Die Aktivierung des Immunrezeptors RIG-I beeinflusst die T-Zellsensitivität von Melanomzellen: Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Lina Spaan
aus Essen

Dezember 2014

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Klinik für Dermatologie in der Arbeitsgruppe „Molekulare Tumorimmunologie“ durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Ehrmann

2. Gutachter: PD Dr. Annette Paschen

3. Gutachter: Prof. Dr. Carsten Kirschning

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Elke Cario

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.2015

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT DUISBURG ESSEN

Offen im Denken

ub universitäts bibliothek

Diese Dissertation wird über DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/37770
URN: urn:nbn:de:hbz:464-20200616-104155-6

Alle Rechte vorbehalten.

Tagungsbeiträge

In der Online-Version nicht enthalten.

1 Inhaltsverzeichnis

2 Abkürzungsverzeichnis ... 7
3 Abbildungsverzeichnis ... 13
4 Einleitung ... 14
4.1 Das maligne Melanom ... 14
4.1.1 Entstehung des maligen Melanoms ... 14
4.1.2 Molekulare Veränderungen im malignen Melanom ... 15
4.1.3 Therapie des malignen Melanoms ... 16
4.1.4 Rolle zytotoxischer Lymphozyten in der Immunabwehr von Melanomen ... 19
4.2 HLA Klasse I-restringierte Antigene ... 20
4.3 Immuzell-Rekrutierung durch Chemokine ... 23
4.4 Typ I Interferone und Typ I Interferon-vermittelte Signalgebung ... 24
4.5 RIG-I-ähnliche Rezeptoren ... 26
4.5.1 Signalweiterleitung durch RIG-I-ähnliche Rezeptoren ... 27
4.6 Ziel der Arbeit ... 29
5 Material ... 30
5.1 Chemikalien und Reagenzien ... 30
5.1.1 Allgemein ... 30
5.1.2 RT-PCR/qRT-PCR ... 30
5.1.3 Durchflusszytometrie ... 31
5.1.4 Western Blot ... 31
5.1.5 Immunpräzipitation ... 32
5.1.6 Silberfärbung ... 32
5.1.7 Agarosegelelektrophorese ... 32
5.2 Fertige Lösungen und Reaktionssysteme ... 33
5.3 Inhibitoren ... 33
5.4 Kulturmedien, Puffer und sonstige Lösungen ... 33
5.4.1 Kulturmedien für Bakterien und Antibiotika ... 33
5.4.2 Zellkulturzusätze und Kultur- und Einfriermedien für eukaryotische Zellen ... 34
5.4.3 Puffer und sonstige Lösungen ... 34
5.4.3.1 Durchflusszytometrie ... 34
5.4.3.2 Western Blot ... 35
5.4.3.3 Immunopräzipitation ... 36
5.4.3.4 Silberfärbung ... 36
5.4.3.5 Agarosegelelektrophorese ... 37
5.4.3.6 ELISPOT und ELISA ... 37
5.5 Zelllinien ... 37
5.6 Bakterien ... 38
5.7 RNA Mimetika und siRNAs ... 38
5.8 Antikörper ... 39
5.8.1 Primäre Antikörper für Western Blot ... 39
5.8.2 Primäre Antikörper für Durchflusszytometrie und magnetische Zellsortierung 39
5.8.3 Sekundäre Antikörper ... 40
5.8.4 Antikörper für ELISA und ELISPOT ... 40
5.9 Apoptosemessungen ... 40
5.10 Zytokine ... 40
5.11 Plasmide ... 41
5.12 Geräte ... 41
5.13 Verbrauchsmaterialien ... 42
6 Methoden ... 43

6.1 Molekularbiologische Methoden ... 43
6.1.1 Isolierung von RNA ... 43
6.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren ... 43
6.1.3 cDNA Synthese ... 43
6.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ... 44
6.1.5 Quantitative PCR (qRT-PCR) ... 44
6.1.6 Agarosegelelektrophorese ... 46
6.1.7 Transformation von Plasmid-DNA und Anzucht von Bakterien ... 46
6.2 Zellbiologische Methoden ... 46
6.2.1 Zellkultur ... 46
6.2.1.1 Kultivierung von Zelllinien ... 47
6.2.1.2 Restimulierung von $CD8^+$ T-Lymphozyten ... 47
6.2.1.3 Auftauen und Kryokonservierung von Zelllinien ... 47
6.2.2 Bestimmung der Zellzahl ... 48
6.2.3 Transiente Transfektion von Zelllinien ... 48
6.2.3.1 siRNA Transfektion ... 48
6.2.3.2 3pRNA Transfektion ... 48
6.2.3.3 DNA Transfektion ... 49
6.2.4 IFN Behandlung ... 49
6.2.5 Proliferations-Assay ... 49
6.2.6 xCELLigence basierter Zytotoxizitäts-Assay ... 50
6.3 Proteinbiochemische Methoden ... 50
6.3.1 Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Reagenz ... 50
6.3.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ... 50
6.3.3 Western Blot ... 51
6.3.4 Immunopräzipitation ... 52
6.3.5 Silberfärbung ... 52
6.4 Immunologische Methoden ... 53
6.4.1 Durchflusszytometrie ... 53
6.4.1.1 Analyse von Oberflächenmolekülen ... 53
6.4.1.2 Apoptose-Messungen ... 54
6.4.2 Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen ... 54
6.4.3 Isolierung polyklonaler NK-Zellen aus PBMC ... 54
6.4.4 CD107a Degranulationsassay ... 55
6.4.5 Nachweis von Zytokinen in Zellkultur-Überständen ... 56
6.4.5.1 IFN-γ Enzyme Linked Immuno Spot Technique (IFN-γ ELISPOT) ... 56
6.4.5.2 IFN-γ Enzyme Linked Immunosorbent Assay (IFN-γ ELISA) ... 56
6.4.5.3 CCL5/CXCL10 ELISA ... 57
6.4.6 Proteasominhibiton ... 57
6.4.7 Statistische Auswertung ... 58
7 Ergebnisse ... 59
7.1 3pRNA induziert Apoptose in einer Subpopulation von Melanomzellen ... 59
7.2 3pRNA Transfektion führt nicht zur erhöhten NK-Zell-Sensitivität von Melanomzellen ... 60
7.3 3pRNA Transfektion von Melanomzellen verbessert die Erkennung durch autologe $CD8^+$ T-Zellen ... 63
7.4 RIG-I Aktivierung induziert die Expression von Typ I Interferonen ... 65
7.5 RIG-I Aktivierung erhöht die Immunogenität von Melanomzellen unabhängig von der Typ I IFN Signalgebung ... 66
7.6 RIG-I Aktivierung induziert die STAT1 Expression unabhängig von einer funktionellen Typ I IFN Signalgebung ... 69

7.7 Die STAT1 Expression ist nicht essentiell für eine 3pRNA-vermittelte Induktion der Immunogenität ... 70
7.8 3pRNA induziert die APM Expression auch in anderen Tumorentitäten unabhängig von der Typ I IFN Signalgebung ... 74
7.9 3pRNA induziert die Expression von IRF-1 und NLRC5 unabhängig von der Typ I IFN Signalgebung ... 76
7.10 3pRNA induziert die Expression verschiedener T-Zell-rekrutierender Chemokine . 77
7.11 Die Freisetzung von Chemokinen durch 3pRNA-transfizierte Melanomzellen erfolgt unabhängig von einer funktionellen Typ I IFN Signalgebung ... 78
8 Diskussion ... 81
8.1 „Immune-Escape“ durch eine verringerte HLA Klasse I Expression ... 81
8.2 Melanomzellen weisen Defekte im Typ I IFN Signalweg auf ... 82
8.3 RIG-I Aktivierung führt zu einer erhöhten Tumorimmunogenität unabhängig von der Typ I IFN Signalgebung ... 82
8.4 Die Rolle von STAT1 in der 3pRNA-vermittelten Immunogenität von Tumorzellen ... 84
8.5 UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen weisen eine schwache Induktion der IFN-β Expression nach 3pRNA Transfektion auf ... 86
8.6 Die Rolle von IRF-1 in der 3pRNA-vermittelten Immunogenität von Tumorzellen 87
8.7 Die Rolle von NLRC5 in der 3pRNA-vermittelten Immunogenität von Tumorzellen ... 89
8.8 Mechanismen der 3pRNA-vermittelten Immunogenität von Melanomzellen ... 90
8.9 3pRNA induziert Apoptose in einer Subpopulation von Melanomzellen ... 92
8.10 3pRNA-vermittelte Immunzellinfiltration ... 93
8.11 3pRNA-vermittelte Typ I IFN Expression und Melanomtherapie ... 95
9 Zusammenfassungen ... 97
9.1 Deutsche Zusammenfassung ... 97
9.2 English Summary ... 99
10 Literaturverzeichnis ... 101
11 Anhang ... 117
11.1 IFN-γ Behandlung induziert die Expression von HLA Klasse I und ICAM-1 Molekülen auf der Melanomzelllinie Ma-Mel-61b ... 117
11.2 UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen weisen *STAT1* mRNA auf ... 117
11.3 UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen sind mit dem PIV5 infiziert ... 118
11.4 UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen zeigen eine gesteigerte basale HLA Klasse I Expression ... 119
Danksagung ... 120
Lebenslauf ... 120
Erklärungen ... 121

2 Abkürzungsverzeichnis

Δ	Delta
°C	Grad Celsius
µ	Mikro
Ab	*Antibody*, Antikörper
Abb.	Abbildung
ABC	*ATP-binding-cassette*
ACT	Adoptiver T-Zell-Transfer
AK	Antikörper
APAF-1	*Apoptotic protease activating factor-1*
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APM	Antigen-Prozessierungs-und-Präsentationsmaschinerie
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäuren
ASC	*Apoptosis-associated speck-like proteincontaining CARD*
ATF-3	*Activating transcription factor 3*
ATP	Adenosintriphosphat
β2m/B2M	β2-Mikroglobulin
BiP	*Binding immunoglobulin protein*
Bcl-10	*B-cell lymphoma/leukemia 10*
BSA	Bovines Serum Albumin
CARD	*Caspase activation and recruitment domain*
CASPASE	C*ysteinyl-aspartate specific protease*
CCL	*C-C motif ligand*
CDK4	*Cyclin-dependent kinase 4*
cDNA	*Complementary DNA*, komplementäre DNA
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
COP	*Coat protein complex*
C_t	*threshold cycle*
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CTL	*Cytotoxic T cell*, Zytotoxische T-Zelle
CTLA-4	C*ytotoxic T lymphocyte antigen 4*
ctrl. RNA	Kontroll-RNA

DC	*Dendritic cell*, Dendritische Zelle
DDB1	*DNA damage-binding protein 1*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAM-1	*DNAX accessory molecule-1*
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsRNA	Doppelsträngige RNA
E. coli	*Escherichia coli*
ECL	*Enhanced Chemiluminescence*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
ELISPOT	*Enzyme Linked Immuno Spot Technique*
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAP	*ER aminopeptidase associated with antigen processing*
ERK	*Extracellular-signal regulated kinase*
ERp57	Endoplasmatisches Retikulum Protein 57
esRNA	Einzelsträngige RNA
FACS	*Fluorescence activated cell sorting*
FAM	6-Carboxyfluorescein
Fas	*FS7-associated cell surface antigen*
FasL	Fas Ligand
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HEK	*Human embryonic kidney*, menschliche embryonale Nierenzellen
HLA	*Human leukocyte antigen*
HMGB1	*High-mobility group protein B1*
HRP	*Horseradish Peroxidase*, Meerettichperoxidase
H_2O	Wasser
ICAM-1	*Intercellular adhesion molecule-1*
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon alpha Rezeptor

IκBα	*Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*
IKK	*IκBα kinase komplex*
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IPS-1	*IFN-β promoter stimulator-1*
IRF	*Interferon regulatory factor*
ISG	*Interferon-stimulated genes,* Interferon stimulierte Gene
ISGF3	*ISG factor 3*
ISRE	*IFN-stimulated response element*
JAK1	*Janus tyrosinase kinase-1*
kDa	Kilodalton
KIR	*Killer immunoglobulin-like receptor*
l	Liter
LB	*Luria Broth Medium*
LC/MS	Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie
LFA-1	*Lymphocyte function-associated antigen-1*
LGP2	*Laboratory of genetics and physiology 2*
LMP2	*Latent membrane protein 2*
LPS	Lipopolysaccharid
m	Milli
M	Molar
mAb	*Monoclonal antibody*
MACS	*Magnetic cell sorting,* magnetische Zellsortierung
MACV	Machupo-Virus
AK	Antikörper
mAK	monoklonaler AK
MAPK	*Mitogen-activated protein kinase*
MAVS	*Mitochondrial antiviral signaling protein*
MDA-5	*Melanoma differentiation associated factor-5*
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	*Major histocompatibility complex*
MICA/B	*MHC class I polypeptide-related sequence A/B*
min	Minute

mRNA	*messenger RNA*
MxA	*Myxovirus resistance protein A*
n	Nano
NCR	*Natural, cytotoxicity receptor*
NF-κB	*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
NKG2D	*Natural killer group 2, member D*
NK-Zelle	*Natural killer cell,* Natürliche Killerzelle
NLP	*NOD like protein*
NLR	*NOD like receptor*
NLRC5	*NOD like receptor family CARD domain containing 5*
N-Terminus	Amino-Terminus
OAS3	*2´5´-Oligoadenylate synthetase 3*
pAK	polyklonaler AK
PAMP	*Pathogen-associated molecular patterns*
PBMC	*Peripheral blood mononuclear cells,* mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	*Phosphat buffered saline,* Phosphat gepufferte physiologische Salzlösung
PCR	*Polymerase chain reaction,* Polymerase Kettenreaktion
PD-1	*Programmed cell death-1*
PD-L1	*Programmed cell death-ligand-1*
PE	Phycoerythrin
PGS	P*rotein G sepharose*
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H^+-Ionen-Konzentration in wässriger Lösung
PI	Propidiumiodid
PI3K	*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-3-kinase*
PIV5	Para-Influenzavirus 5
PLC	*Peptid-loading complex*
pNPP	para-Nitrophenylphosphate
PRR	*Pattern recognition receptor*
P/S	Penicillin/Streptomycin
PTEN	*Phosphatase and tensin homolog*
qRT-PCR	*quantitative Real-Time PCR*

RAS	*Rat sarcoma virol oncogene homolog*
RD	Repressordomäne
RGP	*Radial-growth phase*
RIG-I	*Retinoic acid-inducible gene-I*
RLR	*RIG-I like receptor*
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute*
RT	Reverse Transkriptase
SD	*Standard deviation,* Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunde
siRNA	*small interfering RNA*
STAT	*Signal transducer and activator of transcription*
TAP	*Transporter associated with antigen processing*
TAPBP	*TAP-binding protein*
TEMED	*N, N, N´, N´-Tetramethylethy lenediamine electrophoresis reagent*
TF	Transkriptionsfaktor
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TIL	Tumor infiltrierende $CD8^+$ T-Zellen
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-α
TLR	*Toll-like Receptor*
TNFR1	TNF-Rezeptor 1
TPBS	Tween/Phosphat-gepufferte physiologische Salzlösung
Treg	regulatorische T-Zelle
Tyk2	*Tyrosin kinase 2*
ULBP	*UL16 Binding protein*
ü.N.	über Nacht
UPS	Ubiquitin-Proteasom System
UV	ultraviolett
V	Volt
VGP	*Vertical-growth phase*
VISA	*Virus-induced signaling adapter*

VLA-4	*Very late antigen-4*
WB	Western Blot

3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung der HLA Klasse I Antigenpräsentation 22
Abb. 2: Darstellung der RIG-I Signalweiterleitung 29
Abb. 3: 3pRNA induziert Apoptose in einer Subpopulation von Melanomzellen..... 59
Abb. 4: 3pRNA Transfektion führt zu einem kurzzeitigen Proliferationsstop von Melanomzellen..... 60
Abb. 5: 3pRNA Transfektion führt nicht zu einer verstärkten Erkennung von Melanomzellen durch NK-Zellen 61
Abb. 6: Keine gesteigerte Expression aktivierender NK-Zell-Liganden durch 3pRNA-transfizierte Melanomzellen..... 62
Abb. 7: 3pRNA Transfektion steigert die Oberflächenexpression von HLA Klasse I und ICAM-1 Molekülen 63
Abb. 8: 3pRNA Transfektion von Melanomzellen induziert die Aktivierung von autologen $CD8^+$ T-Zellen 64
Abb. 9: 3pRNA Transfektion induziert die Expression von APM Komponenten in Melanomzellen..... 65
Abb. 10: 3pRNATransfektion induziert die RIG-I Signalgebung 66
Abb. 11: 3pRNA erhöht die Immunogenität von Melanomzellen unabhängig von der Typ I IFN Signalgebung 68
Abb. 12: RIG-I Aktivierung induziert die STAT1 Expression unabhängig von einer funktionellen Typ I IFN Signalgebung 70
Abb. 13: PIV5 Infektion der UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen führt zur proteasomalen Degradation von STAT1..... 72
Abb. 14: 3pRNA Transfektion induziert die Typ I IFN Expression in den STAT1-negativen Melanomzellen UKRV-Mel-18a(PIV5) 73
Abb. 15: Die STAT1 Expression ist nicht essentiell für eine 3pRNA-vermittelte Induktion der Immunogenität 74
Abb. 16: 3pRNA induziert die Expression von HLA Klasse I und APM Komponenten in humanen $STAT1^{-/-}$ und $IFNAR1^{-/-}$ Fibrosarkomzelllinien 75
Abb. 17: 3pRNA Transfektion induziert die Expression von IRF-1 und NLRC5 unabhängig von einer funktionellen Typ I IFN Signalgebung 77
Abb. 18: 3pRNA Transfektion induziert die Expression T-Zell-rekrutierender Chemokine . 78
Abb. 19: Die Freisetzung von Chemokinen durch 3pRNA Transfektion ist unabhängig von der Typ I IFN Signalgebung 79
Abb. 20: Darstellung der 3pRNA-vermittelten APM Induktion..... 91
Abb. 21: IFN-γ Behandlung der Melanomzelllinie Ma-Mel-61b führt zu einer gesteigerten HLA Klasse I und ICAM-1 Expression..... 117
Abb. 22: Die Melanomzelllinien UKRV-Mel-18a(PIV5) und UKRV-Mel-18b weisen eine vergleichbare Menge an *STAT1* mRNA auf 117
Abb. 23: Flüssigchromatographische/Massenspektrometrische- (LC/MS) Analyse der UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen 118
Abb. 24: Basale HLA Klasse I Expression der Melanomzelllinien UKRV-Mel-18a(PIV5) und UKRV-Mel-18b 119

4 Einleitung

4.1 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom ist, mit einer Inzidenz von 15-25/100.000 Personen, die häufigste und aggressivste Form unter den verschiedenen Hauttumoren (Miller and Mihm, 2006; Schadendorf and Hauschild, 2014). Trotz Bemühungen der Vorsorge und der frühen Erkennung von Tumoren, sterben bislang ca. 20% der Patienten an ihrer Krankheit. Die Überlebensdauer eines Stadium IV-Patienten beträgt derweil 6-12 Monate (Schadendorf and Hauschild, 2014).

Das Melanom entsteht durch eine bösartige Entartung von pigmentbildenden Zellen (Melanozyten) und manifestiert sich überwiegend in der Haut. In selteneren Fällen kann es auch zu einer Manifestation von Tumoren in Augen und an Schleim- oder Hirnhäuten kommen (Laver et al., 2010; Liubinas et al., 2010; Seetharamu et al., 2010).

Als Ursache für die Entstehung eines Melanoms ist unter anderem die Exposition mit ultravioletter- (UV) Strahlung beschrieben (Gilchrest et al., 1999). Unter normalen Bedingungen kommt es durch ausdifferenzierte Melanozyten zur Produktion von Melanin, welches die Haut vor UV-Strahlung-vermittelten DNA Schäden schützt. Zu starke UV-Exposition, vor allem im Kindes- und Jugendalter, kann dennoch zu irreversiblen DNA-Schäden führen, die eine ungehinderte Zellproliferation von Melanozyten bewirken und so zu der Entstehung eines Melanoms beitragen (Wiecker et al., 2003). Neben UV-Strahlung zählt die Suppression des Immunsystems durch Viruserkrankungen oder Transplantationen zu den weiteren Risikofaktoren (Markovic et al., 2007). Außerdem kann eine angeborene genetische Prädisposition sowie die Anzahl an melanozytären Nävi für die Tumorentstehung von Bedeutung sein (Psaty et al., 2010).

4.1.1 Entstehung des maligen Melanoms

In einem gesunden Organismus besteht ein Gleichgewicht zwischen der Proliferation und dem Zelltod von Zellen. Wird dieses Gleichgewicht in Richtung Zellüberleben gestört, kommt es zur unkontrollierten Proliferation von Zellen und somit zur Tumorentstehung. Durch die Fähigkeit maligner Tumore, ihre Zellen über Blut- und Lymphbahnen weiter zu transportieren, können auch weiter entfernte Organe befallen werden.

Nach Clark und Elder geht man bei der Entstehung eines malignen Melanoms von einem stufenweisen Prozess aus (Clark, 1991; Elder et al., 1993). Dabei bildet sich zunächst ein gutartiger melanozytärer Nävus aus proliferierenden Melanozyten. Die Progression des Melanoms verläuft anschließend über Melanome *in situ* (Melanome ohne Invasionspotential aber mit deutlichen Dysplasiezeichen) und über radial wachsende primäre Melanome, welche noch keine Fähigkeit zur Metastasierung besitzen. Der kritische Schritt der Melanomentstehung ist der Übergang zum VGP-Melanom (*Vertical-Growth Phase-Melanoma*), da hier die Fähigkeit zur Metastasierung erworben wird. VGP-Melanome sind in der Lage die Basalmembran zu durchbrechen, in die umliegende Dermis einzuwandern und dort zu akkumulieren. An letzter Stelle des Progressionsverlaufs steht schließlich das metastasierende Melanom. Die Entstehung eines malignen Melanoms muss nicht linear verlaufen. So können beispielsweise einige Stufen der Melanomentstehung übersprungen werden (Clark et al., 1984; Miller and Mihm, 2006). Außerdem ist auch ein Stillstand der Progression möglich, sodass nicht jedes Melanom eine Entwicklung bis zur Metastasierung durchlaufen muss.

4.1.2 Molekulare Veränderungen im malignen Melanom

Für die maligne Transformation eines gesunden Melanozyten, bis hin zur metastasierenden Melanomzelle, ist das Zusammenspiel vieler verschiedener Faktoren nötig. Dies bedeutet einerseits, dass mehrere Gene an der Pathogenese von Melanomen beteiligt sind und anderseits, dass alleinige Defekte in einzelnen Genen nicht zu einer Tumorentstehung führen können (Flaherty et al., 2012). Außerdem müssen einzelne Genmutationen nicht zwingend für die Tumorinitation essentiell sein. Dennoch, das Auftreten verschiedener somatischer Mutationen in wichtigen regulatorischen Signalkaskaden, wie dem Ras/Raf/MEK/ERK, dem $p16^{INK4A}$-CDK4/6-Rb oder dem PI3K-AKT Signalweg, scheint bei der Melanomentstehung bei einer Vielzahl von Patienten, entscheidend zu sein. Das G-Protein N-RAS, welches unter normalen Bedingungen nach Aktivierung über Wachstumsfaktoren die RAF Kinase aktiviert, ist beispielsweise in 15-20% der Melanome mutiert (Padua et al., 1984; Vantveer et al., 1989). In 50% der Fälle tritt eine aktivierende Mutation des *B-RAF*-Gens, durch einen Aminosäurenaustausch von Valin zu Glutamat an der Position 600 ($B\text{-}RAF^{V600E}$), auf (Curtin et al., 2005; Davies et al., 2002). Neben der verstärkten Aktivierung des MAPK Signalweges kommt es zusätzlich in 5% der Fälle zu einem Verlust der Expression des Tumorsuppressors

p16 (INK4A) (Yang et al., 2005). Dieser wird durch den CDKN2A Lokus kodiert und ist maßgeblich an der Regulation des Zellzyklus beteiligt (Stott et al., 1998). Der Verlust der p16 Expression wird hauptsächlich durch Mutationen, Deletionen oder der transkriptionellen Stilllegung des CDKN2A Lokus hervorgerufen (Yang et al., 2005). *PTEN* (*Phosphatase and Tensin Homolog*) Mutationen und Deletionen sind ebenfalls bei der Melanomentstehung beschrieben, treten aber vorrangig gleichzeitig mit *B-RAF* Mutationen auf (Curtin et al., 2005; Daniotti et al., 2004; Tsao et al., 2004). Dabei führt die PTEN Inaktivierung zu einer konstitutiven Aktivierung des PI3K Signalwegs, welcher über die Herabregulation von Zelladhäsionsmolekülen, wie E-Cadherin, ein invasives Wachstum der entarteten Melanozyten induziert (Li et al., 2002). Weniger häufig auftretende genetische Veränderungen sind *Cyclin D1* (CCND1) Amplifikationen oder *CDK4* (*cyclin-dependent kinase 4*) Mutationen (Curtin et al., 2005; Smalley et al., 2008a; Smalley et al., 2008b) sowie Aktivierungen der Tyrosinkinase *KIT* (Carvajal et al., 2011).

4.1.3 Therapie des malignen Melanoms

Abhängig von der Art des malignen Melanoms, des Stadiums der Erkrankung und des Alters sowie des allgemeinen Gesundheitszustandes des Patienten, gibt es verschiedene Therapieoptionen. Bei früher Diagnose bestehen, durch die vollständige chirurgische Entfernung des Primärtumors, gute Heilungschancen. Im Falle des Auftretens von Metastasen verschlechtert sich die Prognose deutlich (Schadendorf and Hauschild, 2014). Bis 2010 galt die Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Dacarbazin als alleinige Standardtherapie. Diese führte bei 10-15% der Patienten zu einem objektiven Ansprechen. In der Regel kam es jedoch dennoch zu einem progressiven Verlauf der Erkrankung (Sznol, 2011). Seit 2011 wurden bedeutende Fortschritte, im Bezug auf die Erkenntnisse von molekularen Ursachen der Melanomentstehung, gewonnen. Die Erkenntnis der Existenz sogenannter Schlüsselmutationen, in *BRAF*, *NRAS* oder *CKIT*, die in 60-70% aller kutanen Melanome auftreten, führte zu der Entwicklung spezifischer Inhibitoren dieser Moleküle (Schadendorf and Hauschild, 2014). Die Inhibitoren Dabrafenib und Vemurafenib besitzen eine Spezifität für die $B\text{-}RAF^{V600E}$ Mutante und verlängern, im Vergleich zur Chemotherapie, das progressionsfreie Überleben von Patienten um 6-7 Monate (Chapman et al., 2011; Hauschild et al., 2012). Im Jahr 2014 konnte gezeigt werden, dass die Kombination von B-RAF und MEK Inhibitoren das progressionsfreie Überleben um 4 Monate, im Vergleich zur

Monotherapie, verlängert (Long et al., 2014). Trotz guter Ansprechraten, von etwa 60% der B-RAF^{V600E} Träger, führt die Behandlung mit Dabrafenib, Vemurafenib und/ oder mit dem MEK Inhibitor Trametininb, zu einer Resistenzentwicklung in einem Großteil der Patienten und somit zu einer Progression der Erkrankung (Chapman et al., 2014; Hauschild et al., 2012).

Neben der Behandlung von Melanompatienten mit Signalweginhibitoren, ist die Behandlung mit immunmodulierenden Substanzen ein wichtiger therapeutischer Ansatz. Eine Strategie hierbei ist die Verwendung immunregulatorischer Antikörper (AK), wie anti-CTLA-4 (*anti-cytotoxic T-lymphocyte-antigen-4),* anti-PD-1 (p*rogrammed cell death-1*) oder anti-PD-L1 (*programmed cell death-ligand 1*).

CTLA-4 ist ein Mitglied der Immunglobulin Rezeptor Superfamilie und wird unter anderem auf konventionellen CD4^{+} und CD8^{+} T-Zellen sowie auf regulatorischen T-Zellen (Treg), Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) und natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) exprimiert. Die Aktivierung des Rezeptors durch einen entsprechenden Liganden, wie B7-1, resultiert in einer reduzierten Immunantwort (Leach et al., 1996; Pentcheva-Hoang et al., 2009; Rudd et al., 2009). Durch die Verwendung des CTLA-4 mAK Ipilimumab, konnte bereits ein verbessertes Gesamtüberleben von Patienten mit malignem Melanom, im fortgeschrittenem Stadium, nachgewiesen werden (Hodi et al., 2010; Robert et al., 2011).

Der PD-1/PD-L1 Signalweg ist ein zweiter Kontrollpunkt des Immunsystems. Der Transmembranrezeptor PD-1, welcher vor allem auf T-Zellen, B-Zellen und Monozyten exprimiert wird, bindet an die Liganden PD-L1 und PD-L2 (Keir et al., 2008). Diese Bindung führt zu einer Inhibierung der PI3-Kinase und AKT Signalgebung in Immunzellen. Die Behandlung von Patienten mit dem PD-1 mAK Nivolumab zeigte eine verbesserte, langanhaltende Immunantwort in Melanompatienten (Brahmer et al., 2012; Wolchok et al., 2013). Im Jahre 2013 konnte durch eine Studie mit Stadium IV-Patienten ein progressionsfreies Überleben von > 7 Monaten, nach anti-PD-1 Therapie, beobachtet werden (Hamid et al., 2013). Eine Kombination der immunmodulierenden AK Ipilimumab und Nivolumab erzielte eine einjährige Überlebensrate, von 81% der Melanompatienten, im fortgeschrittenen Stadium. (Wolchok et al., 2013) Derzeitig wird die Behandlung mit Ipilimumab oder Nivolumab mit einer Kombinationstherapie der beiden mAK verglichen (Schadendorf and Hauschild, 2014). Durch das signifikant verlängerte progressionsfreie Überleben der Patienten mit mAK-Therapien, wird zusätzlich über die Kombination von anti-CTLA-4/ anti-PD-1 mAK und der Behandlung mit Inhibitoren, die gegen den MAPK Signalweg gerichtet sind, nachgedacht (Hamid et al., 2013; Schadendorf and Hauschild,

2014). Trotz der bemerkenswerten Erfolge der dargestellten Immuntherapien, treten in 93% der Patienten Nebenwirkungen, wie Ausschlag, Juckreiz, Müdigkeit und Durchfall, auf. Starke Nebenwirkungen, wie sie in 53% der Patienten zu beobachten sind, führen in 21% der Fälle sogar zu einem Abbruch der Therapie (Wolchok et al., 2013).

Der adoptive T-Zell-Transfer (ACT) ist eine weitere Therapiemöglichkeit des malignen Melanoms. Hierbei konnten in den letzten Jahren bedeutende Fortschritte erzielt werden (Dudley et al 2005). Um die Immunantwort von Patienten zu stärken, werden beim ACT Tumor-infiltrierende $CD8^+$ T-Zellen (TIL), mit Spezifität gegen Melanom-assoziierte Antigene, aus Metastasen von Patienten isoliert und *ex vivo* expandiert und aktiviert. Im Anschluss werden die expandierten T-Zellen per Infusion zurück in den Patienten geleitet. Durch das verbesserte Verständnis der molekularen Grundlagen von Anti-Tumor-Antworten, wird der ACT heute mit Lymphodepletionen und Chemotherapien kombiniert. Dabei führt die Depletion immunsuppressiver Zellen zu einem veränderten Tumormikromilieu, indem $CD8^+$ T-Zellen optimal aktiviert sind und stark proliferieren können (Phan and Rosenberg, 2013). Die derzeitige Anspruchsrate des kombinierten ACT liegt bei 40-50% der Melanompatienen, von denen ein signifikanter Teil, nach 3-5 Jahren, immer noch ein progessionsfreies Überleben zeigt (Kalos and June, 2013; Weber, 2014).

Ein limitierender Faktor des ACT, ist die Generierung von tumor-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen. Bei vielen Patienten ist es nicht möglich, eine ausreichende Anzahl dieser T-Zellen zu isolieren und *ex vivo* zu expandieren, sodass der ACT nur für eine Minderheit von Patienten zugänglich ist. Außerdem können, wie bei der Behandlung mit modulierenden AK, eine Reihe von starken Nebenwirkungen, wie Autoimmunerkrankungen, auftreten (Kalos and June, 2013).

Die adjuvante Therapie von Patienten mit IFN-α wurde ebenfalls intensiv untersucht. Trotz starker Nebenwirkungen konnten bislang nur wenige Studien einen Vorteil der Therapie bei Melanompatienten zeigen (Eggermont et al., 2012; Garbe et al., 2008; Kirkwood et al., 1996; Tarhini et al., 2012). Einige Studien deuten jedoch darauf hin, dass möglicherweise bestimmte Subpopulationen von Melanompatienten sensitiv auf IFN-α Therapien reagieren (Eggermont et al., 2012; Vihinen et al., 2014).

4.1.4 Rolle zytotoxischer Lymphozyten in der Immunabwehr von Melanomen

Der Erfolg des ACT beruht auf der Tatsache, dass Melanomzellen durch zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen (CTL), des adaptiven Immunsystems, spezifisch erkannt und eliminiert werden können (Coulie et al., 2014). Die Erkennung erfolgt hierbei über Antigenepitope, die über HLA (*Human leukocyte antigen*) Klasse I Moleküle auf der Oberfläche von Melanomzellen präsentiert werden. Die Bindung von T-Zell-Rezeptoren (TCR) an spezifische HLA Klasse I Moleküle, führt zur Aktivierung der T-Zellen und nachfolgend zur Elimination der Tumorzelle über verschiedene Mechanismen (Boon et al., 2006; van der Bruggen et al., 1991). Ein Mechanismus der T-Zell-vermittelten Apoptose von Tumorzellen ist die Granula abhängige Exozytose. Dabei erfolgt die Ausschüttung lytischer Moleküle, wie Perforin, Granzyme und Granulysin, durch die aktivierte T-Zelle in die sogenannte „Immunologische Synapse“. Das Perforin polymerisiert in der Membran der Zielzelle und bildet so Poren, durch die Granzyme und Granulysin in das Zytosol der Tumorzelle gelangen und dort verschiedene apoptotische Signalwege induzieren (Chavez-Galan et al., 2009; Jenkins and Griffiths, 2010). Neben der Granula abhängigen Exozytose, ist die Fas-FasL Interaktion und die Tumor-Nekrose-Faktor-α- (TNF-α) induzierte Apoptose, bei der Elimination von Tumorzellen von Bedeutung. Während bei der Fas-FasL Interaktion, der durch CTL exprimierte Fas Ligand an den Fas Rezeptor auf der Tumorzelle bindet, kommt es bei der TNF-α-induzierten Apoptose zu einer Freisetzung von TNF-α durch die T-Zelle. Die Bindung von TNF-α an den TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) der Zielzelle leitet dann diverse Apoptose Signalwege ein (Brehm et al., 2005; Corbin and Harty, 2005; Strasser et al., 2009; Zhang et al., 2008). Neben der Produktion von TNF-α kommt es, durch aktivierte T-Zellen, auch zu einer Sezernierung von Interferon-γ (IFN-γ) (Badovinac and Harty, 2001). Dieses besitzt sowohl bei der Bekämpfung von viralen und bakteriellen Infektionen als auch bei der Kontrolle der Proliferation des Zellüberlebens von Tumorzellen eine wichtige Funktion (Ikeda et al., 2002; Schoenborn and Wilson, 2007). Auftretende Mutationen in Komponenten der TNF-α oder IFN-γ-induzierten Signalwege in Tumorzellen, können zu einer Insensitivität von Tumorzellen, gegenüber den Proliferations-inhibierenden und den Apoptose-induzierenden Effekten von TNF-α und IFN-γ führen (Respa et al., 2011; Topfer et al., 2011).

Die Erkennung von Tumorzellen durch CTL, kann durch die Herabregulation der HLA Klasse I Moleküle, wie sie im Falle von Melanommetastasen häufig beobachtet wird, stark

reduziert werden (Garrido et al., 2010; Mendez et al., 2008; Paschen et al., 2006). Derart veränderte Tumorzellen können durch zytotoxische NK-Zellen, die dem angeborenen Immunsystem angehören, erkannt und eliminiert werden. NK-Zellen werden durch eine Vielzahl aktivierender und inhibierender Liganden reguliert. Dabei entscheidet das Verhältnis von aktivierenden und inhibierenden Signalen der Zielzelle, ob diese durch NK-Zellen lysiert wird. Die Expression verschiedener inhibierender Rezeptoren, wie KIR (*Killer immunoglobulin-like receptor*) Molekülen, NKR-P1 und CD94/NKG2(A/B), sorgt unter anderem durch die Bindung an HLA Klasse I Moleküle, für den Erhalt der Selbsttoleranz von gesunden Zellen (Ljunggren and Karre, 1990). Zu den aktivierenden Rezeptoren gehören NKG2D (*Natural killer group 2, member D*), 2B4, NKp80 und die natürlichen zytotoxischen Rezeptoren (*Natural, cytotoxicity receptors, NCRs*) NKp30, NKp44 und NKp46. Der Rezeptor NKG2D, welcher auch auf CTL als kostimulatorischer Rezeptor exprimiert ist, nimmt dabei die wichtigste Funktion ein (Obeidy and Sharland, 2009). Seine Liganden sind unter anderem ULBP1 (*UL-16 binding protein 1*), ULBP2, ULBP3, MICA (*MHC class I polypeptide-related sequence A*) und MICB. Die Relevanz dieser Liganden, im Bezug auf die Eliminierung von Tumoren, konnte bereits in einer Reihe von Mausexperimenten gezeigt werden (Cerwenka et al., 2001; Diefenbach et al., 2001; Guerra et al., 2008; Smyth et al., 2005).

4.2 HLA Klasse I-restringierte Antigene

HLA Klasse I-Antigen Komplexe, die von TCR erkannt werden, sind Trimäre aus einer schweren Kette des HLA Klasse I Moleküls, einer leichten Kette des HLA Klasse I Moleküls (β2-Mikroglobulin) und einem Antigenepitop. Antigenepitope, die über HLA Klasse I Moleküle gegenüber CTL präsentiert werden, sind in der Regel 8-10 Aminosäuren (AS) lang (Singh-Jasuja et al., 2004). An der Generierung dieser kurzen Peptide sind verschiedene Proteasen und Peptidasen beteiligt. Das im Zytosol lokalisierte Proteasom spaltet zunächst das gesamte Tumorantigen in kürzere, 2-25 AS lange, Fragmente (Abb. 1) (Strehl et al., 2005). Der zentrale proteolytische Enzymkomplex ist dabei das 26S Proteasom, welches aus den Untereinheiten 20S und 18S besteht (Braun et al., 1999; Voges et al., 1999). Die durch das Proteasom generierten Epitopvorläufer können im Anschluss durch zytosolische Peptidasen in kleinere Fragmente geschnitten werden. Peptide, die bereits eine Länge von 8-16 AS besitzen, werden bevorzugt über die ABC-Transporter (*ATP-binding cassette*) TAP1 und TAP2 (*Transporter associated with antigen processing*) in das Lumen des Endoplasmatischen

Retikulums (ER) transportiert (van Endert et al., 1994). Dabei bindet am N-terminalen Ende der Peptid-Transporter TAP1 und TAP2 das Chaperon Tapasin (TAPBP), welches die Rekrutierung des PLC (*Peptid-loading complex*) initiiert (Ortmann et al., 1997). Neben den kurzen, 8-16 AS langen Peptiden, können auch längere Peptide, mit einer geringeren Effizienz, durch TAP Proteine transportiert werden. Während kurze Peptide direkt auf HLA Klasse I Moleküle geladen werden, werden längere Peptide zunächst im ER durch die Aminopetidasen ERAP1 (*ER aminopeptidase associated with antigen processing*) und ERAP2 weiter prozessiert (Elliott et al., 1995; Snyder et al., 1994). Die Prozessierung führt dabei zur Generierung von 8-9 AS langen Peptidfragmenten, die somit eine optimale Größe für die HLA Klasse I Beladung besitzen (Jones, 1997; Singh-Jasuja et al., 2004; York et al., 2002). Bei der HLA Klasse I Beladung binden zunächst die Chaperone BiP (*Binding immunoglobulin protein*) und Calnexin an die neu synthetisierte schwere Kette des HLA Klasse I Moleküls und verhindern somit deren frühzeitige Degradation (Nossner and Parham, 1995; Zhang et al., 2006). Zusätzlich wird durch BiP und Calnexin die Faltung der schweren Kette sowie die Heterodimerisierung mit der leichten Kette des HLA Klasse I Moleküls vermittelt (Gething and Sambrook, 1992; Vassilakos et al., 1996; Zhang et al., 2006). Durch die folgende Konformationsänderung und die Freisetzung des Calnexin, kommt es zu einer Rekrutierung des gesamten HLA Klasse I Moleküls in den PLC. Unter Beteiligung des Chaperons Calreticulin sowie der Oxiredukatase ERp57, TAP und TAPBP kommt es zur Beladung des HLA Klasse I Moleküls mit einem entsprechenden Antigenpeptid (Del Cid et al., 2010; Jones, 1997; Wearsch et al., 2011). Diese führt zu einer Dissoziation der HLA Klasse I Moleküle vom PLC und zum Verlassen des ER über COPII- (*Coat protein complex II*) beschichtete Vesikel und das cis-Golgi Netzwerk (Cho et al., 2011; Spiliotis et al., 2000). An der Zelloberfläche kommt es schließlich zur Präsentation der Antigenpeptide.

