
aus
München

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Peter Schön

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Uwe-Karsten Hanisch

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Martin Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2014

Teile der vorliegenden Inaugural-Dissertation wurden im Vorfeld bereits publiziert:

Schill T, Schön MP, Pletz N, Emmert S, Schön M (2012) **Stimulation of pulmonary immune responses by the TLR2/6 agonist MALP-2 and effect on melanoma metastasis to the lung.** Exp Dermatol 21(2): 91-98

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG ... 8

1.1. Das maligne Melanom ... 8

1.1.1. Epidemiologie ... 8

1.1.2. Ätiologie ... 9

1.1.3. Einteilung ... 9

1.1.4. Diagnose/Prognose ... 10

1.1.5. Therapie ... 12

1.1.6. Lungenmetastasen ... 14

1.1.7. B16-F10-Modellsystem ... 15

1.2. Immunsystem und Tumoren ... 16

1.2.1. Native Immunabwehr zum Schutz vor Tumorerkrankungen ... 16

1.2.2. Erkennung von Tumorzellen durch das Immunsystem ... 16

1.2.2.1. Adaptives Immunsystem und Tumoren ... 17

1.2.2.2. Angeborenes Immunsystem und Tumoren ... 18

1.2.2.2.1. Makrophagen ... 18

1.2.2.2.2. Neutrophile Granulozyten ... 19

1.2.2.2.3. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) ... 20

1.2.2.2.4. Dendritische Zellen ... 20

1.2.3. Tumoren und Immun-Evasion („*immune escape*“) ... 21

1.2.3.1. Geringe Immunogenität und antigene Modulation ... 21

1.2.3.2. Reduktion co-stimulatorischer Signale ... 22

1.2.3.3. Apoptoseresistenz ... 22

1.2.3.4. Elimination von T-Zellen ... 22

1.2.3.5. Schaffung eines immunprivilegierten Ortes ... 22

1.2.4. Immunüberwachung und „Immunoediting“ von Tumoren ... 23

1.3. Immuntherapie von Tumoren ... 26

1.3.1. Immuntherapie mit TLR-Agonisten ... 27

1.4. Toll-like-Rezeptoren (TLR) ... 28

1.4.1. TLR-Spezies und ihre Agonisten ... 29

1.4.1.1. TLR1-Familie ... 29

1.4.1.2. TLR3-Familie ... 30

1.4.1.3. TLR4-Familie ... 30

1.4.1.4. TLR5-Familie ... 30

1.4.1.5. TLR7-Familie ... 30

1.4.1.6. TLR11-Familie ... 30

1.4.2. TLR-Aufbau ... 30
1.4.3. TLR-Signalkaskaden ... 31

1.5. Macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) ... 33
1.5.1. *In-vivo* und *in-vitro*-Effekte von MALP-2 ... 34
1.5.2. Antitumorale Wirkung von MALP-2 *in vivo* ... 35

1.6. Zielsetzung der Arbeit ... 37

2. MATERIAL UND METHODEN ... 38

2.1. Material ... 38
2.1.1. Chemikalien und Fertiglösungen ... 38
2.1.2. Verbrauchsmaterialien ... 39
2.1.3. Apparaturen und Hilfsmittel ... 40
2.1.4. Fertig zusammengestellte Nachweis-Reagenzien ... 41
2.1.5. Proteine ... 41
2.1.6. Antikörper ... 42
2.1.6.1. Für Immunhistochemie ... 42
2.1.6.1.1. Primär-Antikörper ... 42
2.1.6.1.2. Sekundär-Antikörper ... 42
2.1.6.1.3. Tertiär-Reagenz ... 42
2.1.6.2. Für Fluoreszenzimmunhistochemie an HUVECs ... 43
2.1.6.3. Für FACS ... 43
2.1.6.3.1. Fluoreszenzmarkierte Primär-Antikörper ... 43
2.1.6.3.2. Unmarkierte Primär-Antikörper ... 43
2.1.6.3.3. Fluoreszenzmarkierte Sekundär-Antikörper ... 44
2.1.6.4. Für *in-vitro*-Adhäsionsassay ... 44
2.1.7. Zellkultur-Nährmedien ... 44
2.1.8. Puffer und Lösungen ... 45
2.1.8.1. Für tierexperimentelle Arbeiten ... 45
2.1.8.2. Für Immunhistochemie ... 45
2.1.8.3. Für FACS ... 48
2.1.8.4. Für Fluoreszenz-Immunhistochemie ... 49
2.1.9. Software ... 49

2.2. Methoden ... 50
2.2.1. Tierexperimentelle Arbeiten ... 50
2.2.1.1. Versuchstiere und Tierhaltung ... 50
2.2.1.2. Intraperitoneale Narkose ... 50
2.2.1.3. Intratracheale MALP-2-Instillation ... 50
2.2.1.4. Präparation der Lunge ... 51

2.2.1.5. Intravenöse Injektion muriner Melanomzellen ... 51
2.2.1.6. Versuche zur pulmonalen Metastasierung unter pulmonaler MALP-2-Stimulation ... 52
2.2.1.7. Kurzzeit-Metastasierung ... 53
2.2.2. Zellbiologische Methoden ... 54
2.2.2.1. Zellkultur und Zellpräparation ... 54
2.2.2.1.1. B16-F10-Melanomzellen ... 54
2.2.2.1.2. HUVEC ... 54
2.2.2.1.3. Passagieren der Zelllinien ... 54
2.2.2.1.4. Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität ... 55
2.2.2.1.5. Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Lungengewebe ... 55
2.2.2.1.6. Gewinnung von murinen Lymphozyten aus der Milz ... 55
2.2.2.1.7. Gewinnung muriner Immunzellen aus dem Peritonealraum von Mäusen vor und nach MALP-2-Stimulation ... 56
2.2.2.1.8. CFDA SE-Markierung von adhärenten Zellen ... 57
2.2.2.2. Proliferationsassay (MTT) ... 57
2.2.2.3. Zellvermittelte Zytotoxizitäts-Messung (*Killing-Assay*) ... 58
2.2.2.4. *In-vitro*-Adhäsionsexperimente mit B16-F10-Zellen an VCAM-1-beschichteten Oberflächen 60
2.2.2.5. Durchflusszytometrie/*Fluorecence-activated-cell-sorter* (FACS) ... 60
2.2.2.5.1. Durchflusszytometrische Quantifizierung pulmonaler Immunzellen und endothelialer Adhäsionsmoleküle nach MALP-2-Stimulation ... 61
2.2.2.5.2. Durchflusszytometrische Auswertung der Kurzzeitmetastasierung ... 62
2.2.2.5.3. Durchflusszytometrische Auswertung der *Killing*-Experimente ... 63
2.2.2.5.4. Analyse der Integrinexpression VLA-4 und LFA-1 auf B16-F10-Melanomzellen ... 63
2.2.2.6. *In-vitro*-Stimulation von HUVEC-Zellen ... 63
2.2.2.6.1. Immunfluoreszenzfärbung von VCAM-1 auf HUVEC-Zellen ... 63
2.2.3. Immunhistochemie ... 65
2.2.3.1. Probenvorbereitung ... 65
2.2.3.2. Fixierung, Einbettung und Lagerung ... 65
2.2.3.3. Immundetektion ... 66
2.2.3.3.1. Immundetektion an Kryostatschnitten ... 66
2.2.3.3.2. Immundetektion an Paraffinschnitten ... 67
2.2.3.3.3. 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)-Färbung ... 68
2.2.3.4. Histologische Quantifizierung von Immunzellen in Lungengewebe nach MALP-2-Stimulation ... 68
2.2.3.5. Histologische Darstellung der endothelialen Adhäsionsmoleküle in Lungengewebe nach MALP-2-Stimulation ... 69
2.2.4. Statistische Auswertung ... 69

3. ERGEBNISSE 70

3.1. Aktivierung des pulmonalen angeborenen Immunsystems durch tracheale Instillation von MALP-2 70

3.2. MALP-2-vermittelte TLR2/6-Stimulation hat *in vitro* keine Auswirkung auf die Proliferation von B16-F10-Melanomzellen 74

3.3. Aktivierung des pulmonalen angeborenen Immunsystems durch pulmonale Instillation von MALP-2 und Auswirkung auf bestehende experimentell induzierte Melanommetastasen 75

3.4. Vorstimulation des angeborenen Immunsystems durch pulmonale Instillation von MALP-2 und Auswirkung auf hämatogen induzierte Melanommetastasen 78

3.5. Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle nach MALP-2-Instillation 80

3.6. MALP-2 führt *in vitro* nicht direkt zur Steigerung der VCAM-1-Expression auf HUVEC 84

3.7. Expression von Adhäsionsmolekülen auf B16-F10-Melanomzellen und *in-vitro*-Adhäsion an VCAM-1 85

3.8. Das frühe Schicksal von B16-F10-Melanomzellen *in vivo* 87

3.9. *In-vitro*-Interaktion MALP-2-aktivierter Immunzellen mit B16-F10-Melanomzellen 90

4. DISKUSSION 93

4.1. MALP-2 und Leukozytenrekrutierung in die Mauslunge 93

4.2. Wirkung der MALP-2-Stimulation auf Metastasen 94

4.2.1. Die MALP-2-Behandlung induziert keine spezifisch gegen B16-F10-Melanomzellen gerichtete Immunantwort 95

4.2.2. Antitumorale Aktivität des angeborenen Immunsystems und *Timing* 96

4.2.3. Beinflussbarkeit der Metastasierung von Melanomzellen nach TLR2/6-Stimulation 97

4.2.4. TLR2-Stimulation und Tumorprogession 99

5. ZUSAMMENFASSUNG 103

6. LITERATURVERZEICHNIS 105

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 120

1. Einleitung

1.1. Das maligne Melanom

Das maligne Melanom [griechisch; μέλας „schwarz“] ist der bösartigste Tumor in der Dermatologie und geht auf Melanozyten zurück, die aus der Neuralleiste in die Haut eingewandert sind. Der Tumor zeichnet sich durch frühzeitige lymphogene und/oder hämatogene Metastasierung aus. Es stellt die am häufigsten tödlich verlaufende Hautkrankheit dar. In Mitteleuropa gehen etwa 3% aller Krebsfälle und 1-2% aller Todesfälle durch Krebs auf das Melanom zurück (Fritsch 2009). Zum heutigen Zeitpunkt wird das Spektrum der Melanomerkrankung klinisch von zwei Extremen bestimmt. Auf der einen Seite können dünne, primäre kutane Melanome operativ leicht entfernt werden und zeigen eine gute Heilungsrate. Demgegenüber stehen metastasierte maligne Melanome mit einer sehr schlechten Prognose, für die bisher keine effektive Therapie existiert.

1.1.1. Epidemiologie

Die meisten Melanome entstehen zwischen dem 30. und dem 70. Lebensjahr. Das mediane Alter bei Diagnosestellung beträgt 57 Jahre. Frauen sind ca. 1,5-mal häufiger betroffen als Männer (Ries et al. 2000). Die Inzidenz liegt derzeit in Mitteleuropa etwa bei 12/100000 Einwohner pro Jahr. In den letzten Jahrzehnten ist die Inzidenz des malignen Melanoms, vor allem in den Industriestaaten, kontinuierlich angestiegen, beispielsweise in den USA von 1973 bis 1997 um 270% (Ries et al. 2000; Jemal et al. 2001). In Deutschland gibt es etwa 10000 Neuerkrankungen pro Jahr. Besonders hohe Zahlen, nämlich 40-60/100000 pro Jahr, werden aus Australien berichtet (Garbe und Blum 2001). Innerhalb der hellhäutigen Bevölkerung nimmt die Morbidität mit der UV-Belastung des Wohngebiets und damit mit der Nähe zum Äquator zu. Die asiatische und schwarze Bevölkerung entwickelt sehr viel seltener Melanome, dann allerdings bevorzugt im Bereich der Handteller, Fußsohlen und Schleimhäute (Stevens et al. 1990).

1.1.2. Ätiologie

Als wichtigster pathogenetischer Faktor wird die Induktion des malignen Melanoms durch UV-Bestrahlung angenommen. Hierbei scheint nicht, wie beim Plattenepithelkarzinom der Haut, die kumulative UV-Exposition ausschlaggebend zu sein. Die Inzidenz des Melanoms korreliert vielmehr mit der Anzahl abgelaufener schwerer Sonnenbrände, insbesondere jener im Kindesalter (Elwood und Jopson 1997). Der Anstieg der Inzidenz des Melanoms wird somit vorwiegend auf die geänderten Freizeitgewohnheiten zurückgeführt. UV-Licht kann allerdings nicht als alleinige Ursache für diesen Anstieg in Frage kommen, da auch maligne Melanome an nicht sonnenexponierten Hautstellen sowie Schleimhäuten zugenommen haben. Toxische, endokrine und medikamentöse Einflussfaktoren können die Melanomentstehung begünstigen (Markovic et al. 2007a; Pflugfelder et al. 2013). Auch gibt es Hinweise, dass immundefiziente Menschen, wie beispielsweise Organtransplantierte oder an AIDS Erkrankte häufiger Melanome entwickeln als immunkompetente Menschen. Bei etwa 10 % der Melanome besteht eine familiäre Häufung (Smith et al. 1993; Euvrard et al. 2003; Hollenbeak et al. 2005).

Weitere Risikofaktoren für die Entstehung eines malignen Melanoms sind ethnische Zugehörigkeit (kaukasisch), Hauttyp (1, 2) sowie multiple „typische“ Clark-Nävi (Pflugfelder et al. 2013).

1.1.3. Einteilung

Die Melanome der Haut machen etwa 90% der Melanome aus, der Rest entfällt auf Melanome der Schleimhäute, des ZNS und des Auges. Die Melanome der Haut lassen sich klinisch und histopathologisch in 4 Subtypen (plus Sonderformen) einteilen:

Superfiziell **S**preitendes **M**elanom (SSM) (ca. 60%)

Noduläres **M**alignes **M**elanom (NMM) (ca. 20%)

Lentigo **M**aligna **M**elanom (LMM) (ca. 10%)

Akro**l**entiginöses **M**elanom (ALM) (ca. 4%)

Etwa 5% der Melanome sind Sonderformen, hierzu gehört unter anderem das **am**elanotische **M**elanom (AMM) und das desmoplastische maligne Melanom. Darunter fallen auch metastasierende maligne Melanome, die keine Hinweise auf ein primär kutanes Melanom im Bereich der Haut aufweisen.

1.1.4. Diagnose/Prognose

Mehr als 90 % der Melanome werden heute dank verbesserter Früherkennung im Primärstadium entdeckt. Die wichtigste Differentialdiagnose zur Frühform eines malignen Melanoms ist der melanozytäre Naevus. Als diagnostische Hilfe kann dabei die **ABCD**-Regel dienen: **A**symmetrie, unregelmäßige **B**egrenzung, unterschiedliches **C**olorit innerhalb des Herdes und ein **D**urchmesser >5mm sind Anzeichen für das Vorliegen eines malignen Melanoms. Manchmal wird ein **E** für **E**levation (Auftreten von Knötchen) der Regel hinzugefügt.

Die medizinische Relevanz des malignen Melanoms wird durch die Neigung zur frühen lymphogenen und hämatogenen Metastasierung bestimmt. Entscheidend für die Prognose ist das klinische Stadium zum Zeitpunkt der Tumorexzision. Die Tabelle 1.1 gibt die klinische Stadieneinteilung anhand der Primärtumordicke (T-Stadium), der lymphogenen Metastasierung (N-Stadium) und der Fernmetastasen (M-Stadium) wieder. Die jeweiligen 5-Jahres-Überlebensraten sind angezeigt. Die Prognose des malignen Melanoms korreliert im Primärstadium mit der Tumormasse. Die vertikale Tumordicke nach Breslow (gemessen in mm vom Stratum granulosum bis zum unteren Tumorrand) und die Eindringtiefe (nach Clark) erlauben eine Abschätzung der Tumorgröße und sind prognostische Parameter des Metastasierungsrisikos (Marghoob et al. 2000). Des Weiteren ist die Differenzierung zwischen regionaler und disseminierter Metastasierung grundlegend. Sobald das Melanom Fernmetastasen aufweist, verschlechtert sich die Prognose für den Patienten rapide. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt heute bei regionaler Metastasierung etwa 50%, bei Fernmetastasierung zwischen 10% und 20% mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von 6-16 Monaten (Balch et al. 2001; Balch et al. 2009).

Stadium	Primärtumor (pT)	Regionäre Lymphknotenmetastasen (pN)	Fernmetastasen (M)	5-Jahres-Überlebesrate
0	In-situ-Tumoren	-	-	Nicht ermittelt
IA	≤1,0mm, keine Ulzeration	-	-	97%
IB	≤1,0mm, mit Ulzeration oder Mitoserate ≥1mm²	-	-	94%
	1,01-2,0mm, keine Ulzeration	-	-	91%
IIA	1,01-2,0mm, mit Ulzeration	-	-	82%
	2,01-4,0mm, keine Ulzeration	-	-	79%
IIB	2,01-4,0mm, mit Ulzeration	-	-	68%
	> 4,0mm keine Ulzeration	-	-	71%
IIC	> 4,0mm mit Ulzeration	-	-	53%
IIIA	Jede Tumordicke, keine Ulzeration	Mikrometastasen	-	78%
IIIB	Jede Tumordicke, mit Ulzeration	Mikrometastasen	-	55%
	Jede Tumordicke, keine Ulzeration	≤3 Makrometastasen	-	48%
	Jede Tumordicke, keine Ulzeration	Satelliten- und/ oder *In-Transit*-Metastasen	-	69%
IIIC	Jede Tumordicke, mit Ulzeration	≤3 Makrometastasen	-	38%
	Jede Tumordicke, ± Ulzeration	≥4 Makrometastasen oder kapselüberschreitender Lymphknotenbefall ± Satelliten- und oder *In-Transit*-Metastasen mit Lymphknotenbefall	-	38%
IV	-	-	Fernmetastasen ohne LDH↑	23%
	-	-	Fernmetastasen mit LDH↑	10%

Tab. 1.1: Stadieneinteilung und Prognose des Melanoms

(verändert nach Balch et al. 2009; Plewig et al. 2012).

1.1.5. Therapie

Die Therapie des malignen Melanoms erfolgt primär operativ. Neben der operativen Therapie stellen Strahlentherapie, Chemotherapie und Immuntherapie die Standbeine der adjuvanten Tumortherapie dar.

Die bislang effektivste und meist kurative Therapie stellt bislang die frühzeitige Diagnose und anschließende vollständige Exzision vor dem Auftreten von Metastasen dar.

IL-2 und IFN-α gehören zu den am häufigsten verwendeten Immunmodulatoren bei der adjuvanten Therapie von Melanomen mit hohem Metastasierungsrisiko. Für IFN-α konnte für Melanome mit hohem Metastasierungsrisiko in prospektiven randomisierten Studien eine Verlängerung der rezidivfreien Überlebenszeit beobachtet werden (Kirkwood et al. 1996). Ergebnisse in Bezug auf das Gesamtüberleben der Patienten sind hingegen uneinheitlich (Markovic et al. 2007b). Für die adjuvante IL-2-Monotherapie existieren keine ausreichenden Studiendaten.

Bei Patienten mit metastasiertem Melanom sind kurative Therapien meist nicht möglich. Zusätzlich zur operativen Therapie werden hier verschiedene lokale Therapien wie Strahlentherapie (Herbert et al. 1991), Elektrochemotherapie (Gaudy et al. 2006) oder lokale Immuntherapie, beispielsweise durch intratumorale IL-2-Injektionen (Weide et al. 2010), eingesetzt, um eine bessere lokoregionale Kontrolle der Erkrankung zu erreichen. Dabei ist anzumerken, dass auch lokale unspezifische Immuntherapien nicht nur lokale, sondern auch systemische Wirkungen auf eine Melanomerkrankung im metastasierten Stadium haben könnten, denn nach intratumoralen IL-2-Injektionen scheinen manche Patienten ungewöhnlich gut auf nachfolgende Chemotherapien anzusprechen (Weide et al. 2011).

Als systemische Therapieansätze werden Chemotherapien, Immuntherapien und neuerdings auch zielgerichtete molekulare Therapien (BRAF-, KIT-, MEK-Inhibitoren) eingesetzt. Chemotherapien zeigen bei fortgeschrittenen Melanomen allerdings nur eine limitierte Wirksamkeit (Helmbach et al. 2001). Decarbazin und Temozolomid weisen in der Therapie von Melanomen im Stadium IV nur Ansprechraten von 12,1% bzw. 13,5% auf (Middleton et al. 2000). Eine Verlängerung des Gesamtüberlebens konnte nicht beobachtet werden (Markovic et al. 2007b; Quirt et al. 2007).

Immuntherapeutische Ansätze zeigen hoffnungsvolle, aber derzeit insgesamt ähnlich ernüchternde Ergebnisse. Hinsichtlich der systemischen Hochdosistherapie metastasierter Melanome mit IL-2 konnte eine objektive Ansprechrate von 16% gezeigt werden. In 6% der Fälle konnte sogar eine komplette Remission erreicht werden (Atkins et al. 1999). Trotz kompletter Remission kommt es nach wenigen Monaten fast immer zum Rezidiv.

Interessanterweise profitiert ein kleiner Teil der Patienten von der Hochdosis-Therapie mit IL-2, denn etwa 4% der Patienten bleiben progressionsfrei (Atkins et al. 2000). Versuche, die Ansprechraten der IL-2-Hochdosistherapie durch gp100 Peptidvakzine und inkomplettes Freund'sches Adjuvans (Montanide ISA-51) zu verbessern, zeigten zwar eine leichte Verbesserung des progressionsfreien Überlebenszeitraums (2,2 Monate gegenüber 1,6 Monaten; p = 0,008), eine signifikante Steigerung der Gesamtüberlebenszeit (17,8 Monate vs 11,1 Monate; p = 0,06) konnte aber nicht erreicht werden (Schwartzentruber et al. 2011). Allein für Ipilimumab, einen monoklonalen Antikörper gegen CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*), konnte eine Verbesserung der Gesamtüberlebenszeit (10,1 Monate vs 6,4 Monate; p = 0,001) nachgewiesen werden (Hodi et al. 2010). CTLA-4 fungiert normalerweise als negativer Regulator der T-Zell-Aktivierung, Blockade von CTLA-4 durch Ipilimumab enthemmt unspezifisch das adaptive Immunsystem. Ipilimumab war bezüglich der Gesamtüberlebenszeit, auch in Kombination mit DTIC, einer DTIC-Monochemotherapie überlegen (11,2 Monate vs 9,1 Monate; p=0,001). Allerdings waren auch hier sehr niedrige Ansprechraten zwischen 10% und 15% zu verzeichnen (Robert et al. 2011). Die kleine Patientengruppe, bei der allerdings ein Ansprechen auf die kombinierte Immunchemotherapie zu beobachten war, zeigte eine deutlich längere Ansprechdauer auf die Therapie (19,3 Monate vs 8,1 Monate; p=0,03).

Einen weiteren neuen Therapieansatz stellen die molekularen zielgerichteten Therapien mit BRAF-, KIT-, MEK-Inhibitoren dar (Guo et al. 2011; Flaherty et al. 2012; Sosman et al. 2012). Diese Inhibitoren können nur eine Wirksamkeit zeigen, wenn bestimmte Kinasen zellulärer Signalwege wie BRAF oder KIT in den Melanomzellen durch bestimmte Mutationen konstitutiv aktiviert sind. Beispielsweise kann der im Jahr 2012 zugelassene BRAF-Inhibitor Vemurafenib nur bei bestehender aktivierender V600E-Mutation im BRAF-Molekül eingesetzt werden. Durch diese Mutation kommt es in den Melanomzellen zu einer konstitutiven Aktivierung des MAPKinase-Signalweges, hierdurch werden Zellproliferation und die Apoptoseresistenz der Melanomzellen gesteigert. Die V600E-Mutation ist bei etwa 50% der Melanome nachweisbar (Davies et al. 2002). Ist ein Einsatz des BRAF-Inhibitors Vemurafenib möglich, werden Ansprechraten von 53% beschrieben (Sosman et al. 2012). Sechs Monate nach Beginn einer Studie, in der Vemurafenib gegen DTIC verglichen wurde, zeigte sich, dass die mit Vemurafenib behandelte Kohorte eine deutlich verbesserte Gesamtüberlebensrate (84% vs 64%; p=0,001) im Vergleich zu der mit DTIC behandelten Kohorte aufwies (Chapman et al. 2011). Aber auch hier wird eine Resistenzentwicklung

gegenüber den Substanzen beobachtet, so dass die mediane progressionsfreie Überlebenszeit in diesen Fällen hier auch nur mit 6,8 Monaten beschrieben wurde (Sosman et al. 2012).
Das Fehlen gut wirksamer Therapien für das metastasierte Melanom unterstreicht die Notwendigkeit, neben Früherkennung und Prävention neue Therapiemöglichkeiten für das maligne Melanom zu entwickeln. Hierbei stehen nicht nur systemische Therapieansätze im Fokus des Interesses, sondern auch Therapieansätze, die eine lokoregionäre Kontrolle der Melanomerkrankung ermöglichen. Eine spezifische sowie unspezifische Immunmodulation stellt einen erfolgversprechenden Therapieansatz dar, um eine lokale und systemische Tumorkontrolle zu erreichen.

1.1.6. Lungenmetastasen

Eine häufige Lokalisation für Fernmetastasen des malignen Melanoms stellt die Lunge dar. 30%-50% Prozent der Melanompatienten in Stadium IV entwickeln im Verlauf der Erkrankung Lungenmetastasen (Coit 1993; Barth et al. 1995). Patienten mit Lungenmetastasen zeigen ein medianes Überleben von nur 7,3 Monaten (Petersen et al. 2007). Die Lungenmetastasen sind meist peripher gelegen und lange asymptomatisch, führen letztlich aber häufig zu respiratorischen Problemen, die die Lebensqualität der Patienten deutlich einschränken. Solitäre Lungenmetastasen können operativ entfernt werden. Die chirurgische Therapie multipler Lungenmetastasen gestaltet sich allerdings schwierig. Sie ist nur in Ausnahmefällen indiziert, da Parenchym schonend operiert werden muss, um respiratorische Probleme zu vermeiden.
Eine Möglichkeit der nicht operativen Therapie multipler Lungenmetastasen stellt die inhalative Therapie mittels Immunstimulantien dar. Durch Inhalation können lokal hohe Wirkstoffkonzentrationen erreicht werden, während systemische Nebenwirkungen stark reduziert sind (Sharma et al. 2001). Patienten mit pulmonalen Metastasen eines Nierenzellcarzinoms profitieren beispielsweise von einer inhalativen IL-2-Therapie (Huland et al. 2000; Huland et al. 2004). Pulmonale Metastasen maligner Melanome zeigen dagegen leider nur eine niedrige Ansprechrate auf inhalative IL-2-Therapie (Enk et al. 2000).

1.1.7. B16-F10-Modellsystem

Für das maligne Melanom existiert ein gut beschriebenes murines Tiermodell, mit dessen Hilfe die Wirkung von Therapeutika auf pulmonale Metastasen untersucht werden kann. Die verwendete Melanomzelllinie B16-F10 zeichnet sich im Tiermodell durch ihr Potenzial aus, in syngenen Mäusen pulmonale Metastasen zu bilden. Fidler (1973) selektierte diese Zelllinie aus einer Serie sogenannter B16–Maus-Melanome aufgrund ihrer Eigenschaft, vermehrt Lungenmetastasen zu bilden, wenn sie in die Schwanzvene von C57/BL6-Mäusen injiziert wurden (Fidler 1973). Neben der Untersuchung pulmonaler Metastasierungsprozesse eignet sich dieses syngene *in-vivo*-Modellsystem auch, um verschiedene immuntherapeutische Ansätze zu untersuchen. So kann durch intratracheale Instillation von Arzneimitteln deren lokale Wirkung auf pulmonale Metastasen und die pulmonale Metastasierung untersucht werden. B16-F10-Melanome besitzen nur schwach immunogene Eigenschaften, so dass immuntherapeutische Ansätze, die in diesem Tiermodell zu Erfolgen führen, ein hohes Potenzial aufweisen, um auf andere Tierspezies oder den Menschen übertragbar zu sein (Stone et al. 2009).

1.2. Immunsystem und Tumoren

1.2.1. Native Immunabwehr zum Schutz vor Tumorerkrankungen

Um die Entstehung von Tumorerkrankungen zu verhindern, existieren verschiedene intrinsische und extrinsische Tumorsuppressormechanismen. Ein grundsätzlicher extrinsischer Tumorsuppressormechanismus wird durch das Immunsystem repräsentiert.

Das Immunsystem hat drei Hauptfunktionen bezüglich des Schutzes vor Tumorerkrankungen und deren Entstehung:

1.) Es schützt vor viralen Infektionen und verhindert so die Entstehung virusinduzierter Tumoren (zur Hausen 1991).

2.) Es schützt vor der Ausbildung einer chronisch entzündlichen Umgebung, die die Tumorgenese unterstützen kann, indem es Pathogene eliminiert und zur schnellen Auflösung von Entzündungszuständen beiträgt (Coussens und Werb 2002).

3.) Es eliminiert Tumorzellen und Tumorzell-Vorstufen in unterschiedlichen Geweben.

1.2.2. Erkennung von Tumorzellen durch das Immunsystem

Wenn sich normale Körperzellen zu Tumorzellen entwickeln, verändern sich die von ihnen präsentierten Oberflächenantigene. Embryonale Antigene, die von ausdifferenzierten Zellen nicht exprimiert werden, können wieder reaktiviert werden. Selbstantigene können durch Mutation und abnorme posttranslationale Modifikation verändert werden. Auch die Überexpression normaler Antigene kann aufgrund der veränderten Quantität immunogen wirken. Diese neuen oder veränderten Antigene stellen eine Möglichkeit für das Immunsystem dar, die Tumorzellen sowie präkanzeröse Zellen zu erkennen und anschließend zu eliminieren.

Diese Erkennbarkeit von Tumorzellen durch das Immunsystem ist das zentrale Dogma jener Hypothese der Immunüberwachung zur Abwehr von Tumorerkrankungen, wie sie von Burnet und Thomas formuliert wurde (Burnet 1970; Thomas 1982). Ursprünglich dachten Burnet und Thomas, dass es nur dem adaptiven Immunsystem möglich wäre, Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren. Trotz teilweise widersprüchlicher Ergebnisse (Stutman 1974) konnte man erst um die Jahrtausendwende zeigen, dass auch das angeborene Immunsystem eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Bekämpfung von Tumorzellen hat (Smyth et al. 2000; Cui et al. 2003; Dunn et al. 2004).

1.2.2.1. **Adaptives Immunsystem und Tumoren**

T-Helferzellen ($CD4^+$-Zellen) spielen eine wichtige Rolle bei der Initiierung und Lenkung der adaptiven Immunantwort. Sie binden über ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) Peptide, die ihnen über MHC-II-Moleküle von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) präsentiert werden. T-Helferzellen können anhand ihres Zytokinprofils charakterisiert und in verschiedene Subtypen unterteilt werden. Man unterscheidet hierbei unter anderem TH1-Zellen von TH2-Zellen. TH1-Zellen sind vor allem für die Initiierung der zellvermittelten Immunität zuständig und tragen durch IL-2- und IFN-γ-Sekretion zur Proliferation und Differenzierung von $CD8^+$-zytotoxischen T-Zellen (CTL) bei. IFN-γ steigert außerdem die Zytotoxizität von CTL und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). TH2-Zellen sezernieren vor allem IL-4, -5, -9, -10 und -13 und sind so hauptsächlich für die Initiierung der humoralen Immunität mit Antikörper-Klassenwechsel (*class switch*) zum IgE zuständig. Sie induzieren hierdurch Mastzell- und Eosinophilen-vermittelte Immunantworten. TH1- und TH2 –Zellen hemmen sich in ihren Effektorfunktionen gegenseitig. Eine TH1-dominierte Immunantwort fördert demnach eine gegen Tumoren gerichtete adaptive Immunantwort.

TH1-Zellen scheinen aber auch direkt auf Tumorzellen Einfluss nehmen zu können. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass TH1-Zellen die Fähigkeit haben, Tumorzellen in Seneszenz zu versetzen und so ein Tumorwachstum langfristig verhindern können (Braumüller et al. 2013).

Nach heutiger Kenntnis vermittelt das adaptive Immunsystem allerdings den Großteil seiner antitumoralen Effektorfunktion über $CD8^+$-zytotoxische T-Zellen (CTL), die Tumorantigene über ihren TCR erkennen können, wenn sie über Major Histokompatibilitäts-Komplexe (MHC) der Klasse I präsentiert werden. Um ihre somatischen Zielzellen erkennen und bekämpfen zu können, müssen naive zytotoxische T-Zellen zuerst aktiviert werden. Für diese Aktivierung ist neben der MHC-I/TCR-Interaktion noch mindestens ein weiteres co-stimulatorisches Signal nötig. Diese co-stimulatorischen Signale können membrangebundene oder lösliche Faktoren aus dem Umgebungsmilieu sein. Gut charakterisierte membrangebundene, co-stimulatorische Signale sind beispielsweise die Moleküle der B7-Familie, CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2), die an CD28 auf T-Zellen binden. Die meisten körpereigenen Zellen exprimieren keine CD28-Liganden. Die co-stimulatorischen Signalmoleküle CD80 und CD86 werden von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (dendritischen Zellen) exprimiert, die somit eine Schlüsselstellung in der Generierung einer

adaptiven Immunantwort innehaben. Einmal aktiviert, durchlaufen CTL mit Hilfe von IL-2 als Wachstums- und Differenzierungsfaktor die klonale Expansion.

Dermaßen aktivierte CTL können Tumorzellen, wenn sie über ihren TCR an das entsprechende Tumorantigen auf MHC-I binden, prinzipiell über zwei Mechanismen töten. Durch Aktivierung der CTL kommt es zur Ausschüttung von Granzym B und Perforin aus präformierten Granula. In der Zielzelle wird durch das ausgeschüttete Perforin eine Pore in der Plasmamembran gebildet. Durch die Pore kann das ebenfalls ausgeschüttete Granzym B in die Zielzelle eindringen und aktiviert dort als Serinprotease Caspasen, die die Apoptose der Zielzelle einleiten. Die zweite Möglichkeit, durch aktivierte $CD8^+$-Zellen Tumorzellen zu töten, wird durch die Expression von Fas-Ligand (CD95L) vermittelt. Bindet Fas-Ligand an den Todesrezeptor Fas (CD95), der auf fast allen Zellen konstitutiv exprimiert wird, kommt es in der Zielzelle zur Induktion von Apoptose (zusammengefasst in Schütt und Bröker 2009).

1.2.2.2. **Angeborenes Immunsystem und Tumoren**

Das angeborene Immunsystem ist über dendritische Zellen an der Ausbildung einer adaptiven Immunreaktion gegen Tumorzellen beteiligt. Die Zellen der angeborenen Immunität (Makrophagen, neutrophile Granulozyten, NK-Zellen) können aber auch direkte antitumorale Aktivität ausüben, indem sie Tumorzellen lysieren oder durch Produktion von Zytokinen Tumorwachstum und Angiogenese blockieren.

1.2.2.2.1. **Makrophagen**

Die Rolle von Makrophagen bei der Tumorabwehr ist gegenwärtig nicht abschließend geklärt. Man unterscheidet zwei funktionelle Differenzierungsformen der Makrophagen: die einen sind in der Lage, Tumorzellen zu bekämpfen und werden als Makrophagen-Typ1 (M1) bezeichnet, die anderen, nämlich Makrophagen-Typ2 (M2), scheinen Tumorwachstum unterstützen zu können (Allavena et al. 2008).

Sind M1-Makrophagen entsprechend aktiviert, sind sie in der Lage, Tumorzellen durch verschiedene Mechanismen zu bekämpfen. Durch die Sekretion lysosomaler Enzyme, Produktion reaktiver Sauerstoffspezies sowie durch Stickstoffmonoxid können direkte Schäden an Tumorzellen verursacht werden (Nathan et al. 1979; Cui et al. 1994; Albina und Reichner 1998). Durch die Expression von Molekülen der TNF-Rezeptor-Familie, beispielsweise TNF–*related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL), können Makrophagen Apoptose induzieren (Griffith et al. 1999). Außerdem können Makrophagen Tumorzellen indirekt schädigen, indem sie Schäden an Endothelzellen verursachen und so die

Thrombosierung von Gefäßen bewirken, die den Tumor versorgen (Mantovani et al. 2002). Weiterhin sind sie in der Lage, tumorassoziierte Antigene für T-Zellen zu präsentieren und immunstimulatorische Zytokine wie IL-1, IL-8 und IL-12 auszuschütten. So werden T- und NK-Zellen stimuliert zu proliferieren und Tumoren zu bekämpfen (Tsung et al. 2002). Außerdem sind Makrophagen an der Antikörper-vermittelten zellulären Zytotoxizität beteiligt, indem sie über Fc-Rezeptoren spezifische Antikörper binden (Johnson et al. 1986).
M2-Makrophagen hingegen zeigen keine tumorizide Aktivität und besitzen weniger ausgeprägte Antigen-präsentierende Eigenschaften. M2-Makrophagen sind häufig in der Umgebung von Tumorzellen zu finden. Sie werden dann auch als Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) bezeichnet. Sie bilden Zytokine, die die T-Zell-Funktion hemmen (beispielsweise IL-10, TGF-β) und Tumorwachstum und/oder Angiogenese fördern (beispielsweise VEGF) (Allavena et al. 2008).
IL-4 und IL-10 können bewirken, dass Makrophagen den M2-Typ annehmen (Mantovani et al. 2004). Auf welchem Weg sie allerdings *in vivo* dazu gebracht werden können, sich wieder in einen M1-Typ zurückzuverwandeln, ist Gegenstand der derzeitigen Forschung.

