

Aus dem Department für Kleintiere und Pferde  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien  
(Departmentsprecher: O.Univ.-Prof. Dr.med.vet. Joerg Aurich Dipl.ECAR)  
Fach: Onkologie

Immunbiologie des Melanoms unter besonderer Berücksichtigung des kaninen Melanoms

DIPLOMARBEIT  
Zur Erlangung der Würde einer  
MAGISTRA MEDICINAE VETERINARIAE  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

vorgelegt von  
Marlene Mitterlehner

Wien, August 2020

BETREUER:

Priv.-Doz. Dipl.-Ing. Dr.nat.techn. Sabine Brandt

Forschungsgruppe Onkologie (RGO)

Department für Kleintiere und Pferde

Veterinärmedizinische Universität Wien

GUTACHTER:

Dr. med. vet. Michael Willmann

Onkologie

Interne Medizin Kleintiere

Department für Kleintiere und Pferde

Veterinärmedizinische Universität Wien



## Inhalt

1	Einleitung.....	1
2	Wissenschaftliche Fragestellung.....	9
3	Das Immunsystem .....	10
3.1	Die angeborene Immunität.....	10
3.2	Die adaptive Immunität .....	12
3.3	Immunzellen – ein Überblick.....	14
4	Die Entstehung von Tumoren .....	16
5	Immuneditieren .....	23
6	Wie passt das Melanom das Immunmilieu seinen Bedürfnissen an? .....	24
6.1	Mangelnde Immunogenität von Melanomzellen.....	24
6.1.1	Tumorassoziierte Antigene .....	24
6.1.2	Veränderung der MHC-Expression .....	27
6.2	Programmed death-1 (PD-1).....	28
6.3	Immunzellen.....	30
6.3.1	Zytotoxische T-Zellen .....	30
6.3.2	CD4+ Th1/Th2-Zellen .....	32
6.3.3	Regulatorische T-Zellen.....	33
6.3.4	Tumorassoziierte Neutrophile Granulozyten (TANs).....	34
6.3.5	Regulatorische myeloide Zellen .....	36
6.3.6	Sinuskarnophagen.....	44
6.3.7	Natürliche Killerzellen .....	45
7	Kanines Melanom .....	48
7.1	Tumorassoziierte Antigene beim kaninen Melanom .....	48
7.2	Die Expression von MHC-Molekülen.....	50
7.3	Programmed death-1 .....	50
7.4	Immunzellen.....	51
7.4.1	T-Zellen .....	51
7.4.2	Tumorassoziierte Neutrophile Granulozyten .....	53
7.4.3	Myeloid-derived suppressor cells.....	53
7.4.4	Tumorassoziierte Makrophagen.....	54
7.4.5	Dendritische Zellen .....	55

7.4.6	Natürliche Killerzellen .....	55
7.5	Immuntherapie des kaninen Melanoms .....	56
8	Schlussfolgerung .....	62
9	Zusammenfassung .....	64
10	Summary .....	66
11	Literaturverzeichnis.....	68

## 1 Einleitung

Das Melanom ist ein von Melanozyten ausgehender Tumor. Es kommt sowohl beim Menschen als auch beim Hund vor, ebenso wie bei vielen anderen Tierarten. Generell können melanozytäre Tumoren in benigne Melanozytome und maligne Melanome eingeteilt werden (NISHIYA et al., 2016).

**Das maligne Melanom des Menschen.** Bei Menschen ist die Inzidenz des malignen Melanoms in den vergangenen Jahren weltweit gestiegen. In den USA hat es sich bei Männern zum fünfthäufigsten, bei Frauen zum sechsthäufigsten Tumor entwickelt. Weltweit ist die Inzidenz in Queensland, Australien am höchsten, mit einer Anzahl diagnostizierter Melanome von 55,8/100.000/Jahr bei Männern und 40,1/100.000/Jahr bei Frauen. Aber auch in Europa erkranken immer mehr Menschen am malignen Melanom, obwohl Unterschiede zwischen einzelnen Staaten bestehen. Am höchsten ist die Inzidenz in der Schweiz, in Norwegen, Schweden und Dänemark, niedriger in weniger wohlhabenden Staaten (RASTRELLI et al., 2014). In Österreich liegt die Inzidenz invasiver Melanome bei 25/100.000 (MONSHI et al., 2015).

Männer sind 1,5-mal häufiger von malignen Melanomen betroffen als Frauen, wobei die Geschlechtsunterschiede in Relation zum Alter betrachtet werden müssen. Bis zu einem Alter von 40 Jahren sind Frauen öfter betroffen als Männer, ab einem Alter von 75 Jahren erkranken Männer jedoch fast 3-mal häufiger (RASTRELLI et al., 2014).

Als wichtiger Risikofaktor für das Auftreten eines malignen Melanoms gilt der genotoxische Einfluss von UV-Strahlung. Menschen, die Sonnenbrände in der Kindheit gehabt haben, haben ein erhöhtes Risiko, ein malignes Melanom zu entwickeln. Auch die Anzahl melanozytärer Nävi, die familiäre Vorgeschichte und die genetische Empfänglichkeit haben Einfluss auf die Entstehung eines Melanoms. Rotes Haar, helle Haut- und Augenfarbe, viele Sommersprossen und Empfindlichkeit gegenüber Sonnenstrahlung scheinen die Erkrankung zu begünstigen (RASTRELLI et al., 2014).

Das kutane maligne Melanom kann in drei Untergruppen unterteilt werden - das superfiziell spreitende Melanom, das noduläre Melanom und das Lentigo Maligne Melanom. Mit 70 % der Erkrankungen stellt das superfiziell spreitende Melanom den am häufigsten auftretenden Subtyp dar. Es ist vor allem an der Hinterseite der Beine und am Rücken lokalisiert. 5 % der Melanome sind noduläre Melanome, die hauptsächlich an Rumpf und Gliedmaßen auftreten.

Das Lentigo Maligne Melanom stellt 4-15 % der Melanome und befindet sich meist am Hals und am Kopf (RASTRELLI et al., 2014).

Ein selteneres, an den Akren lokalisiertes Melanom ist das akrale lentiginöse Melanom. Es tritt an Fingern und Zehen sowie an Handflächen oder Fußsohlen auf. Ein weiterer Typ ist das Desmoplastische Melanom. Das Desmoplastische Melanom befindet sich meist an Kopf oder Hals, kann aber auch an anderen Stellen von Haut und Schleimhaut auftreten. Neben den genannten Subtypen des malignen Melanoms wurden noch einige weitere, aber selten auftretende Formen beschrieben. Auch amelanotische Erscheinungsformen können vorkommen (RASTRELLI et al., 2014).

Eine besondere Form des Melanoms stellt das uveale Melanom dar. Es ist seltener als das kutane Melanom und repräsentiert etwa 5 % der Melanome in den USA (CHATTOPAHDYAY et al., 2016).

Eine seltene, aber aggressive Form des malignen Melanoms ist das mukosale Melanom, welches nur 0,8-3,7 % aller Melanome ausmacht. Es tritt an Schleimhäuten von Respirationstrakt, Gastrointestinaltrakt und Urogenitaltrakt auf. Oft wird es erst spät diagnostiziert und ist mit einer schlechteren Prognose als das Kutane Melanom assoziiert (YDE et al., 2018).

Die Ätiologie des mukosalen Melanoms ist noch nicht geklärt. Aufgrund der anatomischen Lokalisation gilt UV-Strahlung nicht als Risikofaktor, auch die Rolle des Rauchens ist noch nicht endgültig bestimmt. Einige genetische und metabolische Veränderungen, die zur Entstehung des mukosalen Melanoms beitragen, sind bekannt (YDE et al., 2018).

Die Prognose des Melanoms ist davon abhängig, in welchem Stadium es diagnostiziert wird. Stadium 0 Melanome (*Melanoma in situ*) haben die Dermis noch nicht infiltriert und noch nicht zu metastasieren begonnen. Trotz eines geringen Rezidivrisikos haben sie eine sehr gute Prognose (BARTLETT und KARAKOUSIS, 2015).

Bei Stadium I- und II-Melanomen beeinflussen vor allem die Tumordicke und das Auftreten von Ulzerationen die Prognose. Auch die Mitoserate ist ein wichtiger prognostischer Faktor. Größere Dicke, das Vorhandensein von Ulzera und eine hohe Mitoserate sind mit einer geringeren 10-Jahres-Überlebensrate assoziiert (BARTLETT und KARAKOUSIS, 2015).

Stadium III-Melanome sind durch lokale Metastasen charakterisiert. Innerhalb dieser Gruppe herrscht eine große prognostische Heterogenität. Die Prognose ist unter anderem von den

Eigenschaften des Primärtumors, von der Anzahl involvierter Lymphknoten und der Art der Metastasen abhängig (BARTLETT und KARAKOUSIS, 2015).

PatientInnen mit Stadium IV-Melanomen haben bereits Metastasen an entfernteren Lokalisationen entwickelt. Vor dem Einsatz zielgerichteter Tumorthérapien und Immuntherapien lag die 1-Jahres-Überlebensrate zwischen 41 % und 59 %. Mit der Entwicklung von Immuntherapien konnte sie aber inzwischen verbessert werden (BARTLETT und KARAKOUSIS, 2015).

Einfluss auf die Prognose haben auch das Alter der PatientInnen, die anatomische Lokalisation und das Geschlecht. Ein höheres Alter ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert, ebenso wie Melanome, die an Rumpf, Kopf und Hals lokalisiert sind. Eine bessere Prognose scheinen Frauen zu haben (BARTLETT und KARAKOUSIS, 2015).

**Das kanine Melanom.** Das kanine Melanom tritt an verschiedenen Stellen des Körpers auf, unter anderem in der Maulhöhle, an den Lippen, der Haut, am Auge und an den Zehen. Das orale und das kutane Melanom scheinen darunter am häufigsten vorzukommen (NISHIYA et al., 2016).

Nicht alle kaninen Melanome enthalten Melanin, auch amelanotische Erscheinungsformen sind möglich. Amelanotische Melanome stellen bis zu einem Drittel aller kaninen Melanome (NISHIYA et al., 2016). Histologisch unterscheiden sich kanine Melanome von humanen malignen Melanomen dadurch, dass sie vorwiegend in der Dermis lokalisiert sind und nur in Einzelfällen die Epidermis betreffen, während humane Melanome normalerweise epidermal auftreten (GILLARD et al., 2014). Dennoch darf nicht außer Acht gelassen werden, dass kanine Melanozyten nicht nur in der Dermis, sondern auch in der Epidermis und in Haarfollikeln angesiedelt sind (PROUTEAU und ANDRÉ, 2019).

Die histologischen Eigenschaften des kaninen Melanoms gleichen sehr seltenen Formen des humanen Melanoms (GILLARD et al., 2014). Histopathologisch konnten vier kanine melanozytäre Tumortypen identifiziert werden, die mit humanen histologischen Subtypen vergleichbar sind – Animal-Type Melanome, Melanom-simulierende Nävi, Melanome mit epithelioiden Zellen und Melanome mit gemischten Zellen (PROUTEAU und ANDRÉ, 2019).

Das Melanom ist der häufigste orale Tumor des Hundes und die häufigste Form des kaninen mukosalen Melanoms. Weitere, aber seltener betroffene Lokalisationen mukosaler Melanome sind die Anorektalregion, der Darm und die Nasenhöhle (PROUTEAU und ANDRÉ, 2019).

Orale kanine Melanome haben eine hohe Tendenz zu invasivem Wachstum und Metastasierung und gelten daher als hochgradig maligne. Sie sind meist an Gingiva, Lippen, Zunge und hartem Gaumen lokalisiert, mit abnehmender Häufigkeit bei der Aufzählung. Auch amelanotische Erscheinungsformen kommen vor (BERGMAN, 2007b). Klinische Symptome, die mit oralen Melanomen assoziiert sind, sind unter anderem Dysphagie, Foetor ex ore, Ptyalismus und Blutungen. Bei Knocheninvasion kann es auch zur Mandibulafraktur kommen (PROUTEAU und ANDRÉ, 2019)

Das mittlere Lebensalter, in dem orale Melanome bei Hunden diagnostiziert werden, liegt bei 10-11 Jahren. Eine höhere Wahrscheinlichkeit, orale Melanome zu entwickeln, haben Pudel, Golden Retriever, Labrador Retriever, Rottweiler, Yorkshire Terrier, Cocker Spaniel, Chow-Chow, Scottish Terrier und Dackel (PROUTEAU und ANDRÉ, 2019).

Die Prognose des aggressiven oralen Melanoms ist schlecht und vor allem von der Größe des Primärtumors und dem Vorhandensein von Metastasen abhängig. Die Überlebenszeit für Hunde mit Stadium I-Melanomen, also einer Tumorgöße  $<2$  cm ohne Metastasen, die chirurgisch, mit Bestrahlung und/oder Chemotherapie behandelt werden, wurde mit 12-14 Monate angegeben (BERGMAN, 2007b).

Die Immuntherapie hat sich zu einem wichtigen Bestandteil der Therapie des oralen kaninen Melanoms entwickelt. Dabei kommt vor allem die DNA-Vakzine Oncept® (Merial, Duluth, GA, USA) zum Einsatz (TUREK et al., 2020). Oncept® soll die mediane Überlebenszeit von Hunden mit oralen Melanomen im Stadium II oder III, deren Tumoren zuvor chirurgisch und/oder mit Bestrahlung lokal unter Kontrolle gebracht worden waren, verlängern. Sie ist gegen das für die Melaninsynthese notwendige Enzym Tyrosinase gerichtet, welches in Melanomzellen überexprimiert wird. Für die Vakzinierung der Hunde wird xenogene humane Tyrosinase-DNA verwendet (OTTNOD et al., 2013). Die meisten Hunde tolerieren die Behandlung gut und zeigen nur milde Reaktionen (VERGANTI et al., 2017). Auch von Katzen wird die Vakzinierung mit Oncept® gut toleriert, bei einem geringen Nebenwirkungsrisiko (SARBU et al., 2017).

Als weniger aggressiv als das orale Melanom gilt das okuläre Melanom, wobei seine Eigenschaften wiederum von der Lokalisation abhängig sind. Das okuläre Melanom tritt an Augenlidern, Konjunktiven, Orbita, Limbus und Uvea auf. Das uveale Melanom ist eine aggressivere Form unter den okulären Melanomen (NISHIYA et al., 2016). Das uveale Melanom geht häufig mit einer verdickten Iris, unregelmäßigen Pupillen und Schmerzen einher. Auch Keratitis, Uveitis und Glaukom können vorkommen. Der auffälligste Befund bei

der Untersuchung ist jedoch meist eine dunkel pigmentierte Masse in der vorderen Augenkammer (PROUTEAU und ANDRÉ, 2019).

15-29 % der kaninen melanozytären Tumoren im Auge sind maligne. Während benigne uveale Melanozytome eine sehr gute Prognose haben, ist diese bei malignen uvealen Melanomen deutlich schlechter (PROUTEAU und ANDRÉ, 2019).

Kanine subunguale/digitale Melanome zeichnen sich durch ihr häufig auftretendes, lokal invasives Wachstum aus. Trotz chirurgischer Intervention des Primärtumors kommt es in vielen Fällen zum Auftreten von Metastasen. Die mediane Überlebenszeit von Hunden ohne Metastasen zum Zeitpunkt der Diagnose, die mit einer Zehenamputation behandelt wurden, liegt bei 12 Monaten. 42-57 % überleben ein Jahr, 11-13 % überleben zwei Jahre (NISHIYA et al., 2016). In der Aggressivität seines biologischen Verhaltens steht es zwischen oralen und kutanen Melanomen (PROUTEAU und ANDRÉ, 2019).

Eine zusätzlich zur Tumorentfernung durchgeführte Vakzinierung mit xenogener muriner Tyrosinase-DNA kann die mediane Überlebenszeit von Hunden mit digitalem Melanom auf 476 Tage im Vergleich zu einer historischen Vergleichsgruppe mit alleiniger Tumorsektion (365 Tage) erhöhen, mit einer Ein-Jahres-Überlebensrate von 63% gegenüber 44% in der Vergleichsgruppe (MANLEY et al., 2011).

Im Gegensatz zu diesen genannten Formen des Melanoms zeigt das kanine kutane Melanom oftmals ein benignes Verhalten. Kutane Melanome treten meist im Gesicht in der Nähe der Augenlider, am Rumpf und an den Extremitäten auf. Sie sind solitäre Strukturen, klein, pigmentiert, fest und verschieblich (NISHIYA et al., 2016).

In vielen Fällen ist die lokale Resektion von kutanen Melanomen kurativ. Einige Faktoren, wie Ulzeration, Invasion in Lymphgefäße, ein über die Dermis hinausgehendes Wachstum sind jedoch mit einer schlechteren Prognose assoziiert (PROUTEAU und ANDRÉ, 2019).

Maligne kutane Melanome sind meist am Kopf, am ventralen Abdomen und am Skrotum lokalisiert. Auch Melanome an mukokutanen Übergängen haben maligne Eigenschaften. Die malignen Läsionen zeigen ein schnelles Wachstum, unterschiedliche Pigmentierung und neigen zu Ulzerationen (NISHIYA et al., 2016).

Unter den verschiedenen Hunderassen ist eine Prädisposition gewisser Rassen zu erkennen. Orale Melanome kommen besonders häufig beim Pudel vor, kutane Melanome beim Rottweiler und Beauceron. Beim Labrador, Golden Retriever und Boxer hingegen besteht

keine Prädisposition für eine spezielle Lokalisation. Unter den prädisponierten Rassen treten Melanome vor allem bei dunkelhaarigen Hunden wie bei Rottweilern, Beaucerons und Schnauzern auf. Hellhaarige oder haarlose Hunde sind im Gegensatz dazu deutlich seltener betroffen (GILLARD et al., 2014).

Über die Ätiologie des kaninen Melanoms herrscht nach wie vor Unklarheit. Familiäre Disposition, Traumata, chemische Einflüsse, Hormone und Genetik zählen zu den vermuteten Faktoren. Für eine genetische Prädisposition spricht, dass gewisse Hunderassen häufiger Melanome entwickeln und dass vor allem reinrassige Hunde betroffen sind (GILLARD et al., 2014; NISHIYA et al., 2016).

Sonnenlicht kann bei Hunden wahrscheinlich höchstens an exponierten Stellen wie dem Gesicht oder der Pinna die Entstehung von Melanomen begünstigen (NISHIYA et al., 2016). Dass hellhaarige und haarlose Hunde seltener an Melanomen erkranken, lässt jedoch vermuten, dass UV-Strahlung beim Hund einen geringeren Einfluss als beim Menschen hat (GILLARD et al., 2014). Auch das Auftreten mukosaler und akraler/digitaler Melanome wird wohl kaum durch die Exposition gegenüber Sonnenlicht verursacht werden (NISHIYA et al., 2016).

**Der Hund als Modell für das humane Melanom.** Neue Tumorthérapien müssen, bevor sie bei Menschen eingesetzt werden können, auf anderem Wege getestet werden. In der ersten Phase werden an Tumorzelllinien *in vitro*-Studien durchgeführt (GORDON et al., 2018). Darauf folgen häufig *in vivo*-Studien an Versuchstiermodellen. Werden bei Versuchstieren Erfolge erzielt, muss der Übergang zum Menschen geschafft werden. In der Vergangenheit hat sich jedoch oft gezeigt, dass Tierversuche nur eine begrenzte Aussagekraft haben, obwohl sie nach wie vor eine wichtige Rolle spielen. Grund dafür sind vor allem genetische, molekulare und physiologische Unterschiede. 85 % der frühen klinischen Studien scheitern trotz erfolgreicher präklinischer Studien. Von denjenigen Therapeutika, die bis zur Phase III gelangen, kann letztendlich nur die Hälfte für therapeutische Zwecke eingesetzt werden (MAK et al., 2014).

Ein häufig herangezogenes Versuchstier für Melanome ist, wie bei anderen Tumoren, die Maus. Weitere Tiere, die als Modell dienen, sind beispielsweise der Hund, das Pferd und der Zebrafisch (VAN DER WEYDEN et al., 2016).

Das kanine maligne Melanom entsteht und metastasiert in immunkompetenten Hunden. Aufgrund dessen hat es als Modell eine höhere Aussagekraft als Mausmodelle, bei denen im Regelfall genetisch veränderte Tiere mit spontaner Tumorbildung verwendet werden oder

humane Tumorzellen immunsupprimierten Mäusen implantiert werden (VAN DER WEYDEN et al., 2016). Diese Mausmodelle lassen zwar eine Untersuchung gewisser Details des Melanoms zu, sie können aber nicht die Komplexität des humanen Melanoms widerspiegeln (SIMPSON et al., 2013). Im Gegensatz dazu ähnelt das spontan auftretende kanine Melanom in Heterogenität und Komplexität dem humanen Melanom (VAN DER WEYDEN et al., 2016). Bei beiden Spezies kommen sowohl stark pigmentierte als auch amelanotische Melanome vor. Außerdem weisen sie teilweise dieselben genetischen Mutationen auf (SIMPSON et al., 2013; PROUTEAU und ANDRÉ, 2019). Dass verschiedene Hunderassen betroffen sind ermöglicht es zudem, unterschiedliche genetische Hintergründe des Melanoms zu untersuchen (BARUTELLO et al., 2018).

Für die gute Vergleichbarkeit zwischen humanen und kaninen Tumoren sprechen auch die ähnliche Größe und Zellkinetik (BARUTELLO et al., 2018).

Kanine orale Melanome zeigen ein ähnliches Verhalten wie humane mukosale Melanome. Beide Formen haben eine vergleichbare Tendenz zu invasivem Wachstum und Metastasierung, ebenso wie eine schlechte Prognose, auch bei Patienten mit wenig fortgeschrittenem Primärtumor. Meist werden diese Melanome jedoch sowohl beim Hund als auch beim Menschen erst spät diagnostiziert, wenn bereits lokale Invasion, Ulzera, Nekrosen und Metastasen nachweisbar sind. Auch histopathologisch weisen Melanozyten von kaninen oralen und humanen mukosalen Melanomen eine vergleichbare Morphologie auf (SIMPSON et al., 2013).

Auch akrale und kutane Melanome von Hund und Mensch haben histopathologisch einige Übereinstimmungen. Benigne Läsionen bei Hunden, die den Großteil der kutanen melanozytären Tumoren ausmachen, haben gewisse Ähnlichkeiten mit humanen Nävi (SIMPSON et al., 2013).

Hunde erhalten mit chirurgischer Tumorentfernung, Bestrahlung, Chemotherapie und Immuntherapie außerdem oft eine ähnliche Therapie wie Menschen. Da die Überlebenszeit bei Hunden kürzer ist bei Menschen, sind bei Versuchen an Hunden mit malignem Melanom die Auswirkungen von Medikamenten auf den Krankheitsverlauf früher ersichtlich (VAN DER WEYDEN et al., 2016). Wie humane maligne Melanome haben auch kanine maligne Melanome eine vergleichbare Resistenz gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie (SIMPSON et al., 2013). In der Veterinär-onkologie gibt es bisher jedoch keinen Behandlungsstandard für kanine Melanome (HERNANDEZ et al., 2018).

Nicht nur die ähnlichen Eigenschaften von kaninen und humanen malignen Melanomen sprechen für den Hund als präklinisches Modell. Da Hunde eng mit Menschen zusammenleben, kann man davon ausgehen, dass sie denselben, möglicherweise Tumorerkrankungen begünstigenden Umwelteinflüssen ausgesetzt sind (NISHIYA et al., 2016). Hund und Mensch ähneln sich auch in der Entwicklung des Immunsystems, welches bei beiden Spezies zur Zeit der Geburt zwar noch nicht ausgereift, aber bereits voll entwickelt ist. Auch einige Immunzellen, wie CD4+, CD8+, CD90+ und DCs weisen Parallelen auf, ebenso wie die Immunglobuline (BARUTELLO et al., 2018).

## 2 Wissenschaftliche Fragestellung

Damit Melanome entstehen können, müssen sie, wie alle Tumoren, einen Weg finden, dem Immunsystem zu entgehen. Basierend auf einer umfassenden Literaturrecherche soll diese Diplomarbeit einen Überblick darüber geben, welche Mechanismen das Melanom dazu nutzt. Für die Recherche wurde die Literaturlatenbank PubMed herangezogen und nach Publikationen zu humanen und kaninen Melanomen, vor allem zu deren Immunbiologie, durchsucht. Mithilfe von PubMed wurden auch allgemeine Informationen zu Tumorgenese, Tumorprogression und Tumorimmunologie gesammelt.

Das Hauptinteresse dieser Diplomarbeit gilt dem kaninen Melanom. Obwohl die Veterinärmedizin in den vergangenen Jahren vor allem in der Entwicklung von Immuntherapien große Fortschritte gemacht hat, wird in Publikationen zur Immunbiologie des kaninen Melanoms häufig auf Erkenntnisse aus der Humanmedizin verwiesen. Da das Wissen zum humanen Melanom nach wie vor große Bedeutung beim Verständnis der Immunbiologie des kaninen Melanoms hat, wird in dieser Diplomarbeit auch ausführlich auf das Melanom des Menschen eingegangen.

### 3 Das Immunsystem

Das Immunsystem übernimmt sowohl bei Menschen als auch bei Tieren die Aufgabe, den Körper vor fremden Substanzen, Krankheitserregern und fehlerhaften eigenen Zellen zu schützen. Es lässt sich in das angeborene und das adaptive Immunsystem unterteilen. Diese beiden Anteile agieren jedoch keineswegs unabhängig voneinander, vielmehr ist ihr Zusammenspiel für eine wirksame Immunreaktion ausschlaggebend (PARKIN und COHEN, 2016).

#### 3.1 Die angeborene Immunität

Der erste Abwehrmechanismus, der aktiviert wird, ist das angeborene Immunsystem. Es ist in der Lage, sehr schnell zu reagieren, seine Antwort ist jedoch eher unspezifisch. Der Körper erkennt über sogenannte "Mustererkennungsrezeptoren" - "pattern recognition receptors" (PRRs) eingedrungene Mikroorganismen und beschädigte, tote oder sterbende Zellen. Zellassoziierte PRRs sind an "Wächterzellen" - Sentinelzellen -, die im ganzen Körper verteilt sind, lokalisiert, während lösliche PRRs im Blut zirkulieren. Als Sentinelzellen dienen einerseits Immunzellen wie Makrophagen oder Dendritische Zellen, andererseits aber auch nicht-Immunzellen wie bestimmte Epithelzellen. Zur Gruppe der PRRs gehören unter anderem Toll-like Rezeptoren (TLRs), RIG-1-like Rezeptoren, NOD-like Rezeptoren und die löslichen PRRs. Die Bindung der Liganden an die PRRs induziert die Produktion proinflammatorischer Zytokine und löst eine Entzündungsreaktion aus (TIZARD, 2017).

**Die humorale angeborene Immunität.** Zur humoralen Komponente der angeborenen Immunität gehören die Sekretion von Entzündungsmediatoren und das Komplementsystem. Entzündungsmediatoren werden sezerniert, wenn Sentinelzellen aktiviert wurden. Die Funktionen dieser Mediatoren (Zytokine, Chemokine) sind vielfältig und variieren je nach Molekültyp. Sie vermitteln die Entstehung einer Entzündungsreaktion, interagieren mit anderen Zellen des Immunsystems und erleichtern den Übergang zur adaptiven Immunität. Beispiele für bedeutende Entzündungsmediatoren sind Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin (IL)-1 und IL-6 (TIZARD, 2017).

Das Komplementsystem wiederum stellt ein Netzwerk von PRRs, Proteasen, Serumproteinen, Rezeptoren und Regulatoren dar. Es dient dazu, Pathogene abzutöten, sobald sie in den Körper gelangen, warnt das Immunsystem vor eindringenden Pathogenen und reguliert die

Entzündungsreaktion. Außerdem ist es an der Entfernung von veränderten, geschädigten oder apoptotischen Zellen, sowie an Chemotaxis und Opsonisierung beteiligt. Das Komplementsystem ist in der Lage, sehr schnell zu reagieren. Es kann über drei verschiedene Wege aktiviert werden: über den alternativen Weg, den Lektin-Weg oder den klassischen Weg. Beim alternativen und beim Lektin-Weg funktioniert die Aktivierung durch die Erkennung von Pathogenen über PRRs, wodurch eine Reaktion des angeborenen Immunsystems ausgelöst wird. Beim klassischen Weg erfolgt die Aktivierung über Antigen-Antikörper-Komplexe und hängt mit dem adaptiven Immunsystem zusammen (TIZARD, 2017).

**Die zelluläre angeborene Immunität.** Infolge der Aktivierung von Sentinelzellen kommt es, je nach Art des Pathogens, auch zur Anlockung anderer Immunzellen. In der frühen Phase sind vor allem die neutrophilen Granulozyten wichtig, die in großer Zahl auftreten und deren Aufgabe es ist, Erreger zu töten und zu phagozytieren. Sie werden über chemotaktische Moleküle, die von der Lokalisation der Mikroorganismen diffundieren, angezogen. Um von neutrophilen Granulozyten gebunden werden zu können, müssen Bakterien opsonisiert werden. Opsonisierung bedeutet, dass die Erreger mit gewissen Molekülen markiert werden, die sie attraktiver für neutrophile Granulozyten machen. Dadurch werden Bindung und Phagozytose der Erreger erleichtert. Die Opsonisierung erfolgt zum Beispiel durch Komplementfaktoren oder Antikörper (TIZARD, 2017).

