

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
Im Walter Brendel Zentrum für Experimentelle Medizin
Leitung: Prof. Dr. U. Pohl

**Kombination von gpIIb/IIIa-Blockade
und adoptivem T-Zell-Transfer
im Modell der Metastasierung des B16-
Melanoms**

Dissertation
zum
Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt

von Costanza Chiapponi, dott.ssa in Lettere e Filosofia (Pisa, 07/02)
aus Alessandria, Italien

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilian-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Georg Enders

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Rudolf Rupec

Prof. Dr. Judith P. Johnson

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 31.03.2011

Diese Arbeit ist für Frau I.W., die in der Nacht vom 16.06.2010 an ihrem metastasierten malignen Melanom verstorben ist und für alle meine vergangenen und zukünftigen Patienten, die unter dieser Erkrankung gelitten haben und leiden werden.

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	6
1.1. <i>Behandlungsstrategien für die Metastasierung des malignen Melanoms</i>	6
1.2. <i>Immuntherapie</i>	7
1.3. <i>Rolle der Thrombozyten in der hämatogenen Metastasierung</i>	13
1.4. <i>Zielsetzung der Arbeit</i>	15
II. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1. <i>Tiere</i>	16
2.2. <i>Zellen</i>	16
2.2.1. <i>Tumorzelllinie</i>	16
2.2.2. <i>Kulturbedingungen</i>	17
2.3. <i>Genexpressionsanalyse</i>	17
2.3.1. <i>RNA-Isolierung</i>	17
2.3.2. <i>cDNA-Synthese</i>	18
2.3.3. <i>PCR</i>	18
2.3.4. <i>cDNA-Arrays</i>	19
2.4. <i>Die prokoagulatorische Aktivität</i>	19
2.5. <i>Bindung von Tumorzellen und Plättchen</i>	20
2.5.1. <i>Blutentnahme am Spendertier</i>	20
2.5.2. <i>Isolierung und Markierung der Thrombozyten</i>	20
2.5.3. <i>Inkubation von Thrombozyten und Tumorzellen</i>	21
2.5.4. <i>Durchflusszytometrie</i>	21
2.6. <i>Bindung von Fibrinogen</i>	22
2.7. <i>In vivo Versuche</i>	22
2.7.1. <i>Metastasenmodell</i>	22
2.7.2. <i>Tumorkvakziniierung-Modell</i>	22
2.7.3. <i>Fütterung mit dem IIb/IIIa-Inhibitor</i>	23
2.7.4. <i>Versuchsprotokolle</i>	24
2.7.5. <i>Lungenentnahme und Metastasenzählung</i>	24
2.8. <i>ELISA</i>	27
2.9. <i>Statistische Auswertung der Daten</i>	28
III. ERGEBNISSE	29
3.1. <i>Hämatogene Metastasierung von B16D5 Tumorzellen</i>	29

3.2. Aktivierung der Gerinnung durch B16D5 Tumorzellen	31
3.3. Bindung von Thrombozyten durch B16D5 Tumorzellen	35
3.4. Bindung von Fibrinogen durch B16D5 Tumorzellen	39
3.5. Metastasierung der B16D5 Tumorzellen unter Plättchenhemmung	40
3.6. Verbesserung der Ergebnisse der Immuntherapie durch Kombination mit Gantofiban	42
3.7. Analyse der Immunantwort und des Tumorzellüberlebens durch Zytokinexpression im Plasma	53
3.8. Analyse der Immunantwort durch Genexpression in der Lunge	59
IV. DISKUSSION	63
4.1. Das B16 Maus-Melanom-Modell	63
4.2. Lokales Überleben der Tumorzellen	64
4.3. Mechanismen der Gantofiban-Wirkung	73
4.4. Adoptiver T-Zell-Transfer und gpIIb/IIIa Blockade	76
4.5. Mechanismen der Kombination gpIIb/IIIa Blockade und T-Zell-Transfer	78
4.6. Schlussfolgerungen	86
V. ZUSAMMENFASSUNG	88
VI. ABKÜRZUNGEN	91
VII. ABBILDUNGEN	94
VIII. TABELLEN	95
IX. LITERATUR	96
X. DANKSAGUNG	118

I. EINLEITUNG

If you are a mouse with cancer, we can take good care of you.

(J. Folkman)

1.1. Behandlungsstrategien für die Metastasierung des malignen Melanoms

Die Haupttodesursache des malignen Melanoms stellt nicht der Primärtumor selbst, sondern die Lungen-, Leber-, Hirn- und Knochenmetastasen dar. Diese liegen bei ca. 10% der Patienten bereits bei Diagnosestellung vor, treten aber noch in 90% der Fälle in den ersten fünf Jahren nach chirurgischer Entfernung des Primärtumors auf. Auch Spätmetastasen sind nicht ungewöhnlich.

Bei Stadium IV der Erkrankung (Vorliegen von Fernmetastasen) ist die Prognose der Patienten sehr schlecht. Heilungen sind selten zu erreichen und die Behandlung hat hauptsächlich das Ziel, die Überlebenszeit der Patienten zu verlängern und die Tumormasse zu reduzieren. Die 10-Jahre-Überlebensrate, die im Stadium I noch sehr gut ist (95-86%), sinkt in den metastasierten Stadien auf 59-43% (Mikrometastasen) bzw. 15-10% (Fernmetastasen) (Daten der American Cancer Society 09/2010). Die mittlere Überlebenszeit beträgt in diesen zwei Stadien unbehandelt circa vier bis sechs Monate, unter Behandlung durchschnittlich sechs bis neun Monate. Dies zeigt, dass die aktuelle Standardtherapie des Stadiums IV noch nicht zufriedenstellend ist und dass die Bekämpfung und die Vorbeugung des Metastasierungsprozesses das Hauptproblem darstellen.

Nur ungefähr ein Viertel der Patienten im Stadium IV kommen für die chirurgische Resektion der Metastasen in Frage (1). Generell ist die Prognose dieser Patienten etwas besser, wenn das Intervall zwischen Erstdiagnose und dem Auftreten der Metastasen lang, die Zahl der Metastasen begrenzt und eine komplette Resektion möglich ist. Chirurgisch ist ein Langzeitüberleben oder sogar die Heilung nur in Einzelfällen zu erreichen. Ähnlich stellt sich die Situation von Patienten mit Hirnmetastasen dar. Ohne Behandlung sterben sie ca. ein bis drei Monate nach Diagnosestellung. Die chirurgische Resektion verlängert ihre

Überlebenszeit auf vier Monate, eine zusätzliche postoperative Bestrahlung um ein weiteres halbes Jahr (2;3).

Inoperable metastasierte Tumoren werden mit einer systemischen Chemotherapie behandelt. Heilungen sind dadurch allerdings selten zu erreichen, daher liegen die Ziele dieser Vorgehensweise hauptsächlich in einer Verlängerung der Überlebenszeit und Reduktion der Tumormasse. Mit einer Monochemotherapie sind in 5% bis 28% der Fälle auch komplette Remissionen zu erzielen, die jedoch nur selten länger als wenige Monate andauern. Eine Polychemotherapie führt zu höheren Ansprechraten (zwischen 22% und 45% (4;5)), aber bei gleichzeitig erhöhter Toxizität zu keinem deutlichen Vorteil in den Überlebensraten.

Aus diesem Grunde bemühen sich weltweit Forscher um alternative Therapiestrategien wie die Immuntherapie.

1.2. Immuntherapie

Die Immuntherapie beruht auf der grundsätzlichen Überzeugung, dass Tumore durch die Immunabwehr eliminiert werden können und verfolgt daher das Ziel, eine Immunantwort gegen die neoplastisch veränderten Zellen zu erzielen. Man unterscheidet hierbei zwischen dem aktiven und passiven Ansatz. Die aktive Immuntherapie nutzt für die Erzielung einer Immunantwort unspezifische und spezifische Immunstimulantien. Als unspezifische Immunstimulantien werden bakterielle Bestandteile wie Bacillus Calmette-Guerin oder Corynebacterium parvum verwendet aber auch Immunmediatoren wie IL-2, TNF- α , IFN- α und - γ . Bestrahlte autologe oder allogene Tumorzellen werden ebenfalls verabreicht um eine Immunantwort zu erzielen. Bei der passiven Immuntherapie hingegen werden Antikörper oder verschiedene Abwehrzellen eingesetzt, die aus dem Kranken (autologe I.) bzw. aus einem Spender (allogene I.) isoliert, expandiert und reinokuliert werden. Bisherige Versuche nutzten hierfür beispielsweise monoklonale Antikörper, Lymphokin-aktivierte Killerzellen (LAK) oder Tumor-infiltrierende Zellen (TIL).

Erste Hinweise auf die Möglichkeit des Immunsystems zur Eliminierung von Tumorzellen fielen dem amerikanischen Chirurg W. Coley Ende des 19. Jahrhunderts auf. Er bemerkte, dass diejenigen Patienten, die sich nach einer operativen Tumorentfernung mit einem Erysipel infizierten hatten, eine höhere Überlebensrate aufwiesen als andere. Coley erklärte sich diese Beobachtungen dadurch, dass eine unspezifische Aktivierung des Immunsystems zu einer Regression der Neoplasie führte. Ihm gelangen angeblich sogar komplette Heilungen durch Inokulation lebendiger Erreger.

Mit der Einführung von Chemo- und Radiotherapie und den ersten Erfolgen in der Krebsbehandlung traten Coleys Erkenntnisse allerdings in den Hintergrund. Erst ca. 100 Jahre später wurden seine Ideen wieder aufgenommen. So gelang 1986 S. Rosenberg die Isolierung von TIL im Mausmodell. TIL sind Lymphozyten, die den Tumor infiltrieren und deswegen über eine höhere Spezifität verfügen. Er expandierte diese Zellen mit IL-2 und injizierte mit diesem Vakzin tumorkranken Mäuse. Das Ergebnis war eine signifikante Tumorregression in den behandelten Tieren (6). Versuche, diesen Effekt auf den Menschen zu übertragen, erwiesen sich jedoch als enttäuschend. So führten die weiteren Studien trotz der Anwendung vieler verschiedener Protokolle und Behandlungskonzepte bislang noch nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen.

Zur aktuellen Standardtherapie des malignen Melanoms gehört der Einsatz von Interferon α . Seine Anwendung in der adjuvanten Therapie von Tumoren begann in den 80er Jahren in den USA. In Deutschland sind IFN α -2a (Roferon) und IFN α -2b (IntronA) zugelassen. Diese zwei Substanzen unterscheiden sich in ihrer molekularen Struktur nur in zwei Aminosäuren und sind in ihrer Wirkung auch weitgehend äquivalent. Die besten Ergebnisse sind allerdings nicht in der Behandlung von Melanomen, sondern im Bereich der Leukämien erzielt worden. Die therapeutische Wirkung des Interferons besteht in einer Aktivierung des Immunsystems und in einer Proliferationshemmung entarteter Zellen. Seine Anwendung geht mit Grippe-ähnlichen, hämatologischen, hepatischen und psychiatrischen Nebenwirkungen einher und ist außerdem in der Wirksamkeit sehr umstritten. Die Ansprechrate einer Monotherapie liegt mit 13% auf dem Niveau der

Wirksamkeit einer Monochemotherapie mit einem Anteil von kompletten Remissionen in Höhe von 5% (7). Allerdings konnte bis jetzt keine der zahlreichen klinischen Studien einen signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben der Behandelten zeigen.

Zur Klasse der Immunmodulatoren gehört auch Interleukin 2. Es handelt sich um ein Zytokin, das in vivo und in vitro zur Expansion und Steigerung der Zytotoxizität von Lymphozyten und NK-Zellen führt. Nach vielversprechenden Tierversuchen kam es 1984 in klinischen Studien an Menschen zur Anwendung. Die Behandlung von Melanomen mit Interleukin 2 als Monotherapie erwies sich aber bald als enttäuschend (8% komplette, 9% partielle Remissionen (8)). Mit höheren intravenösen Dosierungen konnte man eine Ansprechrates von bis zu 25% erreichen. Es traten jedoch einige unangenehme Nebenwirkungen auf wie Fieber, Schüttelfrost, Abgeschlagenheit, Erytheme, Tachykardie und Ödembildung infolge der Schädigung der Gefäßwände. Die Ansprechrates ist somit vergleichbar mit der der Chemotherapie, wobei im Gegensatz dazu ein Teil der Remissionen dauerhaft ist (9). In manchen Ländern - u.a. in den USA - ist die Therapie mit IL-2 zugelassen, in Deutschland jedoch wird die Anwendung des IL-2 Präparates Proleukin auf das Nierenzellkarzinom beschränkt.

Eine Kombination der zwei obengenannten Immunmodulatoren beruht auf der Idee eines daraus entstehenden synergistischen Effektes. Tatsächlich aber führte sie nur zu Remissionsraten zwischen 15% und 44% (10;11).

Erfolgreicher ist der Einsatz von kombinierten Therapieschemata mit Chemotherapeutika und Immunstimulation wie Cisplatin-Vinblastin-Dacarbazin mit Interferon α und Interleukin 2 (Biochemotherapie). Sie erreichen Ansprechrates bis zu 66% und eine langfristige Remission von ca. 9%. Allerdings zeigten die Studien keinen signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben gegenüber einer alleinigen Chemotherapie (12-17). Patienten, die einer Biochemotherapie unterzogen wurden, zeigten bereits Rezidive innerhalb der ersten 6 Monate. O'Day et al. erreichten mit einer Biochemotherapie mit Cisplatin, Dacarbazin, Vinblastin, IL-2 und GM-CSF eine Gesamtansprechrates von 26% (18). Die Kombination

von IL-2 mit LAK oder TIL's im Rahmen der adoptiven Immuntherapie zeigte keinen Vorteil gegenüber der alleinigen Hochdosis-IL-2-Therapie (19).

Neben den Immunmodulatoren werden auch Antigene und Abwehrzellen in Form von Vakzinen verabreicht. Eine mögliche Strategie ist die Vakzinierung mit Tumorpeptiden. Diese Vakzine werden relativ gut vertragen und erzielen eine Ansprechrage von ca. 50% (20;21). Allerdings stellt die genetische Instabilität der Tumore einen limitierenden Faktor bei der Antigenauswahl dar. Eine ähnliche Wirkung erreicht man mit der Anwendung von dendritischen Zellen, die Antigenpeptide präsentieren (22;23). In klinischer Entwicklung befindet sich zur Zeit der monoklonale IgG-1-Antikörper Ipilimumab, welcher den auf T-Zellen exprimierten CTLA-4-Rezeptor inhibiert und dadurch eine gesteigerte T-Zell-Antwort einleitet (24).

Unter „adoptiver Immuntherapie“ (adoptive cell therapy oder ACT) versteht man die Isolierung und in vitro Expandierung und Aktivierung von autologen oder allogenen T-Zellen, die dann den Patienten zurücktransfundiert werden (25). Mögliche Anwendungen basieren auf den lymphokin-aktivierten-Killerzellen (LAK) (26) oder auf den tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) (27).

Tabelle 1 fasst die Ergebnisse einiger der Therapieansätze zusammen, die in den letzten Jahren in der Behandlung der metastasierten Melanome im Rahmen von klinischen Studien getestet wurden. Häufig wurden unterschiedliche Ansätze kombiniert um die Ansprechrage zu verbessern.

Protokoll	objektive Ansprechrate
Chemotherapie <ul style="list-style-type: none"> • Dacarbazin • Cisplatin, Carmustin, Dacarbazin und Tamoxifen 	20% (28) 55% (29)
Interferon α 9-18 MU/m ² KO s.c. 3x/Woche, kontinuierliche Gabe	13-25% (30;31)
Interferon α + Temozolomide TMZ 200mg/m ² KO/d von Tag 1 bis 5 jeden Monat + IFN- α 5 MU/m ² KO an Tag 1, 3, und 5 jede Woche	24% (32)
CVT+ IL-2 + IFN-α CVT (Cisplatin 20mg/m ² KO/d für 4 Tage + Vinblastin 1,6mg/m ² KO/d für 4 Tage + Temozolomid 250mg/m ² KO/d für 5 Tage) + 180 IU/m ² KO IL-2 für 4 Tage + IFN- α 4 IU/m ² KO s.c. für 5 Tage in Intervallen von 28 Tagen, max. 9 Zyklen.	43% (33) 20% (34)
HDB-IL-2 Regimen IL-2 600.000-720.000 U/KgKG als Bolus alle 8 St. von Tag 1 bis 5 (Zyklus 1) und von Tag 15 bis Tag 19 (Zyklus 2), max. 14 Dosen/Zyklus.	16%-21% (35-37)
HDB-IL-2 Regimen + LAK-Zellen Nach einem IL-2-Zyklus (s.o.) fand die Leukapherese statt. Die Zellen wurden dann für 3 bis 4 Tage mit IL-2 in vitro stimuliert und während des zweiten IL-2-Zyklus den Patienten reinfundiert.	22% (38;39)
lymphodepletierende Chemotherapie* + HDB-IL-2 Regimen + TIL-Zellen *60mg/KgKG Cyclophosphamid für 2 Tage, 25mg/m ² Fludarabine für 5 Tage)	52% (40;41)
lymphodepletierende Chemotherapie* + Ganzkörperbestrahlung mit 1200 cGy + HDB-IL-2 Regimen + TIL-Zellen	72% (42-44)

Table 1: Ansprechrate verschiedener Immuntherapieprotokollen in den letzten Jahren.

Trotz zum Teil relativ guter Ergebnisse in einzelnen Studien, meistens mit kombinierten Ansätzen, wie in Tabelle 1 dargestellt, beträgt die Gesamtansprechrates nur ca. 2,6%, wenn man alle Ergebnisse der Immuntherapie bei der Behandlung von Patienten mit Stadium IV Melanom in den letzten zehn Jahren betrachtet (45). Dabei lässt sich eine große Diskrepanz zwischen Tier und Patientenstudien feststellen: die LAK-Therapie, die in der Maus vielversprechende Ergebnisse erreichte, führte in klinischen Studien nur in 20% bis 30% der behandelten Patienten zu einer objektiven Regression des Tumors (46;47). Auch die TIL-Therapie, die in Tierversuchen noch eine 50 bis 100fach höhere Wirksamkeit als die LAK-Therapie aufwies, führte zu ähnlichen Ergebnissen (48-52). „The history of cancer research has been a history of curing cancer in the mouse... We have cured cancer of mice for decades and it simply didn't work in humans“ sagte Dr. R. Klausner, damaliger Direktor der National Cancer Institut of LA der Zeitung Times.

Die Gründe dieser Diskrepanz sind bis heute noch ungeklärt. Vier Voraussetzungen müssen für einen erfolgreichen antitumoralen Effekt von zytotoxischen T-Lymphozyten auf Tumorzellen gegeben sein:

- a) sie müssen in ausreichender Zahl vorhanden sein,
- b) sie müssen den metastatischen Situs erreichen,
- c) sie müssen den Kreislauf verlassen können und ins Gewebe extravasieren und
- d) sie müssen die Tumorzelle zerstören können.

Eine mögliche Ursache der Misserfolge der Immuntherapie beim Menschen ist die Größe der Tumormasse. Bei Behandlungsbeginn sind Tumore beim Menschen in der Regel bereits sehr viel größer als in den meisten Metastasierungsmodellen der Maus. Die Zahl der transferierten immunkompetenten Zellen kann man jedoch nicht beliebig erhöhen, weil das Risiko für Nebenwirkungen wie thromboembolische Ereignisse stark ansteigt. Ein weiteres Problem scheint die mangelnde Zugänglichkeit der Tumoren für die T-Zellen zu sein: manche Tumore wachsen, obwohl mehr als 30% der zirkulierenden T-Zellen eine spezifische Antitumoraktivität aufweisen (53), so dass man davon ausgehen muss, dass die

T-Zellen die Tumorzellen nicht erreichen können. Bai et al. (54) zeigten, dass das „microenvironment“ des Tumors teilweise in der Lage ist, die Aktivität von T-Zellen zu supprimieren, die ansonsten effektiv sind. Diese Immunsuppression konnte auf Zytokine wie IL-10 (55) oder TGF- β (56) zurückgeführt werden. Diese können die Freisetzung von Substanzen, wie Perforin, Granzyme A und B und Interferon γ inhibieren, die für die zytotoxische Wirkung der T-Zellen essentiell sind. Zur Unterstützung der Immuntherapie könnte man deshalb versuchen, auf das Proliferations- und Metastasierungsverhalten der Tumorzellen negativ einzuwirken und die physische und chemische Zugänglichkeit der Tumorzellen für die T-Zellen zu erleichtern. Dazu sollte die Kenntnis der Initialmechanismen der Tumorsiedlung hilfreich sein.

Die Tumorzellen benötigen für ihr lokales Überleben eine ganze Reihe von Voraussetzungen: Adhäsionsmoleküle, um sich festzusetzen sowie Schutz vor der mechanischen Dislokation durch die Scherkräfte des fließenden Blutes. Daneben benötigen sie Faktoren, um das Gefäßsystem zu verlassen und zu proliferieren. Dies alles fehlt einzelnen Zellen. Erst im Verbund und zusammen mit anderen Blutzellen, wie zum Beispiel den Plättchen oder den zirkulierenden HPC/EPC sind sie besser fürs Überleben gerüstet.

1.3. Rolle der Thrombozyten in der hämatogenen Metastasierung

Im 19. Jahrhundert beobachtete Trousseau, dass die Neoplasien oft mit Thrombose und Hyperkoagulation einhergehen. Deswegen trägt die Kombination von Krebs und Thrombose heute seinen Namen (Trousseau syndrom). Bei fast 20% der Patienten mit einem venösen thromboembolischen Ereignis wird eine Neoplasie neu diagnostiziert (57) und ungefähr ebenso viele Krebspatienten weisen einen hyperkoagulatorischen Status auf, was erhebliche Probleme in ihrer Behandlung verursacht (58).

Die Tumore verfügen über die Fähigkeit, die Thrombozytenaggregation in vitro (59) und in vivo zu aktivieren, was als entscheidender Faktor in der Unterstützung des Metastasierungsprozesses interpretiert wird. 1968 zeigten zum Beispiel Gasic et al. (60), dass plättchendepletierte Mäuse eine niedrigere Metastasenzahl aufweisen. Insbesondere eine Beeinträchtigung ihres Aggregationsvermögens scheint die Wirksamkeit entscheidend

zu erhöhen (61). Diese Tumor-Plättchen-Wechselwirkungen sind außerdem von der Gerinnung abhängig: so weisen auch Mäuse die über kein Fibrinogen verfügen, weniger Metastasen auf (62;63). In anderen Versuchen führte die Blockierung von Thrombin zu ähnlichen Ergebnissen (64). Jae Hong Im et al. beobachteten, dass sich Gerinnsel aus Tumorzellen, Plättchen und Fibrinogen schon fünf Minuten nach der Tumorgabe bilden (65). Diese Gerinnsel schützen die neoplastischen Zellen vor mechanischem Stress und vor der Immunabwehraktivität (66). Suzuki et al. postulierten, dass auch das Anheften an die Endothelien durch die Plättchen begünstigt wird (67). Laut Studien von Honn et al. führt die Sekretion von 12(S)-HETE (ein Lipooxygenasenmetabolit aus der Arachidonsäure) durch die Plättchen zu einer Endothelretraktion, die die Extravasation begünstigt (68). Außerdem setzen Plättchen angiogenetische Faktoren frei, die das Tumorwachstum unterstützen (69). Die Inhibition der Plättchenaktivität scheint sich daher über mehrere Mechanismen vorteilhaft auszuwirken.

Die Kombination einer Antikoagulation mit einer Chemotherapie wurde von Hejna et al. bei Patienten mit kleinzelligem Lungenkarzinom untersucht (70). Die Patienten, die zusätzlich zu der Chemotherapie Warfarin erhielten, zeigten sowohl eine höhere Ansprechrate als auch eine signifikante Überlebensverlängerung gegenüber denjenigen, die rein mit Chemotherapie behandelt wurden. Allerdings brachte ein ähnliches Therapiemodell von Prostata, kolorektalem und nicht-kleinzelligem Karzinom keinen deutlichen Vorteil für den antikoagulierten Therapiearm (71).

Über die Anwendung von Plättchenaggregationshemmern in Kombination mit einem Immuntherapiemodell gibt es bislang nach unseren Kenntnissen keine Daten.

Es gibt aus der Literatur Hinweise darauf, dass sowohl die Gerinnung als auch die Plättchen zur Steigerung der Metastasenbildung beitragen können. Es bleibt als offene Frage, ob die Inhibition dieses Mechanismus zu einer Verbesserung der Ergebnisse der Immuntherapie beitragen kann. Aus diesem Grund sollte die Rolle der Plättchenadhäsion in einem definierten Metastasierungsmodell untersucht und mit einer etablierten Immuntherapie kombiniert werden.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Prozess der hämatogenen Metastasierung besser zu verstehen, um der Entwicklung von Melanometastasen in der Lunge vorzubeugen bzw. zu behandeln. Die Grundlage der Untersuchungen stellte das hämatogene Metastasierungsmodell des B16 Melanoms in C57 Mäusen dar. Bei diesem bilden sich innerhalb von zehn Tagen nach intravenöser Injektion zahlreiche makroskopisch sichtbare Metastasen in der Lunge.

Im Einzelnen sollte untersucht werden:

- 1. Welche Faktoren bestimmen die Ansiedlung der Tumorzellen in der Lunge?*
- 2. Welche Rolle spielen dabei Adhäsionsmoleküle?*
- 3. Tragen die Gerinnung und die Plättchenaggregation zur Bildung von Metastasen bei?*
- 4. Welche Auswirkung hat die Hemmung der Plättchenadhäsion auf die Metastasierung?*
- 5. Führt die Kombination von Hemmung der Plättchenadhäsion mit einer Immuntherapie (adoptiver CTL-Transfer) zu einer Verbesserung der Therapie?*
- 6. Wie wirkt die Blockade der Plättchenadhäsion auf die Immunabwehr?*

Mit der Beantwortung dieser Fragen sollte ein Beitrag zum besseren Verständnis des Prozesses der hämatogenen Metastasierung und zur Verbesserung der Ergebnisse der Immuntherapie in der Maus angestrebt werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

Die im Folgenden dargestellten tierexperimentellen Untersuchungen wurden mit Genehmigung der Regierung Oberbayern (AZ.209.1/211-2531-96/04) im Zeitraum von 2004 bis 2006 am Walther Brendel Institut der Ludwig-Maximilians-Universität im Rahmen des „Promotionsstudiums Molekulare Medizin“ der LMU durchgeführt.

2.1. Tiere

Als Versuchstiere dienten weibliche C57BL6 Mäuse aus dem Inzuchtstamm der Fa. Charles River (Sulzfeld). Es wurden jeweils bis zu sechs Tiere in einem Käfig mit freiem Zugang zu Wasser und Standardtrockenfutter bei einer Umgebungstemperatur von 24°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50% im Tierstall des Instituts für chirurgische Forschung gehalten. Die Beleuchtung erfolgte durch künstliches Licht in einem zwölf-stündlich wechselnden Hell-Dunkel-Rhythmus.

Das Durchschnittsalter der für diese Versuche angewendeten Tiere betrug acht bis zwölf Wochen, das Gewicht 18-24g.

Als Spendertiere für die Isolierung von Plasma, Thrombozyten und Lymphozyten dienten ebenfalls weibliche C57BL6 Mäuse (Charles River, Sulzfeld) mit einem Alter zwischen acht und zwölf Wochen und einem Gewicht von 18-24g.

2.2. Zellen

2.2.1. Tumorzelllinie

B16-D5 (D5) ist ein schwach immunogener Subklon der spontanen B16BL6 Melanom Zelllinie der Maus (72). Diese wurden zur Induktion von Metastasen verwendet.

D5-G6 ist ein stabiler Klon von D5, der mit einem murinen GM-CSF retroviralen Vektor transduziert wurde. D5-G6 sezernieren ca. 200ng GM-CSF/ml/10⁶ Zellen/24h. Diese Zellen dienten zur Induktion einer stabilen T-Zell-Antwort.

Beide Zelllinien wurden von Dr. B. A. Fox (Earle Chiles Res. Institut Portland, Oregon) zur Verfügung gestellt.

2.2.2. Kulturbedingungen

Die Tumorzellen wurden in RPMI 1640 mit 0.1 mM nicht essentiellen Aminosäuren, 1 mM Natrium-pyruvat, 2 mM L-Glutamin, 50 mM 2-Mercaptoethanol und 10% FBS in T-75 oder T-150 Flaschen kultiviert. Die Anzucht erfolgte im Brutschrank (CO₂-Auto-Zero Typ B 5061 EK-02; Heraeus, Hanau) bei 37°C, 90% relativer Luftfeuchtigkeit und mit 5% CO₂ angereicherter Luft. Nach ein paar Tagen konnten die Zellen in der Regel gesammelt werden. Hierfür wurden zum Ablösen der Zellen zunächst 4ml Trypsin-EDTA auf die Zellen gegeben und nach einer fünfminütigen Inkubationszeit 10ml RPMI-Medium hinzugefügt. Die Zellen wurden dann anschließend mit 450g zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Zellpellet mit RPMI oder PBS resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Die so gewonnenen Tumorzellen konnten nun eingefroren, weitergezüchtet oder für die Versuche verwendet werden.

2.3. Genexpressionsanalyse

2.3.1. RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung wurde der Nucleospin RNA II Kit der Fa. Macherey-Nagel, 52355 Düren verwendet. Die Isolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Dabei wurde ein Teil der Lungengewebsproben (20-30mg) mit 600µl Lysepuffer (RA1 mit 1% β-Mercaptoethanol) versetzt und eine Minute lang homogenisiert (Homogenisator OMNI 2000). Das Homogenisat wurde dann in Anwesenheit chaotroper Salze auf eine Säule, die eine Siliziumdioxidmembran enthält, aufgetragen und mittels Zentrifugation gewaschen. Die gebundene totale RNA wurde dann mit RNase freiem dH₂O eluiert. Die so gewonnene RNA-Lösung wurde bei -80°C gelagert.

Zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration wurde die Absorption der RNA-Lösung in einem Photometer bei einer Wellenlänge von $\lambda=260\text{nm}$ bestimmt. 1 AU entsprach dabei einer Konzentration von 40µg/ml RNA. Eine Beurteilung der Reinheit der gelösten RNA war

mit Hilfe der Bestimmung des Absorptions-Quotienten A260/A280 möglich. Hier galten Werte von 1,9-2,1 als Nachweis reiner RNA. Die Qualität der RNA wurde durch Agarose-Gelelektrophorese anhand der UV-Detektion gesichert. Dabei wurden 10µl RNA-Lösung mit 2µl Ladepuffer gemischt und in einem 1%igen Agarosegel getrennt. Die Auftrennung erfolgte bei einer Stromstärke von 90mA.

Es schloss sich die cDNA-Synthese und die PCR an, die nach den Standardprotokollen durchgeführt wurde.

2.3.2. cDNA-Synthese

Bestandteile eines Ansatzes für die cDNA-Synthese (30µl) waren: 1µl Oligo p(dT)15-Primer 45µM, 6µl 5x First-Strand-Puffer, 1µl M-MLV Reverse Transkriptase 200U/µl, 1,5µl dNTP-Mix je 10mM, 1µl RNase-Inhibitor 30U/µl sowie 2µg totaler RNA in 19,5µl H₂O. Diese Lösung wurde für 3min auf 75°C erwärmt und dann auf Eis abgekühlt.

Danach wurde das Gemisch 1h bei 37°C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde es 10 min bei 95°C inkubiert. Die so synthetisierte cDNA wurde dann bei -80°C gelagert.

2.3.3. PCR

Die PCR wurde nach den Standardprotokollen durchgeführt.

Bestandteile eines Ansatzes für die Polymerasen-Ketten-reaktion (50µl) waren: 5µl 10x NH₄ Puffer, 1,5µl 50mM MgCl₂ Puffer, 0,2µl PANscript Polymerase 5U/µl, 0,5µl dNTP-Mix je 10mM, je 1µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer 20µM, 37,8µl dH₂O und 3µl cDNA-Lösung.

Nach einer initialen Denaturierung der Probe bei 94°C für 60 Sekunden, wurden 20 bis 45 Zyklen mit 45s Denaturierung bei 94°C, 45s bei der Annealing mit primerspezifischer Temperatur (bei Fragmenten >1 kbp: 1 min/1 kbp) und 60s Extension bei 72°C durchgeführt. Die Reaktion erfolgte auf dem Robocycler der Fa. Stratagene.

Verwendet wurden folgende Primer:

Pmel/Si (GeneID 20431) 5-ctggagtcgggctcagtcac/5-cagaaggccttggtgggtgtg

TF/F3 (GeneID 14066) 5-gtgacctgggctatgaagc, 5-cgcagggtgaggaatgtacc

CD4 (GeneID 12504) 5-gattctggggcagcatggca, 5-ctgtcaagggggttagagacc

CD8 (Gene ID 12525) 5-gatgctcttggtcttccag, 5-cagcactggcttgtagtag

NKG2D (Gene ID 27007) 5-gacctcaagccagcaaagtg, 5-aggaagcttggtctctggctc

Perforin (Gene ID 18646) 5-ctgaatgggctcacagctga, 5-ctctgtcgtgggcagcagtc

Granzym (Gene ID 14938) A 5-ggtgttgactgctgcccact, 5-ggtcccctgcacaaatcatg

2.3.4. cDNA-Arrays

Die Genexpression wurde mit bead-basierten cDNA-Arrays nach dem Protokoll der Herstellerfirma (Illumina, San Diego, USA) untersucht.

Dafür wird zunächst mRNA aus dem Gewebe isoliert und zu einer biotinmarkierten cDNA transkribiert. Auf den Beads findet die spezifische Hybridisierung der Sonden mit den komplementären Zielsequenzen statt. Ungebundene Nukleinsäuren werden dann durch stringentes Waschen entfernt. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden mithilfe eines Lasers zur Emission angeregt und die erzeugten Signale werden durch einen hochauflösenden Scanner gemessen. Somit wird ein Bild generiert, welches die Signalintensitäten aller Sonden beinhaltet und mit einer speziellen von der Herstellerfirma entwickelten Software ausgewertet wird. Nach der Hintergrund-Subtraktion wird eine globale Normalisierung durchgeführt. Die Daten werden in relative light units (RLU) angegeben und gelten als positiv (P) in der Regel wenn sie >150 RLU sind.

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden die Tumorzellen auch in FACS mit fluoreszierenden Antikörpern gegen CD51, CD44, CD62P und CD62L der Fa. Becton-Dickinson, Heilderberg inkubiert. Als Kontrolle wurden FITC markierte Maus-IgG derselben Firma benutzt.

2.4. Die prokoagulatorische Aktivität

Zum Nachweis der PCA wurde der Umsatz eines Modellsubstrates, Val-Pro-Arg-Amino-4-Methyl-Coumarin (Bachem, Weil, Deutschland) gemessen. Diese Substanz wird durch die Protease Thrombin an der spezifischen Erkennungssequenz Gly-Pro-Arg↓ gespalten, wodurch die fluoreszierende Endgruppe 7-Amino-4-Methyl-Coumarin (AMC) freigesetzt wird. Während das ungespaltene Substrat keine Fluoreszenz-Emission bei 460nm zeigt,

wird das freigesetzte AMC unter diesen Bedingungen zu einer starken Fluoreszenzemission angeregt. Das zeitabhängig anwachsende Fluoreszenzsignal ist somit direkt mit der proteolytischen Aktivität des Thrombins korreliert.

Getestet wurden adhärente, frei suspendierte, vitale und apoptotische Tumorzellen (1×10^5 pro Well). Apoptose wurde durch Inkubation mit Staurosporin ($1 \mu\text{M}$ für 24h) erreicht (73). (Fa. Merck/Calbiochem # 569397)

Als Thrombinquelle diente Citratplasma, von welchem $50 \mu\text{l}$ pro Well zu den Zellen gegeben wurden.

Die Messung der Fluoreszenz erfolgte in einem FLUOStar Optima Fluorimeter (BMG Labtech, Offenburg, Germany). Dieses pipettiert das AMC-Substrat ($10 \mu\text{M}$) sowie CaCl_2 (2mM) zur Rekalzifizierung der Probe und misst dann alle zwei Minuten die Fluoreszenz bei 460nm . Die Mittelwerte in RLU aus jeweils drei Versuchen wurden dann in Kurven dargestellt.

2.5. Bindung von Tumorzellen und Plättchen

2.5.1. Blutentnahme am Spendertier

Für die Isolierung von Thrombozyten wurden Vollblutproben durch offene Herzpunktion bei äther-narkotisierten Mäusen mit einer Einmalkanüle (20 Gauge) in einer Heparin-versetzten 2ml Spritze gewonnen. In der Spritze waren jeweils $200 \mu\text{l}$ Alsever Puffer Lösung ($41,0 \text{g}$ Glukose-Monohydrat, 16g tri-Natriumcitrat-Dihydrat, $1,1 \text{g}$ Zitronensäure-Monohydrat, $8,4 \text{g}$ Natriumchlorid, pH 6,2; Apotheke Klinikum Innenstadt der Universität München) und $15 \mu\text{l}$ Prostaglandin E2 (1mg/ml ; Sigma) aufgezogen. Letzteres verhindert die in vitro Aktivierung der Thrombozyten, ohne jedoch eine irreversible Hemmung zu bewirken.

2.5.2. Isolierung und Markierung der Thrombozyten

Aus Vollblutproben wurde mittels langsamer Zentrifugation (100g in der Sorvall RC5C, Rotor HB4) plättchenreiches Plasma (PRP) gewonnen. Aus PRP wurden mittels schnellerer Zentrifugation (400g in der Sorvall RC5C, Rotor HB4) die Plättchen isoliert. Die Konzen-

tration der Thrombozytensuspension wurde mittels ACT Counter (Coulter Corp, Miami, USA) bestimmt.

Die Fluoreszenzmarkierung von Thrombozyten erfolgte nach dem von Massberg et al. etablierten und durch Manegold 2003 modifizierten Protokoll (74). Zur Markierung wurde Carboxyfluorescein-diazetat-Succinimidylester (CFDA-SE, Molecular Probes/Invitrogen) eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine nicht-fluoreszierende Substanz, die in die Zelle diffundiert und stabile CFSE Fluorophoren nach esterasevermittelter Katalyse bildet (Absorptionspeak 492 nm; Emissionspeak 518 nm). Die intrazellulären Fluorophore reagieren mit Lysinresiduen der Proteine und bleiben dann innerhalb der Zelle solange die Membran intakt ist. Der Einsatz dieser Substanz bietet gegenüber anderen Farbstoffen den Vorteil einer lang anhaltenden Markierung über mehrere Stunden.

1×10^7 Thrombozyten wurden jeweils mit $50 \mu\text{M}$ CFDA-SE über 30 Minuten im Dunkeln bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die markierten Zellen dreimal im PBS ausgewaschen, um sicherzustellen, dass es zu keiner Weitergabe der Fluoreszenz kommt. Vor der Durchführung der Versuche wurde durchflusszytometrisch sichergestellt, dass es bei den so gewonnenen, markierten und gewaschenen Plättchen zu keiner Aggregation kam.

2.5.3. Inkubation von Thrombozyten und Tumorzellen

1×10^7 markierte Thrombozyten wurden in Röhrchen unter langsamer Rotation jeweils alleine oder mit 2×10^5 Tumorzellen über unterschiedliche Zeiträume inkubiert (10 Minuten, 30 Minuten, 1 Stunde, 1,5 Stunden, 2 Stunden). In einigen Versuchsreihen wurde Thrombin ($0,5$ und $1 \text{ U}/\mu\text{l}$) dazugegeben.

2.5.4. Durchflusszytometrie

Um die Auswirkungen der Inkubation der Tumorzellen mit den markierten Thrombozyten zu untersuchen, wurden *in vitro* Analysen mittels Durchflusszytometrie (FACScan) durchgeführt.

Die Messungen erfolgten am FACSort flow cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg). Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe der CELLQuest Software (Becton Dickinson) aufgearbeitet und graphisch dargestellt.

2.6. Bindung von Fibrinogen

1×10^5 Tumorzellen in $100 \mu\text{l}$ PBS wurden über 30 Minuten mit $10 \mu\text{g/ml}$ Alexa Fluor 594 markiertem Fibrinogen (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in Anwesenheit von 2mM Ca^{2+} inkubiert. Am Ende der Inkubation wurden Proben auf einen Objektträger gegeben und mikroskopisch ausgewertet. Dies erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Carl-Zeiss, Halbergmoos Deutschland).

2.7. In vivo Versuche

2.7.1. Metastasenmodell

Es wurden jeweils 2×10^5 in $100 \mu\text{l}$ RPMI Medium suspendierte Zellen in eine der beiden seitlichen Schwanzvenen eines Versuchstiers injiziert. Dabei wurde sorgfältig darauf geachtet, dass das gesamte Volumen von $100 \mu\text{l}$ streng venös appliziert wurde. Bei einem Volumen von $100 \mu\text{l}$ ist dies gut kontrollierbar, da dies sehr schwer paravasal injiziert werden kann. Tiere, bei denen eine Widerstandserhöhung festgestellt wurde, die auf eine nicht korrekte Injektion hinweist, wurden aus dem Versuch genommen.

Nach Ablauf von zehn Tagen wurden die Versuche beendet. Dazu wurden die Tiere narkotisiert und durch Überstreckung der Halswirbelsäule getötet.

2.7.2. Tumorstimulation-Modell

Zunächst wurden die Spendertiere immunisiert und aus deren Lymphknoten die spezifischen T-Zellen gewonnen. Die mit GM-CSF transfizierten D5-G6 Zellen wurden aus den Flaschen abtrypsiniert, mit PBS gewaschen und auf 2×10^7 Zellen/ml eingestellt. Zur Immunisierung der Spendertiere wurden je 1×10^6 D5-G6 subkutan an den vier Extremitäten der Mäuse gegeben. Acht Tage später wurden die Spendertiere narkotisiert und getötet. Die drainierenden Lymphknoten wurden entnommen und daraus mittels eines

Homogenisators eine Einzelzellsuspension hergestellt. Nach einem Waschvorgang wurden die Zellen in der Neubauer-Zählkammer gezählt und in komplettem Medium plus Gentamycin 50µg/ml auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden in einer 24-well Platte mit anti-CD3 (Clon 2C11 als Aszites, 50µl pro 2ml enthaltende Well, d.h. 1/40 verdünnt) über zwei Tage stimuliert. Anschließend wurden die Lymphozyten gewaschen, auf eine Konzentration von 2×10^5 /ml eingestellt und mit 60IU rekombinantem humanem IL-2/ml (Chiron/Novartis) für drei weitere Tage expandiert. Dann wurden die Zellen geerntet, in PBS gewaschen, gezählt und für den adoptiven Transfer benutzt.

2.7.3. Fütterung mit dem gpIIb/IIIa-Inhibitor

Für die Blockade des gpIIb/IIIa Rezeptors wurde EMD 122347 (Gantofiban) verwendet. Dieses wurde in einer Dosierung von 2mg/Tier/Tag in 0,1ml PBS-Gummi Arabicum 1%ige Lösung per Magensonde verabreicht.

Die Dosierung von 2mg wurde vom Hersteller Merck empfohlen. In dieser Dosierung (ca. 100mg/kg) wird eine effektive Konzentration von 3 µg/ml Blut erreicht. Diese Konzentration ist nicht toxisch (bis 1000mg/kg KG) und ist 10x höher als die IC50 für die Blockade der durch TRAP (Thrombin Rezeptor aktivierende Peptid) induzierten Thrombozytenaggregation, wie aus der Publikation von Dickfeld et al. (75) errechnet wurde.

Die EMD 122347-Gummi Arabicum Mischung wurde für jeden Versuch frisch vorbereitet und bis zum Ende des Versuches im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Für die Applikation der Magensonde wurden die Tiere in eine leichte Äthernarkose versetzt. Diese sollte so flach sein, dass der Schluckreflex erhalten bleibt. Die Magensonde wurde oral eingeführt. Zur Sicherung diente das widerstandslose Gleiten des Schlauches für eine Länge von circa 4-5cm. Nach der Gabe wurde die Sonde entfernt und die Maus nur dann wieder in den Käfig gestellt, wenn kein Erbrechen beobachtet wurde und sie wach genug war, sich kontrolliert zu bewegen.

2.7.4. Versuchsprotokolle

Die Verabreichung von EMD begann einen Tag vor der Tumorgabe und wurde täglich bis zum Tag der T-Zell-Gabe weitergeführt. Am Tag 0 bekamen die Mäuse jeweils 2×10^5 Tumorzellen über die Schwanzvene verabreicht. In einer Versuchsreihe wurden am Tag 0 lediglich 1×10^5 Tumorzellen intravenös gegeben, bei gleichbleibender Zahl an T-Zellen.

Mit derselben Technik erfolgte die langsame Verabreichung von $3,5 \times 10^7$ spezifischen T-Zellen. Dies erfolgte je nach Versuchsreihe am Tag 4, 5 oder 6.

Sowohl bei der Tumorzellgabe als auch bei der T-Zell-Gabe kam es zu keinen thromboembolischen Ereignissen, trotz sehr großer Zellmengen. Um diese Komplikation zu vermeiden, wurden die Zellen stets unmittelbar vor der Injektion durch mehrmaliges Pipettieren in Suspension gehalten.

Zur Stimulation der verabreichten T-Lymphozyten wurden ab dem ersten Tag nach der Immuntherapie 90.000 Einheiten IL-2 täglich intraperitoneal injiziert.

2.7.5. Lungenentnahme und Metastasenzählung

Zur Entnahme der Lungen wurden die Tiere mit Äther tief narkotisiert und durch Überstreckung der Halswirbelsäule getötet. Der Thorax wurde eröffnet, eine Lunge am Hilus abgesetzt, in PBS ausgewaschen und in ein Eppendorfröhrchen überführt. Unmittelbar danach erfolgte die Verblindung, indem die Lungen aus den beschrifteten in neue Röhrchen umgesetzt wurden, die mit Buchstaben des Alphabets bezeichnet waren.

Jede Lunge wurde dann auf beiden Seiten mit einer Digitalkamera fotografiert. Um die gesamte Oberfläche scharf darzustellen, wurden die Organe auf den Boden einer Petrischale gelegt und durch die umgekehrte Schale fotografiert, an der sie problemlos gut hafteten. Es wurden dann digital Fotos von beiden Seiten aufgenommen auf den Rechner übertragen und gespeichert. Die Digitalbilder wurden am Computer ausgewertet. Mit Hilfe eines über das Bild gelegten Gitternetzes wurden die durch die Melaninpigmentierung deutlich sichtbaren Metastasen gezählt. Als Metastasenzahl galt die Summe aus Vorder- und Hinterseite der Lunge.

Die Auszählung erfolgte verblindet und wurde jeweils zweimal wiederholt. Die untenstehende Abbildung zeigt ein Bild, wie es für die Auswertung benutzt wurde.

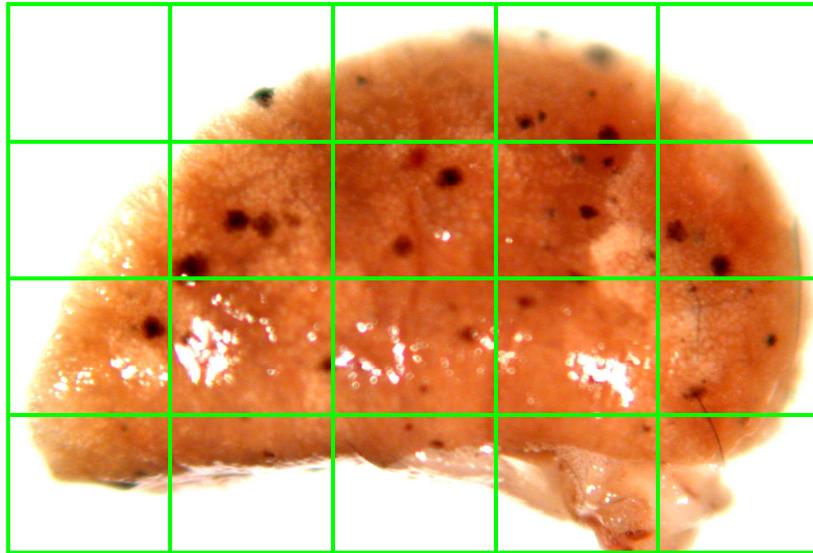


Abbildung 1: Gittermuster für die Auszählung der Lungenmetastasen.

Die Abbildung wurde mit der Digitalkamera aufgenommen und in den Rechner übertragen. In Photoshop wurde das Bild mit dem angezeigten Raster überlagert, um die Auszählung zu erleichtern.

Im Folgenden sind die Protokolle zu den Versuchen mit dem Transfer am Tag vier als Tabelle wiedergegeben.

	Gruppe 1 N=6	Gruppe 2 N=10	Gruppe 3 N=5	Gruppe 4 N=11
Tag -1			EMD 122347	EMD 122347
Tag 0 TUMORGABE			EMD 122347	EMD 122347
Tag 1			EMD 122347	EMD 122347
Tag 2			EMD 122347	EMD 122347
Tag 3			EMD 122347	EMD 122347
Tag 4		T-ZELL-GABE + IL-2		T-ZELL-GABE + IL-2
Tag 5		IL-2		IL-2
Tag 6		IL-2		IL-2
Tag 7		IL-2		IL-2
Tag 8		IL-2		IL-2
Tag 9		IL-2		IL-2
Tag 10 LUNGENENTNAHME				

Tabelle 2: T-Zell-Transfer vier Tage nach Tumorgabe – Versuchsschema.

Wenn die Verabreichung der Immuntherapie am Tag sechs nach Tumorgabe (doppeltes therapeutisches Fenster im Vergleich zum Modell) begonnen wurde, sah das Protokoll folgendermaßen aus:

	* auf dieser Kontrolle wurde verzichtet	Gruppe 1 N=7	Gruppe 2 N=9	Gruppe 3 N=7
Tag -1			EMD 122347	EMD 122347
Tag 0	TUMORGABE		EMD 122347	EMD 122347
Tag 1			EMD 122347	EMD 122347
Tag 2			EMD 122347	EMD 122347
Tag 3			EMD 122347	EMD 122347
Tag 4			EMD 122347	EMD 122347
Tag 5			EMD 122347	EMD 122347
Tag 6		T-ZELLGABE + IL-2		T-ZELLGABE + IL-2
Tag 7		IL-2		IL-2
Tag 8		IL-2		IL-2
Tag 9		IL-2		IL-2
Tag 10	LUNGENENTNAHME			

Tabelle 3: T-Zell-Transfer sechs Tage nach Tumorgabe – Versuchsschema.

2.8. ELISA

Zum spezifischen Nachweis von Zytokinen und Proteinen kam die ELISA-Methode zur Anwendung. Es wurden die kommerziell erhältlichen Quantikine Mouse TGF- β , TNF- α , CXCL-12 und VEGF-a Immunoassays von R&D-Systems nach den Angaben der Herstellerfirma verwendet. Die detaillierten Protokolle für die Durchführung des Tests mittels R&D-Kit sind unter den folgenden Links einsehbar:

<http://www.rndsystems.com/pdf/mb100b.pdf>

<http://www.rndsystems.com/pdf/mta00.pdf>

<http://www.rndsystems.com/pdf/mcx120.pdf>

<http://www.rndsystems.com/pdf/mmv00.pdf>

2.9. Statistische Auswertung der Daten

Die gesamte Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mit Hilfe der Computersoftware Sigma Plot 11.0.

Die Mittelwerte der einzelnen Messungen errechnen sich aus der Anzahl der Versuchstiere pro Versuchsgruppe und sind mit \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

Zum Vergleich der Gruppen untereinander wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet, gefolgt vom Mann-Whitney-U-Vergleich.

Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0.05$ festgelegt.

III. ERGEBNISSE

3.1. Hämatogene Metastasierung von B16D5 Tumorzellen

Nach Gabe von 2×10^5 B16D5 Melanomzellen über die Schwanzvene entwickelten sich innerhalb von zehn Tagen makroskopisch deutlich sichtbare Metastasen in den Lungen der Versuchstiere. Durchschnittlich handelte es sich um mehr als 200 Läsionen pro Lungenflügel.

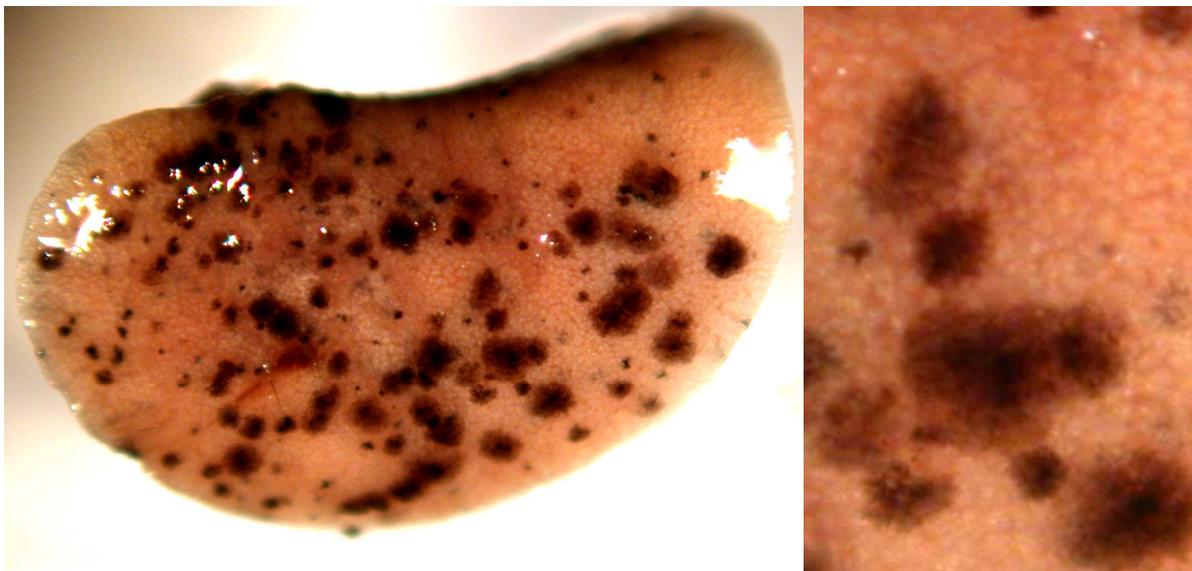


Abbildung 2: Lungenmetastasen des B16 Melanoms.

Das Bild links zeigt eine Seite einer Lunge (ca. 2cm groß), zehn Tage nach intravenöser Tumorgabe. Rechts ist eine 20fache Vergrößerung einiger Läsione zu sehen.

Bei der Darstellung der metastasierten Lunge fallen sowohl große als auch kleinere Läsionen auf. Es ist dabei unwahrscheinlich, dass jede Metastase die Folge der Proliferation einer einzigen Tumorzelle ist. Vielmehr ist anzunehmen, dass Zellen in unterschiedlicher Zahl in den Kapillaren der Lunge hängenbleiben. Wie es zu dieser ersten Ansiedlung der Tumorzellen kommt ist jedoch unklar.

Eine Möglichkeit besteht darin, dass die Tumorzellen mittels spezifischer Adhäsionsmoleküle an dem Endothel der Lungengefäße adhäreren und dann auswandern.

Daher wurden die verwendeten Tumorzellen in einem cDNA-Array auf sämtliche bekannte Adhäsionsmoleküle untersucht. Die angefügte Tabelle zeigt das Ergebnis für ausgewählte und für die Adhäsion relevante Moleküle.

Symbol	Genname	CD-Name	Mittelwert (RLU)	D5-K call
Itgav	Integrin alpha V	CD 51	175,56	P
Itgalb	Integrin alpha IIb	CD 41	97,88	A
Itgam	Integrin alpha M	CD 11b	72,53	A
Itgb1	Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)	CD 29	4725,22	P
Itgb2	Integrin beta 2	CD 18	77,44	A
Itgb3	Integrin beta 3	CD 61	90,57	A
Itgb6	Integrin beta 6		98,16	A
Selp	Selectin, platelet	CD62P	108,67	A
Icam1	Intercellular adhesion molecule	CD 54	92,55	A
CD36	CD 36 antigen		70,88	A
Sele	Selectin, endothelial cells	CD 62E	102,85	A
Selpl	Selectin, platelet (p-selectin) ligand	CD162	78,28	A
Sell	Selectin lymphocyte	CD 62L	63,74	A
Itga4	Integrin alpha 4	CD 49d	86,01	A
Vcam1	Vascular cell adhesion molecule 1	CD 106	117,24	A
Pecam1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule	CD 31	84,03	A
L1 cam	L1 adhesion molecule		96,99	A

Tabelle 4: Expression von Adhäsionsmolekülen und Integrinen in B16D5 Zellen in einem cDNA-Array. Die Ergebnisse sind in relative light units (RLU) angegeben und geben den Mittelwert aus drei unabhängigen Analysen wieder. P=present, A=absent.

Von den getesteten Adhäsionsmolekülen konnten im cDNA-Array nur CD51 und CD29 mit einer Signalhöhe von 175 bzw. 4725 RLU nachgewiesen werden.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurden die Tumorzellen auch in FACS mit Antikörpern gegen unterschiedliche Adhäsionsmoleküle getestet. Dabei wurden sie mit fluoreszierenden Antikörpern gegen CD51, CD44, CD62P und CD62L inkubiert. Als Kontrolle wurden FITC markierte Maus-IgG benutzt. Von den getesteten Markern war nur CD51 positiv. Die angefügte Abbildung stellt das Ergebnis der Inkubation der B16D5 Tumorzellen mit dem CD51 Antikörper dar.

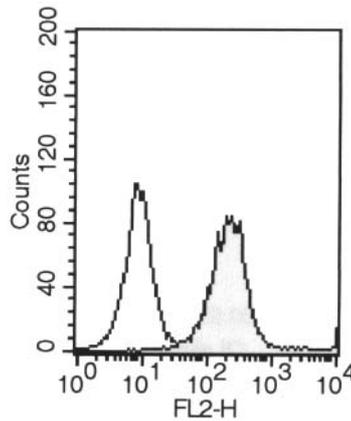


Abbildung 3: Expression des CD51 Rezeptors in der FACS Analyse. FITC markierte Maus-IgG-Antikörper dienen als Kontrolle. Die Anzahl der Zellen ist gegen die Fluoreszenz aufgetragen.

Dabei bestätigt sich die Expression des CD51-Rezeptors auf den Tumorzellen. Das CD51/CD29 Heterodimer kann Fibronectin, Vitronectin und Fibrinogen binden. Diese befinden sich jedoch nicht auf dem unstimulierten Endothel. Es ist somit klar, dass andere Mechanismen neben der direkten rezeptorvermittelten Adhäsion eine Rolle in der Ansiedlung der Tumorzellen in den Lungen spielen müssen.

Aus der Literatur ist zu entnehmen, dass die Tumorzellen in vivo unmittelbar nach der Injektion Aggregate bilden (76;77). Da keine homotypischen Moleküle bekannt sind, muss diese Aggregatbildung durch andere Faktoren vermittelt werden. Hierfür kommen Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren in Frage. Es ist sowohl möglich, dass diese Aggregate in den kleinen Kapillargefäßen der Lunge mechanisch stecken bleiben als auch dass die Gerinnung oder die Thrombozyten die Ansiedlung der Tumorzellen in den Lungen vermitteln. Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit zunächst untersucht, ob die Tumorzellen eine Gerinnungsaktivierung und eine Bindung von Thrombozyten bewirken können.

