



## 1 Einleitung

Bei Melanomen handelt es sich um Tumoren der Pigmentzellen. Sie machen 3,8 % aller Tumoren beim Pferd aus. Besonders bei Schimmeln kommen Melanome mit einer hohen Inzidenz vor. Ungefähr 80 % dieser Tiere bilden ab einem Alter von 15 Jahren Melanome aus. Das Melanom des Pferdes wird besonders in der Perianalregion sowie am Kopf im Bereich der Lippen, der Augenlider und der Parotisgegend beobachtet. Die Tumoren metastasieren über die Blut- und Lymphgefäße in die regionalen Lymphknoten und von dort in die inneren Organe. Dies kann schwere Funktionsverluste nach sich ziehen. Ein häufigeres Problem stellen jedoch durch expansives Wachstum der Tumoren auftretende Kot- und Harnabsatzstörungen dar. Daneben können Melanome je nach Lokalisation die Gebrauchsfähigkeit des Pferdes erheblich beeinträchtigen. Bisher existieren keine erfolgreichen Therapieverfahren gegen das equine Melanom. Eine Behandlungsmöglichkeit stellt die Tumorimmunotherapie dar. Bei einem Verfahren dieser Therapiemethode wird für Zytokine kodierende Plasmid-DNA intratumoral appliziert. Hiermit soll die Immunogenität von Tumoren gesteigert werden, damit diese vom körpereigenen Abwehrsystem erkannt und bekämpft werden können. Aus zahlreichen wissenschaftlichen Arbeiten der Human- und Veterinärmedizin geht hervor, dass das Zytokin Interleukin-12 zur Tumorregression führt und antimetastatische Wirkungen besitzt. Ziel der vorliegenden Untersuchung ist die Ermittlung der Eliminations- und Expressionskinetik intratumoral verabreichter für Interleukin-12 kodierender Plasmid-DNA in Melanomen beim Schimmel. Daneben wird beabsichtigt die IFN- $\gamma$ -mRNA-Expression im Tumorgewebe zu bestimmen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen zur Verbesserung der Melanomtherapie mit Interleukin-12 beitragen.



## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Melanome

#### 2.1.1 Pathogenese

Bei Melanomen handelt es sich um Tumoren der Pigmentzellen (PULLEY u. STANNARD 1990; WEISS u. TEIFKE 1999). Die Geschwülste treten häufig bei alten Schimmeln (WEISS u. TEIFKE 2007), vereinzelt auch bei Pferden mit anderen Fellfarben auf (KNOTTENBELT u. PASCOE 2000; SCOTT u. MILLER 2003). Sie machen ungefähr 3,8 % aller diagnostizierten equinen Tumoren (SUNDBERG et al. 1977) und 6-14 % der Hauttumoren beim Pferd aus (VALENTINE 2006). Annähernd 75-80 % aller Schimmel über 15 Jahre sind von multiplen Melanomen befallen (VALENTINE 1995; SELTENHAMMER et al. 2003). Die Tumoren treten selten vor dem sechsten Lebensjahr auf (PULLEY u. STANNARD 1990). Die Größe und die Anzahl korrelieren signifikant mit dem Alter des Pferdes, und es besteht keine Rasse- oder Geschlechtsdisposition (SCOTT u. MILLER 2003; DIETZ 2006). Der Grund für die Entstehung von Melanomen ist unbekannt (PULLEY u. STANNARD 1990; SCOTT u. MILLER 2003). Die hohe Inzidenz von Melanomen bei Schimmeln wird mit der altersabhängigen Depigmentation in Zusammenhang gebracht (J EGLUM 1997; RIEDER et al. 2000). PILSWORTH und KNOTTENBELT (2006) vermuten, dass es sich bei dieser Erkrankung um eine Speicherkrankheit handeln könnte. ROSENGREN PIELBERG und Mitarbeiter (2008) machen eine im Zusammenhang mit der Fellfarbe Schimmel selektierte Mutation für die frühzeitige Vergrauung und die erhöhte Anfälligkeit von Schimmeln für Melanome verantwortlich.