Eosinophile Granulozyten sind vor allem dafür zuständig, den Körper vor Parasiten zu schützen. Sie bekämpfen Antigene, die durch Antikörper der Klasse IgE markiert sind, indem sie aus ihren Granula zytotoxische Moleküle freisetzen. Außerdem sind Eosinophile Granulozyten an allergischen Reaktionen beteiligt (PARKIN und COHEN, 2016).

Mastzellen und basophile Granulozyten haben ebenfalls eine hohe Affinität für IgE-gebundene Antigene. Degranulieren diese Zellen, werden Mediatoren wie vasoaktive Amine, Histamine oder Serotonin sezerniert. Freigesetzte Leukotriene, Prostaglandine oder der Plättchenaktivierende Faktor (PAF) bewirken außerdem eine erhöhte Gefäßpermeabilität, Bronchokonstriktion und vermitteln die Entstehung einer Entzündungsreaktion (PARKIN und COHEN, 2016).

Makrophagen entwickeln sich zum größten Teil aus Monozyten, deren Vorläufer myeloide Stammzellen des Knochenmarks sind. Makrophagen reagieren später als Neutrophile Granulozyten, haben aber bessere antimikrobielle Eigenschaften. Ihre Hauptaufgaben sind die Funktion als Sentinelzellen, das Vorantreiben der Entzündungsreaktion und die Phagozytose.

Bei der Phagozytose zerstören sie Bakterien sowohl über oxidative als auch über nicht-oxidative Mechanismen. Zur Entzündung tragen sie unter anderem durch ihre Wächterfunktion, die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und durch die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen bei. Sie sind außerdem fähig, Antikörper zu produzieren und dadurch das adaptive Immunsystem zu aktivieren (TIZARD, 2017).

Eine Besonderheit der Makrophagen ist ihre Polarisierung zum M1-Typ, M2-Typ oder zum Subtyp der regulatorischen Makrophagen. Die Polarisierung muss nicht endgültig sein und ist abhängig von den anwesenden Zytokinen oder mikrobiellen Produkten. M1-Makrophagen sind charakterisiert durch ihre proinflammatorischen Eigenschaften, M2-Makrophagen supprimieren die Entzündungsreaktion und sind an der Reparatur von Gewebe beteiligt. Makrophagen vom Typ der regulatorischen Makrophagen haben potente antiinflammatorische Aktivität (TIZARD, 2017).

### **3.2 Die adaptive Immunität**

Die angeborene Immunität ist zwar schnell, aber nur kurzfristig ausreichend. Sie kann nur gewisse Pathogene erkennen und hat keine Möglichkeit, ein Gedächtnis zu entwickeln. Um gezielter und effektiver reagieren zu können, braucht der Körper die adaptive Immunität (TIZARD, 2017).

Die adaptive Immunität basiert darauf, dass Antigene von antigenprozessierenden Zellen aufgenommen, prozessiert und über den Haupthistokompatibilitätskomplex ("major histocompatibility complex", MHC) präsentiert werden. Es wird dabei zwischen zwei Typen von Antigenen unterschieden: den exogenen Antigenen, zu denen Erreger zählen, die sich im Gewebe und der extrazellulären Flüssigkeit befinden, und den endogenen Antigenen, wie intrazelluläre Erreger und Viren. Exogene Antigene werden über MHC Klasse II-Moleküle präsentiert und endogene Antigene über MHC Klasse I-Moleküle. Alle kernhaltigen Zellen exprimieren MHC I und sind demnach in der Lage, endogene Antigene zu präsentieren. MHC II hingegen wird nur von spezialisierten antigenprozessierenden Zellen exprimiert. Die drei wichtigsten antigenprozessierenden Zellen sind dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen, wobei die Dendritischen Zellen am potentesten sind (TIZARD, 2017).

Dendritische Zellen (Dendritic cells, DCs) sind vor allem in lymphoiden Organen und unter Epithelien lokalisiert, da die Wahrscheinlichkeit eines Antigenkontakts dort am größten ist. Sie fungieren als Wächterzellen, prozessieren und präsentieren Antigene und leiten so die

adaptive Immunantwort ein. Außerdem entscheiden sie darüber, ob eine zellvermittelte Reaktion, eine antikörpervermittelte Antwort, oder Toleranz eingeleitet wird. Die bedeutendsten Gruppen der dendritischen Zellen sind die klassischen DCs und die plasmazytoiden DCs, sowie die in der Haut lokalisierten Langerhans-Zellen und die in lymphoiden Organen vorkommenden follikulären DCs (TIZARD, 2017).

Die über MHC-Moleküle präsentierten Antigene werden von T-Helferzellen erkannt und gebunden. Die Art der beteiligten T-Zelle entscheidet darüber, welche Immunantwort ausgelöst wird. Allen T-Zellen ist gemeinsam, dass sie nur auf Antigene reagieren können, die über MHC-Moleküle präsentiert werden (TIZARD, 2017).

T-Helferzellen tragen an ihrer Oberfläche das Differenzierungscluster (CD)-4 Molekül, das ihnen ermöglicht, an MHC II zu binden. Die durch die Bindung aktivierten T-Helferzellen 1 (Th-1) sezernieren Zytokine wie IL-2, TNF- $\alpha$  und Interferon (IFN)- $\gamma$  und vermitteln dadurch eine zellvermittelte Immunreaktion. Diese richtet sich vor allem gegen intrazelluläre Organismen. T-Helferzellen 2 (Th-2) hingegen sezernieren IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13. Dadurch induzieren sie die antikörpervermittelte Immunität und fördern die B-Zell-Proliferation und deren Sekretion von Immunglobulinen (TIZARD, 2017).

Eine dritte Gruppe von T-Helferzellen sind die Th-17-Zellen. Ihr Name leitet sich von IL-17 ab, welches sie neben anderen Zytokinen produzieren. Sie spielen eine wichtige Rolle bei entzündlichen Prozessen und haben Helferfunktion bei der B-Zell-Reaktion (TIZARD, 2017).

Zytotoxische T-Zellen exprimieren an ihrer Oberfläche das CD8-Molekül. Mit diesem binden sie an MHC I und können somit auf endogene Antigene reagieren. Sie sind auch dafür zuständig, überflüssige T-Zellen zu entfernen. Zytotoxische T-Zellen töten entweder durch die Sekretion von Perforinen und Granzymen, oder indem sie die Apoptose der zu zerstörenden Zelle über den CD95 death receptor-Signalweg einleiten (TIZARD, 2017).

Im Gegensatz zu T-Zellen können B-Zellen mit ihren Rezeptoren auch lösliche, nicht über MHC präsentierte Antigene erkennen. Bindet der B-Zell-Rezeptor ein Antigen, wird dieses Antigen prozessiert und über MHC II präsentiert, da B-Zellen zur Gruppe der antigenpräsentierenden Zellen gehören. Mit der Erkennung eines Antigens durch die B-Zelle wird auch die Produktion von Antikörpern induziert. Die Antikörperproduktion ist teilweise von der Kostimulation durch T-Helferzellen abhängig, kann teilweise aber auch ohne sie stattfinden (TIZARD, 2017).

Antigenstimulierte B-Zellen differenzieren zu Plasmazellen, welche fähig sind, Antikörper in großer Zahl zu synthetisieren. Als Antikörper fungieren Immunglobuline verschiedener Klassen: IgG, IgA, IgM, IgE und IgD. Sie binden freie intakte Antigene und markieren sie für die Zerstörung. Dabei richten sie sich vor allem gegen extrazelluläre Erreger (TIZARD, 2017).

Eine weitere Gruppe von Immunzellen sind die lymphoiden Zellen des angeborenen Immunsystems ("innate lymphoid cells"; ILC). Zu ihnen gehören die angeborenen Helferzellen, welche ähnliche Funktionen wie T-Helfer-Zellen haben, und die angeborenen zytotoxischen Zellen mit der Untergruppe der Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). NK-Zellen können schnell aktiviert werden und töten virusinfizierte Zellen oder Tumorzellen unter anderem mithilfe von Perforinen und Granulysinen (TIZARD, 2017). Zerstört werden Zellen, die durch Antikörper markiert sind und Zellen, denen die Expression von MHC-I-Molekülen fehlt (PARKIN und COHEN, 2016).

NK-T-Zellen wiederum sind eine eigene Klasse. Sie sind "innate-like" T-Zellen, die sowohl NK-Zellrezeptoren, als auch einen T-Zellrezeptor aufweisen. Sie können schnell reagieren und interagieren mit vielen anderen Immunzellen. Außerdem sind sie in der Lage, die Immunität zu regulieren, indem sie sowohl proinflammatorische Zytokine wie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  als auch antiinflammatorische wie IL-4 und IL-10 sekretieren (TIZARD, 2017).

### 3.3 Immunzellen – ein Überblick

Tab. 1: Überblick über die Zellen des Immunsystems und ihre Funktion (PARKIN und COHEN, 2016; TIZARD, 2017)

Immunzellen	Funktion
Monozyten	Vorläufer der Makrophagen
Mastzellen	Beteiligung an allergischen Reaktionen
<b>Granulozyten</b>	
Neutrophile Granulozyten	Phagozytose
Eosinophile Granulozyten	Immunität gegen Parasiten; Allergien
Basophile Granulozyten	Beteiligung an allergischen Reaktionen
<b>Antigenpräsentierende Zellen</b>	
Dendritische Zellen	Sentinelzellen, Antigenpräsentation

Makrophagen	Sentinelzellen, Entzündungsmediation, Phagozytose, Antigenpräsentation
B-Zellen	Sentinelzellen, Antikörperproduktion, Antigenpräsentation
<b>Lymphozyten</b>	
<b>Innate lymphoid cells</b>	
Natürliche Killerzellen	Zerstörung von Zellen, Regulation der Immunreaktion
<b>B-Zellen</b>	
B-Lymphozyten	Sentinelzellen, Antikörperproduktion, Antigenpräsentation
Plasmazellen	Antikörperproduktion
B-Gedächtniszellen	Gedächtnisfunktion, schnelle Reaktion bei erneutem Pathogenkontakt
<b>T-Zellen</b>	
T-Helferzellen	Vermittler der Immunreaktion
Regulatorische T-Zellen	Regulation der Immunreaktion
T-Gedächtniszellen	Gedächtnisfunktion, schnelle Reaktion bei erneutem Pathogenkontakt
Zytotoxische T-Zellen	Zerstörung von Zellen

#### 4 Die Entstehung von Tumoren

Die Entstehung von Tumoren ist ein komplexer, in mehreren Schritten ablaufender Prozess. Damit eine normale Zelle zur Tumorzelle werden kann, muss sie gewisse Eigenschaften entwickeln. Im Jahr 2000 definierten Hanahan und Weinberg die so genannten „Hallmarks of cancer“ - die Hauptkennzeichen von Krebs. Diese beschreiben sechs Veränderungen in der Zellphysiologie, die für ein malignes Wachstum notwendig seien. Sie bestehen aus der Unabhängigkeit von äußeren Wachstumssignalen, der Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, der Umgehung der Apoptose, einem unbegrenzten replikativen Potential, der Induktion der Angiogenese und der Fähigkeit zu Gewebeinvasion und Metastasierung (HANAHAN und WEINBERG, 2000). Etwa ein Jahrzehnt später erweiterten die Autoren die "Hallmarks of cancer" um zwei weitere Punkte – die Umprogrammierung des Energiestoffwechsels und die Fähigkeit, der Zerstörung durch das Immunsystem zu entgehen (HANAHAN und WEINBERG, 2011).

**Unabhängigkeit von äußeren Wachstumssignalen.** Im Gegensatz zu gesunden Zellen sind Tumorzellen unabhängig von äußeren Wachstumssignalen. Diese Unabhängigkeit erreichen sie dadurch, dass sie die von ihnen benötigten Wachstumsfaktoren wie den Transformierenden Wachstumsfaktor  $\alpha$  ("Transforming growth factor  $\alpha$ "; TGF $\alpha$ ), oder den Plättchen-abgeleiteten Wachstumsfaktor (Platelet-derived growth factor; PDGF) selber produzieren. Zudem kommt es bei Tumorzellen zu einer veränderten Expression von Wachstumsfaktorrezeptoren. Diese Veränderungen machen die Rezeptoren einerseits hyperreaktiv, andererseits ermöglichen sie es ihnen, auch ohne Anwesenheit von Liganden zu agieren. Die Wachstums-Signalwege in der Zelle laufen bei vielen Tumoren ebenfalls nicht mehr auf physiologische Weise ab. Außerdem sind die den Tumor umgebenden Stromazellen in der Lage, durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren das Tumorstadium zu fördern (HANAHAN und WEINBERG, 2000).

Auch Melanomzellen exprimieren Wachstumsfaktoren wie den "basic fibroblast growth factor" (bFGF), PDGF-A und PDGF-B, TGF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ , IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , sowie "melanoma growth stimulatory activity" (MGSA). Im Vergleich dazu exprimieren normale Melanozyten nur TGF- $\beta$ 1 und MGSA (RODECK und HERLYN, 1991).

**Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen.** Das Wachstum normaler Zellen wird sowohl durch lösliche Wachstumsinhibitoren als auch durch Inhibitoren,

die auf umliegenden Zellen und der extrazellulären Matrix lokalisiert sind, eingeschränkt. Einer der wichtigsten Mechanismen ist dabei der Retinoblastoma Protein-Signalweg, der dazu führt, dass Zellen vom G1-Stadium ins S-Stadium eintreten. Tumorzellen setzen diesen Signalweg jedoch außer Kraft und werden dadurch unsensibel auf Wachstumsinhibitoren, die diesen Weg benutzen. Einer dieser Wachstumsinhibitoren ist TGF- $\beta$ . Zusätzlich besitzen Tumorzellen mehrere Mechanismen, um dem Eintreten in das postmitotische Stadium zu entgehen (HANAHAN und WEINBERG, 2000).

**Umgehung der Apoptose.** Unter physiologischen Bedingungen untersuchen Sensoren die Zelle auf intrazelluläre oder extrazelluläre Abnormalitäten. Werden Unregelmäßigkeiten oder Fehler entdeckt, wird die Zerstörung der Zelle eingeleitet. Auf diese Weise kann ein Teil von mutierten Zellen bereits frühzeitig beseitigt werden. Vermutlich alle Tumorzellen haben Wege gefunden, der Apoptose zu entgehen. Einer der wichtigsten Mechanismen bei der Umgehung der Apoptose ist die funktionale Inaktivierung des Tumorsuppressorproteins p53. Durch diese Inaktivierung wird die Erkennung von DNA-Schäden, Hypoxie oder Onkogenen behindert und die Apoptose bleibt aus (HANAHAN und WEINBERG, 2000).

Anstelle der Apoptose kommt es bei Tumoren eher zur Nekrose. Bei der Nekrose wird, im Gegensatz zur Apoptose, Zellinhalt frei und eine Entzündungsreaktion entsteht. Die angelockten Entzündungszellen begünstigen die Entwicklung des Tumors, indem sie Angiogenese, Proliferation und Invasivität fördern. Nekrotische Zellen setzen außerdem Faktoren frei, die die Proliferation umliegender Zellen fördern (HANAHAN und WEINBERG, 2011).

**Unbegrenzt replikatives Potential.** Die drei bereits beschriebenen Eigenschaften von Tumorzellen – Unabhängigkeit von äußeren Wachstumsfaktoren, Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen und Umgehung der Apoptose – tragen dazu bei, dass Tumorzellen die Fähigkeit erlangen, unbegrenzt zu replizieren (HANAHAN und WEINBERG, 2000). Ein unbegrenzt replikatives Potential wurde auch bei Melanomen beobachtet (LUGOVIĆ-MIHIC' et al., 2019). Damit eine unbegrenzte Replikation möglich ist, muss auch die intrinsische Regulation der Zelle, welche ebenfalls vor unregulierter Vermehrung schützt, gestört sein (HANAHAN und WEINBERG, 2000).

Das replikative Potential gesunder Zellen ist keineswegs unendlich, sondern ist auf eine gewisse Anzahl an Teilungen begrenzt. Dies ist einerseits darauf zurückzuführen, dass sich die Länge der Telomere bei jeder Teilung verkürzt und so ein Ende der Replikation und eine

begrenzte Lebensdauer der Zelle vorherbestimmt sind. Zellen mit unendlichem Replikationspotential nutzen das Enzym Telomerase, welches die Neusynthese der fehlenden Telomere katalysiert. Die Telomerase ist nicht nur in malignen Zellen, sondern auch in bestimmten normalen Zellen mit großem replikativem Potential vorhanden. Zu ihnen gehören beispielsweise Zellen des fetalen Gewebes oder normale Knochenmarksstammzellen (HAYFLICK, 1997).

Die Lebensdauer einer Zelle wird auch durch das Erreichen der Zellseneszenz begrenzt. Die Seneszenz beschreibt einen Zustand, der durch fehlende Proliferation gekennzeichnet ist und in den die Zelle nach einer gewissen Anzahl an Zyklen eintritt. Das Eintreten einer Zelle in dieses Stadium kann auch dadurch induziert werden, dass bei der Proliferation gewisse Unregelmäßigkeiten wie vermehrte Onkogenexpression oder subkritische Telomerverkürzung auftreten. Entartete Zellen müssen diesen Mechanismus erst überwinden, um unbegrenzt wachsen zu können, weshalb die Seneszenz eine wichtige Barriere zum Schutz vor malignem Wachstum darstellt (HANAHAHAN und WEINBERG, 2011).

**Angiogenese.** Für die Aufrechterhaltung ihrer Stoffwechselfvorgänge und um ihren Nährstoff- und Sauerstoffbedarf decken zu können, müssen Tumorzellen für eine ausreichende Gefäßversorgung sorgen. Physiologisch findet während der Embryonalentwicklung eine kontrollierte Ausbildung von Gefäßen statt, welche gewährleistet, dass jede Zelle nur einen minimalen Abstand zur nächsten Kapillare hat. Nach Abschluss der Organogenese kann die Angiogenese in gewissen Fällen wieder aktiviert werden, jedoch nur vorübergehend und als streng regulierter Vorgang. Dies geschieht zum Beispiel bei der Wundheilung oder im Zuge des weiblichen Reproduktionszyklus (HANAHAHAN und WEINBERG, 2011).

Im Gegensatz dazu kommt es bei Tumoren zu einer angiogenen Umkehr, die eine kontinuierliche Ausbildung neuer Gefäße bewirkt (HANAHAHAN und WEINBERG, 2011). Bereits bei prä-malignen Läsionen konnte eine erhöhte Dichte an Mikrogefäßen beobachtet werden, was darauf hinweist, dass diese Umkehr schon in frühen Stadien der Tumorentwicklung stattfindet (RAICA et al., 2009). Die Induktion der Angiogenese wird durch Faktoren vermittelt, die an die Endothelzellen binden. Einer der wichtigsten Regulatoren ist dabei das Signalprotein Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor A ("vascular endothelial growth factor"; VEGF-A). Unter hypoxischen Umständen oder bei onkogenen Signalen kommt es zu einer erhöhten Expression des VEGF-A-Gens. Weitere pro-angiogene Faktoren kommen aus der Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren ("fibroblast growth factor; FGF). Als Gegenspieler wirkt vor

allem das suppressiv wirkende Thrombospondin 1 (TSP-1) (HANAHAN und WEINBERG, 2011). Auch Perizyten und myeloide Zellen wie Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile, Mastzellen und dendritische Zellen sind an der Tumorangiogenese beteiligt (MURDOCH et al., 2008; RAZA et al., 2010).

Bei Melanomen ist die Beteiligung verschiedener Wachstumsfaktoren und Zytokine an der Angiogenese bekannt. Dazu zählen VEGF-A, bFGF, der Plazenta-Wachstumsfaktor ("placental growth factor"; PGF), Angiopoietin (Ang), IL-8 und PDGF, von denen die meisten von Melanomzellen und Endothelzellen produziert werden. Bei Melanomzellen besteht außerdem eine erhöhte Expression der dazugehörigen Rezeptoren (CHO et al., 2019).

***Gewebeinvasion und Metastasierung.*** Vielen Tumoren gelingt es nach einiger Zeit, invasiv zu wachsen und zu metastasieren. Die Kaskade von Invasion und Metastasierung besteht aus einigen aufeinanderfolgenden Schritten und beginnt mit lokalem invasivem Wachstum. Darauf folgen das Eindringen in Blut- und Lymphgefäße, die Ausbreitung auf diesem Weg und schließlich das Verlassen der Gefäße und das Eindringen in das Parenchym des Zielgewebes. Dort entstehen primär Mikrometastasen, die sich später zu makroskopischen Tumoren entwickeln (HANAHAN und WEINBERG, 2011).

Bei malignen Zellen ist das Bindungsvermögen an andere Zellen oder an die extrazelluläre Matrix gestört. Karzinomzellen können beispielsweise E-Cadherin verlieren, welches ein wichtiges Zelladhäsionsmolekül darstellt, sowie für den Zusammenhalt von Zellen im Zellverband und deren Ruhezustand sorgt. Auch die Expression von Genen, die für andere Adhäsionsmoleküle codieren, kann verändert sein (HANAHAN und WEINBERG, 2011).

Auch das Eintreten der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) ist ausschlaggebend für die Metastasierung. Die EMT beschreibt einen Vorgang, bei dem Zellen ihren Phänotyp rapide und reversibel verändern. Sie läuft normalerweise bei der Embryonalentwicklung und der Wundheilung ab. Tumorzellen machen sich die EMT zunutze, um invasiv wachsen und metastasieren zu können. Bei der EMT verlieren Tumorzellen ihre epithelialen Eigenschaften und nehmen mesenchymalen Charakter an, was ihnen erlaubt, sich aus dem Zellverband herauszulösen, durch das Gewebe im Sinne der so genannten "Migration" in Richtung Blutgefäße abzuwandern und in diese überzugehen. Mit dem Blutstrom gelangen die Tumorzellen zu anderen Geweben, wo sie ihn wieder verlassen und sich als Metastasen neu ansiedeln, indem sie eine umgekehrte Transition von mesenchymalen zu epithelialen Zellen (MET) durchmachen. Sowohl EMT- als auch MET-Ereignisse lassen sich sehr gut anhand

des Nachweises jeweils charakteristischer Proteinexpressionsmuster nachweisen (TALMADGE und FIDLER, 2010). Dies ist auch kürzlich für primäre Tumorzellen gelungen, die aus kaninen oralen Melanomen explantiert und in Kultur genommen wurden. Die Zellen testeten positiv für die Expression typischer EMT-assoziiierter Moleküle wie Vimentin, Matrixmetalloproteinase 1 (MMP1) und MMP9, was für deren invasiven Charakter sprach (SCHMID et al., 2019).

Die Invasivität des Wachstums wird auch durch das Tumorstroma beeinflusst. Um ins Gewebe eindringen zu können, müssen Tumoren erst die Basalmembran durchdringen, weshalb diese einen gewissen Schutz darstellt. Auch die extrazelluläre Matrix gibt dem Gewebe Stabilität und bindet Zytokine und Wachstumsfaktoren. Sie besteht unter anderem aus Makromolekülen wie Kollagenfibrillen, Proteoglykanen und Fibronectin. Bei Neoplasien verändern sich die Art und die Anordnung der Fasern, was es den Tumorzellen erleichtert, ins Gewebe einzuwandern. Zudem werden häufig Proteine, die normalerweise bei der Embryonalentwicklung anwesend sind, re-exprimiert (EGEBLAD et al., 2010).

Bei Melanomen kommt es selbst nach der Exzision des Primärtumors häufig zur Metastasierung. Metastasierung ist bei Melanomen mit einer schlechten Prognose assoziiert. Bei einigen Patienten treten Metastasen bereits sehr früh im Krankheitsverlauf auf, bei 40% der Patienten dauert es aber über 5 Jahre (DAMSKY et al., 2014).

**Reprogrammierung des Energiestoffwechsels.** Normale Zellen verarbeiten unter aeroben Bedingungen im Zytosol Glukose über die Glykolyse zu Pyruvat, welches anschließend in den Mitochondrien zu Kohlendioxid verstoffwechselt wird. Unter anaeroben Umständen kommt es zur „anaeroben Glykolyse“, bei der kaum Pyruvat in die Mitochondrien gelangt (HANAHAN und WEINBERG, 2011). Otto Warburg erforschte bereits früh den Metabolismus von Tumorzellen und konnte dabei Unterschiede zu normalen Zellen feststellen. Krebszellen beschreiten trotz ausreichender Sauerstoffversorgung einen Stoffwechselweg ähnlich der anaeroben Glykolyse - eine Art „aerobe Glykolyse“ (WARBURG, 1931; WARBURG, 1956; WEINHOUSE et al., 1956). Tatsächlich besteht ein Zusammenhang zwischen Glykolyse, aktivierten Onkogenen und mutierten Tumorsuppressoren (HANAHAN und WEINBERG, 2011).

Die Energiegewinnung durch Glykolyse ist deutlich weniger effizient als die mitochondriale oxidative Phosphorylierung. Um dennoch genügend Energie produzieren zu können, sorgen Tumorzellen für mehr Glukose im Zytoplasma, zum Beispiel indem sie die Anzahl an

Glukosetransportern erhöhen. Unter hypoxischen Umständen, wie sie häufig in Tumoren zu finden sind, wird die Nutzung der Glykolyse noch deutlicher und sowohl die Anzahl an Glukosetransportern als auch die Konzentrationen von an der Glykolyse beteiligten Enzymen steigen (HANAHAN und WEINBERG, 2011).

Es scheint zwei Untergruppen von Krebszellen zu geben, die sich in der Art der Energiegewinnung unterscheiden. Die einen Zellen gehen den glukoseabhängigen Weg und produzieren dabei Laktat, die andere Gruppe importiert hingegen das von anderen Zellen produzierte Laktat und verwendet es als Energiequelle (KENNEDY und DEWHIRST, 2010). Auf diese Weise gehen die beiden Zelltypen vermutlich eine Symbiose ein (HANAHAN und WEINBERG, 2011).

Bei Melanomen hängen die Änderungen im Energiestoffwechsel mit den zugrundeliegenden genetischen Mutationen zusammen. So kommen bei Melanomzellen sowohl eine Erhöhung von Glukoseaufnahme und -abbau, als auch eine verminderte Glykolyse vor. Die Veränderung der Stoffwechselvorgänge wird durch unterschiedliche komplexe Signalwege vermittelt (HOSSEINI et al., 2017).

**Vermeidung der Zerstörung durch das Immunsystem.** Bei einem Immunsystem, das veränderte Zellen erkennt und zerstört, muss es Tumorzellen erst gelingen, die Erkennung durch das Immunsystem zu vermeiden oder dessen Reaktion zu hemmen, um erfolgreich proliferieren zu können. Sowohl das adaptive als auch das angeborene Immunsystem tragen zur Immunüberwachung und somit zum Schutz des Körpers vor Tumoren bei (HANAHAN und WEINBERG, 2011). Die Interaktion des Immunsystems mit Tumorzellen ist tatsächlich jedoch viel komplexer. Im Zuge des „Immeditierens“ werden nicht nur veränderte Zellen eliminiert, sondern auch deren Eigenschaften moduliert, so dass es zur Selektion von Zellen mit geringer Immunogenität kommt. Aus ihnen können schließlich solide Tumoren entstehen (DUNN et al., 2004).

Die Zellen des Immunsystems beeinflussen das Tumorstadium auf verschiedenste Weise, sie können es sowohl hemmen, als auch fördern. Besonders potente Suppressoren der Antitumorimmunität sind regulatorische T-Zellen (Tregs), die über verschiedene Mechanismen das Fortschreiten des Tumors fördern (OUYANG et al., 2016). Ihre Anzahl ist im Blut von Melanompatienten deutlich höher als bei Gesunden (JANDUS et al., 2008). Regulatorische myeloide Zellen, vor allem myeloide Suppressorzellen (MDSCs), dendritische Zellen und Makrophagen, sind ebenfalls in der Lage, die Bekämpfung des Tumors zu hemmen (SICA und

BRONTE, 2007; MURDOCH et al., 2008; OSTRAND-ROSENBERG und SINHA, 2009). Bei Menschen mit Melanom sind große Zahlen an CD8+ T-Lymphozyten im Tumorgewebe einerseits mit besseren klinischen Ergebnissen assoziiert (ERDAG et al., 2012; MAHMOUD et al., 2017), gleichzeitig gibt es jedoch Hinweise, dass diese Zellen unter gewissen Umständen selbst an der Immunsuppression und der Rekrutierung von Tregs beteiligt sein können (SPRANGER et al., 2013). Auch tumorassoziierten neutrophilen Granulozyten wurden sowohl tumorsuppressive als auch tumorfördernde Eigenschaften zugesprochen (MISHALIAN et al., 2013).

Sowohl die humorale als auch die zelluläre Komponente des Immunsystems sind an der Entwicklung maligner Melanome beteiligt. Melanomzellen schaffen es einerseits, das Immunmilieu ihren Bedürfnissen anzupassen, andererseits moduliert auch das Immunsystem im Zuge des Immuneditierens die Eigenschaften der Melanomzellen (RODRÍGUEZ-CERDEIRA et al., 2017; LUGOVIĆ-MIHIĆ et al., 2019).

