



1 Einleitung und wissenschaftlicher Hintergrund

1.1 Das equine maligne Melanom

Der aktuelle Wissensstand zu Ätiologie, Klinik und Therapie equiner Melanome ist in Publikation 1 (Anhang 10.1) zusammengefasst. Eine Übersicht zu Immunologie und Immuntherapie des equinen malignen Melanoms wird in Publikation 2 (Anhang 10.2) dargestellt. Diese folgende Einleitung ist diesen Publikationen in Teilen entnommen.

Das equine Melanom gehört zu den häufigsten Hauttumoren des Pferdes. Vergrauende Pferde (Schimmel) sind für diese melanozytäre Neoplasie prädisponiert [1]. Aufgrund des langsamen Wachstums und der häufig erst spät auftretenden Metastasierung werden Melanome beim Schimmel häufig in ihrer Malignität unterschätzt. Es wird derzeit aber davon ausgegangen, dass ein Großteil der equinen melanozytären (benigen) Tumore eine maligne Transformation durchmacht. Aufgrund ihres hohen Metastasierungsrisikos im Krankheitsverlauf ist daher jedes Melanom als potenziell maligne anzusehen, sodass der Begriff des equinen malignen Melanoms (EMM) gerechtfertigt ist [2]. Die Prävalenz des EMM liegt bei älteren Schimmeln bei mehr als 65 % [1,3]. Inzwischen ist auch die genetische Basis dieser Neoplasie untersucht [4]. Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Inzidenz dermalen Melanome und dem autosomal dominant vererbten Merkmal des Ergrauens beim Schimmel. Dieses wird durch eine 4.6 kb Duplikation im Intron 6 des Syntaxin-17 (STX17)-Gens verursacht [5]. Die Heritabilität für die Entstehung von Melanomen beim Schimmel ist moderat (0,37) und unterliegt einem polygenen Effekt [6]. Die genaue Pathogenese ist allerdings noch nicht abschließend geklärt. Die intronische 4.6 kb Duplikation in STX17 steht mit einer konstitutiven Aktivierung eines Zellstoffwechselforgangs in melanozytären Zellen der Schimmel im Zusammenhang, der durch Mitogen-aktivierte Proteinkinasen, genauer via *extracellular-signal regulated kinases* (ERK) charakterisiert ist [7]. Dabei sind typische somatische Mutationen, die diesen Stoffwechselweg bei der Melanomentstehung anderer Spezies aktivieren, hingegen nicht nachweisbar [7].

Die Tumore zeigen meist über längere Zeit ein langsames, oft infiltratives Wachstum an typischen Prädilektionsstellen, wie der Schweifunterseite, der Perianalregion, den Augenlidern, den Lippen, der Parotis oder den Luftsäcken [8]. Häufig sind Signalement und klinisches Erscheinungsbild ausreichend, um eine Verdachtsdiagnose zu stellen. Gesichert werden kann diese durch die zytologisch-histologische Untersuchung eines Feinnadelaspirats oder einer Tumorbiopsie. Im Allgemeinen sind melanotische Melanome schon an dem makroskopisch erkennbaren schwarz pigmentierten Gewebe zu diagnostizieren. Mit zunehmender Malignität verlieren die Tumore mehr und mehr an Pigment, sodass sie sich amelanotisch präsentieren.



