

Aus der Universitäts-Hautklinik Tübingen  
Sektion Dermatologische Onkologie

**Vergleich des antiproliferativen und  
zytokinininduzierenden Potenzials der Alpha-Interferone  
Multiferon und Roferon-A bei Patienten mit malignem  
Melanom**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Haase, Nicolas**

**2020**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler  
1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Weide  
2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Stubenrauch

Tag der Disputation: 08.09.2020

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das maligne Melanom .....	1
1.2 Therapie des malignen Melanoms .....	2
1.3 Interferon-alpha .....	3
1.4 Zytokine .....	9
IL-1alpha, IL-1beta und IL-1RA.....	10
Interleukin-6.....	12
Interleukin-15.....	13
Interleukin 17A (Interleukin-17).....	14
TNF-alpha .....	15
CXCL10 (IP 10).....	16
CCL2 (MCP-1) .....	17
CCL7 (MCP-3) .....	17
CCL3 (MIP-1alpha) .....	18
CCL4 (MIP-1beta) .....	19
CCL20 (MIP-3alpha) .....	19
1.5 Adjuvante Therapie.....	20
1.6 Zielsetzung der Dissertation .....	21
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
2.1 Zelllinien und Zellkultur .....	23
2.2 Melanomzellisolation aus Tumorgewebe .....	25
2.3 Immunhistochemie zum Nachweis von Melan A und HMB45.....	26
2.4 Separation und Isolierung von PBMCs aus Vollblut.....	27
2.5 Zytotoxizitäts- und Proliferationsassay (MUH-Assay) .....	29
2.6 Durchflusszytometrischer Nachweis des IFNAR-1 .....	30
2.7 Stimulation der PBMCs mit Multiferon/Roferon-A für die Zytokinanalyse.....	30
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
3.1 Patienten.....	32
3.2 Immunhistochemischer Nachweis von Melan A und HMB 45 .....	35
3.3 Expression des IFNAR-1 auf der Zelloberfläche der Melanomzellen.....	36
3.4 Direkte antiproliferative Effekte von Multiferon und Roferon-A .....	37

3.5 Zytokinprofil - Stimulation von PBMCs mit Multiferon und Roferon-A .....	40
IL-1beta.....	44
IL-1ra.....	45
IL-6.....	46
IL-15.....	47
IL-17a.....	48
IP 10.....	49
MCP-1.....	50
MCP-3.....	51
MIP-1alpha.....	52
MIP-1beta.....	53
MIP-3alpha.....	54
TNF-alpha.....	55
3.6 Kombinierte Effekte von Multiferon/Roferon-A und PBMCs auf die Proliferationsinhibition der Melanomzellen .....	56
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>72</b>
4.1 Direkte antitumorale Effekte von Multiferon und Roferon-A .....	72
4.1.1 Diskussion der Methode.....	72
4.1.2 Diskussion der direkten antitumoralen Effekte.....	73
4.1.3 Schlussfolgerung .....	78
4.2 Zytokinanalyse nach Stimulation von Patienten-PBMCs mit Multiferon und Roferon-A .....	79
4.2.1 Diskussion der Methode.....	79
4.2.2 Diskussion der Zytokine .....	81
4.2.2.1 Zytokine als mögliche prädiktive Marker .....	83
4.2.7 Schlussfolgerung .....	86
4.3 Kombinierte direkte und indirekte antiproliferative Effekte von Multiferon und Roferon-A .....	86
4.3.1 Diskussion der Methode – Berücksichtigung von antitumoralen Effekten von IL-2 und IL-7.....	86
4.3.2 Diskussion der antitumoralen Effekte von Multiferon und Roferon-A im autologen System aus PBMCs und Melanomzellen .....	87
4.3.3 Schlussfolgerung .....	89

<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>91</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>93</b>
<b>7. Anhang.....</b>	<b>111</b>
7.1 Tabellen .....	111
7.2 Danksagung .....	113
7.3 Eigenständigkeitserklärung.....	111

## Abkürzungsverzeichnis

5-AZA-dC	5-Aza-2'-deoxycytidine
AP-Polymer	alkaline phosphatase polymer
B78/H1	muriner-B16-Melanom-Subklon
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
bFGF	basic fibroblast growth factor
B-RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma
Cdk	cyclin-dependent kinase
Clod-Lip	liposome-encapsulated clodronate
CRK	adapter molecule crk
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
DMBA/TPA	7,12-Dimethylbenz[a]anthracen/12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
DMSO	dimethylsulfoxid
E:T	effector target ratio
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
FLK-1	fetal Liver Kinase 1
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HE	Hämatoxylin-Eosin
HMB45	human melanoma black 45
IFN	interferon
IFNAR	interferon- $\alpha/\beta$ receptor
IL	Interleukin
IL-1RA	IL-1Receptor-Antagonist
ISGF3	interferon-stimulated gene factor 3
ISRE	interferon stimulated response element
Jak-1	janus kinase-1
K1735	murine Melanomzelllinie
LAK	lymphokin-aktivierte-Killerzellen
Ly294002	selective inhibitor of phosphatidylinositol 3 (PI3) kinase
L-Zellen	L strain of Earle's mouse fibroblasts
MALT	mucosa-associated lymphoid tissue
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDSCs	myeloid derived suppressor cells
Melan A (MART-1)	melanoma antigen recognized by T cells 1
MHC	major histocompatibility complex
MO-MDSCs	monocyte myeloid-derived suppressor cells

Mt-ret	Metallothionein-I kontrollierte Ret-oncogene expression
MUH	4-Methylumbelliferylheptanoat
NFkappaB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
PD-1	programmed cell death protein 1
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PI3K	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SCID	severe combined immunodeficiency
SH2	src homology 2
SOCS	suppressor of cytokine signalling
STAT	signal transducers and activators of transcription
Th17-Zellen	T helper 17 cells
TNF-alpha	tumor necrosis factor alpha
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
Tyk-2	tyrosine kinase 2
VEGF	vascular endothelial growth factor
VSV	vesicular stomatitis virus
xMAP®	multi-analyte profiling

# 1. Einleitung

## 1.1 Das maligne Melanom

Das sich aus den Melanozyten oder melanozytären Nävuszellen entwickelnde Melanom gehört zu den malignen Tumoren der Haut und ist verantwortlich für ca. 90 % der Todesfälle, die auf kutane Tumoren zurückzuführen sind [1]. Die Aggressivität des Tumors begründet sich weniger in seiner lokalen Destruktivität, wie z. B. beim Basalzellkarzinom, als in der bezogen auf seine relative Tumorgroße bestehenden frühen Tendenz zur Metastasierung [2]. Bei etwa 5 % der Patienten finden sich zum Zeitpunkt der Erstdiagnose Metastasen, welche in ca. 1/5 der Fälle das regionäre Lymphabflussgebiet überschritten haben [3].

Der stetige Anstieg der Inzidenz des malignen Melanoms bei der hellhäutigen Bevölkerung hat dazu geführt, dass diese Tumorentität weltweit zu den 20 häufigsten Tumoren [4, 5] und in Deutschland mittlerweile zu den 10 häufigsten soliden Krebserkrankungen zählt [6]. Die Statistiken des Zentrums für Krebsregisterdaten belegen eine Verdreifachung der altersstandardisierten Erkrankungsrate von Frauen und Männern in Deutschland seit den 1980er Jahren [6]. Für das Jahr 2016 prognostizierte das Zentrum für Krebsregisterdaten eine Inzidenz<sup>1</sup> von 21,4 für Männer und 22,2 für Frauen [6]. Trotz des Anstieges der Inzidenz konnte eine relative Stabilisierung hinsichtlich der Mortalitätszahlen verzeichnet werden [6]. Diese lässt sich möglicherweise mit einer verbesserten Früherkennung [7] und der damit einhergehenden geringeren Tumordicke bei Erstdiagnose erklären, welche entscheidend zur Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung beiträgt.

Zu den Faktoren, die mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines malignen Melanoms assoziiert sind, gehören: Anzahl von melanozytären Nävi (> 100), Anzahl von atypischen melanozytären Nävi (> 5), Hauttyp 1 und 2, invasives Melanom bei einem oder mehreren Verwandten ersten Grades [8-10]. Als wichtigster exogener Risikofaktor gilt die Exposition gegenüber natürlichem und künstlichem UV-Licht [11]. Insbesondere scheinen eine starke intermittierende UV-Belastung [12, 13] und eine

---

<sup>1</sup> Anzahl der Neuerkrankungen pro Jahr bezogen auf 100.000 Einwohner.



hohe UV-Lichtexposition im Kindes- und Jugendalter die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Melanoms in späteren Jahren zu begünstigen [14, 15].

## **1.2 Therapie des malignen Melanoms**

Die Therapie des malignen Melanoms richtet sich nach der Ausbreitung des Tumors zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. Die chirurgische Resektion stellt sowohl im nicht metastasierten als auch im metastasierten Stadium die bislang einzige kurative Therapiemöglichkeit dar. Für Patienten, die nach der chirurgischen Resektion ein erhöhtes Rezidivrisiko aufweisen, besteht die Möglichkeit einer adjuvanten Therapie mit IFN- $\alpha$  (s. Kapitel 1.4). Bei Tumorabsiedlungen, die die lokoregionären Lymphknoten überschreiten und keiner kurativen chirurgischen Therapie mehr zugänglich sind, stehen für die Patienten zum gegenwärtigen Zeitpunkt mehrere neue Medikamente zur Verfügung, die zu einer Verlängerung des Gesamtüberlebens beitragen können. Mit dem selektiven B-RAF-Inhibitor (Vemurafenib) steht seit der Zulassung im Februar 2012 in Europa erstmals eine zielgerichtete molekulare Therapie zur Verfügung, die bei V600-B-RAF-Mutationen eingesetzt werden kann. Diese Mutationen finden sich bei ca. 40-60 % aller Melanome [16, 17]. Bei Patienten, deren Melanome diese Mutationen aufweisen, haben die B-RAF-Inhibitoren (Vemurafenib, Dabrafenib) bereits die Chemotherapie aufgrund von deutlich besseren Gesamtüberlebensraten und objektiven Ansprechraten als Therapie der Wahl abgelöst [18, 19].

Weitere Therapieoptionen stehen mit den relativ neuen Immuntherapeutika, einem CTLA-4-Antikörper (Ipilimumab) und den PD-1-Antikörpern (Nivolumab, Pembrolizumab), zur Verfügung, welche über die Blockade der Immuncheckpoints (CTLA-4 bzw. PD-1) eine verstärkte T-Zell-Antwort induzieren. Seit Mitte 2015 sind auch in Europa die PD-1-Antikörper für die Behandlung des fortgeschrittenen Melanoms zugelassen. Die Studien, die bereits Ende 2014 zur Zulassung in den USA führten, wiesen eine 3-Jahres-Überlebensrate von ca. 41 % nach [20, 21]. Durch die neuen Medikamente ergeben sich auch neue mögliche Kombinationstherapien (CTLA-4-Antikörper + PD-1-Antikörper), die derzeit in Studien untersucht werden und teilweise schon vielversprechende Ergebnisse erzielen konnten (medianes Überleben von ca. 40 Monaten) [22].

Darüber hinaus können auch strahlentherapeutische Verfahren zur Behandlung des malignen Melanoms bei nicht resezierbaren Primärtumoren, nach Lymphknotenresektion, bei lokoregionären Metastasen und bei Fernmetastasen eingesetzt werden [23]. Aufgrund der geringen objektiven Ansprechraten (7-12 %) der Monochemotherapie gelangt diese nur noch zur Anwendung, wenn die oben genannten neuen Substanzen und neuartigen Therapien nicht wirken oder aufgrund von relativen oder absoluten Kontraindikationen nicht verwendet werden können [23].

### **1.3 Interferon-alpha**

Bereits im Jahre 1957 entdeckten die Virologen Isaacs und Lindenmann eine Substanz, die Hühnerembryo-Zellen vor der Infektion mit dem Influenza-Virus schützte, und nannten diese Interferon [24]. In den nachfolgenden Jahren rückten neben den antiviralen Effekten zunehmend auch die antiproliferativen und immunmodulierenden Eigenschaften der Alpha-Interferone in den Fokus der wissenschaftlichen Forschung. Interferon- $\alpha$ 2b und Interferon- $\alpha$ 2a wurden erstmals 1986 in den USA zur Behandlung der Haarzelleukämie zugelassen. Seitdem finden die Alpha-Interferone bei zahlreichen verschiedenen Neoplasien mit unterschiedlichem Erfolg ihre Anwendung (s. Anhang Tab 1).

### **Aufbau und Subtypen**

Die prinzipiell von allen kernhaltigen Zellen, aber in großen Mengen insbesondere von den plasmacytoiden dendritischen Zellen [25] sezernierten Alpha-Interferone gehören zur Gruppe der Glykoproteine und bestehen aus 165-166 Aminosäuren. Bisher ließen sich 12 aktive verschiedene Alpha-Interferon-Varianten identifizieren (IFN- $\alpha$ 1, -2, -4, -5, -6, -7, -8, -10, -14, -16, -17 und -21), die von 13 funktionellen Genen kodiert werden [26]. Die Diskrepanz zwischen der Anzahl an Genen und unterschiedlichen Proteinen erklärt sich durch 2 Gene (IFNA1, IFNA13), die für dasselbe Alpha-Interferon-Protein kodieren. Neben den 12 verschiedenen Subtypen konnten auch mehrere allelische Genvarianten beschrieben werden. Das in unseren Versuchen verwendete Alpha-Interferon Multiferon® enthält mehrere Subtypen ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 8,  $\alpha$ 10,  $\alpha$ 14,  $\alpha$ 21) und wurde mit Roferon-A®, welches nur den Subtyp Interferon- $\alpha$ 2a enthält, verglichen. Die unterschiedlichen Subtypen der Alpha-Interferone werden von dem Interferonrezeptor gebunden und vermitteln ihre Effekte über den JAK-STAT-Signalweg.

## Der Jak-STAT-Signalweg

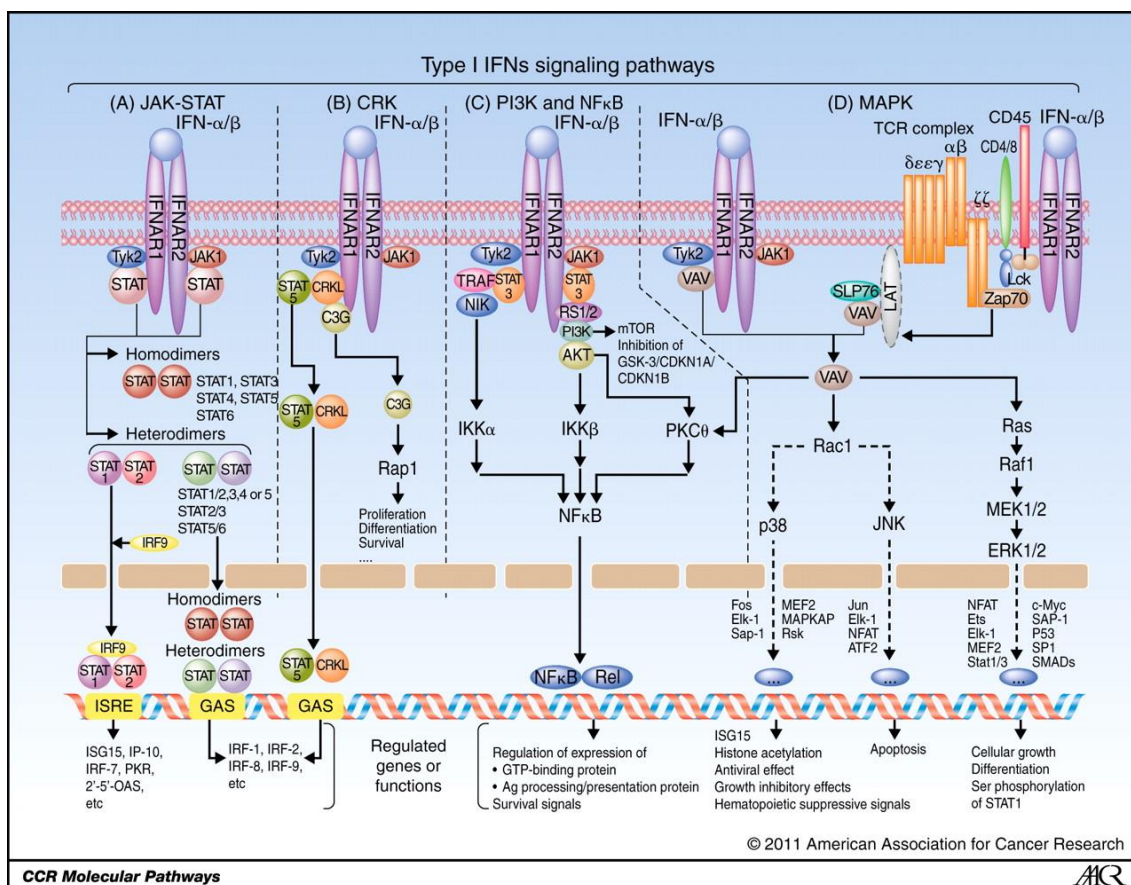


Abb. 1: Typ I IFN-Signalwege [27]

Für die Initiierung der Signalkaskade und Weiterleitung des extrinsischen und intrinsischen Signals sind die mit einer Rezeptortyrosinkinase (Tyk-2) und einer Januskinase assoziierten Ketten (IFNAR-1, IFNAR-2) des Interferonrezeptors erforderlich [28-30]. Durch die Bindung von Interferon-alpha kommt es zur Dimerisierung der beiden Rezeptorketten und zur Aktivierung der assoziierten Rezeptorkinasen (Tyk-2 und Jak-1), die für die Phosphorylierung von Tyrosinresten der intrazellulären Rezeptorketten verantwortlich sind [31]. Die Phosphotyrosinreste werden somit zu Andockstellen für SH2 (src homology 2) und andere Liganden wie z. B. STAT-Proteine, die bevorzugt an phosphorylierte Rezeptordomänen binden.

Die STAT-Proteine gehören zu der Familie der zyttoplasmatischen Transkriptionsfaktoren, welche stets im Zytoplasma vorhanden und an der

Signaltransduktion von Zytokinen, Hormonen und Wachstumsfaktoren beteiligt sind [32]. Bislang sind 7 Subtypen der STAT-Proteinfamilie bekannt: STAT-1, STAT-2, STAT-3, STAT-4, STAT-5a, STAT-5b und STAT-6. Nach der Phosphorylierung der verschiedenen Subtypen dissoziieren diese und bilden miteinander Homo- oder Heterodimere aus. Der STAT-1-STAT-2-P48-Komplex (ISGF3) bindet im Nucleus der Zelle an die interferonabhängigen Promotoren, die ISRE's der DNA und initiiert somit die Transkription von verschiedenen Genen [33, 34]. Bisher ließen sich mehrere 100 Gene identifizieren, die in Abhängigkeit von Interferon-Alpha induzierbar sind [35]. Welche Gene exprimiert werden, hängt dabei entscheidend vom Zelltyp ab [36]. Weitere wichtige Signalwege, die einer Regulation durch Typ 1 Interferone unterliegen können, sind PI3K [37, 38], MAPK [39, 40] und CRK [41, 42].

### **Direkte antitumorale Effekte**

Die antiproliferative Wirkung der Interferone, die erstmals an Fibroblasten (L-Zellen) beobachtet wurde [43], konnte in zahlreichen nachfolgenden Experimenten auch für Interferon-alpha und seine Wirkung auf verschiedene transformierte Zelllinien bestätigt werden [44]. Hinreichende Belege für die direkten antitumoralen Effekte der Alpha-Interferone gegenüber dem malignen Melanom finden sich sowohl in vitro als auch in vivo [44-49]. Der Wirkmechanismus, dem diese antitumoralen Effekte zugrunde liegen, scheint jedoch kein universeller, sondern ein von weiteren Faktoren wie dem Differenzierungsgrad oder dem Ursprung der Zelle abhängiger zu sein. Die bisher bei verschiedenen transformierten Zelltypen beschriebenen antitumoralen Effekte der Alpha-Interferone umfassen sowohl apoptotische, den Zellzyklus regulierende und zytotoxische Effekte. Für die multiple Myelomzelllinie U266 konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Behandlung mit Interferon-alpha die Apoptose induzierte und mit der Aktivierung der proapoptotischen Proteine Bak und Bax assoziiert war [50].

In einer weiteren Studie mit der U266 Myelomzelllinie erfolgte der Nachweis, dass die apoptotischen Effekte PI3K und mTOR abhängig vermittelt werden, da die Hemmung des PI3K-Signalweges mit Ly294002 und die Hemmung von mTOR mit Rapamycin die zuvor beobachteten apoptotischen Effekte aufhob [51].

Ein weiterer antitumoraler Wirkmechanismus der Alpha-Interferone kann in der Regulation verschiedener Phasen des Zellzyklus bestehen. So konnte bei der Mehrzahl von mit Interferon-alpha behandelten transformierten hämatopoetischen Zelllinien ein Zellzyklusarrest in der G1-Phase nachgewiesen werden [52]. Auch bei Nierenkarzinomzellen, die mit Interferon-alpha behandelt wurden, zeigte sich ein Zellzyklusarrest in der G1-Phase [53]. Es ließ sich hier allerdings keine Induktion der Apoptose beobachten [53]. Mögliche Mechanismen der Induktion des Zellzyklusarrestes in der G1-Phase umfassten die verstärkte Expression der Cdk-Inhibitoren p19 und p21 in Maus-Makrophagen [54] und die verstärkte Induktion von p15 und p27 bei verschiedenen lymphoiden Zelllinien [55, 56]. An Burkitt-Lymphom-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit Interferon-alpha durch die Suppression von Cyclin D3 und cdc25A zum Eintritt der Zellen in eine G0-ähnliche Phase führte und nach Beendigung der Interferon-alpha-Therapie reversibel war [57].

Die bisher beim malignen Melanom nach der Behandlung mit Interferon-alpha beschriebenen antitumoralen Effekte umfassten nur in Ausnahmefällen die Induktion der Apoptose [49, 58]. In der Mehrzahl der Studien hingegen ließ sich bei der Verwendung von Interferon-alpha als singular wirkendes Agens keine signifikante Induktion der Apoptose beobachten [59, 60]. Durch die Kombination von Interferon-alpha mit anderen Wirkstoffen wie z. B. Bortezomib, 5-AZA-dC oder Cisplatin ließen sich allerdings synergistische apoptotische Effekte erzielen [61-63]. Eine mögliche Rolle hierbei könnte die Sensitivierung der Zellen für die Apoptose durch eine vermehrte Expression von proapoptotischen Faktoren spielen, die sich in mehreren Studien nachweisen ließ [59, 64-68]. An Hepatom- und Melanomzellen konnte z. B. auch gezeigt werden, dass der Tumorsuppressor p53 durch Interferon-alpha induzierbar zu sein scheint [63, 69].

### **Indirekte / Immunmodulatorische antitumorale Effekte**

Die pleiotropen immunologischen Mechanismen, die durch Interferon-alpha induziert bzw. modifiziert werden und entscheidend zur antitumoralen Wirksamkeit dieses Zytokins beitragen könnten, sollen im folgenden Abschnitt vor allem in Bezug auf das maligne Melanom dargestellt werden.

Im Zusammenhang mit dem malignen Melanom und anderen Tumoren mehren sich in den letzten Jahren die Hinweise, dass die bekannte antitumorale Wirksamkeit der Alpha-Interferone im Organismus (beim Melanom) vielmehr auf immunmodulierenden (indirekten) Effekten als auf direkten Effekten beruht [70, 71]. Die fundamentale Bedeutung der endogenen Produktion von Typ-I-Interferonen für die immunvermittelte Tumorabwehr zeigte sich unter anderem bei Versuchen mit Knock-out-Mäusen, die keinen Interferon-I-Rezeptor (IFNAR-1) exprimierten. An diesen Mäusen konnte im Vergleich zu den gesunden Wildtyp-Mäusen der Kontrollgruppe eine deutlich schnellere Entwicklung von syngen und allogenen transplantierten Melanomen und Lymphomen beobachtet werden [72].

Eine grundlegende Voraussetzung für die Erkennung von Tumorzellen durch das Immunsystem und die Initiierung einer spezifischen zytotoxischen T-Zell-Antwort bildet die Präsentation von tumorspezifischen Peptiden mithilfe von MHC-I-Rezeptoren. Interferon-alpha induziert eine gesteigerte Expression dieser Rezeptoren sowohl auf normalen Körper- als auch auf Melanom- und verschiedenen anderen Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* [73-75] und führt somit zu einer potenziell verbesserten Erkennbarkeit der Tumorzellen durch das Immunsystem.

Bei der Behandlung des JB/MS murinen Melanoms in SOCS-1- und Interferon-gamma-defizienten Mäusen zeigte sich, dass Alpha-Interferone ihre antitumoralen Effekte im Wesentlichen über CD-8<sup>+</sup>- und CD-4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten vermitteln. So führte die Zugabe von Antikörpern gegen CD-8<sup>+</sup>- bzw. CD-4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten zur Aufhebung der zuvor beobachteten antitumoralen Effekte von Interferon-alpha [76]. Diese Studie belegt ebenfalls die Wichtigkeit des Interferon-I-Signalweges für die antitumoralen Effekte der Alpha-Interferone, da sich durch das Abschalten des SOCS-Genes, welches für Proteine kodiert, die unter physiologischen Bedingungen durch negative Rückkopplung eine übermäßige Aktivierung des Interferon-Signalweges verhindern, signifikant verstärken ließen. Eine weitere Studie weist auf die mögliche Bedeutung dieses Signalweges in CD-8<sup>+</sup>- bzw. CD-4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten hin. Die Analyse von B- und T-Zellen von Melanompatienten erbrachte den Nachweis, dass der Interferon-Signalweg im Vergleich

zu Lymphozyten von gesunden Spendern signifikant herunterreguliert war und die Expression der Interferon-I-abhängigen Gene ebenfalls signifikant geringer ausfiel [77].

Eine weitere wichtige Zellpopulation für die Vermittlung der Interferon-alpha-abhängigen antitumoralen Effekte sind die dendritischen Zellen. Neben der Fähigkeit, Antigene und darunter auch tumorspezifische Antigene zu präsentieren und somit eine gerichtete Immunantwort zu generieren, konnte gezeigt werden, dass dendritische Zellen nach Stimulation mit Interferon-alpha – unter anderem durch die Sezernierung von IL-6 – regulatorische T-Zellen im Tumorgewebe hemmen können und somit indirekt zu einer verlängerten und verstärkten Antwort von tumorspezifischen T-Zellen beitragen [78]. Weiterhin erfolgte in dieser Studie der Nachweis, dass der intratumorale Gentransfer von Interferon-alpha nach der hämatopoetischen Stammzelltransplantation und der darauffolgenden Lymphopenie-induzierten homöostatischen Proliferation zu einer signifikanten Tumorsuppression führte. Dies betraf sowohl Tumoren, die mit dem Alpha-Interferon-Vektor transfiziert, als auch entfernte Tumoren, die nicht transfiziert wurden. Auch hier konnten CD-8<sup>+</sup>, CD-4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten und NK-Zellen für die antitumoralen Effekte verantwortlich gemacht werden.

In einer weiteren Studie ließ sich zudem ein deutlicher Trend für die Reduktion der Anzahl von regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut von Melanompatienten nachweisen, bei denen zuvor die Induktionsphase einer Hochdosis-Interferontherapie begonnen wurde. Die Daten zur prognostischen Relevanz der Konzentration der regulatorischen T-Zellen hinsichtlich des Gesamtüberlebens und des rezidivfreien Überlebens lagen allerdings noch nicht vor [79]. Indem Alpha-Interferone die Differenzierung von Monozyten in dendritische Zellen induzieren [80], generieren sie die Voraussetzung für die oben genannten antitumoralen Mechanismen. Wie In-vitro-Experimente zeigen konnten, sind Interferon-alpha-aktivierte Monozyten in der Lage, verschiedene Tumorzelllinien zu eradizieren [81]. Aber auch in tierexperimentellen Versuchen gelang der Nachweis, dass Monozyten durch Interferon-alpha aktiviert werden können. So entwickelten sich bei immundefizienten (SCID) Mäusen durch die frühe Gabe von Interferon-alpha, Interferon-gamma und Monozyten signifikant kleinere Tumore und die Mäuse überlebten länger [82].

Hinsichtlich der Suszeptibilität von NK-Zellen für Interferon-alpha erfolgte der Nachweis, dass der Interferon-Typ-I-Signalweg zwar für die Ausreifung von NK-Zellen benötigt wird, nicht jedoch für die Induktion von antitumoralen Antworten gegenüber dem B16F10-Melanommodell [83]. Die bei verschiedenen Melanomzelllinien nachgewiesene verminderte Sekretion von VEGF nach der Behandlung mit Interferon-alpha könnte für die beschriebenen antiangiogenetischen Effekte der Alpha-Interferone verantwortlich sein [84, 85]. Auch nach der Behandlung von neuroendokrinen Tumorzelllinien mit Interferon-alpha ließ sich eine verminderte Transkription des VEGF-Gens beobachten [86]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Interferon-alpha die Produktion von verschiedenen anderen Zytokinen induziert [87], welche wiederum direkte oder indirekte antitumorale Wirkungen vermitteln können.

#### **1.4 Zytokine**

Der Begriff der Zytokine umfasst eine heterogene Gruppe (Interferone, Interleukine, Chemokine, Monokine, Wachstumsfaktoren) von löslichen, niedermolekularen Proteinen (ca. 25kDa), die von verschiedenen Zellen als Antwort auf einen aktivierenden Stimulus sezerniert werden können und unter physiologischen/pathologischen Bedingungen die funktionelle Aktivität von Zellen bzw. Geweben modulieren, indem sie Wachstum, Angiogenese, Entzündungsreaktionen, Immunregulation und Differenzierung (s. Hämatopoese) beeinflussen [88-90]. Die Wirkung dieser Signalmoleküle wird über spezifische Zytokinrezeptoren vermittelt und variiert in Abhängigkeit der Zielzelle und ihrer Umgebung. So kann die Wirkung der Zytokine neben der auto- und parakrinen auch auf der endokrinen Ebene erfolgen.

Seit Rudolf Virchow im Jahre 1863 die Anwesenheit von Leukozyten im Tumorgewebe beschrieb [91], konnte nicht nur die Assoziation von chronischen Entzündungsprozessen im Gewebe und das Auftreten von bestimmten Tumoren bestätigt, sondern auch ein kausaler Zusammenhang beider Prozesse für bestimmte Tumorentitäten (Gallenblasenkarzinom, HCC, MALT-Lymphome) belegt werden. Viele Faktoren deuten darauf hin, dass die im Rahmen des chronischen Entzündungsprozesses gebildeten Zytokine im Tumormikromilieu direkt und durch die



hervorgerufene lokale Immunsuppression auch indirekt zur Proliferation, Migration und zum Überleben von Tumorzellen beitragen. Diese Prozesse werden durch eine Vielzahl von Zytokinen reguliert, die sowohl von den Tumorzellen selbst als auch von den infiltrierenden Immunzellen und den umliegenden Stromazellen sezerniert werden können. Die Expression von bestimmten Zytokinen und Zytokinrezeptoren steht im Zusammenhang mit molekularen Prozessen, die die Metastasierung des Melanoms fördern oder auch hemmen können [92]. Bestimmte proinflammatorische Zytokine scheinen bei Melanompatienten auch das Ansprechen auf eine Therapie mit Interferon-alpha abzuschwächen [93].

### **Funktionen der Zytokine im Kontext des malignen Melanoms**

Im folgenden Abschnitt sollen die in der Zytokinanalyse bestimmten Zytokine und ihre wichtigsten bekannten Funktionen hinsichtlich tumoraler Prozesse beim malignen Melanom dargestellt werden.

### **IL-1alpha, IL-1beta und IL-1RA**

IL-1 zählt zu den proinflammatorischen Zytokinen und umfasst die Subtypen IL-1alpha und IL-1beta. Beide Proteine weisen weitestgehend äquivalente biologische Wirkungen auf und vermitteln diese durch denselben Rezeptorkomplex. Allerdings unterscheiden sich die Subtypen hinsichtlich ihrer Wirkebene, wobei IL-1alpha im Zytosol lokalisiert oder mit der Plasmamembran assoziiert ist und IL-1beta seine Wirkung auch auf systemischer Ebene entfalten kann [94]. IL-1RA wirkt als physiologischer Antagonist von IL-1alpha/beta, indem es kompetitiv und ohne intrinsische Aktivität an den IL-1-Rezeptor bindet. Hinsichtlich der Funktion von IL-1 im Zusammenhang mit der Tumorgenese und Tumorpromotion beim malignen Melanom und anderen Tumoren weist die Mehrzahl der bisherigen Studien IL-1 deutliche protumorale Wirkungen zu.

In Gewebeproben von 170 Melanompatienten erfolgte der immunhistochemische Nachweis, dass IL-1alpha bzw. IL-1beta in 98 % bzw. 13 % der primären und in 55 % bzw. 9,8 % der metastatischen Melanome exprimiert wurde [95]. IL-1 scheint nicht nur

an der Vermittlung der physiologischen Diapedese von Leukozyten beteiligt zu sein, sondern durch die Regulation der Expression von Adhäsionsmolekülen auch bei der Adhäsion von Melanomzellen und anderen Tumorzellen an Endothelzellen (IL-1alpha) eine wichtige Rolle zu spielen [96-101]. Im Einklang mit diesen Beobachtungen ließ sich demonstrieren, dass Mäuse mit Mutationen im IL-1beta-Gen nach intrasplener Applikation von B-16-Melanomzellen signifikant weniger Lebermetastasen entwickelten als die Wildtyp-Mäuse der Kontrollgruppe [102]. Auch eine weitere Studie belegte, dass der positive immunhistochemische Nachweis von IL-1alpha in Paraffinschnitten von Magenkarzinomen signifikant mit dem Auftreten von Lebermetastasen korrelierte (22,7 % vs. 2,5 %) [103].

Hinsichtlich der Beeinflussung von immunologischen Prozessen erfolgte der Nachweis, dass IL-1alpha und IL-1beta an der Herunterregulation von melanozytenspezifischen Differenzierungsantigenen beteiligt sind und somit eine mögliche Erkennung von Melanomzellen durch zytotoxische T-Zellen erschwert wird [104]. Die Infiltration von Makrophagen in das Gewebe von Melanomen scheint mit dem Grad des Tumors und dem Grad der Angiogenese zu korrelieren. Für den Effekt der Infiltration von Makrophagen in das Tumorgewebe werden IL-1alpha und TNF- $\alpha$ -abhängige Mechanismen verantwortlich gemacht [105].

Weiterhin ließ sich zeigen, dass die Transplantation von IL-1beta sezernierenden Fibrosarkomzellen in Mäusen zur Akkumulation von CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> unreifen MDSCs (myeloid derived suppressor cells) führte und eine generalisierte Immunsuppression zur Folge hatte, die das Tumorstadium begünstigte [106]. Im Einklang mit diesen Beobachtungen erfolgte der Nachweis, dass die B-RAF-Mutation, die in 40-60 % der Melanome zu finden ist, durch die Regulation der IL-1-Sekretion eine bedeutende Rolle bei der lokalen Immunsuppression im Tumormikromilieu zu spielen scheint [107]. Diese Studie belegte, dass die Transfektion von primären humanen Melanozyten und verschiedenen Melanomzelllinien mit dem für die B-RAF-Mutation V600E kodierenden Vektor zu einer deutlichen Steigerung der IL-1-Sekretion führte. Bei der nachfolgenden Behandlung der tumorassoziierten Fibroblasten der Melanompatienten mit IL-

1alpha/beta konnte eine verminderte Funktion und ein reduziertes Wachstum von melanomspezifischen zytotoxischen T-Zellen beobachtet werden.

Analog zu den oben beschriebenen protumoralen Effekten von IL-1alpha/beta konnten im Gegenzug in bisher veröffentlichten Studien zur Wirkung von IL-1RA vorwiegend antitumorale Effekte nachgewiesen werden. An Mäusen mit dem B16-Melanom führte die kontinuierliche Freisetzung von IL-1RA mithilfe von „biodegradable microspheres“ zu einer deutlichen Verringerung der Angiogenese, der Tumorlast und der Metastasenbildung in der Lunge [108]. Auch in einer weiteren Studie zeigten sich nach der Transfektion des IL-1Ra-Genes in zwei Melanomzelllinien, die zuvor eine hohe (SMEL) bzw. niedrige (PMEL) IL-1-Produktion aufwiesen, signifikant weniger Lungenmetastasen [109]. Eine weitere Studie konnte belegen, dass insbesondere das metastatische Potenzial von B16-Melanomzellen durch die vorherige Gabe von IL-1Ra um 73-87 % reduziert werden konnte [110].

### **Interleukin-6**

Ebenfalls den proinflammatorischen Zytokinen zugehörig ist IL-6. Neben der Induktion der Produktion von Akute-Phase-Proteinen in der Leber beeinflusst IL-6 auch die Differenzierung und das Wachstum von B-Zellen sowie die Proliferation von T-Zellen. Im Hinblick auf das maligne Melanom ließ sich an einem Mt-ret Melanommodell zeigen, dass die Mäuse, die das IL-6-Gen nicht exprimierten, signifikant weniger und signifikant kleinere Melanome entwickelten als die Mt-ret-Mäuse, die IL-6 exprimierten [111]. In einer weiteren Studie, bei der ebenfalls das ret-Melanommodell zur Anwendung kam, konnte ein signifikant erhöhter Serumlevel von IL-6 im Vergleich zu den gesunden Mäusen vom Wildtyp nachgewiesen werden. Durch die Zugabe von IL-6 ins Kulturmedium wurden zudem dendritische Zellen generiert, die verminderte tumorreaktive Eigenschaften aufwiesen [112]. Überdies konnten mehrere retrospektive Studien an Melanompatienten einen möglichen Nutzen von IL-6 als prognostischen Marker belegen [113-115].