## 5 Immuneditieren

Bereits im Jahre 1909 postulierte Paul Ehrlich, dass das Immunsystem in der Lage sei, das Wachstum von Tumoren zu unterdrücken. Die in den folgenden Jahrzehnten gewonnenen Erkenntnisse, wie beispielsweise die Entdeckung von tumorspezifischen Antigenen, bestärkten diese Theorie. Mitte des 20. Jahrhunderts entwickelten Sir Macfarlane Burnet und Lewis Thomas die Hypothese der Tumormimmunüberwachung (DUNN et al., 2002). Diese besagt, dass das Immunsystem in der Lage sei, mutierte Zellen zu erkennen und zu eliminieren, um so eine gewisse Homöostase im Körper zu erreichen (RIBATTI, 2017).

Wie sich jedoch mit zunehmendem Wissensstand herausstellte, ist die Immunüberwachung nur ein Aspekt der Interaktion zwischen dem Immunsystem und entarteten Zellen (DUNN et al., 2004). So ist das Immunsystem zwar einerseits in der Lage, die Entstehung von Tumoren zu hemmen, andererseits fördert es die Selektion von Tumorzellen mit geringer Immunogenität (SHANKARAN et al., 2001).

Aufgrund dessen entstand die Theorie des Tumor-Immuneditierens, die sowohl die protektiven, als auch die tumormodulierenden Eigenschaften des Immunsystems beinhaltet. Dunn et al. beschrieben dabei die "drei E" des Tumor-Immuneditierens, die aus den drei aufeinanderfolgenden Stadien "Eliminierung", "Equilibrium" (Gleichgewichtszustand) und "Entkommen" (bestehen (DUNN et al., 2002).

Die Phase der Eliminierung ist mit der ursprünglichen Theorie der Tumorüberwachung vergleichbar. In diesem Stadium kann es dem Immunsystem gelingen, den Tumor im Anfangsstadium zu eliminieren. Ist dies nicht der Fall, tritt die Phase des Equilibriums ein. Diese ist gekennzeichnet durch die hohe genetische Instabilität der Tumorzellen und den starken Selektionsdruck, den das Immunsystem auf sie ausübt. Im Laufe der Zeit setzen sich jene Zellen durch, die resistent gegen die Immunantwort sind und es folgt der Übergang in die Phase des Entkommens, in der sich diese resistenten malignen Zellen unkontrolliert ausbreiten können (DUNN et al., 2002).

## 6 Wie passt das Melanom das Immunmilieu seinen Bedürfnissen an?

Um der Erkennung und Zerstörung durch das Immunsystem zu entgehen, nutzen Melanome unterschiedliche Mechanismen. Sie reduzieren ihre Immunogenität, indem sie beispielsweise die Expression von tumorassoziierten Antigenen drosseln, oder die Expression von MHC-Molekülen verändern (DUNN et al., 2007; JOHNSON et al., 2016).

Auch die Mikroumgebung des Tumors spielt eine wesentliche Rolle bei der Progression und der Metastasierung von Melanomen und anderen Tumoren. Sie besteht aus einer zellulären Komponente, einer nicht-zellulären Komponente und aus extrazellulärer Matrix. Die zelluläre Komponente setzt sich aus Tumorzellen, Nicht-Tumorzellen, mesenchymalen Stammzellen, Immunzellen, Endothelzellen, Nischenzellen, tumorassoziierten Fibroblasten und Adipozyten zusammen. Die nicht-zelluläre Komponente besteht vor allem aus Zytokinen, Chemokinen, Mediatoren und Wachstumsfaktoren (CACHO-DÍAZ et al., 2020).

Tumorzellen werden durch das Tumormilieu beeinflusst, umgekehrt passen Tumorzellen das Umfeld aber auch ihren eigenen Bedürfnissen an. Sie nutzen das sie umgebende inflammatorische Milieu gezielt für die Tumorprogression, da es durch das Immunsystem zu einer Selektion der Tumorzellen kommt. Die anwesenden Entzündungszellen und die von ihnen sezernierten Zytokine haben aber zum Teil auch selbst karzinogene Eigenschaften (CACHO-DÍAZ et al., 2020).

Gleichzeitig supprimieren Tumorzellen und andere Zellen des Tumormilieus die Antitumorimmunität (CACHO-DÍAZ et al., 2020). Sie interagieren mit Immunzellen, verändern oder supprimieren deren Funktion und verschaffen sich damit die Möglichkeit, der Antitumorimmunität zu entgehen (GONZALEZ-GUGEL et al., 2016).

Einige Strategien von Melanomen, das Immunmilieu ihren Bedürfnissen anzupassen, sollen im Folgenden beschrieben werden.

### 6.1 Mangelnde Immunogenität von Melanomzellen

#### 6.1.1 Tumorassoziierte Antigene

Tumorzellen exprimieren Antigene, deren Anwesenheit eine Aktivierung des Immunsystems auslösen und durch das Zusammenspiel von angeborener und adaptiver Immunantwort eine Abwehrreaktion hervorrufen kann. Solche tumorassoziierten Antigene (TAAs) sind im besten

Fall spezifisch für die jeweiligen Tumorzellen und nicht oder kaum in normalem Gewebe zu finden (SUCKOW, 2013). Klinisch von Bedeutung sind TAAs außerdem, da sie für Diagnostik und Prognosestellung herangezogen werden können und einen vielversprechenden Ansatz bei der Entwicklung neuer Immuntherapien darstellen (PITCOVSKI et al., 2017).

Melanome exprimieren eine breite Palette Melanom-assoziiertes Antigene (MAAs), die sich in Melanozyten-Differenzierungsantigene, Onkofetale/Tumor-Testis Antigene, die GAGE-Protein Familie und Zellmembranproteine unterteilen lassen (PITCOVSKI et al., 2017).

Melanozyten-Differenzierungsantigene sind von Melanozyten exprimierte Antigene, die mit der Differenzierung von Melanozyten und der Biosynthese von Melanin in Zusammenhang stehen. Sie sind spezifisch für diesen Zelltyp. In normalem Gewebe beschränkt sich ihre Anwesenheit auf pigmentierte Bereiche von Haut, Schleimhaut, Uvea, Iris und Retina. Bedeutung erlangen die Melanozyten-Differenzierungsantigene vor allem dadurch, dass sie auch von Melanomzellen exprimiert werden. Zu diesen Antigenen zählen unter anderem Melan-A bzw. MART-1, Tyrosinase und gp100, deren Vorkommen nicht nur bei Melanomen des Menschen und der Maus, sondern auch beim kaninen Melanom gut dokumentiert ist. Tyrosinase und gp100 sind wichtige Bestandteile der Melaninsynthese, während Melan-A zusätzlich durch die Interaktion mit gp100 zu dessen Funktionalität beiträgt (STELL et al., 2009). Weitere bekannte Melanozyten-Differenzierungsantigene sind etwa TRP-1 (gp75) und TRP-2 (PITCOVSKI et al., 2017).

Die physiologische Aufgabe von Tumor-Testis Antigenen ("cancer-testis antigens"; CTA) ist unter anderem das Mitwirken bei Proliferation, Differenzierung und Überleben von Keimbahnzellen. Eine ähnliche Funktion dieser Antigene bei Tumorzellen wird vermutet. CTA sind außer beim Melanom auch bei anderen Tumorerkrankungen präsent. Die am besten untersuchten Familien sind das Melanoma-assoziiertes Antigen (MAGE), das B-M antigen-1 (BAGE), das G-Antigen (GAGE), NY-ESO-1 und der Synoviales-Sarkom-X-Chromosom-Bruchpunkt ("synovial sarcoma X chromosome breakpoint"; SSX) (PITCOVSKI et al., 2017).

Zellmembranmoleküle, deren Expression in Melanomen erhöht ist, stellen ebenfalls wichtige MAAs dar. Am besten erforscht sind dabei Integrine, Melanom-Chondroitinsulfatproteoglykane (MCSP, auch Chondroitinsulfatproteoglykan-4), Moleküle der Immunglobulinsuperfamilie, Melanotransferrin (MTf) und S100. Ihre Hochregulierung fördert Wachstum, Migration und Invasion von Melanomzellen (PITCOVSKI et al., 2017).

Zu den meistuntersuchten nicht-Protein Antigenen, die bei Melanomen vorkommen, zählen Ganglioside, die jedoch lediglich eine schwache Immunreaktion hervorrufen. Eine eigene Gruppe von Antigenen bilden Neoantigene, die aus den im Laufe der Tumorentwicklung anfallenden Genmutationen hervorgehen (PITCOVSKI et al., 2017).

Die Abwehrreaktion, die TAAs eigentlich auslösen sollten, ist in vielen Fällen nur schwach ausgeprägt und die Antwort des angeborenen Immunsystems ist unzureichend (WHITESIDE, 2006).

Die ungenügende Immunreaktion kann unter anderem darauf zurückgeführt werden, dass es mit der Progression von Melanomen und ihrer zunehmenden Malignität häufig zu einer veränderten Transkription der für TAAs kodierenden Gene kommt (DUNN et al., 2007). In Melanomzellen, bei denen ein Verlust der Antigenexpression vorliegt, ist dennoch eine basale Transkription intakter mRNA vorhanden. Der Mangel an MAAs dürfte weniger an einer Veränderung der Gene liegen, sondern an Störungen in der Genregulation. Es konnte festgestellt werden, dass der Großteil der betroffenen Melanomzellen zugleich eine Herabregulierung des Genregulators MITF-M aufweist (PANDOLFI et al., 2008).

Humane Melanomzelllinien selbst sind in der Lage, Faktoren zu produzieren, die die Expression von Differenzierungsantigenen hemmen. Einer dieser Faktoren ist das Zytokin Oncostatin M (OSM), welches sich negativ auf die Expression von Melan-A/MART-1, gp100, Tyrosinase, Tyrosinase-verwandten Proteinen 1 und 2 (Trp1, Trp2) und von Mikrophthalmie-assoziiierter Transkriptionsfaktor (MITF-M) auswirkt (DURDA et al., 2003).

Die verminderte oder nicht vorhandene Expression von TAAs hat zur Folge, dass die Erkennung durch zytotoxische T-Lymphozyten nicht mehr funktionieren kann. Dadurch wird den Tumorzellen ermöglicht, der Zerstörung durch das Immunsystem zu entgehen (DUNN et al., 2007).

Die Erhöhung der Antigen-Expression in Melanomzellen mit geringer TAA-Expression gilt als ein möglicher Ansatz zur Immuntherapie des Melanoms. Auf diese Weise sollen zytotoxische T-Lymphozyten Tumorzellen erkennen können und die spezifische Immunantwort verbessert werden. Durch eine Behandlung humaner Melanomzelllinien mit IFN- $\beta$  konnten sowohl die Expression der Melanom-assoziierten Antigene Melan-A/MART-1 und gp100, als auch die Konzentration der HLA Klasse 1-Moleküle erhöht werden (DUNN et al., 2007). Mutagen-aktivierte Proteinkinase (MEK)-Inhibitoren können in Melanomzellen mit niedriger TAA-Expression den Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweg dahingehend

beeinflussen, dass es zu einer erhöhten Expression von MAA und in der Folge zu einer Verstärkung der Melan-A/MART-1-spezifischen CTL-Antwort kommt (KONO et al., 2006).

### **6.1.2 Veränderung der MHC-Expression**

MHC-Moleküle sind auch für die Präsentation von Tumorantigenen zuständig. Die Suppression der MHC-Expression durch Tumorzellen ist eine wichtige Strategie zur Immunevasion (OSBORN und GREER, 2015). MHC Klasse I-Moleküle befinden sich an der Zelloberfläche der meisten Zellen. Die Antigene, die sie präsentieren, werden von CD8+ zytotoxischen T-Zellen erkannt. MHC II-Moleküle sind in erster Linie an der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen lokalisiert. Die über sie präsentierten Antigene werden von CD4+ T-Zellen erkannt. (DEGENHARDT et al., 2010). Auch andere Zellen können MHC II exprimieren. Dazu ist jedoch die Stimulation durch proinflammatorische Zytokine wie IFN- $\gamma$  notwendig (OSBORN und GREER, 2015). Ein wichtiger Regulator der MHC II-Expression ist der Klasse II-Transaktivator (CIITA) (DROZINA et al., 2005).

Bei humanen Melanomen und anderen Tumoren kommt es oftmals zur Unterdrückung der MHC-I und MHC-II-Expression. Diese ist mit Immunsuppression, Metastasierung und schlechter Prognose assoziiert. Indem Tumorzellen die Fähigkeit verlieren, Tumorantigene zu präsentieren, entgehen sie der Erkennung durch CD8+ T-Lymphozyten und Antigenpräsentierende Zellen (JOHNSON et al., 2016).

Obwohl MHC-II hauptsächlich von Immunzellen exprimiert wird, wurde bei verschiedenen Tumoren, unter anderem beim Melanom, eine tumorspezifische MHC II-Expression beschrieben. MHC II+ Tumorzellen scheinen eine größere Immunogenität zu besitzen und eher in der Lage zu sein, eine Immunreaktion hervorzurufen (JOHNSON et al., 2016). Häufig nimmt die Konzentration von MHC II mit zunehmender Progression des Melanoms ab. Bei Melanomen in radialer Wachstumsphase (RGP) wurde eine höhere basale Expression von MHC II beschrieben als bei weiter fortgeschrittenen Melanomen in vertikaler Wachstumsphase (VGP). Metastasierende Melanome wiederum exprimieren keine MHC II-Moleküle mehr (OSBORN und GREER, 2015). Der Verlust der MHC I-Expression tritt bei Melanomzellen ebenfalls relativ häufig ein (RODIG et al., 2018).

Andere Autoren konnten jedoch ein anderes Muster der MHC-Expression feststellen. Sie beschrieben eine Überexpression von für MHC-Moleküle kodierenden Genen bei VGP- und metastatischen Melanomzelllinien, welche bei normalen Melanozyten nicht vorhanden war.

Bei VGP-Melanomen korrelierte die Genexpression außerdem mit der tatsächlichen Expression von MHC I und II. Bei metastatischen Melanomen hingegen fehlte diese Korrelation (DEGENHARDT et al., 2010).

Die Expression von MHC I und MHC II ist stark von der Konzentration des Transaktivators CIITA abhängig. Eine große Zahl von für MHC-Moleküle kodierenden Genkopien ist nicht ausreichend, um tatsächlich eine starke Expression von MHC I und II zu erreichen. Die zunehmende Suppression der MHC-Expression liegt möglicherweise aber daran, dass mit der Progression des Melanoms auch die Konzentration von CIITA abnimmt. Bei metastatischen Melanomen ist CIITA nur in nicht detektierbaren Mengen vorhanden, während er bei VGP-Melanomen in hoher Konzentration vorkommt (DEGENHARDT et al., 2010).

Bei RGP- und VGP-Melanomen kann durch eine Behandlung mit IFN- $\gamma$  die MHC II-Expression stimuliert werden, bei metastatischen Melanomen kann dieser Effekt nicht erzielt werden. Der dafür notwendige Rezeptor für IFN- $\gamma$  ist jedoch in allen Stadien vorhanden, wodurch die Melanomzellen ansprechbar wären. Um zu funktionieren, benötigt der IFN-Rezeptor aber einen intakten STAT1-Signalweg. STAT1 ist bei metastatischen Melanomen häufig supprimiert und könnte zur verminderten MHC II-Expression beitragen (OSBORN und GREER, 2015).

## **6.2 Programmed death-1 (PD-1)**

Programmed cell death protein-1 (PD-1) ist ein Rezeptor, der von aktivierten CD4+ und CD8+ T-Zellen, NK-T-Zellen, B-Zellen, aktivierten Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert wird (SZNOL und CHEN, 2014). Auch beim humanen und kaninen Melanom und verschiedenen anderen Tumoren des Menschen konnte beobachtet werden, dass tumorinfiltrierende Lymphozyten PD-1 exprimieren (CHAPON et al., 2011; MAEKAWA et al., 2016).

Die Liganden für PD-1 sind Programmed cell death-ligand (PD-L)1 und PD-L2 (SZNOL und CHEN, 2014). Die Interaktion von PD-1 und PD-L1 bzw. PD-L2 wirkt suppressiv auf die Immunantwort. Bei Tumorerkrankungen stellt daher die Blockade von PD-1 einen immuntherapeutischen Ansatz dar (GARCIA-DIAZ et al., 2017).

PD-L1 wird unter physiologischen Umständen nur in geringem Ausmaß exprimiert, unter anderem von gewissen Gewebemakrophagen in Lunge, Leber und Tonsillen (DONG et al., 2002). Bei Tumorerkrankungen wird PD-L1 sowohl von Tumorzellen als auch von den

Immunzellen des Tumormilieus exprimiert (CHEN et al., 2019). Beim Menschen konnte es unter anderem bei gewissen Lymphomen, Thymomen und einer Vielzahl von Karzinomen nachgewiesen werden, sowie bei Melanomen und deren metastatischen Zellen im Lymphknoten (DONG et al., 2002; BROWN et al., 2003).

Unter physiologischen Umständen scheint die Interaktion von PD-1 und PD-L1 an der Erhaltung der Selbsttoleranz innerhalb eines Organismus beteiligt zu sein. So erkrankten Mäuse mit PD-1-Gendefekt im Laufe ihres Lebens an Autoimmunerkrankungen mit chronisch progressivem Verlauf (NISHIMURA et al., 1999). Die Interaktion von PD-1 und PD-L1 kann sowohl die Proliferation als auch die Zytokinsekretion der T-Lymphozyten hemmen. T-Zellen, die in Anwesenheit von PD-L1 aktiviert werden, sezernieren deutlich verminderte Mengen von IFN- $\gamma$  und IL-10 (FREEMAN et al., 2000).

Bei Tumoren interagiert das von Tumorzellen oder Immunzellen exprimierte PD-L1 mit PD-1 auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten. Durch diese Interaktion wird die Immunreaktion von T-Zellen geschwächt (CHEN et al., 2019). Bindet PD-L1 von Tumorzellen an den PD-1-Rezeptor an CD8<sup>+</sup> Lymphozyten, kommt es direkt zur Verminderung von Zytokinsekretion und Zytotoxizität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Auch bei CD4<sup>+</sup> tumorinfiltrierenden Lymphozyten kann es zur Suppression der Zytokinsekretion kommen (JUNEJA et al., 2017). Von Tumorzellen exprimiertes PD-L1 führt außerdem zur vermehrten Apoptose von T-Zellen (DONG et al., 2002).

Tumorzellen erreichen die PD-L1-Expression über zwei verschiedene Wege, die „angeborene Immunresistenz“ und „adaptive Immunresistenz“ genannt werden können. „Adaptive Immunresistenz“ bedeutet eine konstitutive PD-L1-Expression, die durch Amplifikation von PD-L1-Genen oder einer gestörten Aktivierung des Onkogen-Signalings zustande kommt. Die „adaptive Immunresistenz“ beschreibt eine PD-L1-Expression von Tumor- und Immunzellen, die von der Anwesenheit inflammatorischer Faktoren im Tumormilieu abhängig sind. Vor allem IFN- $\gamma$ , welches von aktivierten T-Zellen sezerniert wird, ist in der Lage, die PD-L1-Expression zu induzieren. Aber auch andere Zytokine, wie IL-1a, IL-10, IL-27 und IL-32a können bei kultivierten humanen Monozyten und Tumorzellen einen solchen Effekt haben (CHEN et al., 2019). Neben diesen genannten Faktoren sind zudem bakterielle Lipopolysaccharide und vascular endothelial growth factor (VEGF) in der Lage, bei Tumorzellen die Oberflächenexpression von PD-L1 auszulösen (SZNOL und CHEN, 2014). Welche Faktoren

jedoch tatsächlich eine PD-L1-Expression auslösen können, hängt von der Art des Tumors und vom jeweiligen Zelltyp ab (CHEN et al., 2019).

Eine konstitutive Expression von PD-L1 ist an kultivierten Melanomzellen kaum vorhanden. Die Stimulation mit IFN- $\gamma$  ist jedoch in der Lage, die PD-L1-Expression auf diesen Zellen zu induzieren. Für die Wirkung von IFN- $\gamma$  scheinen auch geringe Mengen des Rezeptors für IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ -Rezeptor-1, an Melanomzellen auszureichen. IFN- $\gamma$  bewirkt eine vermehrte Transkription und Translation von PD-L1. Diese Vorgänge werden über den Transkriptionsfaktor STAT1 vermittelt. IL-1 $\alpha$  kann bei Melanomzellen nur in Kombination mit IFN- $\gamma$  die Expression von PD-L1 auslösen (CHEN et al., 2019).

Die Expression von PD-L2 an der Zelloberfläche von Melanomzellen kann wie bei PD-L1 durch IFN- $\gamma$  stimuliert werden. IFN- $\beta$  hat einen ähnlich starken, teilweise sogar stärkeren Effekt als IFN- $\gamma$ . Die Wirkung dieser Zytokine auf die PD-L2-Expression wird über die beiden Transkriptionsfaktoren Interferonregulationsfaktor-1 (IRF1) und STAT3 reguliert (GARCIA-DIAZ et al., 2017).

## **6.3 Immunzellen**

### **6.3.1 Zytotoxische T-Zellen**

Wichtige Effektorzellen des adaptiven Immunsystems sind die CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs). Sie erkennen Tumorantigene, die ihnen durch andere Zellen über MHC I-Moleküle präsentiert werden, und zerstören diese. Bei Melanomerkrankungen ist dieser Abwehrmechanismus jedoch oft gestört (OSBORN und GREER, 2015).

Weniger als 10% der Metastasen von humanen Melanomen weisen eine diffuse Infiltration mit CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten auf, obwohl bei den meisten Metastasen perivaskuläre Immunzellpopulationen vorhanden sind (ERDAG et al., 2012). Um Melanomzellen effektiv bekämpfen zu können, ist es allerdings notwendig, dass die Effektorzellen in ausreichender Zahl ins Tumorgewebe gelangen. Es wurde beschrieben, dass Patienten, deren Melanome große Zahlen an CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten beherbergen, klinisch einen weniger aggressiven Krankheitsverlauf zeigen (ERDAG et al., 2012; MAHMOUD et al., 2017). Während die Migration in das perivaskuläre Gewebe in den meisten Fällen zu funktionieren scheint, gelingt offenbar die Infiltration des Melanomgewebes nicht. Mögliche Ursachen könnten ein Mangel an dafür notwendigen Molekülen, Chemokinen und Integrinen, eine erhöhte Emigration von Immunzellen aus dem Tumorgewebe oder die Unfähigkeit von T-Lymphozyten, im Tumor-

Microenvironment zu überleben, sein. Stärkere T-Zell-Infiltration scheint außerdem mit den Chemokinen CCL2-5, CXCL9 und CXCL10 in Zusammenhang zu stehen (ERDAG et al., 2012).

CTLs im Blut von Menschen mit Melanom können zwar eine spontane Reaktion auf bekannte Melanomantigene zeigen, diese ist aber deutlich schwächer als die Reaktion auf Virusantigene. Die Reaktion auf Melan A ist dabei, verglichen mit anderen Melanomantigenen, am stärksten ausgeprägt, dennoch fällt auch sie lediglich schwach aus (PALMOWSKI et al., 2002).

Die Aktivität von antigenspezifischen CTLs in tumorinfiltrierten Lymphknoten ist jedoch nicht bei allen Patienten mit malignem Melanom gleich. Während Melan A-spezifische CTLs bei gewissen Patienten in Anwesenheit von Melan A ihre Anzahl deutlich erhöhen und durchaus Aktivität gegen Tumorantigene zeigen, scheinen sie bei anderen das Tumorantigen nicht ausreichend erkannt zu haben. Das Priming der CTLs und ihre Expansion bleiben in diesen Fällen aus (PALMOWSKI et al., 2002).

Häufig weisen die CTLs von Patienten in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung eine stärkere antigenspezifische Aktivität auf als CTLs von Patienten in frühen Stadien. Dies liegt vermutlich daran, dass die Wahrscheinlichkeit eines T-Zell-Primings steigt, je stärker das lymphatische Gewebe mit Tumorzellen infiltriert ist. Eine Tumorregression kann zu diesem Zeitpunkt aber dennoch nicht erreicht werden, da die Reaktion der CTLs meist zu schwach und zu spät ist (PALMOWSKI et al., 2002).

Ähnlich wie bei chronischen viralen Infektionen können CD8<sup>+</sup> Zellen auch bei Tumorerkrankungen einen Erschöpfungszustand entwickeln. Erschöpfte CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten sind charakterisiert durch die Expression von inhibitorischen Rezeptoren wie PD-1, CTLA-4 und TIM-3, niedrige Zytokinproduktion und veränderte T-Zell-Rezeptoren. Außerdem weisen sie Fehler im Metabolismus und eine veränderte Expression von Transkriptionsfaktoren und Genen, die in Chemotaxis, Adhäsion und Migration involviert sind, auf (WHERRY et al., 2007; BAITSCH et al., 2011).

Bei Menschen mit Stage III und IV Melanomen konnte nachgewiesen werden, dass CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus tumorinfiltrierten Lymphknoten im Gegensatz zu zirkulierenden T-Zellen die Merkmale erschöpfter T-Zellen tragen. Die aus Tumorinfiltrierten Lymphknoten (TILN) isolierten CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten glichen erschöpften T-Zellen nicht nur in ihrer Genexpression,

sondern exprimierten auch eine Vielzahl inhibitorischer Rezeptoren (BAITSCH et al., 2011; GROTZ et al., 2015).

Bei der Analyse von Melanommetastasen wurde bei den Proben mit starker CD8+ T-Zell-Infiltration zugleich eine erhöhte Expression der inhibitorischen Moleküle Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) und PD-L1 festgestellt. Außerdem konnte eine große Anzahl an FoxP3+ CD4+ T-Zellen gefunden werden. Im Gegensatz dazu wiesen Metastasen ohne CD8+ T-Zell-Infiltration nur minimale Konzentrationen von FoxP3, IDO und PD-L1 auf. Diese Ergebnisse könnten bedeuten, dass aktivierte CD8+ T-Zellen selbst immunsuppressive Wirkung haben (SPRANGER et al., 2013).

CD8+ T-Zellen unterstützen außerdem die Regulatorische T-Zell (Treg)-Akkumulation im Tumorgewebe, beispielsweise indem sie die Konzentration von CCL22 und CCR4 erhöhen (SPRANGER et al., 2013).

### **6.3.2 CD4+ Th1/Th2-Zellen**

Zur Gewährleistung funktionierender Immunreaktionen tragen auch T-Helfer-Zellen bei. Sie unterstützen die Funktion von B-Zellen, CD8+ T-Zellen und Makrophagen und helfen dadurch dem Körper, Pathogene abzuwehren. Ihre Aufgabe ist es auch, die Dauer und Intensität einer Immunantwort zu regulieren und Autoimmunreaktionen zu verhindern (ZHU et al., 2010).

CD4+ T-Lymphozyten können nach den Zytokinen, die sie produzieren, in Gruppen eingeteilt werden. Th1 wird dabei die Produktion von IL-2, IFN-gamma und TNF- $\beta$  zugeschrieben, während Th2-Zellen IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13 produzieren (MOSMANN et al., 1986; ABBAS et al., 1996). Sowohl Th1 als auch Th2 des Menschen sind in der Lage, IL-10 zu produzieren (SORNASSE et al., 1996). Weitere Untergruppen von CD4+ T-Zellen sind Th17 und induzierte Tregs (iTreg) (ZHU et al., 2010) sowie T folliculäre Helferzellen (Tfh) (SCHMITT et al., 2014).

In von Melanomzellen infiltrierten Wächterlymphknoten kommt es zu einer veränderten Polarisation der CD4+ T-Zellen. Es zeigte sich, dass dabei eine Verschiebung in Richtung der Th2-Zellen stattfindet und somit weniger Th1- und mehr Th2-Zellen anwesend sind. Diese Verschiebung spiegelt sich auch im Zytokinmilieu der Lymphknoten wider, mit einer Verminderung der Th1-Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-12 und einer Erhöhung der Th2-Zytokine IL-13, IL-4, IL-6, TGF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  (GROTZ et al., 2015). Auch im Plasma von Melanompatienten konnte die erhöhte Konzentration von Th2-Zytokinen festgestellt werden (NEVALA et al.,

2009). Es scheint eine Art Th2-medierte chronische Entzündung zu herrschen, die sich sowohl auf betroffene Lymphknoten als auch systemisch auswirkt (NEVALA et al., 2009; GROTZ et al., 2015).

Die Th2-Polarisation bei Melanomen könnte mit erhöhten Werten von VEGF zusammenhängen. In vitro konnte durch eine Behandlung von Lymphknoten mit VEGF eine solche Th2-Polarisation ausgelöst werden. Melanomzellen sind in der Lage, die Transkription von VEGF hoch zu regulieren, wodurch es zu erhöhten Konzentrationen von VEGF im Plasma kommt. In Melanom-Wächterlymphknoten sind zudem zahlreiche Rezeptoren für VEGF vorhanden (NEVALA et al., 2009; GROTZ et al., 2015).

### **6.3.3 Regulatorische T-Zellen**

Natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen (Tregs) stellen einen kleinen Anteil aller CD4+ Zellen dar (5-6%) (WANG und WANG, 2007). Sie sind notwendig zur Aufrechterhaltung einer Immunhomöostase und schützen den Körper davor, sich selbst anzugreifen (SAKAGUCHI et al., 1995).