3.2. Aktivierung der Gerinnung durch B16D5 Tumorzellen

Welche Faktoren können nun zu einer Aktivierung der Gerinnung führen? Neben den plasmatischen Gerinnungsfaktoren ist dies vor allem durch den Faktor 3 (Tissue Factor) im

extrinsischen System der Gerinnung vermittelt. Die Genanalyse im cDNA-Array lieferte eine hohe Expression des F3. Damit ist eine Voraussetzung für die Aktivierung des Gerinnungssystems gegeben.

Symbol	Genname	CD-Name	Mittelwert (RLU)	D5-K call
F3	Coagulation factor 3	TF	762,72	P

Tabelle 5: Tissue Factor-Expression durch B16D5 Tumorzellen in cDNA-Array. Es zeigt sich ein hohes Signal als Hinweis auf Tissue Factor Expression durch die B16D5 Tumorzellen.

Der Befund aus dem Gen-Array konnte auch in der RT-PCR bestätigt werden. Wie das unten angefügte Bild zeigt, konnte bereits bei 25 Zyklen ein deutliches Amplikon erreicht werden.

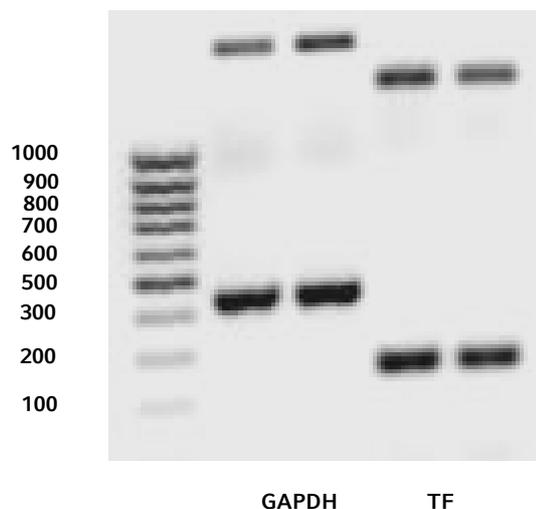


Abbildung 4: Tissue Factor Expression von zwei unterschiedlichen Chargen von B16-Zellen. Darstellung eines 1% Agarosegels. Die oberen Bande entsprechen 25, die unteren 30 Zyklen. Als Kontrolle wurde GAPDH verwendet (18/23 Zyklen).

Es zeigt sich, dass Tissue Factor von den D5 Tumorzellen exprimiert wird. Dieser Koagulationsfaktor, auch Thromboplastin oder CD142 genannt, wird normalerweise von Fibroblasten und glatten Muskelzellen produziert. Es wird dann durch die Oxidoreduktase PDI (protein disulfid isomerase) aktiviert, die an Verletzungsstellen der Endothelien von

adhärenten Plättchen und Endothelzellen sezerniert wird (78) und es kommt dann über die Gerinnungskaskade zur Thrombinaktivierung und Fibrinbildung.

Um zu prüfen, ob der durch die B16D5 Tumorzellen produzierte Tissue Factor auch funktionell und somit in der Lage war, Thrombin zu aktivieren, wurde die prokoagulatorische Aktivität (PCA) der Tumorzellen getestet.

Dazu wurde zu den Tumorzellen das Substrat Val-Pro-Arg-Amino-4-Methyl-Coumarin gegeben, das von Thrombin an der spezifischen Erkennungssequenz Gly-Pro-Arg↓ gespalten wird. Durch diese Spaltung wird die fluoreszierende Endgruppe 7-Amino-4-Methyl-Coumarin (AMC) freigesetzt. Das zeitabhängig anwachsende Fluoreszenzsignal bei 460nm korreliert dabei direkt mit der proteolytischen Aktivität des Thrombins. Kurz vor der Analyse wurden zu den Tumorzellen als Thrombinquelle Citratplasma und Kalziumchlorid zur Rekalzifizierung vom Gerät gegeben. Als Kontrolle wurde Plasma ohne Tumorzellen getestet.

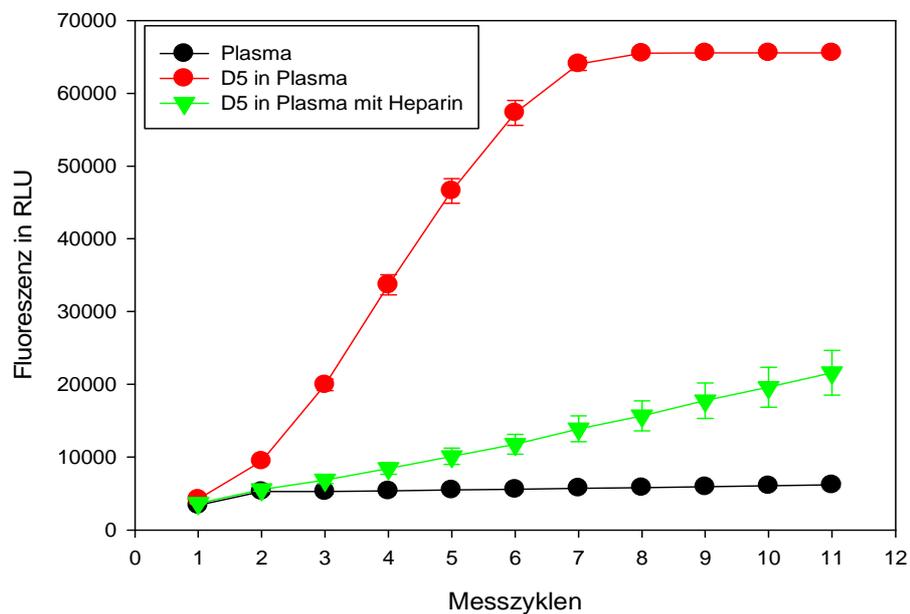


Abbildung 5: Thrombinaktivierung durch die B16D5 Tumorzellen – prokoagulatorische Aktivität (PCA). In schwarz dargestellt ist die Kontrolle (Citratplasma). In rot sind die Thrombinaktivierungswerte, die durch B16D5 Tumorzellen in Citratplasma erreicht wurden. Die in grün dargestellte Linie zeigt die Werte, die von den B16D5 Tumorzellen im Citratplasma erreicht wurden, wenn Heparin zugegeben wurde. Alle Werte sind als Mittelwert aus drei unabhängigen Analysen \pm Standardfehler angegeben.

Wie in Abbildung 5 gezeigt, können die D5 Tumorzellen das im Plasma enthaltene Prothrombin zu Thrombin aktivieren. Dieser Effekt kann durch Heparin-Zugabe inhibiert werden. Damit sind die Tumorzellen in der Lage, in vivo die Gerinnung zu aktivieren.

Die prokoagulatorische Aktivität der Tumorzellen wurde dann unter unterschiedlichen Bedingungen getestet. Dabei interessierte vor allem die Frage, ob die Tumorzellen direkt nach der intravenösen Gabe, nach ihrer Adhäsion oder in Folge von apoptotischen Vorgängen und ADP-Freisetzung Thrombin am stärksten aktivieren. Dazu wurden diese drei Zustände reproduziert. So wurde das Verhalten von adhärenenten, von frei in PBS suspendierten und von durch Staurosporininkubation in Apoptose geführten Zellen verglichen. Zu jeder Gruppe wurden ebenfalls unmittelbar vor der Analyse Citratplasma, als Thrombinquelle und Ca-Cl_2 zu Rekalzifizierung dazu gegeben. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in folgender Abbildung wiedergegeben.

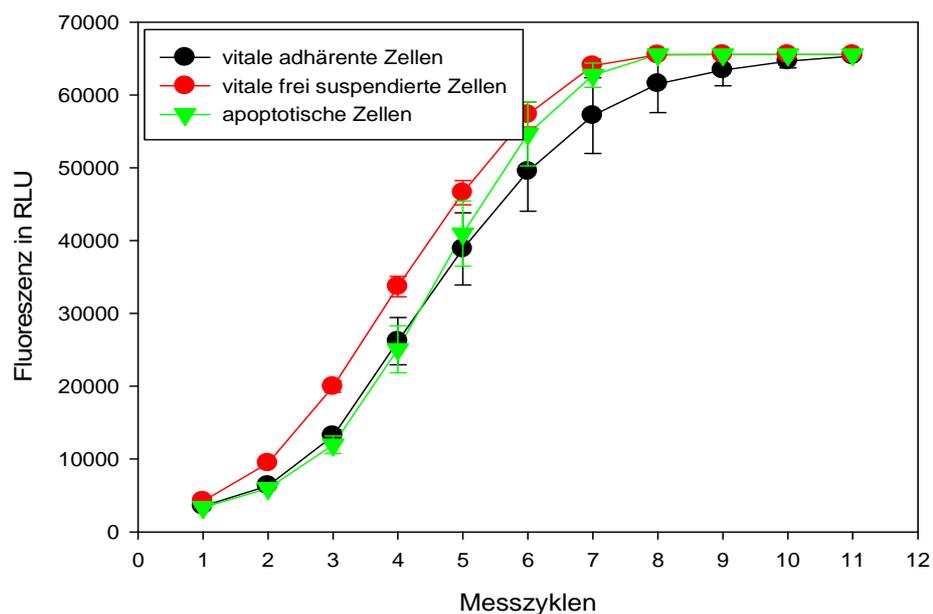


Abbildung 6: Thrombinaktivierung durch vitale frei suspendierte, vitale adhärenente und apoptotische B16D5 Tumorzellen, gemessen als prokoagulatorische Aktivität (PCA).

Die roten Kreise stellen frei in PBS suspendierte Zellen dar. Die vitalen, an der Platte adhärenenten Tumorzellen sind durch schwarze Kreise repräsentiert. Die apoptotischen Tumorzellen hingegen sind als grüne Dreiecke symbolisiert. Alle Werte sind der Mittelwert aus drei unabhängigen Analysen \pm Standardfehler.

Die Abbildung zeigt, dass die B16D5 Tumorzellen in allen geschilderten Zuständen Thrombin direkt aktivieren können. Das Ausmaß dieser Aktivierung war in allen drei Gruppen ähnlich. Die Gabe von 10µl Heparin (1:10) konnte in jedem der genannten Versuche diesen Effekt hemmen.

Damit ist klar, dass es nach Injektion von D5-Tumorzellen in die Blutbahn der Maus zu einer Thrombinaktivierung kommt, die direkt von den Tumorzellen verursacht wird. Damit besteht die Vermutung, dass die Tumorzellen Aggregate bilden und so in der Endstrombahn leicht stecken bleiben können. Die Thrombinaktivierung kann in vitro durch Heparin-Gabe blockiert werden.

In der physiologischen Gerinnungskaskade führt die Aktivierung des Thrombins zur Spaltung des im Blutplasma gelöst vorliegenden Fibrinogens in Fibrin, welches sich zu unlöslichen Fibrin-Polymeren zusammenlagert. Parallel kann Thrombin auch über den Thrombinrezeptor die Aggregation von Thrombozyten induzieren. Da die B16D5 Tumorzellen sich in der Lage zeigten, funktionellen Faktor 3 zu produzieren und somit Thrombin zu aktivieren, wurde die Fähigkeit der Tumorzellen getestet, die Thrombozytenadhäsion zu stimulieren.

3.3. Bindung von Thrombozyten durch B16D5 Tumorzellen

Es wurde die Fähigkeit der Tumorzellen getestet, Thrombozyten an sich zu binden. Dazu wurden die D5-Zellen und markierte Plättchen miteinander in vitro inkubiert und die Proben in einem FACS-Gerät analysiert.

Die Plättchen wurden aus Spendertieren mittels Herzpunktion gewonnen und markiert. Die CFDA-SE-Markierung der Thrombozyten basiert auf stabilen CFSE Fluorophoren, die nach esterasevermittelter Katalyse in der Zelle gebildet werden und innerhalb der Zelle bleiben. Der Einsatz dieser Substanz bietet gegenüber anderen Farbstoffen den Vorteil einer lang anhaltenden Markierung über mehrere Stunden, die nicht diffundiert und somit nicht auf die Tumorzellen übertragen werden kann. Außerdem wurde mittels Durchflusszytometrie

und Aggregometrie gezeigt, dass die Thrombozyten durch die Markierung nicht aktiviert werden und ihre volle Funktionalität behalten (79).

1×10^7 markierte Thrombozyten wurden in Röhrcchen unter langsamer Rotation jeweils alleine oder mit 2×10^5 Tumorzellen über unterschiedliche Zeiträume inkubiert (10 Minuten, 30 Minuten, 1 Stunde, 1,5 Stunden, 2 Stunden). Sowohl vitale als auch apoptotische Tumorzellen wurden getestet. Es wurden außerdem unterschiedliche Thrombin-konzentrationen (0,5-1 U/ μ l) dazu gegeben. Dabei zeigte sich mit steigender Thrombin-konzentration eine zunehmende Bildung von Aggregaten in den Proben, die die Analyse erschwerte. Eine Konzentration von 0,5 U/ μ l erschien für die Analyse optimal zu sein.

Zur Analyse der Thrombozytenbindung wurde das Auswertefenster im FACS um die D5-Tumorzelle gesetzt. Da diese nicht fluoreszenzmarkiert sind ergibt sich kein Signal im Fluoreszenzkanal. Dies wurde als Hintergrund festgelegt. Folgende repräsentative FACS-Analyse veranschaulicht dieses Ergebnis.

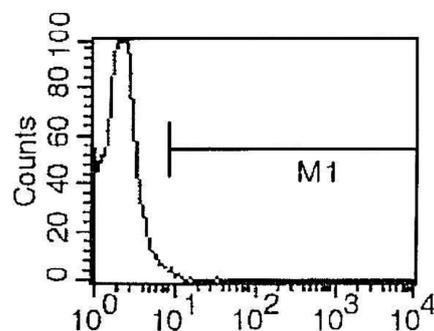


Abbildung 7: Bindung von Thrombozyten durch B16D5 Tumorzellen – FACS – Kontrolle. Auswertung der FITC Fluoreszenz.

Inkubiert man die B16 D5 Melanomzellen mit fluoreszierenden Thrombozyten, so binden diese und es entsteht folgendes Bild:

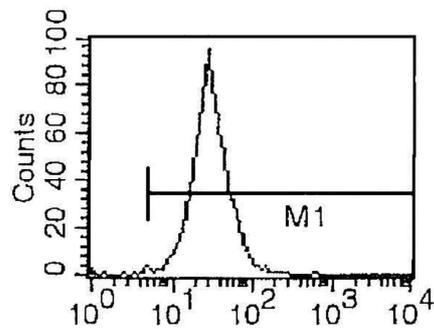


Abbildung 8: Bindung von Thrombozyten durch B16D5 Tumorzellen – FACS - Tumorzellen und markierte Thrombozyten.

Es kommt nach der Konkubation zu einem hohen Fluoreszenzsignal mit einem Peak um den Kanal 30. Das Signal kann nur von den markierten Thrombozyten kommen. Dies bedeutet, dass die B16D5 Melanomzellen und die Plättchen aneinander adhären.

Da eine große Anzahl an Tumorzellen im Rahmen des Metastasierungsprozess apoptotisch wird (metastatic inefficiency), wurde als nächstes getestet, welche Wirkung apoptotische Tumorzellen auf Thrombozyten ausüben. Dafür wurden mit Staurosporin behandelte B16 Melanomzellen und markierte Plättchen inkubiert. Folgendes Bild entstand aus der FACS-Analyse:

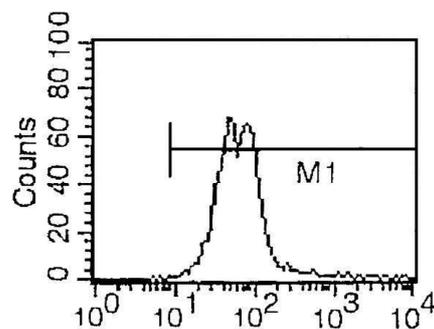


Abbildung 9: Bindung von Thrombozyten durch B16D5 Tumorzellen – FACS – apoptotische Tumorzellen und markierte Thrombozyten.

Dabei zeigte sich eine Zunahme des Signals durch Apoptose mit zwei Peaks, einmal um den Kanal 40 und einmal um den Kanal 80.

Als nächstes wurde getestet ob die Zugabe von Thrombin (0,5 U/ μ l) und somit die Aktivierung der Plättchen einen Effekt ausübt. Folgendes Bild entstand aus der FACS-Analyse.

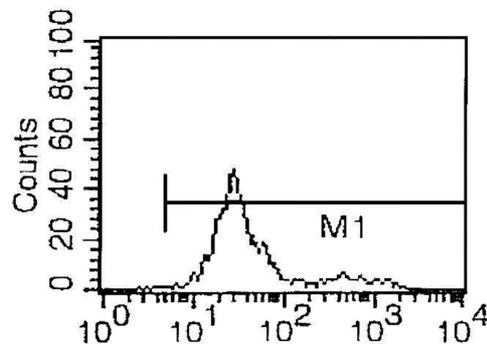


Abbildung 10: Bindung von Thrombozyten durch B16D5 Tumorzellen – FACS - Tumorzellen, markierte Thrombozyten und Thrombin.

Hierbei zeigte eine kleinere Gruppe von Zellen ein sehr hohes Signal (Kanal 102-103).

Zusammenfassend zeigte die FACS-Analyse nach Inkubation der B16 Melanomzellen mit den markierten Plättchen ein deutliches Fluoreszenzsignal. Dieses nahm unter Apoptose der Tumorzellen zu. Zudem kam es zu einem sehr hohen Signal in einer kleinen Gruppe von Tumorzellen nach Zugabe von Thrombin.

Das mit den Tumorzellen assoziierte Signal in der FACS-Analyse wird dadurch bedingt, dass eine große Anzahl von Thrombozyten an ihrer Oberfläche bindet. Die Intensität des Signals korreliert mit der Zahl von gebundenen Thrombozyten (80). Somit beobachtet man, dass die Adhäsionsstärke der Tumorzellen an den Plättchen steigt, wenn die Tumorzellen in die Apoptose geführt werden und wenn Thrombin dazu gegeben wird. In diesem Fall kam es sogar zu Schwierigkeiten bei der Auswertung, da es zur Verklumpung kam, so dass die Meßöffnung des FACS-Gerätes verlegt wurde.

Eine direkte Bindung der Tumorzellen an den bekannten Rezeptoren der Thrombozyten ist sehr schwer zu erklären, weil die B16D5 Tumorzellen über keine Plättchenrezeptoren verfügen, wie die oben dargestellte cDNA-Array Analyse bereits illustrierte. Neben der direkten Bindung an die Tumorzellen dürfte in vivo die indirekte Bindung von Plättchen über Fibronectin, Vitronectin und Fibrinogen eine wichtige Rolle spielen. So findet sich im

cDNA-Array ebenso wie in der FACS-Analyse als relevanter Rezeptor CD51/29, der die o.g. Substanzen bindet. Es wurde daher als nächstes untersucht, ob die B16D5 Tumorzellen auch in vitro Fibrinogen an sich binden können.

3.4. Bindung von Fibrinogen durch B16D5 Tumorzellen

Um diese Hypothese zu testen, wurden die Tumorzellen mit fluoreszierendem Fibrinogen in PBS inkubiert. Nach Inkubation wurden dann die Zellen mikroskopisch analysiert. Am Fluoreszenzmikroskop konnten mehrere an dem Alexa-Fibrinogen gebundene Tumorzellen dargestellt werden. Ein Beispiel davon ist in Abbildung 11 wiedergegeben:



Abbildung 11: Bindung von Fibrinogen durch B16D5 Tumorzellen. Doppelaufnahme Phasenkontrast/Fluoreszenz.

Das Bild, zeigt dass die B16D5 Tumorzellen an das Fibrinogen auch in Abwesenheit von Thrombin (der Versuch erfolgte in PBS) binden.

Die bislang dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die in dieser Arbeit angewendeten Tumorzellen Tissue Faktor exprimieren, Thrombin aktivieren und sowohl Thrombozyten als auch Fibrinogen, auch in Abwesenheit von Thrombin, an sich binden können. Da die

Tumorzellen lediglich den CD51/CD29 Rezeptor exprimieren ist es damit wahrscheinlich, dass die Bindung der Tumorzellen an Endothelzellen und auch an Thrombozyten durch das Fibrinogen überbrückt wird. An das Fibrinogen und aneinander binden die Thrombozyten über ihren gpIIb/IIIa Rezeptor. Damit bilden sich größere Aggregate von Tumorzellen, Thrombozyten und Fibrinogen, die in den Lungen hängen bleiben und die Adhäsion, das Überleben und die Extravasation der Tumorzellen so unterstützen, dass eine Metastase wachsen kann.

Damit stellt sich die naheliegende Frage, ob sich die Hemmung der Plättchenaktivierung und der Plättchenadhäsion negativ auf die Metastasierung auswirkt.

3.5. Metastasierung der B16D5 Tumorzellen unter Plättchenhemmung

Drei verschiedene Klassen der Thrombozytenfunktionshemmer stehen zur Verfügung: Acetylsalizylsäure, Thienopyridine und gpIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten. ASS hemmt die Thrombozytenaktivierung durch irreversible Blockierung der Thromboxansynthese. Die Thienopyridine, zu denen Clopidogrel gehört, hemmen die ADP-abhängige Thrombozytenaktivierung durch irreversible Blockierung des P2Y₁₂-Rezeptors. Zu den gpIIb/IIIa-Antagonisten, die die Thrombozyten-Fibrinogen-Vernetzung für die Plättchenaggregation hemmen, gehört EMD 122 347, auch Gantofiban genannt. Diese drei Substanzen wurden in einem Screeningversuch getestet. Dabei zeigte sich, dass die Blockade des gpIIb/IIIa Rezeptors zu der stärksten Metastasenreduktion führt. Deshalb wurde dieses Medikament, das uns freundlicherweise von der Firma Merck zur Verfügung gestellt wurde, in den folgenden Versuchen verwendet und den Mäusen täglich per Magensonde verabreicht. Mit der Behandlung wurde ein Tag vor der Tumorgabe begonnen, weil das Medikament erst dann aktiv ist, wenn es hepatisch verstoffwechselt wurde. Als wirksame Dosierung wurden 2mg/d/Tier verabreicht. Diese Dosierung ist 10x höher als die IC₅₀ für die Blockade der durch TRAP induzierten Thrombozytenaggregation, wie aus der Publikation von Dickfeld et al. (81) errechnet wurde.

Nach Gabe von Gantofiban zeigte sich, dass die Anzahl der Metastasen deutlich niedriger war als in der Kontrolle, wie Abbildung 12 veranschaulicht.

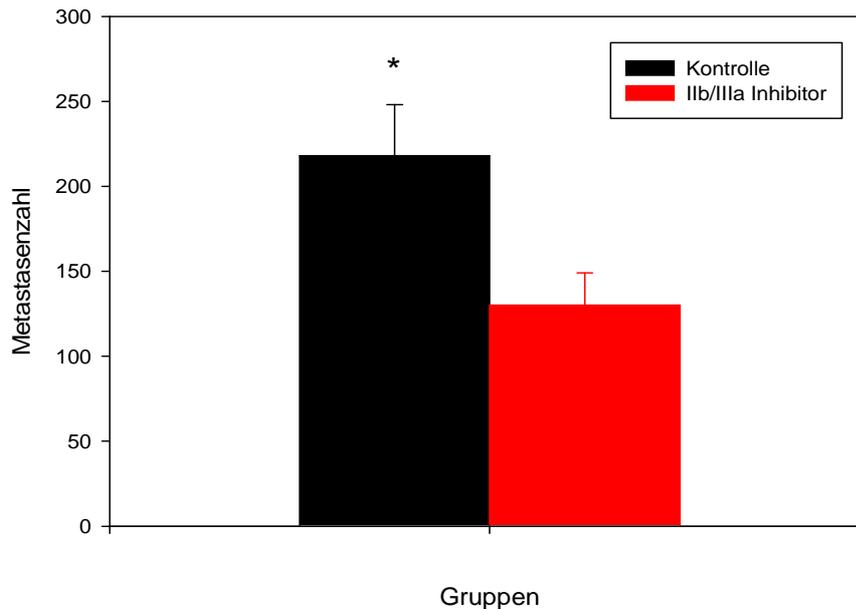


Abbildung 12: Metastasenreduktion durch Gabe des gpIIb/IIIa-Inhibitors Gantofiban.

Die schwarze Säule repräsentiert die durchschnittliche Metastasenanzahl in der Kontrollgruppe (n=10), die rote die durchschnittliche Metastasenanzahl in den mit Gantofiban über die ersten fünf Tage gefütterten Mäusen (n=10). Dargestellt ist der Mittelwert±Standardfehler. Der Unterschied zwischen den zwei Gruppen ist statistisch signifikant ($p < 0.05$).

Die Abbildung zeigt, dass eine fünftägige Behandlung mit dem gpIIb/IIIa Inhibitor Gantofiban eine erhebliche Reduktion der Metastasenanzahl erzielen konnte: in dieser Gruppe entwickelten sich durchschnittlich 130 Metastasen, während in der Kontrollgruppe im Durchschnitt 218 Metastasen nachgewiesen werden konnte. Somit wies die Gantofiban-Gruppe ca 40% weniger Metastasen auf als die Kontrolle. Diese war eine drastische Reduktion, die allerdings noch keiner Heilung entspricht. Um dieses Ergebnis noch weiter zu verbessern, wurde die Blockade des gpIIb/IIIa Rezeptors mit einer Immuntherapie kombiniert. Dazu wurden ex-vivo sensibilisierte CTLs in tumortragende Mäuse transferiert und das therapeutische Fenster zwischen Tumorgabe und CTL-Transfer verlängert. Diesem Versuch lag die Annahme zugrunde, dass die gpIIb/IIIa Blockade die Zahl der Tumorzellen reduziert und so zu einem verbesserten E/T-Verhältnis führt, bzw die lokalen Tumorzellen besser für die injizierten CTLs zugänglich sind, wenn sie weniger durch Fibrinogen und Plättchen abgeschirmt werden.

Als nächster Schritt wurde daher die gp11b/IIIa-Blockade mit einem T-Zellen-Therapie-Modell kombiniert. Dieser hatte sich in unserer Arbeitsgruppe bereits als sehr erfolgreich erwiesen. Allerdings hatte er jedoch gezeigt, dass er nur über ein sehr kleines therapeutisches Fenster verfügt.

3.6. Verbesserung der Ergebnisse der Immuntherapie durch Kombination mit

Gantofiban

Zur Induktion der CTLs wurden GM-CSF sezernierende B16D5 Tumorzellen an den Extremitäten der Mäuse subkutan injiziert. Eine Woche später wurden ihre inguinalen, axillären und subpektoralen Lymphknoten extirpiert und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Daraus wurden tumorspezifische T-Zellen gewonnen und mit anti-CD3 und IL-2 kultiviert und expandiert. Diese, vor allem CD8+ Zellen, erkennen spezifisch die B16D5 Melanomzellen und können diese lysieren. Wurden diese spezifischen T-Lymphozyten Mäusen intravenös injiziert, die drei Tage vorher Tumorzellen ebenfalls intravenös erhalten hatten, so konnte man die Entstehung von pulmonalen Metastasen komplett verhindern. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass die so behandelten Tiere länger als 200 Tage metastasenfrei überlebten (82). Das unten stehende Schema fasst die wichtigsten Schritte dieses Therapiemodells zusammen. Abbildung 13 zeigt exemplarisch die Lunge einer so behandelten Maus.

Immuntherapie-Schema mit Immuntherapie am Tag 3

Tag 0	Tumorzellgabe 2×10^5 B16D5 Tumorzellen i.v.
Tag 1	
Tag 2	
Tag 3	T-Zell-Gabe $3,5 \times 10^7$ tumorspezifische T-Lymphozyten i.v. + IL-2 i.p.
Tag 4	IL-2 i.p.
Tag 5	IL-2 i.p.
Tag 6	IL-2 i.p.
Tag 7	IL-2 i.p.
Tag 8	IL-2 i.p.
Tag 9	IL-2 i.p.
Tag 10	Lungenentnahme und Auswertung

Die unten stehende Abbildung stellt exemplarisch die Lunge einer so behandelten Maus dar.

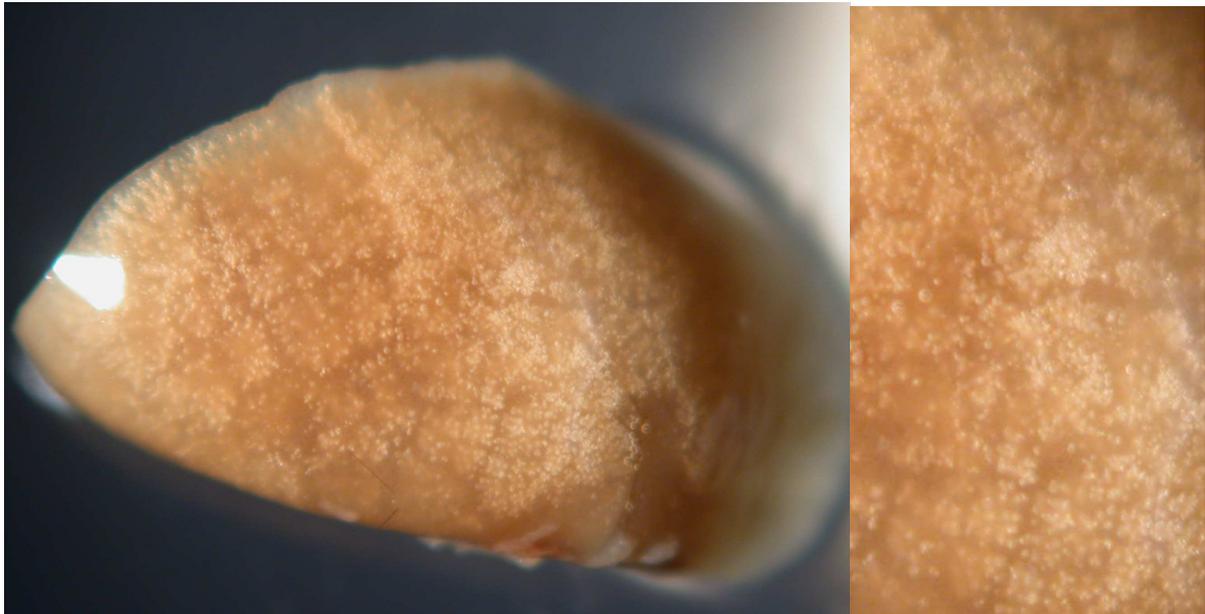


Abbildung 13: Heilung der Lungenmetastasen durch Transfer von spezifischen T-Zellen drei Tage nach Tumorgabe. Lungenbilder.