1.2.2.2.2. **Neutrophile Granulozyten**

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) schützen den Wirtsorganismus vor eindringenden Mikroorganismen und können die Wundheilung unterstützen. Bezüglich der Interaktion mit Tumorzellen wurden sie bisher kaum untersucht und wurden meist mit tumorprogressionsfördernden Mechanismen in Zusammenhang gebracht. In jüngster Zeit gibt es Hinweise, dass auch neutrophile Granulozyten in tumorbekämpfende N1- und tumorfördernde N2-Typen unterteilt werden können (Fridlender et al. 2009). Sind neutrophile Granulozyten entsprechend aktiviert (N1-Typ), können sie Tumorzellen direkt schädigen, indem sie wie Makrophagen reaktive Sauerstoffspezies bilden oder TRAIL exprimieren. Außerdem stellen sie eine bedeutende Quelle proinflammatorischer Zytokine dar (Di Carlo et al. 2001; Hicks et al. 2006; Kresowik und Griffith 2009; Souto et al. 2009). TGF-β in der Tumorumgebung scheint bei PMN, ähnlich wie bei Makrophagen, die Entwicklung des tumorunterstützenden Phänotyps (N2-Typ) zu induzieren (Fridlender et al. 2009). N2- PMN können Tumorwachstum durch die Produktion angiogenesefördernder Faktoren und Extrazellulärmatrix-degradierender Enzyme fördern (Pekarek et al. 1995; Shojaei et al. 2008). Ebenso existieren Untersuchungen, dass PMN die Extravasation und Metastasierung von Tumorzellen unterstützen können (Huh et al. 2010).

1.2.2.2.3. **Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)**

Am besten ist bisher die Fähigkeit der Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Tumorzellen zu lysieren, charakterisiert. NK-Zellen sind in der Lage, Tumorzellen zu bekämpfen, wenn sie auf deren Oberfläche Liganden für ihre NK-Zellrezeptoren finden. NK-Zellen besitzen aktivierende und inhibitorische Rezeptoren, die entweder zur Immunglobulinsuperfamilie gehören (wie KIRs (*killer cell immunoglobulin like receptors*)), oder Lektine (beispielsweise NKG2D) darstellen. Als klassisches Beispiel für inhibierende Rezeptoren der NK-Zellen können KIRs gelten, die bestimmte MHC-I-Allele binden können (wie KIR3DL1 oder KIR3DL4). Ein Verlust von MHC-I-Allelen (*missing self*) hebt die durch sie erzeugten inhibitorischen Signale auf und enthemmt so die NK-Zellen. Ein Verlust von MHC-I-Allelen findet sich häufig bei Tumorzellen. Der Verlust der MHC-Identität alleine reicht allerdings nicht aus, um NK-Zellen so weit zu aktivieren, dass sie ihre Zielzellen töten. Sie benötigen weiterhin aktivierende Signale, etwa über Rezeptoren wie NKG2D. Diese aktivierenden NK-Zellrezeptoren sind in der Lage, von der Zelle produzierte Stressproteine (wie MIC-A oder MIC-B) oder auch onkofetale Antigene zu erkennen. Viele Liganden der NK-Zellrezeptoren sind heute noch nicht bekannt. Außerdem exprimieren NK-Zellen den aktivierenden NK-Zellrezeptor FcγRIII (CD16) an ihrer Oberfläche. Sie können so den Fc-Teil von IgG, das an Zelloberflächen fixiert ist, binden. So werden NK-Zellen zur Lyse der mit IgG markierten Zelle angeregt und sind somit an der Antikörper-vermittelten zellulären Zytotoxizität beteiligt. Sind die Ziele der NK-Zellen dann "zum Abschuß freigegeben", sezernieren sie, ähnlich der CTL, Perforin und Granzym B, um die Zielzelle zu lysieren (zusammengefasst in Schütt und Bröker 2009). Außerdem können NK-Zellen auch TRAIL exprimieren, um so Apoptose zu induzieren (Takeda et al. 2001).

1.2.2.2.4. **Dendritische Zellen**

Dendritischen Zellen (DCs) kommt bei der Initiierung der adaptiven Immunantwort eine zentrale Rolle zu. Durch Pinozytose nehmen sie Material aus dem extrazellulären Milieu auf und erheben so einen „Antigenstatus“ ihrer Umgebung, der auch Tumorantigene von abgestorbenen Zellen beinhalten kann. Kommt es über ihre „*Pathogen-recognition*“-Rezeptoren (PRR) zu einem Gefahrensignal, durchlaufen diese „unreifen“ DCs einen Reifungsprozess. Die dendritischen Zellen runden sich ab, migrieren in die Lymphknoten und exprimieren dort verstärkt co-stimulatorische Moleküle der B7-Familie, die für die T-Zell-Aktivierung nötig sind. Im Lymphknoten präsentieren die nun „reifen“ dendritischen Zellen

die zuvor aufgenommenen Antigene mittels MHC-II-Komplexen an naive CD4-T-Zellen. Durch Kreuzpräsentation können DCs auch Tumorantigene von abgestorbenen Tumorzellen auf MHC-I an CD8-T-Zellen präsentieren, um so eine Immunantwort gegen Tumorzellen anzustoßen. Auch scheinen DCs bei der Antigenpräsentation über die weitere Differenzierung von T-Helferzellen zu entscheiden und so eine TH1-dominierte (zellvermittelte Antwort) oder TH2-dominierte (humorale Antwort) T-Zell-Antwort zu induzieren. Neben diesen wichtigen regulatorischen Funktionen gibt es Hinweise, dass DCs unter besonderen Umständen auch direkt tumorizide Wirkungen durch TRAIL entfalten können (Fanger et al. 1999; Stary et al. 2007).

1.2.3. Tumoren und Immun-Evasion („*immune escape*“)

Um der Detektion und/oder Elimination durch Immuneffektorzellen zu entgehen, müssen Tumoren aktive oder passive Toleranzmechanismen entwickeln. Einige wichtige dieser *Immune escape*-Mechanismen werden im Folgenden kurz umrissen (Übersicht in Vesely et al. 2011):

1.2.3.1. **Geringe Immunogenität und antigene Modulation**

Tumorzellen können einer Entdeckung durch das adaptive Immunsystem entgehen, indem sie Defekte in der Antigenprozessierung und/oder der Antigenpräsentation aufweisen, so dass Tumorantigene nicht oder nur vermindert präsentiert werden. Auch der Verlust von Tumorantigenen reduziert die Immunogenität von Tumorzellen.

Beispiele für Defekte in der Antigenpräsentation und Antigenprozessierung sind:

a) Modulation von MHC I-Molekülen, die die Antigene an tumorspezifische T-Lymphozyten präsentieren (Khong et al. 2004).

b) Modulation von TAP-Transportern (*transporter associated with antigen processing*) oder Komponenten des Immunproteasoms, wie LMP2 und LMP7, die in der Tumorzelle für die Antigenprozessierung zuständig sind (Seliger et al. 2000).

1.2.3.2. **Reduktion co-stimulatorischer Signale**

Tumorzellen können auch der Immunabwehr entgehen, indem sie keine co-stimulatorischen Signale exprimieren. So können beispielsweise NK-Zellen nicht gegen Tumorzellen aktiv werden, wenn diese keine aktivierenden Liganden für NK-Zell Rezeptoren wie NKG2D auf ihrer Oberfläche exprimieren (Stern-Ginossar et al. 2008).
Außerdem setzen Tumorzellen nur wenige Gefahrensignale frei, welche Entzündungsprozesse induzieren können. Dadurch werden TH1-Zellen nicht in ausreichendem Maße aktiviert.

1.2.3.3. **Apoptoseresistenz**

Tumorzellen können der immunvermittelten Elimination entgehen, indem sie proapoptotische Gene durch *loss of function* Mutationen und *gene silencing* ausschalten und beispielsweise nur inaktive Varianten von Todesrezeptoren wie FAS- oder TRAIL-Rezeptoren exprimieren (Shin et al. 2001; Takahashi et al. 2006). Eine andere Möglichkeit, die Apoptoseresistenz zu steigern, ist die Überexpression antiapoptotischer Molekülen wie FLIP oder BCL-XL (Kataoka et al. 1998; Hinz et al. 2000).

1.2.3.4. **Elimination von T-Zellen**

Tumorzellen können auch aktiv Liganden für Todesrezeptoren wie PD-L1 (*Programmed cell death 1 ligand 1*) oder Fas-Ligand auf ihrer Oberfläche exprimieren. Eine tumorspezifische Immunantwort wird dann unterdrückt, indem die Tumorzellen die Apoptose zytotoxischer T-Lymphozyten auslösen (Dong et al. 2002; Kim et al. 2005).

1.2.3.5. **Schaffung eines immunprivilegierten Ortes**

Eine weitere mögliche Alternative, um der Bekämpfung durch das Immunsystem zu entgehen, ist die Schaffung eines immunprivilegierten Ortes, beispielsweise durch Verkapselung und/oder Etablierung eines immunsuppressiven Mikromilieus in der Tumorumgebung durch die Tumorzellen selbst (Radoja et al. 2000). Die Entwicklung eines immunsuppressiven Milieus kann durch verschiedene lösliche Faktoren induziert werden, die durch die Tumorzellen selbst produziert werden. Manche Tumoren können lösliche NKG2D-Liganden wie MIC-B sezernieren, wodurch sie die aktivierenden NK-Zellrezeptoren absättigen und so im Mikromilieu des Tumors die Möglichkeit der Tumorzellerkennung hemmen können (Groh

et al. 2002). Auch die Expression des Tryptophan-katabolisierenden Enzymes IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) kann die Etablierung eines immunsuppressiven Mikromilieus ermöglichen. IDO depletiert Tryptophan, das T-Zellen zur Aktivierung benötigen (Zamanakou et al. 2007). Ein immunsuppressives Milieu kann auch durch Produktion immunsuppressiver Zytokine wie IL-10 oder TGF-β durch Tumorzellen induziert werden. TGF-β, das von Tumorzellen produziert wird, kann die Umwandlung naiver CD4+CD25-T-Zellen in CD4+CD25+Foxp3+ regulatorische T-Zellen (Treg) induzieren (Liu et al. 2007). Treg-Zellen, die zur Aufrechterhaltung des immunologischen Gleichgewichts aktiv eine Immuntoleranz induzieren können, führen im Tumormilieu ihrerseits zu einer Suppression von T-Zellen und fördern so den *Immune escape* (Terabe und Berzofsky 2004; Sakaguchi et al. 2009). TGF-β Sekretion führt auch zur Hemmung der DC-Aktivierung und zu direkter Hemmung der T-Zell- und NK-Zell-Aktivität (Wrzesinski et al. 2007). Die IL-10 Produktion kann die DC-Funktion supprimieren und verlagert dadurch die Immunantwort in Richtung TH2, die für die Bekämpfung von Tumorzellen weniger effektiv ist (Aruga et al. 1997). Außerdem werden Makrophagen durch IL-10 und TGF-β im Tumormilieu dazu gebracht, sich zu Tumorwachstum-fördernden M2-Makrophagen zu differenzieren (Mantovani et al. 2008).

1.2.4. Immunüberwachung und „Immunoediting“ von Tumoren

Heute geht man davon aus, dass das Immunsystem nicht nur für die Entdeckung und Zerstörung von Tumorzellen zuständig ist, sondern dass ein intaktes Immunsystem auch die Immunogenität der Tumorzellen beeinflusst (Schreiber et al. 2011). Diese Erkenntnis konnte man anhand von Experimenten mit Inzuchtstämmen von Mäusen gewinnen. Tumoren, die sich in Tieren mit einem defizienten Immunsystem entwickeln, zeigen stärkere immunogene Eigenschaften als Tumoren, die sich in immunkompetenten Tieren entwickeln, wenn man sie in immunkompetente Tiere mit ansonst gleichem genetischen Hintergrund transplantiert (Shankaran et al. 2001).

Der durch ein intaktes Immunsystem ausgeübte Selektionsdruck auf die Tumorzellen führt zur Entwicklung von *Immune escape*-Mechanismen und fördert die Entwicklung wenig immunogener Tumorvarianten. Das Resultat sind gering immunogene Tumorzellvarianten, die für das Immunsystem „unsichtbar“ geworden sind, sei es durch schlechte immunogene Eigenschaften der Tumorzellen selbst oder durch induzierte Toleranzmechanismen. Dieser Vorgang wird auch als *Immunoediting* bezeichnet (Dunn et al. 2004).

Bei der Hypothese der Immunüberwachung und des *Immunoeditings* geht man von drei Phasen in der Entwicklung der Tumorerkrankung aus (Abb 1.1).

1.) Elimination

2.) Equilibrium

3.) Escape

In der **Eliminations-Phase** arbeiten die Zellen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems zusammen, um transformierte Zellen zu erkennen und zu zerstören. In der Regel wird dadurch der größte Teil der sich entwickelnden Tumorzellen zerstört. Damit kann der Organismus vor der Entstehung einer Tumorerkrankung geschützt werden. Ist es dem Immunsystem allerdings nicht möglich, alle transformierten Zellen zu eliminieren, kann die Tumorerkrankung in die Equilibrium- Phase übergehen.

In der **Equilibrium-Phase** halten sich Wachstum und Zerstörung der nicht eliminierten Tumorzellvarianten durch das Immunsystem das Gleichgewicht, so dass in der Gesamtheit kein relevantes Tumorzellwachstum besteht. Diese Phase kann sich über einen langen Zeitraum erstrecken. Die heterogene Population von Tumorzellvarianten kann weitere Mutationen erwerben, die zur Ausbildung von *Immune escape*-Mechanismen führen.

Die Tumorerkrankung geht dann in die ***Escape*-Phase** über, sobald das Wachstum der transformierten Zellen infolge Akquirierung multipler *Immune escape*-Mechanismen in einer durch das Immunsystem ungehemmter Weise erfolgen kann.

Eine klinisch detektierbare Tumorerkrankung befindet sich meist in der Escape-Phase. Übergange zwischen Eliminations-, Equilibriums- und Escape-Phase sind theoretisch in alle Richtungen möglich (zusammengefasst in Dunn et al. 2004; Schreiber et al. 2011).

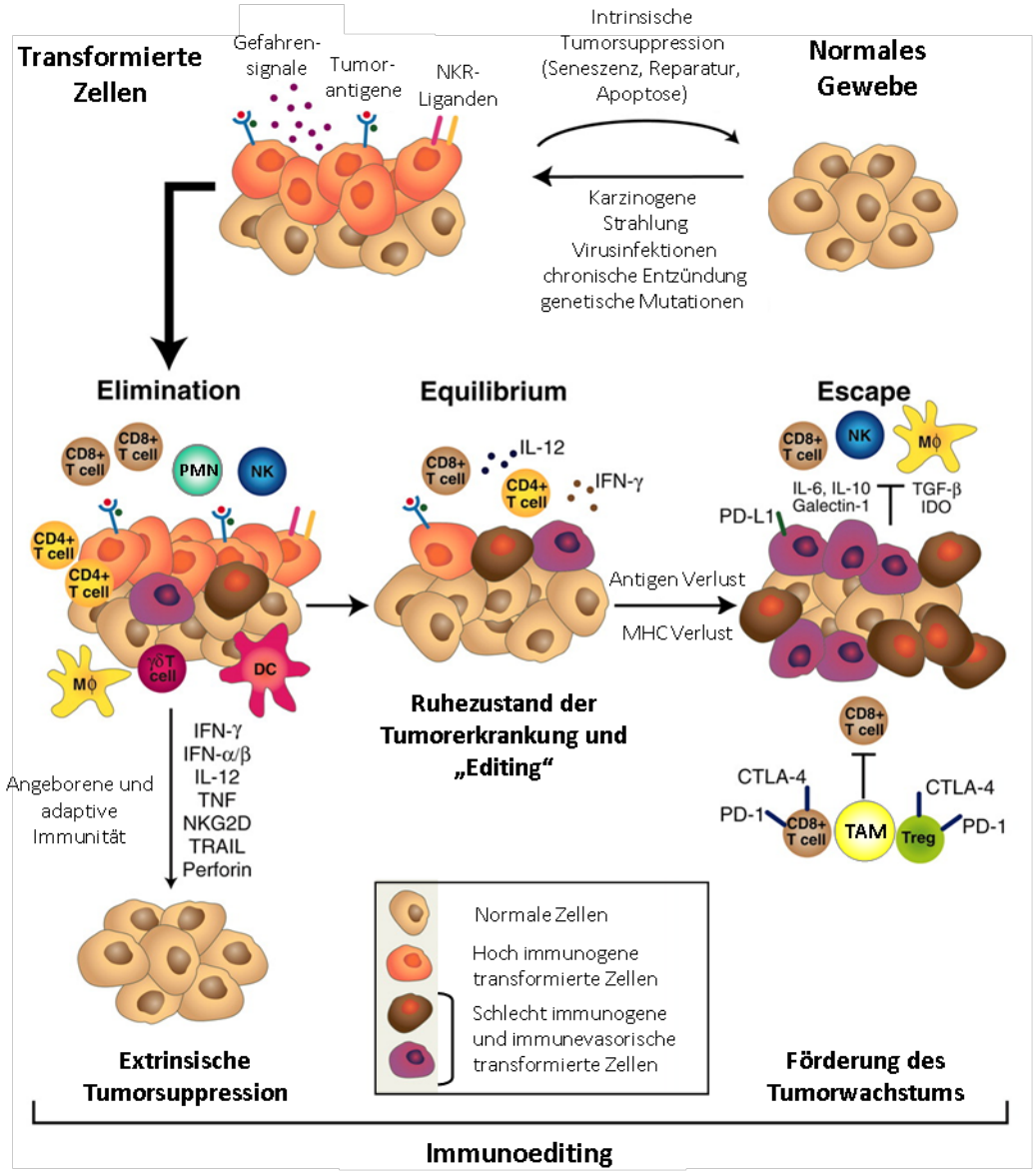

Abb.: 1.1: Immunogenität von Tumoren und das „Immunoediting“-Konzept

MΦ = Makrophage; PMN = Polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt; DC = Dendritische Zelle; IDO = Indolamin-2,3-Dioxygenase; IL = Interleukin; TNF = Tumornekrosefaktor; IFN = Interferon; NK = Natürliche Killerzelle; NKG2D = aktivierender NK-Zell Rezeptor; PD-L1 = *programmed death 1 ligand*; TAM = Tumor assoziierte Makropagen; Treg = regulatorischer T-Zelle (inhibiert andere T-Zellen zur Aufrechterhaltung immunologischer Toleranz), CTLA-4 = *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4* (verändert nach Schreiber et al. 2011).

1.3. Immuntherapie von Tumoren

Bei der Immuntherapie von Tumoren stellt sich die Frage, in wie weit eine klinisch progrediente, bereits metastasierte Krebserkrankung aus der Escape-Phase wieder suffizient durch das Immunsystem erkannt und attackiert werden kann und damit wieder in die Equilibriums- oder besser noch in die Eliminationsphase zurückgebracht werden kann. Hierfür existieren verschiedene mechanistische Ansätze, die meist auf eine Modulation von Mechanismen des adaptiven Immunsystems abzielen (zusammengefasst in Blattman und Greenberg 2004; Schreiber et al. 2011).

Ansätze, die auf eine Modifizierung der T-Zellaktivität abzielen, sind beispielsweise:

1. Tumorvakzinierung, mit deren Hilfe man starke spezifische Immunantworten gegen Tumorantigene wie MAGE-3 oder NY-ESO-1 generieren will.
2. Spezifische Hemmung negativer Regulatoren der T-Zell-Aktivierung, um so eine ungehemmte T-Zell-Aktivierung gegen Tumoren zu erzeugen. Als Beispiel sei der gegen CTLA-4 gerichtete Antikörper Ipilimumab genannt, der kürzlich zur Behandlung des metastasierten Melanoms zugelassen wurde oder Anti-PD-1-Antikörper, die über einen ähnlichen Wirkmechanismus in das Tumorgeschehen eingreifen.
3. Adoptiver T-Zelltransfer. Dieser kann entweder als allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation nach Hochdosis-Radiochemotherapie eingesetzt werden, um die entstehenden Graft-versus-Tumor-Effekte zu nutzen, wie sie bei hämatologischen Tumorerkrankungen therapeutisch durchgeführt werden, oder als adoptiver T-Zelltransfer autologer Tumor-spezifischer T-Lymphozyten, die aus Patienten isoliert oder gentechnisch erzeugt werden, um anschließend in vitro expandiert und reinfundiert zu werden.

Ein anderer therapeutischer Ansatz basiert auf der Modulation des angeborenen Immunsystems. Die Aktivierung der angeborenen Immunität basiert wie auch bei der adaptiven Immunität auf der Fähigkeit, ein Pathogen als fremd zu erkennen. Basierend auf der Annahme, dass transformierte Zellen an sich nicht genügend Gefahrensignale exprimieren, um die tumorizide Aktivität des angeborenen Immunsystems zu aktivieren, kann durch Zugabe von Gefahrensignalen, beispielsweise durch Toll-like-Rezeptor-Agonisten (TLR-Agonisten), versucht werden, die Zellen des angeborenen Immunsystems so zu stimulieren,

dass diese ihre eigene tumorizide Wirkung entfalten. Zudem kann durch Zugabe von Gefahrensignalen bewirkt werden, dass professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC), wie dendritische Zellen, durch verstärkte Präsentation von Tumorantigenen eine adaptive Immunantwort anstoßen.

TLR-Agonisten stellen demnach eine Möglichkeit dar, das unspezifische Immunsystem künstlich zu aktivieren, mit dem Ziel, die körpereigene Tumorabwehr zu unterstützen und die tolerogene Situation einer Tumorerkrankung in eine immunogene umzuwandeln.

1.3.1. Immuntherapie mit TLR-Agonisten

Die Immuntherapie gegen maligne Tumoren mit Hilfe von TLR-Agonisten hat ihre Wurzeln in der Arbeit des New Yorker Chirurgen William Coely (Coley 1893). Ihm war aufgefallen, dass sich Tumoren bei Patienten zurückbilden konnten, wenn sie nach einem operativen Eingriff eine bakterielle Infektion erlitten. Daraufhin versuchte er Patienten, die an inoperablen Sarkomen litten, mit intratumoraler Injektion von bakteriellen Lysaten zu behandeln. Obwohl er deutliche Behandlungserfolge beobachten konnte, gerieten seine Studien bald in Vergessenheit und wurden durch modernere Verfahren, wie beispielsweise die Strahlentherapie, ersetzt (Akira 2009). Erst 80 Jahre später wurde das Interesse an Immuntherapien bei Tumoren wieder geweckt. Untersuchungen hatten gezeigt, dass die intravesikale Verabreichung von Bacillus Calmette-Guerin (BCG), einem schwach virulenten Stamm von Mykobakterium bovis, zu Behandlungserfolgen bei frühen Stadien des Urothelkarzinoms der Blase führten (Morales et al. 1976). Erst Jahre später konnte gezeigt werden, dass BCG über die Toll-like Rezeptoren (TLR) 2 und 4 die Zellen des angeborenen Immunsystems aktiviert und so seine anti-tumorale Wirkung entfaltet (Kresowik und Griffith 2009).

Im Hinblick auf die Krebstherapie verschiedener Tumorentitäten befinden sich derzeit verschiedene TLR-Agonisten entweder als Mono-Therapeutikum, als Kombinations-Therapeutikum mit Chemo- und Radiotherapie, oder als Adjuvans bei spezifischen Immuntherapien wie der Tumorvakzinierung, in unterschiedlichen Phasen der klinischen Prüfung (Galluzzi et al. 2012). Der TLR7/8-Agonist Imiquimod (Aldara^{TM}) sei hier besonders hervorgehoben, da er als topisches Therapeutikum bereits seit Jahren für die Behandlung aktinischer Keratosen, *Carcinomata in situ* der Epidermis (Korman et al. 2005), und superfizieller Basalzellkarzinome (Schulze et al. 2005; Stary et al. 2007) am Menschen zugelassen ist. Aber auch aggressivere Tumoren, zum Beispiel kutane Melanommetastasen,

können sich unter topischer Therapie mit dem TLR7/8-Agonisten Imiquimod zurückbilden (Steinmann et al. 2000; Bong et al. 2002).

1.4. Toll-like-Rezeptoren (TLR)

TLR werden vor allem, aber nicht ausschließlich, auf Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen/Monozyten, Granulozyten, dendritischen Zellen und NK-Zellen exprimiert und sind dort für die Pathogenerkennung verantwortlich. Ihren Namen haben sie durch die strukturelle Ähnlichkeit mit den Toll-Rezeptoren. Ursprünglich entdeckt wurden Toll-Rezeptoren bei Drosophila als Moleküle, die in der Embryonalentwicklung der Fruchtfliege von Bedeutung sind (Anderson et al. 1985). Später aber zeigte sich, dass diese Rezeptoren auch eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Pilzinfektionen der Fruchtfliege spielen und somit eine Funktion in der unspezifischen Immunabwehr haben (Rosetto et al. 1995). Janeway und Mitarbeiter beschrieben 1997 den ersten Toll-like-Rezeptor beim Menschen (Medzhitov et al. 1997). TLRs gehören zu den sogenannten ***p**attern **r**ecognition*-**R**ezeptoren (PRRs), die in der Lage sind, sogenannte ***p**athogen-**a**ssociated **m**olecular **p**atterns* (PAMPs) zu erkennen. Die PAMPs stellen entwicklungsgeschichtlich konservierte Strukturen pathogener bakterieller und viraler Erreger dar. Da diese Strukturen essentiell für das Überleben von Pathogenen sind, wie beispielsweise Komponenten der Bakterienzellwand oder Nukleinsäuren, mutieren diese PAMPs kaum. Zu den wohl bekanntesten PAMPs gehört das Lipopolysaccharid (LPS), das ein seit langem bekannter Bestandteil der äußeren Zellwand Gram-negativer Bakterien ist. LPS führt bereits in geringsten Konzentrationen zur Aktivierung von Monozyten/Makrophagen, die daraufhin inflammatorische Zytokine sezernieren (Schütt und Bröker 2009).

Um ihre volle Ligandensensitivität zu erreichen, sind TLRs in einigen Fällen auf Co-Rezeptoren angewiesen. So wird beispielsweise die LPS-Detektion von TLR4 durch eine Erkennungs-Untereinheit MD-2 (*myeloid differentiation protein-2*) vermittelt. Zusätzlich sind CD14 und LPS-bindendes Protein (LBP) bei der Detektion von LPS eingebunden. LPS bindet zuerst an LBP, welches ein im Plasma gelöstes Akute-Phase-Protein ist. Dieses interagiert dann mit CD14, einem mittels Glycosylphosphatidylinositol-Anker an die Zelloberfläche von Makrophagen gekoppelten Protein. Anschließend wird LPS-LBP durch CD14 auf den TLR4-MD-2-Komplex übertragen und die Oligomerisierung von TLR 4 wird eingeleitet (Kawai und Akira 2009).

TLR werden nicht ausschließlich durch PAMP aktiviert, sondern können auch durch endogene Liganden, sogenannten ***d**amage-**a**ssosciated **m**olecular **p**atterns* (DAMPs) aktivert werden. Diese endogenen Liganden sind Moleküle, die durch Stress oder durch sterbende Zellen freigesetzt werden. Beispiele für solche DAMPs sind das Nicht-Histone-Chromatin-bindende Protein HMGB1, Hitzeschockproteine oder Produkte der extrazellulären Matrix (Galluzzi et al. 2012).

1.4.1. TLR-Spezies und ihre Agonisten

Bisher sind 13 TLRs in Vertebraten beschrieben worden, von denen 10 im Menschen vorkommen. TLR1, 2, 4, 5, 6 werden als Oberflächenrezeptoren vor allem auf Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert, während TLR3, 7, 8 und 9 im endosomalen Kompartiment lokalisiert sind (Kumar et al. 2009a).
Man kann die TLR phylogenetisch in sechs große Familien unterteilen, jede Familie erkennt eine andere Art der PAMPs (Roach et al. 2005).

1.4.1.1. **TLR1-Familie**

Die TLR1–Familie besteht aus TLR1, TLR2, TLR6 und TLR10. Im Unterschied zu den anderen TLR-Familien, deren TLRs Homodimere bilden, kann in der TLR1–Familie nur TLR2 Homodimere ausbilden. Die anderen TLR (TLR1, TLR6 und TLR10) bilden Heterodimere mit TLR2 aus, um so eine breitere Ligandenspezifität für unterschiedliche Lipoproteine und Lipopeptide zu erreichen (Zahringer et al. 2008). TLR2/1-Heterodimere erkennen Triacyllipopeptide, während TLR2/6-Heterodimere Diacyllipopeptide erkennen (Takeuchi et al. 2001; Takeuchi et al. 2002; Kang et al. 2009). Bei der Detektion von Diacyllipopeptiden durch TLR2/6 scheint CD36, ein Klasse II *Scavanger*-Rezeptor der auf Zellen der angeborenen Immunantwort exprimiert wird, zusätzlich als Co-Rezeptor zu fungieren (Hoebe et al. 2005). Weiterhin kann TLR2 in Assoziation mit Dectin-1, einem strukturell nicht verwandten c-Typ-Lectin, Zymosan (beta1,3-Glucan und beta 1,6-Glucan) detektieren (Gantner et al. 2003). Die Aufgabe von TLR10 ist derzeit nicht abschließend geklärt, doch scheint er, ähnlich wie TLR1, mit TLR2 Heterodimere zu bilden und für die Erkennung von Triacyllipopeptiden verantwortlich zu sein (Guan et al. 2010).

1.4.1.2. **TLR3-Familie**

TLR3 erkennt virale dsRNA sowie das synthetische Analogon zu dsRNA Poly I:C (Alexopoulou et al. 2001).

1.4.1.3. **TLR4-Familie**

TLR4 erkennt mit Hilfe von MD-2 und CD14 (siehe 1.4) Lipopolysaccharid (LPS) Gram-positiver Bakterien (Hoshino et al. 1999; Yang et al. 2000). Außerdem interagiert TLR4 mit Glykoinositolphospholipiden von Trypanosomen sowie verschiedenen endogenen Liganden wie Heparansulfat oder Fibrinogen (Kumar et al. 2009a).

1.4.1.4. **TLR5-Familie**

TLR5 erkennt einen konservierten Abschnitt des Flagellins, eines wichtigen Strukturproteins motiler Bakterien (Hayashi et al. 2001).

1.4.1.5. **TLR7-Familie**

Die Mitglieder der TLR-7 Familie, bestehend aus TLR7, 8 und 9, erkennen ssRNA und ssDNA, wobei TLR7 und 8 ssRNA sowie synthetische Imidazoquinoline wie Imiquimod erkennen (Heil et al. 2004). TLR9 ist vor allem für das Erkennen nicht methylierter CpG-reicher ssDNA zuständig (Hemmi et al. 2000).

1.4.1.6. **TLR11-Familie**

Die TLR11-Familie kommt beim Menschen nur in Form eines Pseudogens vor (Roach et al. 2005). Bei der Maus binden sie Profillin-ähnliche Proteine, eine Klasse Actin-bindender Proteine, die unter anderem in Protozoen wie Toxoplasma gondii vorkommen, an TLR11 (Yarovinsky et al. 2005).

1.4.2. TLR-Aufbau

Die TLR sind Typ1 Membranrezeptoren. Wie auch bei vielen anderen Oberflächen-Rezeptoren bilden sie für die Signalübertragung Dimere aus. Die TLR bestehen aus einer extrazellulären leucin-reichen LRR-Domäne (*leucin-rich-repeat domain*), einer

Transmembran-Domäne und einer zytoplasmatischen TIR-Domäne (Toll/interleukin-1 Rezeptor-Domäne) (Abb.1.2). Die LRR-Ectodomäne der TLR erinnert in der Kristallstruktur an ein Hufeisen. Sie besitzt 16-28 Tandem-Wiederholungen des LRR-Motives, welches für das Erkennen von PAMPs bestehend aus Fetten, Zuckern, Proteinen und Nukleinsäuren zuständig ist (Bell et al. 2003; Matsushima et al. 2007). Die intrazelluläre TIR-Domäne besteht aus etwa 150 Aminosäuren und zeigt hohe Homologie mit der zytoplasmatischen Domäne des Interleukin-1 Rezeptors (O'Neill und Bowie 2007).

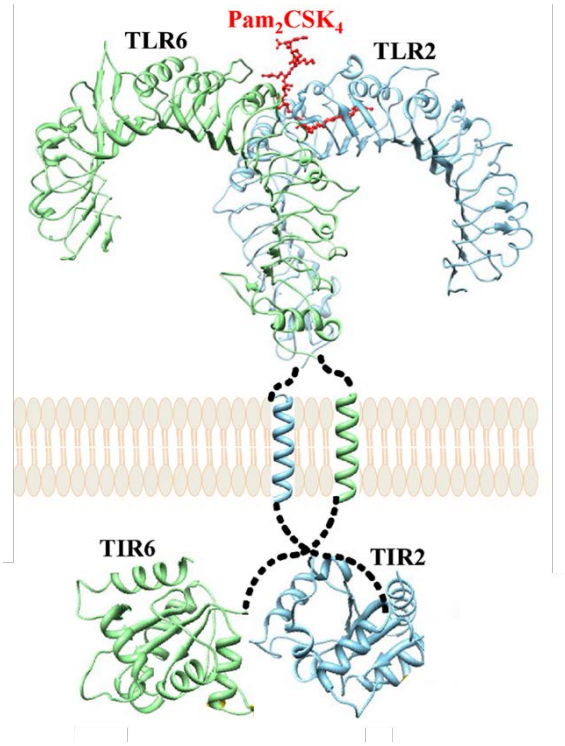

Abb.:1.2: Aufbau eines TLR anhand des TLR2/6 Heterodimers

Die hufeisenförmige LRR-Ectodomäne ist im oberen Bildabschnitt dargestellt. Ebenso die Bindung des Diacyllipopeptids Pam_2CSK_4 (Rot), einem TLR2/6-Agonisten. Die TIR-domäne ist im unteren Bildabschnitt dargestellt (verändert nach Basith et al. 2011).

1.4.3. TLR-Signalkaskaden

Die unterschiedlichen TLR interagieren, nach Ligandenbindung und Dimerisierung über ihre intrazelluläre TIR-Domäne, je nach TLR, mit TIR-Domänen beinhaltenden Adaptermolekülen (Abb.1.3).

TLR5, 7, 9, 11 interagieren direkt mit MyD88 (*myeloid differentiation primary response protein* 88), TLR1, 2, 4, 6 nutzen TIRAP (*TIR- containing adaptor protein*), um mit MyD88 zu interagieren. Während TLR3 direkt an TRIF (*TIR- containing adaptor inducing Interferon beta)*

binden kann, nutzt TLR4 TRAM (*TRIF- related adaptor molecule),* um an TRIF zu binden. Prinzipiell unterscheidet man in der TLR-Signalkaskade einen MyD88-abhängigen- und einen TRIF-abhängigen Signalweg.

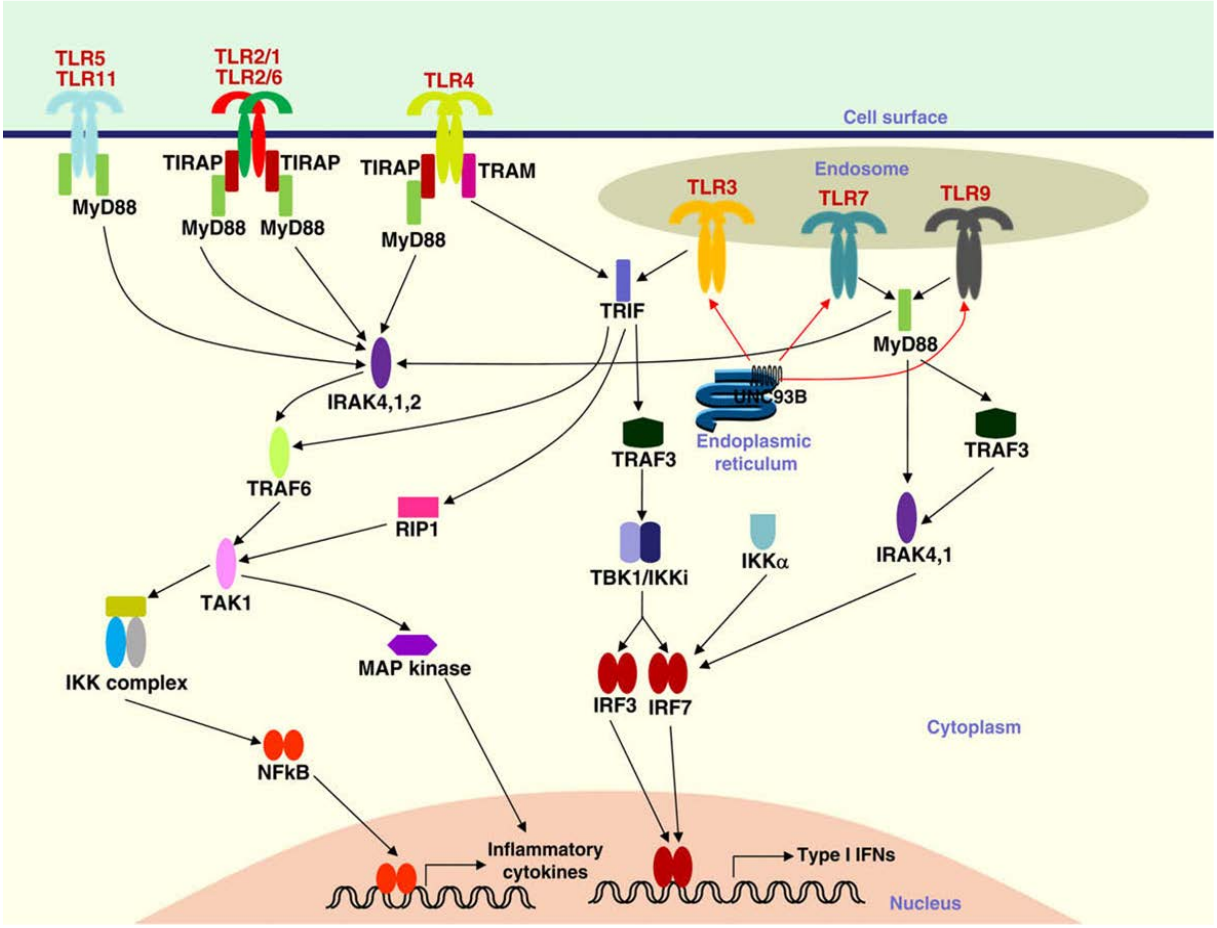

Abb.:1.3: TLR Signalwege in Makrophagen und dendritischen Zellen (Kumar et al. 2009b)

Beim MyD88-abhängigen Signalweg werden die *IL-1 receptor associated kinase* (IRAK) 1, 2, 4 von MyD88 rekrutiert und aktiviert. Initial wird IRAK4 aktiviert, anschließend IRAK1 und 2. Die Kinasen IRAK1 und 2 phosphorylieren und aktivieren so ihrerseits TRAF6 (*TNF receptor associated factor-6*), welcher dann zu einer Aktivierung der Kinase TAK1 (*Transforming growth factor β activated kinase-1*) führt. TAK1 führt dann über MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen)-Signalwege zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 (*activator-protein-1*) oder über den IKK-Komplex (*I-kappa B kinase complex*) zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kappaB (*nuklear factor-kappa B*). Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren führt dann im Zellkern zu verstärkter Transkription proinflammatorischer Zytokine. Um die Transkription von Typ I Interferonen oder IFN-induzierbaren-Genen zu steigern, kann IRAKI auch IRF 7 (*Interferon regulatory factor-7*) phosphorylieren und so aktivieren.

