



Patrick Steinig (Autor)

Langzeiteffekte der Behandlung equiner Melanome und Charakterisierung des Zytokinexpressionsprofils gesunder Pferde

Eine Studie zur Interleukin 12 und 18 Gentherapie *in vivo*

Wissenschaftliche Reihe
der Klinik für Pferde

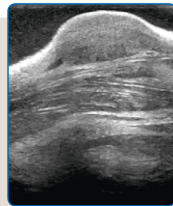
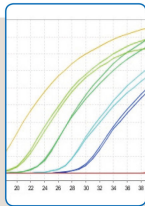
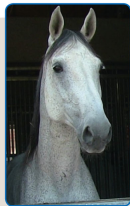
Herausgegeben von
Karsten Feige, Peter Stadler,
Harald Sieme, Bernhard Ohnesorge



Patrick Steinig

**Langzeiteffekte der Behandlung equiner
Melanome und Charakterisierung des
Zytokinexpressionsprofils gesunder Pferde**

Eine Studie zur Interleukin 12 und 18 Gentherapie *in vivo*



STIFTUNG TIERÄRZTLICHE HOCHSCHULE HANNOVER

27

 Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/7543>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>



1 Einleitung

Beim equinen Melanom handelt es sich um einen Hauttumor des Pferdes, der insbesondere aufgrund seiner hohen Prävalenz bei Schimmeln von Bedeutung ist [1, 2]. Da keine erfolgsversprechenden Therapiemöglichkeiten bestehen, haben MÄHLMANN et al. (2012) Schimmel mit equinen Melanomen mit einer DNA-basierten Immuntherapie mit MIDGE[®]-Vektoren behandelt [3]. Die Studie fand im Jahr 2010 einen vorläufigen Abschluss. Es konnte dargestellt werden, dass die Gentherapie sicher war sowie eine Remission der Tumorumfänge hervorgerufen hat. Basierend auf diesen Erkenntnissen, wird der von MÄHLMANN et al. [3] erprobte Therapieansatz in der vorliegenden Studie weiterverfolgt.

Der erste Teil dieser Studie befasst sich mit der weiteren Entwicklung der durch MÄHLMANN et al. (2012) behandelten Pferde [3]. Insbesondere ist die Tumorentwicklung in der Langzeitperspektive zu evaluieren und zu prüfen, ob unerwünschte Langzeitwirkungen der Therapie aufgetreten sind.

Weiterhin soll in einem zweiten Teil der immunologische Wirkmechanismus der Therapie weiter erforscht werden. Diesbezüglich soll untersucht werden, ob die genutzten MIDGE[®]-Vektoren equine Gewebe *in vivo* transfizieren. Zusätzlich stellt die Identifizierung der immunstimulierenden Komponenten der verwendeten MIDGE[®]-Vektoren ein Ziel der Studie dar. Von besonderem Interesse sind der Nachweis sowie die Charakterisierung der frühen Immunantwort induziert durch die Applikation der Vektoren.



2 Literaturübersicht

2.1 Equine Melanome

Beim equinen Melanom handelt es sich um Hauttumore des Pferdes, die in der Dermis oder Subkutis lokalisiert sind [1]. Die Tumore sind in der Regel gut umschrieben sowie durch grob granuliertes Melanin charakterisiert [1]. Sie stellen sich beim Pferd häufig als multiple, schwarze, derbe, rundliche und gegenüber der Haut erhabene Umfangsvermehrungen dar [2; 4]. Größe und Volumen der Tumore variieren stark und die Oberflächen können ulzerieren [2].

Charakteristische Prädilektionsstellen für Melanome sind unbehaarte Hautareale, wie die ventrale Schweifrübe, das Perineum, die Lippen und Augenlider sowie der Bereich der *Glandula parotis* [2;4-7]. Equine Melanome treten vorwiegend bei Schimmeln auf. Sind diese älter als 15 Jahre, beträgt ihre Prävalenz bis zu 80 % [2]. Robertson gab 1996 im Rahmen einer retrospektiven Betrachtung für das Alter von erkrankten Pferden einen Median von 7,6 Jahren an [8]. Insgesamt lässt sich feststellen, dass sich die Wahrscheinlichkeit eines Schimmels, an Melanomen zu erkranken, mit dem Alter erhöht [9].