#### 2.1.2 Klinisches Erscheinungsbild

Für das equine Melanom werden drei Wachstumsformen beschrieben. Die erste Form zeigt ein langsames Wachstum über viele Jahre ohne Metastasenbildung. Eine



zweite Form ist durch ein jahrelanges langsames Wachstum und ein plötzlich einsetzendes rasches Wachstum mit Metastasenbildung gekennzeichnet. Die dritte Form beinhaltet maligne Tumoren, die von Beginn an ein schnelles Wachstum zeigen (SCOTT u. MILLER 2003; REES 2004). Die genannten Wachstumsformen beziehen weder die Epidermis noch die dermoepidermale Verbindungszone mit ein, sondern sind entweder in der Dermis oder in der Subkutis lokalisiert (FLEURY et al. 2000; SELTENHAMMER et al. 2004). Die Geschwülste sind für gewöhnlich fest, schwarz und wachsen überwiegend knötchenförmig (REES 2004). Einige Tumoren sondern eine dickflüssige, schwarze Substanz ab (SCOTT u. MILLER 2003). Die das Melanom überdeckende Haut kann haarlos, pigmentiert, ulzeriert oder normal erscheinen (SHAPPELL u. LITTLE 1992). Die Tumoren können sich an jeder Stelle des Körpers entwickeln, treten für gewöhnlich aber an der Schweifrübenunterseite, an den äußeren Geschlechtsorganen und in der Perianalregion auf (SCOTT u. MILLER 2003). Am Kopf wachsen die Neoplasien im Bereich des Ohrgrundes, der Parotisgegend, der Lippen und der Augenlider (SCOTT u. MILLER 2003; DIETZ 2006). Üblicherweise zeigen equine dermale Melanome ein multizentrisches Wachstum (JEGLUM 1997). Daneben metastasieren Melanome über die Blut- und Lymphgefäße in die regionären Lymphknoten (PULLEY u. STANNARD 1990; JEGLUM 1997). Am häufigsten sind das Brust- und das Bauchfell, die Lymphknoten des Magen-Darm-Kanals, die Leber, die Lungen und die Milz von Tochtergeschwülsten betroffen (DIETZ 2006). Aber auch die Ohrspeicheldrüsen, die Luftsäcke und die Iriden (KNOTTENBELT u. PASCOE 2000), das Herz (JEGLUM 1997; PASCOE u. KNOTTENBELT 1999; MACGILLIVRAY et al. 2002) und die Blutgefäße (MACGILLIVRAY et al. 2002) sowie das Gehirn (JEGLUM 1997) und das Rückenmark (PASCOE u. KNOTTENBELT 1999) werden befallen. Die Metastasen können, abhängig von dem betroffenen Organ, zu den unterschiedlichsten klinischen Symptomen führen (SHAPPELL u. LITTLE 1992; MACGILLIVRAY et al. 2002). Ein häufigeres Problem stellen jedoch die durch das expansive Tumorwachstum bedingten Kot- und Harnabsatzstörungen dar (ROWE u. SULLINS 2004). Tumoren in der Gurt- und Sattellage beziehungsweise im Bereich des Zaumzeugs schränken die Nutzung des Tieres als Reitpferd ein.



## 2.2 Immunologie

Das Abwehrsystem ist ein System verschiedenartiger Zellen, die mit Hilfe von Mediatoren und Oberflächenmolekülen in vielfältiger Weise miteinander in Wechselwirkung treten. Die Zellen der unspezifischen Abwehr (Monozyten, Granulozyten, NK-Zellen) und die Zellen der spezifischen Abwehr (B-Zellen, T-Zellen) gehen aus der myeloischen und lymphatischen Reihe der mesenchymalen Retikulumzellen im Knochenmark hervor. Die Zellen der spezifischen Abwehr differenzieren sich im Laufe ihrer Entwicklung und bilden antigenspezifische Rezeptoren aus. Die T-Zellen lassen sich in Subtypen unterteilen. CD8-T-Zellen (zytotoxische T-Lymphozyten) erkennen und lysieren Wirtszellen, die mittels MHC-1-Molekülen intrazelluläre Antigene auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. CD4-T-Zellen (T-Helferzellen) erkennen extrazelluläre Antigene, welche von Phagozyten aufgenommen und mittels MHC-2-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert wurden. MHC-1-Moleküle kommen auf allen Zellen vor, MHC-2-Moleküle dagegen nur auf antigenpräsentierenden B-Zellen, Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen. Die aktivierten CD4-T-Zellen sezernieren eine Vielfalt an Zytokinen, mit denen sie andere Immunzellen beeinflussen. Die CD4-T-Zellen (Th0-Zellen) differenzieren sich zu Th1- und Th2-Zellen. Diese beiden Zelltypen sind Antagonisten und unterscheiden sich hinsichtlich ihres produzierten Zytokinspektrums. Die Bildung von Th1-Zellen wird durch IL-12 induziert. Th1-Zellen fördern durch  $\text{IFN-}\gamma$  die Bildung weiterer Th1-Zellen, führen zur Makrophagenaktivierung und hemmen die Bildung von Th2-Zellen. Th2-Zellen begünstigen die Bildung weiterer Th2-Zellen, fördern die Antikörperproduktion und hemmen die Bildung von Th1-Zellen. Vereinfacht kann gesagt werden, dass Th1-Zellen die zellvermittelte Immunantwort unterstützen, währenddessen Th2-Zellen für die humorale Immunantwort mitverantwortlich sind (JUNGI 2000).