Der TRIF-abhängige Signalweg wird nur von TLR3 und TLR4 genutzt. Aktivierung von TRIF führt einerseits über TRAF3 (*TNF receptor associated factor-3*) zur Aktivierung von TBK1/IKKα, die ihrerseits die Translokation von IRF3 und 7 in den Zellkern induzieren, so dass Typ I-Interferone verstärkt transkribiert werden können. Andererseits kann TRIF über RIP1 (*receptor-interacting protein-1*) oder über TRAF6 TAK1 aktivieren und so zur Aktivierung des IKK-Komplex und des MAPK-Signalweges führen.
(zusammengefasst in Kumar et al. 2009a).

1.5. Macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2)

Eine vielversprechende Substanz zum Einsatz in der Immuntherapie stellt MALP-2 dar. MALP-2 ist ein spezifischer TLR2/6-Agonist, dessen Signalweiterleitung (siehe Abb. 1.3) über MyD88-abhängige Signalwege erfolgt (Takeuchi et al. 2001; Sato et al. 2002). MALP-2 ist ein 2 Kilodalton großes Diacyllipopeptid, das ursprünglich aus Mycoplasma fermentas isoliert wurde (siehe Abb. 1.4). Es handelt sich um ein Diacyllipopeptid, das im Vergleich zu den Triacylglyceriden eine freie NH2-Gruppe besitzt. Der Peptidanteil von MALP-2 besteht aus 14 Aminosäuren (Mühlradt et al. 1997).

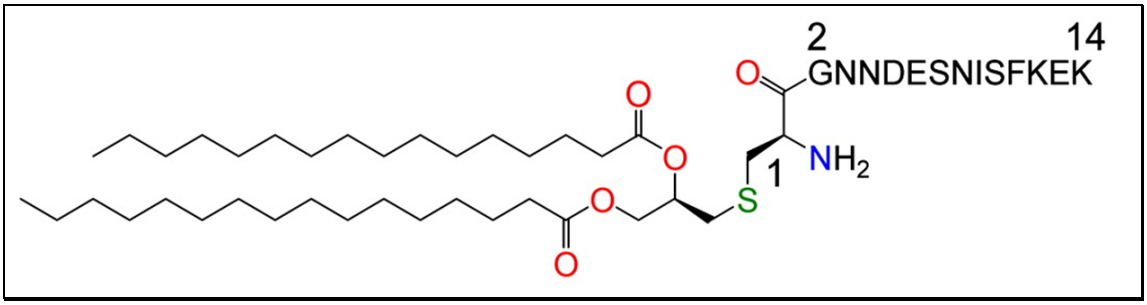

Abb.: 1.4: Struktur von MALP-2 (Jin und Lee 2008)

Seit 1997 kann MALP-2 synthetisch hergestellt werden. Bei der synthetischen Herstellung entstehen aufgrund eines chiralen C-Atoms unterschiedliche Enantiomere, von denen die R-Form eine mehr als 100-fach höhere biologische Aktivität als die S-Form zeigt (Takeuchi et al. 2000).

1.5.1. *In-vivo*- und *in-vitro*-Effekte von MALP-2

TLR2/6 wird vor allem auf Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen, unreifen dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten exprimiert, konnte aber auch auf Zellen, die nicht dem Immunsystem im engeren Sinn zugerechnet werden, beispielsweise Endothelzellen oder Tumorzellen, nachgewiesen werden (Huang et al. 2005; Grote et al. 2010).

Werden Makrophagen *in vitro* mit MALP-2 stimuliert, führt dies zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine wie TNFα, IL-6, IL-8, GROα (CXCL1), MCP-1 (CCL2), MIP-1α (CCL3) und MIP-1ß (CCL4) (Deiters und Mühlradt 1999; Kaufmann et al. 1999), aber auch zur Produktion von Typ I-Interferonen wie IFN-β (Dietrich et al. 2010). Die Ausschüttung dieser Zyto- und Chemokine führt *in vivo* zum Anlocken verschiedener Leukozytenpopulationen (Lührmann et al. 2002a). In Makrophagen wird durch MALP-2-Stimulation die Produktion von Stickstoffmonoxid induziert und so deren antimikrobielle Aktivität gesteigert (Mühlradt et al. 1997; Palma et al. 2009). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass MALP-2 *in vitro* die tumorizide Aktivität von Makrophagen steigern kann (Ruschmeyer et al. 1993).
Stimuliert man neutrophile Granulozyten *in vitro* mit MALP-2, schütten diese IL-8 und MIP-1ß (CCL4) aus. Gleichzeitig wird ihre Phagozytose-Aktivität erhöht und so eine verbesserte Bakterienabwehr erreicht (Wilde et al. 2007). Außerdem wird durch MALP-2-Stimulation der *oxidative burst* (Produkion reaktiver Sauerstoffspezies) neutrophiler Granulozyten verbessert (Wilde et al. 2007), über den die neutrophilen Granulozyten auch in der Lage sind, Melanomzellen zu schädigen (Dissemond et al. 2003; Zivkovic et al. 2007).
Weiterhin kann MALP-2 die Reifung dendritischer Zellen induzieren und ist demnach in die Kommunikation zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem eingebunden (Weigt et al. 2003; Link et al. 2004). Intranasale Applikation von MALP-2 dient als potentes mukosales Adjuvans, das die humorale und die zelluläre Immunantwort verbessern kann (Rharbaoui et al. 2002; Lührmann et al. 2005).

Wird MALP-2 intraperitoneal appliziert, reichen nur wenige Nanogramm aus, um Monozyten/Makrophagen zu stimulieren und die Infiltration von Leukozyten in den Bauchraum auszulösen (Deiters und Mühlradt 1999).
Bei Ratten, in deren Lungen MALP-2 instilliert wird, kommt es bei ähnlich geringen Mengen bereits nach einigen Stunden kompartimentspezifisch zur Einwanderung von Monozyten/Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, T-Lymphozyten, NK-Zellen und

dendritischen Zellen (Lührmann et al. 2002a; Pabst et al. 2009). Durch wiederholte Instillation lässt sich Bronchus- assoziiertes lymphatisches Gewebe stimulieren (Lührmann et al. 2002b). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine lokale Vorstimulation des angeborenen Immunsystems mit MALP-2 die Immunabwehr gegen bakterielle Infekte im Bauchraum (Feterowski et al. 2005) und in der Lunge verbessert (Reppe et al. 2009; Kerber-Momot et al. 2010). So zeigen Nager, die 24h vor experimenteller Induktion einer Pneumonie pulmonal mit MALP-2 instilliert werden, ein verbessertes Gesamtüberleben (Reppe et al. 2009) oder auch eine Reduktion der koloniebildenden Einheiten in der Lunge (Kerber-Momot et al. 2010). Diese Verbesserung der Bakterienabwehr konnte nicht beobachtet werden, wenn MALP-2 erst nach Infektion des Organismus lokal appliziert wurde (Kerber-Momot et al. 2010).

Neben der Verbesserung der Immunabwehr gegen bakterielle Erreger führt MALP-2-Stimulation auch zu einer Steigerung der Angiogenese (Grote et al. 2010), so dass auch Wundheilungsprozesse in diabetischen Mäusen beschleunigt werden können (Deiters et al. 2004).

1.5.2. Antitumorale Wirkung von MALP-2 *in vivo*

In verschiedenen experimentellen Studien wurde *in vivo* eine antitumorale Wirkung von MALP-2 beobachtet. In einem murinen Modell für Methylcholanthren (Meth A)-induzierte Fibrosarkome konnte gezeigt werden, dass MALP-2-Injektion zu einer immunvermittelten, ausgeprägten, hämorrhagischen Nekrose bis hin zur Abheilung der subkutan wachsenden Tumoren führt (Galanos et al. 2000). Es ist bekannt, dass durch Meth A induzierte Tumoren sensibel gegenüber TNFα sind (Haranaka et al. 1986), so dass der Effekt auf das Tumorwachstum vor allem durch die MALP-2-vermittelte TNFα-Induktion zu erklären ist. In einem weiteren murinen Modell für Pankreastumoren konnten Schneider und Mitarbeiter (2004) zeigen, dass durch intratumorale Injektion von MALP-2 das Wachstum syngener PanC02-Zellen (Pankreaskarzinomzellen) reduziert werden kann. Das Gesamtüberleben der MALP-2-behandelten Tiere konnte so, im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren, verlängert werden (Schneider et al. 2004). Dieser Effekt der Immuntherapie mit MALP-2 konnte auch beobachtet werden, wenn MALP-2 mit einer Gemcitabin-basierten Chemotherapie kombiniert wurde (Schneider et al. 2004). Mechanistisch wurde die Induktion der antitumoralen Aktivität auf eine Durchbrechung der tumorinduzierten Immunsuppression zurückgeführt, die zu einer Aktivierung der antitumoralen Aktivität des angeborenen sowie

des adaptiven Immunsystems führte. 16-37 Tage nach intratumoraler MALP-2-Injektion konnte um die Tumoren und in den Tumoren eine deutlich erhöhte Anzahl CD8-positiver T-Lymphozyten und NK-Zellen nachgewiesen werden (Schneider et al. 2004). Die Ergebnisse für das Pankreaskarzinom konnten anhand einer ersten klinischen Phase I/II-Studie auf den Menschen übertragen werden (Schmidt et al. 2007).

Auch für das Mammakarzinom als eigene Tumorentität konnte eine Steigerung der antitumoralen Aktivität des Immunsystems durch MALP-2 gezeigt werden (Shingu et al. 2003). So konnte in der Baumwollratte gezeigt werden, dass durch die intratracheale Applikation von MALP-2 die Bildung pulmonaler Metastasen durch die syngenen MAD106-Zellen (Mammaadenokarzinom-Zelllinie) bei gleichzeitiger Applikation von MALP-2 und Tumorzellen reduziert werden kann. Die Reduktion der Tumorzellen in den mit MALP-2 behandelten Tieren war assoziiert mit einer verstärkten Rekrutierung von Makrophagen und NK-Zellen in der Mikroumgebung der Tumorzellen, so dass eine Aktivierung der tumoriziden Aktivität des angeborenen Immunsystems als Wirkmechanismus der pulmonalen MALP-2 Instillation vermutet werden kann (Shingu et al. 2002; Shingu et al. 2003). Die Wirkung einer pulmonalen Immunstimulation mit MALP-2 auf pulmonale Melanommetastasen wurde bisher nicht untersucht.

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der schlechten Prognose für die Behandlung von Patienten mit metastasierendem Melanom ist die Entwicklung neuer effektiver Therapien von essentieller Bedeutung, hierbei scheinen immuntherapeutische Ansätze vielversprechend.
Erste Untersuchungen zeigten bereits (Shingu et al. 2003; Schneider et al. 2004), dass der TLR-Agonist MALP-2 eine erfolgversprechende Substanz für einen immuntherapeutischen Ansatz zur Behandlung des metastasierenden malignen Melanoms sein könnte.
Für das maligne Melanom existiert ein gut beschriebenes murines Metastasierungsmodell, mit Hilfe dessen die pulmonale Metastasierung syngener B16-F10-Melanomzellen tier-experimentell untersucht werden kann.

In der vorliegenden Arbeit soll überprüft werden, ob durch Aktivierung des pulmonalen Immunsystems durch intratracheale Instillation von MALP-2 die Mikrometastasenbildung zirkulierender Melanomzellen in der Lunge von Versuchstieren vermindert werden kann und somit die Applikation von MALP-2 positive Auswirkungen auf eine Melanomerkrankung im metastasierten Stadium haben könnte.
Im ersten Teil der Arbeit soll hierfür die Aktivierung des pulmonalen Immunsystems nach intratrachealer Instillation von MALP-2 untersucht und auch hinsichtlich ihrer zeitlichen Dynamik charakterisiert werden.
Im zweiten Teil der Arbeit soll die Metastasenbildung durch intravenöse Injektion von B16-F10-Melanomzellen vor und nach pulmonaler Stimulation des angeborenen Immunsystems der Lunge durch MALP-2 *in vivo* und *in vitro* untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Fertiglösungen

2-Propanol (Isopropanol)	Merck
3-Amino-9-ethyl-carbazole	Sigma
Aceton	Merck
BD FACS *Lysing-Solution*	BD
DAPI (5mg/ml)	Merck
Dimethylformid	Merck
DMEM *High-Glucose* (4,5g/l)	PAA Laboratories
EDTA	Roth
EGM (*endothelial cell growth medium*)	PromoCell
Essigsäure (100%)	Merck
Ethanol (100%)	Merck
Faramount	DAKO
Fetal Bovine Serum Gold	PAA
Fluorescent Mounting Medium	DAKO
Formaldehyd (37%)	Merck
H_2O_2 (30%)	Roth
HBSS	GIBCO
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydrogencarbonat	Merck
Ketamin (10%)	Medistar
L-Glutamin (200 nM)	GIBCO
Liberase-Cl-Stammlösung (15mg/ml)	Roche
Lithiumcarbonat	Roth
MALP-2 (1 mg/ml)	Alexis Biochemicals
Mayers Haemalaunlösung	Merck
Methanol (100%)	Merck
NaCl (0,9%)	Diaca
Natrium-Acetat	Roth

Natriumchlorid	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumhydroxid	Merck
Amoniumchlorid	Merck
OCT *Tissue-Tek*	Sakura
Paraformaldehyd	Roth
PBS (steril; mit Ca^{2+} und Mg^{2+})	PAA Laboratories
PBS (steril; ohne Ca^{2+} und Mg^{2+})	PAA Laboratories
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)	GIBCO
Propidiumjodid	Roth
Proteinase K	Roth
RPMI 1640	PAA Laboratories
Salzsäure (37%)	Merck
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories
Xylazin (2%)	Riemser
Xylol	Merck

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

12-Loch-Platte	Greiner bio-one
24-Loch-Platte	Greiner bio-one
96-Loch-Platte	Greiner bio-one
Deckgläser für Immunhistochemie	Thermo scientific
Deckgläser für Immunfluoreszenz	BD
Objektträger (Superfrost-Plus)	Thermo scientific
Plastikkanüle (Vasofix Safety 21G)	Braun
Plastikkanüle (Vasofix Safety 24G)	Braun
Plastikkanüle (Vasofix Safety 27G)	Braun
Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäß (2 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäß (15 ml)	BD Falcon
Reaktionsgefäß (50 ml)	BD Falcon
Skalpellklingen	Bayha GmbH

Spritzen (1 ml)	BD
Spritzen (10 ml)	Braun
Zellkulturflasche (T-75)	Greiner bio-one
Zellsieb (100 µm)	BD Falcon
Zellsieb (40 µm)	BD Falcon

2.1.3. Apparaturen und Hilfsmittel

96-Loch-Plattenleser	Thermo scientific
Brutschrank (HERA Cell 150i)	Thermo scientific
Einbettautomat (Exelsior)	Thermo scientific
FACSCanto II	BD
Feinwaage (Acculab)	Satorius
Fluoreszenzmikroskop (AxioImager.M1)	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 2)	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200)	Zeiss
Infrarotlichtlampe	efbe-Schott
Kaltlichtlampe (Zeiss KL 2500 LCD)	Zeiss
Kamera (Caplio R4)	Ricoh
Kryomikrotom (Leica CM 3050-s)	Leica
Kühltisch (Leica EG 1150C)	Leica
Magnetrührer (MR 1000)	Heidolph Instruments
Medimachine	BD
Megafuge 1.0	Heraeus Sepatech
Multi Gourmet	Braun
Paraffinmikrotom (Leica RM 2235)	Leica
pH-Meter	Mettler Toledo
Scantainer	Scanbur
Vortex-2 Genie	Scientific Industries
Waage (CP 3235)	Satorius
Wasserbad	Memmert
Zellbank (Lamine Air HB 2448)	Heraeus

2.1.4. Fertig zusammengestellte Nachweis-Reagenzien

Biotin-Blocking System (Avidin-Lsg. und Biotin-Lsg.)	DAKO
Cell Titer 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Kit	Promega
Vybrandt CFDA SE Cell Tracer Kit	Invitrogene

2.1.5. Proteine

VCAM-1 Fc-Chimare (10 µg/ml)	R&D Systems

2.1.6. Antikörper

2.1.6.1. Für Immunhistochemie

2.1.6.1.1. Primär-Antikörper

Antigen	Spezies und Speziesspezifität	Klon	Markierung	Isotyp	Firma	Eingesetzte Verdünnung
F4/80	Ratte anti-Maus	Cl:A3-1	nicht markiert	IgG2b	AbD Serotec	1:100
NK-1.1	Maus anti- Maus	PK136	Biotin	IgG2aκ	Biozol	1:50
CD11b	Ratte anti-Maus	M1/70.15	nicht markiert	IgG2b	Immunotools	1:100
CD8	Ratte anti-Maus	53-6.8	nicht markiert	IgG2aκ	BD Pharmingen	1:25
CD4	Ratte anti-Maus	RM4-5	nicht markiert	IgG2aκ	BD Pharmingen	1:50
CD19	Ratte anti-Maus	1D3	nicht markiert	IgG2aκ	BD Pharmingen	1:100
Gr1	Ratte anti-Maus	RB6-8C5	nicht markiert	IgG2bκ	BD Pharmingen	1:25
CD106	Ratte anti-Maus	429	nicht markiert	IgG2aκ	BD Pharmingen	1:200
CD54	armenischer Hamster anti-Maus	300	nicht markiert	IgG1κ	BD Pharmingen	1:100
Isotyp-Kontrolle	Ratte	I4131	nicht markiert	IgG2b	Sigma	1:500

2.1.6.1.2. Sekundär-Antikörper

Antigen	Spezies und Speziesspezifität	Klon	Markierung	Isotyp	Firma	Eingesetzte Verdünnung
Anti-Ratte	Kaninchen anti-Ratte, Maus-absorbiert	Polyklonal	Biotin	IgG (H+L)	Vector/ Linaris	1:100
Anti-Hamster	Ziege anti-Hamster, Maus-absorbiert	Polyklonal	Biotin	IgG (H+L)	Vector/ Linaris	1:500

2.1.6.1.3. Tertiär-Reagenz

Name	Konjugierte Peroxidase	Firma	Eingesetzte Verdünnung
Streptavidin-Peroxidase Konjugat (HRP)	Meerrettich-Peroxidase	Vector/Linaris	1:500

2.1.6.2. Für Fluoreszenzimmunhistochemie an HUVECs

	Antigen	Spezies und Speziesspezifität	Markierung	Isotyp	Firma	Eingesetzte Verdünnung
Primär-Antikörper	CD106	Maus anti-Human	nicht markiert	IgG (H+L)	Immunotools	1:100
Sekundär-Antikörper	Anti-Maus	Ziege anti-Maus	FITC	$F(ab)_2$	Dako	1:100
Isotyp-Kontrolle	Anti-Ratte	Maus anti-Ratte	FITC	IgG	Immunotools	1:100

2.1.6.3. Für FACS

2.1.6.3.1. Fluoreszenzmarkierte Primär-Antikörper

Antigen	Spezies und Speziesspezifität	Klon	Markierung	Isotyp	Firma
NK-1.1	Ratte anti-Maus	PK136	PE	IgG2a	Immunotools
CD11b	Ratte anti-Maus	M1/70.15	FITC	IgG2b	Immunotools
CD11b	Ratte anti-Maus	M1/70.15	PE	IgG2b	Immunotools
CD4	Ratte anti-Maus	PJP6	FITC	IgG2aκ	Immunotools
CD4	Ratte anti-Maus	H129.19	PE	IgG2aκ	BD Pharmingen
Gr-1	Ratte anti-Maus	RB6-8C5	FITC	IgG2b	Immunotools
CD8	Ratte anti-Maus	YTS169.4	PE	IgG	AbDSerotec
Isotyp-Kontrolle	Ratte	TBE15	FITC	IgG2bκ	Immunotools
Isotyp-Kontrolle	Ratte	TBE15	PE	IgG2bκ	Immunotools
CD54	Ratte anti-Maus	YN1/1.7.4	FITC	IgG2bκ	eBioscience
CD31	Ratte anti-Maus	390	APC	IgG2aκ	eBioscience
CD106	Ratte anti-Maus	429	FITC	IgG2aκ	eBioscience

2.1.6.3.2. Unmarkierte Primär-Antikörper

Antigen	Spezies und Speziesspezifität	Klon	Markierung	Isotyp	Firma
CD16/CD32	Ratte anti-Maus	2.4G2	nicht markiert	IgG2bκ	BD Pharmingen
CD11a	Ratte anti-Maus	2D7	nicht markiert	IgG2aκ	BD Pharmingen
CD29	Ratte anti-Maus	9EG7	nicht markiert	IgG2aκ	BD Pharmingen
CD49d	Ratte anti-Maus	R1-2	nicht markiert	IgG2aκ	BD Pharmingen
Isotyp-Kontrolle	Ratte anti-Maus	I4131	nicht markiert	IgG2b	Sigma

2.1.6.3.3. **Fluoreszenzmarkierte Sekundär-Antikörper**

Antigen	**Spezies und Speziesspezifität**	**Klon**	**Markierung**	**Isotyp**	**Firma**
Anti-Ratte	Ziege anti-Ratte	-	PE	IgG (H+L)	Caltag

2.1.6.4. **Für *in-vitro*-Adhäsionsassay**

Antigen	**Spezies und Speziesspezifität**	**Klon**	**Markierung**	**Isotyp**	**Firma**	**Eingesetzte Verdünnung**
CD106	Ratte anti-Maus	429	nicht markiert	IgG2aκ	BD Pharmingen	1:200

2.1.7. Zellkultur-Nährmedien

DMEM-Zellkulturmedium:	500 ml	DMEM *High-Glucose* (4,5 g/l)
	5 ml	Penicillin/Streptomycin (10.000 Units/ml)
	50 ml	FBS
	5 ml	200mM L-Glutamin
RPMI-Zellkulturmedium:	500 ml	RPMI-Medium
	50 ml	FBS
	5 ml	Penicillin/Streptomycin
	5 ml	Glutamin (200 mM)
EGM-Zellkulturmedium	500 ml	EGM (*endothelial cell growth medium*)
	50 ml	FBS

2.1.8. Puffer und Lösungen

2.1.8.1. **Für tierexperimentelle Arbeiten**

MALP-2-Lösung:	0,5 µl	MALP-2 (1 mg/ml)
	29,5 µl	0,9% NaCl
Xylazin/Ketamin –Mischung:	0,8 ml	2% Xylazin
	1,2 ml	10% Ketamin
	8 ml	0,9% NaCl
OCT/PBS-Lösung:	5 ml	OCT
	5 ml	PBS

2.1.8.2. **Für Immunhistochemie**

Li_2CO_3- Lösung:	500 ml	A. bidest.
	mit Li_2CO_3 auffüllen bis die Lösung mit Li_2CO_3 gesättigt ist	
10x PBS:	400 g	NaCl
	10 g	KCl
	72 g	Na_2HP0_4 +$2H_20$
	10 g	KH_2PO_4
	ad 5.000 ml	A. bidest.
	pH auf 7,2 einstellen, autoklavieren	
1xPBS:	100 ml	10x PBS
	900 ml	A. bidest.
	pH auf 7,3 einstellen	
3% H_2O_2 in PBS:	20 ml	30% H_2O_2
	ad 200 ml	1x PBS

3,7% Formalinlösung:	100 ml	37% Formaldehyd
	900 ml	1x PBS
4% Formalinlösung:	108 ml	37% Formaldehyd
	896 ml	1x PBS
AEC-Färbereagenz:	80 mg	3-Amino-9-ethyl-carbazol
	10 ml	DMF
	190 ml	0,1 M Acetatpuffer
	200 µl	30% H_2O_2 zum Starten der Reaktion
	rühren bis leichte Ausflockung Auftritt, danach mit Filterpapier filtrieren (immer frisch ansetzen!)	
0,1 M Acetatpuffer:	100 ml	0,2 M Acetatpuffer
	100 ml	A.bidest.
0,2 M Acetatpuffer:	250 ml	0,2 M Essigsäure
	750 ml	0,2 M Na-Acetat-Lösung
	1 Monat bei RT lagerungsfähig	
0,2 M Essigsäure:	2,88 ml	konz. Essigsäure (18M)
	ad 250 ml	H_2O
0,2 M Na-Acetat-Lösung:	20,4 g	Na-Acetat
	ad 750 ml	H_2O
4% PFA:	40 g	PFA
	900 ml	1x PBS
	2 ml	4N NaOH
	auf 40°C erwärmen bis Lösung klar ist	
	pH auf 7,4 einstellen	
	ad 1.000 ml	1x PBS
	Lagerung bei -20°C	

Citratpuffer pH 6,0:	1,8 ml	Stammlösung A (0,1 M)
	8,2 ml	Stammlösung B (0,1 M)
	90 ml	A. dest.
	pH auf 6,0 einstellen	
Stammlösung A (0,1 M):	21,01 g	Zitronensäure
	1000 ml	A. dest.
	Lagerung bei +4°C	
Stammlösung B (0,1 M):	29,41 g	Natrium-Dihydrat
	100 ml	A. dest.
	Lagerung bei +4°C	
Proteinase K-Lösung (10 µg/µl):	100 mg	Proteinase K
	10 ml	A. bidest.
	Lagerung bei -20°C	
Proteinase K-Lösung (80 µg/ml):	2 µl	Proteinase K-Lösung (10 µg/µl)
	248 µl	Tris-EDTA-Puffer
Tris-EDTA-Puffer:	1,21 g	Tris
	0,372 g	EDTA
	1000 ml	H_2O
	pH auf 8,0 einstellen	
	Lagerung bei +4°C	
0,1 M Tris-Puffer	12,1 g	Tris
	1000 ml	H_2O
	pH auf 7,4 einstellen	

Zink-Lösung:	0,5 g	Calziumacetat
	5,0 g	Zinkacetat
	5,0 g	Zinkchlorid
	1000 ml	0,1 M Tris-Puffer
	Lagerung bei RT	
Blockpuffer:	1xPBS	
	+ 5% FCS	
	+ 5% Serum der Spezies des Sekundär-Ak	

2.1.8.3. **Für FACS**

FACS-Puffer:	1xPBS	
	+ 5% FCS	
Propidiumjodid-Lösung:	50 µg	Propidiumjodid
	1 ml	PBS
NH_4Cl–Puffer (Lysispuffer)	18,18 g	NH_4Cl
	2,00 g	$KHCO_3$
	74,5 mg	EDTA
	ad 2000 ml	A. dest.
BD-Lysepuffer:	1 ml	BD FACS *Lysing-Solution*
	9 ml	A. bidest.
Liberase-Cl-Lösung (1mg/ml):	1,4 ml	HBSS
	100 µl	Liberase-Cl-Stammlösung

2.1.8.4. **Für Fluoreszenz-Immunhistochemie**

DAPI-Färbelösung:	1 µl	DAPI (5mg/ml)
	1 ml	1x PBS

Blockpuffer:	1xPBS
	+ 5% FCS
	+ 5% Serum der Spezies des Sekundär-Ak

2.1.9. Software

Photoshop	Adobe
Excel	Microsoft
GraphPad Prism	GraphPad Software
FACSDiva Version 6.1.2	BD

2.2. Methoden

2.2.1. Tierexperimentelle Arbeiten

2.2.1.1. Versuchstiere und Tierhaltung

Für die Versuche wurden Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6J verwendet. Die Versuchstiere wurden aus der Brutkolonie des zentralen Versuchstierlabors der Medizinischen Fakultät Göttingen (Deutschland) bezogen. Die Tierhaltung erfolgte in einem Scantainer (Scanbur, Dänemark) unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 h, mit Futter und Frischwasser *ad libitum.* Zum Zeitpunkt der Versuche waren die Tiere zwischen 8 und 12 Wochen alt. Die Tierversuchsgruppen waren in Bezug auf Geschlecht und Alter der Tiere angeglichen. Das Tierversuchsvorhaben war behördlich durch die niedersächsische Landesregierung genehmigt (Amtliche Tierversuchsnummer: 33.14.42502-04-099/09).

2.2.1.2. Intraperitoneale Narkose

Um die Mäuse zu betäuben, wurde ihnen im Zwangsgriff eine Mischung aus Xylazin und Ketamin intraperitoneal injiziert. Generell werden bei Mäusen und Ratten 5-15 mg/kg Körpergewicht Xylazin sowie 50-200 mg/kg Körpergewicht Ketamin eingesetzt. Pro 10 g Körpergewicht wurden 0,05 ml der Xylazin/Ketamin–Mischung verabreicht. Dies entspricht 8 mg/kg Körpergewicht Xylazin und 60 mg/kg Körpergewicht Ketamin.

2.2.1.3. Intratracheale MALP-2-Instillation

Die intratracheale Instillation wurde unter Narkose durchgeführt. Die narkotisierten C57BL/6J-Mäuse wurden mit den Vorderzähnen an ein Gummiband gehängt und auf eine schiefe Ebene gelegt. Der Strahler einer Kaltlichtlampe wurde unter dem Kehlkopf der Maus in Position gebracht, um die für die Instillation notwendigen Lichtverhältnisse zu schaffen.

Der Mund der Maus wurde geöffnet, die Zunge vorsichtig mit einer Pinzette zur Seite gezogen, so dass der Blick auf den Kehldeckel frei war. Unter Sicht wurde eine 24G-Plastikkanüle mit Führungsstab in den Rachen des Tieres eingeführt. Durch leichtes Tangieren des Kehldeckels mit dem Führungsstab wurde dieser reflektorisch zurückgeklappt, so dass der Blick auf die Stimmlippen frei war. Der Führungsstab wurde in die Luftröhre eingeführt, die Plastikkanüle vorgeschoben und der Führungsstab entfernt. Durch die Plastikkanüle wurden anschließend 30 µl MALP-2-Lösung mit Hilfe einer Pipette instilliert,

gefolgt vom gleichen Volumen Luft. Als Vehikelkontrolle dienten 30 µl 0,9% NaCl. Die Markierung der Tiere erfolgte durch Ohrstanzen.
Nach der Instillation standen die Tiere bis zum vollständigen Erwachen unter Beobachtung. Um ein Auskühlen der Versuchstiere unter der Narkose zu vermeiden, wurden sie bis zum vollständigen Erwachen bei 37°C auf einer Wärmeplatte gelagert. Nach Erwachen aus der Narkose wurden die Tiere wieder in Käfigen zusammengesetzt.

2.2.1.4. **Präparation der Lunge**

Nach intraperitonealer Narkose (2.2.1.2) wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Die Fixierung erfolgte mit Hilfe von Injektionskanülen auf einer Styroporplatte. Brust- und Bauchfell wurden mit 70% Ethanol benetzt, um die Verteilung von Körperhaaren zu vermeiden. Mittels einer Schere wurden Bauch- und Brusthaut entfernt. Um Blut aus der Lunge zu entfernen, wurde die linke Nierenarterie sowie die linke Nierenvene durchtrennt. Anschließend wurde der rechte Ventrikel des Herzens mit 5 ml PBS perfundiert.
Der Brustkorb wurde mit der Schere eröffnet, die Lunge vorsichtig aus dem Brustraum entfernt, Herz, Thymus und Speiseröhre abpräpariert. Anschließend wurden Blutreste an der Lunge durch zweimaliges kurzes Eintauchen in PBS entfernt, die überschüssige Flüssigkeit wurde abgetupft. Die Lunge konnte im folgenden für weitere Versuche verwendet werden.
Für die histologische Immunquantifizierung (2.2.3.4) und histologische Darstellung endothelialer Adhäsionsmoleküle (2.2.3.5) sowie für die histologische Auswertung der Kurzzeit-Metastasierungsexperimente (2.2.1.7) war es wichtig, ein vergleichbares Volumen der unterschiedlichen Lungen sicherzustellen. Eine gute Gewebeerhaltung und ein reproduzierbares Alveolarvolumen wurde durch intratracheale Instillation einer OCT/PBS-Lösung erreicht. Hierzu wurde vor der Eröffnung des Brustkorbs der Hals freipräpariert, die Speicheldrüse entfernt und die Trachea mit einer 24G-Kanüle punktiert. Über die Kanüle wurde die Lunge langsam mit 0,8 ml OCT/PBS-Lösung gefüllt. Anschließend erfolgte die Präparation der Lunge wie oben beschrieben.

2.2.1.5. **Intravenöse Injektion muriner Melanomzellen**

Für die Versuche zur pulmonalen Metastasierung (2.2.1.6) und Kurzzeit-Metastasierung (2.2.1.7) wurden den C57BL/6J-Mäusen Einzelzell-Suspensionen der B16-F10-Melanomzellen oder GFP-B16-F10-Melanomzellen über die laterale Schwanzvene injiziert.
Vor der intravenösen Injektion von B16-F10-Melanomzellen wurden die Mäuse für ca. 10 min mit einer Infrarotlampe bestrahlt, um die Hautdurchblutung zu fördern und so die Venen

des Schwanzes zu erweitern. Die Tiere wurden mit Hilfe einer Zwangsröhre fixiert. Mittels einer 27G-Kanüle wurde die laterale Schwanzvene punktiert. Für die Metastasierungsversuche (2.2.1.6) wurden pro Tier $2{,}5x10^5$ B16-F10-Melanomzellen in einem Volumen von 150 µl PBS injiziert. Für die Kurzzeit-Metastasierung (2.2.1.7) wurden $1x10^6$ GFP markierte B16-F10-Melanomzellen in einem Volumen von 150 µl PBS injiziert.

2.2.1.6. Versuche zur pulmonalen Metastasierung unter pulmonaler MALP-2-Stimulation

Zur Untersuchung der pulmonalen Metastasierung von Melanomzellen existiert ein bereits seit Jahren gut etabliertes syngenes Modell. Hierbei werden Zellen der Melanomzelllinie B16-F10 in die laterale Schwanzvene von Mäusen des Stammes C57BL/6J injiziert (2.2.1.5). Die Melanomzellen der Line B16-F10 haben die Eigenschaft, besonders in der Lunge zu adhäerieren und dort Metastasen zu bilden (Fidler 1973). Bereits 14 Tage nach Injektion von B16-F10-Melanomzellen sind die Metastasen zu einer Größe herangewachsen, die makroskopisch gut auf der Lungenoberfläche zu erkennen ist, ohne dass die einzelnen Metastasen bereits konfluieren. Nach 14 Tagen Wachstum der Metastasen bestehen für das Versuchstier in der Regel noch keine physiologischen Beeinträchtigungen unter den Haltungsbedingungen.

Die Untersuchung der Wirkung der pulmonalen Immunstimulation durch MALP-2 auf die pulmonale Metastasierung von i.v. injizierten B16-F10-Melanomzellen erfolgte durch drei verschiedene Versuchsansätze, die im folgenden erläutert werden.

Die Versuche wurden an 8-12 Wochen alten männlichen C57BL/6J-Mäusen durchgeführt. In jeder Versuchsgruppe waren mindestens 5 Tiere. Am Tag der Tumorzellinjektion (Tag 0) wurden die Tiere gewogen, und es erfolgte die Injektion von $2{,}5x10^5$ B16-F10-Melanomzellen über die laterale Schwanzvene (2.2.1.5).

Die Stimulation des pulmonalen Immunsystems durch intratracheale Instillation mit MALP-2-Lösung oder 0,9% NaCl als Vehikelkontrolle (2.2.1.3) erfolgte nach folgenden Schemata:

Eine Gruppe wurde 24 h <u>vor</u> Tumorzellinjektion mit 30µl MALP-2-Lösung instilliert (0,5 µg MALP-2). Der Kontrollgruppe wurde 30 µl 0,9% NaCl instilliert.

Die zweite Gruppe wurde 24 h <u>nach</u> Tumorzellinjektion mit 30 µl einer MALP-2-Lösung instilliert (0,5 µg MALP-2). Tieren der Kontrollgruppe wurden jeweils 30 µl 0,9% NaCl instilliert.

Die dritte Gruppe wurde 24 h und 8 Tage nach Tumorzellinjektion mit 30 µl einer MALP-2-Lösung instilliert (0,5 µg MALP-2). Der Kontrollgruppe wurden jeweils 30 µl 0,9% NaCl instilliert.