Melanome zeichnen sich beim Schimmel häufig durch eine geringe Invasivität aus [4; 10-12]. Es kann allerdings unabhängig von Wachstumsraten oder Größe zu hämatogener und lymphogener Metastasierung der Melanome kommen [5]. Zudem sind Melanommetastasen in Knochenmark, Mesenterium, Skelettmuskulatur oder anderen epithelialen Organen beschrieben [4; 5; 13-17]. Oft ist eine eindeutige Diagnose lediglich durch aufwendige weiterführende Untersuchungen (z.B. Ultraschografie) möglich. Organdysfunktionen durch metastasierte Melanome sind jedoch im Vergleich zur Häufigkeit des Vorkommens von equinen Melanomen selten beschrieben [2; 4; 17-20].

In der Regel zählen equine Melanome nicht zu den akut lebensbedrohenden Erkrankungen [2]. Klinisch können aber in Abhängigkeit von der Lokalisation Kotabsatzstörungen, Kolik, Gewichtsverlust, Ödeme, Atembeschwerden, Epistaxis, Paresen, Ataxien, Dysurie oder Priapismus auftreten und damit zu einer Störung des



Allgemeinbefindens der Pferde, bis hin zum letalen Ausgang, führen [4; 5; 15; 16; 18; 21-23].

Die genaue Ätiologie des equinen Melanoms ist noch ungeklärt. Obwohl frühere Autoren keinen neoplastischen Ursprung vermuteten [6; 24], ist heute unstrittig, dass es sich um eine neoplastische Erkrankung handelt [1; 5; 9; 15; 25].

In mehreren Studien wurde ein ätiologischer Zusammenhang zwischen der dominant vererbten Schimmelfarbe sowie der Entstehung von Melanomen hergestellt [7; 26-28]. Ferner gelangte die Genexpression in der Haut genauer zur Untersuchung. Dabei konnte herausgearbeitet werden, dass sich die Expression der in Melanozyten gebildeten Glykoproteine 100 (gp100) und gp75 beim Schimmel und einem farbigen Pferd differenziert [26]. Sogar innerhalb der Population von Schimmeln existieren Unterschiede in den Expressionsmengen [26].

Diese Erkenntnisse waren der Ursprung für eine Reihe an Untersuchungen, um genetische Ursachen der Melanomentstehung zu erforschen. Im Vergleich des Schimmelgenoms mit dem Genom von farbigen Pferden wurde eine Duplikation des Intron 6 im Gen Syntaxin-17 entdeckt [27; 29]. Pferde, die diese Variation Syntaxin-17 homozygot tragen, fallen durch eine erhöhte Prävalenz für Melanome auf [27; 29]. Eine weitere genetische Konstellation, für die eine erhöhte Prävalenz an Melanomen nachgewiesen wurde, ist der homozygote Genotyp für das *Agouti signaling peptide* Gen [27].



2.2 Tumorimmunologie

2.2.1 Tumorzellelimination

Eine Tumorzellelimination stellt das Resultat einer effektiven antitumoralen Immunantwort dar. Gesteuert und begünstigt durch zahlreiche Faktoren werden Tumorzellen erkannt und durch das Immunsystem unschädlich gemacht. Diesbezüglich spielen die zelluläre und die humorale Immunreaktion eine entscheidende Rolle [30].

Humorale Komponenten des Immunsystems, insbesondere Antikörper (Ak), können hierbei einen körpereigenen Schutz vor entarteten Zellen bilden [31; 32]. Die Fab-Fragmente der Ak können an Antigene binden, die auf der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert werden. Die an Tumorzellen gebundenen Antikörper können durch ihr Fc-Fragment an Fc-Rezeptoren von Immunzellen, wie Makrophagen sowie neutrophile Granulozyten, binden. Durch diesen Mechanismus kann es zu einer antikörper-vermittelten Zytotoxizität (*antibody dependent cellular cytotoxicity*) kommen, die im Zelltod durch Phagozytose resultiert [33; 34].