## **Interleukin-15**

IL-15 zählt zu den proinflammatorischen Zytokinen und induziert unter anderem die Proliferation und Aktivierung von T- sowie NK-Zellen [116]. Darüber hinaus scheint IL-15 ein wichtiger Faktor für das Überleben von Gedächtnis-CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu sein [117, 118]. Die bisher veröffentlichten Studien zur Rolle von IL-15 im Kontext des malignen Melanoms weisen IL-15 überwiegend antitumorale Eigenschaften zu. So konnte gezeigt werden, dass sich mit IL-15 stimulierten PBMCs, die zuvor von unbehandelten Melanompatienten isoliert wurden, eine durch Lymphokin-aktivierte-Killerzellen (LAK) vermittelte antitumorale Antwort gegenüber autologen Melanomzellen induzieren ließ [119]. Weiterhin erfolgte der Nachweis in einem B16F10-Melanom-Mausmodell, dass die gesteigerte Expression von IL-15 in transgenen Mäusen zu einer erhöhten Resistenz gegenüber injizierten B16F10 Melanomzellen führte [120].

Im Einklang mit diesen Beobachtungen ließ sich auch in einer weiteren Studie mit dem B16F10-Melanom-Mausmodell belegen, dass die Überexpression von IL-15 in transgenen Mäusen zu einem signifikant geringeren Tumorwachstum und einer signifikant geringeren Metastasierungsrate im Vergleich zu den IL-15<sup>-/-</sup>-Mäusen der Kontrollgruppe führte [121]. Eine verstärkte Resistenz gegenüber den applizierten Melanomzellen bestand auch dann noch, wenn die potenziellen Effektor-Zellen wie NK-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen depletiert wurden. Dies weist auf einen weiteren antitumoralen Effektormechanismus von IL-15 hin, der möglicherweise mit dem ebenfalls erfassten erhöhten Serumspiegel von Typ-I-Interferonen in den transgenen Mäusen oder mit der verstärkten Sekretion von IL-12 durch Lungenmakrophagen zusammenhängen könnte.

Eine weitere Studie erbrachte den Nachweis, dass IL-15 ein wichtiger Faktor für die Aktivierung von tumorspezifischen NK-Zellen durch VSV-infizierte dendritische Zellen zu sein scheint [122]. Weiterhin ließ sich zeigen, dass sich IL-15 durch Typ-I-Interferone induzieren lässt und zu einer verstärkten Fähigkeit von dendritischen Zellen führte, antigenspezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu stimulieren [123]. In einer prospektiven Studie mit 33 Patienten mit primärem kutanen Melanom konnte kein Zusammenhang

zwischen dem Serumlevel von IL-15 und der Progression der Erkrankung festgestellt werden [124].

### **Interleukin 17A (Interleukin-17)**

IL-17A gehört zu den proinflammatorischen Zytokinen und wird unter anderem von einer speziellen Subgruppe von CD4<sup>+</sup>-Helfer-Zellen, den Th17-Zellen, sezerniert. Durch die Induktion der Expression von verschiedenen Zytokinen wirkt IL-17 chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und ist somit an der Regulation von lokalen Entzündungsreaktionen beteiligt. Weiterhin kann es über direkte und indirekte Mechanismen die Angiogenese induzieren [125].

In bisherigen Studien wurde deutlich, dass IL-17A gegenüber dem Melanom und verschiedenen anderen Tumoren sowohl pro- als auch antitumorale Effekte vermitteln kann. So erfolgte der Nachweis in durch DMBA/TPA induzierten Hauttumoren bei Mäusen, dass die durch IL-17 hervorgerufene Entzündungsreaktion einen entscheidenden Faktor für das Tumorstadium und die Tumorstadium darstellte [126]. Eine weitere Studie, in der Fibrosarkomzellen und Kolonkarzinomzellen im Mausmodell verwendet wurden, belegte, dass die Überexpression von IL-17A in immundefizienten Mäusen zu neoangiogenetischen und protumoralen Effekten führte [125].

Im Einklang mit diesen Ergebnissen ließ sich weiterhin beobachten, dass IL-17-defiziente Mäuse ein vermindertes Tumorstadium für das B16-Melanommodell und das MB46 Blasenkarzinommodell aufwiesen [127]. Diese Daten konnten auch in einem weiteren Knock-out-Experiment reproduziert werden. Hier zeigte sich in den IL-17-defizienten Mäusen ein signifikant geringeres Tumorstadium für das B16-F10-Melanom und für weitere transplantierte Tumoren [128]. Auch die Anzahl von IL-17<sup>+</sup>-T-Zellen schien für das B16-Melanommodell mit der Tumorstadium zu korrelieren. So konnte in Mäusen mit dem B16-Melanom im Vergleich zu den gesunden Mäusen der Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte Anzahl von IL-17<sup>+</sup>-T-Zellen in Blut, Knochenmark und Milz erfasst werden, wobei die größte Anzahl von IL-17<sup>+</sup>-T-Zellen im Tumorgewebe zu finden war [129].

Neben den oben genannten protumoralen Eigenschaften von IL-17 wurden allerdings in mehreren Studien auch antitumorale Effekte dieses Zytokins beschrieben. So ließ sich in einem Knock-out-Experiment feststellen, dass IL-17A-defiziente Mäuse eine höhere Suszeptibilität für die Entwicklung eines Melanoms in der Lunge aufwiesen als die gesunden Mäuse der Kontrollgruppe [130].

### **TNF-alpha**

TNF-alpha gehört ebenfalls zu der Gruppe der proinflammatorischen Zytokine und wurde ursprünglich nach seiner Eigenschaft benannt, bestimmte Tumorzellen „lysieren“ zu können [131, 132]. Es spielt eine entscheidende Rolle bei der Initiierung der Entzündungsreaktion über den NFkappaB-Signalweg. Die Aktivierung dieses Signalweges über ikkB scheint in verschiedenen murinen Tumormodellen in einem engen Zusammenhang mit der entzündungsassoziierten Tumorentwicklung zu stehen [133, 134]. Im Rahmen der Tumorentstehung scheint TNF-alpha unterschiedliche und zum Teil sogar gegensätzliche Wirkungen vermitteln zu können.

Die bisher vorliegenden Studien weisen darauf hin, dass die chronische endogene Produktion von TNF-alpha zum Tumorwachstum und zur Metastasierung beitragen kann. So ließ sich beispielsweise belegen, dass TNF-alpha die Angiogenese im Mausmodell beeinflusst, indem es den VEGF-Rezeptor (FLK-1) herunterreguliert [135]. Für die Wirkung von TNF-alpha im Zusammenhang mit der Tumorentstehung beim malignen Melanom erfolgte der Nachweis, dass TNF-alpha in einem Fibronectin-Invasions-Assay die Invasion und Migration von Melanomzellen in vitro erhöhen konnte [136, 137]. In einem Maus-Melanommodell konnte weiterhin gezeigt werden, dass TNF-alpha eine entscheidende Rolle bei der reversiblen phänotypischen Entdifferenzierung von Melanomzellen spielt und somit eine immunologische Antwort durch zytotoxische T-Zellen verhindern kann [138]. In einer prospektiv-randomisierten Studie mit 66 Melanompatienten, die sich in Stadium III-IV befanden, führte die Suche nach prognostischen Markern für das Ansprechen auf eine adjuvante Therapie mit Interferon-alpha zu dem Ergebnis, dass TNF-alpha mit der Toxizität von Interferon-alpha und dem rezidivfreien Überleben der Patienten korrelierte [139]. Als eine mögliche Erklärung hierfür wurde die Beobachtung herangezogen, dass TNF-alpha

regulatorische T-Zellen, die für die Vermittlung der Immuntoleranz gegenüber Tumoren von Bedeutung sein können, in ihrer Funktion gehemmt wurden [140].

### **CXCL10 (IP 10)**

Neben seiner chemotaktischen Wirkung auf periphere Monozyten und stimulierte T-Zellen fördert CXCL10 ebenfalls die Adhäsion von T-Zellen an Endothelzellen [141]. Weiterhin beschrieben sind antiangiogenetische Effekte von CXCL10, die durch die Inhibition von bFGF vermittelt werden können [142]. Hinsichtlich einer möglichen antitumoralen Wirkung von CXCL10 ließen sich bereits in frühen in-vivo-Experimenten immunvermittelte antitumorale Effekte an Mäusen mit Mamma-CA/Plasmozytom nachweisen [143]. Im Zusammenhang mit dem malignen Melanom konnte gezeigt werden, dass Melanomzellen, die mit dem CXCL10-Gen transfiziert und danach Mäusen subkutan appliziert wurden, zu signifikant kleineren Tumoren heranwuchsen als die Melanomzellen, die nicht oder mit einem Null-Vektor transfiziert worden waren. Zudem war die Gefäßdichte bei den transfizierten Melanomzellen im Vergleich zu den nicht-transfizierten Zellen deutlich reduziert [144].

Eine weitere Studie konnte ebenfalls belegen, dass die intraperitoneale Transfektion mit einem für CXCL10 kodierenden Adenovirusvektor bei Mäusen mit dem B16F1-Melanom zu einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen der Kontrollgruppe führte. Weiterhin konnte diese Studie darlegen, dass die Invasivität von Melanomzellen in Matrigel-beschichteten Transwellkammern durch die Zugabe von CXCL10 signifikant und dosisabhängig reduziert werden konnte [145]. In einer ebenfalls in dieser Studie durchgeführten Analyse von Melanompatienten-PBMCs stammenden Zytokinen ließ sich darüber hinaus demonstrieren, dass die PBMCs von Patienten, die sich in Remission befanden, signifikant mehr CXCL10 sezernierten als die PBMCs der Patienten, die eine klinische Progression aufwiesen. Auch eine weitere Studie deutet eine mögliche Rolle von CXCL10 als prognostischem Marker für das Therapieansprechen an. Hier zeigte sich bei 21 Patienten, die sich im Tumorstadium II oder III befanden und mit einer niedrig dosierten adjuvanten Therapie mit Interferon-alpha behandelt wurden, nach 3 Monaten ein signifikanter Anstieg der Plasmakonzentration von CXCL10. [146].

### **CCL2 (MCP-1)**

CCL2 zählt zu den Chemokinen, die zur Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen befähigt sind. Im Zusammenhang mit dem malignen Melanom konnte sowohl in frühen als auch in aktuellen Studien nachgewiesen werden, dass verschiedene Melanomzellen CCL2 sezernierten [147]. Mehrere Studien ergaben, dass die Anzahl an Makrophagen in der Mikroumgebung von Tumoren mit der Progression und Prognose des Tumors korrelierte. So erfolgte beispielsweise der Nachweis bei einem Mamma-Ca-Mausmodell, dass CCL2, welches von Tumorzellen oder Stromazellen sezerniert werden kann, ein für die Metastasierung notwendiger Faktor ist [148]. Weiterhin ließ sich in dieser Studie belegen, dass die durch CCL2 rekrutierten Monozyten zur metastatischen Streuung der Tumorzellen beitrugen, indem sie den Durchtritt der Tumorzellen in den extravasalen Raum erleichterten. Nach der Transfektion des CCL2-Gen-Vektors in Melanomzelllinien, die zuvor nur in einem geringen Umfang CCL2 sezernierten und sich noch in einer frühen Phase der Melanomprogression befanden, konnte am Mausmodell gezeigt werden, dass die Tumorentstehung entscheidend mit dem Umfang der Sekretion von CCL2 und der damit einhergehenden Monozyten-Infiltration korrelierte. Eine geringe Sekretion von CCL2 führte zu einer relativ geringen Invasion von Monozyten in das Tumorgewebe und hatte die Formation von Tumorzellen zur Folge. Eine hohe Sekretion von CCL2 hingegen führte zu einer massiven Infiltration von Monozyten und einer Destruktion des Tumors [149].

Auch in einer weiteren Studie ließ sich demonstrieren, dass die Transfektion einer niedrig malignen Melanomzelllinie (IIB-MEL-J) mit einem für das CCL2-Gen kodierenden Expressionsvektor mit einer erhöhten Rekrutierung von Makrophagen in das Tumorgewebe assoziiert war. Nach der Depletion der Makrophagen mit Clod-Lip (liposome-encapsulated clodronate) zeigten sich um bis zu 70 % kleinere Tumoren [150].

### **CCL7 (MCP-3)**

Über die Bindung an die Zytokinrezeptoren CCR1, 2 und 3 wirkt CCL7 chemotaktisch auf T-Lymphozyten, mononukleäre Phagozyten, NK-Zellen, Basophile, Eosinophile und dendritische Zellen. [151-156]. Im Hinblick auf eine potenzielle antitumorale Wirkung von CCL7 gegenüber dem malignen Melanom konnte gezeigt werden, dass die



Applikation des CCL7-Genes mittels Parvovirusvektor in einem B78/H1- und K1735-Maus-Melanommodell zu einem reduzierten Melanomwachstum führte, welches durch NK-Zellen und T-Zellen vermittelt wurde [157]. In einer weiteren Studie ließ sich zudem belegen, dass die Konzentration von CCL7 im Kammerwasser von Patienten mit uvealen Melanomen signifikant erhöht und mit der Anwesenheit von CD68<sup>+</sup>-Makrophagen assoziiert war [158].

### **CCL3 (MIP-1alpha)**

CCL3 kann von den Rezeptoren CCR1/CCR5 gebunden werden und wirkt chemoattraktiv auf T-Zellen [159] und unreife dendritische Zellen [160]. Hinsichtlich der Rolle von CCL3 beim malignen Melanom ließ sich zeigen, dass die Transfektion von B16 F10-Melanomzellen mit einem CCL3-Vektor und die anschließende i.v. Applikation der transfizierten Melanomzellen bei Mäusen zu einer im Vergleich mit den nicht transfizierten Melanomzellen signifikant geringeren Anzahl von Lungenmetastasen führte [161]. Die Anzahl der Metastasen in der Lunge war hier negativ proportional zur sezernierten CCL3-Konzentration und es konnte vorübergehend eine deutlich erhöhte Anzahl von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nachgewiesen werden. Bei subkutaner Applikation der transfizierten und nichttransfizierten B16 F10-Melanomzellen ließen sich jedoch keine Unterschiede im Tumorwachstum beobachten.

Auch eine weitere Studie bestätigte die antitumoralen Effekte von CCL3. Hier zeigte sich bei CCL3<sup>-/-</sup>-oder CCL2<sup>-/-</sup>-Mäusen ein verstärktes Wachstum und eine vermehrte Neigung zur Metastasierung von subkutan applizierten B16 F10-Melanomzellen [162]. Dieses verstärkte Tumorwachstum und die gesteigerte Neigung zur Metastasierung der B16 F10-Melanomzellen gingen einher mit einer verminderten Anzahl von tumorinfiltrierenden Zellen wie CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und NK-Zellen. Hinsichtlich einer möglichen prognostischen Relevanz von CCL3 erfolgte der Nachweis, dass das Serumlevel von CCL3 und CCL4 bei Melanompatienten mit längerem rezidivfreien Überleben im Vergleich zu Patienten mit kürzerem rezidivfreien Überleben signifikant erhöht war [87].

### **CCL4 (MIP-1beta)**

CCL4 (MIP-1beta) und CCL3 (MIP-1alpha) scheinen unter anderem an der Attraktion von regulatorischen T-Zellen beteiligt zu sein und sind somit potenziell in der Lage, zur Immuntoleranz gegenüber Tumoren beizutragen. Wie bei Mäusen mit B-16-Melanomen gezeigt werden konnte, sezernierten tumorinfiltrierende MO-MDSCs hohe Level von CCL4 (MIP-1beta) und CCL3 (MIP-1alpha), was in einer CCR5-abhängigen Weise zur Attraktion von regulatorischen T-Zellen führte [163]. Bei Mäusen, die den CCR5 nicht exprimierten, konnte hingegen ein verzögertes Tumorwachstum beobachtet werden.

### **CCL20 (MIP-3alpha)**

Die bisher beschriebenen physiologischen Funktionen von CCL20 umfassen die chemotaktische Attraktion von dendritischen Zellen [164], Lymphozyten, Monozyten und in einem geringen Umfang auch von Neutrophilen Granulozyten [165, 166]. Im Hinblick auf die Funktion von CCL20 im Zusammenhang mit dem malignen Melanom konnte gezeigt werden, dass die intratumorale Injektion eines für CCL20 kodierenden adenoviralen Vektors bei einem B16-Melanom-Mausmodell und 3 weiteren Tumor-Mausmodellen zu einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen der Kontrollgruppe führte [167]. Die Vermittlung der antitumoralen Effekte erfolgte über CD-8<sup>+</sup>-T-Zellen. Weiterhin ließ sich durch die Analyse dendritischer Zellen von Melanompatienten und gesunden Probanden nachweisen, dass die plasmacytoiden dendritischen Zellen der Melanompatienten den Rezeptor für CCL20 wesentlich stärker exprimierten als die plasmacytoiden dendritischen Zellen der gesunden Probanden und in der Lage waren, einem Konzentrationsgradienten von CCL20 zu folgen. Ebenfalls konnte die Produktion von CCL20 und die Anwesenheit von plasmacytoiden dendritischen Zellen in der Melanomumgebung belegt werden [168]. Dies legt eine Funktion von CCL20 für die Rekrutierung von CCR6-positiven plasmacytoiden dendritischen Zellen nahe, welche wiederum in der Lage sind, Alpha-Interferone zu sezernieren. Bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen konnte zudem gezeigt werden, dass die Konzentration von CCL20 im Serum ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Überleben der Patienten war [169].

## **1.5 Adjuvante Therapie**

Die Möglichkeit einer adjuvanten Therapie mit Interferon-Alpha kann für alle Patienten in Erwägung gezogen werden, die auch nach der Resektion aller tumorsuspekten Areale ein hohes Rezidiv- und Mortalitätsrisiko aufweisen [2]. Dies gilt für Patienten, bei denen die Dicke des Primärtumors mehr als 2 mm beträgt und eine Ulzeration im histologischen Präparat vorliegt (Stadium IIB). Ebenso empfohlen wird eine adjuvante Therapie bei einer Tumordicke von über 4 mm mit (Stadium IIC) oder ohne Ulzeration (Stadium IIB) und bei jedem Nachweis einer oder mehrerer befallener Lymphknoten ohne Fernmetastasen, unabhängig von der Tumordicke [23]. Interferon-alpha war bis vor kurzem die einzige zugelassene adjuvante Therapie mit nachgewiesener Wirksamkeit in Bezug auf das Gesamt- und progressionsfreie Überleben. Allerdings konnten signifikante Effekte bezüglich des Gesamtüberlebens nur in 2 von 15 prospektiv-randomisierten Studien beobachtet werden [170, 171]. Hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens erfolgte der Nachweis einer signifikanten Wirksamkeit bisher in 6 Studien [170-175].

In den oben genannten klinischen Studien kamen entweder Interferon-alpha2a oder Interferon-alpha2b zur Anwendung. Die Wirkung dieser beiden Alpha-Interferon-Subtypen wird als gleichwertig angenommen, da sich beide nur in einer Aminosäure unterscheiden [11]. Neben diesen bereits etablierten Alpha-Interferonen ist auch das in unseren Versuchen verwendete Multiferon mit seinen verschiedenen Alpha-Interferon-Subtypen seit 2006 aufgrund von einer klinischen Studie von Stadler et. al [176] in einigen europäischen Ländern zugelassen. Der Einsatz von Interferon-alpha wird allerdings aufgrund der sehr häufig auftretenden gravierenden Nebenwirkungen und des geringen Nutzens kontrovers diskutiert. Nach Angaben des Herstellers (Roche) treten Nebenwirkungen wie Leukopenie, Haarausfall, verstärktes Schwitzen, grippeähnliche Erkrankung, Müdigkeit, Fieber, Rigor, verminderter Appetit, Anorexie, Übelkeit, geringe Hypocalcämie, Myalgie, Arthralgie sehr häufig ( $\geq 1/10$ ) und Thrombozytopenie, Anämie, Übelkeit/Erbrechen häufig ( $\geq 1/100$  bis  $< 1/10$ ) auf.

## **1.6 Zielsetzung der Dissertation**

Ziel dieser Arbeit war es, die antitumoralen und zytokininduzierenden Effekte der Alpha-Interferone Multiferon und Roferon-A zu vergleichen. Untersucht wurden sowohl die direkten antitumoralen Effekte auf verschiedene Melanomzelllinien als auch die kombinierten direkten und indirekten antitumoralen Effekte in einem autologen System aus PBMCs und Melanomzellen. Die Zytokine, die nach der Stimulation von Melanompatienten-PBMCs mit den beiden Alpha-Interferonen erfasst wurden, sollten einen Hinweis auf die Faktoren liefern, die möglicherweise zur indirekten antitumoralen Wirkung der Alpha-Interferone beitragen können. Hintergrund dieser Experimente war die Beobachtung, dass die zwölf physiologisch vorkommenden verschiedenen Subtypen der Alpha-Interferone unterschiedlich stark ausgeprägte antivirale und antitumorale Effekte induzieren können.

Das seit 2006 in einigen europäischen Ländern zugelassene Multiferon enthält im Gegensatz zu Roferon-A mehrere verschiedene Subtypen ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 10$ ,  $\alpha 14$ ,  $\alpha 21$ ) des Alpha-Interferons. Da zum Zeitpunkt der Anfertigung der Arbeit weder klinische, noch experimentelle Vergleichsstudien der beiden Alpha-Interferone vorlagen, stellte sich die Frage, ob in vitro ein Vorteil von Multiferon hinsichtlich der direkten oder indirekten antitumoralen Effekte gegenüber Roferon-A bestehen würde.

## 2. Material und Methoden

**Tab. 1:** Übersicht der verwendeten Materialien

Verwendete Materialien	Hersteller
Absaugvorrichtung (IV-500 Vacuset Multi-Tip Kit)	Inotech
Antikörper (Anti-human IFN $\alpha/\beta$ R1), Katalognummer: AF245	R&D SYSTEMS
Antikörper (HMB45), Katalognummer: #M0634	DAKO
Antikörper (Melan A), Katalognummer: #M7196	DAKO
AP-Polymer	Thermo-Fisher
Biocoll Separating Solution	Biochrom
Chromogenlösung	Thermo-Fisher
DMSO	PanReac AppliChem
Eppendorfcups	Eppendorf
Excel 2010	Microsoft
FACS (LSR II)	BD Biosciences
FACSDiva Software	BD Biosciences
FACS-Röhrchen	Sarstedt
Falcon-Röhrchen	Falcon
FCS	Biochrom
Formalin	Sigma-Aldrich
Gefrierschrank	Liebherr
horse serum	Thermo-Fisher
humanes Serum	Blutspende
Inkubator (Heracell 240 CO2 Incubator)	Thermo Scientific
Interleukin-2 (Endkonzentration: 100 U/ml)	Life Technologies
Interleukin-7 (Endkonzentration: 10 ng/ml)	Life Technologies
Inversmikroskop (CK 40)	Olympus
Kaisers Glyceringelatine	Sigma-Aldrich
Kryoröhrchen	Thermo Scientific
Luminometer (Fluorocan II)	Labsystems
MUH (4-Methylumbelliferylheptanoat)	Sigma-Aldrich
Multiferon	Swedish Orphan Biovitrum
Navilösung	Sigma-Aldrich
PBS	GE Healthcare Life Sciences
Penicillin/Streptomycin-Antibiotika	Biochrom
Primary Antibody Enhancer	Thermo-Fisher
Roferon-A	F. Hoffmann-La Roche
RPMI 1640 Medium	Lonza
Sekundärantikörper FACS (donkey anti-goat Cy3 gelabelt)	Dianova
Sicherheitswerkbank (Herasafe HS18)	Heraeus
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Trypsin	Biochrom
Tween 20	Thermo-Fisher
Ultra V Block	Thermo-Fisher
Wasserbad (1083)	Gesellschaft für Labortechnik
Zählkammer nach Neubauer	Neolab
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One
Zellkultur-Objektträger	BD Biosciences
Zellschaber	Cellstar
Zellsieb	BD Biosciences
Zentrifuge (Varifuge 3.0R)	Heraeus
Zentrifuge (Mikrozentrifuge)	Eppendorf

## **2.1 Zelllinien und Zellkultur**

**Tab.2:** Übersicht der verwendeten kommerziellen Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Tumorart</b>	<b>Literaturangabe</b>
451Lu	Lungenmetastase	[177, 178]
WM852	Hautmetastase	[179, 180]
A375R	Hautmetastase	[181]
A375S	Hautmetastase	
BLM	Lungenmetastase	[182]
MEWO	Lymphknotenmetastase	[183, 184]
MM60	Hautmetastase	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Dirk Schadendorf
MV3	Lymphknotenmetastase	[185]
SK-Mel-28	Primärtumor der Haut	[183, 186]
WM266-4	Hautmetastase	[180]

### **Zellkulturbedingungen**

Alle Arbeiten an den Zellkulturen wurden mit sterilen Materialien und unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Kultivierung der Melanomzellen erfolgte als Monolayer in T75-Zellkulturflaschen mit RPMI 1640-Medium, welches mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin-Antibiotika supplementiert wurde. Die Zelllinien wurden im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % H<sub>2</sub>O-gesättigter Atmosphäre kultiviert.

### **Mediumwechsel und Subkultivierung (Passagieren)**

Die Zellkulturen wurden alle zwei Tage unter einem Inversmikroskop beurteilt und in Abhängigkeit ihrer Konfluenz passagiert oder bei geringerer Zelldichte mit neuem Medium supplementiert. Für die Passagierung wurde zunächst das alte Medium entfernt und die adhären Zellen mittels Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Es wurden pro Zellkulturflasche 3ml Trypsin verwendet. Um die Enzymaktivität zu steigern und somit den Vorgang der Ablösung zu beschleunigen, wurden die Zellkulturflaschen für 5 min in den Inkubator gestellt. Durch leichtes Beklopfen mit der Hand ließen sich nach dieser Zeit weitere Zellen ablösen. Die enzymatische Aktivität wurde durch das im Medium enthaltene FCS inhibiert. Sichergestellt wird eine Hemmung der Enzyme bei einem Volumen des Mediums, das mindestens doppelt so groß ist wie das Volumen des Trypsins. Der Boden der Flasche wurde mehrmals mit der

Suspension aus Zellen, Trypsin und Medium gespült und anschließend in ein 15-ml-Falcon-Röhrchen übertragen. Um die Trypsinreste von den Melanomzellen zu trennen, wurden die Falcon-Röhrchen bei 21 °C mit 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet entsprechend seiner Größe und im Hinblick auf seine weitere Verwendung mit der erforderlichen Menge an Medium resuspendiert und in eine neue Zellkulturflasche transferiert. Ein Mediumwechsel erfolgte durch Absaugen des alten Mediums und anschließender Zugabe von 12 ml neuem Medium.

### **Auftauen und Einfrieren von Melanomzellen/PBMCs**

Um Melanomzellen von bereits etablierten Zellkulturen aufzutauen, wurden zunächst 11 ml Medium in eine Zellkulturflasche gegeben und die Kryoröhrchen mit den Melanomzellen im Wasserbad bei 37 °C angetaut. Darauf erfolgte die sofortige Zugabe von 1 ml Medium zu den angetauten Zellen und nach anschließender Resuspendierung konnten diese in die bereits mit Medium vorbereitete Zellkulturflasche transferiert werden. Der Ablauf des Auftauens von PBMCs verlief analog zu dem oben beschriebenen Procedere, allerdings mit der Einschränkung, dass die PBMCs in eine 6-Well-Platte eingesät wurden.

### **Kryokonservierung**

Um langfristig bestimmte Zelllinien zu konservieren, wurde nach Ablösung und Zentrifugation der Zellen das Pellet in Einfriermedium (70 % RPMI, 20 % FCS und 10 % DMSO) gelöst und jeweils 1 ml in ein Einfrierröhrchen übertragen. Die Kryokonservierung der PBMCs erforderte ein spezielles Einfriermedium, welches aus 10 % DMSO und FCS bestand. Kurzfristig lagerten die Zellen in einem -80 °C-Gefrierschrank, die langfristige Verwahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

### **Bestimmung der Zellzahl**

Um das in den Experimenten benötigte unterschiedliche Verhältnis von Melanomzellen zu PBMCs herzustellen, war es erforderlich, die Anzahl dieser Zellen zu ermitteln. Die Auszählung wurde mithilfe einer Zählkammer nach Neubauer (Abb. 2) vorgenommen. Diese besteht aus 3 x 3 Großquadraten mit einer Kantenlänge von je 1 mm. Auf einem

Niveau 1 mm unterhalb der Stege ist sie in zweifacher Ausführung in der Mitte des Objektträgers eingelassen.

Bevor mit der Zählung begonnen werden konnte, erfolgte die Platzierung des Deckglases im Querformat auf dem Objektträger. Die korrekte Lage zeigt sich in der Ausbildung von Newtonschen Ringen, die entstehen, wenn die Höhe des Zwischenraums von Deckglas und Steg im Größenbereich der Lichtwellenlänge liegt und somit zu vernachlässigen ist. In diesem Zustand beträgt der Abstand zwischen Deckglas und Zählkammer 1 mm. Indem je 10  $\mu$ l der Zellsuspension an die obere und untere Kante des Deckglases pipettiert werden, verteilt sich die Zellsuspension durch den Kapillarsog gleichmäßig unter dem Deckglas und in der Zählkammer.

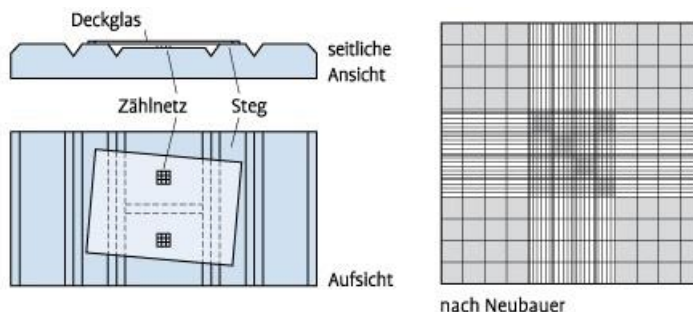


Abb. 2 Objektträger mit Zählkammer nach Neubauer modifiziert nach [89]

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in den vier großen Eckquadraten der Zählkammer bei 100-facher Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Anzahl der Zellen in einem Milliliter errechnet sich aus dem Mittelwert der Zellzahl aller 4 Quadrate multipliziert mit dem Faktor  $10^4$ . Die Trypanblaufärbung (Verhältnis 1 : 1) ermöglicht eine selektive Anfärbung der avitalen Zellen einer Zellsuspension. Dadurch lässt sich verhindern, dass fälschlicherweise tote Zellen mitgezählt werden.

## **2.2 Melanomzellisolation aus Tumorgewebe**

Die Resektate der in der Universitätsklinik Tübingen operierten Melanompatienten wurden unmittelbar nach der Operation in RPMI-Medium (10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin) gekühlt ins Labor transportiert. Um die Melanomzellen aus dem Resektat zu isolieren, erfolgte die Aufteilung des Tumorgewebes in mehrere kleine Stücke mit einem Skalpell und die Entfernung von vorhandenem Fettgewebe. 2-3 der bereits zerkleinerten Gewebeteile wurden für die Zellisolation vorgesehen. Die restlichen Stücke lagerten übergangsweise nach der Schockgefrierung (durch flüssigen



Stickstoff) in Einfrierröhrchen bei -80 °C im Gefrierschrank, bevor sie für die langfristige Verwahrung in flüssigem Stickstoff gelagert wurden. Für die Zellkultur wurden mehrere Stücke des Resektats in einer 6-Well-Platte verteilt, erneut zerkleinert (Stücke < 0,5cm) und mit Navilösung (bestehend aus: 100 ml HBSS, 50 mg Collagenase, 100 mg Hyaluronidase, 73 mg Dispase) bedeckt. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C wurde die enzymatische Aktivität der Enzyme in der Navilösung durch Zugabe von Medium (RPMI) inhibiert. Um sicherzustellen, dass sich so viele Zellen wie möglich vom Primärgewebe abgelöst haben, war es erforderlich, das Medium zu resuspendieren und anschließend durch ein Zellsieb in ein 50-ml-Falcon-Röhrchen zu filtrieren. Anschließend wurde das Falcon 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet ließ sich in ausreichender Menge Medium lösen und in ein oder zwei Wells einer 6-Well-Platte überführen. Nach 12 h wurde das Medium erneuert. Für den Nachweis, dass es sich bei den isolierten Zellen um Melanomzellen handelte, wurde im weiteren Verlauf der Kultivierung obligatorisch eine immunhistochemische Färbung auf Melan A und HMB45 durchgeführt.

### **2.3 Immunhistochemie zum Nachweis von Melan A und HMB45**

Um zu bestätigen, dass es sich bei den Zellen, die in der Zellkultur angezüchtet wurden, um Melanomzellen handelte, wurden melanomspezifische zytoplasmatische Proteine (HMB45 und Melan A) durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern nachgewiesen. Vor dem eigentlichen Ablauf der immunhistochemischen Färbung wurden die zu färbenden Zellen auf einem Objektträger ausgesät. Dafür wurden sie gezählt und die benötigte Menge (10000-20000 Zellen) in je eine Kammer des Zellkultur-Objektträgers pipettiert. Um zu gewährleisten, dass die Zellen optimale Wachstumsbedingungen vorfinden, wurden pro Kammer jeweils 0,5 µl Medium hinzugefügt.

24-48 h später waren die Zellen adhärent und es konnte mit der immunhistochemischen Färbung begonnen werden. Nach Abschütten des sich in den Kammern des Objektträgers befindlichen Mediums erfolgte ein zweimaliges Waschen mit PBS, danach eine 10-minütige Fixierung der Zellen mit 4-prozentigem Formalin. Dabei war zu beachten, dass der Boden der Kammer mit Formalin bedeckt war. Anschließend

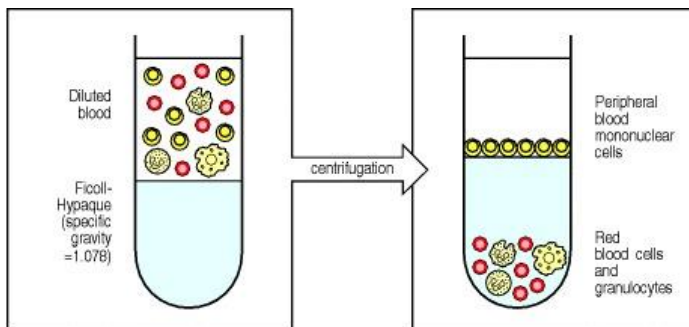
wurde das Formalin abgeschüttet und die Kammern erneut 4 x mit PBS gewaschen. Nach einer 10-minütigen Inkubation der Zellen mit Ultra V Block musste der viermalige Spülvorgang mit PBS wiederholt werden. Der erste Antikörper wurde in PBS verdünnt, welches zuvor mit 0,1 % Tween 20 und 10 % „horse serum“ supplementiert worden war. Die Verdünnung des Antikörpers bei Melan A betrug 1 : 50 und die Verdünnung bei HMB45 1 : 100. Anschließend wurde das viermalige Waschen mit PBS durchgeführt. Nachfolgend wurde für 20 min der Primary Antibody Enhancer hinzugegeben und die Kammern erneut 4 x mit PBS gewaschen. Das AP-Polymer musste dann für 30 min hinzugefügt und die Kammern wiederum 4 x mit PBS gewaschen werden. Nun wurde die Chromogenlösung für 10-25 min auf die Objektträger gegeben. Sobald eine Rotfärbung der Zellen mikroskopisch zu erkennen war, musste die Kammer der Objektträger 2 x mit PBS ausgespült werden, bevor der HE-Farbstoff aufpipettiert und 5 min inkubiert werden konnte. Anschließend wurde mit Leitungswasser gespült, bis kein blauer Farbstoff auf dem Objektträger zurückblieb, danach mit Aquadest. Darauf konnten die Kammern von dem Objektträger abgelöst und dieser an der Luft getrocknet werden.

Nach diesem Vorgang wurden 3 Tropfen der zuvor im Wasserbad erwärmten Kaisers Glyceringelatine auf den Objektträger pipettiert und das Deckglas so aufgedrückt, dass darunter keine Luftblasen zurückblieben. Um ein Verrutschen des Deckglases auf dem Objektträger zu verhindern, wurden die fertigen Präparate an der Luft getrocknet. Danach konnten sie mikroskopiert werden, um zu verifizieren, dass es sich bei den gefärbten Zellen um Melanomzellen handelte.

#### **2.4 Separation und Isolierung von PBMCs aus Vollblut**

Alle in den Experimenten verwendeten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) wurden mithilfe der Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation [187] unmittelbar nach der Blutentnahme aus dem heparinisierten Vollblut der Patienten isoliert. Das Verfahren macht sich die unterschiedlichen Sedimentationskoeffizienten der jeweiligen Blutbestandteile zunutze. So bilden sich bei der Zentrifugierung des Blutes verschiedene diskontinuierliche Dichtegradienten (Phasen) aus. Ficoll (Biocoll

Separating Solution), ein Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer, erfüllt hierbei die Funktion eines Trennmediums und separiert die Leukozyten von den Erythrozyten und Granulozyten (Abbildung), die sich aufgrund ihrer größeren Dichte am Boden des Falcons ablagern. Ficoll selbst hat eine geringere Dichte (1,077 g/Liter) und befindet sich deshalb als Phase über den Erythrozyten und Granulozyten. Die mononukleären Zellen hingegen, bilden eine Schicht zwischen Ficoll und Serum aus, den sogenannten Buffy-Coat.



**Abb. 3:** Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation [88]

Das entnommene Blut des Patienten (2 x 55 ml) wurde in zwei T75-Zellkulturflaschen (55 ml/Zellkulturflasche) überführt und mit den darin zuvor hinzugefügten 85 ml PBS vermischt. Je 35 ml des Gemisches aus PBS und Patientenblut konnten daraufhin langsam auf die sich in acht 50-ml-Falcon-Röhrchen befindliche Biocoll Separating Solution (15 ml/50 ml-Falcon-Röhrchen) überschichtet werden. Dabei war darauf zu achten, dass sich Ficoll und Blut nicht vermischten und zwei getrennte Phasen entstanden. Um die bei der Zentrifugierung entstehenden Schichten unterschiedlicher Dichte zu erhalten, wurde die anschließende Zentrifugierung der insgesamt 8 Falcon-Röhrchen ohne Bremse für 30 min mit 1800 rpm bei Raumtemperatur durchgeführt. Der bei der Zentrifugation entstandene Buffy-Coat konnte mittels einer 5-ml-Pipette abgesaugt und in ein neues 50-ml-Falcon-Röhrchen transferiert (2 Buffy-Coats/50-ml-Falcon-Röhrchen) werden. Anschließend wurde das Volumen in den 50-ml-Falcon-Röhrchen auf ein Gesamtvolumen von 50 ml mit PBS aufgefüllt und bei 1200 rpm 12 min lang mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugierung verworfen und die Zellpellets in einem 50-ml-Falcon-Röhrchen vereinigt. Es erfolgte ein erneutes Auffüllen des Falcons mit PBS und ein Zentrifugieren mit 1000 rpm für 12 min. Nach Abschütten des PBS wurde das Pellet in 5 ml PBS resuspendiert. 10 µl der Suspension wurden für die Zählung der PBMCs verwendet. Nach der erneuten

Zentrifugierung bei 800 rpm für 12 min wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet in der zuvor berechneten Menge des Einfriermediums (FCS + 10 % DMSO) gelöst. Jedes Kryoröhrchen enthält idealerweise in einem Milliliter 20 Mio. PBMCs. Die Lagerung der PBMCs erfolgte bei -80 °C.

