

Untersuchungen
zur transkriptionellen Regulation
der Immunevasion
maligner Melanome durch ICER

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Toszka Bohn
Geb. am 11. April 1987 in Wiesbaden

Mainz, den 07.12.2016

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Februar 2017

1. Einleitung	3
1.1 Makrophagen	3
1.1.1 M1 und M2 Makrophagen	4
1.1.2 Die Rolle der Makrophagen in der Tumorentstehung	7
1.2 Der cAMP-Signalweg	8
1.2.1 ICER	10
1.2.2 Die Rolle von cAMP im Immunsystem und in der Tumorentstehung	12
1.3 Das maligne Melanom	13
1.3.1 Das B16F10 Melanommodell	16
1.4 Zielsetzung der Arbeit	17
2. Material und Methode	18
2.1 Verbrauchsmaterialien	18
2.2 Laborgeräte	19
2.3 Chemikalien	19
2.4 Zellkulturmedien, Lösungen, Puffer und Reagenzien	20
2.5 Tiere	24
2.6 Zelllinien	25
2.7 Antikörper	25
2.8 Plasmide	25
2.9 Cytokine/Reagenzien zur Stimulation	27
2.10 Kits	27
2.11 Methoden der Zellkultur	28
2.11.1 Kultivierung der Tumorzelllinien B16F10 und MC38	28
2.11.2 Bestimmung der Lebendzellzahl	28
2.11.3 Anreinigung und Stimulation von Peritoneal-Makrophagen	29
2.11.4 Anreinigung und Stimulation von Mastzellen aus dem Knochenmark	29
2.12 <i>In vivo</i> Tumormodelle (B16F10, MC38)	30
2.12.1 Inokulation der Tumorzellen	30
2.12.2 Messung der TumorgroÙe	30
2.12.3 Behandlung der Tumore mit MDL-12	31
2.13 <i>Ex vivo</i> Aufarbeitungen	31
2.13.1 Milz	31
2.13.2 Lymphknoten	31
2.13.3 Tumor	32
2.14 cAMP-ELISA	32
2.15 Messung der Proliferationskapazität	33
2.16 Durchflusszytometrie	33
2.16.1 Oberflächenfärbung	34
2.16.2 Fixierung/Permeabilisierung	34
2.16.3 Intrazellulärfärbung	34
2.17 Calcein-Färbung von Tumorzellen	35
2.18 Seahorse-Assay	35
2.19 Transfektion von Mastzellen	36
2.20 Reportergenassay	36
2.21 Next Generation Sequencing (NGS)	37

2.22 Bioinformatische Auswertungen	37
2.22.1 TCGA Datensatz	38
2.22.2 Murine Transkriptomdaten	38
2.23 Statistische Analysen	38
3. Ergebnisse	39
3.1 Verstärkte <i>ICER</i> -Expression in humanen Melanombiopsien gegenüber Kolonkarzinombiopsien	39
3.2 Die Höhe der <i>ICER</i> -Expression in Melanombiopsien korreliert mit einem fortschreitendem Tumorstadium	41
3.3 <i>Icer</i> -defiziente Mäuse stoßen B16F10 Melanomzellen ab	43
3.4 Die murine Melanomzelllinie B16F10 besitzt im Vergleich zur murinen Kolonadenokarzinomzelllinie MC38 eine stark erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration	45
3.5 Tumor-infiltrierende CD4 ⁺ T-Zellen und Makrophagen enthalten eine erhöhte Konzentration an cAMP	46
3.6 CD4 ⁺ T-Zellen und Makrophagen interagieren über einen direkten Zell-Zell-Kontakt mit B16F10 Melanomzellen	48
3.7 Die alleinige Defizienz von <i>Icer</i> in CD4 ⁺ T-Zellen führt zu keiner Tumorabstoßung	50
3.8 Das B16F10 Melanomwachstum ist in <i>Icer^{fl/fl} Lysm-Cre</i> Mäusen inhibiert	51
3.9 <i>Icer</i> -defiziente Makrophagen nutzen verstärkt die Glykolyse zur Energiegewinnung	53
3.10 <i>Icer</i> -defiziente Makrophagen produzieren <i>in vitro</i> mehr TNF- α als <i>Icer</i> -kompetente Makrophagen	55
3.11 Die <i>Tnfa</i> -Promotoraktivität wird durch ICER inhibiert	56
3.12 Der prozentuale Anteil an Melanom-infiltrierenden Makrophagen ist in <i>Icer^{fl/fl} Lysm-Cre</i> Mäusen erhöht	58
3.13 Tumor-infiltrierende Makrophagen aus <i>Icer^{fl/fl} Lysm-Cre</i> Mäusen produzieren vermehrt TNF- α und iNOS	59
3.14 In <i>Icer</i> -defizienten Makrophagen ist die Expression M1-typischer Markergene hoch- und die M2-charakteristischer Markergene herunterreguliert	61
3.15 In <i>Icer^{-/-} Tnfa^{-/-}</i> Doppel-KO-Mäusen ist das B16F10 Melanomwachstum nicht inhibiert	63
3.16 Reduzierte Melanomprogression infolge einer Behandlung mit dem Adenylatzyklase-Inhibitor MDL-12	65
4. Diskussion	68
4.1 Makrophagen-abhängige anti-Tumor-Immunantwort	68
4.2 Therapeutische Relevanz	74
5. Zusammenfassung	75
6. Abstract	76
7. Literaturverzeichnis	77
8. Abkürzungsverzeichnis	89
9. Abbildungsverzeichnis	92
10. Curriculum Vitae	93
11. Danksagung	94

1. Einleitung

1.1 Makrophagen

Makrophagen sind große Fresszellen, die dem angeborenen Immunsystem angehören. Ihre erste Beschreibung geht auf das 19. Jahrhundert zurück, in dem Ilya Metchnikoff erstmals Zellen beschrieb, die in der Lage waren durch Phagozytose ihren Wirt vor Erregern zu schützen.¹⁻³

Aus einer gemeinsamen pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle entwickeln sich über mehrere Entwicklungsstadien Monozyten, die im Blutkreislauf zirkulieren und ins Gewebe einwandern.^{4,5} Dort können sie durch den Stimulus verschiedener Cytokine heranreifen.^{6,7} Diese Entwicklung wird maßgeblich durch den Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF), der hauptsächlich von Stromazellen im Blut und im Gewebe produziert wird, kontrolliert.⁸⁻¹¹

Zu den Hauptaufgaben der Makrophagen zählt die Beseitigung von Krankheitserregern, sowie infizierten und absterbenden Zellen mittels Phagozytose.⁶ Hierbei können Makrophagen sogenannte DAMPs (damage-associated molecular patterns) absterbender Zellen, wie Hitzeschockproteine oder ATP, über spezifische Rezeptoren, wie beispielsweise Scavenger-Rezeptoren, detektieren und so den Heilungsprozess einleiten. Einen Mechanismus zur Bekämpfung von Pathogenen stellt die Erkennung von PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) dar. Dies sind Proteine, Zucker oder Nukleinsäuren von Pathogenen, die von PRRs (pattern recognition receptors), wie z.B. von Toll-like-Rezeptoren (TLR), erkannt werden. Die Pathogene werden anschließend von den Makrophagen aufgenommen, zersetzt und die Antigene im Lymphknoten über MHC (major histocompatibility complex)-Komplexe T-Zellen präsentiert, wodurch diese aktiviert werden.^{12,13} Zusätzlich werden durch die Ausschüttung von Cytokinen und Chemokinen weitere Zellpopulationen, wie Neutrophile oder Monozyten, an den Entzündungsherd angelockt und aktiviert.¹⁴ Durch die Produktion von Wachstumsfaktoren werden die abgestorbenen Zellen ersetzt. Somit besitzen die im Gewebe angesiedelten Makrophagen eine Schlüsselfunktion in der Gewebereparatur und Geweberegeneration, weshalb sie entscheidend an der Aufrechterhaltung der Gewebe-Homöostase beteiligt sind. Diese homöostatischen und reparierenden Funktionen der Gewebe-besiedelnden Makrophagen können jedoch außer Kraft gesetzt werden, wodurch es unter anderem zur Entstehung von Krebs kommt.¹⁵

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Makrophagen neben ihrer tragenden Rolle in der Bekämpfung zahlreicher unterschiedlicher Krankheitserreger, durch ihre Fähigkeit T-Zellen zu aktivieren und an den Entzündungsherd zu locken, ein wichtiges Bindeglied zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität darstellen.

1.1.1 M1 und M2 Makrophagen

Abhängig von ihrem umgebenen Milieu können sich Makrophagen in funktionell unterschiedliche Subtypen differenzieren.¹⁶ Eine vereinfachende Einteilung erfolgt in eine pro-inflammatorische M1 und in eine Gewebe-besiedelnde M2 Subpopulation, die sich durch unterschiedliche Funktionen, die auf distinkten Genexpressionsprofilen beruhen, charakterisieren lassen.¹⁷ So spielen M1 Makrophagen eine entscheidende Rolle in der Bekämpfung von Tumoren und intrazellulären Erregern, während M2 Makrophagen das Tumorwachstum fördern und bei der Parasitenbekämpfung wichtig sind. Außerdem üben M2 Makrophagen entscheidende Funktionen bei der Gewebe-Homöostase aus. In Folge einer Gewebeverletzung werden Makrophagen aus dem Blut und dem Knochenmark zu dem Entzündungsherd gelockt, wo sie Zelltrümmer, apoptotische Zellen und eingedrungene Krankheitserreger phagozytieren.^{18,19} Des Weiteren produzieren und sezernieren sie zahlreiche Wachstumsfaktoren, wodurch es zur Heilung und Regeneration des verletzten Gewebes kommt.^{20,21}

In Abb. 1 sind charakteristische Merkmale der M1 und M2 Makrophagen dargestellt. *In vitro* lassen sich Makrophagen-Vorläuferzellen durch Produkte Gram-negativer Bakterien, wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS) und pro-inflammatorische Cytokine, wie IFN- γ , zu M1 Makrophagen differenzieren.²² Sie zeichnen sich durch eine hohe Expression des Enzyms iNOS (inducible nitric oxide synthase) aus, welches die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) aus Arginin katalysiert. Zur Abwehr von Krankheitserregern produzieren M1 Makrophagen große Mengen an NO, welches die DNA oxidativ schädigt und eisenhaltige Enzyme blockiert.^{23,24} Weiterhin produzieren M1 Makrophagen inflammatorische Cytokine, wie Interleukin (IL)-1 β , IL-6 und den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). M1 Makrophagen sind an ihrem charakteristischen Cytokinprofil, welches durch eine starke IL-12- und IL-23-Produktion, aber einer geringen IL-10-Produktion (IL-12^{hi}IL23^{hi}IL-10^{lo}) gekennzeichnet ist zu identifizieren.²⁵ M1 Makrophagen sind außerdem durch eine verstärkte MHC-II-Expression zur Antigenpräsentation befähigt. Durch die Ausschüttung von IL-12 tragen M1 Makrophagen dazu bei, dass sich naive T-Zellen nach ihrer Aktivierung zu Th1-Zellen¹ differenzieren, denen es wiederum möglich ist M1 Makrophagen zu aktivieren.²⁶ Weiterhin ist dieser Makrophagen-Phänotyp durch eine erhöhte Produktion der Chemokine IL-8 und CCL2 gekennzeichnet, um Neutrophile und weitere Monozyten an den Entzündungsherd anzulocken.²⁷

¹ Naive CD4⁺ T-Zellen können sich *in vitro* und *in vivo* in unterschiedliche T-Helferzellklassen entwickeln, die durch eine individuelle Gensignatur und die Produktion charakteristischer Cytokine gekennzeichnet sind. Durch das Cytokin IL-12 differenzieren sich naive CD4⁺ T-Zellen zu Th1-Zellen, die maßgeblich IFN- γ produzieren und an der Bekämpfung intrazellulärer Erreger beteiligt sind.¹⁸⁰

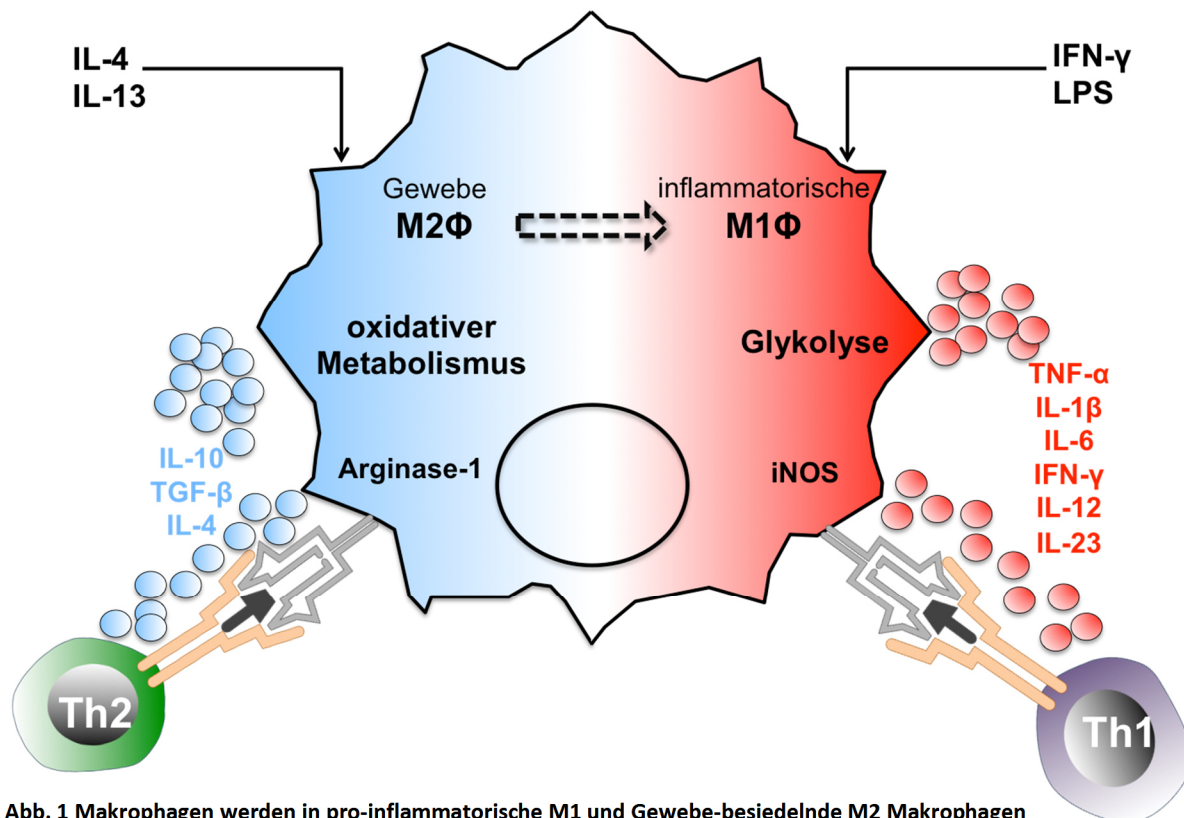


Abb. 1 Makrophagen werden in pro-inflammatorische M1 und Gewebe-besiedelnde M2 Makrophagen eingeteilt.

Makrophagen können einerseits *in vitro* durch LPS und das Cytokin IFN- γ in M1 Makrophagen oder durch die Cytokine IL-4 und IL-13 in M2 Makrophagen differenziert werden. Neben den funktionellen Unterschieden beider Subgruppierungen, gibt es zahlreiche Unterschiede bezüglich des Metabolismus und des Cytokinprofils. So nutzen M2 Makrophagen verstärkt den oxidativen Metabolismus zur Energiegewinnung, während M1 Makrophagen die Glykolyse als Hauptenergielieferant dient. M2 Makrophagen produzieren große Mengen an IL-10, TGF- β und IL-4, wodurch sie dazu beitragen, dass naive T-Zellen sich in Th2-Zellen ausdifferenzieren können. Im Gegensatz hierzu stellen M1 Makrophagen starke Produzenten der proinflammatorischen Cytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-12 und IL-23 dar. Des Weiteren sind M1 Makrophagen durch eine starke Expression des Enzyms iNOS gekennzeichnet. Auch M1 Makrophagen tragen zur Differenzierung von T-Zellen bei. Allerdings werden naive T-Zellen nicht wie bei M2 Makrophagen in Th2-Richtung, sondern in Th1-Richtung polarisiert.

Die Differenzierung zum zweiten bekannten Phänotyp, den M2 Makrophagen, erfolgt *in vitro* durch die Anwesenheit der Cytokine IL-4 und IL-13. Ein charakteristisches Merkmal ist ihr Cytokinprofil IL-12^{lo}IL23^{lo}IL10^{hi}TGF- β ^{hi}.²⁸ Durch die Ausschüttung Th2-spezifischer Cytokine, wie IL-4, ist es ihnen möglich naive T-Zellen in Richtung der T-Helferzellsubpopulation des Typs 2 (Th2)² zu polarisieren.²⁹ Hierdurch wird außerdem die B-Zell-Proliferation und Bildung von Antikörpern begünstigt. Gleichzeitig wird ein Wechsel zum M1 Phänotyp inhibiert.^{30–32} Weiterhin produzieren M2 Makrophagen große Mengen des Enzyms Arginase-1 (Arg1), welches Arginin zu Ornithin metabolisiert, was für zahlreiche Zellheilungsprozesse benötigt wird.^{33,34} Zusätzlich sind M2 Makrophagen durch eine verstärkte Expression von *Egf* (Epidermal growth factor) und *Vegf* (Vascular

² Durch IL-4 können sich naive CD4⁺ T-Zellen in Th2-Zellen differenzieren. Charakteristisch für die durch Th2-Zellen ausgelösten Immunantworten ist die Produktion von IL-4, IL-5, IL-13, IL-10 und IgG1-Antikörpern. Th2-Zellen sind an der Entstehung allergischer Erkrankungen und an der humoralen Immunantwort gegen extrazelluläre Pathogene beteiligt.¹⁸⁰

endothelial growth factor) gekennzeichnet. Außerdem kommt es zu einer verstärkten Expression an Mannose-Rezeptoren auf der Oberfläche von M2 Makrophagen.³⁵

Die Ausdifferenzierung zu M1 und M2 Makrophagen ist kein statisches System. So ist es möglich, dass M2 Makrophagen, abhängig von ihrem umgebenen Milieu, durch einen Wechsel in ihrem Metabolismus zu M1 Makrophagen ausdifferenzieren können.^{16,36} Umgekehrt ist dies jedoch nicht möglich, da das von M1 Makrophagen zur Abwehr von Krankheitserregern produzierte NO hoch toxisch ist. So tötet NO nicht ausschließlich die Krankheitserreger, sondern auch umliegendes Gewebe und die M1 Makrophagen selbst.^{24,36,37}

1.1.2 Die Rolle der Makrophagen in der Tumorentstehung

Für die unterschiedlichen Makrophagen-Subpopulationen wurden sowohl Tumor-abwehrende als auch Tumor-fördernde Charakteristika beschrieben.

Eine entscheidende Rolle hierbei spielen die sogenannten Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM), die eine weitere separate Gruppe innerhalb der Makrophagen-Subpopulationen bilden und einen M2-ähnlichen Phänotyp besitzen. TAMs fördern im Allgemeinen die Tumorbildung. So ist bekannt, dass die M2-charakteristischen Cytokine IL-4 und IL-13 positiv auf die Tumorentstehung wirken und dass sich die Prognose für Krebspatienten mit steigender Anzahl an TAMs, MDSCs (myeloid derived suppressor cells) und unreifen Monozyten verschlechtert.³⁸⁻⁴⁴

Mithilfe des Cytokins IFN- γ können die immunsuppressiven und tumorfördernden Eigenschaften der TAMs umgekehrt werden. IFN- γ fördert, wie in Abb. 1 dargestellt, die Differenzierung zu M1 Makrophagen und die damit verbundenen T-Zell-Antworten im Tumor.⁴⁵ Des Weiteren kann durch Inhibition des NF κ B (nuclear factor- κ B)-Signalwegs der Wechsel des Phänotyps von TAMs in Richtung M1 gefördert werden.⁴⁶

M1 Makrophagen werden im Allgemeinen protektive Eigenschaften in der Tumorentstehung zugeschrieben. Sie aktivieren, wie in 1.1.1 bereits beschrieben, Tumor-abwehrende Mechanismen. Außerdem unterdrücken sie die Aktivitäten Tumor-assoziiierter Makrophagen, M2 Makrophagen und unreifer myeloider Zellen, die Tumor-spezifische Immunantworten supprimieren und das Tumorwachstum bzw. die Bildung von Metastasen fördern.^{47,48} Durch die M1-abhängige Aktivierung der Th1-Zellen kommt es zu einer positiven Rückkopplungsschleife, da Th1-Zellen wiederum M1 Makrophagen aktivieren.

1.2 Der cAMP-Signalweg

Mitte der 1950er Jahre wurde zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat (cAMP) als erster sekundärer Botenstoff identifiziert, der über die Jahre hinweg zu einem Schlüsselmolekül in der Umsetzung extrazellulärer in intrazelluläre Signale wurde.⁴⁹ In Abb. 2 sind die wichtigsten Komponenten des cAMP-Signalwegs dargestellt.

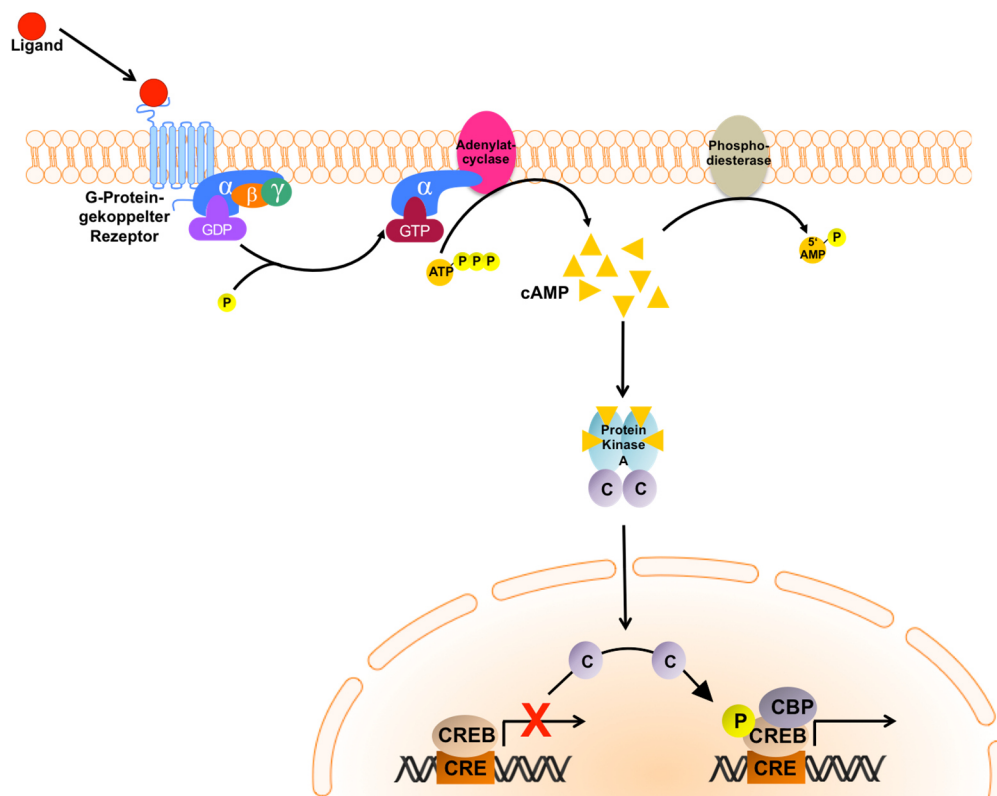


Abb. 2 Der cAMP-Signalweg.

Die Generierung von cAMP erfolgt aus ATP durch die Enzymfamilie der Adenylatzyklen. Durch das Vorhandensein von cAMP in der Zelle wird die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Von dieser lösen sich nach Aktivierung zwei katalytische Untereinheiten ab und wandern in den Zellkern. Diese können Transkriptionsfaktoren wie CREB phosphorylieren. Durch die Phosphorylierung von CREB durch die PKA kann es zur Bindung des „CREB binding Proteins“ (CBP) kommen, welches gemeinsam mit CREB einen aktivierenden Komplex bildet. Durch Bindung dieses Komplexes an „cAMP response“-Elemente (CRE) cAMP-regulierter Gene, wird die Transkription dieser Gene aktiviert.

Die intrazelluläre cAMP-Konzentration wird durch zwei große Enzymfamilien reguliert. Zum einen erfolgt die Generierung von cAMP aus Adenosintriphosphat (ATP) durch die Enzymfamilie der Adenylatzyklen, die „downstream“ von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) aktiviert werden, wenn Liganden, wie z.B. Hormone, an ihre spezifischen Rezeptoren binden. Es existieren neun membranständige Adenylatzyklen und eine lösliche Form, die ausschließlich in spezifischen Zellkompartimenten vorkommt. Der Abbau von cAMP zu 5'-Adenosinmonophosphat (5'-AMP) wird durch die Familie der Phosphodiesterasen (PDE) katalysiert. Es existieren sieben PDE-Familien, wobei

man insbesondere von der PDE4- und der PDE7-Familie weiß, dass ihre Aktivität in Anwesenheit von cAMP stark ansteigt.⁵⁰⁻⁵³ Das durch Adenylatzyklen generierte cAMP aktiviert seinerseits die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), einen Komplex aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten. cAMP bindet an die regulatorischen Untereinheiten, was zu ihrer Ablösung führt. Diese gelangen in den Zellkern und können dort Transkriptionsfaktoren, wie das „cAMP response element binding protein“ (CREB), phosphorylieren.⁵⁴ CREB bindet an sogenannte CRE- (cAMP response element) Elemente in der DNA, welche die spezifische Konsensussequenz TGACGTCA enthalten.^{55,56} Durch seine Phosphorylierung ist es CREB möglich mit dem Koaktivator „CREB binding protein“ (CBP) zu interagieren.⁵⁷ Diese Interaktion bildet einen aktivierenden Komplex, der durch Bindung an das CRE-Element cAMP-regulierter Gene zur Aktivierung der Transkription des betroffenen Gens führt.

1.2.1 ICER

Der „inducible cAMP early repressor“ (ICER) gehört zur CREB- und CREM- (cAMP responsive element modulator) Familie der basischen Leuzinzipper Transkriptionsfaktoren und fungiert als transkriptioneller Repressor des cAMP-Signalwegs.⁵⁸⁻⁶⁰ Die Struktur des *Creb*- und des *Creem*-Gens ist in Abb. 3 dargestellt. Die Transkription von ICER beginnt an einem alternativen Promotor, dem P2-Promotor, innerhalb des *Creem*-Gens. Der P2-Promotor beinhaltet tandem repetitive CRE-Elemente, weshalb er sehr schnell und stark nach Aktivierung des cAMP-Signalwegs aktiviert wird. Das ICER-spezifische Exon besteht lediglich aus acht Aminosäuren. Es existieren, wie in Abb. 3 dargestellt, vier alternative Spleißvarianten von ICER, die sich durch die An- bzw. Abwesenheit der Exons γ und I_a bzw. I_b unterscheiden. Die unterschiedlichen Spleißvarianten haben eine Größe zwischen 109 und 153 Aminosäuren und besitzen CREB- (ICERI) oder CREM- (ICERII) ähnliche DNA-Bindedomänen. Durch den Transkriptionsstart am P2- und nicht am P1-Promotor innerhalb des *Creem*-Gens, fehlt ICER die Transaktivierungsdomäne, allerdings besitzt ICER die gleichen DNA-Bindedomänen wie CREM.⁵⁹

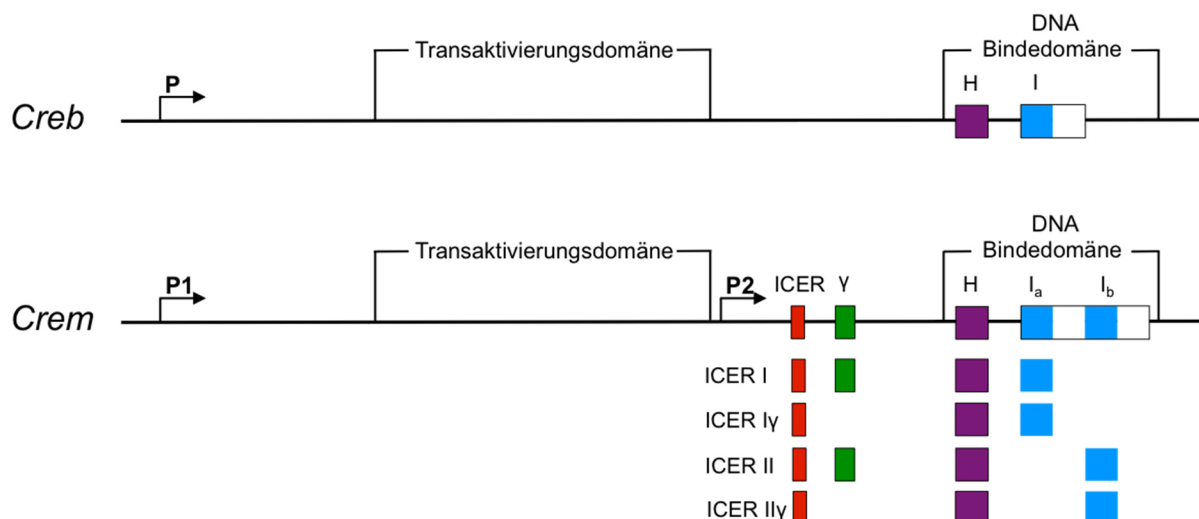


Abb. 3 Aufbau des *Creb*- und des *Creem*-Gens.

Den Transkriptionsstart von ICER bildet ein alternativer Promotor, der P2-Promotor, innerhalb des *Creem*-Gens. Es existieren vier alternative Spleißvarianten von ICER, die sich in der An- bzw. Abwesenheit der Exons γ , I_a und I_b unterscheiden. ICER besitzt CREB- (ICERI) oder CREM- (ICERII) ähnliche DNA-Bindedomänen. Durch den späteren Transkriptionsstart am P2-, statt am P1-Promotor, fehlt ICER eine Transaktivierungsdomäne.

Modifiziert nach Bodor et al., Suppression of T cell function: a potential role for transcriptional repressor ICER, Journal of leukocyte biology, 2000.

Wie aus Abb. 4 ersichtlich ist, bindet ICER, wie CREB, an CRE-Elemente in der DNA. Allerdings ist es ICER durch die fehlende Transaktivierungsdomäne nicht möglich CBP zu rekrutieren, so dass kein transkriptionsaktivierender Komplex gebildet wird. Die Bindung von ICER an die CRE-Elemente cAMP-regulierter Gene führt somit zu einer Inhibierung der Transkription.

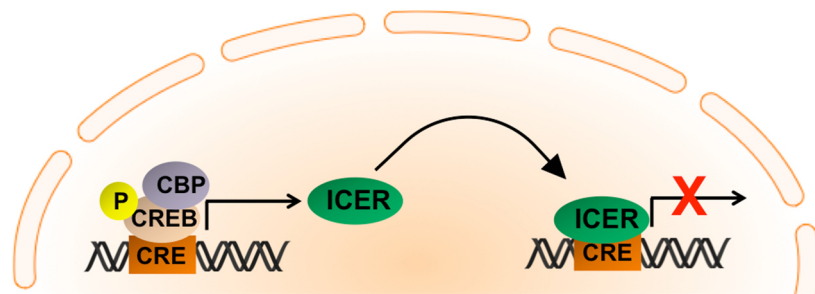


Abb. 4 ICER inhibiert die Transkription cAMP-regulierter Gene.

Durch Bindung des aktivierenden CREB-CBP-Komplexes an regulatorische Elemente (CRE) cAMP-kontrollierter Gene wird deren Transkription aktiviert. Dadurch wird auch ICER transkribiert, der wiederum ein transkriptioneller Repressor cAMP-regulierter Gene ist. Durch Bindung von ICER an die CRE-Elemente ist die Transkription cAMP-regulierter Gene inhibiert.