Wurden die therapeutischen T-Zellen jedoch nur einen Tag später verabreicht (=Tag 4), fand man bereits einzelne makroskopisch sichtbare Lungenmetastasen, welche bei längerem Abwarten große Metastasen bilden können. Wurde nun das therapeutische Fenster von drei Tagen noch weiter verlängert, so entwickelten sich in den Lungen der Mäuse mehr als 100 Metastasen.

Abbildung 14 stellt die mittleren Metastasenzahlen bei Beginn der Immuntherapie an Tag 3, 4 und 6 nach Tumorgabe dar.

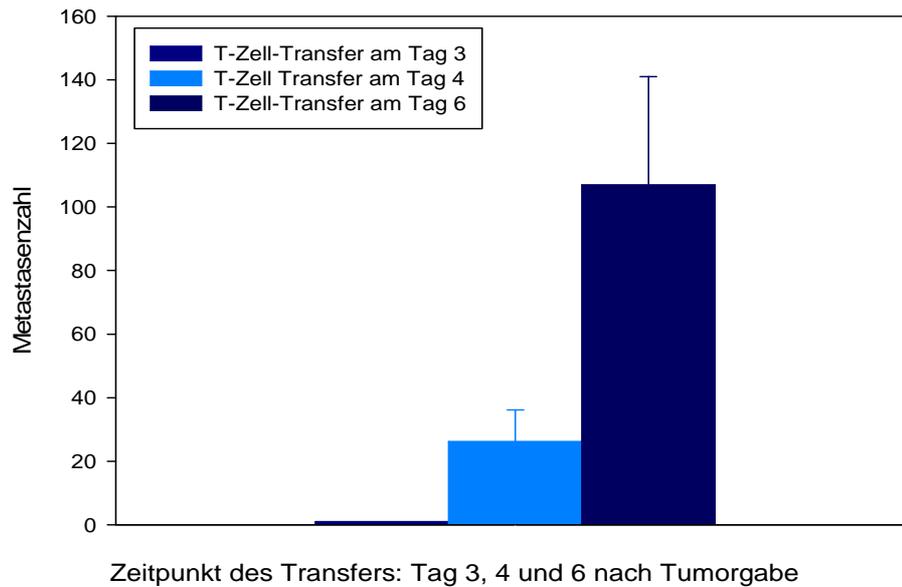


Abbildung 14: Metastasenanzahl bei Beginn der Immuntherapie, jeweils 3 ($n=6$), 4 ($n=5$) und 6 Tage ($n=7$) nach Tumorgabe. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Der erste Balken (Metastasenanzahl bei Beginn der Therapie drei Tage nach Tumorgabe) ist aus graphischen Gründen höher dargestellt, die Metastasenanzahl beträgt aber 0.

Die Abbildung zeigt, wie es im verwendeten Modell mit Erweiterung des therapeutischen Fensters zu einer zunehmend größeren Metastasenanzahl kommt. Der Mittelwert der Metastasen steigt von 0 (beim Transfer am Tag drei nach Tumorgabe) auf 30 beim Transfer vier Tage nach Tumorgabe und auf mehr als hundert Metastasen, wenn der Transfer sechs Tage nach Tumorgabe erfolgt (doppeltes therapeutisches Fenster).

Der Unterschied zwischen Tag 3 und Tag 4 nach Tumorgabe liegt darin, dass die Tumorzellen, die überleben, sich mindestens einmal mehr teilen bevor sie mit den CTLs konfrontiert werden. Damit ist das E/T-Verhältnis grundsätzlich ungünstiger. Indem die Ansiedlung und Adhäsion der Tumorzellen erschwert wird, könnte jedoch Gantofiban ein günstigeres E/T-Verhältnis schaffen und somit den T-Zell-Transfer unterstützen.

Als nächstes wurde daher getestet, ob es möglich ist, die Aktivität der am Tag 4 verabreichten spezifischen T-Lymphozyten mit diesem tumorreduzierenden Medikamenten zu unterstützen. Dafür wurden die Mäuse in vier Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe blieb unbehandelt und diente als Kontrolle. Einer zweiten Gruppe wurde nur Gantofiban oral,

einer dritten wurden nur die therapeutischen T-Lymphozyten an Tag 4 intravenös, einer vierten und letzten Gruppe wurden sowohl die therapeutischen T-Lymphozyten an Tag 4 intravenös als auch Gantofiban oral verabreicht.

Die Versuche ergaben, dass am Tag 10 nach Therapie die Kontrolle mehr als 200 Metastasen entwickelt hatte, die mit Gantofiban therapierten Mäusen mehr als 100, die mit der Immuntherapie behandelten Mäuse mehr als 20, während die Mäuse die sowohl die Immuntherapie als auch Gantofiban erhielten weniger als fünf Metastasen auf ihrer Lunge zeigten.

Kontrolle (n=6)	Therapie mit Gantofiban (n=10)	Adoptiver T-Zell Transfer an Tag 4 (n=5)	Adoptiver T-Zell Transfer an Tag 4 und Gantofiban (n=11)
			
218 ± 30 Metastasen	130 ± 19 Metastasen	26 ± 10 Metastasen	3 ± 2 Metastasen

Tabelle 6: Metastasenzahl bei Kontrolltieren, Gantofiban-behandelten Tieren, Tieren die einen T-Zell-Transfer vier Tage nach Tumorgabe bekamen und Tiere die sowohl mit dem T-Zell-Transfer vier Tage nach Tumorgabe als auch mit Gantofiban behandelt wurden. Daten und Lungenbilder.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der T-Zell-Transfer am Tag 4 eine gute Metastasenreduktion bewirkt, ohne jedoch eine komplette Metastasenfreiheit, wie nach drei Tagen zu erreichen. Insgesamt wurde durch diese Behandlung die Metastasenzahl auf ca. 11% reduziert. Abbildung 15 veranschaulicht dieses Ergebnis anhand der durchschnittlichen Metastasenzahl (218 in der Kontrolle und 26 in der Gruppe, die die CTLs 4 Tag nach Tumorgabe erhielt), Abbildung 16 anhand zwei exemplarischer Bilder.

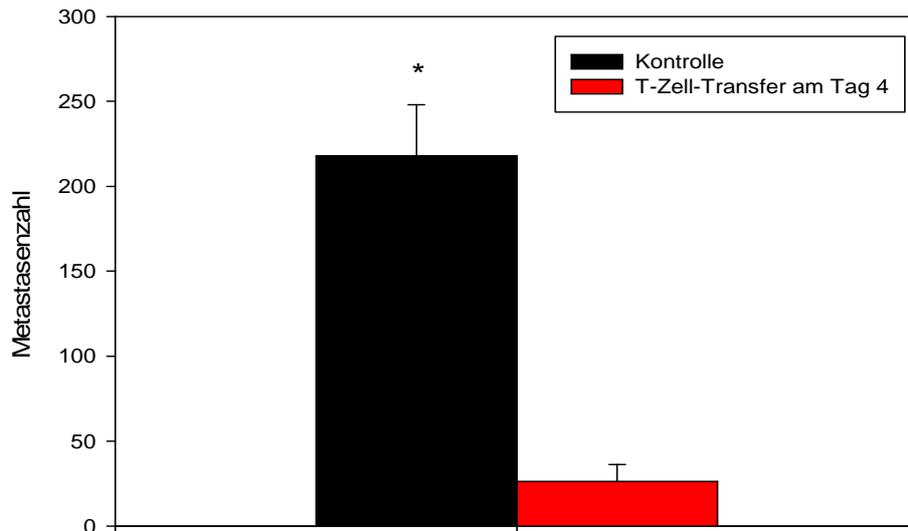


Abbildung 15: Metastasenzahl bei der Kontrolle gegenüber Metastasenzahl bei Verabreichung der CTLs am Tag 4 nach Tumorgabe. (n=6 bzw. 5). Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler.

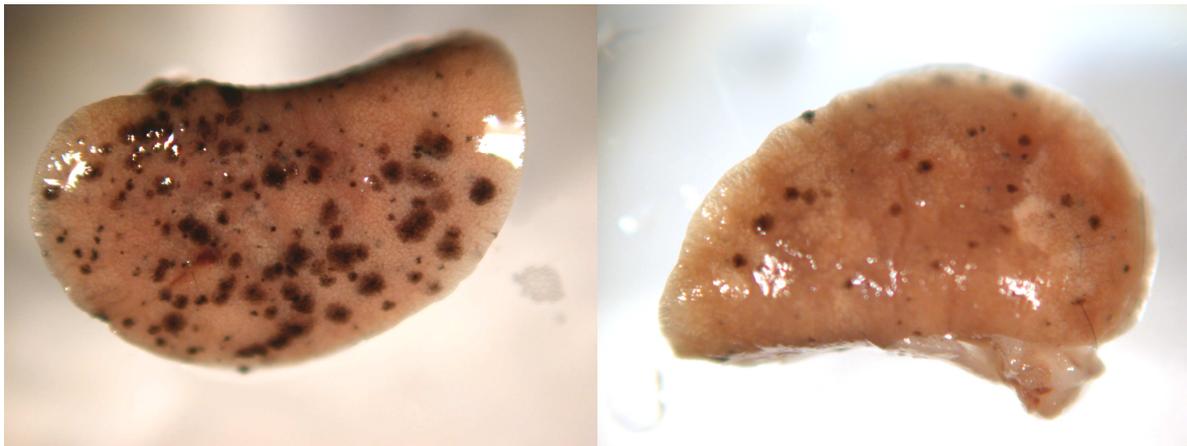


Abbildung 16: Metastasen bei der Kontrolle gegenüber Metastasen bei Verabreichung der CTLs an Tag 4 nach Tumorgabe. Lungenbilder.

Die zusätzliche Verabreichung von Gantofiban führte zu einem deutlich positiven Effekt, wenn die CTLs vier Tage nach Tumorgabe verabreicht wurden. So wurde mit dieser kombinierten Behandlung die Metastasenzahl auf ca. 1% reduziert. Abbildung 16 stellt dieses Ergebnis anhand der durchschnittlichen Metastasenzahl dar (218 in der Kontrolle und 3 in der Gruppe, die Gantofiban und CTLs vier Tage nach Tumorgabe erhielt), Abbildung 17 anhand zwei exemplarischer Bilder.

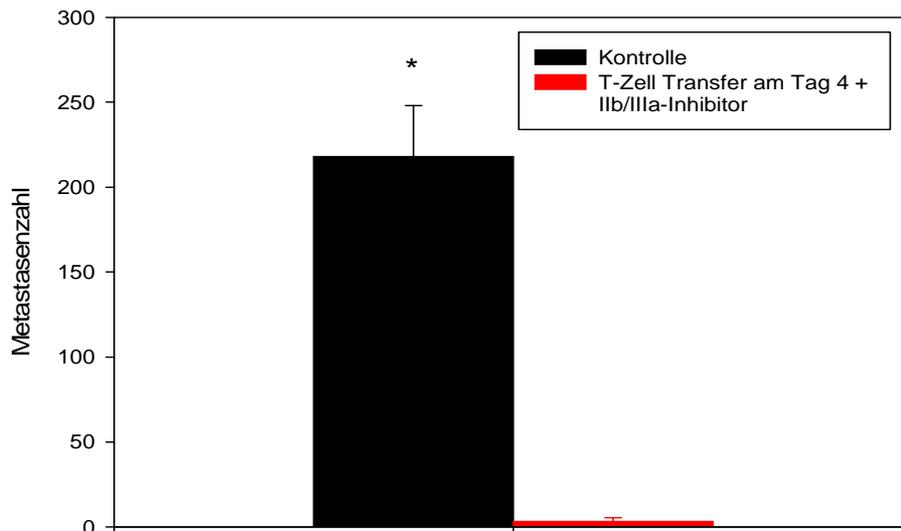


Abbildung 17: Metastasenzahl bei der Kontrolle gegenüber Metastasenzahl bei Verabreichung der CTLs an Tag 4 nach Tumorgabe mit zusätzlicher Gantofibanbehandlung (n=6 bzw. 11). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler.

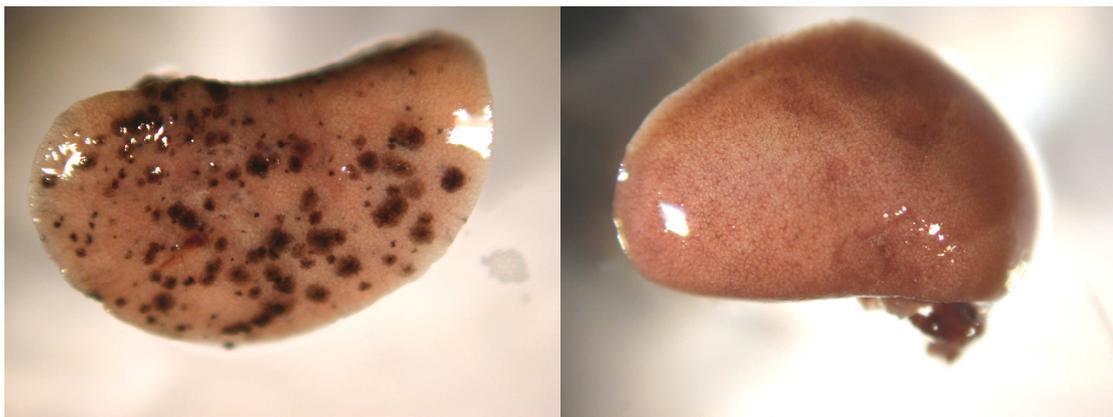


Abbildung 18: Metastasen bei der Kontrolle gegenüber Metastasen bei Verabreichung der CTLs an Tag 4 nach Tumorgabe mit zusätzlicher Gantofibanbehandlung. Lungenbilder.

Insgesamt zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse, dass die Kombination des CTLs-Transfers am Tag 4 mit Gantofiban die Metastasenzahl auf 11% reduziert, verglichen mit dem alleinigen CTL-Transfer an Tag 4. Abbildung 19 repräsentiert dieses Ergebnis anhand der durchschnittlichen Metastasenzahl (26 in der Gruppe, die die CTLs vier Tage nach Tumorgabe erhielt, 3 in der Gruppe die zusätzlich zu den CTLs vier Tage nach Tumorgabe auch Gantofiban erhielt), Abbildung 20 anhand von zwei exemplarischen Bildern.

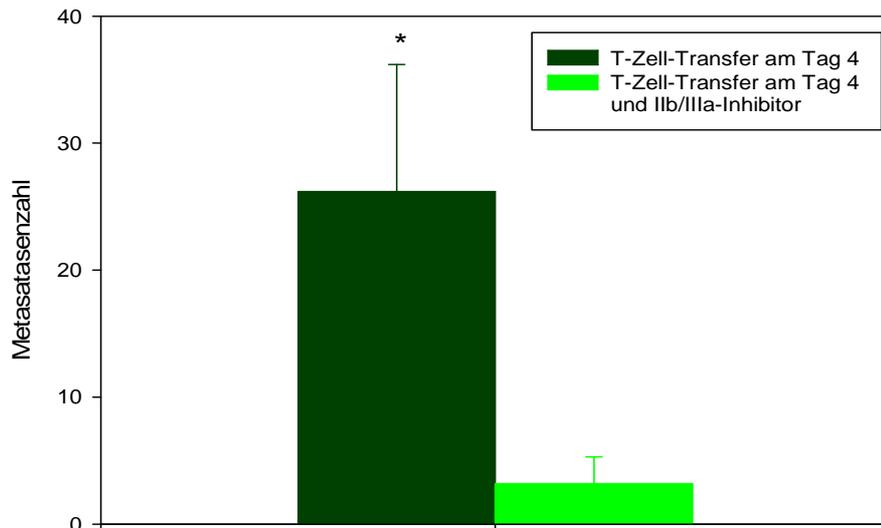


Abbildung 19. Metastasenanzahl bei Verabreichung der CTLs an Tag 4 nach Tumorgabe. Ohne und mit zusätzlicher Gantofibanbehandlung (n=5 bzw. 11). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler.

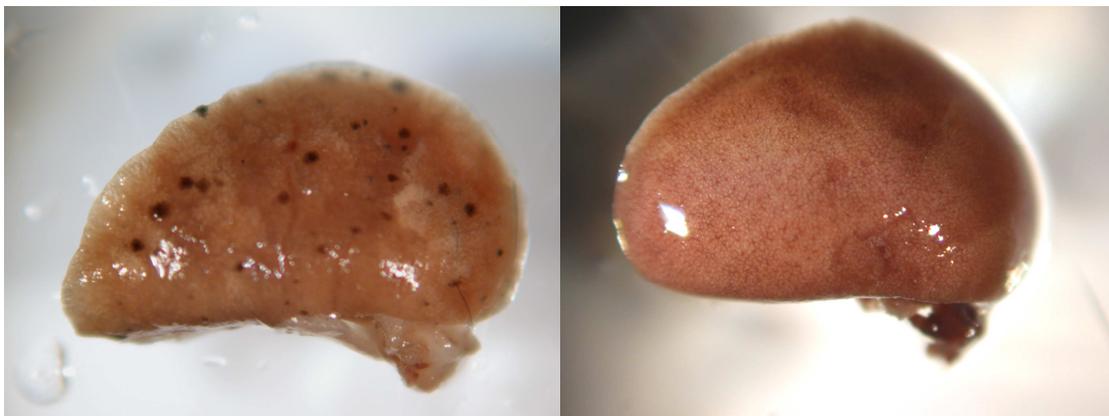


Abbildung 20: Metastasen bei Verabreichung der CTLs an Tag 4 nach Tumorgabe. Ohne und mit zusätzlicher Gantofibanbehandlung (n=5 bzw. 11). Lungenbilder.

In der Gruppe, die sowohl die therapeutischen T-Zellen als auch Gantofiban bekam, waren sechs von elf Tieren sogar metastasenfrei. Hingegen war keins der Tiere in der Gruppe, die ausschließlich mit den therapeutischen T-Zellen behandelt wurde metastasenfrei. Nach diesem Erfolg bei Erweiterung des Abstandes zwischen Tumorgabe und T-Zell-Transfer dehnten wir diesen noch weiter auf fünf- bis sechs Tage aus. Auch in diesen Versuchen erwies sich die Kombination erfolgreicher als der alleinige T-Zell-Transfer. Nach T-Zell-

Transfer stieg die Zahl der Metastasen bei einem Abstand von fünf Tagen auf 23, während bei sechs Tagen schon 59 Metastasen im Durchschnitt zu messen waren. Abbildung 21 stellt diesen Zahlen graphisch dar, Abbildung 22 veranschaulicht dieses Ergebnis anhand von exemplarischen Lungenbildern.

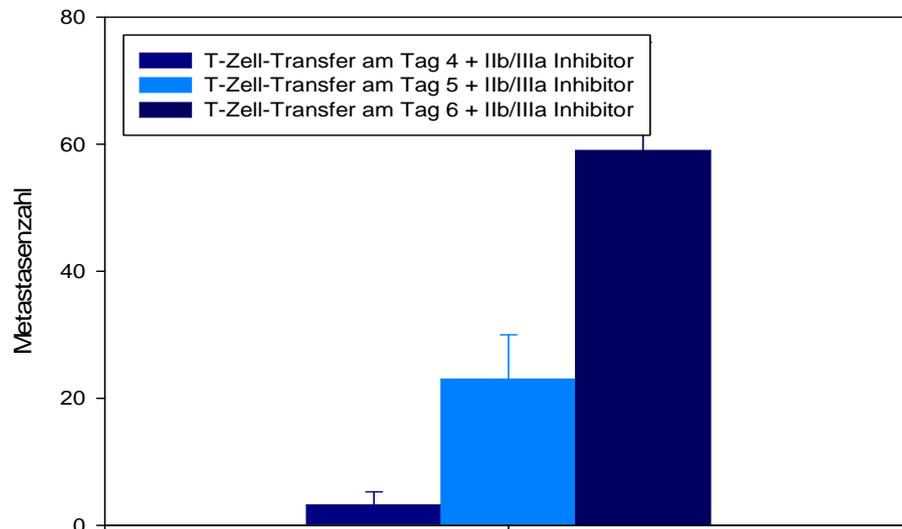


Abbildung 21: Metastasenzahl bei der Kombination T-Zell Transfer + Gantofiban, wenn der T-Zell-Transfer 4, 5 und 6 Tage nach Tumorgabe erfolgt.

Adoptiver T-Zell Transfer an Tag 4 und Gantofiban (n=11)	Adoptiver T-Zell Transfer an Tag 5 und Gantofiban (n=11)	Adoptiver T-Zell Transfer an Tag 6 und Gantofiban (n=7)
		
3 ± 2 Metastasen	23 ± 7 Metastasen	59 ± 17 Metastasen

Tabelle 7: Metastasen bei der Kombination T-Zell Transfer + Gantofiban, wenn der T-Zell-Transfer 4, 5 und 6 Tage nach Tumorgabe erfolgt. Lungenbilder.

Die durchschnittliche Metastasenzahl betrug 3, wenn zusätzlich zu Gantofiban die T-Zellen vier Tage nach Tumorgabe verabreicht werden. Sie stieg auf 23, wenn zusätzlich zu der Gantofibanfütterung die Mäuse die therapeutischen T-Zellen fünf Tage nach Tumorgabe bekamen. Wurden die T-Lymphozyten erst sechs Tage nach Tumorgabe verabreicht, so stieg die Durchschnittsmetastasenzahl auf 59, trotz Gantofibantherapie. Vergleicht man die Wirksamkeit der Kombinationstherapie mit dem T-Zell-Transfer, so fällt auf, dass die Metastasenzahl nach Behandlung mit der kombinierten Therapie in jedem Fall niedriger liegt. Abbildung 22 stellt dieses Ergebnis grafisch dar.

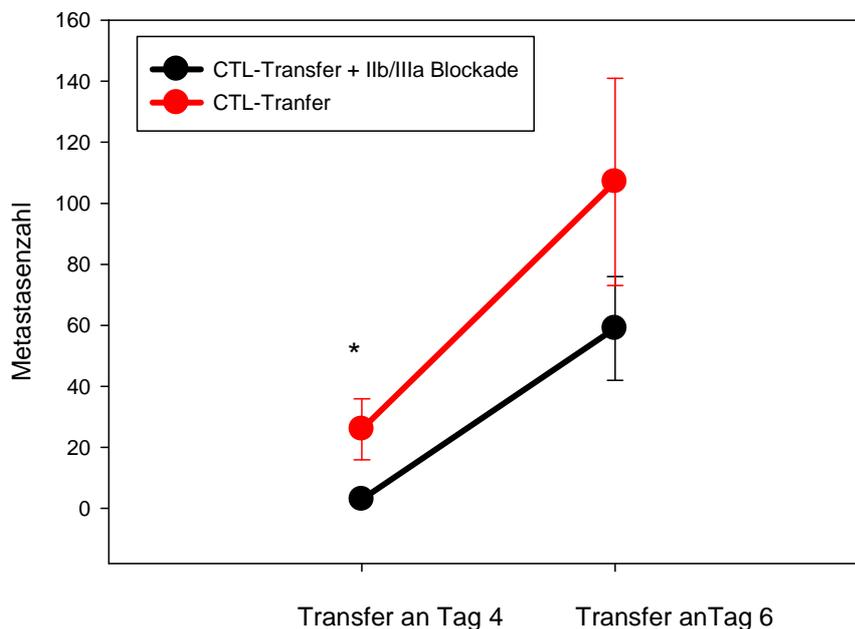


Abbildung 22: Metastasenzahl nach Erweiterung des therapeutischen Fensters von 3 auf 6 Tage. Aufgetragen ist die Metastasenzahl gegen die Zeit. Die erste Gruppe erhielt nur CTLs (rot), die zweite zusätzlich zu den CTLs Gantofiban (schwarz).

Die Abbildung zeigt, dass die Kombination von Gantofiban mit dem T-Zell-Transfer zu jedem Zeitpunkt erfolgreicher ist als der alleinige T-Zell-Transfer, auch wenn es zu einem Wirkungsverlust kommt, je später die spezifischen T-Lymphozyten verabreicht werden. Gleichzeitig war aber kein Tier metastasenfrem.

Wie kann man sich diesen Wirkungsverlust erklären? Eine Möglichkeit wäre, dass mit dem Abstand zwischen Tumorgabe und CTL-Transfer die Tumorzellen proliferieren und sich so

ein ungünstigeres E/T-Verhältnis einstellt. Um zu testen, ob das E/T-Verhältnis für den Erfolg des T-Zell-Transfers von Bedeutung ist, wurden sechs Tieren nur 1×10^5 anstatt der üblichen 2×10^5 Tumorzellen und die gleiche Anzahl an zytotoxischen T-Lymphozyten sechs Tage nach Tumorgabe verabreicht ($3,5 \times 10^7$). Zehn Tage danach wurde die Zahl der Metastasen in der Lunge überprüft. Abbildung 23 zeigt das Ergebnis dieses Versuches anhand der durchschnittlichen Metastasenzahl in beiden Gruppen.

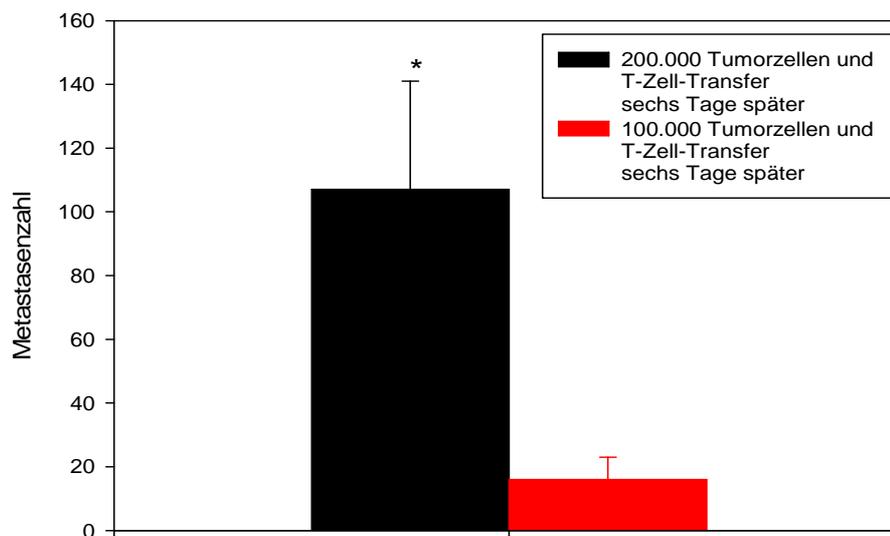


Abbildung 23: Metastasenzahl nach Behandlung mit $3,5 \times 10^7$ CTLs 6 Tage nach Verabreichung von jeweils 2×10^5 (schwarze Säule) und 1×10^5 Tumorzellen (rote Säule) ($n=6$ pro Gruppe).

Die Abbildung zeigt, dass der T-Zell-Transfer erfolgreicher ist, wenn weniger Tumorzellen vorhanden sind. Die Gruppe, die initial weniger Tumorzellen intravenös erhielt entwickelte eine deutlich niedrigere Metastasenzahl. Trotz deutlich günstigerem E/T-Verhältnis kam es jedoch zu keiner kompletten Elimination der Metastasen. Daraus folgt, dass das E/T-Verhältnis zwar wichtig, jedoch nicht der einzige entscheidende Faktor ist.

Schafft das gpIIb/IIIa-Inhibitor Gantofiban ein günstigeres E/T-Verhältnis? Um diese Frage zu untersuchen, wurde nach einer Methode gesucht, die Anzahl an Tumorzellen in den Lungen der Mäuse zu bestimmen. Die Tumorzellzahl in den Lungen der Mäuse zu quantifizieren ist sehr schwierig. So finden sich 24 Stunden nach Gabe von 2×10^5

Tumorzellen ca. 10% davon nach der Angaben der Literatur(83-85). Diese sind zwar nachweisbar, wenn die gesamte Lunge aufgeschnitten wird und die Immunhistologie alle entdeckt. So hat A. Chambers zusammen mit den Tumorzellen fluoreszierende Beads gegeben, die in der Lungenstrombahn steckenbleiben und dann das Verhältnis Tumorzelle-Bead bestimmt (86). Dabei ist allerdings die histologische Bestimmung der Tumorzellzahl am Anfang fehleranfällig, da auch Zellen miterfasst werden, die zerstört oder phagozytiert werden. Als Alternative wurde über eine Amplifikation mit PCR ein Markergen des Tumors nachgewiesen, Pmel 17/gp100. Pmel gehört zu den melanomassoziierten Antigenen. Vorversuche hatten gezeigt, dass in einer Standardreaktion weniger als 100 Tumorzellen noch nachweisbar waren.

So wurden die Lungen von Mäusen, die mit Gantofiban behandelt wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1, 3 und 5 Tage nach Tumorgabe) entnommen, RNA wurde isoliert und Pmel amplifiziert und das Ergebnis für gapdh normalisiert. In Abbildung 24 ist das Ergebnis der RT-PCR wiedergegeben.