Vierzehn Tage nach Tumorzellinjektion (Tag 14) wurden die Tiere narkotisiert (2.2.1.2) und mittels zervikaler Dislokation getötet. Die Lungen wurden präpariert (2.2.1.4), anschließend gewogen und mit Hilfe einer Digitalkamera (Caplio R4, Ricoh) photographiert. Mit Hilfe einer Lupe wurde die Anzahl der oberflächlich sichtbaren Metastasen der gesamten Lunge ausgezählt. Anschließend wurde die Lunge geteilt. Der rechte Lungenflügel wurde für 24 h in 4% PFA fixiert und dann in Paraffin eingebettet (2.2.3.2). Der linke Lungenflügel wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.2.1.7. **Kurzzeit-Metastasierung**

Zur Untersuchung des frühen Schicksals von B16-F10-Melanomzellen in den ersten Stunden nach Injektion in ein mittels intratrachealer MALP-2-Instillation vorstimuliertes System, erfolgte die Untersuchung des pulmonalen Tumorzellarrests 1 h und 5 h nach Tumorzellinjektion.

Um zu diesen frühen Zeitpunkten die Menge der in der Lunge adhärenten B16-F10-Zellen quantifizieren zu können, wurden mit *Green fluorescent Protein* (GFP) stabil transfizierte und somit fluoreszenzmarkierte B16-F10-Melanomzellen verwendet (GFP-B16-F10). Durch die neu gewonnene Fluoreszenzeigenschaft konnte die Abgrenzbarkeit der einzelnen Tumorzellen vom umliegenden Lungengewebe sichergestellt werden. Die Herstellung der GFP-B16-F10-Melanomzellen wurde bereits beschrieben (Erpenbeck et al. 2010).

24 h vor Tumorzellinjektion wurden die Mäuse mit 0,5 µg MALP-2 oder 0,9% NaCl als Vehikelkontrolle instilliert (2.2.1.3). Dann wurden $1x10^6$ GFP-B16-F10-Zellen über die laterale Schwanzvene injiziert (2.2.1.5). 1 h und 5 h nach Tumorzellinjektion wurden die Versuchstiere mittels zervikaler Dislokation getötet. Die Lungen wurden wie unter 2.2.1.4 beschrieben mit 0,8 ml OCT /PBS-Lösung gefüllt.

Der linke Lungenlappen wurde schockgefroren (2.2.3.2) und für die fluoreszenzmikroskopische Auswertung verwendet. Für die fluoreszenzmikroskopische Auswertung wurden Gefrierschnitte einer Dicke von 10 µm verwendet. Die Schnitte wurden für 10 min mittels 3,7% Formaldehyd fixiert und anschließend dreimal kurz in Leitungswasser gewaschen. GFP-B16-F10-Melanomzellen wurden durch ihre Fluoreszenzeigenschaften im FITC-Kanal detektiert. Die fluoreszenzmikroskopische

Auswertung (Zeiss, AxioImager.M1) erfolgte, indem pro Schnitt 10 Gesichtsfelder bei einer 20x Vergrößerung ausgezählt wurden. Pro Tier wurden 5 verschiedene Gefrierschnitte ausgewertet. Zwischen den Gefrierschnitten wurde ein Mindestabstand von 50 µm eingehalten.
Die Lappen der rechten Lunge wurden zu einer Einzelzellsuspension verdaut (2.2.2.1.5) und für die durchflusszytometrische Untersuchung mittels FACS (2.2.2.5.1) verwendet.

2.2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.2.1. Zellkultur und Zellpräparation

2.2.2.1.1. B16-F10-Melanomzellen

B16-F10-Melanomzellen wurden in T75-Zellkulturflaschen mit 20 ml DMEM-Zellkulturmedium bei 37°C und 5%CO_2/95%O_2 inkubiert und regelmäßig lichtmikroskopisch auf Verunreinigung und Zelldichte kontrolliert. Kurz vor Erreichen der Konfluenz wurden die B16-F10-Tumorzellen im Verhältnis 1:5 passagiert. Eine mögliche Verunreinigung der Zellkulturen mit Mykoplasmen wurde regelmäßig mittels Mykoplasmen-PCR ausgeschlossen.

2.2.2.1.2. HUVEC

HUVEC-Zellen (*human umbilical vein endothelial cells*) wurden in T75-Zellkulturflaschen mit 20 ml EGM-Zellkulturmedium bei 37°C und 5%CO_2/95%O_2 inkubiert und regelmäßig lichtmikroskopisch auf Verunreinigung und Zelldichte kontrolliert. Kurz vor Erreichen der Konfluenz wurden die HUVEC-Zellen im Verhältnis 1:6 passagiert. Eine mögliche Kontamination der Zellkultur durch Mykoplasmen wurde mittels Mykoplasmen-spezifischer PCR ausgeschlossen.

2.2.2.1.3. Passagieren der Zelllinien

Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und verworfen, die T75-Zellkulturflaschen wurden mit 10 ml PBS (ohne Mg^{2+} und Ca^{2+}) gespült. Die enzymatische Ablösung der Zellen erfolgte nach Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C für 2 min. Durch Zugabe von 12 ml DMEM-Zellkulturmedium (B16-F10) oder 12 ml EGM-Zellkulturmedium (HUVEC), erfolgte die Inaktivierung des Trypsins. Die Zellen wurden durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert und in ein 15-ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Bestimmung der Menge vitaler Zellen in einer Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen durch 5 min

Zentrifugation bei 1200 Upm pelletiert und je nach Endkonzentration in dem gewünschten Volumen Zellkulturmedium resuspendiert.

2.2.2.1.4. **Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität**

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte mit Hilfe des Trypanblau-Ausschlusstests, indem 10 µl Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau-Lösung vermischt wurden. Vitale Zellen können den Farbstoff ausschließen, während tote Zellen blau angefärbt werden. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer- Zählkammer.

2.2.2.1.5. **Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Lungengewebe**

Die präparierten Lungenlappen (2.2.1.4) wurden mit einer Rasierklinge in kleine Stücke zerschnitten und anschließend in einem Loch einer 24-Loch-Platte in 1 ml einer Liberase-Cl-Lösung verdaut. Die Verdauung erfolgte bei 37°C in Anwesenheit eines Gasgemisches 5%CO_2/95%O_2 für 90 min. Anschließend wurden die Zellen durch langsames Auf- und Abpipettieren mit einer 1.000 ml Pipette resuspendiert. Größere Gewebebrocken wurden entfernt, indem die Zellsuspension durch ein 100 µm Zellsieb in ein 15 ml Reaktiongefäß filtriert wurde. Anschließend wurde das Zellsieb mit 2 ml warmer (37°C) *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS) nachgespült. Die Suspension wurde mit warmem HBSS auf 15 ml aufgefüllt. Durch Zentrifugation für 5 min bei 1.600 Upm wurden die Zellen erneut pelletiert. Die hypotone Erythrozytenlyse erfolgte mittels Zugabe von 3 ml BD-Lysepuffer unter vortexen. Nach 45 sek wurde die Lyse durch Zugabe von 10 ml HBSS beendet. Zelltrümmer wurden dekantiert und der Überstand erneut durch ein 100 µm Zellsieb gegeben. Die Suspension wurde mit HBSS auf 15 ml aufgefüllt. Durch Zentrifugation für 7 min bei 1.100 Upm wurden die Zellen erneut pelletiert und mit 500 µl PBS mit 5% FBS resuspendiert.
Die so gewonnene Einzelzellsuspension aus Lungengewebe wurde anschließend nach Bedarf aliquotiert und direkt für weitere Versuche verwendet.

2.2.2.1.6. **Gewinnung von murinen Lymphozyten aus der Milz**

Um Lymphozyten aus der Milz für den *in vitro Killing-Assay* (2.2.2.3) zu gewinnen, wurden C57BL/6J-Mäuse nach Narkose mit Xylazin /Ketamin (2.2.1.2) durch zervikale Dislokation getötet. Die Bauchhöhle wurde operativ eröffnet und die Milz entnommen. Anschließend erfolgte die mechanische Separation in eine Einzelzellsuspension. Die Milz wurde hierfür mit

3 ml RPMI-Kulturmedium (4°C) in eine 12-Loch-Platte gegeben und mit dem Stempel einer 10 ml Spritze zerrieben. Anschließend wurde die Suspension durch ein 100 µm Zellsieb filtriert. Das Sieb wurde mit 2 ml RPMI-Kulturmedium (4°C) nachgespült. Die gewonnene Einzelzellsuspension wurde anschließend für 10min bei 1.200 Upm (4°C) pelletiert und der Überstand dekantiert. Die chemische Lyse der Erythrozyten erfolgte, indem das Pellet durch leichtes Klopfen resuspendiert und mit 5 ml NH_4Cl–Puffer für 10 min auf Eis unter mehrmaligem Schwenken inkubiert wurde. Nach 10min wurde die Lyse durch langsame Zugabe von 35 ml RPMI-Kulturmedium (4°C) abgestoppt. Die Zellen wurden durch erneutes Zentrifugieren (10 min, 1.200 Upm bei 4°C) pelletiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in 10 ml RPMI-Kulturmedium (37°C) resuspendiert. Die Zellzahl wurde in einer Neubauerkammer bestimmt (2.2.2.1.4). Die Vitalität der Zellen wurde mittels Trypanblau überprüft und lag >95% (2.2.2.1.4). Die Zellen wurden in der gewünschten Konzentration direkt für den *in vitro Killing-Assay* eingesetzt (2.2.2.3).

2.2.2.1.7. **Gewinnung muriner Immunzellen aus dem Peritonealraum von Mäusen vor und nach MALP-2-Stimulation**

Zur Gewinnung muriner Immunzellen aus der Peritonealflüssigkeit von Mäusen vor oder nach MALP-2-Stimulation wurde den C57BL/6J-Mäusen jeweils 3 µg MALP-2 (stimulierte Gruppe) in einem Geamtvolumen von 1 ml 0,9% NaCl intraperitoneal injiziert. Als Vehikelkontrolle wurde 1 ml 0,9% NaCl (Kontrollgruppe) injiziert. Die Injektion erfolgte im Zwangsgriff. 24 h nach Injektion erfolgte die Isolation der peritonealen Immunzellen.

Um chemische Irritationen vor Isolation der Immunzellen durch intraperitoneale Narkose zu vermeiden, wurden die Tiere durch CO_2-Narkose betäubt und anschließend mittels zervikaler Dislokation getötet. Die Bauchhaut wurde abpräpariert, so dass der Blick auf die intakte Bauchwand frei war. Unter Schonung von Gefäßen wurde mit Hilfe einer 21G-Kanüle 5 ml zimmerwarmes PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) injiziert. Zum Spülen wurde der Bauch des toten Tieres für ca. 10 sek massiert, anschließend wurde die Flüssigkeit abgesaugt und der Bauchraum erneut mit 5 ml PBS gespült. Die peritoneale Spülflüssigkeit von jeweils zwei Tieren wurde zusammengeführt und anschließend für 10 min bei 1.100 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig in 10 ml PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde zweimal wiederholt und das Pellet anschließend in 7 ml RPMI-Medium resuspendiert.

Die Zellzahl wurde in einer Neubauerkammer bestimmt (2.2.2.1.4). Die Vitalität der Zellen wurde mittels Trypanblau überprüft und lag >95%. Die so gewonnenen Zellen wurden sofort für die Untersuchung der zellvermittelten Zytotoxizität verwendet (2.2.2.3).

2.2.2.1.8. **CFDA SE-Markierung von adhärenten Zellen**

Die Fluoreszenzmarkierung von B16-F10-Melanomzellen für den FACS basierten Killing-Assay sowie für Adhäsionsassays wurde mittels Vybrandt CFDA SE Cell Tracer Kit (Invitrogene) durchgeführt. Einzelne Zellpopulationen können so in einem komplexen Gemisch verschiedener Zellpopulationen exakt identifiziert werden. CFDA SE (**C**arboxy**f**luorescein **d**i**a**cetate **s**uccimidyl**e**ster) ist ein farbloses und nicht fluoreszierendes Molekül, das passiv in Zellen diffundieren kann. Im Zytosol werden durch intrazelluläre Esterasen Acetatgruppen abgespalten, so dass ein stark fluoreszierender Amin-reaktiver Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester entsteht. Die Succinimidyl-Ester-Gruppe kann nun mit intrazellulären Aminen reagieren und so in den Zellen fixierte Fluoreszenzkonjugate bilden. Auf diese Weise markierte Zellen haben je ein Fluoreszenzmaximum bei 492 nm und 517 nm. Die Fluoreszenzmarkierung ist für viele Tage stabil und wird bei Teilung der Zellen auf die Tochterzellen übertragen.

Die B16-F10-Melanomzellen wurden in T75-Flaschen bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Das Kulturmedium wurde entfernt und 5 ml vorgewärmtes (37°C) 2 µM CFDA SE in PBS zugegeben. Nach 15 min Inkubation bei 37°C und 5%CO_2/95%O_2 wurde die Flüssigkeit abgesaugt und durch 10 ml RPMI-Zellkulturmedium ersetzt. Die Zellen wurden erneut für 30 min bei 37°C + 5%CO_2/95%O_2 inkubiert (Acetat-Hydrolyse). Anschließend wurden die CFDA SE markierten B16-F10-Melanomzellen (CFSE-B16-F10-Melanomzellen) wie unter 2.2.2.1.3 beschrieben abtrypsiniert und gewaschen. Die markierten B16-F10-Melanomzellen wurden anschließend für den *in-vitro-Killing-Assay* (2.2.2.3) sowie für den *in-vitro*-Adhäsionsassay (2.2.2.4) verwendet.

2.2.2.2. **Proliferationsassay (MTT)**

Die Proliferation von B16-F10-Melanomzellen wurde unter Stimulation mit verschiedenen MALP-2 Konzentrationen mittels *CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega) bestimmt. In lebenden Zellen wird der wasserlösliche Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan umgewandelt. Die Menge des gebildeten Formazans kann

anschließend photometrisch bestimmt werden; sie korreliert mit der Anzahl vitaler Zellen. $5x10^3$ B16-F10-Zellen wurden pro Loch einer 96-Loch-Platte in DMEM-Kulturmedium ausgesäht. Anschließend wurden die Zellen mit unterschiedlichen Endkonzentrationen MALP-2 bei 37°C und 5%CO_2/95%O_2 inkubiert. Nach 72 h Proliferationszeit wurden pro Loch 15 µl *Dye-Solution* zugegeben. Nach weiteren 4 h Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 100 µl *Solubilization-Solution/Stop-Mix*. Die 96-Loch-Platte wurde anschließend für eine weitere Stunde bei Dunkelheit und 37°C+5%CO_2/95%O_2 inkubiert. Die Lösung wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren unter Vermeidung einer Bläschenbildung vermischt. Die Absorption wurde bei 570 nm in einem 96-Loch-Plattenleser bestimmt, mögliche Verunreinigungen (Zell-Debris, Fingerabdrücke) wurden durch Messung einer Referenzwellenlänge bei 750 nm ausgeschlossen.

2.2.2.3. **Zellvermittelte Zytotoxizitäts-Messung (*Killing-Assay*)**

Mittels eines *in-vitro-Killing-Assays* kann eine Änderung des zytotoxischen Potenzials von Immunzellen (Effektorzellen) gegen B16-F10-Melanomzellen (Zielzellen) unter gewissen Einflussfaktoren, hier MALP-2-Stimulation, gemessen werden.

B16-F10-Melanomzellen wurden hierfür in verschiedenen Effektor/Zielzell-Verhältnissen (E/T-Verhältnis) mit frisch isolierten murinen Immunzellen co-inkubiert. Nach 4-12 h Co-Inkubation erfolgte die Messung der zellvermittelten Zytotoxizität der Immunzellen gegen die B16-F10-Melanomzellen durch einen FACS basierten Versuchsaufbau.

B16-F10-Melanomzellen wurden zuvor mittels CFDA SE-Markierung fluoreszenzmarkiert (2.2.2.1.8), um später durchflusszytometrisch im FITC-Kanal von Immunzellen differenziert werden zu können. Tote Zellen wurden vor der Messung durch Zugabe von Propidiumjodid fluoreszenzmarkiert. Propidiumjodid vermag bei toten Zellen durch die Membran zu diffundieren, interkaliert in der Zelle in die DNA und kann anschließend durchflusszytometisch im PE-Kanal detektiert werden. Lebende B16-F10-Melanomzellen konnten somit als FITC positive und PE negative Zellen identifiziert werden, tote B16-F10-Melanomzellen als FITC positive und PE positive Zellen.

Jeweils $5x10^5$ CFSE-B16-F10-Melanomzellen (2.2.2.1.8) wurden in 12-Loch-Platten (Greiner bio-one) ausgesät. Nach Inkubation für 12 h bei 37°C und 5%CO_2/95%O_2 wurde der Überstand abpipettiert. Tote Zellen wurden durch dreimaliges Waschen mit RPMI-Kulturmedium entfernt. Auf den B16-F10-Melanomzellrasen wurden anschließend frisch isolierte Immunzellen in 2 ml RPMI mit 10%FCS und 1%Penicillin/Streptomycin pipettiert.

Die Co-Inkubation erfolgte auf einem Schwenktisch unter langsamem Schwenken bei 37°C und 5%CO_2/95%O_2.

Die Co-Inkubation erfolgte in zwei verschiedenen Ansätzen:

1.) Für die Messung der zellvermittelten Zytotoxizität von murinen Leukozyten aus der Milz wurden die Zellen wie unter 2.2.2.1.6 beschrieben isoliert und in An- oder Abwesenheit von 5 ng/ml MALP-2 für 4 h im E/T-Verhältnis von 5:1 und 20:1 mit fluoreszenzmarkierten B16-F10-Zellen co-inkubiert.

2.) Im zweiten Ansatz wurden peritoneale Immunzellen 24 h nach intraperitonealer Injektion von MALP-2 sowie aus mit NaCl-behandelten Kontrolltieren isoliert (2.2.2.1.8). Für die Messung der zellvermittelten Zytotoxizität der MALP-2-induzierten peritonealen Immunzellen im Vergleich zu naiven peritonealen Immunzellen wurden die Zellen für 12 h im E/T-Verhältnis von 50:1 mit fluoreszenzmarkierten B16-F10-Zellen co-inkubiert.

Nach Co-Inkubation über den oben genannten Zeitraum wurde der Überstand mit Suspensionszellen vorsichtig abpipettiert und mit 750 µl 1xPBS (ohne Mg^{2+} und Ca^{2+}) gespült. Der Überstand wurde jeweils für die FACS-Analyse aufgehoben. Die adhärenten CFSE-B16-F10-Melanomzellen wurden vorsichtig für 2min bei 37°C mit 100 µl Trypstin/EDTA abgelöst und anschließend mit 1 ml PBS (mit Mg^{2+}, Ca^{2+} und 10%FCS) gespült. Die abgelöste Fraktion der adhärenten Zellen wurde mit der Suspensionszell-Fraktion vereinigt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 7 min bei 1.200 Upm pelletiert und in 100 µl PBS resuspendiert. Um die toten Zellen zu markieren, wurden 10 µl einer Propidiumjodid-Lösung (50 µg/ml) zugegeben. Die Zellen wurden bei 4°C im Dunkeln für 15 min inkubiert, anschließend wurden 500 µl PBS zugegeben. Das Zellgemisch wurde dann mittels FACS analysiert (2.2.2.5.3). CFSE-B16-F10-Melanomzellen wurden anhand ihrer Fluoreszenzeigenschaften im FITC-Kanal ausgewählt. Im PE-Kanal konnte anschließend der Anteil Propidiumjodid gefärbter (toter) Zellen bestimmt werden. Es wurden je Ansatz insgesamt $5x10^4$ B16-F10-Melanomzellen gemessen und der Anteil toter B16-F10-Melanomzellen bestimmt. Um einer Verfälschung der Ergebnisse durch Zelldebris vorzubeugen, wurde Zelldebris anhand des *Fowardscatters* sowie der PE-Fluoreszenz identifiziert und aus der Messung ausgeschlossen.

Als Negativ-Kontrolle dienten CFSE-B16-F10-Melanomzellen, die nicht mit Immunzellen co-inkubiert waren.

2.2.2.4. *In-vitro*-Adhäsionsexperimente mit B16-F10-Zellen an VCAM-1-beschichteten Oberflächen

a) Beschichtung einer Oberfläche mit VCAM-1

Um Integrin-beschichtete Oberflächen zu generieren, die für einen Adhäsionsassay verwendet werden können, wird die Fähigkeit des Fc-Teiles von Antikörpern an Plastikoberflächen zu binden, genutzt. Eine VCAM-1 Fc-Chimäre, also ein chimäres Protein, das an einem Ende aus VCAM-1 und am anderen Ende aus einem Fc-Teil besteht, wird mit einer Plastikoberfläche in Kontakt gebracht. Durch Adhäsion der Fc-Teile an die Plastikoberfläche wird der VCAM-1-Anteil nach außen präsentiert.

Die benötigte Anzahl an Löchern einer 96-Loch-Platte (Greiner bio-one, Solingen, Deutschland) wurden mit 150 µl einer VCAM-1 Fc-Chimäre (10 µg/ml, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) für 5 h bei 37°C inkubiert. Überschüssige Proteine wurden durch dreimaliges Waschen mit 150 µl PBS entfernt. Die so beschichteten Oberflächen wurden anschließend sofort für den statischen Adhäsionsassay verwendet.

b) Statische Adhäsionsexperimente

VCAM-1 beschichtete Oberflächen einer 96-Loch-Platte wurden für 1 h mit 150 µl eines funktionshemmenden VCAM-1-AK (10 µg/ml) oder 150 µl einer Isotypkontrolle (10 µg/ml) inkubiert. Die Flüssigkeit wurde abgesaugt und $1x10^5$ CFSE-B16-F10-Melanomzellen in 150 µl PBS wurden zugegeben und für 3min bei RT inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit 150 µl PBS gewaschen. Die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch mittels eines inversen Mikroskops (Zeiss, Axiovert 200).

2.2.2.5. Durchflusszytometrie/*Fluorecence-activated-cell-sorter* (FACS)

Die durchflusszytometrische Messung eignet sich unter anderem zur Untersuchung von Zellsuspensionen, zur Bestimmung von absoluten Zellzahlen, zur Zelltypisierung sowie zu verschiedenen funktionellen Untersuchungen.

Suspensionszellen werden einzeln in einem laminaren Probenstrom an einem Laser vorbeigeleitet. Hierbei werden die Zellen auf Eigenschaften, Größe, Granularität und nach Fluoreszenzeigenschaften untersucht.

Das von einem Laser ausgesandte monochromatische Licht trifft auf eine zu messende Zelle. Im Vorwärtsstreulicht oder *Forwardscatter* (FSC) kann die relative Größe der Zelle bestimmt werden. Das in einem 90°-Winkel gemessene Seitwärtsstreulicht oder *Sidescatter* (SSC) stellt

ein Maß für die Granularität der Zellen dar. Zusätzlich besitzt das Durchflusszytometer verschiedene Fluoreszenzkanäle, in denen verschiedene Fluoreszenzspektren auch in einem 90° Winkel detektiert werden können. Durch Markierung von Oberflächenmolekülen der Zellen mittels spezifischer, fluoreszenzgekoppelter Antikörper lassen sich Zellen weiter charakterisieren. Verwendet man fluoreszenzgekoppelte Antikörper mit unterschiedlichen Fluorochromen (z.B. FITC, PE, APC) ist die Bestimmung multipler Eigenschaften in einem Suspensionsansatz, auf Zellniveau, möglich. Die gemessene Fluoreszenzintensität kann auch als Maß der relativen Expressionsstärke von Oberflächenmolekülen herangezogen werden. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass innerhalb kürzester Zeit viele tausend Zellen gezählt und selbst aus komplexen Zellsuspensionen charakterisiert werden können.

2.2.2.5.1. **Durchflusszytometrische Quantifizierung pulmonaler Immunzellen und endothelialer Adhäsionsmoleküle nach MALP-2-Stimulation**

Die durchflusszytometrische Untersuchung der pulmonalen Immunzellen und der endothelialen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 erfolgte anhand einer Einzelzellsuspension aus Lungengewebe (2.2.2.1.5). Versuchstiere 24 h nach MALP-2-Instillation wurden mit Tieren 24 h nach NaCl-Instillation verglichen (2.2.1.3).

Für die Markierung der Oberflächenantigene von Immunzellen und Lungenendothelzellen wurde ein Aliquot von 100 µl der Lungensuspension (2.2.2.1.5) eingesetzt. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Zugabe von 1 µl CD16/CD32-Ak und 5% FBS blockiert. Nach Inkubation für 5 min bei 4°C erfolgte die Fluoreszenzfärbung mit direktmarkierten Fluoreszenzantikörpern nach Herstellerangabe bei 4°C für 5 min in Dunkelheit. Nicht gebundene Antikörper wurden anschließend entfernt, indem die Zellen bei 1.200 Upm (4°C) für 5 min pelletiert wurden, der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 1 ml PBS mit 5% FBS resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde wiederholt und das Pellet anschließend in 500µl PBS resuspeniert und die Zellsuspension mittels FACS gemessen. Zur Vermeidung des Signalverlustes durch Rezeptor-*Shedding* (proteolytische Abspaltung) oder Rezeptor-Internalisierung durch Endozytose erfolgten alle Arbeitsschritte auf Eis, zentrifugiert wurde in einer vorgekühlten Zentrifuge bei 4°C.

Immunzellen wurden folgendermaßen markiert und detektiert:
T-Helferzellen wurden über die Markierung mit CD4 (PE) -Antikörper dargestellt. Zytotoxische T-Zellen wurden durch die Markierung mit CD8 (PE)-Antikörper dargestellt. Granulozyten wurden mittels Markierung mit Gr1 (FITC)- Antikörper dargestellt. Die Darstellung von Makrophagen ($CD11b^+/Gr1^-$) erfolgte nach Doppelmarkierung mit Antikörpern gegen CD11b (PE)/ Gr1 (FITC). Passende Isotyp-Kontrollen wurden mitgeführt. Die Kompensation erfolgte manuell. Für die Quantifizierung der Immunzellen wurden pro Tier $1x10^5$ Gesamtlungenzellen gezählt. Die Auswertung erfolgte anhand der mitgelieferten Sofware (FACSDiva Version 6.1.2).

Lungenendothelzellen wurden folgendermaßen markiert und detektiert:
Zur Darstellung der Expression von VCAM-1 oder ICAM-1 auf Lungenendothelzellen erfolgte eine Dreifachmarkierung mit CD31 (APC)-Antikörper, mit CD11b (PE)-Antikörper und CD106 (FITC)-Antikörper im Fall der VCAM-1 Färbung oder CD54 (FITC)-Antikörper im Fall einer ICAM-1 Markierung. Endothelzellen wurden als CD31+/ CD11b- dargestellt, um eine Verunreinigung durch Monocyten/Makrophagen auszuschließen. Die Einstellung durchflusszytometrischer Fenster (*gates*) erfolgte anhand der Fluoreszenz minus-one Methode wie bei Perfetto und Mitarbeiter beschrieben (Perfetto et al. 2004). Passende Isotyp-Kontrollen wurden mitgeführt. Die Kompensation erfolgte automatisiert und wurde bei Bedarf manuell korrigiert. Für die Auswertung der VCAM-1 und ICAM-1 Expression in Lungenendothelzellen wurden pro Tier $1x10^5$ Endothelzellen (CD 31+/CD11b-) gezählt. Die Auswertung erfolgte anhand mitgelieferter Software (FACSDiva Version 6.1.2).

2.2.2.5.2. **Durchflusszytometrische Auswertung der Kurzzeitmetastasierung**

Für die durchflusszytometrische Quantifizierung der pulmonal adhärenten Melanomzellen wurde eine Einzelzellsuspension des Lungengewebes wie unter 2.2.2.1.5 beschrieben hergestellt. Die gewonnenen Einzelzellen einer Lunge wurden in einem Gesamtvolumen von 500 µl PBS resuspendiert. Die Quantifizierung der GFP markierten B16-F10-Melanomzellen erfolgte durchflusszytometrisch. Die GFP markierten B16-F10-Melanomzellen wurden durch ihre Fluoreszenzeigenschaften im FITC Kanal identifiziert. Je Tier wurden insgesamt $3x10^6$ Gesamtzellen der Einzelzellsuspension gezählt.

2.2.2.5.3. **Durchflusszytometrische Auswertung der *Killing*-Experimente**

Siehe 2.2.1.7

2.2.2.5.4. **Analyse der Integrinexpression VLA-4 und LFA-1 auf B16-F10-Melanomzellen**

Die Färbung der Integrine α4 (CD49d) and β1 (CD29), sowie αL (CD11a) and β2 (CD18) erfolgte mit unmarkierten Primärantikörpern aus der Ratte. 100 µl Zellsuspension wurde mit 10 µg/ml Antikörper wie unter 2.2.2.5.1 beschrieben gefärbt. Im Anschluss erfolgte die Sekundärmarkierung des Primärantikörpers mittels 1 µl PE-markiertem Ziege-Anti-Ratte-Antikörper. Die Inkubation erfolgte für 5min im Dunkeln bei 4°C. Nicht gebundene Antikörper wurden entfernt, indem die Zellen bei 1.200 Upm (4°C) für 5 min pelletiert wurden, der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 1ml PBS mit 5%FBS resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde wiederholt und das Pellet anschließend in 500 µl PBS resuspendiert. Die Auswertung erfolgte anhand der Fluoreszenzeigenschaften im PE-Kanal. Passende Isotypkontrollen wurden mitgeführt.

2.2.2.6. ***In-vitro*-Stimulation von HUVEC-Zellen**

HUVEC-Zellen (2.2.2.1.2) wurden auf Deckgläsern kultiviert, indem die Deckgläser (18 mm Durchmesser) in 12-Loch-Platten gelegt wurden. Je $1x10^5$ HUVEC Zellen wurden in 2 ml EGM-Zellkulturmedium für 12 h bei 37°C/5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert.

Anschließend wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen für 24 h mit TNFα (25 ng/ml) oder MALP-2 (100 ng/ml) in EGM-Zellkulturmedium bei 37°C/5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert. Als Kontrolle wurden unstimulierte Zellen mitgeführt.

Auf den so stimulierten Zellen wurde anschließend mittels Immunfluoreszenzfärbung die VCAM-1 Expression nachgewiesen.

2.2.2.6.1. **Immunfluoreszenzfärbung von VCAM-1 auf HUVEC-Zellen**

Die Immunfluoreszenzfärbung ermöglicht die Immundetektion von spezifischen zellulären Oberflächenantigenen. Auch intrazelluläre Antigene können wie mit der Durchflusszytometrie (2.2.2.5) direkt oder indirekt mit Hilfe fluoreszenzgekoppelter Antikörper identifiziert werden. So lassen sich Lokalisation und Expressionsstärke zellulärer Proteine fluoreszenzmikroskopisch darstellen.

Das Zellkulturmedium der stimulierten HUVEC-Zellen (2.2.2.6) wurde vorsichtig abgesaugt und mit 1.000 µl 1xPBS gewaschen. Die Zellen wurden fixiert, indem 500 µl Metanol (-20°C) in jedes Loch pipettiert und anschließend für 20 min bei -20°C inkubiert wurde. Die Deckgläser wurden danach aus der 12-Loch-Platte genommen und luftgetrocknet.

Unspezifische Bindungen wurden durch Inkubation für 1 h mit 500 µl Blocklösung (5% FCS in 1x PBS) in einer feuchten Kammer blockiert. Um Antikörper zu sparen, erfolgten die Antikörper- Inkubationen in Sandwich-Technik. Parafilm wurde auf dem Boden einer feuchten Kammer ausgebreitet. Je 100 µl VCAM-1 Antikörper-Lösung (10 µg/ml in Blockpuffer) wurde auf den Parafilm pipettiert und das Deckgläschen so auf die Antikörperlösung gelegt, dass die HUVEC-Zellen auf der Unterseite direkt Kontakt zur Inkubationslösung hatten. Als Isotyp-Kontrolle diente Maus anti-Ratte IgG. Nach Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur (RT) wurden die Deckgläschen 3x5 min mit Blocklösung gewaschen. Die Markierung primär Antikörpers erfolgte wieder in Sandwich-Technik durch Inkubation mit FITC-markiertem Ziege-anti-Maus sekundär Antikörper in Blocklösung für 40 min bei RT und Dunkelheit. Die Kernfärbung erfolgte danach durch Inkubation mit 100 µl DAPI-Färbelösung für 20 min bei Raumtemeratur. DAPI (4‘,6-Diamidin-2-phenylindol) ist ein Fluoreszenzfarbstoff mit bläulicher Fluoreszenz, der in die DNA interkaliert und so zur Markierung von DNA eingesetzt werden kann. Anschließend wurden die Deckgläschen 3x5 min mit 1xPBS gewaschen und mit *Fluorescent Mounting Medium* auf einem Objektträger luftblasenfrei eingedeckt. Um eine Austrocknung des Eindeck-Mediums zu vermeiden, wurde das Deckgläschen mit klarem Nagellack abdichtet. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung und Dokumentation erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop AxioImager M1 (Zeiss).

2.2.3. Immunhistochemie

Die Immundetektion an Lungengewebe erfolgte mit Hilfe der **S**trept-**A**vidin-**B**iotin-**C**omplex-Methode (SABC-Methode). Diese Methode gehört zu den indirekten immunhistochemischen Nachweismethoden. Das nachzuweisende Antigen im Gewebe wird von einem nichtmarkierten antigenspezifischen Primärantikörper erkannt. Der Primärantikörper wird mittels eines speziesspezifischen, biotinylierten Sekundärantikörpers markiert. Die Enzymmarkierung des Sekundärantikörpers erfolgt über ein Streptavidin-Peroxidase-konjugat. Hierbei wird die starke Bindungsaffinität von Streptavidin zu Biotin genutzt. Bei der folgenden enzymatischen Färbung wird durch eine Peroxid-abhängige Oxidation das nahezu farblose Chromogen 3-Amino-9-Ethylcarbazol in einen roten Farbstoff umgewandelt. Dieser Farbstoff fällt als Niederschlag um die vom Primärantikörper gebundene Struktur aus. Da der erzeugte Farbstoff nicht wasserlöslich ist, erfolgt die Eindeckelung in ein wasserhaltiges Eindeckmedium (Faramount; Dako). Durch das mehrstufige Verfahren wird eine Signalamplifikation erreicht. Um hierbei auftretende, unspezifische Färbeartefakte zu vermeiden, sollte vor Antikörpermarkierung eine Blockierung von endogenen Peroxidasen und von endogenem Biotin erfolgen.

2.2.3.1. **Probenvorbereitung**

Um gut reproduzierbare und vergleichbare histologische Schnitte des Lungengewebes zu generieren, wurden die Lungen der Versuchstiere mit 0,8 ml OCT/PBS-Lösung gefüllt und wie unter 2.2.1.4 beschrieben präpariert.

2.2.3.2. **Fixierung, Einbettung und Lagerung**

<u>Kryogen-Fixierung:</u>

Kryofixierte Proben wurden hergestellt, indem der linke Lungenlappen auf einer Korkscheibe in OCT eingebettet und mit Hilfe von mit Trockeneis gekühltem Isopentan tiefgefroren wurde. Die Lagerung der Kryogen-fixierten Proben erfolgte bei -80°C.

<u>Zink-Fixierung:</u>

Um Lungen mittels Zink-Lösung zu fixieren, wurden Proben für 24 h bei RT unter leichtem Schwenken in 10 ml Zink-Lösung fixiert. Anschließend wurden die Zink-fixierten Lungen für dreimal 10 min in 1xPBS gewaschen und anschließend wie die Kryogen-fixierten Proben eingebettet und gelagert.

PFA-Fixierung, Paraffin-Einbettung :

Um Proben mit PFA zu fixieren, wurden die rechten Lungenlappen für 24 h unter leichtem Schwenken in 10 ml 4% PFA fixiert.

Anschließend wurden die PFA-fixierten Lungen für 1h in Leitungswasser gewässert, um das Fixativ auszuwaschen, dann automatisiert entwässert und in Paraffin eingebettet (Einbettautomat Exelsior, Thermo scientific). Die Entwässerung und Einbettung erfolgte nach dem folgenden Schema:

- Isopropanol 50%	60 min
- Isopropanol 70%	60 min
- Isopropanol 80%	60 min
- Isopropanol 80%	60 min
- Isopropanol 96%	60 min
- Isopropanol 96%	60 min
- Isopropanol 100%	90 min
- Isopropanol 100%	90 min
- Xylol	90 min
- Xylol	90 min
- Paraffin	120 min
- Paraffin	120 min

Die Lagerung der Paraffinblöcke erfolgte im Dunkeln bei Raumtemperatur.

2.2.3.3. **Immundetektion**

2.2.3.3.1. **Immundetektion an Kryostatschnitten**

Für die immunhistologische Lungengewebsuntersuchung wurden 5 µm dicke Kryostatschnitte auf Glasobjektträger aufgebracht und für 10 min aufgetaut. Anschließend wurden die Schnitte für 10 min in eiskaltem Methanol bei -20°C fixiert. Um Methanolreste zu entfernen, wurde einmal kurz in 1xPBS gewaschen. Um unspezifische Signale durch endogene Peroxidasen zu vermeiden, wurde für 10 min mit 3% H_20_2 in 1xPBS inkubiert, gefolgt von dreimaligem Waschen für je 3 min in 1xPBS. Da Lungengewebe reich an endogenem Biotin ist, erfolgte anschließend das Blockieren des endogenen Biotins mittels *Biotin-Blocking System* (Dako). Je Schnitt wurden 100 µl Avidin-Lösung (Dako) aufgebracht und für 10 min in einer feuchten

Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1xPBS wurde für 10 min mit 100 µl Biotin–Lösung (Dako) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal mit 1xPBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit 200 µl Blockpuffer für 20 min bei RT in einer feuchten Kammer abgesättigt. Die Antigenmarkierung mit Primär-Antikörper erfolgte mit je 200 µl Antikörperlösung in Blockpuffer für 45 min bei RT in einer feuchten Kammer oder über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit 1xPBS erfolgte die Markierung des Primärantikörpers mittels biotinyliertem, speziesspezifischem Sekundär-Antikörper in 200 µl Blockpuffer für 40min bei RT in einer feuchten Kammer. Ungebundener Sekundär-Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit 1xPBS entfernt. Durch Inkubation mit 200 µl einer Streptavidin-Peroxidase-Konjugat-Lösung (Streptavidin-Peroxidase-Konjugat 1: 500 in PBS) für 40 min bei RT in einer feuchten Kammer erfolgte die enzymatische Markierung. Überschüssiges Streptavidin-Peroxidase-Konjugat wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend erfolgte die AEC-Färbung (2.2.3.3.3).