### **2.5 Zytotoxizitäts- und Proliferationsassay (MUH-Assay)**

Zur Ermittlung der Anzahl von lebenden Zellen kam der auf Fluoreszenz beruhende Zytotoxizitäts- und Proliferationsassay (MUH-Assay) zur Anwendung [188, 189]. Das hierbei verwendete fluorogene Substrat 4-Methylumbelliferylheptanoat (MUH) gelangt durch Diffusion durch die Zellmembran in das Zytoplasma von vitalen Zellen, wo es von Esterasen oder Sulfatasen zu dem stark fluoreszierenden 4-Methylumbelliferon hydrolysiert wird. Die emittierte Fluoreszenz ist proportional zum Anteil an lebenden Zellen und wurde mit einem Luminometer detektiert.

Für die verschiedenen Versuchsansätze wurden 96-Well-Platten verwendet und jeweils 2500 Melanomzellen/150 µl RPMI-Medium in ein Well pipettiert und anschließend für 24 h bei Standardbedingungen inkubiert. Nach Ablauf der 24 h waren die Zellen adhärent und konnten nach Erneuerung des Mediums mit unterschiedlichen Konzentrationen von Multiferon/Roferon-A behandelt werden.

Bei den Versuchen, in denen der Einfluss der zu den Melanomzellen autologen PBMCs untersucht werden sollte, war es erforderlich, die entsprechenden Zellen bereits am Vortag aufzutauen und diese für 24 h in 6-Well-Platten mit RPMI 1640-Medium zu inkubieren. Um verschiedene Verhältnisse der Melanomzellen zu PBMCs (1 : 1,25/1 : 5/1 : 20/1 : 80) zu erhalten, wurden diese nach den 24 h gezählt und dann in dem berechneten Volumen des humanen Serums resuspendiert. Dieses wurde zusätzlich mit IL-2 und IL-7 supplementiert.

Im nächsten Schritt erfolgte schließlich die Zugabe von Multiferon/Roferon-A in unterschiedlichen Konzentrationen. Nach 72 h Inkubation des neuen Ansatzes wurde der Überstand entfernt und die Wells zweimal mit je 100 µl PBS gewaschen. Für die MUH-Lösung wurde MUH im Verhältnis 1 : 100 mit PBS verdünnt und davon 100 µl in jedes Well pipettiert. Danach folgte die Inkubation des neuen Ansatzes für 1 h.

Die Erfassung der Extinktion und der Emission erfolgte bei 355 nm bzw. 460 nm an einem Luminometer. Die relativen Wachstumsinhibitionsraten wurden aus den erfassten Fluoreszenzdaten berechnet, indem der Mittelwert der Fluoreszenzdaten der jeweiligen behandelten Ansätze durch den Mittelwert der Fluoreszenzdaten der unbehandelten Ansätze (Kontrolle) dividiert wurde. Für die Berechnungen und die grafische Darstellung der Fluoreszenzdaten wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Excel 2010 verwendet.

## **2.6 Durchflusszytometrischer Nachweis des IFNAR-1**

Die durchflusszytometrische Analyse mittels FACS ermöglichte den stichprobenartigen Nachweis der Expression der Untereinheit des Interferonrezeptors (IFNAR-1) auf der Oberfläche von einigen in den Versuchen verwendeten Melanomzelllinien.

Um die Integrität der Oberflächenrezeptoren zu gewährleisten, erfolgte die Ablösung der adhärennten Melanomzellen nicht wie üblich durch Trypsin, sondern mit der Hilfe eines Zellschabers. Es wurden 1 Mio. Zellen für TüMel 40 und 500.000 Zellen für TüMel 32H eingesetzt. Die Zellen wurden bei 300 rpm 5 min lang zentrifugiert, darauf mit FACS-Puffer (2 % FCS/PBS) resuspendiert und davon jeweils 200 µl in 1,5-ml-Röhrchen überführt. Anschließend konnte der Primärantikörper (Anti-human IFN  $\alpha/\beta$  R1) hinzugefügt und 1 h bei 4 °C inkubiert werden.

Nun erfolgte die Zugabe von 1 ml FACS-Puffer und die 3-minütige Zentrifugierung der Zellen bei 800 rpm. Darauf wurde der Überstand abgesaugt und die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 30 min bei 4 °C vorgenommen. Hiernach wurde der oben beschriebene Waschvorgang wiederholt. Für die Messung am FACS wurden die Zellen in 500-µl-FACS-Puffer resuspendiert und in spezielle 5-ml-FACS-Röhrchen übertragen. Die Erfassung der durch den gebundenen Sekundärantikörper emittierten Fluoreszenz ( $\lambda_{an} = 492$  nm) erfolgte mit dem FITC-Kanal ( $\lambda_{em} = 510$  nm). Die Auswertung der Ergebnisse wurde mit der FACSDiva Software vorgenommen.

## **2.7 Stimulation der PBMCs mit Multiferon/Roferon-A für die Zytokinanalyse**

Die auf dem Prinzip der xMAP-Detektionstechnologie beruhende Zytokinanalyse, die mit dem Procarta Cytokine Assay Kit durchgeführt wurde, kam zur Anwendung, um die Zytokinprofile der PBMCs von insgesamt 12 verschiedenen Patienten (s. Tab. 3) nach

Stimulation mit Multiferon/Roferon-A zu untersuchen. Für die Zytokinanalyse wurden die PBMCs der Patienten aufgetaut und in je ein 15-ml-Falcon-Röhrchen mit 10 ml Medium (RPMI) übertragen. Anschließend wurden die 6 Falcon-Röhrchen 5 min bei 1200 rpm und 21 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin abgesaugt und das Pellet konnte nun in 5 ml Medium (RPMI + 1 % Pen/Strep + 1 % humanes Serum + IL-7 + IL-2) gelöst und in ein Well einer 6-Well-Platte überführt werden. Die Zellen lagerten über Nacht bei 37 °C im Inkubator und wurden am nächsten Tag nach der Färbung mit Trypanblau gezählt.

Die unterschiedlichen Ansätze (0,5-1 Mio Zellen) wurden auf eine 24-Well-Platte verteilt und die PBMCs mit Multiferon oder Roferon-A in der Konzentration von 10000 U/ml stimuliert. Der Inhalt der 24-Well-Platte wurde nach 6 h in Eppendorfcups übertragen und anschließend zentrifugiert, um die flüssige Phase von den PBMCs zu trennen. Der Überstand wurde nach Zentrifugierung der Zellen abgenommen und bei -80 °C eingefroren. Die eigentliche quantitative Bestimmung der Zytokine (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1-ra, IL-6, IL-15, IL-17, IP-10, TNF- $\alpha$ , MCP-1, MCP-3, MIP-3, MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$ ) erfolgte mithilfe des Procarta Cytokine Assay Kits durch die Firma PROGEN Biotechnik GmbH in Heidelberg.

## **2.8 Statistische Analyse**

Die im weiteren Verlauf dargestellten Analysen auf statistische Signifikanz der Ergebnisse wurden von Herrn Dipl.-Stat. Frederic Klein auf Honorarbasis durchgeführt. Die Berechnungen erfolgten mithilfe des Statistikprogramms SPSS. Es wurden der Shapiro-Wilk-Test, der Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben, der T-Test für verbundene Stichproben und der Friedman-Test als statistische Testverfahren angewendet. P-Werte < 0,01 wurden als hochsignifikant und p-Werte < 0,05 wurden als signifikant betrachtet.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Patienten**

Die in der Zellkultur und für die Experimente verwendeten nicht kommerziellen Zelllinien (Tab. 2) wurden jeweils aus den Tumorresektaten der am Universitätsklinikum Tübingen ambulant oder stationär operierten Patienten etabliert. Aus dem Blut dieser Patienten entstammten ebenfalls die für die Versuche in Kapitel 3.5 benötigten PBMCs. Somit bildeten die Melanomzellen und die PBMCs derselben Patienten in der Versuchsanordnung ein autologes System. Eine Übersicht der klinischen Daten der Patienten, von denen die in der Zytokinanalyse verwendeten PBMCs entstammten, findet sich in Tab. 3. Für alle Versuche lagen Einverständniserklärungen vor, die im Rahmen der Zustimmung zur Weiterverwendung von Körpermaterialien in der Blut- und Gewebebank erhoben wurden. Darüber hinaus erfolgte die Genehmigung der Studie durch die Ethikkommission der Universität Tübingen (Projekt-Nummer: 602/2015BO2).

**Tab. 2:** Übersicht der in Tübingen etablierten Melanomzelllinien

LK = Lymphknoten; m = männlich; w = weiblich; NM = Noduläres Melanom; ALM = Akro-lentiginöses Melanom; Ulz = ulzerierend; SSM = Superfiziell spreitendes Melanom; n.a. = not available

Name der Patienten-Zelllinie	TüMel 20H	TüMel 36H	TüMel 38	TüMel 39	TüMel 40	TüMel 41H	TüMel 42	TüMel 43	TüMel 44	TüMel 45	TüMel 51	TüMel 53H
Geschlecht	m	m	w	m	m	m	w	w	w	w	w	w
Autologe PBMCs	–	Ja	–	Ja	–	–	–	–	Ja	Ja	Ja	Ja
Tumorart	Hirn-metastase	Hirn-metastase	Lk-metastase	Lk-metastase	Lungen-metastase	Hirn-metastase	Dünndarm-metastase	Lk-metastase	Lungen-metastase	Lungen-metastase	Lk-metastase	Hirn-metastase
Patientenalter zum Zeitpunkt der Resektion	54 Jahre	59 Jahre	58 Jahre	51 Jahre	66 Jahre	48 Jahre	60 Jahre	44 Jahre	42 Jahre	74 Jahre	58 Jahre	43 Jahre
Entnahmedatum Gewebe/PBMCs	13.12.10/ –	25.10.10/ 04.02.11	30.12.10/ –	03.12.10/ 18.02.11, 25.05.11	03.12.10/ –	01.12.10/ –	01.12.10/ –	30.12.10/ –	13.01.11/ 31.01.11	19.01.11/ 04.02.11	10.04.11/ 09.05.11	15.04.11/ 12.05.11
Diagnosedatum	05/2010	03/2005	05/2008	02/2010	04/2006	10/2010	10/2005	05/2009	02/2006	2001	10/2006	01/2008
Histologie	Okkultes Melanom	NM	ALM	Ulz. noduläres Melanom	SSM	Okkultes Melanom	Schleimhaut-melanom	NM	SSM	SSM	SSM	SSM
Tumordicke	n.a.	1,95 mm	3,2 mm	4,0 mm	2 mm	n.a.	n.a.	10,0 mm	1,7 mm	0,9 mm	1,5 mm	1,35mm
Letzte Beobachtung	11.08.11	28.12.11	11.03.11	12.12.14	01.09.14	n.a.	04.12.14	19.01.11	24.10.11	21.04.11	25.02.14	18.10.13
Todesursache	Melanom	Melanom	Melanom	lebt	lebt	Melanom	lebt	lebt	Melanom	Melanom	Melanom	lebt
Todestag	11.08.11	28.12.11	11.03.11	lebt	lebt	n.a.	lebt	lebt	n.a.	21.04.11	25.02.14	n.a.



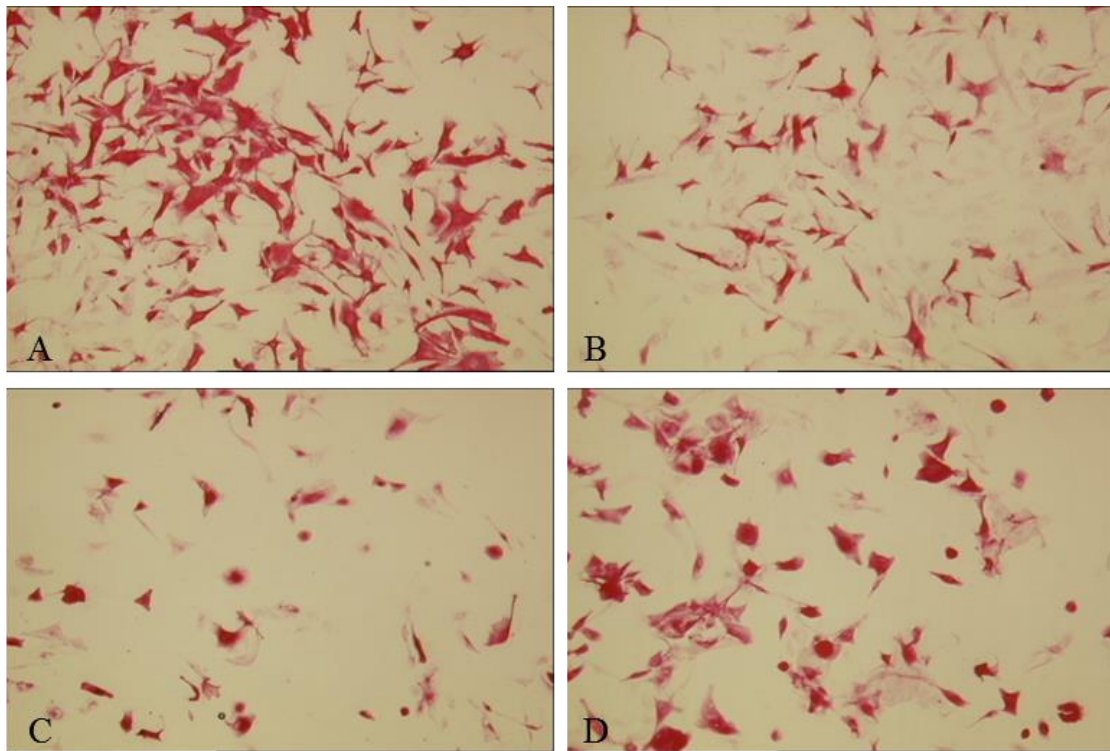
**Tab. 3:** Übersicht der verwendeten Patienten-PBMCs

BE = Blutentnahme; m = männlich; w = weiblich; NM = noduläres Melanom; ALM = Akro-lentiginöses Melanom; SSM = Superfiziell spreitendes Melanom; n.a. = not available; graue Spalten = Patienten, die innerhalb von 24 Monaten ein Rezidiv erlitten = Patientengruppe 1; weiße Spalten = Patienten, die innerhalb von 24 Monaten kein Rezidiv erlitten = Patientengruppe 2

Patientennummer bei Zytokinanalyse	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Geschlecht	m	m	m	w	w	m	w	m	w	m	m	m
Alter zum Zeitpunkt der BE	45	49	68	62	69	60	61	60	59	47	59	57
Diagnosedatum	15.05.08	15.09.08	15.06.08	15.08.08	15.03.09	15.10.08	15.03.08	15.11.08	15.09.08	15.08.08	15.10.08	15.08.08
Datum der Blutentnahme	25.07.08	14.10.08	27.08.08	23.01.09	20.05.09	05.12.08	19.09.08	15.12.08	28.10.08	30.09.08	26.11.08	16.09.08
Rezidiv innerhalb von 24 Monaten nach BE	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Therapie IFN- $\alpha$ von/bis/Schema	05/08-12/09, 3 Mio I.E. 3x /Woche s.c.	11/08-03/10, 3 Mio I.E. 3x /Woche s.c.	08/08-09/09, 3 Mio I.E. 3x /Woche s.c.	01/09-12/09, 3 Mio I.E. 3x /Woche s.c.	05/09-11/10, 3 Mio I.E. 3x /Woche s.c.	10/08-03/09, 3 Mio I.E. 3x /Woche s.c.	09/08-11/09, 3 Mio I.E. 3x /Woche s.c.	02/09-08/10, 3 Mio I.E. 3x /Woche s.c.	01/09-06/10, 3 Mio I.E. 3x /Woche s.c.	11/08-06/10, 3 Mio I.E. 3x /Woche s.c.	01/09-06/10, 3 Mio I.E. 3x /Woche s.c.	12/08-06/10, 3 Mio I.E. 3x /Woche s.c.
Therapie zum Zeitpunkt der Blutentnahme (PBMCs)	Interferontherapie	Keine Therapie	Keine Therapie	Keine Therapie	Keine Therapie	Interferontherapie	Keine Therapie	Keine Therapie	Keine Therapie	Keine Therapie	Keine Therapie	Keine Therapie
Stadium zum Zeitpunkt der Entnahmen	IV, pT3b, N1, M1c	IVa, pT3a, N0, M1c	IIIb, pT4b, N2a, M0	IIIb, pT1a, N2b, M0	IV, pT3, N0, M1c	IV, n.a.	IIIb, pT4a, N2, M0	IV, pT3a, N1, M1b	IV, pT3a, N1, M1	IIa, pT3a, N0, M0	IIa, pT2b, N0, M0	IIa, pT2b, N0, M0
Histologie	SSM	SSM	SSM	n.a.	Schleimhautmelanom	Retroaurikuläres Melanom	SSM	n.a.	Noduläres Melanom	SSM	SSM	SSM
Tumordicke	3,8 mm	2,1 mm	5,5 mm	0,3 mm	mind. 2 mm	9,0 mm	5,0 mm	4 mm	3 mm	4mm	1,5mm	2,0mm
Rezidivdatum	05/2010	02/2010	08/2009	11/2008	10/2010	03/2009	07/2008	06/2012	08/2011	rezidivfrei	rezidivfrei	rezidivfrei
Monate bis Rezidiv ab BE	21	15	11	-2	16	2	-2	41	33	rezidivfrei	rezidivfrei	rezidivfrei
Follow up seit Blutentnahme	34	24	24	69	19	19	74	55	26	65	66	68
Letzte Beobachtung	08.06.11	01.11.10	15.09.10	24.10.14	05.01.11	28.07.10	26.11.14	26.07.13	10.01.11	18.03.14	17.06.14	20.05.14
Todesursache	Melanom	Melanom	Melanom	lebt	Melanom	Melanom	lebt	Melanom	lebt	lebt	lebt	lebt
Todestag	08.06.11	01.11.10	15.09.10	lebt	05.01.11	28.07.10	lebt	26.07.13	lebt	lebt	lebt	lebt

### **3.2 Immunhistochemischer Nachweis von Melan A und HMB 45**

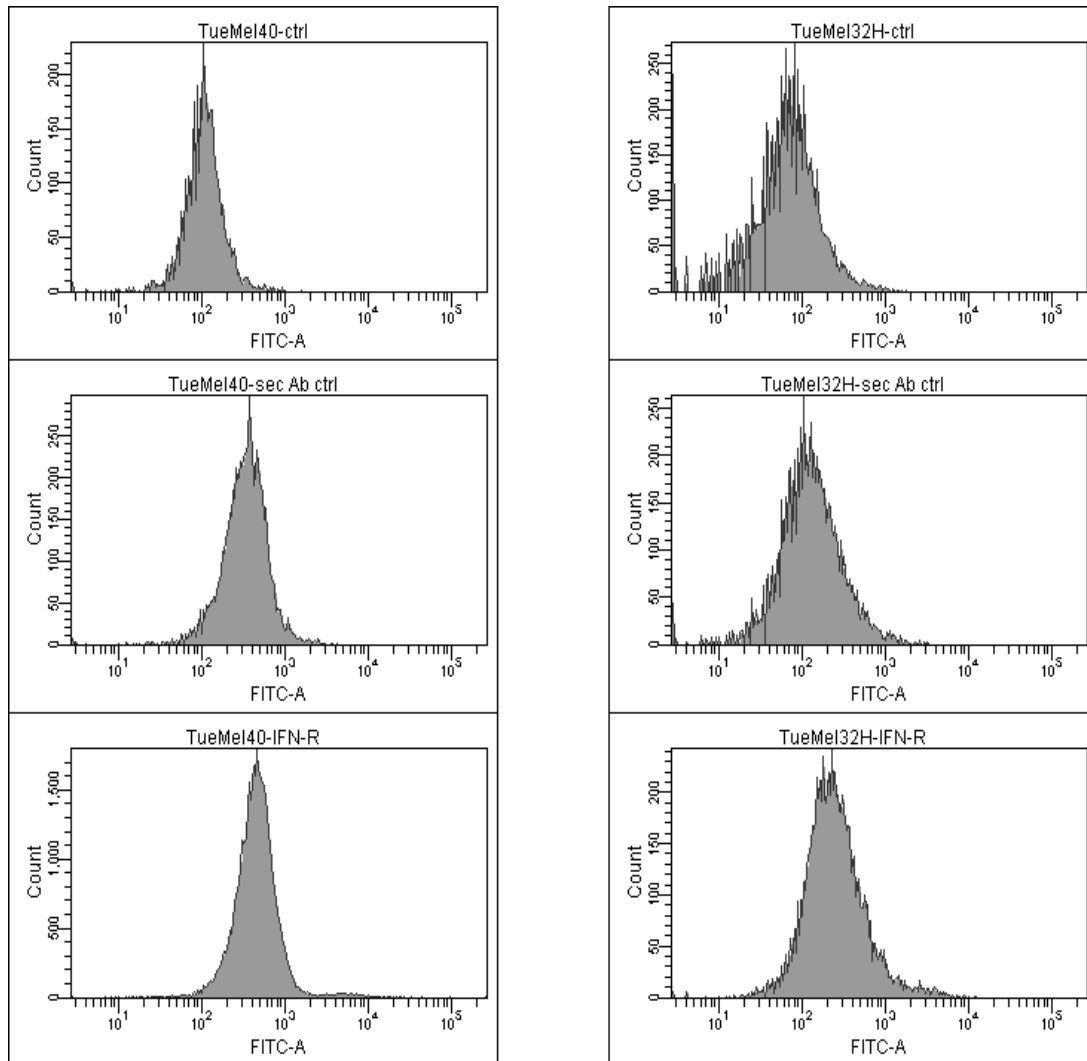
Der Nachweis, dass es sich bei den in der Zellkultur befindlichen Zellen um Melanomzellen handelte, erfolgte durch die immunhistochemische Färbung der melanomspezifischen zytoplasmatischen Proteine Melan A und HMB 45. Bei allen in den Experimenten verwendeten Melanomzelllinien konnten sowohl Melan A als auch HMB 45 nachgewiesen werden. Die nachfolgend abgebildeten Zellen der Zelllinien TüMel 39 und TüMel 53H stehen dabei beispielhaft für alle in den Versuchen verwendeten Melanomzellen (s. Abb. 4).



**Abb. 4:** Immunhistochemische Färbung von Melan A und HMB 45  
TüMel 39 nach Färbung von HMB 45 (A) und Melan A (B) bei 5-facher Vergrößerung.  
TüMel 53H nach Färbung von HMB 45 (C) und Melan A (D) bei 5-facher Vergrößerung.

### 3.3 Expression des IFNAR-1 auf der Zelloberfläche der Melanomzellen

Der Rezeptor für Interferon-alpha vermittelt die Wirkung der Typ-1 Interferone und wurde im Hinblick auf die nachfolgenden Versuche, in denen Alpha-Interferone (Multiferon, Roferon-A) zum Einsatz kamen, exemplarisch auf den Melanomzellen zweier Zelllinien mithilfe der FACS-Analyse nachgewiesen (s. Abb. 5).



**Abb. 5:** TüMel 40 und TüMel 32H exprimieren den IFNAR-1  
Die FACS-Analyse des IFNAR-1 bei TüMel 40 und TüMel 32H mit konjugierten monoklonalen Antikörpern zeigt die mit dem FITC-Kanal erfasste Fluoreszenz bei der Kontrollgruppe ohne Ak (ctrl), nach alleiniger Zugabe des 2. Ak (sec Ab ctrl) und nach Kombination beider Ak (IFN-R). Aus Kostengründen erfolgte die Testung nur bei 2 Zelllinien.

Die durchflusszytometrische Analyse für TüMel 40 und TüMel 32H ergab eine deutlich messbare Signalanhebung der Fluoreszenz nach Zugabe des Primär- sowie des FITC-markierten Sekundärantikörpers im Vergleich zu den Kontrollen (alleinige Inkubation mit dem Sekundärantikörper ohne vorherige Inkubation mit dem Primärantikörper).

### **3.4 Direkte antiproliferative Effekte von Multiferon und Roferon-A**

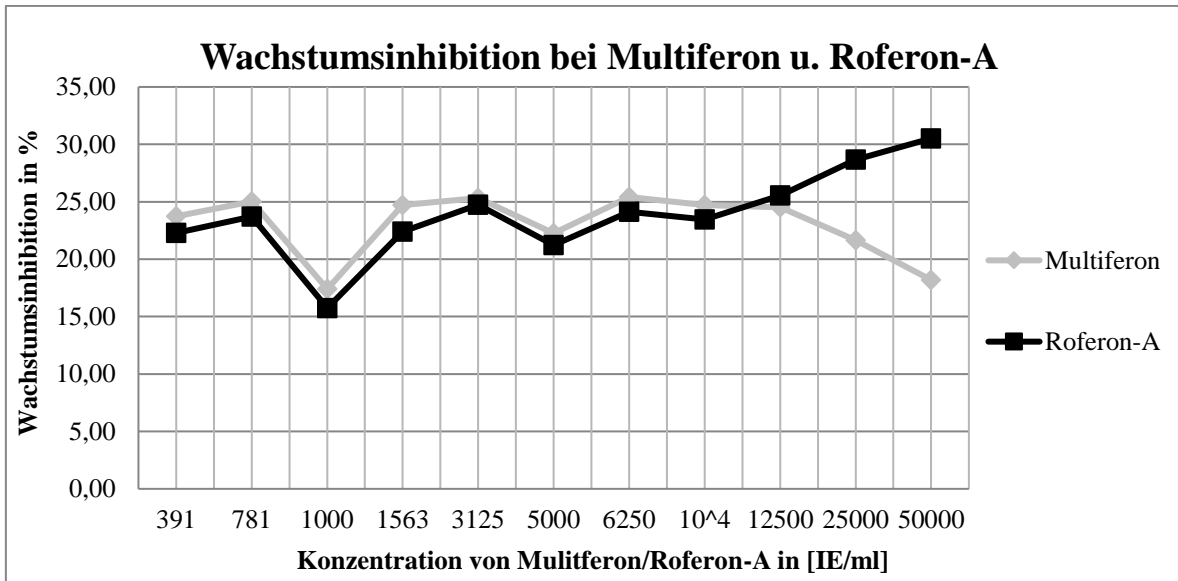
Der erste Teil der Versuche umfasste die isolierte Behandlung von 18 verschiedenen Melanomzelllinien mit Multiferon und Roferon-A. In den Experimenten wurden sowohl kommerzielle als auch aus Tumorgewebe von Patienten etablierte Zelllinien mit den Alpha-Interferonen Multiferon und Roferon-A mit 11 verschiedenen Konzentrationen in einem Bereich von 381-50000 IE/ml behandelt. Alle mit Multiferon oder Roferon-A behandelten Melanomzelllinien zeigten eine signifikante Wachstumshemmung ( $p < 0,01$ ) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Bei 3 Konzentrationen (5000 IE/ml, 25000 IE/ml und 50000 IE/ml) offenbarten die Versuche signifikante Unterschiede der beiden Alpha-Interferone in der Potenz ihrer direkten antiproliferativen Wirkung auf die Melanomzellen. Bei 5000 IE/ml zeigte sich eine signifikant höhere Wachstumsinhibition bei der Verwendung von Multiferon (22,27 % vs. 21,24 %,  $p = 0,007$ ). Hingegen ergaben sich signifikant höhere Wachstumsinhibitionen mit Roferon-A bei 25000 IE/ml (28,66 vs. 21,63 %,  $p = 0,018$ ) und bei 50000 IE/ml (30,52 % vs. 18,18 %,  $p = 0,015$ ).

Unabhängig von der Interferonart und der Konzentration lagen die Wachstumsinhibitionsraten der getesteten Zelllinien in einem Bereich von -10 % (stärkere Proliferation nach IFN im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle) bis 63,7 %. Die durchschnittlichen Wachstumsinhibitionsraten bei den getesteten Konzentrationen lagen zwischen 15,75 % mit Roferon-A bzw. 17,40 % mit Multiferon und 30,52 % mit Roferon-A bzw. 25,41 % mit Multiferon. Die Abhängigkeit der Wachstumsinhibition bei Steigerung der Konzentration der beiden Alpha-Interferone war insgesamt gering ausgeprägt. So betrug die Differenz der Mittelwerte der Wachstumsinhibitionsraten zwischen der niedrigsten und der höchsten Konzentration für Roferon-A 14,77 % und für Multiferon 8,01 %. Bei den höchsten Konzentrationen (25.000 IE/ml-50.000 IE/ml) von Multiferon und Roferon-A ließen sich unterschiedliche Effekte beobachten. Bei 3 Zelllinien (WM-266-4, TüMel39, TüMel41H) führten diese Konzentrationen bei der Verwendung von Roferon-A zu Wachstumsinhibitionsraten von bis zu 60 %, bei anderen hingegen (z. B. TüMel 43, TüMel 40) konnte eine Wachstumsinhibition beobachtet werden, die sowohl bei der Verwendung von Multiferon als auch bei Roferon-A deutlich geringer ausgeprägt war als bei den mittleren Konzentrationen

(s. Tab. 4). Nachfolgend aufgeführt ist eine Übersicht (Tab. 4) mit allen erfassten Wachstumsinhibitionsraten der verschiedenen Zelllinien bei den getesteten IFN- $\alpha$ -Konzentrationen. Des Weiteren sind die durchschnittlichen Wachstumsinhibitionsraten mit Multiferon und Roferon-A in Abb. 4 dargestellt.

**Tab. 4:** Wachstumsinhibitionsraten in % bei den getesteten Zelllinien und Konzentrationen  
Graue Felder: Wachstumsinhibition mit Multiferon. Weiße Felder: Wachstumsinhibition mit Roferon-A. Leere Felder: Konzentration nicht getestet.

Zelllinie	Konzentration von Multiferon/Roferon-A in [IE/ml]										
	391	781	1000	1563	3125	5000	6250	10 <sup>4</sup>	12500	25000	50000
451	-	-	12,7	-	-	13,5	-	13,0	-	-	17,2
	-	-	11,3	-	-	12,9	-	8,2	-	-	5,3
852	-	-	12,3	-	-	18,2	-	20,2	-	-	19,8
	-	-	13,4	-	-	17,1	-	19,0	-	-	24,3
MEWO	-	-	20,4	-	-	24,1	-	26,7	-	-	28,2
	-	-	17,7	-	-	22,6	-	28,1	-	-	30,8
Skme128	-	-	8,9	-	-	13,1	-	15,9	-	-	22,8
	-	-	10,0	-	-	13,0	-	17,6	-	-	26,0
BLM	-	-	32,8	-	-	39,5	-	45,6	-	-	48,4
	-	-	28,8	-	-	38,0	-	41,9	-	-	48,7
MV3	-	-	17,2	-	-	25,1	-	27,0	-	-	29,7
	-	-	13,3	-	-	23,8	-	26,0	-	-	32,8
MM60	9,3	13,1	-	9,8	7,6	-	9,1	-	7,5	7,2	-10,0
	14,6	16,8	-	12,6	11,0	-	12,0	-	10,5	15,5	41,6
WM266-4	42,9	42,6	-	43,3	50,0	-	49,5	-	53,4	46,7	48,5
	35,4	41,4	-	39,7	44,3	-	43,0	-	44,3	43,2	63,7
A375R	5,9	5,1	-	6,3	4,6	-	2,8	-	4,7	-2,2	1,6
	-0,4	1,1	-	0,2	3,2	-	2,2	-	1,9	4,0	39,5
A375S	20,0	21,5	-	21,8	26,2	-	18,2	-	15,7	14,5	3,9
	17,1	13,1	-	18,1	16,0	-	12,3	-	15,0	16,8	26,5
TüMel 41H	29,8	34,4	-	32,3	24,1	-	31,8	-	28,0	25,2	33,3
	23,6	23,5	-	23,4	22,8	-	24,0	-	35,0	50,3	60,0
ZüMel 1H	7,7	10,5	-	6,2	3,6	-	9,1	-	3,4	5,9	0,2
	3,7	9,8	-	1,6	5,9	-	12,2	-	4,3	24,8	45,7
TüMel 43	25,1	21,1	-	19,3	28,2	-	20,9	-	22,4	14,0	2,8
	25,3	19,3	-	19,5	28,4	-	23,5	-	23,8	23,2	-5,4
TüMel 20H2	29,0	31,4	-	32,8	32,0	-	33,6	-	33,7	31,6	17,9
	28,1	34,3	-	34,0	31,4	-	34,4	-	35,0	31,9	22,4
TüMel 38	33,5	34,3	-	37,9	39,7	-	37,0	-	41,0	30,2	18,5
	32,9	29,8	-	36,4	36,4	-	38,6	-	38,1	30,9	17,6
TüMel 40	30,5	33,2	-	29,5	32,3	-	35,7	-	31,8	33,6	16,9
	33,2	32,8	-	33,0	31,7	-	30,9	-	36,9	35,3	15,3
TüMel 42	18,0	22,2	-	20,0	19,4	-	19,2	-	18,7	14,6	2,3
	25,3	26,3	-	21,3	25,0	-	18,6	-	18,1	14,4	-4,3
TüMel 39	33,2	31,0	-	37,4	36,1	-	38,0	-	33,8	38,3	25,1
	28,8	36,1	-	28,9	40,6	-	37,9	-	43,8	53,6	58,6
Durchschnittliche Wachstumsinhibition mit Multiferon	23,75	25,02	17,40	24,71	25,33	22,27	25,41	24,72	24,51	21,63	18,18
p-Wert: Multiferon im Vergleich zur Kontrolle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Durchschnittliche Wachstumsinhibition mit Roferon-A	22,29	23,70	15,75	22,39	24,73	21,24	24,13	23,46	25,56	28,66	30,52
p-Wert: Roferon-A im Vergleich zur Kontrolle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
p-Wert zwischen Multiferon und Roferon-A	0,308	0,377	0,140	0,085	0,644	0,007	0,283	0,290	0,479	0,018	0,015



**Abb. 4:** Durchschnittliche Wachstumsinhibition bei den getesteten Konzentrationen von Multiferon und Roferon-A. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Alpha-Interferonen ergaben sich bei 5000 IE/ml, bei 25000 IE/ml und bei 50000 IE/ml.

### 3.5 Zytokinprofil – Stimulation von PBMCs mit Multiferon und Roferon-A

Die im weiteren Verlauf dargestellten Resultate der Zytokinanalyse umfassen die Betrachtung der Konzentrationen von 13 verschiedenen Zytokinen, die von den PBMCs der insgesamt 12 Patienten (s. Tabelle 3) nach vorausgehender Stimulation mit Multiferon und Roferon-A sezerniert wurden. Die Erfassung der Konzentration dieser Zytokine sollte zeigen, welche von ihnen in welchem Umfang Alpha-Interferon-abhängig sezerniert wurden und somit möglicherweise bei der Vermittlung von antiproliferativen Effekten von Bedeutung sein könnten. Des Weiteren sollte untersucht werden, inwieweit die Konzentrationen der Zytokine mit der rezidivfreien Zeit der Patienten korrelierten und ob Unterschiede im stimulatorischen Potenzial der Alpha-Interferone bestanden.