Durch Typ I IFN, Typ II IFN oder TNF-α kann es, durch die veränderte Transkription und Translation der 20S Proteasom-Untereinheiten, zur Bildung eines Immunoproteasoms kommen. Die 20S Proteasom-Untereinheit setzt sich aus 28 Untereinheiten zusammen, die vier übereinander geordnete Ringe, mit je 7 Untereinheiten, bilden. Während die zwei äußeren Ringe jeweils aus α-Untereinheiten bestehen (α1-α7), werden die inneren Ringe durch β-Untereinheiten (β1-β7) gebildet. Die β-Untereinheiten bilden das katalytische Zentrum, für dessen Aktivität jedoch nur die Untereinheiten β1, β2 und β5 verantwortlich sind (Groll et al., 1997). IFN sowie TNF-α induzieren die Expression von drei Immunountereinheiten iβ1 (LMP2), iβ2 (MECL-1) und iβ5 (LMP2) (Fruh and Yang, 1999; Hallermalm et al., 2001; Shin et al., 2006). Diese werden bei der Proteasom-Neusynthese, anstelle der konstitutiv

exprimierten β1-, β2- und β5-Untereinheiten, in das sogenannte Immunoproteasom eingebaut und induzieren eine noch effizientere HLA Klasse I Präsentation auf Zellen (Fruh and Yang, 1999; Hallermalm et al., 2001; Schwarz et al., 2000; Shin et al., 2006; Sijts et al., 2000a; Sijts et al., 2000b; van Hall et al., 2000).

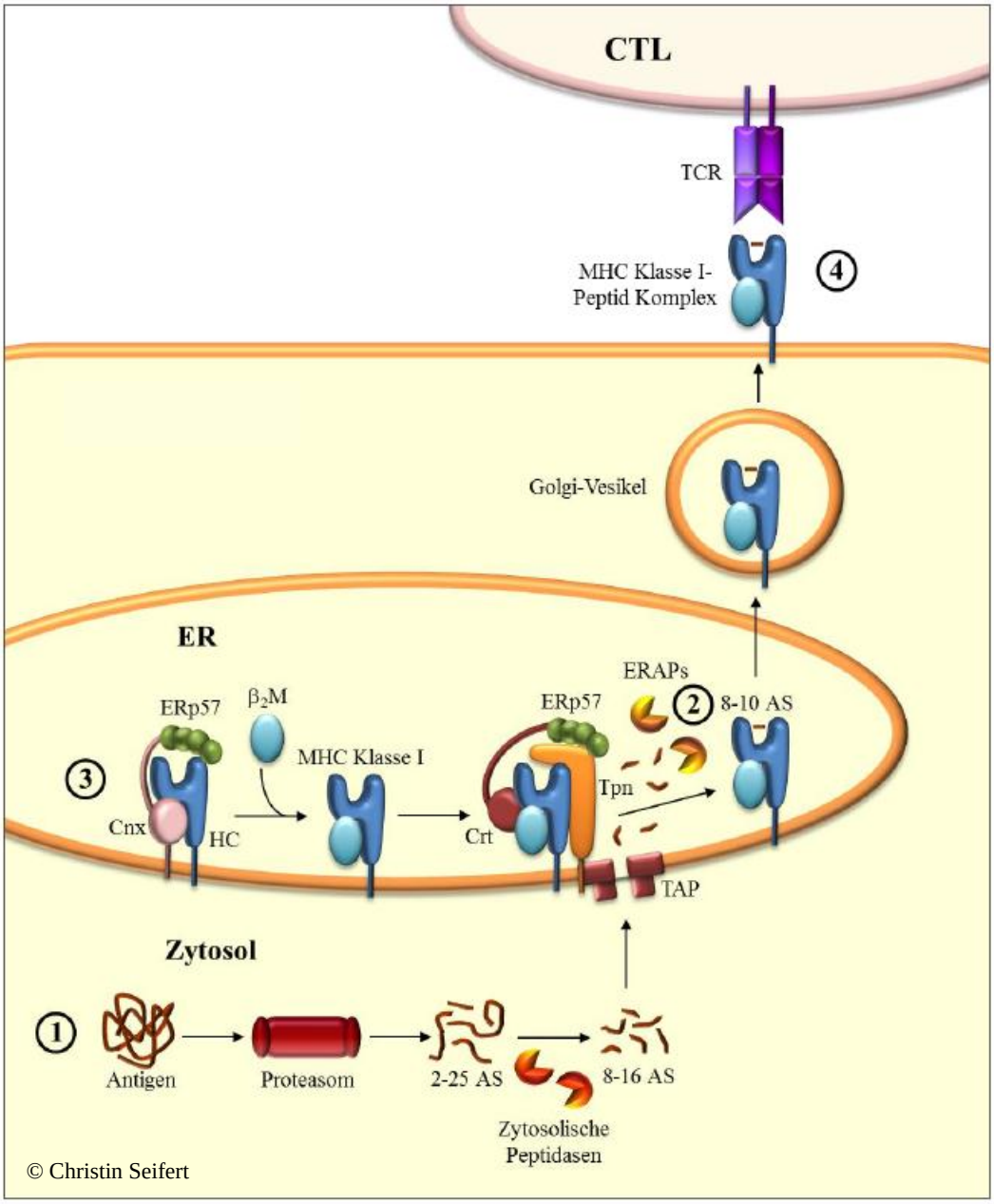


Abb. 1: Darstellung der HLA Klasse I Antigenpräsentation
(**1**) Die Antigenprozessierung findet im Zytosol durch das Proteasom und weitere zytosolische Peptidasen statt. (**2**) Im Lumen des ER werden längere Peptidfragmente durch die Aminopeptidasen ERAP1 und ERAP2 weiter prozessiert und im Anschluss (**3**) auf das HLA Klasse I Molekül geladen. (**4**) Der entstandene HLA Klasse I-Antigen-Komplex wird über Golgi-Vesikel zur Zelloberfläche transportiert, sodass es schließlich zur Präsentation der Antigenpeptide gegenüber CTL kommt. Aminosäuren (AS), Calnexin (Cnx), Schwere Kette des HLA Klasse I Moleküls (HC), β2-Mikroglobulin (β2m), Calreticulin (Crt), Tapasin (Tpn), ER Aminopeptidasen (ERAPs). Abbildung übernommen von Christin Seifert, Klinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Essen (2012).

4.3 Immuzell-Rekrutierung durch Chemokine

Voraussetzung für eine effektive T-Zell-Antwort gegen das Melanom, ist die Migration von Lymphozyten in den Tumor. Diese kann jedoch vielfach eingeschränkt sein. In primären Melanomen ist die Abwesenheit von Tumor-infiltrierenden T-Zellen, mit einem erhöhten Risiko der Metastasenbildung und einer schlechteren Überlebensprognose der Patienten, assoziiert (Azimi et al., 2012; Taylor et al., 2007). Die Rekrutierung von $CD8^+$ T-Zellen ist zum einen von Adhäsionsmolekülen, wie LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen-1*) und VLA-4 (*Very late antigen-4*), abhängig (Kedl and Mescher, 1997). Zum anderen nehmen aber auch Chemokine eine entscheidende Funktion bei der Rekrutierung ein (Harlin et al., 2009; Messina et al., 2012).

Die Familie der Chemokine besteht aus ca. 50 Proteinen, die alle an der Rekrutierung von Leukozyten, unter physiologischen und pathologischen Bedingungen, beteiligt sind. Chemokine binden an 7-Transmembran-G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die hauptsächlich auf Leukozyten exprimiert werden. Entscheidend ist hierbei, dass viele Chemokine an mehr als einen Rezeptor gleichzeitig binden können. Zusätzlich sind Chemokinrezeptoren ebenfalls in der Lage verschiedene Liganden mit einer hohen Affinität zu binden (Balkwill, 2012; Mantovani et al., 2006; Sallusto and Baggiolini, 2008; Zlotnik et al., 2006). Die Einteilung der Chemokine erfolgt anhand ihrer Struktur und ihrer Funktion. Strukturell werden die Chemokine dabei durch die Anzahl und die Position der Cysteinreste im N-Terminus (CXC, CC, C and Cx_3C) unterschieden. Bei der funktionellen Klassifizierung erfolgt die Einteilung in homeostatische und inflammatorische Chemokine. Während homeostatische Chemokine konstitutiv in vielen lymphoiden Organen exprimiert werden, kommt es in infiziertem oder geschädigtem Gewebe zu einer Induktion von inflammatorischen Chemokinen. Diese sorgen anschließend für eine Rekrutierung von Lymphozyten in die geschädigten Regionen (Balkwill, 2012; Mantovani et al., 2006; Sallusto and Baggiolini, 2008; Zlotnik et al., 2006).

Aufgrund ihrer starken chemotaktischen Eigenschaften, determinieren Chemokine die Zusammensetzung von Lymphoiden- und Myeloiden-Zellen in Tumoren. Chemokine können in Tumoren durch Leukozyten und Stromazellen, aber auch durch Tumorzellen selbst, exprimiert werden. Dabei besitzt jedes Chemokin sein eigenes Expressionsprofil und Spektrum an Zielzellen (Balkwill, 2012; Fridman et al., 2012; Leibovich-Rivkin et al., 2013). Nicht nur deshalb ist die Funktion von Chemokinen in der Tumorprogression und –regression sehr komplex und vielfältig. Die CXCR3 Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 rekrutieren beispielsweise anti-tumorale Immunzellen, wie die $CD4^+$ T-Helfer-Zellen

(Th1-Zellen) und NK-Zellen (Fulton, 2009; Keeley et al., 2010). Die Expression des Chemokins CCL5 führt ebenfalls zu einer Rekrutierung von Zellen mit Anti-Tumor-Aktivität, wie Th1-Zellen und CTL. Zusätzlich werden aber auch immunsuppressive monozytäre Zellen rekrutiert (Gonzalez-Martin et al., 2012; Soria and Ben-Baruch, 2008). Die Expression von CCL2 konnte mit einer verstärkten Metastasierung von Brustkrebs, durch die Rekrutierung von inflammatorischen Monozyten, in Verbindung gebracht werden (Qian et al., 2011). Gleichzeitig zeigte sich aber auch eine verbesserte Rekrutierung von $CD4^+$ Th1-Zellen und eine anti-metastatische Wirkung durch die Aufnahme von neutrophilen Zellen (Granot et al., 2011; Qian et al., 2011). Arbeiten von Harlin und dessen Kollegen zeigen, dass die gemeinsame Expression der Chemokine CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 und CXCL10 mit der Rekrutierung von $CD8^+$ T-Zellen in Melanommetastasen assoziiert ist (Harlin et al., 2009). Letztendlich besitzt die Zusammensetzung des Chemokinexpressionsprofil einen entscheidenden Einfluss darauf, ob es durch die Rekrutierung von zytotoxischen Immunzellen zu einer Lyse von Tumorzellen kommt, oder ob diese einer Immunzell-vermittelten Apoptose, durch die Rekrutierung von immunsuppressiven Zellen, entkommen (Colotta et al., 2009; Hanahan and Coussens, 2012; Hanahan and Weinberg, 2011; Ruffell et al., 2010).

4.4 Typ I Interferone und Typ I Interferon-vermittelte Signalgebung

In einigen Melanompatienten kommt es zur spontanen Induktion einer Tumorantigen-spezifischen T-Zell-Antwort. Der Mechanismus ist hierbei noch weitgehend unverstanden. Derzeitige Studien lassen jedoch vermuten, dass Typ I IFN für eine effektive Anti-Tumor-Antwort durch $CD8^+$ T-Zellen essentiell sind (Bald et al., 2014; Diamond et al., 2011; Fuertes et al., 2011; Yang et al., 2014). Die Aktivierung von $CD8^+$ T-Zellen wird über die spezifische Erkennung von HLA Klasse I-Antigen-Komplexen über den TCR und über die Bindung von kostimulatorischen Molekülen der Zielzelle, an entsprechende Rezeptoren der T-Zelle, vermittelt. Zusätzlich können Typ I IFN als weiteres Signal die Differenzierung von T-Zellen in CTL unterstützen (Hervas-Stubbs et al., 2010). Typ I IFN sind durch direkte und indirekte Effekte an der Aktivierung, der Migration, der Differenzierung und dem Überleben vieler Immunzellen, wie Makrophagen, Monozyten, NK-Zellen, DC-Zellen, B-Zellen und T-Zellen, beteiligt. Durch Mausexperimente konnte zudem gezeigt werden, dass die Induktion von Typ I IFN, in Kombination mit der Blockade des Immunrezeptors PD-1, zu einem verlängerten Überleben führt (Bald et al., 2014). Somit sind Typ I IFN wichtige Regulatoren der angeborenen und der adaptiven Immunantwort. Neben der Modulation von

Immunzellen, können Typ I IFN auch direkt auf Zielzellen wirken. So kommt es durch eine IFN Behandlung von Tumorzellen z.B. zu einer verringerten Proliferation und zu einer Veränderung des immunologischen Phänotyps (Garrido et al., 2010; Pansky et al., 2000; Wellbrock et al., 2005). Letzteres wird vor allem durch die Hochregulation von HLA Klasse I Molekülen auf der Zelloberfläche vermittelt (Garrido et al., 2010; Keskinen et al., 1997). Typ I IFN induzieren die Expression des NLP (*NOD like protein*) NLRC5, welches als Masterregulator der HLA Klasse I Expression und verschiedener Antigen-Prozessierungs-und-Präsentationsmaschinerie (APM) Komponenten, wie TAP1 und LMP2, fungiert (Biswas et al., 2012; Meissner et al., 2010; Neerincx et al., 2010). Zusätzlich kommt es durch Typ I IFN zu einer gesteigerten Expression der Transkriptionsfaktoren (TF) STAT1 und IRF-1, welche ebenfalls als potente Induktoren von HLA Klasse I und anderer APM Komponenten beschrieben sind (Chatterjee-Kishore et al., 1998; Chen et al., 2013; Respa et al., 2011; White et al., 1996). Demnach kommt es neben der Typ I IFN vermittelten Differenzierung von T-Zellen, ebenfalls zu einer verbesserten Antigenpräsentation gegenüber CTL.

Die Familie der Typ I IFN umschließt die Mitglieder IFN-α (mit verschiedenen Subtypen), IFN-β, IFN-ε, IFN-κ und IFN-ω (Pestka et al., 2004). Durch die Erkennung von viralen und bakteriellen Zielstrukturen (PAMP; *pathogen-associated molecular patterns*), wie einzelsträngiger(es)RNA, doppelsträngiger(ds)RNA, viralen Glykoproteinen, CpG-DNA oder Lipopolysacchariden (LPS) durch PRR (*pattern recognition receptors*), kommt es zu einer schnellen Induktion von Typ I IFN. Während viele der PRR ubiquitär exprimiert werden, werden andere eher restringiert durch spezifische Zellen exprimiert (Iwasaki and Medzhitov, 2004; Loo and Gale, 2011; Zhao et al., 2014). Der Typ I IFN Rezeptor (IFNAR) ist ein Heterodimer aus 2 Untereinheiten (IFNAR1 und IFNAR2). Die Bindung von Typ I IFN an diesen Rezeptor, bewirkt einen direkten antiviralen Effekt auf infizierte Zellen, durch die Inhibierung der viralen Replikation und der Induktion von proapoptotischen Molekülen. Zusätzlich kommt es durch die parakrine Bindung von Typ I IFN and den IFNAR auf benachbarten nicht-infizierten Zellen, durch die Expression IFN-stimulierter Gene (ISG) zur Induktion eines antiviralen Status, sodass diese vor einer potentiellen Infektion geschützt sind (Gonzalez-Navajas et al., 2012; Stark et al., 1998). Typ I IFN aktivieren die rezeptorgebundenen Kinasen JAK1 (*Janus tyrosinase kinase 1*) und Tyk2 (*Tyrosinase kinase 2*), welche durch Phosphorylierung die Proteine STAT1 (*signal transducer and activator of transcription-1*) und STAT2 aktivieren. STAT1 und STAT2 bilden zusammen mit dem TF IRF-9 (*IFN-response factor-9*) den sogenannten ISGF3 (*ISG factor 3*) Komplex (Fu et al., 1990; Schindler et al., 1992). Dieser bindet an ISRE- (*IFN-stimulated response element*)

Sequenzen der DNA und induziert so die Expression von ISG wie OAS3 (*2´5´-oligoadenylate synthetase 3*), MxA (*myxovirus resistance protein A*) und IRF-7 (Chang et al., 1991; Gonzalez-Navajas et al., 2012; Levy et al., 1988; Takaoka and Yanai, 2006).
STAT1$^{-/-}$ Mäuse haben keine intakte Typ I IFN Signalgebung und sind hoch empfänglich gegenüber viralen und bakteriellen Infektionen (Meraz et al., 1996). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass STAT1$^{-/-}$ Mäuse gegenüber einer chemisch induzierten Karzinogenese deutlich empfänglicher als wt Mäuse sind (Kaplan et al., 1998). In einer Reihe von humanen soliden Tumoren, wurden Mutationen in *JAK1*, *STAT1* oder Defekte in der Bildung des ISGF3 Komplexes beschrieben. Diese Tumorzellen weisen eine eingeschränkte oder gar keine funktionelle Typ I IFN Signalgebung auf (Lesinski et al., 2007; Pansky et al., 2000; Wellbrock et al., 2005; Wong et al., 1997).

4.5 RIG-I-ähnliche Rezeptoren

Die Erkennung von viraler RNA findet im Zytosol durch RLR (*RIG-I like receptors*) statt. Bei RLR handelt es sich um DExD/H Box RNA Helikasen. Die Bindung von viraler RNA an RLR aktiviert die Typ I IFN Produktion und die Expression von antiviralen Genen (Gitlin et al., 2006; Kato et al., 2008). Bislang konnten drei Mitglieder der RLR Familie identifiziert werden: RIG-I (*retinoic acid-inducible gene I*), MDA-5 (*melanoma differentiation associated factor 5*) und LGP2 (*laboratory of genetics and physiology 2*). RLR werden in nahezu jedem Gewebe exprimiert, obwohl die basale Expression meist gering ist (Loo and Gale, 2011). Durch IFN oder infolge von Virusinfektionen kann diese jedoch stark induziert werden (Kang et al., 2004; Yoneyama et al., 2005; Yoneyama et al., 2004). Die Tatsache, dass MDA-5 auch in IFN-resistenten Zellen durch Virusinfektionen induziert werden kann, deutet auf einen IFN-unabhängigen Mechanismus der Aktivierung hin (Yount et al., 2007).
RIG-I und MDA-5 besitzen eine große strukturelle Ähnlichkeit. Beide Rezeptoren sind in 3 eigenständige Domänen unterteilt. Die N-terminale Region besteht aus einer CARD- (*caspase activation and recruitment domain*) Domäne, an die sich zentral die DExD/H Box RNA Helikase Domäne anschließt. Diese besitzt eine Adenosintriphosphat (ATP) Hydrolysefunktion und sorgt wahrscheinlich für das Entwinden der RNA. Der C-Terminus besteht aus einer Repressordomäne (RD), welche an der Autoregulation von RIG-I beteiligt ist (Saito et al., 2007; Yoneyama et al., 2005; Yoneyama et al., 2004). Im Gegensatz zu RIG-I und MDA-5 fehlt LGP2 die N-terminale CARD Domäne.

RIG-I und MDA-5 erkennen eine Vielzahl von Viren. Einige Viren, wie *Paramyxoviradae* und *Rhabdoviridae*, werden ausschließlich von RIG-I erkannt. Ebenso gibt es Viren, die nur durch MDA-5 oder auch durch beide Rezeptoren erkannt werden (Kato et al., 2006; Venkataraman et al., 2007). Sowohl RIG-I als auch MDA-5 erkennen dsRNA. Vergleiche zwischen den beiden RLR zeigen, dass MDA-5 bevorzugt längere dsRNA erkennt, während RIG-I kürzere dsRNA Fragmente zu präferieren scheint. Zusätzlich führt esRNA zu einer Signalweiterleitung durch RIG-I (Kato et al., 2008). RIG-I bindet bevorzugt RNA Sequenzen, welche 3 Phosphate an ihrem 5´-Ende besitzen (3pRNA). Diese Endung hilft zur Unterscheidung zwischen fremder und zelleigener RNA (Hornung et al., 2006). Während es durch unphosphorylierte RNA nicht zu einer Bindung an RIG-I kommt, führt die Bindung von einfach- bzw. zweifach phosphorylierter RNA zu einer reduzierten Signalweiterleitung und Typ I IFN Produktion (Pichlmair et al., 2009). RNAs mit 5´oder 3´ Überhängen werden durch RIG-I, im Vergleich zu RNAs ohne Überhänge, deutlich schlechter erkannt (Marques et al., 2006). Durch die Transfektion von synthetischen RIG-I und MDA-5 Liganden wie, 3pRNA oder poly(I:C), kann ebenfalls eine Aktivierung der Rezeptoren in Tumorzellen induziert werden. RLR Aktivierung führt dabei unter anderem zur Induktion von Typ I IFN, proinflammatorischen Zytokinen und einem immunogenen Zelltod von Tumorzellen (Besch et al., 2009; Duewell et al., 2014; Kubler et al., 2010). Außerdem konnte sowohl in *vitro* als auch in *vivo* eine Aktivierung von Immunzellen, wie NK-Zellen, DC und T-Zellen, nach RIG-I oder MDA-5 Induktion gezeigt werden. Durch eine RIG-I bzw. MDA-5 induzierte Reifung von DC, kommt es dabei zu einer verbesserten Crosspräsentation von Tumorantigegen gegenüber $CD8^+$ T-Zellen (Duewell et al., 2014; Gatti et al., 2013; Kubler et al., 2010; Schulz et al., 2005; Wang et al., 2002). Dabei werden Antigenpeptide durch $CD8^+$ DC aufgenommen, prozessiert und anschließend auf HLA Klasse I Molekülen, gegenüber $CD8^+$ T-Zellen, präsentiert.

4.5.1 Signalweiterleitung durch RIG-I-ähnliche Rezeptoren

Durch Kristallstrukturanalysen konnte gezeigt werden, dass sowohl virale als auch synthetisch generierte 3pRNA an die RD von RIG-I bindet (Cui et al., 2008). Die Regulation von RIG-I findet durch die Interaktion zwischen CARD-Domäne und RD statt (Saito et al., 2007). Im Grundzustand wird die CARD-Domäne durch die Assoziation mit der RD in einem inaktiven Status gehalten. Durch die Bindung von 3pRNA in der RD kommt es zu einer

Konformationsänderung und damit zur Dissoziation von RD und CARD-Domäne. Der aktivierte RIG-I Rezeptor multimerisiert und bindet mit seiner CARD-Domäne an das Adapterprotein IPS-1, auch bekannt als MAVS/VISA/Cardif (Abb. 2) (Scott, 2010). Das IPS-1 Protein ist in der äußeren Membran von Mitochondrien und in Membranen von Peroxisomen lokalisiert (Dixit et al., 2010; Scott, 2010) und besitzt, wie RIG-I, eine N-terminale CARD-Domäne. Diese ist für die RIG-I-vermittelte Typ I IFN Produktion essentiell. Durch die Bindung von RIG-I oder MDA-5 an IPS-1, kommt es zu einer Rekrutierung von Signalmolekülen, die zur Bildung des sogenannten Signalosoms beitragen (Hiscott et al., 2006). Die wichtigsten TF, die dabei aktiviert werden, sind IRF-3, IRF-7 und NF-κB (Loo and Gale, 2011; Paz et al., 2006). IRF-3 und IRF-7 werden durch die IκB Kinasen IKKε und TBK1 phosphoryliert und somit aktiviert. Die aktivierten TF bilden Homo- bzw. Heterodimeren, die an die Promotoren verschiedener Gene binden und so deren Expression induzieren. Die Aktivierung von NF-κB benötigt eine IKKε-abhängige Phosphorylierung der inhibitorischen NF-κB Untereinheit IκBα. Diese wird im Anschluss ubiquitiniert und über das Proteasom abgebaut. IRF-3 und IRF-7 binden zusammen mit NF-κB und einem TF-Komplex, aus ATF-3, c-Jun und CBP-300 an den IFN-β Promotor und induzieren so dessen Transkription (Panne, 2008). In den meisten Zellen wird IRF-3 konstitutiv exprimiert, während IRF-7 zunächst durch Typ I IFN induziert werden muss (Marie et al., 1998). Somit scheint IRF-3 eine sofortige Wirkung auf die Typ I IFN Expression zu besitzen, während IRF-7 die IFN Expression über eine positive Rückkopplung reguliert. Die Produktion von IFN-β führt zur autokrinen und parakrinen Bindung an den IFNAR und somit zu einer ISGF3-abhängigen Induktion von ISG. Dabei werden sowohl Proteine mit antiviraler Aktivität als auch Komponenten der APM, RLR, IRF und verschiedene proinflammatorische Zytokine und Chemokine induziert. Die Induktion des JAK/STAT Signalweges führt außerdem zu einer verstärkten Expression von Typ I IFN durch eine positive Rückkopplung (Loo et al., 2008; Poeck et al., 2010).

Neben der Expression von Typ I IFN, kommt es nach viralen Infektionen ebenfalls zu einer Expression des Typ III Interferons IFN-λ, welches ebenfalls an der Kontrolle von Virusinfektionen beteiligt ist (Donnelly and Kotenko, 2010). Letztendlich führt die Induktion von ISG über Typ I IFN zu einer Immunantwort, die zusammen mit der veränderten Genexpression der infizierten Zelle zur Kontrolle einer viralen Infektion führt.

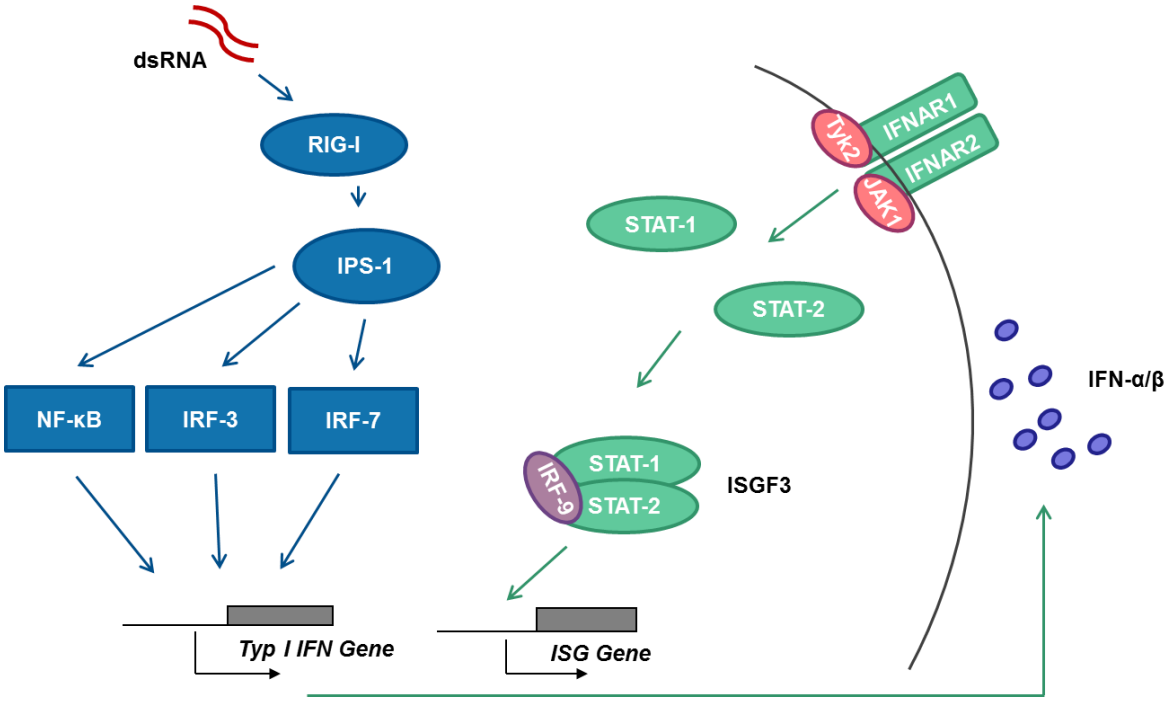


Abb. 2: Darstellung der RIG-I Signalweiterleitung
Virale oder synthetische dsRNA bindet im Zytosol an den Immunrezeptor RIG-I. Dieses führt zu einer Bindung zwischen RIG-I und dem Adapterprotein IPS-1, welche die Aktivierung der TF NF-κB, IRF-3 und IRF-7 induziert. Diese binden an die Promotoren der Typ I IFN Gene und induzieren so deren Transkription. IFN-α und IFN-β binden autokrin und parakrin an den IFNAR und aktivieren die Tyk2 und JAK1-vermittelte Aktivierung von STAT1 und STAT2. Ein Komplex aus STAT1, STAT2 und IRF-9 bindet im Anschluss an Promotoren von ISG und induziert so deren Expression.

4.6 Ziel der Arbeit

Die Aktivierung des Immunrezeptors RIG-I in Tumorzellen führt bekanntermaßen zur Expression von IFN-β und proinflammatorischen Zytokinen, die aktivierend auf verschiedene Immunzellen wirken. Die Effekte der RIG-I Aktivierung auf die immunologischen Eigenschaften einer Tumorzelle war bislang kaum untersucht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob die Aktivierung von RIG-I durch den synthetischen Liganden 3pRNA die Immunogenität von Melanomzellen beeinflusst. Dazu sollten Melanomzelllinien, etabliert aus den Metastasen von Melanompatienten, zunächst mit 3pRNA transfiziert und im Anschluss die Erkennung durch Tumor-reaktive autologe/ -allogene $CD8^+$ T-Zellen und NK-Zellen untersucht werden. Im Falle eines Einflusses der RIG-I Aktivierung auf die Immunogenität des Melanoms sollte der zugrunde liegende Mechanismus geklärt werden. Da bereits bekannt war, dass Tumorzellen nach RIG-I Aktivierung vermehrt Zytokine freisetzen, sollte im Rahmen dieser Arbeit zudem die Expression von Chemokinen analysiert werden. Der Schwerpunkt sollte hierbei auf Chemokine gelegt werden, die mit der Rekrutierung von T-Zellen assoziiert sind.

5 Material

5.1 Chemikalien und Reagenzien

5.1.1 Allgemein

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
Agarose	SigmaAldrich
Agar-agar	Invitrogen
Aqua ad iniectabilia	Braun
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	Merck
DMSO	Sigma-Aldrich
Ethanol (96 Vol.%)	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	Roth
Formaldehyd (CH_2O)	Merck
Hefeextrakt	Gerbu
Schwefelsäure (H_2SO_4)	Sigma-Aldrich
Isopropanol (C3H8O)	Sigma-Aldrich
Natriumnitrat (NaN_3)	Fluka
Natriumchlorid (NaCl)	Fluka
Magnesiumclorid ($MgCl_2$)	AppliChem
Trypanblau	Biochrom
Trypton/Pepton	Roth

5.1.2 RT-PCR/qRT-PCR

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
Deoxynucleotide	Mix Stratagene
DNA loading dye	Fermentas
DSF-Taq DNA Polymerase	Bioron
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
TaqMan Universal PCR Master Mix, no AmpErase	Applied Biosystems

Zur Quantifizierung spezifischer mRNA wurden Taqman Gene Expression Assays von Applied Biosystems bezogen. Die entsprechenden Assay-Nummern (Assay-ID) sind im Folgenden aufgelistet:

Taqman Sonde	Assay-ID	Fluoreszenzfarbstoff
B2M	Hs99999907_m1	FAM/MGB
CCL2	Hs00234140_m1	FAM/MGB
CCL3	Hs00234142_m1	FAM/MGB
CCL4	Hs00237011_m1	FAM/MGB
CCL5	Hs00982282_m1	FAM/MGB
CXCL9	Hs00171065_m1	FAM/MGB
CXCL10	Hs00171042_m1	FAM/MGB
GAPDH	Hs99999905_m1	FAM/MGB
HLA-A	Hs01058806_g1	FAM/MGB
HLA-B	Hs00818803_g1	FAM/MGB
IFN-β	HS01077985_s1	FAM/MGB
IRF-1	Hs00971960_m1	FAM/MGB
LMP2 (PSMB9)	Hs00160610_m1	FAM/MGB
NLRC5	Hs01072161_m1	FAM/MGB
TAP1	Hs00388682_m1	FAM/MGB
TAP2	Hs01561215_m1	FAM/MGB
Tapasin (TAPBP)	Hs00542606_m1	FAM/MGB

5.1.3 Durchflusszytometrie

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
COULTER CLENZ Cleaning Agent	Beckman Coulter
Flow Check	Beckman Coulter
IsoFlow Sheath Fluid	Beckman Coulter

5.1.4 Western Blot

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
Acrylamidlösung	BioRad
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Bradford Reagenz	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
BSA Typ H1	Gerbu
BSA Standard	BioRad
Glycerol	Roth
Glycin	Gerbu
Magermilch Pulver	Gerbu
Methanol (CH_4O)	Sigma-Aldrich
PageRulerTM Prestained Protein Ladder	Fermentas
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Protease Inhibitor Tabletten	Roche
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Gerbu
TEMED	Sigma-Aldrich

Trisma Base	AppliChem
Tween 20	Gerbu

5.1.5 Immunpräzipitation

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
DTT	Thermo Scientific
EDTA	Merck
Glycerol	Roth
HEPES	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	Fluka
Leupeptin	Roche
Natrimvanadat (Na_3VO_4)	Sigma-Aldrich
NP-40/ IGEPAL	Sigma-Aldrich
PMSF	Sigma-Aldrich
Pepstatin	Sigma-Aldrich
Protease Inhibitor Tabletten	Roche
Protein G Sepharose (PGS) beads	Life technologies

5.1.6 Silberfärbung

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
EDTA	Merck
Ethanol MEK vergällt (C_2H_6O)	Merck
Essigsäure ($C_2H_4O_2$)	Baker
Formaldehyd (CH_2O)	Baker
Natriumacetat ($C_2H_3NaO_2$)	Baker
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Baker
Natriumthiosulfat ($Na_2S_2O_3$)	Merck
Silbernitrat ($AgNO_3$)	Merck

5.1.7 Agarosegelelektrophorese

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
GeneRulerTM 1 kb DNA Ladder	Fermentas

5.2 Fertige Lösungen und Reaktionssysteme

Reagenz/Kit	Hersteller
GeneJet Plasmid Miniprep Kit	Fermentas
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Fugene	Promega
RNase-Free DNase Set	Qiagen
Rneasy Plus Mini Kit	Qiagen
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific
CCL5 ELISA	Biolegend
CXCL10 ELISA	Biolegend
BCIP®/NBT Liquid Substrate System	Sigma-Aldrich
ExtrAvidin-Alkaline Phosphatase	Sigma-Aldrich
Alkaline Phosphatase Yellow (pNPP) Liquid Substrate	Sigma-Aldrich
TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)	Applied Biosystems
High Speed Maxi Plasmid Kit	Qiagen

5.3 Inhibitoren

Inhibitor	Hersteller
MG132	Sigma-Aldrich

5.4 Kulturmedien, Puffer und sonstige Lösungen

5.4.1 Kulturmedien für Bakterien und Antibiotika

Chemikalie/Reagenz/Medium	Hersteller/Zusammensetzung
LB-Medium	10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 1 l bidest H_2O (pH 7,0)
LB-Agarplatten	l l LB-Medium, 15 g Agar, Antibiotikum
Ampicillin	Sigma-Aldrich (Endkonzentration 150 µg/ml)
SOC-Medium	Invitrogen

5.4.2 Zellkulturzusätze und Kultur-und Einfriermedien für eukaryotische Zellen

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
fetales Kälberserum (FCS, Charge A10108-2367)	PAA
PBS (1x)	Gibco
PBS (10x)	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
RPMI 1640 mit L-Glutamin	Gibco
DMEM	Gibco
Trypsin-EDTA (10x)	Biochrom

Medium	Zusammensetzung
Einfriermedium	FCS, 10% DMSO
Komplettes Medium	RPMI 1640 mit L-Glutamin/ DMEM, 10% FCS, 100 Units/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin (1% P/S)
T-Zell-Medium	RPMI 1640 mit L-Glutamin/ DMEM, 10% FCS, 100 Units/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin (1% P/S), IL-2 (250 IU/ml)

Das FCS wurde vor der Verwendung für 30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert.

5.4.3 Puffer und sonstige Lösungen

5.4.3.1 Durchflusszytometrie

Puffer	Zusammensetzung
10x Binding-Puffer	0,1 M Hepes (pH 7,4) 1,4 M NaCl 25 nM $CaCl_2$

FACS-Puffer	1 x PBS: 500 ml FCS: 10 ml NaN_3: 0,5 g
Fixierungslösung:	1 x PBS: 500 ml PFA, 37%: 54 ml

5.4.3.2 Western Blot

Puffer	**Zusammensetzung**
RIPA Puffer:	Tris: 50 mM NaCl: 50 mM SDS: 0,1% Na Deoxycholate: 0,5% Triton X 100: 1% PMSF: 1 mM Protease Inhibitor: 1%
5x Probenpuffer:	Glycerol (99%): 5 ml SDS: 1,5 g 0.25% Bromphenolblau: 1 ml β-Mercaptoethanol: 2,5 ml auffüllen mit H_2O: 7,5 ml
4 x Puffer für Trenngel:	Trisma Base 1,5 M: 90,85 g 10% SDS: 20 ml auffüllen mit H_2O: 500 ml pH 8,8
4 x Puffer für Sammelgel:	Trisma Base 0,5 M: 15,15 g 10% SDS: 10 ml auffüllen mit H_2O: 250 ml pH 6,8
10 x Elektrophorese Puffer:	Trisma Base: 75 g SDS: 25 g Glycin: 360 g auffüllen mit H_2O: 2000 ml
10 x Transfer Puffer:	Trisma Base: 75 g SDS: 9,35 g Glycin: 362,5 g auffüllen mit H_2O: 2000 ml

1 x Transfer Puffer:	10 x Transfer Puffer: 200 ml Methanol: 400 ml auffüllen mit H_2O: 2000 ml
Waschpuffer (TPBS):	Tween: 2 ml 10 x PBS: 200 ml auffüllen mit H_20: 2000 ml

5.4.3.3 Immunopräzipitation

Puffer	**Zusammensetzung**
2xIP-Puffer	0,1 mM EDTA 150/250/500 mM NaCl 10 mM KCl 10 mM $MgCl_2$ 10% Glycerol 20 mM HEPES 0,5% (v/v) NP-40/ IGEPAL 0,1 mM PMSF 1 mM DTT 0,5 µM Pepstatin 100 µl Leupeptin 0,1 mM $NaVO_4$ 1 Tablette Protease Inhibitor auffüllen mit H_20: 50 ml pH 7,4

5.4.3.4 Silberfärbung

Puffer	**Zusammensetzung**
Lösung A	50% (v/) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure auffüllen mit H_20: 2000 ml
Lösung B	30% (v/v) Ethanol 500 mM Natriumactetat 8 mM Natriumthiosulfat auffüllen mit H_20: 2000 ml
Lösung C	6 mM Silbernitrat auffüllen mit H_20: 2000 ml
Lösung D	236 mM Natriumcarbonat auffüllen mit H_20: 2000 ml

Lösung E	236 mM Natriumcarbonat 0,01% (v/v) Formaldehyd auffüllen mit H_20: 2000 ml
Lösung F	50 mM EDTA auffüllen mit H_20: 2000 ml

5.4.3.5 Agarosegelelektrophorese

Puffer	**Zusammensetzung**
TAE-Puffer (50x)	1 M Tris 10% EDTA, 0,5 M pH 8 (v/v) 5,71% Essigsäure (v/v) auffüllen mit H_20: 1000 ml
DNA Probenpuffer(1x)	30% Glycerin 0,25% Bromphenolblau (w/v)

5.4.3.6 ELISPOT und ELISA

DPBS-Tween20:	200 ml 10 x DPBS 1 ml Tween 20 auffüllen mit H_20: 2000 ml
DPBS / 0,5% BSA:	50 ml 1 x DPBS 0,25g BSA
Salines-Tween20:	0,9% NaCl 0,05% Tween20

5.5 Zelllinien

Im Folgenden sind alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien aufgelistet. Zelllinien aus Melanommetastasen von Tumorpatienten wurden, mit deren Einverständnis und Bewilligung, durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Essen, generiert. Bei allen Zelllinien handelt es sich um Zellen humanen Ursprungs.