Für ICER konnten bisher zahlreiche unterschiedliche Funktionen im Immunsystem nachgewiesen werden. So induziert beispielsweise ein ICER-abhängiger Mechanismus Apoptose in Thymozyten, während dieser in Epithel- und neuronalen Zellen deren Differenzierung und Proliferation fördert.^{61,62} In Zuge dessen konnte gezeigt werden, dass Zellen, die ICER sehr stark exprimieren, resistent gegen den cAMP-induzierten Zelltod sind.⁶³ Weiterhin konnte in zahlreichen Versuchen gezeigt werden, dass eine Behandlung von murinen und humanen myeloiden, lymphoiden und erythroiden Vorläuferzellen mit Substanzen, die zu einem Anstieg des cAMP-Levels führen, sowohl einen positiven als auch einen negativen Effekt auf die Proliferation und Differenzierung dieser Zellen haben können.^{64,65}

Zu den wichtigsten Funktionen von ICER zählt seine Funktion in der regulatorischen T-Zell (Treg)-abhängigen Suppression konventioneller T-Zellen. Natürliche regulatorische T-Zellen (nTreg) besitzen einen hohen intrazellulären cAMP-Gehalt. Durch die direkte Zell-Zell-Interaktion mittels „Gap Junctions“ (GJ) gelangt dieses cAMP in konventionelle CD4⁺ T-Zellen, wodurch in diesen die ICER-Expression induziert wird.⁶⁶ ICER ist es wiederum möglich an den IL-2-Promotor zu binden, was in dessen Inhibition resultiert.⁶⁷ Dadurch können die T-Zellen nicht mehr proliferieren, da IL-2 einen essentiellen Wachstumsfaktor für T-Zellen darstellt.⁶⁸⁻⁷⁰

Bezüglich der Rolle von ICER in der Tumorentstehung ist bisher nichts bekannt. Man weiß lediglich, dass CREB in die Entwicklung und Differenzierung von Melanozyten involviert ist, aber auch, dass CREB in Melanomen sehr stark exprimiert wird und deshalb womöglich mit ihrem Wachstum und der Bildung von Metastasen assoziiert ist.⁷¹ Außerdem werden einige Gene, die an der Bildung von Melanomen beteiligt sind, durch CREB reguliert.^{72,73} Obwohl CREB und ICER im cAMP-Signalweg stark miteinander verknüpft sind, konnte für ICER noch keine Funktion in der Tumorentstehung gezeigt werden.

1.2.2 Die Rolle von cAMP im Immunsystem und in der Tumorentstehung

Seit seiner ersten Beschreibung konnten zahlreiche wichtige inflammatorische Funktionen von cAMP im Organismus nachgewiesen werden. So inhibiert cAMP beispielsweise die Aktivierung von T-Zellen und die Ausschüttung der pro-inflammatorischen Cytokine IL-1 β und TNF- α von Makrophagen.⁷⁴⁻⁷⁶ Weiterhin ist bekannt, dass eine erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration in humanen Endothelzellen zu einer verminderten Expression der Zelladhäsionsmoleküle E-Selectin und „vascular cell adhesion molecule 1“ (VCAM-1) führt.⁷⁷ Hierdurch kommt es zu einer verminderten Einwanderung von Lymphozyten in infiziertes Gewebe. Für Gliazellen des Gehirns konnte gezeigt werden, dass ein durch den Neurotransmitter Noradrenalin vermittelter Anstieg des intrazellulären cAMP-Gehalts einerseits zu einer Inhibierung der LPS-induzierten IL-1 β -Expression und andererseits der IFN- γ -induzierten Expression von MHC-II-Molekülen führt.⁷⁸ In diesem Fall kommt es also zu einer Suppression der Immunantwort, wodurch das Gehirn vor einem Angriff durch Immunzellen geschützt ist. Bei vielen weiteren Prozessen im Immunsystem konnte eine Beteiligung des cAMP-Signalwegs, beispielsweise über die Vernetzung und Interaktion mit weiteren komplexen Signalwegen, nachgewiesen werden.

Auch an der Entwicklung und Differenzierung humaner Melanozyten und deren Melaninsynthese ist der cAMP-Signalweg maßgeblich beteiligt.⁷⁹ Die Melaninsynthese ist durch die Aktivierung des MC1 (melanocortin-1)-Rezeptors (MC1R) durch α -MSH (α -melanocyte stimulating hormone) reguliert. MC1R aktiviert wiederum die cAMP-Signalkaskade, was zur Expression zahlreicher Gene, die an der Melaninsynthese beteiligt sind, führt.^{80,81} Ein Einzelnukleotid-Polymorphismus (single nucleotide polymorphism, SNP) im *MC1R* Gen führt zu einer eingeschränkten Rezeptoraktivität und einer damit verbundenen Abschwächung des cAMP-Signals, was zu einem verringerten Melanin-Gehalt führt. Diese MC1R-Variante in Melanozyten ist hoch sensitiv für UV-Licht, weshalb Menschen mit diesem Phänotyp ein stark erhöhtes Risiko besitzen an Hautkrebs zu erkranken.⁸²⁻⁸⁴ Auch konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration durch Inhibierung der PDE4-Aktivität die Proliferation von Melanomzellen stark fördert.⁸⁵

Auch der MAPK (mitogen-activated protein kinases)-Signalweg spielt bei der Entwicklung von Melanozyten eine entscheidende Rolle. Genetische Mutationen mit Auswirkungen auf den MAPK-Signalweg sind in 50-70% der Fälle an der Entwicklung eines Melanoms beteiligt.^{86,87} Eine große Rolle spielen hierbei Melanome mit einer BRAF-Mutation. Bezüglich der Entstehung eines Melanoms konnte bereits eine Interaktion des cAMP-Signalwegs und des MAPK-Signalwegs nachgewiesen werden. So hat die PKA beispielsweise einen inhibitorischen Effekt auf CRAF, so dass lediglich BRAF aktiviert wird.⁸⁸

1.3 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom (schwarzer Hautkrebs) ist nicht nur in Deutschland, sondern weltweit eine der häufigsten Krebserkrankungen. In der statistischen Analyse des Robert Koch-Instituts aus dem Jahr 2012 ist das maligne Melanom die fünfthäufigste Krebsneuerkrankung in Deutschland (Abb. 5). Dies trifft sowohl für Männer, bei denen 4,1% aller Krebsneuerkrankungen schwarzer Hautkrebs ist, als auch mit 4,6% aller Krebsneuerkrankungen für Frauen zu.

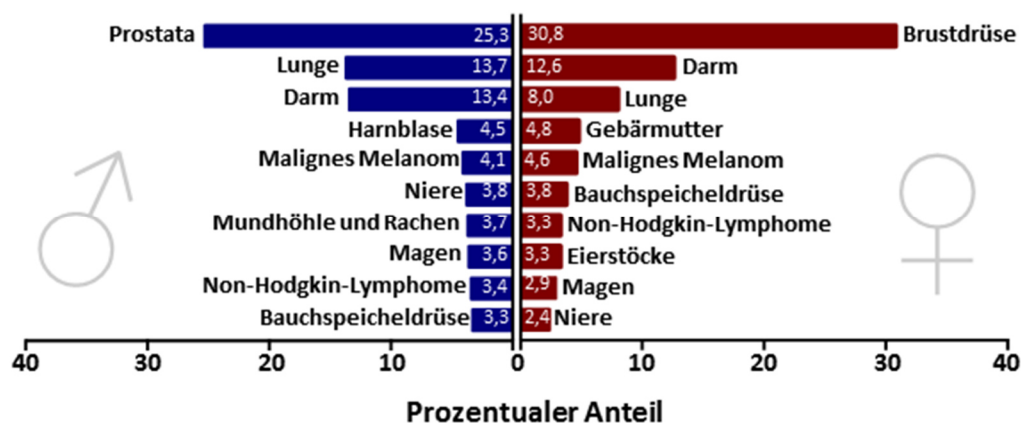


Abb. 5 Prozentualer Anteil der zehn häufigsten Krebsarten an allen Krebsneuerkrankungen 2012 in Deutschland.

Das maligne Melanom war 2012 die fünfthäufigste Krebsart aller Krebsneuerkrankungen in Deutschland. Bei den Frauen waren 4,6% der Krebsneuerkrankungen schwarzer Hautkrebs, bei den Männern 4,1%.

Modifiziert nach Robert Koch-Institut „Krebs in Deutschland“.⁸⁹

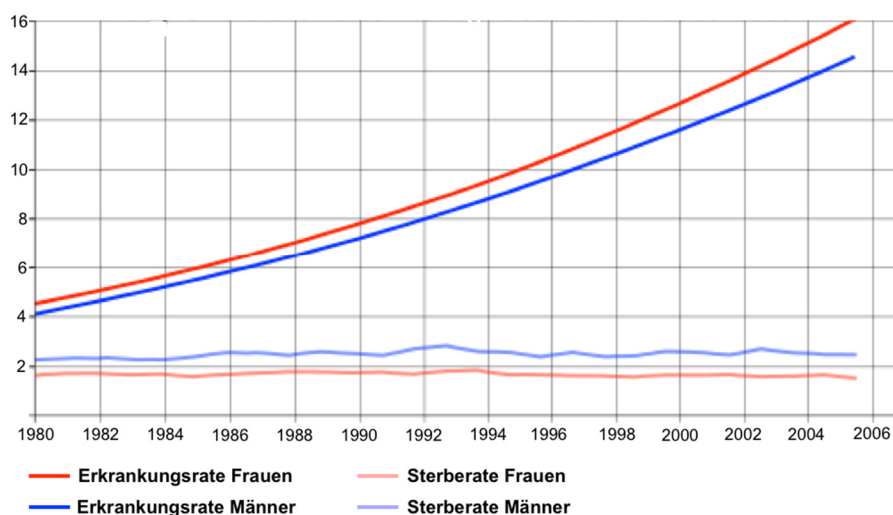


Abb. 6 Inzidenz und Mortalität des malignen Melanoms der Haut in Deutschland.

Die Neuerkrankungs- und Sterberate des malignen Melanoms der Haut für Männer und Frauen in Deutschland von 1980 bis 2006.

Modifiziert nach Robert Koch-Institut „Krebs in Deutschland 2009/2010“, 9. Ausgabe 2013.

Bei keiner anderen Tumorerkrankung ist über die letzten 30 Jahre die Neuerkrankungsrate in einem Maße angestiegen, wie bei der des malignen Melanoms. Global gesehen kommt es zu ca. 160000 Neuerkrankungen und 48000 Todesfällen pro Jahr (Stand 2013).⁹⁰ Der rapide Anstieg der Neuerkrankungen ist auch aus Abb. 6 ersichtlich, in der die Inzidenz an einem malignen Melanom zu erkranken für Männer und Frauen in Deutschland in dem Zeitraum von 1980 bis 2006, dargestellt ist. Hieraus ist zu erkennen, dass sich die Neuerkrankungsrate in diesem Zeitraum vervierfacht hat. Die Langzeitüberlebensrate (5 Jahre) für Patienten mit einem Stadium III (regionale Metastasen) und einem Stadium IV (Fernmetastasen) Melanom beträgt 62% bzw. 16%. Wie aus Abb. 6 ersichtlich ist, hat sich die Sterberate in den letzten 30 Jahren aufgrund ausbleibender medikamentöser Behandlungserfolge nicht verringert.

Die Entstehung eines malignen Melanoms kann genetische, aber auch umweltbedingte Ursachen haben. Wie bereits in 1.2.2 beschrieben sind die häufigsten genetischen Ursachen eines malignen Melanoms Mutationen, die den MAPK-Signalweg, vor allem BRAF-Mutationen, betreffen. Zu den umweltbedingten Hauptursachen zählen durch UV-Licht verursachte Mutationen, was erheblich zum raschen Anstieg der Inzidenz beigetragen hat.^{91,92}

Die klassischen Chemotherapien, die bei vielen anderen Krebsarten erfolgreich eingesetzt werden, sind in der Behandlung eines metastasierenden Melanoms nicht sehr erfolgreich, weshalb nach Alternativen gesucht wurde. Da Tumorzellen effiziente Mechanismen besitzen dem Immunsystem zu entkommen, sind immunmodulatorische Medikamente, sogenannte Checkpoint-Inhibitoren, entwickelt worden, die seit 2010 auch sehr erfolgreich in der Behandlung des malignen Melanoms eingesetzt werden. Das Wirkprinzip dieser Checkpoint-Inhibitoren ist die Reaktivierung bestehender Immunantworten. Hierzu blockieren sie die Interaktion von Rezeptoren auf T-Zellen mit ihren Liganden auf anderen, bisher nicht genau definierten, Zellen. Hierdurch wird das inhibitorische Signal aufgehoben und die Zelle kann wieder ihre Effektorfunktion ausüben.⁹³⁻⁹⁵ Die bisher erfolgreichsten Checkpoint-Inhibitoren sind CTLA-4- (Ipilimumab) und PD-1-Antikörper (Nivolumab, Pembrolizumab).^{96,97}

PD-1 (programmed cell death protein 1) wird auf T-Zellen als Folge der T-Zell-Aktivierung auf deren Oberfläche exprimiert, um ihre Effektorphase/Effektorfunktion zu limitieren. Durch Bindung an seine Liganden PD-L1 und PD-L2 erhält die T-Zelle ein inhibitorisches Signal, was ihre Aktivierung und damit ihre zytotoxische Funktion verhindert. Viele Krebsarten exprimieren PD-L1, wodurch sie einer Zerstörung durch T-Zellen genau in dem Moment entgehen, in dem sie vom Immunsystem angegriffen werden. Eine Blockade der PD1-Interaktion mit seinen Liganden führt somit zu einer Umkehrung dieses Effekts und damit zu einer verbesserten anti-Tumor-Antwort.^{93-95,98,99}

CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) wird im Zuge seiner Aktivierung auf T-Zellen exprimiert und verhindert durch seine supprimierende Wirkung deren Überaktivierung. Je weiter die

T-Zell-Aktivierung fortgeschritten ist, desto mehr CTLA-4 wird auf der Oberfläche der T-Zellen exprimiert. CTLA-4 bindet mit hoher Affinität an CD80/CD86 und konkurriert somit mit CD28 um die Bindung an seine Liganden, weshalb CTLA-4 als kompetitiver Inhibitor des kostimulierenden Signals CD28 wirkt.¹⁰⁰ Durch die Blockade der Ligation von CTLA-4 mit CD80/CD86 durch Ipilimumab können T-Zellen durch Antigenpräsentierende Zellen (APC) wieder aktiviert werden, was seinerseits zu einer verbesserten anti-Tumor-Antwort führt.¹⁰¹

Mit diesen neuartigen immunologischen Therapieansätzen konnte sowohl das Langzeitüberleben als auch die Lebensqualität betroffener Patienten signifikant verbessert werden. Allerdings sprechen 60% der Melanompatienten nur bedingt oder überhaupt nicht auf diese Form der Therapie an, weshalb es von großer Bedeutung ist, weitere immuntherapeutische Ansätze zu entwickeln und deren klinische Anwendung zu erreichen.^{102,103}

1.3.1 Das B16F10 Melanommodell

Die B16 Tumorzelllinie ist aus einem chemisch induzierten Tumor in weiblichen C57BL/6 Mäusen hervorgegangen. Es existieren zahlreiche Varianten dieser Zelllinie, die sich hauptsächlich aufgrund ihres unterschiedlich metastasierenden Potentials unterscheiden.^{104,105} Die in dieser Doktorarbeit verwendete B16F10 Linie ist eine sehr aggressive und stark metastasierende Variante. Das B16F10 Melanommodell kann als Lungenmetastasen-Modell verwendet werden, in dem die Zellen intravenös (i.v.) injiziert werden. Alternativ kann es auch subkutan (s.c.) injiziert werden. Vorwiegend metastasieren die Zellen nach intravenöser, aber auch nach subkutaner Injektion, in die Lunge.¹⁰⁶

Es bestehen zahlreiche Gemeinsamkeiten zwischen dem B16F10 Melanommodell in der Maus und humanen Melanomen. So exprimieren humane Melanome beispielsweise die Melanozyten-Differenzierungsantigene (MDA) gp100, Tyrosinase (Tyr) und „Tyrosinase related protein“ 1 und 2 (TRP-1/TRP-2), deren murine Homologe mgp100, mTyr, mTRP-1 und mTRP-2 ebenfalls alle von B16F10 Zellen exprimiert werden.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹

Weiterhin ist bekannt, dass das Auftreten der Autoimmunerkrankung Vitiligo, die durch eine Depletion der Melanozyten verursacht wird, in Menschen mit metastasierendem Melanom mit einer verbesserten Prognose korreliert.¹¹⁰ Dies konnte ebenfalls im B16F10 Melanommodell beobachtet werden. Auch die Tatsache, dass der adoptive Transfer gp100-spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) zu einer verringerten Tumorlast führt, konnte sowohl human als auch murin im metastasierenden Modell nachgewiesen werden.¹¹¹ Neben diesen Gemeinsamkeiten zwischen humanen Melanomen und dem murinen B16F10 Melanommodell, gibt es auch einige Unterschiede. So exprimieren humane Melanomzellen beispielsweise sehr variable Level an MHC-Klasse-I-Molekülen, während hingegen murine B16F10 Zellen durchgehend eine sehr geringe Expression an MHC-I-Molekülen aufweisen. Da in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Gemeinsamkeiten zwischen humanen Melanomen und der murinen B16F10 Melanomzelllinie aufgedeckt werden konnten, ist das B16F10 Modell eines der am häufigsten verwendeten murinen Melanommodelle für humane Melanome.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

cAMP ist einer der wichtigsten sekundären Botenstoffe, durch den extrazelluläre in intrazelluläre Signale umgesetzt werden. Ihm konnten unter anderem zahlreiche Funktionen in inflammatorischen Prozessen des Immunsystems nachgewiesen werden. Weiterhin ist der cAMP-Signalweg maßgeblich an der Entwicklung und Differenzierung humaner Melanozyten beteiligt. Aufgrund dessen und durch seine Interaktion mit dem MAPK-Signalweg ist anzunehmen, dass er auch eine entscheidende Rolle in der Progression von Melanomen spielt, wobei der genaue Ablauf und die Beteiligung des cAMP-Signalwegs noch nicht aufgeklärt werden konnte. Somit war das Ziel dieser Arbeit die Rolle der einzelnen Komponenten des cAMP-Signalwegs in der Melanomentstehung anhand des murinen subkutanen B16F10 Melanommodells aufzuklären. Insbesondere lag der Fokus hierbei auf der Untersuchung, inwieweit der cAMP-Signalweg und im Besonderen der Transkriptionsfaktor ICER das Immunsystem dahingehend beeinflusst, dass es zu keiner effizienten anti-Melanom-Immunantwort kommt. Des Weiteren sollte das therapeutische Potential einer Unterbindung des cAMP-Signalwegs in den Melanomzellen getestet werden.

2. Material und Methode

2.1 Verbrauchsmaterialien

Alle Plastikwaren wurden steril bezogen.

Tab. 1: Bezugsliste der Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Cryos (2ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Elektroporationsküvette 4mm	BioRad (München, Deutschland)
Gewebekulturplatten (24-, 48-, 96-well)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Gummihandschuhe	Starlab (Hamburg, Deutschland)
Luminometer Reagenzgefäße	Turner Designs (Sunnyvale, USA)
Objektträger	Diagonal (Münster, Deutschland)
Petrischale (35mm x 10mm)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Pipettenspitzen (10µl, 100µl, 1000µl)	Starlab (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße (0,5ml; 1,5ml; 2ml)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Reaktionsgefäße (0,5ml; 1,5ml; 2ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reagenzgefäße (15ml; 50ml)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Reagenzgefäße (Durchflusszytometrie)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Rundbodenplatte (96-well)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Spritzen (2ml, 10ml)	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Spritzen (1ml)	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Zellkulturflaschen (25cm ² , 75cm ² , 175cm ²)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Zellkulturplatte (96-well, low adhesive)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Zellkulturplatte (96-well, Seahorse)	Seahorse Bioscience (Santa Clara, USA)
Zellsieb (40µm)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Zellsuspensionsplatte (6-well)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Spitzbodenplatte (96-well)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)

2.2 Laborgeräte

Tab. 2: Laborgeräte und Hersteller

Gerät	Hersteller
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
CO ₂ Inkubator	Sanyo (München, Deutschland)
Durchflusszytometer (LSRII, ArialI)	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Genepulser II	BioRad (München, Deutschland)
Genios Microplate Reader	Tecan Group AG (Männedorf, Schweiz)
Heizblock (MHR23)	HLC (Eschborn, Deutschland)
Inkubations-Wasserbad	Julabo (Seelbach, Deutschland)
Kühlzentrifuge Multifuge 3L-R	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Luminometer	Turner Designs (Sunnyvale, USA)
Messschieber	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Mikroskop (ID03)	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Pipetboy comfort	INTEGRA Biosciences (Fernwald, Deutschland)
Pipetten (Eppendorf Research) (1-10µl; 10-100µl; 20-200µl; 100-1000µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Qubit® 2.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Seahorse XF ^e 96 Analyzer	Seahorse Bioscience (Santa Clara, USA)
Sterilbank (MSC Advantage)	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Vortex Genie 2	Mitlacher Laboratoriumstechnik
Zentrifuge (Megafuge 1.0, Biofuge fresco)	Heraeus (Hanau, Deutschland)

2.3 Chemikalien

Standardchemikalien wurden von Roth (Karlsruhe, Deutschland), SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) in p.a. („pro analysis“) Qualität bezogen: Alanin, Ammoniumchlorid, Aspargin, Asparginsäure, Biotin, Glutaminsäure, Kaliumhydrogencarbonat, Natriumazid, Natriumchlorid, Natriumhydrogencarbonat, Natriumdihydrogenphosphat, Natrium-Selenit, Natriumpyruvat, Prolin, Salzsäure.

2.4 Zellkulturmedien, Lösungen, Puffer und Reagenzien

Tab. 3: Bezugsliste der Zellkulturmedien, Medienzusätze, Lösungszusätze und weiterer Versuchsreagenzien

Medium	Hersteller
Accutase	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
BSA	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
Collagenase D	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Calcein AM	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Cystein	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
DMEM	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
DMEM - Glucosefrei	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
DMEM Trockenpulver	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
EDTA	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
FCS	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Geneticin® G418 Sulfate	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
Glycin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Hepes	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ketamin Inresa 2ml (Ketaminhydrochlorid)	Inresa Arzneimittel GmbH (Freiburg, Deutschland)
L-Glutamin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
MDL-12	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
MEM Trockenpulver	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
Monensin Solution (1000x)	eBioscience (Frankfurt am Main, Deutschland)
Natriumpyruvat	Serva (Tübingen, Deutschland)
NEAA (100x)	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	Serva (Tübingen, Deutschland)
Phenolrot	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
RPMI	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
Rompun 2% (Xylazinhydrochlorid)	Bayer (Leverkusen, Deutschland)
Trypanblau	Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)
Vitamin B12	SERVA Elektrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)

Aminosäure-Mischung

In Vollentsalztem (VE) Wasser

32mM	Alanin
17mM	Asparagin
26mM	Asparaginsäure
58mM	Glutaminsäure
40mM	Prolin
114mM	Natriumpyruvat

Diese Aminosäuremischung wurde für 3 Stunden bei 40°C inkubiert. Weiterhin wurde eine zweite Lösung in VE-Wasser angesetzt, der 1mM Biotin, 184µM Vitamin B12 und 1M HCl (1:2000) zugefügt wurde. Diese Lösung wurde in einer Verdünnung von 1:185 der zuvor angesetzten Aminosäure-Mischung hinzugefügt.

B16F10 Kulturmedium

In RPMI

1‰	Penicillin/Streptomycin (siehe Penicillin/Streptomycin-Lösung)
10%	FCS
1%	NEAA (100x)
1%	200mM Glutamin
50µM	β-Mercaptoethanol

Cystein-Lösung

Es wurde eine 58µM Cystein-Lösung in 0,25M HCl angesetzt.

EDTA (disodium ethylenediamine tetracetic acid) - Lösung

Es wurde eine Stammlösung von 0,5M mit einem pH-Wert von 8 angesetzt. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert.

Fötale Kälberserum (FCS)

Das FCS wurde zur Inaktivierung der Komplementkomponenten für 45 Minuten bei 56°C erhitzt. Die Aufbewahrung erfolgte in 300ml Aliquots bei 4°C. Vor Verwendung wurde das FCS bei 1100 x g für 20min zentrifugiert. Für die Zellkulturmedien wurde ausschließlich der Überstand verwendet.

Gey's Lysepuffer

Gey's Lysepuffer wurde zur Lyse von Erythrozyten verwendet. Die Lyse wurde durch einen osmotischen Schock durchgeführt. Hierzu wurde eine auf 37°C vorgewärmte 0,83%ige Ammoniumchlorid-Lösung folgender Zusammensetzung genutzt:

In VE-Wasser

16mM NH₄Cl

10mM KHCO₃

126µM EDTA

pH-Wert: 7,4

GM-Puffer (Großer MACS-Puffer)

In PBS

0,5% 10% BSA

5mM EDTA

0,01% 1% NaN₃-Lösung

Iscove's Medium

Trockenpulver DMEM, dem folgende Reagenzien zugefügt wurden:

44mM NaHCO₃

12,5mM Hepes

1:100 Aminosäure-Mischung (Zusammensetzung siehe Aminosäure-Mischung)

1:2500 Cystein-Lösung (Zusammensetzung siehe Cystein-Lösung)

128µM Natrium-Selenit

1‰ Penicillin/Streptomycin (siehe Penicillin/Streptomycin-Lösung)

50µM β-Mercaptoethanol

pH-Wert: 6,9

Ketamin-Rompun-Narkoselösung

Eine Ampulle Ketamin (2ml) wurden mit 800µl Rompun-Lösung zu einer Arbeitslösung vermischt. Diese wurde für maximal 12 Wochen bei 4°C aufbewahrt. Die angesetzte Arbeitslösung wurde unmittelbar vor Injektion 1:5 in PBS verdünnt. Die Verabreichung erfolgte intraperitoneal (i.p.). Dem Gewicht der Maus entsprechend wurden im Durchschnitt zwischen 150µl und 250µl injiziert.

Mastzellmedium

In Testmedium (Bestandteile siehe Testmedium) + 10% FCS

20U/ml	murines (m) IL-3
50U/ml	mIL-4
200ng/ml	rekombinanter Kit-Ligand

MC38 Kulturmedium

In DMEM

1‰	Penicillin/Streptomycin (siehe Penicillin/Streptomycin-Lösung)
10%	FCS
1%	200mM Glutamin
1%	Natriumpyruvat (siehe Natriumpyruvat Lösung)

Minimal Essential Medium (MEM)

MEM Trockenpulver

1‰	Penicillin/Streptomycin
50µM	β-Mercaptoethanol

Natriumpyruvat-Lösung

0,1M in VE-Wasser, anschließend 0,2µm steril filtriert.

PBS (Phosphate Buffered Saline)

In Vollentsalztem (VE) Wasser

1,4M	NaCl
0,1M	NaH ₂ PO ₄
pH-Wert: 7,2	

Penicillin/Streptomycin-Lösung

In VE-Wasser

172µM	Penicillin
137µM	Streptomycin

Rinderserumalbumin (BSA)

Es wurde eine 10%ige Lösung in PBS angesetzt. Diese wurde 0,2µm steril filtriert und in 50ml Aliquots bei 4°C aufbewahrt.

Seahorse Medium

In Glucose-freiem DMEM

2mM Glutamin

143mM NaCl

0,5% Phenolrot

pH-Wert: 7,35

Testmedium (TM)

In Iscove's Medium

1% 200mM Glutamin

1% 0,1M Natriumpyruvat-Lösung

5% FCS

Trypanblaulösung

In PBS

0,5% Trypanblau

0,02% Natriumazid

Die 0,5%ige Trypanblaulösung wurde 1:10 in PBS zu einer Arbeitslösung verdünnt.

2.5 Tiere

C57BL/6J Mäuse wurden kommerziell von der Firma Harlan Sprague Dawley Inc. bezogen. *Icer*-defiziente Mäuse (*Icer*^{-/-}) und Mäuse mit loxP flankierten *Icer* Allelen (*Icer*^{fl/fl}) auf C57BL/6J Hintergrund wurden von S. Endo und N. Kojima zur Verfügung gestellt.¹¹² *Icer*^{fl/fl} Mäuse wurden mit *Lysm-Cre* und *Cd4-Cre* Mäusen gekreuzt.^{113,114} *Tnf*-defiziente Mäuse wurden von K. Steinbrink, Hautklinik, Universitätsmedizin Mainz, zur Verfügung gestellt.¹¹⁵ *Tnf*-defiziente Mäuse wurden mit *Icer*-defizienten Mäusen verpaart. Für *in vivo* Tumorexperimente wurden die Mäuse in einem Alter zwischen 8-10 Wochen verwendet. Für *in vitro* Experimente waren sie zwischen 6-12 Wochen alt. Alle Mäuse wurden in Tierhaltungseinrichtungen des „Translational Animal Research Center“ (TARC) der Johannes Gutenberg-Universität gezüchtet und gehalten. Hierbei wurden die Mäuse unter einem künstlichen 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten.

2.6 Zelllinien

Die OVA-exprimierende B16F10 Melanom-Zelllinie wurde von M. Diken, TrOn Mainz, zur Verfügung gestellt.¹⁰⁴ Die Kolonadenkarzinom-Zelllinie MC38 wurde von H.C. Probst, Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz, zur Verfügung gestellt.¹¹⁶

2.7 Antikörper

Folgende Antikörper wurden sowohl zur durchflusszytometrischen Analyse als auch zum durchflusszytometrischen Sortieren von Immunzellen genutzt.

Tab. 4: Bezugsliste: Antikörper für FACS-Analyse

Antikörper	Klon	Hersteller
anti-CD45 PAN	30-F11	eBioscience (Frankfurt am Main, Deutschland)
anti-CD4	GK1.5	eBioscience (Frankfurt am Main, Deutschland)
anti-CD11b	M1/70	BioLegend (Fell, Deutschland)
anti-F4/80	BM8	eBioscience (Frankfurt am Main, Deutschland)
anti-TNF- α	MP6-XT22	BioLegend (Fell, Deutschland)
anti-Nos2	CXNFT	eBioscience (Frankfurt am Main, Deutschland)
anti-cAMP		abcam (Cambridge, UK)
donkey anti-mouse IgG H + L		Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Rat IgG1, κ		BioLegend (Fell, Deutschland)
Rat IgG2a, κ		eBioscience (Frankfurt am Main, Deutschland)

2.8 Plasmide

Folgende Plasmide wurden zur Durchführung des Reporterassays verwendet. Die entsprechenden Sequenzen wurden in pUC57-Amp synthetisiert (Genewiz, Essex, UK). Zusätzlich wurden die Sequenzen am 5'-Ende mit einer BamHI Restriktionsschnittstelle (GGATCC) und am 3'-Ende mit einer NotI Restriktionsschnittstelle (GCGGCCGC) versehen. Durch die vorhandenen Restriktionsschnittstellen konnten die Sequenzen schließlich in den pcDNA3.1(+) Vektor (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) kloniert werden.