2.2.3.3.2. **Immundetektion an Paraffinschnitten**

3µm dicke Paraffinschnitte wurden über Nacht in einem Trockenschrank bei 45°C getrocknet. Anschließend erfolgte die Entparaffinierung mittels dreimaliger Inkubation in Xylol für je 10 min. Dann wurden die Schnitte in absteigender Alkoholreihe rehydriert:

- Isopropanol 100% 10 min
- Ethanol 100% 10 min
- Ethanol 90% 10 min
- Ethanol 70% 10 min
- Ethanol 50% 10 min
- PBS 10 min

Die Epitop-Demaskierung (Antigenretrival) auf Paraffinschnitten erfolgte bei Immundetektion mit F4/80-Ak durch Inkubation in Citratpuffer (DAKO) für 20 min bei 39°C in einem Gemüsedampfgarer (Multi Gourmet; Braun). Bei Immundetektion mit Gr1-Ak erfolgte die Epitopdemaskierung durch Inkubation der Gewebeschnitte mit Proteinase K-Lösung (80 µg/ml) für 10 min bei 39°C in einem Gemüsedampfgarer (Multi Gourmet; Braun). Anschließend wurden die Objektträger innerhalb von 30 min auf Raumtemperatur abgekühlt und dann dreimal 3 min in PBS gewaschen. Die folgenden Schritte, Inaktivierung der endogenen Peroxidase, Blockierung von endogenem Biotin und Immunmarkierung erfolgten nach demselben Protokoll wie für Kryoschnitte beschrieben (2.2.3.3.1). Anschließend erfolgte die AEC-Färbung (2.2.3.3.3)

2.2.3.3.3. **3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)-Färbung**

Die Farbmarkierung der Zielstrukturen erfolgte durch Oxidation von 3-Amino-9-Ethylcarbazol. Hierfür wurden die Schnitte für 5min bei RT in AEC-Färbereagenz inkubiert. Nach einmaligem, kurzen Waschen in H_2O wurde die Farbreaktion abgestoppt, indem die Objektträger für 10 min in 4% Formaldehyd-Lösung inkubiert wurden. Nach erneutem, zweimaligen Waschen in H_2O erfolgte die Gegenfärbung mit Mayers-Hämalaunlösung für 5-10 sek. Anschließend wurden größere Mengen der Färbelösung durch zweimaliges Waschen in H_2O abgespült. Dann wurde dreimal für je 3 min in H_2O gewaschen. Durch Inkubation für 25 sek in gesättigter Li_2CO_3-Lösung wurde kontrastiert. Anschließend erfolgte fünfmaliges Waschen für je 3 min in H_2O. Die so gefärbten Schnitte wurden mittels Einbettlösung (Faramount, Dako) eingebettet und innerhalb von 2 Tagen mikroskopisch ausgewertet und bei RT unter Lichtabschluss archiviert.

2.2.3.4. **Histologische Quantifizierung von Immunzellen in Lungengewebe nach MALP-2-Stimulation**

Die histologische Quantifizierung der Immunreaktion nach MALP-2-Instillation erfolgte an 5µm dicken Gefrierschnitten. Je ein zentraler Längsschnitt der linken Lunge wurde verwendet. Immunzellen wurden immunhistochemisch mit Antikörpern gegen CD4, CD8, CD19, CD11b und Gr1 gefärbt (2.2.3.3.1).

Die spezifische Darstellung von Makrophagen erfolgte immunhistochemisch mit Antikörpern gegen F4/80 an 3 µm dicken PFA-fixierten Paraffinschnitten, wie unter 2.2.3.3.2 beschrieben. Die Epitopdemaskierung erfolgte mittels Citratpuffer.

Nach CD4, CD8, CD19 und F4/80-Färbung wurden die Zellen in einer 20x-Vergrößerung ausgezählt. Pro Schnitt wurden mindestens 10 Gesichtsfelder ausgezählt. Im Falle einer CD11b- und Gr1-Färbung erfolgte die Auswertung, aufgrund der hohen Zellzahlen und damit erschwerten Einzelzelldetektion, densitometrisch. Digitale Aufnahmen der Präparate wurden computerassistiert ausgewertet. Dafür wurden mittels Bildbearbeitungsprogramm, Photoshop (Adobe), die gefärbten Zellen markiert und anschießend die markierten Pixel zur Gesamtpixelzahl in Bezug gesetzt. Pro Tier wurden mindestens 10 Gesichtsfelder in einer 20x-Vergrößerung eines zentralen Querschnittes der linken Lunge ausgezählt.

2.2.3.5. Histologische Darstellung der endothelialen Adhäsionsmoleküle in Lungengewebe nach MALP-2-Stimulation

Die immunhistochemische Darstellung von VCAM-1 (CD106) erfolgte an 5 µm dicken Gefrierschnitten. Die Färbung erfolgte wie unter Immundetektion an Kryostatschnitten beschrieben (2.2.3.3.1). Die immunhistochemische Darstellung von ICAM-1 (CD54) erfolgte an 5 µm dicken Zink-fixierten Paraffinschnitten. Die Färbung erfolgte wie unter Immundetektion an Paraffinschnitten beschrieben (2.2.3.3.2), eine Epitop-Demaskierung musste nicht erfolgen.

2.2.4. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mittels *two tailed Students t-Test* in Excel (Microsoft), sowie mit GraphPad Prism (GraphPad Software). P-Werte von <0,05 (95% Konfidenzintervall) wurden als statistisch signifikant bewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Aktivierung des pulmonalen angeborenen Immunsystems durch tracheale Instillation von MALP-2

Um zu bestimmen, zu welchem Zeitpunkt eine MALP-2-Instillation zu einem maximalen Einstrom von Leukozyten, insbesondere von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) und Makrophagen in die Lungen von C57BL/6J-wt-Mäusen führt, wurden die Tiere durch einmalige Instillation von 0,5 µg MALP-2 behandelt (2.2.1.3). Anschließend wurde die Art und Menge der Leukozyten in der Lunge nach 3, 6, 12, 24 und 72 h immunhistochemisch bestimmt (2.2.3.4). Als Kontrolle dienten Lungen von Tieren, die 3 h zuvor mit 30 µl physiologischer NaCl-Lösung als Vehikelkontrolle instilliert worden waren. Um einen Überblick über die Einwanderung der Immunzellen zu gewinnen, wurde der Immunmarker CD11b, der Makrophagen und PMN markiert, verwendet. Bereits 12 h nach Instillation mit 0,5 µg MALP-2 konnte eine signifikante Erhöhung der $CD11b^+$-Immunzellen auf das Dreifache, verglichen mit dem Grundniveau, beobachtet werden ($p<0,01$). Nach 24 h wurde das Maximum (6-fach; $p<0,01$) erreicht. 72 h nach Instillation war die Anzahl der $CD11b^+$-Immunzellen wieder auf das Grundniveau abgesunken (Abb. 3-1).

Die Immunmarkierung von Gr1, einem spezifisch von Granulozyten exprimierten Antigen, zeigte einen analogen zeitlichen Verlauf mit einem Maximum der Granulozyten-Einwanderung nach 24 h (6-fach; $p<0,01$). Zusätzlich wurde die Makrophagen-Population 24 h nach MALP-2-Instillation durch Färbung mit dem spezifischen Makrophagenmarker F4/80 dargestellt. Ein signifikanter Anstieg der Makrophagenpopulation um den Faktor 3,4 von 117 Zellen/mm² in den Lungen unstimulierter Tiere auf 393 Zellen/mm² war detektierbar ($p<0,001$; Abb.3-1c).

Innerhalb der 72-stündigen Beobachtungszeit konnten keine signifikanten quantitativen Änderungen der $CD8^+$-Zellen (CTL) oder $CD4^+$-Zellen (T-Helferzellen) durch MALP-2 festgestellt werden (Abb.3-1). 24 h nach MALP-2-Stimulation waren durchschnittlich 58 $CD8^+$-Zellen/mm² und 130 $CD4^+$-Zellen/mm² zu zählen, in der Kontrollgruppe befanden sich durchschnittlich 58 $CD8^+$-Zellen/mm² und 117 $CD4^+$-Zellen/mm² in den Lungen.

$CD19^+$-Zellen (B-Zellen), sowie $Nk1.1^+$-Zellen (Natürliche-Killerzellen) konnten im Lungengewebe weder vor noch nach Immunstimulation mit MALP-2 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

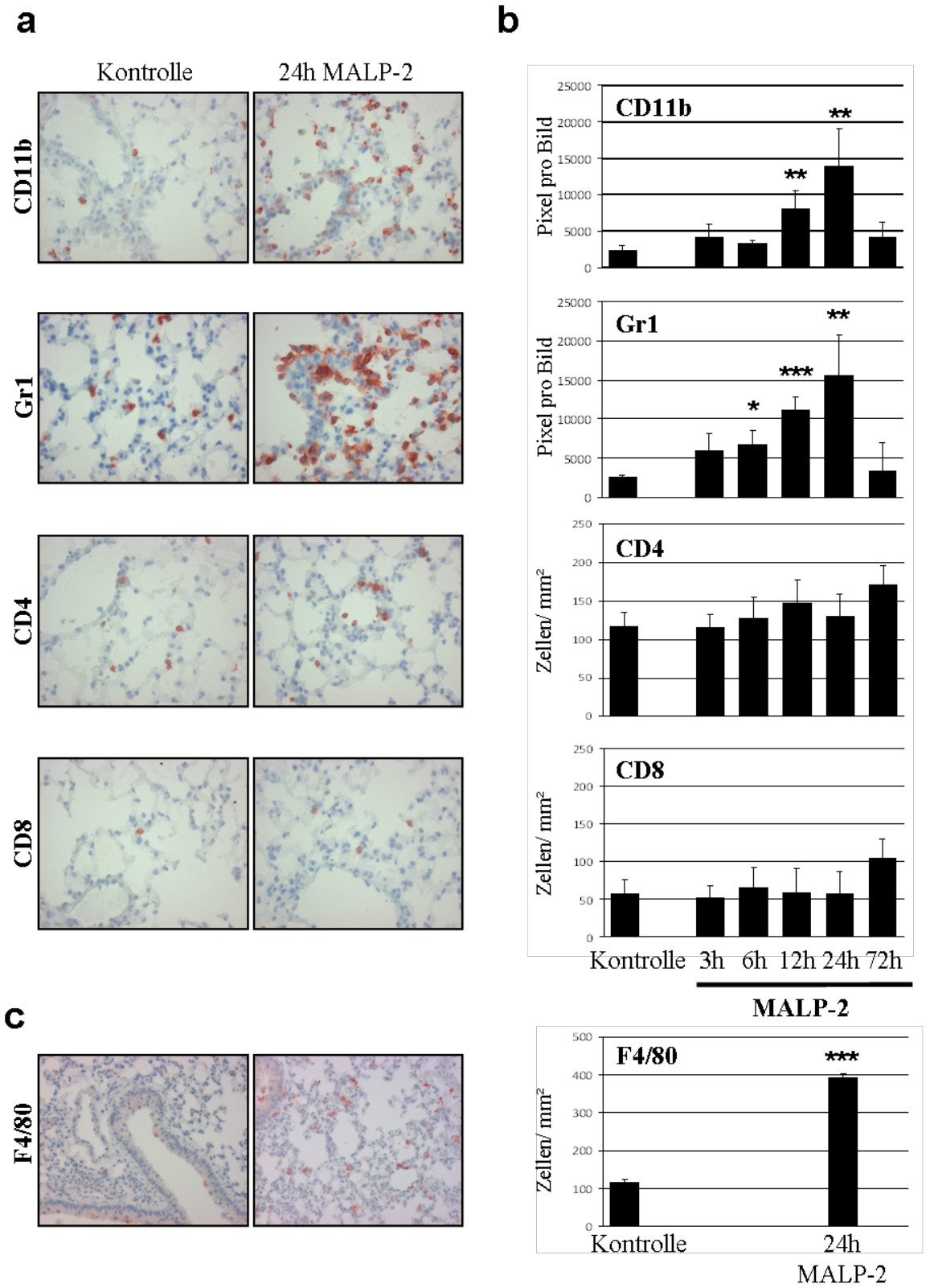

Abb. 3-1: Einwanderung verschiedener Leukozytenuntergruppen in Maus-Lungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einmaliger Instillation von 0,5 µg MALP-2. (a) Repräsentative immunhistochemische Färbungen von Immunzellen in Lungengewebe 24 h nach MALP-2-Instillation im Vergleich zu Kontrolltieren. **(b)** Immunhistochemische Quantifizierung unterschiedlicher Leukozytenuntergruppen in der Lunge 3 h, 6 h, 12 h, 24 h und 72 h nach einmaliger Instillation von 0,5 µg MALP-2 (n=3). Die Quantifizierung erfolgte an

Gefrierschnitten (5 µm). Die Immunzellen wurden durch monoklonale Antikörper gegen die angegebenen Antigene markiert und gefärbt. Die stärkste Leukozytenakkumulation war nach 24 h zu beobachten. **(c)** Die immunhistochemische Quantifizierung der Makrophagen (F4/80) erfolgte an 3 µm dicken Paraffinschnitten der Lungen 24 h nach Instillation von MALP-2 oder NaCl (n=3). **(b, c)** Die Daten sind als Mittelwerte +SD dargestellt. Signifikante Unterschiede bezogen auf die NaCl-Kontrollgruppe sind mit Sternchen angezeigt: *- $p<0,05$; **- $p<0,01$; ***-$p<0,001$.

Die immunhistologischen Ergebnisse wurden durch eine zweite unabhängige Methode untersucht und bestätigt, indem eine aus Lungen hergestellte Einzelzellsuspension durchflusszytometrisch untersucht wurde (2.2.2.5.1). Lungen aus Tieren 24 h nach MALP-2-Instillation wurden mit Lungen 24 h nach NaCl-Instillation (Kontrollgruppe) verglichen. Nach MALP-2-Instillation konnte auch hier eine starke Erhöhung der neutrophilen Granulozyten auf 22,7% der gesamten Lungenzellen im Vergleich zu 5,5% in Tieren der Kontrollgruppe beobachtet werden ($Gr1^+$; $p<0,01$). Für die Makrophagenpopulation, detektiert als $Gr1^-$/$CD11b^+$-Zellen, konnte ein Anstieg von 5%, in der Kontrollgruppe auf 9,6% der gesamten Lungenzellen 24 h nach MALP-2-Stimulation nachgewiesen werden ($Gr1^-$/$CD11b^+$; $p<0,001$). Eine signifikante Änderung der $CD8^+$-Zellen oder der $CD4^+$-Zellen konnte 24 h nach MALP2-Instillation auch mit dieser Methode nicht beobachtet werden (Abb. 3-2).

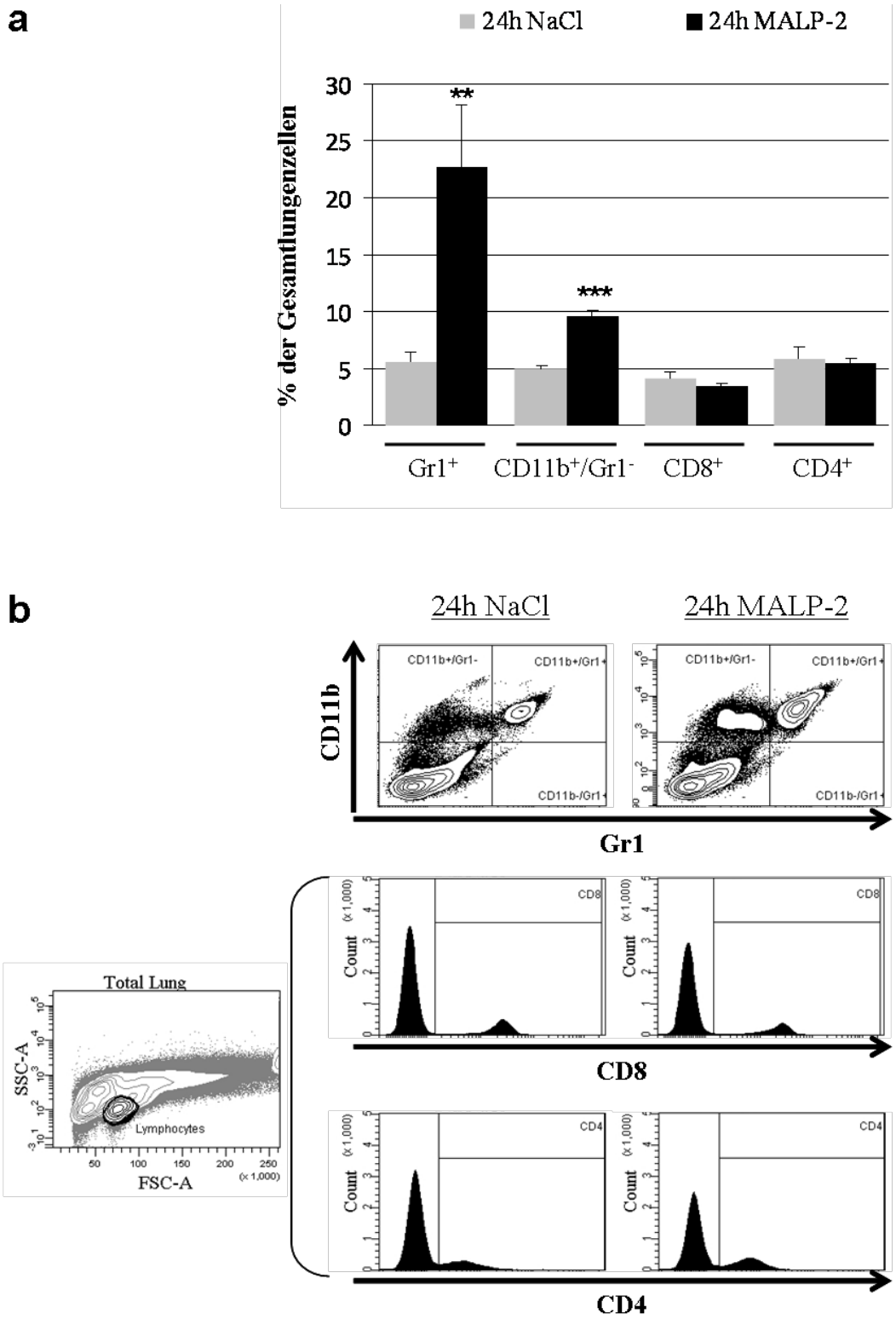

Abb. 3-2: FACS-Analyse verschiedener Leukozytenuntergruppen 24 h nach 0,5 µl MALP-2-Instillation anhand einer Einzelzellsuspension von Lungengewebe. (a) Die Daten sind als Mittelwert +SD dargestellt. Signifikante Unterschiede bezogen auf die NaCl-Kontrollgruppe sind mit Sternchen angezeigt: *- $p<0,05$; **- $p<0,01$; ***-$p<0,001$; n=3. **(b)** Granulozyten wurden als $Gr1^+$ identifiziert; Makrophagen als $CD11b^+/Gr1^-$. $CD4^+$- und $CD8^+$-Zellen wurden mittels FSC und SSC, wie abgebildet, innerhalb der Lymphozytenpopulation (schwarzer Kreis) nachgewiesen. Repräsentative *Scatter-Plots* der Versuchsgruppen sind abgebildet.

3.2. MALP-2-vermittelte TLR2/6-Stimulation hat *in vitro* keine Auswirkung auf die Proliferation von B16-F10-Melanomzellen

TLR werden nicht nur auf Immunzellen, sondern auch auf Tumorzellen exprimiert. Für B16-F10-Melanomzellen wurde beschrieben, dass die Zellen verschiedene TLRs exprimieren, darunter auch TLR2/6 (Huang et al. 2005; Yang et al. 2009). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass *in vitro* Stimulation des TLR2/1 durch Pam3Cys bei B16-F10-Melanomzellen zu einer Steigerung der Proliferation führt (Yang et al. 2009).

Hieraus resultiert die grundsätzliche Frage, ob MALP-2 eine direkte Wirkung auf das Wachstum der B16-F10-Melanomzellen haben könnte.

Mit Hilfe eines *in vitro* MTT-Proliferationsassays wurde die Wirkung der MALP-2-Stimulation auf die Proliferation von B16-F10-Melanomzellen untersucht (2.2.2.2).

B16-F10-Melanomzellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von 0,1 ng/ml bis 100 ng/ml MALP-2 für 72 h inkubiert.

Durch Stimulation der Zellen mit 0,1-100 ng/ml MALP-2 konnte *in vitro* keine Veränderung der Zellproliferation festgestellt werden (Abb.3-3).

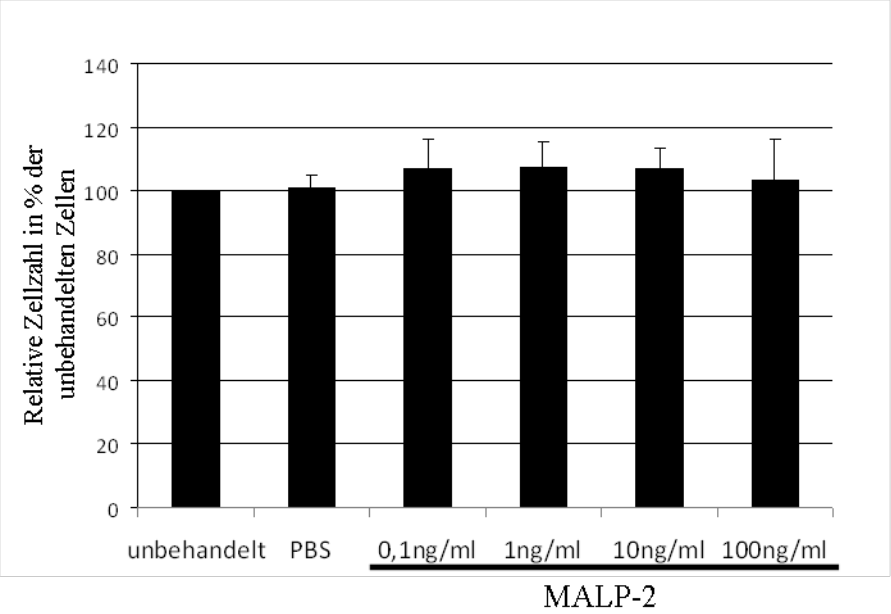

Abb. 3-3: *In-vitro*-Proliferation von B16-F10-Melanomzellen unter MALP-2-Stimulation. B16-F10-Zellen wurden *in vitro* in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen MALP-2 inkubiert. Nach 72 h wurde die Proliferation mittels eines MTT-basierten Proliferations-Assays gemessen. Die Daten sind als Mittelwert +SD dargestellt.

3.3. Aktivierung des pulmonalen angeborenen Immunsystems durch pulmonale Instillation von MALP-2 und Auswirkung auf bestehende experimentell induzierte Melanommetastasen

Um die Wirkung einer pulmonalen Immunstimulation durch MALP-2 auf bereits bestehende Lungenmetastasen zu untersuchen, wurden C57BL/6J-wt-Mäuse 24 h nach Injektion von 2,5 x10^5 B16 F10-Melanomzellen (2.2.1.5) mit 0,5 µg MALP-2 instilliert (2.2.1.3). Zum Zeitpunkt der Immunstimulation haben sich die B16-F10-Melanomzellen bereits im Kapillarbett der Lunge eingenistet und ortsständige Metastasen gebildet. Vierzehn Tage nach Injektion der Tumorzellen wurden die Versuchstiere getötet, die Lungen herauspräpariert (2.2.1.4) und die Anzahl der oberflächlich sichtbaren, pulmonalen Melanommetastasen ausgezählt (2.2.1.6). Zusätzlich wurde das Lungengewicht als Surrogat-Parameter für die Tumormasse bestimmt. In der unstimulierten, NaCl-behandelten Kontrollgruppe (n = 7) wurden im Mittel 287 ± 102SD oberflächliche pulmonale Metastasen gezählt. Das Lungengewicht betrug im Mittel 196 mg ± 15SD. In der mit 0,5 µg MALP-2-stimulierten Versuchsgruppe (n= 7) wurden 190 ± 87SD pulmonale Metastasen gezählt, das Lungengewicht betrug im Mittel 201mg ± 8SD. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen konnten weder hinsichtlich der Anzahl der oberflächlichen Metastasen (p=0,08) noch im Lungengewicht (p=0,43) als Surrogat-Parameter für die Tumorlast gefunden werden (Abb.3-4a).

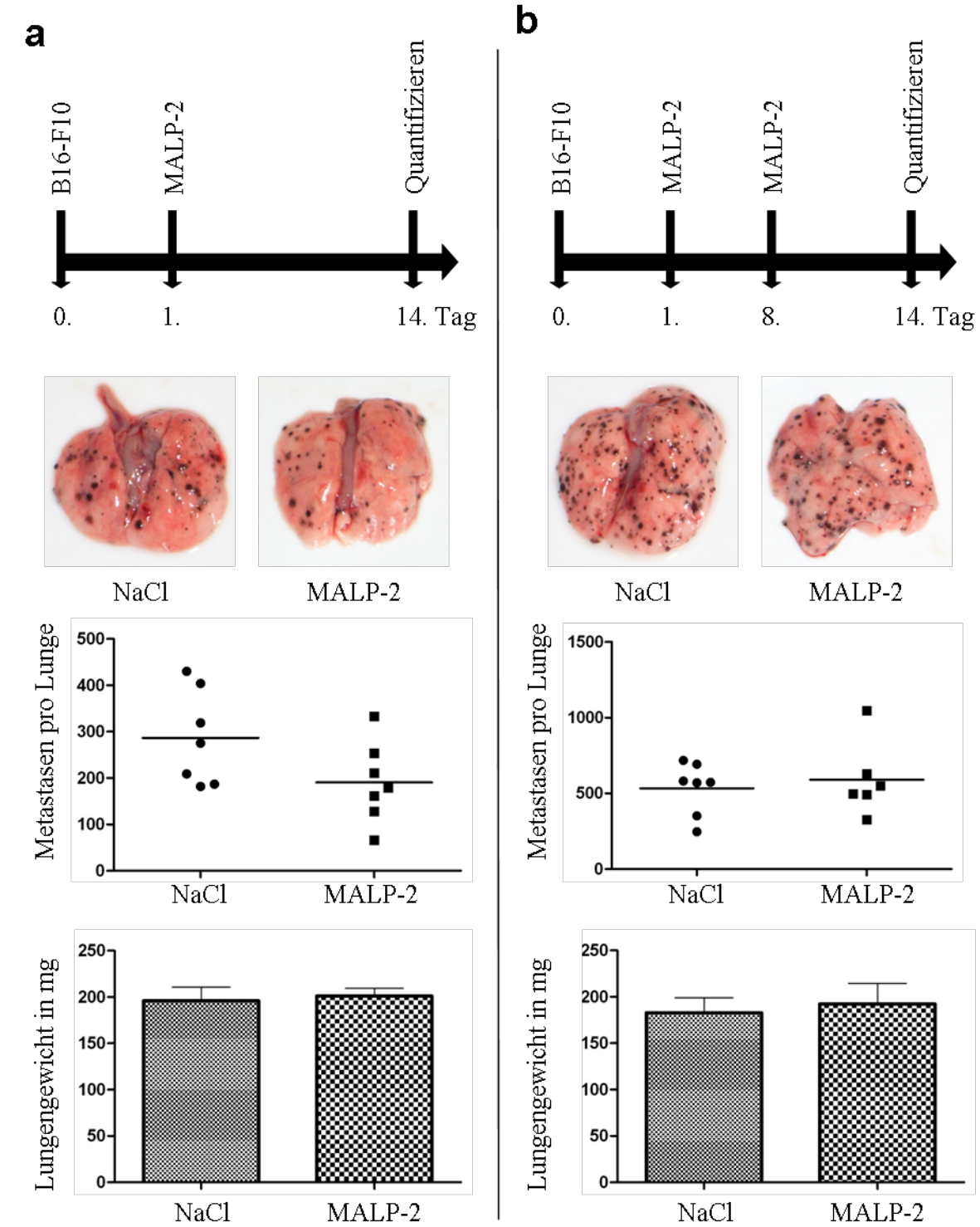

Abb. 3-4: MALP-2-induzierte Aktivierung des angeborenen Immunsystems und Einfluss auf experimentell induzierte pulmonale Melanommetastasen. C57/BL/6J-wt-Mäuse wurden, wie in den oberen Grafiken dargestellt, behandelt. 14 Tage nach Melanomzellinjektion wurden die oberflächlichen Metastasen gezählt und die Lungen gewogen. Die Daten sind als Mittelwert +SD dargestellt. Repräsentative Bilder der Lungen jeder Versuchsgruppe sind abgebildet. **(a)** $2{,}5 \times 10^5$ B16-F10-Melanomzellen wurden 24h vor Instillation mit 0,5 µg MALP-2 (n=7) oder 0,9% NaCl als Vehikelkontrolle (n=7) injiziert. **(b)** Instillation mit 0,5 µg MALP-2 (n=6) oder 0,9% NaCl als Vehikelkontrolle (n=7) erfolgte einen Tag nach Injektion von $2{,}5 \times 10^5$ B16-F10-Melanomzellen, nach weiteren sieben Tagen erfolgte eine erneute Instillation mit 0,5 µg MALP-2 (*boost*).

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob eine wiederholte MALP-2-Stimulation des pulmonalen Immunsystems (*boost*) antitumorale Effekte gegen B16-F10-Melanommetastasen verstärken kann. Hierfür wurden C57BL/6J-Mäuse an Tag 1 und 8 (boost) nach Tumorzellinjektion mit jeweils 0,5 µg MALP-2 pulmonal stimuliert (Abb.3-4b). Die Vergleichsgruppe wurde an Tag 1 und 8 mit 0,9% physiologischer NaCl-Lösung (Vehikel) instilliert. Nach 14 Tagen konnten in der wiederholt mittels MALP-2-behandelten Versuchsgruppe (n= 7) 590 ± 244SD oberflächliche, pulmonale Metastasen gezählt werden, das Lungengewicht betrug im Mittel 192 mg ± 22 mg SD. In der NaCl-behandelten Versuchsgruppe (n= 6) wurden im Mittel 534 ± 173SD oberflächliche, pulmonale Metastasen gezählt, das Lungengewicht betrug im Mittel 183 mg ± 16 mg SD.
Auch die wiederholte Stimulation des pulmonalen Immunsystems mittels MALP-2 führte nicht zu signifikanten Unterschieden, weder hinsichtlich der Anzahl der oberflächlichen Metastasen (p=0,63) noch beim Lungengewicht (p=0,39) (Abb.3-4b).
Die immunhistochemische Untersuchung der Metastasen tragenden Lungen an Tag 14 von MALP-2-behandelten im Vergleich zu den mit NaCl-Lösung behandelten Tieren zeigten keine Unterschiede bezüglich tumorassoziierter $CD8^+$, $Gr1^+$ und $F4/80^+$ Immunzellen (Daten nicht gezeigt). Die Metastasen tragenden Lungen von wiederholt mit MALP-2-stimulierten Tieren (Tag 1 und Tag 8) zeigten im Lungeninterstitium eine leicht erhöhte Anzahl an Makrophagen ($F4/80^+$). Unterschiede in der Anzahl an tumorassozierten Makrophagen (TAM) konnten jedoch nicht gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend hatte eine Aktivierung der angeborenen pulmonalen Immunantwort durch MALP-2 keine Auswirkung auf experimentell induzierte Melanommetastasen, zumindest nicht, wenn MALP-2 nach dem Tumorzellarrest im Kapillarbett der Lunge verabreicht wird.

3.4. Vorstimulation des angeborenen Immunsystems durch pulmonale Instillation von MALP-2 und Auswirkung auf hämatogen induzierte Melanommetastasen

Die Möglichkeit, dass ein durch MALP-2-vorstimuliertes Immunsystem, unter anderem aufgrund der erhöhten Anzahl an Effektorzellen des angeborenen Immunsystems (3.1), B16-F10-Melanomzellen vor und während ihrer Absiedelung verstärkt bekämpfen könnte, wurde in weiteren Versuchen getestet.

Basierend auf den Untersuchungen zur pulmonalen Immunstimulation (3.1) erfolgte die Melanomzellinjektion (2.2.1.5) 24 h nach intratrachealer MALP-2-Instillation (2.2.1.3). Dies war der Zeitpunkt, zu dem in den Vorexperimenten die meisten Immunzellen/Leukozyten ins pulmonale Gewebe eingewandert sind (3.1). Der Vergleichsgruppe wurde wieder physiologische NaCl-Lösung als Vehikelkontrolle instilliert.

Überraschenderweise zeigten sich auch hier keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl der oberflächlichen Lungenmetastasen (p=0,26) oder bezüglich des Lungengewichtes (p=0,11; Abb.3-5). In der mit NaCl-Lösung behandelten Versuchsgruppe (n=5) wurden im Mittel 299 ± 111 SD oberflächliche pulmonale Metastasen gezählt, das Lungengewicht betrug im Mittel 156 mg ± 10 mg SD. In der mit 0,5 µg MALP-2-stimulierten Versuchsgruppe (n=8) wurden im Mittel 394 ± 155 SD pulmonale Metastasen gezählt, das Lungengewicht betrug im Mittel 178 mg ± 26 mg SD. Auch eine Wiederholung des Experimentes mit gering erhöhten Tierzahlen (MALP-2 n=9; NaCl n=7) bestätigte, dass kein Unterschied in der Anzahl oberflächlicher Metastasen (p=0,46), sowie kein Unterschied im Lungengewicht (p=0,49) bestand. In der MALP-2-stimulierten Gruppe (n=9) wurden 229 ± 71 SD pulmonale Metastasen gezählt, das Lungengewicht betrug 162 mg ± 22 mg SD. In der NaCl-Kontrollgruppe (n=7) wurden 198 ± 86 SD pulmonale Metastasen gezählt, das Lungengewicht betrug 155 mg ± 14 mg SD.

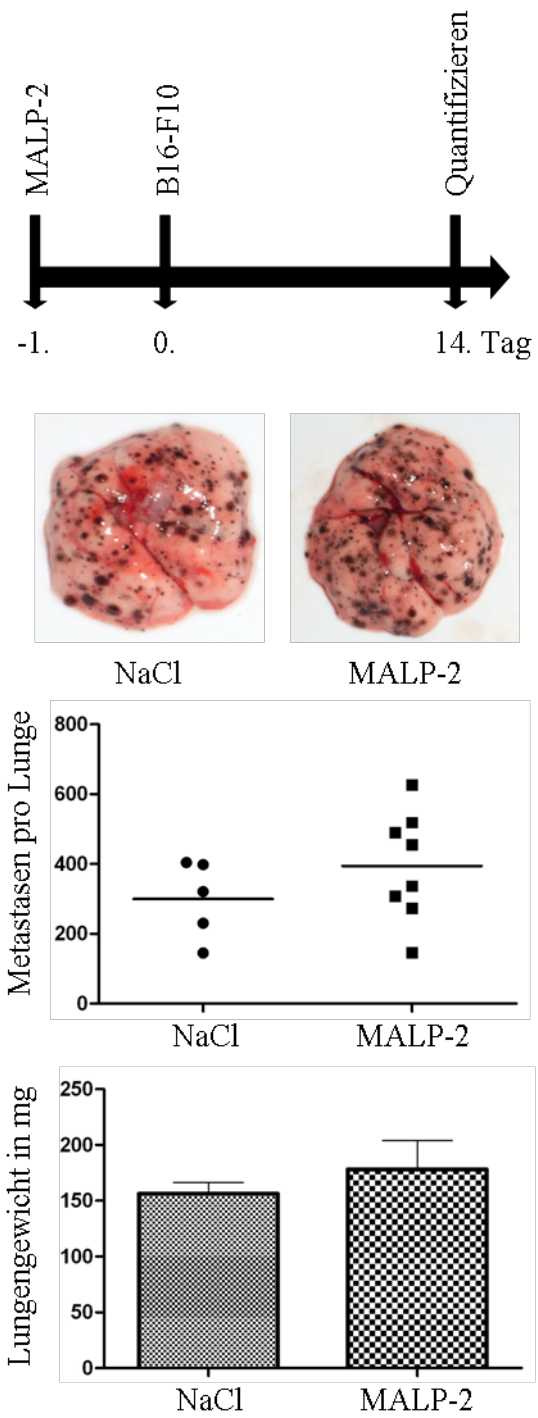

Abb. 3-5: MALP-2-Vorstimulation und Auswirkung auf pulmonale Melanommetastasen. Die Instillation mit 0,5 µg MALP-2 (n=8) oder 0,9% NaCl als Vehikelkontrolle (n=5) erfolgte 24 h vor Injektion von $2{,}5 \times 10^5$ B16-F10-Melanomzellen. 14 Tage nach Melanomzellinjektion wurden die oberflächlichen Metastasen gezählt und die Lungen gewogen. Die Daten sind als Mittelwert +SD dargestellt. Repräsentative Bilder der Lungen jeder Versuchsgruppe sind abgebildet.