Therapeutisch werden derzeit primär lokale Therapien mit intraläsional verabreichten Therapeutika, Bestrahlung, Hyperthermie und unterschiedlichen chirurgischen Verfahren angewandt. Zur intraläsionalen Therapie kommen Chemotherapeutika, wie Cisplatin, Carboplatin oder 5-Fluorouracil, zur Anwendung [9-11]. Melanome (human und kanin) sprechen eher schlecht auf Chemotherapeutika an, sodass die intratumorale Konzentration des Chemotherapeutikums für eine erfolgreiche Therapie entsprechend hoch sein muss [12]. Eine Kombination der intratumoralen Injektion mit anschließender Elektroporation (Elektrochemotherapie) konnte lokal eine Tumorregression hervorrufen und limitierte die systemische Toxizität des Chemotherapeutikums Cisplatin bei Pferden mit Melanomen [13]. Die systemische Toxizität für die gesunden Zellen des Patienten und der Personen, die mit dem behandelten Pferd umgehen, schränkt jedoch die Nutzung von Cisplatin aus Sicherheitsaspekten ein. Die chirurgische Exzision hingegen ist besonders bei solitären, kleinen Tumoren erfolgversprechend [14,15]. Da jedoch eventuell vorhandene Metastasen durch eine lokale Therapie nicht erreicht werden und Rezidive möglich sind, ist einer systemischen Behandlung der Vorzug zu geben. Ein Pferd, bei dem mehrfach chirurgisch die perineale Melanombürde verkleinert wurde und Cisplatin mit Elektrochemotherapie ins verbleibende Wundbett instilliert wurde, musste wenige Monate nach der Therapie aufgrund multipler abdominaler Metastasen euthanasiert werden [16]. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Kombinationstherapie aus wiederholter unvollständiger chirurgischer Tumorentfernung und Elektrochemotherapie die Metastasierung begünstigt hat. Da es sich beim Melanom ferner um eine Neoplasie mit potenziell guter Ansprechbarkeit auf eine immunologische Therapie handelt, fokussiert sich die Forschung aktuell auf diese Therapieform.

1.2 Die immunologische Tumorthherapie

Aufgabe des Immunsystems ist der Schutz körpereigener Zellen. Die Bekämpfung von Neoplasien stellt damit eine Herausforderung für das Immunsystem dar, da es sich hierbei um zwar entartete, aber doch körpereigene und damit zumeist wenig immunogene Zellen handelt. Trotz der Infiltration solider Tumoren mit verschiedenen Immuneffektorzellen sind diese häufig nicht in der Lage, eine bedeutsame Tumorregression zu bewirken. Dies liegt daran, dass die T-Zellinfiltration in soliden Tumoren häufig regulatorische T-Zellen beinhaltet und regulatorische Substanzen ausgeschüttet werden, die eine effektive Tumorlyse verhindern [17-19]. Zur zuverlässigen Tumorbekämpfung ist deshalb das Zusammenspiel des angeborenen (unspezifischen) Immunsystems mit dem adaptiven (spezifischen) Immunsystem unabdingbar. Das Ziel einer antineoplastischen Immuntherapie ist die dauerhafte Manipulation des Immunsystems von Tumorpatienten, damit eine effektive antitumorale Immunantwort zur klinischen Tumorregression führt. „The ideal cancer immunotherapy agent should discriminate between cancer and normal cells (specificity), be potent enough to kill small or large numbers of tumor cells (sensitivity), and prevent recurrence of a tumor (durability).“ [20] Um diese Ziele zu erreichen, kann



der Gentransfer eine geeignete Methode darstellen [21]. Im Folgenden werden zur besseren Verständlichkeit grundlegende Mechanismen in der körpereigenen Tumorbekämpfung aufgeführt.

An der Erkennung und Abwehr von Tumoren sind Antigen-präsentierende Zellen, neutrophile Granulozyten und lymphoide Zellen der unspezifischen Immunabwehr beteiligt. Eine Polarisierung dieser Zellen zugunsten einer antitumoralen Wirksamkeit (Makrophagen vom Typ I, neutrophile Granulozyten vom Typ I, T-Helfer-Zellen vom Typ I) führt zu Synergien in der Tumorabwehr. Interferone spielen bei der Aktivierung und Stimulation der Effektorzellen eine Rolle und übernehmen eine wichtige Aufgabe in der Vernetzung der Antigen-unspezifischen und Antigen-spezifischen antitumoralen Immunantwort [22]. Typ-I-Interferone werden unter anderem von dendritischen Zellen sezerniert und haben neben ihrer antiviralen auch eine antitumorale Wirkung [23]. Interferon gamma ($\text{IFN}\gamma$) ist ebenfalls zentraler Bestandteil in der Th1-polarisierten und gegen Tumore gerichteten Immunantwort [24-27]. Kürzlich wurde der Nachweis erbracht, dass Tumor-DNA im Zytosol dendritischer Zellen erkannt werden kann und über Signalwege, die den *stimulator of interferon gene complex* (STING) einschließen, zur Aktivierung der unspezifischen Abwehrmechanismen beitragen [28].