2.2.2 Zelluläres Immunsystem

Die zentralen Effektorzellen der antitumoralen Immunreaktion sind T-Zellen und Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen), die durch antigenpräsentierende Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen) und Zytokine reguliert werden [35]. Es wurde nachgewiesen, dass eine lymphozytäre Infiltration von Tumorgewebe mit einer verbesserten Prognose einhergeht [36].

Unreife **dendritische Zellen (DC)** sind in der Haut in Form der Langerhanszellen anzutreffen [37]. Durch den Einfluss von „*danger signals*“, wie z.B. Interleukin 1 (IL-1), Lipopolysaccharid oder Tumor-Nekrose-Faktor alpha ($TNF\alpha$), kommt es zur Ausreifung der DC [38-41]. Im Rahmen der Ausreifung entwickeln die DC die Eigenschaft, zahlreiche verschiedene Moleküle (z.B. IL-12, *major histocompatibility complex II* (MHC-II)) zu exprimieren, wodurch sie die Funktionen einer



antigenpräsentierenden Zelle (APC) erlangen [42; 43]. Die Aktivierung durch *danger signals* kann ebenso zu einer gegen Tumorantigene gerichteten Immunreaktion führen [44]. Durch zahlreiche MHC-, Kostimulations- und Adhäsionsmoleküle sind DC darüber hinaus in der Lage, effektiv und gezielt eine antitumorale Reaktion auf humoraler und zellulärer Ebene zu induzieren [43; 45; 46].

CD⁴⁺-T-Zellen (T-Helfer-Zellen) aktivieren unter anderem CD⁸⁺-T-Zellen. Ihr T-Zellrezeptor bindet ausschließlich an MHC-II-Komplexe, die von APC und B-Zellen exprimiert werden. Die von den APC präsentierten MHC-II-Peptid-Komplexe bilden nach Bindung an den T-Zellrezeptor mit diesem zusammen eine immunologische Synapse [47]. Durch eine ausreichend lange und feste Bindung zwischen CD⁴⁺-T-Zellen und APC werden die CD⁴⁺-T-Zellen aktiviert. Die Aktivierung beinhaltet die Möglichkeit, vermehrt immunstimulatorische Zytokine, wie z.B. IL-2 oder Interferon gamma (IFN γ), zu sezernieren. Hierdurch wird die Aktivität der CD⁸⁺-T-Zellen gesteigert [48]. Die CD⁴⁺-T-Zellen können, vermittelt über CD40, APC aktivieren, wodurch eine gesteigerte Expression der MHC-Moleküle, Kostimulationsmoleküle, diverser Zytokine und überdies die weitere Aktivierung zytotoxischer T-Zellen (CD⁸⁺-T-Zellen, CTL) initiiert wird [49-51]. Ferner unterstützen sie B-Zellen dabei, deren Antikörperproduktion zu aktivieren.

CD⁴⁺-T-Zellen sezernieren außerdem nicht nur immunstimulatorische Zytokine. Es werden von unterschiedlichen Subtypen dieser T-Helferzellen auch inhibitorische Mediatoren wie z.B. IL-10 sezerniert. Durch diese sowie andere regulatorische Mechanismen wird eine zelluläre Immuntoleranz erreicht und eine Überstimulation vermieden [49]. Durch die Expression spezieller Rezeptoren auf T-Helferzellen wird die Bildung immunologischer Synapsen kompetitiv gehemmt [52].

CD⁸⁺-T-Zellen (zytotoxische T-Zellen, CTL) sind die Haupteffektorzellen der antitumoralen Immunreaktion. Sie binden an MHC-I-Molekül-Peptid-Komplexe, die intrazelluläre Proteinfragmente beinhalten können [35; 53; 54]. Die Rolle dieses Immunmechanismus in der Tumorbekämpfung wurde durch Versuche mit *knockout*-Mäusen untermauert [55; 56]. Tiere, die nicht in der Lage sind, eine Zelllyse durch CD⁸⁺-T-Zellen einzuleiten, zeigen eine erhöhte Tumorzinzidenz [55; 56].