Zelllinie	Herkunft	Ursprung/Eigenschaft
Ma-Mel-86c	Klinik für Dermatologie, Essen	Melanomzelllinie
Ma-Mel-47	Klinik für Dermatologie, Essen	Melanomzelllinie
Ma-Mel-61b	Klinik für Dermatologie, Essen	Melanomzelllinie
Ma-Mel-61g (JAK1$^{-/-}$)	Klinik für Dermatologie, Essen	Melanomzelllinie
UKRV-Mel-18a(PIV5)	Klinik für Dermatologie, Essen	Melanomzelllinie, PIV5 infizierter Klon
UKRV-Mel-18b	Klinik für Dermatologie, Essen	Melanomzelllinie
U3A (STAT1$^{-/-}$)	Matthias Müller, Wien	Fibrosarkomzelllinie
U5A (IFNAR$^{-/-}$)	Matthias Müller, Wien	Fibrosarkomzelllinie
Tyrosinase-spezifischer, CD8^{+} T-Zell-Klon	Klinik für Dermatologie, Essen	Patient Ma-Mel-86
MelanA-spezifischer, CD8^{+} T-Zell-Klon	Klinik für Dermatologie, Essen	gesunder Spender
Bulk CD8^{+} T-Zellen	Klinik für Dermatologie, Essen	Patient Ma-Mel-61

5.6 Bakterien

Bakterien	Hersteller
One Shot TOPTEN chemisch kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*)	Invitrogen

5.7 RNA Mimetika und siRNAs

3pRNA (5´-pppRNA)	Christoph Coch, Bonn
Kontroll RNA (5´-CACACACACACACACACACA-3´)	Biomers
IRF1 siRNA (ON-TARGETplus SMARTpool)	Thermo Scientific
Kontroll siRNA (ON-TARGETplus SMARTpool)	Thermo Scientific

5.8 Antikörper

5.8.1 Primäre Antikörper für Western Blot

Bezeichnung	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
GAPDH	Kaninchen, mAK	1:5000	Cell Signaling
IRF-1	Kaninchen, pAK	1:1000	Santa Cruz
IRF-9	Maus, mAK	1:2500	BD Biosciences
Phospho-STAT1 (Tyr701)	Maus, mAK	1:1000	Cell Signaling
Phospho-STAT1 (Tyr701)	Kaninchen, mAK	1:1000	Santa Cruz
STAT1	Maus, mAK	1:1000	Cell Signaling
β2m	Maus, mAK	1:500	Soldano Ferone, Pittsburgh
HC-10	Maus, mAK	1:1000	Soldano Ferone, Pittsburgh
TAP1	Maus, mAK	1:1000	Soldano Ferone, Pittsburgh
LMP2	Maus, mAK	1:250	Soldano Ferone, Pittsburgh
RIG-I	Kaninchen, mAK	1:1000	Cell Signaling
Trim25	Maus, mAK	1:10000	BD Biosciences
OAS3	Kaninchen, pAK	1:200	Santa Cruz
NLRC5	Ratte, mAK	1:5	Thomas Kufer, Köln
p53	Maus, mAK	1:2500	Santa Cruz
V5-Tag	Maus, mAK	1:1000	AbD Serotec
DDB1	Maus, pAK	1:1000	Bethyl Laboratories, Inc

5.8.2 Primäre Antikörper für Durchflusszytometrie und magnetische Zellsortierung

Bezeichnung	Antigen	Endkonzentration	Hersteller
CD54-PE	ICAM-1	5 µl/Test	Beckmann Coulter
HLA-DR-PE	HLA-DR	5 µl/Test	Beckmann Coulter
W6/32	HLA Klasse I	10 µl/Test	Hybridomüberstand
MICA (AMO1)	MICA	0.2 µg/ml	BAMOMAB
MICB (BMO1)	MICB	0.2 µg/ml	BAMOMAB
ULBP1 (170818)	ULBP1	0.2 µg/ml	BAMOMAB
ULBP2 (BUMO1)	ULBP2	0.2 µg/ml	BAMOMAB
ULBP3 (166510)	ULBP3	0.2 µg/ml	BAMOMAB
CD112	Nectin-2	10 µl/Test	Daniele Pende, Italien
CD155-FITC	Poliovirus Rezeptor	20 µl/Test	Santa Cruz
CD107a-PE	CD107a	10 µl/Test	BD Biosciences
CD56-APC	CD56	3 µl/Test	Beckmann Coulter
CD3-PE	CD3	3 µl/Test	Beckmann Coulter
IgG1 (Mouse)-PE	Isotype Kontrolle	5 µl/Test	Beckmann Coulter
IgG1 (Mouse)-FITC	Isotype Kontrolle	20 µl/Test	Beckmann Coulter

5.8.3 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Applikation	Hersteller
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	WB	Jackson ImmunoResearch Laboratories
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rat IgG (H+L)	WB	Jackson ImmunoResearch Laboratories
Anti-rabbit IgG HRP-linked Ab	WB	Cell Signalling
R-Phycoerythrin-Conjugated AffiniPure F(ab´) Fragment Goat-Anti-Mouse IgG (H+L)	FACS	Jackson ImmunoResearch Laboratories

5.8.4 Antikörper für ELISA und ELISPOT

Antikörper	Applikation	Hersteller
Human CCL5 Capture Ab	CCL5 ELISA	Biolegend
Human CCL5 Detection Ab	CCL5 ELISA	Biolegend
Human CXCL10 Capture Ab	CXCL10 ELISA	Biolegend
Human CXCL10 Detection Ab	CXCL10 ELISA	Biolegend
mAK 1-D1K, 1 mg/ml	IFN-γ ELISA, ELISPOT	MABTECH
mAK 7-B6-1-Biotin (1 mg/ml)	IFN-γ ELISA, ELISPOT	MABTECH
mAK 13A5, (1 mg/ml)	IL-6 ELISA	MABTECH
biotinylierter mAK 39C3 (1 mg/ml)	IL-6 ELISA	MABTECH

5.9 Apoptosemessungen

Bezeichnung	Endkonzentration	Hersteller
Annexin V-APC	5 µl/Test	BD Biosciences
Propidium Iodide	5 µl/Test	BD Biosciences

5.10 Zytokine

Zytokine	Verwendung	Hersteller
IL-2	T-Zell-Stimulierung	Chiron Corporation
Rekombinantes humanes IL-6	ELISA	MABTECH
IFN-α	Behandlung von Zellen	PeproTech
IFN-γ	ELISA, ELISPOT Behandlung von Zellen	PeproTech

5.11 Plasmide

Plasmid	Hersteller
pMyc-NLRC5	Thomas Kufer, Köln
pcDNA3.1	Invitrogen

5.12 Geräte

Geräte	Hersteller
Autoklav	Syntec
Brutschrank	Heraeus Instruments
Eismaschine AF100	Scotsman
Gallios Durchflusszytometer	Beckman Coulter
Glasmesspipetten	Hirschmann®EM Techcolor
Gelelektrophorese Kammer SUB-CELL® GT	BioRad
Inkubatorschrank	Binder
Kryo-Einfrier-Container	Nalgene
Lichtmikroskop (invers)	Leica
Mikrozentrifuge	Biofuge
Mikrowelle 700	SEVERIN
Mini-PROTEAN vertical Electrophorese System	BioRad
Mini-PROTEAN System Glass plates	BioRad
Mixer	Oehmen Labortechnik
Multi Imager (UV-Transilluminator)	Biostep
Multi-Kanal Pipette	Rainin
Neubauer-Zählkammer	Brand
pH-Elektrode	EUTECH instruments
Pipetten	Rainin
PowerPac HC	BioRad
Rollator TRM 50	IDL GmbH & Co, KG
Qiashredder	Qiagen
QuadroMACSTM Separator	Miltenyi Biotec
Röntgenfilmkassette	BioRad
Schüttelinkubator	ThermoScientific
Spektrometer Infinite 200	Tecan
Step One Plus real-time PCR system	Applied Biosystems
Steril-Bank	ThermoScientific
Thermocycler	BioRad
Thermomixer	Eppendorf
Thermorührer	IKA-Combimag RCT
Vortex	Oehmen Labortechnik
Waagen	Kern
Wasserbad	Fischer & Rintelen
xCELLigence System	Roche
Zentrifugen	ThermoScientific

5.13 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
3 MM Chromatographie-Papier, Whatman® 46x57 cm	GE Healthcare
6 well Plates TC	TPP
8er Strips PCR-tubes with single caps 0,2 ml	BioRad
24 Well TC-Plate, sterile, with lid	Greiner bio-one
96 Well Cell Culture Plate, sterile, U-bottom, with lid	Greiner bio-one
96 Well Plate flat bottom white	Costar
Amersham Hybond ECL	GE Healthcare
Amersham Hyperfilm ECL 18x24 cm	GE Healthcare
Deckgläschen	Langenbrinck
Einmalpipetten CELLSTAR 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner bio-one
E-Plate	OLS (OMNI Life Science)
FACS-Röhrchen	Beckman Coulter
Falconröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one
Filter 0,2 µm steril	Sartorin
Kryo-Einfrier-Röhrchen	Greiner bio-one
MACS-Säulen	Milteny Biotec
Optische Adhäsionsfolien	Applied Biosystems
Petrischalen TC 20 mm	Greiner bio-one
Pipettenstopfwatte	Oehmen Laborbedarf
Pipettenspitzen	Rainin
Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf
Whatman Papier	GE Healthcare
Western Blot Equipment	BioRad
Zellkulturflaschen 75 cm^2, 175 cm^2	Greiner bio-one

6 Methoden

6.1 Molekularbiologische Methoden

6.1.1 Isolierung von RNA

Zur Isolierung der gesamten zellulären RNA, wurden adhärente Zellen zunächst 1 x mit PBS gewaschen und anschließend mit Hilfe einer Trypsin/EDTA Lösung geerntet. Die abgelösten, resuspendierten Zellen wurden für 7 min bei 1200 rpm RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Isolierung der RNA erfolgte durch das Rneasy Plus Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Zusätzlich wurden die Proben, vor der Elution, für 20 min mit DNAse (Qiagen) behandelt. Die Elution erfolgte in 30 µl RNase-freiem H_2O. Bis zu Weiterverwendung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

6.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte mittels Nano Drop 2000 (Thermo Scientific). Zur Berechnung der Konzentration wurden folgende Beziehungen verwendet:
1,0 A_{260} = 50 µg doppelsträngige DNA/ml
1,0 A_{260} = 40 µg RNA/ml
Die Reinheit der Präparation ließ sich über das Verhältniss der OD-Werte von OD_{260} zu OD_{280} definieren, wobei ein Quotient von 1,8-2 auf eine saubere Präparation schließen ließ.

6.1.3 cDNA Synthese

Für die qRT-PCR musste zunächst die isolierte mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Die cDNA Synthese erfolgte mittels *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. 1 µg RNA wurde hierfür in 10 µl RNAse-freiem H_2O aufgenommen und mit 10 µl des RT-Master-Mix, für 10 min bei 25°C, inkubiert. Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt für 120 min bei 37°C. Anschließend erfolgte die Inaktivierung des Enzyms,

indem der Ansatz für 5 min bei 85°C erhitzt wurde. Bis zu Weiterverwendung wurde die cDNA bei -80°C gelagert.

RT-Master-Mix:

10 x RT- Puffer	2,0 µl
25 x dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10 x RT Random-Primer	2,0 µl
20 U/µl RNase Inhibitor	1,0 µl
MultiScribeTM Reverse Transkriptase (50 U/µl)	1,0 µl
RNase-freies H_2O	3,2 µl

6.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR diente zur Vervielfältigung spezifischer DNA Sequenzabschnitte. Um DNA Kontaminationen in isolierten RNA Proben auszuschließen, wurde eine PCR durchgeführt. Für einen 25 µl PCR-Ansatz wurden folgende Komponenten pipettiert:

10 x PCR Puffer	2,50 µl
dNTP Mix (10 mM)	0,50 µl
sense Primer (10 µM)	0,50 µl
anti-sense Primer (10 µM)	0,50 µl
DFS-Taq- DNA Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
Aqua bidest.	18,25 µl
cDNA	2,50 µl

Zur Amplifikation mittels Thermocycler wurden folgende Reaktionsbedingungen gewählt:

1. Schritt: 95°C	5 min
2. Schritt: 95°C	30 sek
3. Schritt: 60°C-65°C	30 sek
4. Schritt: 72°C	1 min
5. Schritt: 34-fache Wiederholung der Schritte 2-4	
6. Schritt: 72°C	10 min
7. Schritt: 4°C	∞

6.1.5 Quantitative PCR (qRT-PCR)

Um die Expression verschiedener Gene quantitativ zu erfassen, wurde eine real-time PCR durchgeführt. Hierfür wurden sogenannte Taqman-Sonden verwendet, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxyfluorescein (FAM) markiert waren und sich durch ihre besondere Sequenzspezifität auszeichnen. Diese Sonden binden gezielt an das gewünschte

PCR Produkt. Um ein Fluoreszenzsignal zu erhalten, muss zunächst der Quencer, welcher an die Sonden gekoppelt ist, räumlich von der Sonde getrennt werden. Die Taq-Polymerase ist durch ihre 5´-3´Exonukleaseaktivität in der Lage, die Fluoreszenzsonde hydrolytisch zu spalten und so vom Quencher zu trennen. Die darauf folgende Anregung der Sonde führt zur Emission einer definierten Wellenlänge, die messtechnisch erfasst werden kann. Anhand der Fluoreszenzmessung, in jedem einzelnen Reaktionszyklus, können Rückschlüsse auf die Menge an gebildeten PCR-Produkten gezogen werden. Für die Auswertung der *real-time* Daten, wurde eine relative Quantifizierung vorgenommen. Hierfür wurde das Haushaltsgen GAPDH als Referenzgen gewählt. Die Berechnung der unterschiedlichen Genexpressionen wurde nach der 2-ΔΔCt Methode (Livak and Schmittgen, 2001) durchgeführt. Hierbei wurden die berechneten Ct-Werte des Referenzgens zunächst von den berechneten Ct-Werten des Zielgens subtrahiert. Die so berechneten ΔCt-Werte wurden durch den Ct-Wert einer festgelegten Kontrollprobe normalisiert (ΔΔCt-Wert). Der berechnete Wert wurde in die Formel 2-ΔΔ-Ct eingesetzt und so die normalisierte Genexpressionsveränderung berechnet.

Für einen 10 µl Ansatz wurden folgende Reagenzien pipettiert:

real-time PCR Master Mix:

20 x Taqman Probe	0,5 µl
2 x Taqman Mastermix	5 µl
500 ng cDNA	1 µl
Aqua bidest.	3,5 µl

Zur Amplifikation mittels real-time PCR Cycler wurden folgende Reaktionsbedingungen gewählt:

1. Schritt: 95°C	10 min
2. Schritt: 95°C	15 sek
3. Schritt: 60°C	1 min
4. Schritt: 39-fache Wiederholung der Schritte 2-4	

Alle Proben wurden als technische Triplikate pipettiert.

6.1.6 Agarosegelelektrophorese

Um DNA Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen, wurden 1%ige Agarosegele verwendet. Hierfür wurde die entsprechende Menge an Agarose in TAE-Puffer suspendiert und anschließend in der Mikrowelle aufgekocht. Im Anschluss wurde die Lösung mit Ethidiumbromid (0,7 µg/ml) versetzt und in eine Gelkammer mit eingesetztem Kamm gegossen. Die aufzutrennenden Proben wurden mit 6xDNA-Ladepuffer versetzt und anschließend in dem Agarosegel bei 5 V/cm Elektrodenabstand elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion der DNA Banden erfolgte durch einen MultiImager (Biostep).

6.1.7 Transformation von Plasmid-DNA und Anzucht von Bakterien

Um Plasmid-DNA zu amplifizieren, wurde diese in Bakterien transformiert. Hierfür wurde 1 µg DNA zu *One Shot® TOP10* chemisch kompetenten *E. coli* Zellen gegeben und der Ansatz anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte der Hitzeschock, bei dem der Ansatz für 30 sek bei 42°C im Thermocycler inkubierte. Nach einer weiteren Inkubation für 2 min auf Eis, wurde der Transformationsansatz mit 250 µl SOC-Medium versetzt und bei 37°C für 1-2 h bei 300 rpm geschüttelt. Nach anschließender Zentrifugation des Ansatzes, für 3 min bei 6000 U/min, wurden die Bakterien auf Antibiotika-haltigen Agar-Platten ausplattiert und bei 37°C ü.N. im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden 200 ml LB-Selektivmedium mit einer einzelnen Kolonie beimpft und bei 37°C ü.N. geschüttelt. Die Übernachtkultur wurde bei 4000 rpm für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die DNA Isolierung durch das High Speed Maxi Plasmid Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

6.2 Zellbiologische Methoden

6.2.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden steril, unter einer Sicherheitsbank mit vertikalem Luftstrom, durchgeführt. Es wurden ausschließlich sterile Medien, Puffer, Zusätze und Kunststoffmaterialien bzw. autoklavierte Glaswaren verwendet. Die Inkubation und

Kultivierung der verwendeten Zellen, erfolgte bei 37°C und 5% CO_2 in gesättigter Atmosphäre.

6.2.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung der verwendeten Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen. Als Wachstumsmedium wurde, je nach Zelllinie, komplettes Medium mit RPMI oder DMEM verwendet. Das Passagieren der Zellen erfolgte bei einem Konfluenzgrad von 70-90%. Dazu wurden die adherenten Zellen zunächst einmal mit PBS gewaschen und im Anschluss durch die Zugabe von 1-2 ml Trypsin/EDTA Lösung von der Flasche gelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 10 ml FCS haltigem Medium für 7 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach Resuspension des Zellpellets in frischem Medium, wurden die Zellen in geeigneter Verdünnung (1:2-1:10) in einer neuen Flasche ausgesät.

6.2.1.2 Restimulierung von $CD8^+$ T-Lymphozyten

Die Restimulation von $CD8^+$ T-Lymphozyten erfolgte 7-10 Tage nach der vorherigen Stimulation. Jeweils 1 x 10^6 T-Zellen wurden mit 1 x 10^5 bestrahlten Tumorzellen in 2 ml T-Zell-Medium in einem 24-Well bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

6.2.1.3 Auftauen und Kryokonservierung von Zelllinien

Um eingefrorene Zellen aufzutauen, wurden die Kryoröhrchen für 2-3 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert und die Zellen unmittelbar danach in 10 ml vorgewärmtes Medium aufgenommen. Nach anschließender Zentrifugation für 7 min bei 1200 rpm, wurde das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen und in einer Zellkulturflasche ausgesät.
Zur Kryokonservierung von Zellen wurden diese zunächst durch Trypsin/EDTA Zugabe von der Zellkulturflasche gelöst und für 7 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1,5 ml eiskaltem Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Um ein langsameres und schonenderes Einfrieren der Zellen zu ermöglich, wurden die Kryoröhrchen zunächst in ein vorgekühltes Einfriergefäß bei -80°C gestellt. Für eine dauerhafte Lagerung der Proben, wurden diese nach wenigen Tagen in flüssigen Stickstoff transferiert.

6.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 90 µl Trypanblau-Lösung versetzt und 10 µl des Gemisches auf die Zählkammer pipettiert. Es wurden alle lebenden, nicht blau gefärbten Zellen, gezählt und die Zellzahl wie folgt berechnet:

Zellzahl pro ml = Zellzahl pro Quadrant x 10^4 x Verdünnungsfaktor x Volumen der gelösten Zellen

6.2.3 Transiente Transfektion von Zelllinien

6.2.3.1 siRNA Transfektion

Zur transienten Herabregulation von IRF-1 in humanen Zellen, wurden 1-2 x 10^5 Zellen 16-24 h vor der Transfektion in 6-Well-Platten ausgesät. Für die Transfektion der Zellen eines Wells wurden 2 µl des Transfektionsreagenzes Lipofectamin 2000 mit 98 µl RPMI Medium, ohne FCS für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 100 nM IRF-1 siRNA oder Kontroll siRNA in 100 µl RPMI ohne FCS aufgenommen und die Transfektionslösung im Verhältnis 1:1 mit der RNA-Lösung für 20-45 min inkubiert. Im Anschluss erfolgte die tröpfchenweise Zugabe von 200 µl der Transfektions-RNA-Lösung pro Well.

6.2.3.2 3pRNA Transfektion

Um transient 3pRNA in humane Zellen einzubringen, wurden 1-2 x 10^5 Zellen 16-24 h vor der Transfektion in 6-Well-Platten ausgesät. Für die Transfektion eines Wells wurden 2 µl des Transfektionsreagenzes Lipofectamin 2000 mit 98 µl RPMI Medium ohne FCS für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 ng 3pRNA oder Kontroll-RNA in 100 µl RPMI ohne FCS aufgenommen und die Transfektionslösung im Verhältnis 1:1 mit der RNA-Lösung für 20-45 min inkubiert. Im Anschluss erfolgte die tröpfchenweise Zugabe von 200 µl der Transfektions-RNA-Lösung pro Well. Die Analyse der Zellen erfolgte 24 h nach der Transfektion.

6.2.3.3 DNA Transfektion

Zur Überexpression bestimmter Proteine in humanen Zellen, wurden diese transient mit Plasmid-DNA transfiziert. Hierfür wurden 1-2 x 10^5 Zellen 16-24 h vor der Transfektion in 6-Well-Platten ausgesät. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und 900 µl FCS-freies Kulturmedium hinzugegeben. Pro Transfektionsansatz wurden 3 µl des Transfektionsreagenzes Fugene und 1 µg Plasmid-DNA zu einem finalen Volumen von 100 µl mit RPMI, ohne Zusätze, versetzt und für 20 min inkubiert. Die Zugabe der Transfektionslösung erfolgte tröpfchenweise. Nach einer weiteren 4-stündigen Inkubation der Zellen im 37°C warmen Inkubator, wurden diese mit 1 ml Kulturmedium (20% FCS) supplementiert.

6.2.4 IFN Behandlung

Zur Behandlung von Zellen mit IFN, wurden 1-2 x 10^5 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät. Nach 16-20 h wurden die Zellen mit IFN-α (1000 U/ml) oder IFN-γ (500 U/ml) behandelt. Die Kontrollzellen verblieben unbehandelt. Die Analyse der Zellen erfolgte nach 24 h.

6.2.5 Proliferations-Assay

Zur Analyse der Proliferation der Melanomzelllinien, wurde das xCELLigence System verwendet. 0,5-1 x 10^4 Zellen wurden in 200 µl Medium 16-24 h vor der Transfektion in einer sogenannten *E-Plate* ausgesät. Diese ist mit Mikroelektroden im Plattenboden ausgestattet. In einem schwachen elektrischen Feld beeinflusst der biologische Status der Zellen die elektrische Impedanz zwischen Medium und den Mikroelektroden-Sensoren und erlaubt so Änderungen in der Zellkultur dynamisch zu beobachten. Für die Transfektion der Zellen eines Wells der *E-Plate*, wurden 0,2 µl des Transfektionsreagenzes Lipofectamin 2000, mit 9,8 µl RPMI Medium, ohne FCS, für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 ng 3pRNA oder Kontroll-RNA in 10 µl RPMI ohne FCS aufgenommen und die Transfektionslösung im Verhältnis 1:1 mit der RNA-Lösung für 20-45 min inkubiert. Im Anschluss erfolgte die tröpfchenweise Zugabe von 20 µl der Transfektions-RNA-Lösung pro Well. Die Analyse der Zellen erfolgte bis 172 h nach Transfektion. Alle Ansätze wurden als technische Duplikate pipettiert.

6.2.6 xCELLigence basierter Zytotoxizitäts-Assay

Zur Analyse der $CD8^+$ T-Zell-vermittelten Lyse von Melanomzellen, wurde das xCELLigence System verwendet. 0,5 x 10^4 Melanomzellen wurden in 200 µl Medium 16-24 h vor der Transfektion in einer *E-Plate* ausgesät. Die Transfektion der Zellen wurde wie beim Proliferations-Assay (6.2.5) durchgeführt. Nach 20-24 h erfolgte die Zugabe von autologen $CD8^+$ T-Zellen im Verhältnis 1:2 und 1:5. Hierfür wurde zunächst das Medium aus den Wells entfernt und die T-Zellen in 100 µl T-Zell-Medium hinzugegen. Die Analyse der Zellen erfolgte bis 90 h nach T-Zell-Zugabe. Alle Ansätze wurden als technische Duplikate pipettiert.

6.3 Proteinbiochemische Methoden

6.3.1 Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Reagenz

Zur Analyse der Proteinexpression in verschiedenen Zelllinien, musste zunächst die Proteinkonzentration bestimmt werden. Hierfür wurden die zu analysierenden Zellen durch Trypsin/EDTA Zugabe von der 6-Well-Platte gelöst und für 7 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Die 1 x mit PBS gewaschenen Zellpellets wurden in 30-60 µl RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitor aufgenommen und für 15 min auf Eis inkubiert. Durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm für 15 min, konnten entstandene Zelltrümmer, von den sich im Überstand befindenden Proteinen, entfernt werden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Bradford-Test. Dabei wurden die zu untersuchenden Proteinlysate mit einer Coomassie-Brillant-Blau haltigen Bradfordlösung gemischt und die Extinktion bei 595 nm mittels Spektrometer (Infinite 200) photometrisch detektiert. Die Proteinkonzentration der Proben wurde anhand einer BSA Standartkurve berechnet.

6.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE erfolgte nach der Laemmli Methode. 10-60 µg der durch Bradford-Test berechneten Proteinextrakte, wurden in einem 5 x Proben-Puffer aufgenommen und für 3 min bei 99°C denaturiert. Anschließend wurden die

Proteine in einem SDS-Gel bei einer konstanten Spannung von 110 V aufgrund ihres Molekulargewichtes aufgetrennt.

SDS-Gel-Zusammensetzung:

Lösung	10%iges Trenngel	2,5%iges Sammelgel
H_2O	1,9 ml	0,68 ml
30% Arylamid	1,7 ml	0,17 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	1,3 ml	-
10% SDS	0,05 ml	0,01 ml
10% APS	0,05 ml	0,01 ml
TEMED	0,002 ml	0,001 ml
1 M Tris (pH 6,8)	-	0,13 ml

6.4.1 Western Blot

Zur Detektion und Semiquantifizierung spezifischer Proteine, folgte der elektrophoretischen Trennung durch SDS-PAGE, ein 1-stündiger Transfer (100 V bei 4°C) der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Für die Durchführung wurde das Wet (Tank) Blot Verfahren angewandt. Hierbei erfolgt der Aufbau nach dem sogenannten Sandwichverfahren:
1) Auflegen eines Schwamms auf das Anodengitter, 2) Auflegen von 3 glattgerollten Filterpapieren, 3) Auflegen des SDS-Polyacrylamidgels, 4) Auflegen der Nitrozellulosemembran, 5) Auflegen von 3 weiteren glattgerollten Filterpapieren, 6) Auflegen eines Schwammes, 7) Abschließen der Blotkassette mittels Kathodengitter und anschließendes Einsetzen der Kassette in die Blotvorrichtung. Nach erfolgreichem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h mit 5%iger Magermilch bei RT blockiert. Es folgte die Zugabe des primären AK, verdünnt in 5% Magermilch oder in 5% BSA ü.N., wobei sich die Konzentration des AK nach den Angaben des Herstellers richteten. Durch 3-maliges Waschen der Membran, für 5 min, mit T-PBS, konnten nicht gebundene AK am nächsten Tag vollständig entfernt werden. Anschließend erfolgte eine weitere 1-stündige Inkubation der Membran mit dem sekundären AK, welcher über eine kovalent gebundene Meerrettichperoxidase (HRP) verfügte. Nach erneutem 3-maligem Waschen, für 5 min mit T-PBS, wurde die Membran, für 2 min, in frisch angesetzter *Enhanced Chemoluminiscence* (ECL)-Lösung inkubiert. Diese enthielt Luminol, ein Substrat für die an den sekundären AK gekoppelten Meerrettichperoxidase. Die durch die Substratumsetzung entstandene Lichtreaktion konnte per Amersham Hyperfilm (GE Healthcare) visualisiert werden.

6.4.2 Immunopräzipitation

Um die Interaktion zweier Proteine nachzuweisen, wurde eine Immunopräzipitation (IP) durchgeführt. Hierfür wurden zunächst die Zellen aus der Kulturflasche abgelöst und in Falcon-Röhrchen überführt. Nach einmaliger Zentrifugation bei 1200 rpm, für 3 min bei 4°C, wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und in vorgekühlten Reaktionsgefäßen, erneut bei 3500 rpm, für 2 min bei 4°C, zentrifugiert. Der Waschschritt wurde 3 x wiederholt und die Zellpellets im Anschluss in 1 ml 2x IP-Puffer (150 nM NaCl) aufgenommen. Die Lyse der Zellen erfolgte bei 4°C für 25-30 min auf dem Rollator. Nach der Inkubation wurden die Lysate bei 13500 rpm, für 25 min bei 4°C, zentrifugiert und die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt. Es folgte die Zugabe des V5-Tag mAK gegen das zu untersuchende Protein und eine Inkubation üN bei 4°C. Am nächsten Tag wurden 30 µl PGS beads, welche den AK binden, zu den Zelllysaten gegeben und die Zellen im Anschluss erneut für 1 h, bei 4°C, auf dem Rollator inkubiert. Die PGS-Beads wurden bei 1000 rpm, für 1 min bei 4°C, pellettiert und der Überstand verworfen. Es folgten mehrere Waschschritte mit 500 µl 2x IP-Puffer mit wechselnden NaCl-Konzentration (150 mM, 250 mM, 500 mM, 500 mM, 250 mM, 150 mM) und einer Zentrifugation bei 1000 rpm, für 1 min bei 4°C. Zuletzt wurden die Beads in 30 µl 2,5x Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Analyse der Proben erfolgte mittels Silberfärbung oder Western Blot.

6.4.3 Silberfärbung

Zur Detektion von Proteinen nach der IP durch Silberfärbung, wurden zunächst 30 µl der Proben auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen und bei 100 V, 4°C ü.N. aufgetrennt. Am nächsten Tag erfolgte die Silberfärbung in 9 Schritten:

Färbeschritt	Volumen	Lösung	Dauer der Behandlung
1. Fixierung	0,5 l	A	2 h
2. Inkubation	2 l	B	20 min – 2 h
3. Wässern	1 l	H_20	2 x 20 min
4. Färbung	0,5 l	C	30 min
5. Wässern	0,5 l	H_20	einige sek
6. Spülen	0,5 l	D	1 min
7. Entwicklung	0,5 l	E	3-7 min
8. Stoppen	0,5 l	F	mind. 20 min
9. Waschen	2 l	H_20	mind. 10 min

Detektierbare Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und zur massenspektrometrischen Analyse verschickt.

6.5 Immunologische Methoden

6.5.1 Durchflusszytometrie

6.5.1.1 Analyse von Oberflächenmolekülen

Um Oberflächenmoleküle von Zellen quantitativ zu erfassen, wurde das Verfahren der Durchflusszytometrie angewandt. Die zu analysierenden Zellen wurden durch Trypsin/EDTA Zugabe von der 6-Well-Platte gelöst und für 7 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Die entstandenen Zellpellets wurden in FACS-Puffer aufgenommen und 1 x 10^5 Zellen pro Ansatz in eine 96-Well-Platte gegeben. Die Suspension wurde für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Wiederholung des Waschschritts mit 200 µl FACS-Puffer, folgte die Inkubation der Zellen mit dem primären AK für 30 min bei 4°C im Dunklen. Dieser war entweder direkt mit einem Fluoreszenzmolekül gekoppelt oder ungekoppelt. Nach erneutem, zweimaligem Waschen für 7 min bei 1200 rpm, wurden die Zellen, welche mit einem direkt gekoppelten AK inkubiert wurden, in 300 µl Fixierungslösung resuspendiert und bei 4°C im Dunklen inkubiert. Die Zellen, die mit einem ungekoppelten AK inkubiert wurden, wurden im Anschluss mit 1 µl eines sekundären Fluoreszenz-markierten AK, mit einer Spezifität für den 1. AK, für 30 min bei 4°C im Dunklen inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die ausschließlich mit dem sekundären AK, oder, im Falle der direkt gekoppelten AK, mit einem entsprechenden Isotyp-AK inkubiert wurden. Im Anschluss erfolgten erneut zwei Waschschritte und die Resuspension der Zellen

in 300 µl Fixierungslösung. Zur Berechnung der relativen Fluoreszenzintensität, wurde die unspezifische mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von Zellen, die mit dem sekundären AK oder der Isotyp-Kontrolle inkubiert wurden, vom MFI-Wert der zu analysierenden Probe dividiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Kaluza-Software.

6.5.1.2 Apoptose-Messungen

Zur Quantifizierung von apoptotischen Zellen nach 3pRNA Transfektion, wurden adherente Zellen und Zellen aus dem Zellkultur-Überstand geerntet. Die zu analysierenden Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen und im Anschluss 7 min bei 1200 rpm zentrifugiert. 1 x 10^5 Zellen wurden in 100 µl Binding-Puffer aufgenommen und mit 5 µl Annevin V und 5 µl Propidiumiodid (PI) für 15 min im Dunklen inkubiert. Nach Zugabe weiterer 400 µl Binding-Puffer erfolgte die Analyse mittels eines Durchflusszytometers und der Kaluza Software.

6.5.2 Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen

Für die Gewinnung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) wurde eine Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Die Isolierung erfolgte aus Buffy-Coats von gesunden Spendern. Dazu wurde das Blut 1:1 mit PBS verdünnt und im Anschluss auf 15 ml Separarationsmedium (Ficoll) in 50 ml Falcon-Röhrchen aufgeschichtet. In einem sich anschließenden Zentrifugationsschritt, bei 1800 rpm für 30 min, ohne Bremskraft wurden die PBMC, aufgrund ihrer Dichte, von den Erythrozyten und Granulozyten separiert. Die in der Interphase angereicherten PBMC wurden mittels Pasteurpipette gewonnen und erneut bei 1500 rpm für 10 min zentrifugiert. Nach Aufnahme des Pellets in 50 ml PBS, konnte dieses zur Isolierung polyklonaler NK-Zellen weiter verwendet werden.

6.5.3 Isolierung polyklonaler NK-Zellen aus PBMC

Um NK-Zellen aus PBMC gesunder Spender zu isolieren, wurde die MACS (*magnetic cell sorting*)-Technologie angewandt. Bei diesem Prinzip werden AK, die an kleine Magnetkügelchen gekoppelt sind, spezifisch an Oberflächenmoleküle von Zellen gebunden. Durch das Anlegen eines magnetischen Feldes, können im Anschluss die Zellen, die

spezifisch von einem AK gebunden sind, von ungebundenen Zellen separiert werden, indem sie durch das magnetische Feld zurückgehalten werden.
Zur Isolierung polyklonaler NK-Zellen, wurden im ersten Schritt alle CD3-positiven Zellen entfernt. In einem weiteren Selektionsschritt, wurden anschließend alle CD56-positiven Zellen angereichert. Die Separation wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:
2 x 10^8 PBMC wurden bei 1200 rpm, 7 min zentrifugiert und in 1,6 ml MACS-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 400 µl CD3-spezifischen MACS-Beads für 20 min, 4°C im Dunkeln. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit 2 ml MACS-Puffer und folgender Zentrifugation bei 1200 rpm, 7 min wurde das Pellet in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert und auf eine zuvor mit 3 ml MACS-Puffer voräquilibrierte Säule, die durch Magneten gehalten wurde, gegeben. Durch die Zugabe von weiteren 3 ml Puffer, wurden die CD3-negativen Zellen aus der Säule gespült, während alle CD3-positiven Zellen in der Säule zurückgehalten wurden (negative Selektion). Nach zweimaligem Waschen der Säule mit 1 ml MACS-Puffer, konnten die gewonnenen CD3-negativen Zellen zentrifugiert und anschließend der CD56 Selektion unterzogen werden. Dabei wurde das Pellet in 800 µl MACS-Puffer gelöst und mit 200 µl CD56 MACS-Beads versetzt. Es folgte eine erneute Inkubation für 20 min bei 4°C. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit 2 ml MACS-Puffer und folgender Zentrifugation bei 1200 rpm, für 7 min, wurden die Zellen erneut auf eine zuvor mit 3 ml MACS-Puffer voräquilibrierte Säule gegeben. Alle CD56-positiven Zellen wurden dieses Mal aufgrund ihrer magnetischen Markierung zurückgehalten, während alle CD56-negativen Zellen die Säule passierten. Durch das Entfernen der Säule vom Magneten und Zugabe von 5 ml Medium, konnten die CD3-negativen und CD56-positiven Zellen von der Säule gespült und anschließend bei 1200 rpm, 7 min pelletiert werden. Im Anschluss wurden die isolierten NK-Zellen für 2-3 Tage in Medium (+ 500 U/ml IL-2) kultiviert und anschließend im CD107a Degranulationsassay eingesetzt.

6.5.4 CD107a Degranulationsassay

Zur Analyse der Aktivierung von NK-Zellen wurde der CD107a Degranulationsassay verwendet. Bei CD107a handelt es sich um ein Molekül, welches nach Aktivierung von NK- und T-Zellen auf der Oberfläche exprimiert wird. Für den Assay wurden 3pRNA bzw. Kontroll-RNA transfizierte Melanomzellen mit IL-2 aktivierten NK-Zellen im Verhältnis 1:1, in Anwesenheit eines CD107a-Phycoerythrin (PE) gekoppelten AK bzw. ohne AK, inkubiert.

Nach 1 h wurden die Zellen für zusätzliche 3 h mit 2 mM Monensin koinkubiert, um eine frühzeitige Internalisierung der CD107a Moleküle zu verhindern. Im Anschluss wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und mit AK gegen CD3 und CD56 gefärbt. Die Quantifizierung der CD107a Expression auf den NK-Zellen erfolgte mittels eines Durchflusszytometers und der Kaluza Software.

6.5.5 Nachweis von Zytokinen in Zellkultur-Überständen

6.5.5.1 IFN-γ Enzyme Linked Immuno Spot Technique (IFN-γ ELISPOT)

Durch den IFN-γ ELISPOT kann die Freisetzung von IFN-γ, durch einzelne T-Zellen, nachgewiesen werden. Dabei wird jede IFN-γ produzierende Zelle durch einen farbigen Punkt auf der Membran einer 96-Well-Platte detektiert. Zum Nachweis von IFN-γ produzierenden T-Zellen, nach Inkubation mit 3pRNA bzw. Kontroll-RNA transfizierten Melanomzellen, wurde eine 96-Well-Multiscreen-Platte (Millipore) zunächst mit 25 µl 35% Ethanol/Well für 1 min befeuchtet und im Anschluss 3 x mit 200 µl PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation der Platte mit 75 µl/Well mAK 1-D1K (0,5 µg/ml) in PBS bei 4°C ü.N. Nach viermaligem Waschen der Platte mit 200 µl PBS/Well für 5 min, wurde die Membran mit 180 µl Medium/Well für 1 h bei 37°C blockiert. Anschließend wurde das Medium verworfen und 1 x 10^4 Melanomzellen, mit 1 x 10^4 $CD8^+$ Effektor-T-Zellen, für 20 h in T-Zell-Medium bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen mit PBS/Tween wurde die Platte für 2 h mit 60 µl/Well mAK 7-B6-1-Biotin (1 µg/ml) in PBS/0,5% BSA bei 37°C inkubiert. Es folgte ein erneutes sechsmaliges Waschen mit PBS/Tween und die Zugabe von 100 µl, einer 1:1000 in PBS/0,5% BSA verdünnten, ExtrAvidin-Alkaline Phosphatase Lösung für 1 h bei RT. Anschließend wurde die Platte 3 x mit PBS/Tween und 3 x mit PBS für 3 min gewaschen. Für die Entwicklung der ELISPOTS wurden 100 µl/Well BCIP/NBT Substratlösung hinzugegeben. Nach Sichtbarwerden der IFN-γ Punkte, wurde die Reaktion durch das Waschen der Wells mit H_2O abgestoppt.

6.5.5.2 IFN-γ Enzyme Linked Immunosorbent Assay (IFN-γ ELISA)

Um die IFN-γ Produktion von T-Zellen nach Inkubation mit 3pRNA-transfizierten Melanomzellen bzw. Kontrollzellen nachzuweisen, wurde ein IFN-γ ELISA durchgeführt.

Hierfür wurde zunächst eine 96-Well-Platte mit 100 µl mAK 1-D1K (2 µg/ml) in PBS beschichtet. Nach 24 h wurde die Platte mit 200 µl/Well PBS gewaschen und anschließend mit 200 µl PBS/Tween für 1 h blockiert. Es folgte ein zweimaliges Waschen der Platte mit 200 µl Salinen-Tween. Im Anschluss wurden je 100 µl der IFN-γ Standardverdünnungsreihe (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,15 U/ml) bzw. 100 µl der zu analysierenden Überstände (1:2-1:5 Verdünnung) in die Wells gegeben und die Platte für 1-2 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Platte mit Salinen-Tween, wurden die Wells mit 100 µl mAK 7-B6-1-Biotin (0,1 µg/100 µl) für 1 h inkubiert. Danach folgte erneut ein dreimaliges Waschen mit Salinen-Tween und weiterhin die Zugabe von 100 µl einer 1:1000 verdünnten ExtrAvidin-Alkaline Phosphatase Lösung pro Well für 1 h. Die enzymatische Farbreaktion wurde nach fünfmaligem Waschen, durch die Zugabe von 100 µl pNPP Substratlösung/Well, induziert. Nach 5-10 min Inkubation wurde die Messung bei 405 nm im Spektrometer (Infinite 200) durchgeführt.

6.5.5.3 CCL5/CXCL10 ELISA

Um Melanomzellen bezüglich ihrer CCL5 bzw. CXCL10 Freisetzung nach 3pRNA Transfektion zu untersuchen, wurden die CCL5/CXCL110 ELISA von Biolegend durchgeführt. Der Zellkultur-Überstand der zu analysierenden Zellen wurde geerntet, im Anschluss für 7 min bei 1200 rpm zentrifugiert und in den entsprechenden Assays eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Alle Ansätze wurden als technische Duplikate pipettiert.

6.5.6 Proteasominhibiton

Um den proteasomalen Abbau von Proteinen zu inhibieren, wurden 2 x 10^5 Zellen der Zelllinie UKRV-Mel-18a(PIV5) in 6-Well-Platten ausgesät. Nach 16-20 h wurden die Zellen mit 10 µM des Proteosominhibitors MG132 für 1-24 h behandelt. Nach Herstellung von Zelllysaten konnte die spezifische Proteinexpression mittels Western Blot analysiert werden.