ICERI:

5'- ATGGCACGAAGGCGCGCCGAGCTCGAGGATGGCTGTAAGTGGAGATGAAACTGATGAGGAGACTGACCT
 TGCCCCAAGTCACATGGCTGCTGCCACAGGTGACATGCCAACTTACCAGATCCGAGCTCCTACTACTGCTTTGC
 CACAAGGTGTGGTGTGATGGCTGCCTCACCAGGAAGCCTGCACAGTCCCCAGCAACTAGCAGAAGAAGCAACTC
 GCAAGCGGGAGCTGAGGCTGATGAAAAACAGGGAAGCTGCCCGGGAGTGTGCGAGGAAGAAGAAGAATA
 TGTCAAATGTCTTGAAAATCGTGTGGCTGTGCTTGAAAATCAAAACAAGACCCTCATTGAGGAACTCAAGGCC
 CTCAAAGACCTTTATTGCCATAAAGCAGAGTAACTGTGTTTGATTTGGACCTTGTGACTGTGAACTCTAATCG
 GGGCAGGCGATGCAGCATCCTCATAATGGCCATGTGGACTTGTAGATGGGTCTCT -3'

ICERly:

5'- ATGGCACGAAGGCGCGCCGAGCTCGAGGATGGCTGTAAGTGGAGATGAAACTGCTGCCACAGGTGACAT
 GCCAACTTACCAGATCCGAGCTCCTACTACTGCTTTGCCACAAGGTGTGGTGTGATGGCTGCCTCACCAGGAAGC
 CTGCACAGTCCCCAGCAACTAGCAGAAGAAGCAACTCGCAAGCGGGAGCTGAGGCTGATGAAAAACAGGGA
 AGCTGCCCGGGAGTGTGCGAGGAAGAAGAAGAATATGTCAAATGTCTTGAAAATCGTGTGGCTGTGCTTGA
 AAATCAAAACAAGACCCTCATTGAGGAACTCAAGGCCCTCAAAGACCTTTATTGCCATAAAGCAGAGTAACTG
 TTTTTGATTTGGACCTTGTGACTGTGAACTCTAATCGGGGCAGGCGATGCAGCATCCTCATAATGGCCATGT
 GGACTTGTAGATGGGTCTCT - 3'

ICERII:

5'- ATGGCACGAAGGCGCGCCGAGCTCGAGGATGGCTGTAAGTGGAGATGAAACTGATGAGGAGACTGACC
 TTGCCCCAAGTCACATGGCTGCTGCCACAGGTGACATGCCAACTTACCAGATCCGAGCTCCTACTACTGCTTTG
 CCACAAGGTGTGGTGTGATGGCTGCCTCACCAGGAAGCCTGCACAGTCCCCAGCAACTAGCAGAAGAAGCAACT
 CGCAAGCGGGAGCTGAGGCTGATGAAAAACAGGGAAGCTGCTAAAGAATGTCGACGTGAAAGAAAGAGTA
 TGTC AAGTGTCTTGAGAGTCGAGTCGAGTGTGGAAGTTCAGAACAAGAAGCTTATAGAGGAGCTTGA AAC
 TTTGAAAGACATTTGCTCTCCCAAACAGATTAG - 3'

ICERIIy:

5'- ATGGCTGTAAGTGGAGATGAAACTGCTGCCACAGGTGACATGCCAACTTACCAGATCCGAGCTCC
 TACTACTGCTTTGCCACAAGGTGTGGTGTGATGGCTGCCTCACCAGGAAGCCTGCACAGTCCCCAGCAACTAGCA
 GAAGAAGCAACTCGCAAGCGGGAGCTGAGGCTGATGAAAAACAGGGAAGCTGCTAAAGAATGTGACGTCG
 AAAGAAAGAGTATGTCAAGTGTCTTGAGAGTCGAGTCGAGTGTGGAAGTTCAGAACAAGAAGCTTATAGA
 GGAGCTTGA AACTTTGAAAGACATTTGCTCTCCCAAACAGATTAG - 3'

Zusätzlich wurde das Konstrukt für die Renilla Luciferase (pRL-TK, Promega) und das *Tnf* (NCBI Gene ID: 21926) Promotor Konstrukt zur Transfektion von Mastzellen verwendet.

2.9 Cytokine/Reagenzien zur Stimulation

Tab. 5: Bezugsliste: Cytokine/Reagenzien zur Stimulation

Cytokine/Reagenzien	Hersteller
mIL-3	eigene Herstellung: Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz
mIL-4	eigene Herstellung: Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz
rekombinanter Kit-Ligand	eigene Herstellung: Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz
R-LPS	Enzo Life Science (Lörrach, Deutschland)
Ionomycin Kalziumsalz	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

2.10 Kits

Tab. 6: Bezugsliste: Kits

Kit	Hersteller
Dual-Luciferase® Reporter Assay	Promega (Fitchburg, USA)
High Sensitivity DNA Kit	Agilent (Santa Clara, USA)
Nextera XT DNA Library Preparation Kit	Illumina (Eindhoven, Niederlande)
RNeasy Micro Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
RNA 6000 Pico Kit	Agilent (Santa Clara, USA)
SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing	TaKaRa Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)
Transcription Factor Fixation/Permeabilization Kit	eBioscience (Frankfurt am Main, Deutschland)
Qubit® dsDNA BR Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)

2.11 Methoden der Zellkultur

Alle Zellkultur betreffenden Arbeiten wurden an einer Sterilbank mit sterilen Glas- und Plastikwaren und sterilen Geräten durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5%.

2.11.1 Kultivierung der Tumorzelllinien B16F10 und MC38

Die B16F10 Melanomzellen bzw. MC38 Kolonadenokarzinomzellen wurden sieben Tage vor Injektion aufgetaut und in ihrem entsprechenden Medium (2.4 Zellkulturmedien, Lösungen, Puffer) in Kultur genommen. Die Kultivierung der adhärennten Tumorzelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂. Bei einer Konfluenz von 70-80% wurden die Zellen gesplittet. Hierzu wurde das Medium zunächst abgesaugt, die Zellkulturflasche einmal mit PBS gewaschen und schließlich 0,2ml/cm² Accutase auf die Zellen gegeben. Dies wurde mehrere Minuten inkubiert bis sich die Zellen abgelöst hatten. Anschließend wurden die Zellen entsprechend verdünnt. Als Selektionsdruck für die OVA-Expression der B16F10 Melanomzellen wurden dem Medium 300µg/ml G418 zugeführt. Ein Tag vor Verwendung der B16F10 Melanomzellen wurde das Medium gewechselt und die Zellen für einen Tag in Medium ohne G418 Zusatz kultiviert.

2.11.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden jeweils 10µl der entsprechenden Zellsuspension mit physiologischer Trypanblaulösung verdünnt (1:10 oder 1:100). Der Farbstoff Trypanblau besitzt die Eigenschaft durch die nicht mehr intakte Zellmembran in tote Zellen einzudringen, wodurch diese im Lichtmikroskop blau erscheinen. Lebende Zellen hingegen sind ungefärbt, da Trypanblau durch die intakte Zellmembran nicht in das Zellinnere eindringen kann. Mittels einer Neubauer-Zählkammer mit einer Kammertiefe von 0,1mm wurde die Zahl der lebenden ungefärbten Zellen bestimmt. Dies erfolgte mithilfe der Formel $N \times V \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$. Dabei ist N die Anzahl der lebenden Zellen in den 16 Einzelquadraten, V ist der Verdünnungsfaktor und 10^4 der Kammerfaktor der Neubauer-Zählkammer.

2.11.3 Anreinigung und Stimulation von Peritoneal-Makrophagen

Zur Anreinigung der Peritoneal-Makrophagen aus der Bauchhöhle, wurde die Maus zunächst auf einer Unterlage in Rückenlage fixiert. Anschließend wurde das Fell im Bauchbereich komplett abgelöst ohne dabei die Bauchhöhle zu beschädigen. Zum Spülen des Bauchraums (Peritoneallavage) wurden mit einer Spritze 10ml PBS + 10% FCS in die Bauchhöhle injiziert und anschließend nach ca. einminütiger Inkubationszeit mithilfe der Spritze wieder herausgezogen. Um die optimale Zellausbeute zu erreichen, wurde das Ganze ein zweites Mal wiederholt. Die isolierten Zellen aus der Peritonealhöhle konnten anschließend gezählt, in TM + 5% FCS (TM5) aufgenommen (Zentrifugation bei 400 x g, 10min) und ausplattiert werden.

Von den aus der Bauchhöhle angereinigten Makrophagen wurden jeweils 1×10^6 /well in einer 24-well Platte in TM5 ausplattiert. Zur Stimulation wurde 100ng/ml LPS pro well für 24 Stunden hinzugegeben.

2.11.4 Anreinigung und Stimulation von Mastzellen aus dem Knochenmark

Femur und Tibia der Hinterbeine von C57BL/6J Mäusen wurden steril präpariert. Das Knochenmark wurde mithilfe einer 10ml Spritze und einer 0,55x25mm Kanüle mit MEM ausgespült. Um eine homogene Zellsuspension zu erhalten wurde das Knochenmarksgewebe zunächst mehrfach resuspendiert. Die hieraus resultierten Zellen wurden für 10min bei 400 x g zentrifugiert und zur Lyse der Erythrozyten in 1ml/Maus Gey's Lysepuffer aufgenommen. Die Reaktion wurde nach 2min mit einem 4-fachen Überschuss an MEM abgestoppt. Anschließend wurde die Suspension über ein 0,45µm Zellsieb gegeben. Im Anschluss wurden die Zellen zentrifugiert und in 10ml/Maus Mastzellmedium aufgenommen und jeweils 1ml/well in einer 24-well Platte ausplattiert. In einem Zweitages-Rhythmus wurden die Zellen gefüttert und umgesetzt, indem die Hälfte des Mastzellmediums durch frisches Medium ausgetauscht wurde. Durch vorsichtiges resuspendieren und überführen in eine neue Platte wurden adhärente Zellen abgetrennt. Nach 4-5 Wochen waren mindestens 95% der so kultivierten Zellen BMMC (bone marrow derived mast cells).

Die *in vitro* Stimulation von Mastzellen erfolgt mit Ionomycin über den $Fc\epsilon R1\alpha$ ($Fc\epsilon$ Rezeptor 1α), indem es einen Calcium-Influx in das Cytoplasma verursacht. Ionomycin wurde in einer Konzentration von 0,375µM zur Stimulation eingesetzt.

2.12 *In vivo* Tumormodelle (B16F10, MC38)

2.12.1 Inokulation der Tumorzellen

Die B16F10 bzw. MC38 Tumorzellen wurden bei einer Konfluenz von 70-80% aus der Zellkulturflasche geerntet. Hierzu wurde das Medium zunächst abgenommen und die adhärennten Zellen mit PBS einmal gewaschen. Anschließend wurde 0,2ml/cm² Accutase in die Flasche gegeben und so lange inkubiert bis sich die Zellen vom Flaschenboden gelöst hatten. Zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion wurden die in der Accutase-Lösung befindlichen Zellen in die vierfache Menge Zellkulturmedium in ein 50ml Falcon überführt. Anschließend wurde die Zellzahl mithilfe einer Trypanblaufärbung (2.11.2 Bestimmung der Lebendzellzahl) bestimmt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen (400 x g, 10min) und schließlich auf 2x10⁶/ml (B16F10) bzw. 1x10⁷/ml (MC38) in PBS eingestellt. Zur Injektion der Tumorzellen wurden die Mäuse mit einer Ketamin-Rompun-Lösung (2.4 Zellkulturmedien, Lösungen, Puffer und Reagenzien) narkotisiert. Bei den in Narkose befindlichen Tieren wurde schließlich die rechte und/oder linke Flanke rasiert. Schließlich wurden 2x10⁵ B16F10 Melanomzellen in 100µl PBS bzw. 1x10⁶ MC38 Kolonadenokarzinomzellen in 100µl PBS subkutan (s.c.) in die rechte (B16F10) bzw. linke (MC38) Flanke injiziert.

2.12.2 Messung der Tumorgröße

Über den gesamten Zeitraum des Tumorversuchs blieb die Flanke der Mäuse zur besseren Begutachtung der Tumorentwicklung rasiert. Ab dem siebten Tag nach Injektion der Tumorzellen war der Tumor unter der Haut sichtbar. Die Tumorgröße (Breite x Länge) wurde mittels eines Messschiebers ermittelt. War der Tumor sichtbar, aber noch nicht erhaben, so dass eine Messung mittels Schieblehre nicht möglich war, wurde der Tumurlänge und der Tumorbreite jeweils die Konstante 1 zugeteilt. Die Tumormessungen erfolgten immer im Zwei-Tages-Rhythmus. Das Tumolvolumen wurde mittels der Formel $Breite^2 \times Länge \times 0,5$ aus der gemessenen Breite und Länge des Tumors errechnet.

2.12.3 Behandlung der Tumore mit MDL-12

Zur Behandlung der Tumore wurde der Adenylatzyklase-Inhibitor MDL-12 verwendet. Dieser wurde nach Herstellerangaben in einer Konzentration von 20mM in DMSO gelöst und für maximal drei Monate auf -20°C gelagert. Zunächst wurden die Tumorzellen subkutan in die jeweilige Flanke der entsprechenden Mäuse inokuliert (2.12.1 Inokulation der Tumorzellen). Sechs Tage nach Inokulation wurde mit der MDL-12-Behandlung begonnen (Abb. 23). Hierzu wurden jeweils 50µl einer 20µM MDL-12-Lösung (gelöst in PBS) subkutan peritumoral injiziert. Diese Behandlung wurde in einem Drei-Tages-Rhythmus wiederholt. Zusätzlich wurde ab dem sechsten Tag nach Injektion der Tumorzellen die Tumorgröße im Zwei-Tages-Rhythmus mithilfe einer Schieblehre gemessen. Das Tumolvolumen wurde aus gemessener Breite und gemessener Länge mittels der Formel $Breite^2 \times Länge \times 0,5$ bestimmt.

2.13 Ex vivo Aufarbeitungen

2.13.1 Milz

Zur durchflusszytometrischen Analyse der unterschiedlichen Lymphozyten-Populationen in der Milz, wurde die Milz zunächst aus der Maus präpariert und über einem 40µm Zellsieb mithilfe eines 1ml Spritzenstempels zerrieben. Das Zellsieb und der Spritzenstempel wurden mit MEM + 2% FCS gut gespült. Anschließend wurden die Zellen zunächst bei 400 x g für 7min zentrifugiert bevor die Erythrozyten mithilfe des Gey's Lysepuffers lysiert wurden. Hierzu wurde 1ml/Milz Gey's Lysepuffer auf das Zellpellet gegeben, sehr gut resuspendiert und für 2min inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe des vierfachen Volumens an MEM + 2% FCS abgestoppt. Die Zellen wurden schließlich bei 400 x g für 7min zentrifugiert. Abschließend wurden die Zellen zur weiteren Färbung in GM-Puffer aufgenommen.

2.13.2 Lymphknoten

Zur durchflusszytometrischen Analyse der in den Lymphknoten eingewanderten Immunzellen, wurden die Lymphknoten zunächst aus der Maus präpariert. Für die in Kapitel 3.5 dargestellte Analyse wurden die drainierenden und die nicht drainierenden Lymphknoten Tumortragender Mäuse genutzt. Hierzu wurden die B16F10 Melanomzellen in die rechte Flanke von C57BL/6J Mäusen inokuliert. Als drainierende Lymphknoten wurden die rechten inguinalen Lymphknoten entnommen.

Als nicht drainierende Lymphknoten dienten die inguinalen Lymphknoten der linken Körperseite. Die präparierten Lymphknoten wurden in 5ml MEM in eine 6-well Platte überführt. In dieser wurden die Lymphknoten zwischen zwei Objektträgern zerrieben. Anschließend wurde die Lymphknotenzellen enthaltene Lösung über ein 40µm Zellsieb in ein 50ml Falcon überführt. Die Zellen wurden für 7min bei 400 x g zentrifugiert und zur weiteren Färbung mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern in GM-Puffer aufgenommen.

2.13.3 Tumor

Zur Analyse der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten mithilfe der Durchflusszytometrie musste aus dem Tumor eine Einzelzellsuspension hergestellt werden. Hierzu wurde der Tumor zunächst aus der Maus präpariert, in dem er mithilfe eines spitzen Skalpells von der Haut abgetrennt und in eine Petrischale überführt wurde. Anschließend wurde 1ml einer 1mg/ml Collagenase D-Lösung (in PBS gelöst) an mehreren Stellen in den präparierten Tumor injiziert und ca. eine Minute inkubiert. Anschließend wurde der Tumor mit einer Schere zerkleinert und in ein 15ml Falcon mit 1ml 1mg/ml Collagenase D-Lösung überführt. Schließlich wurde der Tumor bei 37°C im Wasserbad für 30 Minuten verdaut. Die verdaute Suspension wurde über einem 40µm Zellsieb mithilfe eines 2ml Spritzenstempels zerrieben. Die dadurch entstandene Zellsuspension wurde einmal mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 400 x g, 7min) und schließlich für die weitere durchflusszytometrische Messung gefärbt. Zur Färbung mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern wurden die Zellen in GM-Puffer aufgenommen. Unmittelbar vor der durchflusszytometrischen Messung wurde die Tumorzellsuspension bei starker Aggregation ein weiteres Mal über ein 40µm Zellsieb filtriert.

2.14 cAMP-ELISA

Zur Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration von B16F10 Melanomzellen und MC38 Kolonkarzinomzellen wurden die Zellen zunächst nach ihrem Auftauen für drei Tage in ihrem entsprechenden Zellkulturmedium kultiviert (2.4 Zellkulturmedien, Lösungen, Puffer). Zur Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration wurden jeweils 1×10^6 Zellen verwendet.

Zur Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration MDL-12-behandelter B16F10 Melanomzellen, wurden 1×10^6 B16F10 Zellen mit 20µM MDL-12 für 72 Stunden in einer 24-well-Platte inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

Die Bestimmung der cAMP-Konzentration erfolgte mithilfe des „Cyclic AMP EIA Kit“ (Cayman Chemical, Michigan, USA). Die Probenvorbereitung, der Assay und die Auswertung der Daten erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Es wurden acht Replikate pro Gruppe gemessen.

2.15 Messung der Proliferationskapazität

Zur Bestimmung der Proliferationskapazität MDL-12-behandelter B16F10 Melanomzellen, wurden 2×10^5 B16F10 Zellen in einer 96-well Rundbodenplatte für 72 Stunden mit 100 μ M MDL-12 behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte B16F10 Melanomzellen. Durch Zugabe von 0,5 μ Ci/well 3 H-Thymidin für weitere 18 Stunden, wurde schließlich mithilfe eines β -Counters die 3 H-Thymidin Aufnahme der einzelnen Ansätze bestimmt.

2.16 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie werden Zellen anhand ihrer Größe, Struktur, Oberflächenmarker und intrazellulären Zusammensetzung unterschieden. Hierfür werden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, die spezifisch gegen die zu untersuchenden Merkmale sind, markiert. Die markierten Zellen werden von einem Laserstrahl erfasst, wodurch es zu Lichtstreuungen kommt. Weiterhin werden die gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe angeregt, so dass Licht bestimmter Wellenlängen emittiert wird. Dadurch erhält man für jeden Fluoreszenzfarbstoff ein spezifisches Signal. Zur Interpretation sind vor allem das Vorwärtsstreulicht FSC (Forwardscatter), das ein Maß für die relative Größe der Zelle darstellt und zum anderen das Seitwärtsstreulicht SCC (Sidescatter), welches als Maß für die Zellgranularität gilt, entscheidend. Die Färbung der Zellen zur durchflusszytometrischen Analyse wurde mithilfe des „Transcription Factor Staining Kits“ (eBioscience) durchgeführt. Die verwendeten Antikörper sind in Kapitel 2.7 aufgelistet.

2.16.1 Oberflächenfärbung

Für die durchflusszytometrische Analyse von *in vitro* Zellkulturen wurden pro Probe 1×10^6 Zellen, von den *ex vivo* präparierten Tumoren die kompletten Tumorzellsuspensionen, gefärbt. Die Färbung erfolgte in einer 96-well Spitzbodenplatte bzw. zur weiteren Charakterisierung der Tumorinfiltrierenden Makrophagen wurden die Tumurlösungen in einer „low adhesive“ 96-well Rundbodenplatte gefärbt. Die Zellen wurden zunächst einmal mit GM-Puffer gewaschen. Alle in diesem Protokoll durchgeführten Zentrifugationsschritte wurden bei $400 \times g$ für 2min durchgeführt. Zur Oberflächenfärbung der Zellen wurden diese mit jeweils $50 \mu\text{l}$ der Färbelösung (in GM-Puffer) für 15min bei 4°C inkubiert. Abschließend wurden die Zellen zweimal mit GM-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung/Permeabilisierung und die Intrazellulärfärbung. Sollten die Zellen durchflusszytometrisch sortiert werden, wurden sie ohne weitere Behandlung in 1-2ml GM-Puffer aufgenommen.

2.16.2 Fixierung/Permeabilisierung

Zur Fixierung bzw. Permeabilisierung der Zellen wurden jeder Probe $50 \mu\text{l}$ der Fixierlösung FixPerm (eBioscience) zugegeben. Dies wurde für 30min bei 4°C inkubiert und anschließend zweimal mit dem dazugehörigen Perm-Puffer (eBioscience) gewaschen. Wurde keine weitere intrazelluläre Färbung durchgeführt, wurden die gefärbten und fixierten Zellen zur Messung im Durchflusszytometer in $100 \mu\text{l}$ GM-Puffer aufgenommen.

2.16.3 Intrazellulärfärbung

Zum Nachweis intrazellulärer Cytokine war es notwendig die Zellen zuvor für 3-5 Stunden mit Monensin (eBioscience) zu behandeln. Durch diese Behandlung wurde der intrazelluläre Transport der Proteine zum Golgi Komplex inhibiert. Stattdessen akkumulierten die Proteine im endoplasmatischen Retikulum, wodurch sie besser nachzuweisen waren.

Zur Intrazellulärfärbung wurden nach der Fixierung/Permeabilisierung $50 \mu\text{l}$ Färbelösung (in GM-Puffer) zugegeben und für 30min bei 4°C inkubiert. Abschließend wurden die Proben in $100 \mu\text{l}$ GM-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert.

2.17 Calcein-Färbung von Tumorzellen

Zur Färbung der B16F10 Zellen mit dem Zellmarkierungsfarbstoff Calcein AM wurden die Zellen auf 1×10^7 /ml in TM + 5% FCS (TM5) eingestellt. Die Zellen wurden schließlich mit der ebenfalls in TM5 angesetzten $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ Calcein Färbelösung 1:1 gemischt, so dass die Zellen auf 5×10^6 /ml eingestellt waren und Calcein in einer Endkonzentration von $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ vorlag. Die Färbung erfolgte für 30 Minuten bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit TM5 gewaschen (Zentrifugation bei $400 \times g$, 7min).

Zur Überprüfung, inwieweit CD4^+ T-Zellen und Makrophagen mit den B16F10 Tumorzellen über „Gap Junctions“ interagieren, wurden 5×10^4 Milzzellen mit 5×10^4 Calcein-gefärbten B16F10 Tumorzellen in einer 96-well Rundbodenplatte für vier Stunden kokultiviert. Als Kontrolle wurde der identische Ansatz mit ungefärbten Tumorzellen angesetzt. Die Analyse der Calcein-positiven CD4^+ T-Zellen und der Calcein-positiven Makrophagen erfolgte mithilfe der Durchflusszytometrie.

2.18 Seahorse-Assay

Der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführte Seahorse-Assay wurde in Kooperation mit C. Lückel und M. Huber, Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Philipps Universität Marburg, durchgeführt. Mithilfe eines Seahorse-Assays kann unter anderem die Glykolyse-Rate und damit der bevorzugte Metabolismus einer Zelle bestimmt werden. Zellen mit einem glykolytischen Phänotyp produzieren höhere Raten an Protonen als solche, die vermehrt den oxidativen Metabolismus zur Energiegewinnung nutzen. Da diese Protonen-Produktion zu einer Ansäuerung des Milieus führt, stellt die ECAR (extracellular acidification rate)-Einheit ein Maß für die glykolytische Aktivität der Zellen dar. Zur Bestimmung der Glykolyse-Rate wurden 2×10^5 Makrophagen aus der Bauchhöhle *Icer*-kompetenter und *Icer*-defizienter Mäuse in einem Volumen von $200 \mu\text{l}$ TM + 5% FCS (TM5) in einer 96-well Seahorse-Zellkulturplatte für vier Stunden in Kultur genommen. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde in Seahorse-Medium aufgenommen, um eine Verfälschung der Messung durch die im Kulturmedium enthaltene Glucose auszuschließen. Anschließend erfolgte die 90-minütige Messung mithilfe eines „Seahorse XF^e Fluor 96-well Analyzer“. Hierfür erfolgten zunächst vier basale Messungen bevor $2,5 \mu\text{M}$ Oligomycin zugegeben und drei weitere Messungen durchgeführt wurden. Nach weiterer Zugabe von 100mM 2-Deoxyglucose (2-DG) erfolgten vier weitere Messungen. Gemessen wurde die ECAR-Rate, also die Ansäuerung des Mediums durch Protonen.

2.19 Transfektion von Mastzellen

Das Gesamtvolumen eines Transfektionsansatzes betrug 200µl. Zunächst wurden die Mastzellen geerntet, gezählt, zentrifugiert (400 x g, 10min), einmal mit Iscove's gewaschen und schließlich auf 2×10^7 /ml in Iscove's eingestellt. Von den zu transfizierenden Plasmiden wurden jeweils 8µg (*Tnf*-Reporterkonstrukt) bzw. 4µg (ICER-Konstrukte) eingesetzt. Jeder Plasmidlösung wurden weiterhin 300ng pRL-TK zugefügt. Die Plasmidlösungen wurden in 100µl Iscove's angesetzt. Je Ansatz wurden 2×10^6 Zellen (in 100µl Iscove's) transfiziert. Jeweils 100µl Plasmidlösung und 100µl Zellen wurden gemeinsam in eine Transfektionsküvette überführt und bei 190V und 600µF transfiziert (Genepulser, Biorad). Unmittelbar nach der Transfektion wurde 1ml auf 37°C vorgewärmtes Mastzellmedium in die Küvette gegeben und die darin enthaltenen Zellen in eine 24-well Platte überführt. Die transfizierten Zellen wurden zur Erholung zwei Stunden im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Anschließend wurden die einzelnen Ansätze in 1,5ml Reaktionsgefäße geerntet und für 5min bei 1400 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden wieder in 1ml vorgewärmtes Mastzellmedium aufgenommen und in eine neue 24-well Platte überführt. Zusätzlich wurden die einzelnen Ansätze jeweils mit 0,375µM Ionomycin für ca. 18 Stunden stimuliert. Anschließend erfolgte die Durchführung eines Reporterassays.

2.20 Reporterassay

Mithilfe eines Reporterassays wird der Einfluss von Transkriptionsfaktoren auf die Expression bestimmter Gene untersucht. Hierzu wurde die Photinus Luciferase (*Photinus pyralis*) kodierende Sequenz hinter die *Tnf*-Promotor Sequenz kloniert. Als Kontrolle für die Transfektionseffizienz diente ein Konstrukt für eine zweite Luciferase, die Renilla Luciferase (*Renilla reniformis*), welches kotransfiziert wurde.

Der Reporterassay wurde mithilfe des „Dual-Luciferase® Reporter Assay Kits“ (Promega) durchgeführt. Hierfür wurden die transfizierten und stimulierten Mastzellen zunächst in 1,5ml Reaktionsgefäße geerntet, zentrifugiert (5min, 1400 x g) und einmal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde schließlich in 50µl Passive Lysis Buffer (PLB, Stocklösung 1:5 in H₂O verdünnt) aufgenommen und bei -20°C für ca. 60min eingefroren. Anschließend wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und 10min auf einem Schüttler bei 4°C inkubiert. Schließlich wurden die Proben bei 4°C, 12500 x g für 2min zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Messung an einem Luminometer TD-20/20 verwendet. Hierfür wurden 10µl Überstand in ein Messröhrchen überführt und 50µl LARII zugegeben. Daraufhin erfolgte die Messung des Photinus-Werts. Anschließend wurden 50µl des

Renilla-Substrats Stop&Glo (Konzentrat zuvor 1:50 mit Stop&Glo Puffer verdünnt) der Probe zugegeben. Anschließend erfolgte die Messung des Renilla-Werts. Der Photinus-Wert stellt ein Maß für die Promotoraktivität des gemessenen Gens dar. Zur Quantifizierung wurden die Proben anhand des Renilla-Werts normalisiert.

2.21 Next Generation Sequencing (NGS)

Von *ex vivo* isolierten Tumor-infiltrierenden Makrophagen aus *Icer*-kompetenten (n=2) und *Icer*-defizienten (n=4) Mäusen wurde eine mRNA-Sequenzierung durchgeführt. Hierfür wurden die Tumor-infiltrierenden Makrophagen zunächst aus der Tumorzellsuspension (2.13.3 Tumor) mithilfe des durchflusszytometrischen Sortierers AriaII (BD Biosciences) isoliert. Im Durchschnitt konnten 2×10^4 CD45⁺, CD11b⁺, F4/80⁺ Tumor-infiltrierende Makrophagen aus den einzelnen Mäusen isoliert werden. Die anschließende RNA-Präparation erfolgte mithilfe des „RNeasy Micro Kits“ (Qiagen). Die Quantität und die Qualität der resultierenden RNA wurde mithilfe eines „RNA Pico Chips“ an einem Bioanalyzer 2100 (Agilent) detektiert. Die cDNA-Synthese erfolgte anhand des „SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing“ (TaKaRa Clontech). Die darauf folgende „Library“-Präparation wurde mit dem „Nextera XT DNA Library Preparation Kit“ (Illumina) durchgeführt. Die Größe und die Qualität der fertigen „Libraries“ wurde mithilfe eines „High Sensitivity DNA Chips“ (Bioanalyzer 2100, Agilent) bestimmt. Die Quantität wurde an einem Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) mithilfe eines „Qubit® dsDNA BR Assay Kits“ gemessen.

Die Sequenzierung wurde vom Institut für Molekulargenetik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, durchgeführt. Die „50nt single read“-Sequenzierung wurde auf einem HiSeq2500 (Illumina) mithilfe des „HiSeq® Rapid SR SBS Kit v2“ (50 Zyklen) durchgeführt. Zur Cluster Generierung wurde das „HiSeq® Rapid SR Cluster Kit v2“ und eine „Rapid SR v2 Flow cell“ (Illumina) verwendet.

2.22 Bioinformatische Auswertungen

Alle bioinformatischen Analysen erfolgten in Kooperation mit S. Rapp, Institut für Molekulargenetik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

2.22.1 TCGA Datensatz

Zur Analyse humaner Transkriptomdaten von Patienten mit einem malignen Melanom (SKCM) bzw. Kolonadenokarzinom (COAD) wurden Datensätze des TCGA Forschungsnetzwerks genutzt (<http://cancergenome.nih.gov/>, National Institutes of Health, Maryland, USA).

Zur Analyse differentiell exprimierter Gene zwischen Biopsien primärer Tumore von Melanompatienten (n=104) und primärer Tumore von Kolonadenokarzinompatienten (n=284), wurden die Datensätze in der „R Software“ (Version 3.3.1) mithilfe eines „DESeq2 Pakets“ analysiert.^{117,118} Die Genexpression eines einzelnen Gens wurde basierend auf den normalisierten „counts“ aus den TCGA Datensätzen analysiert. Die statistischen Analysen differentiell exprimierter Gene unterschiedlicher Krebsarten oder unterschiedlicher Patientengruppen wurden mithilfe eines ungepaarten, zweiseitigen Studentischen T-Tests durchgeführt. Da ICER Bestandteil des *CREM*-Gens ist, wurde die spezifische *ICER*-Expression durch Expressionswerte der *CREM* Isoformen uc001iyf, uc001iym, uc001iyn, uc001iyo oder durch Erfassung des *ICER*-spezifischen Exons (chr10:35484055-35484142:+) und der Spleißvarianten-Übergänge (chr10:35484142:+ to chr10:35490379:+, chr10:35484142:+ to chr10:35495823:+) bestimmt.

2.22.2 Murine Transkriptomdaten

Im Durchschnitt wurden 12 Millionen Reads pro Probe generiert. Die Daten wurden mithilfe der CLCGenomics Software (Quiagen) ausgewertet.

2.23 Statistische Analysen

In den Abbildungen sind die Mittelwerte der einzelnen Datensätze +/- Standardabweichung dargestellt. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz der Mittelwerte wurde ein Studentischer T-Test mithilfe der „GraphPad Prism Software“ (Version 7.0a) durchgeführt. Lag in den Datensätzen keine Gauß-Verteilung vor, wurde die statistische Signifikanz mithilfe eines Mann-Whitney-U-Tests berechnet. Die Gauß-Verteilung wurde mithilfe des Kolmogorow-Smirnow-Tests berechnet. Zur Bestimmung der Signifikanz wurden folgende p-Werte festgelegt: *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001

3. Ergebnisse

3.1 Verstärkte *ICER*-Expression in humanen Melanombiopsien gegenüber Kolonkarzinombiopsien

Seit Jahrzehnten ist bekannt, dass eine verstärkte Konzentration verschiedener Bestandteile des cAMP-Signalwegs mit der Aggressivität und Ausbreitung bestimmter Krebsarten korreliert. So inhibiert vom Tumor produziertes cAMP beispielsweise die Produktion bestimmter Cytokine und Chemokine $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen und deren Einwanderung in den Tumor.¹¹⁹ Der besondere Fokus dieser Untersuchungen lag hierbei unter anderem auf dem malignen Melanom, für welches schon seit Ende der 1980er Jahre bekannt ist, dass eine Korrelation zwischen dem cAMP-Gehalt in den Melanomzellen und ihrem metastasierenden Potential besteht.¹²⁰

Zur Klärung, welche Bestandteile des cAMP-Signalwegs verstärkt an der Entstehung und Verbreitung der Melanomzellen im Körper beteiligt sind, sollten zunächst die Komponenten des cAMP-Signalwegs identifiziert werden, die spezifisch im Melanom gegenüber anderen Krebsarten verstärkt exprimiert werden. Hierzu wurde die Datenbank des „National Institute of Health“ (NIH) genutzt, die Transkriptomdatensätze aus 34 verschiedenen Krebsarten enthält. Hierbei konnten signifikante Expressionsunterschiede zwischen Faktoren des cAMP-Signalwegs in Melanombiopsien (n=470) im Vergleich zu Kolonkarzinombiopsien (n=461), insbesondere bezüglich der Expression des Transkriptionsfaktors *ICER*, festgestellt werden. Für die bioinformatischen Analysen wurden die Datensätze solcher Patienten ausgeschlossen, welche vor der Probenentnahme therapeutisch behandelt wurden, so dass letztendlich 99 Transkriptome von Melanombiopsien und 287 Transkriptome von Kolonkarzinombiopsien untersucht wurden.