**Tab. 5:** Induktionsraten (Konzentration der stimulierten PBMCs in Bezug zu der Konzentration der unstimulierten PBMCs) der Zytokine  
Graue Felder: Multiferon; weiße Felder: Roferon-A

Patienten	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-1RA	IL-6	IL-15	IL-17a	IP 10	MCP-1	MCP-3	MIP-1 $\alpha$	MIP-1 $\beta$	MIP-3 $\alpha$	TNF- $\alpha$
P1	1,69	1,34	2,38	11,54	1,33	2,83	9,42	0,94	1,70	2,73	2,32	1,58	2,03
	1,51	1,45	2,61	12,98	1,33	2,03	9,95	0,95	1,82	2,71	2,20	1,48	1,76
P2	3,46	0,65	3,15	3,25	4,17	2,12	23,49	0,91	10,24	2,03	2,34	1,23	1,38
	3,19	0,74	2,58	3,10	4,06	2,05	18,50	1,00	8,35	1,68	1,86	1,19	1,05
P3	1,89	1,00	2,37	1,00	0,89	1,38	2,74	1,05	0,84	1,63	1,38	1,09	1,15
	1,95	1,00	2,41	1,49	1,07	1,25	4,60	1,07	1,24	1,62	1,50	1,15	1,15
P4	1,51	0,89	3,08	1,66	1,16	1,42	4,21	0,96	1,28	1,64	1,75	1,20	1,08
	1,77	1,29	2,91	1,44	1,11	1,49	5,67	0,91	1,37	1,41	1,62	1,18	0,84
P5	2,47	1,00	3,46	1,00	1,34	1,58	3,37	1,07	1,79	1,34	1,36	1,25	1,38
	2,33	1,00	3,15	1,00	1,07	1,76	3,06	1,00	1,21	1,25	1,21	1,19	1,16
P6	1,93	1,12	3,07	1,93	3,05	1,45	3,32	1,01	2,89	1,67	1,58	1,38	1,18
	2,25	1,27	2,89	2,33	2,86	1,30	3,35	0,97	2,55	1,50	1,35	1,20	1,22
P7	2,60	1,00	4,08	1,00	6,58	2,68	23,40	1,00	8,21	2,36	1,66	1,37	0,92
	2,81	1,00	4,26	1,00	6,98	2,45	23,40	0,95	8,55	1,92	1,55	1,33	0,86
P8	3,61	1,00	3,62	1,00	1,43	2,53	7,05	1,10	5,20	2,60	1,91	1,43	2,00
	3,97	1,00	3,38	1,00	1,85	2,53	8,83	0,93	5,16	2,10	1,68	1,33	1,22
P9	15,82	1,00	3,45	1,00	1,00	2,05	10,93	1,19	3,68	1,82	1,47	1,30	1,60
	18,12	1,00	4,18	1,00	1,74	2,48	13,18	1,23	4,74	1,75	1,66	1,46	1,65
P10	8,24	0,94	3,12	0,87	3,39	2,56	39,45	0,91	4,68	1,83	1,73	1,29	1,02
	7,76	0,94	3,21	1,03	3,28	3,06	45,04	1,02	4,32	1,64	1,68	1,26	1,38
P11	1,25	1,00	3,51	2,80	1,51	1,46	3,44	0,83	1,58	1,63	1,49	1,17	1,06
	1,32	1,00	3,43	2,92	1,54	1,39	2,73	0,82	1,64	1,39	1,55	1,10	0,94
P12	1,89	1,00	4,30	1,34	2,07	1,78	1,85	1,44	1,32	2,33	1,59	1,34	1,82
	1,71	1,00	3,85	1,70	1,89	1,61	2,02	1,04	1,44	1,70	1,43	1,18	1,48
$\bar{x}$	3,86	0,99	3,30	2,37	2,33	1,99	11,06	1,03	3,62	1,97	1,71	1,30	1,39
P1-12	4,06	1,06	3,24	2,58	2,40	1,95	11,69	0,99	3,53	1,72	1,61	1,25	1,23
$\bar{x}$	2,22	1,00	3,09	3,05	2,65	1,92	9,99	0,99	3,85	1,92	1,77	1,30	1,30
P1-7	2,26	1,11	2,97	3,33	2,64	1,76	9,79	0,98	3,58	1,73	1,61	1,25	1,15
$\bar{x}$	6,16	0,99	3,60	1,40	1,88	2,08	12,54	1,09	3,29	2,04	1,64	1,31	1,50
P8-12	6,58	0,99	3,61	1,53	2,06	2,21	14,36	1,01	3,46	1,71	1,60	1,27	1,34
p-Wert zw. Multiferon u. Roferon-A P1-12	0,364	0,098	0,549	0,117	0,444	0,715	0,387	0,285	0,678	0,002	0,060	0,101	0,072
p-Wert P1-7 vs. P8-12	0,220	0,786	0,114	0,274	0,417	0,637	0,754	0,409	0,740	0,633	0,471	0,909	0,438
	0,237	0,435	0,055	0,457	0,539	0,244	0,613	0,676	0,570	0,954	0,925	0,772	0,289
p-Werte im Vergleich zur Kontrolle	0,002	0,893	0,000	0,028	0,004	0,000	0,000	0,479	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006
	0,002	0,345	0,000	0,012	0,002	0,000	0,002	0,737	0,000	0,000	0,000	0,000	0,023

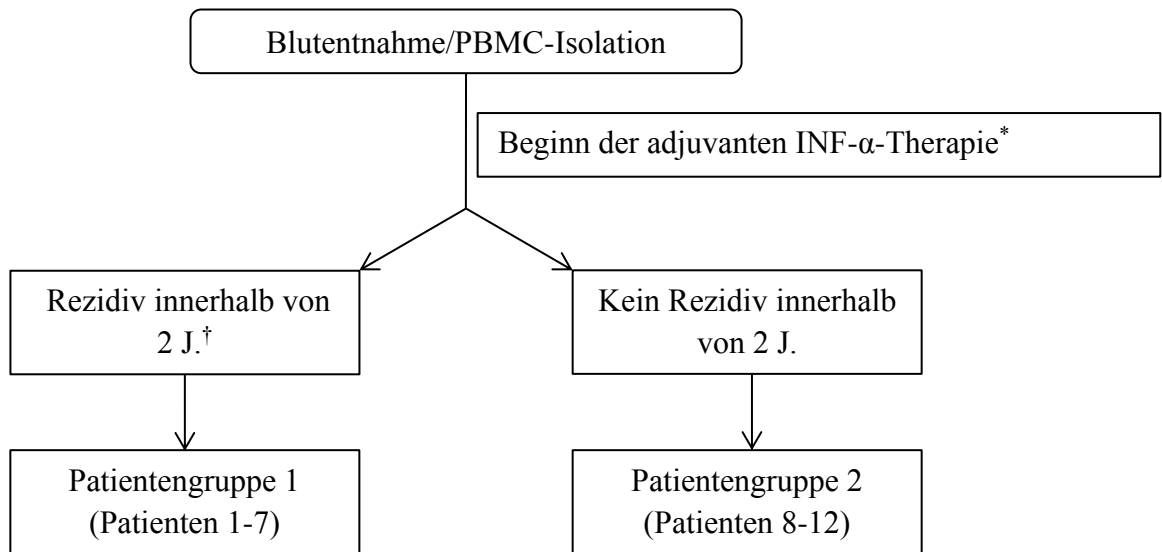
Mit Ausnahme von MCP-1 und Il-1beta zeigte sich bei allen weiteren getesteten Zytokinen eine signifikante Induktion nach vorheriger Stimulation der PBMCs mit den Alpha-Interferonen (s. Tab. 5). Signifikante Unterschiede zwischen den Alpha-Interferonen in den Induktionsraten konnten nur für MIP-1 $\alpha$  beobachtet werden. Hier zeigte sich eine signifikant höhere Induktionsrate nach der Stimulation der PBMCs mit Multiferon im Vergleich zu Roferon-A (1,97 vs. 1,72, p = 0,002). Bei allen weiteren Zytokinen bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Induzierbarkeit durch Multiferon und Roferon-A.

Bei den Zytokinen Il-1 $\alpha$ , Il-1RA, Il-6, Il-15, IP 10 und MCP-3 zeigten sich Zytokinkonzentrationen, die nach der Stimulation der PBMCs mit den Alpha-Interferonen mindestens doppelt so hoch waren wie die Konzentrationen der unstimulierten Kontrollgruppen. Daher wurden diese Zytokine der Gruppe der Zytokine zugeordnet, die stark auf die Stimulation mit Interferon-alpha reagierten. Für Il-1 $\beta$ , Il-17a, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-3 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  lagen die Induktionsraten nach der Stimulation mit den Alpha-Interferonen zwischen 1 und 2. Diese Zytokine wurden aufgrund ihrer geringeren Induzierbarkeit zur Gruppe der Zytokine gezählt, die schwach auf Interferon-alpha reagierten.

### **Korrelation der Induktionsraten der Zytokine mit der rezidivfreien Zeit der Patientengruppen**

Die retrospektive Einteilung der Patienten in zwei verschiedene Gruppen mit 7 und 5 Patienten (Abb. 10) erfolgte aufgrund des Auftretens von Rezidiven innerhalb von 24 Monaten unter adjuvanter Therapie mit Roferon-A. Der Beobachtungszeitraum begann mit der Blutentnahme/PBMC-Isolation und endete nach 24 Monaten. Die Patienten, die in diesem Zeitraum ein Rezidiv entwickelten, wurden der Patientengruppe 1 zugeordnet und die rezidivfreien Patienten der Patientengruppe 2.



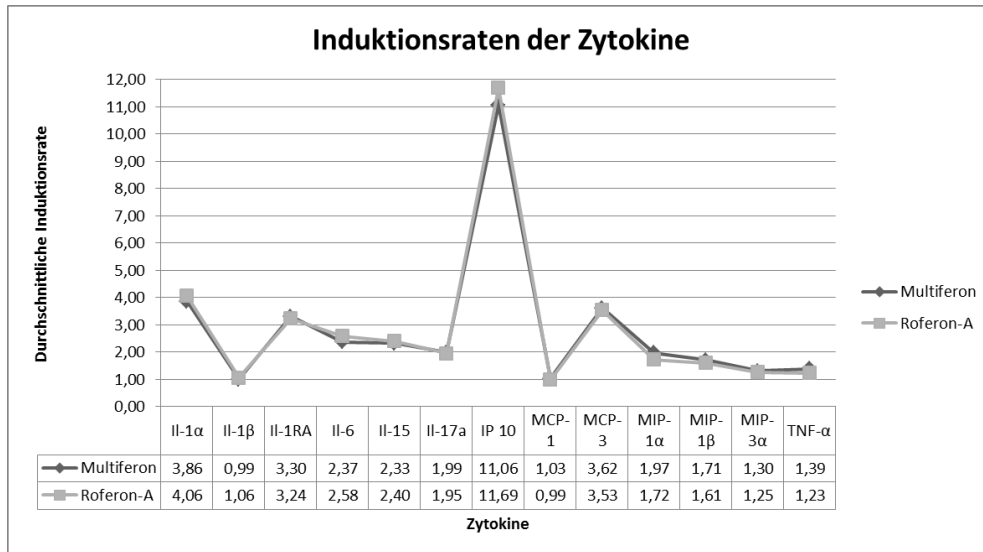


**Abb. 10:** Einteilung der Patientengruppen bei der Zytokinanalyse.

\* Bei den Patienten 1 und 6 begann die IFN- $\alpha$ -Therapie bereits vor der Blutentnahme. † Die Patienten 4 und 7 entwickelten bereits vor der Blutentnahme ein Rezidiv.

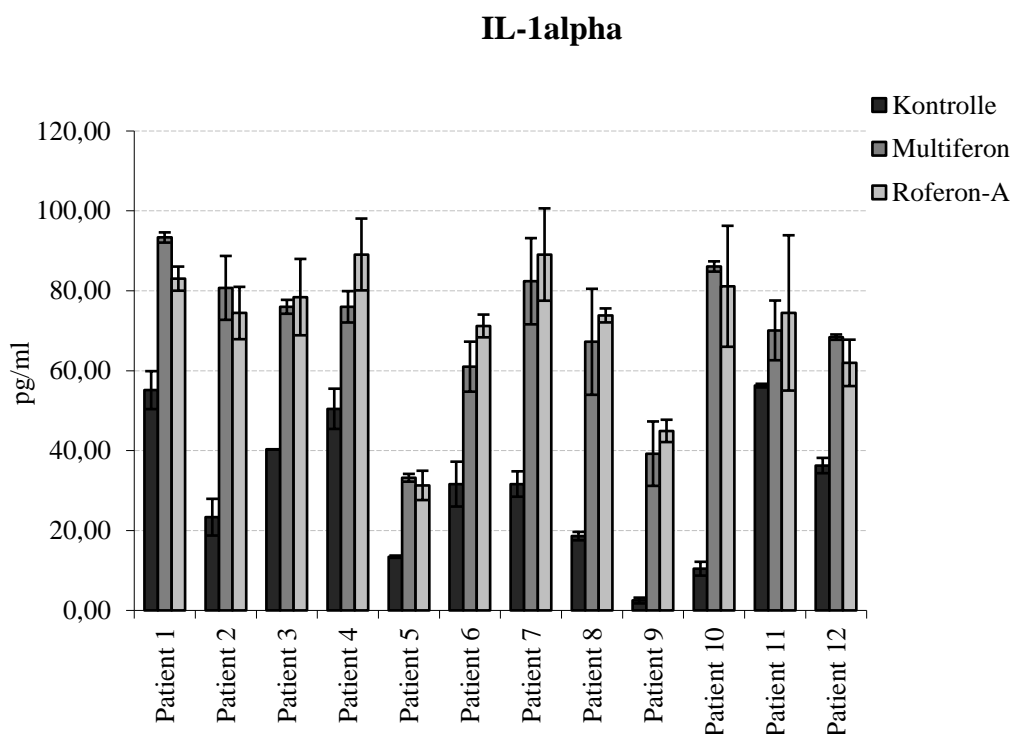
In der Betrachtung der PBMCs und ihrer Zytokinprofile im Kontext ihrer zugeordneten Patientengruppe (s. Abb. 10) ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Induzierbarkeit zwischen den beiden (s. Tab.5) Patientengruppen feststellen. Somit konnte kein Zusammenhang zwischen den Induktionsraten der Zytokine in den jeweiligen Patientengruppen und dem rezidivfreien Überleben nachgewiesen werden.

Die darüber hinaus dargestellten Diagramme (Abb. 10-22) zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung der absoluten Konzentration der jeweiligen Zytokine im Überstand der Kontrollansätze im Vergleich zu den mit Multiferon und Roferon-A stimulierten Ansätzen (10000 U/ml). Des Weiteren sind in Abb.10. die durchschnittlichen Induktionsraten aller getesteten Zytokine dargestellt.



**Abb. 10:** Durchschnittliche Induktionsraten der getesteten Zytokine nach Stimulation mit Multiferon und Roferon-A

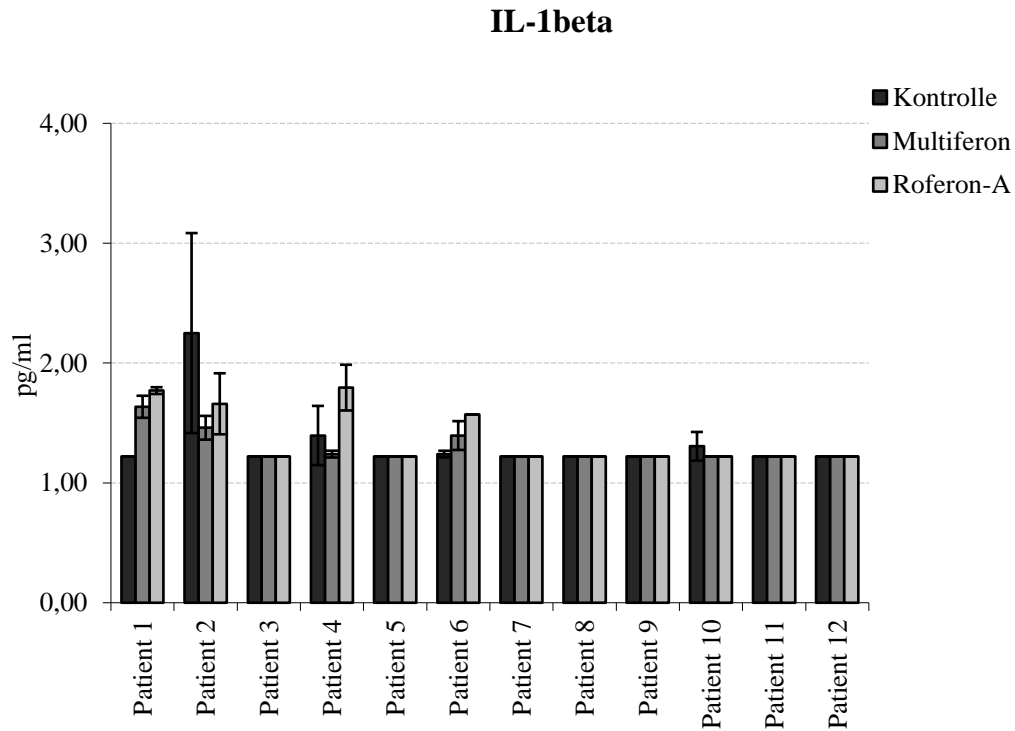
## IL-1alpha



**Abb. 11:** Konzentration des Zytokins Interleukin-1 $\alpha$  in pg/ml nach Stimulation der PBMCs mit Multiferon und Roferon-A

Für IL-1alpha (s. Abb. 11) zeigten die Kontrollansätze eine variable Ausgangskonzentration. Die Stimulation mit Multiferon und Roferon-A führte durchschnittlich bei den PBMCs zu einer signifikanten Sekretion von IL-1alpha. Bei den PBMCs der Patienten 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 konnte mindestens eine Verdopplung der Zytokinkonzentration im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Die größte Steigerung (18fache) der Zytokinkonzentration im Vergleich zur Kontrolle ließ sich bei den PBMCs von Patient 9 erfassen. Im Durchschnitt konnten keine signifikanten Unterschiede im stimulatorischen Potenzial zwischen Multiferon und Roferon-A beobachtet werden.

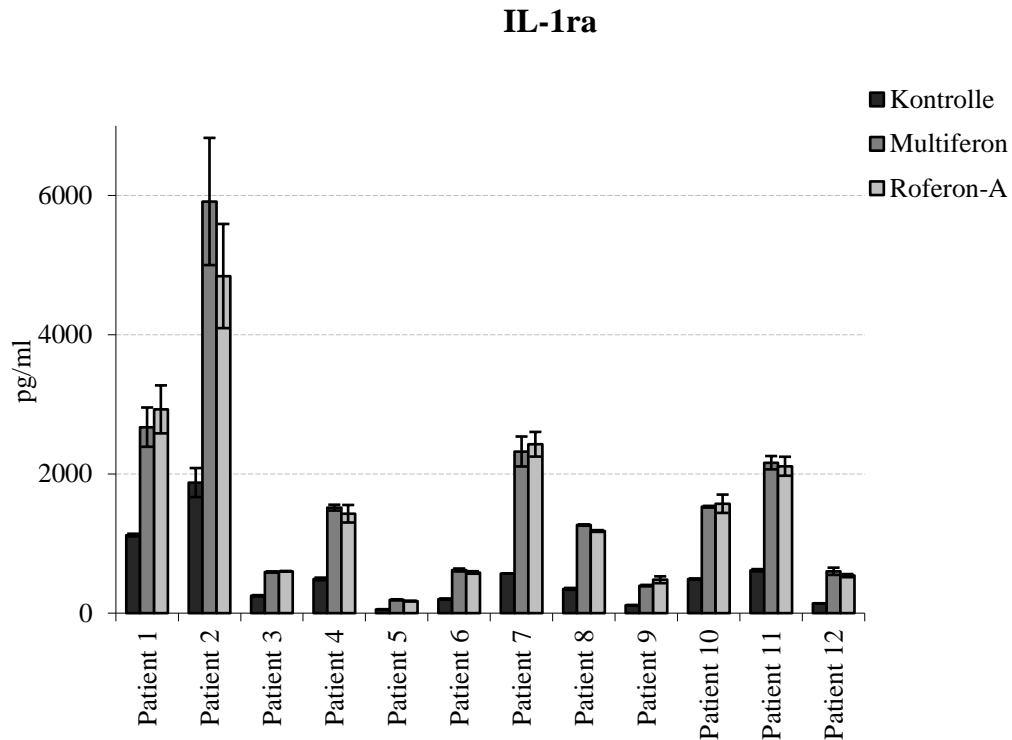
## IL-1beta



**Abb. 12:** Konzentration des Zytokins Interleukin-1-beta in pg/ml nach Stimulation der PBMCs mit Multiferon und Roferon-A

Von den PBMCs der Patienten 2, 4, 6 und 10 abgesehen, lagen die detektierten Zytokinkonzentrationen für IL-1beta in den Kontrollansätzen unterhalb der Nachweisgrenze von 1,22 pg/ml (s. Abb. 12). Da Zytokinkonzentrationen, die unterhalb dieser Nachweisgrenze liegen, nicht zuverlässig quantifiziert werden können, wurden alle Werte, die unterhalb der Nachweisgrenze lagen, auf die untere Nachweisgrenze des Assays von 1,22 pg/ml normiert. Die Stimulation der PBMCs mit Multiferon und Roferon-A erbrachte im Durchschnitt keine signifikante Steigerung der Konzentration im Vergleich zu den Kontrollansätzen. Im Mittel waren keine signifikanten Unterschiede im stimulatorischen Potenzial der Alpha-Interferone zu erkennen.

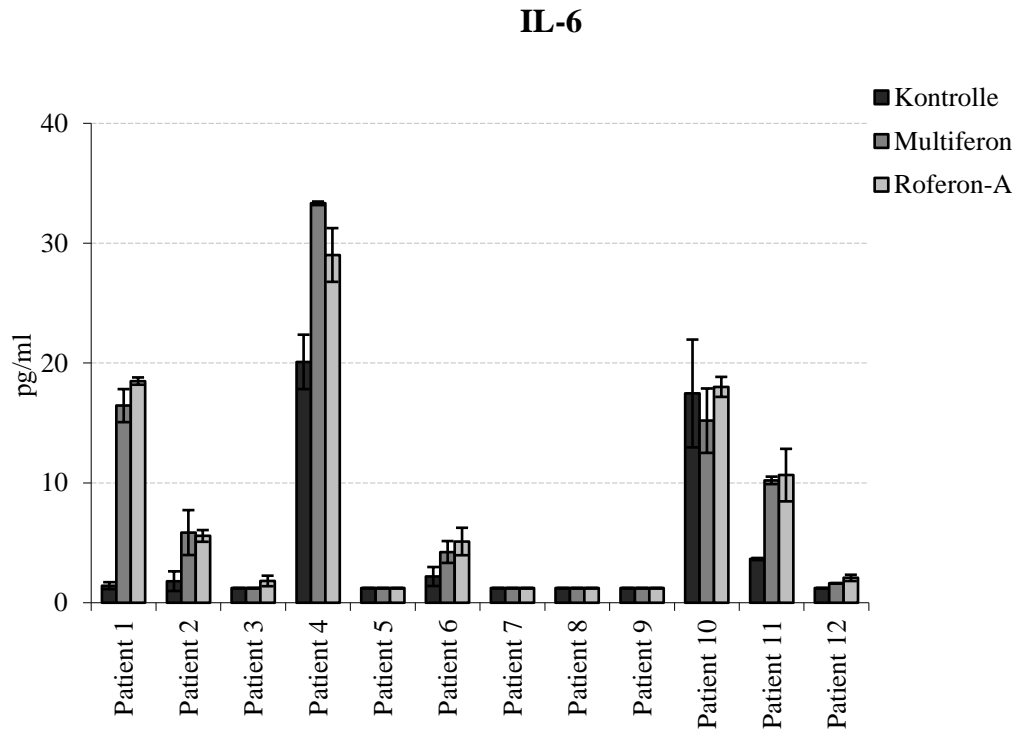
## IL-1ra



**Abb. 13:** Konzentration des Zytokins Interleukin 1-ra in pg/ml nach Stimulation der PBMCs mit Multiferon und Roferon-A

Bei variablen Konzentrationen von IL-1ra (s. Abb. 13) in den Kontrollansätzen führte die Stimulation mit Multiferon oder Roferon-A im Durchschnitt zu einem signifikanten Anstieg der Zytokinkonzentration, wobei die PBMCs von Patient 7 mit der größten Steigerung auf die Stimulation reagierten und sich eine Vervierfachung der Ausgangskonzentration einstellte. Auch bei den PBMCs der anderen Patienten war mindestens eine Verdopplung der Konzentration zu verzeichnen. Auch hier zeigten sich im Durchschnitt keine signifikanten Differenzen des stimulatorischen Potenzials zwischen Multiferon und Roferon-A.

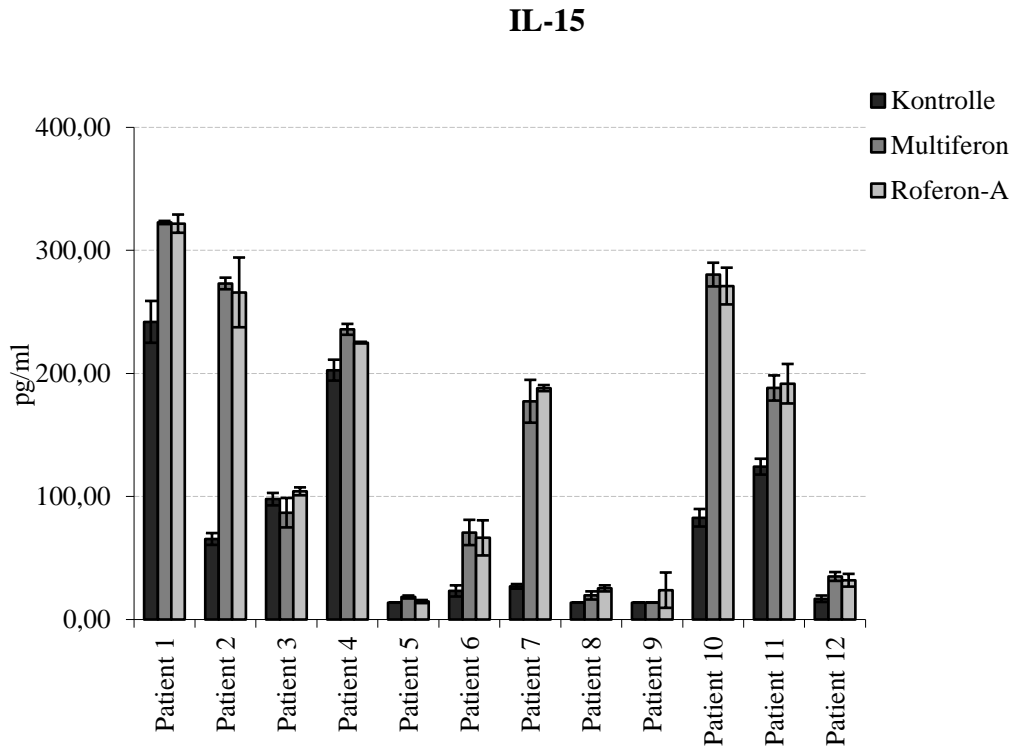
## IL-6



**Abb. 14:** Konzentration des Zytokins Interleukin 6 in pg/ml nach Stimulation der PBMCs mit Multiferon oder Roferon-A

Bei der Konzentration von IL-6 (s. Abb. 14) zeigte sich bei den Kontrollansätzen ein variables Level. Da die erfassten Zytokinkonzentrationen bei den PBMCs der Patienten 3, 5, 7, 8, 9 und 12 unterhalb der Nachweisgrenze lagen, wurden diese auf die untere Nachweisgrenze des Assays von 1,22 pg/ml normiert. Die PBMCs der Patienten 5, 7, 8, 9 ließen weder in der Kontrolle, noch nach der Stimulation eine im Messbereich liegende Konzentration erkennen. Die IL-6-Konzentration bei Patient 1 offenbarte die größte Steigerung (13fach) im Vergleich zum Kontrollansatz. Die Unterschiede im stimulatorischen Potenzial der Alpha-Interferone fielen im Durchschnitt nicht signifikant aus.

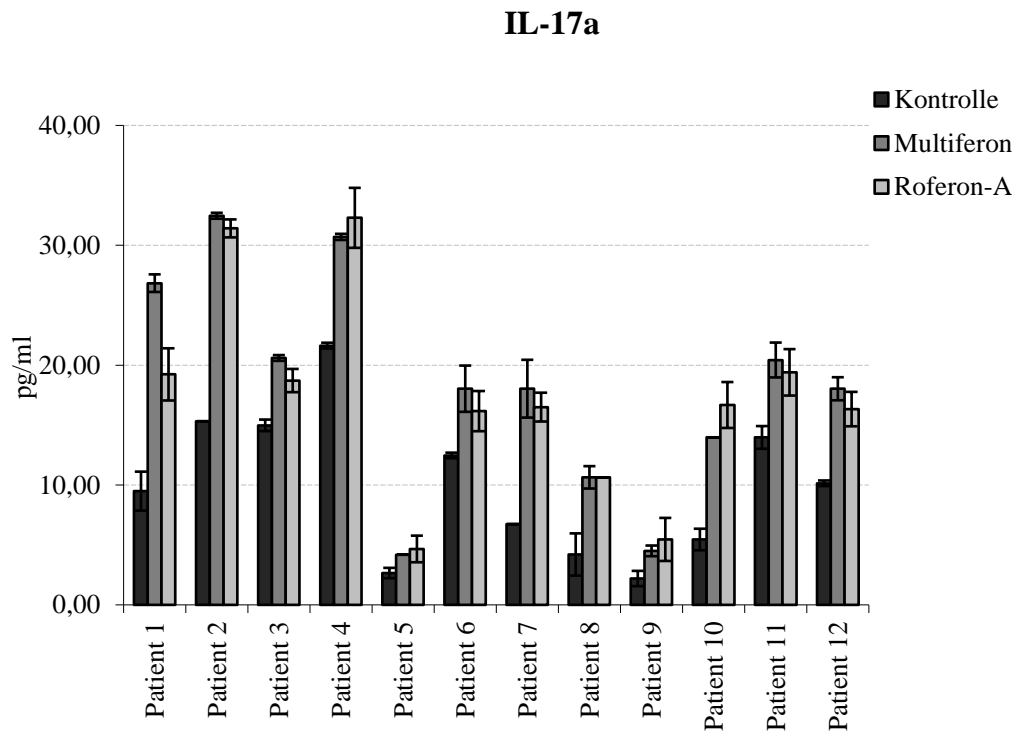
## IL-15



**Abb. 15:** Konzentration des Zytokins Interleukin-15 in pg/ml nach Stimulation der PBMCs mit Multiferon und Roferon-A

Bei IL-15 (s. Abb. 15) waren variable Zytokinkonzentrationen bei den Kontrollansätzen zu verzeichnen. Mindestens eine Verdopplung der Zytokinkonzentration nach Stimulation ließ sich bei den PBMCs der Patienten 2, 6, 7, 10 und 12 erkennen. Die größte Steigerung der Zytokinkonzentration im Vergleich zu den Kontrollansätzen war bei den PBMCs von Patient 7 zu erkennen, hier stieg die Konzentration um das 6 bis 7fache an. Insgesamt zeigte sich eine signifikante Induktion von IL-15 nach der Stimulation der PBMCs mit den Alpha-Interferonen. Die Alpha-Interferone zeigten im Durchschnitt hinsichtlich ihres stimulatorischen Potenzials keine signifikanten Unterschiede.

## IL-17a



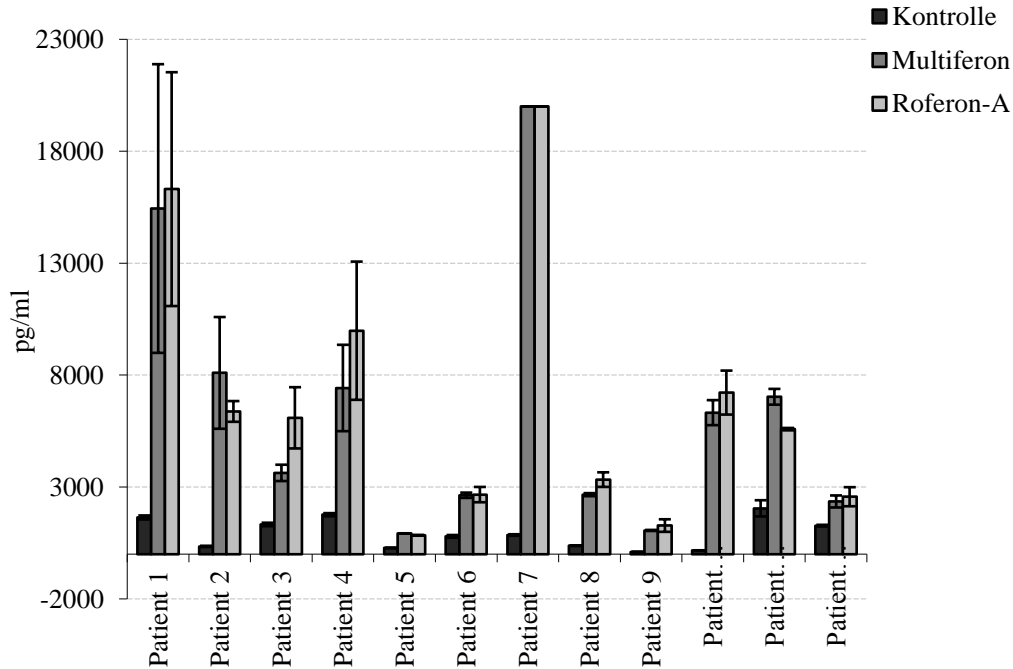
**Abb. 16:** Konzentration des Zytokins Interleukin-17-alpha in pg/ml nach Stimulation der PBMCs mit Multiferon und Roferon-A

Die Konzentrationen von IL-17a (s. Abb. 16) zeigen bei einem variablen Grundlevel der Kontrollansätze bei fast allen PBMCs ein im Durchschnitt signifikantes Ansprechen auf die vorherige Stimulation mit Multiferon und Roferon-A. Eine Verdopplung im Vergleich zu der Konzentration der Kontrollansätze ergab sich bei den PBMCs der Patienten 1, 2, 7, 8, 9 und 10. Im Mittel konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit Multiferon oder Roferon-A stimulierten Gruppen beobachtet werden.



## IP 10

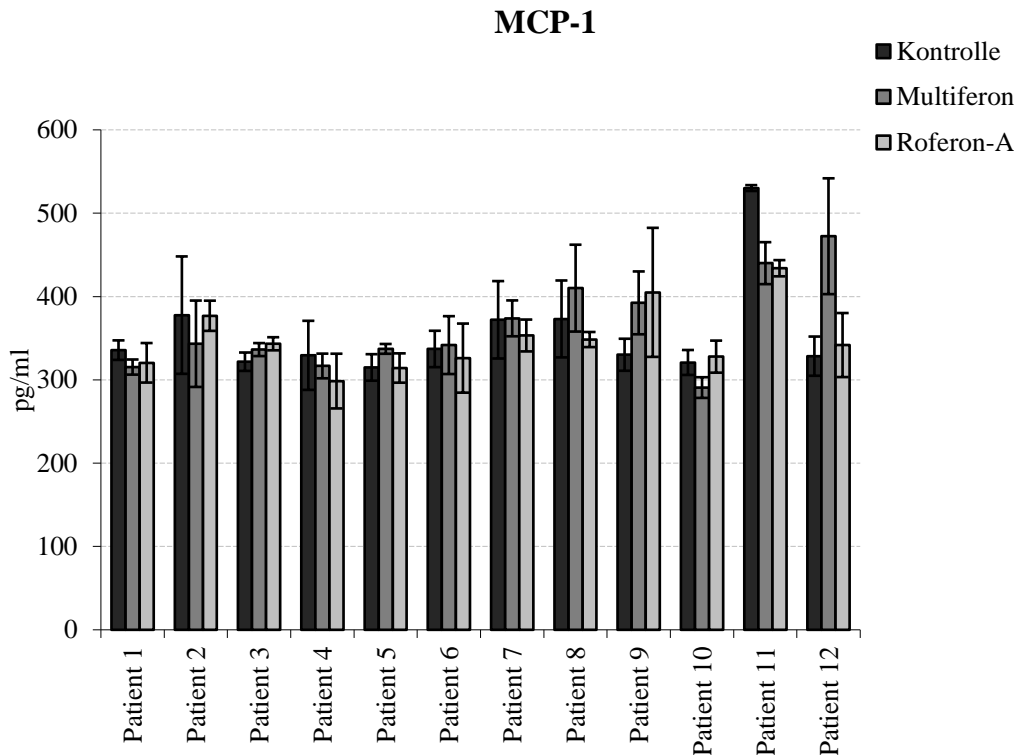
### IP 10



**Abb. 17:** Konzentration des Zytokins IP 10 in pg/ml nach Stimulation der PBMCs mit Multiferon und Roferon-A

Für das Zytokin IP 10 (s. Abb. 17) zeigten die Kontrollansätze bei allen Patienten eine variable Konzentration. Nach der Stimulation reagierten die PBMCs der Patienten mit einer im Durchschnitt signifikanten Steigerung der Sekretion des Zytokins. Bei allen Patienten konnte mindestens eine Verdopplung der Kontrollkonzentration beobachtet werden. Bei Patient 7 ließ sich eine Zytokinkonzentration erfassen, die oberhalb der Nachweisgrenze lag. Daher wurde die Konzentration in diesem Ansatz auf die obere Nachweisgrenze für IP 10 von 20000,00 pg/ml normiert. Die größte Steigerung im Vergleich zur Kontrolle wurde bei den PBMCs von Patient 10 beobachtet, hier zeigte sich eine Konzentration, die 45mal so hoch war wie die in der Kontrolle. Im Mittel ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Multiferon und Roferon-A im stimulatorischen Potenzial nachweisen.

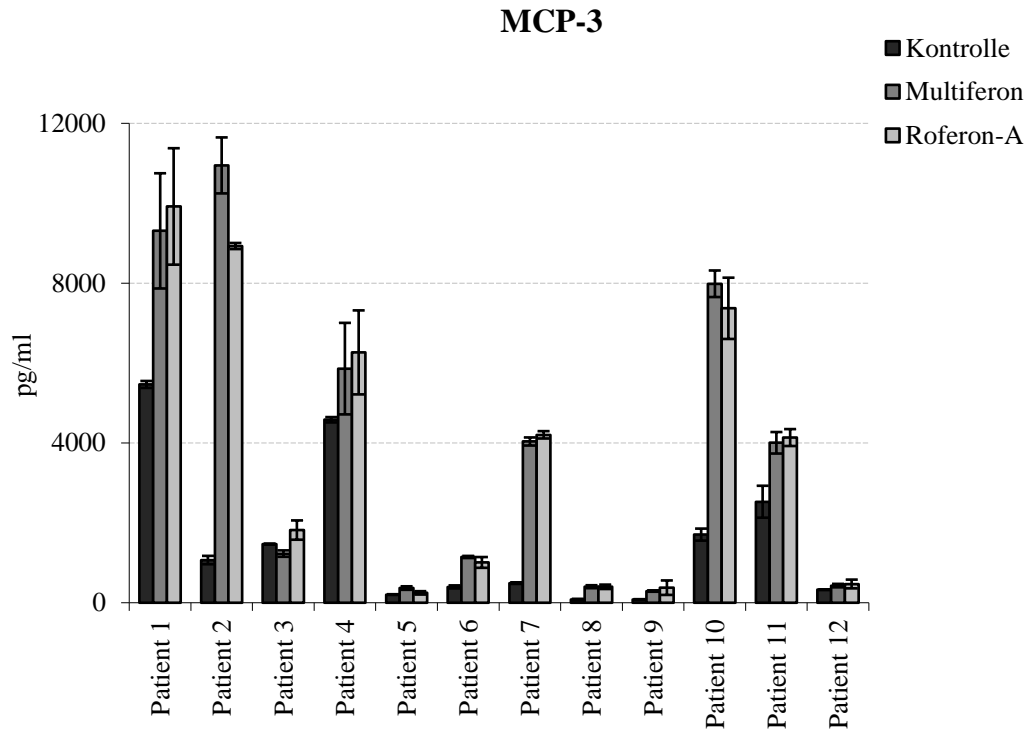
## MCP-1



**Abb. 18:** Konzentration des Zytokins MCP-1 in pg/ml nach Stimulation der PBMCs mit Multiferon und Roferon-A

Bei dem Zytokin MCP-1 (s. Abb. 18) ließ sich bei fast allen Kontrollansätzen ein ähnlich hohes Konzentrationslevel erkennen, welches bis auf eine Ausnahme (Patient 12) nach der Stimulation mit Multiferon oder Roferon-A kaum oder gar nicht gesteigert werden konnte. Insgesamt ergab sich keine signifikante Induktion der Zytokine nach vorheriger Stimulation mit den Alpha-Interferonen. Signifikante Unterschiede im stimulatorischen Potenzial von Multiferon und Roferon-A konnten nicht beobachtet werden.