CTL werden über zwei Signale aktiviert. Das erste Signal stellt die Bindung ihrer T-Zell-Rezeptoren (TCR) an MHC-I-Peptid-Komplexe dar, wobei die Signalstärke proportional zur Anzahl der Bindungen ist [35; 53]. Als zweites Signal fungieren sowohl Bindungen über Adhäsions- und Kostimulationsmoleküle als auch die Stimulation über Zytokine [47; 57]. Die Kombination der Signale führt zur Aktivierung der CTL, die mit der Sezernierung von Perforinen einhergeht [47].

Fehlt bei der Aktivierung naiver T-Zellen das zweite Signal, entstehen immuntolerante CTL. Diese mononukleären Zellen sind nicht in der Lage, Tumorzellen zu lysieren [58].

Natürliche Killer Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie ihre zytotoxische Wirkung unabhängig von der Erkennung spezifischer Antigene vermitteln. Allerdings hemmen autologe MHC-I-Moleküle ihre zytotoxische Aktivität. Dadurch lysieren NK-Zellen hauptsächlich Zellen ohne, mit wenigen oder mit fremden MHC-I-Molekülen. Dies bedeutet, dass körpereigene Zellen, da diese MHC-I-Moleküle auf der Zelloberfläche tragen, vor der zytotoxischen Wirkung der NK-Zellen geschützt werden [54; 59]. Die Inhibition der NK-Zellen durch solche *self-signals* steht in Balance gegenüber stimulierenden Signalen.

Nach einer Stimulation durch Zytokine oder Oberflächenmoleküle (exprimiert von z. B. DC) sezernieren NK-Zellen zahlreiche Zytokine ($\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-2, IL-3, IL-5, IL-8). Dadurch nehmen sie einen Einfluss auf weitere Effektorzellen, vor allem Makrophagen und T-Zellen [60; 61].

Die Fähigkeit, Tumorzellen direkt zu lysieren, ist bei NK-Zellen begrenzt, kann jedoch durch eine starke Stimulation mit IL-2 sowie der damit verbundenen Umwandlung in Lymphokin-aktivierte Killerzellen deutlich erhöht werden [62; 63].

Durch Forschungen am Chediak Higashi Syndrom wurde die Rolle der NK-Zellen in der humanen Tumorbekämpfung erkannt. Im Rahmen dieses Krankheitskomplexes kommt es zu einer verminderten zytotoxischen Wirkung von NK-Zellen [64]. Untersuchungen an NK-Zell-*knockout*-Mäusen erwiesen, dass NK-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Hemmung des Tumorwachstums und der



Metastasierung spielen [65; 66]. NK-Zellen besitzen eine entscheidende Bedeutung bei der Elimination von Tumorzellen, die keine oder wenig MHC-I Komplexe exprimieren, da NK-Zellen im Gegensatz zu CTLs diese Komplexe nicht zur Vermittlung des Zelltods benötigen [67].

NK-Zellen und CD⁸⁺-T-Zellen speichern in ihren Granula zytotoxische Substanzen/Mediatoren wie Perforine. Letztere führen, nach Einbau in die Zellmembran der Zielzellen, zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Zellmembran, wodurch der Zelltod herbeigeführt wird [68]. Durch Studien mit *knockout*-Mäusen, die nicht in der Lage waren, die perforin-vermittelte zytotoxische Reaktion zu nutzen, wurde die Bedeutung dieser Mediatoren in der antitumoralen Immunantwort geklärt. Es zeigte sich sowohl bei induzierten (Behandlung mit Methylcholanthrene) als auch bei spontanen Sarkomen eine schlechtere Prognose bei den Perforin-*knockout*-Mäusen [67; 69].

Makrophagen gehören zu den APC. Sie setzen Sauerstoffradikale frei und sezernieren TNF α und weitere Zytokine. Aufgrund dieser Sekretion und ihrer Funktion als APC sind sie regulatorisch am Immungeschehen beteiligt [70]. Ihr direkter antitumoraler Effekt resultiert in der Regel aus der Aktivierung unter Beteiligung von IFN γ [71; 72].

Eine Sonderform der Makrophagen stellen die tumorassoziierten Makrophagen dar. Durch die chemotaktische Wirkung von CCL2, das von Tumorzellen oder gereizten Zellen in Tumornähe sezerniert werden kann, infiltrieren Makrophagen das Tumorgewebe [73]. Diese Makrophagen können die tumorale Angiogenese sowohl fördern als auch hemmen [74].