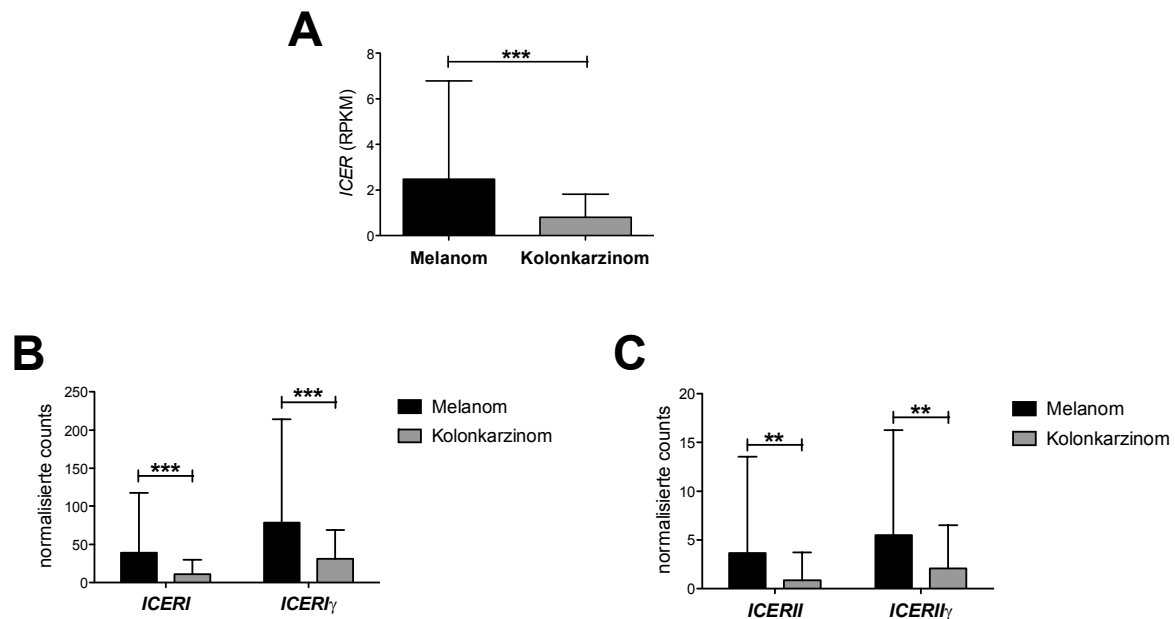


Abb. 7 Die *ICER*-Expression ist in Melanombiopsien im Vergleich zu Kolonkarzinombiopsien stark erhöht.³

Aus den humanen Transkriptomdatensätzen der Melanom- (n=470) und der Kolonkarzinombiopsien (n=461) wurden lediglich die Transkriptomte der Primärtumorbiopsien von Patienten verwendet, welche sich vor der Probenentnahme noch keiner Behandlung unterzogen hatten, so dass letztendlich 99 Transkriptomte von Melanompatienten und 287 Transkriptomte von Kolonkarzinompatienten bioinformatisch analysiert wurden. Die Analysen wurden sowohl spezifisch für *ICER* durchgeführt (A), als auch für jede Transkriptvariante einzeln. In B sind die Ergebnisse der alternativen Spleißvarianten *ICERI* und *ICERI_γ* und in C die Ergebnisse von *ICERII* und *ICERII_γ* dargestellt. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger studentischer T-Test durchgeführt (**p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,01).

Wie in Abb. 7 zu erkennen ist, ist die *ICER*-Expression in Melanombiopsien im Vergleich zu Kolonkarzinombiopsien stark erhöht. Dies gilt sowohl für *ICER* generell, also für alle Transkriptvarianten zusammengefasst (Abb. 7A), als auch für jede Transkriptvariante einzeln, wie in Abb. 7B und Abb. 7C dargestellt. Um eine Korrelation zwischen der Expression von *ICER* und der Progression von Melanomen zu prüfen, wurde im Folgenden untersucht, ob eine verstärkte *ICER*-Expression ebenfalls mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium korreliert.

³ RPKM: Reads per kilobase per million mappable reads

3.2 Die Höhe der *ICER*-Expression in Melanombiopsien korreliert mit einem fortschreitendem Tumorstadium

In der „Cancer Genome Atlas“ Datenbank des NIH sind die Daten jedes Patienten mit einer Identifikationsnummer (Patienten-ID) versehen. Für jede Patienten-ID sind zusätzlich zu den Transkriptomdaten zahlreiche weitere Informationen, wie zum Beispiel das Alter der Patienten, die Behandlungsmethode oder der Heilungsstatus hinterlegt. Weiterhin erhält man Informationen über das jeweilige Tumorstadium des Patienten, so dass die Melanom- und Kolonkarzinomdatensätze aus 3.1 dahingehend bioinformatisch analysiert wurden, ob die verstärkte *ICER*-Expression mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium korreliert. Hierzu wurden die 99 Melanomtranskriptomte und 287 Kolonkarzinomtranskriptomte bezüglich ihres Tumorstadiums aufgeteilt, so dass für Stadium I zwei Transkriptomte von Melanompatienten und 45 Kolonkarzinomtranskriptomte zur Analyse blieben. Für Stadium II waren es 63 Melanome und 110 Kolonkarzinome, für Stadium III 29 Melanome und 83 Kolonkarzinome und für Stadium IV vier Melanome und 38 Kolonkarzinome. Die Patienten-IDs, aus denen kein definiertes Tumorstadium ersichtlich war, wurden in der Analyse nicht berücksichtigt. Dies war im Melanomdatensatz ein Transkriptom und im Kolonkarzinomdatensatz elf Transkriptomte.

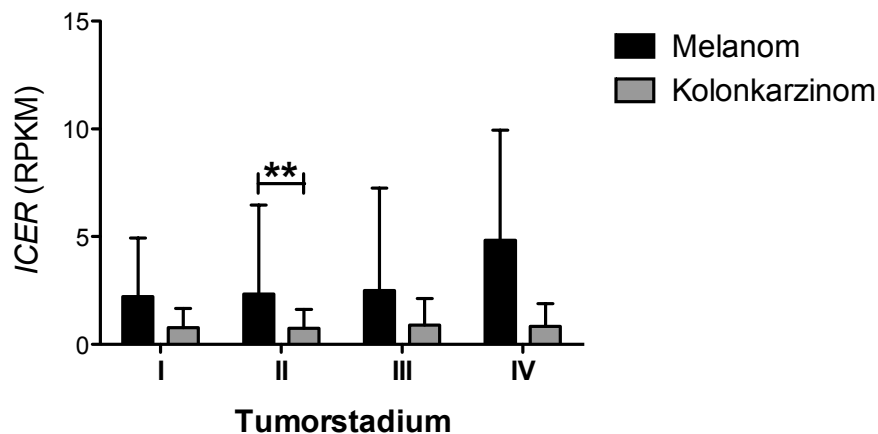


Abb. 8 Die Stärke der *ICER*-Expression ist in Melanombiopsien vom Stadium des Tumors abhängig.

Die Transkriptomte der 99 Melanombiopsien und 287 Kolonkarzinombiopsien aus Abb. 7 wurden nach ihrem Tumorstadium zum Zeitpunkt der Probenentnahme hin aufgeteilt und bioinformatisch auf ihre *ICER*-Expression analysiert. Für Stadium I waren lediglich zwei Transkriptomte von Melanompatienten und 45 Kolonkarzinomtranskriptomte zu analysieren. Für Stadium II waren es 63 Melanome und 110 Kolonkarzinome, für Stadium III 29 Melanome und 83 Kolonkarzinome und für Stadium IV 4 Melanome und 38 Kolonkarzinome. Für die Statistik wurde ein zweiseitiger Studentischer T-Test durchgeführt (** $p \leq 0,01$).

In Abb. 8 ist zu erkennen, dass die *ICER*-Expression in Kolonkarzinombiopsien über die unterschiedlichen Tumorstadien hinweg konstant bleibt, während sie in Melanombiopsien zu

Stadium IV hin ansteigt. Weiterhin ist in Abb. 8 zu erkennen, dass die *ICER*-Expression in den Melanombiopsien über alle Tumorstadien hinweg höher ist als in den Kolonkarzinombiopsien.

Da die hier vorliegenden Transkriptome ein Abbild der Genexpression aller Zellen im Tumorgewebe, also auch der infiltrierenden Zellen des Immunsystems, darstellen, kann abschließend nicht geklärt werden, welcher Zelltyp für die vergleichsweise starke Expression von *ICER* im Melanom verantwortlich ist.

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse, wurden im Folgenden Versuche durchgeführt, die über eine mögliche Funktion von *ICER* in der Entstehung und Progression von Melanomen Aufschluss geben sollten. Hierzu wurden zahlreiche Tumorexperimente mit Mäusen durchgeführt, die eine Defizienz für den transkriptionellen Repressor *ICER* aufweisen.

3.3 *Icer*-defiziente Mäuse stoßen B16F10 Melanomzellen ab

Zur funktionellen Untersuchung von ICER in der Entstehung und im Wachstum von Melanomen, wurden *in vivo* Tumorexperimente mit *Icer*-defizienten Mäusen durchgeführt. Da human, wie aus Abb. 7 ersichtlich ist, die *ICER*-Expression in Melanombiopsien im Vergleich zu Kolonkarzinombiopsien stark erhöht ist, wurden für die murinen *in vivo* Experimente zum einen die Melanomzelllinie B16F10 und die Kolonadenokarzinomzelllinie MC38 verwendet.

Hierzu wurden 2×10^5 B16F10 bzw. 1×10^6 MC38 Tumorzellen subkutan (s.c.) in die Flanke *Icer*-defizienter Mäuse (*Icer*^{-/-}) und der entsprechenden wildtypischen Kontrolltiere (WT) injiziert und das Tumorwachstum über einen Zeitraum von 15 Tagen (B16F10) bzw. 13 Tagen (MC38) beobachtet (2.12 *In vivo* Tumormodelle (B16F10, MC38)). Hierfür wurden die Länge und die Breite des Tumors mithilfe einer Schieblehre ermittelt und das daraus resultierende Tumolvolumen mittels der Formel $Breite^2 \times Länge \times 0,5$ errechnet.

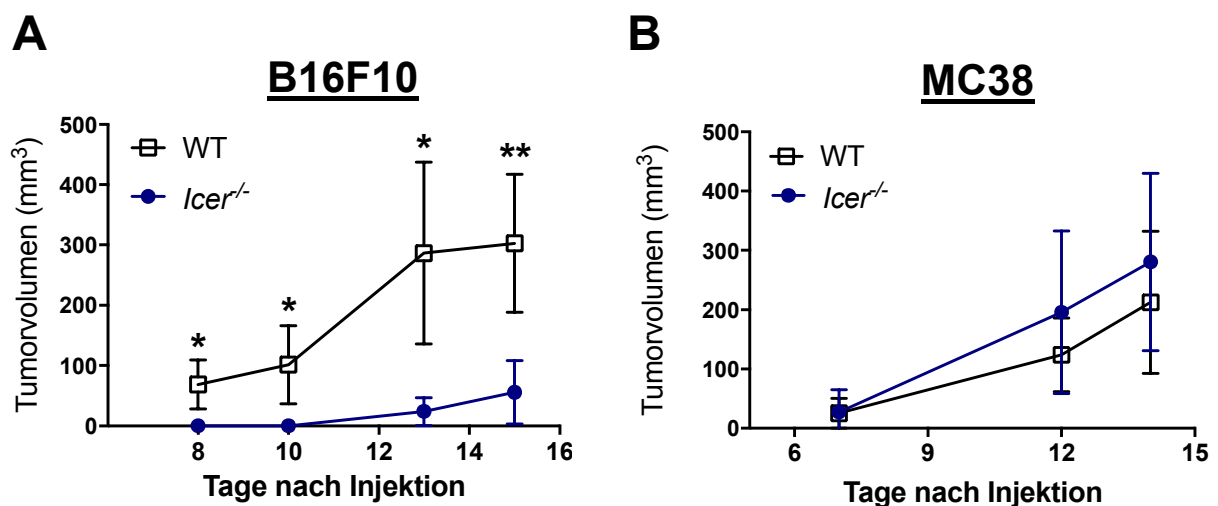


Abb. 9 Das B16F10 Melanomwachstum ist in *Icer*-defizienten Mäusen stark verringert.

A Es wurden 2×10^5 B16F10 Melanomzellen s.c. in *Icer*-defiziente Mäuse (n=5) und in die WT Kontrollen (n=5) injiziert und die Tumorgöße über 15 Tage mit einer Schieblehre gemessen. In **B** wurden 1×10^6 MC38 Adenokarzinomzellen s.c. in die Flanke *Icer*-defizienter Mäuse (n=5) und entsprechender WT Kontrolltiere (n=5) gespritzt. Auch hier wurde die Tumorgöße mithilfe einer Schieblehre über 13 Tage gemessen. Aus der gemessenen Länge und Breite des Tumors lies sich mithilfe der Formel $Breite^2 \times Länge \times 0,5$ das Tumolvolumen errechnen. Es wurde für jeden Zeitpunkt der Tumormessung eine statistische Analyse durchgeführt. Die Signifikanz wurde über einen zweiseitigen Studentischen T-Test errechnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

Betrachtet man in Abb. 9A die Tumorentwicklung des B16F10 Melanoms in *Icer*-defizienten und *Icer*-kompetenten Mäusen (WT) über einen Zeitraum von 15 Tagen, so sieht man, dass das B16F10 Melanomwachstum in *Icer*-defizienten Tieren im Vergleich zur Entwicklung in WT Tieren signifikant verringert ist. In *Icer*-defizienten Mäusen wuchs der Tumor langsamer und auch das finale Tumolvolumen war signifikant geringer als das Tumolvolumen in den Kontrolltieren. Mit

durchschnittlich 55mm^3 liegt das Tumorzvolumen der *Icer*-defizienten Mäuse damit ca. um das 5-fache unter dem finalen durchschnittlichen Tumorzvolumen der Kontrolltiere, welches bei 302mm^3 liegt. In

Abb. 9B ist über einen Zeitraum von 13 Tagen das Wachstum des MC38 Adenokarzinoms in *Icer*-defizienten und WT Tieren dargestellt. Wie eindeutig zu erkennen ist, gibt es bezüglich des MC38 Modells keinen Unterschied in der Entwicklung des Tumors zwischen beiden Gruppen. Nach einer Versuchslaufzeit von 13 Tagen liegt das durchschnittliche Tumorzvolumen der Kontrolltiere bei 212mm^3 und das der *Icer*-defizienten Tiere sogar bei 280mm^3 .

Eine *Icer*-Defizienz führt somit zu einer starken Inhibition der Melanomentwicklung, da dessen Wachstum in *Icer*-defizienten Mäusen gehemmt ist, während die Progression des Kolonkarzinoms eher gefördert als gehemmt wird.

3.4 Die murine Melanomzelllinie B16F10 besitzt im Vergleich zur murinen Kolonadenokarzinomzelllinie MC38 eine stark erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration

Da, wie in Abb. 9 dargestellt, *Icer*-defiziente Mäuse die Proliferation s.c. injizierter B16F10 Melanomzellen, nicht aber die der MC38 Kolonadenokarzinomzellen signifikant inhibieren, wurde nach Unterschieden zwischen beiden Zelllinien geschaut. Ein offensichtlicher Kandidat war in diesem Zusammenhang cAMP, da es die Expression von ICER induziert. Deshalb wurden beide Zelllinien zunächst für drei Tage kultiviert und anschließend die intrazelluläre cAMP-Konzentration mittels einer ELISA-basierten Analyse bestimmt.

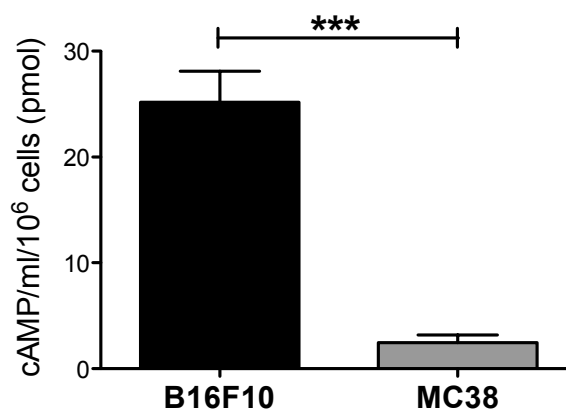


Abb. 10 Die intrazelluläre cAMP-Konzentration von B16F10 Zellen ist signifikant höher als die von MC38 Zellen.

1x10⁶ B16F10 bzw. MC38 Tumorzellen wurden mithilfe eines spezifischen cAMP-ELISA-Kits (Cayman) auf ihren intrazellulären cAMP-Gehalt hin untersucht. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Es wurden acht Replikate gemessen und die Signifikanz mithilfe eines zweiseitigen Studentischen T-Tests errechnet (**p ≤ 0,01).

In Abb. 10 ist zu erkennen, dass die intrazelluläre cAMP-Konzentration in B16F10 Tumorzellen wesentlich höher als die in MC38 Tumorzellen ist.

Der Befund, dass *Icer*-defiziente Mäuse die Progression eines Tumors mit einem hohen cAMP-Gehalt (B16F10) inhibieren können, während dies den WT Kontrolltieren nicht gelingt, lässt den Schluss zu, dass die cAMP-vermittelte Induktion von ICER, insbesondere in Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs), eine anti-Tumorantwort supprimieren kann. D.h. der immunsuppressive Mechanismus, der die Expansion der B16F10 Melanomzellen ermöglicht, beruht zu einem großen Teil auf Tumorgeneriertem cAMP. Offensichtlich ist dies bei den MC38 Kolonkarzinomzellen, die per se wenig cAMP generieren, nicht der Fall. Dieser Tumortyp benutzt eine andere Strategie, die nicht auf cAMP beruht, um eine anti-Tumorantwort zu vermeiden.

3.5 Tumor-infiltrierende CD4⁺ T-Zellen und Makrophagen enthalten eine erhöhte Konzentration an cAMP

Zur Identifikation des Zelltyps, der maßgeblich an der B16F10 Melanomabstoßung *Icer*-defizienter Mäuse beteiligt ist, wurden zunächst Tumor-infiltrierende cAMP-Produzenten im B16F10 Melanommodell untersucht. Hierzu wurden, wie in Material und Methode beschrieben, C57BL/6J Mäuse mit B16F10 Tumorzellen s.c. inokuliert. Zwölf Tage nach Injektion wurden die Tumore, Milzen, drainierenden Lymphknoten (dLN) und die nicht drainierenden Lymphknoten (ndLN) präpariert und eine Zellsuspension aus ihnen hergestellt. Mithilfe der Durchflusszytometrie wurden zahlreiche Zellpopulationen, wie z.B. T-Zellen, dendritische Zellen (DC), Makrophagen und natürliche Killerzellen (NK Zellen) auf ihren cAMP-Gehalt hin analysiert. Hierbei konnten Unterschiede in der intrazellulären cAMP-Konzentration von Tumor-infiltrierenden CD4⁺ T-Zellen und Makrophagen im Vergleich zu CD4⁺ T-Zellen und Makrophagen aus der Peripherie nachgewiesen werden.

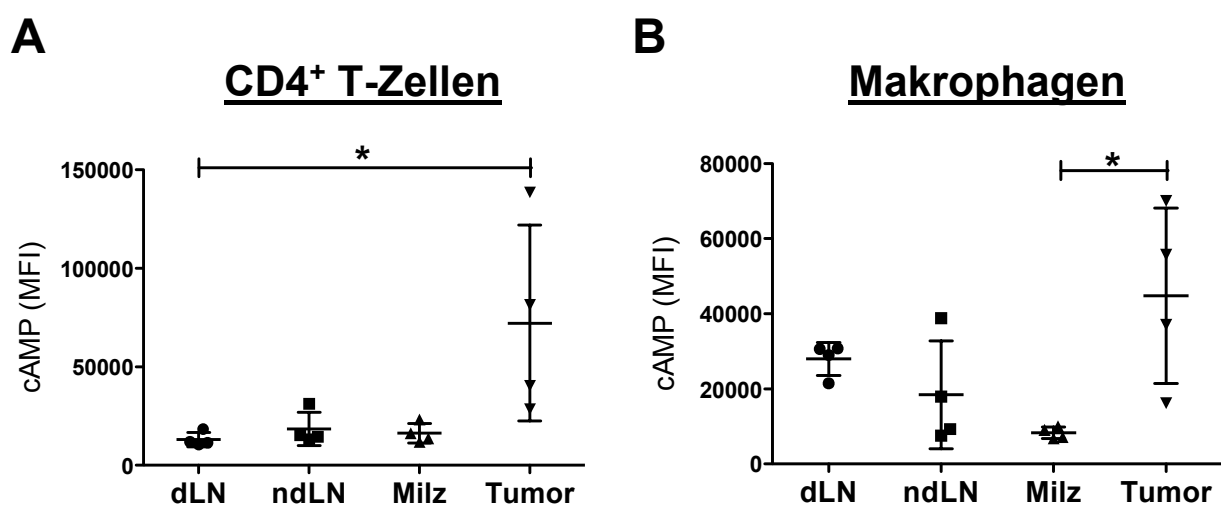


Abb. 11 Die intrazelluläre cAMP-Konzentration in Tumor-infiltrierenden CD4⁺ T-Zellen und Makrophagen ist im Vergleich zur cAMP-Konzentration in CD4⁺ T-Zellen und Makrophagen aus der Peripherie stark erhöht.

Zunächst wurden 2×10^5 B16F10 Melanomzellen s.c. in C57BL/6J Mäuse ($n=4$) injiziert. Zwölf Tage nach Inokulation wurden die Tumore, Milzen, dLN und ndLN präpariert und jeweils eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die jeweiligen Suspensionen wurden anschließend mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern auf CD11b und F4/80 (Makrophagen) bzw. CD3 und CD4 (CD4⁺ T-Zellen) gefärbt. Zusätzlich wurden alle Proben mit einem spezifischen anti-CD45-Antikörper gefärbt um die Lymphozyten von den Tumorzellen abzugrenzen. Die unterschiedlichen Zellpopulationen wurden abschließend mittels FACS-Analyse (LSRII, BD Biosciences) auf ihren intrazellulären cAMP-Gehalt hin untersucht. Hierzu wurden die Zellsuspensionen mit einem spezifischen Antikörper gegen cAMP (abcam) gefärbt und anschließend mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundäntikörper (donkeyamouse FITC, Invitrogen) markiert. In **A** ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von cAMP in CD4⁺ T-Zellen aus dem Tumor, der Milz und den Lymphknoten (dLN und ndLN) dargestellt. **B** zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität von cAMP in Tumor-infiltrierenden Makrophagen, Makrophagen aus der Milz, dLNs und ndLNs. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte über einen zweiseitigen Studentischen T-Test (* $p \leq 0,05$).

In Abb. 11A ist zu erkennen, dass die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von cAMP in Tumor-infiltrierenden CD4⁺ T-Zellen mit einem Wert von ca. 72000 wesentlich höher ist als die MFI von

cAMP in CD4⁺ T-Zellen aus der Milz, drainierenden und nicht drainierenden Lymphknoten, die bei ungefähr 15000 liegt. Das gleiche Resultat wird aus Abb. 11B hinsichtlich der cAMP-Konzentration in Makrophagen ersichtlich. Auch hier ist die MFI, die direkt mit dem cAMP-Gehalt der Tumor-infiltrierenden Makrophagen korreliert, signifikant höher als die der Makrophagen aus der Peripherie. Aus den in Abb. 10 und Abb. 11 dargestellten Ergebnissen resultierte die Frage, inwieweit die Tumor-infiltrierenden CD4⁺ T-Zellen und Makrophagen mit den Tumorzellen selbst interagieren. Hauptsächlich sollte geklärt werden, wie das cAMP aus den Melanomzellen in die CD4⁺ T-Zellen und Makrophagen gelangt. Diesbezüglich wurden Versuche mit dem Vitalfarbstoff Calcein Acetoxymethylester (AM) durchgeführt, der zur Untersuchung „Gap-Junction“-vermittelter Kommunikation verwendet werden kann, da Calcein-AM nach Hydrolyse durch intrazelluläre Esterasen grün fluoresziert und nur durch „gap junctional intercellular communication“ (GJIC) zwischen interagierenden Zellen ausgetauscht werden kann.

3.6 CD4⁺ T-Zellen und Makrophagen interagieren über einen direkten Zell-Zell-Kontakt mit B16F10 Melanomzellen

Der sekundäre Botenstoff cAMP hemmt die Differenzierung und Proliferation von T-Zellen über die Inhibierung der IL-2-Synthese in T-Zellen, in die auch ICER involviert ist.^{67,68,121} Darüber hinaus ist bekannt, dass nTregs die T-Zell-Antwort von CD4⁺ T-Zellen durch Inhibierung der IL-2-Produktion supprimieren können.¹²² Auf Grundlage dessen konnte schließlich gezeigt werden, dass nTregs mit konventionellen CD4⁺ T-Zellen über kleinste Cytosol-verbindende Kanäle, so genannte „gap junctions“ (GJ), interagieren.⁶⁶ Hierbei wird cAMP aus nTregs über GJs in konventionelle T-Zellen transferiert, in denen es schließlich die IL-2-Synthese und damit die IL-2-vermittelte autokrine T-Zell-Proliferation hemmt. In dieser Arbeit konnte bisher gezeigt werden, dass die murine Melanomzelllinie B16F10 im Vergleich zur murinen Kolonadenokarzinomzelllinie MC38 einen sehr hohen intrazellulären Gehalt an cAMP aufweist (Abb. 10). Darüber hinaus wurde in Abb. 11 gezeigt, dass Tumor-infiltrierende Makrophagen und Tumor-infiltrierende CD4⁺ T-Zellen eine höhere intrazelluläre cAMP-Konzentration besitzen als Makrophagen und CD4⁺ T-Zellen aus der Peripherie. Aufgrund dessen stellte sich die Frage, wie der sekundäre Botenstoff cAMP aus den B16F10-Zellen in die Tumor-infiltrierenden Makrophagen bzw. CD4⁺ T-Zellen gelangt. Um zu klären, ob die Melanomzellen mit CD4⁺ T-Zellen und Makrophagen, wie Tregs mit konventionellen T-Zellen, über GJs miteinander interagieren, wurde ein Versuch mit dem Zellmarkierungsfarbstoff Calcein AM (Invitrogen) durchgeführt. Hierfür wurden die B16F10 Melanomzellen zunächst mit Calcein angefärbt und anschließend mit Milzzellen kokultiviert. Nach vier Stunden wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie auf Calcein-positive Zellen hin untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern auf den Lymphozyten-Marker CD45 und zusätzlich auf CD3 und CD4 (CD4⁺ T-Zellen) bzw. CD11b und F4/80 (Makrophagen) gefärbt.

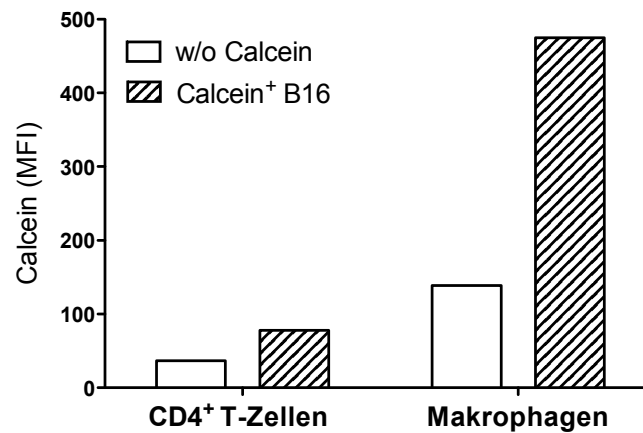


Abb. 12 CD4⁺ T-Zellen und Makrophagen interagieren über GJs mit B16F10 Tumorzellen.

Die B16F10 Melanomzellen wurden mit einer 2µg/ml Calcein AM Lösung (Invitrogen) gefärbt und anschließend in einem 1:1 Verhältnis mit Milzzellen in Kultur genommen. Hierzu wurden jeweils 5x10⁴ Milzzellen und 5x10⁴ Calcein-gefärbte (Calcein⁺ B16) bzw. ungefärbte (w/o Calcein) B16F10 Melanomzellen in einer 96-well-Rundbodenplatte für vier Stunden kokultiviert. Anschließend wurde mithilfe der Durchflusszytometrie nach Calcein-positiven CD4⁺ T-Zellen bzw. Calcein-positiven Makrophagen geschaut. Hierzu wurden die Zellen mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern für CD45, CD3 und CD4 (CD4⁺ T-Zellen) bzw. CD45, CD11b und F4/80 (Makrophagen) gefärbt.

Wie in Abb. 12 zu erkennen ist, konnten nach vierstündiger Inkubationszeit in der Kokultur sowohl Calcein-positive CD4⁺ T-Zellen als auch Calcein-positive Makrophagen nachgewiesen werden. Weiterhin ist zu erkennen, dass die MFI von Calcein in Makrophagen höher ist als die Calcein-MFI der CD4⁺ T-Zellen. Die MFI von Calcein in Makrophagen liegt bei 475, während die der CD4⁺ T-Zellen bei ca. 140 liegt. Da der Farbstoff Calcein AM lediglich über GJs von Zelle zu Zelle übertragen wird, lässt sich aus Abb. 12 schließen, dass CD4⁺ T-Zellen, wie auch Makrophagen über GJs mit B16F10 Melanomzellen interagieren.¹²³ B16F10 Melanomzellen besitzen im Vergleich zu anderen Tumorzelllinien einen sehr hohen intrazellulären Gehalt an cAMP (Abb. 10). Es darf deshalb angenommen werden, dass dieses cAMP somit über GJs an Tumor-infiltrierende Makrophagen und CD4⁺ T-Zellen weitergegeben wird, weshalb diese, wie in Abb. 11 dargestellt, im Vergleich zu peripheren Makrophagen und CD4⁺ T-Zellen eine sehr hohe intrazelluläre cAMP-Konzentration besitzen.

Zur weiteren Klärung, inwieweit CD4⁺ T-Zellen und Makrophagen an der Abstoßung der B16F10 Melanomzellen durch *Icer*-defiziente Mäuse beteiligt sind, wurden zusätzliche *in vivo* Tumorexperimente mit konditionellen Knockout (KO) Mäusen für *Icer* durchgeführt.

3.7 Die alleinige Defizienz von *Icer* in CD4⁺ T-Zellen führt zu keiner Tumorabstoßung

Zunächst wurde untersucht, ob und inwieweit CD4⁺ T-Zellen an der Melanomabstoßung *Icer*-defizienter Mäuse beteiligt sind. Hierzu wurde ein *in vivo* Tumorexperiment mit Mäusen durchgeführt, in denen die *Icer*-Defizienz lediglich in CD4⁺ T-Zellen (siehe 2.5 Tiere) vorlag (*Icer*^{f/f} *Cd4-Cre*). In diese Mäuse und in die entsprechenden Kontrolltiere (*Icer*^{f/f}) wurden s.c. 2×10^5 B16F10 Tumorzellen injiziert und das Tumorstadium über einen Zeitraum von 19 Tagen beobachtet.

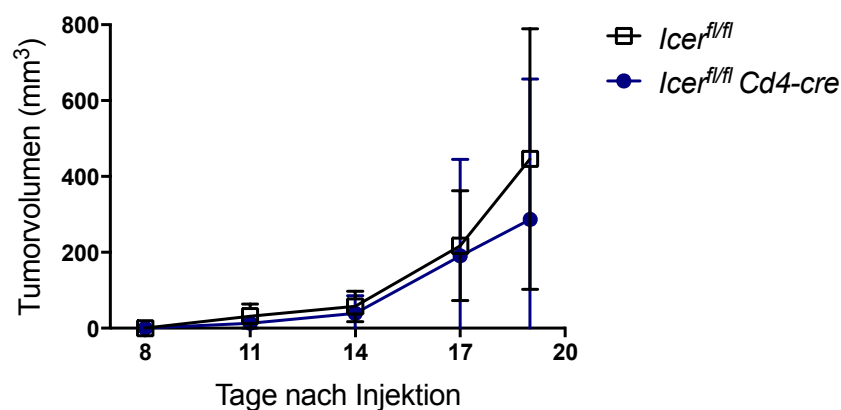


Abb. 13 In *Icer*^{f/f} *Cd4-cre* Mäusen ist das B16F10 Melanomwachstum nicht vermindert.