In der spezifischen Tumormunität spielen Tumor-assoziierte Antigene (TAA) eine zentrale Rolle. Verschiedene TAA des Melanoms sind bekannt und können als Ziel einer Immuntherapie fungieren [29-32]. Sie werden den T-Zellen entweder durch Antigen-präsentierende Zellen (über MHC-I oder MHC-II) oder auf den Tumorzellen an MHC-I-Komplexe gekoppelt gezeigt. Nach Erkennung der TAA durch T-Zellen können durch diese weitere Effektorzellen aktiviert, Chemokine und Zytokine freigesetzt und co-stimulatorische Moleküle induziert werden. Je nachdem, welche Zellen angesprochen werden und welche Mediatoren in der Folge gebildet werden, kommt es eher zu einer Th1-Antwort (T-Helferzelltyp 1 (CD8^+)) mit Bildung von zytotoxischen T-Zellen oder zu einer Th2-Antwort (T-Helferzelltyp 2 (CD4^+)) [33]. Damit die Immunantwort koordiniert abläuft und auf die unspezifische Reaktion eine antigenspezifische Antwort folgt, muss das Zusammenspiel zwischen angeborenem und Antigen-spezifischem Teil des Immunsystems optimal funktionieren.

In der Therapie equiner Melanome spielen systemische Therapien bislang kaum eine Rolle und wenn, dann handelt es sich um Immuntherapien. Cimetidin, ein Histamin-2-Rezeptor-Antagonist, konnte sich trotz anfänglich erfolgversprechender Ergebnisse beim Pferd nicht durchsetzen, da neuere Untersuchungen die früheren Therapieerfolge nicht bestätigen konnten und die orale Bioverfügbarkeit schlecht ist [34-37]. Andere systemische Therapien basieren meist auf Einzelfallberichten oder auf Fallserien mit autologen Tumorzellen, xenogener Interleukin-12-Gentherapie, xenogener Tyrosinase-DNA-Vakzinierung oder kombinierter autologer Vakzine mit Suizidgentherapie, Ganciclovir und adjuvanter xenogener Zellzytokintherapie [38-42].



Zu den Zytokinen mit antitumoralen Effekten gehören insbesondere die Interleukine 12 und 18. Diese Zytokine können eine Verstärkung der zellulären Immunität hervorrufen und die Tumor-vermittelte Neoangiogenese inhibieren [43-47]. Die systemische Verabreichung der rekombinanten Proteine selbst kann jedoch eine lebensbedrohliche Toxizität auslösen [48-50]. Bei systemischer Gabe von Interleukinen fallen die anfänglich hohen Plasmakonzentrationen aufgrund der kurzen Halbwertszeit zudem sehr schnell unter eine wirksame Grenze. Folglich ist die Interleukintherapie in Form rekombinanter Proteine eine ungeeignete Methode. Die Verabreichung von Zytokin-DNA kann hingegen eine Immunantwort ohne toxische Nebenwirkungen potenzieren und hält durch die transgene Synthese im Organismus eine konstante Plasmakonzentration aufrecht [51,52]. Weiterhin soll die intratumorale Zytokingentherapie die Immunogenität des Tumors erhöhen, indem transgene Zytokine am Ort der Neoplasie exprimiert und sezerniert werden, welche wiederum lokal eine parakrine Wirkung auf Effektor-T-Zellen entfalten sollen [53]. Durch die Wahl der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-12 und -18 kann möglicherweise bereits durch deren unspezifische proinflammatorische Wirkung die Hemmung verschiedener Abwehrmechanismen gegenüber den Tumorzellen und ihren assoziierten Antigenen aufgehoben werden. Aus diesen Gründen ist die Zytokingentherapie mit den Interleukinen 12 und 18 zentrales Thema der vorliegenden Untersuchung.