2.2.3 Funktion ausgewählter Zytokine in der Tumorummunologie

2.2.3.1 Interleukin 2 (IL-2)

Eine der ersten Funktionen von IL-2, die entdeckt wurde, war die Optimierung der T-Zellproliferation und Differenzierung *in vitro* [75-78]. Daraus resultierte die vorläufige



Benennung als *T-cell growth factor*, bevor das Protein im Jahr 1979 entsprechend der systematischen Nomenklatur Interleukin 2 genannt wurde [75]. Studien konnten nachweisen, dass IL-2 nicht nur durch T-Helferzellen, sondern auch durch CTL, dendritische Zellen und regulatorische T-Zellen exprimiert wird [79; 80]. IL-2 spielt eine entscheidende Rolle bei der Proliferation sowie der Generationsdauer von T-Zellen, bei der Differenzierung von naiven T-Zellen zu Effektor- oder Gedächtnis-T-Zellen und kann sogar die Proliferationshemmung von anergischen T-Zellen überwinden [75-78; 81-90]. IL-2 wirkt allerdings nicht nur auf T-Zellen, sondern ebenfalls auf die Entwicklung von dendritischen Zellen und die Reifung von B-Zellen [91]. Im Gegensatz zu dieser immunstimulierenden Wirkung kann IL-2 jedoch auch die Apoptose von T-Zellen in Form eines *activation-induced cell death* vermitteln und die Zahl von antigenspezifischen T-Zellen reduzieren [92-101]. Zusätzlich kann IL-2 durch die Hemmung der IL-17-Produktion und die Stimulation der regulatorischen T-Zellen antiinflammatorisch wirken [102]. Folglich ist IL-2 ein entscheidender Faktor bei der Etablierung einer autologen Immuntoleranz [102-108].

Bei der Behandlung von Tumoren kommt IL-2 eine bedeutende Rolle hinsichtlich der Interleukintherapien zu. Bereits in den 1980er-Jahren gelangte IL-2 aufgrund seiner CTL-stimulierenden Eigenschaften als Therapeutikum gegen Tumore zum Einsatz [109-111]. In Studien an humanen metastasierenden Melanomen zeigte es positive Effekte als antitumorales Therapeutikum [109]. Diese gehen jedoch mit zahlreichen unerwünschten Nebeneffekten einher, die auf eine Veränderung der Permeabilität der Blutgefäße zurückzuführen sind [112; 113].

2.2.3.2 Interleukin 4 (IL-4)

Das Zytokin IL-4 wird vor allem von Th2-Zellen, Mastzellen und basophilen Granulozyten sezerniert [114; 115] und gilt als typisches Th2-Zytokin, da es eine entscheidende Funktion bei der Differenzierung von Th0-Zellen (unreife T-Effektorzelle) zu Th2-Zellen hat [116]. IL-4 führt überdies zu einer vermehrten Immunglobulin-Sekretion von B-Zellen [117]. Es hemmt die spontane und vermittelte



Zellapoptose von T- und B-Zellen, sodass sich das Generationsintervall der Zellen verlängert [118-121].

Eine antitumorale Wirkung von IL-4 auf Melanome ist beschrieben [115]. In diversen Tumorgeweben ließ sich eine höhere Konzentration von IL-4 nachweisen [122]. Durch dieses endogene IL-4 werden das Tumorwachstum sowie die Metastasierung gefördert, sodass endogenem IL-4 eine protumorale Rolle zukommt [123-125]. Durch IL-4 wird die zytotoxische Wirkung von CD⁸⁺-T-Zellen gehemmt, worüber ein Einfluss auf das Tumorwachstum zu erklären ist [126-128]. Neben dem hemmenden Einfluss auf die Zytotoxizität der T-Zellen ist für zahlreiche Tumorzellen eine IL-4 abhängige Resistenz gegenüber der Zellapoptose beschrieben [129-131].