Es wurden 2×10^5 B16F10 Tumorzellen s.c. in die rechte Flanke von Mäusen mit einer *Icer*-Defizienz in CD4⁺ T-Zellen injiziert (*Icer*^{f/f} *Cd4-cre*, n=8). Als Kontrollen wurden WT Mäuse (*Icer*^{f/f}, n=10) verwendet. Die Tumorgröße wurde über einen Zeitraum von 19 Tagen mithilfe einer Schieblehre gemessen. Das Tumorstadium wurde aus der Breite und der Länge des Tumors mittels der Formel $\text{Breite}^2 \times \text{Länge} \times 0,5$ errechnet.

Beobachtet man in Abb. 13 die Entwicklung der inokulierten B16F10 Melanomzellen in *Icer*^{f/f} *Cd4-cre* und *Icer*^{f/f} WT Mäusen über einen Zeitraum von 19 Tagen, so ist bezüglich des Tumorstadiums kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen zu erkennen.

Eine alleinige Defizienz von *Icer* in CD4⁺ T-Zellen hat keine Tumorabstoßung zur Folge. CD4⁺ T-Zellen sind somit nicht für die Inhibition der Proliferation des B16F10 Melanoms durch *Icer*-defiziente Mäuse verantwortlich.

3.8 Das B16F10 Melanomwachstum ist in *Icer^{fl/fl} Lysm-Cre* Mäusen inhibiert

Wie aus Abb. 11 ersichtlich ist, wurden im B16F10 Melanommodell neben Tumor-infiltrierenden CD4⁺ T-Zellen auch Makrophagen mit einer erhöhten intrazellulären cAMP-Konzentration nachgewiesen. Daher wurde überprüft, ob eine Defizienz von *Icer* ausschließlich in Makrophagen (*Icer^{fl/fl} Lysm-Cre*, siehe 2.5 Tiere) in einer Abstoßung des B16F10 Melanoms resultiert. Hierzu wurden jeweils 2x10⁵ B16F10 Melanomzellen s.c. in *Icer^{fl/fl} Lysm-Cre* und in die entsprechenden Kontrolltiere (*Icer^{fl/fl}*) injiziert und das Tumorstadium über einen Zeitraum von 13 Tagen beobachtet. Zusätzlich wurde die MC38 Kolonkarzinomzelllinie genutzt, von der 1x10⁶ Zellen ebenfalls s.c. in *Icer^{fl/fl} Lysm-Cre* und entsprechende Kontrollmäuse injiziert wurden. Die Tumorentwicklung wurde über einen Zeitraum von 21 Tagen gemessen.

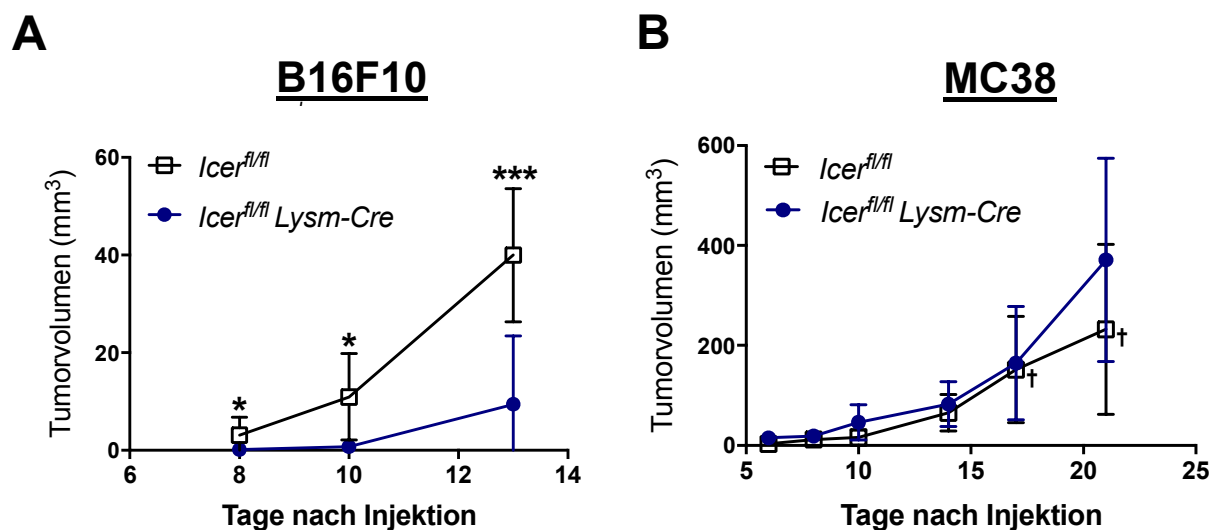


Abb. 14 B16F10 Melanomzellen, aber nicht MC38 Kolonkarzinomzellen, werden von *Icer^{fl/fl} Lysm-Cre* Mäusen abgestoßen.

A Es wurden 2x10⁵ B16F10 Melanomzellen s.c. in Mäuse mit einem konditionellen KO für *Icer* in Makrophagen (*Icer^{fl/fl} Lysm-Cre*, n=5) und in die entsprechenden Kontrollmäuse (*Icer^{fl/fl}*, n=9) injiziert und das Tumorstadium über 13 Tage beobachtet. In **B** wurden 1x10⁶ MC38 Tumorzellen s.c. in *Icer^{fl/fl}* (n=10) bzw. *Icer^{fl/fl} Lysm-Cre* (n=7) Mäuse inokuliert und die Tumorstadium über einen Zeitraum von 21 Tagen gemessen. Das Tumorstadium wurde aus gemessener Breite und Länge mithilfe der Formel $Breite^2 \times Länge \times 0,5$ errechnet. Verstorbene Mäuse sind durch ein Kreuz gekennzeichnet. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger Studentischer T-Test angewendet (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01).

Betrachtet man in Abb. 14A das Wachstum der B16F10 Melanomzellen in *Icer^{fl/fl} Lysm-Cre* und WT (*Icer^{fl/fl}*) Mäusen, so sieht man, dass das Wachstum der B16F10 Tumorzellen in *Icer^{fl/fl} Lysm-Cre* Mäusen im Vergleich zu den WT Mäusen signifikant verringert ist. Weiterhin ist die durchschnittliche finale Tumorstadium in *Icer^{fl/fl} Lysm-Cre* Mäusen signifikant geringer als die der *Icer^{fl/fl}* Mäuse. So liegt am Ende des Experiments die durchschnittliche Tumorstadium einer Kontrollmaus bei 40mm³, während diejenige einer konditionell *Icer*-defizienten Maus lediglich bei 10mm³ liegt. Wie weiterhin in Abb. 14 zu erkennen ist, gibt es hinsichtlich der MC38 Tumorentwicklung keinen signifikanten Unterschied

zwischen beiden Gruppen. Das durchschnittliche Tumolvolumen der WT Mäuse liegt sogar minimal unter dem der *Icer^{fl/fl} Lysm-cre* Mäuse.

Zusammengefasst lässt sich aus Abb. 14 erkennen, dass Mäuse, die eine *Icer*-Defizienz in Makrophagen besitzen, B16F10 Melanomzellen, aber nicht MC38 Kolonkarzinomzellen, abstoßen, weshalb Makrophagen vermutlich für die Melanomabstoßung *Icer*-defizienter Mäuse, wie in Abb. 9 dargestellt, verantwortlich sind. Um dies zu verifizieren lag der weitere Fokus dieser Arbeit auf der Analyse des unterschiedlichen Phänotyps *Icer*-defizienter und *Icer*-kompetenter Makrophagen.

3.9 *Icer*-defiziente Makrophagen nutzen verstärkt die Glykolyse zur Energiegewinnung

Makrophagen werden gemäß ihres Phänotyps in inflammatorische M1 Makrophagen und Gewebebesiedelnde anti-inflammatorische M2 Makrophagen eingeteilt. Die unterschiedlichen Makrophagen-Subpopulationen werden unter anderem anhand ihres Metabolismus unterschieden. So nutzen M1 Makrophagen verstärkt die Glykolyse zur Energiegewinnung, während M2 Makrophagen präferentiell oxidative Phosphorylierung zur Energiegewinnung nutzen.^{35,124–126} Um potentielle Unterschiede bezüglich des Metabolismus zwischen *Icer*-defizienten und WT Makrophagen zu identifizieren, wurden *in vitro* sogenannte Seahorse-Assays mit Makrophagen aus der Bauchhöhle durchgeführt. Mithilfe eines Seahorse-Assays kann sowohl die Glykolyse-Rate als auch die Effizienz des oxidativen Metabolismus bestimmt werden, wobei sich die folgenden Assays lediglich auf die Glykolyse-Effizienz beziehen. Zellen mit einem glykolytischen Phänotyp produzieren wesentlich höhere Raten an Protonen als solche, die vermehrt den oxidativen Metabolismus zur Energiegewinnung nutzen. Da diese Protonen-Produktion zu einer Ansäuerung des Milieus führt, stellt die ECAR (extracellular acidification rate)-Einheit ein Maß für die glykolytische Aktivität der Zellen dar. Zur Bestimmung der Glykolyse-Rate von wildtypischen und *Icer*-defizienten Makrophagen wurden die Makrophagen nach Isolation für vier Stunden in Kultur genommen.

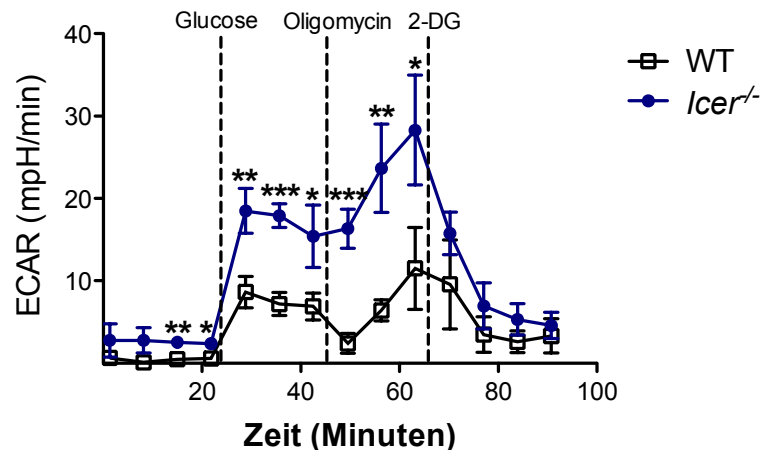


Abb. 15 *Icer*-defiziente Makrophagen besitzen eine höhere Glykolyse-Rate als *Icer*-kompetente Makrophagen.

Von den durch eine Bauchhöhlenspülung gewonnenen Makrophagen aus *Icer*-defizienten (*Icer*^{-/-}, n=4) und WT Mäusen (n=4) wurden je 2x10⁵ Zellen in einem Gesamtvolumen von 200µl TM5 in eine 96-well Seahorse-Zellkulturplatte ausplattiert und in Kultur genommen. Nach vierstündiger Inkubationszeit wurde das Kulturmedium (TM5) entfernt und die Zellen für eine Stunde in Glucose-freies Seahorse-Medium (DMEM + 2mM Glutamin) aufgenommen. Anschließend folgte die 90-minütige Messung in einem Seahorse XFe Fluor 96-well Analyzer (Seahorse Bioscience). Nach vier basalen Messungen, wurde den Ansätzen 25mM Glucose zugeführt. Hier erfolgten drei Messungen bevor 2,5µM Oligomycin zugeführt wurde und weitere drei Messungen stattfanden. Abschließend wurde 100mM 2-Deoxyglucose (2-DG) zugegeben und weitere vier Messungen durchgeführt. Gemessen wurde hierbei die ECAR-Rate, also die Ansäuerung des Mediums durch Protonen. Zur Berechnung der Signifikanzen wurde ein zweiseitiger Studentischer T-Test verwendet (*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,01).

In Abb. 15 ist die Glykolyse-Rate *Icer*-defizienter und wildtypischer Makrophagen aus der Bauchhöhle dargestellt. Hierbei ist zu erkennen, dass die Unterschiede zwischen den Gruppen zu Beginn noch recht gering sind. Nach Zugabe der Glucose kommt es zu einem Anstieg der ECAR-Rate, da die Glucose als Substrat für die Glykolyse dient. Das Endprodukt der Glykolyse ist Pyruvat, welches durch die Laktat-Dehydrogenase in Laktat umgewandelt wird. Hierbei werden Protonen freigesetzt, die zu einer Ansäuerung des Mediums führen, welche durch den pH-Wert messbar ist. In diesem Abschnitt der Messung ist zu erkennen, dass *Icer*-defiziente Makrophagen eine wesentlich stärkere Glykolyse-Rate besitzen als Makrophagen aus WT Mäusen. Schließlich wird Oligomycin zugegeben, welches die oxidative Phosphorylierung hemmt, so dass die Zellen unter Stress zur Glykolyse gezwungen sind. Auch in diesem Bereich der Messung ist die Glykolyse-Rate der *Icer*-defizienten Makrophagen höher als die der *Icer*-kompetenten Makrophagen. Als letzte Komponente wird 2-Deoxyglucose (2-DG) zugegeben, welches die Glykolyse hemmt, so dass es zu einem Abfall der ECAR-Rate kommt. In Abb. 15 ist diesbezüglich zu erkennen, dass noch zu Beginn dieses Messungsabschnitts die Glykolyse-Rate der Makrophagen aus *Icer*-defizienten Mäusen höher ist als die der wildtypischen Makrophagen. Im weiteren Verlauf nähern sich die Kurven jedoch an, da die Glykolyse vollständig gehemmt und nur noch der Hintergrund, also die Ansäuerung des Mediums, die nicht durch Glykolyse entsteht, gemessen wird.

Aus Abb. 15 wird somit ersichtlich, dass *Icer*-defiziente Makrophagen im Vergleich zu Makrophagen aus der Bauchhöhle wildtypischer Mäuse eine stärkere Glykolyse-Rate besitzen. Dieses Resultat zeigt, dass *Icer*-defizienter Makrophagen einen M1 Phänotyp besitzen.

3.10 *Icer*-defiziente Makrophagen produzieren *in vitro* mehr TNF- α als *Icer*-kompetente Makrophagen

Ein weiteres Unterscheidungskriterium zwischen M1 und M2 Makrophagen ist die differenzielle Expression charakteristischer Markergene. So sind das pro-inflammatorische Cytokin TNF- α und das Enzym „induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase“ (iNOS) typische M1 Marker, während beispielsweise IL-10 ein typischer M2 Marker ist.^{127,128} Um Unterschiede in der Produktion dieser M1-charakteristischen Cytokine zu identifizieren, wurden Makrophagen aus der Bauchhöhle aus *Icer*-defizienten (*Icer*^{-/-}) Mäusen und Kontrollmäusen (WT) angereinigt und für 24 Stunden mit 100ng/ml LPS stimuliert. Anschließend wurde mittels einer durchflusszytometrischen Analyse die TNF- α -Produktion gemessen.

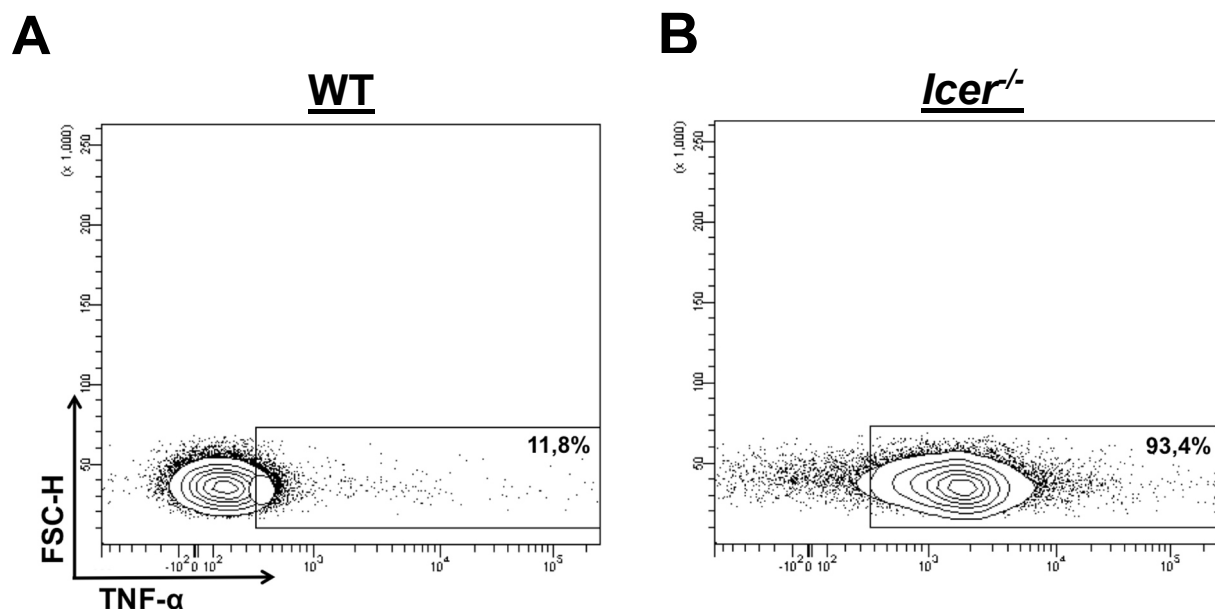


Abb. 16 Peritoneal-Makrophagen aus *Icer*-defizienten Mäusen produzieren mehr TNF- α als Makrophagen aus WT Mäusen.

1x10⁶ *Icer*-defiziente bzw. wildtypische Makrophagen aus der Bauchhöhle wurden für 24 Stunden mit 100ng/ml LPS in einer 24-well-Platte stimuliert. Anschließend wurden sie mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern auf CD11b, F4/80 und TNF- α gefärbt und mithilfe einer FACS-Analyse auf TNF- α -Produzenten hin untersucht. In **A** ist der prozentuale Anteil an TNF- α -positiven CD11b⁺ F4/80⁺ Makrophagen aus WT Mäusen und in **B** aus *Icer*-defizienten Mäusen dargestellt.

Aus Abb. 16 wird ersichtlich, dass nach 24-stündiger LPS-Stimulation 93,4% der *Icer*-defizienten Makrophagen TNF- α -Produzenten sind, während lediglich 11,8% der wildtypischen Makrophagen TNF- α produzieren. Dieses Ergebnis ist eine weitere Bestätigung des bereits in Abb. 15 dargestellten M1 Phänotyps *Icer*-defizienter Makrophagen.

3.11 Die *Tnfa*-Promotoraktivität wird durch ICER inhibiert

Wie in Abb. 16 dargestellt, konnten in Peritoneal-Makrophagen aus WT Mäusen ca. 80% weniger TNF- α -Produzenten nachgewiesen werden als in *Icer*-defizienten Makrophagen. Um diesbezüglich eine mögliche Interaktion zwischen ICER und dem *Tnfa*-Promotor aufzudecken, wurde ein Reportergerassay durchgeführt. Aufgrund verschiedener Eigenschaften wurden hierfür Mastzellen anstelle von Makrophagen genutzt. Zum einen sind Mastzellen im Gegensatz zu Peritoneal-Makrophagen in großen Mengen verfügbar, zum anderen ist die für eine Auswertung solcher Überexpressionsexperimente benötigte Transfektionseffizienz deutlich höher als die von Makrophagen. Hierfür wurde in Mastzellen ein Konstrukt, in dem die *Tnfa*-Promotorregion vor eine Luciferase-kodierende Sequenz kloniert wurde, transfiziert. Zusätzlich wurde jeweils ein zusätzliches ICER-Konstrukt kotransfiziert. Als Kontrolle diente der Leervektor pcDNA. Weiterhin diente als interne Kontrolle zur Normalisierung der Transfektionseffizienz ein zusätzliches Luciferase-Konstrukt (*Renilla* Luciferase, pRL-TK), welches ebenfalls kotransfiziert wurde.

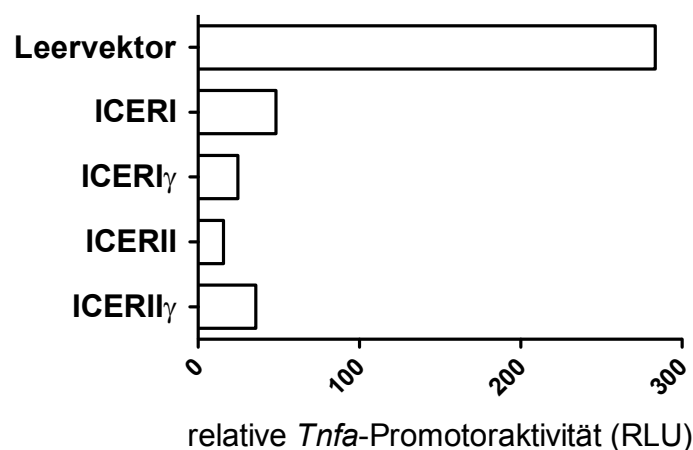


Abb. 17 ICER hemmt die *Tnfa*-Promotoraktivität in Mastzellen.

Pro Ansatz wurden 4×10^6 Mastzellen mit $8 \mu\text{g}$ eines *Tnfa*-Reporterkonstrukts (*Tnfa*-Promotorsequenz vor einer Luciferase-kodierenden Sequenz) und $4 \mu\text{g}$ eines der jeweiligen ICER-Konstrukte transfiziert. Als Kontrolle zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden zusätzlich pro Ansatz 300ng eines zusätzlichen Luciferase-Konstrukts (*Renilla* Luciferase) kotransfiziert. Als Kontrolle diente der Leervektor pcDNA. Nach dreistündiger Erholung bei 37°C im Brutschrank wurden die jeweiligen Ansätze über Nacht mit $0,375 \mu\text{M}$ Ionomycin stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit dem „Passive Lysis Buffer“ lysiert und die Luciferaseaktivität mittels des „Dual-Luciferase® Reporter Assays“ (Promega) gemessen.

Die in Abb. 17 gemessene Luciferase-Aktivität gibt die Aktivität des *Tnfa*-Promotors an. Transfiziert man zusätzlich zum *Tnfa*-Promotor-Luciferase-Konstrukt den Leervektor pcDNA, so gibt die gemessene Luciferase-Aktivität (relative Lichteinheiten (RLU)) den Normalzustand an. Kotransfiziert man statt des Leervektors Plasmide mit Sequenzen für bestimmte Transkriptionsfaktoren, in diesem Fall die unterschiedlichen ICER-Spleißvarianten, so kann man durch die gemessene Luciferase-

Aktivität Rückschlüsse auf die Interaktion des Transkriptionsfaktors mit dem jeweiligen Promotor schließen. Diesbezüglich ist aus

Abb. 17 ersichtlich, dass die gemessene Luciferase-Aktivität in den Ansätzen, in denen die ICER-Konstrukte transfiziert wurden, bei ca. 15-50RLU liegen. Dies ist wesentlich geringer als die in der pcDNA-Leervektor-Kontrolle gemessene Luciferase-Aktivität mit 283RLU. Dies gilt für jede einzelne Spleißvariante von ICER, so dass zusammenfassend gesagt werden kann, dass die *Tnfa*-Promotoraktivität durch ICER gehemmt wird.

3.12 Der prozentuale Anteil an Melanom-infiltrierenden Makrophagen ist in *Icer^{fl/fl} Lysm-Cre* Mäusen erhöht

Um den Einfluss von Makrophagen auf die Melanomabstoßung *Icer*-defizienter Mäuse näher zu analysieren, wurde zunächst untersucht, ob ein Unterschied im prozentualen Anteil Tumor-infiltrierender Makrophagen zwischen Mäusen mit einer konditionellen Depletion von *Icer* in Makrophagen (*Icer^{fl/fl} Lysm-Cre*) und WT Tieren (*Icer^{fl/fl}*) vorliegt. Hierfür wurden 2×10^5 B16F10 Melanomzellen s.c. in die rechte Flanke von *Icer^{fl/fl}* (n=10) bzw. *Icer^{fl/fl} Lysm-Cre* Mäusen (n=7) injiziert. Im Bereich der linken Flanke derselben Tiere wurden 1×10^6 MC38 Kolonkarzinomzellen s.c. injiziert. Nach 21 Tagen wurden die Tumore aufgearbeitet und mithilfe der Durchflusszytometrie der prozentuale Anteil Tumor-infiltrierender Makrophagen ermittelt.

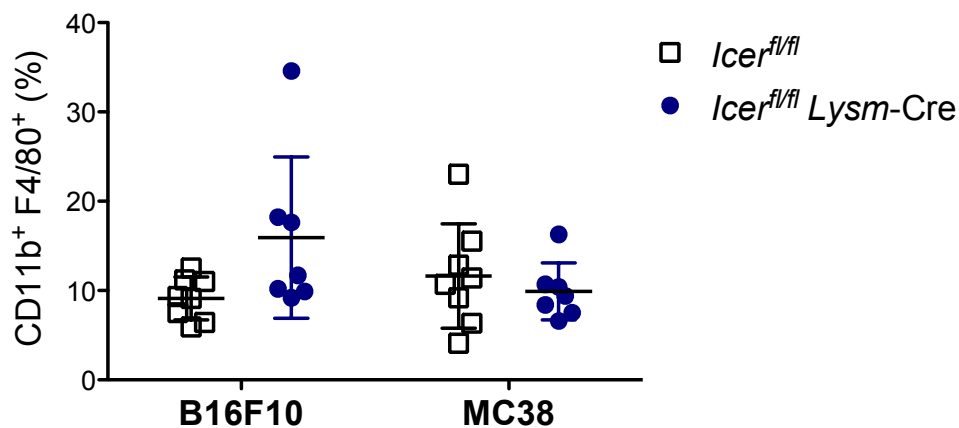


Abb. 18 Der prozentuale Anteil an B16F10-infiltrierenden Makrophagen ist in *Icer^{fl/fl} Lysm-Cre* Mäusen durchschnittlich höher als in *Icer^{fl/fl}* Mäusen.

Zunächst wurden 2×10^5 B16F10 Tumorzellen s.c. in die rechte Flanke konditioneller KO Mäuse für *Icer* in Makrophagen (*Icer^{fl/fl} Lysm-Cre*, n=7) und in die entsprechenden Kontrolltiere (*Icer^{fl/fl}*, n=10) gespritzt. Zusätzlich wurden s.c. in die linke Flanke jeweils 1×10^6 MC38 Kolonkarzinomzellen injiziert. Nach 21 Tagen wurden die Tumore aus den Tieren präpariert, zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet und mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern, die an CD45, CD11b und F4/80 binden, angefärbt. Der prozentuale Anteil an Tumor-infiltrierenden Makrophagen konnte anschließend mithilfe der durchflusszytometrischen Analyse bestimmt werden.

Bezüglich des B16F10 Melanoms ist in Abb. 18 zu erkennen, dass der prozentuale Anteil an Tumor-infiltrierenden Makrophagen in *Icer^{fl/fl} Lysm-Cre* Mäusen im Vergleich zum prozentualen Anteil der Tumor-infiltrierenden Makrophagen in den Kontrolltieren leicht erhöht ist. In den konditionellen KO Mäusen (*Icer^{fl/fl} Lysm-Cre*) sind durchschnittlich 16% der eingewanderten Lymphozyten CD11b⁺ F4/80⁺ Makrophagen, während es in den WT Mäusen (*Icer^{fl/fl}*) durchschnittlich lediglich 9% sind. Betrachtet man hingegen im MC38 Modell den Anteil an Tumor-infiltrierenden Makrophagen, so ist zu erkennen, dass es in diesem Fall keinen Unterschied zwischen beiden Gruppen gibt. Von den in den MC38 eingewanderten CD45⁺ Lymphozyten sind in den Kontrollmäusen 11,6% und in den

konditionellen KO Mäusen 10% CD11b⁺ F4/80⁺ Makrophagen. In den folgenden Versuchen wurde der Fokus auf phänotypische Unterschiede zwischen *Icer*-defizienten und *Icer*-kompetenten Tumor-infiltrierenden Makrophagen gelegt.

3.13 Tumor-infiltrierende Makrophagen aus *Icer^{fl/fl} Lysm-Cre* Mäusen produzieren vermehrt TNF- α und iNOS

Um den Phänotyp der Tumor-infiltrierenden Makrophagen näher zu untersuchen, wurden zunächst 2×10^5 B16F10 Melanomzellen s.c. in *Icer^{fl/fl} Lysm-Cre* bzw. *Icer^{fl/fl} WT* Mäuse injiziert. Nach 20 Tagen wurden die Tumore aus den Tieren präpariert und der Phänotyp der Tumor-infiltrierenden Makrophagen mithilfe durchflusszytometrischer Analysen genauer analysiert. Hierzu wurden die Tumorzellsuspensionen zunächst für vier Stunden mit LPS, einem starken M1 Stimulus, stimuliert und anschließend mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern auf CD45, CD11b, F4/80, TNF- α und iNOS angefärbt und im Durchflusszytometer gemessen und analysiert.

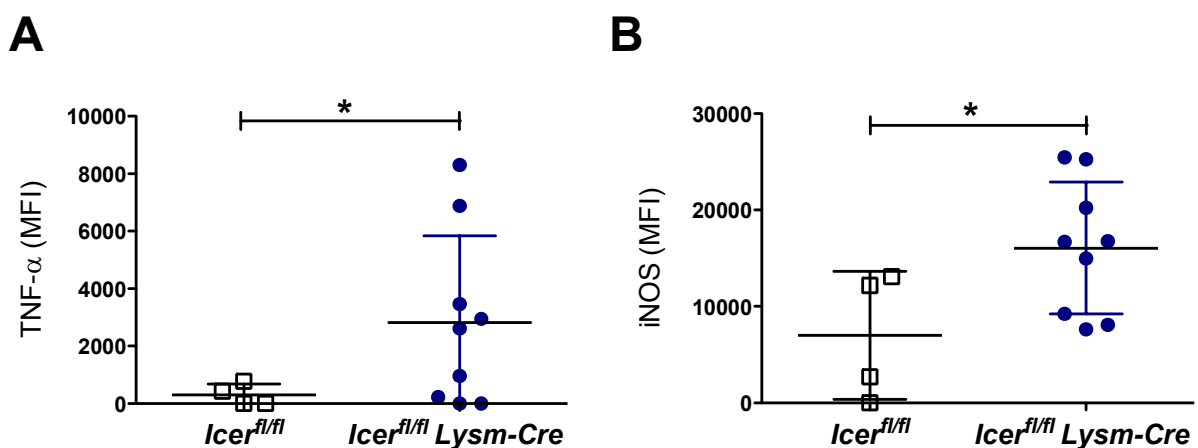


Abb. 19 Tumor-infiltrierende Makrophagen aus *Icer^{fl/fl} Lysm-Cre* Mäusen produzieren mehr TNF- α und iNOS als Tumor-infiltrierende Makrophagen aus WT Mäusen.

Es wurden 2×10^5 B16F10 Melanomzellen s.c. in *Icer^{fl/fl} Lysm-Cre* (n=9) und entsprechende WT Tiere (*Icer^{fl/fl}*, n=4) injiziert. Nach 20 Tagen wurden die Tumore präpariert und zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet. Anschließend wurden die Zellen für vier Stunden mit 100ng/ml LPS stimuliert. Zur Analyse des Makrophagen-Phänotyps wurden die Zellen mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD45, CD11b und F4/80 markiert. Zusätzlich wurden die Proben mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern auf TNF- α (A) und iNOS (B) gefärbt. Die Signifikanzen wurden mithilfe eines zweiseitigen Studentischen T-Test errechnet (*p \leq 0,05).

Mithilfe des Lymphozyten-Markers CD45 konnten anfänglich die Tumor-infiltrierenden Lymphozyten von den B16F10 Melanomzellen separiert werden. Weiterhin war es möglich die Makrophagen über ihre spezifischen Oberflächenmarker CD11b und F4/80 von den anderen Lymphozyten-Populationen zu trennen. Bezüglich des Phänotyps wurden Unterschiede in der TNF- α - und iNOS-Produktion der

Tumor-infiltrierenden Makrophagen aus *Icer^{fl/fl} Lysm-Cre* und *Icer^{fl/fl}* Kontrollmäusen analysiert. Wie aus

Abb. 19A ersichtlich ist, ist die MFI von TNF- α in B16F10-infiltrierenden Makrophagen aus *Icer^{fl/fl} Lysm-Cre* Mäusen signifikant höher als die MFI von TNF- α der Makrophagen aus WT Mäusen. Das gleiche ist in

Abb. 19B bezüglich der MFI von iNOS zu erkennen. Auch hier ist die MFI von iNOS in Makrophagen aus *Icer^{fl/fl} Lysm-Cre* Mäusen signifikant erhöht im Vergleich zu Makrophagen aus WT Mäusen. Aus den in

Abb. 19 dargestellten Ergebnissen ist zu erkennen, dass Tumor-infiltrierende Makrophagen aus *Icer^{fl/fl} Lysm-Cre* Mäusen einen stärker ausgeprägten M1 Phänotyp besitzen als solche aus WT Mäusen.