1.2.1 Interleukin-12 und -18

Das heterodimere Interleukin-12 (IL-12) besteht aus der konstitutiv produzierten 35 kDa Untereinheit (IL-12 α) und der durch Stimuli induzierbaren 40 kDa Untereinheit (IL-12 β) [54,55]. Es handelt sich um ein Schlüsselzytokin in der Immunantwort sowie der Entzündungsreaktion und wird von verschiedenen Effektorzellen (Phagozyten, Lymphozyten, dendritischen Zellen) synthetisiert [55,56]. Neben Bakterien und Parasiten können auch doppelsträngige und bakterielle DNA die Expression von IL-12 stimulieren [57]. Interleukin-12-Rezeptoren befinden sich auf aktivierten T-Zellen und auf Natural-Killer-Zellen (NK-Zellen) [58]. Aufgrund dessen nimmt Interleukin-12 neben seiner Rolle bei Erkrankungen, wie Diabetes mellitus, Psoriasis, multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis und entzündlichen Darmerkrankungen, eine wichtige Stellung in der Koordinierung der zellulären Immunantwort bei Tumorerkrankungen ein [52]. Die antitumorale Wirkung von Interleukin-12 beruht dabei auf verschiedenen Mechanismen: Die Erkennbarkeit der Tumore für das Immunsystem wird durch eine hochregulierte Expression von MHC-I- und -II-Molekülen und interzellulären Adhäsionsmolekülen (ICAM-I) auf Melanomzellen nach Stimulation mit Interleukin-12 erhöht [59] und zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) und NK-Zellen werden aktiviert [60]. Zusätzlich hat Interleukin-12 einen stark inhibitorischen Effekt auf die tumorinduzierte Neoangiogenese und kann auf diese Weise zur Nekrose von Tumoren beitragen [46,61,62]. Die Aktivierung von Makrophagen und die dadurch induzierte Synthese und Freisetzung reaktiver Stickstoffverbindungen ist ein weiterer Mechanismus der Tumorlyse [63]. Die Wirkung von Interleukin-



12 ist hierbei allerdings abhängig von der Art der Tumoren [64]. Die Hauptwirkung von Interleukin-12 besteht in der Induktion des nachgeschalteten Botenstoffs Interferon gamma ($IFN\gamma$). Dadurch werden beide Anteile des Immunsystems (adaptiv/spezifisch und angeboren/unspezifisch) gleichermaßen aktiviert. Durch die Wirkung von $IFN\gamma$ werden verschiedene antitumoral wirksame Signalwege mit Beteiligung von Makrophagen und anderen Immunzellen stimuliert [65]. Interleukin-12 führt überdies zu einer Verstärkung der Th1-Immunantwort [66-68]. Naive T-Zellen entwickeln sich durch Stimulation mit Interleukin-12 in Kombination mit Interleukin-27 zu Th1-Zellen, ihre Entwicklung zu Th2-Zellen wird dagegen unterbunden [69,70]. Dies führt zu einer Steigerung und Expansion der Th1-Antwort durch positive Feedback-Mechanismen [64]. Im Mausmodell und bei humanmedizinischen Melanompatienten wurde eine antimetastatische Wirkung von Interleukin-12-Plasmid-DNA nachgewiesen [51,71,72]. Die intratumorale Applikation bewirkte eine Tumorregression [73-75]. Auch beim Pferd konnte die intratumorale Injektion humaner Interleukin-12-Plasmid-DNA einen Rückgang des Tumorwachstums bis hin zur Tumorregression verursachen [76]. Diese Wirkung macht Interleukin-12 auch beim Pferd zu einem vielversprechenden Th1-verstärkenden Adjuvanz für Tumorstoffe und ist Grundlage der vorliegenden Arbeitshypothesen.

Interleukin-18 ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 18 kD. Die Kombination von Interleukin-12 und -18 verstärkt die antitumoralen Eigenschaften von Interleukin-12 [46,77,78]. Interleukin-18 gehört zur Interleukin-1-Zytokinfamilie und wird von Immunzellen (Makrophagen, dendritischen Zellen und Mikroglia), aber auch von Zellen anderer Gewebe (Keratinocyten, synovialen Fibroblasten, Osteoblasten, Splenozyten, Nebennierenrindenzellen) synthetisiert. Das Zytokin wirkt über den Interleukin-18-Rezeptor (IL-18R) auf Makrophagen, Granulozyten und NK-Zellen [79,80], aber auch Endothelzellen und glatte Muskelzellen können IL-18R exprimieren [81]. Seine Wirkung beruht auf der Potenzierung der $IFN\gamma$ -Induktion in T-Zellen und NK-Zellen durch andere Faktoren, z. B. durch Interleukin-12 oder bakterielle Stimuli [82-91]. Neben der Induktion von $IFN\gamma$ induziert Interleukin-18 weitere Zytokine ($TNF\alpha$, $IL-1\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-4$, $IL-6$, $IL-10$ und $IL-13$) [92,93]. Ob Interleukin-18 hierbei eher Th1-Zytokine oder eher Th2-Zytokine induziert, ist von den co-stimulierenden Faktoren abhängig. Die Interleukin-18-Synthese wird über NF- κ B und *IL-1R associated kinase* (IRAK) reguliert [94]. Interleukin-18-DNA hat *in vitro*, im Mausmodell und in klinischen Studien antitumorale und antiangiogenetische Wirkungen auf Melanome gezeigt [95-97].