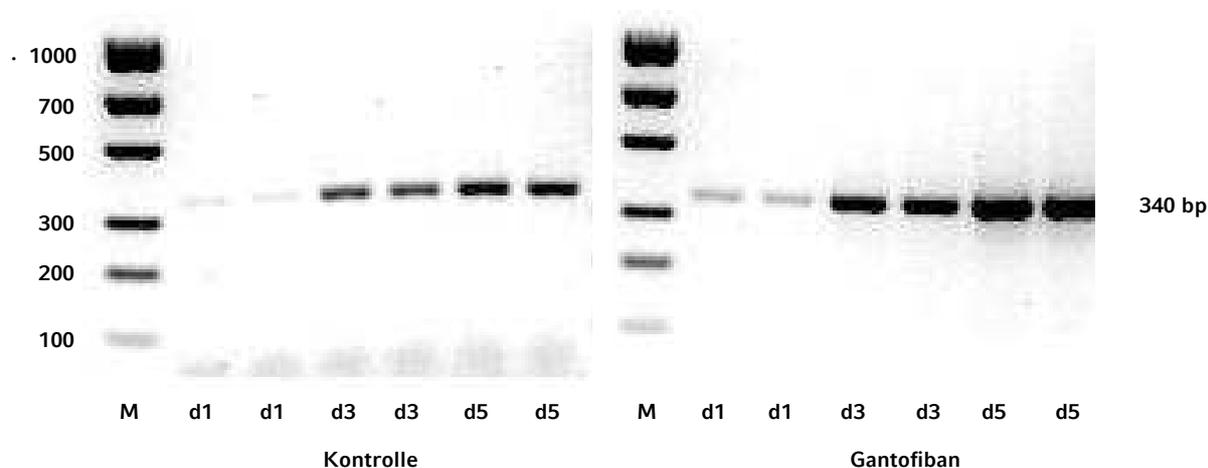


Abbildung 24: Pmel-Signal als spezifischen Marker für die Quantifizierung der Tumorzellzahl.

Es wurden Proben von jeweils fünf Tieren pro Gruppe analysiert. Die Untersuchung erfolgte zweimal pro Zeitpunkt (1, 3 und 5 Tage nach Tumorgabe) und die PCR wurde mit 25 Zyklen durchgeführt.

Die Abbildung zeigt, dass 24 Stunden nach der Injektion der Tumorzellen das Signal für Pmel in beiden Gruppen nur sehr niedrig war. Bei den Mäusen, die jedoch mit Gantofiban

behandelt wurden, zeigte sich ein höheres Signal an den Tagen 3 und 5 nach Tumorgabe. Es folgt, dass in den Lungen dieser Mäuse während der ersten fünf Tage nach Tumorgabe sicherlich nicht weniger Tumorzellen vor Ort sind. Somit muss die Hypothese, dass Gantofiban ein günstigeres E-T-Verhältnis schafft, verworfen werden. Die in vivo Versuche haben jedoch gezeigt, dass Gantofiban sowohl alleine als auch in Kombination mit dem CTL-Transfer eine Metastasenreduktion bewirkt (Abb. 12, 16 und 17). Wenn also zu Beginn mehr Tumorzellen vor Ort sind (stärkeres Pmel-Signal), muss es bei Gantofiban-behandelten Tieren erst im Verlauf zu einer effizienteren Elimination gekommen sein.

Für eine effizientere Elimination der Tumorzellen kann man nun zwei Hypothesen formulieren. Da Gantofiban die Anheftung von Plättchen reduziert, kann es sein, dass (a) die Tumorzellen in gpIIb/IIIa-blockierten Mäusen durch die Immunabwehr besser erkannt und effizienter eliminiert werden und/oder dass (b) unter gpIIb/IIIa-Blockade Faktoren der Plättchen fehlen, die wichtig für die Bildung einer Nische sind, in der die Tumorzellen proliferieren und zu einer Metastase wachsen.

Um diese zwei Hypothesen zu überprüfen, wurden zum einen die Konzentration von Zytokinen, die eine Immunantwort nachweisen (wie TNF- α , TGF- β) zum anderen von Zytokinen, die für das metastatische Milieu und das lokale Überleben der Tumorzellen wichtig sind (wie VEGF und CXCL12) untersucht.

3.7. Analyse der Immunantwort und des Tumorzellüberlebens durch Zytokinexpression im Plasma

Im Plasma von Kontrolltieren und von Mäusen die mit Gantofiban behandelt wurden, wurde die Konzentration von unterschiedlichen Zytokinen mittels ELISA gemessen.

Als Hinweis auf eine verstärkte Immunantwort wurde die Konzentration von TNF- α gemessen. Diese Substanz wird hauptsächlich von Makrophagen produziert. Eine hohe Plasmakonzentration belegt die Aktivität von Makrophagen und somit eine Immunreaktion. In der Kontrolle zeigte sich ein geringer Anstieg an Tag 2 nach Tumorgabe, gefolgt von einem Peak von Tag 4 bis Tag 6 (max. 23 pg/ml). In der Gruppe, die mit dem gpIIb/IIIa-

Inhibitor Gantofiban behandelt wurde zeigte sich ein deutlicher Peak 24 Stunden nach Tumorgabe gefolgt von dem Anstieg an Tag 4 bis Tag 6. Damit unterscheiden sich die beiden Gruppen nur in dem initialen Peak in der Gantofibangruppe. Dieser Unterschied ist signifikant (circa 18 pg/ml versus 9 pg/ml). Der restliche Verlauf unterscheidet sich nicht.

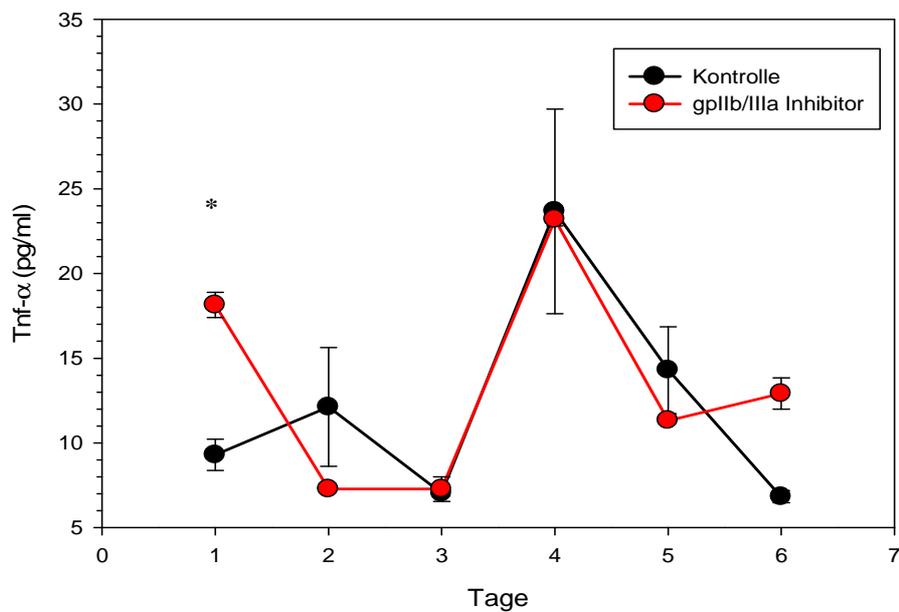


Abbildung 25: Verlauf der TNF- α -Konzentration im Plasma über die Zeit.

In schwarz sind die Werte der Kontrolle, in rot die der mit Gantofiban behandelten Tiere angegeben (n=6 pro Gruppe).

Aus diesem Ergebnis kann man schließen, dass die Makrophagen in der Gruppe, die mit Gantofiban behandelt wurde initial stärker stimuliert wurden als in der Kontrolle. Eine mögliche Erklärung ist, dass unter Gantofiban-Behandlung weniger Thrombozyten an den Tumorzellen adhären und diese somit besser durch die Immunabwehr angreifbar sind.

Ein Hinweis für die Thrombozytenaktivität liefert die Plasmakonzentration von TGF- β . TGF- β wird in hoher Konzentration in Plättchen gebildet. Es existieren drei Isoformen dieses Enzyms: TGF- β 1, 2 und 3. Studien zeigen, dass es sogar von mehreren Melanomzelllinien sezerniert wird, im Gegensatz zu normalen Melanozyten, die nur nach Stimulation diese Substanz freisetzen. Der hier untersuchte Tumorzellstamm B16D5 zeigte im cDNA-Array

kein Signal für TGF- β 1, Überstände von Zellkultur waren ebenfalls negativ. So muss dieser von degranulierenden Thrombozyten sezerniert werden.

Abbildung 26 zeigt die Konzentration dieser Substanz im Plasma über die Zeit. Ähnlich wie bei der Bestimmung von TNF- α wurden eine Kontrollgruppe und eine gpIIb/IIIa-Gruppe miteinander verglichen.

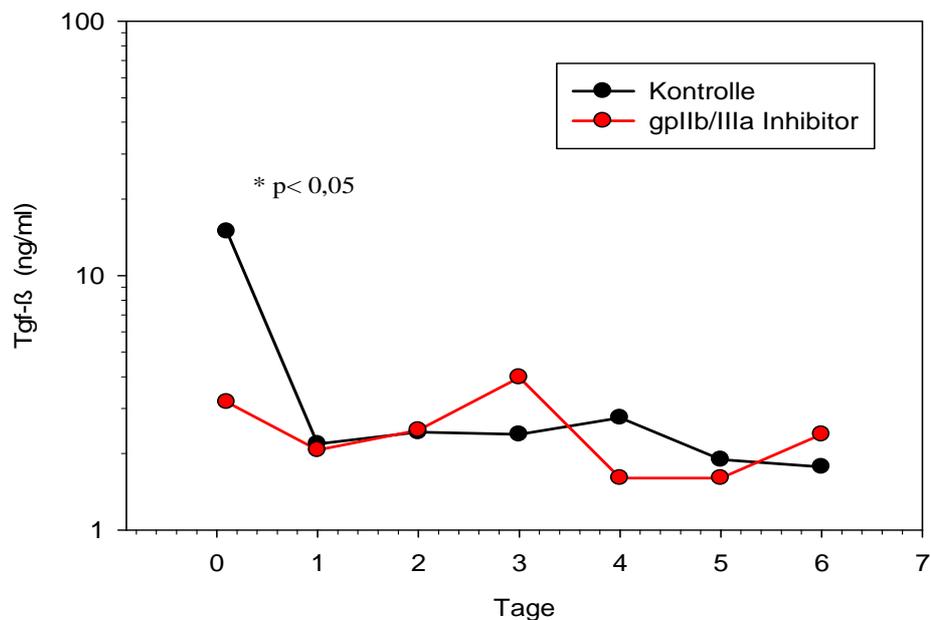


Abbildung 26: TGF- β -Konzentration im Plasma über die Zeit.

In dieser Abbildung dargestellt sind in schwarz die TGF- β Konzentration der Kontrolltiere, in rot die der mit Gantofiban behandelten Tiere (n=6 pro Gruppe). SE ist sehr gering und ist daher in der Abbildung schwer zu erkennen.

Es fällt auf, dass die TGF- β Plasmakonzentration in der Kontrolle sofort nach der Tumorgabe (die Lungen wurden ca. zwei Stunden nach der Tumorgabe entnommen) einen deutlichen Peak zeigt (15ng/ml). Im Gegensatz dazu wurden bei Gantofiban-behandelten Tieren solch hohe Werte nicht gemessen (3ng/ml zwei Stunden nach der Tumorgabe). Im weiteren Verlauf sinkt die TGF-Konzentration auf Werte von 0,5-3ng/ml ab und es findet sich kein signifikanter Unterschied. Dieses Ergebnis zeigt, dass es möglicherweise zwei Stunden nach Injektion der Tumorzellen zu einer hohen Thrombozytenaktivität in Kontrolltieren kommt. Die Behandlung mit Gantofiban inhibiert dieses Phänomen und die Plättchenaktivität bleibt die Zeit über auf dem niedrigen Niveau.

Was entscheidet nun über das lokale Überleben der Tumorzellen? Neben zytotoxischen Mediatoren, die die Tumorzellen schädigen, gibt es Substanzen, die entscheidend für das lokale Überleben der Tumorzellen sind. Dazu zählen Ansiedlungsfaktoren, die das Überleben der Zellen begünstigen. Einer dieser Faktoren ist der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Dabei handelt es sich um eine Substanz, die sowohl von Endothelzellen als auch von Plättchen sezerniert werden kann. Die D5-Tumorzellen sind in der Lage VEGF-a zu produzieren. Er wirkt angiogenetisch als chemotaktischer Faktor für endotheliale Präkursoren.

Die Messung der VEGF-Konzentration im Plasma von unbehandelten Tieren ergab <20pg/ml. Nach Injektion von Tumorzellen lag die VEGF-a-Konzentration im Plasma von gpIIb/IIIa-blockierten Tieren immer unter dem Wert von Kontrolltieren. So fand sich in der Kontrolle initial ein Peak von 60pg/ml an. Die Konzentration sank dann auf 48pg/ml 24 Stunden später und stieg dann (=Tag 4 nach Tumorgabe) wieder auf 60pg/ml an. Ab Tag 5 sank sie und erreichte an Tag 6 nach Tumorgabe einen Wert von 25pg/ml. In der gpIIb/IIIa-blockierten Gruppe betrug die VEGF-Konzentration nach Tumorgabe zunächst 30pg/ml. Sie stieg dann auf 40pg/ml an Tag 2 und blieb an Tag 3 und 4 nach Tumorgabe konstant. An Tag 5 nach Tumorgabe stieg sie dann auf 50pg/ml und sank schließlich wieder an Tag 6 nach Tumorgabe auf 30pg/ml. Somit ergaben sich zwei signifikante Unterschiede in den beschriebenen Konzentrationen. 24 Stunden und vier Tage nach Tumorgabe war die VEGF-Konzentration in Gantofiban behandelten Tieren signifikant niedriger im Vergleich zu den Kontrollen.

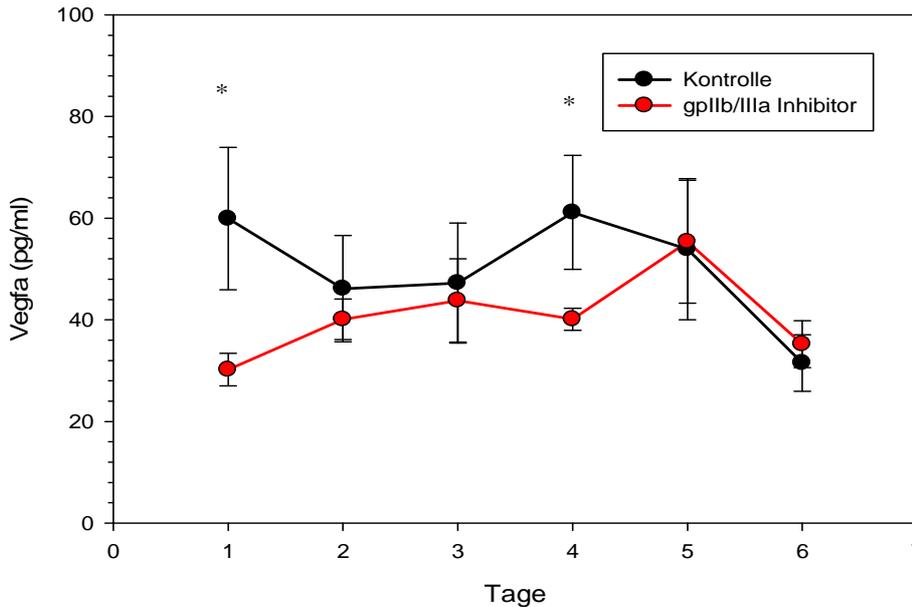


Abbildung 27: VEGF-a-Konzentration im Plasma über die Zeit.

In schwarz sind die Werte der Kontrolle, in rot die der mit Gantofiban behandelten Tiere (n=6 pro Gruppe).

Abbildung 27 zeigt, dass in den gpIIb/IIIa-blockierten Tieren die VEGF-a-Konzentration im Plasma zu jedem Zeitpunkt niedriger ist als in der Kontrolle. Zu zwei Zeitpunkten ist dieser Unterschied auch statistisch signifikant ($p < 0.05$): 24 Stunden nach Tumorgabe beträgt die Konzentration bei den Gantofiban-behandelten Tieren 30 und bei den Kontrollen 60 pg/ml, vier Tage nach Tumorgabe jeweils 40 und 60 pg/ml.

Ein anderer Faktor, der das Überleben der Tumorzellen unterstützen kann ist Cxcl-12 (Sdf1). Dieser wird von den Thrombozyten freigesetzt, jedoch nicht von den D5-Tumorzellen. Diese Substanz hat ähnlich wie VEGF eine chemotaktische Wirkung auf Stammzellen, Tumorzellen und Entzündungszellen. Es ist hierbei interessant, dass Orte mit hoher CXCL12-Produktionrate wie Knochenmark, Lunge und Leber am häufigsten von Metastasen betroffen sind. Darüber hinaus unterstützt CXCL12 die Tumorangiogenese. In der Kontrollgruppe wurde 24 Stunden nach Tumorgabe eine Konzentration von 0,9ng/ml gemessen. Diese stieg kontinuierlich bis zu einem Peak von 1,8ng/ml 4 Tage nach Tumorgabe an und sank dann wieder. In der mit Gantofiban behandelten Gruppe wurden in

den ersten zwei Tagen nach der Tumorgabe ebenfalls Werte von 0,9 und 0,7ng/ml gemessen. Die Konzentration stieg dann steil bis zu einem Maximum von 2,2ng/ml, das am dritten Tag nach Tumorgabe erreicht wurde und sank dann langsam wieder. Vergleicht man die Verläufe, so findet man zwei signifikante Unterschiede: die CXCL12-Konzentration ist signifikant höher 3 Tage nach der Tumorgabe bei den mit Gantofiban behandelten Tieren und niedriger 4 Tage nach Tumorgabe. Die maximale Konzentration wird in gpIIb/IIIa blockierten Tieren somit früher erreicht.

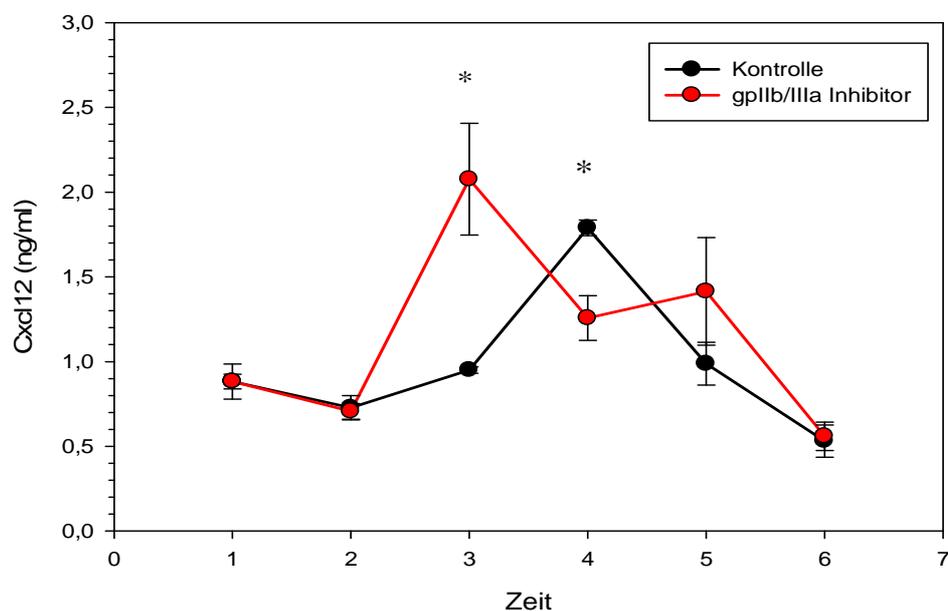


Abbildung 28: CXCL12-Konzentration im Plasma über die Zeit.

In schwarz sind die Werte der Kontrolle, in rot die der mit Gantofiban behandelten Tiere (n=6 pro Gruppe).

Die maximale CXCL12-Sekretion findet sich somit bei der Gantofiban-Behandlung früher als in der Kontrolle. Dieses Ergebnis ist sehr schwierig zu interpretieren, da CXCL12 ein chemotaktischer Faktor ist, der das Überleben der Tumorzellen unterstützt.

Insgesamt weist die Analyse der Mediatoren im Plasma auf eine stärkere Immunreaktion in den Lungen von Gantofiban-behandelten Mäusen hin. Dies könnte die Grundlage für eine effizientere Tumorzellelimination in diesen Tieren sein. Die Mediatoren im Plasma lieferten

jedoch nur einen Hinweis und sie gaben eine Summenreaktion wieder. Deshalb wurde im Folgenden die Genexpression von wichtigen Molekülen in der Lunge untersucht, die die Immunreaktion charakterisieren können.

3.8. Analyse der Immunantwort durch Genexpression in der Lunge

Untersucht wurde die Expression von Markern der spezifischen (wie CD4, CD8, Granzym A und Perforin) als auch der unspezifischen Abwehr, wie NKG2D, der Rezeptor der NK-Zellen.

CD4 und CD8 sind Oberflächenantigene der T-Lymphozyten. Der Nachweis eines hohen Signals spricht für die Anwesenheit von CD4 und CD8 positiven Lymphozyten in den Lungen der Tiere. Das unten angefügte Gel-Bild (Abb. 29) zeigt die Expression von CD8 1, 3 und 5 Tage nach der Tumorgabe. Während für CD4 selbst bei 40 Zyklen kein Signal in den Lungen nachweisbar war, fand sich für CD8 bereits bei 30 Zyklen Hinweis.

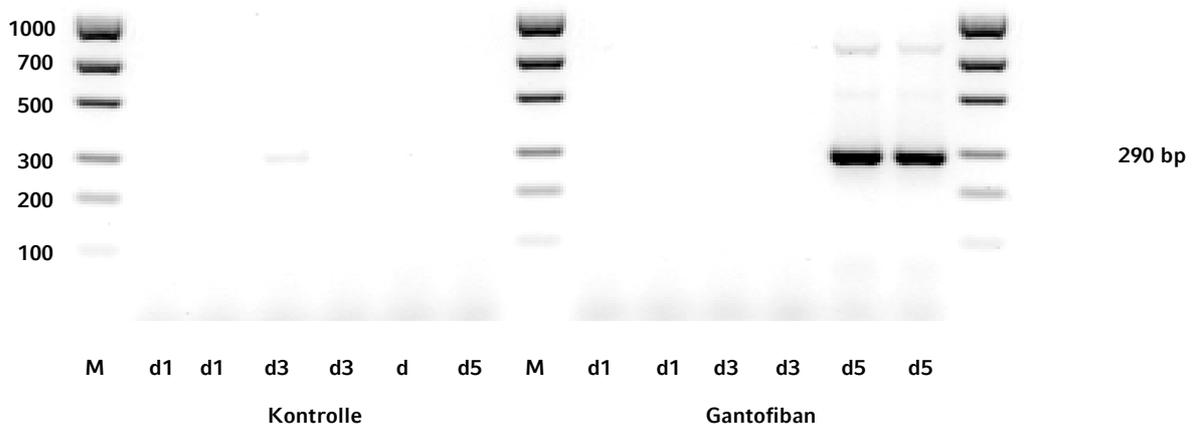


Abbildung 29: CD8-Expression in der Lunge über die Zeit.

Dargestellt die Expression in unbehandelten (links) und mit Gantofiban behandelten Tieren (rechts) 1, 3 und 5 Tage nach Tumorgabe (jeweils d1, d3 und d5). Alle Versuche wurden mit drei Mäusen pro Gruppe durchgeführt (35 Zyklen).

Die Abbildung zeigt eine starke Expression von CD8 am fünften Tag nach Tumorgabe in den mit Gantofiban behandelten Tieren. Die CD8+ zytotoxischen T-Zellen erkennen die Tumorzellen und lösen über den Signalweg Perforin/Granzym Apoptose aus. Deshalb

wurden diese Marker ebenso in der Lunge untersucht. Die Abbildungen 30 und 31 zeigen die Expression von Perforin und Granzym A in den Lungen von Kontrolltieren und Gantofiban-behandelten Tieren. Abbildung 30 stellt die Perforin-, Abbildung 31 die GranzymA-Expression dar.

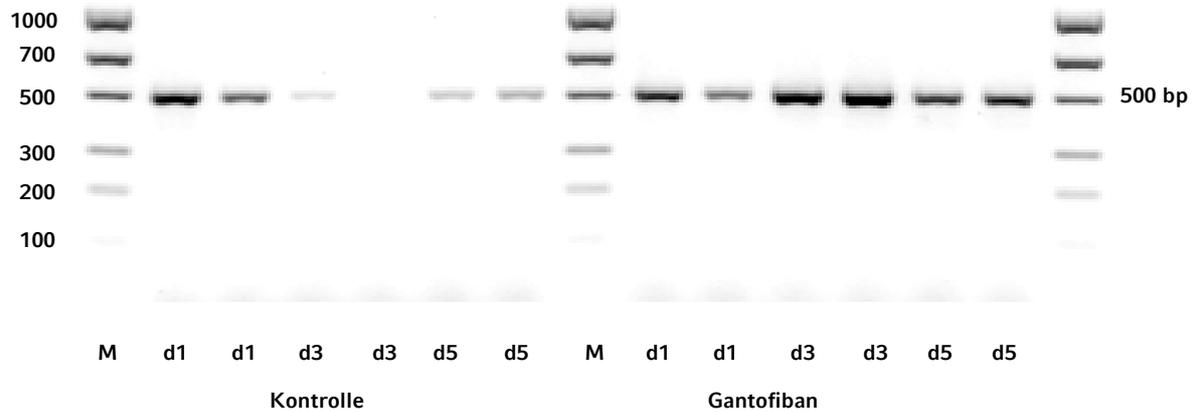


Abbildung 30: Perforin-Expression in der Lunge über die Zeit.

Dargestellt ist die Expression in jeweils unbehandelten (links) und mit Gantofiban behandelten Tieren (rechts) 1, 3 und 5 Tage nach Tumorgabe (jeweils d1, d3 und d5). Alle Versuche wurden mit drei Mäusen pro Gruppe durchgeführt (30 Zyklen).

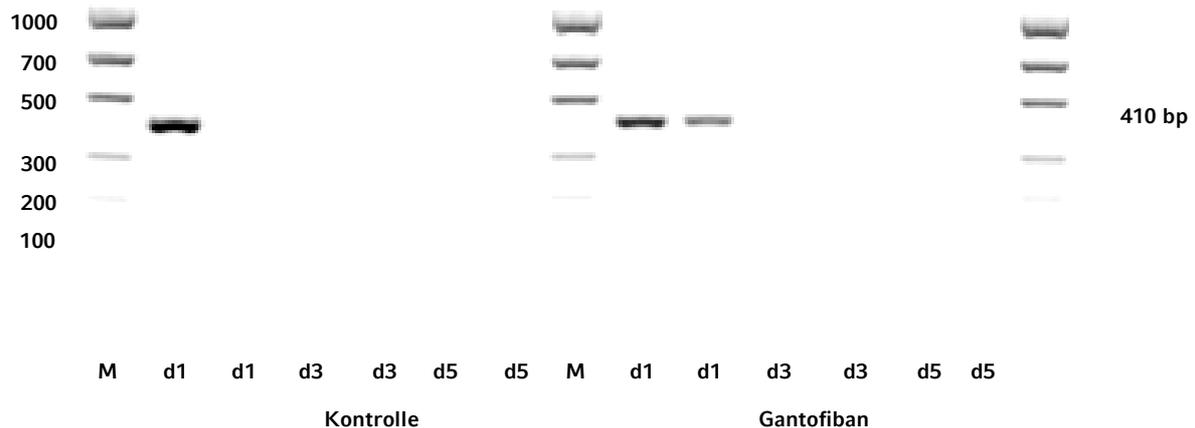


Abbildung 31: GranzymA-Expression in der Lunge über die Zeit.

Dargestellt ist die Expression in jeweils unbehandelten (links) und mit Gantofiban behandelten Tieren (rechts) 1, 3 und 5 Tage nach Tumorgabe (jeweils d1, d3 und d5). Alle Versuche wurden mit drei Mäusen pro Gruppe durchgeführt (30 Zyklen).

Die Abbildungen zeigen keinen signifikanten Unterschied in der Expression von Granzym A aber eine deutliche stärkere Expression von Perforin zu allen Zeitpunkten mit einem Maximum am dritten Tag nach Tumorgabe.

Faktoren der unspezifischen Abwehr wie Nkg2d wurden ebenfalls untersucht. Dieser ist ein Marker für die Aktivität der NK-Zellen. Abbildung 32 zeigt die Expression dieser Substanz.

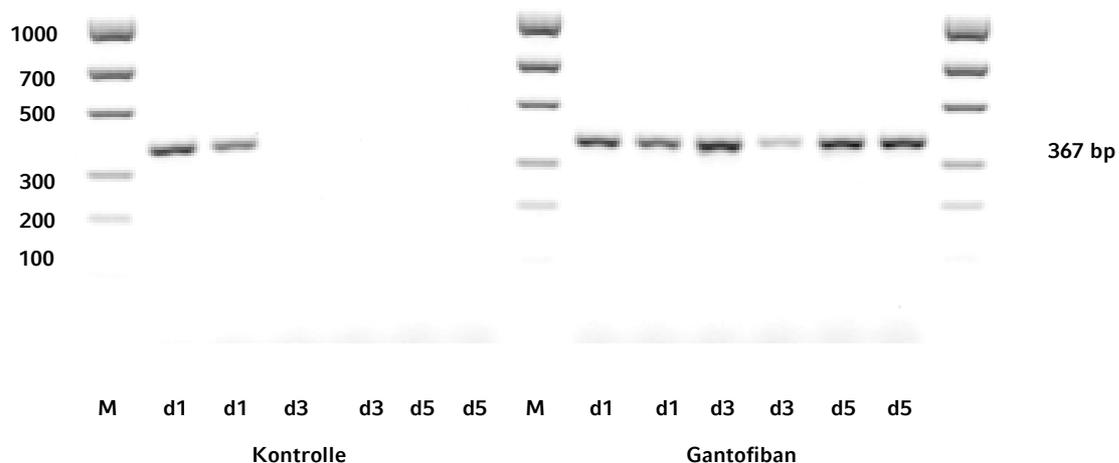


Abbildung 32: *Nkg2d-Expression in den Lungen über die Zeit.*

Dargestellt ist die Expression von unbehandelten (links) und mit Gantofiban behandelten Tieren (rechts) 1, 3 und 5 Tage nach Tumorgabe (jeweils d1, d3 und d5). Alle Versuche wurden mit drei Mäusen pro Gruppe durchgeführt (30 Zyklen).