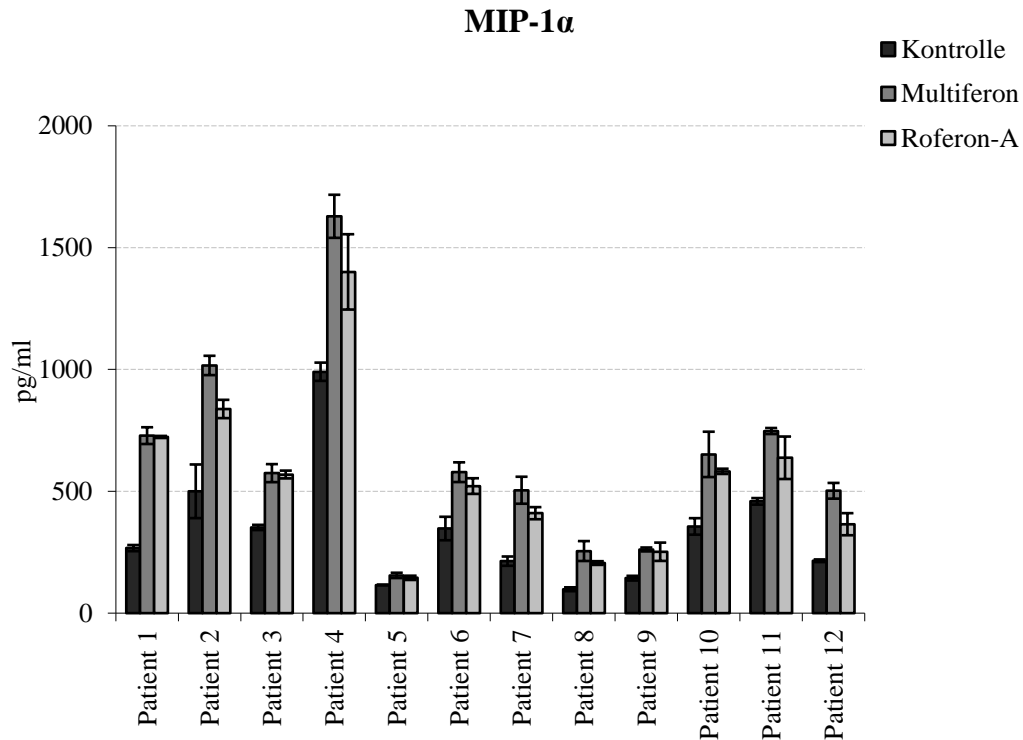
## MCP-3



**Abb. 19:** Konzentration des Zytokins MCP-3 in pg/ml nach Stimulation der PBMCs mit Multiferon und Roferon-A

Die Konzentrationen von MCP-3 (s. Abb. 19) zeigten bei sehr unterschiedlichen Konzentrationsniveaus in den Kontrollansätzen eine im Durchschnitt signifikante Abhängigkeit von der vorherigen Stimulation mit Multiferon oder Roferon-A. Bei den PBMCs von Patient 2 konnte der größte Anstieg im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Hier stieg die Konzentration nach Stimulation mit Roferon-A um das 8-10fache an. Im Durchschnitt wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Multiferon und Roferon-A in der Potenz der hervorgerufenen Zytokinantwort beobachtet.

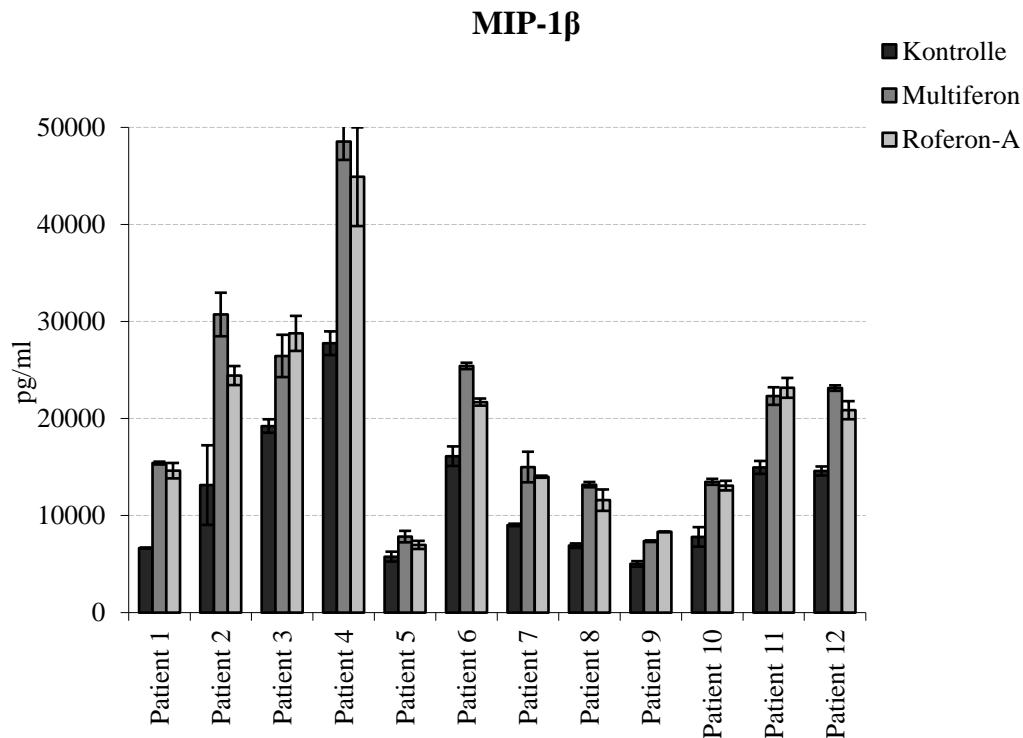
## MIP-1alpha



**Abb. 20:** Konzentration des Zytokins MIP 1-alpha in pg/ml nach Stimulation der PBMCs mit Multiferon und Roferon-A

Im Durchschnitt zeigten alle PBMCs der Patienten ein signifikantes Ansprechen auf die Stimulation mit Multiferon oder Roferon-A (s. Abb. 20). Bei den Patienten 1, 2, 7, 8 und 12 konnte mindestens eine Verdopplung der Konzentration von MIP-1 $\alpha$  im Vergleich zu den Kontrollansätzen beobachtet werden. Im Mittel bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Alpha-Interferonen in ihrem stimulatorischen Potenzial.

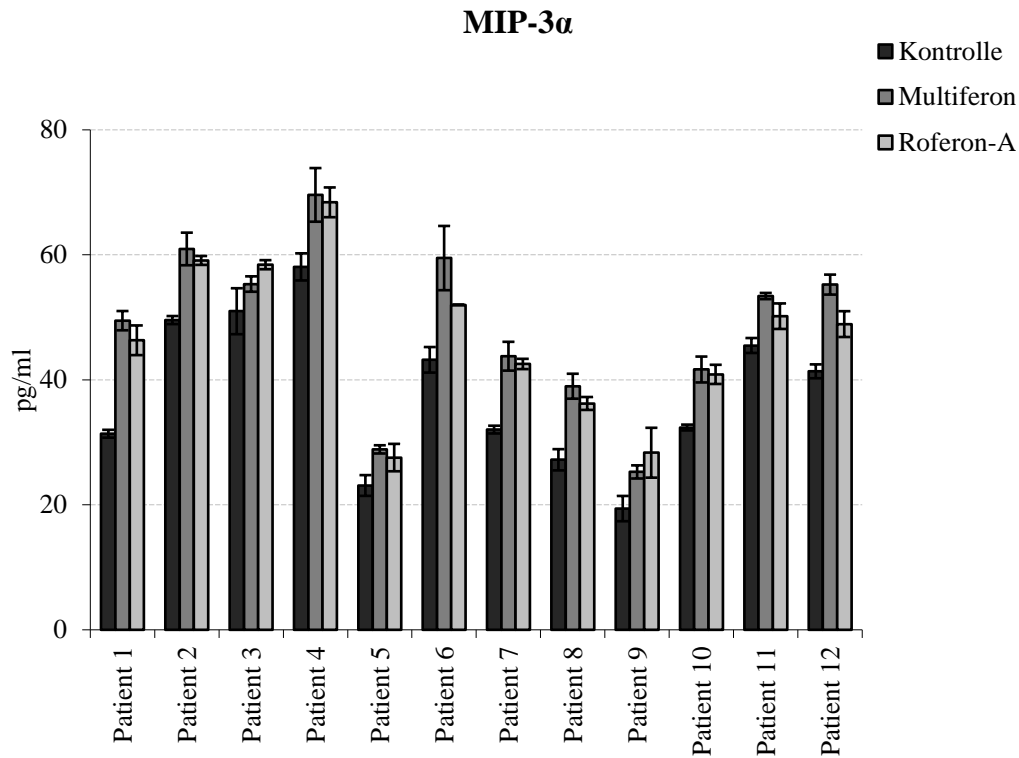
## MIP-1beta



**Abb. 21:** Konzentration des Zytokins MIP-1 $\beta$  in pg/ml nach Stimulation der PBMCs mit Multiferon und Roferon-A

Im Durchschnitt reagierten alle PBMCs der Patienten auf die Stimulation mit Multiferon oder Roferon-A mit einer signifikanten Zytokinsekretion (s. Abb. 21), wobei die Schwankungsbreite der Konzentration in den Kontrollansätzen relativ groß war. Die PBMCs des Patienten 4 zeigten die höchste Konzentration des Zytokins MIP-1 $\beta$ . Eine Verdopplung der Zytokinsekretion konnte nur bei den PBMCs der Patienten 1 und 2 beobachtet werden. Im Mittel ließen sich keine signifikanten Unterschiede der Zytokinkonzentrationen zwischen den mit Multiferon oder Roferon-A stimulierten PBMCs erkennen.

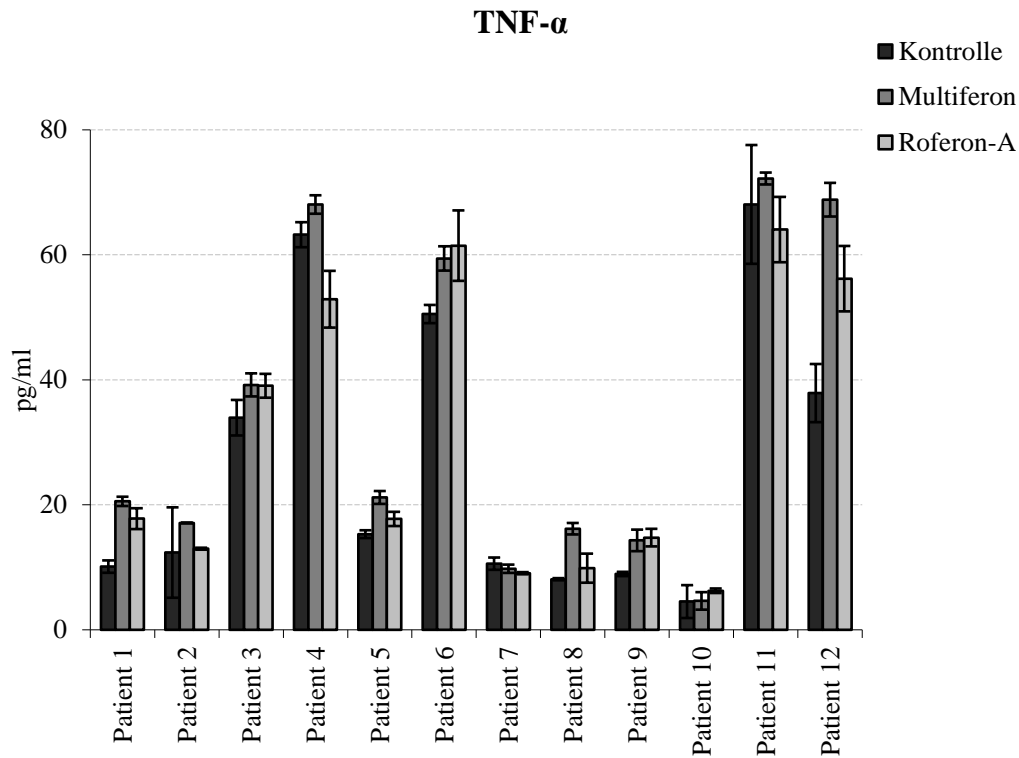
## MIP-3alpha



**Abb. 22:** Konzentration des Zytokins MIP-3 $\alpha$  in pg/ml nach Stimulation der PBMCs mit Multiferon und Roferon-A

Für das Zytokin MIP-3 $\alpha$  (s. Abb. 22) zeigten die Kontrollansätze ein variables Zytokinlevel, das durch die Stimulation mit Multiferon und Roferon-A in einem signifikanten Ausmaß (bezogen auf den Durchschnitt) gesteigert werden konnte. Im Mittel ließen sich keine signifikanten Unterschiede im stimulatorischen Potenzial der Alpha-Interferone beobachten.

## TNF-alpha



**Abb. 23:** Konzentration des Zytokins TNF- $\alpha$  in pg/ml nach Stimulation der PBMCs mit Multiferon und Roferon-A

Bei TNF- $\alpha$  (s. Abb. 23) zeigten sich relativ große Unterschiede zwischen den Zytokinkonzentrationen der Kontrollansätze. Die Stimulation mit Multiferon und Roferon-A erbrachte bei allen Ansätzen durchschnittlich eine signifikante Steigerung der Konzentration um weniger als das Doppelte. Es konnten, bezogen auf den Durchschnitt, keine signifikanten Unterschiede der Alpha-Interferone Multiferon und Roferon-A in ihrem stimulatorischen Potenzial beobachtet werden.

### **3.6 Kombinierte Effekte von Multiferon/Roferon-A und PBMCs auf die Proliferationsinhibition der Melanomzellen**

Nachdem in den oben beschriebenen Experimenten bereits der direkte Einfluss von Multiferon/Roferon-A auf die Proliferation der Melanomzellen und die Zytokinsekretion von PBMCs untersucht wurde, lag der Gegenstand der Untersuchung bei der nachfolgenden Versuchsreihe in der Betrachtung des kombinierten antiproliferativen Effektes von Multiferon/Roferon-A und den PBMCs auf die Melanomzellen. Hierfür wurden Melanomzellen und autologe PBMCs verwendet. Zusammen mit den vorherigen Experimenten erhielten wir durch diese Versuche weitere Hinweise über die möglichen Wirkprinzipien der Alpha-Interferone. Ziel dieses Versuchsaufbaus war dabei die Beantwortung der Frage, ob die bisher erzielten direkten antiproliferativen Effekte der Alpha-Interferone durch die Zugabe von autologen PBMCs weiter gesteigert werden können und in welchem Ausmaß diese Effekte über die PBMCs vermittelt werden.

Wie schon bei den meisten Einzelbehandlungen von Melanomzellen mit Multiferon/Roferon-A in Kapitel 3.3 und bei der Zytokinanalyse in Kapitel 3.4 zeigten sich auch in dieser Versuchsreihe, abgesehen von einer Ausnahme (Multiferon bei 1,25 : 1 und 100 IE/ml vs. Roferon-A bei 1,25 : 1 und 100 IE/ml, 30,04 % vs. 25,49 %,  $p = 0,007$ ), keine signifikanten Unterschiede in den erzielten Wachstumsinhibitionsraten der beiden Alpha-Interferone (Tab. 6).



**Tab. 6:** Vergleich der mittleren Wachstumsinhibitionsraten der Ansätze mit Multiferon und Roferon-A bei verschiedenen E:Ts und verschiedenen Konzentrationen der Alpha-Interferone  
MF = Multiferon, Ro = Roferon-A

	Signifikanz (zweiseitig)
MF bei 0:1 und 10 IE/ml - Ro bei 0:1 und 10 IE/ml	0,789
MF bei 0:1 und 100 IE/ml - Ro bei 0:1 und 100 IE/ml	0,827
MF bei 0:1 und 1000 IE/ml - Ro bei 0:1 und 1000 IE/ml	0,834
MF bei 1,25:1 und 0 IE/ml - Ro bei 1,25:1 und 0 IE/ml	0,962
MF bei 1,25:1 und 10 IE/ml - Ro bei 1,25:1 und 10 IE/ml	0,552
MF bei 1,25:1 und 100 IE/ml - Ro bei 1,25:1 und 100 IE/ml	0,007
MF bei 1,25:1 und 1000 IE/ml - Ro bei 1,25:1 und 1000 IE/ml	0,09
MF bei 5:1 und 0 IE/ml - Ro bei 5:1 und 0 IE/ml	0,541
MF bei 5:1 und 10 IE/ml - Ro bei 5:1 und 10 IE/ml	0,744
MF bei 5:1 und 100 IE/ml - Ro bei 5:1 und 100 IE/ml	0,686
MF bei 5:1 und 1000 IE/ml - Ro bei 5:1 und 1000 IE/ml	0,872
MF bei 20:1 und 0 IE/ml - Ro bei 20:1 und 0 IE/ml	0,827
MF bei 20:1 und 10 IE/ml - Ro bei 20:1 und 10 IE/ml	0,605
MF bei 20:1 und 100 IE/ml - Ro bei 20:1 und 100 IE/ml	0,585
MF bei 20:1 und 1000 IE/ml - Ro bei 20:1 und 1000 IE/ml	0,748

Für die meisten Ansätze ergaben sich signifikante Wachstumsinhibitionsraten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgruppen (s. Tab. 7). Ausnahmen bestanden bei Multiferon bei einem E:T von 0 : 1 und einer Multiferonkonzentration von 10 IE/ml, bei Multiferon und Roferon-A bei einem E:T von 1,25 : 1 und einer Alpha-Interferon-Konzentration von 0 IE/ml, bei Multiferon bei einem E:T von 1,25 : 1 und einer Multiferonkonzentration von 10 IE/ml und bei Multiferon und Roferon-A bei einem E:T von 5 : 1 und einer Interferon-alpha-Konzentration von 0 IE/ml.

**Tab. 7:** Vergleich der Ansätze mit Multiferon/Roferon-A und verschiedenen PBMC-Verhältnissen gegenüber der unbehandelten Kontrolle

Ro = Roferon-A; MF = Multiferon

Test bei einer Stichprobe		Test bei einer Stichprobe	
	Sig. (2-seitig)		Sig. (2-seitig)
MF bei 0:1 und 10 IE/ml	0,108	Ro bei 5:1 und 0 IE/ml	0,074
Ro bei 0:1 und 10 IE/ml	0,019	MF bei 5:1 und 10 IE/ml	0,019
MF bei 0:1 und 100 IE/ml	0,011	Ro bei 5:1 und 10 IE/ml	0,003
Ro bei 0:1 und 100 IE/ml	0,005	MF bei 5:1 und 100 IE/ml	0,019
MF bei 0:1 und 1000 IE/ml	0,031	Ro bei 5:1 und 100 IE/ml	0,003
Ro bei 0:1 und 1000 IE/ml	0,005	MF bei 5:1 und 1000 IE/ml	0,007
MF bei 1,25:1 und 0 IE/ml	0,707	MF bei 20:1 und 0 IE/ml	0,008
MF bei 1,25:1 und 10 IE/ml	0,069	Ro bei 20:1 und 0 IE/ml	0,017
Ro bei 1,25:1 und 10 IE/ml	0,015	MF bei 20:1 und 10 IE/ml	0,02
MF bei 1,25:1 und 100 IE/ml	0,024	Ro bei 20:1 und 10 IE/ml	0,002
Ro bei 1,25:1 und 100 IE/ml	0,028	MF bei 20:1 und 100 IE/ml	0,014
MF bei 1,25:1 und 1000 IE/ml	0,029	Ro bei 20:1 und 100 IE/ml	0,003
Ro bei 1,25:1 und 1000 IE/ml	0,033	MF bei 20:1 und 1000 IE/ml	0,012
MF bei 5:1 und 0 IE/ml	0,274	Ro bei 20:1 und 1000 IE/ml	0,004

Die in den Versuchen (s. Tab. 8, s. Abb. 24-29) angelegten Kontrollgruppen, bei denen die Melanomzellen wie in den oben beschriebenen Experimenten isoliert mit Multiferon/Roferon-A behandelt wurden, bestätigten die bereits in Kapitel 3.3 erzielten Ergebnisse auch an den hier verwendeten Zelllinien. Die Variationsbreite der Proliferationshemmung in Bezug auf die Kontrollansätze lag ohne die additiven antiproliferativen Effekte der PBMCs in einem Bereich von -6,81 bis 42,50 %. Die Kombination von PBMCs und den Alpha-Interferonen führte im Vergleich zu den ausschließlich mit den Alpha-Interferonen behandelten Ansätzen zwar zu einer Steigerung der Wachstumsinhibitionsraten (s. Tab. 8), diese Steigerung war allerdings statistisch nicht signifikant (s. Tab. 9). Zusammen mit den PBMCs ergaben sich synergistische antiproliferative Effekte (nicht signifikant), die insbesondere bei den Multiferon-/Roferon-A-Konzentrationen 10 IE/ml und 100 IE/ml bei den mittleren PBMC-Verhältnissen (5:1, 20:1) die größte Proliferationshemmung zeigten (bis zu 60 %). 1000 IE/ml von Multiferon oder Roferon-A erbrachten keine oder nur eine relativ

geringfügige weitere Steigerung der Proliferationshemmung (s. Tab. 8). Das optimale Verhältnis von PBMCs zu Tumorzellen für die größtmögliche Wachstumshemmung lag in einem Bereich von 20 : 1. Kleinere Verhältnisse (1,25 : 1, 5 : 1) führten zu einer verminderten Inhibition des Wachstums und das höchste Verhältnis (80 : 1) führte im Vergleich zu den Verhältnissen (5 : 1, 20 : 1), von einer Ausnahme abgesehen, immer zu einer geringeren oder gleich starken Proliferationshemmung.

**Tab. 8:** Übersicht aller Wachstumsinhibitionsraten bei verschiedenen E:Ts und Interferon-Konzentrationen

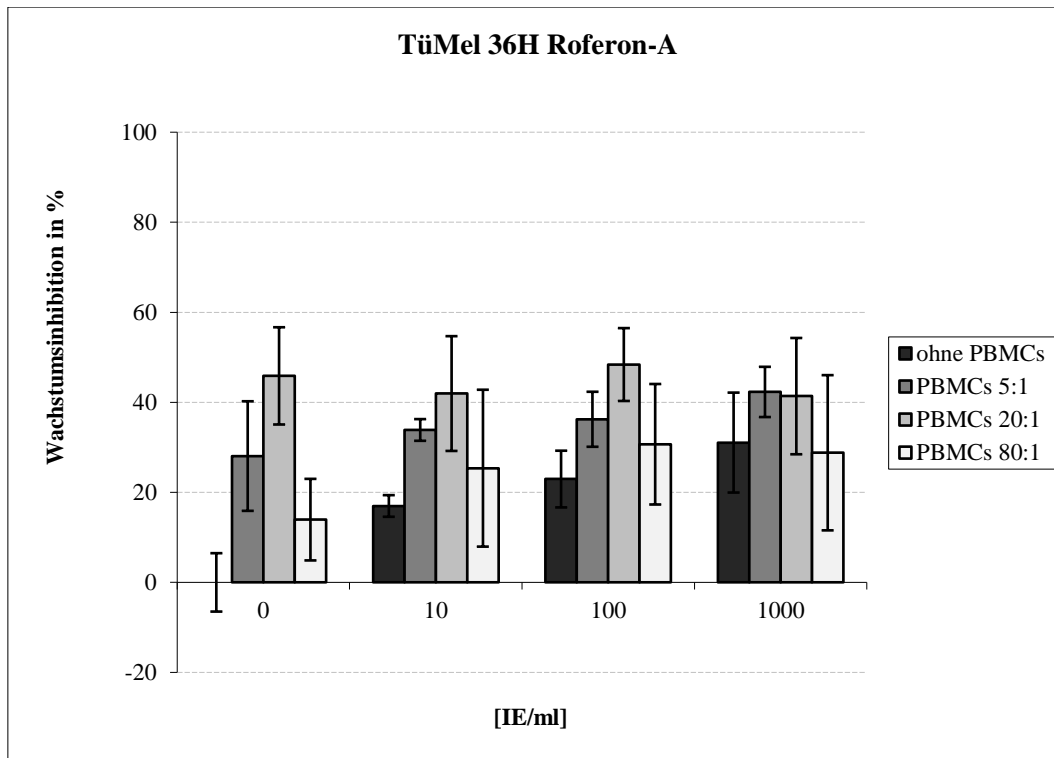
Graue Felder: Multiferon; weiße Felder: Roferon-A; n.t. = not tested

	TüMel 36H				TüMel 44				TüMel 45				TüMel 51				TüMel 53H				TüMel 39			
	0:1	5:1	20:1	80:1	0:1	5:1	20:1	80:1	0:1	5:1	20:1	80:1	0:1	1,25:1	5:1	20:1	0:1	1,25:1	5:1	20:1	0:1	1,25:1	5:1	20:1
0 IE/ml	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	0,00	5,41	13,42	-15,86	0,00	40,27	50,65	9,96	0,00	3,02	1,98	25,68	0,00	-7,83	-15,07	32,85	0,00	12,40	31,64	46,95
0 IE/ml	0,00	28,06	45,87	13,93	0,00	40,98	45,03	-4,56	0,00	23,75	30,93	7,38	0,00	-6,05	-0,25	21,24	0,00	7,46	2,16	8,18	0,00	7,40	28,07	52,43
10 IE/ml	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	-6,81	15,71	23,10	-5,36	39,15	47,23	53,86	41,28	17,59	23,15	27,30	31,57	11,11	10,41	11,18	8,05	14,69	30,87	50,68	56,94
10 IE/ml	16,97	33,86	41,95	25,37	37,44	43,72	43,43	31,94	14,80	29,34	36,17	29,27	11,16	20,28	22,20	31,47	12,17	24,00	24,04	24,05	16,31	30,92	46,78	57,31
100 IE/ml	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	6,19	12,33	20,52	8,82	31,55	50,44	58,36	45,92	17,89	28,51	33,01	36,62	16,57	22,73	16,92	15,50	19,12	38,88	57,22	57,96
100 IE/ml	22,95	36,23	48,39	30,68	32,25	48,77	56,02	35,69	16,85	33,00	41,52	35,40	21,99	24,42	31,63	36,17	11,21	18,49	22,09	22,16	16,99	33,57	53,86	58,42
1000 IE/ml	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	6,21	17,56	19,19	11,98	42,50	51,47	56,50	46,19	20,31	29,76	43,47	41,01	11,98	28,36	26,73	17,46	20,03	47,24	58,56	58,23
1000 IE/ml	31,05	42,30	41,37	28,80	35,24	53,05	51,34	35,77	23,15	37,16	40,26	20,93	23,06	27,97	37,26	35,76	12,96	21,56	19,89	19,49	15,42	40,72	57,98	59,36

**Tab. 9:** Vergleich zwischen Ansätzen mit PBMCs und dem jeweiligen Kontrollansatz ohne PBMCs

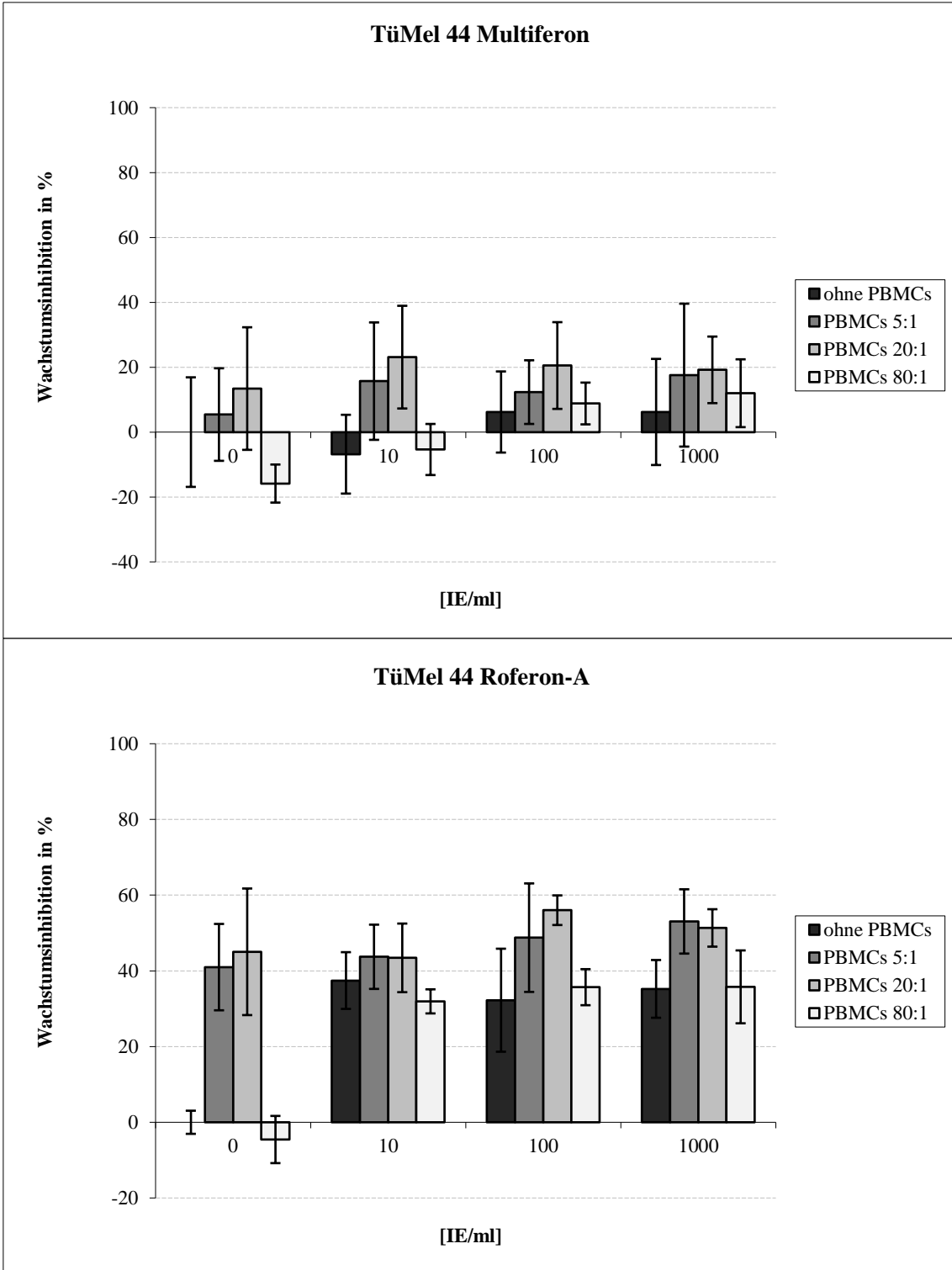
Die Zugabe von PBMCs führte zu keiner statistisch signifikanten Steigerung der Wachstumsinhibitionsraten im Vergleich zu den Ansätzen, die ausschließlich mit den Alpha-Interferonen behandelt wurden.

	p-Werte		
	0:1 vs. 1,25:1	0:1 vs 5:1	0:1 vs. 20:1
10 IE/ml Multiferon	1,00	0,46	0,33
10 IE/ml Roferon-A	1,00	0,25	0,41
100 IE/ml Multiferon	0,94	0,36	0,18
100 IE/ml Roferon-A	1,00	0,14	0,14
1000 IE/ml Multiferon	0,97	0,40	0,13
1000 IE/ml Roferon-A	0,33	0,33	0,33



**Abb. 24:** MUH-Assay bei TüMel 36H mit Roferon-A  
Relative Wachstumsinhibition in % bezogen auf die Kontrolle (Melanomzellen + RPMI-Medium + IL-2 + IL- + humanes Serum) nach vorheriger Inkubation mit Roferon-A. Die verwendeten Verhältnisse (0 : 1, 5 : 1, 20 : 1, 80 : 1) von PBMCs zu Melanomzellen wurden jeweils mit 4 verschiedenen Roferon-A Konzentrationen (0 IE/ml, 10 IE/ml, 100 IE/ml, 1000 IE/ml) kombiniert.

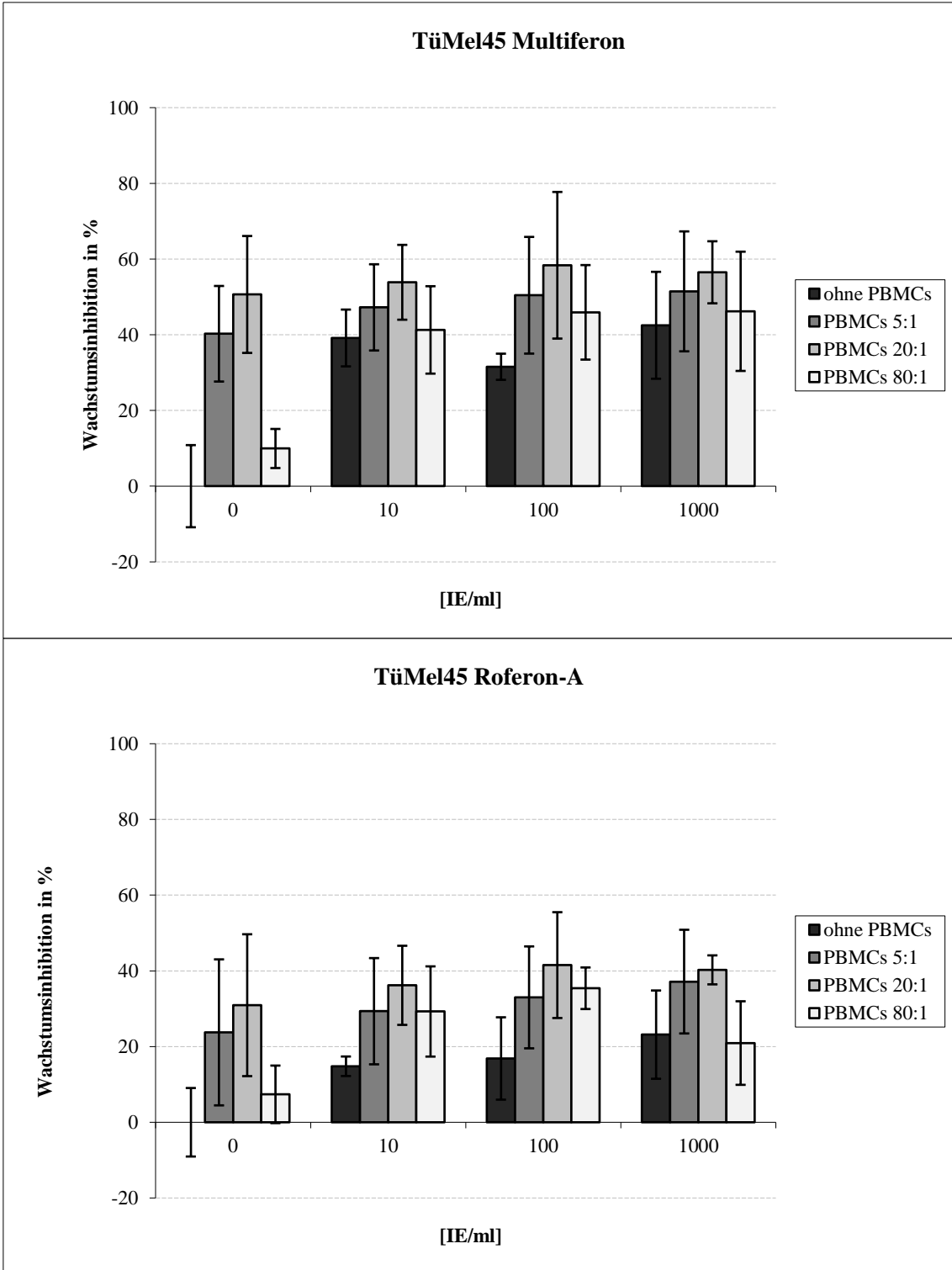
Bei TüMel36H (s. Abb. 24) zeigte sich in den Kontrollgruppen (0 IE/ml) eine sichtbare Proliferationshemmung. In den mit Roferon-A stimulierten Ansätzen und dem E:T von 5 : 1 kam es zu einer Steigerung der Wachstumshemmung von 28 % bei 0 IE/ml auf 42 % bei 1000 IE/ml und bei dem E:T von 80 : 1 konnte eine Steigerung von 13 % bei 0 IE auf 28 % bei 1000 IE/ml verzeichnet werden. Die Wachstumsinhibition von 45 %, die ohne Stimulation (0 IE/ml) bei einem E:T von 20 : 1 erfasst werden konnte, ließ sich durch die Zugabe von Roferon-A nicht weiter steigern. Auch in den Ansätzen, die keine PBMCs enthielten, konnte eine Roferon-A-abhängige Wachstumsinhibition erfasst werden. Die hier beobachtete Wachstumsinhibition lag, bis auf eine Ausnahme (1000 IE/ml), deutlich unter der, die in den Ansätzen mit den PBMCs erzielt wurde.



**Abb. 25:** MUH-Assay bei TüMel 44 mit Multiferon und Roferon-A  
 Relative Wachstumsinhibition in % bezogen auf die Kontrolle (Melanomzellen + RPMI-Medium + IL-2 + IL-7 + humanes Serum) nach vorheriger Inkubation mit Roferon-A. Die verwendeten Verhältnisse (0 : 1, 5 : 1, 20 : 1, 80 : 1) von PBMCs zu Melanomzellen wurden jeweils mit 4 verschiedenen Roferon-A Konzentrationen (0 IE/ml, 10 IE/ml, 100 IE/ml, 1000 IE/ml) kombiniert.

Die Melanomzellen der Zelllinie TüMel44 (s. Abb. 25) reagierten sehr unterschiedlich auf die Behandlung mit Multiferon und Roferon-A. Bei den Melanomzellen, die mit Multiferon behandelt wurden, zeigte sich bei den niedrigen und mittleren E:Ts (5 : 1, 20 : 1) in der unstimulierten Kontrollgruppe eine schwach ausgeprägte Wachstumsinhibition, die durch Zugabe von Multiferon nur leicht gesteigert werden konnte. Die größten Steigerungsraten im Vergleich zur Kontrolle fanden sich bei 10 IE/ml. Die Steigerung betrug bei dem E:T von 5 : 1 10 % und bei dem E:T von 20 : 1 ebenfalls 10 %. Die alleinige Behandlung (ohne PBMCs) mit Multiferon führte zu einer Wachstumsinhibition, die 6 % nicht überschritt.