6.5.7 Statistische Auswertung

Für die Berechnung von statistisch signifikanten Unterschieden innerhalb eines Zellsystems, wurde der paarige, zweiseitige t-Test verwendet. Die Auswertungen erfolgten mit der GraphPad Prism Software Version 5.03. Dabei wurde ein $p < 0{,}05$ als signifikant eingestuft.
Die Streuung der Werte eines Merkmals um den Mittelwert wurde als Standardabweichung (SD) in den Abbildungen dargestellt.

7 Ergebnisse

Verschiedene Arbeiten konnten bereits zeigen, dass die Nachahmung einer viralen Infektion in Tumorzellen zu einer verstärkten Ausschüttung von Typ I IFN, proinflammatorischen Zytokinen und zu einer Induktion von Apoptose führt (Besch et al., 2009; Duewell et al., 2014; Kubler et al., 2010). In dieser Arbeit sollte der Einfluss einer synthetisch generierten dsRNA (3pRNA), die an den zytosolischen Rezeptor RIG-I bindet, im Hinblick auf die Immunogenität von Melanomzellen untersucht werden.

7.1 3pRNA induziert Apoptose in einer Subpopulation von Melanomzellen

Um zunächst den Anteil apoptotischer Zellen nach RIG-I Aktivierung zu bestimmen, wurden die humanen Melanomzelllinien Ma-Mel-47 und Ma-Mel-86c mit 3pRNA bzw. einer Kontroll-RNA transfiziert und anschließend alle adherenten und nicht-adherenten Zellen geerntet. Die Analyse der Zellen erfolgte mittels Annexin V und Propidiumiodid (PI)-Färbung. Die 3pRNA Transfektion der Zelllinie Ma-Mel-47 induzierte in 30% der Zellen Apoptose nach 24 h. Bei den Ma-Mel-86c Zellen konnte eine ähnliche Wirksamkeit erst nach 72 h beobachtet werden konnte (Abb. 3). In beiden Zelllinien zeigten etwa 2/3 der Zellen keine Anzeichen einer frühen oder späten Apoptose, 72 h nach 3pRNA Transfektion.

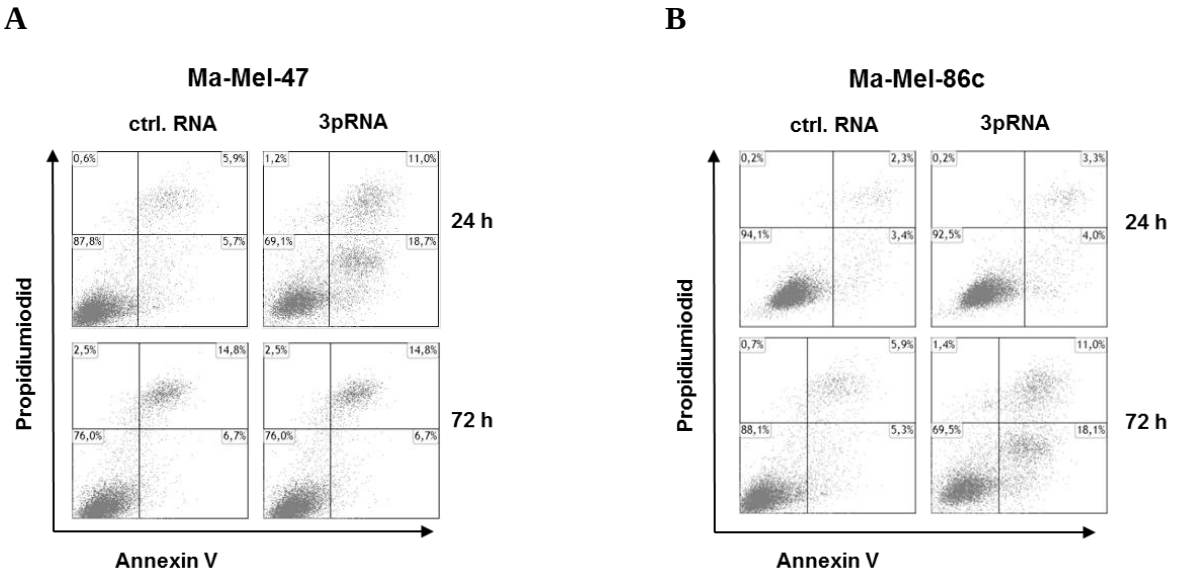


Abb. 3: 3pRNA induziert Apoptose in einer Subpopulation von Melanomzellen
Die Zelllinien Ma-Mel-47 und Ma-Mel-86c wurden mit 3pRNA bzw. Kontroll-RNA (200 ng/ml) transfiziert und der Anteil früh- und spät-apoptotischer Zellen mittels Annexin V/PI-Färbung nach 24 h bzw. 72 h analysiert. Repräsentatives Histogramm der Ma-Mel-47 Zellen (**A**) und Ma-Mel-86c (**B**) Zellen von n=3 Experimenten.

Dieses Ergebnis konnte durch Echtzeit-Proliferationsanalysen weiterhin bestätigt werden. Hierfür wurde die Proliferation der Zellen, mittels des xCELLigence Systems, über einen Zeitraum von mindestens 126 h verfolgt. 3pRNA Transfektion führte in den Zelllinien Ma-Mel-47 und Ma-Mel-86c zu einem Proliferationsstop und einer schwachen Reduktion der Zellzahl ca. 20 h (Ma-Mel-47) bzw. 40 h (Ma-Mel-86c) nach Transfektion (Abb. 4). Nach ca. 40 h (Ma-Mel-47) bzw. ca. 80 h (Ma-Mel-86c) konnte ein erneuter Anstieg der Proliferationskurve und damit eine erneutes Wachstum der überlebenden Zellen beobachtet werden.

Somit konnte gezeigt werden, dass die 3pRNA Transfektion nur in einer Subgruppe von Melanomzellen Apoptose induziert. Etwa 2/3 der Zellen blieben vital und waren in der Lage weiterhin zu proliferieren. Um den Einfluss der 3pRNA Transfektionen auf die Immunogenität von Melanomzellen zu untersuchen, wurden in folgenden Versuchen die adherenten nicht-apoptotischen Zellen untersucht.

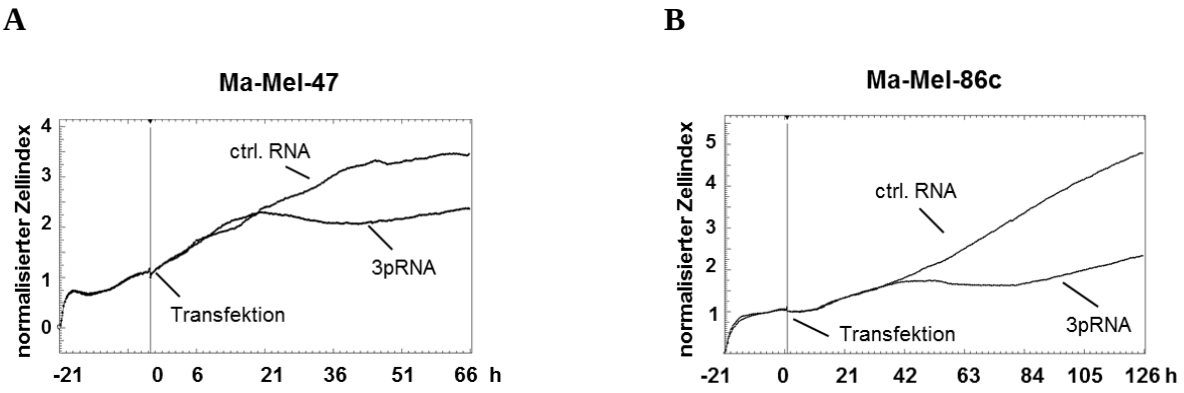


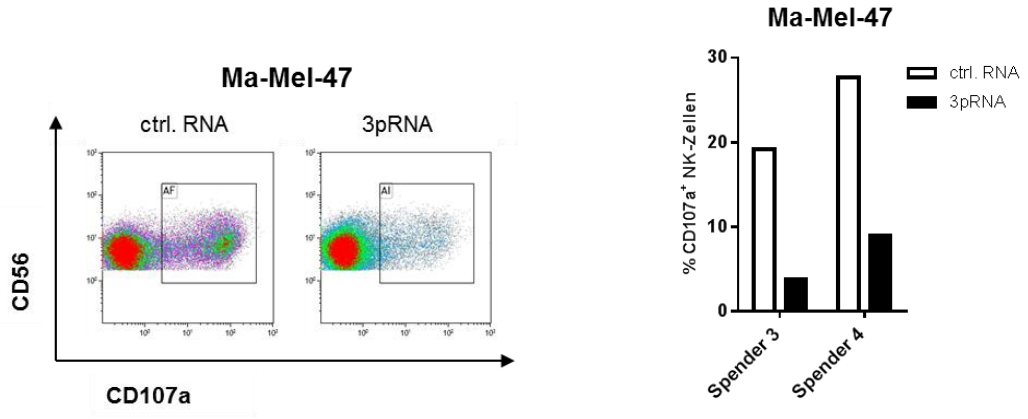
Abb. 4: 3pRNA Transfektion führt zu einem kurzzeitigen Proliferationsstop von Melanomzellen
Die Zelllinien Ma-Mel-47 und Ma-Mel-86c wurden mit 3pRNA bzw. Kontroll-RNA (200 ng/ml) transfiziert. Die Proliferation der Ma-Mel-47 (**A**) und Ma-Mel-86c (**B**) Zellen wurde in Echtzeit über den angegebenen Zeitraum nach Transfektion im xCELLigence System überwacht. Repräsentative Darstellung von n=3 Experimenten.

7.2 3pRNA Transfektion führt nicht zur erhöhten NK-Zell-Sensitivität von Melanomzellen

Virusbefallene Zellen werden durch das angeborene Immunsystem erkannt und bekämpft. Dabei nehmen NK-Zellen eine wichtige Funktion ein. Durch die Bindung verschiedener aktivierender Liganden an ihre entsprechenden Rezeptoren auf NK-Zellen, können diese zytotoxisch aktiviert werden. Um zu analysieren, ob es durch 3pRNA Transfektion zu einer verstärkten NK-Zell-Aktivität kommt, wurden die humanen Melanomzelllinien Ma-Mel-47 und Ma-Mel-86c mit 3pRNA transfiziert und im Anschluss mit allogenen NK-Zellen von gesunden Spendern inkubiert. Die NK-Zell-Aktivierung wurde folgend durch einen CD107a Degranulationsassay bestimmt. Überraschenderweise zeigte eine 3pRNA Transfektion der

Melanomzellen keine erhöhte Oberflächenexpression von CD107a auf NK-Zellen und somit keine verbesserte NK-Zell-Aktivierung (Abb. 5). Es konnte vielmehr ein vermindertes NK-Zell-Ansprechen durch eine verringerte CD107a Oberflächenexpression aller getesteten NK-Zellen detektiert werden.

A



B

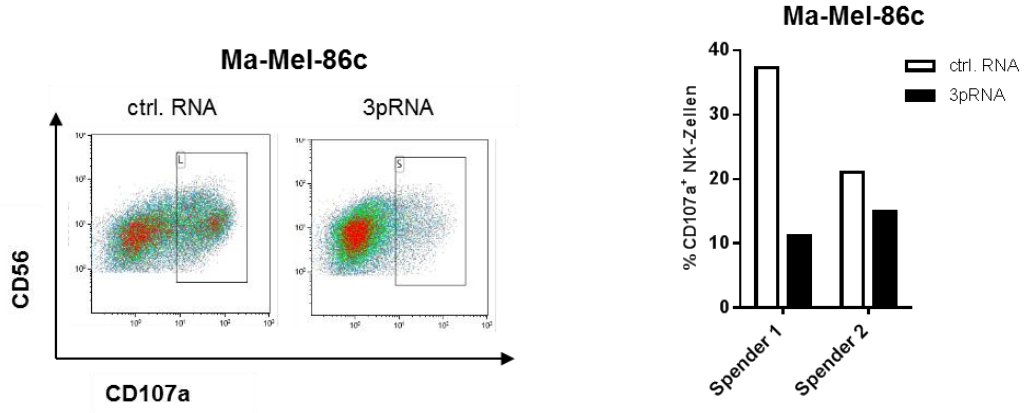


Abb. 5: 3pRNA Transfektion führt nicht zu einer verstärkten Erkennung von Melanomzellen durch NK-Zellen
Ma-Mel-47 und Ma-Mel-86c Zellen wurden mit 3pRNA bzw. Kontroll-RNA (200 ng/ml) für 20-24 h transfiziert und im Anschluss mit allogenen $CD3^{-}CD56^{+}$ NK-Zellen von gesunden Spendern für 4 h inkubiert. Bestimmung der NK-Zell-Aktivität durch den CD107a Degranulationsassay mittels Durchflusszytometrie: CD107a Oberflächenexpression der NK-Zellen nach Inkubation mit 3pRNA-/Kontroll-RNA-transfizierten Ma-Mel-47 (**A**) und Ma-Mel-86c (**B**) Zellen. Links, repräsentative CD107a Expression; rechts, Darstellung von 2 unabhängigen Versuchen.

Um die Ursache der verschlechterten NK-Zell-Aktivierung zu analysieren, wurde im Folgenden die Expression verschiedener aktivierender NK-Zell-Liganden auf Melanomzellen untersucht. Bei den Proteinen ULBP1-3 sowie MICA und MICB handelt es sich um Liganden, die an den aktivierenden NK-Zell-Rezeptor NKG2D binden. Des Weiteren führt die Bindung der Liganden CD112 und CD155 an den NK-Zell-Rezeptor DNAM-1 zu einer Aktivierung dieser Zellen. Durchflusszytometrische Untersuchungen konnten zeigen, dass eine 3pRNA Transfektion der Melanomzellen Ma-Mel-86c und Ma-Mel-47 nicht zu einer gesteigerten Expression der NKG2D-Liganden ULBP1, ULBP2, ULBP3, MICA und MICB

führte (Abb. 6). Lediglich eine Induktion des DNAM-1-Liganden CD112 konnte auf den Ma-Mel-47 Zellen nach 3pRNA Transfektion detektiert werden.

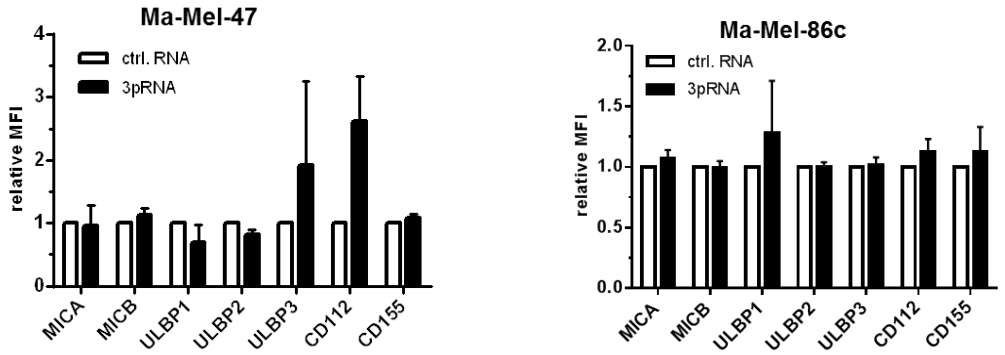


Abb. 6: Keine gesteigerte Expression aktivierender NK-Zell-Liganden durch 3pRNA-transfizierte Melanomzellen
Die Zelllinien Ma-Mel-47 und Ma-Mel-86c wurden mit 3pRNA bzw. Kontroll-RNA (200 ng/ml) für 20-24 h transfiziert. Bestimmung der Oberflächenexpression verschiedener Liganden aktivierender NK-Zell-Rezeptoren mittels Durchflusszytometrie. Darstellung der relativen MFI (+SD) von n=3 Experimenten.

Neben aktivierenden Liganden wird die NK-Zell-Aktivität auch durch Liganden inhibierender Rezeptoren kontrolliert. Eine zentrale Rolle nimmt hierbei das HLA Klasse I Molekül ein, welches unter anderem an die inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren KIR, NKR-P1 und CD94/NKG2(A/B) bindet. Die 3pRNA Transfektion der Ma-Mel-47 und Ma-Mel-86c Zellen führte in beiden Fällen zu einer deutlich gesteigerten Oberflächenexpression der HLA Klasse I Moleküle (Abb. 7). Das HLA Klasse II Molekül HLA-DR, welches unter anderem an den inhibitorischen NK-Zell-Rezeptor LAG-3 bindet, wurde hingegen nicht induziert.
Insgesamt lassen die Beobachtungen vermuten, dass die 3pRNA Transfektion, durch die induzierte Expression des inhibierenden NK-Zell-Liganden HLA Klasse I und der nahezu unveränderten Expression von aktivierenden NK-Zell-Liganden, zu einer verschlechterten Erkennung von Melanomzellen durch NK-Zellen führt.

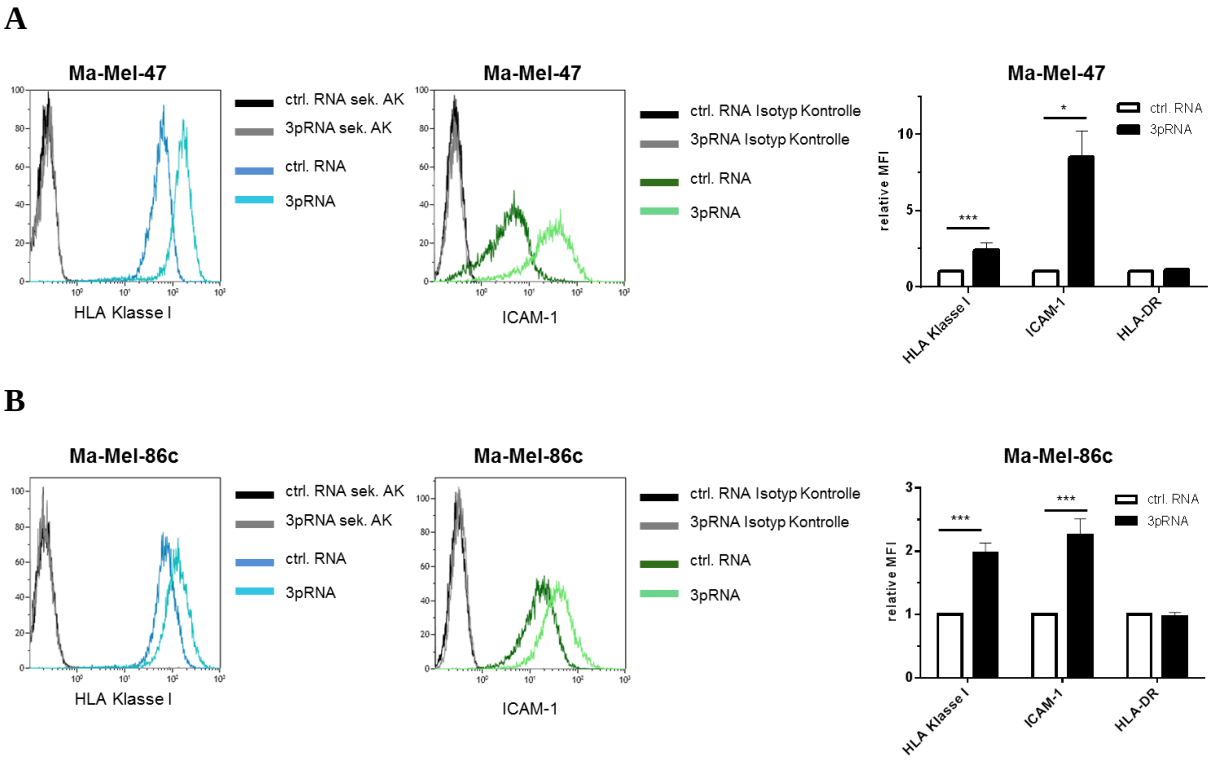


Abb. 7: 3pRNA Transfektion steigert die Oberflächenexpression von HLA Klasse I und ICAM-1 Molekülen
Ma-Mel-47 (**A**) und Ma-Mel-86c (**B**) Zellen wurden mit 3pRNA bzw. Kontroll-RNA (200 ng/ml) für 20-24 h transfiziert. Bestimmung der HLA Klasse I, ICAM-1 und HLA-DR Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie. Links, repräsentatives Histogramm der HLA Klasse I und ICAM-1 Expression; rechts, Darstellung der relativen MFI (+SD) von n=3 Experimenten. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005.

7.3 3pRNA Transfektion von Melanomzellen verbessert die Erkennung durch autologe CD8$^+$ T-Zellen

Neben der Inhibierung von NK-Zellen spielt das HLA Klasse I Molekül bei der Aktivierung von T-Zellen eine entscheidende Rolle. Dabei werden HLA Klasse I-Antigen-Komplexe spezifisch durch den TCR von CD8$^+$ T-Zellen erkannt und führen so zu einer zytotoxischen Antwort dieser Zellen. Wie in Abbildung 7 gezeigt, führte die Transfektion von Melanomzellen mit 3pRNA zu einer gesteigerten Expression von HLA Klasse I Molekülen. Zusätzlich konnte eine Induktion des Adhäsionsmoleküls ICAM-1, welches die Interaktion zwischen dem TCR von CD8$^+$ T-Zellen und HLA Klasse I-Antigen-Komplexen unterstützt, nachgewiesen werden.

Um zu analysieren, ob die erhöhte Expression von HLA Klasse I Molekülen einen Einfluss auf die Aktivierung spezifischer CD8$^+$ T-Zellen hat, wurde die Menge an IFN-γ produzierenden T-Zellen nach Inkubation mit 3pRNA- oder Kontroll-RNA-transfizierten Melanomzellen, gemessen. Die Melanomzelllinie Ma-Mel-86c wurde mit 3pRNA bzw. Kontroll-RNA transfiziert und im Anschluss mit autologen CD8$^+$ T-Zellen inkubiert. Es

wurden zwei verschiedene T-Zell-Klone verwendet, die beide ein Epitop des Differenzierungsantigens Tyrosinase erkennen. Nach 24 h wurde die Anzahl an IFN-γ produzierenden T-Zellen, durch einen IFN-γ ELISPOT Assay, gemessen. Im Vergleich zu den Kontrollzellen führte die Inkubation der $CD8^+$ T-Zellen, mit 3pRNA-transfizierten Melanomzellen, zu einer deutlich verstärkten T-Zell-Aktivierung, während T-Zellen, welche ohne Tumorzellen inkubiert wurden, keine basale IFN-γ Produktion zeigten (Abb. 8).

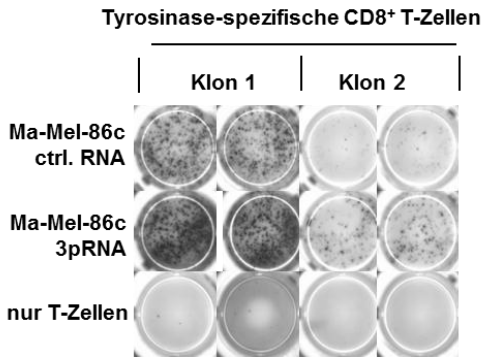


Abb. 8: 3pRNA Transfektion von Melanomzellen induziert die Aktivierung von autologen $CD8^+$ T-Zellen
Ma-Mel-86c Zellen wurden mit 3pRNA bzw. Kontroll-RNA (200 ng/ml) für 24 h transfiziert und im Anschluss mit autologen, Tyrosinase-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen für 24 h inkubiert. Die Aktivierung der T-Zellen wurde mittels IFN-γ ELISPOT Assay bestimmt. Darstellung eines repräsentativen Ergebnisses von n=3 Experimenten.

Um den Mechanismus der verbesserten T-Zell-Erkennung zu ermitteln, wurde im Anschluss die Expression der APM untersucht. Diese generiert zunächst über das Proteasom und verschiedene weitere zytosolische Proteasen kleine Antigenpeptide, welche dann im ER auf HLA Klasse I Moleküle geladen und anschließend über Golgi-Vesikel zur Zelloberfläche transportiert werden. Mittels qRT-PCR generierte Daten zeigten, dass verschiedene APM Komponenten durch 3pRNA Transfektion deutlich induziert wurden (Abb. 9A). Hierbei wurden sowohl die HLA Klasse I Untereinheiten *B2M* und *HLA-A* als auch eine katalytische Untereinheit des Immunoproteasoms (*LMP2*) sowie die Transporter *TAP1*, *TAP2* und *TAPBP*, welche am Überführung von Peptiden in das ER beteiligt sind, analysiert. Die gesteigerte Expression ausgewählter APM Komponenten, wie LMP2, TAP1 und der schweren Ketten der HLA Klasse I Moleküle, konnten ebenfalls auf Proteinebene bestätigt werden (Abb. 9B).
Somit konnte gezeigt werden, dass 3pRNA die Immunogenität von Melanomzellen durch eine gesteigerte Expression von APM Komponenten erhöht, was zu einer verstärkten Aktivierung von $CD8^+$ T-Zellen führt.

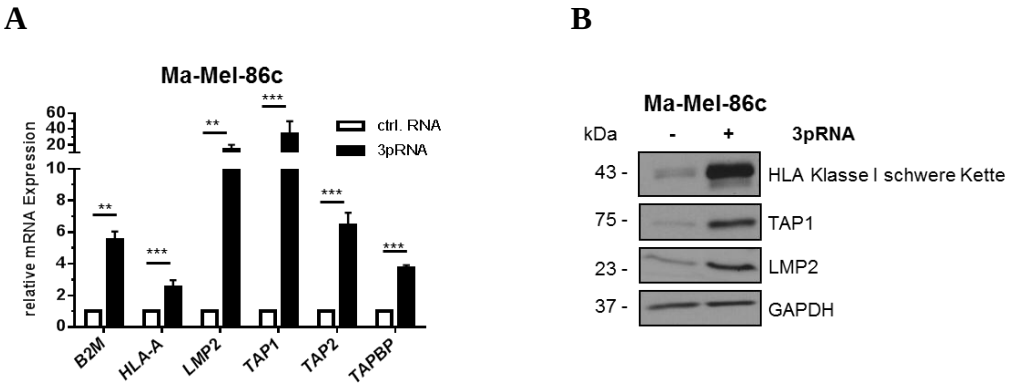


Abb. 9: 3pRNA Transfektion induziert die Expression von APM Komponenten in Melanomzellen
Die Zelllinie Ma-Mel-86c wurde mit 3pRNA bzw. Kontroll-RNA (200 ng/ml) für 20-24 h transfiziert. (**A**) Bestimmung der APM mRNA Expression mittels qRT-PCR. Die Menge an spezifischer mRNA wurde auf die endogene *GAPDH* mRNA Menge normalisiert. Darstellung der relativen Expression von n=3 Experimenten (+SD; **p<0,01, ***p<0,005). (**B**) Bestimmung der APM Proteinexpression mittels Western Blot. Darstellung eines repräsentativen Ergebnisses von n=3 Experimenten.

7.4 RIG-I Aktivierung induziert die Expression von Typ I Interferonen

In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass 3pRNA über die Bindung an den zytosolischen Rezeptor RIG-I zu einer Induktion von Type I IFN führt (Besch et al., 2009; Duewell et al., 2014; Kubler et al., 2010; Schlee et al., 2009). Wie in Abbildung 10A und 10B dargestellt, führte eine Transfektion der Zelllinie Ma-Mel-86c mit 3pRNA sowohl zu einer deutlich erhöhten Expression des Rezeptors RIG-I als auch zu einer starken Induktion der *IFN-β* mRNA. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die 3pRNA Transfektion die Expression des OAS3 Proteins, welches als Zielgen der Typ I IFN Signalgebung beschrieben ist, induzierte (Abb. 10A). Neben der Fähigkeit auf 3pRNA Transfektion mit einer Typ I IFN Produktion zu reagieren, konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung der Ma-Mel-86c Zellen mit IFN-α und IFN-γ zu einer Hochregulation der Oberflächenexpression von HLA Klasse I und ICAM-1 Molekülen führte (Abb. 10C). Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass 3pRNA die Immunogenität von Melanomzellen, abhängig von der autokrinen Typ I IFN Signalgebung, moduliert.

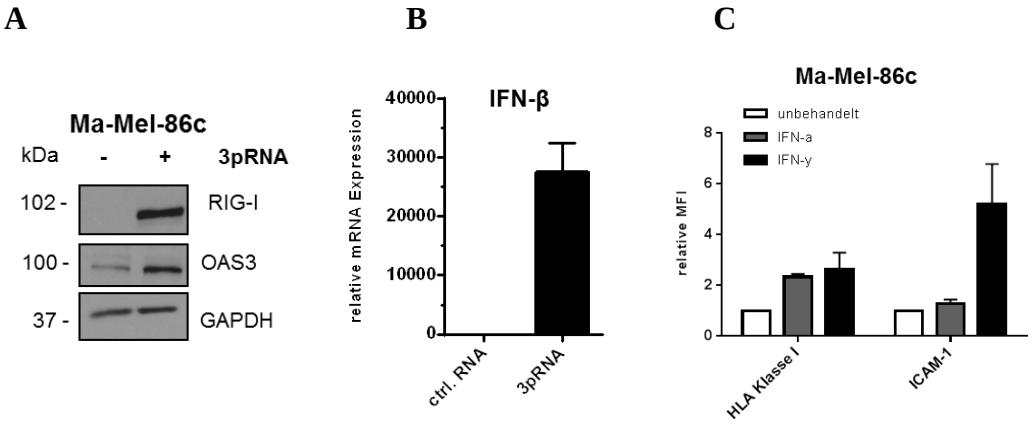


Abb. 10: 3pRNATransfektion induziert die RIG-I Signalgebung
(**A,B**) Ma-Mel-86c Zellen wurden mit 3pRNA bzw. Kontroll-RNA (200ng/ml) für 20-24 h transfiziert. (**A**) Bestimmung der RIG-I und OAS3 Proteinexpression mittels Western Blot. Darstellung eines repräsentativen Ergebnisses von n=3 Experimenten. (**B**) Bestimmung der *IFN-β* mRNA Expression mittels qRT-PCR. Die Menge an spezifischer mRNA wurde auf die endogene *GAPDH* mRNA Menge normalisiert. Darstellung der relativen Expression (+SD) von n=3 Experimenten. (**C**) Ma-Mel-86c Zellen wurden mit IFN-α (1000 U/ml) oder IFN-γ (500 U/ml) für 20-24 h behandelt. Die Kontrollzellen blieben unbehandelt. Bestimmung der HLA Klasse I und ICAM-1 Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie. Darstellung der relativen MFI (+SD) von n=3 Experimenten.

7.5 RIG-I Aktivierung erhöht die Immunogenität von Melanomzellen unabhängig von der Typ I IFN Signalgebung

Ausgehend von der Hypothese, dass eine intakte IFN Signalgebung für die 3pRNA-induzierte Immunogenität von Melanomzellen essentiell ist, wurde die humane IFN-resistente Melanomzelllinie Ma-Mel-61g für weitere Analysen ausgewählt. Diese Zelllinie wurde aus einer Metastase des Patienten Ma-Mel-61 generiert und ist aufgrund einer Mutation im *JAK1-Gen* insensitiv gegenüber IFN. (Identifizierung der *JAK1* Mutation: Antje Sucker, Klinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Essen). Wie durch Western Blot Analysen gezeigt, führte eine Typ I bzw. Typ II IFN Behandlung der Ma-Mel-61g Zellen nicht zu einer Induktion und/ oder Phosphorylierung des STAT1(Tyr701) Proteins und somit auch nicht zu einer Hochregulation der Oberflächenexpression von HLA Klasse I oder ICAM-1 Molekülen (Abb. 11A und Abb. 11B). Überraschenderweise konnte durch 3pRNA Transfektion der IFN-resistenten Ma-Mel-61g Zellen eine Hochregulation der HLA Klasse I und ICAM-1 Molekülen auf der Zelloberfläche dieser Zellen erreicht werden (Abb. 11C). Zusätzlich konnte, wie auch für die Ma-Mel-86c Zellen, eine gesteigerte Expression der APM Komponenten auf mRNA- und Protein-Ebene detektiert werden (Abb. 11D und Abb. 11E). Die Inkubation von 3pRNA-transfizierten Ma-Mel-61g Zellen, mit autologen $CD8^+$ T-Zellen, führte zu einer verstärkten IFN-γ Produktion der $CD8^+$ T-Zellen (Abb. 11F).

Um zu analysieren, ob es neben einer verstärkten IFN-γ Freisetzung durch die $CD8^+$ T-Zellen, auch zu einer verstärkten Lyse der Tumorzellen durch eine 3pRNA Transfektion kommt,

wurden erneut Ma-Mel-61g Zellen mit 3pRNA transfiziert und mit autologen $CD8^+$ T-Zellen inkubiert. Der Zellindex der Melanomzellen wurde mittels des xCELLigence Systems 0-74 h nach T-Zell-Zugabe gemessen. Die Inkubation der 3pRNA-transfizierten Tumorzellen mit $CD8^+$ T-Zellen führte zu einem deutlich stärkeren Abfall des Signals, gleichbedeutend einer deutlich verringerten Tumorzellzahl im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 11G). Die stärkste Reduktion konnte bei einem Tumor-T-Zell-Verhältnis von 1:2 detektiert werden. Ein höheres Effektor-Target-Verhältnis führte zu einer schnellen, fast vollständigen Elimination aller 3pRNA und Kontroll-RNA transfizierten Tumorzellen.

Die dargestellten Daten weisen darauf hin, dass 3pRNA die Immunogenität von Melanomzellen, auch unabhängig von einer funktionellen Typ I IFN Signalgebung, erhöht. Neben einer verstärkten Aktivierung, nach Inkubation mit 3pRNA-transfizierten Tumorzellen, kommt es außerdem zu einer verstärkten Tötung der Melanomzellen durch die $CD8^+$ T-Zellen.

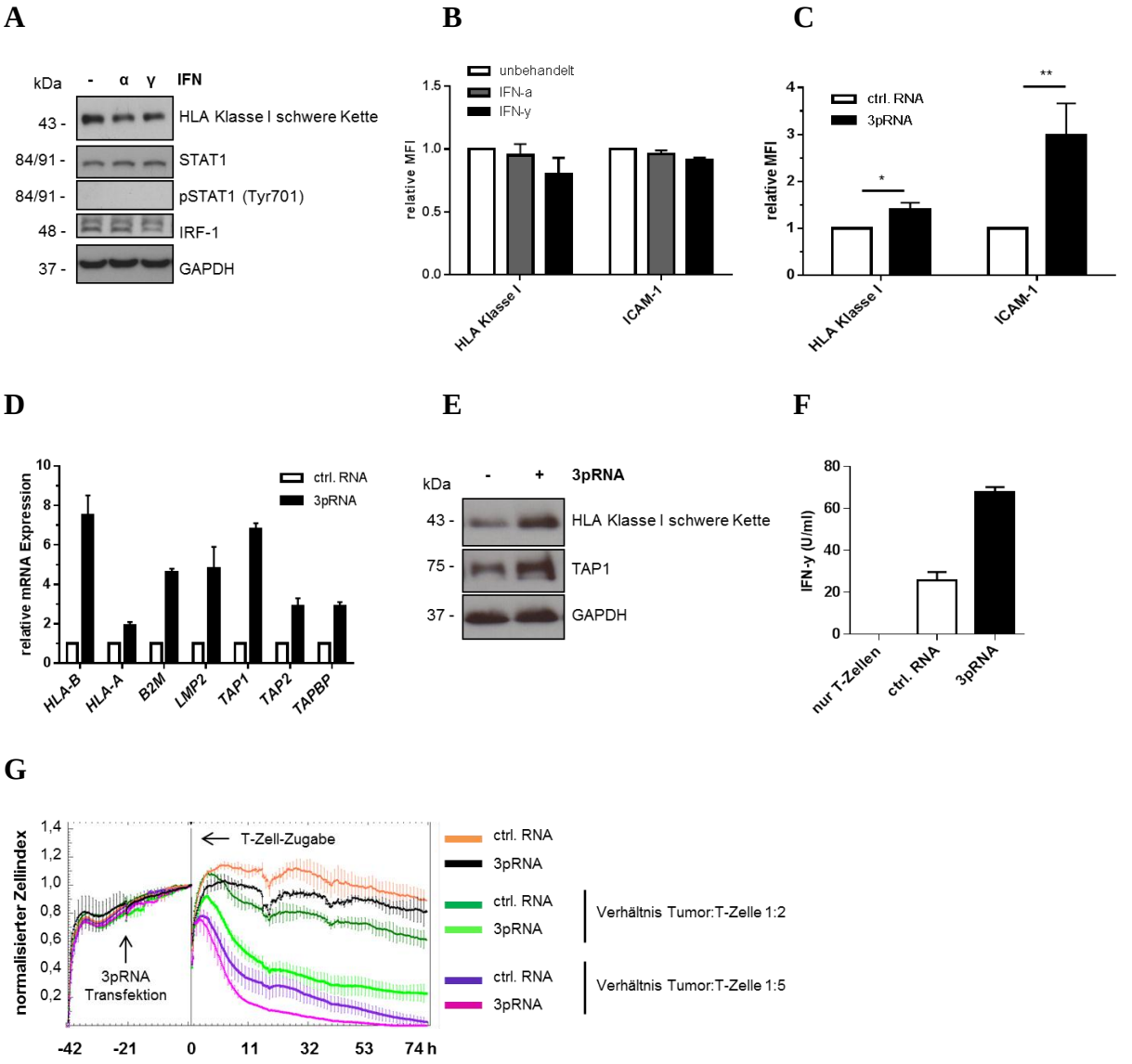


Abb. 11: 3pRNA erhöht die Immunogenität von Melanomzellen unabhängig von der Typ I IFN Signalgebung
(**A,B**) Die JAK1-defiziente Zelllinie Ma-Mel-61g wurde mit IFN-α (1000 U/ml) oder IFN-γ (500 U/ml) für 20-24 h behandelt. Die Kontrollzellen blieben unbehandelt. (**A**) Bestimmung der Proteinexpression mittels Western Blot. Darstellung eines repräsentativen Ergebnisses von n=3 Experimenten. (**B**) Bestimmung der HLA Klasse I und ICAM-1 Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie. Darstellung der relativen MFI (+SD) von n=3 Experimenten. *p<0,05, **p<0,01. (**D-G**) Ma-Mel-61g Zellen wurden mit 3pRNA bzw. Kontroll-RNA (200 ng/ml) für 20-24 h transfiziert. (**D**) Bestimmung der APM mRNA Expression mittels qRT-PCR. Die Menge an spezifischer mRNA wurde auf die endogene *GAPDH* mRNA Mengel normalisiert. Darstellung der relativen Expression von n=3 Experimenten (+SD). (**E**) Bestimmung der APM Proteinexpression mittels Western Blot. Darstellung eines repräsentativen Ergebnisses von n=3 Experimenten. (**F**) Die 3pRNA-transfizierten Melanomzellen wurden für 24 h mit autologen $CD8^+$ T-Zellen inkubiert und die Zellkultur-Überstande im Anschluss geerntet. Die Auswertung erfolgte mittels IFN-γ ELISA. Darstellung der mittleren IFN-γ Expression von n=3 Experimenten (+SD). (**G**) Die 3pRNA-transfizierten Melanomzellen wurden mit autologen $CD8^+$ T-Zellen inkubiert und der Zellindex mittels des xCELLigence Systems 0-74 h nach T-Zell-Zugabe gemessen. Repräsentative Darstellung von n=3 Experimenten.

7.6 RIG-I Aktivierung induziert die STAT1 Expression unabhängig von einer funktionellen Typ I IFN Signalgebung

Durch Dempoya und dessen Kollegen konnte bereits 2012 eine Typ I IFN-unabhängige Phosphorylierung des STAT1(Tyr701) Proteins, nach dsRNA Transfektion, nachgewiesen werden (Dempoya et al., 2012). Um zu analysieren, ob die *JAK1*-mutierten Ma-Mel-61g Zellen ebenfalls eine IFN-unabhängige STAT1 Aktivierung aufwiesen, wurden diese Zellen erneut mit 3pRNA transfiziert. Die Zelllinie Ma-Mel-61b, welche aus einer weiteren Metastase des Patienten Ma-Mel-61 generiert wurde, diente, aufgrund ihres funktionellen Typ I IFN Signalwegs, als Kontrollzelllinie. Wie zu erwarten, führte eine IFN-γ Behandlung der Ma-Mel-61b Zellen, nicht aber der Ma-Mel-61g Zellen, zu einer gesteigerten HLA Klasse I und ICAM-1 Oberflächenexpression (Anhang Abb. 21 und Abb. 11B). Weitere Analysen der IFN-sensitiven Ma-Mel-61b und der IFN-resistenten Ma-Mel-61g Zellen zeigten jedoch eine deutlich verstärkte Expression des STAT1 Proteins, nach 3pRNA Transfektion, in beiden Zelllinien. (Abb. 12A). Zusätzlich konnte eine Induktion der STAT1(Tyr701) Phosphorylierung und eine verstärkte Expression des TF IRF-9, nach 3pRNA Transfektion, nachgewiesen werden. Die Expression des STAT1 Proteins, sowie dessen Phosphorylierung wurde in den IFN-sensitiven Ma-Mel-61b deutlich stärker als in den IFN-resistenten Ma-Mel-61g Zellen induziert. Sowohl in den Ma-Mel-61b Zellen als auch in den Ma-Mel-61g Zellen konnte eine Induktion von RIG-I und OAS3 im Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 12B). Quantitative PCR Daten zeigten außerdem eine Induktion der *IFN-β* mRNA in den IFN-sensitiven Ma-Mel-61b und den IFN-resistenten Ma-Mel-61g Zellen (Abb. 12C). Ähnlich wie für die STAT1 Expression konnte in den Ma-Mel-61b Zellen jedoch eine deutlich stärkere *IFN-β* Induktion als in den Ma-Mel-61g Zellen nachgewiesen werden.