Neben dieser physiologischen Funktion sind Tregs auch in die Progression von Tumorerkrankungen involviert, da sie die Antitumorimmunität supprimieren (JANDUS et al., 2008). In mehreren humanmedizinischen Studien wurde bereits nachgewiesen, dass bei Patienten, die an Krebserkrankungen leiden, die Konzentration von Tregs sowohl in der Peripherie als auch in Tumoren erhöht ist (ICHIHARA et al., 2003; LING et al., 2007).

Auch bei an malignem Melanom erkrankten Menschen konnte eine signifikant höhere Anzahl an Tregs als bei gesunden Menschen festgestellt werden. In Tumoren und tumorinfiltrierten Lymphknoten finden sich dabei deutlich mehr Tregs als im peripheren Blut oder in nicht betroffenen Lymphknoten (JANDUS et al., 2008).

Die Akkumulation von Tregs im Tumorgewebe scheint auf verschiedenen Wegen zu geschehen. Vieles deutet darauf hin, dass Tumorzellen selbst in der Lage sind, Tregs zu rekrutieren (TOMINAGA et al., 2010). Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs), die in Melanom-konditionierten Medien kultiviert wurden, weisen beispielsweise einen größeren Anteil an Tregs auf als die im Kontrollmedium kultivierten PBMCs (BAUMGARTNER et al., 2007). Außerdem können Tumorzellen die Anlockung und die lokale Proliferation von Tregs, sowie die Konversion von CD4+ Zellen zu Tregs fördern, indem sie bestimmte Zytokine

sezernieren. Aus Versuchen an mit Tumoren infizierten Ratten und Mäusen ist bekannt, dass Zytokine wie CCL-22, CCL-2, TGF- $\beta$  oder PGE<sub>2</sub> solche Auswirkungen haben können (TOMINAGA et al., 2010).

Tregs nutzen mehrere Strategien, die Antwort des Immunsystems zu hemmen. Indem sie immunsuppressive Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  sezernieren, supprimieren sie die Aktivität und Proliferation anderer Immunzellen wie CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T-Zellen und NK-Zellen. Auch der Wettkampf um Wachstumsfaktoren mit anderen Immunzellen trägt zur Schwächung der Antitumorimmunität bei (BAUMGARTNER et al., 2007; OUYANG et al., 2016).

Tregs haben außerdem die Eigenschaft, exzessiv CD25 zu exprimieren. Mit dieser Überexpression hemmen sie die Sekretion von Antitumor-Zytokinen wie IL-2, IL-7 und IL-12. Tregs sezernieren auch Zytokine wie CTLA-4 und PD-L1, welche an Antigenpräsentierende Zellen binden und inhibitorische Wirkung haben. Dadurch wird die Interaktion zwischen Antigenpräsentierenden Zellen und zytotoxischen T-Zellen gestört (OUYANG et al., 2016).

#### **6.3.4 Tumorassoziierte Neutrophile Granulozyten (TANs)**

Tumorassoziierten Neutrophilen Granulozyten werden verschiedene Funktionen zugeschrieben. Während die einen Studien das Fördern von Angiogenese, Tumorentwicklung und Metastasierung durch TAN dokumentierten, kamen andere zu dem Schluss, dass TAN durch direkte Tumorzytotoxizität und die Erhöhung der Konzentration von Antitumor-Mediatoren die Progression von malignen Tumoren hemmen können (MISHALIAN et al., 2013).

TANs können ähnlich wie tumorassoziierte Makrophagen in zwei Stadien der Aktivierung bzw. Differenzierung eingeteilt werden – in den N1- und den N2-Typ. Der N1-Phänotyp zeichnet sich durch seine anti-Tumor-Eigenschaften aus. N1-TANs exprimieren vermehrt immunaktivierende Zytokine und Chemokine, weniger Arginase und töten *in vitro* Tumorzellen effektiver ab. Der N2-Phänotyp hingegen zeigt pro-Tumor-Eigenschaften (FRIDLENDER et al., 2009). Die im Tumor anwesenden Zytokine entscheiden darüber, welchen Phänotyp die neutrophilen Granulozyten ausbilden (RESENDE und ULRICH, 2013). TGF- $\beta$  ist eines der wichtigsten Moleküle bei der Polarisierung zum N1- bzw. N2-Phänotyp. Wird TGF- $\beta$  blockiert, steigt die Anzahl an N1-TANs. Die Existenz zweier verschiedener Stadien könnten eine Erklärung dafür sein, warum TANs so gegensätzliche Wirkungen auf Tumoren zugeschrieben

werden (FRIDLENDER et al., 2009). Ein möglicher weiterer Subtyp sind N0-TAN, die als ruhende TANs beschrieben wurden (HOUGHTON, 2010).

Um neutrophile Granulozyten in entzündetes Gewebe zu locken, ist die Anwesenheit von Chemokinen erforderlich. Maligne Zellen sezernieren sowohl solche Chemokine als auch proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, G-CSF, TNF- $\alpha$  und IFN- $\alpha$ . Diese regen Parenchymzellen zur Produktion von Chemokinen an. So finden sich in Tumoren unter anderem Chemokine wie CCL3, CXCL8, CXCL6, CXCL1 und CXCL2, welche neutrophile Granulozyten anlocken und aktivieren (RESENDE und ULRICH, 2013). CXCR2 wird unter anderem von neutrophilen Granulozyten exprimiert und induziert gemeinsam mit CXCR4 das Einwandern von Neutrophilen aus dem Knochenmark in entzündetes Gewebe (JABLONSKA et al., 2014).

Sowohl bei Menschen mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen als auch bei Mäusen mit Melanomen ist die Anzahl der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut deutlich höher als bei Gesunden und korreliert außerdem mit dem Tumorstage. Die im Blut der erkrankten Mäuse vorhandenen Neutrophilen konnten als TANs mit pro-Tumor-Eigenschaften identifiziert werden. Es stellte sich heraus, dass die bei fortgeschrittenen Tumoren im Blut zirkulierenden TANs, anders als normale neutrophile Granulozyten, die Metastasierung fördern. Dies geschieht unter anderem dadurch, dass diese zirkulierenden TANs die Aktivierung peripherer Leukozyten behindern, was eine geschwächte Antitumorreaktion zur Folge hat (ZHANG et al., 2016).

Die Tumorprogression fördern N2-TANs auch durch die Hochregulierung von Genen für proangiogene Faktoren wie VEGF und Matrix-Metalloproteinase (MMP)9 sowie durch die Expression prometastatischer Proteine (ANDZINSKI et al., 2016).

Inwiefern sich TANs von granulozytären myeloiden Suppressorzellen (GrMDSCs) unterscheiden, wurde in verschiedenen Publikationen diskutiert und an Maustumormodellen und Menschen mit Tumorerkrankungen untersucht. So konnten unter anderem Unterschiede in der Expression von Myeloperoxidase, Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Zytokinen, sowie in Migrationsverhalten, Kernmorphologie und dem Vorkommen spontaner Apoptosen gefunden werden. Bei Menschen mit Nierenkarzinom wurde außerdem beschrieben, dass GrMDSCs im Vergleich zu neutrophilen Granulozyten mehr Arginase freisetzen. Die einzelnen Subgruppen von GrMDSCs heben aber jeweils unterschiedliche Eigenschaften (DUMITRU et al., 2012). Viele Funktionen von MDSCs und TANs überschneiden sich jedoch. MDSCs sind

ebenfalls in Angiogenese, Invasion und Metastasierung involviert. Möglicherweise entstehen GrMDSCs und Neutrophile aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle (BRANDAU et al., 2013).

### **6.3.5 Regulatorische myeloide Zellen**

Regulatorische myeloide Zellen sind eine Gruppe von Zellen, die ebenfalls inhibitorische Wirkung auf die Antitumorimmunität haben. Besonders MDSCs, Makrophagen und dendritische Zellen spielen dabei eine wichtige Rolle. Bei Tumorerkrankungen sorgen regulatorische myeloide Zellen für die Entstehung eines chronisch inflammatorischen Umfelds und modulieren die Immunantwort in der Tumorumgebung. Sie sind an Tumorinitiation und -progression beteiligt und fördern Angiogenese und Metastasierung (SICA und BRONTE, 2007; MURDOCH et al., 2008; SHOJAEI et al., 2008; OSTRAND-ROSENBERG und SINHA, 2009).

#### **6.3.5.1 Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs)**

MDSCs sind eine heterogene Gruppe aktivierter unreifer myeloider Zellen. Unter ihnen finden sich sowohl Zellen mit Monozyten- als auch mit Granulozytenabstammung, also frühe Entwicklungsstadien von Makrophagen, Dendritischen Zellen und Granulozyten (GABRILOVICH und NAGARAJ, 2009; NADAL et al., 2018). Für humane MDSCs wurde die Einteilung in monozytäre MDSC (MoMDSC) und granulozytäre MDSC (GrMDSC) getroffen, allerdings sind zwei weitere Kategorien von MDSCs beschrieben, die in keine dieser beiden Gruppen eingeordnet werden können: unreife Myeloidzellen (ImMC) und CD14(-) Zellen (DUMITRU et al., 2012).

Physiologisch sind unreife myeloide Zellen hauptsächlich im Knochenmark zu finden (NADAL et al., 2018). Unter pathologischen Bedingungen jedoch, beispielsweise bei Krebs, Sepsis und verschiedenen Infektionskrankheiten, werden diese unreifen myeloiden Zellen daran gehindert, sich zu reifen myeloiden Zellen, also zu Granulozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen zu entwickeln. Dadurch kommt es auch außerhalb des Knochenmarks zur vermehrten Ansammlung unreifer myeloider Zellen (YOUN et al., 2008).

Diverse von Tumorzellen sezernierte Faktoren tragen zur Vermehrung der MDSCs bei. Zu diesen Faktoren gehören unter anderem der Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF), der Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), der Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) und VEGF. Auch IL-12, IL-13, CC-Chemokinligand-2 (CCL-2),

CXC-Chemokinligand-5 (CXCL-5) und CXC-Chemokinligand-12 (CXCL-12) sind in diesen Vorgang involviert. GM-CSF und G-CSF sind außerdem wichtige Mediatoren bei der Mobilisation von MDSCs aus dem Knochenmark und der Milz in sekundäre lymphoide Organe und ins Tumor-Microenvironment (NADAL et al., 2018).

Die Aktivierung der MDSCs erfolgt schließlich im Tumorgewebe, vermutlich unter Beteiligung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-13/4 und IFN- $\gamma$  (NADAL et al., 2018). Infolge der Aktivierung kommt es zur erhöhten Expression von immunsuppressiven Faktoren, unter anderem Arginase 1, Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS), Nitric Oxide (NO) und ROS (GABRILOVICH und NAGARAJ, 2009). Von Mäusen mit Tumoren ist bekannt, dass ihre MDSCs deutlich mehr ROS freisetzen als die MDSCs tumorfreier Mäuse und dass nur die MDSCs der erkrankten Tiere die antigenspezifische Antwort von CD8<sup>+</sup> T-Zellen inhibieren können. Durch die Interaktion mit antigenspezifischen T-Zellen und die gleichzeitige Anwesenheit der spezifischen Antigene steigt die ROS-Produktion zusätzlich an (KUSMARTSEV et al., 2004). Die Produktion von ROS kann auch durch verschiedene vom Tumor stammende Faktoren ausgelöst werden, wie zum Beispiel durch TGF- $\beta$ , IL-3, IL-6, IL-10, platelet-derived growth factor und GM-CSF (GABRILOVICH und NAGARAJ, 2009).

Das Freisetzen der immunsuppressiven Faktoren ermöglicht es MDSCs, die T- und NK-Zell-Antwort zu hemmen (MURDOCH et al., 2008). Die Sekretion von Arginase 1 führt dabei zu einem Mangel an L-Arginin, wodurch über verschiedene Wege die T-Zell-Funktion behindert wird. Das sezernierte NO blockiert unter anderem die JAK3- und STAT5-Funktion in T-Zellen, stört die MHC-II-Expression und induziert die Apoptose von T-Lymphozyten. Durch die erhöhten Konzentrationen von Peroxynitrit, die in der Umgebung von MDSCs und inflammatorischen Zellen auftreten, wird außerdem die Unempfindlichkeit von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten auf antigenspezifische Reize erreicht (GABRILOVICH und NAGARAJ, 2009). Die Sekretion von ROS wirkt ebenfalls inhibitorisch auf die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort (KUSMARTSEV et al., 2004).

Außer der Inhibition der T-Zell-Antwort tragen MDSCs auch zur Entwicklung von Tregs bei (HUANG et al., 2006). Sie beeinflussen auch die Polarisierung von Makrophagen. Bei der Interaktion von MDSCs und Makrophagen über direkten Zell-Zell-Kontakt verändern sie die Zytokinproduktion des jeweiligen anderen. So hemmen MDSCs die IL-12-Produktion von Makrophagen, während sie selbst als Reaktion auf Makrophagen-Signale ihre IL-10-Produktion erhöhen. Diese Interaktion bedeutet eine Polarisation von M1 Makrophagen zum

M2-Phänotyp und somit eine weitere Einschränkung der Antitumor-Immunität (SINHA et al., 2007).

Die Tumorprogression fördern MDSCs auch, indem sie die Angiogenese vorantreiben. Die Anwesenheit von MDSCs in Tumoren führt zu einer höheren Gefäßdichte. Dies wird vor allem durch die Expression von MMP9, welches die Bioverfügbarkeit von VEGF erhöht, und durch die Fähigkeit von MDSCs, zu endothelartigen Zellen zu differenzieren, erreicht (MURDOCH et al., 2008).

Bei humanen Melanomen sind höhere Zahlen von MDSCs mit kürzerem Überleben, kürzerem progressionsfreiem Überleben und einer erhöhten Gefahr, zu sterben assoziiert. Eine geringe Anzahl an MDSCs hingegen spricht für längeres Überleben. PatientInnen, deren MDSCs im Krankheitsverlauf niedrig bleiben, haben zudem eine deutlich verbesserte Überlebensdauer als PatientInnen, deren MDSC-Anzahl sich verändert (TOBIN et al., 2019).

Im Plasma von Stage IV-MelanompatientInnen sind die Zytokine IL-6 und IL-8 im Vergleich zu Gesunden deutlich erhöht. IL-6 fördert im Tumormilieu und in der Peripherie die Differenzierung von myeloiden Vorläuferzellen zu MDSCs und verstärkt die suppressiven Eigenschaften von MDSCs. IL-8 ist an der Rekrutierung und Aktivierung von MDSCs und anderen myeloiden Zellen beteiligt. Melanome selbst können diese beiden Zytokine exprimieren. Sie scheinen einen Effekt auf MDSCs zu haben, da ihre Konzentrationen im Plasma mit der Anzahl an zirkulierenden MDSCs korrelieren (TOBIN et al., 2019).

#### **6.3.5.2 Tumorassoziierte Makrophagen (TAMs)**

Zur Infiltration eines Gewebes mit Makrophagen kommt es unter normalen Umständen beispielsweise bei der Wundheilung oder wenn der Organismus mit Pathogenen konfrontiert ist. In diesem Fall werden Monozyten ins Gewebe gelockt und ihre Differenzierung zu Makrophagen stimuliert. Dieser Vorgang wird durch diverse Faktoren vermittelt, zu denen unter anderem Colony-Stimulating Factor 1 (CSF-1; auch macrophage-CSF), GM-CSF, das Makrophagen-stimulierende Protein (MSP), TGF- $\beta$ 1 und gewisse Chemokine (CCL2, CCL7, CCL8, CCL3, CCL4 und Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) gehören. Auch Produkte, die beim Untergang von Gewebe entstehen, sind beteiligt (POLLARD, 2004).

Auch Tumoren sind in der Lage, Makrophagen zu rekrutieren. Diese tumorassoziierten Makrophagen (TAMs) stammen von zirkulierenden Monozyten-Vorläuferzellen ab

(MANTOVANI et al., 2002). Die Rekrutierung der TAMs erfolgt über eine Vielzahl von Chemokinen und Wachstumsfaktoren, die sowohl von Tumorzellen, als auch vom Tumorstroma sezerniert werden. Es konnte gezeigt werden, dass bei Tumoren mit einer großen Anzahl an TAMs auch hohe Konzentrationen von Chemokinen und Makrophagen-Wachstumsfaktoren vorhanden sind (POLLARD, 2004).

Die Konzentration von CCL2 und CSF-1 korreliert bei vielen Neoplasien mit der Anzahl der TAMs (POLLARD, 2004). Bei Melanomen haben besonders CXCL1 und seine zugehörigen Moleküle Bedeutung, da sie das Melanomwachstum stimulieren und Inflammation und Angiogenese fördern. Weitere wichtige Faktoren bei der Rekrutierung von TAMs sind VEGF und M-CSF (MANTOVANI et al., 2002). Die involvierten Chemokine tragen auch insofern zur Tumorprogression bei, als sie die Angiogenese stimulieren und Proliferation, Überleben und Metastasierung von Tumorzellen fördern (MANTOVANI et al., 2002).

Innerhalb von Tumoren sammeln sich TAMs vor allem in sauerstoffarmen Bereichen mit schlechter Durchblutung an. Über die Aktivierung der Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF)-1 und HIF-2 passen sich TAMs an ihre hypoxische Umgebung an. Durch Hypoxie aktiviertes HIF-1 $\alpha$  in TAMs bewirkt in Tumor- und Stromazellen zusätzlich eine erhöhte Expression gewisser Rezeptoren und Liganden, welche die Metastasierung fördern (SICA und BRONTE, 2007). HIF-1 $\alpha$  reguliert außerdem die Transkription von VEGF (YANG und ZHANG, 2017).

Eine Besonderheit von Makrophagen ist, dass sie als Reaktion auf gewisse Signale polarisiert aktiviert werden. Bei der Polarisierung erhalten Makrophagen einen der beiden Phänotypen M1 oder M2 (MANTOVANI und SICA, 2010). Klassischerweise geschieht die Aktivierung durch IFN- $\gamma$ . Dabei entstehen M1-Makrophagen mit Antitumor-Eigenschaften. Alternativ können Makrophagen zum Beispiel durch IL-4 oder IL-13 aktiviert werden. Die auf diese Weise aktivierten M2-Makrophagen sind an der Reparatur und Erneuerung von Geweben beteiligt, modulieren die Immunantwort und fördern die Tumorprogression (MANTOVANI et al., 2002).

Ihre unterschiedliche Wirkung erreichen M1- und M2-Zellen unter anderem durch die von ihnen exprimierten Rezeptoren und die Produktion verschiedener Zytokine und Chemokine. So produzieren M1-Zellen IL-12 und TNF, während M2-Zellen immunsuppressive Moleküle wie IL-10, IL-1-Rezeptorantagonist und den Typ II IL-1 Decoy-Rezeptor produzieren (MANTOVANI et al., 2002).

In den meisten der bisher untersuchten Tumoren gleichen TAMs in ihrem Phänotyp und ihrer Funktion den alternativ aktivierten M2-Makrophagen (MANTOVANI und SICA, 2010). Ihre M2-

Eigenschaften erhalten TAMs einerseits durch Faktoren, die von Tumorzellen, dem Tumormilieu oder von Makrophagen selbst sezerniert werden. Andererseits beeinflusst auch die im Tumor vorherrschende Hypoxie die Entwicklung der M2-Merkmale (YANG und ZHANG, 2017). Wie M2-Makrophagen exprimieren TAMs nur wenig MHCII und IL-12, zeigen geringe Aktivität gegen Mikroorganismen und Tumoren und produzieren große Mengen von Angiogenesemediatoren und anti-inflammatorischem IL-10. Außerdem weisen TAMs hohe Level an M2-spezifischen Genen auf (MANTOVANI und SICA, 2010).

Durch die Sekretion der zahlreichen immunsuppressiven Moleküle greifen TAMs in die Funktion anderer Immunzellen ein. TAMs supprimieren die Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, indem sie mit iNOS und Arginase 1 auf den Metabolismus von L-Arginin einwirken. Mit der Freisetzung von IL-10 bewirken sie die Expression von PD-L1 durch Monozyten, welches die Suppression von zytotoxischen T-Lymphozyten zur Folge hat (YANG und ZHANG, 2017). Außerdem sind TAMs fähig, Tregs zu induzieren. Dies geschieht über die Sekretion von IL-10, Indoleamine 2,3-dioxygenase und PGE2 sowie von CCL17, CCL18 und CCL22 (YANG und ZHANG, 2017).

Bei verschiedenen Tumoren des Menschen spricht eine große Zahl von TAMs für eine schlechtere Prognose (SICA und BRONTE, 2007). TAMs scheinen in beinahe alle Aspekte der Tumorentwicklung involviert zu sein. Mit der Freisetzung von Faktoren wie IL-23, IL-17, IL-6 und Mitogenen sind sie in der Lage, in einer inflammatorischen Umgebung die Entstehung von Neoplasien voranzutreiben oder sie auszulösen (YANG und ZHANG, 2017). TAMs ermöglichen Zellen des Primärtumors, invasiv zu wachsen, in Richtung Gefäße vorzudringen und in diese einzuwandern (CONDEELIS und POLLARD, 2006). Die Interaktion mit TAMs befähigt Tumorzellen, die extrazelluläre Matrix zu durchdringen, da TAMs Proteasen sezernieren, und erleichtert die epithelial-mesenchymale Transition (YANG und ZHANG, 2017).

Eine hohe TAM-Dichte korreliert mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen. TAMs selbst erleichtern das Ansiedeln von Tumorzellen in anderen Organen (CONDEELIS und POLLARD, 2006). Die von ihnen sezernierten Faktoren, z.B. TNF- $\alpha$ , VEGF und TGF- $\beta$ , werden über die Blutbahn transportiert und erreichen vom Primärtumor entfernte Regionen des Körpers. In den Zielorganen stimulieren sie die dortigen Makrophagen, die wiederum Makrophagen und Tumorzellen anlocken. Dieser Vorgang erleichtert die Entstehung von Metastasen (YANG und ZHANG, 2017).

TAMs sind auch an der Angiogenese beteiligt. In Reaktion auf die hypoxischen Umstände im Tumorgewebe produzieren sie proangiogene Faktoren. Zu diesen gehören unter anderem VEGF, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, PDGF und bFGF (YANG und ZHANG, 2017).

Hinter den tumorfördernden Eigenschaften von TAMs stehen verschiedene molekulare Veränderungen und Abweichungen in den Signalwegen. TAMs weisen beispielsweise eine veränderte NF- $\kappa$ B-Aktivität auf, wodurch die Transkription antimikrobieller Peptide, Zytokine, Chemokine, Stress-response-Proteine und anti-apoptotischer Proteine gestört wird. Werden TAMs daher mit Lipopolysacchariden oder proinflammatorischen Signalen konfrontiert, bleibt die Sekretion proinflammatorischer Zytokine aus und sie verharren in einem Zustand der Toleranz (SACCANI et al., 2006).

Wie in anderen tumorinfiltrierenden Immunzellen ist auch in TAMs STAT3 konstitutiv aktiviert. Diese konstitutive Aktivierung von STAT3 verhindert die Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine (KORTYLEWSKI et al., 2005). Auch STAT6 scheint die Ausprägung der Antitumoreigenschaften zu beeinflussen (SINHA et al., 2005).

Bei malignen Melanomen des Menschen sind bereits in frühen Stadien mehr M2-TAMs als M1-TAMs vorhanden. Mit Fortschreiten des Melanoms steigt die Zahl der M2-TAMs stark an und bleibt in allen Tumorstadien deutlich höher als die der M1-Makrophagen. Schon in einer frühen Phase erfolgt außerdem ein Wechsel vom M1- zum M2-Phänotyp. Dieser Wechsel könnte auf die hohen intratumoralen Konzentrationen von iNOS zurückzuführen sein (FALLENI et al., 2017).

Die Zahl der TAMs korreliert positiv mit dem Clark-Level und der Aggressivität des Melanoms. Höher ist sie auch bei Läsionen großer Dicke und bei metastatischen Melanomen (VARNEY et al., 2005).

### **6.3.5.3 Dendritische Zellen**

Dendritische Zellen (DCs) sind wichtige Regulatoren der Immunantwort und gehören zu den Antigenpräsentierenden Zellen (GABRILOVICH, 2004). Indem DCs Antigene präsentieren, lösen sie eine antigenspezifische T-Zell-Antwort aus. Unreife DCs nehmen Antigene, wie z.B. Tumorantigene auf, reifen anschließend und wandern zum Lymphknoten. Dort präsentieren sie die Antigene unreifen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Auf diese Weise leiten sie die Zerstörung von Erregern oder neoplastischen Zellen in die Wege (CASTILLO-MONTIEL et al., 2015).

Dendritische Zellen können auch Makrophagen, NK-Zellen und andere Leukozyten aktivieren, indem sie IL-12 und Interferone sezernieren (MIGNOGNA et al., 2017).

Dendritische Zellen entstehen im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen. Der Großteil von ihnen, die klassischen Dendritischen Zellen ("conventional dendritic cells", cDCs), entwickelt sich aus gemeinsamen myeloiden Vorläuferzellen ("common myeloid progenitors", CMPs) und unreifen myeloiden Zellen (immature myeloid cells, iMCs). Ein kleiner Teil entwickelt sich entlang der lymphoiden Reihe aus gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzellen (common lymphoid progenitors, CLPs). Die meisten der DCs mit lymphoidem Ursprung gehören zur Gruppe der plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDCs) (GABRILOVICH, 2004; LANDE und GILLIET, 2010). Auf diese Weise entsteht eine gewisse Heterogenität innerhalb der Population der Dendritischen Zellen.

Bei Patienten mit Tumorerkrankungen konnte festgestellt werden, dass sie weniger reife DCs im peripheren Blut als gesunde Spender aufweisen, wobei diese Reduktion nur die myeloiden DCs betrifft (GABRILOVICH, 2004). Die vorhandenen DCs sind unfähig, eine ausreichende Immunreaktion hervorzurufen. Diese tumorassoziierten Veränderungen der DC-Aktivität sind nicht nur auf das Tumorgewebe beschränkt. Sie werden vermutlich durch Fehler in der Differenzierung der myeloiden Zellen, sowie durch Unregelmäßigkeiten bei Rekrutierung, Reifung und Überleben der DCs verursacht (GABRILOVICH, 2004; FRICKE und GABRILOVICH, 2006).

Die veränderte Differenzierung führt unter anderem dazu, dass eine verminderte Anzahl reifer, funktioneller DCs entsteht und es zur Ansammlung von unreifen DCs und unreifen myeloiden Zellen kommt (GABRILOVICH, 2004). Die Ansammlung unreifer DCs wird durch die in der Tumorumgebung anwesenden Zytokine begünstigt. Tumorzellen sezernieren große Mengen IL-10, IL-6, M-CSF, GM-CSF, VEGF und Gangliosiden. Die Konzentrationen von IL-12 und IFN- $\gamma$  hingegen sind gering (FRICKE und GABRILOVICH, 2006; KERKAR und RESTIFO, 2012).

Die akkumulierenden unreifen DCs sind nur minimal aktiviert, zeigen eine verminderte allostimulatorische Aktivität und weniger Antigenpräsentation. Zudem haben sie die Fähigkeit, T-Zell-Toleranz hervorzurufen (GABRILOVICH, 2004).

Bei Melanomen kommt wie bei verschiedenen anderen Tumoren vor allem den pDCs besondere Bedeutung zu (JENSEN et al., 2012). Plasmazytoide DCs sind eine kleine Gruppe von DCs mit plasmazellähnlicher Morphologie. Sie stammen zum größten Teil von lymphoiden

Vorläuferzellen ab, können jedoch auch aus myeloiden Zellen hervorgehen. Von klassischen DCs unterscheiden sie sich in Oberflächencharakteristika, Gewebelokalisation, Zytokinproduktion und Antigenpräsentation. Für pDCs wurden bereits mehrere Marker identifiziert. Humane pDCs exprimieren unter anderem CD4 und CD123, nicht aber CD11, welches ein Marker für cDCs ist (LANDE und GILLIET, 2010).

pDCs können als potenteste aller Typ I-Interferon produzierenden Zellen angesehen werden (SAADEH et al., 2016). Als Reaktion auf Viren produzieren humane pDCs große Mengen IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\lambda$ , IFN- $\omega$  und IFN- $\tau$ , womit sie einerseits die Ausbreitung der Viren einschränken und andererseits cDCs zur Zytokinproduktion anregen. Durch die Produktion von Typ I-Interferonen und proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und TNF- $\alpha$  regulieren sie die Funktion anderer Immunzellen (LANDE und GILLIET, 2010; SAADEH et al., 2016). Sie beeinflussen die Differenzierung von Monozyten zu cDCs und fördern die Entstehung einer durch Th1-Zellen vermittelten Immunantwort. Typ I-Interferone fördern auch die Antigenpräsentation durch myeloide DCs, das Überleben und die klonale Expansion von CD8+ T-Zellen, die Differenzierung von CD4+ Zellen zu Th1-Zellen, die Aktivierung von NK-Zellen und die Differenzierung von B-Zellen (LANDE und GILLIET, 2010). Die Fähigkeit von pDCs, Antigene zu präsentieren, ist jedoch geringer als die von myeloiden DCs (GABRILOVICH, 2004). Unter physiologischen Umständen sind in normaler Haut keine pDCs vorhanden. Zu ihrer Rekrutierung kommt es erst, wenn Zustände wie Wundheilung, Infektionen, Entzündungen oder Tumoren eintreten (SAADEH et al., 2016)

Während pDCs zwar einen wichtigen Beitrag zur Funktion des Immunsystems leisten, sind sie dennoch bei Melanomen mit Immunsuppression und einer schlechteren Prognose assoziiert. Bei Menschen mit einer großen Anzahl an CD123+ DCs im Primärtumor kommt es eher zum Auftreten von Rezidiven und einer kürzeren Überlebenszeit (Jensen et al., 2012). Im Microenvironment von Tumoren kommen pDCs nicht in aktivierter, sondern hauptsächlich in inaktiver Form vor. Diese inaktiven Zellen haben vor allem immunsuppressive Eigenschaften. Sie aktivieren Tregs und sind unfähig, eine T-Lymphozyten-Reaktion auszulösen. Außerdem ist beschrieben, dass sie in tumordrainierenden LymphknotenIDO sezernieren können und so ein antiinflammatorisches Milieu schaffen. Als Ursache für die fehlende Aktivierung von pDCs wird einerseits der Mangel an stimulatorischen Signalen verantwortlich gemacht, andererseits sezernieren Tumorzellen selbst inhibitorische Moleküle wie TGF- $\beta$ , VEGF- $\beta$  und IL-10 (LANDE und GILLIET, 2010).