Der Synergismus der proinflammatorischen Interleukine 12 und 18 beruht auf verschiedenen molekularen Mechanismen und ist unter anderem abhängig von ihrer Wirkung auf NK-Zellen und der daraus resultierenden $IFN\gamma$ -Synthese [98]. Interleukin-12 stimuliert zudem die Expression des IL-18R. Dies könnte ein Grund für die überlegene antitumorale Wirksamkeit der therapeutischen Kombination von Interleukin-12 und -18 im Mausmodell gegenüber der Monotherapie sein [77,99]. Zudem konnte die



Toxizität von Interleukin-12 durch die Kombination mit Interleukin-18 gemildert werden. Dieser Effekt resultiert wahrscheinlich aus einer verstärkten IL-10-Synthese und beeinflusst die antitumorale Wirksamkeit nicht [100]. In der vorliegenden Habilitationsschrift wurde die antitumorale Wirkung von Interleukin-12 und Interleukin-18 bei equinen Melanompatienten allein und in Kombination untersucht.

1.2.2 Therapeutische Tumorstoffe

Neben der unspezifischen Zytokingenimmuntherapie spielt die spezifische therapeutische Vakzinierung gegen Tumoren eine wichtige Rolle in der Tumorstoffimmuntherapie. Die prophylaktische Vakzinierung gehört bei Infektionskrankheiten, wie Tetanus, Diphtherie und Tollwut, in der Humanmedizin ebenso wie bei Tetanus, Influenza und Equinem Herpes Virus 1 und 4 in der Pferdemedizin zum Standard. Die therapeutische Vakzinierung auf dem Gebiet der Onkologie ist Gegenstand vieler wissenschaftlicher Untersuchungen. Auch in die Veterinärmedizin hielt dieser Therapieansatz von Malignomen bereits früh Einzug. Im frühen zwanzigsten Jahrhundert wurde eine Tumorstoffvakzine aus autologem Tumorgewebe zur Behandlung der Melanome eines Pferdes hergestellt [101]. Seitdem wurden Tumorstoffvakzinen in der Human- und Veterinärmedizin verbessert und in experimentellen und klinischen Untersuchungen mit variablen Erfolgen zur Therapie von Melanomen eingesetzt [102-106]. Die Vakzinierungserfolge der meisten klinischen Studien waren jedoch auf eine partielle Tumorstoffregression begrenzt.

Durch die therapeutische Tumorstoffvakzinierung können dem Immunsystem Tumor-assoziierte Antigene (TAA) auf unterschiedlichen Wegen präsentiert werden. Dazu dienen reine Tumorstoffzelllysate, dendritische Zellen, verschiedene Adjuvantien, modifizierte Tumorstoffzellen und DNA-Vakzinen [107-124]. Diese unterschiedlichen Vakzinierungsstrategien sind derzeit in der klinischen Erprobung.

Zu den Differenzierungsantigenen, die den TAA untergeordnet sind und von Melanomzellen exprimiert werden, gehören z. B. gp100, Melan A und Tyrosinase [32,125]. Diese besitzen grundsätzlich eine relativ geringe Immunogenität, da sie nicht nur von Melanomzellen, sondern auch von gesunden Melanozyten exprimiert werden, sodass eine immunologische Toleranz gegenüber diesen Molekülen besteht. In Melanomen sind diese Differenzierungsantigene aber häufig überexprimiert und können dadurch potenzielle Zielmoleküle für eine Vakzinierung darstellen. Es ist zu erwarten, dass sich Tyrosinase und gp100 für eine therapeutische Melanomvakzinierung beim Pferd eignen, da ihre Expression in Melanomen von Pferden nachgewiesen wurde [32,125,126].