2.2.3.3 Interleukin 10 (IL-10)

Unter dem Namen *cytokine synthesis inhibiting factor* wurde IL-10 erstmals beschrieben [132]. Die Hauptquelle von endogenem IL-10 sind Makrophagen, doch ebenso T- und B-Zellen, Monozyten, eosinophile Granulozyten, Mastzellen und Keratinozyten [132-139]. Es hemmt Entzündungsreaktionen sowie die zelluläre Immunreaktion und sorgt aus diesem Grund für die Verhinderung von überschießenden Immunreaktionen [134]. Die Wirkung von IL-10 beruht vor allem auf dessen Einfluss auf die APC. IL-10 hemmt z.B. in Monozyten die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und verhindert so eine effektive Antigenpräsentation [140-142]. In Makrophagen werden durch IL-10 die Zytokin- und Stickoxidproduktion gehemmt [143; 144]. Ebenso hemmt es die Funktion von APC der Haut [145; 146]. Zugleich induziert es die Bildung weiterer antiinflammatorischer Mediatoren [147; 148]. Interleukin-10 hemmt direkt und indirekt (über die Hemmung von IL-12) die Produktion von IFN γ in Makrophagen und begünstigt über die Hemmung einer Th1-Immunantwort eine Th2-Immunantwort [132; 141; 142; 145; 149]. Durch IL-10 wird die IFN γ -induzierte Transkription von Genen blockiert (z.B. CXCL10) [150-152]. Folglich besteht bei der Wirkung von IL-10 und IFN γ ein kompetitiver Zusammenhang [153]. Die Wirkung von IL-10 auf NK-Zellen weicht von der zuvor beschriebenen



generellen Wirkung auf Immunzellen ab. Interleukin-10 stimuliert die zytotoxische Wirkung von NK-Zellen und erhöht die durch IL-2 stimulierbare Produktion von $\text{IFN}\gamma$ [154]. Eine Stimulation des Mastzellwachstums und der Histaminliberation konnten ebenfalls nachgewiesen werden [137; 155].

Bei Untersuchungen an Melanomen, Metastasen und Melanomzelllinien zeigten diese eine erhöhte Menge an IL-10-mRNA im Vergleich zu den physiologischen Werten der Gewebe [156; 157]. Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass es sich bei IL-10 um einen autokrinen Wachstums- und Schutzfaktor von Melanomen handelt [158].

2.2.3.4 Interleukin 12 (IL-12)

Interleukin-12 ist ein Heterodimer. Die zwei Untereinheiten werden nach ihrer Größe als IL-12p35 (35 kDa) und IL-12p40 (40 kDa) benannt [159; 160]. Es wird durch phagozytierende und dendritische Zellen exprimiert [160; 161]. Verschiedene Pathogene induzieren eine vermehrte Expression von IL-12 [162]. Es verfügt über einen autokrinen positiven Feedbackmechanismus [160; 163-165]. Eine Synthesehemmung kann durch Zytokine wie IL-10, $\text{TNF}\alpha$ sowie *transforming growth factor beta* ($\text{TGF}\beta$) vermittelt werden [141; 166-168]. Die gleiche Wirkung auf die Synthese von IL-12 lässt sich über *guanine nucleotide-binding protein-coupled*_{as} (G_{as}PC)-, den $\alpha 2$ -adrenergen, den *adenosine*_{2 α} , den Histamin-2- oder den *vasoactive intestinal peptide*-Rezeptor vermitteln [169]. Rezeptoren für IL-12 befinden sich auf aktivierten T-Zellen, DC und NK-Zellen [170]. Interleukin-12 stellt ein charakteristisches Zytokin einer Th1-Immunreaktion dar und induziert die Differenzierung von T-Helferzellen zu Th1-Zellen und die Proliferation von aktivierten CD^{8+} und CD^{4+} T-Zellen [171-176]. Unter dem Einfluss von IL-12 steigt die Zytotoxizität von CD^{8+} - und NK-Zellen [174]. Hierbei kann eine vermehrte Expression von Effektorproteinen wie Granzym B, Perforin und Adhäsionsmolekülen nachgewiesen werden [177-181]. Zusätzlich produzieren Th1-Zellen durch die Stimulation mit IL-12 selbst eine Vielzahl an Zytokinen ($\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-2, IL-3, IL-8)