Durch die Analysen der Typ I IFN-resistenten und Typ I IFN-sensitiven Melanomzellen konnte eine Typ I IFN-unabhängige Aktivierung des STAT1 Proteins nach 3pRNA Transfektion nachgewiesen werden. Diese fiel jedoch in den IFN-resistenten Ma-Mel-61g schwächer aus als in den IFN-sensitiven Ma-Mel-61b. Außerdem zeigen die Daten, dass die 3pRNA Transfektion die RIG-I Signalgebung sowie die Typ I IFN Expression in beiden Zelltypen induzierte.

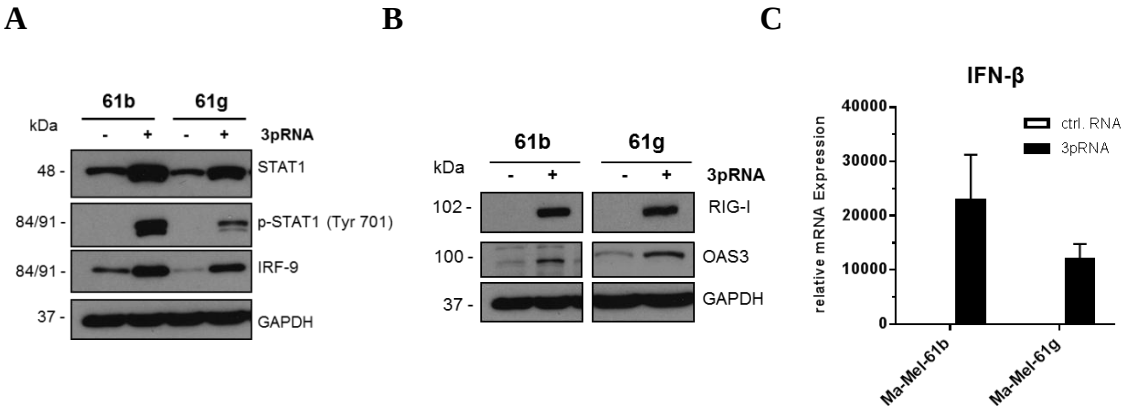


Abb. 12: RIG-I Aktivierung induziert die STAT1 Expression unabhängig von einer funktionellen Typ I IFN Signalgebung
Die Zelllinien Ma-Mel-61b und Ma-Mel-61g wurden mit 3pRNA bzw. Kontroll-RNA (200 ng/ml) für 20-24 h transfiziert. (**A**) Bestimmung der STAT1 und IRF-9 Proteinexpression mittels Western Blot. Darstellung eines repräsentativen Ergebnisses von n=3 Experimenten. (**B**) Bestimmung der RIG-I und OAS3 Proteinexpression mittels Western Blot. Darstellung eines repräsentativen Ergebnisses von n=3 Experimenten. (**C**) Bestimmung der *IFN-β* mRNA Expression mittels qRT-PCR. Die Menge an spezifischer mRNA wurde auf die endogene *GAPDH* mRNA Menge normalisiert. Darstellung der relativen Expression von n=3 Experimenten (+SD).

7.7 Die STAT1 Expression ist nicht essentiell für eine 3pRNA-vermittelte Induktion der Immunogenität

Das STAT1 Protein ist in der Literatur als Induktor von APM Komponenten beschrieben (Chatterjee-Kishore et al., 1998; Respa et al., 2011). Um die Rolle von STAT1 in der 3pRNA-vermittelten Induktion der APM zu untersuchen, wurde auf einen IFN-resistenten Klon der Melanomzelllinie UKRV-Mel-18a(gesamt) zurückgegriffen. Untersuchungen des Zellklons ergaben, dass dieser, trotz der Expression von *STAT1* mRNA, keine STAT1 Proteinexpression aufwies (Anhang Abb. 22 und Abb. 13A). Durch Klonierungsarbeiten konnten Mutationen im *STAT1* Gen jedoch ausgeschlossen werden. Virale Proteine, wie das V-Protein des Parainfluenza-Virus 5 (PIV5), induzieren den proteasomalen Abbau von STAT1 durch Ubiquitinierung (Didcock et al., 1999; Precious et al., 2005). Durch analytische Untersuchungen, konnte das PIV5 in den UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen nachgewiesen werden (Anhang Abb. 23). Um zu analysieren, ob ein verstärkter proteosomaler Abbau des STAT1 Proteins zum Verlust der STAT1 Expression in den UKRV-Mel-18a(PIV5) führte, wurden die UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen mit dem Proteasominhibitor MG132 behandelt. Die Inhibition des Proteasoms führte bereits nach 1 h zu einer Induktion der STAT1 Expression in den UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen (Abb. 13A). Zusätzlich zeigte sich eine verstärkte Expression des Tumorsuppressors p53, welcher bekanntermaßen durch das 26S Proteasom abgebaut wird (Love et al., 2013).

Wie in Abbildung 13A dargestellt, konnte sowohl das V-Protein als auch das P-Protein des PIV5 in den UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen mittels Western Blot nachgewiesen werden.
Weiterhin konnte durch die Verwendung eines PIV5-Tag mAK das V- und das P-Protein aus den UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen immunpräzipitiert werden (Abb. 13B). Als Kontrollzellen dienten bei diesem Versuch die IFN-sensitiven Melanomzellen UKRV-Mel-18b, welche aus einer weiteren Metastase des UKRV-Mel-18 Patienten generiert wurden. Weder in den Proteinlysaten der UKRV-Mel-18b Zellen noch nach der Immunpräzipitation (IP) konnten Proteine des PIV5 in den UKRV-Mel-18b Zellen nachgewiesen werden. Die zusätzlich analysierten HEK-Zellen wiesen ebenfalls keine PIV5 Proteinexpression auf. Um die Funktionalität des PIV5 in den UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen zu untersuchen, wurde eine Co-IP mit einem, gegen das DDB1- (*damage-specific DNA binding protein 1*) Protein gerichteten, AK durchgeführt. Bei DDB1 handelt es sich um einen Interaktionspartner des V-Proteins des PIV5, welcher in nicht-infizierten Zellen an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt ist. Während DDB1 in den UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen co-immunopräzipitiert werden konnte, zeigte sich keine Präzipitation des DDB1 Proteins in den UKRV-Mel-18b- und den HEK-Zellen, obwohl beide Zelllinien eine basale DDB1 Expression aufwiesen (Abb. 13C).

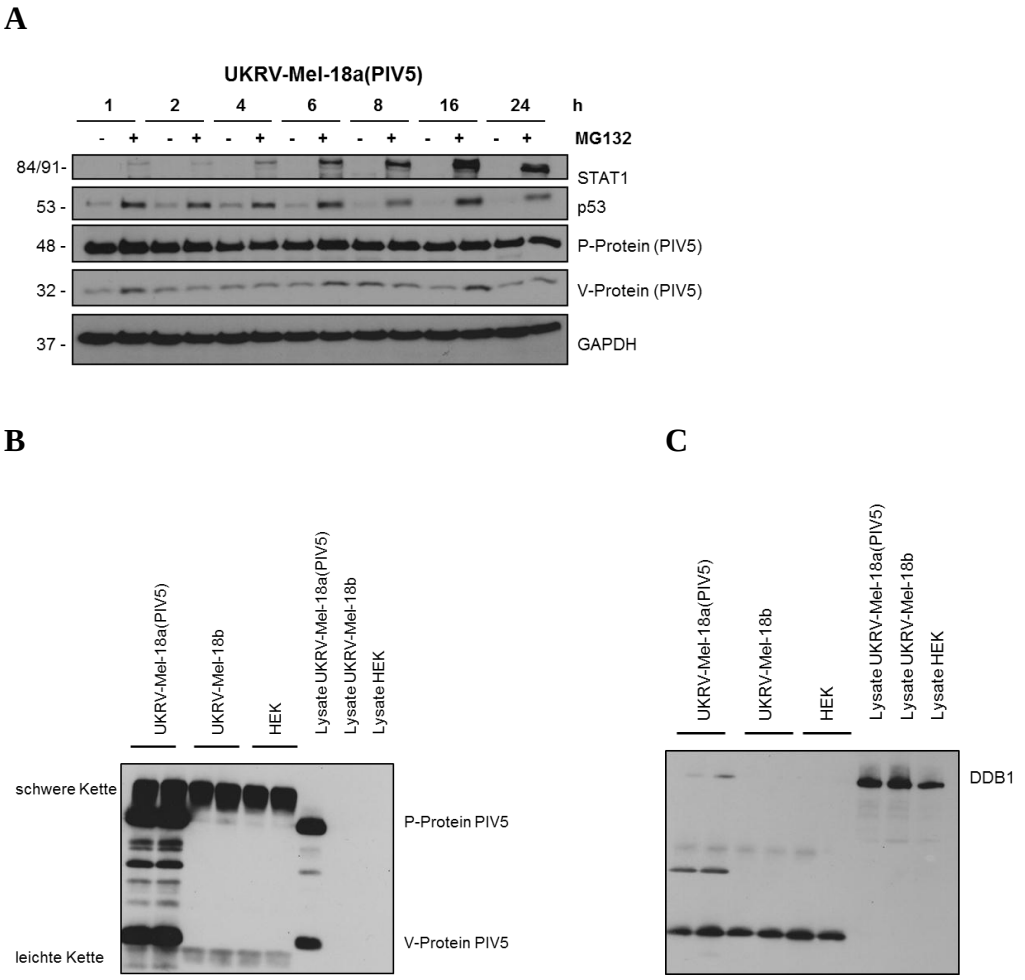


Abb. 13: PIV5 Infektion der UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen führt zur proteasomalen Degradation von STAT1
(**A**) Die Zelllinie UKRV-Mel-18a(PIV5) wurde mit dem Proteasominhibitor MG132 (10 µM) 0-24 h behandelt. Bestimmung der Proteinexpression von STAT1, p53 und der PIV5 Proteine P-Protein und V-Protein mittels Western Blot. Darstellung eines repräsentativen Ergebnisses von n=2 Experimenten. (**B,C**) IP der PIV5 Proteine P-Protein und V-Protein mittels eines PIV5-Tag mAK (**B**) und des DDB1 Proteins mittels eines DDB1 pAK (**C**) in den Zelllinien UKRV-Mel-18a(PIV5), UKRV-Mel-18b und HEK. Als Kontrolle wurden zusätzlich Proteinlysate der Zelllinien aufgetragen. Bestimmung der Proteinexpression mittels Western Blot.

Wie in Abbildung 14A dargestellt, führte eine IFN Behandlung der UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen weder zu einer Induktion des STAT1 Proteins noch zu einer verstärkten Expression der schweren Kette der HLA Klasse I Moleküle. Die Behandlung der UKRV-Mel-18b Zellen hingegen führte zu einer deutlichen Induktion beider Proteine. Durchflusszytometrische Analysen bestätigten dieses Ergebnis, indem eine Hochregulation der Oberflächenexpression von HLA Klasse I und ICAM-1 Molekülen, nach IFN Behandlung, nur auf den UKRV-Mel-18b, nicht aber auf den UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen, beobachtet werden konnte (Abb. 14B und Abb. 14C).

Die 3pRNA Transfektion der UKRV-Mel-18a(PIV5) und der UKRV-Mel-18b Zellen führte, wie in den Ma-Mel-86c und den Ma-Mel-61g Zellen, zu einer Induktion der Proteine RIG-I und OAS3 und der *IFN-β* mRNA (Abb. 14D und Abb. 14E).

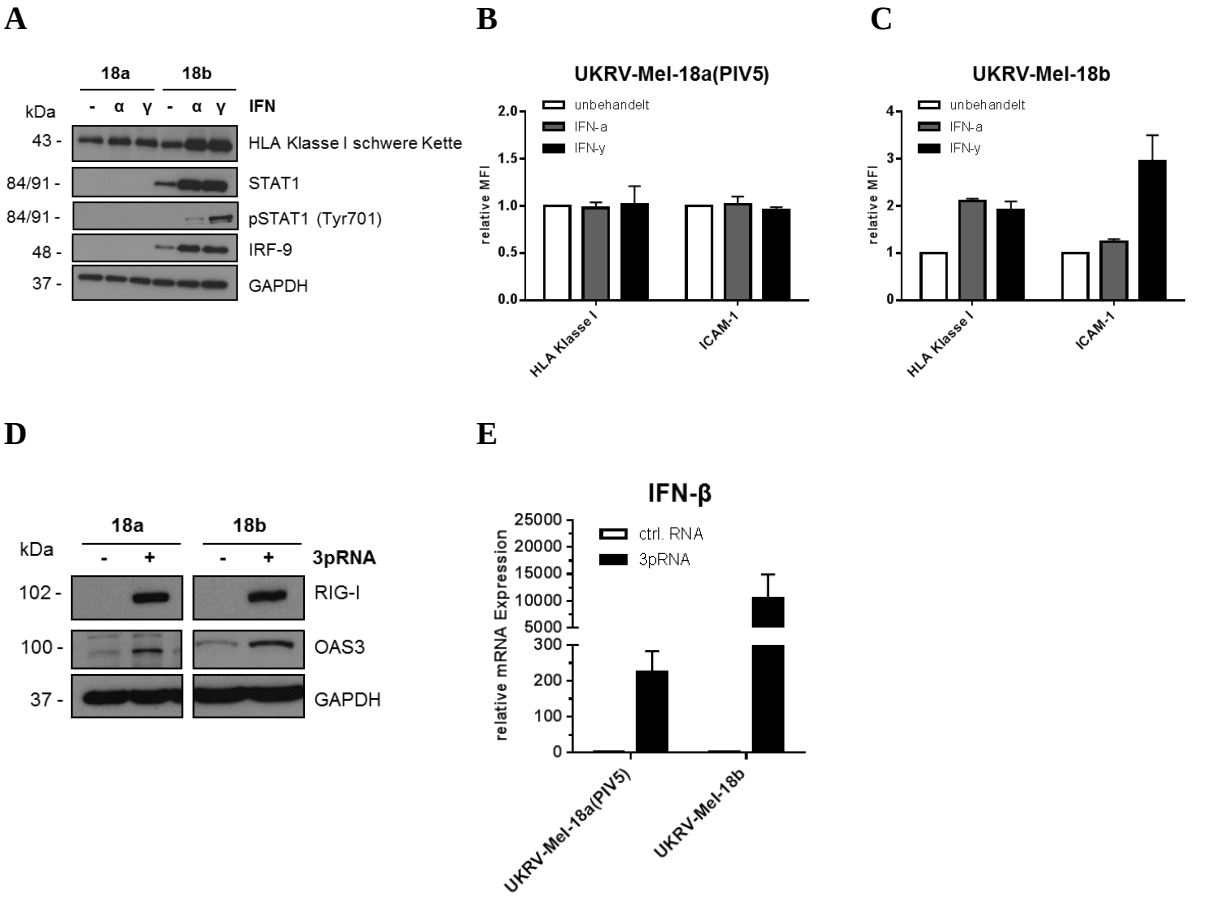


Abb. 14: 3pRNA Transfektion induziert die Typ I IFN Expression in den STAT1-negativen Melanomzellen UKRV-Mel-18a(PIV5)
(**A-C**) Die Zelllinien UKRV-Mel-18a(PIV5) und UKRV-Mel-18b wurden mit IFN-α (1000 U/ml) oder IFN-γ (500 U/ml) für 20-24 h behandelt. Die Kontrollzellen blieben unbehandelt. (**A**) Bestimmung der Proteinexpression der schweren Kette des HLA Klasse I Moleküls, STAT1 und IRF-9 mittels Western Blot. Darstellung eines repräsentativen Ergebnisses von n=3 Experimenten. (**B,C**) Bestimmung der HLA Klasse I und ICAM-1 Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie. Darstellung der relativen MFI von n=3 Experimenten (+SD). (**D,E**) Die Zelllinien UKRV-Mel-18a(PIV5) und UKRV-Mel-18b wurden mit 3pRNA bzw. Kontroll-RNA (200 ng/ml) für 20-24 h transfiziert (**D**) Bestimmung der RIG-I und OAS3 Proteinexpression mittels Western Blot. Darstellung eines repräsentativen Ergebnisses von n=3 Experimenten. (**E**) Bestimmung der *IFN-β* mRNA Expression mittels qRT-PCR. Die Menge an spezifischer mRNA wurde auf die endogene *GAPDH* mRNA Menge normalisiert. Darstellung der relativen Expression von n=3 Experimenten (+SD).

Überraschenderweise konnte durch 3pRNA Transfektion sowohl in den UKRV-Mel-18b als auch UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen eine gesteigerte Oberflächenexpression von HLA Klasse I und ICAM-1 Molekülen induziert werden (Abb. 15A und Abb. 15B). Außerdem zeigte sich eine starke Induktion aller getesteten APM Komponenten sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene (Abb. 15C-E). Die Inkubation von MelanA-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen mit 3pRNA-transfizierten UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen, führte zusätzlich zu einer verstärkten IFN-γ Produktion der T-Zellen, obwohl diese bereits eine starke Aktivierung nach Inkubation mit ctrl. RNA transfizierten Melanomzellen aufwiesen (Abb. 15F). Eine melanomzell-unabhängige Expression von IFN-γ, durch die T-Zellen konnte hingegen nicht beobachtet werden. Da die 3pRNA Transfektion der UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen nicht zu einer Stabilisierung des STAT1 Proteins in diesen Zellen führte, lassen die Ergebnisse auf

einen STAT1-unabhängigen Mechanismus, zur Erhöhung der Immunogenität von Melanomzellen durch 3pRNA, schließen (Abb. 15C).

Insgesamt weisen die dargestellten Daten darauf hin, dass die durch 3pRNA-vermittelte Immunogenität von Melanomzellen über einen IFN- und STAT1-unabhängigen Mechanismus induziert werden kann.

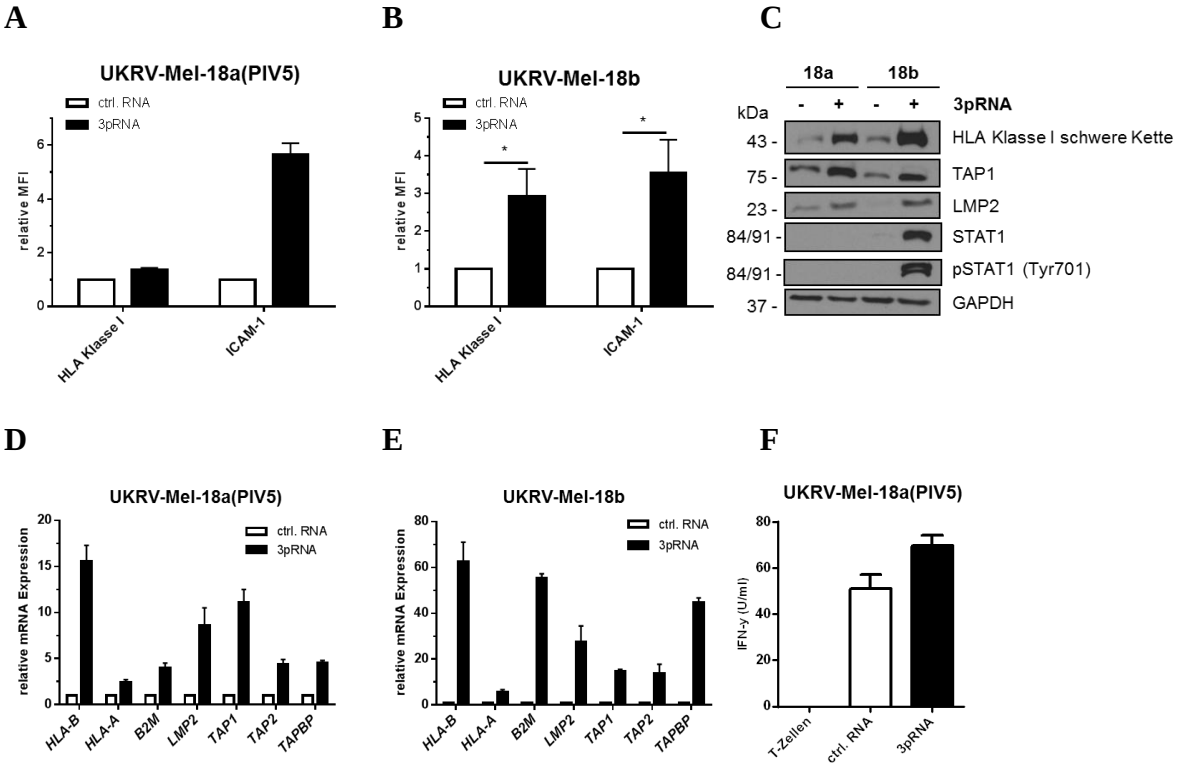


Abb. 15: Die STAT1 Expression ist nicht essentiell für eine 3pRNA-vermittelte Induktion der Immunogenität
Die Zelllinien UKRV-Mel-18a(PIV5) und UKRV-Mel-18b wurden mit 3pRNA bzw. Kontroll-RNA (200 ng/ml) für 20-24 h transfiziert. (**A,B**) Bestimmung der HLA Klasse I und ICAM-1 Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie. Darstellung der relativen MFI von n=3 Experimenten (+SD; *p<0,05, **p<0,01). (**C**) Bestimmung der APM Proteinexpression mittels Western Blot. Darstellung eines repräsentativen Ergebnisses von n=3 Experimenten. (**D,E**) Bestimmung der APM mRNA Expression mittels qRT-PCR. Die Menge an spezifischer mRNA wurde auf die endogene *GAPDH* mRNA Menge normalisiert. Darstellung der relativen Expression von n=3 Experimenten (+SD). (**F**) Die 3pRNA-transfizierten UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen wurden für 24 h mit MelanA-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen inkubiert und die Zellkultur-Überstände im Anschluss geerntet. Die Auswertung erfolgte mittels IFN-γ ELISA. Darstellung eines repräsentativen Ergebnisses der IFN-γ Expression von n=3 Experimenten (+SD).

7.8 3pRNA induziert die APM Expression auch in anderen Tumorentitäten unabhängig von der Typ I IFN Signalgebung

Um zu überprüfen, ob die vorangehend beschriebenen Ergebnisse auch in anderen IFN-resistenten Tumorentitäten zu beobachten sind, wurden die humanen etablierten STAT1- bzw. IFNAR2-negativen Fibrosarkomzelllinien U3A und U5A in die Untersuchungen eingeschlossen (Lutfalla et al., 1995; McKendry et al., 1991). Wie erwartet, zeigte sich nach IFN-α Behandlung keine Induktion der Oberflächenexpression von HLA Klasse I oder ICAM-1 Molekülen auf diesen Zellen (Abb. 16A und Abb. 16D). Lediglich eine Induktion

von HLA Klasse I und ICAM-1 war auf den U5A Zellen nach IFN-γ Behandlung nachzuweisen.

Die 3pRNA Transfektion induzierte sowohl die Expression von HLA Klasse I als auch von ICAM-1 Molekülen auf der Oberfläche beider Zelllinien (Abb. 16B und Abb.16E). Eine Induktion der schweren HLA Klasse I Ketten und der APM Komponente TAP1 konnten auf Protein-Ebene ebenfalls in beiden Zelllinien bestätigt werden (Abb. 16C und Abb. 16F).

Somit konnte gezeigt werden, dass die 3pRNA-vermittelte Induktion von HLA Klasse I und APM Komponenten auch in anderen Tumorentitäten, unabhängig von einer intakten IFN Signalgebung, möglich ist.

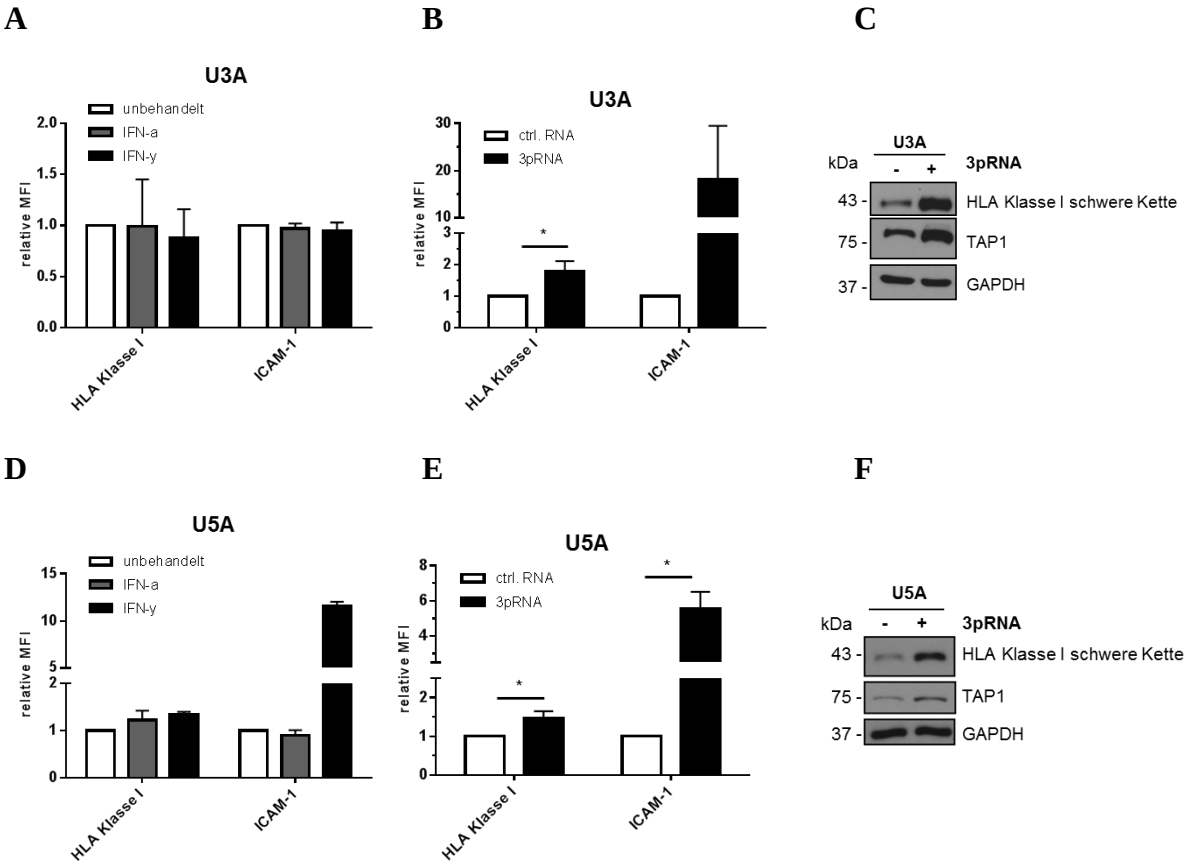


Abb. 16: 3pRNA induziert die Expression von HLA Klasse I und APM Komponenten in humanen STAT1$^{-/-}$ und IFNAR1$^{-/-}$ Fibrosarkomzelllinien

(**A,D**) Die Zelllinien U3A (STAT1$^{-/-}$) und U5A (IFNAR2$^{-/-}$) wurden mit IFN-α (1000 U/ml) oder IFN-γ (500 U/ml) für 20-24 h behandelt. Die Kontrollzellen blieben unbehandelt. Bestimmung der HLA Klasse I und ICAM-1 Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie. Darstellung der relativen MFI von n=3 Experimenten (+SD). (**B,C,E,F**) Die Zelllinien U3A (STAT1$^{-/-}$) und U5A (IFNAR2$^{-/-}$) wurden mit 3pRNA bzw. Kontroll-RNA (200 ng/ml) für 20-24 h transfiziert. (**B,E**) Bestimmung der HLA Klasse I und ICAM-1 Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie. Darstellung der relativen MFI von n=3 Experimenten (+SD; *p<0,05). (**C,F**) Bestimmung der Proteinexpression von TAP1 und der schweren Kette des HLA Klasse I Moleküls mittels Western Blot. Darstellung eines repräsentativen Ergebnisses von n=3 Experimenten.

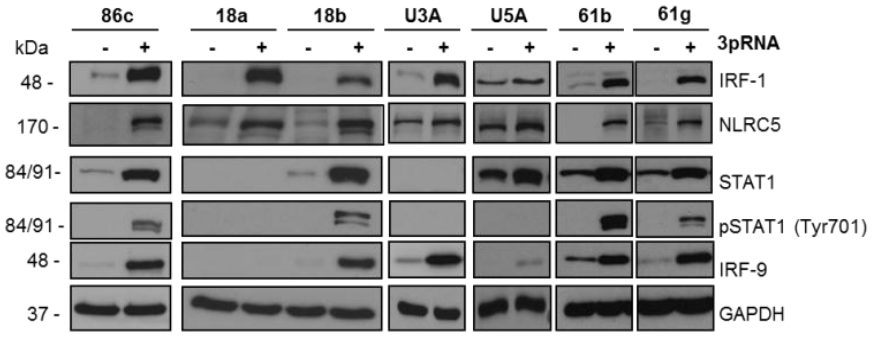
7.9 3pRNA induziert die Expression von IRF-1 und NLRC5 unabhängig von der Typ I IFN Signalgebung

Basierend auf den dargestellten Daten, stellte sich die Frage, welche Faktoren an der IFN-unabhängigen Induktion der HLA Klasse I Expression und der APM Komponenten beteiligt sind. IRF-1 und NLRC5 sind als potente Aktivatoren der HLA Klasse I Expression beschrieben (Biswas et al., 2012; Chatterjee-Kishore et al., 1998; Drew et al., 1995; Gobin et al., 2003; Lorenzi et al., 2012; Meissner et al., 2010; Neerincx et al., 2010). Daher wurde zunächst die Expression beider TF in verschiedenen Zelllinien, nach Transfektion von 3pRNA oder Kontroll-RNA, analysiert. Es zeigte sich, dass die 3pRNA Transfektion sowohl die Expression von IRF-1 als auch von NLRC5 in allen getesteten Zelllinien stark induzierte (Abb. 17A). Die Induktion der beiden Proteine war dabei sowohl unabhängig von einer funktionellen Typ I IFN Signalgebung als auch unabhängig von STAT1, da sich auch in den STAT1-negativen UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen eine starke Induktion von IRF-1 und NLRC5 zeigte.

In vorangegangenen Arbeiten konnte eine Aktivierung von IRF-1 durch die Signalgebung des IPS-1 Proteins gezeigt werden (Ding and Robek, 2014; Dixit et al., 2010). Bei IPS-1 handelt es sich um ein Adapterprotein, welches in den Membranen von Mitochondrien und Peroxisomen lokalisiert ist und nach der Bindung von RIG-I oder MDA-5 unter anderem die Aktivierung der TF IRF-3 und NF-κB induziert (Loo and Gale, 2011; Paz et al., 2006). Basierend auf diesen Erkenntnissen, wurde im Folgenden die Rolle von IRF-1 bei der 3pRNA-vermittelten APM Induktion weiter untersucht. Hierzu wurde die Induktion von IRF-1 in den IFN-sensitiven Ma-Mel-86c- und IFN-resistenten U3A Zellen, mittels siRNA, blockiert. Die Blockade der IRF-1 Induktion, nach 3pRNA Transfektion, in den IRF-1-siRNA behandelten Zellen konnte durch einen Western Blot bestätigt werden und führte zu einer schwachen Induktion der getesteten APM Komponenten (Abb. 17B). Zusätzlich zeigte sich eine schwache Induktion des HLA Klasse I Aktivators NLRC5, im Vergleich zu den Kontroll-siRNA und 3pRNA transfizierten Zellen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die beiden HLA Klasse I Induktoren IRF-1 und NLRC5 nach 3pRNA Transfektion in allen getesteten Zelllinien, unabhängig von einer funktionellen Typ I IFN Signalgebung, induziert wurden. Eine Blockade der IRF-1 Induktion in Melanom- und Fibrosarkomzellen führte zu einer verringerten APM und NLRC5 Induktion nach 3pRNA Transfektion.

A



B

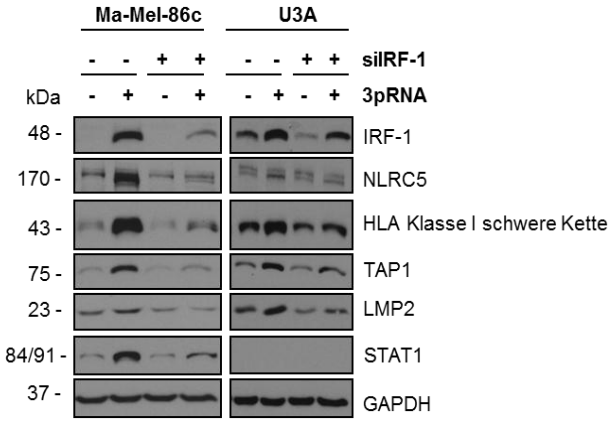


Abb. 17: 3pRNA Transfektion induziert die Expression von IRF-1 und NLRC5 unabhängig von einer funktionellen Typ I IFN Signalgebung
(**A**) Die Zelllinien Ma-Mel-86c, UKRV-Mel-18a(PIV5), UKRV-Mel-18b, U3A (STAT1$^{-/-}$), U5A (IFNAR2$^{-/-}$), Ma-Mel-61b und Ma-Mel-61g wurden mit 3pRNA bzw. Kontroll-RNA (200 ng/ml) für 20-24 h transfiziert. Bestimmung der IRF-1, NLRC5, STAT1 und IRF-9 Proteinexpression mittels Western Blot. Darstellung eines repräsentativen Ergebnisses von n=3 Experimenten. (**B**) Die Zelllinien Ma-Mel-86c und U3A (STAT1$^{-/-}$) wurden mit IRF-1 siRNA oder Kontroll-RNA transfiziert (100 nM). Nach 24 h erfolgte die Transfektion der Zellen mir 3pRNA oder Kontroll-RNA (200 ng/ml) (20-24 h). Bestimmung der IRF-1, NLRC5 und APM Proteinexpression mittels Western Blot. Darstellung eines repräsentativen Ergebnisses von n=2 Experimenten.

7.10 3pRNA induziert die Expression verschiedener T-Zell-rekrutierender Chemokine

Neben einer erhöhten Immunogenität, ist auch die T-Zell-Infiltration von Tumoren für das klinische Ansprechen und das Gesamtüberleben von Patienten, von entscheidender Bedeutung (Azimi et al., 2012; Taylor et al., 2007).

Aus diesem Grund sollte die Expression von Chemokinen, die mit einer CD8^{+} T-Zell-Infiltration des Melanoms assoziiert sind, analysiert werden. Harlin et al. konnten zeigen, dass eine Expression der Chemokine CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 und CXCL10 in metastasierten Läsionen mit CD8^{+} T-Zell-Infiltrat nachweisbar sind (Harlin et al., 2009). Daher wurde zunächst die Melanomzelllinie UKRV-Mel-18b mit 3pRNA transfiziert

und die Induktion dieser Chemokine mittels qRT-PCR analysiert. Die UKRV-Mel-18b Zellen wiesen eine niedrige basale Expression aller getesteten Chemokine auf. Durch eine 3pRNA Transfektion konnte eine Induktion der genannten Chemokine erzielt werden (Abb. 18A). Während die Induktion der *CXCL9* mRNA relativ schwach ausfiel, wurden die Chemokine *CCL5* und *CXCL10* ca. 400.000 fach verstärkt exprimiert. Um die Freisetzung der Chemokine CCL5 und CXCL10 im Zellkultur-Überstand zu bestimmen, wurden die UKRV-Mel-18b Zellen mit 3pRNA oder Kontroll-RNA-transfizierten und die gewonnenen Überstände mittels ELISA analysiert. Hierbei konnte zusätzlich eine deutlich verstärkte CCL5 und CXCL10 Proteinexpression nachgewiesen werden (Abb. 18B). Im Gegensatz zur 3pRNA Transfektion, führte eine IFN-α Behandlung der Zellen lediglich zu einer geringen Induktion der Chemokine *CCL5* und *CXCL10* auf mRNA-Ebene. Alle weiteren getesteten Chemokine wurden nicht induziert (Abb. 18C).

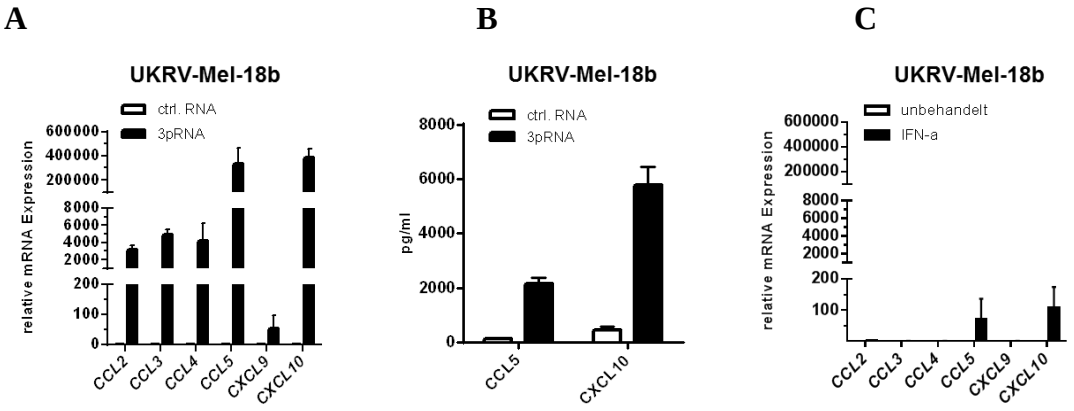


Abb. 18: 3pRNA Transfektion induziert die Expression T-Zell-rekrutierender Chemokine
(**A,B**) Die Zelllinie UKRV-Mel-18b wurden mit 3pRNA bzw. Kontroll-RNA (200 ng/ml) für 20-24 h transfiziert. (**A**) Bestimmung der Chemokin mRNA Expression mittels qRT-PCR. Die Menge an spezifischer mRNA wurde auf die endogene *GAPDH* mRNA Menge normalisiert. Darstellung der relativen Expression von n=3 Experimenten (+SD). (**B**) Die Bestimmung der Chemokin Proteinexpression im Zellkultur-Überstand erfolgte mittels ELISA. Darstellung der mittleren CCL5 und CXCL10 Expression von n=3 Experimenten (+SD). (**C**) Die Zelllinie UKRV-Mel-18b wurde mit IFN-α (1000 U/ml) für 20-24 h behandelt. Bestimmung der Chemokin mRNA Expression mittels qRT-PCR. Die Menge an spezifischer mRNA wurde auf die endogene *GAPDH* mRNA Menge normalisiert. Darstellung der relativen Expression von n=3 Experimenten (+SD).

7.11 Die Freisetzung von Chemokinen durch 3pRNA-transfizierte Melanomzellen erfolgt unabhängig von einer funktionellen Typ I IFN Signalgebung

Die Tatsache, dass T-Zell-rekrutierende Chemokine in IFN-sensitiven Zellen durch 3pRNA Transfektion induziert wurden, führte abschließend zu der Frage, ob die Expression der getesteten Chemokine, auch unabhängig von der Typ I IFN Signalgebung, induziert werden konnte. Um diese Frage zu beantworten, wurden die IFN-resistenten Zelllinien Ma-Mel-61g und UKRV-Mel-18a(PIV5) mit 3pRNA transfiziert und ihre Chemokinexpression analysiert.

Sowohl die UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen als auch die Ma-Mel-61g Zellen wiesen eine stärkere basale Chemokinexpression, als die zuvor getesteten UKRV-Mel-18b Zellen auf. Es zeigte sich, dass eine 3pRNA Transfektion auch in diesen Zellen eine Induktion der Chemokine *CCL2*, *CCL3*, *CCL4*, *CCL5*, *CXCL9* und *CXCL10* auf mRNA-Ebene bewirkte (Abb. 19A und Abb. 19C). Erneut konnte die schwächste Induktion für die mRNA des Chemokins *CXCL9* detektiert werden, während die *CCL5* und *CXCL10* mRNA Expression sehr stark induziert wurde. In den UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen zeigte sich außerdem eine vergleichbar starke Induktion der Chemokine *CCL3* und *CCL4*. Im Vergleich zu den IFN-sensitiven UKRV-Mel-18b Zellen, wiesen die Ma-Mel-61g Zellen und die UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen eine schwächere Induktion aller untersuchten Chemokine auf. Erneut konnte zusätzlich eine verstärkte Freisetzung der Chemokine CCL5 und CXCL10 im Zellkultur-Überstand mittels ELISA nachgewiesen werden (Abb. 19B und Abb. 19D).