Das unerwartete Ergebnis, dass die durch MALP-2 induzierte erhöhte Anzahl pulmonaler Leukozyten nicht zu erkennbaren Änderungen der hämatogen induzierten Lungenmetastasen führte, gab Anlass zu den folgenden Fragen:

A.) Führt die pulmonale Vorstimulation mit MALP-2, beispielsweise durch Induktion von Adhäsionsmolekülen, zu verstärkter Adhäsion und damit erhöhtem Arrest zirkulierender Tumorzellen in der Lunge?

B.) Kann MALP-2 die Effizienz von Leukozyten, B16-F10-Melanomzellen abzutöten, verändern?

Die folgenden Experimente wurden durchgeführt, um diese Fragen zu klären.

3.5. Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle nach MALP-2-Instillation

In der Literatur wurde beschrieben, dass einige Tumorzellen Integrine exprimieren können, die eine hämatogene und lymphogene Metastasierung unterstützen (Schadendorf et al. 1993; Johnson 1999). Integrine vermitteln die Adhäsion an Endothelzellen durch Bindung an Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie, beispielsweise VCAM-1 (CD106) und ICAM-1 (CD54), die auf Endothelzellen exprimiert werden können. Um die Hypothese zu überprüfen, dass intratracheale MALP-2-Stimulation *in vivo* zu verstärkter Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle führt, wurde die Expression von VCAM-1 und ICAM-1 auf Endothelzellen der Lunge untersucht.

Durch immunhistochemische Untersuchung von Lungengewebe (2.2.3.5) 24 h nach Instillation physiologischen NaCl-Lösung konnte gezeigt werden, dass VCAM-1 schwach und nur in wenigen Lungengefäßen exprimiert wird (Abb.3-6a). Im Gegensatz dazu waren 24 h nach MALP-2-Instillation sowohl die Anzahl der VCAM-1 exprimierenden Gefäße als auch die Expressionsstärke deutlich erhöht (Abb. 3-6a). Eine FACS-basierte Untersuchung anhand einer Einzelzellsuspension der Lunge (2.2.2.5.1) bestätigte die histologische Beobachtung. Hier war 24 h nach MALP-2-Instillation die Anzahl der VCAM-1 exprimierenden Endothelzellen um den Faktor 2,6 im Vergleich zu mit physiologischer NaCl-Lösung instillierten Tieren erhöht ($p<0,01$; $n=3$; Abb. 3-6b,c). Auch die mittlere Fluoreszenzintensität

(MFI) als Maß für die VCAM-1-Expressionsstärke stieg nach MALP-2-Instillation signifikant um 28% an ($p<0,05$;n=3; Abb.3-6c).

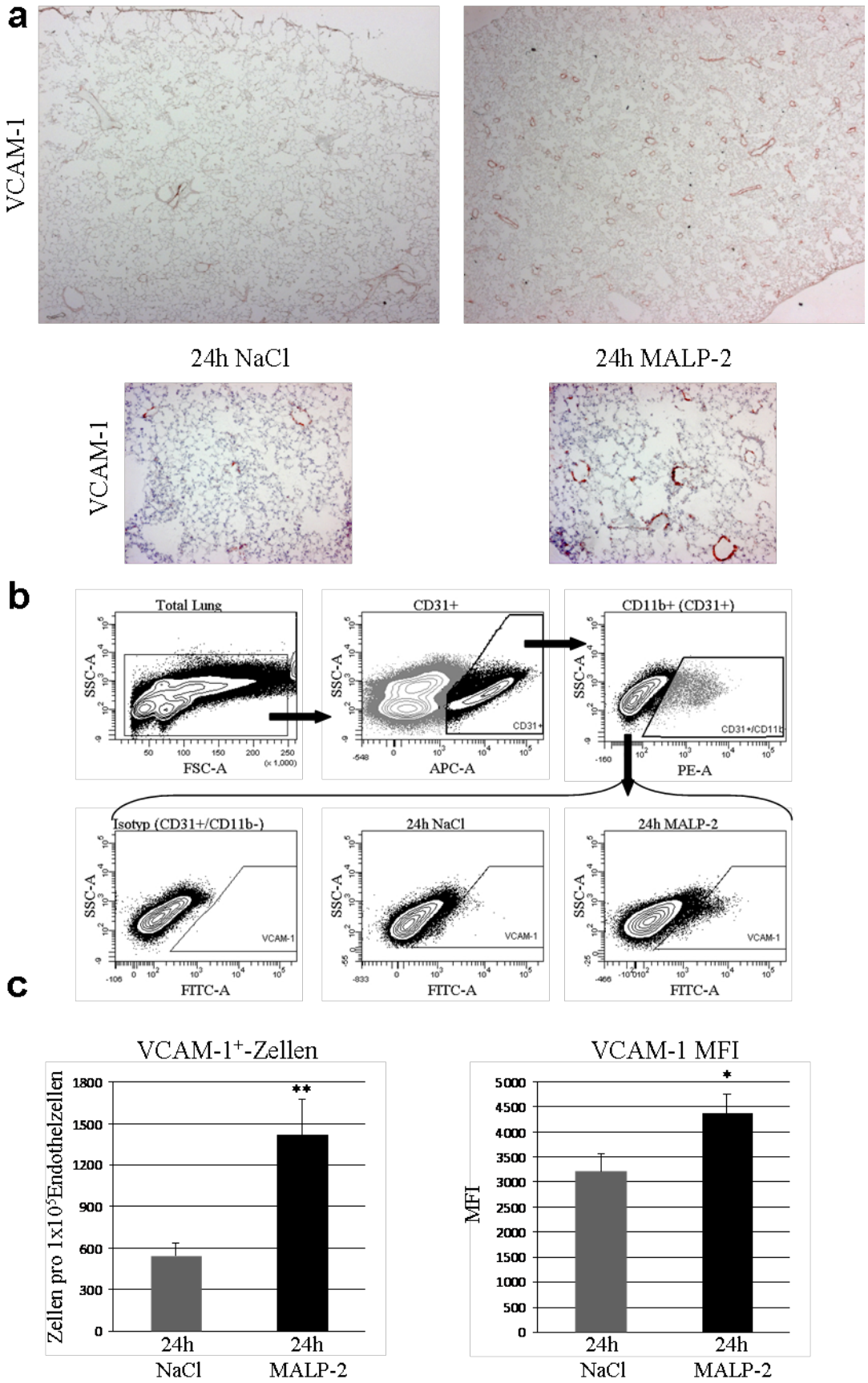

Abb. 3-6: VCAM-1-Expression in der Mauslunge 24 h nach MALP-2-Instillation. (a,b,c) C57/BL/6J-wt-Mäuse wurden intratracheal mit 0,5 µg MALP-2 oder 0,9% NaCl als Vehikelkontrolle instilliert. 24 h nach Instillation wurde VCAM-1 (CD106) immunhistochemisch an 5 µm dicken Gefrierschnitten detektiert. **(a)** Immunhistochemische Darstellung VCAM-1-exprimierender Endothelzellen in 2,5x Vergrößerung (obere Bilder) und 10x Vergrößerung (untere Bilder). **(b, c)** Mäuse wurden, wie oben beschrieben, behandelt. Das Lungengewebe wurde mittels Liberase-Cl zu einer Einzelzellsuspension verdaut und anschließend mittels FACS-Analyse untersucht. **(b)** Die Bilder stellen repräsentativ dar, wie die Endothelzellfraktion ($CD31^+$/CD11b) mittels FACS identifiziert wurde. Außerdem sind repräsentative *Scatter-Plots* des VCAM-1-Nachweises auf Endothelzellen abgebildet. **(c)** In der linken Grafik ist die Anzahl der VCAM-1 exprimierenden Endothelzellen; 24 h nach MALP-2-Instillation vs Vehikelkontrolle dargestellt. In der rechten Grafik ist die mittlere Fluoreszenzintensität (als Maß für die Expressionsstärke) der VCAM-1 exprimierenden Endothelzellen 24 h nach MALP-2-Instillation im Vergleich zur Vehikelkontrolle dargestellt. Die Daten sind als Mittelwert +SD dargestellt (n=3). Signifikante Unterschiede bezogen auf die Vehikelkontrolle sind mit Sternchen angezeigt: *- $p<0,05$; **- $p<0,01$.

Die immunhistologische Untersuchung von ICAM-1 hingegen zeigte in Kontrolltieren bereits eine hohe basale Expression auf allen Lungenendothelzellen (Abb.3-7a). Nach MALP-2-Stimulation war die ICAM-1-Expression gleichermaßen hoch. Da sich schwache bis mittlere Expressionsunterschiede bei hoher basaler Expressionsstärke mittels immunhistochemischer Methoden nur unzureichend quantifizieren lassen, erfolgte die Quantifizierung durch FACS-Analyse einer Einzelzellsuspension aus Lungengewebe (2.2.2.5.1). Die Endothelzellfraktion der Lunge (CD31+/Cd11b-) macht etwa 20% sämtlicher Lungenzellen bei unstimulierten Tieren aus. Nahezu alle dieser Endothelzellen exprimierten ICAM-1 sowohl in MALP-2-stimulierten (98,7%) als auch in unstimulierten Tieren (98,7%; n=3; p=0,91; Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu war die ICAM-1-Expressionsstärke der Endothelzellen, dargestellt durch die mittlere Fluoreszenzintensität, in MALP-2-stimulierten Tieren im Vergleich mit unstimulierten Tieren um 20% signifikant erhöht ($p<0,05$; n=3; Abb. 3-7b,c)

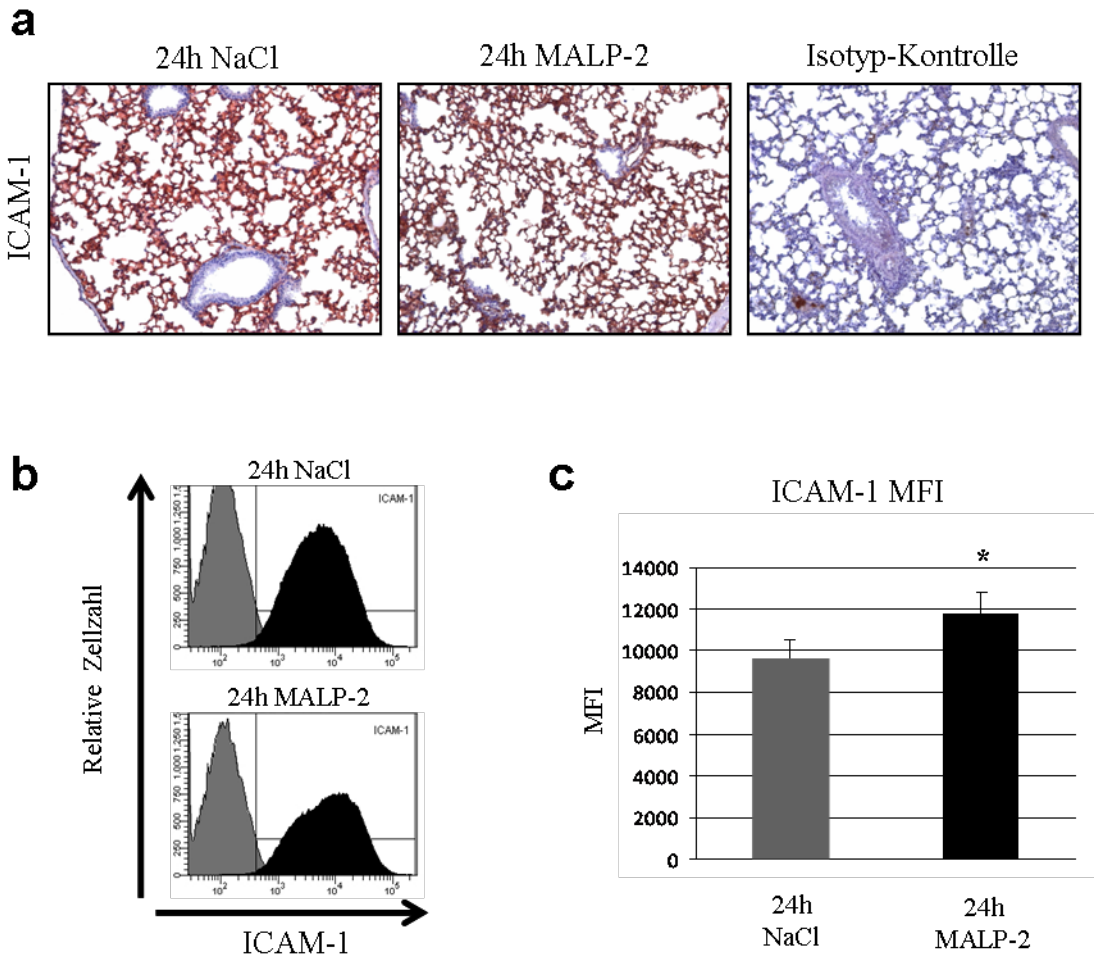

Abb. 3-7: ICAM-1-Expression in der Mauslunge 24 h nach MALP-2-Instillation. (a) C57/BL/6J-Mäuse wurden intratracheal mit 0,5 µg MALP-2 oder 0,9% NaCl-Lösung als Vehikelkontrolle instilliert. 24 h nach Instillation wurde ICAM-1 (CD54) immunhistochemisch an 5 µm dicken Gefrierschnitten detektiert. **(b, c)** C57/BL/6J-Mäuse wurden wie unter (a) beschrieben behandelt, das Lungengewebe wurde zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet und anschließend mittels FACS-Analyse untersucht. **(b)** Die Abbildungen zeigen repräsentative Scatter-Plots, dargestellt ist die ICAM-1-Fluoreszenz (FITC) der Endothelzellfraktion ($CD31^+/CD11b^-$) 24 h nach MALP-2-Instillation im Vergleich zur Vehikelkontrolle. **(c)** Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (als Maß für die Expressionsstärke) der ICAM-1 exprimierenden Endothelzellen 24 h nach MALP-2-Instillation im Vergleich zur Vehikelkontrolle. Die Daten sind als Mittelwert +SD dargestellt (n=3). Signifikante Unterschiede bezogen auf die Vehikelkontrolle sind mit Sternchen angezeigt: *- $p<0,05$.

3.6. MALP-2 führt *in vitro* nicht direkt zur Steigerung der VCAM-1-Expression auf HUVEC

Manche Endothelzellen können TLR2/6 exprimieren. Diese Eigenschaft wurde auch für humane Endothelzellen der Nabelschnurvenen (HUVEC, *human umbilical vein endothelial cells*) beschrieben (Grote et al. 2010). Um zu ergründen, ob die durch MALP-2 bewirkte VCAM-1-Expressionssteigerung auch direkt über Stimulation des TLR2/6 vermittelt werden kann, wurden HUVECs in Anwesenheit oder Abwesenheit von MALP-2 (100 ng/ml) kultiviert. Als Positivkontrolle wurden HUVECs mit 25 ng/ml TNFα inkubiert (2.2.2.6). Nach 24 h Inkubationszeit erfolgte die Fluoreszenzmarkierung von VCAM-1 wie unter 2.2.2.6.1 beschrieben. Stimulation mit MALP-2 führte, im Gegensatz zur TNFα-Stimulation, nicht zur Erhöhung der VCAM-1-Expression (Abb. 3-8). Dies lässt vermuten, dass die VCAM-1-Induktion auf Endothelzellen der Lunge durch MALP-2 indirekt ist.

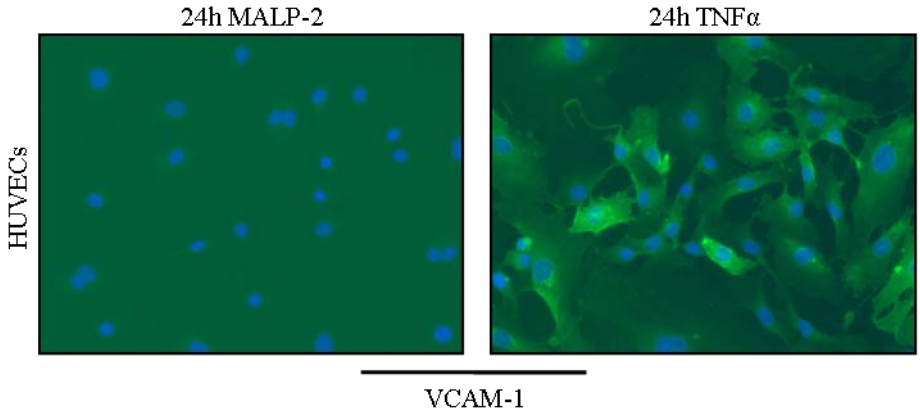

Abb. 3-8: VCAM-1-Expression auf HUVECs nach Stimulation mit MALP-2 oder TNFα. Kultivierte Endothelzellen (HUVEC) wurden mit 100 ng/ml MALP-2 oder 25 ng/ml TNFα für 24h inkubiert. Anschließend wurde die VCAM-1-Expression durch Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI.

3.7. Expression von Adhäsionsmolekülen auf B16-F10-Melanomzellen und *in-vitro*-Adhäsion an VCAM-1

Integrine sind wichtig für die Interaktion zirkulierender Zellen mit endothelialen Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1. Die Bindung an VCAM-1 wird vor allem durch VLA-4 (*Very-Late-activation Antigen-4*), einem Dimer aus den Integrin-Untereinheiten α4 (CD49d) und β1 (CD29), vermittelt.

ICAM-1 bindet vor allem an LFA-1 (*Lymphocyte-Function-Asociated-Antigen-1*), das normalerweise von T-Zellen, B-Zellen, PMN und Makrophagen exprimiert wird. LFA-1 ist zusammengesetzt aus der αL-Untereinheit CD11a und der β2-Untereinheit CD18.

Durch Fluoreszenzmarkierung dieser Integrin-Untereinheiten (2.2.2.5.4) konnte gezeigt werden, dass weder die αL- noch die β2-Untereinheit auf B16-F10-Melanomzellen exprimiert wird (Abb.3-9b). Im Gegensatz hierzu werden die Untereinheiten des VLA-4, α4 und β1, stark von B16-F10-Melanomzellen exprimiert (Abb.3-9a). Diese Beobachtung legt nahe, dass die Tumorzelladhäsion im Kapillarbett der Lunge vor allem durch die VCAM-1/VLA-4-Interaktion vermittelt wird.

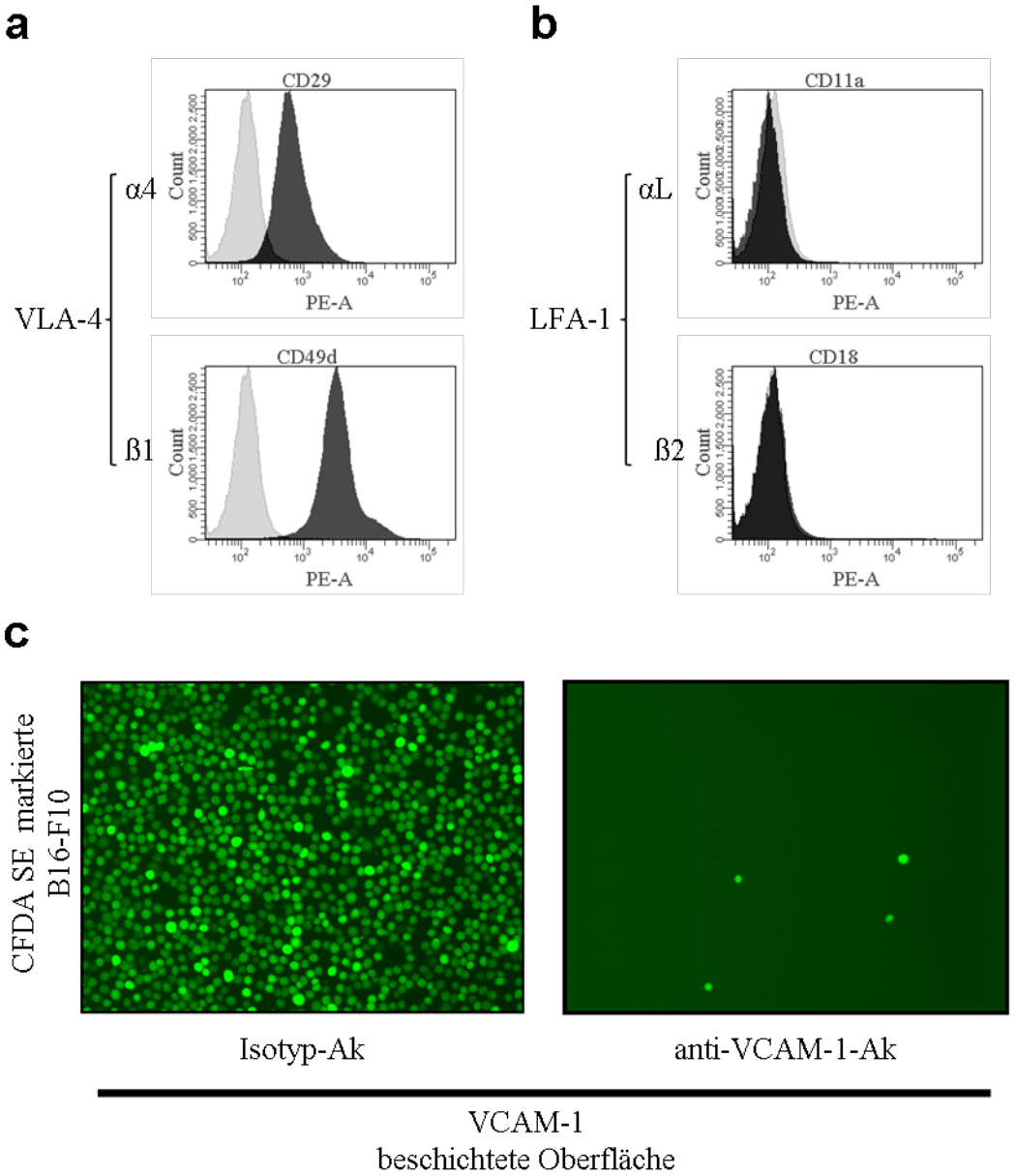

Abb. 3-9: Integrin-Expression auf B16-F10-Melanomzellen und *in-vitro*-Adhäsion an VCAM-1. (a, b) Die Expression der Integrinuntereinheiten wurde auf B16-F10-Melanomzellen mittels FACS-Analyse untersucht. Die Abbildungen zeigen repräsentative *Scatter-Plots*. Die angegebenen Integrine, hier schwarz dargestellt, wurden durch fluoreszenzmarkierte Antikörper im PE-Kanal detektiert. Die Isotyp-Kontrolle ist grau dargestellt. **(a)** Die Integrine α4 und β1 bilden zusammen den Integrinrezeptor VLA-4 und werden auf B16-F10-Melanomzellen stark exprimiert. **(b)** Der Integrinrezeptor LFA-1 bestehend aus Integrin αL und β2 wird nicht auf B16-F10-Melanomzellen exprimiert. **(c)** CFSE-B16-F10-Melanomzellen konnten *in vitro* für 3 min an eine mit VCAM-1 beschichtete Oberfläche adhärieren. Anschließend wurden nicht adhärierte Zellen abgewaschen. Repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Versuchen sind dargestellt. Im linken Bild erfolgte die Adhäsion in Anwesenheit von 10 µg/ml eines Isotyp-Antikörpers. Im rechten Bild erfolgte die Adhäsion in Anwesenheit von 10 µg/ml eines funktionsblockierenden VCAM-1-Antikörpers.

Um diese Annahme zu erhärten, wurde die Adhäsionsfähigkeit der B16-F10-Melanomzellen an ein VCAM-1/Fc-Fusionsprotein *in vitro* geprüft, indem CFSE-B16-F10-Melanomzellen für 3 min auf einer mit VCAM-1 beschichteten Oberfläche inkubiert wurden (2.2.2.4). Nach Inkubation der CFSE-B16-F10-Melanomzellen mit der mit VCAM-1 beschichteten Oberfläche konnte eine eindrucksvolle Adhäsion beobachtet werden (Abb. 3-9c).
Durch Zugabe eines funktionsblockierenden VCAM-1-Ak wurde die VCAM-1/VLA-4-Interaktion spezifisch blockiert. Dadurch konnte die Adhäsion der B16-F10-Melanomzellen komplett unterbunden werden (Abb.3-9c).

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass eine verstärkte Expression von VCAM-1 auf Endothelzellen der Lunge nach MALP-2-Instillation zu einer verstärkten Adhäsion von B16-F10-Melanomzellen in der Lunge beitragen könnte.

3.8. Das frühe Schicksal von B16-F10-Melanomzellen *in vivo*

Die unter 3.4 beschriebenen Metastasierungsversuche zeigen, dass eine Vorstimulation des pulmonalen Immunsystems durch intratracheale Instillation von MALP-2 zu keiner signifikanten Änderung bezüglich der Anzahl der Metastasen führt. Bei diesen Versuchen wurde die Metastasierung zu einem späten Zeitpunkt, das heißt 14 Tage nach Tumorinokulation, untersucht.
Im Folgenden sollte getestet werden, ob in den ersten Stunden nach Tumorinokulation eine Beeinflussung der Metastasierung durch die MALP-2-Stimulation möglich ist. Insbesondere, da Tumorzellen in den ersten Minuten nach Injektion bereits das pulmonale Kapillarbett erreichen, dort an das Lungenendothel adhärieren und anschließend innerhalb der ersten Stunden nach Tumorzellinjektion durch die Zellen des angeborenen Immunsystems getötet werden können, erschien die Untersuchung sehr früher Zeitpunkte sinnvoll.

Um das Schicksal der Melanomzellen in den ersten Stunden nach Tumorzellinjektion nachvollziehen zu können, wurden GFP-exprimierende B16-F10-Melanomzellen (GFP-B16-F10-Melanomzellen), die aufgrund ihrer Fluoreszenzeigenschaften von normalem Lungengewebe unterschieden werden können, verwendet (2.2.1.7). Die Anzahl der sich in der Lunge befindenden GFP-B16-F10-Melanomzellen wurde 1 h und 5 h nach Tumorzellinjektion in Mäusen untersucht, die 24 h vor Tumorzellinjektion mit MALP-2

vorstimuliert wurden (Abb. 3-10a). Als Kontrollgruppe wurden mit NaCl-Lösung instillierte Tiere verwendet.

Zu diesen Zeitpunkten sind die Melanomzellen bereits an die Endothelien des Kapillarbetts adhäriert. Die beiden Zeitpunkte wurden ausgewählt, um mögliche dynamische Unterschiede erfassen zu können. Die Untersuchung erfolgte mittels FACS-Analyse einer Einzelzellsuspension aus Lungengewebe, indem pro Tier $3x10^6$ Lungenzellen ausgewertet wurden (2.2.2.5.2). Zusätzlich erfolgte die Auswertung des Versuches durch histologische Quantifizierung der GFP-B16-F10-Melanomzellen am Gewebeschnitt (2.2.1.7).

In den mit MALP-2-vorstimulierten Tieren und gleichfalls in den mit NaCl-Lösung instillierten Kontrolltieren konnte innerhalb der ersten Stunden nach Tumorzellinjektion eine deutliche Abnahme der Tumorzellzahl beobachtet werden.

In den Lungen der mit MALP-2-vorstimulierten Tiere konnten 1h nach Tumorzellinjektion, mittels FACS-Analyse im Durchschnitt 11.319 (±2.225 SD) GFP-B16-F10-Melanomzellen nachgewiesen werden. Nach 5 h waren durchschnittlich nur noch 5.659 (±1.330 SD) GFP-B16-F10-Melanomzellen vorhanden. In den Lungen der mit NaCl-Lösung vorbehandelten Tiere konnten 1 h nach Tumorzellinjektion im Durchschnitt 12.996 (±2.226 SD) GFP-B16-F10-Melanomzellen nachgewiesen werden, nach 5 h waren durchschnittlich nur noch 4.848 (±1.390 SD) GFP-B16-F10-Melanomzellen vorhanden. Signifikante Unterschiede zwischen mit MALP-2-vorstimulierten Tieren und den mit NaCl-Lösung vorbehandelten Tieren bestanden weder nach 1 h noch nach 5 h (n=3; Abb. 3-10b).

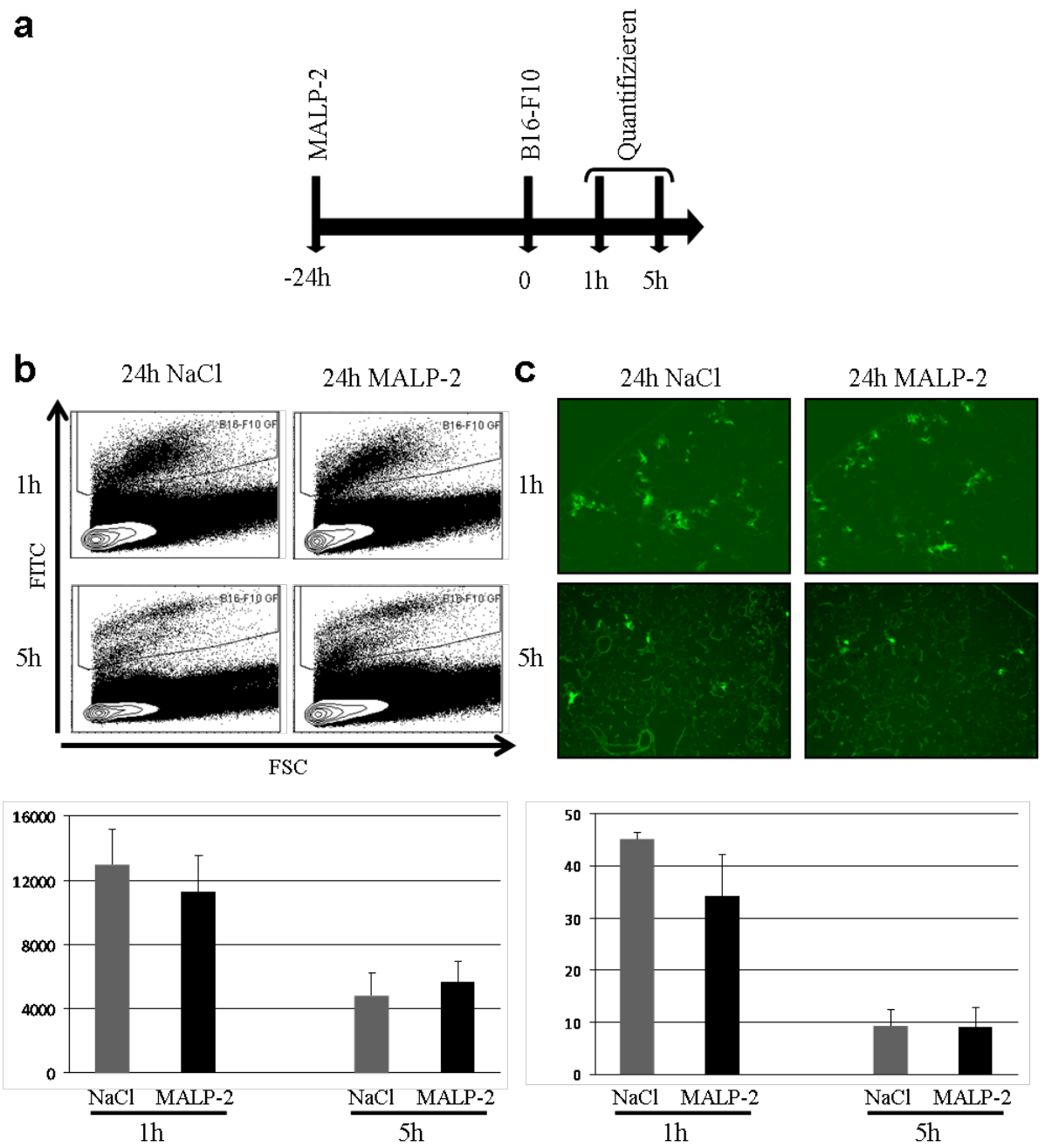

Abb. 3-10: Das frühe Schicksal von GFP-B16-F10-Melanomzellen. (a) Schematische Abbildung des Versuchsaufbaus. Die Instillation mit 0,5 µg MALP-2 (n=3) oder 0,9% NaCl-Lösung als Vehikelkontrolle (n=3) erfolgte 24 h vor Injektion von 10^6 GFP-B16-F10-Melanomzellen. Nach 1 h und nach 5 h wurden die GFP-B16-F10-Melanomzellen mittels **(b)** FACS-Analyse einer Einzelzellsuspension aus Lungengewebe oder **(c)** mittels fluoreszenzmikroskopischer Evaluation von Gewebeschnitten quantifiziert. Repräsentative *Scatter-Plots* bzw. Gewebeschnitte wurden abgebildet. Die Daten sind als Mittelwert +SD dargestellt.

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse anhand von Gefrierschnitten der Lungen bestätigte die mittels FACS-Analyse gewonnenen Ergebnisse (Abb. 3-10c). Die Anzahl, der durch ihre Eigenfluoreszenz erkennbaren, GFP-B16-F10-Melanomzellen sank in NaCl-behandelten

Tieren von 44,3/mm² (±1,2 SD) 1 h nach Tumorzellinjektion auf 9,2/mm² (±3,1 SD) 5 h nach Tumorzellinjektion ab. In den vor Tumorinjektion mit MALP-2-stimulierten Tieren sank die Anzahl der GFP-B16-F10-Melanomzellen von 34,3/mm² (±7,8 SD) 1 h nach Tumorzellinjektion auf 9,1/mm² (±3,7 SD) 5 h nach Tumorzellinjektion ab. Signifikante Unterschiede zwischen den mit MALP-2-vorstimulierten und den Kontrolltieren bestanden auch hier nicht (n=3 Mäuse in jeder Gruppe).

3.9. *In-vitro*-Interaktion MALP-2-aktivierter Immunzellen mit B16-F10-Melanomzellen

Auch wenn in unseren „Kurzzeit"-Metastasierungsexperimenten (3.8) kein Hinweis auf verstärktes „Homing" der Melanomzellen in Lungen der MALP-2-vorstimulierten Tiere gefunden werden konnte, kann, insbesondere da der Großteil von injizierten B16-F10-Melanomzellen innerhalb der ersten 100 Minuten nach Injektion eliminiert wird (Grundy et al. 2007), ein verstärktes „Homing" in Bereichen mit erhöhter VCAM-1-Expression durch eine erhöhte „Tötungseffizienz" von Immunzellen in den mit MALP-2-vorstimulierten Tieren verschleiert werden.

Um diese Hypothese, welche die beobachtete Netto-Auswirkung der MALP-2-Vorstimulation auf die Metastasierung erklären könnte, zu überprüfen, wurden die folgenden Versuche durchgeführt.

Dabei wurde die Fähigkeit von Immunzellen, B16-F10-Melanomzellen *in vitro* zu töten, in Abhängigkeit einer MALP-2-Stimulation untersucht.

Die Messung der zellvermittelten Zytotoxität erfolgte hierbei durch einen FACS-basierten Versuchsaufbau (2.2.2.3). Zuvor mit CFDA SE fluoreszenzmarkierte B16-F10-Melanomzellen (CFSE-B16-F10-Melanomzellen) wurden hierfür als Zielzellen mit unmarkierten Immunzellen als Effektorzellen co-inkubiert und wie in Abb. 3-10a dargestellt identifiziert.

In einem ersten Versuch wurde die Fähigkeit von Immunzellen, die aus der Milz von Mäusen isoliert worden waren (2.2.2.1.6), B16-F10-Melanomzellen zu töten, untersucht. Isolierte Milzzellen enthalten Makrophagen, dendritische Zellen, T-Zellen und Natürliche Killerzellen. Alle diese Zelltypen spielen eine wichtige Rolle bei der Tumorbekämpfung. Isolierte Milzzellen wurden mit CFSE-B16-F10-Melanomzellen für 4 h im Effektorzell/Zielzell-Verhältnis (E/T-Verhältnis) von 5:1 und 20:1 co-inkubiert.

Die Anzahl der toten CFSE-B16-F10-Melanomzellen stieg bei Inkubation im E/T-Verhältnis von 5:1 im Vergleich zu CFSE-B16-F10-Melanomzellen alleine (3,93% tote Zellen) um 51,8% auf 5,96% ($p<0,05$) und bei einem E/T-Verhältnis von 20:1 um 99,6% auf 7,85% ($p<0,01$) an.

Bei zusätzlicher Stimulation der Immunzellen mit 5 ng/ml MALP-2 war beim E/T-Verhältnis von 5:1 keine signifikante Steigerung der zellvermittelten Zytotoxizität im Vergleich zu unstimulierten Milzzellen meßbar. Bei einem höheren E/T-Verhältnis von 20:1 konnte allerdings durch MALP-2-Stimulation der Milzzellen eine signifikante Steigerung ($p<0,05$; $n=6$) der zellvermittelten Zytotoxizität um 24,8%, von 7,85% toten Zielzellen bei unstimulierten auf 9,8% toten Zielzellen bei MALP-2-stimulierten Milzzellen, nachgewiesen werden (Abb. 3-11b).

Wir konnten zeigen, dass Milzzellen an sich in unserem Modellsystem eine schwache zellvermittelte Zytotoxizität gegen CFSE-B16-F10-Melanomzellen zeigen. Die Steigerung der zellvermittelten Zytotoxizität durch MALP-2 im Vergleich mit unstimulierten Milzzellen ist allenfalls gering.