Für den Ansatz, bei dem die Behandlung mit Roferon-A (s. Abb. 25) erfolgte, zeigten sich in den unstimulierten Kontrollgruppen und den E:Ts von 5 : 1 und 20 : 1 Wachstumsinhibitionsraten, die im Bereich von 40 % lagen und durch die Zugabe von Roferon-A ebenfalls nur leicht gesteigert werden konnten. Die größten Steigerungsraten im Vergleich zur Kontrolle fanden sich bei 100 IE/ml. Hier konnten die Wachstumsinhibitionsraten bei einem E:T von 5 : 1 von 40 % auf 48 % und bei einem Verhältnis von 20 : 1 von 45 % auf 56 % gesteigert werden. Die isolierte Behandlung mit Roferon-A zeigte Wachstumsinhibitionsraten, die im Bereich von 35-37 % lagen und damit unter denen, die ein E:T von 5 : 1 und 20 : 1 aufwiesen.

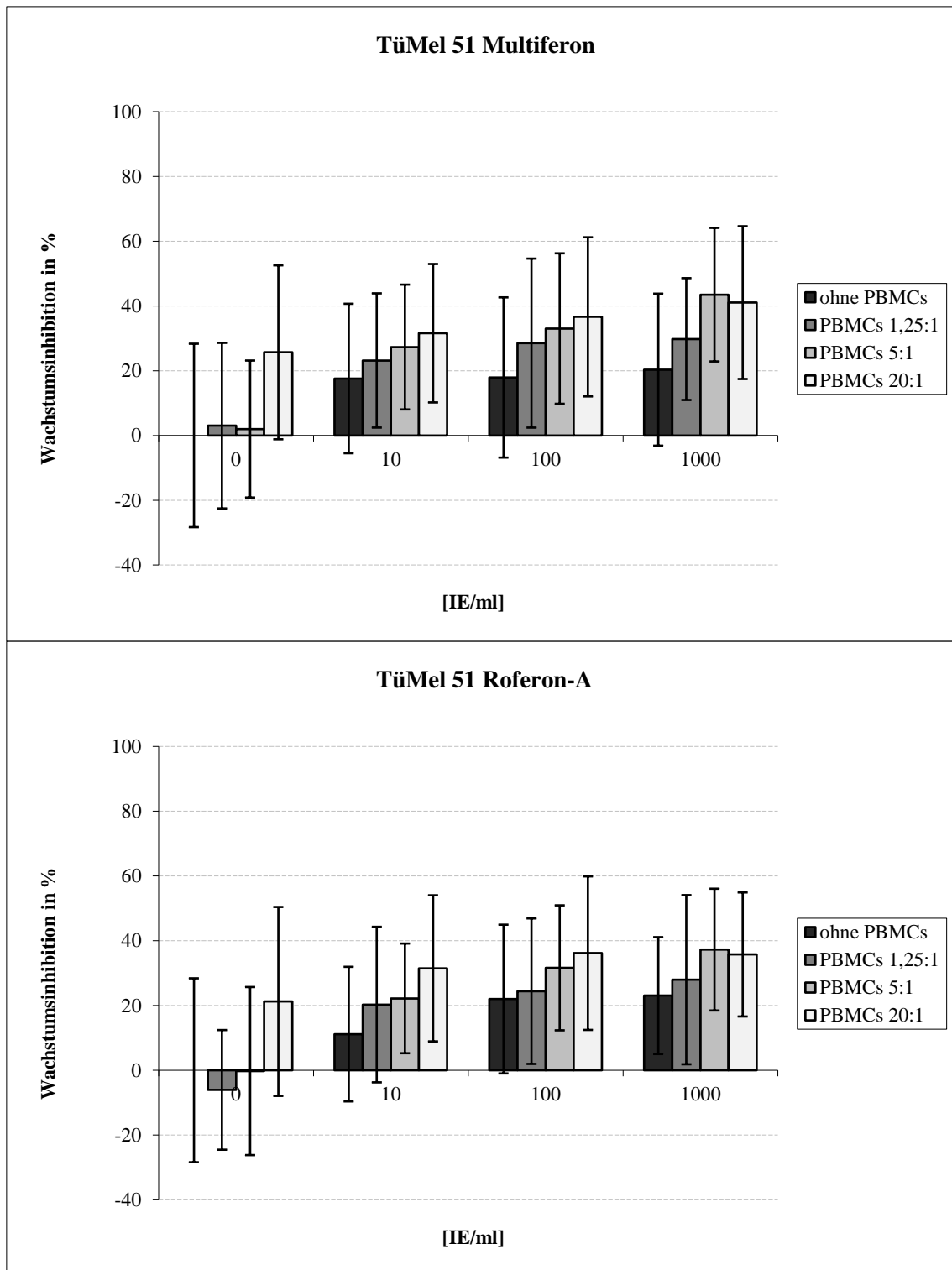


**Abb. 26:** MUH-Assay bei TüMel 45 mit Multiferon und Roferon-A  
 Relative Wachstumsinhibition in % bezogen auf die Kontrolle (Melanomzellen + RPMI-Medium + IL-2 + IL-7 + humanes Serum) nach vorheriger Inkubation mit Roferon-A. Die verwendeten Verhältnisse (0 : 1, 5 : 1, 20 : 1, 80 : 1) von PBMCs zu Melanomzellen wurden jeweils mit 4 verschiedenen Roferon-A Konzentrationen (0 IE/ml, 10 IE/ml, 100 IE/ml, 1000 IE/ml) kombiniert.



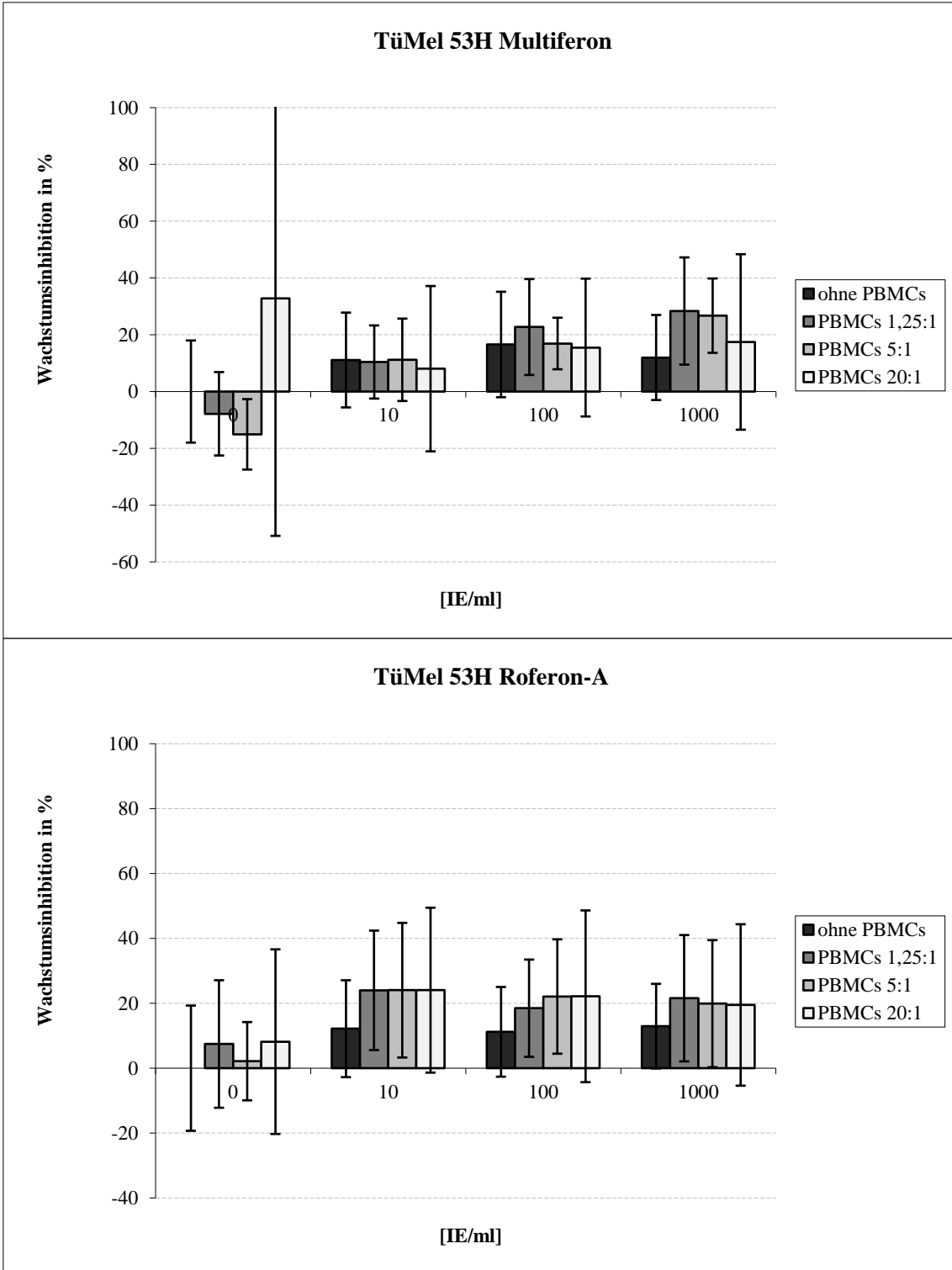
Für den Ansatz, der mit Multiferon (s. Abb. 26) behandelt wurde, zeigten die unstimulierten Kontrollgruppen eine stark ausgeprägte Wachstumsinhibition bei den E:Ts von 5 : 1 und 20 : 1, die bei 40 % bzw. 50 % lag. Die größte Steigerung der Wachstumsinhibition im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle lag bei 100 IE/ml. Hier konnte die Proliferationsinhibition bei den E:Ts von 5 : 1, 20 : 1 und 80 : 1 von 40 % auf 50 %, von 50 % auf 58 % und von 10 % auf 45 % gesteigert werden. Die isolierte Behandlung mit Multiferon führte zu einer Wachstumsinhibition, die zwischen 31-42 % lag.

Bei der Behandlung der Melanomzellen mit Roferon-A (s. Abb. 26) ließ sich für die verschiedenen E:Ts ein ähnliches Ansprechverhalten erkennen, welches aber in der absoluten Höhe der Wachstumsinhibition geringer ausfiel. Hier betrug die Wachstumsinhibition für die E:Ts von 5 : 1, 20 : 1 und 80 : 1 23 %, 30 % und 7 %. Die größte Steigerung zu diesen Werten wurde mit einer Roferon-A-Konzentration erreicht, die ebenfalls bei 100 IE/ml lag und Werte von 33 %, 41 % und 35 % beobachten ließ. Die Wachstumsinhibition, die mit der isolierten Behandlung mit Roferon-A beobachtet werden konnte, lag zwischen 14 und 23 %.



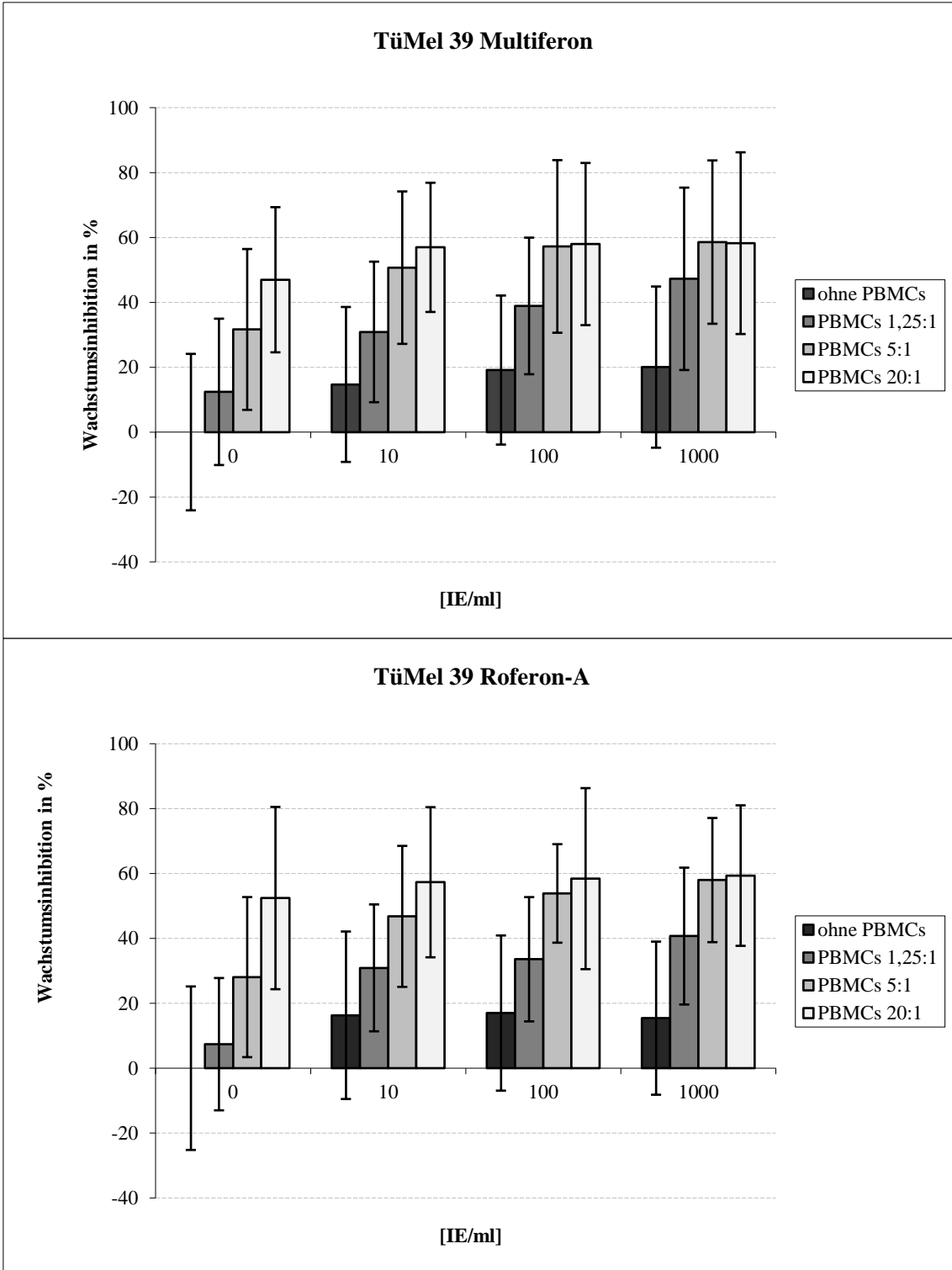
**Abb. 27:** MUH-Assay bei TüMel 51 mit Multiferon und Roferon-A  
 Relative Wachstumsinhibition in % bezogen auf die Kontrolle (Melanomzellen + RPMI-Medium + IL-2 + IL-7 + humanes Serum) nach vorheriger Inkubation mit Roferon-A. Die verwendeten Verhältnisse (0 : 1, 1,25 : 1, 5 : 1, 20 : 1) von PBMCs zu Melanomzellen wurden jeweils mit 4 verschiedenen Roferon-A Konzentrationen (0 IE/ml, 10 IE/ml, 100 IE/ml, 1000 IE/ml) kombiniert.

Die Behandlung sowohl mit Multiferon als auch mit Roferon-A (s. Abb. 27) führte bei TüMel51 zu einem vergleichbaren Ansprechen hinsichtlich der Wachstumshemmung. In den unstimulierten Kontrollgruppen kam es nur bei dem E:T von 20 : 1 zu einer relevanten Wachstumsinhibition (21-25 %). Die niedrigen (1,25 : 1) und mittleren (5 : 1) E:Ts dagegen gingen nicht mit einer ausgeprägten Proliferationsinhibition (< 3 %) einher. Die größte Steigerung der Wachstumsinhibition im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich bei 1000 IE/ml. Hier betrug die Wachstumsinhibition 28 %, 37 % und 35 %. Die isolierte Behandlung der Melanomzellen mit Multiferon/Roferon-A führte zu einer Wachstumsinhibition im Bereich von 11-23 % und lag somit immer unter den Werten, die mit PBMCs erzielt wurden.



**Abb. 28:** MUH-Assay bei TüMel 53H mit Multiferon und Roferon-A  
 Relative Wachstumsinhibition in % bezogen auf die Kontrolle (Melanomzellen + RPMI-Medium + IL-2 + IL-7 + humanes Serum) nach vorheriger Inkubation mit Roferon-A. Die verwendeten Verhältnisse (0 : 1, 1,25 : 1, 5 : 1, 20 : 1) von PBMCs zu Melanomzellen wurden jeweils mit 4 verschiedenen Roferon-A Konzentrationen (0 IE/ml, 10 IE/ml, 100 IE/ml, 1000 IE/ml) kombiniert.

Die bei TüMe153H beobachtete Wachstumsinhibition fiel im Vergleich zu allen anderen getesteten Zelllinien deutlich geringer aus (s. Abb. 28). Bei den unstimulierten Kontrollgruppen konnte nur eine geringe Wachstumshemmung ( $< 8\%$ ) erfasst werden. Die größte Steigerung der Wachstumsinhibition ließ sich bei der Behandlung mit Roferon-A bei 10 IE/ml und mit Multiferon bei 100 IE/ml beobachten. Unterschiede zwischen den verschiedenen PBMC- und Roferon-A-Konzentrationen konnten nicht festgestellt werden. Die isolierte Behandlung mit Multiferon und Roferon-A führte zu einer Wachstumsinhibition, die im Bereich von 11-16 % lag.



**Abb. 29:** MUH-Assay bei TüMel 39 mit Multiferon und Roferon-A  
 Relative Wachstumsinhibition in % bezogen auf die Kontrolle (Melanomzellen + RPMI-Medium + IL-2 + IL-7 + humanes Serum) nach vorheriger Inkubation mit Roferon-A. Die verwendeten Verhältnisse (0 : 1, 1,25 : 1, 5 : 1, 20 : 1) von PBMCs zu Melanomzellen wurden jeweils mit 4 verschiedenen Roferon-A Konzentrationen (0 IE/ml, 10 IE/ml, 100 IE/ml, 1000 IE/ml) kombiniert.

TüMel39 zeigte bei der Behandlung mit Multiferon und Roferon-A in den Kontrollgruppen (0 IE/ml) eine Wachstumsinhibition (12-46 %), die sowohl bei der Behandlung mit Multiferon als auch mit Roferon-A von der Konzentration der PBMCs abhängig war (s. Abb. 29). Es ließ sich bei den höheren Konzentrationen (10, 100, 1000 IE/ml) von Multiferon und Roferon-A eine sichtbare Steigerung der Proliferationshemmung erzielen. Die größten Steigerungsraten im Vergleich zur Kontrolle fanden sich bei 10 IE/ml. Hier stieg die Proliferationshemmung bei den E:Ts 1,25 : 1 und 5 : 1 von 12 % auf 30 % bzw. von 31 % auf 50 %. Die höheren Konzentrationen (100 IE/ml, 1000 IE/ml) von Multiferon und Roferon-A erbrachten im Vergleich zu 10 IE/ml nur noch eine geringe Steigerung der Wachstumsinhibition. Die isolierte Behandlung der Melanomzellen mit Multiferon/Roferon (ohne PBMCs) führte zu einer Wachstumsinhibition, die im Bereich von 7-20 % lag und damit deutlich unter der, die in den Ansätzen mit den PBMCs erzielt wurden.

## **4. Diskussion**

### **4.1 Direkte antitumorale Effekte von Multiferon und Roferon-A**

#### **4.1.1 Diskussion der Methode**

Der in den Versuchen verwendete MUH-Assay (s. Kapitel 2.5) erlaubt es, eine quantitative Aussage über die Anzahl von vitalen, stoffwechsel-aktiven Zellen zu treffen. Durch den Vergleich der Fluoreszenzwerte der Kontrollgruppen mit denen der mit Interferon-alpha behandelten Gruppen werden indirekt aber auch alle antitumoralen Effekte erfasst, die zum Tod der Melanomzellen führen. Hierzu zählen z. B. mögliche zytotoxische oder apoptotische Effekte der Alpha-Interferone, die sich allerdings mit dieser Methode nicht differenzieren lassen.

Weiterhin kann von der durch das Luminometer detektierten Fluoreszenz nicht linear auf die Anzahl der sich teilenden Zellen geschlossen werden, da es sich bei MUH nicht um ein Molekül handelt, welches z. B. wie das beim [<sup>3</sup>H]thymidin-Assay verwendete radioaktiv markierte Nukleosid [<sup>3</sup>H]thymidin direkt in die DNS eingebaut wird, sondern um eines, das von zytosolischen Esterasen und Sulfatasen hydrolysiert wird und somit keinen direkten Marker für die DNS-Synthese darstellt [188]. Folglich kann mit dieser Methode auch keine genaue Aussage über die exakten Wirkprinzipien der Alpha-Interferone erfolgen.

Die bereits in Kapitel 1.2.3 beschriebenen durch Alpha-Interferone potenziell induzierbaren antiproliferativen Mechanismen, die nicht zum direkten Tod der Melanomzellen führen wie z. B. die Induktion des Zellzyklusarrestes, stellen einen möglichen Unsicherheitsfaktor bei der Ermittlung der Wachstumsinhibitionsraten dar. Es wäre theoretisch möglich, dass die zytosolische Stoffwechselaktivität in einer solchen Zellpopulation zu gering ist, um detektierbare Fluoreszenz zu generieren. In diesem Fall würden die sich zwar im Zellzyklusarrest befindlichen, aber dennoch vitalen Zellen zu den avitalen Zellen gezählt, was zu falsch hohen Werten bei der Berechnung der Wachstumsinhibitionsraten führen würde. Andererseits bestünde ebenfalls die Möglichkeit, dass die Zellen einer solchen nicht-proliferierenden



Zellpopulation noch eine ausreichende Stoffwechselaktivität besitzen, um messbare Fluoreszenz zu generieren, man sie dann aber zu der Population der vitalen Zellen zählen müsste und somit die Gefahr bestünde, die antitumoralen Effekte der Alpha-Interferone zu unterschätzen. Eine sichere Differenzierung zwischen stoffwechselaktiven nicht proliferierenden und stoffwechsel-aktiven proliferierenden Zellen wäre mit aufwendigeren und kostenintensiveren Methoden wie z. B. einer FACS-Analyse oder mit dem bereits erwähnten [<sup>3</sup>H]thymidin-Assay möglich gewesen. Da es bei der in dieser Dissertation verfolgten Fragestellung allerdings nicht primär darum ging, eine differenzierte Aussage über das genaue Wirkprinzip der Alpha-Interferone zu treffen, sondern um die Erhebung von möglichen Unterschieden im allgemeinen antitumoralen Potenzial (zytotoxische und apoptotische Effekte) der Alpha-Interferone Multiferon/Roferon-A, war der MUH-Assay für diese Fragestellung eine adäquate Methode.

#### **4.1.2 Diskussion der direkten antitumoralen Effekte**

Da das relativ neue Multiferon im Gegensatz zu Roferon-A mehrere verschiedene Alpha-Interferon-Subtypen enthält, die zudem von dem Interferonrezeptor unterschiedlich stark gebunden werden und hierdurch die antiproliferativen Effekte in Abhängigkeit der verschiedenen Subtypen variieren [190-192], stellte sich die Frage, ob Multiferon bei In-vitro-Versuchen an verschiedenen Melanomzelllinien eventuell eine im Vergleich zu Roferon-A divergente antitumorale Potenz aufweisen würde.

Die bisher einzige Gegenüberstellung von Multiferon und Roferon-A erfolgte lediglich auf antiviraler Ebene. Hier ließ sich nachweisen, dass Multiferon bei der In-vitro-Behandlung des Krim-Kongo-Fieber-Virus eine effizientere Hemmung der Virusreplikation ermöglichte als Roferon-A [193]. Wie allerdings gezeigt werden konnte, unterliegen die antiproliferativen und antiviralen Effekte voneinander unabhängigen Mechanismen, sodass ein Rückschluss von dem antiviralen Potenzial auf das antiproliferative Potenzial nicht zulässig erscheint [40, 192]. So ließ sich in mehreren Studien nachweisen, dass die Induktion von antiviralen Effekten einer geringeren Affinität der Rezeptoruntereinheiten zu den Alpha-Interferon-Subtypen bedurfte als die Induktion von antiproliferativen Effekten [192, 194].

Erstmals konnten unsere In-vitro-Experimente in einem größeren Umfang an 18 verschiedenen Melanomzelllinien belegen, dass – abgesehen von 3 Konzentrationen (5000 IE/ml, 25000 IE/ml, 50000 IE/ml) – keine signifikanten Unterschiede der ermittelten Wachstumsinhibitionsraten zwischen Multiferon und Roferon-A bestanden.

Unsere Ergebnisse bestätigen und erweitern aufgrund des Umfangs der getesteten Melanomzelllinien und der unterschiedlichen Alpha-Interferon-Konzentrationen die Resultate einer In-vitro-Studie, in der bei der Behandlung von drei verschiedenen Melanomzelllinien mit Multiferon und Intron-A (Interferon-alpha2b) nach 48 h ebenfalls keine relevanten Unterschiede in der Wachstumsinhibition festgestellt werden konnten [195]. Die in unseren Experimenten beobachteten überwiegend geringen Wachstumsinhibitionsraten (durchschnittlich ca. 15-30 %) der verschiedenen Melanomzelllinien auf die Behandlung mit Multiferon und Roferon-A und die größtenteils moderate Abhängigkeit der Wachstumsinhibition von Konzentrationssteigerungen der Alpha-Interferone stimmen in der Tendenz mit bisherigen Studienergebnissen zu den Wirkungen der etablierten Alpha-Interferone Roferon-A und Intron-A überein [46, 195-197]. Eine Studie konnte allerdings auch zeigen, dass Multiferon im Konzentrationsbereich von 1-1000 IE/ml keine nachweisbaren antiproliferativen Effekte bei B16F10 Maus-Melanomzellen induzierte [198].

Die in unseren Experimenten überwiegend relativ geringen Ansprechraten der Melanomzellen auf die Behandlung mit Multiferon und Roferon-A können sowohl auf physiologischen als auch auf pathologischen Prozessen basieren. Bisher wurden zahlreiche und teilweise sehr heterogene Resistenzmechanismen beschrieben, die die Wirkung von Alpha-Interferonen bei Melanomzellen abschwächen können. Die nachfolgend diskutierten Resistenzmechanismen können möglicherweise zur Erklärung der überwiegend relativ geringen Wachstumsinhibitionsraten der verschiedenen Melanomzelllinien beitragen. Die Aktivierung des Jak-Stat-Signalweges, welcher für die antiproliferative Wirkung der Alpha-Interferone eine entscheidende Rolle spielt [199, 200], kann an mehreren Stellen durch verschiedene Mechanismen beeinflusst werden. Unter physiologischen Bedingungen wird eine übermäßige Aktivierung des Jak-Stat-Signalweges durch Interferon-alpha unter anderem mithilfe von SOCS-

Proteinen verhindert [201]. Die SOCS-Proteine wirken über das Prinzip der negativen Rückkopplung und können somit die antitumorale Wirkung von Interferon-alpha abschwächen. In Melanomzellen schienen insbesondere die SOCS-Proteine 1 und 3 die antiproliferativen Effekte der Alpha-Interferone hemmen zu können [201]. Weiterhin zeigte sich, dass die verstärkte Expression von SOCS1 in Melanomzellen die Expansion von Melanomzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* hemmen konnte [202].

Auch in einer weiteren Studie ließ sich nachweisen, dass die Inhibition von SOCS1 und SOCS3-Proteinen durch siRNA zu einer Erhöhung der Responsivität von Melanomzellen gegenüber der Behandlung mit Interferon-alpha führte [203]. In einer weiteren Studie schien SOCS1 über die Hemmung der Tyk2 nicht nur die nachfolgende Signaltransduktion durch die STAT-Proteine zu reduzieren, sondern auch die Expression des IFNAR1 zu vermindern [204]. Weiterhin ließ sich beobachten, dass es für die Vermittlung der antiproliferativen Effekte der Alpha-Interferone einer starken Bindung von Interferonrezeptor zu Interferonmolekül bedarf [192]. Diese starke Bindung führte allerdings nachweislich zu einer gesteigerten Rezeptorendozytose des Interferonrezeptors und dadurch zu einer geringeren Responsivität der Melanomzellen gegenüber Interferon-alpha [192].

An Fibrosarkomzellen und an Mamma-Ca-Zelllinien konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass für die Induktion der unterschiedlichen Interferoneffekte (antiviral, antiproliferativ) nicht nur die Rezeptor-Ligand-Interaktionen eine wichtige Rolle spielen, sondern auch die Anzahl der Interferonrezeptoren auf der Zelloberfläche einen wesentlichen Einfluss auf die Wirkung der Alpha-Interferone besitzt [205, 206]. Auf der Ebene der Transkription belegte eine Studie, dass Interferon-resistente Melanomzellen den Transkriptionsfaktor STAT5 verstärkt exprimieren. Dieser verhinderte über die Induktion von SOCS-Proteinen die Aktivierung von STAT1 [207]. Zuvor ergab bereits eine Studie, dass Interferon-resistente Melanomzelllinien ein geringeres Level an STAT1 aufwiesen [199]. Die in unseren Experimenten beobachtete relativ geringe Abhängigkeit der antitumoralen Wirkung von der Konzentrationssteigerung der Alpha-Interferone lässt sich somit möglicherweise durch die bei höheren Alpha-Interferon-Konzentrationen verstärkte Induktion von Resistenzmechanismen erklären. So zeigten sich bei der Behandlung der Zelllinien TüMel38 und TüMel40 mit sehr hohen Alpha-

Interferon-Konzentrationen (50000 IE/ml) sogar geringere Wachstumsinhibitionsraten als bei den niedrigsten Konzentrationen (391 IE/ml). Obwohl bei der überwiegenden Anzahl der getesteten Zelllinien die Wachstumsinhibitionsraten relativ gering ausfielen, ließen sich jedoch bei wenigen Zelllinien (WM-266-4, TüMel39, TüMel41H) Wachstumsinhibitionsraten von bis zu 60 % erzielen.

Bisher wurden nur wenige Studien zu molekularen Eigenschaften publiziert, die neben der möglichen Abwesenheit der oben genannten Resistenzmechanismen evtl. zur Sensibilität von Melanomzelllinien gegenüber Alpha-Interferonen beitragen. In einer Studie konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Interferon-sensible Melanomzelllinie MM418 gegenüber der Interferon-resistenten Zelllinie MeWo ein deutlich erhöhtes basales Level an Cathepsin B aufwies [208]. Die Beobachtung, dass verschiedene Melanomzelllinien mit variablen Ansprechraten auf die Behandlung mit Interferon-alpha reagieren, ist ein bereits bekanntes Phänomen [195, 199] und wird auf die genetische Heterogenität von verschiedenen Melanomzelllinien zurückgeführt. Warum die verschiedenen Alpha-Interferon-Subtypen nicht stärkere antitumorale Effekte bei den Melanomzelllinien induzierten als der einzelne Subtyp Interferon-alpha2a, lässt sich möglicherweise auf die unterschiedlichen Rezeptor-Ligand-Interaktionen der verschiedenen Alpha-Interferon-Subtypen des Multiférons zurückführen. Mit zunehmender Anzahl von unterschiedlichen Alpha-Interferon-Subtypen sinkt aufgrund des kompetitiven Rezeptorbindungsverhaltens der verschiedenen Subtypen die Wahrscheinlichkeit, dass es zur Bindung von hochaffinen Subtypen und damit zur Induktion von antiproliferativen Effekten kommt. Da Multiferon nach Angaben des Herstellers zu einem großen Anteil den fast identischen Subtypen alpha-2 des Roferon-A und darüber hinaus auch zu einem wesentlichen Prozentsatz den Alpha-Interferon-Subtypen  $\alpha 1$  ( $37 \pm 9$  %) enthält, der von allen Alpha-Interferon-Subtypen die geringste Affinität zum Interferon-Rezeptor und damit auch das geringste antiproliferative Potenzial aufweist [190], wäre diese Kombination eine mögliche und wahrscheinliche Erklärung für die überwiegend nicht bestehenden Unterschiede in der antiproliferativen Wirkung der Alpha-Interferone. Aufgrund der Kombination dieser Subtypen wären auch deutlich geringere antiproliferative Effekte des Multiférons im Vergleich zu Roferon-A denkbar gewesen. Dies konnte jedoch

durch unsere Experimente mit der Ausnahme der Konzentrationen von 25000 IE/ml und 50000 IE/ml deutlich widerlegt werden. Möglicherweise können die stärker bindenden Alpha-Interferon-Subtypen, die ebenfalls in Multiferon enthalten sind: alpha-14 ( $11 \pm 3 \%$ ); alpha-2, alpha-21 ( $30 \pm 7 \%$ ); alpha-10, mix, alpha-8 ( $22 \pm 6 \%$ ) die schwachen Effekte des Subtypen  $\alpha 1$  in dem Konzentrationsbereich von 378-25000 IE/ml kompensieren. Signifikant höhere Wachstumsinhibitionen mit Roferon-A im Vergleich zu Multiferon ergaben sich bei den höchsten Konzentrationen von 25000 IE/ml und 50000 IE/ml. Möglicherweise kam es durch die unterschiedlichen Subtypen, die in Multiferon enthalten sind – und hier vor allem durch die stark bindenden Subtypen – zu einer verstärkten Induktion von den bereits diskutierten Resistenzmechanismen und damit zu einer geringeren antiproliferativen Wirkung. Es könnten aber auch die bei höheren Konzentrationen zunehmende Anzahl von Interferon-alpha Subtypen mit einer geringen Affinität zum Rezeptor eine Rolle gespielt haben.

Bei isolierter Betrachtung der antiproliferativen Effekte der Alpha-Interferone in vitro erscheint die Kombination von verschiedenen Subtypen und hierbei insbesondere die Kombination von niedrig affinen Subtypen unter der Berücksichtigung der aktuellen Literatur und den Ergebnissen unserer In-vitro-Experimente wenig vorteilhaft, da bereits gezeigt werden konnte, dass sich mit der Verwendung eines einzelnen hochaffinen Subtypen deutlich höhere Wachstumsinhibitionsraten erzielen ließen. So konnte beispielsweise mit strukturell modifizierten Alpha-Interferonen gezeigt werden, dass diese sowohl in vitro als auch in vivo ein wesentlich höheres antiproliferatives Potenzial aufwiesen als die physiologischen Alpha-Interferon-Subtypen [209, 210]. Ein möglicher Vorteil von Multiferon gegenüber Interferon-alpha2b konnte auf Ebene der Resistenzentwicklung beobachtet werden. Hier zeigte sich, dass unter der Behandlung von Melanomzellen in vitro mit Multiferon signifikant weniger resistente Kolonien auftraten als bei der Behandlung mit Interferon-alpha2b [195]. Der Nachweis, dass diese Effekte auch in vivo bestehen, muss allerdings erst noch erbracht werden.

### **4.1.3 Schlussfolgerung**

Aus der In-vitro-Behandlung von insgesamt 18 verschiedenen Melanomzelllinien mit den Alpha-Interferonen Multiferon und Roferon-A ergaben sich, abgesehen von 3 Konzentrationen (5000 IE/ml, 25000 IE/ml und 50000 IE/ml), keine signifikanten Unterschiede der beiden Alpha-Interferone hinsichtlich ihres direkten antitumoralen Potenzials. Hieraus lässt sich folgern, dass die Kombination der in Multiferon enthaltenen verschiedenen Alpha-Interferon-Subtypen ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 10$ ,  $\alpha 14$ ,  $\alpha 21$ ) bezüglich ihrer antitumoralen Wirkung gegenüber verschiedenen Melanomzelllinien bei 8 von 11 in vitro getesteten Konzentrationen keine Vor- oder Nachteile gegenüber der Verwendung des Subtypen Interferon-alpha2a (Roferon-A) aufweisen. Bei den höchsten Konzentrationen bestand ein signifikanter Vorteil hinsichtlich der erzielten Wachstumsinhibitionsraten bei der Verwendung des einzelnen Subtypen Interferon-alpha2a (Roferon-A).

## **4.2 Zytokinanalyse nach Stimulation von Patienten-PBMCs mit Multiferon und Roferon-A**

### **4.2.1 Diskussion der Methode**

Da die Sezernierung von Zytokinen äußerst komplexen und sensiblen Regulationsmechanismen unterliegt und die Zytokinanalyse mithilfe der Multiplexbestimmung einige Limitationen aufweist, gilt es, bei der Interpretation der Ergebnisse einige Faktoren zu berücksichtigen, die die Zytokinkonzentration beeinflussen können. Die verwendeten, auf der xMAP<sup>®</sup>-Detektionstechnologie basierenden Multiplex Immunoassays ermöglichen gemäß den Angaben des Herstellers, den spezifischen („Kreuzreaktivität nicht größer als 5 %“), genauen („Accuracy“/„Recovery“) und präzisen („Precision“) Nachweis von mehreren verschiedenen Zytokinen in nur einer Probe [211]. Die Nachweisgrenze („Limit of Detection“) für die Zytokine liegt bei dem verwendeten Procarta<sup>®</sup> Cytokine Assay Kit und den meisten anderen Multiplex Immunoassays in einem Bereich von 1 pg/ml. Der Bereich, in dem sich die erfassten Zytokinkonzentrationen zuverlässig quantifizieren lassen, befindet sich allerdings („Limit of Quantitation“) oberhalb dieses Wertes und wird für die jeweilige Messung anhand einer Standardkurve bestimmt. Da aber jeder Hersteller eine andere Standardkurve für seine Zytokin-Kits ausgibt, muss beachtet werden, dass der Vergleich der ermittelten absoluten Zytokinkonzentrationen mit den Ergebnissen anderer Studien nicht ohne weiteres möglich ist [212, 213]. Zytokine werden hochspezifisch von ihren Rezeptoren gebunden und somit können auch Konzentrationen im niedrigen picomolaren Bereich oder möglicherweise auch darunter wirkungsinduzierend sein [214]. Bei der Interpretation der Zytokinkonzentrationen muss folglich bedacht werden, dass auch Zytokine, die nur in geringen Konzentrationen sezerniert werden oder eventuell sogar unterhalb der Nachweisgrenze der Multiplexbestimmung liegen, trotzdem eine Wirkung, insbesondere auf auto- oder parakriner Ebene vermitteln können.