Abbildung 32 zeigt eine deutliche stärkere Expression von Nkg2d in Gantofiban-behandelten Mäusen über die gesamte Zeit.

Die signifikant höheren Signale für Perforin, CD8 und Nkg2d in mit Gantofiban behandelten Tieren spricht für eine höhere Aktivität sowohl der spezifischen (CD8 positive Lymphozyten) als auch der unspezifischen Immunabwehr (NK-Zellen) bereits vor dem Transfer von tumorspezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten. Es ist vorstellbar, dass diese Zellen synergistisch mit den spezifischen T-Lymphozyten arbeiten und somit den Transfer unterstützen. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse ein stärkeres Pmel-Signal in Gantofiban behandelten Tieren, obwohl am Ende doch weniger Metastasen nachweisbar

waren. Die Zytokine aber vor allem die lokale Genexpression weist auf eine starke Immunantwort als Mechanismus für die Reduktion der Metastasenbildung hin.

IV. DISKUSSION

Die Metastasierung von Tumoren stellt ein wichtiges Pathogenitätsmerkmal dar, welches im klinischen Alltag die Effizienz der Tumorbehandlung empfindlich einschränkt. Während der Primärtumor in der Regel problemlos chirurgisch reseziert werden kann, stellen die Metastasen eine therapeutische Herausforderung dar. Ein besseres Verständnis der Initialvorgänge bei der Metastasierung könnte deshalb auch zu einer Verbesserung der Therapie beitragen.

4.1. Das B16 Maus-Melanom-Modell

Ein Modell, an dem einige Schritte zumindest der hämatogenen Metastasierung untersucht werden können, ist das in dieser Arbeit verwendete B16 Maus-Melanom-Modell, bei dem eine definierte Anzahl von Tumorzellen intravenös verabreicht wird. Diese Tumorzellen setzen sich vor allem in der Lunge fest und bilden dort nach einiger Zeit multiple Tumore. Die Vorteile dieses Modells bestehen darin, dass syngene Mäuse zur Verfügung stehen (die hier verwendeten C57BL/6 Mäuse) und dass die Metastasenbildung in der Lunge nach intravenöser Gabe sehr schnell erfolgt: bereits nach zehn Tagen sind 2-3mm große dunkle Metastasen sichtbar, deren Anzahl makroskopisch quantifiziert werden kann. Nachteile dieses Modells sind zum einen, dass die Initialvorgänge der Metastasierung, wie das lokale Tumorstadium, die Mobilisierung und die Migration der Tumorzellen aus dem Primärtumor außer Acht gelassen werden müssen und zum anderen, dass die künstliche hämatogene Streuung größerer Zahlen an Tumorzellen zu thromboembolischen Ereignissen und zum Tod einiger Versuchstiere führen kann. Diese Komplikation trat allerdings in dieser Studie äußerst selten auf, da die Zellen vor der Verabreichung sorgfältig aufgewirbelt und langsam injiziert wurden, so dass die Tumorzellen als Einzelzellen in den Organismus gelangten. Ein weiterer Nachteil des verwendeten Modells bestand darin, dass die Anzahl an Metastasen, die sich in den Kontrollgruppen der einzelnen Versuchsreihe entwickeln, schwanken können. Dies kann man sich so erklären, dass die in den einzelnen Versuchsreihen injizierten Tumorzellen sich in unterschiedlichen Stadien der Zellteilung

befinden können. Um den Effekt dieser Schwankungen zu minimieren, wurden die Tumorzellen in vitro sehr stark expandiert und viele Aliquots davon eingefroren. Diese wurden dann für den jeweiligen Versuch aufgetaut und zu festen Zeiten nach dem Splitten (Vereinzeln) der Zellen verwendet. Es wurden außerdem ausschließlich Gruppen miteinander verglichen, die Tumorzellen aus dem gleichen Aliquot und zum selben Zeitpunkt intravenös erhalten hatten.

Mit den oben genannten Vorteilen und trotz der genannten Nachteile erschien das B16-Maus-Melanom-Modell insgesamt ein einfaches und gut etabliertes Metastasierungsmodell und wurde daher in dieser Studie verwendet. Es ahmt optimal die hämatogene Streuung von Tumoren nach. Auch hier müssen sich Zellen, die im Blut wandern, im Zielorgan festsetzen, lokal überleben und proliferieren.

4.2. Lokales Überleben der Tumorzellen

Verfolgt man das Schicksal intravenös injizierter Tumorzellen, so finden sich bereits einige Stunden nach der i.v. Gabe die Zellen in den Lungen wieder. Dies wurde von Fidler et al. gezeigt, indem sie radioaktiv markierte Tumorzellen inokulierten und die Radioaktivität in den verschiedenen Organen auswerteten (87). Die Zellen selbst wurden dabei nicht direkt dargestellt, sondern es wurden nur die Radioaktivitätswerte in den Lungen gemessen. Damit ergibt sich allerdings eine Fehlerquelle, da die Radioaktivität auch auf zerstörten Zellen bzw. auf Zellen beruhen kann, die diese Tumorzellen phagozytiert haben. Weniger fehleranfällig ist die mikroskopische Darstellung von markierten Tumorzellen in vivo und in Lungenpräparaten. Mit diesen Methoden zeigte sich, dass peripher intravenös verabreichte Tumorzellen sich zum größten Teil in der Lunge festsetzen (88). Die Lunge ist aus anatomischen Gründen dafür prädestiniert dass sich Tumorzellen lokal festsetzen können: es handelt sich um ein gut durchblutetes Organ, dessen Kapillarsystem wie ein Netz auch die kleinsten Emboli aus den peripheren Venen auffängt. Für die Induktion zum Beispiel von Lebermetastasen muss man die Tumorzellen in die Pfortader injizieren, was die Gegebenheiten bei gastrointestinalen Tumoren nachahmt. Für das weitere Überleben der Tumorzellen im Zielorgan liegen die Ursachen dann nicht nur in den Eigenschaften des

Tumorstammes (seed) sondern auch in der unterschiedlichen Mikroumgebung (soil) der Organe: die Endothelzellen der einzelnen Organe exprimieren unterschiedliche Oberflächenrezeptoren (89) und Wachstumsfaktoren, die den Phänotyp der sich dort entwickelnden Metastasen beeinflussen (90).

Im weiteren Verlauf sind je nach Studie in einem Zeitraum von 24 bis 96 Stunden nur noch zwischen 10% und 25% der ursprünglich injizierten Zellen in der Lunge nachweisbar (91-95). Dieses Phänomen wurde in unterschiedlichen Modellen und in unterschiedlichen Organen beschrieben und scheint mit der hämatogenen Metastasierung verbunden zu sein. So wurde auch nach Verabreichung von Melanom- (MDA-MB-435) und Lungenkarzinomzellen (PE14-PE6) in die Arteria Carotis Interna von Mäusen von Kienast et al beobachtet, dass nicht alle Tumorzellen zu einer Hirnmetastase führen (96). So entwickelten sich Makrometastasen nur aus ca. 5-7% der unmittelbar nach Verabreichung intravasal nachgewiesenen Melanomzellen, während dies nur bei ca. 1-2% der Lungenkarzinomzellen der Fall war. Wodurch kommt dieser als „metastatic inefficiency“ bekannte Tumorzellverlust zustande? Viele der ursprünglich injizierten Tumorzellen gehen in die Apoptose (97). Hinweise darauf ergaben Versuche, bei denen das anti-apoptotische Gen bcl-2 in den Tumorzellen überexprimiert wurde und diese Tumorzellen dann deutlich mehr Metastasen als die Kontrollen entwickelten (98). Der Apoptosestimulus kann aus dem Scherstress des Blutes entstehen (99;100), da es insbesondere in den engen Kapillargefäßen der Lunge zur Deformation der Zellen von der sphärischen zu einer zylindrischen Form (101) kommen und das mechanische Trauma zu einem Integritätsverlust der Oberflächenmembran führen kann. Eine weitere Erklärung für diesen initialen Tumorzellverlust kann das Fehlen geeigneter Adhäsionsrezeptoren auf dem Endothel sein. So erleiden Zellen, die keine geeignete Matrix zur Adhäsion finden können, eine Integrin-abhängige Form des Zelltodes, die sogenannte „Anoikis“ (102). Ob die Signale, die notwendig sind, um der Anoikis zu entgehen durch die Bindung an die Endothelzellen, an die Extrazellulärmatrix oder an die exponierte Basalmembran bzw. durch sezernierte Moleküle vermittelt werden, ist unklar. Die Adhäsion an reife Endothelzellen ist schwierig, wie eigene Untersuchungen mit Zelllinien zeigen konnten, da

diese sich unter physiologischen Bedingungen eher antiadhäsiv verhalten. So können sie mittels NO-Sekretion eine chemische Repulsion produzieren und Apoptose in den Tumorzellen hervorrufen (103). Daneben werden im ruhenden Endothel nur sehr wenige Adhäsionsmoleküle exprimiert. Erst nach Stimulation z.B. mit TNF- α oder IL1 regeln die Endothelzellen Adhäsionsmoleküle an der Oberfläche hoch, so dass rollende Zellen fest adhären können (Sticking) (104).

Da die Adhäsion eine Voraussetzung für das lokale Homing und Auswandern der Tumorzellen darstellen kann, stellte sich deshalb die Frage, welche Moleküle der B16D5 Tumorzellen die Adhäsion an Endothelzellen oder die subendotheliale Matrix vermitteln können? Die Genexpressionsanalyse der B16D5 Tumorzellen mittels cDNA-Arrays und FACS zeigte ein nur sehr geringes Repertoire an Adhäsionsmolekülen. So befand sich nur das $\alpha_v\beta_1$ Integrin (CD51/CD29-Rezeptor) an der Oberfläche der B16D5 Tumorzellen. Für diesen Rezeptor ist bekannt, dass er die RGD-Sequenz von Vitronektin, Fibronektin oder Fibrinogen binden kann. Von diesen Molekülen findet sich jedoch keines auf dem unveränderten Endothel. Das bedeutet, dass die D5-Zellen selbst Mediatoren wie TNF und IL1 sezernieren oder aber deren Produktion in andere Zellen induzieren müssen, um zunächst das Endothel aktivieren zu können und so die Expression von weiteren endothelialen Rezeptoren zu stimulieren. Diese Möglichkeit besteht jedoch bei den B16D5 Tumorzellen nicht. Vielmehr müssten sie Monozyten oder Leukozyten dazu stimulieren. Außerdem finden sich auf den B16D5 keine Liganden für Rezeptoren wie Icam1, CD62E oder Vcam1, die üblicherweise auf stimuliertem Endothel exprimiert werden. Damit ist eine direkte Adhäsion von Tumorzellen an das Endothel eher unwahrscheinlich. Ein alternativer Weg, auf dem die Tumorzellen adhären können besteht darin, dass es bei ihrem mechanischen Steckenbleiben zur Hypoxie der Endothelien und deren Schädigung kommen kann. Bei Verlust der Endothelzellen wird dann aber Kollagen freigelegt, an welches die Tumorzellen dann über das $\alpha_v\beta_1$ Integrin leicht binden können. Die Hypoxie der Endothelzellen kann außerdem eine proinflammatorische und prothrombotische Antwort induzieren, die einen proadhäsiven Effekt ausübt (105). So kann Tissue factor

aktiviert und IL-1 vermehrt produziert werden und dadurch Adhäsionsmoleküle wie Elam-1, Icam-1 oder Vcam-1 vermehrt induziert werden. Vitronektin, Fibronektin und Fibrinogen binden dann an die geschädigten und möglicherweise apoptotischen Endothelzellen. Für eine Hypoxie-bedingte inflammatorische Reaktion auf den Endothelien der Lungenkapillaren gibt es allerdings bislang in dem hier benutzten Modell keinen direkten Beweis, obwohl es nahe liegt. Ein dritter Weg, über den die Tumorzellen an den Endothelzellen adhären können, benutzt das Gerinnungssystem und die Adhäsion von Thrombozyten. Gerinnungsfaktoren können direkt durch die Tumorzellen aktiviert werden und direkt binden, selbst Plättchen aktivieren und diese dann die Bindung an die Endothelzellen vermitteln. Die Aktivierung von Plättchen selbst steigert in der Folge die Bildung von Emboli aus Tumorzellen, Fibrinogen und weiteren Plättchen, die in der Endstrombahn des Gefäßsystems sehr viel leichter mechanisch stecken bleiben können als Einzelzellen (106;107). Hinweise dafür kommen zum Beispiel aus der Arbeit von Im et al. (108), die eine Methode entwickelten, um Tumorzellen, Plättchen und Fibrinogen in den Lungenkapillaren an isolierten Lungen zu beobachten. Sie beschrieben diese Methode als 3D-DIFLA (Three-Dimensional Visualisation of Direct Infusion of Fluorescence-Labeled Antibody). Dabei wurden markierte Tumorzellen, Plättchen und Fibrinogen direkt nach der Tumorzellinjektion an isolierten Lungenpräparaten mittels konfokaler Laser-scanning Mikroskopie dargestellt und es wurden dreidimensionale Bilder erstellt. Mit dieser Methode konnten sie zeigen, dass sich bereits fünf Minuten nach der intravenösen Tumorgabe Plättchen-Fibrinogen-Gerinnsel um die Tumorzellen herum bildeten. Diese Emboli formten dann einen Schild um die neoplastischen Zellen, der sie sowohl vor dem Scherstress als auch vor dem Angriff durch die Immunabwehr schützt (109). Neben dieser physikalischen Barriere können die Thrombozyten auch inflammatorische und chemotaktische Faktoren sezernieren, die nicht nur das Aktivierungsniveau und die Permeabilität der Endothelien, sondern auch die Aktivität der zellulären Abwehr modulieren können. Beispiele hierfür sind VEGF-a (110), das die endotheliale Permeabilität reguliert (111), TGF- β , das den aktivierenden Immunrezeptor Nkg2d der NK-Zellen inhibieren und somit eine Immunsuppression hervorrufen kann (112), IL1- β , das die Adhäsion der Tumorzellen an

den Endothelzellen stimulieren kann (113) und Pf4 (Plättchen-Faktor-4 oder Cxcl4), das nicht nur eine Freisetzung von Histamin aus den basophilen (114) sowie die Degranulierung neutrophiler Granulozyten induziert (115), sondern auch die IL-2- und IFN- γ -Sekretion in aktivierten CD3+ T-Zellen inhibiert (116). Für diesen letzten Weg der Adhäsion, bei dem die Tumorzellen Plättchen und Gerinnungsfaktoren für ihre Ansiedlung und ihre Bindung an die Endothelzellen nutzen, konnten in der vorliegenden Arbeit mehrere Hinweise gefunden werden.

So konnte gezeigt werden, dass die B16D5 Tumorzellen den Tissue Factor (F3) exprimieren. Dieser ist in der Lage, die Gerinnungskaskade zu starten. Auf die Rolle dieses Faktors im Metastasierungsprozess wurde bereits in einigen Studien hingewiesen (117-121). Durch Hemmung des Tissue Factors mit Hilfe eines spezifischen Inhibitors konnte eine signifikante Metastasenreduktion erreicht werden (122-124). Der Tissue Factor wird auf vielen Endothelien auf der abluminalen Seite exprimiert. Unter physiologischen Bedingungen ist er deshalb nicht aktiv. Erst bei einem Zellschaden kommt es zu einer Freilegung des Faktors, der zudem dann durch die Thrombozyten mittels Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) aktiviert werden kann (125). Er steuert dann über mehrere Zwischenschritte die Aktivierung des Faktors X, der die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin katalysiert. Der von den hier verwendeten B16D5 exprimierte F3 erwies sich allerdings in vitro bereits als funktionell. Dies konnte anhand der Testung der prokoagulatorischen Aktivität (PCA) gezeigt werden. Nach Zugabe von Plasma zu den B16D5 Tumorzellen kam es zur Spaltung eines thrombinspezifischen Substrates. Dies bedeutet, dass über die TF-Expression die B16D5 Tumorzellen in der Lage sind, das im Plasma enthaltene Prothrombin zu aktivieren und funktionelles Thrombin bereitzustellen. Somit kann der von den B16D5 exprimierte Tissue Faktor auch in Abwesenheit von Thrombozyten und thrombozytärer PDI aktiviert werden. Die Spaltung des thrombinspezifischen Faktors war in den durchgeführten PCA-Tests stets mittels Heparin zu inhibieren. Dies bestätigt dass die Spaltung tatsächlich durch eine Thrombinaktivierung entsteht. Thrombin selbst kann neben der Aktivierung der Gerinnung auch über

Thrombinrezeptoren (PAR1-4 bzw. F2r, F2r11-3) auf den Thrombozyten diese direkt zur Aggregation und Freisetzung von Mediatoren stimulieren.

Thrombin spielt wie andere Gerinnungsfaktoren auch eine wichtige Rolle im Metastasierungsprozess. So führten in diversen Studien in vivo sowohl Hirudin als auch die Blockierung der Thrombinrezeptoren zu einer signifikanten Metastasenreduktion (126;127). Diese Protease aktiviert wie oben erläutert die Gerinnungskaskade, aber auch direkt die Thrombozyten und die Endothelzellen über die Thrombinrezeptoren PAR1-4. Somit entsteht ein prothrombotisches, proinflammatorisches Milieu, das durch Hyperkoagulabilität und erhöhte Endothelpermeabilität charakterisiert ist und daher die Ansiedlung, die Adhäsion und die Extravasation der metastatischen Zellen erleichtert (128). Um zu prüfen, ob vitale oder apoptotische Tumorzellen effizienter Thrombin aktivieren, wurden die Tumorzellen mit Staurosporin, einer Apoptose-induzierenden Substanz, behandelt und es wurde eine PCA-Analyse durchgeführt. Das Ausmaß der Thrombinaktivierung der apoptotischen Zellen erwies sich jedoch ähnlich oder sogar etwas schwächer im Vergleich mit dem Effekt der vitalen Tumorzellen. Die prokoagulatorische Aktivität wurde außerdem sowohl für adhärenente als auch frei suspendierte Tumorzellen getestet, um zu prüfen ob die Prothrombinspaltung effizienter durch adhärenente oder durch zirkulierende Zellen erfolgt. Insgesamt war die Thrombinaktivierung durch frei suspendierte, vitale Zellen etwas schneller und effizienter als die durch apoptotische und adhärenente Zellen. Dies bestätigt die Beobachtungen von Im et al. (129), die eine sofortige Assoziation von frisch injizierten Tumorzellen und Gerinnungsfaktoren am Mikroskop beobachteten. Die Expression von F3 auf den Tumorzellen und der Nachweis seiner Funktionalität mittels PCA-Analyse konnten also zeigen, dass vitale und apoptotische Tumorzellen Thrombin aktivieren können. Dies passiert am ehesten früh im Verlauf der hämatogenen Metastasierung, wenn die vitalen Tumorzellen im Blut transportiert werden. Damit kann die Adhäsion der Tumorzellen in der Lunge in folgendem Szenario beschrieben werden: Thrombin führt über Spaltung von Fibrinogen zur Bildung von Fibrin; an dieses kann sich dann plasmatisches Fibronectin anlagern. Angelagertes Fibrin und Fibronectin stellen dann eine Matrix dar, an die sich sowohl andere Tumorzellen über ihren

CD51/CD29-Rezeptor, als auch die Plättchen mit ihrem IIb/IIIa- oder mit ihrem gpIX-Rezeptor binden können. Mit der Integrin-vermittelten Bindung der Tumorzellen an die Fibronectinmatrix wäre dann auch das Integrin vermittelte Signal möglich, welches die Tumorzelle vor der Apoptose schützt (130). Somit kann die F3 induzierte Thrombinaktivierung und die folgende Bildung von Fibrinogen das Überleben der Tumorzellen entscheidend verbessern. An die Tumorzellen und an das Fibrinogen binden dann auch weitere Thrombozyten, wie von Im et al (131) direkt gezeigt wurde.

Welche Rolle spielen nun aber die gebundenen Thrombozyten? In der Literatur finden sich mehrere Beweise, dass die Thrombozyten eine wichtige Rolle in der Metastasenbildung übernehmen (132-136). Mäuse, die keine zirkulierenden Plättchen besitzen, nachdem der Nf-E2-/- Transkriptionsfaktor ausgeknockt wurde, entwickeln nur 6% der Metastasenzahl eines vergleichbaren Wildtyps (137). Gleiches kann man auch bei plättchendepletierten Mäusen beobachten (138;139). Es gibt nun mehrere Wege, wie die Thrombozyten den Metastasierungsprozess der Tumorzellen unterstützen können: so führt die Bindung der Thrombozyten zu einer Bildung von Aggregaten, die rein aufgrund ihrer Größe leicht in den engen Lungenkapillaren hängen bleiben. Intravitalmikroskopische Aufnahmen an Hirnkapillaren konnten dies in einer Studie von Kienast et al. eindrucksvoll belegen (140). Ähnliche Untersuchungen sind an der Lunge nur sehr viel schwieriger durchzuführen, auch wenn vorläufige eigene Untersuchungen mit einem Mikroskop mit Lichtleiterübertragung diesen Befund bestätigen konnten. Nachdem die Tumorzellen sich in den Lungen festgesetzt haben, nutzen sie möglicherweise nicht nur das Fibrinogen sondern auch die Thrombozyten, um an den Endothelzellen zu adhären. Nierodzik et al. schlugen dazu vor, dass die Plättchen zunächst an Fibronectin binden, welches auf dem Endothel gebunden vorliegt und dass die Tumorzellen erst dann an die adhären Plättchen über weitere Fibronectin- und Fibrinogenbrücken wie in einem Sandwich adhären (141). Hierfür stehen den Plättchen der gpIIb/IIIa- und der gpIX-Rezeptor und den Tumorzellen der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene CD51/CD29-Rezeptor zur Verfügung. Dieser Zellhaufen, in dem sich die Tumorzellen befinden, liefert ihnen außerdem eine Möglichkeit, sich der Immunabwehr zu entziehen, da viele Abwehrzellen einen direkten Kontakt mit den

Zielzellen brauchen, um sie z.B. über die Freisetzung von Perforin eliminieren zu können. So konnten z.B. Nieswandt et al. zeigen, dass die zytolytische Wirkung von NK-Zellen auf Tumorzellen durch Thrombozytenaggregatbildung *in vitro* behindert wird (142;143). Die Aktivität dieser Zellen kann außerdem durch die immunmodulatorische Wirkung der Plättchen beeinflusst werden (144). Neben immunmodulatorischen Zytokinen sezernieren die Plättchen auch wichtige stimulatorische und chemotaktische Substanzen, die die Proliferation von Tumorzellen fördern und Knochenmarkprogenitoren rekrutieren können. Dazu zählen TGF- β , IL1- β , VEGF-a oder der Plättchen Faktor 4 (Pf4 oder Cxcl4). Die Adhäsion und Aktivierung der Plättchen kann deshalb über die Freisetzung der genannten Faktoren zu einer Steigerung des Überlebens und der Proliferation von Tumorzellen beitragen.

Die Bindung von Thrombozyten und B16D5 Tumorzellen konnte in der vorliegenden Studie *in vitro* sowohl im inaktiven als auch im aktivierten Zustand (nach Thrombingabe) nachgewiesen werden. Wie bereits diskutiert, wird von Seiten der B16D5 Tumorzellen lediglich der CD51/CD29 Rezeptor exprimiert. Liganden für diesen Rezeptor sind Vitronektin, Fibrinogen und Fibronektin. An diesen Substanzen kann der IIb/IIIa-Rezeptor der Plättchen ebenfalls binden, so dass sie als Brücken zwischen Tumorzellen, Plättchen und Endothelzellen dienen. In Abwesenheit dieser Brücke ist die direkte Bindung von Tumorzellen und Plättchen nur schwer zu erklären. So zeigten zwar die Ergebnisse der FACS-Analyse eine direkte Bindung markierter Plättchen an Tumorzellen, diese wurde jedoch dramatisch gesteigert, wenn Plasma und somit Fibrinogen und Fibronektin dazu gegeben wurden. Dabei kam es allerdings zu einer gesteigerten Bildung von Tumorzell-Plättchen-Aggregaten, die eine Auswertung im FACS stark erschwerten. Die Fibrinogen-Brücken, die die Bindung von Tumorzellen und Thrombozyten vermitteln, konnten in der vorliegenden Studie anhand von fluoreszierendem Fibrinogen mikroskopisch eindeutig dargestellt werden.

Auf die wichtige Rolle von Fibrinogen in der hämatogenen Metastasierung wiesen bereits Palumbo et al. hin. Sie fanden in Fibrinogen knock-out-Mäusen eine niedrigere

Metastasenzahl als in den entsprechenden Wildtyp-Mäusen (145;146). Als verantwortlicher Mechanismus wurde dabei diskutiert, dass sich die Tumorzellen auf dem Endothel weniger anheften und vor allem weniger „ausbreiten“. So erschienen diese auf den pulmonalen Endothelien der knock-out Mäuse weniger „abgeflacht“, obwohl ihre Anzahl nicht geringer war als in der Kontrolle. Diese Abflachung der Tumorzellen auf den Endothelzellen gilt dabei als eine Voraussetzung für die Transmigration (147;148). Wie kann man sich also die Rolle des Fibrinogens in unserem Modell vorstellen? Die B16D5 können über F3 Fibrinogen aktivieren und damit die Fibrinbildung stimulieren. Fibrin selbst bindet dann über den CD51/CD29 Rezeptor an die Tumorzelle. An dieses gebundene Fibrin binden dann Plättchen über ihren IIb/IIIa Rezeptor, der daneben auch die Aggregation von weiteren Thrombozyten vermittelt. Da auf diesem Weg die Ansiedlung und das Überleben der Tumorzellen unterstützt werden kann, erschien die Blockade dieser Plättchenadhäsion bzw. -aggregation als logische therapeutische Konsequenz und es stellte sich die Frage, welche Auswirkung die Blockade dieses Rezeptors auf die Metastasierung hat?

Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurde zunächst die Auswirkung der direkten IIb/IIIa-Blockade mittels eines spezifischen Inhibitors (Gantofiban) auf die Metastasierung des B16 Melanoms mit der Wirkung von anderen antithrombozytären Wirkstoffen wie Acetylsalicylsäure und Clopidogrel verglichen. Während Acetylsalicylsäure über eine irreversible Hemmung der Cyclooxygenase 1 und 2 und somit über eine Blockade der Prostaglandin- und Thromboxan A2-Bildung wirkt, verursacht Clopidogrel eine irreversible Blockade der thrombozytären ADP-Rezeptoren, so dass die ADP-induzierte Aktivierung des GP-IIb/IIIa-Rezeptorkomplexes in den Thrombozyten ausbleibt. Da Gantofiban ein kompetitiver IIb/IIIa-Inhibitor ist, wirkt es hingegen unabhängig von der Art des Stimulus mit einer reversiblen Blockade des Fibrinogenrezeptors.

Der Test in einem Vorabscreening zeigte, dass die gpIIb/IIIa-Blockade über Gantofiban zur stärksten Metastasenreduktion führte. So konnte der Durchschnittswert der Metastasen in Mäusen, die über fünf Tage beginnend ein Tag vor bis zu vier Tage nach Tumorzellgabe mit

Gantofiban gefüttert wurden, auf circa 60% gesenkt werden. Deshalb wurde dieses Medikament für die weiteren Versuche benutzt.

4.3. Mechanismen der Gantofiban-Wirkung

EMD 122347 (Gantofiban) ist ein gpIIb/IIIa-Antagonist vom Oxazolidinon Typ mit einem Molekulargewicht von 639 Da. Somit handelt es sich um einen sogenannten small molecule inhibitor, der erst in der Leber in die aktive Form verstoffwechselt wird. Die effektive Blutkonzentration von 3µg/ml, die man mit der in dieser Arbeit verwendeten oralen Dosierung von 100mg/Kg KG erreicht, ist 10x höher als die IC50 für die Blockade der durch TRAP (Thrombin Rezeptor aktivierende Peptid) induzierten Thrombozytenaggregation. Gantofiban wurde als IIb/IIIa-Inhibitor ausgesucht, weil es bereits klinisch zugelassen war und im Gegensatz zu anderen Fibrinogenrezeptorantagonisten wie dem Antikörper Abciximab oder den RGD-Mimetika Tirofiban, Lamifiban oder Integrelin oral verabreicht werden kann. Daneben erschien das Wirkungsprofil günstiger, da Gantofiban anders als die anderen zitierten gpIIb/IIIa-Inhibitoren keine Expression von Ligand Induced Binding Sites (LIBS) induziert und somit keinen proaggregatorischen Effekt beim Absetzen der Antagonisierung haben sollte. Weiterhin ist die Antagonisierung des gpIIb/IIIa-Rezeptors kurzlebig und die Wirkung von Gantofiban damit gut steuerbar. Zusätzlich war Gantofiban das einzige Medikament, welches unter den von Dickfeld et al. getesteten gpIIb/IIIa-Antagonisten die TRAP-induzierte Plättchendegranulierung teilweise inhibieren konnte (149). Nach oraler Gabe wird das Medikament hepatisch verstoffwechselt und seine Wirkung hält ca. 24 Stunden an. Daher wurde es im vorliegenden Experiment immer einmal täglich ab einen Tag vor der Tumorgabe verabreicht.