Es existieren bereits Impfstrategien gegen diese melanozytären Differenzierungsantigene. Zur Melanomtherapie des Hundes wurde unlängst eine DNA-Vakzine (Oncept Melanoma[®], Merial Inc., Athens, USA), die auf xenogener TAA-DNA basiert, von der US-amerikanischen *Food and Drug Administration* (U.S. FDA) zugelassen. Ihr Wirkmechanismus beruht auf der Immunisierung gegen die humane Tyrosinase. Generell soll die Vakzinierung von Tumorstoffpatienten mit DNA, die xenogene Tumorstoff-



assoziierte Differenzierungsantigene kodiert, die Immunogenität dieser TAA steigern. Dieses Ziel wird hierbei durch die Entwicklung einer Immunantwort gegen das spezie fremde transgene Protein (im Falle von Oncept Melanoma® gegen das Protein humane Tyrosinase) und einer Kreuzprotektivität gegen das entsprechende körpereigene Protein mit hoher Homologie erreicht. Dazu muss sowohl eine humorale Immunantwort als auch eine spezifische T-Zellantwort (zytotoxische T-Zellen) generiert werden und das angeborene Immunsystem mit dem adaptiven Immunsystem koordiniert zusammenarbeiten. Erste Untersuchungen konnten die Induktion sowohl einer humoralen als auch zellvermittelten Immunantwort gegen die humane Tyrosinase bei geimpften nicht-tumorkranken Pferden nachweisen [42,127]. Aber auch durch die therapeutische Vakzinierung equiner Melanompatienten mit xenogener (humaner) Tyrosinase-DNA ist nur bei einem Drittel der Pferde die Induktion einer Tumorregression zu erwarten [128].

1.3 Transfektion eukaryontischer Zellen mit Nukleinsäuren

Voraussetzung für eine erfolgreiche Gentherapie ist die Transfektion (Einbringen von Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen) der Zielzellen im behandelten Organismus. Dadurch wird der *In-vivo*-Gentransfer zur Gentherapie. Um dieses Ziel zu erreichen, muss die DNA eine für sie zunächst impermeable Membran überwinden. Oberste Bedeutung haben hier zum einen die Effizienz der Transfektion und zum anderen die Sicherheit der Transfektionsmethode in Bezug auf adverse Reaktionen, immunogene Wirkung bei wiederholter Verabreichung, Entzündungsreaktionen und Selektivität in Bezug auf die Zielzellen.

Man unterscheidet grundsätzlich zwischen viralen und nicht-viralen Transfektionsmethoden:

(1) Virale Expressionsvektoren haben den Vorteil einer hohen Transfektionseffizienz, bergen aber verschiedene Risiken. Wegen ihrer Immunogenität können virale Vektoren Immunreaktionen unterschiedlichen Ausmaßes bis hin zum tödlich verlaufenden systemischen Entzündungs-Reaktionssyndrom hervorrufen [129]. Weitere Nachteile viraler Vektoren sind das Risiko, *in vivo* nicht nur die Zielzellen, sondern auch andere Zellen zu infizieren, eine mögliche Integration von Virus-DNA ins Genom an ungewollten Lokalisationen und ihr onkogenes Potenzial [130]. Auch die geringe Größe der DNA, die durch virale Vektoren transportiert werden kann, limitiert ihre Nutzbarkeit [130].

(2) Nicht-virale Expressionsvektoren sind zwar *in vivo* durch geringere Transfektionseffizienzen limitiert, sind jedoch sicherer, einfacher in der Herstellung, weisen keine Größeneinschränkung auf und sind kostengünstiger herzustellen [130]. Auch die Immunreaktion ist im Allgemeinen auf nicht-virale Vektoren geringer ausgeprägt als auf virale [131].

Da sowohl die Transfektionseffizienz als auch die Toxizität der Vektoren für die Anwendung am Patienten in Bezug auf die biologische Sicherheit eine elementare Rolle spielen, sind in der