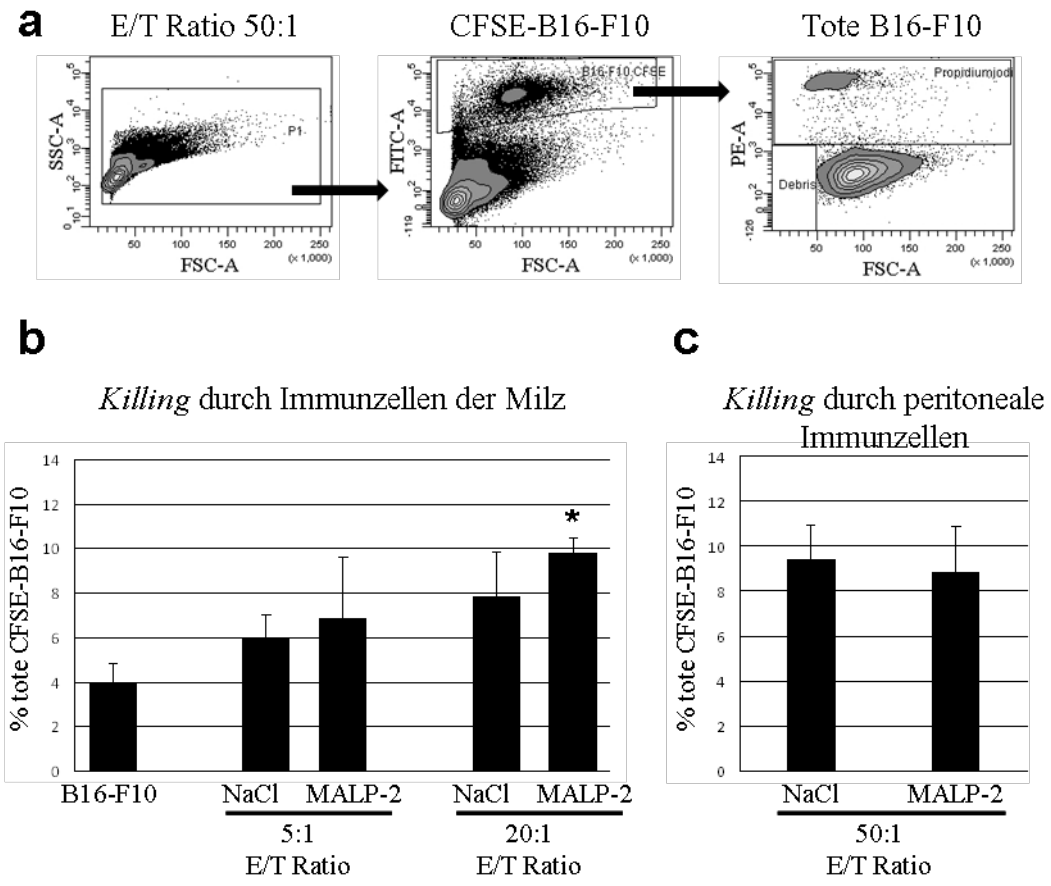

Abb. 3-11: Zellvermittelte Zytotoxizität von Immunzellen gegen B16-F10-Melanomzellen nach MALP-2-Stimulation. (a) Die Abbildungen zeigen repräsentative *Scatter-Plots*. CFSE-B16-F10-Melanomzellen (*Target*-Zellen) wurden aus dem Zellgemisch des *Killingassays* mit Hilfe der Fluoreszenz im FITC-Kanal identifiziert.

Tote Zellen wurden durch Propidiumjodid-Markierung im PE-Kanal identifiziert. **(b)** Isolierte Milzzellen wurden im E/T-Verhältnis 5:1 und 20:1 in An- oder Abwesenheit von 5 ng/ml MALP-2 für 4 h mit CFSE-B16-F10-Melanomzellen co-inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion der toten CFSE-B16-F10-Melanomzellen FACS basiert (n=6). **(c)** Durch intraperitoneale MALP-2-Injektion angelockte peritoneale Immunzellen wurden 24 h nach Injektion isoliert und mit CFSE-B16-F10-Melanomzellen im E/T-Verhältnis 50:1 co-inkubiert. Als Kontrollgruppe wurden peritoneale Immunzellen nach Injektion 0,9%-iger NaCl-Lösung verwendet. Nach 12 h wurde der Prozentsatz toter CFSE-B16-F10-Melanomzellen bestimmt (n=3). **(b, c)** Die Daten sind als Mittelwert +SD dargestellt. Signifikante Unterschiede bezogen auf die Vehikelkontrolle sind mit Sternchen angezeigt: *-p<0,05

Die physiologischen Gegebenheiten in der Lunge *in vivo* stellen sich allerdings komplexer dar. Um diese Gegebenheiten *in vitro* zu simulieren, wurden aus MALP-2-stimulierten Mäusen pulmonale Immunzellen der Lunge isoliert. Unglücklicherweise konnten für den Einsatz in *Killing*-Experimenten nicht genügend vitale und repräsentative Immunzellen gewonnen werden. Isolation pulmonaler Immunzellen mittels bronchoalveolarer Lavage resultierte in einer zu geringen Gesamtmenge an Immunzellen. Isolation mittels Liberaseverdau der Lungen resultierte in einem zu hohen Anteil avitaler Zellen. Isolation der Immunzellen aus Lungen mittels Medimachine (Mechanische Separation) resultierte ebenfalls in nicht ausreichenden Mengen an Immunzellen, insbesondere die PMN- und Makrophagen-Populationen waren stark unterrepräsentiert.

Aus diesem Grund wurden Immunzellen, die 24 h nach intraperitonealer Injektion von 3 µg MALP-2 (oder NaCl als Vehikelkontrolle) in die Peritonealflüssigkeit eingewandert waren, isoliert (2.2.2.1.8) und auf ihre Fähigkeit, CFSE-B16-F10-Melanomzellen bei einem E/T-Verhältnis von 50:1 zu töten, untersucht (2.2.2.3).

Nach zwölfstündiger Co-Inkubation von CFSE-B16-F10-Melanomzellen mit peritonealen Immunzellen, bei einem E/T-Verhältnis von 50:1, konnten wir keinen Unterschied zwischen der Tötungseffizienz von Immunzellen aus den mit MALP-2 injizierten Tieren im Vergleich zu den mit NaCl-Lösung injizierten Tieren beobachten (Abb. 3-11c). Mit durch MALP-2-Injektion induzierten Immunzellen konnten im Mittel 8,9% ± 1,99 SD tote CFSE-B16-F10-Melanomzellen erreicht werden; mit Immunzellen der Kontrollgruppe wurden im Mittel 9,4% ± 1,54 SD tote CFSE-B16-F10-Melanomzellen gefunden (n=3; p=0,75).

4. Diskussion

Der TLR2/6-Agonist MALP-2 ist in der Lage, Zellen des Immunsystems stark zu stimulieren. In früheren Studien wurde beschrieben, dass die lokale Applikation von MALP-2 durch Stimulation der angeborenen und erworbenen Immunabwehr zu einer Reduktion des Tumorwachstums in einem Maus-Modell für Pankreaskarzinome (Schneider et al. 2004), sowie zu einer Reduktion der Metastasenbildung in einem Ratten-Modell für Mammakarzinome führt (Shingu et al. 2003).

Vor diesem Hintergrund scheint MALP-2 eine Erfolg versprechende Substanz zu sein, mit deren Hilfe auch Melanommetastasen bekämpft werden könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein murines Metastasierungsmodell für pulmonale Melanommetastasierung verwendet, in dem MALP-2 zur Immunstimulation intratracheal verabreicht wurde.

4.1. MALP-2 und Leukozytenrekrutierung in die Mauslunge

Die lokale Behandlung mit dem TLR2/6-Agonisten MALP-2 führt, wie bereits gezeigt wurde, zur Einwanderung von Leukozyten an den Ort der Verabreichung (Deiters und Mühlradt 1999; Lührmann et al. 2002a; Deiters et al. 2004). Daten an Mäusen bezüglich des Leukozyteneinstroms in die Lunge nach intratrachealer Instillation von MALP-2 waren bisher nur für das luftleitende Kompartiment, das durch die bronchoalveoläre Lavage repräsentiert wird, gewonnen worden (Reppe et al. 2009). Insbesondere histologisch gewonnene Daten an Mäusen, die alle Lungenkompartimente, also luftleitendes Kompartiment, Lungeninterstitium und den Gefäßpool der Lunge mit einschließen, fehlten bisher. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass intratracheale Instillation mit 0,5 µg MALP-2 zu einem ausgeprägten Leukozyteneinstrom in das Lungenparenchym führt. Das Maximum des Leukozyteneinstroms war nach 24 h messbar. Das Infiltrat bestand zum größten Teil aus PMN und Makrophagen (3.1).

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Daten, die zuvor in der Ratte beobachtet wurden (Lührmann et al. 2002a; Pabst et al. 2009).

Für das luftleitende System in Mäusen war 24 h nach MALP-2-Instillation zusätzlich zu der erhöhten Menge an PMN und Makrophagen ein signifikanter Anstieg der Gesamt-T-Lymphozytenzahlen in der bronchoalveolären Lavage (luftleitendes Kompartiment) beschrieben worden (Reppe et al. 2009). In dieser Arbeit konnten 24 h nach MALP-2

Instillation keine erhöhten Mengen $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Lymphozyten in der gesamten Lunge (bestehend aus luftleitendem Kompartiment + Lungeninterstitium+ Gefäßpool) feststellt werden, weder durch histologische Quantifizierung noch durch FACS-Analyse einer Einzelzellsuspension. Dies impliziert eine kompartimentspezifische Leukozytenrekrutierung nach intratrachealer Instillation von MALP-2, wie sie bereits in Ratten beschrieben wurde (Pabst et al. 2009).

4.2. Wirkung der MALP-2-Stimulation auf Metastasen

MALP-2 führt nach Instillation, wie bereits beschrieben, zu einem massiven Influx von Leukozyten, vornehmlich PMN und Makrophagen, in die Lunge von Mäusen.

Neben zytotoxischen T-Lymphozyten und NK-Zellen wird auch Makrophagen und PMN eine bedeutende Rolle bei der Tumorabwehr zugeschrieben. Manche Makrophagen sind in der Lage, Tumorzellen durch Antikörper-abhängige und durch Antikörper-unabhängige Mechanismen zu töten (te Velde und Figdor 1992; Griffith et al. 1999). In diesem Zusammenhang sind besonders Toll-like-Rezeptoren bedeutsam, denn TLR-stimulierte Makrophagen können eine direkte antitumorale Wirkung entfachen (Stary et al. 2007; Drobits et al. 2012). TLR-Agonisten können somit zur Induktion einer antitumoralen Wirkung von Makrophagen genutzt werden (Ruschmeyer et al. 1993; Buhtoiarov et al. 2007; Schön und Schön 2008). Außerdem ist MALP-2 in der Lage, durch die Aktivierung dendritischer Zellen das angeborene mit dem erworbenen Immunsystem zu verknüpfen (Weigt et al. 2003; Link et al. 2004).

Auch für neutrophile Granulozyten wurde beschrieben, dass sie antitumorale Wirkung entfalten können (Kresowik und Griffith 2009). Durch Generierung reaktiver Sauerstoffspezies sind sie in der Lage, Melanomzellen zu schädigen (Dissemond et al. 2003; Zivkovic et al. 2007). Stimulation durch MALP-2 führt nicht nur zu verstärkter Rekrutierung von PMN, sondern verstärkt auch den oxidativen Burst der PMN (Wilde et al. 2007).

In einem syngenen Maus-Modell für Pankreaskarzinome wurde berichtet, dass MALP-2, wenn es intratumoral injiziert wird, durch Aktivierung des angeborenen und des erworbenen Immunsystems zu einer Reduktion des Tumorwachstum von Panc02-Zellen und zu einem verlängerten Gesamtüberleben der Versuchstiere führt (Schneider et al. 2004). Diese an Mäusen gewonnenen Ergebnisse bezüglich der intratumoralen MALP-2-Injektion bei Pankreaskarzinomen scheinen auf den Menschen übertragbar zu sein (Schmidt et al. 2007).

Neben der intratumoralen Injektion konnte auch durch pulmonale Instillation von MALP-2 die Anzahl experimentell induzierter pulmonaler Mammakarzinommetastasen in Fischer-344-Ratten reduziert werden.

Im Hinblick auf diese Studien erscheint es erstaunlich, dass die pulmonale MALP-2-Instillation in der vorliegenden Arbeit trotz der Induktion eines erheblichen Influxes von PMN und Makrophagen in die Mauslungen (3.1), wenn überhaupt, nur einen begrenzten Einfluss auf die Anzahl der experimentellen Metastasen sowie die Tumormassen von B16-F10-Melanomzellen in immunkompetenten Mäusen aufweist (3.3, 3.4).

Zur Interpretation dieses Phänomens können die im Nachfolgenden aufgeführten Aspekte diskutiert werden:

4.2.1. Die MALP-2-Behandlung induziert keine spezifisch gegen B16-F10-Melanomzellen gerichtete Immunantwort

Schneider et al. konnten in ihren *in vivo* Studien zur intratumoralen MALP-2-Injektion in Pankreaskarzinome nach 21 Tagen nachweisen, dass sich um die Tumorzellen ein Infiltrat aus zytotoxischen T-Lymphozyten und NK-Zellen gebildet hatte (Schneider et al. 2004). In den vorliegenden Experimenten konnte in MALP-2-stimulierten Tieren hingegen kein verstärktes entzündliches Infiltrat beobachtet werden (3.3). Dies legt nahe, dass die durch MALP-2 induzierte Immunantwort nicht spezifisch gegen die B16-F10-Melanomzellen gerichtet war. Diese Auffassung wird durch eine kürzlich publizierte Arbeit bestätigt: hierbei konnte an bereits palpablen B16-F10-Melanomen gezeigt werden, dass auch nach fünfmal wiederholter, intratumoraler Injektion von 3 µg MALP-2 keine Reduktion des Größenwachstums oder des Gesamtüberlebens erreicht werden konnte (Stone et al. 2009). Ortsständig etablierte Tumoren entwickeln normalerweise eine komplexe, bindegewebige Mikroumgebung, durch die Tumorzellen einer Kontrolle durch das Immunsystem entgehen können (Mantovani et al. 2008). In dem in dieser Arbeit verwendeten B16-F10-Metastasierungsmodell erfolgte die MALP-2-Stimulation zu einem Zeitpunkt, zu dem die Tumorzellen noch keine komplexe Mikroumgebung etablieren konnten, zumal die erste Stimulation mit MALP-2 bereits 1 Tag nach Tumorzellinjektion erfolgte (3.3). Eine antitumorale Gesamtaktivität konnte aber auch hier nicht beobachtet werden. TLR2/6-Stimulation durch MALP-2 kann demnach in einigen Fällen als ein verstärkendes Adjuvans, nicht aber als spezifischer Induktor einer antitumoralen Aktivität wirken. Diese Vorstellung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass Immunzellen, die durch MALP-2 angelockt oder stimuliert wurden, in den durchgeführten *in-*

vitro-Killing-Assays keine oder fast keine verstärkte antitumorale Aktivität gegen B16-F10-Melanomzellen zeigten (3.9). Folglich ist auch nachvollziehbar, dass durch Stimulation des TLR2/6 die Immunreaktion gegen *per se* immunogene Tumoren verstärkt wird (Galanos et al. 2000), die Stimulation aber nicht zwangsweise zu einer Verstärkung der Immunreaktion gegen schwach immunogene syngene Tumoren führt. Letztere wurden im verwendeten Modell-System eingesetzt und sind aufgrund von *Immuno-editing*-Prozessen auch in natürlichen Tumoren beim Menschen zu finden.

4.2.2. Antitumorale Aktivität des angeborenen Immunsystems und *Timing*

Shingu und Mitarbeiter (2003) konnten zeigen, dass die Steigerung der antitumoralen Aktivität durch MALP-2 möglicherweise vom Zeitpunkt der Stimulation abhängt und durch das angeborene Immunsystem vermittelt wird. Intratracheal appliziertes MALP-2 konnte die Anzahl der Lungenmetastasen durch MAD106-Zellen in Fischer-344-Ratten nur reduzieren, wenn MALP-2 zusammen mit den Tumorzellen verabreicht wurde (Shingu et al. 2003). Wurde MALP-2 allerdings 1 oder 3 Tage später verabreicht, konnte keine Reduktion der Metastasenzahl beobachtet werden.

Shingu und Mitarbeiter (2003) machten den rasanten Einstrom von Makrophagen in die Lunge sowie das verstärkte Abtöten der Tumorzellen durch Makrophagen und NK-Zellen für die erhöhte antitumorale Aktivität verantwortlich. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden bei der vorliegenden Arbeit die Tumorzellen 24 h nach MALP-2-Stimulation, also zu einem Zeitpunkt, an dem bereits eine hohe Anzahl an Makrophagen und PMN in der Lunge präsent waren injeziert. Allerdings konnte keine Reduktion der Anzahl experimentell induzierter pulmonaler Metastasen nachwiesen werden (3.4).

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Situation insoweit komplexer ist, da der erhöhte Makrophagenspiegel an sich, unabhängig vom Zeitpunkt der MALP-2-Stimulation, nicht zwangsweise in der Lage ist, gegen Tumorzellen aktiv zu werden.

Diese Annahme wird durch zwei analoge, sich ergänzende *ex-vivo*-Experimente unterstützt. Die Experimente zeigen, dass Immunzellen, die aus einer MALP-2-stimulierten Umgebung stammen (Milz und Peritoneum), wenn überhaupt, nur eine leicht erhöhte zellvermittelte Zytotoxizität gegen Melanomzellen zeigen (3.9).

4.2.3. Beinflussbarkeit der Metastasierung von Melanomzellen nach TLR2/6-Stimulation

TLR2/6-Stimulation durch MALP-2 kann komplexe und pleiotrope Effekte an verschiedenartigen Zelltypen hervorrufen. Diese Effekte scheinen sich sogar teilweise antagonisieren zu können.

Es ist vorstellbar, dass eine potenziell durch MALP-2-Instillation induzierte antitumorale Aktivität immigrierter Leukozyten durch die verstärkte Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle und eine hierdurch verstärkte Tumorzelladhäsion maskiert werden könnte. Die Fähigkeit der Tumorzellen, hämatogene Metastasen zu bilden, korreliert mit der Fähigkeit, mit dem Gefäßendothel interagieren zu können. Für diese Zell-Zell-Interaktion können Tumorzellen Adhäsionsmoleküle nutzen, die normalerweise von Leukozyten für die Adhäsion an Endothelzellen und die folgende Extravasation in entzündetes Gewebe genutzt werden (Miles et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine pulmonale MALP-2-Stimulation zu einer deutlich verstärkten Expression von VCAM-1 und ICAM-1 auf den vaskulären Endothelien der Lunge führt (3.5). Die verstärkte Expression von Integrin-Rezeptoren ist wahrscheinlich für den Leukozyteneinstrom verantwortlich (Chin et al. 1997; Basit et al. 2006), könnte aber auch den pulmonalen Arrest zirkulierender Melanomzellen unterstützen.

Eine erhöhte Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen kann die Tumorzelladhäsion entweder durch direkte Bindung an β2-Integrine auf Tumorzellen verstärken (Wang et al. 2005) oder aber durch indirekte Bindung über PMN. PMN würden in diesem Fall über die von ihnen exprimierten β2-Integrine an ICAM-1 auf Endothelzellen und gleichzeitig an ICAM-1 auf Tumorzellen binden (Liang et al. 2005; Liang et al. 2008; Huh et al. 2010). In dem in dieser Arbeit genutzten Metastasierungsmodell hat die verstärkte ICAM-1-Expression nach MALP-2-Stimulation keine Relevanz für die Tumorzelladhäsion, da B16-F10-Melanomzellen, wie dargestellt, weder β2-Integrine noch ICAM-1 exprimieren (3.7). Eine verstärkte ICAM-1-Expression nach Immuntherapie mit TLR-Agonisten könnte aber bezogen auf andere Tumoren für die Tumorzelladhäsion relevant sein.

Anders verhält es sich bezüglich der vermehrten VCAM-1 Expression auf Endothelzellen nach MALP-2-Stimulation.

In dieser Arbeit konnte nachweisen werden, dass B16-F10-Melanomzellen eine starke Expression des Integrins α4β1, dem Bindungspartner von VCAM-1, zeigen (3.7). Die VLA-4/VCAM-1-Interaktion kann nicht nur die Adhäsion von Melanomzellen, sondern auch die Migration durch aktivierte Endothelzellschichten vermitteln (Klemke et al. 2007). Es ist

demnach wahrscheinlich, dass durch die Paarung von VCAM-1 und VLA-4 der Melanomzellarrest im Kapillarbett der Lunge verstärkt wird. Diese Auffassung wird durch die Experimente dieser Arbeit gestützt, in denen gezeigt werden konnte, dass B16-F10-Melanomzellen *in vitro* spezifisch und stark an VCAM-1 binden können (3.7). Ältere Studien unterstützen diese Vorstellung, dass eine verstärkte VCAM-1-Expression auf Lungenendothelzellen *in vivo* zu einer Erhöhung der Anzahl an pulmonal induzierten B16-F10-Melanommetastasen führt (Okahara et al. 1994; Higashiyama et al. 1996).

Die Kurzzeit-Metastasierungsexperimente (3.8), in denen in der Lunge *in vivo* nach 1 h und 5 h keine Erhöhung der Tumorzellzahl nachgewiesen werden konnte, widersprechen der Theorie einer verstärkten Adhäsion nach MALP-2-Stimulation nicht zwangsläufig. Denn aus anderen Studien ist bekannt, dass im Mittel über 80% der pulmonalen B16-F10-Melanomzellen innerhalb der ersten 60 Minuten nach Tumorzellinjektion durch Zellen des angeborenen Immunsystems getötet werden (Grundy et al. 2007; Erpenbeck et al. 2010). Eine verstärkte Adhäsion wäre also bei zusätzlich erhöhter Tötungseffizienz gegen die Tumorzellen durch MALP-2 in diesen Experimenten nicht darstellbar.

Es ist demnach vorstellbar, dass MALP-2 eine doppelte Funktion bezüglich der experimentell induzierten B16-F10-Melanometastasen ausübt. Während pulmonale PMN und Makrophagen, die durch MALP-2-Stimulation rekrutiert wurden, das MetastasierungsPotenzial inhibieren könnten, würde ein verstärkt exprimiertes VCAM-1 den Arrest im Lungengewebe verstärken. Das Ergebnis der Metastasierungsexperimente nach MALP-2-Vorstimulation (3.4, 3.8) könnte daher aufgrund der hier diskutierten Balance zweier gegenläufiger Prinzipien resultieren.

Sollte diese Hypothese richtig sein, könnte die relative Verteilung der individuellen Effekte, die von TLR-Agonisten ausgelöst werden, das Netto-Ergebnis bezüglich antitumoraler Therapien bestimmen. Es ist aber sicherlich schwierig, diese Hypothese in ihrer Gesamtheit zu überprüfen. Außerdem würden große Serien von Experimenten an vielen verschiedenen Tumorentitäten benötigt werden, da es sehr wahrscheinlich ist, dass auch unterschiedliche Tumoren unterschiedlich reagieren würden. Dies unterstreicht daher die Notwendigkeit individualisierter Therapiestrategien.

4.2.4. TLR2-Stimulation und Tumorprogession

Vor kurzem publizierte Studienergebnisse werfen die Frage auf, ob TLR2-Agonisten als Adjuvantien in der Immuntherapie von Tumoren, insbesondere von Melanomen, geeignet sein könnten. So konnte in TLR2-defizienten Mäusen eine Reduktion hämatogener pulmonaler B16-F10-Melanommetastasen im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (Yang et al. 2009). Eine Reduktion an Melanommetastasen konnte ebenso induziert werden, wenn die Mäuse nach der Tumorinokulation mit funktionsblockierenden Antikörpern gegen TLR2 behandelt wurden (Yang et al. 2009; Yan et al. 2012). Die Wirkung der TLR2-Hemmung im Wirtstier wurde auf eine Aufhebung der tumorinduzierten immunsuppressiven Tumormikroumgebung zurückgeführt.

Endogene sowie exogene TLR2-Agonisten scheinen demnach auch lokale und systemische immunsuppressive Effekte verursachen zu können (Netea et al. 2004; Manicassamy et al. 2009; Yamazaki et al. 2011).

Kim und Mitarbeiter (2009) konnten zeigen, dass Versican (ein Proteoglykan, das man unter anderem im Tumorstoma und in Tumorzellen von *Lewis Lung Carcinoma* (LLC) finden kann) über eine TLR2-abhängige Signaltransduktion myeloide Zellen aktiviert und durch diese Zellaktivierung zu einer Tumorprogression von LLC beiträgt (Kim et al. 2009). Eine andere Studie konnte zeigen, dass Pam2-Lipopeptide (die als TLR2/6-Agonisten fungieren), obwohl sie *in vitro* zu einer DC-vermittelten Aktivierung der NK-Zellaktivität führen (Azuma et al. 2010), *in vivo* nach systemischer Gabe (intraperitoneal oder in die Fußsohle) keine Wachstumsreduktion syngener B16-D8-Melanomzellen induzieren können (Yamazaki et al. 2011). Die fehlende Induktion einer antitumoralen Immunantwort bei systemischer Gabe konnte auf eine TLR2-abhängige Erhöhung des IL-10 Spiegels und eine konsekutive Induktion von $Foxp3^+/CD25^+/CD4^+$-regulatorischen T-Zellen zurückgeführt werden (Yamazaki et al. 2011). Außerdem ist bekannt, dass eine Erhöhung des IL-10 unter anderem für die Induktion von M2-Makrophagen verantwortlich ist, die Tumorwachstum und Metastasierung fördern sowie die Generierung tumorizider M1-Makrophagen hemmen können (Allavena et al. 2008).

Dies sind Beispiele dafür, dass über TLR2-Signale eine immunsuppressive Mikroumgebung induziert werden kann, welche die Ausbildung einer effektiven antitumoralen Immunantwort möglicherweise unterdrückt und so zu einer Tumorprogression beitragen kann.

Aber auch gegenteilige Effekte auf Melanommetastasen nach TLR2-Stimulation wurden beschrieben. So konnte durch Stimulation des TLR2/1 durch *synthetic bacterial lipoprotein* (BLP) eine Tumorregression für B16-F10-Melanomzellen, aber auch 3LL *Lewis lung*

carcinoma und FBL3 Tumor (murine Leukämie-Zelllinie) induziert werden (Zhang et al. 2011). Mechanistisch wird hier eine Verstärkung der tumorspezifischen CTL-Antwort bei gleichzeitiger Hemmung der T_{reg} Funktion verantwortlich gemacht.
Es scheint, dass durch TLR2-Stimulation, möglicherweise auch abhängig von der Kombination der Ko-Rezeptoren, sowie dem Zeitpunkt oder dem Administrationsweg, gegensätzliche Auswirkungen bezüglich einer Tumortherapie erzeugt werden können.

Außerdem muss bedacht werden, dass TLR nicht nur auf Leukozyten, sondern auch auf Tumorzellen, darunter auch Melanomzellen, exprimiert werden (Goto et al. 2008; Huang et al. 2008; Sato et al. 2009). Eine Aktivierung von TLR auf Tumorzellen kann sich über den MAPK-Signalweg und die Aktivierung von NF-κB unterstützend auf Tumorprogression, Apoptoseresistenz und Tumorzellinvasion auswirken (Kelly et al. 2006; He et al. 2007; Huang et al. 2007). Andererseits wurde auch beschrieben, dass TLR-Agonisten Apoptose in Tumorzellen induzieren können (Schön et al. 2004). Bedeutsam ist demnach, dass TLR-Agonisten *in vivo* auch endogen vorkommen und somit das Tumorwachstum beeinflussen können. Endogene Liganden für TLR sind beispielsweise Hitzeschockproteine 60, 70, 90 oder auch extrazelluläre Matrix-Bestandteile wie Fibronektin oder Versican (Huang et al. 2008; Kim et al. 2009).
Von TLR2/6 weiss man, dass dieser auf B16-F10-Melanomzellen exprimiert wird (Huang et al. 2005; Yang et al. 2009). Demnach sind B16-F10-Melanomzellen auch direkt durch eine MALP-2-Stimulation beeinflussbar. Defizienz des TLR2 oder des TLR6-Rezeptors auf B16-F10-Melanomzellen führt zu einer deutlichen Abnahme der Tumorzellinvasionsfähigkeit *in vitro* und reduziert die Anzahl experimentell induzierter pulmonaler Metastasen *in vivo* (Yang et al. 2009). Außerdem wurde berichtet, dass die Produktion immunsuppressiver Zytokine und Chemokine durch B16-F10-Melanomzellen, unter anderem TGF-β1, IL-6 und IL-10, *in vitro* nach Stimulation mit dem endogen Liganden Hitzeschockprotein 60 (HSP60) auch über die tumorzelleigene TLR2-Aktivität reguliert werden kann (Yang et al. 2009). Dies deutet darauf hin, dass durch Stimulation des TLR2 auf Tumorzellen *in vivo* eine immunsuppressive Mikroumgebung begünstigt werden kann. Zieht man andere Arbeiten in Betracht, wird deutlich, dass auch andere TLR auf Tumorzellen eine immunsuppressive Mikroumgebung begünstigen können (Huang et al. 2005; Huang et al. 2007; Huang et al. 2012).
Bezüglich der Ausbildung einer immunsuppressiven Mikroumgebung um B16-F10-Melanomzellen wurde bisher nicht näher untersucht, ob dieses Phänomen einer oder mehreren

Untergruppen der TLR2 (TLR2/1, TLR2/dectin-1, TLR2/6 oder TLR2-Homodimeren) zugeordnet werden kann.
Um die genaue Rolle der TLR2-Stimulation bezüglich der Ausbildung einer immunsuppressiven Mikroumgebung um Tumorzellen zu beleuchten, insbesondere der verschiedenen TLR-homo- oder heterodimeren Untergruppen, sind weitere Studien erforderlich.

Neben diesen den *Immune escape* fördernden Mechanismen konnte kürzlich auch gezeigt werden, dass durch direkte Stimulation des TLR2/1 durch Pam3Cys sowie durch Stimulation des TLR4 durch LPS das Wachstum von B16-F10-Melanomzellen *in vitro* gesteigert werden kann (Yang et al. 2009).
Diese Arbeit konnte hingegen zeigen, dass TLR2/6-Stimulation durch MALP-2 *in vitro* zu keiner Steigerung der Proliferationsrate von B16-F10-Melanomzellen führt (3.2). Außerdem konnten *in vivo*, betrachtet man das Gesamtergebnis, keine Hinweise für eine Steigerung der Tumorprogression nach MALP-2-Stimulation an bereits etablierten Melanommetastasen gefunden werden (3.3). Somit muss man davon ausgehen, dass durch MALP-2-Stimulation das Wachstum vom B16-F10-Melanomzellen nicht direkt beeinflusst werden kann, auch wenn ein solcher Effekt formal *in vivo* nicht auszuschließen ist.
Die unterschiedliche Expression von TLR auf den Tumorzellen macht deutlich, dass neben der Wirkung von TLR-Agonisten auf Immunzellen auch das individuelle TLR-Profil der Tumoren bei der Wahl von TLR-Agonisten für die Immuntherapie unterschiedlicher Tumorentitäten bedacht werden muss. Außerdem scheinen auch TLR auf Tumorzellen aufgrund ihrer progressionsfördernden Eigenschaften ein mögliches Ziel für eine Antitumortherapie darzustellen.

TLR-Agonisten können sich in der Tumortherapie wie ein zweischneidiges Schwert verhalten. Auf der einen Seite können sie die Immunität des Wirtes gegen Tumorzellen verstärken, indem sie beispielsweise antigenpräsentierende Zellen stimulieren und zur Einwanderung unterschiedlicher Leukozytenpopulationen führen. Auf der anderen Seite können sie in einigen Fällen Tumorzellen vor der Entdeckung und Bekämpfung durch das Immunsystem schützen, Tumorproliferation verstärken und möglicherweise auch die Metastasierung beeinflussen.
Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass das Resultat einer TLR2/6-Stimulation durch MALP-2 auf die experimentelle pulmonale Melanom-Metastasierung von

vielen komplexen und ineinandergreifenden Effekten auf verschiedene Zelltypen bestimmt wird, die an der Metastasierung beteiligt sind. Die Vorhersage der klinischen Wirksamkeit ist demnach aufgrund einzelner Effekte solcher immunmodulierenden Substanzen schwer herzuleiten. Vielmehr ist eine gründliche Untersuchung der multiplen Faktoren, die für die Metastasenbildung erforderlich sind, eine notwendige Voraussetzung, bevor über den Einsatz der genannten immunologisch wirksamen Substanzen für klinisch-therapeutische Zwecke nachgedacht werden kann.

5. Zusammenfassung

Eine Melanomerkrankung im metastasierten Stadium ist heute noch eine nicht heilbare und in den meisten Fällen tödlich verlaufende Erkrankung. Über 50% der Patienten mit metastasierendem malignen Melanom entwickeln Lungenmetastasen. Nach dem Auftreten von Lungenmetastasen beträgt die durchschnittliche Überlebenszeit noch 7,3 Monate. Demnach ist die Entwicklung von Therapiestrategien notwendig, um das Fortschreiten von Tumormetastasen oder sogar deren Entstehung zu verhindern. Die lokale Stimulation der angeborenen Immunabwehr durch Behandlung mit Toll-like-Rezeptor-Agonisten käme hierfür in Frage. Inhalative Behandlungen mit Immunmodulatoren, wie sie für IL-2 beschrieben wurden, könnten insbesondere für die Behandlung pulmonaler Metastasen genutzt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das pulmonale angeborene Immunsystem im Mausmodell durch den TLR2/6-Agonisten MALP-2 stimuliert und die Auswirkung dieser Immunstimulation auf experimentell induzierte pulmonale Melanommetastasen untersucht.

Intratracheale Instillationen von 0,5 µg MALP-2 führten zu starker Einwanderung neutrophiler Granulozyten (6-fach) und Makrophagen (3,4-fach) in die Lunge von C57/BL6-Mäusen. Innerhalb von 24 h war das Maximum der Immunzelleinwanderung erreicht. Der Leukozyteneinstrom fiel dann innerhalb von 72 h wieder auf das Ursprungsniveau zurück.

Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass MALP-2 auch zu einer deutlichen Steigerung der Expression von VCAM-1 in pulmonalen Blutgefäßen führt. *In vitro* Experimente zeigten, dass dieses Adhäsionsmolekül die Bindung von B16-F10-Melanomzellen vermitteln kann.

Außerdem führte die MALP-2-Behandlung weder *in vitro* noch *in vivo* zu einer signifikanten Steigerung der Fähigkeit von Immunzellen, B16-F10-Melanomzellen zu lysieren.

So konnte, im Gegensatz zu Rückschlüssen aus früheren Publikationen, trotz der ausgeprägten Stimulation des pulmonalen Immunsystems und unabhängig vom Applikationsregime durch MALP-2 vor oder nach Tumorinokulation im Mausmodell keine signifikante Änderung der pulmonalen Metastasen erreicht werden.

Durch Markierung von Melanomzellen, die stabil mit *Green fluorescent Protein* transfiziert waren, war es möglich, Melanomzellen kurz nach Tumorzellaussaat zu untersuchen. Eine lokale TLR2/6-Aktivierung durch MALP-2-Instillation 24 h vor Tumorinokulation führte aber *in vivo* zu keiner Beeinflussung des pulmonalen Melanomzellarrests im Mausmodell. Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch das „Boostern“ des Immunsystems durch

wiederholte intratracheale MALP-2-Applikation an bereits etablierten pulmonalen Metastasen zu keiner Änderung des klinischen Gesamtresultates führt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass diese teilweise unerwarteten Ergebnisse deutlich machen, dass klinische Vorhersagen bezüglich immunmodulierender Therapien mit Vorsicht zu stellen sind, insbesondere, da multiple, sich wechselseitig beeinflussende Effekte durch die Immunstimulantien selbst das Gesamtergebnis einer Tumortherapie beeinflussen können.