So verabreicht konnte Gantofiban bei der Maus die Lungemetastasenzahl des B16-Melanoms auf ca. 60% reduzieren. Ein ähnlicher Effekt wurde in der Literatur für andere gpIIb/IIIa-Inhibitoren in anderen Modellen nachgewiesen. Mit dem nicht-Peptid gpIIb/IIIa-Antagonisten XV454 zum Beispiel konnten Amirkhosravi et al. die Lungenmetastasenzahl des peripher intravenös verabreichten Lewis-Lung-Zell-Karzinoms signifikant reduzieren (150). Dabei wurde XV454 sowohl intravenös als auch oral verabreicht und für beide

Formen der Verabreichung wurde eine signifikante Reduktion der Oberflächenmetastasen 18 Tage nach der Tumorgabe nachgewiesen. Die Ergebnisse von XV454 auf die Metastasierung des Lewis-Lung-Karzinoms (LL) können allerdings nicht ohne weiteres auf das B16 Melanom übertragen werden, weil es sich um komplett unterschiedliche Tumormodelle handelt. So konnten Kienast et al. im Modell der Gehirnmastasenbildung intravitalmikroskopisch zeigen, dass bei dem Lungenkarzinom PC14PE6 die Umwandlung von Mikrometastasen (4 bis 50 Zellen) in Makrometastasen (>50 Zellen) für die weitere Bildung einer Metastase entscheidend war, während bei der Melanomlinie MDA-MB-435 als kritischster Schritt die Entwicklung von der Einzelzelle zu einer Mikrometastase angesehen wurde (151). Da die Plättchen eine wichtige Rolle insbesondere in den frühen Schritten der Metastasierung spielen, in der die Einzelzellen sich in den Lungen festsetzen und adhären, sollte die IIb/IIIa-Blockade in Melanommodellen noch erfolgreicher sein als bei der Verwendung der Lungenkarzinomzellen. Dies konnte in der vorliegenden Studie für die metastasenreduzierende Wirkung von Gantofiban auf das B16 Melanom eindeutig nachgewiesen werden.

Auf welche Weise hängt nun die Blockade des gpIIb/IIIa-Rezeptors auf Thrombozyten mit der Reduktion der Metastasen zusammen? Der gpIIb/IIIa-Rezeptor ist für Plättchen und Megakaryozyten spezifisch. Obwohl er auch von einigen Tumorzellen exprimiert wird (152;153), waren die hier verwendeten B16D5-Tumorzellen für diesen Rezeptor negativ. Damit kann die blockierende Substanz nur an den Plättchen wirken. Hier hemmt sie die Plättchenadhäsion und -aggregation. Als Ligand für das gpIIb/IIIa der Plättchen kommen Fibrinogen, Fibronectin, von Willebrandfaktor, Vitronectin und Thrombospondin in Frage. Für die hier dargestellten Versuche bei weitgehend intaktem Endothel kommen davon vor allem Fibrinogen und das plasmatische Fibronectin in Frage. Eine Stimulation der Plättchen mit Thrombin oder ADP kann deren Bindung an nicht immobilisiertem Fibrinogen bewirken. Wie die Versuche zur PCA mit den B16D5 Zellen zeigten, sind die Tumorzellen in der Lage, Thrombin direkt zu aktivieren. Dieses steht dann zur Aktivierung der Plättchen zur Verfügung und kann so deren Adhärenz über gpIIb/IIIa und Fibrinogen/Fibrin vermitteln. Auch ein hypoxischer Zustand der Endothelzellen, der durch physikalisch festgehaltene

Tumorzellen in der Mikrozirkulation möglich ist, könnte zu einer ADP Freisetzung und zu einer Thrombozytenaktivierung führen. Auf die Bedeutung dieses Aktivierungsweges weisen die Ergebnisse zur Wirkung von Clopidogrel hin: die tägliche Gabe von Clopidogrel führte ebenfalls in dem bereits erwähnten Vorabscreening zu einer Metastasenreduktion. Diese war jedoch geringer als die, die durch Gantofiban erzielt wurde. Die durch Gantofiban verursachte Hemmung der gpIIb/IIIa-Bindung sollte zur Bildung von weniger Mikroemboli von Tumorzellen und Plättchen führen. Diese haben üblicherweise zur Folge, dass die Tumorzellen kurz nach der intravenösen Gabe in den Lungenkapillaren hängenbleiben (154). So scheinen Tumore, die eine plättchenaktivierende Wirkung ausüben, bevorzugt in den Lungen zu metastasieren (155). Die Behandlung mit Gantofiban sollte daher zu einer Reduktion der Anzahl an Tumorzellen führen, die sich in den Lungenkapillaren festsetzen. Ein weiterer Aspekt der gpIIb/IIIa-Blockade besteht darin, dass die Thrombozyten über diesen Rezeptor aktiviert werden und dann Mediatoren freisetzen können. Dies kann dann durch Gabe des Antagonisten reduziert werden (156). Thrombozytenfaktoren, die für das Überleben und die Ansiedlung von Tumoren von Bedeutung sein könnten sind dabei Wachstumsfaktoren, wie Pdgf, VEGF-a sowie Entzündungsmediatoren, wie Platelet Factor-4, Interleukin-8, Mip-1 α , Rantes, Ccl17, Ccx11, Cxcl5. Von diesen sind einige in der Lage, sowohl die Proliferation der Tumorzelle als auch die Attraktion von sogenannten Nischenzellen zu stimulieren. Bei den zuletzt genannten handelt es sich um Zellen aus dem Knochenmark, die vor Ort eine Nische bilden können, in der Tumorzellen besser überleben, wie Kaplan et al. zeigen konnten(157). Sie beobachteten einen chemotaktischen Gradient von CXCL12 und eine Migration von VEGF-Rezeptor positiven Zellen an diejenigen Stellen, an denen sich Metastasen entwickeln. Mit der Behinderung der Rekrutierung dieser Nischenzellen kann sich die Extravasation der Tumorzellen verzögern und es verlängert sich in der Folge die Zeit, in der die Zellen intraluminal bleiben und somit für die Immunabwehr erreichbar sind. Dieser Effekt kann durch das Fehlen von Brückenmolekülen wie z.B. Fibrin noch verstärkt werden. Gantofiban könnte somit sowohl zu einer Reduktion der Zahl an lokalen B16D5 Tumorzellen in der Lunge als auch zu einer besseren Zugänglichkeit der Tumorzellen für aktivierte CTLs und

Abwehrzellen führen. Aus dieser Überlegung leitete sich daher auch die Idee ab, die IIb/IIIa-Blockade mit dem adoptiven Transfer von spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten zu kombinieren. Hierzu gab es bisher in der Literatur keine entsprechenden Daten, so dass es sich um einen völlig neuen Ansatz handelt.

4.4. Adoptiver T-Zell-Transfer und gpIIb/IIIa Blockade

Als Modell, um die Wirkung der Kombination der gpIIb/IIIa-Blockade mit einer zellulären Immuntherapie zu testen, wurden das B16 Melanom und der adoptive Transfer von spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten benutzt. Das B16 Melanom gilt als wichtiges Modell an dem Immuntherapieschemata getestet werden. Dieser Tumorstamm zeigt eine sehr niedrige Expression von MHC Molekülen der Klasse I und ist somit ein nur wenig immunogener Tumor. Eine Immunreaktion lässt sich weder durch Bestrahlung der Tumorzellen, noch mit dem Zusatz von BCG oder *C. parvum*, welches eine Immunantwort in anderen Tumormodellen erzeugen kann (158;159), verlässlich induzieren. Auch eine hochdosierte IL-2-Therapie erzielt keine signifikanten Ergebnisse in diesem Modell. Selbst die Transfektion mit dem kostimulatorischen Molekül B7-1, eine Maßnahme, die in anderen wenig immunogenen Tumoren eine Immunantwort produziert, hat eine deutlich geringere Wirkung auf das B16 Melanom (160;161). Es ist ein schwieriges Modell, bei dem gängige Vakzinierungsstrategien meist zu spät kommen. Allerdings haben Winter et al. zeigen können, dass mit einer GM-CSF transfizierten Tumorlinie nach s.c. Immunisierung in lokalen Lymphknoten sensibilisierte T-Zellen induziert werden, die nach ex vivo Expansion mit anti-CD3 und IL-2 für eine Therapie verwendet werden können (162). Die sensibilisierten zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) müssen dann in einem Zeitraum von bis zu drei Tagen nach Tumoringjektion ebenfalls intravenös verabreicht werden. Zusätzlich muss nach dem Transfer IL-2 täglich verabreicht werden, um die CTLs weiter in vivo zu stimulieren.

Dieses Immuntherapiemodell wurde gewählt, weil es sich um ein erfolgreiches Modell handelt, das zu einer kompletten und dauerhaften Heilung der behandelten Tiere führen kann. Als tumorfrei galten dabei Mäuse, die keine makroskopisch sichtbaren Metastasen

auf der Lungenoberfläche zeigten. Diese Auswertungsmethode findet ihre Grenze darin, dass das Innere des Organs sowie eventuelle Mikrometastasen, die dem Auge entgehen, unberücksichtigt bleiben. Langzeitversuche haben jedoch gezeigt, dass Mäuse, die auch nach zehn Tagen noch keine sichtbaren Oberflächenmetastasen auf ihrer Lunge entwickelt hatten, länger als 200 Tage überlebten. Sie gelten somit als vollständig geheilt (163).

Der vollständige Heilungserfolg dieses Immuntherapiemodells ist jedoch von einigen Voraussetzungen abhängig. So muss der T-Zell-Transfer spätestens am dritten Tag nach Tumorgabe erfolgen. Beginnt die Behandlung nur einen Tag später, entwickeln sich weiterhin Metastasen auf den Lungen der Tiere. Daneben muss außerdem eine adäquate Anzahl an T-Lymphozyten transferiert werden um ein geeignetes Effektor/Zielzell-Verhältnis (E/T) zu erreichen. Daher müssen nach intravenöser Gabe von 2×10^5 Tumorzellen mindestens $3,5 \times 10^7$ CTLs verabreicht werden um eine Heilung zu erreichen. Diese Voraussetzungen schränken die Übertragbarkeit dieses Modells auf klinische Studien ein: Immuntherapieschemata in einem klinischen Setting kommen erst zu einem deutlich späteren Zeitpunkt zum Einsatz, außerdem darf das Risiko von Nebenwirkungen und Thromboembolien nicht vernachlässigt werden, das mit der Verabreichung von sehr großen Zellzahlen verbunden ist.

Um das Immuntherapieschema so zu verbessern, dass es auf klinische Studien übertragen werden kann, muss also das therapeutische Fenster erweitert und das E/T-Verhältnis verbessert werden, ohne dabei die CTL-Zahl erhöhen zu müssen. Dafür muss man das Tumorzellüberleben bzw. die Tumorpheriferation in den Lungen als Zielorgan erschweren. Tumorzellen eignen sich homeostatische Mechanismen wie die Plättchenadhäsion an, um in den Lungen der Mäuse überleben und wachsen zu können. Dieser Mechanismus kann eine mögliche Achillesferse im Metastasierungsprozess darstellen. Daher wurde die gpIIb/IIIa Blockade mit dem vorgestellten Immuntherapiemodell kombiniert mit dem Ziel, das zeitliche Fenster für die Therapie bei gleichbleibender CTL-Zahl erweitern zu können. Anstatt an Tag drei wurden die CTLs an Tag vier, fünf und sechs nach der Tumorgabe verabreicht. Zusätzlich wurden die Mäuse mit dem gpIIb/IIIa-Inhibitor Gantofiban bis zum

Tag des Transfers gefüttert. Eine Fortführung der IIb/IIIa-Blockade über den Tag des Transfers hinaus erschien deshalb nicht sinnvoll, weil der gpIIb/IIIa vor allem die ersten Schritte der Metastasierung wie Ansiedlung, Adhäsion und Extravasation betrifft. So erbrachte eine Fortführung der Therapie mit dem gpIIb/IIIa-Antagonisten XV454 über die ersten Tage nach Tumorgabe hinaus keinen signifikanten Effekt auf die Metastasierung des Lewis-Zell-Karzinoms in der Studie von Amirkhosravi et al. (164).

Die Kombination der gpIIb/IIIa-Blockade mit dem CTL-Transfer erwies sich zu jedem Zeitpunkt als effektiver gegenüber der alleinigen Immuntherapie. So konnte die Metastasenanzahl **an Tag 4** um ca. 99 %, **an Tag 5** um ca. 89% und **an Tag 6** um ca. 73% reduziert und damit das Ziel der Erweiterung des therapeutischen Fensters erreicht werden. Die Ergebnisse zeigen aber auch, dass eine Verlängerung des therapeutischen Fensters nicht unbegrenzt möglich ist. So steigt die Metastasenanzahl, unabhängig von dem Zusatz von Gantofiban, je später der Transfer erfolgt.

Durch welchen Mechanismus verbessert nun Gantofiban die Ergebnisse des CTL-Transfers an Tag 4, 5 und 6? Dabei kommen prinzipiell zwei Möglichkeiten in Frage. Zum einen kann die Reduktion der Tumorzellen vor Ort das E/T-Verhältnis verbessern, zum anderen kann die Reduktion der Plättchenadhäsion zu einer besseren Zugänglichkeit der Tumorzellen für die CTLs und somit zu einer effizienteren Immunantwort führen.

4.5. Mechanismen der Kombination gpIIb/IIIa Blockade und T-Zell-Transfer

4.5.1. Die gpIIb/IIIa-Blockade und das E/T-Verhältnis.

Als Hypothese, um die synergistische Wirkung von Gantofiban in Kombination mit dem CTL-Transfer zu erklären, wurde zunächst angenommen, dass die IIb/IIIa-Blockade zu einer niedrigeren Tumorzellenzahl vor Ort und somit zu einem günstigeren E/T-Verhältnis führt.

Ein adäquates E/T-Verhältnis ist eine der Voraussetzungen für den Erfolg des Transfers. Im hier verwendeten Modell wurden erst 2×10^5 Tumorzellen und dann $3,5 \times 10^7$ CTLs verabreicht. Dies ergibt rein rechnerisch ein E/T-Verhältnis von 175 CTLs zu einer Tumorzelle. Dieses Verhältnis gilt allerdings nur unter der Voraussetzung, dass alle Zellen

überleben und die Tumorzellen nicht sofort proliferieren. Der Einfluss des E/T ist wahrscheinlich noch größer, als die rechnerischen Verhältnisse es nahelegen, da initial in der Lunge Tumorzellen absterben. Wenn also die gpIIb/IIIa-Blockade das initiale E/T dramatisch verschiebt, dann sollte sich dies in der Zahl der lokalen Tumorzellen niederschlagen.

Wie kann nun Gantofiban das E/T-Verhältnis in der Lunge verbessern? Durch die Reduktion der Plättchenadhäsion erreichen die Tumorzellen die Lungen eher als Einzelzellen anstatt als Zellaggregate. Damit ist es vorstellbar, dass vermehrt Einzelzellen durch das Kapillarbett gelangen und in andere Organe wandern. Die Analyse auf sichtbare Metastasen in Leber, Milz und Niere brachte dazu keine Hinweise. Ebenso führte die Analyse des tumorspezifischen Markers Pmel zu keinem eindeutigen Anstieg des Signals in diesen Organen. Damit erscheint diese Möglichkeit als eher unwahrscheinlich. Eine weitere Möglichkeit, dass das E/T-Verhältnis ansteigt, ist gegeben, wenn Einzelzellen vor Ort eine schlechtere Überlebensrate aufweisen. Hinweise darauf, dass die Bildung von Tumoraggregaten nicht nur wichtig für die lokale Ansiedlung, sondern auch für das weitere Überleben ist, finden sich in den langzeit-intravitalmikroskopischen Untersuchungen von Kienast et al. (165). Als mögliche Gründe dafür, ist es vorstellbar, dass einzelne Tumorzellen anfälliger für den Scherstress des Blutes sind, der zur Dislokation führen kann oder aber die entsprechenden Integrinsignale nicht vermittelt werden können, die vor der Apoptose schützen (166). Diese Signale könnten Brückenmoleküle wie Fibronectin und Fibrinogen vermitteln und so nicht nur die Apoptose verhindern, sondern auch die Anheftung an das Gefäß verbessern. Weitere Hinweise darauf kommen aus der bereits zitierten Studie von Palumbo, in der man eine fehlende Ausbreitung der Tumorzellen auf den Lungenendothelien unter Fibrinogenblockade beobachten konnte (167). Ein Grund dafür könnte sein, dass dieses Ausbreiten bzw. Stretching der Tumorzellen eine Voraussetzung für deren Transmigration ist.

Um nun zu verstehen, ob Gantofiban vor allem das E/T Verhältnis beeinflusst oder aber zur Ansiedlung von Einzelzellen führt, die besser zugänglich sind, musste die Zahl der

überlebenden Tumorzellen in der Lunge bestimmt werden. Dieses ist histologisch nur sehr schwer möglich und mit einer großen Fehlerquote behaftet, da eine relativ kleine Tumorzellzahl in der Lunge dargestellt werden muss: nach Angaben der Literatur überleben nur etwa 10% der injizierten Zellen (2×10^4) und diese verteilen sich auf beide Lungenflügel (168-170). Eine Möglichkeit, die Anzahl der Tumorzellen doch zu bestimmen stellt der Nachweis eines spezifischen Markergens (Pmel/Si GeneID 20431) mittels PCR in der Lunge dar. Mit Hilfe der PCR lassen sich weniger als 100 Zellen in einer Probe nachweisen. Diese Methode kam deshalb hier zum Einsatz. Überraschenderweise war dabei das Signal des tumorspezifischen Markers Pmel bei den therapierten Tieren höher als in der Kontrolle. Damit muss man davon ausgehen, dass sich in dieser Gruppe initial mehr Tumorzellen festsetzen und/oder überleben als in der unbehandelten Gruppe. Damit kann ein geändertes E/T Verhältnis nicht der entscheidende Punkt in der Überlegenheit der Kombinationstherapie sein. Da allerdings am Ende des Beobachtungszeitraumes von 10 Tagen bei der kombinierten Therapie immer weniger Metastasen nachzuweisen sind, müssen die Tumorzellen im Verlauf ihre Proliferation einstellen oder aber von der Immunabwehr eliminiert worden sein. Beides kann durch eine intravasale Lage der Tumorzellen ohne Abschirmung durch Gerinnungsfaktoren und Plättchen begünstigt werden. Nach Untersuchungen von Kienast et al. bilden sich manifeste Metastasen nur, wenn die Tumorzellen in einem Zeitraum von ca. 5-6 Tagen das Gefäßbett verlassen haben (171). Schaffen sie dies nicht, so gehen sie in einen Ruhezustand (Dormancy) über oder sterben ab. Damit muss für die B16-Zellen nach gpIIb/IIIa-Blockade angenommen werden, dass sie länger im Gefäßbett bleiben und entweder absterben oder vom Immunsystem erkannt werden.

4.5.2 Die gpIIb/IIIa-Blockade und die Elimination der Tumorzellen

Nachdem die Untersuchung des Pmel-Signals in den Lungen von gpIIb/IIIa-blockierten Tieren gezeigt hatte, dass die lokale Tumorzellzahl in dieser Gruppe sogar höher war als in der Kontrolle, musste die Hypothese getestet werden, ob die Tumorzellen unter

Gantofibanbehandlung eine niedrigere Überlebensrate im Verlauf aufweisen oder durch das Immunsystem besser eliminiert werden.

Was beeinflusst nun das Überleben der Tumorzellen? Kienast et al. konnten zeigen, dass in der Entwicklung einer Hirnmetastase aus einer Melanomzelle zunächst 40-50% der Einzelzellen an dem Schritt der Extravasation scheitern, dann weitere 10% der Zellen sterben, die keinen Kontakt zum Gefäßsystem behalten haben und ein Drittel von denen, die sich perivaskulär befinden (172). Während bei Lungenkarzinomzellen (PC14-PE6) der Schritt von der Mikro- zur Makrometastase für die „metastatic inefficiency“ verantwortlich ist, besteht diese für die von Kienast et al. untersuchte Melanomlinie (MDA-MB-435) im Übergang der Einzelzelle zu einer Mikrometastase (173). Außerdem entwickelte sich in der zitierten Studie keine Hirnmetastase aus Einzelzellen, die länger intravasal blieben (>9 Tage), keinen Kontakt zum Gefäßsystem behielten und keine geeignete Vaskularisation entwickelten. Wie Kaplan et al. (174) zeigten, verlassen die Tumorzellen das Gefäßsystem, behalten aber Kontakt, indem sie eine Proliferationsnische bilden. Diese wird durch aktiviertes Endothel, Fibronectin und Feederzellen wie VEGFr1-positive Zellen aus dem Knochenmark gebildet. Hierbei können die Plättchen mit Fibronectin sowie mit weiteren Faktoren wie VEGF-a oder CXCL12 beitragen, die zum einen das Endothel stimulieren und zum anderen die Knochenmarkzellen anlocken können. Die Nische bildet einen geschützten Raum, in dem die Tumorzellen proliferieren können und dem Immunsystem entgehen. Um zu testen, ob die Plättchenadhäsionsblockade mittels Gantofiban mit der Nischenbildung interferiert und die Elimination der Tumorzellen durch die Immunabwehr beeinflusst, wurde die Plasmakonzentration von thrombozytären Mediatoren untersucht, welche möglicherweise für die Nischenbildung wichtig sind sowie die von Chemokinen, die eine Aktivität des Immunsystems anzeigen.

Auf eine Aktivierung mit Freisetzung von Mediatoren durch die Thrombozyten deutet dabei die Plasmakonzentration von TGF- β hin. So konnte in dieser Studie bereits zwei Stunden nach peripher venöser Gabe von B16-Melanomzellen ein Peak in der Plasmakonzentration von TGF- β gemessen werden. Dieses Chemokin übt eine chemotaktische und

modulatorische Wirkung auf Immunzellen aus. Unter anderem scheint es den Metastasierungsprozess durch die Suppression der Makrophagenaktivität zu unterstützen (175-177). So führt die Kombination von anti-TGF- β und IL-2 zu einer signifikanten Metastasenreduktion (178). Auch die lebenslange Verabreichung von TGF- β -Antagonisten schützt Mäuse vor Metastasen (179). Ein TGF- β Peak zwei Stunden nach Tumorzellgabe deutet hier allerdings auf eine Aktivierung der Plättchen hin. Dieses kann eine immunsuppressive Wirkung auf Makrophagen entfalten und so zum Überleben der Tumorzellen beitragen. Im Vergleich zur Kontrolle blieb in gpIIb/IIIa-blockierten Mäusen der besagte 2-Stunden-Peak der TGF- β Konzentration aus. Das bedeutet, dass die Plättchenaktivierung in dieser Gruppe geringer ist und möglicherweise die Makrophagen auf die Tumorzellen effektiver reagieren. Als weiterer Hinweis auf die Reaktion von Monozyten/Makrophagen muss auch die höhere TNF- α -Konzentration gelten, die in der vorliegenden Studie in der Gantofiban-Gruppe gemessen werden konnte. Mittels TNF- α können Makrophagen Tumorzellen zerstören. So wurde in einer Studie eine niedrigere TNF- α -Produktion durch peritoneale Makrophagen bei Mäusen gemessen, die Melanomzellen iv. erhalten hatten, als in der Kontrollgruppe (180). Der Anstieg beider Faktoren in gpIIb/IIIa-blockierten Mäusen lässt eine erhöhte Immunreaktion vermuten. Eine mögliche Erklärung für die effizientere Makrophagenreaktion in den ersten Tagen nach Tumorgabe in gpIIb/IIIa-blockierten Mäusen könnte in der Abwesenheit der physikalischen Barriere liegen, die die Plättchen zwischen den Tumorzellen und den Abwehrzellen bilden. Die Tumorzellen bleiben unter der Plättchenadhäsionsblockade länger intravasal und sind damit für die Abwehrzellen besser zugänglich. Eine Abschirmung der intravasal liegenden Tumorzellen kann durch das Rekrutieren von Knochenmarkprogenitoren erfolgen. Diese bilden nach Untersuchungen von Kaplan et al. die sogenannte metastatische Nische (181). Deren Induktion erfolgt dabei durch Mediatoren, die teilweise von den Tumoren, aber auch von anderen Zellen produziert werden können. Dabei spielen VEGF (182;183) sowie das Chemokin Cxcl-12 (184;185) eine entscheidende Rolle. Aus diesem Grunde wurden diese im Plasma der Tiere untersucht. Die VEGF-Plasmakonzentration war in der vorliegenden

Studie bei gpIIb/IIIa-blockierten Mäusen zu jedem Zeitpunkt signifikant niedriger als in der Kontrolle. Dabei kann dieses nicht alleine aus den Tumorzellen stammen, sondern wird vermutlich auch von den Plättchen sezerniert. Auch Amirhosrhabi et al. (186) massen in vitro die VEGF-Konzentration im Plasma, in dem humane A375 Melanomzellen und Plättchen inkubiert wurden. 30 Minuten nach dem Beginn der Inkubation konnten sie mittels FACS zeigen dass 87% der Tumorzellen an den Plättchen adhärten. Zusätzlich kam es zu einer Freisetzung von VEGF, die mit der Zeit progressiv zunahm. Die VEGF-Konzentration, die die A375 Melanomzellen unter normoxischen Bedingungen sezernierten, lag unter 20pg/ml. Nach Inkubation mit den Thrombozyten im Plasma erreichte die VEGF-Konzentration mehr als 100pg/ml. Wurden jedoch die Plättchen mit dem gpIIb/IIIa-Antikörpers Abciximab vorinkubiert (50ug/ml), sank die VEGF-Konzentration auf ca. ein Drittel dieses Wertes. Dieser Mechanismus kann deshalb in den hier vorgestellten Untersuchungen auch wirksam sein, wurde allerdings in vivo gezeigt. VEGF-a selbst ist dabei in der Lage, die Permeabilität des Endothels zu erhöhen und damit die Transmigration von Tumorzellen zu verbessern (187) was ebenfalls die Überlebenschance von Tumorzellen erhöht.

Neben VEGF können Thrombozyten auch das Chemokin CXCL12 sezernieren welches in der Lage ist, chemotaktisch CXCR4 positive Knochenmarkszellen anzulocken und so zur Bildung einer Tumornische beizutragen. Die Bestimmung der Konzentration dieser Substanz im Plasma zeigte hier eine Verschiebung des zeitlichen Peaks. So war die Konzentration dieses Chemokins in gpIIb/IIIa-blockierten Mäusen am dritten Tag nach Tumorgabe höher und am vierten Tag niedriger als in der Kontrollgruppe. Dies würde bedeuten, dass die Rekrutierung von Knochenmarkprogenitoren in gpIIb/IIIa-blockierten Mäusen früher als bei der Kontrolle fände. Dies erscheint allerdings unwahrscheinlich, da es bei gpIIb/IIIa-blockierten Mäuse zu einer niedrigeren Metastasenzahl als bei der Kontrolle kommt. CXCL12 soll darüber hinaus im B16/OVA-Modell eine Chemorepulsion von CTLs verursachen (188). So müsste die Verabreichung von CTLs am Tag drei bei mit Gantofiban behandelten Mäusen zu einer höheren Metastasenzahl führen als in der Kontrolle. Da die Mäuse, die am Tag drei mit dem hier verwendeten Immuntherapieschema

behandelt werden, metastasenfrem sind, wurde nicht getestet, wie sich die gpIIb/IIIa-Inhibition auf diese Gruppe auswirkt. Es erscheint jedoch eher unwahrscheinlich, dass es zu einer größeren Metastasenzahl in diesen Mäusen kommt.

Insgesamt sprechen die anfänglich niedrigere TGF- β , die höhere TNF- α und die niedrigere VEGF-a-Plasmakonzentration für ein Ausbleiben der Plättchenaktivierung und für eine effizientere Makrophagenaktivität in Gantofiban behandelten Mäusen. Der Grund dafür liegt möglicherweise in der besseren Exposition der Tumorzellen, die unter anderem aus der Verzögerung der Nischenbildung durch Knochenmarkprogenitoren resultieren könnte. Somit können Immunabwehrzellen die Tumorzellen besser eliminieren.

Abwehrzellen, die für die Elimination der Tumorzellen in Frage kommen, sind CD4⁺ und CD8⁺ Zellen, Makrophagen (189) und NK-Zellen (190). Die CD4⁺ Zellen nutzen für die Elimination von Tumorzellen den apoptoseninduzierenden Fas-Liganden (Fas-L), IFN- γ und TNF- α . Die CD8⁺ T-Lymphozyten verwenden Perforin und Granzym. Die Makrophagen sezernieren toxische Moleküle wie Stickstoffmonoxid, Sauerstoffradikale, TNF- α und Trail (TNF-related apoptosis inducing ligand), die NK-Zellen Mediatoren wie IFN- γ und Perforin (191;192).

Um zu testen, ob es unter gpIIb/IIIa-Blockade zu einer effizienteren Aktivität dieser Abwehrzellen kommt, wurde die Genexpression von CD4, CD8, Perforin, Granzym und Nkg2d in den Lungen der Mäuse untersucht. Hierbei zeigte sich ein höheres Signal sowohl für CD8 als auch für Perforin und Nkg2d in den Lungen von Mäusen, die mit Gantofiban behandelt wurden. Diese Ergebnisse könnten bedeuten, dass vermehrt spezifische (CD8⁺ Lymphozyten) als auch unspezifische Immunabwehrzellen (NK-Zellen) in der Lunge von gpIIb/IIIa-blockierten Tieren nachweisbar sind.

Die Hauptursache für diese effizientere Immunreaktion scheint darin zu liegen, dass unter der gpIIb/IIIa-Blockade die Tumorzellen vereinzelt auf den Kapillarendothelien vorliegen und somit besser für zirkulierende Immunabwehrzellen zugänglich sind. Dies kann auch dadurch begünstigt werden, dass in Abwesenheit der Plättchen weniger Mediatoren ausgeschüttet werden, die z.B. KM-Zellen anlocken können, die für die Bildung einer metastatischen Proliferationsnische wichtig sind und daneben die Extravasation ins Gewebe

verzögert wird. Damit kann für die B16D5 Tumorzellen nach gpIIb/IIIa-Blockade angenommen werden, dass die Tumorzellen länger im Gefäß bleiben und entweder absterben oder aber vom Immunsystem erkannt werden. Gleichzeitig wirken zytotoxische T-Lymphozyten bei direktem Kontakt mit den Zielzellen effektiver, um über CD95L/CD95 Interaktion bzw. das Einschleusen von Perforin/Granzym die Zytotoxizität zu vermitteln. Diese Mechanismen könnten erklären warum es bei Gantofiban-behandelten Mäusen zu einer kleineren Metastasenzahl kommt, obwohl sich anfänglich sogar mehr Tumorzellen in den Lungen festsetzen (höheres Pmel-Signal).