Im Gegensatz zu den pDCs scheinen cDCs eine protektive Funktion zu haben. Bei humanen Melanompatienten ist eine höhere Dichte von cDCs im Primärtumor mit tumorfreien Wächterlymphknoten assoziiert, während eine niedrigere Dichte häufig für Metastasen im Lymphknoten spricht (MA et al., 2012).

### 6.3.6 Sinusmakrophagen

Pathogene wie fragmentierte tote Tumorzellen, die über die Lymphe in den Lymphknotensinus gelangen, treffen auf die dort ansässigen Sinusmakrophagen. In den verschiedenen Zonen des Lymphknotens sind Makrophagen mit unterschiedlichen Eigenschaften anwesend. Gewisse in den medullären und subkapsulären Sinus vorhandene Sinusmakrophagen exprimieren das Oberflächenantigen CD169, auch Sialoadhesin oder "sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin" (siglec)-1 genannt. CD169+ Makrophagen sind hauptsächlich in Lymphknoten und Milz lokalisiert, in kleiner Anzahl auch in Knochenmark, Leber und dem Verdauungstrakt. Außer dem Oberflächenantigen CD169 exprimieren diese Sinusmakrophagen auch PD-L1, CD163 und CD204 (KOMOHARA et al., 2017).

Die Lymphknotensinusmakrophagen phagozytieren, prozessieren und präsentieren Antigene (ASANO et al., 2011; SAITO et al., 2015). Sie aktivieren eine tumorantigenspezifische Immunreaktion von Lymphozyten. Durch die Bindung, Aufnahme und Präsentation von Immunkomplexen, bestimmten partikulären Antigenen oder tumorstämmigen extrazellulären Vesikeln (tEVs) können subkapsuläre Sinusmakrophagen zur Aktivierung von B-Zellen beitragen (MARTINEZ-POMARES und GORDON, 2012; PUCCI et al., 2016) und invariante NKT-Zellen aktivieren (BARRAL et al., 2010). Zudem sind Sinusmakrophagen fähig, eine CD8+ T-Zell-Reaktion hervorzurufen. Diese Aktivierung erfolgt vermutlich entweder, indem die Sinusmakrophagen den T-Zellen die Antigene direkt präsentieren oder über eine Vermittlung durch Dendritische Zellen (MARTINEZ-POMARES und GORDON, 2012). Diese Funktionen und die frühzeitige Sekretion proinflammatorischer Zytokine machen die Sinusmakrophagen zu einer wichtigen Barriere bei der Ausbreitung von Pathogenen (VENINGA et al., 2015).

Bei Menschen mit malignem Melanom spricht eine hohe Dichte von CD169+ Sinusmakrophagen im regionalen Lymphknoten für eine bessere Prognose (OHNISHI et al., 2013; SAITO et al., 2015). Beim malignen Melanom konnte zudem eine Korrelation zwischen einer niedrigen Zahl CD169+ Makrophagen und dem Auftreten von Rezidiven festgestellt werden, aber kein Zusammenhang mit dem Tumor-Stadium. Ein hohes Verhältnis von

CD169+ Sinusmakrophagen zu CD68+ Sinusmakrophagen hingegen korreliert mit der Dichte der CD8+ T-Lymphozyten im Melanomgewebe. CD68 gilt als Pan-Makrophagen-Marker (SAITO et al., 2015).

Bei malignen Melanomen konnte festgestellt werden, dass CD169+ Sinusmakrophagen im Sinus des regionalen Lymphknotens mit CD43+CD8+ T-Lymphozyten reagieren. Die Interaktion der Sinusmakrophagen mit den CD8+ T-Lymphozyten wird vermutlich über die Bindung von CD43 an CD169 vermittelt (OHNISHI et al., 2013; SAITO et al., 2015).

Die Expression von CD169 durch Makrophagen kann mit Typ 1 Interferonen stimuliert werden. Beim malignen Melanom konnten in der Umgebung der CD169 exprimierenden Sinusmakrophagen zwei Arten IFN $\alpha$  exprimierender Zellen gefunden werden. Der Großteil der IFN $\alpha$  sezernierenden Zellen war positiv für CD68 und zeigte eine histiozytenähnliche Morphologie, während ein kleinerer Teil die Charakteristika von pDCs aufwies (SAITO et al., 2015).

Zu einer gegenteiligen Einschätzung der Bedeutung von CD169+ Sinusmakrophagen bei Melanomen kam eine Studie an Mäusen mit B16 Melanom, bei der wild-type und CD169-/- Mäuse untersucht wurden. Nach Inokulation mit B16 Melanomzellen konnte zwischen diesen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied im Wachstum des Primärtumors festgestellt werden. Eine zusätzliche Immunisierung mit vom Melanom stammenden apoptotischen Vesikeln stellte bei beiden Gruppen einen Schutz gegen das Tumorwachstum dar, wobei ebenfalls kein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Mausgruppen erkennbar war. Der Grad der Infiltration des regionalen Lymphknotens mit Melanomzellen war bei CD169-/- Mäusen zwar etwas geringer, die Differenz zur anderen Mausgruppe war aber wiederum nicht signifikant (MUHSIN-SHARAFALDINE et al., 2017).

### **6.3.7 Natürliche Killerzellen**

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind wichtige Zellen bei der angeborenen Abwehr gegen Viren und Tumorzellen. Die Aktivität von NK-Zellen wird durch verschiedene inhibierende und aktivierende Rezeptoren reguliert (VACCA et al., 2020). Sie erkennen Liganden an Tumor- oder virusinfizierten Zellen und reagieren mit den MHC-I-Molekülen von Zielzellen (VITALE et al., 2019). Im Gegensatz zu T-Zellen sind NK-Zellen jedoch auch in der Lage, Tumorzellen zu erkennen und zu zerstören, die keine MHC-I-Moleküle mehr exprimieren (CRISTIANI et al., 2019). Außer der Zerstörung veränderter Zellen interagieren NK-Zellen auch mit anderen

Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems, ebenso wie mit Tumorzellen und Stromazellen (VITALE et al., 2019).

Für die Antitumorimmunität sind in erster Linie die „natural cytotoxicity receptors“ (NCRs) bedeutend, darunter vor allem die Rezeptoren NKp46, NKp44 und NKp30. Sie sind an der Detektion und der Zerstörung maligner Zellen beteiligt. Trotz der starken Aktivität gegen Tumorzellen und Metastasierung scheint das Tumormilieu die Funktion von NK-Zellen zu hemmen (VACCA et al., 2020).

Sowohl die Tumorzellen selbst als auch andere Zellen des Tumormilieus beeinflussen die Aktivität der NK-Zellen. Eine verminderte Funktion der NK-Zellen erreichen sie beispielsweise durch die Expression inhibitorischer Moleküle oder indem sie die Expression von aktivierenden Oberflächenrezeptoren herabregulieren (VACCA et al., 2020). Die Anzahl der exprimierten NCRs ist bei Tumorerkrankungen ebenfalls geringer als unter physiologischen Umständen (VITALE et al., 2019).

Zusätzlich zur Reduktion der Anzahl an NCRs sind Tumorzellen in der Lage, die Expression der NCR-Liganden herab zu regulieren oder die Liganden in löslicher Form freizusetzen. Dies macht sie weniger empfänglich für die NK-Zell-vermittelte Abwehr (VITALE et al., 2019).

NK-Zellen exprimieren wie einige andere Immunzellen den Rezeptor PD-1. PD-1 ist ein inhibitorischer Oberflächenrezeptor und wichtiger Checkpoint bei der T-Zell-Aktivierung. PD-1 bindet die Liganden PD-L1 und PD-L2, die an Tumorzellen, infizierten Zellen, antigenpräsentierenden Zellen und sekundären lymphoiden Organen lokalisiert sind. NK-Zellen von Menschen mit primären und metastatischen Tumoren exprimieren PD-1. Außerdem ist bekannt, dass sich bei Krebspatienten die Expression von PD-1 negativ auf die Aktivität von NK-Zellen auswirken kann (MARIOTTI et al., 2019).

In der Haut sind NK-Zellen zahlreich vorhanden. Da sie keine vorherige Sensitivierung auf ein Antigen benötigen, können sie prä-maligne Melanozyten frühzeitig erkennen und eliminieren, bevor es zur Entstehung eines Melanoms kommt. Häufig kommt bei Melanomzellen zu einer Unterdrückung der MHC-I-Expression, welche die Zellen empfänglicher für die Zerstörung durch NK-Zellen macht (CRISTIANI et al., 2019).

Die Anzahl an NK-Zellen bei humanen Melanomen korreliert positiv mit dem Überleben der Patienten (BARRY et al., 2018). Die NK-Zell-vermittelte Antitumorimmunität ist bei soliden Tumoren jedoch meist nicht effektiv. Dies ist vor allem auf die Einflüsse des Tumormilieus

zurückzuführen. Beispielsweise supprimieren Fibroblasten im Tumorstroma humaner Melanome die zytolytische Aktivität von NK-Zellen (CRISTIANI et al., 2019).

Die NK-Zellen von Patienten mit kutanen Melanomen weisen bei höherem Tumorstage eine geringere Aktivität als bei niedrigerem Tumorstage. Auch die Anzahl von aktivierenden Rezeptoren ist geringer. Diese Veränderungen könnten darauf zurückzuführen sein, dass bei jenen Patienten die Konzentration von TGF- $\beta$ 1, welches immunsuppressiv wirkt, im Serum erhöht ist (MARTINOVIĆ et al., 2019). TGF- $\beta$  beeinflusst die Funktion von NK-Zellen unter anderem indirekt, indem es die DC-Aktivität verändert und Tregs stimuliert (CRISTIANI et al., 2019).

Humane Melanomzellen beeinflussen jedoch auch selbst die Ausprägung aktivierender Rezeptoren. Indem sie im Überfluss aktivierende Liganden exprimieren, erreichen sie eine Hyperaktivierung des Rezeptors. Diese wiederum führt zu Desensibilisierung und Internalisierung der Rezeptoren, wodurch das zytotoxische Potential der NK-Zellen stark eingeschränkt wird. Tatsächlich korrelieren erhöhte Konzentrationen aktivierender Liganden im Serum von Melanompatienten mit der Tumorgroße, Tumorprogression und schlechterer Prognose. Auch eine geringe Anzahl aktivierender Rezeptoren korreliert mit kürzerem Überleben (CRISTIANI et al., 2019).

Humane Melanomzellen können auch MHC-I-Moleküle re-exprimieren. Dies trifft vor allem auf Melanomzellen mit Nähe zu NK-Zellen zu und hängt vermutlich damit zusammen, dass tumorinfiltrierende NK-Zellen IFN- $\gamma$  sezernieren (CRISTIANI et al., 2019).

## 7 Kanines Melanom

### 7.1 Tumorassoziierte Antigene beim kaninen Melanom

Wie humane Melanome exprimieren auch kanine Melanome Melanom-assoziierte Antigene. Vor allem Melan-A, Tyrosinase und das Produkt des SILV-Gens wurden bereits ausführlich untersucht (STELL et al., 2009). Die Tyrosinase-Expression ist beispielsweise bei melanozytären Tumoren deutlich höher als in normalem Gewebe. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede der Expression zwischen malignen und benignen, sowie zwischen oralen und nicht oralen Tumoren. Auch korreliert die Tyrosinase-Expression nicht mit dem Grad der Pigmentierung (PHILLIPS et al., 2012a).

Auch Splice-Varianten und andere Mutationen dieser MAAs konnten bei Melanomen von Hunden gefunden werden, wobei diese nicht nur bei malignen Melanozyten, sondern auch bei gesunden Zellen vorkommen können. Normale Melanozyten nutzen beispielsweise alternatives Splicing zur Regulation der Melaninsynthese. Weder bei gesunden Melanozyten noch bei Melanomen scheinen Mutationen oder alternatives Splicing mit veränderter Pigmentierung assoziiert zu sein (STELL et al., 2009).

Ein weiteres MAA ist das Transmembranprotein CSPG4. Es wird nicht nur von humanen, sondern auch von kaninen Melanomzellen exprimiert. CSPG4 ist ein wichtiges Element der Kommunikation zwischen extrazellulärem und intrazellulärem Kompartiment und ist an Zellproliferation, -adhäsion, -migration und dem Überleben der Zellen beteiligt. Bei Melanomen des Menschen und des Hundes, sowie bei verschiedenen anderen Neoplasien wird CSPG4 von Tumorzellen, Tumor Microenvironment und tumorinitiierenden Zellen exprimiert (ROLIH et al., 2017). Etwa 60% der kaninen Melanome exprimieren CSPG4, an gesunden adulten Zellen kommt es hingegen kaum vor (LORDA et al., 2011).

In der Veterinärmedizin spielen TAAs eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung und Anwendung von Immuntherapien gegen Tumoren. Da der Hund ein gut geeignetes präklinisches Modell für das humane Melanom ist, dienen Fortschritte und neue Erkenntnisse nicht nur der Therapie des kaninen Melanoms (ROLIH et al., 2017).

Gewisse MAAs werden bereits zur Immuntherapie des Kaninen Melanoms genutzt. Ein wichtiger Schritt bei der Entwicklung solcher Therapien war die Erkenntnis, dass Hunde, die mit xenogener, für Antigene codierender DNA vakziniert werden, Antikörper gegen diese Antigene ausbilden. Versuche an Hunden mit Stage II-IV Melanomen, denen unterschiedliche

Konzentrationen von humaner Tyrosinase, murinem GP75, muriner Tyrosinase und muriner Tyrosinase +/- humanem GM-CSF injiziert wurden, zeigten einen Antikörperanstieg und teils gute therapeutische Ergebnisse (BERGMAN et al., 2003; BERGMAN et al., 2006). Im Vergleich zur Kaplan-Meier medianen Überlebenszeit von chirurgisch behandelten Kaninen Melanomen, die bei Stage II mit  $\geq 5$  Monaten und bei Stage III und IV mit  $\geq 2-3$  Monaten angegeben wird, konnte die Therapie mit xenogener humaner Tyrosinase-DNA die mediane Überlebenszeit auf 389 Tage verlängern (BERGMAN et al., 2003).

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde die Vakzine Oncept® (Merial, Duluth, GA, USA) entwickelt. Oncept® wird zur Therapie von Stadium II und III oralen malignen Melanomen des Hundes mit vorhergegangener lokaler Tumorthherapie (Resektion und/oder Bestrahlung) eingesetzt. Sie enthält die Plasmid-DNA für Tyrosinase (VERGANTI et al., 2017). Mehrere Studien haben sich bisher mit dem Effekt dieses Therapieansatzes gegenüber nicht vakzinieren Hunden beschäftigt. Eine prospektive Studie kam dabei zu dem Ergebnis, dass die Vakzinierung mit humaner Tyrosinase die Überlebenszeit der Hunde im Vergleich zu historischen Fällen deutlich verlängert (GROSENBAUGH et al., 2011). Eine retrospektive Studie hingegen konnte keine Verlängerung von progressionsfreiem Zeitraum, krankheitsfreiem Intervall oder medianer Überlebenszeit feststellen (OTTNOD et al., 2013).

Auch das MAA CSPG4 kann immuntherapeutisch genutzt werden (PIRAS et al., 2016). Da es vorwiegend von Tumorzellen exprimiert wird und an gesunden adulten Zellen kaum vorkommt, ist es ein vielversprechendes Molekül für die Vakzinierung (LORDA et al., 2011). Hunde werden dazu mit xenogener CSPG4-DNA vakzinieren. Hunde mit resezierten Stadium II/III-Melanomen, die mit humaner für CSPG4 codierender Plasmid-DNA vakzinieren wurden, zeigten dabei teilweise eine Verlängerung von medianer Überlebenszeit und krankheitsfreiem Überleben im Vergleich zu Hunden ohne Vakzinierung. Diese Auswirkung konnte bei den vakzinieren Hunden  $< 20$ kg festgestellt werden, die deutlich länger überlebten als vakzinieren Hunde  $> 20$ kg, nicht vakzinieren Hunde  $< 20$ kg und die gesamte Gruppe der nicht vakzinieren Hunde. Vakzinieren Hunde  $> 20$ kg zeigten keine deutlichen Unterschiede in der Dauer des Überlebens verglichen mit nicht vakzinieren Hunden. Vakzinieren Hunde, deren Melanome eine stärkere CSPG4-Positivität aufwiesen, überlebten zudem länger als vakzinieren Hunde mit geringerer CSPG4-Positivität (PIRAS et al., 2016).

## 7.2 Die Expression von MHC-Molekülen

Wie bei Tumoren des Menschen kommt es auch bei kaninen Tumoren aufgrund veränderter MHC-Expression zu einer gestörten Antigenpräsentation (PHILLIPS et al., 2012a). Auch bei Hunden besteht ein Zusammenhang zwischen MHC-Expression und Prognose. Bei kaninen B-Zell-Lymphomen beispielsweise ist eine niedrige MHC-II-Expression mit einer schlechteren Prognose assoziiert (RAO et al., 2011).

Eine Gruppe untersuchte die Expression von MHC-I bei kaninen melanozytären Tumoren, dazu wurde aber nur eine geringe Anzahl von Proben herangezogen. Dabei konnte kein signifikanter Zusammenhang der MHC-I-Expression mit der Malignität oder der Lokalisation des Tumors feststellen, sowie keine deutlichen Unterschiede zwischen Tumorgewebe und gesundem Kontrollgewebe (PHILLIPS et al., 2012a).

Kanine Melanomzellen haben die Fähigkeit, die MHC-II-Expression von kaninen myeloiden Zellen zu supprimieren. Myeloide Zellen, die mit konditioniertem Medium von kaninen Melanomzelllinien kultiviert wurden, zeigten nicht nur eine reduzierte Phagozytoseaktivität und die Fähigkeit zur Suppression von Responder-Immunzellen, sondern auch eine verminderte Expression von MHC-II-Molekülen (WASSERMAN et al., 2012).

Kanines IFN- $\gamma$  kann die Expression von MHC-I und MHC-II auch bei kaninen Melanomzelllinien stimulieren (WHITLEY et al., 1995).

## 7.3 Programmed death-1

Vergleichbar mit dem Menschen bindet auch beim Hund PD-L1 an PD-1. Ein Großteil der kaninen Melanome (69,2 %) exprimiert PD-L1 (MAEKAWA et al., 2014). Noch höher ist der Anteil bei den kaninen oralen Melanomen, bei denen 90-100 % der Tumoren PD-L1 exprimieren (MAEKAWA et al., 2014; MAEKAWA et al., 2016). Angesichts der hohen PD-L1-Expression bei kaninen Melanomen kann angenommen werden, dass die PD-1/PD-L1-Interaktion auch beim Hund zur Suppression der T-Zell-Antwort beiträgt (MAEKAWA et al., 2014).

Die PD-L1-Expression ist unter anderem vom Zytokinmilieu im Tumormilieu abhängig. Vor allem IFN- $\gamma$ , welches von aktivierten kaninen T-Zellen sezerniert wird, wirkt stimulierend auf die PD-L1-Expression (HARTLEY et al., 2016). Bei kaninen Melanomzellen erhöht die Behandlung mit IFN- $\gamma$  die Expression von PD-L1 (MAEKAWA et al., 2014). Eine ähnliche

Wirkung hat IFN- $\gamma$  auch bei kaninen Monozyten und Makrophagen. Bei kaninen Monozyten und Makrophagen, die konstitutiv kein PD-L1 exprimieren, kann die Stimulation mit IFN- $\gamma$  eine Expression erreichen (HARTLEY et al., 2016).

Bei kaninen oralen Melanomen wird auch der zugehörige Rezeptor PD-1 exprimiert. Tumorinfiltrierende CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten aus dem Gewebe kaniner oraler Melanome exprimieren PD-1 in hoher Konzentration. Die PD-1-Expression ist bei tumorinfiltrierenden Lymphozyten auch deutlich höher als bei Lymphozyten aus dem peripheren Blut gesunder Hunde (MAEKAWA et al., 2016).

Die Blockade der PD-1/PD-L1-Interaktion ist auch beim kaninen Melanom ein Ansatz für die Entwicklung einer Therapie. Antikörper gegen PD-L1 konnten die Zytokinproduktion von PBMCs und die Lymphozytenproliferation erhöhen. Die Blockade des PD-1/PD-L1-Weges wurde an sieben Hunden mit oralem malignem Melanom (Stadium II-IV) getestet, konnte aber nur bei einem der Hunde (Stadium II) eine partielle Tumorregression bewirken (MAEKAWA et al., 2017).

## **7.4 Immunzellen**

### **7.4.1 T-Zellen**

T-Lymphozyten repräsentieren den größten Anteil der Tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs). TILs sind definiert als Lymphozyten, die das Tumorgewebe und Tumornester infiltrieren oder die in direktem Kontakt mit neoplastischen Zellen stehen. TILs sind eine heterogene Gruppe von Zellen, zu denen unter anderem CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, Tregs,  $\gamma/\delta$ -T-Zellen, B- und NK-Zellen gehören (PORCELLATO et al., 2020).

Bei kaninen melanozytären Tumoren konnte kein Zusammenhang zwischen dem Grad der TIL-Infiltration und klinischen Resultaten, Metastasierung, dem Auftreten von Rezidiven und dem Überleben festgestellt werden. Dieses Ergebnis könnte aber darauf zurückzuführen sein, dass die Gruppe der TILs sowohl aus Zellen mit protektiven Eigenschaften als auch aus immunsuppressive Zellen besteht (PORCELLATO et al., 2020).

Die Anwesenheit von CD20<sup>+</sup> TILs in kaninen melanozytären Tumoren war allerdings mit prognostisch negativen histologischen Faktoren assoziiert. Hunde mit einer großen Anzahl von CD20<sup>+</sup> TILs hatten schlechtere klinische Ergebnisse mit dem Auftreten von Metastasen

oder Rezidiven und ein kürzeres Gesamt- bzw. krankheitsfreies Überleben. CD20+ TILs stellen daher einen potentiellen neuen negativen Marker für kanine melanozytäre Tumoren dar (PORCELLATO et al., 2020).

Bei Hunden, die an malignen Tumoren leiden, entsteht ein Ungleichgewicht zwischen der Th1- und der Th2-Population. Es kommt dabei zu einer vermehrten Th2-Polarisierung. Hunde mit malignen Tumoren weisen weniger Th1-Zellen aber mehr Th-2-Zellen als gesunde Hunde im peripheren Blut auf (HORIUCHI et al., 2007).

Bei Hunden mit oralem malignem Melanom scheint die Typ 1-Immunität supprimiert zu sein, da die Anzahl der IFN- $\gamma$  produzierenden Lymphozyten vermindert ist. Im peripheren Blut erkrankter Hunde ist die Zahl der Th1 und der Typ 1 zytotoxischen T-Zellen (Tc1) deutlich geringer als bei gesunden Hunden (HORIUCHI et al., 2010).

Die Anzahl der zytotoxischen T-Zellen korreliert außerdem negativ mit dem klinischen Tumorstage (HORIUCHI et al., 2010). So befinden sich auch im Blut von Hunden mit Melanomen, die bereits metastasiert haben, weniger Th1- und Tc1-Zellen als im Blut von Hunden mit Melanomen ohne Metastasen (HORIUCHI et al., 2009).

Im Gegensatz zu den Th1 und Tc1-Zellen ist die Zahl der regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut von Hunden mit malignem Melanom deutlich höher als bei gesunden Hunden und korreliert signifikant mit dem Tumorstage (HORIUCHI et al., 2010). Im Blut von Hunden mit Metastasen sind mehr Tregs vorhanden als im Blut von Hunden, deren Melanome noch nicht metastasiert haben (HORIUCHI et al., 2009). Bei den erkrankten Hunden besteht außerdem eine inverse Korrelation zwischen der Größe der Treg-Population und der Anzahl der Th1- und Tc1-Lymphozyten, welche bei gesunden Hunden nicht vorkommt (HORIUCHI et al., 2010).

Aus der Humanmedizin ist bekannt, dass Tregs die Proliferation und IFN- $\gamma$ -Sekretion von aktivierten CD8+ T-Zellen und CD4+CD25- T-Helferzellen supprimieren können (LIYANAGE et al., 2002). Das bei kaninen Melanomen herrschende Verhältnis zwischen Tregs und Typ 1-Immunkzellen, sowie die beschriebene Korrelation mit dem Tumorstage lassen vermuten, dass Tregs auch bei Hunden die Typ 1-Immunität supprimieren und damit einen Beitrag zur Tumorprogression leisten (HORIUCHI et al., 2010).

Die Treg-Population ist bei Hunden mit malignem Melanom im Tumorgewebe noch größer als in der Peripherie. Die große Anzahl tumorinfiltrierender Tregs könnte darauf zurückzuführen

sein, dass kanine Melanomzellen TGF- $\beta$  und Cyclooxygenase-2-PGE2 sezernieren. Diese Faktoren wirken stimulierend auf die Rekrutierung von Tregs (TOMINAGA et al., 2010). Große Treg-Populationen im Melanomgewebe sind auch mit einer kürzeren Überlebensdauer der betroffenen Hunde assoziiert und sind daher als prognostisch schlecht zu bewerten (SAKAI et al., 2018).

Ein bei der Entwicklung von Tregs wichtiger Transkriptionsfaktor ist das intrazelluläre Molekül FoxP3. Bei oralen und kutanen kaninen Melanomen wird FoxP3 auch von neoplastischen Zellen exprimiert. Hohe Konzentrationen von FoxP3 sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Tumorzellen in der Lage sind, eine Treg-ähnliche suppressive Wirkung auf T-Zellen zu haben (PORCELLATO et al., 2019).

#### **7.4.2 Tumorassoziierte Neutrophile Granulozyten**

Informationen zu Tumorassoziierten Neutrophilen Granulozyten (TAN) bei Tumoren des Hundes sind in der Literatur kaum vorhanden. Diverse Publikationen beschäftigen sich zwar mit Neutrophilen Granulozyten bei unterschiedlichen kaninen Tumoren (VANHERBERGHEN et al., 2009; PERRY et al., 2010; MACFARLANE et al., 2016), ein Pendant zu den vom humanen Melanom bekannten tumorassoziierten neutrophilen Granulozyten ist jedoch nicht beschrieben.

#### **7.4.3 Myeloid-derived suppressor cells**

MDSCs spielen auch bei kaninen Tumoren eine wichtige Rolle. Wie beim Menschen kommen sowohl monozytäre als auch granulozytäre MDSCs vor, wobei Granulozytäre MDSCs die dominierende Population darstellen (GOULART et al., 2012). Eine Analyse der Genexpressionsmuster von humanen und kaninen MDSCs ließ große Ähnlichkeiten erkennen (GOULART et al., 2019).

Wie beim Menschen weisen auch Hunde mit Tumoren eine größere Zahl an MDSCs im Blut als gesunde Hunde auf. Die Anzahl der MDSCs korreliert dabei mit dem Tumorstage. Im Blut von Hunden mit Tumoren in fortgeschrittenen Stadien oder bei bereits vorhandenen Metastasen konnte eine signifikant höhere Zahl an MDSCs als bei Hunden in frühen Tumorstadien oder bei gesunden Hunden gefunden werden (GOULART et al., 2012; MUCHA et al., 2014). Dies betrifft sowohl polymorphnukleäre MDSCs als auch monozytäre MDSCs

(HUTCHISON et al., 2019). Auch bei Hunden mit oralem Melanom sind im Blut deutlich mehr MDSCs vorhanden als bei gesunden Hunden (SHERGER et al., 2012).

Wie MDSCs des Menschen exprimieren auch kanine MDSCs immunsuppressive Faktoren. Durch die Expression von Arginase, iNOS2, TGF- $\beta$  und IL-10 wirken sie als aktive Suppressoren der Immunantwort (GOULART et al., 2012). Indem sie die molekularen Signalwege von Tumorzellen beeinflussen, erreichen MDSCs außerdem eine erhöhte Expression von angiogenen Proteinen wie VEGF-C. Dieser Mechanismus ist bei malignen, bereits metastasierenden Tumoren stärker ausgeprägt als bei benignen Tumoren oder malignen Tumoren in früheren Tumorstadien. Er ermöglicht es kaninen MDSCs, die Angiogenese zu induzieren (MUCHA et al., 2014; MUCHA et al., 2016).