Ein weiterer wichtiger Punkt, den es zu beachten gilt, ist der Zeitpunkt der Messung der Zytokine. Um möglichst alle getesteten durch Interferon-alpha induzierbaren Zytokine zu erfassen, erfolgte die Inkubation der Patienten-PBMCs mit den Alpha-Interferonen

für 6 h. Danach wurden die Proben auf Trockeneis gekühlt zur Zytokinanalyse versandt. Die eigentliche Analyse erfolgte ohne Einfriervorgang innerhalb von 24-48 h. Die kurzen Halbwertszeiten vieler zirkulierender Zytokine in vivo und die damit verbundene erschwerte Nachweisbarkeit scheinen in vitro von geringerer Bedeutung zu sein. Wie beispielsweise für  $\beta$ 2M, Neopterin, sTNFRII, sIL-2R, IFN- $\gamma$  im Plasma beobachtet werden konnte, zeigten sich zwischen Proben, die bei verschiedenen Lagerungsbedingungen (Raumtemperatur 24 °C, Kühlschrank 4 °C, Gefrierschrank -80 °C) aufbewahrt wurden auch nach 20 Tagen keine signifikanten Konzentrationsunterschiede [215]. Nur für TNF-alpha ließ sich für die Probe, die bei Raumtemperatur aufbewahrt wurde, eine im Vergleich zu der im Kühlschrank gelagerten Probe um 55 % geringere Konzentration nachweisen [215]. Für den Fall, dass unsere Lagerungsbedingungen die Zytokinkonzentrationen beeinflusst haben sollten, kann aller Wahrscheinlichkeit nach aber davon ausgegangen werden, dass eine gleichsinnige Verringerung oder Erhöhung der Zytokinkonzentrationen sowohl in den Kontrollgruppen als auch in den stimulierten Proben stattgefunden hätte. Somit würden die Verhältnisse zwischen den unstimulierten und stimulierten Proben auch bei unterschiedlichen Konzentrationsniveaus trotzdem konstant und eine Aussage bezüglich der Induktionsfähigkeit der getesteten Zytokine durch Interferon-alpha wäre weiterhin zulässig.

Um auszuschließen, dass physiologische Inhibitoren die Zytokine abbauen, wurde zudem das in unserem Medium enthaltene humane Serum hitzeinaktiviert. Durch die ausschließliche Verwendung von aufgetauten PBMCs für unsere Zytokinanalyse wurde außerdem der Beobachtung Rechnung getragen, dass zwischen aufgetauten und frischen PBMCs Differenzen in der Zytokinsekretion nach Stimulation bestehen können [216]. Weiterhin muss bedacht werden, dass die Stimulation der PBMCs durchgehend mit einer einheitlichen Alpha-Interferon-Konzentration von 10000 U/ml erfolgte und sich somit zu möglichen Unterschieden in der Zytokinantwort bei niedrigeren oder höheren Konzentrationen keine Aussagen treffen lassen. Jedoch ließ sich in einer Studie mit Melanompatienten zeigen, dass eine Erhöhung der Konzentration von Interferon-alpha2b nicht zu einer verstärkten Signaltransduktion oder Genregulation in den untersuchten PBMCs führte [217]. Somit war möglicherweise die in unseren Versuchen



verwendete Konzentration von Interferon-alpha ausreichend, um alle in unseren Experimenten getesteten und potenziell induzierbaren Zytokine zu erfassen. Grundsätzlich musste bei der Interpretation der Ergebnisse der Zytokinanalyse ebenfalls beachtet werden, dass PBMCs aus einer heterogenen Zellpopulation (CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen, basophile und dendritische Zellen) bestehen und der prozentuale Anteil dieser Subpopulationen spenderabhängig variiert. Interindividuelle Vergleiche der absoluten Zytokinkonzentrationen verschiedener Patienten sind damit nur eingeschränkt sinnvoll. Weiterhin muss bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass sowohl IL-2 als auch IL-7 im Kulturmedium enthalten waren. Die Kontrollansätze enthielten zwar ebenfalls IL-2 und IL-7, allerdings wäre es theoretisch möglich, dass bestimmte Zytokine nur durch die Wirkung von IL-2 und IL-7 Alpha-Interferon abhängig sezerniert werden können. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass IL-7 stimulierte PBMCs IL-6, IL-1alpha, IL-1beta und TNF-alpha sezernierten [218]. Hierdurch könnten die teilweise hohen Zytokinkonzentrationen in den Kontrollgruppen erklärt werden.

Es ließ sich durch die Zytokinanalyse folglich nachweisen, dass Interferon-alpha zur Sezernierung von verschiedenen Zytokinen führte, jedoch konnten keine Aussagen über den Mechanismus (direkt, indirekt) der Induktion getroffen werden. Die oben diskutierten Einflussfaktoren auf die Ergebnisse der Zytokinanalyse sind vor allem dann von Bedeutung, wenn eine möglichst genaue quantitative Bestimmung der absoluten Zytokinkonzentrationen erfolgen soll. Für die in unseren Experimenten verfolgte Fragestellung war jedoch die Beantwortung der Frage nach der relativen Induktionsfähigkeit der Zytokine durch die Alpha-Interferone im Vergleich zum jeweiligen Kontrollansatz ausschlaggebend.

#### **4.2.2 Diskussion der Zytokine**

Derzeit wird vermutet, dass die antitumorale Wirkung von Interferon-alpha in vivo vor allem auf indirekten antitumoralen Effekten beruht [70, 71]. Hierbei können Zytokine entscheidende Faktoren sein, die diese Effekte vermitteln. Um zu erfassen, ob zwischen Multiferon und Roferon-A Unterschiede in ihrem zytokininduzierenden Potenzial bestehen und welche Zytokine sich direkt bzw. indirekt durch die beiden Alpha-

Interferone induzieren lassen, wurden insgesamt 13 verschiedene Zytokine nach der Stimulation von Melanopatienten-PBMCs mit Multiferon und Roferon-A bestimmt. Aufgrund der bisher im Zusammenhang mit dem Melanom beschriebenen anti- bzw. protumoralen Funktionen der Zytokine (s. Kapitel 1.3) sollte darüber hinaus überprüft werden, welche Zytokine bei der Vermittlung dieser Effekte eine Rolle spielen und somit möglicherweise auch als prädiktive Marker in weiteren Studien untersucht werden könnten. In unserer Zytokinanalyse wurden, von einer Ausnahme (MIP-1 $\alpha$ ) abgesehen, keine signifikanten qualitativen oder quantitativen Unterschiede zwischen dem stimulatorischen Potenzial von Multiferon und Roferon-A erfasst.

Hinsichtlich der signifikant stärkeren Induktion von MIP-1alpha durch Multiferon im Vergleich zu Roferon-A lagen bisher keine Publikationen vor, in denen eine verstärkte Induktion durch Multiferon gegenüber Roferon-A beschrieben wurde. Im Kontext der bisher bekannten Studien zu den nachgewiesenen unterschiedlichen Wirkungen der Interferon-alpha-Subtypen auf verschiedene PBMC-Subpopulationen [219-221] waren die überwiegend kaum vorhandenen Unterschiede im quantitativen und qualitativen Potenzial der Alpha-Interferone nicht zu erwarten. Die Ursachen hierfür könnten möglicherweise auch auf den bereits in Kapitel 4.1.2 im Zusammenhang mit den direkten antiproliferativen Effekten diskutierten kompetitiven Effekten der verschiedenen Subtypen des Multiférons beruhen.

Es ließ sich zudem zeigen, dass die durch Alpha-Interferone induzierte Resistenz über die SOCS-Proteine nicht nur in Melanomzellen, sondern auch in PBMCs eine Rolle spielt [222, 223], wodurch eine qualitative und quantitative Zytokinantwort limitiert werden könnte. Weiterhin erbrachten unsere In-vitro-Experimente den Nachweis, dass die Zytokine IL-1 $\alpha$ , IL-1-ra, IL-6, IL-15, IL-17, IP-10, TNF- $\alpha$ , MCP-3, MIP-3alpha, MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  nach Stimulation von Melanopatienten-PBMCs mit Multiferon/Roferon-A und in Anwesenheit von IL-2 und IL-7 signifikant sezerniert wurden. Für MCP-1 konnte zwar eine relativ hohe Zytokinkonzentration in den Kontrollgruppen beobachtet werden, allerdings ließ sich diese durch die Zugabe der Alpha-Interferone nicht signifikant steigern. Darüber hinaus wurde auch IL-1beta nicht signifikant induziert. Die geringe Induktionsfähigkeit von IL-1beta durch Interferon-alpha konnte bereits in einer prospektiven randomisierten Studie bei Melanom-

Patienten, die eine Alpha-Interferon-Therapie erhielten, im Serum nachgewiesen werden [139].

Mit unseren Experimenten vergleichbare In-vitro-Studien, die Alpha-Interferone im Hinblick auf ihre zytokininduzierende Wirkung bei PBMCs untersuchten, lagen allerdings nicht vor. In der bisher wichtigsten In-vivo-Studie, die sich zum Vergleich mit unseren Ergebnissen anbietet, wurden insgesamt 29 verschiedenen Zytokine in Serumproben von Melanompatienten, die eine Hochdosistherapie mit Interferon-alpha2b erhielten, mittels Zytokinanalyse bestimmt. Nach 3 Monaten zeigten sich signifikant erhöhte Serumlevel von IP-10 und MCP-1 [87]. Auch unsere Ergebnisse zeigten eine relativ starke Alpha-Interferon-abhängige Induktion von IP-10, wohingegen MCP-1 in unseren Versuchen nicht signifikant induziert werden konnte. Die jedoch in der Studie untersuchten und in unseren Versuchen durch Interferon-alpha signifikant induzierten Zytokine (IL-1alpha, IL-6, MIP-1alpha, MIP-1beta, TNF-alpha), ließen sich in dieser Studie allerdings nicht signifikant induzieren. Ob die Unterschiede zwischen unseren Ergebnissen und denen in dieser Studie auf einer geringeren Induktionsfähigkeit der Zytokine durch die Alpha-Interferone in vivo beruhen oder ob es sich bei diesen Unterschieden um ein Problem der Nachweisbarkeit aufgrund der kurzen HWZ vieler Zytokine im Serum handelt, lässt sich nicht abschließend beantworten. Möglicherweise spielte auch die in unseren Experimenten verwendete höhere Konzentration der Alpha-Interferone und die Supplementation des Mediums mit IL-2 und IL-7 eine Rolle.

#### **4.2.2.1 Zytokine als mögliche prädiktive Marker**

Aufgrund der häufig auftretenden gravierenden Nebenwirkungen und der relativ geringen Anzahl von Patienten, die von der Interferon-Therapie profitieren, wird seit langem nach prädiktiven Markern gesucht, die Rückschlüsse auf das Ansprechen der Interferon-alpha-Therapie ermöglichen. Bisher gibt es keine in der Routine etablierten Biomarker, die Rückschlüsse auf das Ansprechen der Interferon-Therapie erlauben. Die in unserer Zytokinanalyse mit Multiferon und Roferon-A stimulierten PBMCs wurden im Hinblick auf den Krankheitsverlauf der Spender in zwei Gruppen eingeteilt (s. Kapitel 3.5). Die PBMCs der Patienten, die innerhalb von 24 Monaten nach Blutentnahme kein Rezidiv entwickelten (Patientengruppe 2), zeigten in unseren

Versuchen im Vergleich zu den PBMCs der rezidierten Patienten keine signifikant unterschiedlichen Induktionsraten der Zytokine.

In der bisher größten Studie, die Zytokine im Hinblick auf ihre prognostische und prädiktive Aussagekraft bei Melanompatienten, die eine Hochdosistherapie mit Interferon-alpha2b erhielten, überprüfte, konnte gezeigt werden, dass erhöhte Konzentrationen von IL-1alpha, IL-1beta, IL-6, TNF-alpha, MIP-1alpha und MIP-1beta vor der Interferon-alpha-Therapie mit dem rezidivfreien Überleben der Patienten assoziiert waren und somit eine mögliche prognostische Relevanz besitzen [87]. Diese Zytokine waren allerdings in unseren Experimenten in der Gruppe der rezidivfreien Patienten im Vergleich zu der Gruppe der rezidierten Patienten nicht signifikant erhöht. Problematisch ist jedoch, dass die nach 3 Monaten der Therapie in der Studie von Yurkovetsky et. al. [87] erfassten, signifikant erhöhten (IP-10, MCP-1, IFN-alpha, IL-12p40, soluble TNF-RI, TNF-RII, IL-2R) bzw. reduzierten (VEGF, EGF, HGF) Zytokine nicht signifikant mit dem rezidivfreien Überleben der Patienten korrelierten. Daher bleibt die Suche nach prädiktiven Markern für das Ansprechen auf eine Therapie mit Interferon-alpha von großer Bedeutung. Wie bereits diskutiert, konnten unsere Experimente und auch weitere Studien zeigen, dass verschiedene Zytokine durch die Stimulation von PBMCs mit Interferon-alpha sowohl in vitro als auch in vivo induziert werden können. Darüber hinaus erfolgte in der oben genannten Studie [87] der Nachweis, dass große Unterschiede zwischen den Zytokinkonzentrationen im Serum von Melanompatienten und gesunden Patienten bestanden. Vor diesem Hintergrund könnten die durch Alpha-Interferone induzierten Zytokine möglicherweise trotz der bisher teilweise negativen Ergebnisse hinsichtlich ihrer prädiktiven Relevanz eine Rolle als Biomarker spielen. Hierbei könnten möglicherweise die In-vitro-Stimulation von Patienten-PBMCs mit Interferon-alpha und die anschließende Zytokinanalyse gegenüber der Erfassung von Zytokinen im Serum einige Vorteile bieten. So kann der Nachweis von Zytokinen im Serum aufgrund von physiologischen Inhibitoren und der damit einhergehenden geringen Halbwertszeit erschwert oder eventuell nicht möglich sein. Die In-vitro-Stimulation von Patienten-PBMCs könnte somit aufgrund der größeren Stabilität der Zytokine in vitro ein zuverlässigeres Bild bezüglich des induzierbaren Zytokinspektrums ermöglichen. In vitro ließen sich zudem auch verschiedene Zytokine erfassen, die in vivo durch die PBMCs im Tumormikromilieu

nur in geringen Konzentrationen sezerniert werden und daher möglicherweise nicht in den systemischen Kreislauf gelangen, die aber für eine direkte oder indirekte antitumorale Wirkung von Interferon-alpha von Bedeutung sind.

Aufgrund der Funktionen der Zytokine bei der Melanomprogression, die bereits in Kapitel 1.3.1 beschrieben wurden, und der Ergebnisse unserer Zytokinanalyse, soll an dieser Stelle ein Versuch unternommen werden, mögliche Zytokine zu identifizieren, die für die Testung als prädiktive Marker in einer größeren Studie infrage kommen könnten. Grundsätzlich eignen sich für die Auswahl von Zytokinen, die als prädiktive Marker fungieren sollen, besonders diejenigen, welche durch Interferon-alpha relativ stark und selektiv induziert bzw. inhibiert werden. Darüber hinaus sollten diese Zytokine möglichst wichtige Funktionen im Zusammenhang mit der Melanomprogression vermitteln und nur durch wenige andere Faktoren beeinflusst werden.

Da sich diese Voraussetzungen kaum durch ein einzelnes Zytokin erfüllen lassen, ist die Bestimmung von mehreren Zytokinen möglicherweise vielversprechender als die Bestimmung von einzelnen. Legt man diese genannten Voraussetzungen zugrunde und betrachtet unsere und die Ergebnisse der bisher veröffentlichten Studien zu diesem Thema, könnten die Zytokine IL-1alpha, MCP-3 und IP 10 in der Kombination geeignet sein, um in Studien auf ihre prädiktive Aussagekraft überprüft zu werden. In unseren Experimenten wurden diese drei Zytokine von allen getesteten Zytokinen durchschnittlich am stärksten sezerniert (Induktionsrate > 3). Zudem konnten bereits die pro/-antitumoralen Eigenschaften dieser Zytokine im Zusammenhang mit dem Melanom beschrieben werden (s. Kapitel 1.3.1.). Weiterhin ließ sich schon für IL-1alpha zeigen, dass das Serumlevel dieses Zytokins bei Melanompatienten mit einem längerem rezidivfreien Überleben im Vergleich zu Patienten mit kürzerem rezidivfreien Überleben signifikant erhöht war [87]. Ob eine mögliche Kombination der Zytokinanalyse in vitro in Zusammenschau mit den im nachfolgenden Abschnitt diskutierten Wachstumsinhibitionsraten von Melanomzellen in einem autologen System aus Patienten-PBMCs und Melanomzellen mögliche prädiktive Effekte noch verbessern könnte, ließe sich ebenfalls in einer solchen Studie evaluieren.

#### **4.2.7 Schlussfolgerung**

Bei der Analyse der Zytokinkonzentration nach vorausgehender Stimulation von Melanompatienten-PBMCs mit Multiferon und Roferon-A ließen sich, von einer Ausnahme (MIP-1alpha) abgesehen, zwischen den beiden Alpha-Interferonen keine signifikanten qualitativen oder quantitativen Unterschiede der hervorgerufenen Zytokinantwort beobachten. Hieraus lässt sich folgern, dass die in Multiferon enthaltenen verschiedenen Subtypen ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 10$ ,  $\alpha 14$ ,  $\alpha 21$ ) gegenüber dem einzelnen Subtypen ( $\alpha 2a$ ) des Roferon-A, abgesehen von der Ausnahme MIP-1alpha, auch im Hinblick auf das zytokininduzierende Potenzial in Melanom-Patienten-PBMCs keine Vor- oder Nachteile bieten. Weiterhin konnten die Experimente zeigen, dass die Zytokine IL-1 $\alpha$ , IL-1-ra, IL-6, IL-15, IL-17, IP-10, TNF- $\alpha$ , MCP-3, MIP-3alpha, MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  in Anwesenheit von IL-2 und IL-7 Interferon-alpha abhängig von den PBMCs signifikant sezerniert wurden. Aus der Literaturrecherche zu den Funktionen dieser Zytokine in Zusammenhang mit der Melanomprogression lässt sich folgern, dass einige von ihnen durchaus an der antitumoralen Wirkung von Interferon-alpha beteiligt sein könnten, was die derzeitige Theorie stützen würde, dass die antitumoralen Effekte der Alpha-Interferone in vivo primär über indirekte Effekte vermittelt werden.

### **4.3 Kombinierte direkte und indirekte antiproliferative Effekte von Multiferon und Roferon-A**

#### **4.3.1 Diskussion der Methode – Berücksichtigung von antitumoralen Effekten von IL-2 und IL-7**

Neben den möglichen Einschränkungen, die bereits in Kapitel 4.1.1 für den MUH-Assay diskutiert wurden, müssen bei den Versuchen an Melanomzellen mit autologen PBMCs und der nachfolgenden Interpretation der Ergebnisse auch mögliche relevante antitumorale Wirkungen von IL-2 und IL-7 berücksichtigt werden. Um die Population der B- und T-Zellen in den isolierten PBMCs zu expandieren und somit potenzielle antitumorale Effekte von Interferon-alpha zu verstärken, wurde das verwendete Medium zusätzlich mit IL-2 und IL-7 supplementiert. IL-2 fördert neben der Proliferation und Differenzierung von B- und T-Zellen [224] auch die Aktivierung von Monozyten [225].

Hinsichtlich möglicher antitumoraler Effekte von IL-2 ließ sich bereits in einem autologen System aus Melanom- und NK-Zellen zeigen, dass IL-2 in der Lage war, NK-Zellen zu aktivieren und eine NK-zellvermittelte Lyse von Melanomzellen einzuleiten [226]. Die direkte Wirkung von IL-7 besteht in der Induktion der Proliferation und Reifung von B-Zell- und T-Zell-Progenitorzellen [227-229]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass IL-7 stimulierte Monozyten zur antitumoralen Aktivität gegenüber Melanomzellen angeregt werden konnten [218]. Weiterhin ließ sich nachweisen, dass IL-2 und IL-7 sowohl in Kombination als auch bei isolierter Verwendung antitumorale Effekte von LAK-Zellen gegenüber allogenen und autologen Melanomzellen induzieren konnten [230]. Die in den Experimenten beobachteten antitumoralen Effekte in den Kontrollgruppen (IL-2, IL-7 und PBMCs) können wahrscheinlich auf die oben beschriebenen Effekte zurückgeführt werden.

#### **4.3.2 Diskussion der antitumoralen Effekte von Multiferon und Roferon-A im autologen System aus PBMCs und Melanomzellen**

Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass die antitumoralen Effekte der Alpha-Interferone in vivo möglicherweise vielmehr auf indirekten Effekten wie z. B. der Stimulation einer Immunantwort als auf direkten Wirkungen gegenüber den Melanomzellen beruhen [70, 71]. Um nachzuweisen, ob sich die bereits in unseren Experimenten erfassten direkten antitumoralen Effekte von Multiferon und Roferon-A durch Zellen des Immunsystems weiter steigern ließen und ob zwischen den beiden Alpha-Interferonen Unterschiede im Potenzial der kombinierten direkten und indirekten antitumoralen Effekte bestanden, wurde in unseren Experimenten ein autologes System aus Melanomzellen und PBMCs verwendet. Bis zu dem Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Dissertation lagen keine Studien vor, in denen die antitumoralen Effekte von Alpha-Interferonen (Multiferon und Roferon-A) auf Melanomzellen in einem autologen System in vitro untersucht wurden.

Unsere Versuche ergaben, dass sich die durch Interferon-alpha induzierten antitumoralen Effekte, die bereits im 1. Teil der Experimente (Kapitel 4.1.2) beobachtet werden konnten, durch die Zugabe von autologen PBMCs weiter steigern ließen. Diese Steigerungen waren allerdings statistisch nicht signifikant. Es zeigte sich im Vergleich

zu den Ergebnissen im 1. Teil der Experimente eine höhere Variabilität der Wachstumsinhibitionsraten. So ließ sich die erwartete proportionale Abhängigkeit der antitumoralen Effekte sowohl von der PBMC-Konzentration als auch von der Alpha-Interferon-Konzentration nicht immer so deutlich beobachten wie beispielsweise bei der Zelllinie TüMel39. Teilweise bestanden innerhalb derselben Zelllinien (TüMel44, TüMel45) auch größere Unterschiede (in der Höhe) der durch Multiferon und Roferon-A hervorgerufenen Wachstumsinhibitionsraten. Allerdings weisen die fehlenden Unterschiede der beiden Alpha-Interferone hinsichtlich ihrer direkten antiproliferativen und zytokininduzierenden Effekte im 1. und 2. Teil der Experimente darauf hin, dass die beobachteten Unterschiede in den Wachstumsinhibitionsraten wahrscheinlich nicht auf die verschiedenen Subtypen der beiden Alpha-Interferone zurückzuführen sind. Diese Unterschiede können möglicherweise auf die physiologische Heterogenität der Patienten-PBMCs (Donor-Variabilität) zurückgeführt werden. Um die Variabilität der Wachstumsinhibitionsraten zu bestätigen und um statistische Ausreißer ausschließen zu können, müssten jedoch weitere Experimente mit einer größeren Anzahl von Melanomzelllinien und autologen PBMCs durchgeführt werden.

Die beobachteten variablen antitumoralen Effekte in den Ansätzen ohne Interferon-alpha (IL-2, IL-7 und PBMCs) müssen sehr wahrscheinlich auf die antitumoralen Effekte verschiedener durch IL-2/IL-7 stimulierter Subpopulationen der PBMCs zurückgeführt werden (s. Kapitel 4.3.1). Hierfür spricht, dass bei den beobachteten Wachstumsinhibitionsraten in den Kontrollgruppen eine Abhängigkeit von der PBMC-Konzentration bestand. Die Abhängigkeiten in den Kontrollgruppen waren allerdings nur für die E:Ts von 1,25 : 1 bis 20 : 1 gegeben. Bei höheren E:Ts (80 : 1) konnten, von einer Ausnahme (TüMel39) abgesehen, überwiegend geringere Wachstumsinhibitionsraten als bei den niedrigen E:Ts beobachtet werden. Die antitumoralen Effekte in den Gruppen, in denen zusätzlich auch Interferon-alpha verwendet wurde, zeigten, dass sich die sehr wahrscheinlich durch IL-2/IL-7 induzierten antitumoralen Effekte in den Kontrollgruppen durch die Zugabe von Interferon-alpha weiter steigern ließen. Die Steigerungen in den Wachstumsinhibitionsraten waren allerdings statistisch nicht signifikant.



Weiterhin gelang in unseren Experimenten der Nachweis, dass die erfassten antitumoralen Effekte von dem Verhältnis von PBMCs zu Melanomzellen (E:T) abhängig waren. Bei relativ geringen E:Ts (1,25 : 1 und 5 : 1) ließen sich die antitumoralen Effekte durch die beiden Alpha-Interferone verstärken. Hingegen konnte bei E:Ts von 20 : 1 beobachtet werden, dass die antiproliferativen Effekte auch durch hohe Konzentrationen von IFN-alpha allenfalls in einem geringen Umfang erhöht werden konnten. Warum sich die Wachstumsinhibitionsraten bei höheren PBMC-Konzentrationen durch die Zugabe von Alpha-Interferonen nicht im selben Umfang steigern ließen wie bei den niedrigeren PBMC-Konzentrationen, lässt sich möglicherweise durch die unterschiedliche Sensibilität verschiedener Melanomzelllinien gegenüber immunzellvermittelten antitumoralen Effekten und mit den Eigenschaften der Zellen erklären, die die antitumoralen Effekte induzieren. So konnte in einer Kultur aus NK- und Melanomzellen gezeigt werden, dass es nach initialer NK-Zell-vermittelter Lyse der Melanomzellen zu einer Resistenzentwicklung der residualen Melanomzellen kam [231]. Weiterhin ließ sich zeigen, dass Interferon-alpha die Induktion von PD-1 auf CD8<sup>+</sup>-T-Zellen induzierte [232] und somit möglicherweise ebenfalls zu einer Limitation der Immunantwort beiträgt.

Ob sich ein autologes System aus Melanomzellen und PBMCs, in dem, wenn auch in einer sehr vereinfachten Weise, die individuellen tumorimmunologischen Verhältnisse eines Patienten abgebildet werden, möglicherweise als prädiktiver Test für das Therapieansprechen von Interferon-alpha oder evtl. auch den derzeit relativ neuen Immuntherapeutika (PD-1, PD-1Ligand Antagonisten und CTLA-4-Antikörpern) eignen könnte, müsste in größeren Studien untersucht werden. Eine erste Analyse der klinischen Krankheitsverläufe unserer Patienten und der ermittelten Wachstumsinhibitionsraten ihrer Melanomzelllinien konnte allerdings keine Zusammenhänge zwischen Wachstumsinhibitionsraten und dem rezidivfreien Überleben der Patienten nachweisen (Daten nicht gezeigt).

#### **4.3.3 Schlussfolgerung**

Der Vergleich der Alpha-Interferone Multiferon und Roferon-A hinsichtlich ihres antitumoralen Potenzials in einem autologen System aus Melanomzellen und PBMCs

erbrachte teilweise größere Unterschiede in den Wachstumsinhibitionsraten. In Anbetracht der Ergebnisse der Versuche im 1. und 2. Teil der Experimente, in denen sich auf Ebene der direkten antitumoralen und der zytokininduzierenden Effekte zwischen den beiden Alpha-Interferonen kaum signifikante Unterschiede feststellen ließen, sind die variablen Wachstumsinhibitionsraten wahrscheinlich nicht durch die unterschiedlichen Alpha-Interferon-Subtypen bedingt, sondern lassen sich möglicherweise durch die physiologische Heterogenität der Patienten-PBMCs (Donor-Variabilität) erklären. Weiterhin zeigte sich in den Experimenten, dass die Alpha-Interferone die antiproliferativen Effekte bei relativ niedrigen E:Ts (1,25 : 1 u. 5 : 1) verstärken konnten, wohingegen sich bei E:Ts von 20 : 1 die antiproliferativen Effekte gegenüber den Melanomzellen nur in einem geringen Umfang steigern ließen. Insgesamt ergaben sich zwischen den Wachstumsinhibitionsraten in den Ansätzen mit PBMCs gegenüber den Ansätzen ohne PBMCs keine statistisch signifikanten Unterschiede.

## 5. Zusammenfassung

Das Thema der vorliegenden Arbeit umfasst den Vergleich der direkten/indirekten antitumoralen und der zytokininduzierenden Effekte der Alpha-Interferone Multiferon und Roferon-A. Zunächst wurden die direkten antitumoralen Effekte der Alpha-Interferone auf insgesamt 18 verschiedene Melanomzelllinien mittels MUH-Assay untersucht. Die Stimulation von Melanopatienten-PBMCs mit den beiden Alpha-Interferonen und die nachfolgende Zytokinanalyse mithilfe von Multiplex-Immunoassays sollten qualitative und quantitative Unterschiede im Zytokinspektrum erfassen. Auf Grundlage der Ergebnisse der Zytokinanalyse und der bisher in der Literatur beschriebenen pro- bzw. antitumoralen Eigenschaften der getesteten Zytokine im Zusammenhang mit der Melanomentstehung sollten mögliche Zytokine identifiziert werden, die potenziell zur antitumoralen Wirkung der Alpha-Interferone beitragen können und sich daher möglicherweise auch als prädiktive Marker eignen würden. Des Weiteren wurde überprüft, ob zwischen der Zytokinsekretion und dem rezidivfreien Überleben der Patienten ein Zusammenhang bestand. Um zu ermitteln, ob sich die direkten antitumoralen Effekte der Alpha-Interferone durch das Immunsystem weiter steigern lassen, erfolgte abschließend der Vergleich der antitumoralen Wirkung der beiden Alpha-Interferone in einem autologen System aus Melanomzellen und PBMCs. Im Hinblick auf die qualitative und quantitative Sezernierung von Zytokinen von Melanopatienten-PBMCs ließen sich zwischen den unterschiedlichen Subtypen des Multiférons und dem einzelnen Subtypen des Roferon-A, abgesehen von einer Ausnahme (MIP-1 $\alpha$ ), keine signifikanten Unterschiede beobachten. Es zeigte sich, dass die Zytokine IL-1 $\alpha$ , IL-1-ra, IL-6, IL-15, IL-17, IP-10, TNF- $\alpha$ , MCP-3, MIP-3alpha, MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  in Anwesenheit von IL-2 und IL-7 Interferon-alpha abhängig von den PBMCs sezerniert wurden. Der Vergleich der Alpha-Interferone in einem autologen System aus Melanomzellen und PBMCs offenbarte, dass die überwiegend geringen direkten antitumoralen Effekte der Alpha-Interferone, die sich im ersten Teil der Experimente beobachten ließen, durch die Zugabe von autologen PBMCs weiter gesteigert werden konnten. Diese Steigerungen waren statistisch allerdings nicht signifikant. Für die Abhängigkeit der Wachstumsinhibition von der Konzentration der Alpha-Interferone ließ sich sowohl bei den isolierten Versuchen an verschiedenen Melanomzelllinien als auch bei den Versuchen im autologen System aus

Melanomzellen und PBMCs eine moderate Abhängigkeit von der Alpha-Interferon-Konzentration beobachten. Die in den Experimenten gewonnenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die in Multiferon enthaltenen unterschiedlichen Interferon-alpha-Subtypen ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 10$ ,  $\alpha 14$ ,  $\alpha 21$ ) bei den In-vitro-Experimenten keine wesentlichen Vor- oder Nachteile gegenüber dem einzelnen Subtypen ( $\alpha 2a$ ) des Interferon-A hinsichtlich des direkten und wahrscheinlich auch des indirekten antitumoralen oder des zytokininduzierenden Potenzials bieten.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Garbe, C., et al., [*Brief guidelines: malignant melanoma of the skin*], in *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG2006*: Germany. p. 344-9.
2. Balch, C.M., et al., *Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification*, in *J Clin Oncol*2009: United States. p. 6199-206.
3. Buettner, P.G., et al., *Development of prognostic factors and survival in cutaneous melanoma over 25 years: An analysis of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society*. *Cancer*, 2005. **103**(3): p. 616-24.
4. UK, C.R. *Skin cancer incidence in Europe and worldwide*. 26.05.2016]; Available from: <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/skin-cancer/incidence#heading-Seven>.
5. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. *Int J Cancer*, 2015. **136**(5): p. E359-86.
6. Gesellschaft, R.K.-I.H.u.d. and der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, *Krebs in Deutschland 2011/2012*. **10. Ausgabe**.
7. Breitbart, E.W., et al., *Systematic skin cancer screening in Northern Germany*. *J Am Acad Dermatol*, 2012. **66**(2): p. 201-11.
8. Grob, J.J., et al., *Count of benign melanocytic nevi as a major indicator of risk for nonfamilial nodular and superficial spreading melanoma*. *Cancer*, 1990. **66**(2): p. 387-95.
9. Gandini, S., et al., *Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi*. *European journal of cancer*, 2005. **41**(1): p. 28-44.
10. Garbe, C., et al., *Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society*. *J Invest Dermatol*, 1994. **102**(5): p. 695-9.
11. Hiddemann and Bartram, *Die Onkologie*2010.
12. Gandini, S., et al., *Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure*. *European journal of cancer*, 2005. **41**(1): p. 45-60.

13. Elwood, J.M. and R.P. Gallagher, *Body site distribution of cutaneous malignant melanoma in relationship to*. Int J Cancer, 1998. **78**(3): p. 276-80.
14. Khlal, M., et al., *Mortality from melanoma in migrants to Australia: variation by age at arrival and duration of stay*. American journal of epidemiology, 1992. **135**(10): p. 1103-13.
15. Cooke, K.R. and J. Fraser, *Migration and death from malignant melanoma*. Int J Cancer, 1985. **36**(2): p. 175-8.
16. Davies, H., et al., *Mutations of the BRAF gene in human cancer*, in *Nature*2002: England. p. 949-54.
17. Si, L., et al., *Prevalence of BRAF V600E mutation in Chinese melanoma patients: large scale analysis of BRAF and NRAS mutations in a 432-case cohort*, in *Eur J Cancer*2012, Crown 2011. Published by Elsevier Ltd: England. p. 94-100.
18. Chapman, P.B., et al., *Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation*. N Engl J Med, 2011. **364**(26): p. 2507-16.
19. Hauschild, A., et al., *Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial*. Lancet, 2012. **380**(9839): p. 358-65.
20. Topalian, S.L., et al., *Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab*. J Clin Oncol, 2014. **32**(10): p. 1020-30.
21. Ribas, A., *Efficacy and safety of the anti-PD-1 monoclonal antibody MK-3475 in 411 patients with melanoma*. J Clin Oncol 2014; (suppl; abstr LBA9000).
22. Sznol, M., *Survival, response duration, and activity by BRAF mutation status of nivolumab (NIVO, Anti-PD-1, BMS-936558, ONO-4538) and ipilimumab concurrent therapy in advanced melanoma*. J Clin Oncol; (suppl; abstr LBA9003) 2014.
23. *Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. S3-Leitlinie: "Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms"*.
24. Isaacs, A. and J. Lindenmann, *Virus interference. I. The interferon*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1957. **147**(927): p. 258-67.
25. Siegal, F.P., et al., *The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood*. Science, 1999. **284**(5421): p. 1835-7.
26. Diaz, M.O., S. Bohlander, and G. Allen, *Nomenclature of the human interferon genes*. J Interferon Cytokine Res, 1996. **16**(2): p. 179-80.

27. Hervas-Stubbs, S., et al., *Direct effects of type I interferons on cells of the immune system*, in *Clin Cancer Res* 2011, 2011 Aacr.: United States. p. 2619-27.
28. Colamonici, O., et al., *Direct binding to and tyrosine phosphorylation of the alpha subunit of the type I*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(12): p. 8133-42.
29. Colamonici, O.R., et al., *p135tyk2, an interferon-alpha-activated tyrosine kinase, is physically associated*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(5): p. 3518-22.
30. Yan, H., et al., *Phosphorylated interferon-alpha receptor 1 subunit (IFNAR1) acts as a docking*. *Embo j*, 1996. **15**(5): p. 1064-74.
31. Schindler, C., et al., *Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic*. *Science*, 1992. **257**(5071): p. 809-13.
32. Schindler, U., et al., *Components of a Stat recognition code: evidence for two layers of molecular*. *Immunity*, 1995. **2**(6): p. 689-97.
33. Levy, D.E., et al., *Cytoplasmic activation of ISGF3, the positive regulator of*. *Genes Dev*, 1989. **3**(9): p. 1362-71.
34. Fu, X.Y., et al., *ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon alpha, consists of*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(21): p. 8555-9.
35. Der, S.D., et al., *Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(26): p. 15623-8.
36. Schlaak, J.F., et al., *Cell-type and donor-specific transcriptional responses to interferon-alpha. Use of customized gene arrays*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(51): p. 49428-37.
37. Yang, C.H., et al., *Interferon alpha /beta promotes cell survival by activating nuclear factor kappa*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(17): p. 13756-61.
38. Pfeffer, L.M., et al., *STAT3 as an adapter to couple phosphatidylinositol 3-kinase to the IFNAR1 chain*. *Science*, 1997. **276**(5317): p. 1418-20.
39. David, M., et al., *Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon alpha- and interferon*. *Science*, 1995. **269**(5231): p. 1721-3.
40. Arora, T., et al., *Dissociation between IFN-alpha-induced anti-viral and growth signaling pathways*. *J Immunol*, 1999. **162**(6): p. 3289-97.
41. Ahmad, S., et al., *The type I interferon receptor mediates tyrosine phosphorylation of the CrkL adaptor protein*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(48): p. 29991-4.
42. Fish, E.N., et al., *Activation of a CrkL-stat5 signaling complex by type I interferons*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(2): p. 571-3.