3.14 In *Icer*-defizienten Makrophagen ist die Expression M1-typischer Markergene hoch- und die M2-charakteristischer Markergene herunterreguliert

Um den bereits identifizierten M1 Phänotyp *Icer*-defizienter Makrophagen detaillierter zu untersuchen, wurde die Genexpression Tumor-infiltrierender Makrophagen aus *Icer*-defizienten und *Icer*-kompetenten Mäusen analysiert. Hierzu wurden zunächst 2×10^5 B16F10 Tumorzellen s.c. in *Icer^{fl/fl} Lysm-Cre* und *Icer^{fl/fl} WT* Mäuse injiziert. 18 Tage nach Inokulation wurden die Tumor-infiltrierenden Makrophagen mithilfe eines durchflusszytometrischen Sortierers isoliert. Anschließend wurde aus diesen die RNA angereinigt und die Transkriptome mittels „Next Generation Sequenzierung“ (NGS) untersucht.

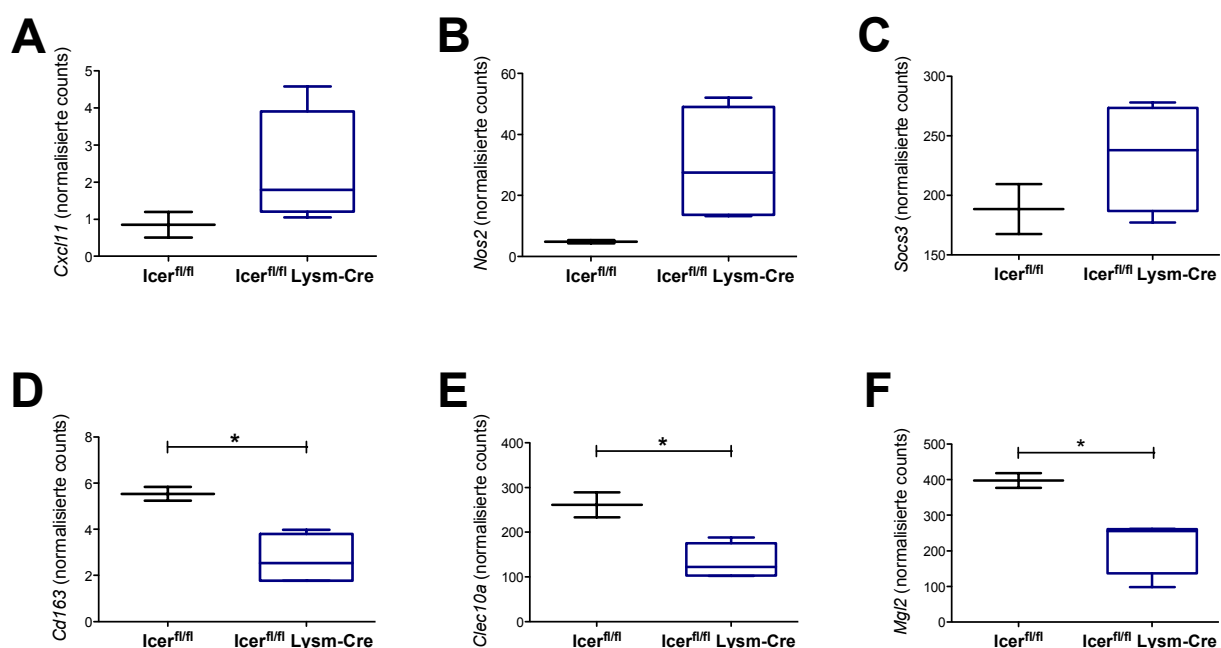


Abb. 20 *Icer*-defiziente Makrophagen exprimieren verstärkt M1-charakteristische Gene, während *Icer*-kompetente Makrophagen verstärkt M2-typische Gene exprimieren.

Es wurden 2×10^5 B16F10 Melanomzellen s.c. in *Icer^{fl/fl} Lysm-Cre* (n=4) bzw. Kontrollmäuse (*Icer^{fl/fl}*, n=2) inokuliert. 18 Tage nach Tumorzellinjektion wurden die Tumore aus den Tieren präpariert und zu einer Einzellsuspension verarbeitet. Diese wurden mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern auf CD45, CD11b und F4/80 angefärbt, so dass die Tumor-infiltrierenden Makrophagen mittels eines durchflusszytometrischen Sortierers (Aria, BD Biosciences) aus den Tumoren isoliert werden konnten. Aus diesen wurde anschließend die RNA angereinigt und die Transkriptome mittels eines HiSeq2500 (Illumina) untersucht. Die Analyse der Expressionsdaten wurde mithilfe der CLCGenomics Work Bench Software (Quiagen) durchgeführt. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger Studentischer T-Test verwendet (*p ≤ 0,05).

Im Rahmen der NGS-Analysen wurden pro Probe durchschnittlich zwölf Millionen „Reads“ generiert. Nach bioinformatischer Analyse der Expressionsdaten mittels der „CLCGenomics Work Bench Software“, konnten 2249 Gene als differentiell exprimiert eingestuft werden. Der weitere Fokus lag hierbei auf Genen, die charakteristisch für einen Makrophagen-Phänotyp des Subtyps M1 bzw. M2

sind. In Abb. 20 ist zu erkennen, dass die M1-charakteristischen Markergene *Cxcl11*, *Nos2* und *Socs3*⁴ (Abb. 20A-C) in *Icer*-defizienten Makrophagen (*Icer*^{f/f} *Lysm*-Cre) stärker exprimiert werden als in wildtypischen Makrophagen (*Icer*^{f/f}). Bezüglich der M2-Markergene *Cd163*, *Clec10a*, *Mgl2*⁵ (Abb. 20D-F) verhält es sich umgekehrt. Diese werden in *Icer*-kompetenten (*Icer*^{f/f}) Makrophagen stärker exprimiert als in *Icer*-defizienten Makrophagen.

Zusammenfassend lässt sich aus Abb. 20 schließen, dass Tumor-infiltrierende *Icer*-defiziente Makrophagen einen M1 Phänotyp besitzen, während hingegen Tumor-infiltrierende WT Makrophagen einen M2 Phänotyp besitzen.

⁴ SOCS3 (Suppressor of cytokine signaling-3) inhibiert die Cytokin-Signaltransduktion, in die der JAK/STAT-Signalweg involviert ist. *Nos2* ist die Genbezeichnung für iNOS (weitere Erläuterungen siehe 1.1). Das Chemokin *Cxcl11* bindet an den CXCR3-Rezeptor und rekrutiert aktivierte T-Zellen zum Entzündungsherd.

⁵ CD163 ist an der Endozytose durch Makrophagen beteiligt. Weiterhin ist CD163 an der Induktion einer Signalkaskade beteiligt, die in einer IL-6-Produktion resultiert. CLEC10A (C-type lectin domain family 10 member A) ist an der Rekrutierung inflammatorischer Monozyten beteiligt. MGL2 (macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 2) ist durch Erkennung bestimmter glykolisierter Strukturen an der Erkennung, Phagozytose und Antigenpräsentation von Krankheitserregern beteiligt.

3.15 In *Icer*^{-/-} *Tnfa*^{-/-} Doppel-KO-Mäusen ist das B16F10 Melanomwachstum nicht inhibiert

Im Verlauf dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Makrophagen an der Melanomabstoßung *Icer*-defizienter Mäuse maßgeblich beteiligt sind (Abb. 14). Der M1 Phänotyp *Icer*-defizienter Makrophagen zeichnet sich sowohl *ex vivo* als auch *in vitro* im Vergleich zu *Icer*-kompetenten Makrophagen hauptsächlich durch eine starke Produktion des pro-inflammatorischen Cytokins TNF-α aus (

Abb. 19, Abb. 16). Zur Bestätigung, dass dies entscheidend zur Melanomabstoßung *Icer*-defizienter Mäuse beiträgt, wurde *in vivo* ein Tumorversuch mit B16F10 Melanomzellen in *Icer*^{-/-} *Tnfa*^{-/-} Mäusen, die eine Defizienz sowohl für ICER als auch für TNF-α besitzen, durchgeführt. Hierfür wurden 2x10⁵ B16F10 Tumorzellen s.c. in *Icer*^{-/-} *Tnfa*^{-/-} Mäuse (n=9) injiziert. Die Kontrollgruppe bestand aus Mäusen, die eine Defizienz für *Tnfa*, aber keine für *Icer* (*Icer*^{+/+} *Tnfa*^{-/-}, n=12) besaßen. Weiterhin wurden Tumorzellen s.c. in *Icer*-defiziente (*Icer*^{-/-} *Tnfa*^{+/+}, n=7) bzw. WT Kontrollmäuse (*Icer*^{+/+} *Tnfa*^{+/+}, n=9) inokuliert. Das Tumorstadium wurde über einen Zeitraum von 15 Tagen gemessen.

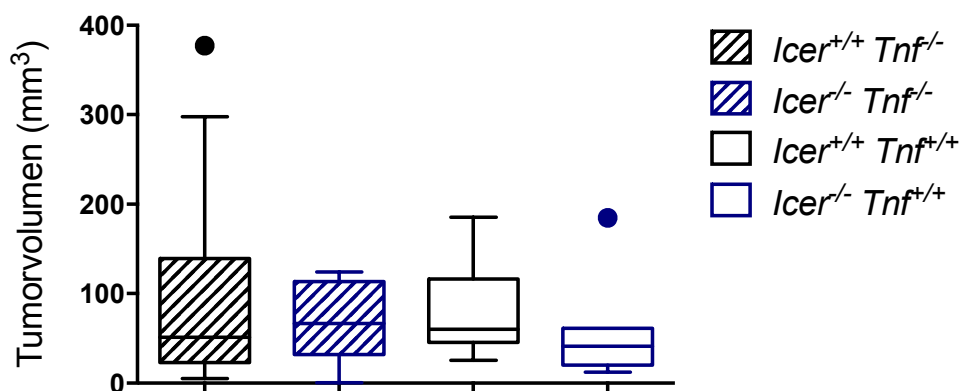


Abb. 21 *Icer*-defiziente Mäuse besitzen ein verringertes Tumorstadium, während es in *Icer/Tnfa*-doppel-defizienten Tieren zu keiner Verminderung des Tumorstadiums kommt.

2x10⁵ B16F10 Melanomzellen wurden s.c. in Mäuse, die eine Defizienz sowohl für ICER als auch für TNF-α (*Icer*^{-/-} *Tnfa*^{-/-}, n=9) besaßen, inokuliert. Die Kontrollgruppe bildeten Tiere, die lediglich die Defizienz für TNF-α besaßen, jedoch keine für ICER (*Icer*^{+/+} *Tnfa*^{-/-}, n=12). Zusätzlich wurden die Tumorzellen in *Icer*-defiziente (*Icer*^{-/-} *Tnfa*^{+/+}, n=7) bzw. *Icer*-kompetente Tiere (*Icer*^{+/+} *Tnfa*^{+/+}, n=9), die nicht defizient für *Tnfa* waren, injiziert. Das Tumorstadium wurde aus der gemessenen Tumorbreite und -länge mittels der Formel $Breite^2 \times Länge \times 0,5$ errechnet.

In Abb. 21 ist das mittlere Tumorstadium 15 Tage nach Injektion der Tumorzellen dargestellt. Hierbei ist zu erkennen, dass das Tumorstadium der *Icer*-defizienten Mäuse (*Icer*^{-/-} *Tnfa*^{+/+}) geringer ist als das der *Icer*-kompetenten (*Icer*^{+/+} *Tnfa*^{+/+}) Mäuse. Weiterhin ist ersichtlich, dass es keinen Unterschied zwischen *Icer*-kompetenten/*Tnfa*-defizienten (*Icer*^{+/+} *Tnfa*^{-/-}) und *Icer*-defizienten/*Tnfa*-defizienten Mäusen (*Icer*^{-/-} *Tnfa*^{-/-}) bezüglich des Tumorstadiums gibt. Das Tumorstadium beider Gruppen befindet sich auf dem gleichen Niveau wie das der WT Mäuse.

Wie bereits in Abb. 9 gezeigt wurde, ist das Tumorwachstum in *Icer*-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen stark inhibiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *Icer*-defiziente Makrophagen im Vergleich zu wildtypischen Makrophagen starke TNF- α -Produzenten sind (Abb. 16,

Abb. 19). Durch eine zusätzliche Depletion von *Tnfa* (Abb. 21) in *Icer*-defizienten Mäusen kann das verringerte Tumorwachstum jedoch wieder aufgehoben werden, was die tragende Rolle der TNF- α -produzierenden M1-Makrophagen hinsichtlich der Inhibition der Tumorprogression *Icer*-defizienter Makrophagen bestätigt.

3.16 Reduzierte Melanomprogression infolge einer Behandlung mit dem Adenylatzyklase-Inhibitor MDL-12

Es konnte bisher gezeigt werden, dass *Icer*-defiziente Mäuse die Progression von Tumorzellen mit einem hohen cAMP-Gehalt (B16F10) inhibieren können. Die entsprechenden Versuche konzentrierten sich auf die Analyse der molekularen Grundlagen dieser Abstoßung. Um abschließend die Möglichkeit für einen therapeutischen Ansatz zur Behandlung von Melanomen zu überprüfen, wurde untersucht, ob das Wachstum von Tumorzellen unterdrückt werden kann, in dem *in vivo* der cAMP-Signalweg inhibiert wird. Hierzu wurde der Adenylatzyklase-Inhibitor MDL-12 verwendet. Um *in vivo* Tumorexperimente mit MDL-12-behandelten B16F10 Melanomzellen durchführen zu können, musste zunächst überprüft werden, ob die cAMP-Produktion dieser Tumorzellen sich durch MDL-12 inhibieren lässt. Hierzu wurden B16F10 Melanomzellen *in vitro* mit 20µM MDL-12 inkubiert und anschließend die cAMP-Konzentration mittels einer cAMP-ELISA-Analyse gemessen. Weiterhin wurde überprüft, ob eine MDL-12-Behandlung der Tumorzellen *per se* zu einem verminderten Wachstum führt (2.15 Messung der Proliferationskapazität).

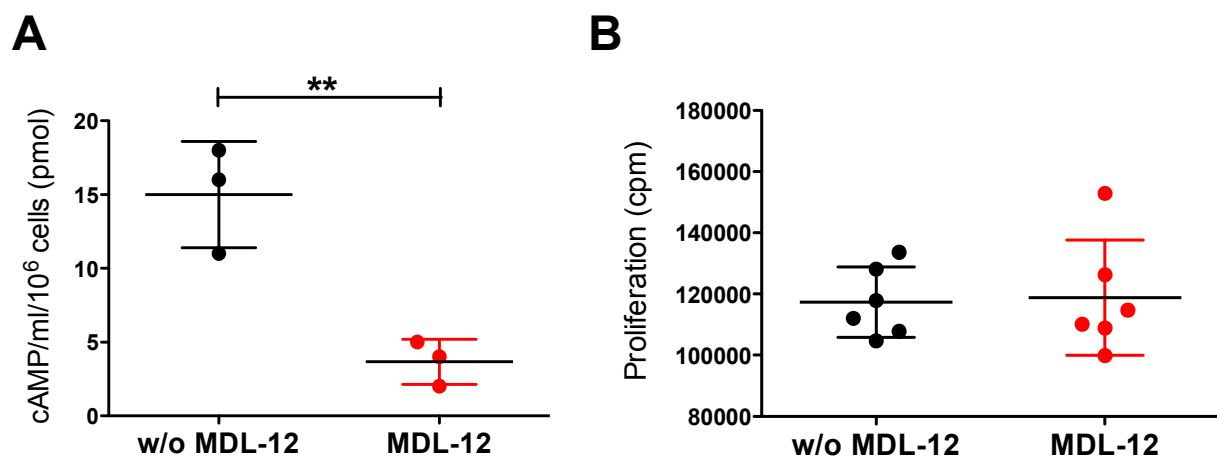


Abb. 22 MDL-12 inhibiert die cAMP-Produktion in B16F10 Melanomzellen, hat jedoch keinen Einfluss auf ihre Proliferationskapazität.

A Jeweils 1×10^6 B16F10 Melanomzellen wurden *in vitro* mit 20µM MDL-12 für drei Tage inkubiert und anschließend die cAMP-Konzentration mittels eines cAMP-ELISA gemessen. Als Kontrolle dienten unbehandelte B16F10 Melanomzellen. Gemessen wurden pro Ansatz jeweils Triplikate. **B** Zur Bestimmung der Proliferationskapazität MDL-12-behandelter B16F10 Melanomzellen wurden 2×10^5 Zellen in einer 96-well-Rundbodenplatte mit 100µM MDL-12 für 72 Stunden behandelt. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz ohne MDL-12 mitgeführt (w/o MDL-12). Nach 72-stündiger Inkubation wurden pro Ansatz 0,5µCi/well ³H-Thymidin zugegeben. Die Aufnahme des ³H-Thymidin wurde nach weiteren 18 Stunden mithilfe eines β-Counters gemessen. Pro Ansatz wurden sechs Replikate durchgeführt. Zur statistischen Analyse wurde ein zweiseitiger Studentischer T-Test durchgeführt (**p ≤ 0,01).

Zum einen ist aus

Abb. 22A zu erkennen, dass die cAMP-Konzentration in B16F10 Zellen durch Zugabe des Adenylatzyklase-Inhibitors MDL-12 beträchtlich verringert wird. MDL-12 erfüllt somit seine Funktion als Inhibitor von Adenylatzyklasen, welche die Bildung von cAMP aus 5'-AMP katalysieren. Weiterhin ist aus

Abb. 22B zu erkennen, dass es bezüglich der Proliferation keinen Unterschied zwischen MDL-12-behandelten und unbehandelten B16F10 Melanomzellen gibt. Eine MDL-12-Behandlung der Tumorzellen hat somit keinen Effekt auf ihre Proliferationskapazität.

Zur Behandlung eines B16F10 Melanoms mit MDL-12 wurde der in Abb. 23 dargestellte Versuchsablauf durchgeführt.

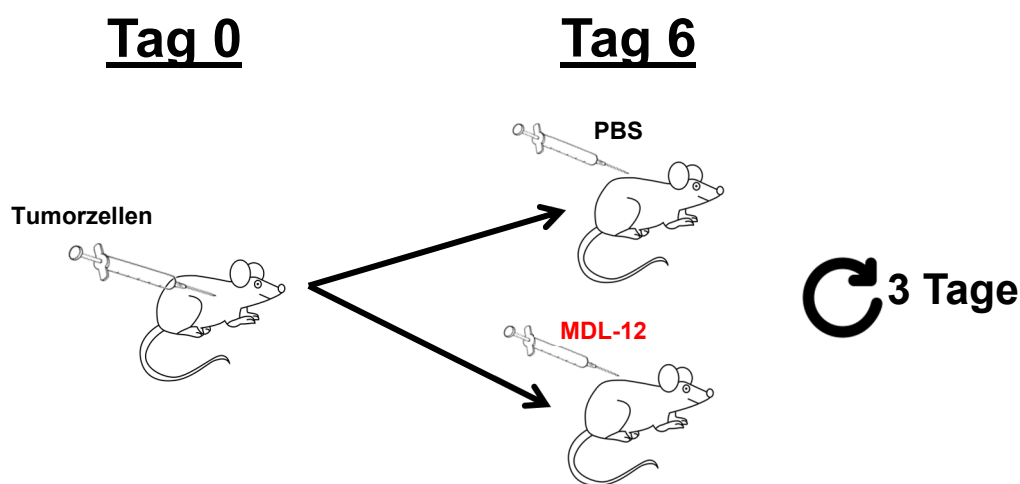


Abb. 23 In vivo Applikation des Adenylatzyklase-Inhibitors MDL-12 zur Melanombehandlung.

Zu Beginn des Versuchs wurden die Tumorzellen s.c. in C57BL/6J Mäuse injiziert. Sechs Tage nach Inokulation wurde mit der therapeutischen Applikation des Adenylatzyklase-Inhibitors MDL-12 begonnen. Hierzu wurden 50µl einer 20µM MDL-12-Lösung oder aber das entsprechende Lösungsmittel (PBS) s.c. peritumoral injiziert. Diese Applikation erfolgte im Drei-Tages-Rhythmus. Als Kontrolle diente pures 1xPBS, das ebenfalls s.c. peritumoral injiziert wurde.

Der Versuch wurde einerseits mit B16F10 Melanomzellen und andererseits mit MC38 Kolonadenokarzinomzellen durchgeführt. Hierfür wurden zu Beginn des Experiments 2×10^5 B16F10 bzw. 1×10^6 MC38 Tumorzellen s.c. in C57BL/6J Mäuse injiziert. Sechs Tage nach Tumorzellinjektion wurde mit der therapeutischen Behandlung begonnen. Hierfür wurde eine 20µM MDL-12-Lösung s.c. peritumoral injiziert, wobei die Kontrollgruppe lediglich pures PBS bekam. Diese Applikation wurde alle drei Tage wiederholt. Zusätzlich hierzu wurde die Tumorgöße über einen Zeitraum von 17 Tagen gemessen.

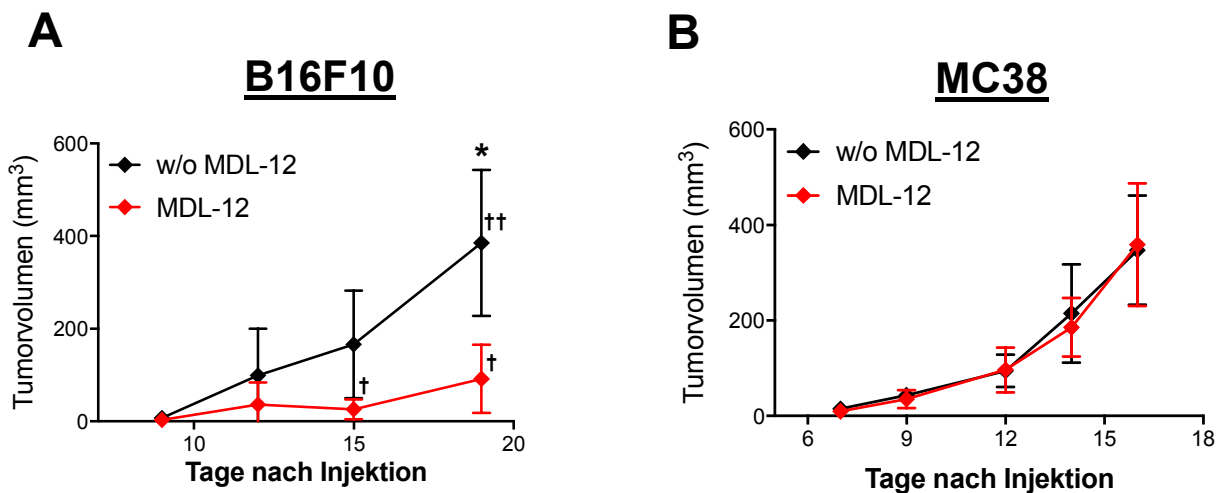


Abb. 24 Durch peritumorale MDL-12-Applikation wird das B16F10 Tumorwachstum in C57BL/6J Mäusen inhibiert.

A Es wurden 2×10^5 B16F10 Melanomzellen s.c. in C57BL/6J Mäuse injiziert. In **B** wurden 1×10^6 MC38 Kolonkarzinomzellen s.c. in C57BL/6J Mäuse injiziert. In beiden Fällen wurde sechs Tage nach der Tumorzellinjektion mit der MDL-12-Behandlung begonnen. Hierzu wurde eine $20 \mu\text{M}$ MDL-12-Lösung (gelöst in PBS) in einem Gesamtvolumen von $50 \mu\text{l}$ s.c. peritumoral injiziert. Diese Behandlung wurde anschließend alle drei Tage wiederholt. Als Kontrolle diente PBS. Parallel wurde in einem Abstand von zwei bis drei Tagen die Tumorgöße mittels einer Schieblehre gemessen und anschließend das Tumolvolumen mithilfe der Formel $\text{Breite}^2 \times \text{Länge} \times 0,5$ berechnet. Verstorbene Mäuse sind mit einem Kreuz gekennzeichnet. Die Signifikanz wurde durch einen zweiseitigen T-Test bestimmt (* $p \leq 0,5$; $n=5$).

Betrachtet man in Abb. 24A die Tumorentwicklung unbehandelter im Vergleich zu MDL-12-behandelter Mäuse, so ist zu erkennen, dass das Tumorwachstum in den MDL-12-behandelten Mäusen gehemmt ist. Hierbei ist auffallend, dass es am sechsten Tag nach Tumorzellinjektion noch keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen in Bezug auf die Tumorentwicklung gab. Nach anschließendem Behandlungsbeginn verlangsamte sich das Tumorwachstum jedoch in den MDL-12-behandelten Mäusen. Der Unterschied in Bezug auf das Tumolvolumen nahm zwischen der Kontrollgruppe und den MDL-12-behandelten Mäusen mit zunehmender Behandlungsdauer stetig zu. In Abb. 24B ist das Wachstum der MC38 Tumorzellen in C57BL/6J Mäusen unter dem Einfluss einer MDL-12-Behandlung dargestellt. Betrachtet man das Tumorwachstum über einen Zeitraum von 17 Tagen, so ist zu sehen, dass es keinen Unterschied zwischen MDL-12-behandelten und MDL-12-unbehandelten Mäusen in Bezug auf die Entwicklung des MC38 Tumors gibt.

Durch *in vivo* Applikationen des Adenylatzyklase-Inhibitors MDL-12 in einem therapeutischen Ansatz ist somit die Entwicklung des B16F10 Melanoms, aber nicht die des MC38 Kolonkarzinoms zu inhibieren.

4. Diskussion

4.1 Makrophagen-abhängige anti-Tumor-Immunantwort

Makrophagen spielen im Immunsystem eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung von Pathogenen. Außerdem wird ihnen sowohl in der Entstehung von Tumoren als auch in ihrer Bekämpfung eine tragende Rolle zugeschrieben. Hierbei werden M1 Makrophagen mit einer anti-Tumor-Immunantwort assoziiert, während M2 Makrophagen eine Tumor-fördernde Funktion zugeschrieben wird. M1 Makrophagen unterscheiden sich von M2 Makrophagen unter anderem durch unterschiedliche Genexpressionsprofile. So werden in M1 Makrophagen beispielsweise verstärkt iNOS und TNF- α transkribiert, während in M2 Makrophagen bevorzugt die Transkription von Arg1 und IL-10 verstärkt ist.¹²⁹

Dem sekundären Botenstoff cAMP werden im Allgemeinen anti-inflammatorische Funktionen innerhalb des Immunsystems zugeschrieben.^{130,131} Auch in Bezug auf Makrophagen konnten schon zahlreiche Zusammenhänge nachgewiesen werden. Für Alveolar-Makrophagen beispielsweise konnte gezeigt werden, dass cAMP zahlreiche Prozesse, wie die Phagozytose, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und die Produktion pro-inflammatorischer Cytokine inhibiert.¹³²⁻¹³⁴ Weiterhin ist über den Einfluss von cAMP in der Entstehung und Polarisierung von Makrophagen bekannt, dass in Anwesenheit von Liganden, die die Bildung von cAMP aus ATP induzieren, wie beispielsweise Prostaglandin E₂ (PGE₂), die Produktion pro-inflammatorischer Cytokine wie TNF- α und MIP-1 α (macrophage inflammatory protein 1 α) in Makrophagen inhibiert ist.^{135,136} Im Gegensatz hierzu ist die Sekretion von Cytokinen, die mit einer anti-inflammatorischen Aktivität von Makrophagen assoziiert sind, in der Anwesenheit von PGE₂ verstärkt. Hierzu zählen IL-10 und G-CSF.^{137,138} Für den transkriptionellen Repressor ICER selbst ist bekannt, dass er nach induzierter Expression durch den cAMP-Signalweg an zahlreichen supprimierenden Vorgängen im Immunsystem beteiligt ist. ICER inhibiert unter anderem T-Zell-Antworten oder führt zu einer Abschwächung der Expression von Fas-Liganden auf T-Zellen und natürlichen Killerzellen.^{68,139,140} Auch konnte gezeigt werden, dass Glucagon die ICER-Expression induziert, was zu einer Suppression von Insulin-Genen in β -Zellen des Pankreas führt.¹⁴¹ Für das Neuropeptid CGRP (calcitonin gene-related peptide) konnte gezeigt werden, dass CGRP in DCs die Expression von ICER induziert. Dadurch wird die TLR-stimulierte Produktion pro-inflammatorischer Cytokine und Chemokine, wie TNF- α und CCL4, in DCs inhibiert. Weiterhin konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass ICER die LPS-induzierte transkriptionelle Aktivität des *Tnf*-Promotors und damit die TNF- α -Produktion inhibiert.¹⁴²

Auch in Makrophagen ist ICER ein Inhibitor bestimmter Genexpressionen. Durch IFN- γ -Stimulation von Makrophagen kommt es in diesen zu einer starken Induktion der *Icer*-Expression. Viele IFN- γ -inhibierten Gene besitzen CRE-Elemente in ihren Promotorregionen, also potentielle Bindedomänen für ICER. Des Weiteren ist für viele dieser Gene bekannt, dass sie durch cAMP koreguliert werden. Außerdem wurde weiterhin gezeigt, dass IFN- γ die Fähigkeit besitzt CRE- bzw. bZIP-Domänen enthaltene Promotoren zu supprimieren.^{143–145}

In der vorliegenden Dissertation wurde erstmals gezeigt, dass der transkriptionelle Repressor ICER auch bei der Polarisierung von Makrophagen, insbesondere Tumor-infiltrierender Makrophagen, eine entscheidende Funktion ausübt.

Die murine Melanomzelllinie B16F10 weist im Vergleich zu der murinen Kolonkarzinomzelllinie MC38 eine höhere intrazelluläre cAMP-Konzentration auf (Abb. 10). Schließlich wurde gezeigt, dass *Icer*-defiziente Mäuse in der Lage sind Tumorzellen mit einem hohen cAMP-Gehalt (B16F10) abzustößen, während solche Tumorzellen mit einer vergleichsweise niedrigen intrazellulären cAMP-Konzentration (MC38) von *Icer*-defizienten Mäusen nicht abgestoßen werden (Abb. 9). Tumor-infiltrierende Makrophagen und Tumor-infiltrierende CD4⁺ T-Zellen weisen gegenüber peripheren Makrophagen und CD4⁺ T-Zellen eine sehr hohe intrazelluläre cAMP-Konzentration auf (Abb. 11), weshalb überprüft wurde, ob eine der beiden Zellpopulationen an der B16F10 Melanomabstoßung *Icer*-defizienter Mäuse beteiligt ist. nTregs interagieren über GJs mit konventionellen CD4⁺ T-Zellen. Hierdurch gelangt der sekundäre Botenstoff cAMP aus nTregs in CD4⁺ T-Zellen, in denen er schließlich die IL-2-Synthese hemmt, wodurch es wiederum zu einer Inhibition der IL-2-vermittelten autokrinen T-Zell-Proliferation kommt.^{66,122} In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch Tumor-infiltrierende Makrophagen und CD4⁺ T-Zellen über GJs mit den Tumorzellen interagieren (Abb. 12), wodurch der sekundäre Botenstoff cAMP aus den Tumorzellen in die Tumor-infiltrierenden Makrophagen und CD4⁺ T-Zellen gelangt, weshalb diese im Vergleich zu Makrophagen und CD4⁺ T-Zellen aus der Peripherie einen stark erhöhten cAMP-Gehalt aufweisen (Abb. 11). Schließlich wurde gezeigt, dass Makrophagen (Abb. 14) und nicht CD4⁺ T-Zellen (Abb. 13) für die B16F10 Melanomabstoßung *Icer*-defizienter Mäuse verantwortlich sind, da Mäuse, die eine Defizienz für *Icer* ausschließlich in Makrophagen besitzen (Abb. 14), B16F10 Melanomzellen abstoßen. Im weiteren Verlauf konnte die Funktion von ICER in der Makrophagen-Polarisierung und der damit verbundenen Suppression einer effizienten anti-Melanom-Immunantwort aufgeklärt werden.