## 2.3 Tumorimmunologie

### 2.3.1 Tumorantigene

Das Immunsystem kämpft nicht nur gegen fremde Pathogene, sondern auch gegen körpereigene neoplastische Zellen (JUNGI 2000). Die meisten Tumoren weisen genetische Veränderungen in Form von Mutationen, Genamplifikationen, chromosomalen Deletionen oder Translokationen auf. Diese Veränderungen bewirken eine Expression modifizierter Proteine in den Tumorzellen, welche antigene Zielstrukturen für die Immunabwehr darstellen (BEVERLEY 1995). Diese Antigene werden vom Immunsystem erkannt und lösen eine Immunantwort aus (TIZARD 2004). Das Immunsystem vernichtet die meisten Tumorzellen aufgrund tumorassoziierter Antigene kurz nach ihrer Entstehung, noch bevor sich diese teilen können (JUNGI 2000). Tumorantigene wirken auf natürliche Weise allerdings nicht stark immunogen (JANEWAY et al. 2002), und die induzierte Immunantwort vermittelt meist keine Schutzwirkung (JUNGI 2000). Obwohl Tumorantigene eine Antitumorreaktion *in vitro* und *in vivo* auslösen können, entsteht eine spontane Reaktion gegen einen bereits etablierten Tumor nur in Ausnahmefällen (JANEWAY et al. 2002). Trotzdem stellen sie wichtige Angriffspunkte für moderne Therapiekonzepte dar (JUNGI 2000).

### 2.3.2 Antitumorimmunität

Das körpereigene Abwehrsystem verfügt über eine ganze Reihe antineoplastischer Wirkungen (JUNGI 2000). Histologische Untersuchungen menschlicher Tumoren haben gezeigt, dass die Mehrzahl der Tumoren deutlich erkennbar mit Entzündungszellen infiltriert sind (BEVERLEY 1995). Die wichtigsten Faktoren zur Bekämpfung von Tumorzellen sind NK-Zellen, T-Zellen, Makrophagen und Antikörper (TIZARD 2004). NK-Zellen stellen eine natürliche, nicht durch Immunisation erworbene Abwehr gegen Tumoren dar und zerstören Tumorzellen, die auf ihrer Oberfläche keine MHC-1-Moleküle exprimieren (JUNGI 2000). Es wurde erkannt, dass der Großteil der Zytotoxizität von NK-Zellen vermittelt wird (BEVERLEY 1995). Tierversuche haben gezeigt, dass es Immunreaktionen auf



Tumoren gibt und dass T-Zellen eine entscheidende Vermittlerrolle bei der Tumorummunität spielen (JANEWAY et al. 2002). Zytolytische T-Zellen erkennen Tumorantigene und lysieren Tumorzellen, sofern diese MHC-1-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Makrophagen wirken auf Tumorzellen zytostatisch und zytolytisch. Das Abtöten der Tumorzellen erfolgt durch die Einleitung der Apoptose (JUNGI 2000). Ihre wichtigsten Effektormechanismen sind die Produktion von Stickoxid, Sauerstoffradikalen, Zytokinen und Esterasen. Antikörper, die gegen tumorassoziierte Antigene gerichtet sind, vermitteln eine antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität. Zytokine und Hormone können das Wachstum gewisser Tumoren hemmen (JUNGI 2000).