#### **7.4.4 Tumorassoziierte Makrophagen**

Bei kaninen Tumoren sind höhere TAM-Zahlen mit größerer Malignität, invasivem Wachstum, Aggressivität, einer hohen Dichte an Mikrogefäßen und stärkerer Tumorphilierung assoziiert (MONTEIRO et al., 2018). In Tumoren mit großer TAM-Population ist auch die Expression von VEGF höher (RAPOSO et al., 2013).

Auch Untersuchungen an kaninen melanozytären Tumoren zeigten, dass sowohl benigne als auch maligne Tumoren TAMs beherbergen. In Melanozytomen ist die TAM-Dichte nur gering, während sie bei Melanomen mäßig bis hoch ist. Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer hohen Anzahl an tumorassoziierten Makrophagen und der Ausprägung von Eigenschaften, die für Malignität sprechen. So treten bei hoher TAM-Dichte eher Ulzera und Nekrosen, ein hoher nukleärer Grad und eine geringere Pigmentierung auf. Es sind mehr tumorös veränderte Zellen vorhanden, nur wenig bis mäßig Stroma und es kommt eher zur Gefäßinvasion (PIRES und PRADA, 2011).

Innerhalb der TAM-Population kann auch bei Tumoren des Hundes eine vermehrte Polarisation in Richtung des M2-Phänotyps entstehen. Bei malignen kaninen Mammatumoren beispielsweise kommt es zu einer Akkumulation von M2-Makrophagen im Tumorgewebe. Im Gegensatz dazu dominieren im Gewebe benigner Mammatumoren TAMs vom M1-Phänotyp (MONTEIRO et al., 2018).

Eine hohe Dichte von TAMs bei Tumoren des Hundes für eine schlechtere Prognose (SICA und BRONTE, 2007; RAPOSO et al., 2012). Da die TAM-Dichte außerdem mit dem Auftreten

von Lymphknotenmetastasen korreliert, scheinen TAMs ähnlich wie beim Menschen die Metastasierung zu fördern (MONTEIRO et al., 2018).

Eine große Anzahl von TAMs mit einer höheren COX-2-Expression assoziiert. Signifikant ist die Korrelation zwischen den beiden Parametern jedoch nur bei benignen Läsionen, obwohl auch bei malignen Melanomen in COX-2-positiven Tumoren mehr TAMs vorhanden sind als in COX-2-negativen. Möglicherweise liegt die Bedeutung der Interaktion zwischen TAMs und COX-2 daher in der Progression von benignen Vorläufern zu malignen Melanomen (PIRES und PRADA, 2011).

#### **7.4.5 Dendritische Zellen**

Die Eigenschaften Dendritischer Zellen werden beim kaninen Melanom durch die in der Tumorumgebung vorhandenen Faktoren beeinflusst. Kanine Knochenmark-stämmige DCs (BM-DCs), die in vitro mit Tumor-konditioniertem Medium von kaninem Melanom kultiviert wurden, zeigten eine verminderte Aktivierung, eine verminderte Phagozytose-Aktivität und waren in der Lage, die Proliferation von Responder-Immunzellen zu supprimieren (WASSERMAN et al., 2012).

In der Humanmedizin stellen DC-basierte Tumorstimmimpfungen einen Ansatz zur Therapie von Tumoren, auch malignen Melanomen, dar. Auch bei kaninen Melanomen gibt es Untersuchungen zur therapeutischen Nutzung Dendritischer Zellen. Beispielsweise wurde versucht, durch DCs, die mit dem Lysat einer kaninen Melanomzelllinie behandelt wurden, eine Immunreaktion hervorzurufen. Vakzinierter Hunde reagierten in der Folge auf intradermal injizierte Zellen dieser Melanomzelllinie mit einer Rekrutierung von CD4+ und CD8+ T-Zellen. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass die DC-basierte Vakzine eine Verstärkung der T-Zell-medierten Immunantwort hervorrufen kann (TAMURA et al., 2008).

#### **7.4.6 Natürliche Killerzellen**

NK-Zellen stellen etwa 5 % der Lymphozyten kaniner PBMCs dar. Im Gegensatz liegt der Anteil humaner NK-Zellen bei 10-15 %. NK-Zellen des Menschen unterscheiden sich von T-Zellen durch die Expression von CD56. Sie exprimieren außerdem keine T-Zell-Antigene wie CD3 oder T-Zell-Rezeptoren. Kanine NK-Zellen hingegen exprimieren kein CD56, sondern weisen sogar geringe Mengen des T-Zell-Markers CD5 auf. Zur Identifizierung kaniner NK-

Zellen können die Abwesenheit von CD3 oder CD5 genutzt werden (ADDISSIE und KLINGEMANN, 2018). Ein weiterer Marker sind Antikörper gegen den kaninen NKp46 (NCR1) Rezeptor (FOLTZ et al., 2016).

Die Zytotoxizität von NK-Zellen aus dem peripheren Blut ist bei Hunden mit Tumoren geringer als bei gesunden Hunden (GINGRICH et al., 2019). Dabei bestehen jedoch Unterschiede zwischen verschiedenen Tumorarten. Am signifikantesten ist die Suppression der Zytotoxizität bei kaninen Mammatumoren, während sie bei Lymphomen im Vergleich zu gesunden Hunden nicht signifikant reduziert ist. Eine leicht verminderte Zytotoxizität der NK-Zellen weisen Hunde mit Osteosarkomen auf. Signifikant niedriger ist die Zytotoxizität beim Vorliegen metastatischer Tumoren (FUNK et al., 2003). Durch Stimulation mit IL-2 kann bei beiden Gruppen die Zytotoxizität der NK-Zellen erhöht werden. Die Steigerung der Zytotoxizität fällt jedoch bei gesunden Hunden deutlich stärker aus als bei Hunden mit Tumoren (FUNK et al., 2005).

Keine der erwähnten Publikationen bezieht sich auf das kanine Melanom oder hat NK-Zellen bei kaninen Melanomen untersucht. Auch für eine gezieltere Nutzung des Hundes als Modell für Tumoren des Menschen ist eine ausführlichere Charakterisierung der kaninen NK-Zellen und ihrer Unterschiede zu den NK-Zellen des Menschen notwendig (GINGRICH et al., 2019).

## **7.5 Immuntherapie des kaninen Melanoms**

Die Immuntherapie des kaninen Melanoms wurde in den vergangenen Jahren stetig weiterentwickelt. Es gab zahlreiche Studien mit unterschiedlichen Ansätzen (FINOCCHIARO und GLIKIN, 2017). So wurden unter anderem Therapien getestet, die auf folgenden Mechanismen beruhen: Vakzinen aus ganzen Tumorzellen oder Tumorzelllysaten; DNA-Vakzinen mit xenogener oder syngener Plasmid-DNA; der Transfer von TAAs oder von für immunstimulatorische Zytokine codierenden Genen (über virusbasierte Vektoren oder andere Methoden); DC-Vakzinen, die mit TAAs, DNA/RNA von TAAs oder mit Tumorzelllysaten gekoppelt sind; adoptiver Zelltransfer; zytokinbasierte Therapien und Antikörper-Therapien (BERGMAN, 2007a).

Eine derzeit empfohlene Therapie des kaninen oralen Melanoms stellt die Verwendung von Oncept® dar, eine Vakzine basierend auf xenogener DNA, kodierend für humane Tyrosinase. Die körpereigene Produktion von Antikörpern gegen humane Tyrosinase soll eine gezielte Immunreaktion gegen kanine Melanomzellen induzieren und in Kombination mit einer

vorangegangenen chirurgischen Tumorentfernung und/oder Bestrahlung die Überlebenszeit erkrankter Hunde verlängern (TUREK et al., 2020). Oncept® erhielt im Jahr 2010 von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) seine volle Zulassung, nachdem es bereits im Jahr 2007 bedingt zugelassen worden war. Bei der Behandlung wird die Vakzine mit einer nadelfreien Methode injiziert, um die DNA transdermal zu applizieren. Die Vakzinierung erfolgt vier Mal im Abstand von zwei Wochen mit einer anschließenden Boosterung alle sechs Monate (ATHERTON et al., 2016).

Trotz teils widersprüchlicher Ergebnisse zur Wirksamkeit (GROSENBAUGH et al., 2011; OTTNOD et al., 2013; VERGANTI et al., 2017) hat sich Oncept® mittlerweile als wichtiger Bestandteil der multimodalen Therapie des kaninen Melanoms etabliert (TUREK et al., 2020).

In einer von Grosenbaugh et al. durchgeführten Studie an Hunden mit oralen Melanomen in den Stadien II und III, bei lokoregionaler Tumorkontrolle, konnte durch die Vakzinierung mit humaner Tyrosinase-DNA tatsächlich eine längere Überlebenszeit als bei nicht vakzinierten Hunden erreicht werden (GROSENBAUGH et al., 2011). Eine weitere retrospektive Studie, die zusätzlich Hunde mit oralen Melanomen im Stadium IV einschloss, konnte die Ergebnisse bei Stadium I-III Patienten bestätigen und sogar eine lebensverlängernde Wirkung bei fortgeschrittenen Stadium 4 Patienten durch die Vakzinierung feststellen (VERGANTI et al., 2017). Verganti et al. diskutieren daher die Vakzinierung mit Oncept® als palliative Therapie für Patienten in fortgeschrittenen Stadien oder beim Vorhandensein makroskopischer Tumoren, da 44,4% der Hunde mit makroskopischen Tumoren auf die Vakzinierung ansprachen und die Autoren für orale Melanome im Stadium IV eine mediane Überlebenszeit von 178 Tagen nachweisen konnte (VERGANTI et al., 2017).

Eine retrospektive Studie an Hunden mit oralen Melanomen in den Stadien I bis III konnte hingegen keine Verlängerung von progressionsfreiem Überleben, krankheitsfreiem Intervall oder medianer Überlebenszeit von vakzinierten Tieren gegenüber nicht vakzinierten feststellen (OTTNOD et al., 2013). Eine weitere retrospektive Studie an 32 Hunden mit oralem Melanom in den Stadien II und III dokumentierte eine mediane Überlebenszeit der vakzinierten Hunde von 335 Tagen und ein medianes progressionsfreies Überleben von 160 Tagen (TREGGIARI et al., 2016). In allen drei Publikationen wird jedoch erwähnt, dass bei der Interpretation der Ergebnisse der retrospektive Charakter dieser Studien berücksichtigt werden müsse, der die Aussagekraft der Ergebnisse einschränkt (OTTNOD et al., 2013; VERGANTI et al., 2017).

Der Effekt von tyrosinasespezifischen Immuntherapien ist vom Grad der Tyrosinaseexpression im Tumor abhängig (ATHERTON et al., 2016). Obwohl die Tyrosinaseexpression bei kaninen melanozytären Tumoren nicht mit dem Grad der Pigmentierung zusammenhängt (PHILLIPS et al., 2012b), kann nicht ausgeschlossen werden, dass Tyrosinase in gewissen Fällen in inkorrekt Form vorliegt und dadurch für die Antigenpräsentation ungeeignet ist. Um die Wirksamkeit von Oncept® tatsächlich beurteilen zu können, müsste eine prospektive, randomisierte Doppelblindstudie durchgeführt werden (ATHERTON et al., 2016).

Zuleger et al. haben eine Studie durchgeführt, in der Hunden mit Melanom humane Tyrosinase-Plasmid-DNA nicht auf die für Oncept® übliche Weise, sondern in Form von DNA-microseeding appliziert wurde. Beim DNA-microseeding wird über ein modifiziertes Tätowierungsgerät die Vakzine in die Haut injiziert. Bei zwei von fünf Hunden konnte auf diese Weise eine Erhöhung der Antikörper gegen humane Tyrosinase erreicht werden. Die Transgen-Expression von humaner Tyrosinase war bei allen Hunden allerdings weniger hoch als ursprünglich erwartet, weshalb eine zusätzliche Optimierung der Applikationsmethode notwendig sein wird (ZULEGER et al., 2017).

Eine weitere Vakzine richtet sich gegen Chondroitinsulfat Proteoglykan-4 (CSPG4), ein Zelloberflächenmarker, der mit Migration, Invasion und Proliferation von Melanomzellen assoziiert ist. Dabei wird xenogene DNA genutzt, die für humanes CSPG4 kodiert. Mit CSPG4-Vakzinierung konnten bei Hunden mit oralen Melanomen in den Stadien II und III nach chirurgischer Tumorentfernung sowohl längeres Gesamtüberleben als auch längeres metastasenfreies Überleben erreicht werden (RICCARDO et al., 2014; PIRAS et al., 2016).

Auch die Nutzung einer Gangliosid GD3-basierten Vakzine wurde untersucht (HUTCHISON et al., 2019). Frische kanine Melanomzellen exprimieren die Disialoganglioside GD2 und GD3, was sie zu einem potentiellen Ziel von Immuntherapien macht (ALMELA und ANSÓN, 2019). Die GD3-Vakzine wurde Hunden mit malignem Melanom vier Mal im Abstand von vier Wochen appliziert. Im Lauf der Behandlungen konnte dadurch eine signifikante Verminderung von polymorphnukleären MDSCs und mononukleären MDSCs erzielt werden (HUTCHISON et al., 2019).

Um eine Immunreaktion gegen Tumoren zu erreichen, werden auch Dendritische Zellen verwendet. Dabei gibt es verschiedene Methoden. DCs werden mit Peptiden oder Proteinen beladen und Tumorzelllysate oder virale Vektoren können genutzt werden, um für TAAs oder Proteine kodierende Gene einzubringen (ALMELA und ANSÓN, 2019). Eine *in vitro*-Studie

konnte feststellen, dass mit einem Lysat der kaninen malignen Melanomzelllinie CMM2 stimulierte DCs in der Lage waren, in Hunden die T-Zell-Immunität gegen CMM2 zu erhöhen (TAMURA et al., 2008).

Ein weiterer therapeutischer Ansatz ist die Vakzinierung mit ganzen Tumorzellen. Die Tumorzellen werden vor der Applikation bestrahlt oder in lysierter Form verwendet und in vielen Fällen mit Adjuvantien versetzt (ALMELA und ANSÓN, 2019). Eine mit xenogenem humanen gp100 transfizierte Melanomzelllinie wurde bestrahlt und anschließend 34 Hunden mit Melanomen in den Stadien II bis IV intradermal verabreicht. Sechs der 34 Hunde reagierten darauf mit zumindest partieller Tumorregression (ALEXANDER et al., 2006).

Auch der Einsatz onkolytischer Viren kann bei der Bekämpfung maligner Melanome helfen. Mithilfe von VSV-GP, einer modifizierten Version des Vesiculären Stomatitis Virus (VSV), konnte die Zerstörung kaniner Melanomzelllinien erreicht werden. Bei Xenograft-Mausmodellen und syngenischen Mausmodellen führte die Behandlung mit VSV-GP zu einer verlängerten Überlebenszeit. Auch die Entwicklung von B16 Melanom-Lungenmetastasen konnte durch eine intravenöse Applikation des Virus supprimiert werden. Einige Faktoren vermindern jedoch die Wirksamkeit der VSV-GP-Therapie. Dazu zählen zum Beispiel eine schlechte Tumovaskularisation, Hypoxie und hoher intratumoraler Druck. Eine hohe Empfindlichkeit des Tumors gegenüber IFN ist ebenfalls mit einer geringeren Wirksamkeit assoziiert (KIMPEL et al., 2018).

Immun-Checkpoints sind ein weiteres Ziel von Immuntherapien. Immun-Checkpoints sind kostimulatorische oder inhibitorische Signale, die die Aktivierung und das Priming von T-Zellen regulieren und wichtig für die Toleranz von Selbstantigenen sind. Bei Tumorerkrankungen sind diese immuninhibitorischen Signalwege meist erhöht und tragen dazu bei, dass Tumoren dem Immunsystem entgehen können (ALMELA und ANSÓN, 2019).

Ähnlich wie bei humanen Tumoren gibt es auch beim kaninen oralen Melanom Bestrebungen, durch die Blockade der PD-1/PD-L1-Interaktion eine Antitumorreaktion zu erreichen. Dazu wurde c4G12 entwickelt, ein monoklonaler Antikörper gegen kanines PD-L1. Hunde mit Lungenmetastasen, die mit c4G12 behandelt worden waren, zeigten eine längere mediane Überlebenszeit als die Kontrollgruppe. Obwohl eine Einzelbeobachtung, überlebte ein Hund nach Behandlung mit dem PD-L1 Antikörper mit 2.222 Tagen vom Zeitpunkt der Diagnose der Lungenmetastasen unerwartet lange (MAEKAWA et al., 2017).

Auch Cytotoxic T-Lymphocyte associated protein-4 (CTLA-4) kann blockiert werden. Für die Behandlung fortgeschrittener humaner Melanome wurden bereits drei Immun-Checkpoint-Inhibitoren von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassen. Diese sind gegen PD-L1 bzw. gegen CTLA-4 gerichtet (ALMELA und ANSÓN, 2019).

Untersuchungen zu einer Checkpoint-Blockade, die eine Kombination aus drei replikationsunfähigen, von Schimpansen stammenden Adenovirus-Vektoren nutzte, brachten vielversprechende Ergebnisse. Von den drei Adenovirus-Vektoren exprimierte einer mouse fibroblast-associated protein (mFAP) und die anderen beiden kanines tyrosinase-related protein (Trp)-1 und -2. Trp-1 und Trp-2 waren dabei in Herpes simplex-1 Glykoprotein D fusioniert. Bei allen fünf Hunden, die mit dieser Kombination vakziniert worden waren, konnte die Anzahl von gegen kanines Trp1 gerichteten aktivierten CD4+ und CD8+ T-Zellen erhöht werden, ebenso wie die Anzahl der mFAP-spezifischen aktivierten CD4+ und CD8+ T-Zellen (KURUPATI et al., 2018).

Eine andere immuntherapeutische Strategie sind zytokinbasierte Therapien. Diese verwenden in der Veterinärmedizin vor allem fünf Zytokine: GM-CSF, IL-2, IFN- $\beta$ , IL-12 und IL-18. Diese Zytokine haben unterschiedliche Effekte, zielen im Allgemeinen aber darauf ab, die Antitumoraktivität verschiedener Immunzellen zu verstärken. Teilweise erreichen sie auch die Apoptose von Tumorzellen und haben antiangiogene Wirkung. Gute Erfolge in klinischen Studien konnten trotz Nebenwirkungen bereits mit IL-12 und IL-18 erzielt werden. IL-2 und IFN- $\beta$  wirken sich aufgrund ihrer Zytotoxizität hingegen negativ auf die Lebensqualität der Erkrankten aus (FINOCCHIARO und GLIKIN, 2017).

Bei Hunden mit Melanom konnten durch eine Kombination von chirurgischer Tumorentfernung und zytokinbasierter Therapie mit Herpes simplex-Thymidinkinase, GM-CSF, IL-2 und IFN- $\beta$  eine bessere Kontrollierbarkeit der systemischen Erkrankung, längeres metastasenfreies Überleben und verlängertes Gesamtüberleben bewirkt werden (FINOCCHIARO und GLIKIN, 2017).

Die Zytokintherapie kann auch mithilfe von DNA-Transfektion erfolgen. Bei der DNA-Transfektion wird fremde DNA entweder über virale Vektoren oder über nicht-virale Vektoren wie Liposome oder DNA-Proteinkomplexe in Zellen verbracht. Neben Zytokinen können auf diese Weise auch Suizidgene, Tumorantigene, Bakterienantigene und proapoptotische Gene transportiert werden (ALMELA und ANSÓN, 2019).

Beim adoptiven T-Zelltransfer (ACT) werden Tumorpatienten tumorspezifische T-Zellen infundiert. Diese sind entweder tumorinfiltrierende T-Lymphozyten aus dem Tumor des Patienten oder periphere T-Zellen des Patienten, die *ex vivo* so verändert wurden, dass sie spezifische Antitumor-T-Zell-Rezeptoren oder Chimäre Antigenrezeptoren exprimieren. Vor der Behandlung des Patienten werden diese T-Zellen *ex vivo* vervielfältigt. Die Wirksamkeit des ACT kann durch eine vor dem Transfer stattfindende Lymphodepletion, wie sie zum Beispiel durch Chemotherapie entsteht, erhöht werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass dabei auch immunsuppressive Zellen zerstört werden. Bei metastatischen Melanomen konnte der Adoptive T-Zelltransfer einen dauerhaften, kompletten Tumorrückgang bewirken, der in manchen Fällen sogar kurativ war. Versuche zu ACT bei Hunden mit soliden Tumoren gibt es bisher noch nicht, lediglich an Hunden mit Lymphom wurde diese Therapiemethode untersucht. Bei Hunden mit non-Hodgkin-Lymphom, die zuvor Chemotherapie erhalten hatten, konnte durch den Transfer autologer T-Lymphozyten bessere klinische Ergebnisse erzielt werden (BUJAK et al., 2018).

Aktuellere Studien geben Hinweis darauf, dass sogar die Bestrahlungstherapie einen immunstimulatorischen Effekt haben kann. Wird durch Bestrahlung ein „immunogener Zelltod“ hervorgerufen oder kommt es zur subletalen Zerstörung von Tumorzellen, werden Danger Associated Molecular Patterns (DAMPs) frei. Die Anwesenheit der DAMPs schafft ein immunogenes Umfeld. Antigenpräsentierende Zellen nehmen die Antigene und Neoantigene auf, präsentieren sie T-Zellen und lösen so eine Immunreaktion gegen die Tumorzellen aus. Die Antitumorreaktion kann verstärkt werden, indem intratumoral Immunadjuvantien appliziert werden. Bei kaninen oralen Melanomen konnten mit einer Kombination aus hypofraktionierter Bestrahlungstherapie und auf Nanotechnologie basierender Immunadjuvantien eine verstärkte Infiltration des Tumors mit Immunzellen erreicht werden. Auch die Zeitspanne, in der der Tumor unter Kontrolle war, konnte dadurch verlängert werden (HOOPES et al., 2018).

## 8 Schlussfolgerung

Das Melanom stellt sowohl bei Menschen als auch bei Hunden eine schwere Tumorerkrankung dar, die sich durch hohe Malignität mit frühem invasivem Wachstum auszeichnet. Gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie erweist es sich bei beiden Spezies als resistent, was die Therapie erschwert (HERNANDEZ et al., 2018).

Die Inzidenz des humanen malignen Melanoms ist in den vergangenen Jahrzehnten stark gestiegen (RASTRELLI et al., 2014). Die tatsächliche Inzidenz von Melanomen in Österreich wird von einer Studie mit 25/100.000 angegeben. Dies ist etwa doppelt so hoch wie vom Österreichischen Krebsregister angegeben. Angesichts dessen kann davon ausgegangen werden, dass die Inzidenz in der Vergangenheit unterschätzt wurde (MONSHI et al., 2015). Auch bei Hunden tritt das maligne Melanom relativ häufig auf und ist das häufigste kutane Malignom dieser Spezies (GILLARD et al., 2014).

Aufgrund dieser Tatsachen wird sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin nach neuen Therapiemöglichkeiten für Melanome gesucht. Da Melanome das Immunsystem manipulieren und es ihren Bedürfnissen anpassen, gelten Immuntherapien als vielversprechender Ansatz (MAHMOUD et al., 2017).

Bei der Therapie des humanen Melanoms werden bereits Medikamente, die die Proliferation von T-Zellen stimulieren und so die Tumorerstörung fördern, erfolgreich eingesetzt. Zurzeit wird vor allem daran geforscht, Immuntherapien zu entwickeln, die selektiv gegen die Tumorzellen des jeweiligen Patienten wirken. Zu diesen zählen Vakzinen, Biochemotherapie und der Transfer von adoptiven T-Zellen und Dendritischen Zellen (RODRÍGUEZ-CERDEIRA et al., 2017).

Einige der bereits an Hunden getesteten Immuntherapien können die Dauer von krankheitsfreiem Überleben und Gesamtüberleben ebenso wie die Lebensqualität der Hunde verbessern (GLIKIN und FINOCCHIARO, 2014). Erfolge bei der Immuntherapie des kaninen Melanoms dienen aber nicht nur der Therapie von Hunden, sondern sind auch wichtiger Bestandteil bei der Entwicklung neuer Behandlungsmethoden für humane Melanome (FINOCCHIARO und GLIKIN, 2017).

Sowohl für eine gezielte Erforschung von Immuntherapien gegen kanine Melanome als auch für die verbesserte Nutzung von Hunden als präklinisches Modell ist die genaue Kenntnis der

Immunbiologie des kaninen Melanoms notwendig. Manche Bereiche davon wurden bereits relativ ausführlich untersucht, in anderen hingegen orientiert sich die Veterinärmedizin noch stark an den Erkenntnissen humanmedizinischer Studien. Ausführlicheres Wissen über die Immunbiologie des kaninen Melanoms würde nicht nur der Veterinär-, sondern auch der Humanmedizin dienen. Es sollte daher Ziel der zukünftigen Forschung sein, die einzelnen Komponenten genauer zu untersuchen.

## 9 Zusammenfassung

Das Melanom ist ein von Melanozyten ausgehender Tumor, der sowohl beim Hund als auch beim Menschen durch hohe Malignität, frühes invasives Wachstum und Resistenz gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung gekennzeichnet sein kann. Angesichts der weltweit steigenden Inzidenz des humanen Melanoms und eingeschränkten Therapiemöglichkeiten hat die Entwicklung verbesserter therapeutischer Vorgangsweisen an Bedeutung gewonnen. Dabei haben sich vor allem immuntherapeutische Ansätze als vielversprechend herausgestellt. Da spezifisch das orale kanine Melanom in vielerlei Hinsicht stark dem humanen Schleimhautmelanom ähnelt, stellt der Hund in diesem Zusammenhang ein gut geeignetes präklinisches Modell für den Menschen dar. Diese Diplomarbeit gibt einen Überblick darüber, auf welche Weise humane und kanine Melanome mit dem Immunsystem interagieren und dieses ihren Bedürfnissen anpassen können.

Um vom Immunsystem unentdeckt zu bleiben, reduzieren Melanomzellen ihre Immunogenität. Sie drosseln dazu beispielsweise die Expression tumorassoziierter Antigene oder verändern die Expression von MHC I- und MHC II-Molekülen.

Zugleich jedoch nützt das bei Tumoren herrschende inflammatorische Umfeld dem Melanomwachstum. Indem das Immunsystem versucht, Tumorzellen zu zerstören, kommt es zur Selektion besonders resistenter Tumorzellen. Auch die in der Mikroumgebung des Melanoms vorhandenen Zellen und nicht-zelluläre, soluble Moleküle wie Zytokine, Chemokine, Mediatoren und Wachstumsfaktoren beeinflussen die Tumorprogression, da sie unter anderem Angiogenese und invasives Wachstum fördern und somit Wegbereiter für die Metastasierung sind.

Melanomzellen supprimieren auch selbst die Funktion des Immunsystems. Dies erreichen sie zum Beispiel, indem sie die Akkumulation immunsuppressiv wirkender Zellen fördern. So befinden sich in der Tumorumgebung regulatorische T-Zellen und regulatorische myeloide Zellen in großer Zahl. Proliferation und Aktivität von Zellen mit Antitumoreigenschaften werden hingegen gehemmt. Dies betrifft beispielsweise zytotoxische T-Zellen, Natürliche Killerzellen und Dendritische Zellen. Tumorassoziierte Makrophagen und tumorassoziierte Neutrophile Granulozyten verändern außerdem ihre Polarisierung, wodurch sie Eigenschaften entwickeln, die dem Tumorwachstum dienen.

Während die Immunbiologie des humanen Melanoms zu großen Teilen bereits ausführlich untersucht wurde, sind zum kaninen Melanom vergleichsweise wenige Informationen vorhanden. Eine genauere Kenntnis der Immunbiologie des kaninen Melanoms würde eine gezieltere Entwicklung von Immuntherapien sowie eine verbesserte Verwendbarkeit von Hunden als präklinisches Modell ermöglichen und somit sowohl der Veterinär- als auch der Humanonkologie dienen.

## 10 Summary

Melanoma is a tumor originating from melanocytes. In both dogs and humans, it is characterized by early invasive growth, high malignancy and resistance to chemotherapy and radiation. In view of the increasing incidence of human melanoma worldwide and the limited therapeutic options, the development of alternative therapeutic methods has become increasingly important. In particular, immunotherapy seems to be a promising approach. Since notably canine mucosal melanoma is highly similar to human mucosal melanoma, naturally affected dogs represent a well-suited preclinical model for human patients. This master thesis provides an overview on how human and canine melanoma modulate the immune system to create optimal conditions for their growth.

In order to remain undetected by the immune system, melanoma cells reduce their immunogenicity. To this aim, they down-regulate for example the expression of tumor-associated antigens, and the expression of antigen-presenting MHC I and MHC II molecules.

At the same time, melanomas benefit from the inflammatory conditions characterizing the tumor microenvironment. When the immune system tries to destroy tumor cells, particularly resistant tumor cells survive and are able to further proliferate. Cells as well as soluble components such as cytokines, chemokines, mediators and growth factors present in the melanoma microenvironment also influence tumor progression, since they act as immunosuppressants and promote angiogenesis and invasive growth, thus facilitating the development of distant metastases.