Mithilfe eines Seahorse-Assays kann der Metabolismus einer Zelle untersucht werden. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass *Icer*-defiziente Makrophagen verstärkt die Glykolyse zur Energiegewinnung nutzen (Abb. 15), was ein typisches Charakteristikum der M1 Makrophagen darstellt. Im Gegensatz hierzu nutzen M2 Makrophagen bevorzugt die oxidative Phosphorylierung zur Energiegewinnung.^{35,125,126} Weiterhin wurde gezeigt, dass *Icer*-defiziente Makrophagen *in vitro*,

aber auch Tumor-infiltrierende Makrophagen aus *Icer*-defizienten Mäusen *ex vivo* im Vergleich zu wildtypischen Makrophagen eine sehr starke Produktion des pro-inflammatorischen Cytokins TNF- α aufweisen (Abb. 16,

Abb. 19), das typischerweise in großen Mengen von M1 Makrophagen, jedoch nicht von M2 Makrophagen, sezerniert wird.¹⁴⁶ Bereits seit längerem ist bekannt, dass in Makrophagen eine Verbindung zwischen dem cAMP-Signalweg und dem vom TLR4-ausgehenden Signalweg besteht. So führt cAMP zu einer Inhibition der LPS-induzierten Produktion von TNF- α in Makrophagen. Bisher war allerdings lediglich bekannt, dass diese cAMP-abhängige Suppression maßgeblich durch die Proteinkinase A reguliert wird.¹⁴⁷ In dieser Dissertation wurde jedoch gezeigt, dass auch der transkriptionelle Repressor ICER hierbei involviert ist. So konnte mithilfe eines Reporterassays in Mastzellen gezeigt werden, dass ICER mit dem *Tnf*-Promotor interagiert, wodurch dessen Aktivität inhibiert wird (Abb. 17). Dies ist eine Erklärung für den beobachteten Defekt *Icer*-kompetenter Makrophagen große Mengen TNF- α zu produzieren, während *Icer*-defiziente Makrophagen starke TNF- α -Produzenten darstellen. M1 und M2 Makrophagen lassen sich nicht nur durch ihre unterschiedliche TNF- α -Produktion charakterisieren, sondern auch anhand unterschiedlicher Genexpressionsprofile weiterer charakteristischer M1- bzw. M2-Marker.¹²⁹ Auf Transkriptomebene wurde deshalb gezeigt, dass Tumor-infiltrierende *Icer*-kompetente Makrophagen ein M2-charakteristisches Genexpressionsprofil aufweisen, wohingegen Tumor-infiltrierende *Icer*-defiziente Makrophagen durch ein M1-charakteristisches Genexpressionsprofil gekennzeichnet sind. Die M1-charakteristischen Gene *Cxcl11*, *Nos2* und *Socs3* werden in *Icer*-defizienten Tumor-infiltrierenden Makrophagen im Vergleich zu *Icer*-kompetenten Tumor-infiltrierenden Makrophagen verstärkt exprimiert (Abb. 20A-C). Die Expression der M2 charakteristischen Gene *Cd163*, *Clec10a* und *Mgl2* verhält sich hingegen entgegengesetzt. Diese Gene werden verstärkt in *Icer*-kompetenten Tumor-infiltrierenden Makrophagen im Vergleich zu Tumor-infiltrierenden Makrophagen aus *Icer*-defizienten Tieren exprimiert (Abb. 20D-F).¹⁴⁸⁻¹⁵¹ Somit konnte auf mehreren Ebenen gezeigt werden, dass *Icer*-defiziente Makrophagen im Vergleich zu wildtypischen Makrophagen, die typische M2 Charakteristika aufweisen, einen M1 Phänotyp besitzen. Diese Beobachtungen stellen eine Erklärung für die beschriebene B16F10 Melanomabstoßung *Icer*-defizienter Mäuse dar, da für M1 Makrophagen eine protektive Funktion in der Tumorbekämpfung nachgewiesen ist. M2 Makrophagen, zu denen die wildtypischen *Icer*-kompetenten Makrophagen zählen, weisen hingegen immunsupprimierende Funktionen auf. M2 Makrophagen präsentieren nur in sehr geringen Mengen Antigene und sekretieren bevorzugt die immunsupprimierenden Cytokine IL-10 und TGF- β .¹⁵² Des Weiteren schaffen Tumor-infiltrierende Makrophagen des M2 Subtyps im Umfeld des Tumors ein Wachstumsförderndes Mikromilieu.¹⁵³ Mit steigendem prozentualen Anteil an Tumor-infiltrierenden

Makrophagen des M2 Subtyps steigt die Tumorlast. Gleichzeitig verringert sich das Langzeitüberleben der Patienten.¹⁵⁴ *Icer*-kompetente Mäuse besitzen vermehrt M2 Makrophagen in der Tumorumgebung. Durch die immunsupprimierenden Eigenschaften dieses Makrophagen Subtyps wird das Melanomwachstum folglich gefördert.

Bei der Charakterisierung der Unterschiede zwischen *Icer*-kompetenten und *Icer*-defizienten Makrophagen war besonders auffallend, dass *Icer*-kompetente Makrophagen einen Defekt in der TNF- α -Produktion aufweisen (Abb. 16), da ICER an den *Tnf*-Promotor bindet und dadurch dessen Aktivität inhibiert (Abb. 17). Um die Tendenz *Icer*-defizienter Makrophagen sich in M1 Makrophagen zu differenzieren *in vivo* zu überprüfen wurden Mäuse mit einer Defizienz für *Icer* und *Tnf* generiert. Diese doppel-defizienten Mäuse waren im Gegensatz zu *Icer*-defizienten Mäusen nicht mehr in der Lage B16F10 Melanomzellen abzustößen (Abb. 21). Dies zeigt, dass die M1 Polarisierung *Icer*-defizienter Makrophagen und die damit verbundene starke Produktion des pro-inflammatorischen Cytokins TNF- α essentiell für die B16F10 Melanomabstoßung ist.

Das pro-inflammatorische Cytokin TNF- α ist, wie sein Name „Tumornekrosefaktor“ besagt, in der Lage Tumore zu nekrotisieren.¹⁵⁵ Hierbei wirkt TNF- α einerseits auf die Gefäßstruktur des Tumors und zerstört diese. Andererseits ist TNF- α an der anti-Tumor-Antwort von CD8⁺ T-Zellen und NK Zellen beteiligt.^{156,157} Von Tumor-infiltrierenden Makrophagen sezerniert, wirkt TNF- α parakrin und führt zur Inhibition der Tumorzellproliferation. Neben seinen inhibitorischen Eigenschaften auf die Tumorzellproliferation weist TNF- α auch Tumor-fördernde Eigenschaften auf. Viele Tumore produzieren selbst in geringen Mengen TNF- α , das autokrin über den TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) wirkt und die Tumorzellproliferation fördert.^{158,159} Auch ist in Patienten mit einem fortgeschrittenem Tumorstadium der TNF-Gehalt im Plasma wesentlich höher als der von Patienten mit einer besseren Prognose.¹⁶⁰ Die Tumor-fördernden bzw. Tumor-inhibierenden Eigenschaften von TNF- α sind Tumor- bzw. Gewebeabhängig, so dass sowohl TNF- α selbst, aber auch TNF- α -Antikörper bzw. Antagonisten in der klinischen Anwendung sind. In der Melanom-Therapie wird die lokale Verabreichung von TNF- α erfolgreich eingesetzt. Eine systemische Gabe ist jedoch nicht möglich, da dies für die Patienten toxisch ist.¹⁶¹ Weiterhin werden auch TNF- α -Antikörper erfolgreich in der Krebstherapie eingesetzt.¹⁶² Die unterschiedlichen Tumor- bzw. Gewebespezifischen Eigenschaften von TNF- α lassen auch in der, in dieser Dissertation vergleichend zwischen Melanom und Kolonkarzinom dargestellten, cAMP-abhängigen Induktion der *Tnf*-Expression den Schluss zu, dass die Ansprechrate des Tumors auf TNF- α stark vom Tumor abhängig ist. Diese Tumorspezifische Ansprechrate ist womöglich auch von der Expressionsstärke der TNFR abhängig.

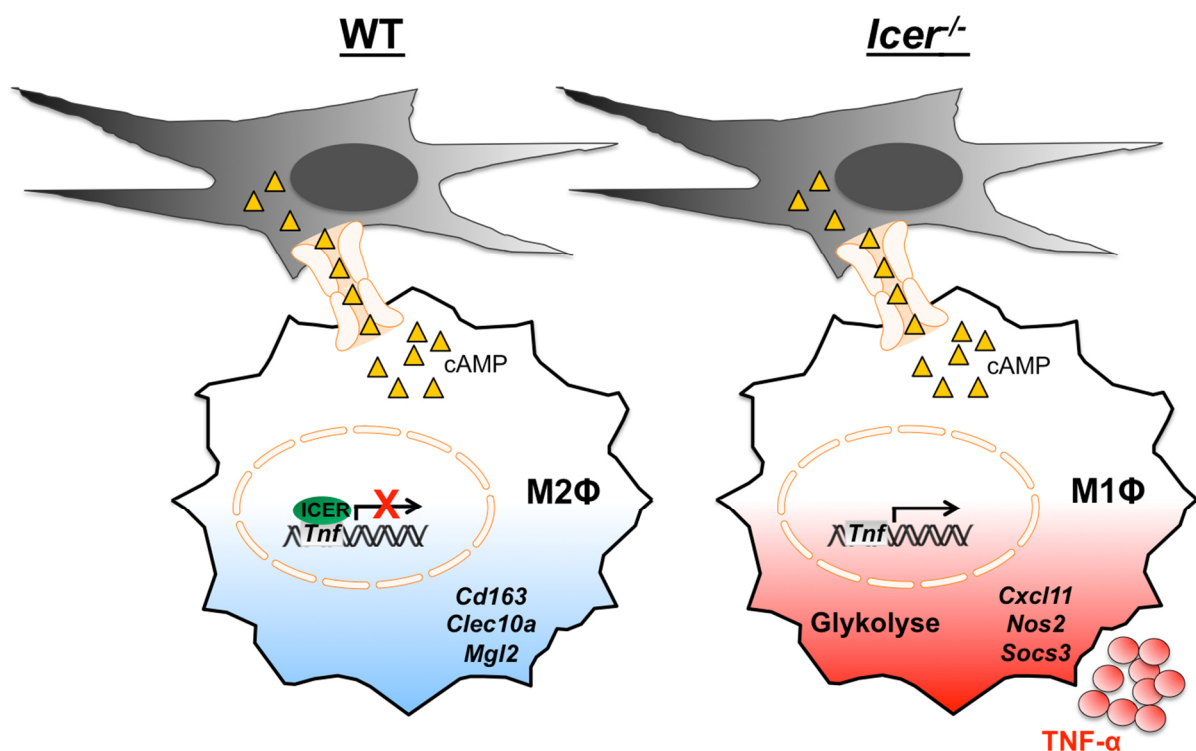


Abb. 25 *Icer*-kompetente Makrophagen entwickeln unter dem Einfluss von cAMP einen M2 Phänotyp und *Icer*-defiziente Makrophagen einen M1 Phänotyp.

Tumor-infiltrierende Makrophagen interagieren über Gap Junctions mit Tumorzellen. Hierdurch gelangt das cAMP aus den Tumorzellen in die Makrophagen. Dadurch wird der cAMP-Signalweg in den Makrophagen aktiviert, was unter anderem in der Expression des transkriptionellen Repressors ICER resultiert. ICER interagiert unter anderem mit dem *Tnf*-Promotor, wodurch dessen Aktivität inhibiert wird. In *Icer*-kompetenten Makrophagen werden vorwiegend M2 charakteristische Markergene exprimiert, während in *Icer*-defizienten Makrophagen M1 charakteristische Markergene transkribiert werden. Außerdem kommt es in *Icer*-defizienten Makrophagen zu einer starken Produktion des pro-inflammatorischen Cytokins TNF- α .

Eine weitere Möglichkeit der Induktion der *Icer*-Expression in Tumor-infiltrierenden Makrophagen stellt eine Signalkaskade über Laktat dar. Im Gegensatz zu nicht entarteten Zellen sind manche Tumortypen durch eine starke Laktatproduktion gekennzeichnet. Dabei werden unter aeroben Bedingungen große Mengen an Glucose zu Laktat umgesetzt. Diese Art des Metabolismus nennt man „Warburg Effekt“.¹⁶³ Hierbei sind vor allem Melanome durch eine starke Laktatproduktion gekennzeichnet, während Kolonkarzinome vergleichsweise nur sehr geringe Mengen an Laktat produzieren.^{164–166} Ein weiterer wichtiger Faktor, der den metabolischen Status von Tumorzellen bestimmt ist die Hypoxie, welche primär die Glykolyse fördert. Hierbei werden zahlreiche glykolytische Enzyme und Glucose-Transporter, wie VEGF, durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α) hochreguliert.^{167,168} Von Colegio et al wurde schließlich publiziert, dass die von Tumorzellen produzierte Milchsäure die *Vegf* und *Arg1* Expression in Tumor-infiltrierenden Makrophagen und damit deren M2 Polarisierung induziert.¹⁶⁹ Laktat kann über seinen Rezeptor

GPR81, der zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört, Adenylatzyklen und damit die cAMP-Produktion direkt induzieren.^{170,171} Der Transport von Laktat aus der Zelle heraus bzw. in die Zelle hinein wird durch die zwei Transporter MCT1 (monocarboxylate transporter 1) und MCT4 reguliert. Hypoxische bzw. glykolytische Krebszellen exprimieren große Mengen an MCT4, der als Haupttransporter zum Export von Laktat aus der Zelle fungiert. Hingegen exprimieren oxidative bzw. aerobische Zellen MCT1, was eine Laktataufnahme zur Folge hat.¹⁷² Es wäre also denkbar, dass das von Tumorzellen produzierte Laktat über die Monocarboxylat-Transporter aus der Zelle heraus transportiert wird. Dieses Laktat bindet schließlich an seinen spezifischen G-Protein-gekoppelten Rezeptor GPR81 auf Tumor-infiltrierenden Makrophagen, wodurch der, wie in Abb. 2 dargestellte, cAMP-Signalweg aktiviert wird. Hierdurch wiederum wird in den Tumor-infiltrierenden Makrophagen die cAMP-Produktion induziert. In Abb. 11 wurde gezeigt, dass Tumor-infiltrierende Makrophagen im Vergleich zu Makrophagen aus der Peripherie eine höhere intrazelluläre cAMP-Konzentration besitzen. Durch Induktion des cAMP-Signalwegs in Tumor-infiltrierenden Makrophagen würde es folglich zu einer verstärkten *Icer*-Expression kommen. Unter Verwendung zusätzlicher Methoden zur Analyse verschiedener phänotypischer und genetischer Aspekte (Seahorse-Assay, Transkriptomanalyse, Durchflusszytometrische Analysen) konnte bestätigt werden, dass *Icer*-kompetente Makrophagen unter dem Einfluss von cAMP einen M2 Phänotyp besitzen, während *Icer*-defiziente Makrophagen unter dem Einfluss von cAMP zu M1 Makrophagen differenzieren. Erste Ergebnisse aus weiterführenden Experimenten bestätigen, dass B16F10 Melanomzellen *in vitro* und *ex vivo* einen höheren Laktatgehalt aufweisen als MC38 Kolonkarzinomzellen. Weiterhin zeigen diese Ergebnisse, dass in Laktat-stimulierten Makrophagen die *Icer*-Expression verstärkt ist. Zur detaillierteren Aufklärung des Laktat-induzierten Mechanismus sind noch weitere Folgeexperimente durchzuführen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ICER nach cAMP-vermittelter Induktion Tumor-infiltrierende Makrophagen in Richtung eines M2 Phänotyps polarisiert. Dies geschieht unter anderem durch Interaktion mit dem *Tnf*-Promotor, wodurch die Produktion des pro-inflammatorischen Cytokins TNF- α inhibiert wird. Durch die Polarisierung der Tumor-infiltrierenden Makrophagen in Richtung eines M2 Phänotyps wird gleichzeitig die Differenzierung in den M1 Subtyp inhibiert, wodurch eine effektive anti-Tumor-Antwort unterbunden wird.

4.2 Therapeutische Relevanz

Das maligne Melanom zählt weltweit sowohl bei Frauen als auch bei Männern zu den häufigsten Krebsarten mit einer hohen Sterblichkeitsrate.¹⁷³ Durch die Entwicklung neuer immuntherapeutischer Maßnahmen konnte erstmals durch den Einsatz sogenannter Checkpoint-Inhibitoren (CTLA-4- und PD-1-Antikörper) das Langzeitüberleben und die Lebensqualität eines beträchtlichen Teils (ca. 40%) von Patienten mit einem Stadium IV Melanom signifikant verbessert werden.^{174,175} Diese Checkpoint-Inhibitoren können in vielen Fällen eine bereits vorhandene anti-Tumorreaktion, die durch CTLA-4- und PD-1-abhängige Suppression der benötigten Th-Zellen blockiert wird, freisetzen, so dass nachgeschaltete anti-Tumormechanismen die weitere Melanomprogression verhindern können.^{93,94} Trotz des großen Erfolgs dieser Therapieansätze spricht die Mehrzahl der Patienten auf diese Therapie nicht an, weshalb es von entscheidender Bedeutung ist, die Mechanismen, durch die Melanome einer Immunantwort ausweichen können, zu verstehen, um alternative Therapieansätze zu entwickeln.¹⁷⁶

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass der transkriptionelle Repressor ICER, dessen Expression durch cAMP induziert wird, in der Entstehung von Melanomen involviert ist. Hierbei konnte nicht nur in einem präklinischen Maustumormodell die Funktion von ICER in der Polarisierung Tumor-infiltrierender Makrophagen und damit seine Beteiligung an einer unzureichenden anti-Melanom-Immunantwort aufgedeckt werden. Es wurde auch mittels frei zugänglicher humaner Datenbanken gezeigt, dass ICER in Melanombiopsien im Vergleich zu Kolonkarzinombiopsien sehr stark exprimiert wird (Abb. 7). Dies konnte für alle Isoformen dieses transkriptionellen Repressors gezeigt werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die *ICER*-Expression vom Stadium des Melanoms abhängig ist (Abb. 8). Die *ICER*-Expression verstärkt sich mit fortgeschrittenem Melanom, während sie bei Kolonkarzinomen über die unterschiedlichen Tumorstadien hinweg auf einem gleichbleibenden Level bleibt und stets geringer ist als die *ICER*-Expression in Melanomen. Außerdem konnte murin gezeigt werden, dass bereits bestehende Melanome auf eine Behandlung durch wiederholte peritumorale Injektionen des Adenylatzyklase-Inhibitors MDL-12 anschlagen. Das B16F10 Melanomwachstum war in den MDL-12-behandelten Mäusen im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen verringert (Abb. 24). Diese Behandlung zeigte aber nur in B16F10 Melanomen Erfolg, jedoch nicht in MC38 Kolonkarzinomen. Es werden bereits zahlreiche Inhibitoren, wie z.B. BRAF-Inhibitoren, aber auch zahlreiche Kinase-Inhibitoren in der Behandlung von malignen Melanomen erfolgreich in der Klinik als Therapie eingesetzt.^{177,178}

Die hier aufgezeigten Daten verdeutlichen die Beteiligung des cAMP-Signalwegs, insbesondere des transkriptionellen Repressors ICER, an der Entstehung und Progression maligner Melanome. Somit könnte der cAMP-Signalweg auch human, zum Beispiel durch Adenylatzyklase-Inhibitoren wie MDL-12, als Angriffspunkt neuartiger therapeutischer Ansätze dienen

5. Zusammenfassung

In den letzten drei Jahrzehnten ist die Zahl der Neuerkrankungen an malignen Melanomen dramatisch angestiegen, wohingegen es hinsichtlich der Sterberate aufgrund ausbleibender therapeutischer Erfolge zu keiner Verbesserung kam.¹⁷³ Zur Entwicklung neuer innovativer therapeutischer Strategien ist das Verständnis der Moleküle und Signalwege, die an der Bildung eines malignen Melanoms und einer effizienten anti-Melanom-Immunantwort beteiligt sind, essentiell. Der intrazelluläre cAMP-Gehalt von Tumorzellen korreliert mit deren metastasierenden Potential, wobei der genaue Mechanismus und dessen Verbindung zum Immunsystem bisher noch nicht aufgeklärt werden konnte.⁸⁵

In der vorliegenden Dissertation zeigte eine Datenbankanalyse, dass in humanen Melanombiopsien insbesondere der transkriptionelle Repressor ICER, dessen Expression durch cAMP induziert wird, stark exprimiert wird. Um einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten ICER-Expression und dem beobachteten Tumorwachstum *in vivo* aufzudecken, wurde die Entwicklung unterschiedlicher Tumorzelllinien in *Icer*-defizienten Mäusen analysiert. Hierbei wurde gefunden, dass sowohl *Icer*-defiziente Mäuse als auch Mäuse mit einer konditionellen Defizienz für *Icer* in Makrophagen, Tumorzellen mit einem hohen cAMP-Gehalt abstoßen. Mithilfe von Metabolismus-, Transkriptom- und durchflusszytometrischen Analysen konnte gezeigt werden, dass Tumor-infiltrierende Makrophagen aus *Icer*-defizienten Mäusen einen Phänotyp des Subtyps 1 (M1) besitzen. Pro-inflammatorische M1 Makrophagen fördern effiziente anti-Tumor-Immunantworten, während anti-inflammatorische M2 Makrophagen diese eher inhibieren und folglich das Tumorwachstum indirekt fördern.¹⁷⁹ Der M1 Phänotyp *Icer*-defizienter Mäuse ist vor allem im Vergleich zu wildtypischen Makrophagen durch eine starke Produktion des pro-inflammatorischen Cytokins TNF- α gekennzeichnet. Weiterhin wurde gezeigt, dass ICER durch Interaktion mit dem *Tnf*-Promotor dessen Aktivität inhibiert, so dass *Icer*-kompetente Makrophagen unter dem Einfluss von cAMP nur sehr wenig TNF- α produzieren. Schließlich wurde gezeigt, dass *Icer*-/*Tnf*-doppel-defiziente Mäuse nicht mehr in der Lage sind Tumorzellen abzustoßen.

Um die Möglichkeit zu testen, inwieweit eine Blockade der cAMP-Bildung in der Behandlung eines malignen Melanoms eingesetzt werden könnte, wurde der therapeutische Einsatz des Adenylatzyklase-Inhibitors MDL-12 getestet. Durch peritumorale MDL-12-Injektionen und der damit verbundenen Inhibition der cAMP-Synthese konnte das Wachstum von B16F10 Melanomzellen in C57BL/6J Mäusen inhibiert werden. In der vorliegenden Dissertation wurde ein cAMP-abhängiger Mechanismus von Melanomzellen aufgedeckt, durch den dieser Tumortyp mittels Inhibition einer effizienten Makrophagen-abhängigen Immunantwort dem Immunsystem entkommen kann.

6. Abstract

During the last three decades the incidence of malignant melanoma has rapidly increased whereas the mortality rate has not changed because of less success in therapeutic treatment. To develop new innovative therapeutic strategies a detailed understanding of molecules and signaling pathways involved in malignant melanoma formation and efficient anti-melanoma immune responses is essential. The intracellular cAMP concentration of tumor cells is correlated to their metastatic potential whereas the mechanism and the connection to the immune system is still unclear.⁸⁵

The expression of the transcriptional repressor ICER is induced by cyclic AMP (cAMP). In this dissertation it could be shown that the expression of ICER is upregulated in human melanoma. To link ICER and tumor growth *in vivo* the development of different tumor cell lines was analyzed in *Icer* deficient mice. Herein it could be shown that *Icer*-deficient mice as well as mice with a conditional deletion for ICER in macrophages reject tumor cells with high cAMP concentrations as a common feature. Using metabolism, transcriptome and flow cytometry analyses it could be shown that tumor-infiltrating macrophages of *Icer* deficient mice have a macrophage phenotype of the M1 subtype. Proinflammatory M1 macrophages promote efficient anti-tumor immune responses whereas M2 macrophages inhibit those anti-tumor immune responses but promote tumor development.¹⁷⁹ *Icer* deficient macrophages are producing high amounts of the proinflammatory cytokine TNF- α in comparison to macrophages of WT mice. In addition it could be shown that ICER interacts with the *Tnf* promoter. Due to this interaction the *Tnf* promoter activity is downregulated and *Icer* competent macrophages do not produce high amounts of TNF- α . Furthermore, it could be shown that double deficient mice for *Icer* and *Tnf* are not able to control tumor cell growth anymore.

To test the possibility of cAMP signaling pathway modulation in melanoma treatment the therapeutic application of the adenylate cyclase inhibitor MDL-12 was tested. Inhibition of *de novo* cAMP synthesis by peritumoral injection of MDL-12 lead to a rejection of B16F10 melanoma cells in WT mice.

Taken together, a yet unknown cAMP-dependent escape mechanism of melanoma cells leading to inhibition of efficient macrophage-dependent anti-melanoma immune responses is demonstrated.

7. Literaturverzeichnis

1. Nathan, C. Metchnikoff's Legacy in 2008. **9**, 695–698 (2008).
2. Cooper, E. L. eCAM: Darwin and Metchnikoff. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **6**, 421–422 (2009).
3. Heifets, L. Centennial of Metchnikoff's discovery. *J. Reticuloendothel. Soc.* **31**, 381–391 (1982).
4. Auffray, C. *et al.* Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior. *Science*. **317**, 666–670 (2007).
5. Tsou, C.-L. *et al.* Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J. Clin. Invest.* **117**, 902–909 (2007).
6. Van Furth, R. & Cohn, Z. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* **53**, 415–435 (1968).
7. Van Furth, R. *et al.* The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull. World Health Organ.* **46**, 845–852 (1972).
8. Whetton, A. D. & Dexter, T. M. Myeloid haemopoietic growth factors. *Biochim. Biophys. Acta* **989**, 111–132 (1989).
9. Shibata, Y. *et al.* GM-CSF Regulates Alveolar Macrophage Differentiation and Innate Immunity in the Lung through PU.1. *Immunity* **15**, 557–567 (2001).
10. Tagliani, E. *et al.* Coordinate regulation of tissue macrophage and dendritic cell population dynamics by CSF-1. *J. Exp. Med.* **208**, 1901–1916 (2011).
11. Jenkins, S. J. *et al.* IL-4 directly signals tissue-resident macrophages to proliferate beyond homeostatic levels controlled by CSF-1. *J. Exp. Med.* **210**, 2477–91 (2013).
12. Evans, H. G. *et al.* In vivo activated monocytes from the site of inflammation in humans specifically promote Th17 responses. *PNAS* **106**, 6232–6237 (2009).
13. Jakubzick, C. *et al.* Minimal Differentiation of Classical Monocytes as They Survey Steady-State Tissues and Transport Antigen to Lymph Nodes. *Immunity* **39**, 599–610 (2013).
14. Shevach, E. & Rosenthal, A. Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **138**, 1213–1229 (1973).
15. Wynn, T. A. & Barron, L. Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. *Semin. Liver Dis.* **30**, 245–257 (2010).
16. Arnold, L. *et al.* Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* **204**, 1057–1069 (2007).
17. Loke, P. *et al.* IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype. *BMC Immunol.* **3**, 1–11 (2002).

18. Galli, S. J., Borregaard, N. & Wynn, T. A. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat. Immunol.* **12**, 1035–1044 (2011).
19. Peiser, L., Mukhopadhyay, S. & Gordon, S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 123–128 (2002).
20. Shimokado, K. *et al.* A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. *Cell* **43**, 277–286 (1985).
21. Rappolee, D. A., Mark, D., Banda, M. J. & Werb, Z. Wound Macrophages Express TGF- α and Other Growth Factors in Vivo: Analysis by mRNA Phenotyping. *Science.* **241**, 708–712 (1988).
22. Bosisio, D. *et al.* Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon- γ : a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide. *Blood* **99**, 3427–3431 (2002).
23. Hibbs, J. B., Vavrin, Z. & Taintor, R. R. L -arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J. Immunol.* (1987).
24. Hibbs, J. B., Taintor, R. R., Vavrin, Z. & Rachlin, E. M. Nitric Oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 87–94 (1988).
25. Verreck, F. A. W. *et al.* Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *PNAS* **101**, 4560–4565 (2004).
26. Nathan, C. F. Secretory Products of Macrophages. *J. Clin. Invest.* **79**, 319–326 (1987).
27. Fantuzzi, L. *et al.* Loss of CCR2 Expression and Functional Response to Monocyte Chemotactic Protein (MCP-1) During the Differentiation of Human Monocytes: Role of Secreted MCP-1 in the Regulation of the Chemotactic Response. *Blood* **94**, 875–883 (1999).
28. El-Behi, M. *et al.* The encephalitogenicity of Th17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat. Immunol.* **12**, 568–575 (2011).
29. Bonecchi, R. *et al.* Divergent Effects of Interleukin-4 and Interferon- γ on Macrophage-Derived Chemokine Production: An Amplification Circuit of Polarized T Helper 2 Responses. *Blood* **92**, 2668–2671 (1998).
30. Ito, S. *et al.* Interleukin-10 Inhibits Expression of Both Interferon α - and Interferon γ - Induced Genes by Suppressing Tyrosine Phosphorylation of STAT1. *Blood* **93**, 1456–1463 (1999).
31. Herbert, D. R. *et al.* Alternative Macrophage Activation Is Essential for Survival during Schistosomiasis and Downmodulates T Helper 1 Responses and Immunopathology. *Immunity* **20**, 623–635 (2004).
32. Katakura, T., Miyazaki, M., Kobayashi, M., Herndon, D. N. & Suzuki, F. CCL17 and IL-10 as Effectors That Enable Alternatively Activated Macrophages to Inhibit the Generation of Classically Activated Macrophages. *J. Immunol.* **172**, 1407–1413 (2004).

33. Pesce, J. T. *et al.* Arginase-1-Expressing Macrophages Suppress Th2 Cytokine-Driven Inflammation and Fibrosis. *PLoS Pathog.* **5**, 1–15 (2009).
34. Van den Bossche, J. *et al.* Arginase-1-independent polyamine production stimulates the expression of IL-4-induced alternatively activated macrophage markers while inhibiting LPS-induced expression of inflammatory genes. *J. Leukoc. Biol.* **91**, 685–699 (2012).
35. Stein, M., Keshav, S., Harris, N. & Gordon, S. Interleukin 4 Potently Enhances Murine Macrophage Mannose Receptor Activity: A Marker of Alternative Immunologic Macrophage Activation. *J. Exp. Med.* **176**, 287–292 (1992).
36. Mills, C. D., Shearer, J., Evans, R. & Caldwell, M. D. Macrophage arginine metabolism and the inhibition or stimulation of cancer. *J. Immunol.* **149**, 2709–2714 (1992).
37. Albina, J. E., Caldwell, M. D., Henry, W. L. & Mills, C. D. Regulation of Macrophage Functions. *J. Exp. Med.* **169**, 1021–1029 (1989).
38. Imtiyaz, H. Z. *et al.* Hypoxia-inducible factor 2 α regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation. *J. Clin. Invest.* **120**, 2699–2714 (2010).
39. Han, G. *et al.* Tumor-Associated Macrophages and Survival in Classic Hodgkin's Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **362**, 875–885 (2010).
40. Ahn, G.-O. *et al.* Inhibition of Mac-1 (CD11b/CD18) enhances tumor response to radiation by reducing myeloid cell recruitment. *PNAS* **107**, 8363–8368 (2010).
41. Gocheva, V. *et al.* IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev.* **24**, 241–255 (2010).
42. Sinha, P., Clements, V. K. & Ostrand-Rosenberg, S. Interleukin-13-regulated M2 Macrophages in Combination with Myeloid Suppressor Cells Block Immune Surveillance against Metastasis. *Cancer Res.* **65**, 11743–11751 (2005).
43. Terabe, M. *et al.* NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat. Immunol.* **1**, 515–520 (2000).
44. DeNardo, D. G. *et al.* CD4⁺ T Cells Regulate Pulmonary Metastasis of Mammary Carcinomas by Enhancing Protumor Properties of Macrophages. *Cancer Cell* **16**, 91–102 (2009).
45. Duluc, D. *et al.* Interferon- γ reverses the immunosuppressive and protumoral properties and prevents the generation of human tumor-associated macrophages. *Int. J. Cancer* **125**, 367–373 (2009).
46. Fong, C. H. Y. *et al.* An antiinflammatory role for IKK β through the inhibition of 'classical' macrophage activation. *J. Exp. Med.* **205**, 1269–1276 (2008).
47. Sierra, J. R. *et al.* Tumor angiogenesis and progression are enhanced by Sema4D produced by tumor-associated macrophages. *J. Exp. Med.* **205**, 1673–1685 (2008).
48. Yang, X. D. *et al.* Histamine deficiency promotes inflammation-associated carcinogenesis through reduced myeloid maturation and accumulation of CD11b⁺Ly6G⁺ immature myeloid cells. *Nat. Med.* **17**, 87–95 (2010).