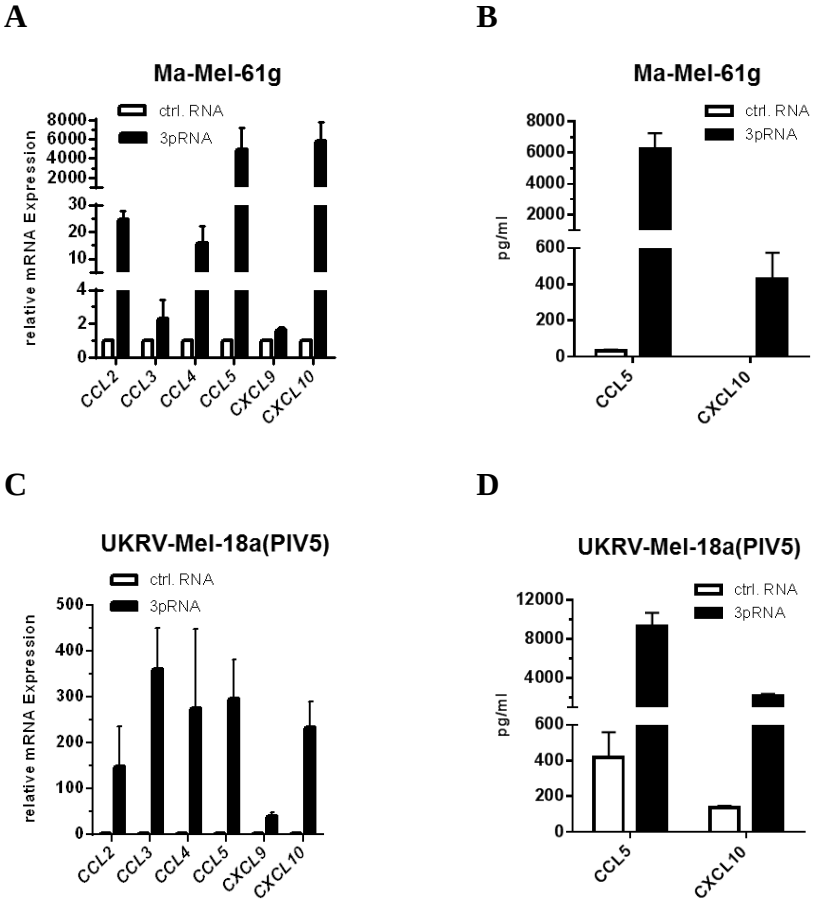


Abb. 19: Die Freisetzung von Chemokinen durch 3pRNA Transfektion ist unabhängig von der Typ I IFN Signalgebung
Die Zelllinien Ma-Mel-61g und UKRV-Mel-18a(PIV5) wurden mit 3pRNA bzw. Kontroll-RNA (200 ng/ml) für 20-24 h transfiziert. (**A,C**) Bestimmung der Chemokin mRNA Expression mittels qRT-PCR. Die Menge an spezifischer mRNA wurde auf die endogene *GAPDH* mRNA Menge normalisiert. Darstellung der relativen Expression von n=3 Experimenten (+SD). Darstellung der relativen Expression von n=3 Experimenten (+SD). (**B,D**) Die Bestimmung der Chemokin Proteinexpression im Zellkultur-Überstand erfolgte mittels ELISA. Darstellung der mittleren CCL5 und CXCL10 Expression von n=3 Experimenten (+SD).

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die 3pRNA Transfektion die Expression von $CD8^+$ T-Zell-rekrutierenden Chemokinen, sowohl in IFN-sensitiven als auch in IFN-resistenten Zellen, induziert. Im Gegensatz zur 3pRNA Transfektion, konnte durch eine IFN-α Behandlung der IFN-sensitiven Melanomzelllinie UKRV-Mel-18b nur eine geringe Induktion der *CCL5* und *CXCL10* mRNA Expression erreicht werden. Somit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die starke Induktion aller anderen getesteten Chemokine unabhängig von der Typ I IFN Signalgebung ist.

8 Diskussion

Das maligne Melanom ist eine der aggressivsten menschlichen Tumorerkrankungen mit einer Letalität von etwa 20%. Andererseits ist das maligne Melanom auch durch eine hohe intrinsische Immunogenität charakterisiert, die in manchen Fällen zu spontanen Regressionen von primären Tumoren und Metastasen führen kann. In einigen Tumoren kommt es außerdem zu einer Infiltration von Lymphozyten, die mit einer verbesserten Prognose der Patienten assoziiert ist (Azimi et al., 2012; Taylor et al., 2007). Zusätzlich lassen sich im peripheren Blut vieler Patienten Tumor-spezifische $CD8^+$ T-Zellen nachweisen, welche die Fähigkeit besitzen autologe Melanomzellen zu töten (Brahmer et al., 2012; Harlin et al., 2006; Topalian et al., 2012; Wolchok et al., 2013). Dies machen sich neue Immuntherapien zunutze, welche die Aktivität der T-Zellen steigern. Hierbei kommen immunmodulatorische mAK zum Einsatz, die durch die Bindung an die inhibitorischen Rezeptoren CTLA-4 und PD-1 die Weiterleitung inhibitorischer Signale in die T-Zellen aufheben. Der Erfolg von Immuntherapien lässt sich trotzdem nur in einer Subpopulationen von Patienten nachweisen, während in anderen Patienten die gesteigerte T-Zell-Aktivität ineffektiv zu sein scheint.

8.1 „Immune-Escape“ durch eine verringerte HLA Klasse I Expression

Ein Mechanismus von Tumorzellen, der T-Zell-Erkennung zu entgehen, ist die Herabregulation von Molekülen, welche für die Interaktionen zwischen Effektor- und Zielzellen entscheidend sind (Whiteside, 2006). Am häufigsten tritt hierbei eine reduzierte Expression der HLA Klasse I Moleküle auf, die in vielen Tumorentitäten beobachtet werden kann (Chang and Ferrone, 2007; Garrido et al., 2010; Lopez-Albaitero et al., 2006). Außerdem kann es durch die Herabregulation der Antigentransporter TAP1 und TAP2 oder der Proteasom-Untereinheiten LMP2 und LMP7 zu einer unvollständigen Prozessierung von Tumorantigenen kommen, infolgedessen Antigene nicht gegenüber T-Zellen präsentiert werden können (Dissemond et al., 2003; Leone et al., 2013; Ren et al., 2014). Neben einer reduzierten Antigenpräsentation über HLA Klasse I Moleküle, kann auch die Herabregulation von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 zu einer verschlechterten Erkennung von Tumorzellen durch $CD8^+$ T-Zellen beitragen (Koneru et al., 2005; Whiteside, 2006).

8.2 Melanomzellen weisen Defekte im Typ I IFN Signalweg auf

Eine reduzierte Expression von HLA Klasse I Molekülen auf Tumorzellen kann durch Typ I IFN aufgehoben werden (Angell et al., 2014). Dennoch, die schlechte Ansprechrate von Melanompatienten auf IFN Therapien lässt auf die Entwicklung von Resistenz-Mechanismen in Tumoren schließen (Eggermont et al., 2012; Tarhini et al., 2012). Eine Ursache, die bei Melanomzellen zur Resistenz-Entwicklung gegenüber Typ I IFN beitragen kann, sind Defekte im Typ I IFN Signalweg (Lesinski et al., 2007; Pansky et al., 2000; Wellbrock et al., 2005; Wong et al., 1997). In dieser Arbeit wurden IFN-sensitive und IFN-resistente Zelllinien, die aus verschiedenen Metastasen eines Melanompatienten generiert wurden, analysiert. Während die Zelllinie Ma-Mel-61b eine intakte IFN Signalgebung aufweist, reagiert die Zelllinie Ma-Mel-61g nicht mit einer Induktion von HLA Klasse I und ICAM-1 Molekülen auf eine IFN Behandlung. Die Resistenz der Ma-Mel-61g Zellen gegenüber einer IFN Behandlung beruht auf einer Funktionsverlust-Mutation im *JAK1* Gen. Tumore mit Defekten in Komponenten des Typ I IFN Signalwegs, wie Mutationen im *JAK1* oder *STAT1* Gen, sind bereits in einer Vielzahl von Publikationen beschrieben worden (Lesinski et al., 2007; Pansky et al., 2000; Ren et al., 2013; Respa et al., 2011; Rodriguez et al., 2007; Wellbrock et al., 2005; Wong et al., 1997). Außerdem kann eine fehlende Ausbildung des ISGF3 Komplexes in Tumorzellen zu einer Resistenz gegenüber Typ I IFN führen (Pansky et al., 2000; Ren et al., 2013; Wellbrock et al., 2005; Wong et al., 1997). Tumore mit Defekten im Typ I IFN Signalweg reagieren nicht mit einer Induktion von ISG und einer verstärkten Expression von HLA Klasse I Molekülen auf eine IFN Behandlung. Die Entwicklung von Therapieansätzen, die auch in diesen Tumoren zu einer erhöhten Immunogenität führen, ist demnach eine wichtige Aufgabe.

8.3 RIG-I Aktivierung führt zu einer erhöhten Tumorimmunogenität unabhängig von der Typ I IFN Signalgebung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des zytosolischen Rezeptors RIG-I zu einer erhöhten Erkennung von Melanomzellen durch $CD8^+$ T-Zellen führt. Bei RIG-I handelt es sich um einen RLR, der vorrangig kurze dsRNA erkennt. Über die Aktivierung des Adapterproteins IPS-1 wird die Expression von Typ I IFN und damit die Transkription von ISG induziert (Chang et al., 1991; Panne, 2008; Scott, 2010). Anhand der hier durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die 3pRNA Transfektion von Tumorzellen die Expression von HLA Klasse I Molekülen über eine gesteigerte

Expression von APM Komponenten induziert. HLA Klasse I-Antigen-Komplexe werden spezifisch durch den TCR von $CD8^+$ T-Zellen gebunden und führen so zu einer Aktivierung der T-Zelle (Boon et al., 2006; van der Bruggen et al., 1991). Zusätzlich konnte eine Induktion des Adhäsionsmoleküls ICAM-1, welches die Interaktion zwischen T-Zelle und Tumorzelle stabilisiert, gemessen werden.

Neben $CD8^+$ T-Zellen wurde auch die Erkennung von 3pRNA-transfizierten Tumorzellen durch NK-Zellen untersucht. NK-Zellen sind zytotoxische Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, die wie $CD8^+$ T-Zellen an der Abwehr von viralen Erregern beteiligt sind. Aus diesem Grund wurde ebenfalls eine verbesserte Tumorerkennung durch NK-Zellen, nach 3pRNA Transfektion, angenommen. Überraschenderweise zeigte sich eine reduzierte Aktivierung der NK-Zellen, nachdem diese mit 3pRNA-transfizierten Tumorzellen inkubiert wurden. Die Analysen zur Expression von Liganden aktivierender NK-Zell-Rezeptoren auf Melanomzellen ergaben, dass diese durch 3pRNA Transfektion nicht induziert wurden. Lediglich die Expression des DNAM-1 Liganden CD112 wurde auf einer der zwei getesteten Zelllinien induziert. Durch die erhöhte Expression von HLA Klasse I Molekülen auf Tumorzellen, welche inhibierende Signale an NK-Zellen übermitteln und der nahezu unveränderten Expression von Liganden aktivierender NK-Zell-Rezeptoren, konnte die verschlechterte NK-Zell-Aktivierung, nach 3pRNA Transfektion, erklärt werden (Boon et al., 2006; Ljunggren and Karre, 1990; van der Bruggen et al., 1991).

Außer der gesteigerten HLA Klasse I und ICAM-1 Expression, wurde die Expression von IFN-β in den Tumorzellen durch 3pRNA Transfektion induziert. Die Tatsache, dass HLA Klasse I und ICAM-1 Moleküle auf IFN-sensitiven Tumorzellen ebenfalls durch die Behandlung mit rekombinanten IFN-α induziert werden konnten, legte nahe, dass die 3pRNA-vermittelte IFN-β Freisetzung ursächlich für die erhöhte Immunogenität der Melanomzellen war (Chatterjee-Kishore et al., 1998). Um diese Hypothese zu prüfen, wurde der Einfluss der 3pRNA Transfektion auf die Immunogenität der *JAK1*-mutierten Melanomzelllinie Ma-Mel-61g untersucht. Auch auf diesen Zellen zeigte sich eine erhöhte HLA Klasse I und ICAM-1 Expression nach 3pRNA Transfektion. Die Inkubation von 3pRNA-transfizierten Ma-Mel-61g Zellen mit autologen $CD8^+$ T-Zellen führte zu einer verbesserten Aktivierung der T-Zellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die RIG-I Aktivierung zu einer Typ I IFN-unabhängigen Erhöhung der Immunogenität von Melanomzellen führt.

Die verstärkte Aktivität der $CD8^+$ T Zellen gegenüber 3pRNA-transfizierten Melanomzellen ging auch mit einer deutlichen Reduktion der Tumorzellzahl, im Vergleich zu den Kontrollzellen, einher. Diese beruhte wahrscheinlich auf einer T-Zell-vermittelten Apoptose

der Tumorzellen, welche über die Ausschüttung von Perforin, Granzym und Granulysin durch die T-Zellen vermittelt wurde. Um den genauen Mechanismus der Tumorelimination zu klären, sind jedoch weitere Untersuchungen nötig. Es ist in jedem Fall davon auszugehen, dass die Reduktion der Zahl der Tumorzellen T-Zell-abhängig ist, da die alleinige 3pRNA Transfektion der Tumorzellen zu keiner signifikanten Reduktion der Proliferation und der Tumorzellzahl führte.

Mit diesen Daten konnte eine 3pRNA-vermittelte Typ I IFN-unabhängigen Induktion von HLA Klasse I und APM Komponenten gezeigt werden.

8.4 Die Rolle von STAT1 in der 3pRNA-vermittelten Immunogenität von Tumorzellen

3pRNA Transfektion der Ma-Mel-61g Zellen induzierte, wie auch in den IFN-sensitiven Ma-Mel-86c Zellen, die Expression von RIG-I und OAS3. Da es sich bei OAS3 um ein ISG handelt, zeigen diese Ergebnisse, dass es auch in IFN-resistenten Tumorzellen zu einer Signalweiterleitung durch RIG-I kommt. Interessanterweise zeigten die IFN-resistenten Ma-Mel-61g Zellen nach 3pRNA Transfektion eine Aktivierung des STAT1 Proteins, welche durch eine Induktion der Tyr701-Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte. Eine IFN Behandlung der Zellen hingegen führte weder zu einer Induktion noch zu einer Phosphorylierung des STAT1 Proteins.

Dempoya und dessen Kollegen konnten bereits 2012 eine dsRNA-vermittelte, IFN-unabhängige, Aktivierung von STAT1 zeigen (Dempoya et al., 2012). Um die Funktion von STAT1 in der 3pRNA-vermittelten Immunogenität von Tumorzellen zu analysieren, wurde die STAT1-negative Zelllinie UKRV-Mel-18a(PIV5) untersucht. Die humane Melanomzelllinie UKRV-Mel-18a(PIV5) ist mit dem PIV5 infiziert, welches über sein V-Protein für eine sofortige proteasomale Degradation des STAT1 Proteins sorgt (Didcock et al., 1999; Precious et al., 2005). Obwohl die UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen eine intakte STAT1 mRNA aufweisen, konnte keine STAT1 Proteinexpression in diesen Zellen nachgewiesen werden. Dennoch zeigte sich auch in diesen Zellen eine erhöhte HLA Klasse I und ICAM-1 Expression nach 3pRNA Transfektion. Während die UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen eine ähnlich starke Induktion von ICAM-1 wie die Kontrollzellen UKRV-Mel-18b zeigten, wurde die HLA Klasse I Expression in den IFN-sensitiven UKRV-Mel-18b deutlich stärker induziert. Dieses Phänomen könnte zum Teil durch die bereits höhere, basale HLA Klasse I Expression der UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen, im Vergleich zu den UKRV-Mel-18b

Zellen, erklärt werden (Anhang Abb. 24). Die hohe basale HLA Klasse I Expression der UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen könnte durch die PIV5 Infektion induziert sein. In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die RNA des Paramyxovirus PIV5, wie 3pRNA, an den zytosolischen Rezeptor RIG-I bindet und so zu einer Induktion der HLA Klasse I Expression führt (Melchjorsen et al., 2005). Somit könnte die gesteigerte basale HLA Klasse I Expression der UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen durch eine PIV5-induzierte Signalgebung vermittelt sein. Im Gegensatz zu den IFN-resistenten UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen, führt die autokrine und parakrine Bindung von IFN-α/IFN-β an den IFNAR auf den Typ I IFN-sensitiven UKRV-Mel-18b Zellen zu einer Induktion des JAK/STAT Signalwegs. Somit kann dieser Signalweg nach 3pRNA Transfektion in den UKRV-Mel-18b, nicht aber in den UKRV-Mel-18a(PIV5), zusätzlich zu einer Induktion der HLA Klasse I Expression beitragen.
Neben der 3pRNA-vermittelten Induktion der HLA Klasse I und ICAM-1 Oberflächenexpression, konnte in den UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen eine verstärkte Expression der getesteten APM Komponenten auf mRNA- und Protein-Ebene detektiert werden. Die Induktion der APM Komponenten erfolgte dabei STAT1 unabhängig, da auch in 3pRNA-transfizierten UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen keine STAT1 Expression detektiert werden konnte. Wie für die Ma-Mel-61g Zellen gezeigt, konnte auch für die UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen eine verbesserte Erkennung durch spezifische $CD8^+$ T-Zellen, nach 3pRNA Transfektion, nachgewiesen werden. Der Anstieg der IFN-γ Freisetzung, nach Koinkubation der T-Zellen mit 3pRNA-transfizierten UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen, war allerdings weniger stark ausgeprägt. Dieses Phänomen könnte auf die bereits deutliche Erkennung der Kontroll-RNA-transfizierten UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen, durch die $CD8^+$ T-Zellen, zurückzuführen sein. Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass es durch 3pRNA Transfektion zu einer Typ I IFN-unabhängigen Induktion und Aktivierung von STAT1 kommt. Diese ist jedoch für die 3pRNA-vermittelte Immunogenität von Melanomzellen nicht essentiell, da sich auch in den STAT1-negativen UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen eine verstärkte HLA Klasse I und APM Expression zeigte.
Basierend auf diesem Ergebnis wurden weitere IFN-resistente Tumorzellen analysiert. Um zu überprüfen, ob die Aktivierung von RIG-I auch zu einer Erhöhung der Immunogenität in anderen Tumorentitäten führen könnte, wurden die humanen Fibrosarkomzelllinien U3A und U5A untersucht. Die STAT1-negative Zelllinie U3A sowie die IFNAR2-negative Zelllinie U5A zeigten ebenfalls eine Induktion von HLA Klasse I und ICAM-1 Molekülen nach 3pRNA Transfektion. Zusätzlich konnte eine Induktion der APM Komponente TAP1 detektiert werden. Dieses Ergebnis belegt, dass die 3pRNA-vermittelte Verbesserung der

Immunogenität nicht auf Melanomzellen beschränkt ist, sondern auch in anderen Tumorentitäten detektiert werden kann. Die erhöhte Immunogenität in Fibrosarkomzellen war erneut sowohl unabhängig von der Typ I IFN Signalgebung als auch unabhängig von STAT1.

8.5 UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen weisen eine schwache Induktion der IFN-β Expression nach 3pRNA Transfektion auf

Eine RIG-I Aktivierung der UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen führte, wie bei allen getesteten Zelllinien, zur Induktion der IFN-β Expression. Diese fiel in den IFN-resistenten UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen jedoch deutlich geringer als in den IFN-sensitiven Kontrollzellen UKRV-Mel-18b aus. Die niedrigere IFN-β Produktion der UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen könnte durch die fehlende Rückkopplung der Typ I IFN Signalgebung in den UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen erklärt werden. Die autokrine/parakrine Bindung von IFN-β an den IFNAR führt bei einer intakten Signalweiterleitung zu einer Induktion der ISG, wie RIG-I oder IFN-β, sodass eine positive Rückkopplung der Signalgebung und damit eine vermehrte IFN-β Expression induziert wird (Gonzalez-Navajas et al., 2012; Loo and Gale, 2011). Durch die defekte Typ I IFN Signalweiterleitung der UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen, kommt es in diesen Zellen nicht zu einer IFN-abhängigen Induktion von ISG und somit nicht zu einer IFN-abhängigen positiven Rückkopplung des Signalwegs.

Die geringere IFN-β Produktion der UKR-Mel-18a(PIV5) Zellen könnte zusätzlich durch eine geringere Transfektionseffizienz der UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen, im Vergleich zu den UKRV-Mel-18b Zellen, erklärt werden. Für diese Hypothese spricht die ebenfalls geringere Induktion der APM Komponenten auf mRNA-Ebene in den UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen, obwohl die Zelllinien UKRV-Mel-18a(PIV5) und UKRV-Mel-18b eine ähnliche basale Expression dieser Komponenten aufwiesen. Eine verringerte Induktion der Oberflächenexpression von ICAM-1 und des TAP1 Proteins konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Durch verschiedene Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass das V-Protein des PIV5 die Kinasen TBK1 und IKKe antagonisiert (Childs et al., 2012; Lu et al., 2008). Diese phosphorylieren/aktivieren die TF IRF-3 und IRF-7, bei denen es sich um entscheidende Aktivatoren der Typ I IFN Transkription handelt. Die Inhibition der TBK1 und IKKe Kinasen, durch das PIV5 und damit das Ausbleiben der Aktivierung von IRF-3 und IRF-7 in den UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen, könnte somit ebenfalls eine Erklärung für die geringere

Induktion der IFN-β Expression in diesen Zellen sein. Die Funktionsfähigkeit des PIV5 in den UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen konnte in dieser Arbeit durch IP-Versuche bewiesen werden. Dabei zeigte sich eine Interaktion zwischen dem V-Protein des PIV5 und dem DDB1-Protein, welches als Interaktionspartner des V-Proteins beschrieben ist. Zusätzlich führte die Inhibition des Proteasoms in den UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen zu einer Expression des STAT1 Proteins. Dieses Ergebnis deutet auf eine PIV5 vermittele Ubiquitinierung des STAT1 Proteins hin.

Zusätzlich lässt sich aus den dargestellten Ergebnissen ableiten, dass die TF IRF-3 und IRF-7 für die IFN-unabhängige Induktion der Tumorimmunogenität nicht essentiell sind, da sich auch in den PIV5-infizierten UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen eine verstärkte Expression der APM Komponenten, nach 3pRNA Transfektion, zeigte. Der TF IRF-9, welcher mit STAT1 und STAT2 den ISGF3 Komplex bildet, wurde in den UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen, nach 3pRNA Transfektion, ebenfalls nicht induziert (Gonzalez-Navajas et al., 2012). Somit ist davon auszugehen, dass auch dieser keine zentrale Bedeutung in der erhöhten IFN-unabhängigen Immunogenität von Tumorzellen durch 3pRNA besitzt.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur Typ I IFN-unabhängigen Aktivierung von ISG, könnten auch für Untersuchungen von Virusinfektionen interessant sein. Das Genom vieler Viren, wie auch das des PIV5, kodiert Proteine, die als kompetente Typ I IFN Antagonisten wirken und so den Typ I IFN Signalweg inhibieren (Didcock et al., 1999; Hengel et al., 2005; Katze et al., 2002). In diesen Fällen wird durch die defekte Typ I IFN Signalgebung eine Induktion von ISG und eine damit verbundenen verstärkte Präsentation von viralen Antigenen auf der Zelloberfläche verhindert. Eine Signalweiterleitung, die den Typ I IFN Signalweg umgeht, könnte trotzdem zu einer verbesserten Erkennung von infizierten Zellen, durch $CD8^+$ T-Zellen, führen.

8.6 Die Rolle von IRF-1 in der 3pRNA-vermittelten Immunogenität von Tumorzellen

Der TF IRF-1 ist als Induktor von HLA Klasse I und APM Komponenten beschrieben (Drew et al., 1995; Gobin et al., 2003). Dabei bindet IRF-1 an die ISRE-Promotorsequenzen der HLA Klasse I und APM Gene und induziert so deren Expression (Doody et al., 2007; Gobin et al., 2003; Gobin et al., 1998a). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IRF-1 in allen getesteten Zelllinien nach 3pRNA Transfektion stark induziert wird. Die Induktion des TF erfolgte unabhängig von einer intakten IFN Signalgebung, da es sowohl in IFN-sensitiven- als

auch in den IFN-resistenten Zelllinien zu einer Induktion von IRF-1 nach 3pRNA Transfektion kam. Weiterhin führte die Herabregulation von IRF-1 in den IFN-sensitiven Ma-Mel-86c und in den IFN-resistenten U3A Zellen zu einer verminderten Induktion der APM Komponenten nach 3pRNA Transfektion. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass es sich bei IRF-1 um einen zentralen Regulator der 3pRNA-vermittelten Immunogenität von Tumorzellen handelt.

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das Adapterprotein IPS-1 sowohl in der äußeren Membran von Mitochondrien als auch in der Membran von Peroxisomen lokalisiert ist. Während die Aktivierung von IPS-1 durch RIG-I in der äußeren Membran von Mitochondrien die Aktivierung von IRF-3 bewirkt, scheint die Aktivierung von IPS-1 in der Peroxisomenmembran die IRF-1 Expression zu induzieren (Dixit et al., 2010; Odendall et al., 2014). IRF-3 stellt durch die Induktion der Expression von Typ I IFN Genen und die daraus resultierende autokrine/parakrine Aktivierung der Typ I IFN Signalgebung einen wichtigen Regulator der ISG Expression dar. Die Aktivierung von IRF-1 führt, im Gegensatz zu IRF-3, zu einer IFN-unabhängigen Expression von APM Komponenten und anderen ISG.

Wie in dieser Arbeit gezeigt, führt der 3pRNA-vermittelte Typ I IFN-unabhängige Signalweg zu einer verbesserten Erkennung von IFN-resistenten Tumorzellen durch T-Zellen. Dieses bestätigen auch vorherige Arbeiten die zeigen, dass IRF-1 gemeinsam mit NF-κB die HLA Klasse I Expression auf Neuroblastomazellen induziert und somit eine verbesserte Erkennung dieser Zellen durch CTL bewirkt (Lorenzi et al., 2012).

Die Aktivierung von IRF-1 über Peroxisomen-gebundenes IPS-1 führt zusätzlich zu einer Induktion von Typ III IFN. Diese sind, wie auch die Typ I IFN, an der Kontrolle von Virusinfektionen beteiligt (Donnelly and Kotenko, 2010). Zudem konnte eine proapoptotische Wirkung von Typ III IFN in heptazellulären Karzinomzellen nachgewiesen werden (Li et al., 2012). Somit könnte die IRF-1-abhängige Typ III IFN Expression ebenfalls anti-tumoral wirken, auch wenn der Typ III IFN Rezeptor nur auf Epithelzellen exprimiert wird (Ding and Robek, 2014).

Interessanterweise ist IRF-1 ebenfalls als Aktivator von RIG-I beschrieben (Su et al., 2007; Wang et al., 2012). Der zytosolische Rezeptor RIG-I induziert, nach Aktivierung durch dsRNA Liganden, die Expression von Typ I IFN. Diese induzieren, über die Expression von ISG, einen antiviralen Status in infizierten Zellen. Diese Funktion scheint durch die IRF-1 induzierte RIG-I Aktivierung zusätzlich verstärkt zu werden. IRF-1 scheint dabei nicht nur redundante ISG der Typ I IFN Signalgebung zu induzieren, sondern die Typ I IFN induzierte Expression weiter zu komplementieren (Kimura et al., 1996).

8.7 Die Rolle von NLRC5 in der 3pRNA-vermittelten Immunogenität von Tumorzellen

Neben IRF-1 konnte auch eine Induktion der NLRC5 Expression nach 3pRNA Transfektion beobachtet werden. NLRC5 ist als potenter Aktivator der *HLA* und der *TAP* bzw. *LMP2* Gene bekannt (Biswas et al., 2012; Meissner et al., 2010; Neerincx et al., 2010). Ähnlich wie bei der Aktivierung von HLA Klasse II Promotoren, wird die Aktivierung von HLA Klasse I Promotoren und anderer APM Gene, durch den sogenannten „Enhanceosome Komplex“, induziert (Gobin et al., 1998b; Neerincx et al., 2013). Dieser bindet an das konservierte SXY-Motiv entsprechender Promotoren und induziert so, gemeinsam mit IRF-1 und NF-κB, deren Expression. Obwohl NLRC5 nicht direkt an die DNA bindet, konnte dieses Protein als wichtiger Bestandteil des „Enhanceosome Komplexes“ identifiziert werden (Biswas et al., 2012; Meissner et al., 2010; Staehli et al., 2012).

NLRC5 gehört, wie der HLA Klasse II Aktivator CIITA, zu den NLRs und wird in vielen Zellen konstitutiv exprimiert. NLRC5 kann durch diverse PAMPs, wie poly(I:C), CpG oder poly(dA:dT), aber auch durch verschiedene Bakterien oder Viren induziert und aktiviert werden (Cui et al., 2010; Kuenzel et al., 2010; Meissner et al., 2010; Neerincx et al., 2010; Staehli et al., 2012). Zusätzlich kommt es durch Typ II IFN in vielen Zellen, wie Lymphozyten, Myeloiden-Zellen und Tumorzellen, zu einer Induktion von NLRC5 (Benko et al., 2010; Neerincx et al., 2010; Staehli et al., 2012). NLRC5 ist an der HLA Klasse I-vermittelten Aktivierung der Proliferation von $CD8^+$ T-Zellen beteiligt und scheint deshalb für die Bekämpfung von Infektionen entscheidend zu sein (Yao and Qian, 2013).

Wie in dieser Arbeit gezeigt, führt RIG-I Aktivierung in den IFN-resistenten JAK1-defizienten Ma-Mel-61g Zellen zu einer Induktion und Aktivierung von STAT1. Der NLRC5 Promotor besitzt Bindestellen für STAT1, verschiedene IRF und NF-κB (Kobayashi and van den Elsen, 2012; Kuenzel et al., 2010). Somit scheint STAT1 unter anderem an der Induktion von NLRC5 beteiligt zu sein (Staehli et al., 2012). Die Typ I IFN-unabhängige Aktivierung von STAT1 in den Ma-Mel-61g Zellen könnte die Expression von NLRC5 induzieren und so indirekt zu einer verstärkten Expression der HLA Klasse I und APM Komponenten führen. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass STAT1, durch die direkte Bindung an die Promotoren von APM Genen, ebenfalls als direkter Aktivator dieser Gene wirken kann. (Chatterjee-Kishore et al., 1998; Leibowitz et al., 2013; Respa et al., 2011). Ferner konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass NLRC5 auch unabhängig von STAT1 induziert wird. So führte die 3pRNA Transfektion der STAT1-negativen Zellen UKRV-Mel-18a(PIV5) und U3A ebenfalls zu einer starken Induktion von NLRC5. Zusätzliche Analysen dieser

Arbeit legen eine mögliche Funktion von IRF-1 in der Regulation von NLRC5 nahe, da die Herabregulation von IRF-1 zu einer reduzierten Induktion von NLRC5, nach 3pRNA Transfektion, führte. Zusätzlich konnte bereits eine Interaktion zwischen RIG-I und NLRC5 nachgewiesen werden (Cui et al., 2010; Ranjan et al., 2014). Dabei scheint NLRC5 die Expression von RIG-I zu stabilisieren und so an der Abwehr von viralen Infektionen zusätzlich beteiligt zu sein (Ranjan et al., 2014).

8.8 Mechanismen der 3pRNA-vermittelten Immunogenität von Melanomzellen

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit und dem derzeitigen Wissenstand lässt sich folgendes Modell zur 3pRNA-vermittelten Induktion der Immunogenität von Melanomzellen entwickeln (Abb. 20). Wie bereits beschrieben, wird durch die Bindung von 3pRNA an den zytosolischen Rezeptor RIG-I, die Interaktion zwischen RIG-I und dem Adapterprotein IPS-1 induziert. Die Aktivierung von IPS-1 durch RIG-I führt zur Rekrutierung eines Signalkomplexes, der die Aktivierung der TF NF-κB und IRF-3 induziert (Loo and Gale, 2011). Diese binden an die Typ I IFN Promotoren und induzieren so deren Transkription. Zusätzlich bewirkt die Aktivierung von NF-κB die Induktion von proinflammatorischen Zytokinen.

Neben der postulierten Aktivierung von IRF-3 und NF-κB scheint es durch die 3pRNA-vermittelte Signalgebung auch zu einer IFN-unabhängigen Aktivierung von IRF-1 zu kommen. IRF-1 ist ein beschriebener Induktor von HLA Klasse I und APM Komponenten. Durch die Bindung an die Promotoren der HLA Klasse I und APM Gene kann IRF-1 deren Expression induzieren (Drew et al., 1995; Gobin et al., 2003; Lorenzi et al., 2012). Zusätzlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass IRF-1 ein direkter oder indirekter Aktivator des HLA Klasse I Transaktivators NLRC5 zu sein scheint. Die Aktivierung von NLRC5, durch IRF-1, führt wahrscheinlich durch die Rekrutierung des „Enhanceosome-Komplexes“ zu einer verstärkten Expression einiger HLA Klasse I und APM Gene (Biswas et al., 2012; Meissner et al., 2010; Neerincx et al., 2013).

In IFN-sensitiven Zellen kommt es, durch die IRF-3/NF-κB vermittelte Induktion von Typ I IFN, zusätzlich zu einer autokrinen Induktion des JAK/STAT Signalwegs. STAT1 beeinflusst die Induktion der APM Komponenten in zweierlei Hinsicht. Zum einen führt die Bindung von STAT1 an einige APM Promotoren zu einer direkten Induktion der Transkription (Chatterjee-

Kishore et al., 1998; Respa et al., 2011). Zum anderen induziert STAT1 die Expression von IRF-1 und NLRC-5 und ermöglicht somit eine positive Rückkopplung der APM Induktion. Demnach gibt es sowohl einen IFN-abhängigen als auch einen IFN-unabhängigen Signalweg der 3pRNA-vermittelten APM Induktion. In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Bindung von NLRC5 an RIG-I die RIG-I Signalgebung zusätzlich stabilisiert (Ranjan et al., 2014). Inwieweit eine direkte Bindung von RIG-I und NLRC5 eine Rolle in der 3pRNA-vermittelten Immunogenität von Tumorzellen spielt, ist bislang jedoch noch nicht geklärt. Ebenfalls ist bislang unklar, welche Faktoren an der dsRNA-vermittelten IFN-unabhängigen Aktivierung von STAT1 beteiligt sind. Ob es sich bei der 3pRNA-vermittelten Induktion von IRF-1 um einen direkten oder einen indirekten Effekt, durch die Aktivierung weiter Faktoren, handelt, ist weiterhin zu untersuchen.

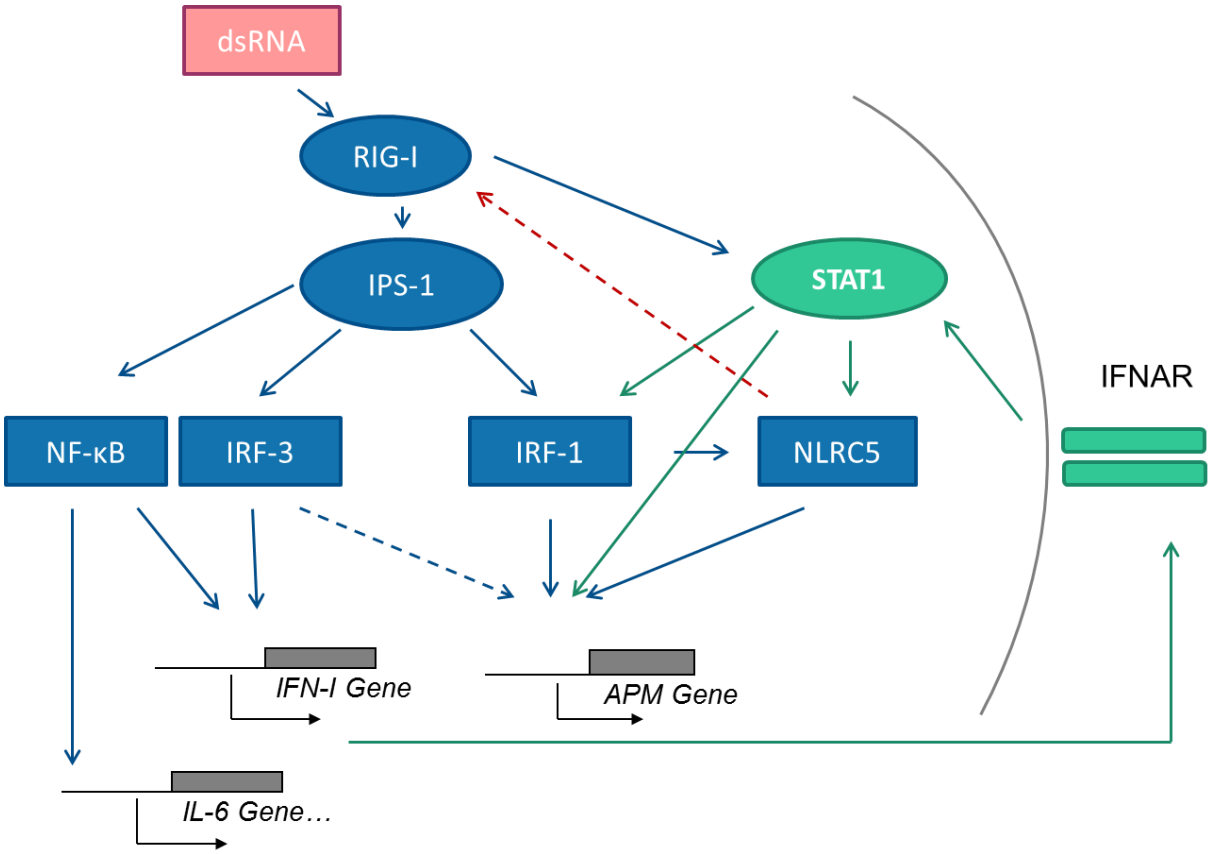


Abb. 20: Darstellung der 3pRNA-vermittelten APM Induktion
Die Aktivierung des zytosolischen Rezeptors RIG-I durch 3pRNA Transfektion führt über die Aktivierung von IPS-1, NF-κB und IRF-3 zu einer Induktion von Typ I IFN und proinflammatorischen Zytokinen. Die Bindung von Typ I IFN an den IFNAR aktiviert den JAK/STAT Signalweg und dadurch die Expression von verschiedenen APM Komponenten. Zusätzlich kommt es durch STAT1 zu einer Induktion von IRF-1 und NLRC5, die ebenfalls die Expression von APM Komponenten induzieren. Neben der IFN-abhängigen Induktion von APM Komponenten wird der TF IRF-1 IFN-unabhängig induziert. Dieser kann die APM und NLRC5 Expression zusätzlich induzieren.

8.9 3pRNA induziert Apoptose in einer Subpopulation von Melanomzellen

Apoptose kann in Tumorzellen durch die Transfektion von RIG-I oder MDA-5 Liganden induziert werden. Infolge der Bindung von 3pRNA an RIG-I bzw. von poly(I:C) an MDA-5 kommt es zur Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalwegs über die Protease Caspase-9 und Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor-1*) (Besch et al., 2009; Kubler et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass diese Induktion von Apoptose in Melanomzellen unabhängig von der Typ I IFN Signalgebung ist (Besch et al., 2009). Die Aktivierung des Adapterproteins IPS-1 und der proapoptotischen Moleküle Puma und Noxa hingegen sind essentiell.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch 3pRNA Transfektion ebenfalls Apoptose in den Melanomzelllinien Ma-Mel-86c und Ma-Mel-47 induziert werden. Während in ca. 30% der Ma-Mel-47 Zellen nach 24 h Apoptose induziert wurde, zeigte sich bei den Ma-Mel-86c Zellen ein ähnliches Ergebnis erst nach 72 h. Dieses Ergebnis konnte zusätzlich durch Proliferationsanalysen bestätigt werden. Hierbei konnte für die Ma-Mel-47 Zellen nach 20 h und für die Ma-Mel-86c Zellen nach 40 h eine Abnahme der Zellzahl und eine Stagnation der Proliferation detektiert werden. Die unterschiedliche Kinetik der Apoptoseinduktion deutet auf eine unterschiedliche Sensitivität der Melanomzellen gegenüber einer 3pRNA Transfektion hin. So konnte z.B. zusätzlich eine deutlich stärkere Induktion der HLA Klasse I und der ICAM-1 Expression in den Ma-Mel-47 Zellen, im Vergleich zu den Ma-Mel-86c Zellen, nach 3pRNA Transfektion, nachgewiesen werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass auch Unterschiede in der Transfektionseffizienz zwischen den beiden Zelllinien zu differenten Effekten auf die Proliferation und das Überleben der Zellen beitragen.

Durch Duewell und dessen Kollegen konnte gezeigt werden, dass es sich bei der dsRNA-vermittelter Apoptose um einen immunogenen Zelltod von Tumorzellen handelt (Duewell et al., 2014). Neben der Induktion von Typ I IFN und proinflammatorischen Zytokinen, induzierte die Transfektion von RLR Liganden die Freisetzung des Entzündungsmediator HMGB1 (*high-mobility group protein B1*) und eine Translokation von Calreticulin in die äußere Zellmembran. Während der TF HMGB1 die Induktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 und TNF-α, induziert, führt die Translokation von Calreticulin auf die Zellmembran zu einer verbesserten Erkennung der Tumorzellen durch DC (Obeid et al., 2007; Rauvala and Rouhiainen, 2007). Die Expression von Typ I IFN durch Tumorzellen führt zusätzlich zu einer Aktivierung von DC, die in der Lage sind, apoptotisches Tumormaterial aufzunehmen und dieses gegenüber naiven $CD8^+$ T-Zellen zu präsentieren (Duewell et al., 2014; Gatti et al., 2013; Kubler et al., 2010). Im Gegensatz dazu

führt eine chemisch induzierte Apoptose, durch Oxaliplatin oder Staurosporine, nicht zu einer DC Aktivierung und Antigenpräsentierung und somit nicht zu einem immunogenen Zelltod der Tumorzellen (Duewell et al., 2014).
Die Proliferationsanalysen dieser Arbeit machen deutlich, dass 3pRNA Transfektion nur in einer Subgruppe von Tumorzellen Apoptose induziert. Die verbleibenden lebenden Zellen sind in der Lage weiter zu proliferieren. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zellen, unabhängig von einer intakten Typ I IFN Signalgebung, eine erhöhte Immunogenität nach 3pRNA Transfektion aufwiesen und so durch CTL vermehrt erkannt und getötet wurden.