### **2.3.3 Immun-„escape“-Mechanismen**

Tumorzellen entgehen der Kontrolle des Immunsystems auf vielfältige Weise. Ein Grund ist die unzureichende Immunogenität von Tumoren (JUNGI 2000). Anfangs ist der Tumor zu klein, um vom Immunsystem erkannt zu werden und später, wenn er eine Immunantwort stimuliert, bereits zu groß für einen Abbau (BEVERLEY 1995). Tumorzellen können der Abwehr durch die Veränderung oder den Verlust von Antigenen, durch das Verschwinden von MHC-1-Molekülen oder durch die Entwicklung einer Resistenz widerstehen (JUNGI 2000). Tumoren führen unter anderem durch die Bildung immunsuppressiver Zytokine, wie etwa TGF- $\beta$ , zur Immunsuppression (JANEWAY et al. 2002). Ein weiterer Grund für die ungenügende Wirksamkeit des Immunsystems sind so genannte „enhancing antibodies“. Dies sind Antikörper, welche die Erkennungsstrukturen für T-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen auf der Tumoroberfläche blockieren (JUNGI 2000) und damit das Tumorstadium verstärken (WEISS 1982).

## **2.4 Zytokine**

Zytokine sind lösliche hormonartige Substanzen und ermöglichen die interzelluläre Kommunikation (JUNGI 2000). Nach ihrer biologischen Funktion werden die Polypeptide in Wachstumsfaktoren, Interleukine, Interferone und Chemokine



eingeteilt. Zytokine werden von verschiedenen Zelltypen nach Stimulation synthetisiert und sezerniert. Sie wirken im pico- bis nanomolaren Bereich über kurze Distanzen von wenigen Mikrometern entweder parakrin oder autokrin (LÖFFLER et al. 2007). Die endokrine Wirkung eines Zytokins auf entfernt liegende Zellen ist abhängig von seiner Verteilung in den Blutkreislauf und seiner Halbwertszeit (JANEWAY et al. 2002). Die spezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzelle leiten das Signal der Zytokinbindung in das Zellinnere weiter. Auf der Zytoplasmaseite werden Signaltransduktionskaskaden aktiviert. Dadurch kommt es zu einer veränderten Genexpression (LÖFFLER u. PETRIDES 2003). Ein Zytokin kann auf verschiedene Zelltypen einwirken und unterschiedliche Antworten hervorrufen (Pleiotropie) (LÖFFLER u. PETRIDES 2003). Andererseits können unterschiedliche Zytokine dieselben oder überlappende Eigenschaften besitzen (Redundanz) (JUNGI 2000; TIZARD 2009). Zytokine induzieren die kaskadenartige Synthese weiterer Zytokine (JUNGI 2000) und beeinflussen die Wirkung anderer Zytokine additiv, synergistisch oder antagonistisch (LÖFFLER et al. 2007).

#### **2.4.1 Interleukin-12**

Interleukin-12 ist ein Zytokin, welches aus einer  $\alpha$ -Kette (p35-Untereinheit) und einer  $\beta$ -Kette (p40-Untereinheit) besteht. Die beiden Ketten sind durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden und bilden das biologisch aktive 74kDa Heterodimer (COLOMBO u. TRINCHIERI 2002). Interleukin-12 wird von Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und dendritischen Zellen gebildet. In Pferden wird die p35-Untereinheit kontinuierlich produziert, während die p40-Untereinheit nur nach Makrophagenaktivierung erzeugt wird (TIZARD 2004). Die Entfaltung der Aktivität von IL-12 ist rezeptorabhängig (YAMAMOTO et al. 1999). Der IL-12-Rezeptor setzt sich aus der  $\beta$ 1- und der  $\beta$ 2-Untereinheit zusammen. Während die  $\beta$ 1-Untereinheit für die Bindung des IL-12 verantwortlich ist, übernimmt die  $\beta$ 2-Untereinheit die Aufgabe der Signalübermittlung. IL-12-Rezeptoren kommen auf aktivierten T-Zellen und NK-Zellen vor und gehören den Typ-1-Transmembranglykoproteinen an (GATELY et al. 1998). Durch die Bindung von IL-12 an seinen Rezeptor kommt es zur Aktivierung von rezeptorabhängigen Tyrosinkinase. Diese führt zur Induktion