Melanoma cells themselves also suppress the function of the immune system. They achieve this for example by triggering the accumulation of immunosuppressive cells. As a consequence, there are large numbers of regulatory T cells and regulatory myeloid cells in the tumor environment. In contrast, proliferation and activity of cells with antitumor properties are inhibited. This applies, for example, to cytotoxic T cells, natural killer cells and dendritic cells. Tumor-associated macrophages and tumor-associated neutrophil granulocytes also change their polarization, which leads to the development of properties that support tumor growth.

While many aspects of the immunobiology of human melanoma have been extensively investigated, less information is available on canine melanoma. A more precise knowledge of the immunobiology of canine melanoma would serve the more targeted development of

immunotherapies und the improved use of canine melanoma patients as a preclinical model for human medicine.

## 11 Literaturverzeichnis

- ABBAS, A.K., MURPHY, K.M. u. SHER, A. (1996): Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**, 787–793.
- ADDISSIE, S. u. KLINGEMANN, H. (2018): Cellular immunotherapy of canine cancer. *Vet Sci* **5**.
- ALEXANDER, A.N., HUELSMEYER, M.K., MITZEY, A., DUBIELZIG, R.R., KURZMAN, I.D., MACEWEN, E.G. u. VAIL, D.M. (2006): Development of an allogeneic whole-cell tumor vaccine expressing xenogeneic gp100 and its implementation in a phase II clinical trial in canine patients with malignant melanoma. *Cancer Immunol Immunother* **55**, 433–442.
- ALMELA, R.M. u. ANSÓN, A. (2019): A Review of Immunotherapeutic Strategies in Canine Malignant Melanoma. *Vet Sci* **6**, 1–12.
- ANDZINSKI, L., KASNITZ, N., STAHNKE, S., WU, C., GEREKE, M., SCHILLING, B., BRANDAU, S., WEISS, S. u. JABLONSKA, J. (2016): Type I IFNs induce anti-tumor polarization of tumor associated neutrophils in mice and human. *Int J Cancer* **138**, 1982–1993.
- ASANO, K., NABEYAMA, A., MIYAKE, Y., QIU, C.-H., KURITA, A., TOMURA, M., KANAGAWA, O., FUJII, S. u. TANAKA, M. (2011): CD169-Positive Macrophages Dominate Antitumor Immunity by Crosspresenting Dead Cell-Associated Antigens. *Immunity* **34**, 85–95.
- ATHERTON, M.J., MORRIS, J.S., MCDERMOTT, M.R. u. LICHTY, B.D. (2016): Cancer immunology and canine malignant melanoma : A comparative review. **169**, 15–26.
- BAITSCH, L., BAUMGAERTNER, P., DEVÈVRE, E., RAGHAV, S.K., LEGAT, A., BARBA, L., WIECKOWSKI, S., BOUZOURENE, H., DEPLANCKE, B., ROMERO, P., RUFER, N. u. SPEISER, D.E. (2011): Exhaustion of tumor-specific CD8 + T cells in metastases from melanoma patients. *J Clin Invest* **121**, 23–25.
- BARRAL, P., POLZELLA, P., BRUCKBAUER, A., ROOIJEN, N. VAN, BERA, G.S., CERUNDOLO, V. u. BATISTA, F.D. (2010): CD169 + MACROPHAGES PRESENT LIPID ANTIGENS TO MEDIATE EARLY ACTIVATION OF INVARIANT NKT CELLS IN LYMPH NODES. *Nat Immunol* **11**, 303–312.

- BARRY, K.C., HSU, J., BROZ, M.L., CUETO, F.J., BINNEWIES, M., COMBES, A.J., NELSON, A.E., LOO, K., KUMAR, R., ROSENBLUM, M.D., ALVARADO, M.D., WOLF, D.M., BOGUNOVIC, D., BHARDWAJ, N., DAUD, A.I., HA, P.K., RYAN, W.R., POLLACK, J.L., SAMAD, B., ASTHANA, S., CHAN, V. u. KRUMMEL, M.F. (2018): A Natural Killer/Dendritic Cell Axis Defines Responsive Tumor Microenvironments in Melanoma. *Physiol Behav* **176**, 139–148.
- BARTLETT, E.K. u. KARAKOUSIS, G.C. (2015): Current staging and prognostic factors in melanoma. *Surg Oncol Clin N Am* **24**, 215–227.
- BARUTELLO, G., ROLIH, V., ARIGONI, M., TARONE, L., CONTI, L., ID, E.Q., ID, P.B., CAVALLO, F. u. RICCARDO, F. (2018): Strengths and Weaknesses of Pre-Clinical Models for Human Melanoma Treatment : Dawn of Dogs ' Revolution for Immunotherapy. doi:10.3390/ijms19030799
- BAUMGARTNER, J., WILSON, C., PALMER, B., RICHTER, D., BANERJEE, A. u. MCCARTER, M. (2007): Melanoma Induces Immunosuppression by Up-Regulating FOXP3+ Regulatory T Cells. *J Surg Res* **141**, 72–77.
- BERGMAN, P.J. (2007a): Anticancer Vaccines. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract* **37**, 1111–1119.
- BERGMAN, P.J. (2007b): Canine Oral Melanoma. *Clin Tech Small Anim Pract* **22**, 55–60.
- BERGMAN, P.J., CAMPS-PALAU, M.A., MCKNIGHT, J.A., LEIBMAN, N.F., CRAFT, D.M., LEUNG, C., LIAO, J., RIVIERE, I., SADELAIN, M., HOHENHAUS, A.E., GREGOR, P., HOUGHTON, A.N., PERALES, M.A. u. WOLCHOK, J.D. (2006): Development of a xenogeneic DNA vaccine program for canine malignant melanoma at the Animal Medical Center. *Vaccine* **24**, 4582–4585.
- BERGMAN, P.J., MCKNIGHT, J., NOVOSAD, A., CHARNEY, S., FARRELLY, J., CRAFT, D., WULDERK, M., JEFFERS, Y., SADELAIN, M., HOHENHAUS, A.E., SEGAL, N., GREGOR, P., ENGELHORN, M., RIVIERE, I., ALAN, N. u. WOLCHOK, J.D. (2003): Long-Term Survival of Dogs with Advanced Malignant Melanoma after DNA Vaccination with Xenogeneic Human Tyrosinase : A Phase I Trial 1. *Clin Cancer Res* **9**, 1284–1290.
- BRANDAU, S., MOSES, K. u. LANG, S. (2013): The kinship of neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells in cancer : Cousins , siblings or twins ? *Semin Cancer*

Biol **23**, 171–182.

- BROWN, J.A., DORFMAN, D.M., MA, F., SULLIVAN, E.L., MUNOZ, O., WOOD, C.R., GREENFIELD, E.A. u. FREEMAN, G.J. (2003): Blockade of Programmed Death-1 Ligands on Dendritic Cells Enhances T Cell Activation and Cytokine Production. *J Immunol* **170**, 1257–1266.
- BUJAK, J.K., PINGWARA, R., NELSON, M.H. u. MAJCHRZAK, K. (2018): Adoptive cell transfer: New perspective treatment in veterinary oncology. *Acta Vet Scand* **60**, 1–13.
- CACHO-DÍAZ, B., GARCÍA-BOTELLO, D.R., WEGMAN-OSTROSKY, T., REYES-SOTO, G., ORTIZ-SÁNCHEZ, E. u. HERRERA-MONTALVO, L.A. (2020): Tumor microenvironment differences between primary tumor and brain metastases. *J Transl Med* **18**, 1.
- CASTILLO-MONTIEL, E., CHIMAL-EGUÍA, J.C., TELLO, J.I., PINON-ZARÁTE, G., HERRERA-ENRÍQUEZ, M. u. CASTELL-RODRÍGUEZ, A. (2015): Enhancing dendritic cell immunotherapy for melanoma using a simple mathematical model. *Theor Biol Med Model* 1–14.
- CHAPON, M., RANDRIAMAMPITA, C., MAUBEC, E., BADOUAL, C., FOUQUET, S., WANG, S.F., MARINHO, E., FARHI, D., GARCETTE, M., JACOBELLI, S., ROUQUETTE, A., CARLOTTI, A., GIROD, A., PRÉVOST-BLONDEL, A., TRAUTMANN, A., AVRIL, M.F. u. BERCOVICI, N. (2011): Progressive upregulation of PD-1 in primary and metastatic melanomas associated with blunted TCR signaling in infiltrating T lymphocytes. *J Invest Dermatol* **131**, 1300–1307.
- CHATTOPAHDYAY, C., KIM, D.W., GOMBOS, D., OBA, J., QIN, Y., WILLIAMS, M., ESMAELI, B., GRIMM, E., WARGO, J., WOODMAN, S. u. PATEL, S. (2016): Uveal Melanoma: From Diagnosis to Treatment and the Science in Between. *Cancer* **122**, 2299–2312.
- CHEN, S., CRABILL, G.A., PRITCHARD, T.S., MCMILLER, T.L., WEI, P., PARDOLL, D.M., PAN, F. u. TOPALIAN, S.L. (2019): Mechanisms regulating PD-L1 expression on tumor and immune cells. *J Immunother Cancer* **7**, 1–12.
- CHO, W.C., JOUR, G. u. AUNG, P.P. (2019): Role of angiogenesis in melanoma progression: Update on key angiogenic mechanisms and other associated components. *Semin Cancer Biol* **59**, 175–186.

- CONDEELIS, J. u. POLLARD, J.W. (2006): Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration , Invasion , and Metastasis. *Cell* **124**, 263–266.
- CRISTIANI, C.M., GAROFALO, C., PASSACATINI, L.C. u. CARBONE, E. (2019): New avenues for melanoma immunotherapy: Natural Killer cells? *Scand J Immunol* 1–13.
- DAMSKY, W.E., THEODOSAKIS, N. u. BOSENBERG, M. (2014): Melanoma metastasis: New concepts and evolving paradigms. *Oncogene* **33**, 2413–2422.
- DEGENHARDT, Y., HUANG, J., GRESHOCK, J., HORIATES, G., NATHANSON, K., YANG, X., HERLYN, M. u. WEBER, B. (2010): Distinct MHC Gene Expression Patterns During Progression of Melanoma. *Genes, Chromosom Cancer* **49**, 144–154.
- DONG, H., STROME, S.E., SALOMAO, D.R., TAMURA, H., HIRANO, F., FLIES, D.B., ROCHE, P.C., LU, J., ZHU, G., TAMADA, K., LENNON, V.A., CELLS, E. u. CHEN, L. (2002): Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* **8**, 793–800.
- DROZINA, G., KOHOUTEK, J., JABRANE-FERRAT, N. u. PETERLIN, B.M. (2005): Expression of MHC II genes. *Curr Top Microbiol Immunol* **290**, 147–170.
- DUMITRU, C.A., MOSES, K., TRELAKIS, S., LANG, S. u. BRANDAU, S. (2012): Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells : immunophenotyping , cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer Immunol Immunother* 1155–1167.
- DUNN, G.P., BRUCE, A.T., IKEDA, H., OLD, L.J. u. SCHREIBER, R.D. (2002): Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* **3**, 991–998.
- DUNN, G.P., OLD, L.J. u. SCHREIBER, R.D. (2004): The immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* **21**, 137–148.
- DUNN, I.S., HAGGERTY, T.J., KONO, M., DURDA, P.J., BUTERA, D., MACDONALD, D.B., BENSON, E.M., ROSE, L.B. u. KURNICK, J.T. (2007): Enhancement of Human Melanoma Antigen Expression by IFN- $\beta$ . *J Immunol* **179**, 2134–2142.
- DURDA, P.J., DUNN, I.S., ROSE, L.B., BUTERA, D., BENSON, E.M., PANDOLFI, F. u. KURNICK, J.T. (2003): Induction of “Antigen Silencing” in Melanomas by Oncostatin M: Down-Modulation of Melanocyte Antigen Expression. *Mol Cancer Res* **1**, 411–419.

- EGEBLAD, M., NAKASONE, E.S. u. WERB, Z. (2010): Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell* **18**, 884–901.
- ERDAG, G., SCHAEFER, J.T., SMOLKIN, M.E., DEACON, D.H., SHEA, S.M., DENGEL, L.T., PATTERSON, J.W. u. SLINGLUFF JR., C.L. (2012): Immunotype and Immunohistologic Characteristics of Tumor Infiltrating Immune Cells are Associated with Clinical Outcome in Metastatic Melanoma Gulsun. *Cancer Res* **72**, 1070–1080.
- FALLENI, M., SAVI, F., TOSI, D., AGAPE, E., CERRI, A., MONEGHINI, L. u. BULFAMANTE, G.P. (2017): M1 and M2 macrophages' clinicopathological significance in cutaneous melanoma. *Melanoma Res* **27**, 200–210.
- FINOCCHIARO, L.M. u. GLIKIN, G.C. (2017): Recent clinical trials of cancer immunogene therapy in companion animals. *World J Exp Med* **7**, 42–48.
- FOLTZ, J.A., SOMANCHI, S.S., YANG, Y., AQUINO-LOPEZ, A., RILEY, E., HAMMOND, J.A., MODIANO, J.F., STORSET, A.K. u. LEE, D.A. (2016): NCR1 Expression Identifies Canine Natural Killer Cell Subsets with Phenotypic Similarity to Human Natural Killer Cells. **7**, 1–15.
- FREEMAN, G.J., LONG, A.J., IWAI, Y., BOURQUE, K., CHERNOVA, T., NISHIMURA, H., FITZ, L.J., MALENKOVICH, N., OKAZAKI, T., BYRNE, M.C., HORTON, H.F., FOUUSER, L., CARTER, L., LING, V., BOWMAN, M.R., CARRENO, B.M., COLLINS, M., WOOD, C.R. u. HONJO, T. (2000): Engagement of the PD-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *J Exp Med* **192**, 1027–1034.
- FRICKE, I. u. GABRILOVICH, D.I. (2006): Dendritic cells and tumor microenvironment: A dangerous liaison. *Immunol Invest* **35**, 459–483.
- FRIDLENDER, Z.G., SUN, J., KIM, S., KAPOOR, V., CHENG, G., LING, L., WORTHEN, G.S., ALBELDA, S.M. u. ALBELDA, S.M. (2009): Polarization of Tumor-Associated Neutrophil (TAN) Phenotype by TGF- $\beta$ : "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* **16**, 183–194.
- FUNK, J., BACH, U., FAILING, K. u. BURKHARDT, E. (2003): Influence of different tumour types on natural cytotoxicity (NK cell activity) and mitogen-induced lymphocyte proliferation in isolated blood lymphocytes from 100 dogs with tumours. *Res Vet Sci* **75**,

129–135.

- FUNK, J., SCHMITZ, G., FAILING, K. u. BURKHARDT, E. (2005): Natural killer (NK) and lymphokine-activated killer (LAK) cell functions from healthy dogs and 29 dogs with a variety of spontaneous neoplasms. *Cancer Immunol Immunother* **54**, 87–92.
- GABRILOVICH, D. (2004): Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol* **4**, 941–952.
- GABRILOVICH, D.I. u. NAGARAJ, S. (2009): Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* **9**, 162–174.
- GARCIA-DIAZ, A., SHIN, D.S., MORENO, B.H., SACO, J., ESCUIN-ORDINAS, H., RODRIGUEZ, G.A., ZARETSKY, J.M., SUN, L., WANG, X., PARISI, G., SAUS, C.P., TORREJON, D.Y., THOMAS, G., COMIN-ANDUIX, B., HU-LIESKOVAN, S., DAMOISEAUX, R., LO, R.S. u. RIBAS, A. (2017): Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep* **19**, 1189–1201.
- GILLARD, M., CADIEU, E., BRITO, C. DE, ABADIE, J., VERGIER, B., DEVAUCHELLE, P., DEGORCE, F., DRÉANO, S., PRIMOT, A., DORSO, L., LAGADIC, M., GALIBERT, F., HÉDAN, B., GALIBERT, M.D. u. ANDRÉ, C. (2014): Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. *Pigment Cell Melanoma Res* **27**, 90–102.
- GINGRICH, A.A., MODIANO, J.F. u. CANTER, R.J. (2019): Characterization and Potential Applications of Dog Natural Killer Cells in Cancer Immunotherapy. *J Clin Med* **8**, 4–11.
- GLIKIN, G.C. u. FINOCCHIARO, L.M.E. (2014): Clinical trials of immunogene therapy for spontaneous tumors in companion animals. *Sci World J* **2014**, 113.
- GONZALEZ-GUGEL, E., SAXENA, M. u. BHARDWAJ, N. (2016): Modulation of innate immunity in the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother* **65**, 1261–1268.
- GORDON, J., BROWN, M. u. REYNOLDS, M. (2018): Cell-Based Methods for Determination of Efficacy for Candidate Therapeutics in the Clinical Management of Cancer. *Diseases* **6**, 1–13.
- GOULART, M.R., HLAVATY, S.I., CHANG, Y., POLTON, G., STELL, A., PERRY, J., WU, Y., SHARMA, E., BROXHOLME, J., LEE, A.C., SZLADOVITS, B., TURMAINE, M., GRIBBEN, J., XIA, D. u. GARDEN, O.A. (2019): Phenotypic and transcriptomic

- characterization of canine myeloid- derived suppressor cells. *Sci Rep* 1–14.
- GOULART, M.R., PLUHAR, G.E. u. OHLFEST, J.R. (2012): Identification of Myeloid Derived Suppressor Cells in Dogs with Naturally Occurring Cancer. *PLoS One* **7**, 1–9.
- GROSENBAUGH, D.A., LEARD, A.T., BERGMAN, P.J., KLEIN, M.K., MELEO, K., SUSANECK, S., HESS, P.R., JANKOWSKI, M.K., JONES, P.D., LEIBMAN, N.F., JOHNSON, M.H., KURZMAN, I.D. u. WOLCHOK, J.D. (2011): Safety and efficacy of a xenogeneic DNA vaccine encoding for human tyrosinase as adjunctive treatment for oral malignant melanoma in dogs following surgical excision of the primary tumor. *Am J Vet Res* **72**, 1631–1638.
- GROTZ, T.E., JAKUB, J.W., MANSFIELD, A.S., GOLDENSTEIN, R., ENNINGA, E.A.L., NEVALA, W.K., LEONTOVICH, A.A. u. MARKOVIC, S.N. (2015): Evidence of Th2 polarization of the sentinel lymph node ( SLN ) in melanoma. *Oncoimmunology* 1–9.
- HANAHAN, D. u. WEINBERG, R.A. (2011): Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674.
- HANAHAN, D. u. WEINBERG, R.A. (2000): The Hallmarks of Cancer. *Cell Press* **100**, 57–70.
- HARTLEY, G., FAULHABER, E., CALDWELL, A., COY, J., KURIHARA, J., GUTH, A., REGAN, D. u. DOW, S. (2016): Immune regulation of canine tumour and macrophage PD-L1 expression. *Vet Comp Oncol* 534–549.
- HAYFLICK, L. (1997): Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochem* **62**, 1180–1190.
- HERNANDEZ, B., ID, H.A.A., WEI, B., MICHAEL, H.T., MERLINO, G. u. SIMPSON, R.M. (2018): Naturally Occurring Canine Melanoma as a Predictive Comparative Oncology Model for Human Mucosal and Other Triple Wild-Type Melanomas. *Int J Mol Sci* **19**, 1–19.
- HOOPEES, P.J., WAGNER, R.J., DUVAL, K., KANG, K., GLADSTONE, D.J., MOODIE, K.L., CRARY-BURNEY, M., ARIASPULIDO, H., VELIZ, F.A., STEINMETZ, N.F. u. FIERING, S.N. (2018): Treatment of canine oral melanoma with nanotechnology-based immunotherapy and radiation. *Mol Pharm* **15**, 3717–3722.
- HORIUCHI, Y., HANAZAWA, A., NAKAJIMA, Y., NARIAI, Y., ASANUMA, H., KUWABARA,

- M., YUKAWA, M. u. ITO, H. (2007): T-Helper ( Th ) 1 / Th2 Imbalance in the Peripheral Blood of Dogs with Malignant Tumor. *Microbiol Immunol* **51**, 1135–1138.
- HORIUCHI, Y., TOMINAGA, M., ICHIKAWA, M., YAMASHITA, M., JIKUMARU, Y., NARIAI, Y., NAKAJIMA, Y., KUWABARA, M. u. YUKAWA, M. (2009): Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of dogs with metastatic tumors. *Microbiol Immunol* **53**, 468–474.
- HORIUCHI, Y., TOMINAGA, M., ICHIKAWA, M., YAMASHITA, M., OKANO, K., JIKUMARU, Y., NARIAI, Y., NAKAJIMA, Y., KUWABARA, M. u. YUKAWA, M. (2010): Relationship between regulatory and type 1 T cells in dogs with oral malignant melanoma. *Microbiol Immunol* **54**, 152–159.
- HOSSEINI, M., KASRAIAN, Z. u. REZVANI, H.R. (2017): Energy metabolism in skin cancers: A therapeutic perspective. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* **1858**, 712–722.
- HOUGHTON, A.M. (2010): The paradox of tumor-associated neutrophils : Fueling tumor growth with cytotoxic substances The paradox of tumor-associated neutrophils Fueling tumor growth with cytotoxic substances. *Cell Cycle* **9**, 1732–1737.
- HUANG, B., PAN, P., LI, Q., SATO, A.I., LEVY, D.E., BROMBERG, J., DIVINO, C.M. u. CHEN, S. (2006): Gr-1 + CD115 + Immature Myeloid Suppressor Cells Mediate the Development of Tumor-Induced T Regulatory Cells and T-Cell Anergy in Tumor-Bearing Host. *Am Assoc Cancer Res* **66**, 1123–1132.
- HUTCHISON, S., SAHAY, B., SOUZA, D.M., EJ, S., LEJEUNE, A., SZIVEK, A., LIVACCARI, A., FOX-ALVAREZ, S., SALUTE, M., POWERS, L. u. MILNER, R. (2019): Characterization of myeloid-derived suppressor cells and cytokines GM-CSF , IL-10 and MCP-1 in dogs with malignant melanoma receiving a GD3-based immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* **216**.
- ICHIHARA, F., KONO, K., TAKAHASHI, A., KAWAIDA, H., SUGAI, H. u. FUJII, H. (2003): Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res* **9**, 4404–4408.
- JABLONSKA, J., WU, C., ANDZINSKI, L., LESCHNER, S. u. WEISS, S. (2014): CXCR2-mediated tumor-associated neutrophil recruitment is regulated by IFN- $\beta$ . *Int J Cancer*

**1358**, 1346–1358.

- JANDUS, C., BIOLEY, G., SPEISER, D.E. u. ROMERO, P. (2008): Selective accumulation of differentiated FOXP3+ CD4+ T cells in metastatic tumor lesions from melanoma patients compared to peripheral blood. *Cancer Immunol Immunother* **57**, 1795–1805.
- JENSEN, T.O., SCHMIDT, H., MØLLER, H.J., DONSKOV, F., HØYER, M., SJOEGREN, P., CHRISTENSEN, I.J. u. STEINICHE, T. (2012): Intratumoral Neutrophils and Plasmacytoid Dendritic Cells Indicate Poor Prognosis and Are Associated with pSTAT3 Expression in AJCC Stage I / II Melanoma. *Cancer* 2476–2485.
- JOHNSON, D.B., ESTRADA, M. V., SALGADO, R., SANCHEZ, V., DOXIE, D.B., OPALENIK, S.R., VILGELM, A.E., FELD, E., JOHNSON, A.S., GREENPLATE, A.R., SANDERS, M.E., LOVLY, C.M., FREDERICK, D.T., KELLEY, M.C., RICHMOND, A., IRISH, J.M., SHYR, Y., SULLIVAN, R.J., PUZANOV, I., SOSMAN, J.A. u. BALKO, J.M. (2016): Melanoma-specific MHC-II expression represents a tumour-autonomous phenotype and predicts response to anti-PD-1/PD-L1 therapy. *Nat Commun* **7**, 1–10.
- JUNEJA, V.R., MCGUIRE, K.A., MANGUSO, R.T., LAFLEUR, M.W., COLLINS, N., HAINING, W.N., FREEMAN, G.J. u. SHARPE, A.H. (2017): PD-L1 on tumor cells is sufficient for immune evasion in immunogenic tumors and inhibits CD8 T cell cytotoxicity. *J Exp Med* **214**, 895–904.
- KENNEDY, K.M. u. DEWHIRST, M.W. (2010): Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic. *Futur Oncol* **6**, 1–32.
- KERKAR, S.P. u. RESTIFO, N.P. (2012): Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. *Cancer Res* **72**, 3125–3130.
- KIMPEL, J., URBIOLA, C., KOSKE, I., TOBER, R., BANKI, Z., WOLLMANN, G. u. LAER, D. VON. (2018): The oncolytic virus VSV-GP is effective against malignant melanoma. *Viruses* **10**, 1–16.
- KOMOHARA, Y., OHNISHI, K. u. TAKEYA, M. (2017): Possible functions of CD169-positive sinus macrophages in lymph nodes in anti-tumor immune responses. *Cancer Sci* **108**, 290–295.
- KONO, M., DUNN, I.S., DURDA, P.J., BUTERA, D., ROSE, L.B., HAGGERTY, T.J., BENSON, E.M. u. KURNICK, J.T. (2006): Role of the Mitogen-Activated Protein Kinase

- Signaling Pathway in the Regulation of Human Melanocytic Antigen Expression. *Am Assoc Cancer Res* **4**, 779–793.
- KORTYLEWSKI, M., KUJAWSKI, M., WANG, T., WEI, S., ZHANG, S., KERR, W.G., JOVE, R., PILON-THOMAS, S., NIU, G., KAY, H., MULE, J., PARDOLL, D. u. YU, H. (2005): Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med* **11**, 1314–1321.
- KURUPATI, R.K., ZHOU, X., XIANG, Z., KELLER, L.H. u. ERTL, H.C.J. (2018): Safety and immunogenicity of a potential checkpoint blockade vaccine for canine melanoma. *Cancer Immunol Immunother* **67**, 1533–1544.
- KUSMARTSEV, S., NEFEDOVA, Y., YODER, D. u. GABRILOVICH, D.I. (2004): Antigen-Specific Inhibition of CD8+ T Cell Response by Immature Myeloid Cells in Cancer Is Mediated by Reactive Oxygen Species. *J Immunol* **172**, 989–999.
- LANDE, R. u. GILLIET, M. (2010): Plasmacytoid dendritic cells : key players in the initiation and regulation of immune responses. *Ann N Y Acad Sci* **1183**, 89–103.
- LING, K.L., PRATAP, S.E., BATES, G.J., SINGH, B., MORTENSEN, N.J., GEORGE, B.D., WARREN, B.F., PIRIS, J., RONCADOR, G., FOX, S.B., BANHAM, A.H. u. CERUNDOLO, V. (2007): Increased frequency of regulatory T cells in peripheral blood and tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer patients. *Cancer Immun* **7**, 1–7.
- LIYANAGE, U.K., MOORE, T.T., JOO, H., TANAKA, Y., HERRMANN, V., DOHERTY, G., DREBIN, J.A., STRASBERG, S.M., EBERLEIN, T.J., GOEDEGEBUURE, P.S., LINEHAN, D.C., LIYANAGE, U.K., MOORE, T.T., JOO, H., TANAKA, Y., HERRMANN, V., DOHERTY, G., DREBIN, J.A., STRASBERG, S.M., EBERLEIN, T.J., GOEDEGEBUURE, P.S. u. LINEHAN, D.C. (2002): Prevalence of Regulatory T Cells Is Increased in Peripheral Blood and Tumor Microenvironment of Patients with Pancreas or Breast Adenocarcinoma. *J Immunol* 2756–2761.
- LORDA, S., PRESTIGIO, S., MANISCALCO, L., LA, G., ARICÒ, A., MARIA, R. De, CAVALLO, F., FERRONE, S., BURACCO, P. u. IUSSICH, S. (2011): Chondroitin sulfate proteoglycan-4 : A biomarker and a potential immunotherapeutic target for canine malignant melanoma q , qq. *Vet J* **190**, 26–30.
- LUGOVIĆ-MIHIĆ, L., ČESIĆ, D., VUKOVIĆ, P., BILIĆ, G.N., ŠITUM, M. u. ŠPOLJAR, S.