8.10 3pRNA-vermittelte Immunzellinfiltration

Derzeitige Studien beschreiben, dass neben der Immunogenität von Tumorzellen die Existenz von TIL für die Prognose und den Therapieerfolg von Patienten relevant ist (Schatton et al., 2014; Taube et al., 2014; Thomas et al., 2013). Die Infiltration von $CD8^+$ T-Zellen in Tumoren scheint dabei einen entscheidenden Einfluss auf die Effizienz von verschiedenen Therapieoptionen, wie der Behandlung mit immunmodulatorischen AK, zu besitzen (Taube et al., 2014). Analysen dieser Arbeit zeigen, dass die RIG-I Aktivierung in Melanomzellen zu einer Induktion der Chemokine CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 und CXCL10 führt. Diese Chemokine sind auch in solchen Melanommetastasen nachweisbar, die eine spontane Infiltration von $CD8^+$ T-Zellen aufweisen (Harlin et al., 2009; Messina et al., 2012). Während die mRNA Menge des Chemokins *CXCL9* nur leicht induziert wurde, führte die 3pRNA Transfektion der IFN-sensitiven UKRV-Mel-18b Zellen zu einer deutlich stärkeren Expression der Chemokine *CCL5* und *CXCL10* auf mRNA-Ebene. Zusätzlich konnte eine Freisetzung der Chemokine CCL5 und CXCL10 in das Zellkultur-Medium nach 3pRNA Transfektion detektiert werden. Auch für die IFN-resistenten Zelllinien UKRV-Mel-18a(PIV5) und Ma-Mel-61g konnte eine vermehrte Freisetzung der Chemokine CCL5 und CXCL10 gemessen werden. Diese fiel jedoch deutlich schwächer aus als in den IFN-sensitiven UKRV-Mel-18(PIV5). Dieser Umstand könnte durch die Tatsache erklärt werden, dass die IFN-sensitiven UKRV-Mel-18b Zellen eine deutlich niedrigere basale Expression aller Chemokine, im Vergleich zu den IFN-resistenten Zellen, aufwiesen. Die vermehrte Freisetzung von CCL5 könnte, neben der Rekrutierung von T-Zellen in den Tumor, auch zur Aktivierung von naiven T-Zellen beitragen, da der CCL5 Rezeptor CCR5 auf diesen Zellen exprimiert wird und dort als kostimulatorisches Signal zu agieren scheint (Molon et al., 2005). Die exakte Funktion von CCL5 ist noch nicht ausreichend geklärt und scheint

divergent zu sein. Wenngleich es durch die CCL5 Expression auch zu einer Induktion von Anti-Tumor-Antworten durch NK-Zellen kommt, ist CCL5 trotzdem in einigen Tumoren mit einer verstärkten Tumorprogression und Metastasierung assoziiert (Hanahan and Coussens, 2012; Soria and Ben-Baruch, 2008). Dabei konnte gezeigt werden, dass CCL5 als Wachstumsfaktor wirkt und die Angiogenese in Tumoren stimuliert (Kershaw et al., 2013). Zusätzlich kann CCL5 die Rekrutierung von immunsupprimierenden Zellen, wie Treg in Tumoren, induzieren (Aldinucci and Colombatti, 2014; Schlecker et al., 2012). Auch in Melanomen konnte eine verstärkte CCL5 Expression mit einer verstärkten Tumorbildung und einer erhöhten Malignität von Tumoren assoziiert werden (Mattei et al., 1994; Mrowietz et al., 1999). Ähnliche Beobachtungen konnten für das Chemokin CXCL10 gemacht werden. Während CXCL10 auf der einen Seite die Angiogenese in Tumoren inhibiert, die Rekrutierung von APC in den Tumor induziert sowie NK-Zellen und T-Zellen aktiviert, konnte auf der anderen Seite eine erhöhte CXCL10 Expression mit einer verstärkten Tumorprogression korreliert werden (Fujita et al., 2009; Furuya et al., 2007; Monteagudo et al., 2007). Hierbei konnte CXCL10 als autokriner Invasionsfaktor in verschiedenen Tumorentitäten identifiziert werden (Kawada et al., 2007; Lo et al., 2010). Die Zusammensetzung des Chemokinexpressionsprofils entscheidet letztendlich, ob dieses einen eher progressiven oder regressiven Einfluss auf die Tumorentwicklung besitzt (Colotta et al., 2009; Hanahan and Coussens, 2012; Hanahan and Weinberg, 2011; Ruffell et al., 2010).

Warum es in manchen Tumormetastasen zu einer Rekrutierung von Immunzellen kommt, während andere Metastasen keine Immunzellinfiltration zeigen, ist bislang nicht komplett verstanden. Es liegt jedoch nahe, dass verschiedene Signalwege, die an der Progression des malignen Melanoms beteiligt sind, auch die Expression von Chemokinen beeinflussen. Ein Signalmolekül, welches in einer Vielzahl von Tumoren stark exprimiert wird, ist STAT3 (Bowman et al., 2000; Buettner et al., 2002). Untersuchungen der STAT3 Signalgebung ergaben, dass die Herabregulation von STAT3 in Tumorzellen zu einer Reduktion von Genen führt, die an der Proliferation und dem Überleben von Tumorzellen beteiligt sind (Bowman et al., 2001; Catlett-Falcone et al., 1999; Epling-Burnette et al., 2001). Zusätzlich konnte bereits eine erhöhte Expression der Chemokine CCL5 und CXCL10 nach Herabregulation des STAT3 Proteins in Tumorzellen nachgewiesen werden (Burdelya et al., 2005; Wang et al., 2004). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression der Chemokine CCL5 und CXCL10 in Tumorzellen durch rekombinantes IFN-α induziert wird. Da IFN-α die Expression von STAT3 herabreguliert, könnte es in IFN-sensitiven Zellen, durch die 3pRNA-vermittelte Expression von Typ I IFN, zu einer Induktion dieser Chemokine kommen

(Moschos et al., 2006). Die Induktion der Chemokine CCL5 und CXCL10 fiel nach IFN-α Behandlung der Tumorzellen jedoch deutlich schwächer aus als nach 3pRNA Transfektion. Zusätzlich konnte eine Induktion der genannten Chemokine auch in den IFN-resistenten Zelllinien UKRV-Mel-18a(PIV5) und Ma-Mel-61g, nach 3pRNA Transfektion, nachgewiesen werden. Somit konnte neben der Typ I IFN-vermittelten Chemokinexpression auch eine Typ I IFN-unabhängige Induktion der Chemokine gezeigt werden. Welcher genaue Mechanismus die 3pRNA-vermittelte Chemokinexpression induziert, muss weiter analysiert werden. Jedoch deuten derzeitige Arbeiten darauf hin, dass IRF-1 an der IFN-unabhängigen Expression von CCL5 und CXCL10, nach 3pRNA Transfektion, beteiligt sein könnte (Harikumar et al., 2014).

8.11 3pRNA-vermittelte Typ I IFN Expression und Melanomtherapie

Interessanterweise konnte in Mausstudien gezeigt werden, dass die Induktion von Typ I IFN über RLR im Tumormikromilieu die Rekrutierung von $CD8^+$ T-Zellen in T-Zell-arme Melanommetastasen bewirkt (Bald et al., 2014). Neben der beschriebenen Relevanz von Chemokinen auf die Immunzellrekrutierung, scheint demnach auch die lokale Typ I IFN Expression in Tumoren für die Rekrutierung von Immunzellen von Bedeutung zu sein (Bald et al., 2014; Yang et al., 2014). Es konnte gezeigt werden, dass es ohne die Expression von Typ I IFN zu keiner Rekrutierung von $CD8^+$ DC in den Tumor kommt (Gajewski et al., 2012). $CD8^+$ DC sind an der Aktivierung von CTL beteiligt, indem sie Antigene aufnehmen, prozessieren und auf HLA Klasse I Molekülen gegenüber den CTL präsentieren (Hildner et al., 2008). Die Expression von Typ I IFN führt somit zu einer DC-vermittelten Crosspräsentation gegenüber $CD8^+$ T-Zellen, sodass diese aktiviert werden (Diamond et al., 2011; Duewell et al., 2014; Fuertes et al., 2011; Gatti et al., 2013). Mäuse mit Defekten in der Typ I IFN Signalgebung weisen verringerte spontane T-Zell-Antworten gegen Tumore auf (Gajewski et al., 2012). Außerdem konnte eine Korrelation zwischen der IFN-β Expression in Tumor-assoziierten Lymphknoten und den T-Zell-Antworten von Patienten gezeigt werden. Zusammenfassend stellen diese Untersuchungen die essentielle Funktion von Typ I IFN, in der Generierung von Anti-Tumor T-Zell-Antworten, dar.

Durch 3pRNA Transfektion konnte im Rahmen dieser Arbeit in allen getesteten Tumorzellen eine Typ I IFN Expression induziert werden. Die Induktion war dabei unabhängig von einer funktionellen Typ I IFN Signalgebung, da auch IFN-resistente Zelllinien eine IFN-β Expression, nach 3pRNA Transfektion, aufwiesen. Ob die Expression von Typ I IFN durch

Tumorzellen auch zu einer verbesserten Crosspräsentation von Tumorantigenen durch $CD8^+$ DC und folglich zu einer verbesserten $CD8^+$ T-Zell-Aktivierung führt, muss noch weiter untersucht werden. In dieser Arbeit konnte jedoch sowohl eine verbesserte Aktivierung von T-Zellen als auch eine verbesserte T-Zell-induzierte Lyse der Tumorzellen, nach 3pRNA Transfektion, gezeigt werden.

Durch die verstärkte Aktivierung von CTL ist die Induktion von Typ I IFN auch für therapeutische Zwecke äußerst relevant. Die Kombination von immunmodulatorischen AK, wie PD-L1, mit IFN-β führt z.B. zu einer besseren Effizienz der AK Behandlung (Yang et al., 2014). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass über eine verbesserte Crosspräsentation von Tumorantigenen, durch DC, diese $CD8^+$ T-Zellen im Tumormikromilieu aktivieren und so eine verstärkte Tumorregression bewirken. Sistigu und Kollegen konnten zusätzlich zeigen, dass die Effektivität von Chemotherapien von einer Tumor-vermittelten Typ I IFN Expression abhängt (Sistigu et al., 2014). Die Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Antracyclin führt in Tumorzellen zu einer Induktion der Typ I IFN Expression und folglich zu einer Induktion von ISG und CXCL10. Die Aktivierung von Typ I IFN scheint dabei durch dsRNA aus apoptotischen Tumorzellen vermittelt zu sein. Diese bindet an den Toll-like-Rezeptor 3 und induziert so die Expression von Typ I IFN und ISG.

Durch die in dieser Arbeit dargestellten Versuche, konnte sowohl eine Induktion von ISG als auch eine Induktion des Chemokins CXCL10, durch 3pRNA Transfektion, detektiert werden. Im Gegensatz zu der Typ I IFN-abhängigen Induktion von ISG über Antracyclin, ist die 3pRNA-vermittelte Induktion dieser Gene jedoch unabhängig von einer autokrinen Typ I IFN Signalgebung. Somit könnte die Aktivierung von RIG-I, über eine synthetische dsRNA, eine potente Strategie sein, um die T-Zell-Erkennung von IFN-sensitiven und IFN-resistenten Tumorzellen zu verbessern. Die verstärkte Erkennung von Tumorzellen, durch $CD8^+$ T-Zellen, könnte die Effizienz von derzeitigen Chemotherapien und Therapien mit immunmodulatorischen AK steigern.

9 Zusammenfassungen

9.1 Deutsche Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist eine aggressive Tumorerkrankung, die auch in Gegenwart von Tumor-reaktiven zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen voranschreitet. Diese T-Zellen erkennen, über ihren T-Zell-Rezeptor, spezifisch HLA Klasse I-Antigen-Komplexe auf der Oberfläche der Melanomzellen. Dadurch kommt es zur Aktivierung der T-Zellen, welche dann die Zerstörung der Tumorzelle einleiten. Allerdings können sich Melanomzellen, durch eine Herabregulation der HLA Klasse I-Antigen-Komplexe, der Erkennung durch $CD8^+$ T-Zellen ganz oder teilweise entziehen. Dieser Herabregulation können die Zytokine IFN-α und IFN-β, sogenannte Typ I Interferone (IFN), entgegenwirken. Typ I IFN binden an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Melanomzellen und aktivieren so den JAK/STAT Signalweg. Als Folge induziert der Transkriptionsfaktor STAT1 im Komplex mit weiteren Faktoren die Expression von verschiedenen Komponenten der Antigen-Prozessierungs-und-Präsentationsmaschinerie (APM) und von HLA Klasse I Molekülen. Aus dieser Kenntnis resultiert ein besonderes Interesse an neuen Behandlungsstrategien, welche zur Aktivierung des JAK/STAT Signalwegs führen und somit die Immunogenität der Melanomzellen beeinflussen. Interessanterweise führt die Aktivierung von RIG-I, einem zytosolischen Rezeptor, der virale doppelsträngige RNA in infizierten Zellen detektiert, zur Induktion von Typ I IFN und proinflammatorischen Zytokinen. Durch die Transfektion von synthetischen RIG-I Liganden, wie 3pRNA, kann eine Aktivierung von RIG-I auch in Tumorzellen induziert werden. Die Bedeutung der RIG-I Aktivierung für die T-Zell-Erkennung des Melanoms war bislang unklar und sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit geklärt werden.

Tatsächlich führte die Aktivierung von RIG-I, infolge einer 3pRNA Transfektion, zu einer verbesserten Erkennung von Melanomzellen durch autologe $CD8^+$ T-Zellen. Diese wurde durch eine verstärkte Expression von APM Komponenten und HLA Klasse I Molekülen vermittelt. Zusätzlich konnte eine gesteigerte Expression des ICAM-1 Moleküls, welches für die Adhäsion von T-Zellen an die Tumorzellen von Bedeutung ist, detektiert werden. Um die Rolle einer autokrinen/parakrinen Typ I IFN Signalgebung in der Immunogenität 3pRNA-transfizierter Melanomzellen zu klären, wurden IFN-sensitive und IFN-resistente Zelllinien in die weiteren Untersuchungen einbezogen. Diese stammten aus verschiedenen Metastasen eines Melanompatienten. Interessanterweise zeigte sich auch für IFN-resistente Melanomzellen eine verbesserte Erkennung durch $CD8^+$ T-Zellen basierend auf der Induktion

von APM Komponenten, HLA Klasse I und ICAM-1 Molekülen nach 3pRNA Transfektion. Weder JAK1 noch STAT1, als Komponenten des JAK/STAT Signalwegs, waren für eine Verbesserung der Immunogenität von IFN-resistenten Tumorzellen essentiell. Allerdings zeigte sich nach RIG-I Aktivierung eine gesteigerte Expression der HLA Klasse I Transkriptionsaktivatoren NLRC5 und IRF-1 sowohl in IFN-sensitiven als auch in IFN-resistenten Zelllinien. IRF-1 konnte als zentraler Regulator der 3pRNA-vermittelten Immunogenität identifiziert werden, da die Herabregulation von IRF-1 mittels siRNA eine verminderte Induktion der APM Komponenten und der NLRC5 Expression nach 3pRNA Transfektion bewirkte. Neben einer erhöhten T-Zellsensitivität konnte auch eine verstärkte Expression von T-Zell-rekrutierenden Chemokinen, wie CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 und CXCL10, durch 3pRNA-transfizierte IFN-sensitive und IFN-resistente Melanomzellen nachgewiesen werden.

Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die Aktivierung des Rezeptors RIG-I die Immunogenität von Tumorzellen und die Expression von T-Zell-rekrutierenden Chemokinen unabhängig von einer intakten Typ I IFN Signalgebung induziert. Die RIG-I Aktivierung könnte demnach eine neue Strategie darstellen, um die T-Zell-Erkennung von IFN-sensitiven und IFN-resistenten Tumorzellen zu verbessern.

9.2 English Summary

Malignant melanoma is a highly aggressive cancer which even progresses in the presence of tumor-reactive $CD8^+$ T cells. Recognition of melanoma cells by $CD8^+$ T cells is mediated by the T cell receptor binding to specific HLA class I-antigen complexes on the surface of the tumor cell. As a result, T cells become activated and eliminate tumor cells. T cell efficiency can be strongly impaired due to downregulation of HLA class I-antigen surface complexes, as frequently observed in human melanoma. In contrast, upregulation of HLA class I antigen complexes and components of the antigen processing and presentation machinery (APM) can be induced by type I interferons (IFN), namely IFN-α and IFN-β. Type I IFN bind to the corresponding receptor at the cell surface and induce the JAK/STAT signaling pathway, which in turn activates specific transcription factors like STAT1. Activated STAT1 associates with other factors and induces the expression of APM components and HLA class I molecules. Thus, of specific interest is the development of new therapies, which activate the JAK/STAT signaling pathway, thereby enhancing tumor immunogenicity. Interestingly, activation of RIG-I, a cytosolic receptor, which senses discrete types of virus-derived double-stranded RNA, induces the expression of type I IFN and proinflammatory cytokines. In tumor cells RIG-I activation can be elicited by transfection with the synthetic RIG-I ligand 3pRNA. However, until today it was unclear to which extent RIG-I activation affects melanoma immunogenicity. Therefore, the aim of this study was to investigate this.

Indeed, 3pRNA-mediated RIG-I activation resulted in an improved recognition of melanoma cells by autologous $CD8^+$ T cells. The latter was based on an increased expression of several APM components, which in turn increased the surface expression of HLA class I molecules. Additionally, an increased expression of ICAM-1 molecules after 3pRNA transfection was detected. To define the role of autocrine/paracrine type I IFN signaling in 3pRNA-modulated tumor immunogenicity, IFN-sensitive and IFN-resistant melanoma cell lines were analysed. These cell lines were generated from different metastases of one patient. Interestingly, also for IFN-resistant 3pRNA-transfected melanoma cells, improved recognition by $CD8^+$ T cells as well as the induction of APM components, HLA class I and ICAM-1 molecules were detected. Neither JAK1 nor STAT1, as components of the JAK/STAT signaling pathway, were essential for the improved immunogenicity of IFN-resistant tumor cells. However, RIG-I activation was associated with an increased expression of the HLA class I transactivators NLRC5 and IRF-1 detectable in both, IFN-sensitive and IFN-resistant cell lines. IRF-1 was identified as a central regulator of 3pRNA-mediated immunogenicity, since

downregulation of IRF-1 by siRNA abrogated the ability of 3pRNA to induce NLRC5 and APM component expression.

In addition to an increased T cell sensitivity, an increased expression of T-cell recruiting chemokines such as CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 and CXCL10 by 3pRNA-transfected IFN-sensitive and IFN-resistant melanoma cells could be detected.

Therefore, this study unravels a novel IFN-independent effect of RIG-I on antigen presentation, T-cell attraction and tumor recognition as a promising approach to enhance the immunogenicity of IFN-sensitive and IFN-resistant tumors.

10 Literaturverzeichnis

Aldinucci, D., and Colombatti, A. (2014). The inflammatory chemokine CCL5 and cancer progression. Mediators of inflammation 2014, 292376.

Angell, T. E., Lechner, M. G., Jang, J. K., LoPresti, J. S., and Epstein, A. L. (2014). MHC Class I Loss is a Frequent Mechanism of Immune Escape in Papillary Thyroid Cancer that is Reversed by Interferon and Selumetinib Treatment in vitro. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.

Azimi, F., Scolyer, R. A., Rumcheva, P., Moncrieff, M., Murali, R., McCarthy, S. W., Saw, R. P., and Thompson, J. F. (2012). Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 30, 2678-2683.

Badovinac, V. P., and Harty, J. T. (2001). Detection and analysis of antigen-specific CD8+ T cells. Immunologic research 24, 325-332.

Bald, T., Landsberg, J., Lopez-Ramos, D., Renn, M., Glodde, N., Jansen, P., Gaffal, E., Steitz, J., Tolba, R., Kalinke, U., et al. (2014). Immune cell-poor melanomas benefit from PD-1 blockade after targeted type I IFN activation. Cancer discovery 4, 674-687.

Balkwill, F. R. (2012). The chemokine system and cancer. The Journal of pathology 226, 148-157.

Benko, S., Magalhaes, J. G., Philpott, D. J., and Girardin, S. E. (2010). NLRC5 limits the activation of inflammatory pathways. Journal of immunology 185, 1681-1691.

Besch, R., Poeck, H., Hohenauer, T., Senft, D., Hacker, G., Berking, C., Hornung, V., Endres, S., Ruzicka, T., Rothenfusser, S., and Hartmann, G. (2009). Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. The Journal of clinical investigation 119, 2399-2411.

Biswas, A., Meissner, T. B., Kawai, T., and Kobayashi, K. S. (2012). Cutting edge: impaired MHC class I expression in mice deficient for Nlrc5/class I transactivator. Journal of immunology 189, 516-520.

Boon, T., Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., and van der Bruggen, P. (2006). Human T cell responses against melanoma. Annual review of immunology 24, 175-208.

Bowman, T., Broome, M. A., Sinibaldi, D., Wharton, W., Pledger, W. J., Sedivy, J. M., Irby, R., Yeatman, T., Courtneidge, S. A., and Jove, R. (2001). Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98, 7319-7324.

Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., and Jove, R. (2000). STATs in oncogenesis. Oncogene 19, 2474-2488.

Brahmer, J. R., Tykodi, S. S., Chow, L. Q., Hwu, W. J., Topalian, S. L., Hwu, P., Drake, C. G., Camacho, L. H., Kauh, J., Odunsi, K., et al. (2012). Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. The New England journal of medicine 366, 2455-2465.

Braun, B. C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P. M., Finley, D., and Schmidt, M. (1999). The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. Nature cell biology 1, 221-226.

Brehm, M. A., Daniels, K. A., and Welsh, R. M. (2005). Rapid production of TNF-alpha following TCR engagement of naive CD8 T cells. Journal of immunology 175, 5043-5049.

Buettner, R., Mora, L. B., and Jove, R. (2002). Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 8, 945-954.

Burdelya, L., Kujawski, M., Niu, G., Zhong, B., Wang, T., Zhang, S., Kortylewski, M., Shain, K., Kay, H., Djeu, J., et al. (2005). Stat3 activity in melanoma cells affects migration of immune effector cells and nitric oxide-mediated antitumor effects. Journal of immunology 174, 3925-3931.

Carvajal, R. D., Antonescu, C. R., Wolchok, J. D., Chapman, P. B., Roman, R. A., Teitcher, J., Panageas, K. S., Busam, K. J., Chmielowski, B., Lutzky, J., et al. (2011). KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. Jama 305, 2327-2334.

Catlett-Falcone, R., Landowski, T. H., Oshiro, M. M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J. L., Nunez, G., et al. (1999). Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. Immunity 10, 105-115.

Cerwenka, A., Baron, J. L., and Lanier, L. L. (2001). Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98, 11521-11526.

Chang, C. C., and Ferrone, S. (2007). Immune selective pressure and HLA class I antigen defects in malignant lesions. Cancer immunology, immunotherapy : CII 56, 227-236.

Chang, K. C., Hansen, E., Foroni, L., Lida, J., and Goldspink, G. (1991). Molecular and functional analysis of the virus- and interferon-inducible human MxA promoter. Archives of virology 117, 1-15.

Chapman, P. B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J. B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., et al. (2011). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. The New England journal of medicine 364, 2507-2516.

Chapman, P. B., Hauschild, A., and Sondak, V. K. (2014). Frontline approach to metastatic BRAF-mutant melanoma diagnosis, molecular evaluation, and treatment choice. American Society of Clinical Oncology educational book / ASCO American Society of Clinical Oncology Meeting, e412-421.

Chatterjee-Kishore, M., Kishore, R., Hicklin, D. J., Marincola, F. M., and Ferrone, S. (1998). Different requirements for signal transducer and activator of transcription 1alpha and interferon regulatory factor 1 in the regulation of low molecular mass polypeptide 2 and transporter associated with antigen processing 1 gene expression. The Journal of biological chemistry 273, 16177-16183.

Chavez-Galan, L., Arenas-Del Angel, M. C., Zenteno, E., Chavez, R., and Lascurain, R. (2009). Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. Cellular & molecular immunology 6, 15-25.

Chen, F. F., Jiang, G., Xu, K., and Zheng, J. N. (2013). Function and mechanism by which interferon regulatory factor-1 inhibits oncogenesis. Oncology letters 5, 417-423.

Childs, K., Randall, R., and Goodbourn, S. (2012). Paramyxovirus V proteins interact with the RNA Helicase LGP2 to inhibit RIG-I-dependent interferon induction. Journal of virology 86, 3411-3421.

Cho, S., Ryoo, J., Jun, Y., and Ahn, K. (2011). Receptor-mediated ER export of human MHC class I molecules is regulated by the C-terminal single amino acid. Traffic 12, 42-55.

Clark, W. H., Jr. (1991). Human cutaneous malignant melanoma as a model for cancer. Cancer metastasis reviews 10, 83-88.

Clark, W. H., Jr., Elder, D. E., Guerry, D. t., Epstein, M. N., Greene, M. H., and Van Horn, M. (1984). A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. Human pathology 15, 1147-1165.

Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., and Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. Carcinogenesis 30, 1073-1081.

Corbin, G. A., and Harty, J. T. (2005). T cells undergo rapid ON/OFF but not ON/OFF/ON cycling of cytokine production in response to antigen. Journal of immunology 174, 718-726.

Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., van der Bruggen, P., and Boon, T. (2014). Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. Nature reviews Cancer 14, 135-146.

Cui, J., Zhu, L., Xia, X., Wang, H. Y., Legras, X., Hong, J., Ji, J., Shen, P., Zheng, S., Chen, Z. J., and Wang, R. F. (2010). NLRC5 negatively regulates the NF-kappaB and type I interferon signaling pathways. Cell 141, 483-496.

Cui, S., Eisenacher, K., Kirchhofer, A., Brzozka, K., Lammens, A., Lammens, K., Fujita, T., Conzelmann, K. K., Krug, A., and Hopfner, K. P. (2008). The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. Molecular cell 29, 169-179.

Curtin, J. A., Fridlyand, J., Kageshita, T., Patel, H. N., Busam, K. J., Kutzner, H., Cho, K. H., Aiba, S., Brocker, E. B., LeBoit, P. E., et al. (2005). Distinct sets of genetic alterations in melanoma. The New England journal of medicine 353, 2135-2147.

Daniotti, M., Oggionni, M., Ranzani, T., Vallacchi, V., Campi, V., Di Stasi, D., Torre, G. D., Perrone, F., Luoni, C., Suardi, S., et al. (2004). BRAF alterations are associated with complex mutational profiles in malignant melanoma. Oncogene 23, 5968-5977.

Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., et al. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature 417, 949-954.

Del Cid, N., Jeffery, E., Rizvi, S. M., Stamper, E., Peters, L. R., Brown, W. C., Provoda, C., and Raghavan, M. (2010). Modes of calreticulin recruitment to the major histocompatibility complex class I assembly pathway. The Journal of biological chemistry 285, 4520-4535.

Dempoya, J., Matsumiya, T., Imaizumi, T., Hayakari, R., Xing, F., Yoshida, H., Okumura, K., and Satoh, K. (2012). Double-Stranded RNA Induces Biphasic STAT1 Phosphorylation by both Type I Interferon (IFN)-Dependent and Type I IFN-Independent Pathways. Journal of virology 86, 12760-12769.

Diamond, M. S., Kinder, M., Matsushita, H., Mashayekhi, M., Dunn, G. P., Archambault, J. M., Lee, H., Arthur, C. D., White, J. M., Kalinke, U., et al. (2011). Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. The Journal of experimental medicine 208, 1989-2003.

Didcock, L., Young, D. F., Goodbourn, S., and Randall, R. E. (1999). The V protein of simian virus 5 inhibits interferon signalling by targeting STAT1 for proteasome-mediated degradation. Journal of virology 73, 9928-9933.

Diefenbach, A., Jensen, E. R., Jamieson, A. M., and Raulet, D. H. (2001). Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. Nature 413, 165-171.

Ding, S., and Robek, M. D. (2014). Peroxisomal MAVS activates IRF1-mediated IFN-lambda production. Nature immunology 15, 700-701.

Dissemond, J., Goette, P., Moers, J., Lindeke, A., Goos, M., Ferrone, S., and Wagner, S. N. (2003). Immunoproteasome subunits LMP2 and LMP7 downregulation in primary malignant melanoma lesions: association with lack of spontaneous regression. Melanoma research 13, 371-377.

Dixit, E., Boulant, S., Zhang, Y., Lee, A. S., Odendall, C., Shum, B., Hacohen, N., Chen, Z. J., Whelan, S. P., Fransen, M., et al. (2010). Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. Cell 141, 668-681.

Donnelly, R. P., and Kotenko, S. V. (2010). Interferon-lambda: a new addition to an old family. Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research 30, 555-564.

Doody, G. M., Stephenson, S., McManamy, C., and Tooze, R. M. (2007). PRDM1/BLIMP-1 modulates IFN-gamma-dependent control of the MHC class I antigen-processing and peptide-loading pathway. Journal of immunology 179, 7614-7623.

Drew, P. D., Franzoso, G., Becker, K. G., Bours, V., Carlson, L. M., Siebenlist, U., and Ozato, K. (1995). NF kappa B and interferon regulatory factor 1 physically interact and synergistically induce major histocompatibility class I gene expression. Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research 15, 1037-1045.

Duewell, P., Steger, A., Lohr, H., Bourhis, H., Hoelz, H., Kirchleitner, S. V., Stieg, M. R., Grassmann, S., Kobold, S., Siveke, J. T., et al. (2014). RIG-I-like helicases induce immunogenic cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8 T cells. Cell death and differentiation.

Eggermont, A. M., Suciu, S., Testori, A., Santinami, M., Kruit, W. H., Marsden, J., Punt, C. J., Sales, F., Dummer, R., Robert, C., et al. (2012). Long-term results of the randomized phase III trial EORTC 18991 of adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation in resected stage III melanoma. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 30, 3810-3818.

Elder, D. E., Clark, W. H., Jr., Elenitsas, R., Guerry, D. t., and Halpern, A. C. (1993). The early and intermediate precursor lesions of tumor progression in the melanocytic system: common acquired nevi and atypical (dysplastic) nevi. Seminars in diagnostic pathology 10, 18-35.

Elliott, T., Willis, A., Cerundolo, V., and Townsend, A. (1995). Processing of major histocompatibility class I-restricted antigens in the endoplasmic reticulum. The Journal of experimental medicine 181, 1481-1491.

Epling-Burnette, P. K., Liu, J. H., Catlett-Falcone, R., Turkson, J., Oshiro, M., Kothapalli, R., Li, Y., Wang, J. M., Yang-Yen, H. F., Karras, J., et al. (2001). Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. The Journal of clinical investigation 107, 351-362.

Flaherty, K. T., Hodi, F. S., and Fisher, D. E. (2012). From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. Nature reviews Cancer 12, 349-361.

Fridman, W. H., Pages, F., Sautes-Fridman, C., and Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. Nature reviews Cancer 12, 298-306.

Fruh, K., and Yang, Y. (1999). Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma. Current opinion in immunology 11, 76-81.

Fu, X. Y., Kessler, D. S., Veals, S. A., Levy, D. E., and Darnell, J. E., Jr. (1990). ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon alpha, consists of multiple interacting polypeptide chains. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87, 8555-8559.

Fuertes, M. B., Kacha, A. K., Kline, J., Woo, S. R., Kranz, D. M., Murphy, K. M., and Gajewski, T. F. (2011). Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+ T cell responses through CD8{alpha}+ dendritic cells. The Journal of experimental medicine 208, 2005-2016.

Fujita, M., Zhu, X., Ueda, R., Sasaki, K., Kohanbash, G., Kastenhuber, E. R., McDonald, H. A., Gibson, G. A., Watkins, S. C., Muthuswamy, R., et al. (2009). Effective immunotherapy against murine gliomas using type 1 polarizing dendritic cells--significant roles of CXCL10. Cancer research 69, 1587-1595.

Fulton, A. M. (2009). The chemokine receptors CXCR4 and CXCR3 in cancer. Current oncology reports 11, 125-131.

Furuya, M., Suyama, T., Usui, H., Kasuya, Y., Nishiyama, M., Tanaka, N., Ishiwata, I., Nagai, Y., Shozu, M., and Kimura, S. (2007). Up-regulation of CXC chemokines and their receptors: implications for proinflammatory microenvironments of ovarian carcinomas and endometriosis. Human pathology 38, 1676-1687.

Gajewski, T. F., Fuertes, M. B., and Woo, S. R. (2012). Innate immune sensing of cancer: clues from an identified role for type I IFNs. Cancer immunology, immunotherapy : CII 61, 1343-1347.

Garbe, C., Radny, P., Linse, R., Dummer, R., Gutzmer, R., Ulrich, J., Stadler, R., Weichenthal, M., Eigentler, T., Ellwanger, U., and Hauschild, A. (2008). 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. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 19, 1195-1201.

Garrido, F., Cabrera, T., and Aptsiauri, N. (2010). "Hard" and "soft" lesions underlying the HLA class I alterations in cancer cells: implications for immunotherapy. International journal of cancer Journal international du cancer 127, 249-256.

Gatti, G., Nunez, N. G., Nocera, D. A., Dejager, L., Libert, C., Giraudo, C., and Maccioni, M. (2013). Direct effect of dsRNA mimetics on cancer cells induces endogenous IFN-beta production capable of improving dendritic cell function. European journal of immunology 43, 1849-1861.

Gething, M. J., and Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. Nature 355, 33-45.

Gilchrest, B. A., Eller, M. S., Geller, A. C., and Yaar, M. (1999). The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. The New England journal of medicine 340, 1341-1348.

Gitlin, L., Barchet, W., Gilfillan, S., Cella, M., Beutler, B., Flavell, R. A., Diamond, M. S., and Colonna, M. (2006). Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 8459-8464.

Gobin, S. J., Biesta, P., and Van den Elsen, P. J. (2003). Regulation of human beta 2-microglobulin transactivation in hematopoietic cells. Blood 101, 3058-3064.

Gobin, S. J., Keijsers, V., van Zutphen, M., and van den Elsen, P. J. (1998a). The role of enhancer A in the locus-specific transactivation of classical and nonclassical HLA class I genes by nuclear factor kappa B. Journal of immunology 161, 2276-2283.

Gobin, S. J., Peijnenburg, A., van Eggermond, M., van Zutphen, M., van den Berg, R., and van den Elsen, P. J. (1998b). The RFX complex is crucial for the constitutive and CIITA-mediated transactivation of MHC class I and beta2-microglobulin genes. Immunity 9, 531-541.

Gonzalez-Martin, A., Mira, E., and Manes, S. (2012). CCR5 as a potential target in cancer therapy: inhibition or stimulation? Anti-cancer agents in medicinal chemistry 12, 1045-1057.

Gonzalez-Navajas, J. M., Lee, J., David, M., and Raz, E. (2012). Immunomodulatory functions of type I interferons. Nature reviews Immunology 12, 125-135.

Granot, Z., Henke, E., Comen, E. A., King, T. A., Norton, L., and Benezra, R. (2011). Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. Cancer cell 20, 300-314.

Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D., and Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 A resolution. Nature 386, 463-471.

Guerra, N., Tan, Y. X., Joncker, N. T., Choy, A., Gallardo, F., Xiong, N., Knoblaugh, S., Cado, D., Greenberg, N. M., and Raulet, D. H. (2008). NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. Immunity 28, 571-580.

Hallermalm, K., Seki, K., Wei, C., Castelli, C., Rivoltini, L., Kiessling, R., and Levitskaya, J. (2001). Tumor necrosis factor-alpha induces coordinated changes in major histocompatibility class I presentation pathway, resulting in increased stability of class I complexes at the cell surface. Blood 98, 1108-1115.

Hamid, O., Robert, C., Daud, A., Hodi, F. S., Hwu, W. J., Kefford, R., Wolchok, J. D., Hersey, P., Joseph, R. W., Weber, J. S., et al. (2013). Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. The New England journal of medicine 369, 134-144.

Hanahan, D., and Coussens, L. M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. Cancer cell 21, 309-322.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144, 646-674.

Harikumar, K. B., Yester, J. W., Surace, M. J., Oyeniran, C., Price, M. M., Huang, W. C., Hait, N. C., Allegood, J. C., Yamada, A., Kong, X., et al. (2014). K63-linked polyubiquitination of transcription factor IRF1 is essential for IL-1-induced production of chemokines CXCL10 and CCL5. Nature immunology 15, 231-238.

Harlin, H., Kuna, T. V., Peterson, A. C., Meng, Y., and Gajewski, T. F. (2006). Tumor progression despite massive influx of activated CD8(+) T cells in a patient with malignant melanoma ascites. Cancer immunology, immunotherapy : CII 55, 1185-1197.

Harlin, H., Meng, Y., Peterson, A. C., Zha, Y., Tretiakova, M., Slingluff, C., McKee, M., and Gajewski, T. F. (2009). Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8+ T-cell recruitment. Cancer research 69, 3077-3085.

Hauschild, A., Grob, J. J., Demidov, L. V., Jouary, T., Gutzmer, R., Millward, M., Rutkowski, P., Blank, C. U., Miller, W. H., Jr., Kaempgen, E., et al. (2012). Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. Lancet 380, 358-365.

Hengel, H., Koszinowski, U. H., and Conzelmann, K. K. (2005). Viruses know it all: new insights into IFN networks. Trends in immunology 26, 396-401.

Hervas-Stubbs, S., Riezu-Boj, J. I., Gonzalez, I., Mancheno, U., Dubrot, J., Azpilicueta, A., Gabari, I., Palazon, A., Aranguren, A., Ruiz, J., et al. (2010). Effects of IFN-alpha as a signal-3 cytokine on human naive and antigen-experienced CD8(+) T cells. European journal of immunology 40, 3389-3402.

Hildner, K., Edelson, B. T., Purtha, W. E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B. U., Unanue, E. R., Diamond, M. S., et al. (2008). Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. Science 322, 1097-1100.

Hiscott, J., Lacoste, J., and Lin, R. (2006). Recruitment of an interferon molecular signaling complex to the mitochondrial membrane: disruption by hepatitis C virus NS3-4A protease. Biochemical pharmacology 72, 1477-1484.

Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J. C., et al. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. The New England journal of medicine 363, 711-723.

Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K. K., Schlee, M., et al. (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. Science 314, 994-997.

Hou, J., Zhou, Y., Zheng, Y., Fan, J., Zhou, W., Ng, I. O., Sun, H., Qin, L., Qiu, S., Lee, J. M., et al. (2014). Hepatic RIG-I predicts survival and interferon-alpha therapeutic response in hepatocellular carcinoma. Cancer cell 25, 49-63.

Ikeda, H., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2002). The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. Cytokine & growth factor reviews 13, 95-109.

Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. Nature immunology 5, 987-995.

Jenkins, M. R., and Griffiths, G. M. (2010). The synapse and cytolytic machinery of cytotoxic T cells. Current opinion in immunology 22, 308-313.

Jones, E. Y. (1997). MHC class I and class II structures. Current opinion in immunology 9, 75-79.

Kalos, M., and June, C. H. (2013). Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology. Immunity 39, 49-60.

Kang, D. C., Gopalkrishnan, R. V., Lin, L., Randolph, A., Valerie, K., Pestka, S., and Fisher, P. B. (2004). Expression analysis and genomic characterization of human melanoma differentiation associated gene-5, mda-5: a novel type I interferon-responsive apoptosis-inducing gene. Oncogene 23, 1789-1800.

Kaplan, D. H., Shankaran, V., Dighe, A. S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 7556-7561.

Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T. S., Fujita, T., and Akira, S. (2008). Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. The Journal of experimental medicine 205, 1601-1610.

Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K. J., et al. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. Nature 441, 101-105.

Katze, M. G., He, Y., and Gale, M., Jr. (2002). Viruses and interferon: a fight for supremacy. Nature reviews Immunology 2, 675-687.

Kawada, K., Hosogi, H., Sonoshita, M., Sakashita, H., Manabe, T., Shimahara, Y., Sakai, Y., Takabayashi, A., Oshima, M., and Taketo, M. M. (2007). Chemokine receptor CXCR3 promotes colon cancer metastasis to lymph nodes. Oncogene 26, 4679-4688.

Kedl, R. M., and Mescher, M. F. (1997). Migration and activation of antigen-specific CD8+ T cells upon in vivo stimulation with allogeneic tumor. Journal of immunology 159, 650-663.

Keeley, E. C., Mehrad, B., and Strieter, R. M. (2010). CXC chemokines in cancer angiogenesis and metastases. Advances in cancer research 106, 91-111.

Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J., and Sharpe, A. H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. Annual review of immunology 26, 677-704.