49. Rall, T. W. & Sutherland, E. W. Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J. Biol. Chem.* **232**, 1065–1076 (1958).
50. Erdogan, S. & Houslay, D. Challenge of human Jurkat T-cells with the adenylate cyclase activator forskolin elicits major changes in cAMP phosphodiesterase (PDE) expression by up-regulating PDE3 and inducing PDE4D1 and PDE4D2 splice variants as well as down-regulating a novel PDE4A. *Biochem. J.* **321**, 165–175 (1997).
51. Sette, C., Iona, S. & Conti, M. The Short-term Activation of a Rolipram-sensitive, cAMP-specific Phosphodiesterase by Thyroid-stimulating Hormone in Thyroid FRTL-5 Cells Is Mediated by a cAMP-dependent Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **269**, 9245–9252 (1994).
52. Ekholm, D., Beifrage, P., Manganiello, V. & Degerman, E. Protein kinase A-dependent activation of PDE4 (cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase) in cultured bovine vascular smooth muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1356**, 64–70 (1997).
53. Madeliun, V. & Vigne, E. La. Rapid Regulation of a Cyclic AMP-Specific Phosphodiesterase (PDE IV) by Forskolin and Isoproterenol in LRM55 Astroglial Cells. *Biochem. Pharmacol.* **51**, 1739–1747 (1996).
54. Gonzalez, G. A. & Montminy, M. R. Cyclic AMP Stimulates Somatostatin Gene Transcription by Phosphorylation of CREB at Serine 133. *Cell* **59**, 675–680 (1989).
55. Masquillier, D. & Sassone-Corsi, P. Transcriptional Cross-talk: Nuclear Factors CREM and CREB Bind to AP-1 Sites and Inhibit Activation by Jun. *J. Biol. Chem.* **267**, 22460–22466 (1992).
56. Montminy, M. R., Sevarino, K. A., Wagner, J. A., Mandel, G. & Goodman, R. H. Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *PNAS* **83**, 6682–6686 (1986).
57. Chrivia, J. C. *et al.* Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* **365**, 855–859 (1993).
58. Walker, W. H. & Habener, J. F. Role of Transcription Factors CREB and CREM in cAMP-Regulated Transcription During Spermatogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* **7**, 133–138 (1996).
59. Molina, C. a, Foulkes, N. S., Lalli, E. & Sassone-Corsi, P. Inducibility and Negative Autoregulation of CREM: An Alternative Promoter Directs the Expression of ICER, An Early Response Repressor. *Cell* **75**, 875–886 (1993).
60. Foulkes, N. S., Borrelli, E. & Sassone-Corsi, P. CREM gene: Use of Alternative DNA-Binding Domains Generates Multiple Antagonists of cAMP-induced Transcription. *Cell* **64**, 739–749 (1991).
61. Kizaki, H., Suzuki, K., Tadakuma, T. & Ishimura, Y. Adenosine Receptor-mediated Accumulation of Cyclic AMP-induced T-lymphocyte Death through Internucleosomal DNA Cleavage. *J. Biol. Chem.* **265**, 5280–5284 (1990).
62. Dumont, J. E., Jauniaux, J.-C. & Roger, P. P. The cyclic AMP-mediated stimulation of cell proliferation. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 67–71 (1989).

63. Ruchaud, S., Seit , P., Foulkes, N. S., Sassone-Corsi, P. & Lanotte, M. The transcriptional repressor ICER and cAMP-induced programmed cell death. *Oncogene* **15**, 827–836 (1997).
64. Taetle, R. & Koessler, A. Effects of Cyclic Nucleotides and Prostaglandins on Normal and Abnormal Human Myeloid Progenitor Proliferation. *Cancer Res.* **40**, 1223–1229 (1980).
65. Rossi, G. *et al.* In Vitro Interactions of PGE and cAMP With Murine and Human Erythroid Precursors. *Blood* **56**, 74–79 (1980).
66. Bopp, T. *et al.* Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J. Exp. Med.* **204**, 1303–1310 (2007).
67. Bodor, J., Fehervari, Z., Diamond, B. & Sakaguchi, S. ICER/CREM-mediated transcriptional attenuation of IL-2 and its role in suppression by regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* **37**, 884–895 (2007).
68. Bodor, J. *et al.* Suppression of T-cell responsiveness by inducible cAMP early repressor (ICER). *J. Leukoc. Biol.* **69**, 1053–1059 (2001).
69. Barton, K. *et al.* Defective thymocyte proliferation and IL-2 production in transgenic mice expressing a dominant-negative form of CREB. *Nature* **379**, 81–85 (1996).
70. Thornton, A. M., Donovan, E. E., Piccirillo, C. A. & Shevach, E. M. Cutting Edge: IL-2 Is Critically Required for the In Vitro Activation of CD4+CD25+ T Cell Suppressor Function. *J. Immunol.* **172**, 6519–6523 (2004).
71. Xie, S. *et al.* Dominant-negative CREB inhibits tumor growth and metastasis of human melanoma cells. *Oncogene* **15**, 2069–2075 (1997).
72. Dobroff, A. S. *et al.* Silencing cAMP-response Element-binding Protein (CREB) Identifies CYR61 as a Tumor Suppressor Gene in Melanoma. *J. Biol. Chem.* **284**, 26194–26205 (2009).
73. Melnikova, V. O. *et al.* CREB Inhibits AP-2 alpha Expression to Regulate the Malignant Phenotype of Melanoma. *PLoS One* **5**, e12452 (2010).
74. Birch, R. E. & Polmar, S. H. Pharmacological modification of immunoregulatory T lymphocytes . I. Effect of adenosine, H1 and H2 histamine agonists upon T lymphocyte regulation of B lymphocyte differentiation in vitro. *Clin. Exp. Immunol.* **48**, 218–230 (1982).
75. Knudsen, P. J., Dinarello, C. A. & Strom, T. B. Prostaglandins posttranscriptionally inhibit monocyte expression of interleukin 1 activity by increasing intracellular cyclic adenosine monophosphate. *J. Immunol.* **137**, 3189–3194 (1986).
76. Kunkel, S. L. *et al.* Prostaglandin E2 Regulates Macrophage-derived Tumor Necrosis Factor Gene Expression. *J. Biol. Chem.* **263**, 5380–5384 (1988).
77. Ghersa, P. *et al.* Inhibition of E-selectin Gene Transcription through a cAMP-dependent Protein Kinase Pathway. *J. Biol. Chem.* **269**, 29129–29137 (1994).
78. Tontsch, U. & Rott, O. Intercellular regulation of major histocompatibility complex class I expression in neural cells. *Immunology* **80**, 507–509 (1993).

79. Abdel-Malek, Z. *et al.* Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. *PNAS* **92**, 1789–1793 (1995).
80. Slominski, A., Tobin, D. J., Shibahara, S. & Wortsman, J. Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation. *Physiol. Rev.* **84**, 1155–1228 (2004).
81. Kadakara, A. L. *et al.* Melanocortin 1 receptor genotype: an important determinant of the damage response of melanocytes to ultraviolet radiation. *FASEB J.* **24**, 3850–3860 (2010).
82. Box, N. F. *et al.* Melanocortin-1 Receptor Genotype is a Risk Factor for Basal and Squamous Cell Carcinoma. *J. Invest. Dermatol.* **116**, 224–229 (2001).
83. Kennedy, C. *et al.* Melanocortin 1 receptor (MC1R) Gene Variants are Associated with an Increased Risk for Cutaneous Melanoma Which is Largely Independent of Skin Type and Hair Color. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 294–300 (2001).
84. Palmer, J. S. *et al.* Melanocortin-1 Receptor Polymorphisms and Risk of Melanoma: Is the Association Explained Solely by Pigmentation Phenotype? *Am. J. Hum. Genet.* **66**, 176–186 (2000).
85. Narita, M. *et al.* A role for cyclic nucleotide phosphodiesterase 4 in regulation of the growth of human malignant melanoma cells. *Oncol. Rep.* **17**, 1133–1139 (2007).
86. Hodis, E. *et al.* A Landscape of Driver Mutations in Melanoma. *Cell* **150**, 251–263 (2012).
87. Krauthammer, M. *et al.* Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat. Genet.* **44**, 1006–1014 (2012).
88. Dumaz, N. *et al.* In Melanoma, RAS Mutations Are Accompanied by Switching Signaling from BRAF to CRAF and Disrupted Cyclic AMP Signaling. *Cancer Res.* **66**, 9483–9491 (2006).
89. Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.: 'Krebs in Deutschland 2011/2012', 10. Ausgabe 2015; Aufrufbar unter http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2015/krebs_. (2015).
90. National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology and End Results. <http://www.seer.cancer.gov/statfacts/> (accessed June 30, 2013). at <<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/cervix>>
91. Boniol, M., Autier, P., Boyle, P. & Gandini, S. Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis. *BMJ* **345**, e4757 (2012).
92. Erdmann, F. *et al.* International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008-are recent generations at higher or lower risk? *Int. J. Cancer* **132**, 385–400 (2013).
93. Barber, D. L. *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**, 682–687 (2006).
94. Iwai, Y. *et al.* Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *PNAS* **99**, 12293–12297 (2002).

95. Sznol, M. & Chen, L. Antagonist Antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the Treatment of Advanced Human Cancer. *Clin. cancer Res.* **19**, 1021–1034 (2014).
96. Hodi, F. S. *et al.* Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **363**, 711–723 (2010).
97. Wang, C. *et al.* In Vitro Characterization of the Anti-PD-1 Antibody Nivolumab, BMS-936558, and In Vivo Toxicology in Non-Human Primates. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 846–856 (2014).
98. Horne-Debets, J. M. *et al.* PD-1 Dependent Exhaustion of CD8+ T cells Drives Chronic Malaria. *Cell Rep.* **5**, 1204–1213 (2013).
99. Dong, H. *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* **8**, 793–800 (2002).
100. Corse, E. & Allison, J. P. Cutting Edge: CTLA-4 on Effector T cells Inhibits In Trans. *J. Immunol.* **189**, 1123–1127 (2012).
101. Peggs, K. S., Quezada, S. A., Chambers, C. A., Korman, A. J. & Allison, J. P. Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J. Exp. Med.* **206**, 1717–1725 (2009).
102. Weber, J. S. *et al.* Phase I/II Study of Ipilimumab for Patients With Metastatic Melanoma. *J. Clin. Oncol.* **26**, 5950–5956 (2008).
103. Brahmer, J. R. *et al.* Phase I Study of Single-Agent Anti-Programmed Death-1 (MDX-1106) in Refractory Solid Tumors: Safety, Clinical Activity, Pharmacodynamics, and Immunologic Correlates. *J. Clin. Oncol.* **28**, 3167–3175 (2010).
104. Fidler, I. J. & Nicolson, G. L. Organ selectivity for implantation survival and growth of B16 melanoma variant tumor lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **57**, 1199–1202 (1976).
105. Fidler, I. J., Gersten, D. M. & Budmen, M. B. Characterization in Vivo and in Vitro of Tumor Cells Selected for Resistance to Syngeneic Lymphocyte-mediated Cytotoxicity. *Cancer Res.* **36**, 3160–3165 (1976).
106. Stackpole, C. Distinct lung - colonizing and lung - metastasizing cell populations in B16 mouse melanoma. *Nature* **289**, 798–800 (1981).
107. Overwijk, B. W. W. *et al.* Gp100/pmel 17 Is a Murine Tumor Rejection Antigen: Induction of 'Self'-reactive, Tumoricidal T Cells Using High-affinity, Altered Peptide Ligand. *J. Exp. Med.* **188**, 277–286 (1998).
108. Bloom, B. M. B. *et al.* Identification of Tyrosinase-related Protein 2 as a Tumor Rejection Antigen for the B16 Melanoma. *J. Exp. Med.* **185**, 453–459 (1997).
109. Colella, B. T. A. *et al.* Self-Tolerance to the Murine Homologue of a Tyrosinase-derived Melanoma Antigen: Implications for Tumor Immunotherapy. *J. Exp. Med.* **191**, 1221–1231 (2000).
110. Jj, N. *et al.* Vitiligo in patients with metastatic melanoma: a good prognostic sign. *J. Am. Acad. Dermatol.* **9**, 689–696 (1983).

111. Kawakami, Y. *et al.* Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression. *J. Immunol.* **154**, 3961–3968 (1995).
112. Kojima, N. *et al.* Inducible cAMP Early Repressor Acts as a Negative Regulator for Kindling Epileptogenesis and Long-Term Fear Memory. *J. Neurosci.* **28**, 6459–6472 (2008).
113. Clausen B.E, C.Burkhardt, Reith, W., Renkawitz, R. & Förster I. Conditional gene targeting in macrophage and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res.* **8**, 265–277 (1999).
114. Sawada, S., Scarborough, J. D., Killeen, N. & Littman, D. R. A Lineage-Specific Transcriptional Silencer Regulates CD4 Gene Expression during T Lymphocyte Development. *Cell* **77**, 917–929 (1994).
115. Pasparakis, B. M., Alexopoulou, L., Episkopou, V. & Kollias, G. Immune and Inflammatory Responses in TNF-alpha-deficient Mice: A Critical Requirement for TNF-alpha in the Formation of Primary B Cell Follicles, Follicular Dendritic Cell Networks and Germinal Centers, and in the Maturation of the Humoral Immune Response. *J. Exp. Med.* **184**, 1397–1411 (1996).
116. Zeh, Herbert J, I. *et al.* High Avidity CTLs for Two Self-Antigens Demonstrate Superior In Vitro and In Vivo Antitumor Efficacy. *J. Immunol.* **162**, 989–994 (1999).
117. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. *R Fond. Stat. Comput.* **1**, (2015).
118. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 1–21 (2014).
119. Raskovalova, T. *et al.* Inhibition of Cytokine Production and Cytotoxic Activity of Human Antimelanoma Specific CD8+ and CD4+ T Lymphocytes by Adenosine-Protein Kinase A Type I Signaling. *Cancer Res.* **67**, 5949–5957 (2007).
120. Sheppard, J. R. *et al.* Biochemical regulation of adenylate cyclase in murine melanoma clones with different metastatic properties. *Int. J. Cancer* **37**, 713–722 (1986).
121. Bodor, J., Spetz, L., Strominger, J. L. & Habener, J. F. cAMP inducibility of transcriptional repressor ICER in developing and mature human T lymphocytes. *PNAS* **93**, 3536–3541 (1996).
122. Thornton, B. A. M. & Shevach, E. M. CD4+ CD25+ Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation In Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production. *J. Exp. Med.* **188**, 287–296 (1998).
123. Fonseca, P. C., Nihei, O. K., Savino, W., Spray, D. C. & Alves, L. A. Flow Cytometry Analysis of Gap Junction-Mediated Cell-Cell Communication: Advantages and Pitfalls. *Cytom. Part A* **69**, 487–493 (2006).
124. Hard, G. C. Some biochemical aspects of the immune macrophage. *Br. J. Exp. Pathol.* **51**, 97–105 (1970).
125. Newsholme, P., Curi, R., Gordon, S. & Newsholme, E. A. Metabolism of glucose, glutamine, long-chain fatty acids and ketone bodies by murine macrophages. *Biochem. J.* **239**, 121–125 (1986).

126. Abramson, S. & Gallin, J. IL-4 inhibits superoxide production by human mononuclear phagocytes. *J. Immunol.* **144**, 625–630 (1990).
127. Ehrt, S. *et al.* Reprogramming of the Macrophage Transcriptome in Response to Interferon-gamma and Mycobacterium tuberculosis: Signaling Roles of Nitric Oxide Synthase-2 and Phagocyte Oxidase. *J. Exp. Med.* **194**, 1123–1140 (2001).
128. Kambayashi, T., Jacob, C. O. & Strassmann, G. IL-4 and IL-13 Modulate IL-10 Release in Endotoxin-Stimulated Murine Peritoneal Mononuclear Phagocytes. *Cell Immunol* **171**, 153–158 (1996).
129. Ojalvo, L. S., King, W., Cox, D. & Pollard, J. W. High-Density Gene Expression Analysis of Tumor-Associated Macrophages from Mouse Mammary Tumors. *Am. J. Pathol.* **174**, 1048–1064 (2009).
130. Bourne, H. R. *et al.* Modulation of Inflammation and Immunity by Cyclic AMP. *Science.* **184**, 19–28 (1974).
131. Aronoff, D. M., Canetti, C., Serezani, C. H., Luo, M. & Peters-Golden, M. Cutting Edge: Macrophage Inhibition by Cyclic AMP (cAMP): Differential Roles of Protein Kinase A and Exchange Protein Directly Activated by cAMP-1. *J. Immunol.* **174**, 595–599 (2005).
132. Aronoff, D. M., Canetti, C. & Peters-Golden, M. Prostaglandin E2 Inhibits Alveolar Macrophage Phagocytosis through an E-Prostanoid 2 Receptor-Mediated Increase in Intracellular Cyclic AMP. *J. Immunol.* **173**, 559–565 (2004).
133. Dent, G. *et al.* Theophylline suppresses human alveolar macrophage respiratory burst through phosphodiesterase inhibition. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **10**, 565–572 (1994).
134. Rowe, J. *et al.* Inability of Histamine to Regulate TNF-alpha Production by Human Alveolar Macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **17**, 218–226 (1997).
135. Ollivier, V., Parry, G. C. N., Cobb, R. R., de Prost, D. & Mackman, N. Elevated Cyclic AMP Inhibits NF-kappaB-mediated Transcription in Human Monocytic Cells and Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 20828–20835 (1996).
136. Pozo, D., Guerrero, J. M. & Calvo, J. R. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit LPS-stimulated MIP-1-alpha production and mRNA expression. *Cytokine* **18**, 35–42 (2002).
137. Platzer, C., Meisel, C., Vogt, K., Platzer, M. & Volk, H. Upregulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor-alpha and cAMP elevating drugs. *Int. Immunol.* **7**, 517–523 (1995).
138. Hareng, L., Meergans, T., von Aulock, S., Volk, H. D. & Hartung, T. Cyclic AMP increases endogenous granulocyte colony-stimulating factor formation in monocytes and THP-1 macrophages despite attenuated TNF-alpha formation. *Eur. J. Immunol.* **33**, 2287–2296 (2003).
139. Bodor, J., Bodorova, J. & Gress, R. E. Suppression of T cell function: a potential role for transcriptional repressor ICER. *J. Leukoc. Biol.* **67**, 774–779 (2000).

140. Bodor, J. & Habener, J. F. Role of Transcriptional Repressor ICER in Cyclic AMP-mediated Attenuation of Cytokine Gene Expression in Human Thymocytes. *J. Biol. Chem.* **273**, 9544–9551 (1998).
141. Hussain, M. A., Daniel, P. B. & Habener, J. F. Glucagon Stimulates Expression of the Inducible cAMP Early Repressor and Suppresses Insulin Gene Expression in Pancreatic beta-cells. *Diabetes* **49**, 1681–1690 (2000).
142. Harzenetter, M. D. *et al.* Negative Regulation of TLR Responses by the Neuropeptide CGRP Is Mediated by the Transcriptional Repressor ICER. *J. Immunol.* **179**, 607–615 (2007).
143. Saavedra, A. P., Cass, L. A., Prendergast, G. V & Meinkoth, J. L. Differential Effects of Acute and Chronic Exposure to Interferon-gamma on Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Response Element-Regulated Gene Expression. *Endocrinology* **141**, 606–614 (2000).
144. Desanctis, J., Varesio, L. & Radzioch, D. Prostaglandins inhibit lipoprotein lipase gene expression in macrophages. *Immunology* **81**, 605–610 (1994).
145. Mead, J. R., Hughes, T. R., Irvine, S. A., Singh, N. N. & Ramji, D. P. Interferon-gamma Stimulates the Expression of the Inducible cAMP Early Repressor in Macrophages through the Activation of Casein Kinase 2. *Biochemistry* **278**, 17741–17751 (2003).
146. Kratochvill, F. *et al.* TNF Counterbalances the Emergence of M2 Tumor Macrophages. *Cell Rep.* **12**, 1902–1914 (2015).
147. Wall, E. a *et al.* Suppression of LPS-Induced TNF-alpha Production in Macrophages by cAMP Is Mediated by PKA-AKAP95-p105. *Sci. Signal.* **2**, ra28 (2009).
148. Quiding-Järbrink, M., Raghavan, S. & Sundquist, M. Enhanced M1 Macrophage Polarization in Human Helicobacter pylori-Associated Atrophic Gastritis and in Vaccinated Mice. *PLoS One* **5**, e15018 (2010).
149. Qin, H. *et al.* SOCS3 Deficiency Promotes M1 Macrophage Polarization and Inflammation. *J. Immunol.* **189**, 3439–3448 (2012).
150. Sulahian, T. H. *et al.* Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. *Cytokine* **12**, 1312–1321 (2000).
151. Levings, M. K. & Schrader, J. W. IL-4 Inhibits the Production of TNF- α and IL-12 by STAT6-Dependent and -Independent Mechanisms. *J. Immunol.* **162**, 5224–5229 (1999).
152. Kryczek, I. *et al.* B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *J. Exp. Med.* **203**, 871–881 (2006).
153. Movahedi, K. *et al.* Different Tumor Microenvironments Contain Functionally Distinct Subsets of Macrophages Derived from Ly6C(high) Monocytes. *Cancer Res.* **70**, 5728–5739 (2010).
154. Tsutsui, S. *et al.* Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density. *Oncol. Rep.* **14**, 425–431 (2005).
155. Carswell, E. A. *et al.* An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 3666–70 (1975).

156. Kashii, Y., Giorda, R., Herberman, R. B., Whiteside, T. L. & Vujanovic, N. L. Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. *J Immunol* **163**, 5358–5366 (1999).
157. Prévost-Blondel, A., Roth, E., Rosenthal, F. M. & Pircher, H. Crucial Role of TNF-alpha in CD8 T cell-Mediated Elimination of 3LL-A9 Lewis Lung Carcinoma Cells In Vivo. *J. Immunol.* **164**, 3645–3651 (2000).
158. Engelmann, H., Aderka, D., Rubinstein, M., Rotman, D. & Wallach, D. A Tumor Necrosis Factor-binding Protein Purified to Homogeneity from Human Urine Protects Cells from Tumor Necrosis Factor Toxicity. *J. Biol. Chem.* **264**, 11974–11980 (1989).
159. Leibovich, S. J. *et al.* Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature* **329**, 630–632 (1987).
160. Anderson, G. M., Nakada, M. T. & DeWitte, M. Tumor necrosis factor- α in the pathogenesis and treatment of cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* **4**, 314–320 (2004).
161. Lienard, D., Ewalenko, P., Delmotte, J. J., Renard, N. & Lejeune, F. J. High-dose recombinant tumor necrosis factor alpha in combination with interferon gamma and melphalan in isolation perfusion of the limbs for melanoma and sarcoma. *J. Clin. Oncol.* **10**, 52–60 (1992).
162. Orosz, P. *et al.* Enhancement of Experimental Metastasis by Tumor Necrosis Factor. *J. Exp. Med.* **177**, 1391–1398 (1993).
163. Warburg, O. On the Origin of Cancer Cells. *Science.* **123**, 309–314 (1956).
164. Brand, A. *et al.* LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. *Cell Metab.* **24**, 1–15 (2016).
165. Walenta, S. *et al.* High Lactate Levels Predict Likelihood of Metastases, Tumor Recurrence, and Restricted Patient Survival in Human Cervical Cancers. *Cancer Res.* **60**, 916–921 (2000).
166. Girgis, H. *et al.* Lactate Dehydrogenase A is a potential prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. *Mol. Cancer* **13**, 1–10 (2014).
167. Lin, C., McGough, R., Aswad, B., Block, J. & Terek, R. Hypoxia induces HIF-1-alpha and VEGF expression in chondrosarcoma cells and chondrocytes. *J. Orthop. Res.* **22**, 1175–1181 (2004).
168. Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. & Keshet, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359**, 843–845 (1992).
169. Colegio, O. R. *et al.* Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* **513**, 559–563 (2014).
170. Lauritzen, K. H. *et al.* Lactate Receptor Sites Link Neurotransmission, Neurovascular Coupling, and Brain Energy Metabolism. *Cereb. cortex* **24**, 2784–2795 (2014).
171. Morland, C. *et al.* The Lactate Receptor, G-Protein-Coupled Receptor 81/Hydroxycarboxylic Acid Receptor 1: Expression and Action in Brain. *J. Neurosci. Res.* **93**, 1045–1055 (2015).

172. Baenke, F. *et al.* Functional screening identifies MCT4 as a key regulator of breast cancer cell metabolism and survival. *J. Pathol.* **237**, 152–165 (2015).
173. Holmes, D. The cancer that rises with the sun. *Nature* **515**, 110–111 (2014).
174. Lipson, E. J. & Drake, C. G. Ipilimumab: An Anti-CTLA-4 Antibody for Metastatic Melanoma. *Clin. Cancer Res.* **17**, 6958–6962 (2011).
175. Hamid, O. *et al.* Safety and Tumor Responses with Lambrolizumab (Anti-PD-1) in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **369**, 134–144 (2013).
176. Wolchok, J. D. *et al.* Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **369**, 122–133 (2013).
177. Zhang, J., Yang, P. L. & Gray, N. S. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 28–39 (2009).
178. Hertzman Johansson, C. & Egyhazi Brage, S. BRAF inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* **142**, 176–182 (2014).
179. Chanmee, T., Ontong, P., Konno, K. & Itano, N. Tumor-Associated Macrophages as Major Players in the Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)*. **6**, 1670–1690 (2014).
180. Mosmann, T., Cherwinski, H., Bond, M., Giedlin, M. & Coffman, R. Two types of murine Helper T cell clone I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* **136**, 5–14 (1986).

8. Abkürzungsverzeichnis

2-DG	2-Deoxyglucose
5'-AMP	5'-Adenosinmonophosphat
α -MSH	α -melanocyte stimulating hormone
APC	Antigenpräsentierende Zelle
Arg1	Arginase-1
ATP	Adenosintriphosphat
BMMC	Bone marrow derived mast cells
BSA	Bovine serum albumin
cAMP	Zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat
CBP	CREB binding protein
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
CHC	Alpha-cyano-4-hydroxycinnamate
CLEC10A	C-type lectin domain family 10 member A
COAD	Colon adenocarcinoma
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element binding protein
CREM	cAMP responsive element modulator
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DC	Dendritische Zelle
dLN	Drainierender Lymphknoten
ECAR	Extracellular acidification rate
EGF	Epidermal growth factor
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
Fc ϵ R1 α	Fc ϵ Rezeptor 1 α
FCS	Fetal calf serum
GJ	Gap Junction
GJIC	Gap junctional intercellular communication
GPGR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
HIF-1 α	Hypoxia-inducible factor-1 α
ICER	Inducible cAMP early repressor

IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
JAK	Januskinase
KO	Knockout
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MC1R	Melanocortin-1-Rezeptor
M-CSF	Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
MCT1	Monocarboxylate transporter 1
MDA	Melanozytendifferenzierungsantigene
MDSC	Myeloid derived suppressor cells
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MGL2	Macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 2
MHC	Major histocompatibility complex
MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein 1 α
MITF	Microphthalmia-associated transcription factor
ndLN	Nicht drainierender Lymphknoten
NF κ B	Nuclear factor- κ B
NGS	Next generation sequencing
NIH	National Institute of Health
NK Zelle	Natürliche Killerzelle
NO	Stickstoffmonoxid
Nt	Nukleotid
nTreg	Natürliche regulatorische T-Zelle
OVA	Ovalbumin
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
Patienten-ID	Patienten-Identifikationsnummer
PBS	Phosphate buffered saline
PD-1	Programmed cell death protein 1
PDE	Phosphodiesterase
PD-L	Programmed cell death ligand
PGE ₂	Prostaglandin E ₂

PKA	Proteinkinase A
PRR	Pattern recognition receptor
RLU	Relative light unit
s.c.	Subkutan
SKCM	Skin cutaneous melanoma
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling-3
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TGF- β	Tumor growth factor β
Th1	T-Helferzellsubpopulation Typ 1
Th2	T-Helferzellsubpopulation Typ 2
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TLR	Toll-like-Rezeptor
TM	Testmedium
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
Treg	Regulatorische T-Zelle
TRP	Tyrosinase related protein
Tyr	Tyrosinase
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VE	Vollentsalzt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WT	Wildtyp

9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Makrophagen werden in pro-inflammatorische M1 und Gewebe-besiedelnde M2 Makrophagen eingeteilt. 5

Abb. 2 Der cAMP-Signalweg..... 8

Abb. 3 Aufbau des Creb und des Crem Gens. 10

Abb. 4 ICER inhibiert die Transkription cAMP-regulierter Gene..... 11

Abb. 5 Prozentualer Anteil der zehn häufigsten Krebsarten an allen Krebsneuerkrankungen 2012 in Deutschland. 13

Abb. 6: Inzidenz und Mortalität des malignen Melanoms der Haut in Deutschland..... 13

Abb. 7 Die ICER-Expression ist in Melanombiopsien im Vergleich zu Kolonkarzinombiopsien stark erhöht. 40

Abb. 8 Die Stärke der ICER-Expression ist in Melanombiopsien vom Stadium des Tumors abhängig..... 41

Abb. 9 Das B16F10 Melanomwachstum ist in Icer-defizienten Mäusen stark verringert. 43

Abb. 10 Die intrazelluläre cAMP-Konzentration von B16F10 Zellen ist signifikant höher als die von MC38 Zellen. 45

Abb. 11 Die intrazelluläre cAMP-Konzentration in Tumor-infiltrierenden CD4⁺ T-Zellen und Makrophagen ist im Vergleich zur cAMP-Konzentration in CD4⁺ T-Zellen und Makrophagen aus der Peripherie stark erhöht. 46

Abb. 12 CD4⁺ T-Zellen und Makrophagen interagieren über GJs mit B16F10 Tumorzellen. 49

Abb. 13 In Icer^{fl/fl} Cd4-cre Mäusen ist das B16F10 Melanomwachstum nicht vermindert. 50

Abb. 14 B16F10 Melanomzellen, aber nicht MC38 Kolonkarzinomzellen, werden von Icer^{fl/fl} Lysm-Cre Mäusen abgestoßen. 51

Abb. 15 Icer-defiziente Makrophagen besitzen eine höhere Glykolyse-Rate als Icer-kompetente Makrophagen.53

Abb. 16 Peritoneal-Makrophagen aus Icer-defizienten Mäusen produzieren mehr TNF- α als Makrophagen aus WT Mäusen. 55

Abb. 17 ICER hemmt die Tnfa-Promotoraktivität in Mastzellen. 56

Abb. 18 Der prozentuale Anteil an B16F10-infiltrierenden Makrophagen ist in Icer^{fl/fl} Lysm-Cre Mäusen durchschnittlich höher als in Icer^{fl/fl} Mäusen. 58

Abb. 19 Tumor-infiltrierende Makrophagen aus Icer^{fl/fl} Lysm-Cre Mäusen produzieren mehr TNF- α und iNOS als Tumor- infiltrierende Makrophagen aus WT Mäusen..... 59

Abb. 20 Icer-defiziente Makrophagen exprimieren verstärkt M1-charakteristische Gene, während Icer-kompetente Makrophagen verstärkt M2-typische Gene exprimieren. 61

Abb. 21 Icer-defiziente Mäuse besitzen ein verringertes Tumolvolumen, während es hingegen in Icer/Tnfa-doppeldefizienten Tieren zu keiner Verminderung des Tumorwachstums kommt. 63

Abb. 22 MDL-12 inhibiert die cAMP-Produktion in B16F10 Melanomzellen, hat jedoch keinen Einfluss auf ihre Proliferationskapazität..... 65

Abb. 23 In vivo Applikation des Adenylatzyklase-Inhibitors MDL-12 zur Melanombehandlung. 66

Abb. 24 Durch peritumorale MDL-12-Applikation wird das B16F10 Tumorwachstum in C57BL/6J Mäusen inhibiert. 67

Abb. 25: Icer-kompetente Makrophagen entwickeln unter dem Einfluss von cAMP einen M2 Phänotyp und Icer-defiziente Makrophagen einen M1 Phänotyp..... 72

10. Curriculum Vitae

11. Danksagung