6. Literaturverzeichnis

Akira S (2009): Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 85(4): 143-56

Albina JE,Reichner JS (1998): Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. Cancer Metastasis Rev 17(1): 39-53

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R,Flavell RA (2001): Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. Nature 413(6857): 732-8

Allavena P, Sica A, Garlanda C,Mantovani A (2008): The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. Immunol Rev 222: 155-61

Anderson KV, Bokla L,Nüsslein-Volhard C (1985): Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. Cell 42(3): 791-8

Aruga A, Aruga E, Tanigawa K, Bishop DK, Sondak VK,Chang AE (1997): Type 1 versus type 2 cytokine release by Vbeta T cell subpopulations determines in vivo antitumor reactivity: IL-10 mediates a suppressive role. J Immunol 159(2): 664-73

Atkins MB, Kunkel L, Sznol M,Rosenberg SA (2000): High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update. Cancer J Sci Am 6 Suppl 1: S11-4

Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, Margolin K, Abrams J, Sznol M, Parkinson D, Hawkins M, et al. (1999): High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. J Clin Oncol 17(7): 2105-16

Azuma M, Sawahata R, Akao Y, Ebihara T, Yamazaki S, Matsumoto M, Hashimoto M, Fukase K, Fujimoto Y,Seya T (2010): The peptide sequence of diacyl lipopeptides determines dendritic cell TLR2-mediated NK activation. PLoS One 5(9)

Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, et al. (2009): Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. J Clin Oncol 27(36): 6199-206

Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, Urist M, McMasters KM, Ross MI, Kirkwood JM, et al. (2001): Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. J Clin Oncol 19(16): 3622-34

Barth A, Wanek LA,Morton DL (1995): Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases. J Am Coll Surg 181(3): 193-201

Basit A, Reutershan J, Morris MA, Solga M, Rose CE, Jr.,Ley K (2006): ICAM-1 and LFA-1 play critical roles in LPS-induced neutrophil recruitment into the alveolar space. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 291(2): L200-7

Basith S, Manavalan B, Govindaraj RG,Choi S (2011): In silico approach to inhibition of signaling pathways of Toll-like receptors 2 and 4 by ST2L. PLoS One 6(8): e23989

Bell JK, Mullen GE, Leifer CA, Mazzoni A, Davies DR,Segal DM (2003): Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. Trends Immunol 24(10): 528-33

Blattman JN,Greenberg PD (2004): Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. Science 305(5681): 200-5

Bong AB, Bonnekoh B, Franke I, Schön MP, Ulrich J,Gollnick H (2002): Imiquimod, a topical immune response modifier, in the treatment of cutaneous metastases of malignant melanoma. Dermatology 205(2): 135-8

Braumüller H, Wieder T, Brenner E, Assmann S, Hahn M, Alkhaled M, Schilbach K, Essmann F, Kneilling M, Griessinger C, et al. (2013): T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. Nature 494(7437): 361-5

Buhtoiarov IN, Sondel PM, Eickhoff JC,Rakhmilevich AL (2007): Macrophages are essential for antitumour effects against weakly immunogenic murine tumours induced by class B CpG-oligodeoxynucleotides. Immunology 120(3): 412-23

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

Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, et al. (2011): Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. N Engl J Med 364(26): 2507-16

Chin JE, Hatfield CA, Winterrowd GE, Brashler JR, Vonderfecht SL, Fidler SF, Griffin RL, Kolbasa KP, Krzesicki RF, Sly LM, et al. (1997): Airway recruitment of leukocytes in mice is dependent on alpha4-integrins and vascular cell adhesion molecule-1. Am J Physiol 272(2 Pt 1): L219-29

Coit DG (1993): Role of surgery for metastatic malignant melanoma: a review. Semin Surg Oncol 9(3): 239-45

Coley WB (1893): The Treatment of Malignant Tumors by Repeated Innoculations of Erysipelas: With a Report of Ten Original Cases. Am J Med Sci(10): 487-511

Coussens LM,Werb Z (2002): Inflammation and cancer. Nature 420(6917): 860-7

Cui S, Reichner JS, Mateo RB,Albina JE (1994): Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or -independent mechanisms. Cancer Res 54(9): 2462-7

Cui Z, Willingham MC, Hicks AM, Alexander-Miller MA, Howard TD, Hawkins GA, Miller MS, Weir HM, Du W,DeLong CJ (2003): Spontaneous regression of advanced cancer: identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 100(11): 6682-7

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, et al. (2002): Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature 417(6892): 949-54

Deiters U, Barsig J, Tawil B,Mühlradt PF (2004): The macrophage-activating lipopeptide-2 accelerates wound healing in diabetic mice. Exp Dermatol 13(12): 731-9

Deiters U,Mühlradt PF (1999): Mycoplasmal lipopeptide MALP-2 induces the chemoattractant proteins macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha), monocyte chemoattractant protein 1, and MIP-2 and promotes leukocyte infiltration in mice. Infect Immun 67(7): 3390-8

Di Carlo E, Forni G, Lollini P, Colombo MP, Modesti A,Musiani P (2001): The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. Blood 97(2): 339-45

Dietrich N, Lienenklaus S, Weiss S,Gekara NO (2010): Murine toll-like receptor 2 activation induces type I interferon responses from endolysosomal compartments. PLoS One 5(4): e10250

Dissemond J, Weimann TK, Schneider LA, Schneeberger A, Scharffetter-Kochanek K, Goos M,Wagner SN (2003): Activated neutrophils exert antitumor activity against human melanoma cells: reactive oxygen species-induced mechanisms and their modulation by granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor. J Invest Dermatol 121(4): 936-8

Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, et al. (2002): Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. Nat Med 8(8): 793-800

Drobits B, Holcmann M, Amberg N, Swiecki M, Grundtner R, Hammer M, Colonna M,Sibilia M (2012): Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. J Clin Invest 122(2): 575-85

Dunn GP, Old LJ,Schreiber RD (2004): The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. Immunity 21(2): 137-48

Elwood JM,Jopson J (1997): Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. Int J Cancer 73(2): 198-203

Enk AH, Nashan D, Rubben A,Knop J (2000): High dose inhalation interleukin-2 therapy for lung metastases in patients with malignant melanoma. Cancer 88(9): 2042-6

Erpenbeck L, Nieswandt B, Schön M, Pozgajova M,Schön MP (2010): Inhibition of platelet GPIb alpha and promotion of melanoma metastasis. J Invest Dermatol 130(2): 576-86

Euvrard S, Kanitakis J,Claudy A (2003): Skin cancers after organ transplantation. N Engl J Med 348(17): 1681-91

Fanger NA, Maliszewski CR, Schooley K,Griffith TS (1999): Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). J Exp Med 190(8): 1155-64

Feterowski C, Novotny A, Kaiser-Moore S, Mühlradt PF, Rossmann-Bloeck T, Rump M, Holzmann B,Weighardt H (2005): Attenuated pathogenesis of polymicrobial peritonitis in mice after TLR2 agonist pre-treatment involves ST2 up-regulation. Int Immunol 17(8): 1035-46

Fidler IJ (1973): Selection of successive tumour lines for metastasis. Nat New Biol 242(118): 148-9

Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M, Demidov LV, Hassel JC, Rutkowski P, Mohr P, et al. (2012): Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. N Engl J Med 367(2): 107-14

Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, Worthen GS,Albelda SM (2009): Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. Cancer Cell 16(3): 183-94

Fritsch P: Dermatologie & Venerologie für das Studium. (Springer-Lehrbuch), Springer, Heidelberg 2009

Galanos C, Gumenscheimer M, Mühlradt P, Jirillo E,Freudenberg M (2000): MALP-2, a Mycoplasma lipopeptide with classical endotoxic properties: end of an era of LPS monopoly? J Endotoxin Res 6(6): 471-6

Galluzzi L, Vacchelli E, Eggermont A, Fridman WH, Galon J, Sautes-Fridman C, Tartour E, Zitvogel L,Kroemer G (2012): Trial Watch: Experimental Toll-like receptor agonists for cancer therapy. Oncoimmunology 1(5): 699-716

Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S,Underhill DM (2003): Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. J Exp Med 197(9): 1107-17

Garbe C,Blum A (2001): Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol 14(5): 280-90

Gaudy C, Richard MA, Folchetti G, Bonerandi JJ,Grob JJ (2006): Randomized controlled study of electrochemotherapy in the local treatment of skin metastases of melanoma. J Cutan Med Surg 10(3): 115-21

Goto Y, Arigami T, Kitago M, Nguyen SL, Narita N, Ferrone S, Morton DL, Irie RF,Hoon DS (2008): Activation of Toll-like receptors 2, 3, and 4 on human melanoma cells induces inflammatory factors. Mol Cancer Ther 7(11): 3642-53

Griffith TS, Wiley SR, Kubin MZ, Sedger LM, Maliszewski CR,Fanger NA (1999): Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. J Exp Med 189(8): 1343-54

Groh V, Wu J, Yee C,Spies T (2002): Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. Nature 419(6908): 734-8

Grote K, Schuett H, Salguero G, Grothusen C, Jagielska J, Drexler H, Mühlradt PF,Schieffer B (2010): Toll-like receptor 2/6 stimulation promotes angiogenesis via GM-CSF as a potential strategy for immune defense and tissue regeneration. Blood

Grundy MA, Zhang T,Sentman CL (2007): NK cells rapidly remove B16F10 tumor cells in a perforin and interferon-gamma independent manner in vivo. Cancer Immunol Immunother 56(8): 1153-61

Guan Y, Ranoa DR, Jiang S, Mutha SK, Li X, Baudry J,Tapping RI (2010): Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling. J Immunol 184(9): 5094-103

Guo J, Si L, Kong Y, Flaherty KT, Xu X, Zhu Y, Corless CL, Li L, Li H, Sheng X, et al. (2011): Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. J Clin Oncol 29(21): 2904-9

Haranaka K, Carswell EA, Williamson BD, Prendergast JS, Satomi N,Old LJ (1986): Purification, characterization, and antitumor activity of nonrecombinant mouse tumor necrosis factor. Proc Natl Acad Sci U S A 83(11): 3949-53

Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM,Aderem A (2001): The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. Nature 410(6832): 1099-103

He W, Liu Q, Wang L, Chen W, Li N,Cao X (2007): TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. Mol Immunol 44(11): 2850-9

Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H,Bauer S (2004): Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. Science 303(5663): 1526-9

Helmbach H, Rossmann E, Kern MA,Schadendorf D (2001): Drug-resistance in human melanoma. Int J Cancer 93(5): 617-22

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, et al. (2000): A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature 408(6813): 740-5

Herbert SH, Solin LJ, Rate WR, Schultz DJ,Hanks GE (1991): The effect of palliative radiation therapy on epidural compression due to metastatic malignant melanoma. Cancer 67(10): 2472-6

Hicks AM, Riedlinger G, Willingham MC, Alexander-Miller MA, Von Kap-Herr C, Pettenati MJ, Sanders AM, Weir HM, Du W, Kim J, et al. (2006): Transferable anticancer innate immunity in spontaneous regression/complete resistance mice. Proc Natl Acad Sci U S A 103(20): 7753-8

Higashiyama A, Watanabe H, Okumura K,Yagita H (1996): Involvement of tumor necrosis factor alpha and very late activation antigen 4/vascular cell adhesion molecule 1 interaction in surgical-stress-enhanced experimental metastasis. Cancer Immunol Immunother 42(4): 231-6

Hinz S, Trauzold A, Boenicke L, Sandberg C, Beckmann S, Bayer E, Walczak H, Kalthoff H,Ungefroren H (2000): Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. Oncogene 19(48): 5477-86

Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, et al. (2010): Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. N Engl J Med 363(8): 711-23

Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Shamel L, Hartung T, Zahringer U, et al. (2005): CD36 is a sensor of diacylglycerides. Nature 433(7025): 523-7

Hollenbeak CS, Todd MM, Billingsley EM, Harper G, Dyer AM,Lengerich EJ (2005): Increased incidence of melanoma in renal transplantation recipients. Cancer 104(9): 1962-7

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K,Akira S (1999): Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. J Immunol 162(7): 3749-52

Huang B, Zhao J, Li H, He KL, Chen Y, Chen SH, Mayer L, Unkeless JC,Xiong H (2005): Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. Cancer Res 65(12): 5009-14

Huang B, Zhao J, Shen S, Li H, He KL, Shen GX, Mayer L, Unkeless J, Li D, Yuan Y, et al. (2007): Listeria monocytogenes promotes tumor growth via tumor cell toll-like receptor 2 signaling. Cancer Res 67(9): 4346-52

Huang B, Zhao J, Unkeless JC, Feng ZH,Xiong H (2008): TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. Oncogene 27(2): 218-24

Huang Y, Cai B, Xu M, Qiu Z, Tao Y, Zhang Y, Wang J, Xu Y, Zhou Y, Yang J, et al. (2012): Gene silencing of Toll-like receptor 2 inhibits proliferation of human liver cancer cells and secretion of inflammatory cytokines. PLoS One 7(7): e38890

Huh SJ, Liang S, Sharma A, Dong C,Robertson GP (2010): Transiently entrapped circulating tumor cells interact with neutrophils to facilitate lung metastasis development. Cancer Res 70(14): 6071-82

Huland E, Heinzer H, Huland H,Yung R (2000): Overview of interleukin-2 inhalation therapy. Cancer J Sci Am 6 Suppl 1: S104-12

Huland E, Heinzer H, Jorres RA, Loppow D,Huland H (2004): Therapeutic approaches in metastatic renal cell carcinoma: local immunotherapy. Urologe A 43 Suppl 3: S140-4

Jemal A, Devesa SS, Hartge P,Tucker MA (2001): Recent trends in cutaneous melanoma incidence among whites in the United States. J Natl Cancer Inst 93(9): 678-83

Jin MS,Lee JO (2008): Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. Immunity 29(2): 182-91

Johnson JP (1999): Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. Cancer Metastasis Rev 18(3): 345-57

Johnson WJ, Steplewski Z, Matthews TJ, Hamilton TA, Koprowski H,Adams DO (1986): Cytolytic interactions between murine macrophages, tumor cells, and monoclonal antibodies: characterization of lytic conditions and requirements for effector activation. J Immunol 136(12): 4704-13

Kang JY, Nan X, Jin MS, Youn SJ, Ryu YH, Mah S, Han SH, Lee H, Paik SG,Lee JO (2009): Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. Immunity 31(6): 873-84

Kataoka T, Schroter M, Hahne M, Schneider P, Irmler M, Thome M, Froelich CJ,Tschopp J (1998): FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. J Immunol 161(8): 3936-42

Kaufmann A, Mühlradt PF, Gemsa D,Sprenger H (1999): Induction of cytokines and chemokines in human monocytes by Mycoplasma fermentans-derived lipoprotein MALP-2. Infect Immun 67(12): 6303-8

Kawai T,Akira S (2009): The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. Int Immunol 21(4): 317-37

Kelly MG, Alvero AB, Chen R, Silasi DA, Abrahams VM, Chan S, Visintin I, Rutherford T,Mor G (2006): TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. Cancer Res 66(7): 3859-68

Kerber-Momot T, Leemhuis D, Lührmann A, Munder A, Tümmler B, Pabst R,Tschernig T (2010): Beneficial effects of TLR-2/6 ligation in pulmonary bacterial infection and immunization with Pseudomonas aeruginosa. Inflammation 33(1): 58-64

Khong HT, Wang QJ,Rosenberg SA (2004): Identification of multiple antigens recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a single patient: tumor escape by antigen loss and loss of MHC expression. J Immunother 27(3): 184-90

Kim JW, Wieckowski E, Taylor DD, Reichert TE, Watkins S,Whiteside TL (2005): Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. Clin Cancer Res 11(3): 1010-20

Kim S, Takahashi H, Lin WW, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, Luo JL,Karin M (2009): Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. Nature 457(7225): 102-6

Kirkwood JM, Strawderman MH, Ernstoff MS, Smith TJ, Borden EC,Blum RH (1996): Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. J Clin Oncol 14(1): 7-17

Klemke M, Weschenfelder T, Konstandin MH,Samstag Y (2007): High affinity interaction of integrin alpha4beta1 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) enhances migration of human melanoma cells across activated endothelial cell layers. J Cell Physiol 212(2): 368-74

Korman N, Moy R, Ling M, Matheson R, Smith S, McKane S,Lee JH (2005): Dosing with 5% imiquimod cream 3 times per week for the treatment of actinic keratosis: results of two phase 3, randomized, double-blind, parallel-group, vehicle-controlled trials. Arch Dermatol 141(4): 467-73

Kresowik TP,Griffith TS (2009): Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for urothelial carcinoma of the bladder. Immunotherapy 1(2): 281-288

Kumar H, Kawai T,Akira S (2009a): Pathogen recognition in the innate immune response. Biochem J 420(1): 1-16

Kumar H, Kawai T,Akira S (2009b): Toll-like receptors and innate immunity. Biochem Biophys Res Commun 388(4): 621-5

Liang S, Hoskins M, Khanna P, Kunz RF,Dong C (2008): Effects of the Tumor-Leukocyte Microenvironment on Melanoma-Neutrophil Adhesion to the Endothelium in a Shear Flow. Cell Mol Bioeng 1(2-3): 189-200

Liang S, Slattery MJ,Dong C (2005): Shear stress and shear rate differentially affect the multi-step process of leukocyte-facilitated melanoma adhesion. Exp Cell Res 310(2): 282-92

Link C, Gavioli R, Ebensen T, Canella A, Reinhard E,Guzman CA (2004): The Toll-like receptor ligand MALP-2 stimulates dendritic cell maturation and modulates proteasome composition and activity. Eur J Immunol 34(3): 899-907

Liu VC, Wong LY, Jang T, Shah AH, Park I, Yang X, Zhang Q, Lonning S, Teicher BA,Lee C (2007): Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. J Immunol 178(5): 2883-92

Lührmann A, Deiters U, Skokowa J, Hanke M, Gessner JE, Mühlradt PF, Pabst R,Tschernig T (2002a): In vivo effects of a synthetic 2-kilodalton macrophage-activating lipopeptide of Mycoplasma fermentans after pulmonary application. Infect Immun 70(7): 3785-92

Lührmann A, Tschernig T,Pabst R (2002b): Stimulation of bronchus-associated lymphoid tissue in rats by repeated inhalation of aerosolized lipopeptide MALP-2. Pathobiology 70(5): 266-9

Lührmann A, Tschernig T, Pabst R,Niewiesk S (2005): Improved intranasal immunization with live-attenuated measles virus after co-inoculation of the lipopeptide MALP-2. Vaccine 23(39): 4721-6

Manicassamy S, Ravindran R, Deng J, Oluoch H, Denning TL, Kasturi SP, Rosenthal KM, Evavold BD,Pulendran B (2009): Toll-like receptor 2-dependent induction of vitamin A-metabolizing enzymes in dendritic cells promotes T regulatory responses and inhibits autoimmunity. Nat Med 15(4): 401-9

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P,Sica A (2002): Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. Trends Immunol 23(11): 549-55

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A,Locati M (2004): The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol 25(12): 677-86

Mantovani A, Romero P, Palucka AK,Marincola FM (2008): Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. Lancet 371(9614): 771-83

Marghoob AA, Koenig K, Bittencourt FV, Kopf AW,Bart RS (2000): Breslow thickness and clark level in melanoma: support for including level in pathology reports and in American Joint Committee on Cancer Staging. Cancer 88(3): 589-95

Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, Vachon CM, Schild SE, McWilliams RR, Hand JL, et al. (2007a): Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. Mayo Clin Proc 82(3): 364-80

Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, Vachon CM, Schild SE, McWilliams RR, Hand JL, et al. (2007b): Malignant melanoma in the 21st century, part 2: staging, prognosis, and treatment. Mayo Clin Proc 82(4): 490-513

Matsushima N, Tanaka T, Enkhbayar P, Mikami T, Taga M, Yamada K,Kuroki Y (2007): Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. BMC Genomics 8: 124

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P,Janeway CA, Jr. (1997): A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature 388(6640): 394-7

Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, Fierlbeck G, Tilgen W, Seiter S, Gore M, Aamdal S, Cebon J, Coates A, et al. (2000): Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. J Clin Oncol 18(1): 158-66

Miles FL, Pruitt FL, van Golen KL,Cooper CR (2008): Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis. Clin Exp Metastasis 25(4): 305-24

Morales A, Eidinger D,Bruce AW (1976): Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. J Urol 116(2): 180-3

Mühlradt PF, Kiess M, Meyer H, Süssmuth R,Jung G (1997): Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from Mycoplasma fermentans acting at picomolar concentration. J Exp Med 185(11): 1951-8

Nathan CF, Silverstein SC, Brukner LH,Cohn ZA (1979): Extracellular cytolysis by activated macrophages and granulocytes. II. Hydrogen peroxide as a mediator of cytotoxicity. J Exp Med 149(1): 100-13

Netea MG, Sutmuller R, Hermann C, Van der Graaf CA, Van der Meer JW, van Krieken JH, Hartung T, Adema G,Kullberg BJ (2004): Toll-like receptor 2 suppresses immunity against Candida albicans through induction of IL-10 and regulatory T cells. J Immunol 172(6): 3712-8

O'Neill LA,Bowie AG (2007): The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol 7(5): 353-64

Okahara H, Yagita H, Miyake K,Okumura K (1994): Involvement of very late activation antigen 4 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in tumor necrosis factor alpha enhancement of experimental metastasis. Cancer Res 54(12): 3233-6

Pabst R, Durak D, Roos A, Lührmann A,Tschernig T (2009): TLR2/6 stimulation of the rat lung: effects on lymphocyte subsets, natural killer cells and dendritic cells in different parts of the air-conducting compartments and at different ages. Immunology 126(1): 132-9

Palma C, Iona E, Ebensen T, Guzman CA,Cassone A (2009): The toll-like receptor 2/6 ligand MALP-2 reduces the viability of Mycobacterium tuberculosis in murine macrophages. Open Microbiol J 3: 47-52

Pekarek LA, Starr BA, Toledano AY,Schreiber H (1995): Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. J Exp Med 181(1): 435-40

Perfetto SP, Chattopadhyay PK,Roederer M (2004): Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. Nat Rev Immunol 4(8): 648-55

Petersen RP, Hanish SI, Haney JC, Miller CC, 3rd, Burfeind WR, Jr., Tyler DS, Seigler HF, Wolfe W, D'Amico TA,Harpole DH, Jr. (2007): Improved survival with pulmonary metastasectomy: an analysis of 1720 patients with pulmonary metastatic melanoma. J Thorac Cardiovasc Surg 133(1): 104-10

Pflugfelder A, Kochs C, Blum A, Capellaro M, Czeschik C, Dettenborn T, Dill D, Dippel E, Eigentler T, Feyer P, et al. (2013): S3-guideline "diagnosis, therapy and follow-up of melanoma" -- short version. J Dtsch Dermatol Ges 11(6): 563-602

Plewig G, Landthaler M, Burgdorf WHC, Hertel M,Ruzicka T: Braun-Falco`s Dermatologie, Venerologie und Allergologie, 6. Auflage; Springer, Berlin Heidelberg 2012

Quirt I, Verma S, Petrella T, Bak K,Charette M (2007): Temozolomide for the treatment of metastatic melanoma: a systematic review. Oncologist 12(9): 1114-23

Radoja S, Rao TD, Hillman D,Frey AB (2000): Mice bearing late-stage tumors have normal functional systemic T cell responses in vitro and in vivo. J Immunol 164(5): 2619-28

Reppe K, Tschernig T, Lührmann A, van Laak V, Grote K, Zemlin MV, Gutbier B, Müller HC, Kursar M, Schutte H, et al. (2009): Immunostimulation with macrophage-activating lipopeptide-2 increased survival in murine pneumonia. Am J Respir Cell Mol Biol 40(4): 474-81

Rharbaoui F, Drabner B, Borsutzky S, Winckler U, Morr M, Ensoli B, Mühlradt PF,Guzman CA (2002): The Mycoplasma-derived lipopeptide MALP-2 is a potent mucosal adjuvant. Eur J Immunol 32(10): 2857-65

Ries LA, Wingo PA, Miller DS, Howe HL, Weir HK, Rosenberg HM, Vernon SW, Cronin K,Edwards BK (2000): The annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer. Cancer 88(10): 2398-424

Roach JC, Glusman G, Rowen L, Kaur A, Purcell MK, Smith KD, Hood LE,Aderem A (2005): The evolution of vertebrate Toll-like receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 102(27): 9577-82

Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, M DJ, Garbe C, Lebbe C, Baurain JF, Testori A, Grob JJ, et al. (2011): Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. N Engl J Med 364(26): 2517-26

Rosetto M, Engstrom Y, Baldari CT, Telford JL,Hultmark D (1995): Signals from the IL-1 receptor homolog, Toll, can activate an immune response in a Drosophila hemocyte cell line. Biochem Biophys Res Commun 209(1): 111-6

Ruschmeyer D, Thude H,Mühlradt PF (1993): MDHM, a macrophage-activating product of Mycoplasma fermentans, stimulates murine macrophages to synthesize nitric oxide and become tumoricidal. FEMS Immunol Med Microbiol 7(3): 223-9

Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P,Yamaguchi T (2009): Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? Int Immunol 21(10): 1105-11

Sato S, Takeuchi O, Fujita T, Tomizawa H, Takeda K,Akira S (2002): A variety of microbial components induce tolerance to lipopolysaccharide by differentially affecting MyD88-dependent and -independent pathways. Int Immunol 14(7): 783-91

Sato Y, Goto Y, Narita N,Hoon DS (2009): Cancer Cells Expressing Toll-like Receptors and the Tumor Microenvironment. Cancer Microenviron 2 Suppl 1: 205-14

Schadendorf D, Gawlik C, Haney U, Ostmeier H, Suter L,Czarnetzki BM (1993): Tumour progression and metastatic behaviour in vivo correlates with integrin expression on melanocytic tumours. J Pathol 170(4): 429-34

Schmidt J, Welsch T, Jäger D, Mühlradt PF, Büchler MW,Märten A (2007): Intratumoural injection of the toll-like receptor-2/6 agonist 'macrophage-activating lipopeptide-2' in patients with pancreatic carcinoma: a phase I/II trial. Br J Cancer 97(5): 598-604

Schneider C, Schmidt T, Ziske C, Tiemann K, Lee KM, Uhlinsky V, Behrens P, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG, Mühlradt PF, et al. (2004): Tumour suppression induced by the macrophage activating lipopeptide MALP-2 in an ultrasound guided pancreatic carcinoma mouse model. Gut 53(3): 355-61

Schön MP,Schön M (2008): TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. Oncogene 27(2): 190-9

Schön MP, Wienrich BG, Drewniok C, Bong AB, Eberle J, Geilen CC, Gollnick H,Schön M (2004): Death receptor-independent apoptosis in malignant melanoma induced by the small-molecule immune response modifier imiquimod. J Invest Dermatol 122(5): 1266-76

Schreiber RD, Old LJ,Smyth MJ (2011): Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. Science 331(6024): 1565-70

Schulze HJ, Cribier B, Requena L, Reifenberger J, Ferrandiz C, Garcia Diez A, Tebbs V,McRae S (2005): Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from a randomized vehicle-controlled phase III study in Europe. Br J Dermatol 152(5): 939-47

Schütt C,Bröker B: Grundwissen Immunologie, 2. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2009

Schwartzentruber DJ, Lawson DH, Richards JM, Conry RM, Miller DM, Treisman J, Gailani F, Riley L, Conlon K, Pockaj B, et al. (2011): gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. N Engl J Med 364(22): 2119-27

Seliger B, Maeurer MJ,Ferrone S (2000): Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. Immunol Today 21(9): 455-64

Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ,Schreiber RD (2001): IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. Nature 410(6832): 1107-11

Sharma S, White D, Imondi AR, Placke ME, Vail DM,Kris MG (2001): Development of inhalational agents for oncologic use. J Clin Oncol 19(6): 1839-47

Shin MS, Kim HS, Lee SH, Park WS, Kim SY, Park JY, Lee JH, Lee SK, Lee SN, Jung SS, et al. (2001): Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers. Cancer Res 61(13): 4942-6

Shingu K, Helfritz A, Kuhlmann S, Zielinska-Skowronek M, Jacobs R, Schmidt RE, Pabst R,von Horsten S (2002): Kinetics of the early recruitment of leukocyte subsets at the sites of tumor cells in the lungs: natural killer (NK) cells rapidly attract monocytes but not lymphocytes in the surveillance of micrometastasis. Int J Cancer 99(1): 74-81

Shingu K, Kruschinski C, Lührmann A, Grote K, Tschernig T, Von Horsten S,Pabst R (2003): Intratracheal macrophage-activating lipopeptide-2 reduces metastasis in the rat lung. Am J Respir Cell Mol Biol 28(3): 316-21

Shojaei F, Singh M, Thompson JD,Ferrara N (2008): Role of Bv8 in neutrophil-dependent angiogenesis in a transgenic model of cancer progression. Proc Natl Acad Sci U S A 105(7): 2640-5

Smith KJ, Skelton HG, Yeager J, Angritt P,Wagner KF (1993): Cutaneous neoplasms in a military population of HIV-1-positive patients. Military Medical Consortium for the Advancement of Retroviral Research. J Am Acad Dermatol 29(3): 400-6

Smyth MJ, Thia KY, Street SE, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, Kawano T, Pelikan SB, Crowe NY,Godfrey DI (2000): Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. J Exp Med 191(4): 661-8

Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, McArthur GA, Hutson TE, Moschos SJ, Flaherty KT, et al. (2012): Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. N Engl J Med 366(8): 707-14

Souto JC, Vila L,Bru A (2009): Polymorphonuclear neutrophils and cancer: Intense and sustained neutrophilia as a treatment against solid tumors. Med Res Rev

Stary G, Bangert C, Tauber M, Strohal R, Kopp T,Stingl G (2007): Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. J Exp Med 204(6): 1441-51

Steinmann A, Funk JO, Schuler G,von den Driesch P (2000): Topical imiquimod treatment of a cutaneous melanoma metastasis. J Am Acad Dermatol 43(3): 555-6

Stern-Ginossar N, Gur C, Biton M, Horwitz E, Elboim M, Stanietsky N, Mandelboim M,Mandelboim O (2008): Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D. Nat Immunol 9(9): 1065-73

Stevens NG, Liff JM,Weiss NS (1990): Plantar melanoma: is the incidence of melanoma of the sole of the foot really higher in blacks than whites? Int J Cancer 45(4): 691-3

Stone GW, Barzee S, Snarsky V, Santucci C, Tran B, Langer R, Zugates GT, Anderson DG,Kornbluth RS (2009): Nanoparticle-delivered multimeric soluble CD40L DNA combined with Toll-Like Receptor agonists as a treatment for melanoma. PLoS One 4(10): e7334

Stutman O (1974): Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. Science 183(4124): 534-6

Takahashi H, Feuerhake F, Kutok JL, Monti S, Dal Cin P, Neuberg D, Aster JC,Shipp MA (2006): FAS death domain deletions and cellular FADD-like interleukin 1beta converting enzyme inhibitory protein (long) overexpression: alternative mechanisms for deregulating the extrinsic apoptotic pathway in diffuse large B-cell lymphoma subtypes. Clin Cancer Res 12(11 Pt 1): 3265-71

Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, Kayagaki N, Yamaguchi N, Kakuta S, Iwakura Y, Yagita H,Okumura K (2001): Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. Nat Med 7(1): 94-100

Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, Mühlradt PF,Akira S (2000): Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. J Immunol 164(2): 554-7

Takeuchi O, Kawai T, Mühlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K,Akira S (2001): Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. Int Immunol 13(7): 933-40

Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL,Akira S (2002): Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. J Immunol 169(1): 10-4

Terabe M,Berzofsky JA (2004): Immunoregulatory T cells in tumor immunity. Curr Opin Immunol 16(2): 157-62

te Velde AA,Figdor CG (1992): Monocyte mediated cytotoxic activity against melanoma. Melanoma Res 1(5-6): 303-9

Thomas L (1982): On immunosurveillance in human cancer. Yale J Biol Med 55(3-4): 329-33

Tsung K, Dolan JP, Tsung YL,Norton JA (2002): Macrophages as effector cells in interleukin 12-induced T cell-dependent tumor rejection. Cancer Res 62(17): 5069-75

Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD,Smyth MJ (2011): Natural innate and adaptive immunity to cancer. Annu Rev Immunol 29: 235-71

Wang HS, Hung Y, Su CH, Peng ST, Guo YJ, Lai MC, Liu CY,Hsu JW (2005): CD44 cross-linking induces integrin-mediated adhesion and transendothelial migration in breast cancer cell line by up-regulation of LFA-1 (alpha L beta2) and VLA-4 (alpha4beta1). Exp Cell Res 304(1): 116-26

Weide B, Derhovanessian E, Pflugfelder A, Eigentler TK, Radny P, Zelba H, Pföhler C, Pawelec G,Garbe C (2010): High response rate after intratumoral treatment with interleukin-2: results from a phase 2 study in 51 patients with metastasized melanoma. Cancer 116(17): 4139-46

Weide B, Eigentler TK, Pflugfelder A, Leiter U, Meier F, Bauer J, Schmidt D, Radny P, Pföhler C,Garbe C (2011): Survival after intratumoral interleukin-2 treatment of 72 melanoma patients and response upon the first chemotherapy during follow-up. Cancer Immunol Immunother 60(4): 487-93

Weigt H, Mühlradt PF, Emmendorffer A, Krug N,Braun A (2003): Synthetic mycoplasma-derived lipopeptide MALP-2 induces maturation and function of dendritic cells. Immunobiology 207(3): 223-33

Wilde I, Lotz S, Engelmann D, Starke A, van Zandbergen G, Solbach W,Laskay T (2007): Direct stimulatory effects of the TLR2/6 ligand bacterial lipopeptide MALP-2 on neutrophil granulocytes. Med Microbiol Immunol 196(2): 61-71

Wrzesinski SH, Wan YY,Flavell RA (2007): Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. Clin Cancer Res 13(18 Pt 1): 5262-70

Yamazaki S, Okada K, Maruyama A, Matsumoto M, Yagita H,Seya T (2011): TLR2-dependent induction of IL-10 and Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells prevents effective anti-tumor immunity induced by Pam2 lipopeptides in vivo. PLoS One 6(4): e18833

Yan J, Hua F, Liu HZ, Yang HZ,Hu ZW (2012): Simultaneous TLR2 inhibition and TLR9 activation synergistically suppress tumor metastasis in mice. Acta Pharmacol Sin 33(4): 503-12

Yang H, Young DW, Gusovsky F,Chow JC (2000): Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated toll-like receptor 4. MD-2 is required for activation of mitogen-activated protein kinases and Elk-1. J Biol Chem 275(27): 20861-6

Yang HZ, Cui B, Liu HZ, Chen ZR, Yan HM, Hua F,Hu ZW (2009): Targeting TLR2 attenuates pulmonary inflammation and fibrosis by reversion of suppressive immune microenvironment. J Immunol 182(1): 692-702

Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S, et al. (2005): TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. Science 308(5728): 1626-9

Zahringer U, Lindner B, Inamura S, Heine H,Alexander C (2008): TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. Immunobiology 213(3-4): 205-24

Zamanakou M, Germenis AE,Karanikas V (2007): Tumor immune escape mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. Immunol Lett 111(2): 69-75

Zhang Y, Luo F, Cai Y, Liu N, Wang L, Xu D,Chu Y (2011): TLR1/TLR2 agonist induces tumor regression by reciprocal modulation of effector and regulatory T cells. J Immunol 186(4): 1963-9

Zivkovic M, Poljak-Blazi M, Zarkovic K, Mihaljevic D, Schaur RJ,Zarkovic N (2007): Oxidative burst of neutrophils against melanoma B16-F10. Cancer Lett 246(1-2): 100-8

zur Hausen H (1991): Viruses in human cancers. Science 254(5035): 1167-73

Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	*Aqua destillata*
A. bidest.	*Aqua bidestillata*
Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazole
Ak	Antikörper
AP-1	Aktivator-Protein 1
APC	Antigen-präsentierende Zellen
APC-konjugiert	Allophycocyanin-konjugiert
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BALF	bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit
BSA	*Bovine Serum Albumin*
°C	Grad Celsius
CD	*Cluster of Differentiation*
CFDA SE	Carboxyfluorescein diacetat succimidylester
CTL	$CD8^+$ zytotoxische T-Zellen
DAMPs	*damage-assosciated molecular patterns*
DAPI	4′,6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMF	N,N Dimethylformid
E/T-Ratio	Effektor/Zielzell-Verhältnis
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz- Dihydrat
EGM	*Endothelial Cell Growth Medium*
FACS	*Fluorescence Activated Cell Sorter*
FCS	*Fetal Calf Serum*
Fc-Teil	Teil der konstanten Kette des Antikörpers
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	*Forwardscatter*
GFP	*Green Fluorescent Protein*
GRO-α	*Growth Regulated Oncogene-α*
HRP	*Horseradish Peroxidase*

HUVEC	*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICAM-1	*Intercellular Adhesion Molecule 1*
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK-Komplex	I-kappa B Kinase-Komplex
IL	Interleukin
IRAK	*Interleukine-1 Receptor-associated Kinase*
IRF	*Interferon Regulatory Factor*
LFA-1	Integrin alpha-L/beta-2
LPS	Lipopolysaccharid
LRR-Domäne	*Leucin-Rich-Repeat Domain*
mAb	monoklonaler Antikörper
MALP-2	*Macrophage-activating Lipopeptide of 2kilo Dalton*
MAPK	*Mitogen-activated Protein Kinase*
MCP	*Monocyte Chemotactic Protein*
Meth A	Methylcholanthren
MHC	*Major Histocompatibility Complex*
MIP	*Macrophage Inflammatory Protein*
MyD88	*Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88*
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	*Nuclear Factor ´κ-Light-Chain-Enhancer´ of Activated B-Cells*
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Pam_2Cys	S-[2,3-bis(palmitoyloxy)propyl] Cystein
Pam_3Cys	N-α-palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-L-Cystein
$Pam_3CysSK4$	N-palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-(R)-cysteinyl-(S)-seryl-(S)-lysyl-(S)-lysyl-(S)-lysyl-(S)-Lysin
PAMP	*Pathogen-associated Molecular Pattern*

PBS	*Phosphat Buffered Saline*
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pH	*Potentia Hydrogenii*
PJ	Propidiumjodid
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PRR	*Pattern Recognition Receptor*
RIP1	*Receptor-Interacting Protein -1*
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute*
RT	Raumtemperatur
SABC-Methode	Streptavidin-Biotin-Complex-Methode
SD	Standardabweichung
SSC	*Sidescatter*
TAB	*TAK1 Binding Protein*
TAK	*TGF-β activated Kinase*
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TH1-Zellen	T-Helferzellen, die die Ausbildung einer zellulären Immunantwort begünstigen
TH2-Zellen	T-Helferzellen, die die Ausbildung einer humoralen Immunantwort begünstigen
TIRAP	*Toll-Interleukin-1 Receptor Domain Containing Adaptor Protein*
TLR	*Toll-Like-Receptor*
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TRAF	*TNF Receptor-associated Factor*
T_{reg}-Zellen	regulatorische T-Zellen
VCAM-1	*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*
VLA-4	*Very Late Antigen 4*
vs	versus
wt	Wildtyp

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Michael Schön danke ich für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die intensive wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit.

Frau Prof. Dr. Margarete Schön danke ich für ihre Diskussionsbereitschaft und die intensive wissenschaftliche Betreuung, vor allem aber für die Unterstützung bei den ersten Schritten der tierexperimentellen Arbeiten.

Karolin Zachmann möchte ich für zahlreiche praktische Tipps für den Laboralltag sowie für die Einweisung in die Laborarbeit nach langer Laborabstinenz danken. Des Weiteren danke ich Annette Bennemann, die mich stets tatkräftig bei histologischen Arbeiten, insbesondere der Optimierung verschiedenster Antigendemaskierungs-Verfahren unterstützt hat.

Ein Dankeschön für die gute und bereichernde Arbeitsatmosphäre auch an alle anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe Schön, namentlich Nora Drick, Nadin Pletz, Verena Lorenz, Philline Schneider und Katrin Wallbrecht, die mich durch die Höhen und Tiefen des Laboralltags begleitet haben.