Kershaw, M. H., Westwood, J. A., and Darcy, P. K. (2013). Gene-engineered T cells for cancer therapy. Nature reviews Cancer 13, 525-541.

Keskinen, P., Ronni, T., Matikainen, S., Lehtonen, A., and Julkunen, I. (1997). Regulation of HLA class I and II expression by interferons and influenza A virus in human peripheral blood mononuclear cells. Immunology 91, 421-429.

Kimura, T., Kadokawa, Y., Harada, H., Matsumoto, M., Sato, M., Kashiwazaki, Y., Tarutani, M., Tan, R. S., Takasugi, T., Matsuyama, T., et al. (1996). Essential and non-redundant roles of p48 (ISGF3 gamma) and IRF-1 in both type I and type II interferon responses, as revealed by gene targeting studies. Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms 1, 115-124.

Kirkwood, J. M., Strawderman, M. H., Ernstoff, M. S., Smith, T. J., Borden, E. C., and Blum, R. H. (1996). Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous

melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 14, 7-17.
Kobayashi, K. S., and van den Elsen, P. J. (2012). NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. Nature reviews Immunology 12, 813-820.
Koneru, M., Schaer, D., Monu, N., Ayala, A., and Frey, A. B. (2005). Defective proximal TCR signaling inhibits CD8+ tumor-infiltrating lymphocyte lytic function. Journal of immunology 174, 1830-1840.
Kubler, K., Gehrke, N., Riemann, S., Bohnert, V., Zillinger, T., Hartmann, E., Polcher, M., Rudlowski, C., Kuhn, W., Hartmann, G., and Barchet, W. (2010). Targeted activation of RNA helicase retinoic acid-inducible gene-I induces proimmunogenic apoptosis of human ovarian cancer cells. Cancer research 70, 5293-5304.
Kuenzel, S., Till, A., Winkler, M., Hasler, R., Lipinski, S., Jung, S., Grotzinger, J., Fickenscher, H., Schreiber, S., and Rosenstiel, P. (2010). The nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor NLRC5 is involved in IFN-dependent antiviral immune responses. Journal of immunology 184, 1990-2000.
Laver, N. V., McLaughlin, M. E., and Duker, J. S. (2010). Ocular melanoma. Archives of pathology & laboratory medicine 134, 1778-1784.
Leach, D. R., Krummel, M. F., and Allison, J. P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. Science 271, 1734-1736.
Leibovich-Rivkin, T., Liubomirski, Y., Bernstein, B., Meshel, T., and Ben-Baruch, A. (2013). Inflammatory factors of the tumor microenvironment induce plasticity in nontransformed breast epithelial cells: EMT, invasion, and collapse of normally organized breast textures. Neoplasia 15, 1330-1346.
Leibowitz, M. S., Srivastava, R. M., Andrade Filho, P. A., Egloff, A. M., Wang, L., Seethala, R. R., Ferrone, S., and Ferris, R. L. (2013). SHP2 is overexpressed and inhibits pSTAT1-mediated APM component expression, T-cell attracting chemokine secretion, and CTL recognition in head and neck cancer cells. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 19, 798-808.
Leone, P., Shin, E. C., Perosa, F., Vacca, A., Dammacco, F., and Racanelli, V. (2013). MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells. Journal of the National Cancer Institute 105, 1172-1187.
Lesinski, G. B., Trefry, J., Brasdovich, M., Kondadasula, S. V., Sackey, K., Zimmerer, J. M., Chaudhury, A. R., Yu, L., Zhang, X., Crespin, T. R., et al. (2007). Melanoma cells exhibit variable signal transducer and activator of transcription 1 phosphorylation and a reduced response to IFN-alpha compared with immune effector cells. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 13, 5010-5019.
Levy, D. E., Kessler, D. S., Pine, R., Reich, N., and Darnell, J. E., Jr. (1988). Interferon-induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive and negative transcriptional control. Genes & development 2, 383-393.
Li, G., Satyamoorthy, K., and Herlyn, M. (2002). Dynamics of cell interactions and communications during melanoma development. Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists 13, 62-70.
Li, W., Huang, X., Tong, H., Wang, Y., Zhang, T., Wang, W., Dai, L., Li, T., Lin, S., and Wu, H. (2012). Comparison of the regulation of beta-catenin signaling by type I, type II and type III interferons in hepatocellular carcinoma cells. PloS one 7, e47040.
Liubinas, S. V., Maartens, N., and Drummond, K. J. (2010). Primary melanocytic neoplasms of the central nervous system. Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia 17, 1227-1232.

Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25, 402-408.

Ljunggren, H. G., and Karre, K. (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. Immunology today 11, 237-244.

Lo, B. K., Yu, M., Zloty, D., Cowan, B., Shapiro, J., and McElwee, K. J. (2010). CXCR3/ligands are significantly involved in the tumorigenesis of basal cell carcinomas. The American journal of pathology 176, 2435-2446.

Long, G. V., Stroyakovskiy, D., Gogas, H., Levchenko, E., de Braud, F., Larkin, J., Garbe, C., Jouary, T., Hauschild, A., Grob, J. J., et al. (2014). Combined BRAF and MEK Inhibition versus BRAF Inhibition Alone in Melanoma. The New England journal of medicine.

Loo, Y. M., Fornek, J., Crochet, N., Bajwa, G., Perwitasari, O., Martinez-Sobrido, L., Akira, S., Gill, M. A., Garcia-Sastre, A., Katze, M. G., and Gale, M., Jr. (2008). Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. Journal of virology 82, 335-345.

Loo, Y. M., and Gale, M., Jr. (2011). Immune signaling by RIG-I-like receptors. Immunity 34, 680-692.

Lopez-Albaitero, A., Nayak, J. V., Ogino, T., Machandia, A., Gooding, W., DeLeo, A. B., Ferrone, S., and Ferris, R. L. (2006). Role of antigen-processing machinery in the in vitro resistance of squamous cell carcinoma of the head and neck cells to recognition by CTL. Journal of immunology 176, 3402-3409.

Lorenzi, S., Forloni, M., Cifaldi, L., Antonucci, C., Citti, A., Boldrini, R., Pezzullo, M., Castellano, A., Russo, V., van der Bruggen, P., et al. (2012). IRF1 and NF-kB restore MHC class I-restricted tumor antigen processing and presentation to cytotoxic T cells in aggressive neuroblastoma. PloS one 7, e46928.

Love, I. M., Shi, D., and Grossman, S. R. (2013). p53 Ubiquitination and proteasomal degradation. Methods in molecular biology 962, 63-73.

Lu, L. L., Puri, M., Horvath, C. M., and Sen, G. C. (2008). Select paramyxoviral V proteins inhibit IRF3 activation by acting as alternative substrates for inhibitor of kappaB kinase epsilon (IKKe)/TBK1. The Journal of biological chemistry 283, 14269-14276.

Lutfalla, G., Holland, S. J., Cinato, E., Monneron, D., Reboul, J., Rogers, N. C., Smith, J. M., Stark, G. R., Gardiner, K., Mogensen, K. E., and et al. (1995). Mutant U5A cells are complemented by an interferon-alpha beta receptor subunit generated by alternative processing of a new member of a cytokine receptor gene cluster. The EMBO journal 14, 5100-5108.

Mantovani, A., Bonecchi, R., and Locati, M. (2006). Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. Nature reviews Immunology 6, 907-918.

Marie, I., Durbin, J. E., and Levy, D. E. (1998). Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. The EMBO journal 17, 6660-6669.

Markovic, S. N., Erickson, L. A., Rao, R. D., Weenig, R. H., Pockaj, B. A., Bardia, A., Vachon, C. M., Schild, S. E., McWilliams, R. R., Hand, J. L., et al. (2007). Malignant melanoma in the 21st century, part 2: staging, prognosis, and treatment. Mayo Clinic proceedings 82, 490-513.

Marques, J. T., Devosse, T., Wang, D., Zamanian-Daryoush, M., Serbinowski, P., Hartmann, R., Fujita, T., Behlke, M. A., and Williams, B. R. (2006). A structural basis for discriminating between self and nonself double-stranded RNAs in mammalian cells. Nature biotechnology 24, 559-565.

Mattei, S., Colombo, M. P., Melani, C., Silvani, A., Parmiani, G., and Herlyn, M. (1994). Expression of cytokine/growth factors and their receptors in human melanoma and melanocytes. International journal of cancer Journal international du cancer 56, 853-857.

McKendry, R., John, J., Flavell, D., Muller, M., Kerr, I. M., and Stark, G. R. (1991). High-frequency mutagenesis of human cells and characterization of a mutant unresponsive to both alpha and gamma interferons. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88, 11455-11459.

Meissner, T. B., Li, A., Biswas, A., Lee, K. H., Liu, Y. J., Bayir, E., Iliopoulos, D., van den Elsen, P. J., and Kobayashi, K. S. (2010). NLR family member NLRC5 is a transcriptional regulator of MHC class I genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 13794-13799.

Melchjorsen, J., Jensen, S. B., Malmgaard, L., Rasmussen, S. B., Weber, F., Bowie, A. G., Matikainen, S., and Paludan, S. R. (2005). Activation of innate defense against a paramyxovirus is mediated by RIG-I and TLR7 and TLR8 in a cell-type-specific manner. Journal of virology 79, 12944-12951.

Mendez, R., Rodriguez, T., Del Campo, A., Monge, E., Maleno, I., Aptsiauri, N., Jimenez, P., Pedrinaci, S., Pawelec, G., Ruiz-Cabello, F., and Garrido, F. (2008). Characterization of HLA class I altered phenotypes in a panel of human melanoma cell lines. Cancer immunology, immunotherapy : CII 57, 719-729.

Meraz, M. A., White, J. M., Sheehan, K. C., Bach, E. A., Rodig, S. J., Dighe, A. S., Kaplan, D. H., Riley, J. K., Greenlund, A. C., Campbell, D., et al. (1996). Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. Cell 84, 431-442.

Messina, J. L., Fenstermacher, D. A., Eschrich, S., Qu, X., Berglund, A. E., Lloyd, M. C., Schell, M. J., Sondak, V. K., Weber, J. S., and Mule, J. J. (2012). 12-Chemokine gene signature identifies lymph node-like structures in melanoma: potential for patient selection for immunotherapy? Scientific reports 2, 765.

Miller, A. J., and Mihm, M. C., Jr. (2006). Melanoma. The New England journal of medicine 355, 51-65.

Molon, B., Gri, G., Bettella, M., Gomez-Mouton, C., Lanzavecchia, A., Martinez, A. C., Manes, S., and Viola, A. (2005). T cell costimulation by chemokine receptors. Nature immunology 6, 465-471.

Monteagudo, C., Martin, J. M., Jorda, E., and Llombart-Bosch, A. (2007). CXCR3 chemokine receptor immunoreactivity in primary cutaneous malignant melanoma: correlation with clinicopathological prognostic factors. Journal of clinical pathology 60, 596-599.

Moschos, S. J., Edington, H. D., Land, S. R., Rao, U. N., Jukic, D., Shipe-Spotloe, J., and Kirkwood, J. M. (2006). 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. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 24, 3164-3171.

Mrowietz, U., Schwenk, U., Maune, S., Bartels, J., Kupper, M., Fichtner, I., Schroder, J. M., and Schadendorf, D. (1999). The chemokine RANTES is secreted by human melanoma cells and is associated with enhanced tumour formation in nude mice. British journal of cancer 79, 1025-1031.

Neerincx, A., Castro, W., Guarda, G., and Kufer, T. A. (2013). NLRC5, at the Heart of Antigen Presentation. Frontiers in immunology 4, 397.

Neerincx, A., Lautz, K., Menning, M., Kremmer, E., Zigrino, P., Hosel, M., Buning, H., Schwarzenbacher, R., and Kufer, T. A. (2010). A role for the human nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat-containing family member NLRC5 in antiviral responses. The Journal of biological chemistry 285, 26223-26232.

Nossner, E., and Parham, P. (1995). Species-specific differences in chaperone interaction of human and mouse major histocompatibility complex class I molecules. The Journal of experimental medicine 181, 327-337.

Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G. M., Apetoh, L., Perfettini, J. L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., et al. (2007). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. Nature medicine 13, 54-61.

Obeidy, P., and Sharland, A. F. (2009). NKG2D and its ligands. The international journal of biochemistry & cell biology 41, 2364-2367.

Odendall, C., Dixit, E., Stavru, F., Bierne, H., Franz, K. M., Durbin, A. F., Boulant, S., Gehrke, L., Cossart, P., and Kagan, J. C. (2014). Diverse intracellular pathogens activate type III interferon expression from peroxisomes. Nature immunology 15, 717-726.

Ortmann, B., Copeman, J., Lehner, P. J., Sadasivan, B., Herberg, J. A., Grandea, A. G., Riddell, S. R., Tampe, R., Spies, T., Trowsdale, J., and Cresswell, P. (1997). A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. Science 277, 1306-1309.

Padua, R. A., Barrass, N., and Currie, G. A. (1984). A novel transforming gene in a human malignant melanoma cell line. Nature 311, 671-673.

Panne, D. (2008). The enhanceosome. Current opinion in structural biology 18, 236-242.

Pansky, A., Hildebrand, P., Fasler-Kan, E., Baselgia, L., Ketterer, S., Beglinger, C., and Heim, M. H. (2000). Defective Jak-STAT signal transduction pathway in melanoma cells resistant to growth inhibition by interferon-alpha. International journal of cancer Journal international du cancer 85, 720-725.

Paschen, A., Arens, N., Sucker, A., Greulich-Bode, K. M., Fonsatti, E., Gloghini, A., Striegel, S., Schwinn, N., Carbone, A., Hildenbrand, R., et al. (2006). The coincidence of chromosome 15 aberrations and beta2-microglobulin gene mutations is causative for the total loss of human leukocyte antigen class I expression in melanoma. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 12, 3297-3305.

Paz, S., Sun, Q., Nakhaei, P., Romieu-Mourez, R., Goubau, D., Julkunen, I., Lin, R., and Hiscott, J. (2006). Induction of IRF-3 and IRF-7 phosphorylation following activation of the RIG-I pathway. Cellular and molecular biology 52, 17-28.

Pentcheva-Hoang, T., Corse, E., and Allison, J. P. (2009). Negative regulators of T-cell activation: potential targets for therapeutic intervention in cancer, autoimmune disease, and persistent infections. Immunological reviews 229, 67-87.

Pestka, S., Krause, C. D., and Walter, M. R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. Immunological reviews 202, 8-32.

Phan, G. Q., and Rosenberg, S. A. (2013). Adoptive cell transfer for patients with metastatic melanoma: the potential and promise of cancer immunotherapy. Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center 20, 289-297.

Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C. P., Rehwinkel, J., Kato, H., Takeuchi, O., Akira, S., Way, M., Schiavo, G., and Reis e Sousa, C. (2009). Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. Journal of virology 83, 10761-10769.

Poeck, H., Bscheider, M., Gross, O., Finger, K., Roth, S., Rebsamen, M., Hannesschlager, N., Schlee, M., Rothenfusser, S., Barchet, W., et al. (2010). Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production. Nature immunology 11, 63-69.

Precious, B., Childs, K., Fitzpatrick-Swallow, V., Goodbourn, S., and Randall, R. E. (2005). Simian virus 5 V protein acts as an adaptor, linking DDB1 to STAT2, to facilitate the ubiquitination of STAT1. Journal of virology 79, 13434-13441.

Psaty, E. L., Scope, A., Halpern, A. C., and Marghoob, A. A. (2010). Defining the patient at high risk for melanoma. International journal of dermatology 49, 362-376.

Qian, B. Z., Li, J., Zhang, H., Kitamura, T., Zhang, J., Campion, L. R., Kaiser, E. A., Snyder, L. A., and Pollard, J. W. (2011). CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. Nature 475, 222-225.

Ranjan, P., Singh, N., Kumar, A., Neerincx, A., Kremmer, E., Cao, W., Davis, W. G., Katz, J. M., Gangappa, S., Lin, R., et al. (2014). NLRC5 interacts with RIG-I to induce a robust antiviral response against influenza virus infection. European journal of immunology.

Rauvala, H., and Rouhiainen, A. (2007). RAGE as a receptor of HMGB1 (Amphoterin): roles in health and disease. Current molecular medicine 7, 725-734.

Ren, Y., Zhang, Y., Liu, R. Z., Fenstermacher, D. A., Wright, K. L., Teer, J. K., and Wu, J. (2013). JAK1 truncating mutations in gynecologic cancer define new role of cancer-associated protein tyrosine kinase aberrations. Scientific reports 3, 3042.

Ren, Y. X., Yang, J., Zhang, L. J., Sun, R. M., Zhao, L. F., Zhang, M., Chen, Y., Ma, J., Qiao, K., Sun, Q. M., et al. (2014). Downregulation of expression of transporters associated with antigen processing 1 and 2 and human leukocyte antigen I and its effect on immunity in nasopharyngeal carcinoma patients. Molecular and clinical oncology 2, 51-58.

Respa, A., Bukur, J., Ferrone, S., Pawelec, G., Zhao, Y., Wang, E., Marincola, F. M., and Seliger, B. (2011). Association of IFN-gamma signal transduction defects with impaired HLA class I antigen processing in melanoma cell lines. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 17, 2668-2678.

Robert, C., Thomas, L., Bondarenko, I., O'Day, S., M, D. J., Garbe, C., Lebbe, C., Baurain, J. F., Testori, A., Grob, J. J., et al. (2011). Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. The New England journal of medicine 364, 2517-2526.

Rodriguez, T., Mendez, R., Del Campo, A., Jimenez, P., Aptsiauri, N., Garrido, F., and Ruiz-Cabello, F. (2007). Distinct mechanisms of loss of IFN-gamma mediated HLA class I inducibility in two melanoma cell lines. BMC cancer 7, 34.

Rudd, C. E., Taylor, A., and Schneider, H. (2009). CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. Immunological reviews 229, 12-26.

Ruffell, B., DeNardo, D. G., Affara, N. I., and Coussens, L. M. (2010). Lymphocytes in cancer development: polarization towards pro-tumor immunity. Cytokine & growth factor reviews 21, 3-10.

Saito, T., Hirai, R., Loo, Y. M., Owen, D., Johnson, C. L., Sinha, S. C., Akira, S., Fujita, T., and Gale, M., Jr. (2007). Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, 582-587.

Sallusto, F., and Baggiolini, M. (2008). Chemokines and leukocyte traffic. Nature immunology 9, 949-952.

Schadendorf, D., and Hauschild, A. (2014). Melanoma in 2013: Melanoma--the run of success continues. Nature reviews Clinical oncology 11, 75-76.

Schatton, T., Scolyer, R. A., Thompson, J. F., and Mihm, M. C., Jr. (2014). Tumor-infiltrating lymphocytes and their significance in melanoma prognosis. Methods in molecular biology 1102, 287-324.

Schindler, C., Shuai, K., Prezioso, V. R., and Darnell, J. E., Jr. (1992). Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. Science 257, 809-813.

Schlecker, E., Stojanovic, A., Eisen, C., Quack, C., Falk, C. S., Umansky, V., and Cerwenka, A. (2012). Tumor-infiltrating monocytic myeloid-derived suppressor cells mediate CCR5-dependent recruitment of regulatory T cells favoring tumor growth. Journal of immunology 189, 5602-5611.

Schlee, M., Roth, A., Hornung, V., Hagmann, C. A., Wimmenauer, V., Barchet, W., Coch, C., Janke, M., Mihailovic, A., Wardle, G., et al. (2009). Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. Immunity 31, 25-34.

Schoenborn, J. R., and Wilson, C. B. (2007). Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. Advances in immunology 96, 41-101.

Schulz, O., Diebold, S. S., Chen, M., Naslund, T. I., Nolte, M. A., Alexopoulou, L., Azuma, Y. T., Flavell, R. A., Liljestrom, P., and Reis e Sousa, C. (2005). Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. Nature 433, 887-892.

Schwarz, K., van Den Broek, M., Kostka, S., Kraft, R., Soza, A., Schmidtke, G., Kloetzel, P. M., and Groettrup, M. (2000). Overexpression of the proteasome subunits LMP2, LMP7, and MECL-1, but not PA28 alpha/beta, enhances the presentation of an immunodominant lymphocytic choriomeningitis virus T cell epitope. Journal of immunology 165, 768-778.

Scott, I. (2010). The role of mitochondria in the mammalian antiviral defense system. Mitochondrion 10, 316-320.

Seetharamu, N., Ott, P. A., and Pavlick, A. C. (2010). Mucosal melanomas: a case-based review of the literature. The oncologist 15, 772-781.

Shin, E. C., Seifert, U., Kato, T., Rice, C. M., Feinstone, S. M., Kloetzel, P. M., and Rehermann, B. (2006). Virus-induced type I IFN stimulates generation of immunoproteasomes at the site of infection. The Journal of clinical investigation 116, 3006-3014.

Sijts, A. J., Ruppert, T., Rehermann, B., Schmidt, M., Koszinowski, U., and Kloetzel, P. M. (2000a). Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. The Journal of experimental medicine 191, 503-514.

Sijts, A. J., Standera, S., Toes, R. E., Ruppert, T., Beekman, N. J., van Veelen, P. A., Ossendorp, F. A., Melief, C. J., and Kloetzel, P. M. (2000b). MHC class I antigen processing of an adenovirus CTL epitope is linked to the levels of immunoproteasomes in infected cells. Journal of immunology 164, 4500-4506.

Singh-Jasuja, H., Emmerich, N. P., and Rammensee, H. G. (2004). The Tubingen approach: identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy. Cancer immunology, immunotherapy : CII 53, 187-195.

Sistigu, A., Yamazaki, T., Vacchelli, E., Chaba, K., Enot, D. P., Adam, J., Vitale, I., Goubar, A., Baracco, E. E., Remedios, C., et al. (2014). Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. Nature medicine 20, 1301-1309.

Smalley, K. S., Contractor, R., Nguyen, T. K., Xiao, M., Edwards, R., Muthusamy, V., King, A. J., Flaherty, K. T., Bosenberg, M., Herlyn, M., and Nathanson, K. L. (2008a). Identification of a novel subgroup of melanomas with KIT/cyclin-dependent kinase-4 overexpression. Cancer research 68, 5743-5752.

Smalley, K. S., Lioni, M., Dalla Palma, M., Xiao, M., Desai, B., Egyhazi, S., Hansson, J., Wu, H., King, A. J., Van Belle, P., et al. (2008b). Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas. Molecular cancer therapeutics 7, 2876-2883.

Smyth, M. J., Swann, J., Cretney, E., Zerafa, N., Yokoyama, W. M., and Hayakawa, Y. (2005). NKG2D function protects the host from tumor initiation. The Journal of experimental medicine 202, 583-588.

Snyder, H. L., Yewdell, J. W., and Bennink, J. R. (1994). Trimming of antigenic peptides in an early secretory compartment. The Journal of experimental medicine 180, 2389-2394.

Soria, G., and Ben-Baruch, A. (2008). The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. Cancer letters 267, 271-285.

Spiliotis, E. T., Manley, H., Osorio, M., Zuniga, M. C., and Edidin, M. (2000). Selective export of MHC class I molecules from the ER after their dissociation from TAP. Immunity 13, 841-851.

Staehli, F., Ludigs, K., Heinz, L. X., Seguin-Estevez, Q., Ferrero, I., Braun, M., Schroder, K., Rebsamen, M., Tardivel, A., Mattmann, C., et al. (2012). NLRC5 deficiency selectively impairs MHC class I- dependent lymphocyte killing by cytotoxic T cells. Journal of immunology 188, 3820-3828.

Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R., Silverman, R. H., and Schreiber, R. D. (1998). How cells respond to interferons. Annual review of biochemistry 67, 227-264.

Stott, F. J., Bates, S., James, M. C., McConnell, B. B., Starborg, M., Brookes, S., Palmero, I., Ryan, K., Hara, E., Vousden, K. H., and Peters, G. (1998). The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. The EMBO journal 17, 5001-5014.

Strasser, A., Jost, P. J., and Nagata, S. (2009). The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. Immunity 30, 180-192.

Strehl, B., Seifert, U., Kruger, E., Heink, S., Kuckelkorn, U., and Kloetzel, P. M. (2005). Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. Immunological reviews 207, 19-30.

Su, Z. Z., Sarkar, D., Emdad, L., Barral, P. M., and Fisher, P. B. (2007). Central role of interferon regulatory factor-1 (IRF-1) in controlling retinoic acid inducible gene-I (RIG-I) expression. Journal of cellular physiology 213, 502-510.

Sznol, M. (2011). Molecular markers of response to treatment for melanoma. Cancer journal 17, 127-133.

Takaoka, A., and Yanai, H. (2006). Interferon signalling network in innate defence. Cellular microbiology 8, 907-922.

Tarhini, A. A., Gogas, H., and Kirkwood, J. M. (2012). IFN-alpha in the treatment of melanoma. Journal of immunology 189, 3789-3793.

Taube, J. M., Klein, A., Brahmer, J. R., Xu, H., Pan, X., Kim, J. H., Chen, L., Pardoll, D. M., Topalian, S. L., and Anders, R. A. (2014). Association of PD-1, PD-1 Ligands, and Other Features of the Tumor Immune Microenvironment with Response to Anti-PD-1 Therapy. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 20, 5064-5074.

Taylor, R. C., Patel, A., Panageas, K. S., Busam, K. J., and Brady, M. S. (2007). Tumor-infiltrating lymphocytes predict sentinel lymph node positivity in patients with cutaneous melanoma. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 25, 869-875.

Thomas, N. E., Busam, K. J., From, L., Kricker, A., Armstrong, B. K., Anton-Culver, H., Gruber, S. B., Gallagher, R. P., Zanetti, R., Rosso, S., et al. (2013). Tumor-infiltrating lymphocyte grade in primary melanomas is independently associated with melanoma-specific survival in the population-based genes, environment and melanoma study. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 31, 4252-4259.

Topalian, S. L., Hodi, F. S., Brahmer, J. R., Gettinger, S. N., Smith, D. C., McDermott, D. F., Powderly, J. D., Carvajal, R. D., Sosman, J. A., Atkins, M. B., et al. (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. The New England journal of medicine 366, 2443-2454.

Topfer, K., Kempe, S., Muller, N., Schmitz, M., Bachmann, M., Cartellieri, M., Schackert, G., and Temme, A. (2011). Tumor evasion from T cell surveillance. Journal of biomedicine & biotechnology 2011, 918471.

Tsao, H., Goel, V., Wu, H., Yang, G., and Haluska, F. G. (2004). Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. The Journal of investigative dermatology 122, 337-341.

van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. Science 254, 1643-1647.

van Endert, P. M., Tampe, R., Meyer, T. H., Tisch, R., Bach, J. F., and McDevitt, H. O. (1994). A sequential model for peptide binding and transport by the transporters associated with antigen processing. Immunity 1, 491-500.

van Hall, T., Sijts, A., Camps, M., Offringa, R., Melief, C., Kloetzel, P. M., and Ossendorp, F. (2000). Differential influence on cytotoxic T lymphocyte epitope presentation by controlled expression of either proteasome immunosubunits or PA28. The Journal of experimental medicine 192, 483-494.

Vantveer, L. J., Burgering, B. M. T., Versteeg, R., Boot, A. J. M., Ruiter, D. J., Osanto, S., Schrier, P. I., and Bos, J. L. (1989). N-Ras Mutations in Human Cutaneous Melanoma from Sun-Exposed Body Sites. Mol Cell Biol 9, 3114-3116.

Vassilakos, A., Cohen-Doyle, M. F., Peterson, P. A., Jackson, M. R., and Williams, D. B. (1996). The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class I histocompatibility molecules. The EMBO journal 15, 1495-1506.

Venkataraman, T., Valdes, M., Elsby, R., Kakuta, S., Caceres, G., Saijo, S., Iwakura, Y., and Barber, G. N. (2007). Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. Journal of immunology 178, 6444-6455.

Vihinen, P., Tervahartiala, T., Sorsa, T., Hansson, J., Bastholt, L., Aamdal, S., Stierner, U., Pyrhonen, S., Syrjanen, K., Lundin, J., and Hernberg, M. (2014). Benefit of adjuvant interferon alfa-2b (IFN-alpha) therapy in melanoma patients with high serum MMP-8 levels. Cancer immunology, immunotherapy : CII.

Voges, D., Zwickl, P., and Baumeister, W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. Annual review of biochemistry 68, 1015-1068.

Wang, F., Xia, W., Liu, F., Li, J., Wang, G., and Gu, J. (2012). Interferon regulator factor 1/retinoic inducible gene I (IRF1/RIG-I) axis mediates 25-hydroxycholesterol-induced interleukin-8 production in atherosclerosis. Cardiovascular research 93, 190-199.

Wang, L., Smith, D., Bot, S., Dellamary, L., Bloom, A., and Bot, A. (2002). Noncoding RNA danger motifs bridge innate and adaptive immunity and are potent adjuvants for vaccination. The Journal of clinical investigation 110, 1175-1184.

Wang, T., Niu, G., Kortylewski, M., Burdelya, L., Shain, K., Zhang, S., Bhattacharya, R., Gabrilovich, D., Heller, R., Coppola, D., et al. (2004). Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. Nature medicine 10, 48-54.

Wearsch, P. A., Peaper, D. R., and Cresswell, P. (2011). Essential glycan-dependent interactions optimize MHC class I peptide loading. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108, 4950-4955.

Weber, J. S. (2014). At the bedside: adoptive cell therapy for melanoma-clinical development. Journal of leukocyte biology 95, 875-882.

Wellbrock, C., Weisser, C., Hassel, J. C., Fischer, P., Becker, J., Vetter, C. S., Behrmann, I., Kortylewski, M., Heinrich, P. C., and Schartl, M. (2005). STAT5 contributes to interferon resistance of melanoma cells. Current biology : CB 15, 1629-1639.

White, L. C., Wright, K. L., Felix, N. J., Ruffner, H., Reis, L. F., Pine, R., and Ting, J. P. (1996). Regulation of LMP2 and TAP1 genes by IRF-1 explains the paucity of CD8+ T cells in IRF-1-/- mice. Immunity 5, 365-376.

Whiteside, T. L. (2006). Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention. Seminars in cancer biology 16, 3-15.

Wiecker, T. S., Luther, H., Buettner, P., Bauer, J., and Garbe, C. (2003). Moderate sun exposure and nevus counts in parents are associated with development of melanocytic nevi in childhood: a risk factor study in 1,812 kindergarten children. Cancer 97, 628-638.

Wolchok, J. D., Kluger, H., Callahan, M. K., Postow, M. A., Rizvi, N. A., Lesokhin, A. M., Segal, N. H., Ariyan, C. E., Gordon, R. A., Reed, K., et al. (2013). Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. The New England journal of medicine 369, 122-133.

Wong, L. H., Krauer, K. G., Hatzinisiriou, I., Estcourt, M. J., Hersey, P., Tam, N. D., Edmondson, S., Devenish, R. J., and Ralph, S. J. (1997). Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF3 components, STAT1, STAT2, and p48-ISGF3gamma. The Journal of biological chemistry 272, 28779-28785.

Yang, G., Rajadurai, A., and Tsao, H. (2005). Recurrent patterns of dual RB and p53 pathway inactivation in melanoma. The Journal of investigative dermatology 125, 1242-1251.

Yang, X., Zhang, X., Fu, M. L., Weichselbaum, R. R., Gajewski, T. F., Guo, Y., and Fu, Y. X. (2014). Targeting the tumor microenvironment with interferon-beta bridges innate and adaptive immune responses. Cancer cell 25, 37-48.

Yao, Y., and Qian, Y. (2013). Expression regulation and function of NLRC5. Protein & cell 4, 168-175.

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y. M., Gale, M., Jr., Akira, S., et al. (2005). Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. Journal of immunology 175, 2851-2858.

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., and Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. Nature immunology 5, 730-737.

York, I. A., Chang, S. C., Saric, T., Keys, J. A., Favreau, J. M., Goldberg, A. L., and Rock, K. L. (2002). The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. Nature immunology 3, 1177-1184.

Yount, J. S., Moran, T. M., and Lopez, C. B. (2007). Cytokine-independent upregulation of MDA5 in viral infection. Journal of virology 81, 7316-7319.

Zhang, X., Vallabhaneni, R., Loughran, P. A., Shapiro, R., Yin, X. M., Yuan, Y., and Billiar, T. R. (2008). Changes in FADD levels, distribution, and phosphorylation in TNFalpha-induced apoptosis in hepatocytes is caspase-3, caspase-8 and BID dependent. Apoptosis : an international journal on programmed cell death 13, 983-992.

Zhang, Y., Baig, E., and Williams, D. B. (2006). Functions of ERp57 in the folding and assembly of major histocompatibility complex class I molecules. The Journal of biological chemistry 281, 14622-14631.

Zhao, S., Zhang, Y., Zhang, Q., Wang, F., and Zhang, D. (2014). Toll-like receptors and prostate cancer. Frontiers in immunology 5, 352.

Zlotnik, A., Yoshie, O., and Nomiyama, H. (2006). The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. Genome biology 7, 243.

11 Anhang

11.1 IFN-γ Behandlung induziert die Expression von HLA Klasse I und ICAM-1 Molekülen auf der Melanomzelllinie Ma-Mel-61b

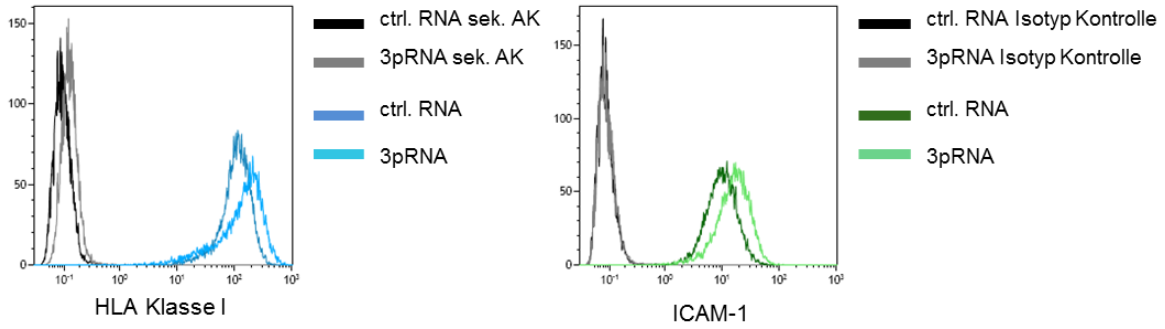


Abb. 21: IFN-γ Behandlung der Melanomzelllinie Ma-Mel-61b führt zu einer gesteigerten HLA Klasse I und ICAM-1 Expression
Die Zelllinie Ma-Mel-61b wurde mit IFN-γ (500 U/ml) für 24 h behandelt. Die Kontrollzellen blieben unbehandelt. Bestimmung der HLA Klasse I und ICAM-1 Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie.

11.2 UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen weisen *STAT1* mRNA auf

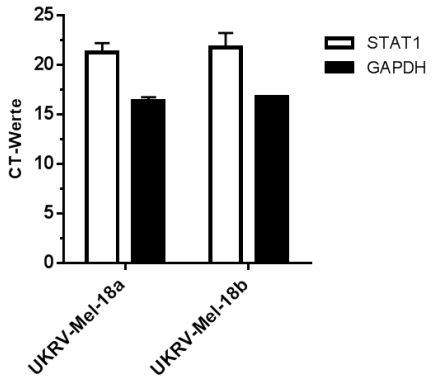


Abb. 22: Die Melanomzelllinien UKRV-Mel-18a(PIV5) und UKRV-Mel-18b weisen eine vergleichbare Menge an *STAT1* mRNA auf
Bestimmung der STAT1 und GAPDH mRNA Expression mittels qRT-PCR. Darstellung der mittleren CT-Werte von n=3 Experimenten (+SD).

11.3 UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen sind mit dem PIV5 infiziert

BRUKER

Detailed Protein Report

Project Info

Name:	ZBA LCMS2014	**Date:**	December 30, 2013

Sample Info & Protocols

		Date:	June 24, 2014
Name:	140624		

Search Result Info

Search Result	Location	Search Engine	Database	Ident. Compounds
HCT_SP_all_Mascot_2014-06-25 09:45:40	/ZBA LCMS2014/140624/7058_B2_01_26937.D	Mascot, 2.4.1	SwissProt, SwissProt_20140514.fasta	12/611

Protein 1:	Non-structural protein V OS=Simian virus 5 (strain W3) GN=P/V PE=1 SV=1		
Accession:	V_SV5	**Score:**	223.91
Database:	SwissProt	**MW [kDa]:**	23.90
Seq. Coverage [%]:	18.50 %	**pI:**	8.96
		No. of Peptides:	5

```
        10         20         30         40         50         60         70         80         90        100        110        120
MDPTDLSFSP DEINKLIETG LNTVEYFTSQ QVTGTSSLGK NTIPPGVTGL LTNAAEAKIQ ESTNHQKGSV GGGAKPKKPR PKIAIVPADD KTVPGKPIPN PLLGLDSTPS TQTVLDLSGK
       130        140        150        160        170        180        190        200        210        220        230
TLPSGSYKGV KLAKFGKENL MTRFIEEPRE NPIATSSPID FKRGRDTGGF HRREYSIGWV GDEVKVTEWC NPSCSPITAA ARRFECTCHQ CPVTCSECER DT
```

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
118	1	471.2000	-145.88	2	14.4	35.6	0	83-91	K.IAIVPADDK.T	
89	1	395.7000	-21.05	2	13.3	23.5	0	144-149	R.FIEEPR.E	
230	1	709.8000	-86.96	2	18.4	52.5	0	150-162	R.ENPIATSSPIDFK.R	
176	1	787.8000	-142.51	2	16.6	44.8	1	150-163	R.ENPIATSSPIDFKR.G	
270	1	691.3000	-51.13	2	19.7	68.7	0	174-185	R.EYSIGWVGDEVK.V	

BRUKER

Detailed Protein Report

Project Info

Name:	ZBA LCMS2014	**Date:**	December 30, 2013

Sample Info & Protocols

		Date:	June 24, 2014
Name:	140624		

Search Result Info

Search Result	Location	Search Engine	Database	Ident. Compounds
HCT_SP_all_Mascot_2014-06-25 09:45:49	/ZBA LCMS2014/140624/7057_A2_01_26935.D	Mascot, 2.4.1	SwissProt, SwissProt_20140514.fasta	37/676

Protein 1:	Phosphoprotein OS=Simian virus 5 (strain W3) GN=P/V PE=2 SV=1		
Accession:	PHOSP_SV5	**Score:**	697.55
Database:	SwissProt	**MW [kDa]:**	42.10
Seq. Coverage [%]:	32.40 %	**pI:**	9.32
		No. of Peptides:	19
Modification(s):	Oxidation		

```
        10         20         30         40         50         60         70         80         90        100        110        120
MDPTDLSFSP DEINKLIETG LNTVEYFTSQ QVTGTSSLGK NTIPPGVTGL LTNAAEAKIQ ESTNHQKGSV GGGAKPKKPR PKIAIVPADD KTVPGKPIPN PLLGLDSTPS TQTVLDLSGK
       130        140        150        160        170        180        190        200        210        220        230        240
TLPSGSYKGV KLAKFGKENL MTRFIEEPRE NPIATSSPID FKRGAGIPAG SIEGSTQSDG WEMKSRSLSG AIHPVLQSPL QQGDLNALVT SVQSLALNVN EILNTVRNLD SRMNQLETKV
       250        260        270        280        290        300        310        320        330        340        350        360
DRILSSQSLI QTIKNDIVGL KAGMATLEGM ITTVKIMDPG VPSNVTVEDV RKTLSNHAVV VPESFNDSFL TQSEDVISLD ELARPTATSV KKIVRKVPPQ KDLTGLKITL EQLAKDCISK
       370        380        390        400
PKMREEYLLK INQASSEAQL IDLKKAIIRS AI
```

Abb. 23: Flüssigchromatographische/Massenspektrometrische- (LC/MS) Analyse der UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen
Proteine des PIV5 wurden durch IP mit einem PIV5-Tag mAK aus den UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen isoliert. Die gewonnenen Zelllysate wurden auf ein Silbergel aufgetragen und aufgetrennt. Im Anschluss wurden die detektierbaren Banden aus dem Gel ausgeschnitten und zur LC/MS-Analyse verschickt.

11.4 UKRV-Mel-18a(PIV5) Zellen zeigen eine gesteigerte basale HLA Klasse I Expression

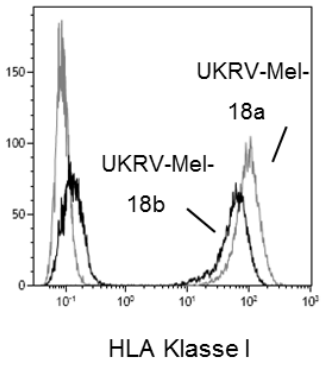


Abb. 24: Basale HLA Klasse I Expression der Melanomzelllinien UKRV-Mel-18a(PIV5) und UKRV-Mel-18b
Bestimmung der HLA Klasse I Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie. Repräsentative Darstellung von n=3 Experimenten.

Danksagung

Die Danksagung ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, g der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Die Aktivierung des Immunrezeptors RIG-I beeinflusst die T-Zell-Sensitivität von Melanomzellen: Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Lina Spaan befürworte.

Essen, den _____	_____	_____
	Name des wissenschaft. Betreuers/Mitglieds der Universität Duisburg-Essen	Unterschrift d. wisschenschaftl. Betreuers/ Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____ _____ _____

Unterschrift der Doktorandin

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, e und g der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____ _____ _____

Unterschrift der Doktorandin