43. Paucker, K., K. Cantell, and W. Henle, *Quantitative studies on viral interference in suspended L cells. III. Effect of*. Virology, 1962. **17**: p. 324-34.
44. Salmon, S.E., et al., *Effects of cloned human leukocyte interferons in the human tumor stem cell assay*. J Clin Oncol, 1983. **1**(3): p. 217-25.
45. Czarniecki, C.W., et al., *Synergistic antiviral and antiproliferative activities of Escherichia coli-derived human alpha, beta, and gamma interferons*. J Virol, 1984. **49**(2): p. 490-6.
46. Garbe, C., et al., *Antitumor activities of interferon alpha, beta, and gamma and their combinations on human melanoma cells in vitro: changes of proliferation, melanin synthesis, and immunophenotype*. J Invest Dermatol, 1990. **95**(6 Suppl): p. 231S-237S.
47. Horikoshi, T., et al., *In vitro comparative study of the antitumor effects of human interferon-alpha, beta and gamma on the growth and invasive potential of human melanoma cells*. J Dermatol, 1995. **22**(9): p. 631-6.
48. Schiller, J.H., et al., *Antiproliferative effects of interferons on human melanoma cells in the human tumor colony-forming assay*. J Interferon Res, 1986. **6**(6): p. 615-25.
49. Krepler, C., et al., *Pegylated and conventional interferon-alpha induce comparable transcriptional responses and inhibition of tumor growth in a human melanoma SCID mouse xenotransplantation model*. J Invest Dermatol, 2004. **123**(4): p. 664-9.
50. Panaretakis, T., et al., *Interferon-alpha-induced apoptosis in U266 cells is associated with activation of*. Oncogene, 2003. **22**(29): p. 4543-56.
51. Thyrell, L., et al., *Interferon alpha-induced apoptosis in tumor cells is mediated through the phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin signaling pathway*. J Biol Chem, 2004. **279**(23): p. 24152-62.
52. Roos, G., T. Leanderson, and E. Lundgren, *Interferon-induced cell cycle changes in human hematopoietic cell lines and fresh*. Cancer Res, 1984. **44**(6): p. 2358-62.
53. Shang, D., et al., *Interferon-alpha induces G1 cell-cycle arrest in renal cell carcinoma cells via activation of Jak-Stat signaling*. Cancer investigation, 2011. **29**(5): p. 347-52.
54. Matsuoka, M., K. Tani, and S. Asano, *Interferon-alpha-induced G1 phase arrest through up-regulated expression of CDK inhibitors, p19Ink4D and p21Cip1 in mouse macrophages*. Oncogene, 1998. **16**(16): p. 2075-86.
55. Sangfelt, O., et al., *Molecular mechanisms underlying interferon-alpha-induced G0/G1 arrest: CKI-mediated regulation of G1 Cdk-complexes and activation of pocket proteins*. Oncogene, 1999. **18**(18): p. 2798-810.



56. Sangfelt, O., et al., *Induction of Cip/Kip and Ink4 cyclin dependent kinase inhibitors by interferon-alpha in hematopoietic cell lines*. *Oncogene*, 1997. **14**(4): p. 415-23.
57. Tiefenbrun, N., et al., *Alpha interferon suppresses the cyclin D3 and cdc25A genes, leading to a reversible G0-like arrest*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(7): p. 3934-44.
58. Maellaro, E., et al., *Different effects of interferon-alpha on melanoma cell lines: a study on telomerase reverse transcriptase, telomerase activity and apoptosis*. *Br J Dermatol*, 2003. **148**(6): p. 1115-24.
59. Chawla-Sarkar, M., D.W. Leaman, and E.C. Borden, *Preferential induction of apoptosis by interferon (IFN)-beta compared with*. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(6): p. 1821-31.
60. Bolling, B., et al., *VEGF production, cell proliferation and apoptosis of human IGR 1 melanoma cells under nIFN-alpha/beta and rIFN-gamma treatment*. *Experimental dermatology*, 2000. **9**(5): p. 327-35.
61. Lesinski, G.B., et al., *IFN-alpha and bortezomib overcome Bcl-2 and Mcl-1 overexpression in melanoma*. *Cancer Res*, 2008. **68**(20): p. 8351-60.
62. Reu, F.J., et al., *Overcoming resistance to interferon-induced apoptosis of renal carcinoma and*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(23): p. 3771-9.
63. Mecchia, M., et al., *Type I consensus interferon (CIFN) gene transfer into human melanoma cells up-regulates p53 and enhances cisplatin-induced apoptosis: implications for new therapeutic strategies with IFN-alpha*. *Gene Ther*, 2000. **7**(2): p. 167-79.
64. Buechner, S.A., et al., *Regression of basal cell carcinoma by intralesional interferon-alpha treatment is mediated by CD95 (Apo-1/Fas)-CD95 ligand-induced suicide*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(11): p. 2691-6.
65. Chen, Q., et al., *Apo2L/TRAIL and Bcl-2-related proteins regulate type I interferon-induced apoptosis in multiple myeloma*. *Blood*, 2001. **98**(7): p. 2183-92.
66. Kayagaki, N., et al., *Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs*. *J Exp Med*, 1999. **189**(9): p. 1451-60.
67. Selleri, C., et al., *Involvement of Fas-mediated apoptosis in the inhibitory effects of interferon-alpha in chronic myelogenous leukemia*. *Blood*, 1997. **89**(3): p. 957-64.

68. Spets, H., et al., *Fas/APO-1 (CD95)-mediated apoptosis is activated by interferon-gamma and interferon- in interleukin-6 (IL-6)-dependent and IL-6-independent multiple myeloma cell lines*. *Blood*, 1998. **92**(8): p. 2914-23.
69. Takaoka, A., et al., *Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour*. *Nature*, 2003. **424**(6948): p. 516-23.
70. Moschos, S.J., et al., *Neoadjuvant treatment of regional stage IIIB melanoma with high-dose interferon alfa-2b induces objective tumor regression in association with modulation of tumor infiltrating host cellular immune responses*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(19): p. 3164-71.
71. Gogas, H., et al., *Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(7): p. 709-18.
72. Picaud, S., et al., *Enhanced tumor development in mice lacking a functional type I interferon receptor*. *J Interferon Cytokine Res*, 2002. **22**(4): p. 457-62.
73. Maio, M., et al., *Modulation by interferons of HLA antigen, high-molecular-weight melanoma associated antigen, and intercellular adhesion molecule 1 expression by cultured melanoma cells with different metastatic potential*. *Cancer Res*, 1989. **49**(11): p. 2980-7.
74. Semino, C., et al., *Heterogeneity of the alpha-interferon-mediated overexpression of class-I and class-II major histocompatibility complex molecules in primary cultured cancer cells*. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, 1993. **7**(3): p. 99-105.
75. von Stamm, U., et al., *Effects of systemic interferon-alpha (IFN-alpha) on the antigenic phenotype of melanoma metastases. EORTC melanoma group cooperative study No. 18852*. *Melanoma research*, 1993. **3**(3): p. 173-80.
76. Guenterberg, K.D., et al., *Enhanced anti-tumor activity of interferon-alpha in SOCS1-deficient mice is mediated by CD4 and CD8 T cells*. *Cancer Immunol Immunother*, 2011. **60**(9): p. 1281-8.
77. Critchley-Thorne, R.J., et al., *Down-regulation of the interferon signaling pathway in T lymphocytes from*. *PLoS Med*, 2007. **4**(5): p. e176.
78. Narumi, K., et al., *In vivo delivery of interferon-alpha gene enhances tumor immunity and suppresses immunotolerance in reconstituted lymphopenic hosts*. *Gene Ther*, 2011.
79. Mozzillo, N. and P. Ascierto, *Reduction of circulating regulatory T cells by intravenous high-dose interferon alfa-2b treatment in melanoma patients*. *Clin Exp Metastasis*, 2012. **29**(7): p. 801-5.
80. Santini, S.M., et al., *Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice*. *J Exp Med*, 2000. **191**(10): p. 1777-88.

81. Baron, S., et al., *Near eradication of clinically relevant concentrations of human tumor cells by*. J Interferon Cytokine Res, 2011. **31**(7): p. 569-73.
82. Nakashima, H., et al., *Potent antitumor effects of combination therapy with IFNs and monocytes in mouse models of established human ovarian and melanoma tumors*. Cancer Immunol Immunother, 2011.
83. Mizutani, T., et al., *Conditional IFNAR1 ablation reveals distinct requirements of Type I IFN signaling*. Oncoimmunology, 2012. **1**(7): p. 1027-1037.
84. Raig, E.T., et al., *VEGF secretion is inhibited by interferon-alpha in several melanoma cell lines*. Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research, 2008. **28**(9): p. 553-61.
85. Roh, M.R., et al., *Difference of interferon-alpha and interferon-beta on melanoma growth and lymph node metastasis in mice*. Melanoma research, 2013. **23**(2): p. 114-24.
86. von Marschall, Z., et al., *Effects of interferon alpha on vascular endothelial growth factor gene transcription and tumor angiogenesis*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(6): p. 437-48.
87. Yurkovetsky, Z.R., et al., *Multiplex analysis of serum cytokines in melanoma patients treated with interferon-alpha2b*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(8): p. 2422-8.
88. Murphy, K.M., *Janeway's Immunobiology*. 8th Edition ed2012, London and New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
89. Pschyrembel, W., *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. 264. ed2012: De Gruyter.
90. Seruga, B., et al., *Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer*, in *Nat Rev Cancer*2008: England. p. 887-99.
91. Virchow, R., *Die krankhaften Geschwülste: 30 Vorlesungen, geh. während d. Wintersemesters 1862 - 1863 an d. Univ. zu Berlin*1865: Hirschwald.
92. Muller, A., et al., *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis*, in *Nature*2001: England. p. 50-6.
93. Huangfu, W.C., et al., *Inflammatory signaling compromises cell responses to interferon alpha*. Oncogene, 2011.
94. *Interleukin-1 and cancer progression: the emerg...* [J Transl Med. 2006] - PubMed - NCBI. 2012.

95. Qin, Y., et al., *Constitutive aberrant endogenous interleukin-1 facilitates inflammation and growth in human melanoma*, in *Mol Cancer Res* 2011, *Mol Cancer Res*; 9(11); 1537-50. 2011 AACR.: United States. p. 1537-50.
96. Lauri, D., et al., *Interleukin-1 increases tumor cell adhesion to endothelial cells through an RGD dependent mechanism: in vitro and in vivo studies*. *Clin Exp Metastasis*, 1990. **8**(1): p. 27-32.
97. Kaji, M., et al., *E-selectin expression induced by pancreas-carcinoma-derived interleukin-1 alpha results in enhanced adhesion of pancreas-carcinoma cells to endothelial cells*. *Int J Cancer*, 1995. **60**(5): p. 712-7.
98. Lafrenie, R.M., et al., *The relative roles of vitronectin receptor, E-selectin and alpha 4 beta 1 in cancer cell adhesion to interleukin-1-treated endothelial cells*. *European journal of cancer*, 1994. **30A**(14): p. 2151-8.
99. Giavazzi, R., et al., *Rolling and adhesion of human tumor cells on vascular endothelium under physiological flow conditions*. *J Clin Invest*, 1993. **92**(6): p. 3038-44.
100. Lafrenie, R.M., et al., *Up-regulated biosynthesis and expression of endothelial cell vitronectin receptor enhances cancer cell adhesion*. *Cancer Res*, 1992. **52**(8): p. 2202-8.
101. Lauri, D., et al., *Tumor cell adhesion to endothelial cells: endothelial leukocyte adhesion molecule-1 as an inducible adhesive receptor specific for colon carcinoma cells*. *J Natl Cancer Inst*, 1991. **83**(18): p. 1321-4.
102. Vidal-Vanaclocha, F., et al., *IL-18 regulates IL-1beta-dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(2): p. 734-9.
103. Tomimatsu, S., T. Ichikura, and H. Mochizuki, *Significant correlation between expression of interleukin-1alpha and liver metastasis in gastric carcinoma*. *Cancer*, 2001. **91**(7): p. 1272-6.
104. Kholmanskikh, O., et al., *Interleukins 1alpha and 1beta secreted by some melanoma cell lines strongly reduce expression of MITF-M and melanocyte differentiation antigens*. *Int J Cancer*, 2010. **127**(7): p. 1625-36.
105. Torisu, H., et al., *Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNFalpha and IL-1alpha*. *Int J Cancer*, 2000. **85**(2): p. 182-8.
106. Song, X., et al., *CD11b+/Gr-1+ immature myeloid cells mediate suppression of T cells in mice bearing tumors of IL-1beta-secreting cells*, in *J Immunol* 2005: United States. p. 8200-8.

107. Khalili, J.S., et al., *Oncogenic BRAF(V600E) Promotes Stromal Cell-Mediated Immunosuppression Via Induction of Interleukin-1 in Melanoma*, in *Clin Cancer Res*2012: United States. p. 5329-40.
108. Lavi, G., et al., *Sustained delivery of IL-1 Ra from biodegradable microspheres reduces the number of murine B16 melanoma lung metastases*, in *J Control Release*2007: Netherlands. p. 123-30.
109. Weinreich, D.M., et al., *Effect of interleukin 1 receptor antagonist gene transduction on human melanoma xenografts in nude mice*. *Cancer Res*, 2003. **63**(18): p. 5957-61.
110. Vidal-Vanaclocha, F., et al., *Interleukin 1 (IL-1)-dependent melanoma hepatic metastasis in vivo; increased endothelial adherence by IL-1-induced mannose receptors and growth factor production in vitro*. *J Natl Cancer Inst*, 1996. **88**(3-4): p. 198-205.
111. von Felbert, V., et al., *Interleukin-6 gene ablation in a transgenic mouse model of malignant skin melanoma*. *Am J Pathol*, 2005. **166**(3): p. 831-41.
112. Zhao, F., et al., *Activation of p38 mitogen-activated protein kinase drives dendritic cells to become tolerogenic in ret transgenic mice spontaneously developing melanoma*, in *Clin Cancer Res*2009: United States. p. 4382-90.
113. Soubrane, C., et al., *Pretreatment serum interleukin-6 concentration as a prognostic factor of overall survival in metastatic malignant melanoma patients treated with biochemotherapy: a retrospective study*. *Melanoma Res*, 2005. **15**(3): p. 199-204.
114. Mouawad, R., et al., *Serum interleukin-6 concentrations as predictive factor of time to progression in metastatic malignant melanoma patients treated by biochemotherapy: a retrospective study*. *Cytokines Cell Mol Ther*, 2002. **7**(4): p. 151-6.
115. Tartour, E., et al., *Serum interleukin 6 and C-reactive protein levels correlate with resistance to IL-2 therapy and poor survival in melanoma patients*. *Br J Cancer*, 1994. **69**(5): p. 911-3.
116. Kennedy, M.K., et al., *Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice*. *J Exp Med*, 2000. **191**(5): p. 771-80.
117. Dubois, S., et al., *Preassociation of IL-15 with IL-15R alpha-IgG1-Fc enhances its activity on proliferation of NK and CD8+/CD44high T cells and its antitumor action*. *Journal of immunology*, 2008. **180**(4): p. 2099-106.
118. Zhang, X., et al., *Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15*. *Immunity*, 1998. **8**(5): p. 591-9.

119. Gamero, A.M., et al., *Interleukin 15 induction of lymphokine-activated killer cell function against autologous tumor cells in melanoma patient lymphocytes by a CD18-dependent, perforin-related mechanism*. *Cancer Res*, 1995. **55**(21): p. 4988-94.
120. Yajima, T., et al., *Overexpression of interleukin-15 in vivo enhances antitumor activity against MHC class I-negative and -positive malignant melanoma through augmented NK activity and cytotoxic T-cell response*. *Int J Cancer*, 2002. **99**(4): p. 573-8.
121. Davies, E., et al., *IL-15 has innate anti-tumor activity independent of NK and CD8 T cells*, in *J Leukoc Biol*2010: United States. p. 529-36.
122. Boudreau, J.E., et al., *IL-15 and type I interferon are required for activation of tumoricidal NK cells by virus-infected dendritic cells*, in *Cancer Res*2011: United States. p. 2497-506.
123. Mattei, F., et al., *IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation*. *J Immunol*, 2001. **167**(3): p. 1179-87.
124. Martinez-Escribano, J.A., et al., [*Prospective study of the levels of serum cytokines in patients with melanoma: prognostic value*]. *Actas Dermosifilogr*, 2005. **96**(2): p. 83-91.
125. Numasaki, M., et al., *Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth*. *Blood*, 2003. **101**(7): p. 2620-7.
126. He, D., et al., *IL-17 mediated inflammation promotes tumor growth and progression in the skin*. *PLoS One*, 2012. **7**(2): p. e32126.
127. Wang, L., et al., *IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway*. *J Exp Med*, 2009. **206**(7): p. 1457-64.
128. He, D., et al., *IL-17 promotes tumor development through the induction of tumor promoting microenvironments at tumor sites and myeloid-derived suppressor cells*. *Journal of immunology*, 2010. **184**(5): p. 2281-8.
129. Kryczek, I., et al., *Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment*. *Journal of immunology*, 2007. **178**(11): p. 6730-3.
130. Martin-Orozco, N., et al., *T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity*. *Immunity*, 2009. **31**(5): p. 787-98.
131. Green, S., A. Dobrjansky, and M.A. Chiasson, *Murine tumor necrosis-inducing factor: purification and effects on myelomonocytic leukemia cells*. *J Natl Cancer Inst*, 1982. **68**(6): p. 997-1003.

132. Matthews, N. and J.F. Watkins, *Tumour-necrosis factor from the rabbit. I. Mode of action, specificity and physicochemical properties*. Br J Cancer, 1978. **38**(2): p. 302-9.
133. Pikarsky, E., et al., *NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer*. Nature, 2004. **431**(7007): p. 461-6.
134. Greten, F.R., et al., *IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer*. Cell, 2004. **118**(3): p. 285-96.
135. Menon, C., et al., *TNF-alpha downregulates vascular endothelial Flk-1 expression in human melanoma xenograft model*, in *Am J Physiol Heart Circ Physiol*2003: United States. p. H317-29.
136. Katerinaki, E., et al., *TNF-alpha increases human melanoma cell invasion and migration in vitro: the role of proteolytic enzymes*, in *Br J Cancer*2003: England. p. 1123-9.
137. Zhu, N., et al., *Melanoma cell attachment, invasion, and integrin expression is upregulated by tumor necrosis factor alpha and suppressed by alpha melanocyte stimulating hormone*, in *J Invest Dermatol*2002: United States. p. 1165-71.
138. Landsberg, J., et al., *Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation*, in *Nature*2012: England. p. 412-6.
139. Hofmann, M.A., et al., *Serum TNF-alpha, B2M and sIL-2R levels are biological correlates of outcome in adjuvant IFN-alpha2b treatment of patients with melanoma*. J Cancer Res Clin Oncol, 2011. **137**(3): p. 455-62.
140. Valencia, X., et al., *TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells*. Blood, 2006. **108**(1): p. 253-61.
141. Taub, D.D., et al., *Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells*. J Exp Med, 1993. **177**(6): p. 1809-14.
142. Angiolillo, A.L., et al., *Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo*. J Exp Med, 1995. **182**(1): p. 155-62.
143. Luster, A.D. and P. Leder, *IP-10, a -C-X-C- chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo*. J Exp Med, 1993. **178**(3): p. 1057-65.
144. Feldman, A.L., et al., *Retroviral gene transfer of interferon-inducible protein 10 inhibits growth of human melanoma xenografts*. Int J Cancer, 2002. **99**(1): p. 149-53.
145. Antonicelli, F., et al., *CXCL10 reduces melanoma proliferation and invasiveness in vitro and in vivo*. Br J Dermatol, 2011. **164**(4): p. 720-8.

146. Mohty, A.M., et al., *Induction of IP-10/CXCL10 secretion as an immunomodulatory effect of low-dose adjuvant interferon-alpha during treatment of melanoma*. Immunobiology, 2010. **215**(2): p. 113-23.
147. Graves, D.T., et al., *Expression of monocyte chemotactic protein-1 in human melanoma in vivo*. Am J Pathol, 1992. **140**(1): p. 9-14.
148. Qian, B.Z., et al., *CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis*, in Nature 2011, 2011 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved: England. p. 222-5.
149. Nesbit, M., et al., *Low-level monocyte chemoattractant protein-1 stimulation of monocytes leads to tumor formation in nontumorigenic melanoma cells*. J Immunol, 2001. **166**(11): p. 6483-90.
150. Gazzaniga, S., et al., *Targeting tumor-associated macrophages and inhibition of MCP-1 reduce angiogenesis and tumor growth in a human melanoma xenograft*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(8): p. 2031-41.
151. Loetscher, P., et al., *Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 1994. **8**(13): p. 1055-60.
152. Taub, D.D., et al., *Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes*. J Clin Invest, 1995. **95**(3): p. 1370-6.
153. Allavena, P., et al., *Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3*. European journal of immunology, 1994. **24**(12): p. 3233-6.
154. Dahinden, C.A., et al., *Monocyte chemotactic protein 3 is a most effective basophil- and eosinophil-activating chemokine*. J Exp Med, 1994. **179**(2): p. 751-6.
155. Tsou, C.L., et al., *Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites*. J Clin Invest, 2007. **117**(4): p. 902-9.
156. Uguccioni, M., et al., *Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta on human monocytes*. European journal of immunology, 1995. **25**(1): p. 64-8.
157. Wetzel, K., et al., *MCP-3 (CCL7) delivered by parvovirus MVMP reduces tumorigenicity of mouse melanoma cells through activation of T lymphocytes and NK cells*. Int J Cancer, 2007. **120**(6): p. 1364-71.
158. Ly, L.V., et al., *Inflammatory cytokines in eyes with uveal melanoma and relation with macrophage infiltration*. Investigative ophthalmology & visual science, 2010. **51**(11): p. 5445-51.



159. Gough, M., et al., *Gene therapy to manipulate effector T cell trafficking to tumors for immunotherapy*. Journal of immunology, 2005. **174**(9): p. 5766-73.
160. Antonio Pezzutto, T.U., Gerd-Rüdiger Burmester, *Taschenatlas der Immunologie*. 2., vollständig überarbeitete und aktualisierte Auflage ed2006, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
161. van Deventer, H.W., et al., *Transfection of macrophage inflammatory protein 1 alpha into B16 F10 melanoma cells inhibits growth of pulmonary metastases but not subcutaneous tumors*. Journal of immunology, 2002. **169**(3): p. 1634-9.
162. Nakasone, Y., et al., *Host-Derived MCP-1 and MIP-1alpha Regulate Protective Anti-Tumor Immunity to Localized and Metastatic B16 Melanoma*. Am J Pathol, 2012. **180**(1): p. 365-74.
163. Schlecker, E., et al., *Tumor-infiltrating monocytic myeloid-derived suppressor cells mediate CCR5-dependent recruitment of regulatory T cells favoring tumor growth*. Journal of immunology, 2012. **189**(12): p. 5602-11.
164. Power, C.A., et al., *Cloning and characterization of a specific receptor for the novel CC chemokine MIP-3alpha from lung dendritic cells*. J Exp Med, 1997. **186**(6): p. 825-35.
165. Hieshima, K., et al., *Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2*. J Biol Chem, 1997. **272**(9): p. 5846-53.
166. Hromas, R., et al., *Cloning and characterization of exodus, a novel beta-chemokine*. Blood, 1997. **89**(9): p. 3315-22.
167. Fushimi, T., et al., *Macrophage inflammatory protein 3alpha transgene attracts dendritic cells to established murine tumors and suppresses tumor growth*. J Clin Invest, 2000. **105**(10): p. 1383-93.
168. Charles, J., et al., *Characterization of circulating dendritic cells in melanoma: role of CCR6 in plasmacytoid dendritic cell recruitment to the tumor*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(6): p. 1646-56.
169. Iwata, T., et al., *Macrophage inflammatory protein-3 alpha (MIP-3a) is a novel serum prognostic marker in patients with colorectal cancer*. J Surg Oncol, 2013. **107**(2): p. 160-6.
170. Garbe, C., et al., *Adjuvant low-dose interferon {alpha}2a with or without dacarbazine compared with surgery alone: a prospective-randomized phase III DeCOG trial in melanoma patients with regional lymph node metastasis*, in Ann Oncol2008: England. p. 1195-201.

171. Kirkwood, J.M., et al., *Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684*. J Clin Oncol, 1996. **14**(1): p. 7-17.
172. Eggermont, A.M., et al., *Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma: final results of EORTC 18991, a randomised phase III trial*, in *Lancet*2008: England. p. 117-26.
173. Grob, J.J., et al., *Randomised trial of interferon alpha-2a as adjuvant therapy in resected primary melanoma thicker than 1.5 mm without clinically detectable node metastases. French Cooperative Group on Melanoma*, in *Lancet*1998: England. p. 1905-10.
174. Hansson, J., et al., *Two different durations of adjuvant therapy with intermediate-dose interferon alfa-2b in patients with high-risk melanoma (Nordic IFN trial): a randomised phase 3 trial*, in *Lancet Oncol*2011, 2011 Elsevier Ltd: England. p. 144-52.
175. Pehamberger, H., et al., *Adjuvant interferon alfa-2a treatment in resected primary stage II cutaneous melanoma. Austrian Malignant Melanoma Cooperative Group*. J Clin Oncol, 1998. **16**(4): p. 1425-9.
176. Stadler, R., et al., *Long-term survival benefit after adjuvant treatment of cutaneous melanoma with dacarbazine and low dose natural interferon alpha: A controlled, randomised multicentre trial*. Acta Oncol, 2006. **45**(4): p. 389-99.
177. Herlyn, D., et al., *Experimental model of human melanoma metastases*. Cancer treatment and research, 1991. **54**: p. 105-18.
178. Herlyn, D., et al., *In vitro properties of human melanoma cells metastatic in nude mice*. Cancer Res, 1990. **50**(8): p. 2296-302.
179. Herlyn, M., et al., *Characteristics of cultured human melanocytes isolated from different stages of tumor progression*. Cancer Res, 1985. **45**(11 Pt 2): p. 5670-6.
180. Rodeck, U., et al., *Metastatic but not primary melanoma cell lines grow in vitro independently of exogenous growth factors*. Int J Cancer, 1987. **40**(5): p. 687-90.
181. Giard, D.J., et al., *In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors*. J Natl Cancer Inst, 1973. **51**(5): p. 1417-23.
182. Van Muijen, G.N., et al., *Antigen expression of metastasizing and non-metastasizing human melanoma cells xenografted into nude mice*. Clin Exp Metastasis, 1991. **9**(3): p. 259-72.
183. Carey, T.E., et al., *Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(9): p. 3278-82.

184. Wright, W.C., W.P. Daniels, and J. Fogh, *Distinction of seventy-one cultured human tumor cell lines by polymorphic enzyme analysis*. J Natl Cancer Inst, 1981. **66**(2): p. 239-47.
185. van Muijen, G.N., et al., *Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice*. Int J Cancer, 1991. **48**(1): p. 85-91.
186. Xing, F., et al., *Concurrent loss of the PTEN and RB1 tumor suppressors attenuates RAF dependence in melanomas harboring (V600E)BRAF*. Oncogene, 2012. **31**(4): p. 446-57.
187. Boyum, A., *Separation of White Blood Cells*. Nature, 1964. **204**: p. 793-4.
188. Zouboulis, C.C., et al., *A fluorometric rapid microassay to identify anti-proliferative compounds for human melanoma cells in vitro*. Melanoma Res, 1991. **1**(2): p. 91-5.
189. Dotsika, E.N. and C.J. Sanderson, *A fluorometric assay for determining cell growth in lymphocyte proliferation and lymphokine assays*. Journal of immunological methods, 1987. **105**(1): p. 55-62.
190. Lavoie, T.B., et al., *Binding and activity of all human alpha interferon subtypes*. Cytokine, 2011. **56**(2): p. 282-9.
191. Jaks, E., et al., *Differential receptor subunit affinities of type I interferons govern differential signal activation*. J Mol Biol, 2007. **366**(2): p. 525-39.
192. Thomas, C., et al., *Structural linkage between ligand discrimination and receptor activation by type I interferons*. Cell, 2011. **146**(4): p. 621-32.
193. Karlberg, H., G. Lindegren, and A. Mirazimi, *Comparison of antiviral activity of recombinant and natural interferons against crimean-congo hemorrhagic Fever virus*. Open Virol J, 2010. **4**: p. 38-41.
194. Ghislain, J., et al., *Configuration of the interferon-alpha/beta receptor complex determines the context of the biological response*. J Biol Chem, 1995. **270**(37): p. 21785-92.
195. Ruuth, K., et al., *Differential resistance of melanoma cells to treatment with recombinant IFN-alpha2b and leukocyte IFN*. Anticancer Res, 2007. **27**(4B): p. 2109-14.
196. Krasagakis, K., et al., *Effects of interferons on cultured human melanocytes in vitro: interferon-beta but not-alpha or -gamma inhibit proliferation and all interferons significantly modulate the cell phenotype*. J Invest Dermatol, 1991. **97**(2): p. 364-72.
197. Zouboulis, C., C. Garbe, and C.E. Orfanos, *[Growth inhibition of melanoma cells by interferons in vitro. Similar antiproliferative effects of 100-1000 times*

- lower concentrations of nIFN-beta in comparison with rIFN-alpha-2a]. Hautarzt, 1989. 40(2): p. 65-9.*
198. Blaya, B., et al., *Antitumoral Activity of Multiferon® (HuIFN-alpha-Le) in Experimental Murine Melanoma Model*. Journal of Clinical & Experimental Dermatology Research, 2013. **03**(05).
  199. Wong, L.H., et al., *Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF3 components, STAT1, STAT2, and p48-ISGF3gamma*. J Biol Chem, 1997. **272**(45): p. 28779-85.
  200. Pansky, A., et al., *Defective Jak-STAT signal transduction pathway in melanoma cells resistant to growth inhibition by interferon-alpha*, in *Int J Cancer* 2000, 2000 Wiley-Liss, Inc.: United States. p. 720-5.
  201. Song, M.M. and K. Shuai, *The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities*. J Biol Chem, 1998. **273**(52): p. 35056-62.
  202. Parrillas, V., et al., *Suppressor of cytokine signaling 1 blocks mitosis in human melanoma cells*. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 2013. **70**(3): p. 545-58.
  203. Lesinski, G.B., et al., *Modulation of SOCS protein expression influences the interferon responsiveness of human melanoma cells*. BMC cancer, 2010. **10**: p. 142.
  204. Piganis, R.A., et al., *Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 inhibits type I interferon (IFN) signaling via the interferon alpha receptor (IFNAR1)-associated tyrosine kinase Tyk2*. J Biol Chem, 2011. **286**(39): p. 33811-8.
  205. Moraga, I., et al., *Receptor density is key to the alpha2/beta interferon differential activities*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(17): p. 4778-87.
  206. Levin, D., D. Harari, and G. Schreiber, *Stochastic receptor expression determines cell fate upon interferon treatment*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(16): p. 3252-66.
  207. Wellbrock, C., et al., *STAT5 contributes to interferon resistance of melanoma cells*. Current biology : CB, 2005. **15**(18): p. 1629-39.
  208. Craven, R.A., et al., *Identification of proteins regulated by interferon-alpha in resistant and sensitive malignant melanoma cell lines*. Proteomics, 2004. **4**(12): p. 3998-4009.
  209. Kalie, E., et al., *An interferon alpha2 mutant optimized by phage display for IFNAR1 binding confers specifically enhanced antitumor activities*. J Biol Chem, 2007. **282**(15): p. 11602-11.

210. Jaitin, D.A., et al., *Inquiring into the differential action of interferons (IFNs): an IFN-alpha2 mutant with enhanced affinity to IFNAR1 is functionally similar to IFN-beta*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(5): p. 1888-97.
211. Affymetrix, I., *User Manual specifically for Cell Culture Supernatant Samples*. 2009.
212. Butterfield, L.H., D.M. Potter, and J.M. Kirkwood, *Multiplex serum biomarker assessments: technical and biostatistical issues*, in *J Transl Med* 2011: England. p. 173.
213. Nechansky, A., et al., *Comparison of the Calibration Standards of Three Commercially Available Multiplex Kits for Human Cytokine Measurement to WHO Standards Reveals Striking Differences*. Biomarker insights, 2008. **3**: p. 227-235.
214. Wilson, H.M. and R.N. Barker, *Cytokines*, in *eLS2001*, John Wiley & Sons, Ltd.
215. Aziz, N., et al., *Variables that affect assays for plasma cytokines and soluble activation markers*. Clin Diagn Lab Immunol, 1999. **6**(1): p. 89-95.
216. Friberg, D., et al., *In vitro cytokine production by normal human peripheral blood mononuclear cells*. Clin Diagn Lab Immunol, 1994. **1**(3): p. 261-8.
217. Zimmerer, J.M., et al., *IFN-alpha-2b-induced signal transduction and gene regulation in patient peripheral blood mononuclear cells is not enhanced by a dose increase from 5 to 10 megaunits/m2*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(5): p. 1438-45.
218. Alderson, M.R., et al., *Interleukin 7 induces cytokine secretion and tumoricidal activity by human peripheral blood monocytes*. J Exp Med, 1991. **173**(4): p. 923-30.
219. Foster, G.R., et al., *IFN-alpha subtypes differentially affect human T cell motility*. J Immunol, 2004. **173**(3): p. 1663-70.
220. Hilkens, C.M., J.F. Schlaak, and I.M. Kerr, *Differential responses to IFN-alpha subtypes in human T cells and dendritic cells*. Journal of immunology, 2003. **171**(10): p. 5255-63.
221. Hillyer, P., et al., *Subtypes of type I IFN differentially enhance cytokine expression by suboptimally stimulated CD4(+) T cells*. European journal of immunology, 2013. **43**(12): p. 3197-208.
222. Brender, C., et al., *Interferon-alpha induces transient suppressors of cytokine signalling expression in human T cells*. Experimental and clinical immunogenetics, 2001. **18**(2): p. 80-5.

223. Zimmerer, J.M., et al., *IFN-alpha-induced signal transduction, gene expression, and antitumor activity of immune effector cells are negatively regulated by suppressor of cytokine signaling proteins*. J Immunol, 2007. **178**(8): p. 4832-45.
224. Lowenthal, J.W., et al., *Similarities between interleukin-2 receptor number and affinity on activated B and T lymphocytes*. Nature, 1985. **315**(6021): p. 669-72.
225. Malkovsky, M., et al., *Recombinant interleukin-2 directly augments the cytotoxicity of human monocytes*. Nature, 1987. **325**(6101): p. 262-5.
226. Carrega, P., et al., *Susceptibility of human melanoma cells to autologous natural killer (NK) cell killing: HLA-related effector mechanisms and role of unlicensed NK cells*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8132.
227. Chazen, G.D., et al., *Interleukin 7 is a T-cell growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(15): p. 5923-7.
228. Namen, A.E., et al., *Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7*. Nature, 1988. **333**(6173): p. 571-3.
229. Armitage, R.J., et al., *Regulation of human T cell proliferation by IL-7*. Journal of immunology, 1990. **144**(3): p. 938-41.
230. Bohm, M., et al., *Lysis of allogeneic and autologous melanoma cells by IL-7-induced lymphokine-activated killer cells*. Br J Cancer, 1994. **70**(1): p. 54-9.
231. Balsamo, M., et al., *Melanoma cells become resistant to NK-cell-mediated killing when exposed to NK-cell numbers compatible with NK-cell infiltration in the tumor*. European journal of immunology, 2012. **42**(7): p. 1833-42.
232. Terawaki, S., et al., *IFN-alpha directly promotes programmed cell death-1 transcription and limits the duration of T cell-mediated immunity*. Journal of immunology, 2011. **186**(5): p. 2772-9.

## **7. Anhang**

### **7.1 Eigenständigkeitserklärung**

#### **Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift**

Die Arbeit wurde im Institut für Dermatologie der Universität Tübingen in der Abteilung Dermatologische Onkologie unter Betreuung von Prof. Dr. med. Benjamin Weide durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Benjamin Weide (Doktorvater), Prof. Dr. med. Friedegund Meier und Dr. rer. nat. Heike Niessner.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. rer. nat. Heike Niessner von mir eigenständig durchgeführt.

Die dargestellten Analysen auf statistische Signifikanz der Ergebnisse wurden von Herrn Dipl.-Stat. Frederic Klein auf Honorarbasis durchgeführt. Alle übrigen statistischen Auswertungen erfolgten eigenständig.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Dorsten, den

## 7.2 Tabellen

**Tab. 1.** Profil der antitumoralen Wirksamkeit von IFN-alpha bei soliden und hämatologischen Malignomen [11].

Tumor	Response-Rate (partielle und komplette Remissionen) [%]
Karzinoid	5-15
Kaposi-Sarkom	35
<b>Malignes Melanom</b>	<b>10-15</b>
Nierenzellkarzinom	10-15
Kolorektale Karzinome	<10
Mammakarzinom	<10
Bronchialkarzinome	<10
Osteosarkome	<10
Chronisch myeloische Leukämie Neudiagnose in fortgeschrittenen Stadien	70-80 10-30
Essenzielle Thrombozythämie und Polycythaemia vera	75
Haarzelleukämie	80-90
Follikuläre Non-Hodgkin-Lymphomea	40-50
Kutane T-Zell-Lymphomea Neudiagnose nach Vortherapie	80 50
Multiples Myeloma Neudiagnose nach Vortherapie	50 15-30



### **7.3 Danksagung**

**Herrn Prof. Dr. Claus Garbe** danke ich für die Möglichkeit die Dissertation in seiner Abteilung anfertigen zu dürfen.

**Herrn Prof. Dr.med. Benjamin Weide** danke ich herzlich für die Ratschläge zur praktischen Durchführung der Experimente und für die weitere Betreuung und Korrektur meiner Dissertation.

**Frau Prof. Dr. Friedegund Meier** möchte ich herzlich für die Überlassung des Themas und die initiale Betreuung und Korrektur meiner Dissertation danken.

**Frau Prof. Dr. Birgitt Schittek** möchte ich für die überaus freundliche Aufnahme und Integration in ihre Arbeitsgruppe danken.

**Frau Dr. rer. nat. Heike Niessner** möchte ich besonders herzlich danken und ein sehr großes Lob aussprechen! Sie war mir von Anbeginn meiner Zeit im Labor bis zum Abschluss der Dissertationsschrift fortwährend eine außerordentliche Unterstützung bei all meinen Bemühungen und eine Mentorin, die sich jeder Doktorand wünsche würde.

**Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern** des Labors für Dermatologische Onkologie gilt mein Dank für eine unvergessliche, von Freundschaft und Hilfsbereitschaft geprägte Arbeitsatmosphäre.