- (2019): Melanoma development: Current knowledge on melanoma pathogenesis. *Acta Dermatovenerologica Croat* **27**, 163–168.
- MA, M.W., MEDICHERLA, R.C., QIAN, M., VEGA-SAENZ DE MIERA, E., FRIEDMAN, E.B., BERMAN, R.S., SHAPIRO, R.L., PAVLICK, A.C., OTT, P.A., BHARDWAJ, N., SHAO, Y., OSMAN, I. u. DARVISHIAN, F. (2012): Immune response in melanoma: an in-depth analysis of the primary tumor and corresponding sentinel lymph node. *Mod Pathol* **25**, 1–18.
- MACFARLANE, M.J., MACFARLANE, L.L., SCASE, T., PARKIN, T. u. MORRIS, J.S. (2016): Use of neutrophil to lymphocyte ratio for predicting histopathological grade of canine mast cell tumours. *Vet Rec* 1–6.
- MAEKAWA, N., KONNAI, S., IKEBUCHI, R., OKAGAWA, T., ADACHI, M., TAKAGI, S., KAGAWA, Y., NAKAJIMA, C., SUZUKI, Y., MURATA, S. u. OHASHI, K. (2014): Expression of PD-L1 on canine tumor cells and enhancement of IFN- $\gamma$  production from tumor-infiltrating cells by PD-L1 blockade. *PLoS One* **9**.
- MAEKAWA, N., KONNAI, S., OKAGAWA, T., NISHIMORI, A., IKEBUCHI, R., IZUMI, Y., TAKAGI, S., KAGAWA, Y., NAKAJIMA, C., SUZUKI, Y., KATO, Y., MURATA, S. u. OHASHI, K. (2016): Immunohistochemical analysis of PD-L1 expression in canine malignant cancers and PD-1 expression on lymphocytes in canine oral melanoma. *PLoS One* **11**, 1–13.
- MAEKAWA, N., KONNAI, S., TAKAGI, S., KAGAWA, Y., OKAGAWA, T., NISHIMORI, A., IKEBUCHI, R., IZUMI, Y., DEGUCHI, T., NAKAJIMA, C., KATO, Y., YAMAMOTO, K., UEMURA, H., SUZUKI, Y., MURATA, S. u. OHASHI, K. (2017): A canine chimeric monoclonal antibody targeting PD-L1 and its clinical efficacy in canine oral malignant melanoma or undifferentiated sarcoma. *Sci Rep* **7**, 1–12.
- MAHMOUD, F., SHIELDS, B., MAKHOUL, I., AVARITT, N., WONG, H.K., HUTCHINS, L.F. u. SHALIN, S. (2017): Immune surveillance in melanoma : From immune attack to melanoma escape and even counterattack. *Cancer Biol Ther* **18**, 451–469.
- MAK, I.W.Y., EVANIEW, N. u. GHERT, M. (2014): Lost in translation: Animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am J Transl Res* **6**, 114–118.
- MANLEY, C.A., LEIBMAN, N.F., WOLCHOK, J.D., RIVIÈRE, I.C., BARTIDO, S., CRAFT,

- D.M. u. BERGMAN, P.J. (2011): Xenogeneic Murine Tyrosinase DNA Vaccine for Malignant Melanoma of the Digit of Dogs. *J Vet Intern Med* **25**, 94–99.
- MANTOVANI, A. u. SICA, A. (2010): Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol* **22**, 231–237.
- MANTOVANI, A., SOZZANI, S., LOCATI, M., ALLAVENA, P. u. SICA, A. (2002): Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* **23**, 549–555.
- MARIOTTI, F.R., QUATRINI, L., MUNARI, E., VACCA, P. u. MORETTA, L. (2019): Innate Lymphoid Cells : Expression of PD-1 and Other Checkpoints in Normal and Pathological Conditions. *Front Immunol* **10**, 1–9.
- MARTINEZ-POMARES, L. u. GORDON, S. (2012): CD169 + macrophages at the crossroads of antigen presentation. *Trends Immunol* **33**, 66–70.
- MARTINOVIĆ, K.M., MILIĆEVIĆ, M., LARSEN, A.K., DŽODIĆ, R., JURIŠIĆ, V., KONJEVIĆ, G. u. VULETIĆ, A. (2019): Effect of cytokines on NK cell activity and activating receptor expression in high-risk cutaneous melanoma patients. *Eur Cytokine Netw* **30**, 160–167.
- MIGNOGNA, C., SCALI, E., CAMASTRA, C., PRESTA, I., ZEPPA, P., BARNI, T., DONATO, G., BOTTONI, U. u. VITO, A. Di. (2017): Innate immunity in cutaneous melanoma. *Clin Exp Dermatol* 243–250.
- MISHALIAN, I., BAYUH, R., LEVY, L., ZOLOTAROV, L., MICHAELI, J. u. FRIDLENDER, Z.G. (2013): Tumor - associated neutrophils ( TAN ) develop pro - tumorigenic properties during tumor progression. *Cancer Immunol Immunother* 1745–1756.
- MONSHI, B., VUJIC, M., KIVARANOVIC, D., SESTI, A., OBERAIGNER, W., VUJIC, I., ORTIZ-URDA, S., POSCH, C., FEICHTINGER, H., HACKL, M. u. RAPPERSBERGER, K. (2015): The burden of malignant melanoma - Lessons to be learned from Austria. *Eur J Cancer* **56**, 45–53.
- MONTEIRO, L.N., RODRIGUES, M.A., GOMES, D.A., SALGADO, B.S. u. CASSALI, G.D. (2018): Tumour-associated macrophages : Relation with progression and invasiveness , and assessment of M1 / M2 macrophages in canine mammary tumours. *Vet J* **234**, 119–125.
- MOSMANN, T.R., CHERWINSKI, H., BOND, M.W., GIEDLIN, M.A. u. COFFMAN, R.L.

- (1986): Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**, 2348–2357.
- MUCHA, J., MAJCHRZAK, K., TACIAK, B., HELLMÉN, E. u. KRÓL, M. (2014): MDSCs Mediate Angiogenesis and Predispose Canine Mammary Tumor Cells for Metastasis via IL-28 / IL-28RA ( IFN- I ) Signaling. *PLoS One* **9**, 1–11.
- MUCHA, J., RYBICKA, A., DOLKA, I., SZYMANSKA, J., MANUALI, E., PARZENIECKA-JAWORSKA, M., KLUCINSKI, W. u. KRÓL, M. (2016): Immunosuppression in Dogs During Mammary Cancer Development. *Vet Pathol* **53**, 1147–1153.
- MUHSIN-SHARAFALDINE, M.-R., SAUNDERSON, S.C., DUNN, A.C. u. MCLELLAN, A.D. (2017): Melanoma growth and lymph node metastasis is independent of host CD169 expression. *Biochem Biophys Res Commun* **486**, 965–970.
- MURDOCH, C., MUTHANA, M., COFFELT, S.B. u. LEWIS, C.E. (2008): The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* **8**, 618–631.
- NADAL, C., BÉGUIN, J., BENCHEKROUN, G. u. ROUX, D. LE. (2018): The myeloid derived suppressor cells : Who are they ? Can they be used as a diagnostic tool to investigate metastasis in veterinary medicine ? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **61**, 5–8.
- NEVALA, W.K., VACHON, C.M., LEONTOVICH, A.A., SCOTT, C.G., THOMPSON, M.A. u. MARKOVIC, S.N. (2009): Evidence of systemic Th2 driven chronic inflammation in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* **15**, 1931–1939.
- NISHIMURA, H., NOSE, M., HIAI, H., MINATO, N. u. HONJO, T. (1999): Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* **11**, 141–151.
- NISHIYA, A.T., MASSOCO, C.O., FELIZZOLA, C.R., PERLMANN, E., BATSCHINSKI, K., TEDARDI, M.V., GARCIA, J.S., MENDONÇA, P.P., TEIXEIRA, T.F. u. DAGLI, M.L.Z. (2016): Comparative aspects of canine melanoma. *Vet Sci* **3**, 1–22.
- OHNISHI, K., KOMOHARA, Y., SAITO, Y., MIYAMOTO, Y., WATANABE, M., BABA, H. u. TAKEYA, M. (2013): CD169-positive macrophages in regional lymph nodes are associated with a favorable prognosis in patients with colorectal carcinoma. *Cancer Sci* **104**, 1237–1244.
- OSBORN, J.L. u. GREER, S.F. (2015): Metastatic Melanoma Cells Evade Immune Detection

- by Silencing STAT1. *Int J Mol Sci* **1**, 4343–4361.
- OSTRAND-ROSENBERG, S. u. SINHA, P. (2009): Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer. *J Immunol* **182**, 4499–4506.
- OTTNOD, J.M., SMEDLEY, R.C., WALSHAW, R., HAUPTMAN, J.G., KIUPEL, M. u. OBRADOVICH, J.E. (2013): A retrospective analysis of the efficacy of Oncept vaccine for the adjunct treatment of canine oral malignant melanoma. *Vet Comp Oncol* **219–229**.
- OUYANG, Z., WU, H., LI, L., LUO, Y., LI, X. u. HUANG, G. (2016): Regulatory T cells in the immunotherapy of melanoma. *Tumor Biol* **37**, 77–85.
- PALMOWSKI, M.J., HERMANS, I., DUNBAR, P.R. u. CERUNDOLO, V. (2002): The use of HLA class I tetramers to design a vaccination strategy for melanoma patients. *Immunol Rev* **188**, 155–163.
- PANDOLFI, F., CIANCI, R., LOLLI, S., DUNN, I.S., NEWTON, E.E., HAGGERTY, T.J., BOYLE, L.A. u. KURNICK, J.T. (2008): Strategies to overcome obstacles to successful immunotherapy of melanoma. *Int J Immunopathol Pharmacol* **21**, 493–500.
- PARKIN, J. u. COHEN, B. (2016): An Overview of the immune system. *Handb Clin Neurol* **133**, 61–76.
- PERRY, J.A., THAMM, D.H., EICKHOFF, J., AVERY, A.C. u. DOW, S.W. (2010): Increased monocyte chemotactic protein-1 concentration and monocyte count independently associate with a poor prognosis in dogs with lymphoma. *Vet Comp Oncol* **9**, 55–64.
- PHILLIPS, J.C., LEMBCKE, L.M., NOLTENIUS, C.E., NEWMAN, S.J., BLACKFORD, J.T., GROSENBAUGH, D.A. u. LEARD, A.T. (2012a): Evaluation of tyrosinase expression in canine and equine melanocytic tumors. *Am J Vet Res* **73**, 272–278.
- PHILLIPS, J.C., LEMBCKE, L.M., NOLTENIUS, C.E., NEWMAN, S.J., BLACKFORD, J.T., GROSENBAUGH, D.A. u. LEARD, T.A. (2012b): Evaluation of tyrosinase expression in canine and equine melanocytic tumors. *Am J Vet Res* **73**.
- PIRAS, L.A., RICCARDO, F., IUSSICH, S., MANISCALCO, L., GATTINO, F., MARTANO, M., MORELLO, E., MAYAYO, S.L., ROLIH, V., GARAVAGLIA, F., MARIA, R. De, LARDONE, E., COLLIVIGNARELLI, F., MIGNACCA, D., GIACOBINO, D., FERRONE, S., CAVALLO, F. u. BURACCO, P. (2016): Prolongation of survival of dogs with oral malignant melanoma treated by en bloc surgical resection and adjuvant CSPG4-antigen

- electrovaccination. *Vet Comp Oncol* **15**, 996–1013.
- PIRES, I. u. PRADA, J. (2011): Tumour-Associated Macrophages ( TAMs ) and Cox-2 Expression in Canine Melanocytic Lesions. In: *Melanoma in the Clinic - Diagnosis, Management and Complications of Malignancy*. 163–180.
- PITCOVSKI, J., SHAHAR, E., AIZENSHTEIN, E. u. GORODETSKY, R. (2017): Melanoma antigens and related immunological markers. *Crit Rev Oncol / Hematol* 1–68.
- POLLARD, J.W. (2004): Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature* **4**, 1–8.
- PORCELLATO, I., BRACHELENTE, C., PAOLIS, L. De, MENCHETTI, L., SILVESTRI, S., SFORNA, M., VICHI, G., IUSSICH, S. u. MECHELLI, L. (2019): FoxP3 and IDO in Canine Melanocytic Tumors. **56**, 189–199.
- PORCELLATO, I., SILVESTRI, S., MENCHETTI, L., RECUPERO, F., MECHELLI, L., SFORNA, M., IUSSICH, S., BONGIOVANNI, L., LEPRI, E. u. BRACHELENTE, C. (2020): Tumour-infiltrating lymphocytes in canine melanocytic tumours: An investigation on the prognostic role of CD3+ and CD20+ lymphocytic populations. *Vet Comp Oncol* **18**, 370–380.
- PROUTEAU, A. u. ANDRÉ, C. (2019): Canine Melanomas as Models for Human Melanomas: Clinical, Histological, and Genetic Comparison.
- PUCCI, F., GARRIS, C., LAI, C.P., NEWTON, A., PFIRSCHKE, C., ENGBLOM, C., ALVAREZ, D., SPRACHMAN, M., EVAVOLD, C., MAGNUSON, A., ANDRIAN, U.H. VON, GLATZ, K., BREAKFIELD, X.O., MEMPEL, T.R., WEISSLEDER, R. u. PITTET, M.J. (2016): SCS macrophages suppress melanoma by restricting tumor- derived vesicle–B cell interactions. *Science (80- )* **352**, 242–246.
- RAICA, M., CIMPEAN, A.M. u. RIBATTI, D. (2009): Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Eur J Cancer* **45**, 1924–1934.
- RAO, S., LANA, S., EICKHOFF, J., MARCUS, E., AVERY, P.R., MORLEY, P.S. u. AVERY, A.C. (2011): Class II Major Histocompatibility Complex Expression and Cell Size Independently Predict Survival in Canine B-Cell Lymphoma. *J Vet Intern Med* 1097–1105.
- RAPOSO, T., GREGÓRIO, H., PIRES, I., PRADA, J. u. QUEIROGA, F.L. (2012): Prognostic

- value of tumour-associated macrophages in canine mammary tumours. *Vet Comp Oncol* **12**, 10–19.
- RAPOSO, T.P., PIRES, I., CARVALHO, M.I., PRADA, J., ARGYLE, D.J. u. QUEIROGA, F.L. (2013): Tumour-associated macrophages are associated with vascular endothelial growth factor expression in canine mammary tumours. *Vet Comp Oncol* **13**, 464–474.
- RASTRELLI, M., TROPEA, S., ROSSI, C.R. u. ALAIBAC, M. (2014): Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. *In Vivo (Brooklyn)* **1012**, 1005–1011.
- RAZA, A., FRANKLIN, M.J. u. DUDEK, A.Z. (2010): Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *Am J Hematol* **85**, 593–598.
- RESENDE, R.R. u. ULRICH, H. (2013): Trends in stem cell proliferation and cancer research. In: *Trends in Stem Cell Proliferation and Cancer Research*. 479–501.
- RIBATTI, D. (2017): The concept of immune surveillance against tumors. The first theories. *Oncotarget* **8**, 7175–7180.
- RICCARDO, F., IUSSICH, S., MANISCALCO, L., MAYAYO, S.L., ROSA, G. LA, ARIGONI, M., MARIA, R. DE, GATTINO, F., LANZARDO, S., LARDONE, E., MARTANO, M., MORELLO, E., PRESTIGIO, S., FIORE, A., QUAGLINO, E., ZABARINO, S., FERRONE, S., BURACCO, P. u. CAVALLO, F. (2014): CSPG4-specific immunity and survival prolongation in dogs with oral malignant melanoma immunized with human CSPG4 DNA. *Clin Cancer Res* **20**, 3753–3762.
- RODECK, U. u. HERLYN, M. (1991): Growth factors in melanoma. *Cancer Metastasis Rev* **10**, 89–101.
- RODIG, S.J., GUSENLEITNER, D., JACKSON, D.G., GJINI, E., GIOBBIE-HURDER, A., JIN, C., CHANG, H., LOVITCH, S.B., HORAK, C., WEBER, J.S., WEIRATHER, J.L., WOLCHOK, J.D., POSTOW, M.A., PAVLICK, A.C., CHESNEY, J. u. HODI, F.S. (2018): MHC proteins confer differential sensitivity to CTLA-4 and PD-1 blockade in untreated metastatic melanoma. *Sci Transl Med* **3342**, 1–14.
- RODRÍGUEZ-CERDEIRA, C., GREGORIO, M.C., LÓPEZ-BARCENAS, A., SÁNCHEZ-BLANCO, E., SÁNCHEZ-BLANCO, B., FABBROCINI, G., BARDHI, B., SINANI, A. u. GUZMAN, R.A. (2017): Advances in Immunotherapy for Melanoma: A Comprehensive

- Review. *Mediators Inflamm* **2017**, 1–14.
- ROLIH, V., BARUTELLO, G., IUSSICH, S., MARIA, R. DE, QUAGLINO, E., BURACCO, P., CAVALLO, F. u. RICCARDO, F. (2017): CSPG4: A prototype oncoantigen for translational immunotherapy studies. *J Transl Med* **15**, 1–14.
- SAADEH, D., KURBAN, M. u. ABBAS, O. (2016): Plasmacytoid dendritic cell role in cutaneous malignancies. *J Dermatol Sci* 1–7.
- SACCANI, A., SCHIOPPA, T., PORTA, C., BISWAS, S.K., NEBULONI, M., VAGO, L., BOTTAZZI, B., COLOMBO, M.P., MANTOVANI, A. u. SICA, A. (2006): p50 Nuclear Factor- K B Overexpression in Tumor-Associated Macrophages Inhibits M1 Inflammatory Responses and Antitumor Resistance. *Am Assoc Cancer Res* 11432–11441.
- SAITO, Y., OHNISHI, K., MIYASHITA, A., NAKAHARA, S., FUJIWARA, Y., HORLAD, H., MOTOSHIMA, T., FUKUSHIMA, S., JINNIN, M., IHN, H., TAKEYA, M. u. KOMOHARA, Y. (2015): Prognostic Significance of CD169+ Lymph Node Sinus Macrophages in Patients with Malignant Melanoma. *Cancer Immunol Res* **3**, 1356–1364.
- SAKAGUCHI, S., SAKAGUCHI, N., ASANO, M., ITOH, M. u. TODA, M. (1995): Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* **155**, 1151 LP – 1164.
- SAKAI, K., MAEDA, S., YAMADA, Y., CHAMBERS, J.K., UCHIDA, K., NAKAYAMA, H., YONEZAWA, T. u. MATSUKI, N. (2018): Association of tumour-infiltrating regulatory T cells with adverse outcomes in dogs with malignant tumours. *Vet Comp Oncol* **1**, 330–336.
- SARBU, L., KITCHELL, B.E. u. BERGMAN, P.J. (2017): Safety of administering the canine melanoma DNA vaccine (Oncept) to cats with malignant melanoma – a retrospective study. *J Feline Med Surg* **19**, 224–230.
- SCHMID, F., BRODESSER, D., REIFINGER, M., FORTE, S., SEMP, P., EBERSPÄCHER-SCHWEDA, M.C., WOLSCHEK, M., BRANDT, S., KLEITER, M. u. PRATSCHER, B. (2019): Canine oral primary melanoma cells exhibit shift to mesenchymal phenotype and phagocytic behaviour. *Vet Comp Oncol* **17**, 211–220.

- SCHMITT, N., BENTEBIBEL, S.-E. u. UENO, H. (2014): Phenotype and Functions of Memory Tfh cells in Human Blood. *Trends Immunol* **35**, 436–442.
- SHANKARAN, V., IKEDA, H., BRUCE, A.T., WHITE, J.M., SWANSON, P.E., OLD, L.J. u. SCHREIBER, R.D. (2001): IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107–1111.
- SHERGER, M., KISSEBERTH, W., LONDON, C., OLIVO-MARSTON, S. u. PAPENFUSS, T.L. (2012): Identification of myeloid derived suppressor cells in the peripheral blood of tumor bearing dogs. *BMC Vet Res* **8**, 1–12.
- SHOJAEI, F., ZHONG, C., WU, X., YU, L. u. FERRARA, N. (2008): Role of myeloid cells in tumor angiogenesis and growth. *Trends Cell Biol* **18**, 372–378.
- SICA, A. u. BRONTE, V. (2007): Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest* **117**, 1155–1166.
- SIMPSON, R.M., BASTIAN, B.C., MICHAEL, H.T., WEBSTER, J.D., PRASAD, M.L., CONWAY, C.M., PRIETO, V.M., GARY, J.M., GOLDSCHMIDT, M.H., ESPLIN, D.G., SMEDLEY, R.C., PIRIS, A., MEUTEN, D.J., KIUPEL, M., LEE, C.C.R., WARD, J.M., DWYER, J.E., DAVIS, B.J., ANVER, M.R., MOLINOLO, A.A., HOOVER, S.B., RODRIGUEZ-CANALES, J. u. HEWITT, S.M. (2013): Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* **27**, 37–47.
- SINHA, P., CLEMENTS, V.K., BUNT, S.K., ALBELDA, S.M. u. OSTRAND-ROSENBERG, S. (2007): Cross-Talk between Myeloid-Derived Suppressor Cells and Macrophages Subverts Tumor Immunity toward a Type 2 Response. *J Immunol* **179**, 977–983.
- SINHA, P., CLEMENTS, V.K. u. OSTRAND-ROSENBERG, S. (2005): Reduction of Myeloid-Derived Suppressor Cells and Induction of M1 Macrophages Facilitate the Rejection of Established Metastatic Disease. *J Immunol* **175**, 636–645.
- SORNASSE, T., LARENAS, P., DAVIS, K.A., VRIES, J.E. DE u. YSSEL, H. (1996): Differentiation and Stability of T Helper 1 and 2 Cells Derived from Naive Human Neonatal CD4 + T Cells, Analyzed at the Single-cell Level. *J Exp Med* **184**, 473–483.
- SPRANGER, S., SPAAPEN, R.M., ZHA, Y., WILLIAMS, J., MENG, Y., HA, T.T. u. GAJEWSKI, T.F. (2013): Up-Regulation of PD-L1, IDO, and Tregs in the Melanoma

- Tumor Microenvironment Is Driven by CD8+ T Cells. *Sci Transl Med* **5**, 1–21.
- STELL, A.J., DOBSON, J.M., SCASE, T.J. u. CATCHPOLE, B. (2009): Evaluation of variants of melanoma-associated antigen genes and mRNA transcripts in melanomas of dogs. *Am J Vet Res* **70**, 1512–1520.
- SUCKOW, M.A. (2013): Cancer vaccines : Harnessing the potential of anti-tumor immunity. *Vet J* **198**, 28–33.
- SZNOL, M. u. CHEN, L. (2014): Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer. *Clin cancer Res* **19**, 1021–1034.
- TALMADGE, J.E. u. FIDLER, I.J. (2010): The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. *Cancer Res* **70**, 5649–5669.
- TAMURA, K., YAMADA, M., ISOTANI, M., ARAI, H., YAGIHARA, H., ONO, K., WASHIZU, T. u. BONKOBARA, M. (2008): Induction of dendritic cell-mediated immune responses against canine malignant melanoma cells. *Vet J* **175**, 126–129.
- TIZARD, I. (2017): *Veterinary Immunology*. 10. Aufl., Elsevier Inc., St. Louis, Missouri.
- TOBIN, R.P., JORDAN, K.R., KAPOOR, P., SPONGBERG, E., DAVIS, D., VORWALD, V.M., COUTS, K.L., GAO, D., SMITH, D.E., BORGERS, J.S.W., ROBINSON, S., AMATO, C., GONZALEZ, R., LEWIS, K.D., ROBINSON, W.A., BORGES, V.F. u. MCCARTER, M.D. (2019): IL-6 and IL-8 Are Linked With Myeloid-Derived Suppressor Cell Accumulation and Correlate With Poor Clinical Outcomes in Melanoma Patients. *Front Oncol* **9**, 1–12.
- TOMINAGA, M., HORIUCHI, Y., ICHIKAWA, M., YAMASHITA, M., OKANO, K., JIKUMARU, Y., NARIAI, Y. u. KADOSAWA, T. (2010): Flow Cytometric Analysis of Peripheral Blood and Tumor-Infiltrating Regulatory T Cells in Dogs with Oral Malignant Melanoma. *J Vet Diagnostic Investig* **22**, 438–441.
- TREGGIARI, E., GRANT, J.P. u. NORTH, S.M. (2016): A retrospective review of outcome and survival following surgery and adjuvant xenogeneic DNA vaccination in 32 dogs with oral malignant melanoma. *J Vet Med Sci* **78**, 845–850.
- TUREK, M., LADUE, T., LOOPER, J., NAGATA, K., SHIOMITSU, K., KEYERLEBER, M., BUCHHOLZ, J., GIEGER, T. u. HETZEL, S. (2020): Multimodality treatment including ONCEPT for canine oral melanoma: A retrospective analysis of 131 dogs. *Vet Radiol Ultrasound* **61**, 471–480.

- VACCA, P., PIETRA, G., TUMINO, N., MUNARI, E., MINGARI, M.C. u. MORETTA, L. (2020): Exploiting Human NK Cells in Tumor Therapy. *Front Immunol* **10**, 1–8.
- VANHERBERGHEN, M., DAY, M.J., DELVAUX, F., GABRIEL, A., CLERCX, C. u. PEETERS, D. (2009): An Immunohistochemical Study of the Inflammatory Infiltrate Associated with Nasal Carcinoma in Dogs and Cats. *J Comp Pathol* **141**, 17–26.
- VARNEY, M.L., JOHANSSON, S.L. u. SINGH, R.K. (2005): Tumour-associated macrophage infiltration, neovascularization and aggressiveness in malignant melanoma: Role of monocyte chemotactic protein-1 and vascular endothelial growth factor-A. *Melanoma Res* **15**, 417–425.
- VENINGA, H., BORG, E.G.F., VREEMAN, K., TAYLOR, P.R., KALAY, H., KOOYK, Y. VAN, KRAAL, G., MARTINEZ-POMARES, L. u. HAAN, J.M.M. DEN. (2015): Antigen targeting reveals splenic CD169 + macrophages as promoters of germinal center B-cell responses. *Eur J Immunol* 747–757.
- VERGANTI, S., BERLATO, D., BLACKWOOD, L., POLTON, G.A., ELDERS, R., DOYLE, R., TAYLOR, A. u. MURPHY, S. (2017): Use of Oncept melanoma vaccine in 69 canine oral malignant melanomas in the UK. *J Small Anim Pract* **58**, 10–16.
- VITALE, M., CANTONI, C., CHIESA, M. DELLA, FERLAZZO, G., MUCCIO, L., MARIA, A. DE, MARCENARO, E., MORETTA, L. u. SIVORI, S. (2019): An Historical Overview : The Discovery of How NK Cells Can Kill Enemies , Recruit Defense Troops , and More. *Front Immunol* **10**, 1–15.
- WANG, H.Y. u. WANG, R.-F. (2007): Regulatory T cells and cancer. *Curr Opin Immunol* **19**, 217–223.
- WARBURG, O. (1956): On the Origin of Cancer Cells. *Science (80- )* **123**, 309–314.
- WARBURG, O.H. (1931): The Metabolism of Tumours: Investigations from the Kaiser Wilhelm Institute for Biology, Berlin-Dahlem. *J Am Med Assoc* **96**.
- WASSERMAN, J., DIESE, L., VANGUNDY, Z., LONDON, C., CARSON, W.E. u. PAPENFUSS, T.L. (2012): Suppression of canine myeloid cells by soluble factors from cultured canine tumor cells. *Vet Immunol Immunopathol* **6**, 247–253.
- WEINHOUSE, S., WARBURG, O., BURK, D. u. SCHADE, A.L. (1956): On Respiratory Impairment in Cancer Cells. *Science (80- )* **124**, 267–272.

- WEYDEN, L. VAN DER, PATTON, E.E., WOOD, G.A., FOOTE, A.K., BRENN, T., ARENDS, M.J. u. ADAMS, D.J. (2016): Cross-species models of human melanoma. *J Pathol* **238**, 152–165.
- WHERRY, E.J., HA, S., KAECH, S.M., HAINING, W.N., SARKAR, S., KALIA, V., SUBRAMANIAM, S., BLATTMAN, J.N., BARBER, D.L. u. AHMED, R. (2007): Resource Molecular Signature of CD8 + T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection. *Immunity* **27**, 670–684.
- WHITESIDE, T.L. (2006): Immune suppression in cancer : Effects on immune cells , mechanisms and future therapeutic intervention. *Semin Cancer Biol* **16**, 3–15.
- WHITLEY, E.M., BIRD, A.C., ZUCKER, K.E. u. WOLFE, L.G. (1995): Modulation by canine interferon-gamma of major histocompatibility complex and tumor-associated antigen expression in canine mammary tumor and melanoma cell lines. *Anticancer Res* **15**, 923–929.
- YANG, L. u. ZHANG, Y. (2017): Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. *J Hematol Oncol* **10**, 1–12.
- YDE, S.S., SJOEGREN, P., HEJE, M. u. STOLLE, L.B. (2018): Mucosal Melanoma: a Literature Review. *Curr Oncol Rep* **20**, 1–10.
- YOUN, J.-I., NAGARAJ, S., COLLAZO, M. u. GABRILOVICH, D.I. (2008): Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor-Bearing Mice. *J Immunol* **181**, 5791–5802.
- ZHANG, J., QIAO, X., SHI, H., HAN, X. u. LIU, W. (2016): Circulating tumor-associated neutrophils ( cTAN ) contribute to circulating tumor cell survival by suppressing peripheral leukocyte activation. *Tumor Biol* 5397–5404.
- ZHU, J., YAMANE, H. u. PAUL, W.E. (2010): Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annu Rev Immunol* **28**, 445–489.
- ZULEGER, C.L., KANG, C., RANHEIM, E.A., KURZMAN, I.D., MACKLIN, M.D., NEWTON, M.A., WOLCHOK, J.D., VAIL, D.M., ERIKSSON, E. u. ALBERTINI, M.R. (2017): Pilot study of safety and feasibility of DNA microseeding for treatment of spontaneous canine melanoma. *Vet Med Sci* **3**, 134–145.