Eine Problematik dieser Studie ergibt sich daraus, dass ausschließlich die makroskopischen Metastasen berücksichtigt wurden. So ist es auch möglich, dass die initial größere Tumorzellzahl von gpIIb/IIIa-blockierten Mäusen nicht zu einer erhöhten Metastasenzahl am Tag 10 führt, weil eine größere Anzahl an Tumorzellen in einem schlafenden Zustand verharrt (Dormancy). Dies kann nicht ausgeschlossen werden und könnte erst durch Langzeitüberleben-Studien entkräftet werden. Darauf deutet auch das relativ hohe Pmel Signal in der Lunge hin. Allerdings haben intravitalmikroskopische Studien gezeigt, dass Tumorzellen, die nach 5 Tagen noch nicht das Gefäßsystem verlassen haben, nicht weiter proliferieren und damit nicht zur Metastasenbildung beitragen können. Diese Zellen müssten das Gefäß verlassen haben und in unmittelbarer Nähe desselben „überwintern“. Dafür gibt es zwar histologisch keine Belege, berücksichtigt man aber, dass VEGF die Permeabilität des Endothels erhöhen und damit die Emigration von Tumorzellen erleichtern kann, so weist die reduzierte VEGF-a Konzentration bei den Gantofiban behandelten Zellen darauf hin, dass die Tumorzellen länger intravasal verbleiben und durch die Immunabwehr eliminiert werden können. Damit erscheint der letztgenannte Weg als wenig wahrscheinlich.

Zusammenfassend hat die Pmel-Expression gezeigt, dass die Beeinträchtigung der Thrombozytenadhäsion zu Beginn zu einer höheren Tumorzellzahl in den Lungen der Mäuse führt. Die niedrigere Metastasenzahl, die zehn Tage nach Tumorgabe in Gantofiban-behandelten Mäusen nachweisbar ist, kann deshalb darauf zurückgeführt werden, dass es

zu einer stärkeren Reaktion der unspezifischen und der spezifischen Immunabwehr direkt nach Tumorgabe und zu einer besseren Exposition der Tumorzellen für die Abwehrzellen kommt. Beide Faktoren führen zu einer besseren Tumorzellelimination im Verlauf, so dass sich unter Gantofibanbehandlung weniger Metastasen entwickeln als in der Kontrolle und es durch die Kombination mit dem CTL-Transfer zu einer effizienteren Metastasenreduktion kommt.

4.6. Schlussfolgerungen

Trotz großer Fortschritte in den Kenntnissen über Metastasierung und Tumorummunologie, ist die klinische Anwendung der Immuntherapie in der Behandlung von soliden Tumoren bislang nicht überzeugend. Die Analyse von 1.300 Vakzinierungsprotokollen zeigte eine Gesamtansprechrates von 3% (193). Von allen Schemata hat bislang der adoptive Transfer von in vitro expandierten zytotoxischen T-Lymphozyten die besten Ergebnisse gezeigt. Die Entwicklungen deuten jedoch an, dass eine Kombination unterschiedlicher Ansätze notwendig ist, um Ansprechrates und Ergebnisse der Immuntherapie entscheidend zu verbessern. Eine lymphoablative Präkonditionierung wird zum Beispiel zur Zeit mit dem CTL-Transfer in klinischen Studien kombiniert. Durch diese Präkonditionierung werden CD4+/CD25+ regulatorische T-Zellen (TReg) eliminiert, die eine Immunsuppression hervorrufen. Ähnliche Effekte können auch durch TNF-Gabe erreicht werden (194). Nach der besten Kombination wird allerdings noch gesucht. Eine mögliche Ergänzung könnte daher die in dieser Studie im Maus-Modell getestete Kombination mit der Plättchenadhäsionsblockade sein.

Die Plättchen, sowie die Gerinnung, wurden in der hier vorgestellten Studie als Faktoren erkannt, die die Metastasierung im B16-Melanom-Maus-Modell unterstützen. So ruft die Hemmung ihrer Adhäsion mittels Gantofiban eine signifikante Tumorreduktion hervor. Kombiniert man den Effekt der Plättchenadhäsionsblockade mit einem adoptiven Transfer von zytotoxischen T-Lymphozyten, so ist die Metastasenreduktion signifikant stärker als durch die alleinige Immuntherapie. Als mögliche Erklärung für diesen Synergismus fand sich ein verändertes Profil immunmodulatorischer (höhere TNF-alpha und niedrigere TGF-β

Konzentration) und tumorunterstützender Zytokine (niedrigere VEGF-Konzentration). Der Eindruck einer stärkeren Immunreaktion in Gantofiban-behandelten Tieren konnte durch Genexpressionsanalyse verstärkt werden. Somit erwies sich die Kombination eines einfachen und klinisch zugelassenen Ansatzes wie der Blockade des gpIIb/IIIa-Rezeptors mit dem Transfer von zytotoxischen Lymphozyten als eine vielversprechende Möglichkeit, die Grenze der Immuntherapie zu erweitern. Dieser in der Maus erfolgreiche Ansatz sollte nun in klinischen Studien getestet werden, um so Ansprechrate und Ergebnisse des CTL-Transfers beim Menschen zu verbessern.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Metastasierung von Tumorzellen ist ein komplexer Vorgang, bei dem sich Tumorzellen aus dem Verband lösen, in Blut oder Lymphe wandern, sich dann in einem Zielorgan festsetzen und weitere Tumore bilden. Die Chirurgie, die Chemo-, die Strahlen- und die Immuntherapie stellen die vier Säulen der Behandlung dar. Die Prognose einer metastasierten Tumorerkrankung bleibt jedoch sehr infaust. Ein besseres Verständnis der Vorgänge der Metastasierung ist dringend notwendig, um geeignete therapeutische Strategien zu entwickeln. Für die Untersuchung dieses Prozesses sind Tiermodelle hilfreich. Ein solches stellt z.B. die intravenöse Gabe von B16D5 Tumorzellen in C57 Mäusen dar. Dabei lässt man die Initialvorgänge der Metastasierung, wie lokales Tumorstadium, Mobilisierung und Migration außer Acht und beginnt bei der hämatogenen Streuung der Tumorzellen. Die Tumorzellen siedeln sich nach intravenöser Gabe bevorzugt im nächsten Kapillarbett z.B. in der Lunge an. Interessanterweise ist ihr Überleben in der Lunge sehr ineffektiv. Neben Adhäsionsmolekülen benötigen sie Schutz vor Scherstress (shear stress) aber auch den Angriffen der Immunabwehr, um zu überleben. Ziel der Doktorarbeit war es deshalb, die Bedingungen des lokalen Überlebens der Tumorzellen zu beschreiben und zu untersuchen, ob therapeutische Interventionen, die damit interferieren sich mit dem etablierten Transfer von zytotoxischen T-Lymphozyten kombinieren lassen und zu einer Reduktion der Metastasierungsrate führen.

Die Analyse der B16-Tumorzellen mittels FACS und Genarray ergab, dass diese als einzig relevanten Adhäsionsrezeptor das Integrin CD29/CD51 exprimieren. Mit diesem ist allerdings eine direkte Adhäsion an das Lungenendothel unwahrscheinlich. Vielmehr werden Brückenmoleküle wie Fibrinogen, Vitronectin oder Fibronectin für die Adhäsion benötigt. Von diesen erscheinen die Plasmaproteine Fibrinogen und Fibronectin als wahrscheinliche Kandidaten. Des Weiteren zeigte die Analyse, dass die B16-Tumorzellen den F3 (Tissue Factor) sehr hoch exprimieren. Funktionelle Untersuchungen (PCA Aktivität) konnten dann zeigen, dass die Tumorzellen die Gerinnung aktivieren und Fibrinogen

binden können (Inkubation mit Alexa-Fibrinogen). Daneben binden sie auf diesem Weg auch Thrombozyten über deren gpIIb/IIIa Rezeptor.

Sowohl die Gerinnungsaktivierung als auch die Thrombozytenbindung stellen wichtige Schutzmechanismen vor dem Scherstress und vor der Immunabwehr dar. Um dies zu überprüfen untersuchten wir die Wirkung eines gpIIb/IIIa Inhibitors und kombinierten dies mit dem Transfer von ex-vivo induzierten, Melanom-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten.

Die alleinige Blockade des Plättchenadhäsionsrezeptor gpIIb/IIIa führte im Untersuchungszeitraum zu einer signifikanten Reduktion der Metastasen in der Lunge. Dieses Therapieprotokoll wurde dann mit dem Transfer von zytotoxischen T-Zellen kombiniert. Die alleinige Gabe dieser therapeutischen T-Zellen war sehr erfolgreich (komplette Heilung der behandelten Tiere), wenn diese bis maximal drei Tage nach Tumorgabe verabreicht wurden. Es entwickelten sich jedoch Metastasen, wenn die therapeutischen Zellen nur ein Tag später injiziert wurden. Durch die Kombination mit der IIb/IIIa-Blockade konnte dieses therapeutische Fenster erweitert werden. Mit 4 Tagen Abstand konnte eine komplette Wirkung der Immuntherapie festgestellt werden aber auch mit 5 oder 6 Tagen war noch eine additive Wirkung nachweisbar.

Was bewirkte nun die gpIIb/IIIa Blockade vor Ort und wie unterstützt sie die Wirkung der CTLs? Pharmakologisch bewirkt die gpIIb/IIIa Blockade eine Reduktion der Plättchenadhäsion und Aktivierung. Als Beleg dafür fanden wir im Plasma der gpIIb/IIIa behandelten Tiere zu ausgewählten Zeitpunkten eine Reduktion von TGF- β und VEGF-a. Beide Faktoren können von Plättchen sezerniert werden und weisen auf eine geringere Plättchenaktivierung hin. VEGF-a kann dabei die Permeabilität der Endothelien erhöhen und so die Emigration von Tumorzellen erleichtern. Gleichzeitig gibt es Berichte, die auf die Rolle des VEGF-a bei der Bildung der metastatischen Nische hinweisen. Der Anstieg von TNF- α im Plasma signalisierte, dass in derselben Gruppe die Immunabwehr (z.B. Monozyten/Makrophagen) stärker stimuliert wurde. Damit werden vermutlich mehr Tumorzellen zerstört.

Bei der Analyse der lokalen Genexpression in der Lunge zeigte sich allerdings, dass zumindest in den ersten Tagen das Marker-Gen für Tumorzellen (Pmel) bei der mit gpIIb/IIIa-Blockade therapierten Gruppe höher lag als bei den Kontrollen. Dies kann damit erklärt werden, dass bei der therapierten Gruppe die Tumorzellen zu Beginn vermehrt als Einzelzellen auftreten und gleichmäßiger in der Organprobe verteilt sind, während sie bei den Kontrollen als Zell-Zell und Zell-Thrombozyten Aggregate vorliegen. Der Therapieeffekt kann dann damit erklärt werden, dass diese im Gegensatz zu den Aggregaten in der Kontrollgruppe besser für Scherstress und das Immunsystem zugänglich sind. Als Hinweis auf die verstärkte Immunreaktion vor Ort fanden wir mittels PCR eine höhere Expression von CD8 und Perforin als Zeichen für CTLs sowie des NK-Markers Nkg2d. Wir vermuten, dass hierdurch die zusätzliche Gabe eines gpIIb/IIIa-Inhibitors auch den Erfolg einer T-Zell-basierten Therapie in der Maus verbessert.

Ausgehend von dieser Beobachtung kann man folgern, dass eine Kombination der zellulären Immuntherapie mit einem gpIIb/IIIa-Blocker eine interessante Therapieoption darstellt, die in klinischen Studien untersucht werden sollte.

VI. ABKÜRZUNGEN

12(S)-HETE = 12(S)-HydroxyEicosaTetraEnoic acid, ein Lipooxygenasenmetabolit von Arachidonsäure

AMC = 7-Amino-4-Methyl-Coumarin

anti-CD3 = Antikörper gegen den Rezeptor CD3

B16D5 = Melanomzelllinie

bEND3 = brain endothelial, Endothelzelllinie der Maus

BM-PC = Bone Marrow Progenitor Cells

C57 = Mauslinie

CD51 = ItgaV, Integrin alpha V

CD106 = Vcam1, Vascular cell adhesion molecule 1

CD11b = ItgaM, Integrin alpha M

CD162 = Selpl, Selectin, platelet (p-selectin) ligand

CD18 = Itgb2, Integrin beta 2

CD29 = Itgb1, Integrin beta 1

CD31 = Pecam1, Platelet/endothelial cell adhesion

CD36 = Glykoprotein IIIb (gpIIIb)

CD41 = ItgIIb, Integrin alpha IIb

CD49d = Itga4, Integrin alpha 4

CD54 = Icam, Intercellular adhesion molecule

CD61 = Itgb3, Integrin beta 3

CD62E = Sele, Selectin, endothelial cells

CD62L = Sell, Selectin lymphocyte

CD62P = Selp, Selectin, platelet

CD8 = Protein der Zellmembran von zytotoxischen T-Zellen

cDNA-Synthese = complementary DNA

CFDA-SE = Carboxyfluorescein-diazetat-Succinimidylester

CFSE = carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester

cGy = centi-Gray

CM = complete medium

CTL = cytotoxic T-Lymphocyte = zytotoxische T-Lymphozt

CVT = Chemotherapie-Schema

CXCL12 = CXC-Motiv-Chemokin 12, auch stromal cell-derived factor 1 (Sdf-1)

CXCR4 = CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4, auch Stromal cell-derived factor 1 receptor

D5-G6 = Stamm der B16D5 Melanomzellen die GMCSF sezernieren

d = dies = Tag

dNTP-Mix = vorbereitete Lösung, die Natriumsalze von dATP, dCTP, dGTP and dTTP, 10mM in Wasser enthält.

EDTA = Ethylendiamin-tetraacetat

ELISA = enzyme-linked immuno sorbent assay

EMD 122 347 = Gantofiban, IIb/IIIa Inhibitor

EPC = Endothelial Progenitor Cell

E/-T-Verhältnis = Verhältnis Effektor Zellen zu Targetzellen, in dieser Arbeit das numerische Verhältnis zwischen transferierten T-Lymphozyten und zu eliminierenden Tumorzellen.

F3 = Tissue factor

FACS = fluorescence activated cell sorting

Fas-Ligand = FasL oder CD95L, Typ-II Transmembranprotein das der TNF-Familie gehört und eine Rolle in der Apoptose spielt.

FBS = Fetal Bovine Serum

FGF = Fibroblast Growth Factor

FITC = Fluoresceinisothiocyanat

GM-CSF = granulocyte monocyte colony stimulierender Faktor

gpIIb/IIIa = Glykoprotein IIb/IIIa oder CD41/61, Aggregationsrezeptor der Thrombozyten

GrzA = Granzym A und B

HBD = Chemotherapie-Schema

HPC = hämatopoietic Progenitor Cells

IC50 = mittlere Inhibitorische Konzentration

Icam1 = intercellular adhesion molecule – CD54

IFN- α = Interferon alpha

IFN- γ = Interferon gamma

IL-10 = Interleukin 10

IL-2 = Interleukin 2

ItgaIIb = Integrin alpha IIb, CD 41

Itga4 = Integrin alpha 4, CD49d

ItgaM = Integrin alpha M, CD 11b

ItgaV = Integrin alpha V, CD 51

Itgb1 = Integrin beta 1, CD 29

Itgb2 = Integrin beta 2, CD 18

Itgb3 = Integrin beta 3, CD 61

Itgb6 = Integrin beta 6

KG = Körpergewicht

KO = Körperoberfläche

L1 cam = L1 adhesion molecule

LAK = Lymphokin-aktivierte Killerzellen
ME = Mercaptoethanol
M-MLV Reverse Transkriptase = Moloney Murine Leukemia Virus eine rekombinante DANN-Polymerase für die cDNA-Synthese
Nf-E2 = nuclear factor (erythroid-derived 2)
Nkg2d = aktivierender Rezeptor der humanen Natürlichen Killer (NK) Zellen
NK-Zellen = Natural Killer Zelle
PBS = physiologic buffer solution
PCA = prokoagulatorische Aktivität
PCR = Polymerasen-Ketten-reaktion
Pdgf = Platelet Derived Growth Factor
Pecam1 = Platelet/endothelial cell adhesion mol – CD31
Pfn = Perforin
Pmel 17 = ein spezifisches Melanomantigen
RGD-Sequenz = Arginin-Glycin-Aspartat
RLU = relative light units
RPMI = Zellkulturmedium, das am Roswell Park Memorial Institute in den 1960er Jahren entwickelt wurde.
RT-PCR = Real-Time-quantitative-PCR oder quantitative Echtzeit-PCR. Zusätzlich zu der normalen Polymerasen-Ketten-Reaktion ermöglicht die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht.
Sdf1 = stromal cell-derived factor 1 auch CXCL12
Sele = Selektin endothelial cells, CD62E
Sell = Selectin lymphocyte, CD62L
Selp = Selectin platelet, CD 62P
Selpl = Selektin platelet ligand, CD162
Tf = Tissue Factor, T3
TGF- β = T growth factor beta
TIL = Tumor-Infiltrierende Zellen
TMZ = Chemotherapie
TNF- α = Tumor Nekrose Factor alpha
TRAP = thrombin receptor-activating peptide
Vcam1 = vascular cell adhesion molecule 1, CD 106
VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFr = VEGF Rezeptor

VII. ABBILDUNGEN

Abbildung 1: Gittermuster für die Auszählung der Lungenmetastasen.	25
Abbildung 2: Lungenmetastasen des B16 Melanoms.	29
Abbildung 3: Expression des CD51 Rezeptors durch die B16 Melanomzellen	31
Abbildung 4: Expression von Tissue Factor durch die B16 Melanomzellen	32
Abbildung 5: PCA-Thrombinaktivierung durch die B16D5 Tumorzellen	33
Abbildung 6: PCA-Thrombinaktivierung durch vitale frei suspendierte, vitale adhären- te und apoptotische B16D5 Tumorzellen	34
Abbildung 7: FACS-Bindung von Thrombozyten durch B16D5 Tumorzellen- Kontrolle.....	36
Abbildung 8: FACS-Bindung von Thrombozyten durch B16D5 Tumorzellen-Tumorzellen und markierte Thrombozyten.....	37
Abbildung 9: FACS-Bindung von Thrombozyten durch B16D5 Tumorzellen- apoptotische Tumorzellen und markierte Thrombozyten.....	37
Abbildung 10: FACS-Bindung von Thrombozyten durch B16D5 Tumorzellen-Tumorzellen, markierte Thrombozyten und Thrombin.	38
Abbildung 11: Bindung von Fibrinogen durch B16D5 Tumorzellen.....	39
Abbildung 12: Metastasenreduktion durch Gabe des gpIIb/IIIa-Inhibitors Gantofiban.	41
Abbildung 13: Heilung der Lungenmetastasen durch Transfer von spezifischen T-Zellen drei Tage nach Tumorgabe. Lungenbilder.	43
Abbildung 14: Metastasenzahl bei Beginn der Immuntherapie, jeweils 3, 4 und 6 Tage nach Tumorgabe.....	44
Abbildung 15: Metastasenzahl bei der Kontrolle gegenüber Metastasenzahl bei Verabreich- ung der CTLs am Tag 4 nach Tumorgabe.	46
Abbildung 16: Metastasen bei der Kontrolle gegenüber Metastasen bei Verabreichung der CTLs an Tag 4 nach Tumorgabe. Lungenbilder.	46
Abbildung 17: Metastasenzahl bei der Kontrolle gegenüber Metastasenzahl bei Verabreich- ung der CTLs an Tag 4 nach Tumorgabe mit zusätzlicher Gantofibanbehandlung	47
Abbildung 18: Metastasen bei der Kontrolle gegenüber Metastasen bei Verabreichung der CTLs an Tag 4 nach Tumorgabe mit zusätzlicher Gantofibanbehandlung. Lungenbilder. ...	47
Abbildung 19: Metastasenzahl bei Verabreichung der CTLs an Tag 4 nach Tumorgabe. Ohne und mit zusätzlicher Gantofibanbehandlung	48
Abbildung 20: Metastasen bei Verabreichung der CTLs an Tag 4 nach Tumorgabe. Ohne und mit zusätzlicher Gantofibanbehandlung.Lungenbilder.....	48
Abbildung 21: Metastasenzahl bei der Kombination T-Zell Transfer + Gantofiban mit 4-, 5- und 6-tägigem therapeutischen Fenster	49

Abbildung 22: Metastasenzahl nach Erweiterung des therapeutischen Fensters von 3 auf 6 Tage.....	50
Abbildung 23: Metastasenzahl mit der Hälfte der Tumorzellen und doppeltem therapeutischen Fenster.....	51
Abbildung 24: Pmel-Signal für die Quantifizierung der Tumorzellzahl.	52
Abbildung 25: TNF- α -Konzentration im Plasma über die Zeit.....	54
Abbildung 26: TGF- β -Konzentration im Plasma über die Zeit.	55
Abbildung 27: VEGF-a-Konzentration im Plasma über die Zeit.....	57
Abbildung 28: CXCL12-Konzentration im Plasma über die Zeit.	58
Abbildung 29: CD8-Expression in der Lunge über die Zeit.	59
Abbildung 30: Perforin-Expression in der Lunge über die Zeit.	60
Abbildung 31: GranzymA-Expression in der Lunge über die Zeit.	60
Abbildung 32: Nkg2d-Expression in den Lungen über die Zeit.....	61

VIII. TABELLEN

Tabelle 1: Ansprechrate verschiedener Immuntherapieprotokollen in den letzten Jahren...11	
Tabelle 2: T-Zell-Transfer vier Tage nach Tumorgabe – Versuchsschema.	26
Tabelle 3: T-Zell-Transfer sechs Tage nach Tumorgabe – Versuchsschema.....	27
Tabelle 4: Expression von Adhäsionsmolekülen und Integrinen in B16D5 Zellen in einem cDNA-Array.....	30
Tabelle 5: Tissue Factor-Expression durch B16D5 Tumorzellen in einem cDNA-Array.	32
Tabelle 6: Metastasenzahl bei Kontrolltieren, Gantofiban-behandelten Tieren, Tieren die einen T-Zell-Transfer vier Tage nach Tumorgabe bekamen und Tiere die sowohl mit dem T-Zell-Transfer vier Tage nach Tumorgabe als auch mit Gantofiban behandelt wurden. Daten und Lungenbilder.....	45
Tabelle 7: Metastasen bei der Kombination T-Zell Transfer + Gantofiban, wenn der T-Zell-Transfer 4, 5 und 6 Tage nach Tumorgabe erfolgt. Daten und Lungenbilder.	49

IX. LITERATUR

- (1) Leo F, Cagini L, Rocmans P, Cappello M, Geel AN, Maggi G et al. Lung metastases from melanoma: when is surgical treatment warranted? *Br J Cancer* 2000 September;83(5):569-72.
- (2) Brown PD, Brown CA, Pollock BE, Gorman DA, Foote RL. Stereotactic radiosurgery for patients with "radioresistant" brain metastases. *Neurosurgery* 2002 September;51(3):656-65.
- (3) Buchsbaum JC, Suh JH, Lee SY, Chidel MA, Greskovich JF, Barnett GH. Survival by radiation therapy oncology group recursive partitioning analysis class and treatment modality in patients with brain metastases from malignant melanoma: a retrospective study. *Cancer* 2002 April 15;94(8):2265-72.
- (4) Anderson CM, Buzaid AC, Legha SS. Systemic treatments for advanced cutaneous melanoma. *Oncology (Williston Park)* 1995 November;9(11):1149-58.
- (5) Wagner JD, Gordon MS, Chuang TY, Coleman JJ, III. Current therapy of cutaneous melanoma. *Plast Reconstr Surg* 2000 April;105(5):1774-99.
- (6) Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 1986 September 19;233(4770):1318-21.
- (7) Asadullah K, Sterry W, Trefzer U. Cytokines: interleukin and interferon therapy in dermatology. *Clin Exp Dermatol* 2002 October;27(7):578-84.
- (8) Rosenberg SA. Progress in the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer. *J Intern Med* 2001 December;250(6):462-75.
- (9) Atkins MB, Kunkel L, Sznol M, Rosenberg SA. High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update. *Cancer J Sci Am* 2000 February;6 Suppl 1:S11-S14.

(10) Marincola FM, White DE, Wise AP, Rosenberg SA. Combination therapy with interferon alfa-2a and interleukin-2 for the treatment of metastatic cancer. *J Clin Oncol* 1995 May;13(5):1110-22.

(11) Sparano JA, Fisher RI, Sunderland M, Margolin K, Ernest ML, Sznol M et al. Randomized phase III trial of treatment with high-dose interleukin-2 either alone or in combination with interferon alfa-2a in patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol* 1993 October;11(10):1969-77.

(12) Keilholz U, Goey SH, Punt CJ, Proebstle TM, Salzmann R, Scheibenbogen C et al. Interferon alfa-2a and interleukin-2 with or without cisplatin in metastatic melanoma: a randomized trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Melanoma Cooperative Group. *J Clin Oncol* 1997 July;15(7):2579-88.

(13) Keilholz U. Biochemotherapy of melanoma. *Forum (Genova)* 2003;13(2):158-65.

(14) Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL et al. Prospective randomized trial of the treatment of patients with metastatic melanoma using chemotherapy with cisplatin, dacarbazine, and tamoxifen alone or in combination with interleukin-2 and interferon alfa-2b. *J Clin Oncol* 1999 March;17(3):968-75.

(15) Dorval T, Negrier S, Chevreau C, Avril MF, Baume D, Cupissol D et al. Randomized trial of treatment with cisplatin and interleukin-2 either alone or in combination with interferon-alpha-2a in patients with metastatic melanoma: a Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer Multicenter, parallel study. *Cancer* 1999 March 1;85(5):1060-6.

(16) Eton O, Legha SS, Bedikian AY, Lee JJ, Buzaid AC, Hodges C et al. Sequential biochemotherapy versus chemotherapy for metastatic melanoma: results from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 2002 April 15;20(8):2045-52.

(17) Ridolfi R, Chiarion-Sileni V, Guida M, Romanini A, Labianca R, Freschi A et al. Cisplatin, dacarbazine with or without subcutaneous interleukin-2, and interferon alpha-2b in advanced melanoma outpatients: results from an Italian multicenter phase III randomized clinical trial. *J Clin Oncol* 2002 March 15;20(6):1600-7.

(18) Lewis KD, Robinson WA, McCarter M, Pearlman N, O'Day SJ, Anderson C et al. Phase II multicenter study of neoadjuvant biochemotherapy for patients with stage III malignant melanoma. *J Clin Oncol* 2006 July 1;24(19):3157-63.

(19) Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL, Chang AE, Schwartzentruber DJ et al. Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993 April 21;85(8):622-32.

(20) Rosenberg SA. New opportunities for the development of cancer immunotherapies. *Cancer J Sci Am* 1998 May;4 Suppl 1:S1-S4.

(21) Baba T, Sato-Matsushita M, Kanamoto A, Itoh A, Oyaizu N, Inoue Y et al. Phase I clinical trial of the vaccination for the patients with metastatic melanoma using gp100-derived epitope peptide restricted to HLA-A*2402. *J Transl Med* 2010;8:84.

(22) Ridolfi L, Petrini M, Fiammenghi L, Granato AM, Ancarani V, Pancisi E et al. Unexpected high response rate to traditional therapy after dendritic cell-based vaccine in advanced melanoma: update of clinical outcome and subgroup analysis. *Clin Dev Immunol* 2010;2010:504979.

(23) Nakai N, Hartmann G, Kishimoto S, Katoh N. Dendritic cell vaccination in human melanoma: relationships between clinical effects and vaccine parameters. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010 October;23(5):607-19.

(24) O'Day SJ, Maio M, Chiarion-Sileni V, Gajewski TF, Pehamberger H, Bondarenko IN et al. Efficacy and safety of ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a multicenter single-arm phase II study. *Ann Oncol* 2010 August;21(8):1712-7.

(25) Gattinoni L, Powell DJ, Jr., Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat Rev Immunol* 2006 May;6(5):383-93.

(26) Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 1985 December 5;313(23):1485-92.

(27) Goff SL, Smith FO, Klapper JA, Sherry R, Wunderlich JR, Steinberg SM et al. Tumor infiltrating lymphocyte therapy for metastatic melanoma: analysis of tumors resected for TIL. *J Immunother* 2010 October;33(8):840-7.

(28) Serrone L, Zeuli M, Sega FM, Cognetti F. Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. *J Exp Clin Cancer Res* 2000 March;19(1):21-34.

(29) Serrone L, Zeuli M, Sega FM, Cognetti F. Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. *J Exp Clin Cancer Res* 2000 March;19(1):21-34.

(30) Robinson WA, Mughal TI, Thomas MR, Johnson M, Spiegel RJ. Treatment of metastatic malignant melanoma with recombinant interferon alpha 2. *Immunobiology* 1986 September;172(3-5):275-82.

(31) Miller RL, Steis RG, Clark JW, Smith JW, Crum E, McKnight JE et al. Randomized trial of recombinant alpha 2b-interferon with or without indomethacin in patients with metastatic malignant melanoma. *Cancer Res* 1989 April 1;49(7):1871-6.

(32) Ron IG, Sarid D, Ryvo L, Sapir EE, Schneebaum S, Metser U et al. A biochemotherapy regimen with concurrent administration of cisplatin, vinblastine, temozolomide (Temodal), interferon-alfa and interleukin-2 for metastatic melanoma: a phase II study. *Melanoma Res* 2006 February;16(1):65-9.

(33) Ron IG, Sarid D, Ryvo L, Sapir EE, Schneebaum S, Metser U et al. A biochemotherapy regimen with concurrent administration of cisplatin, vinblastine,

temozolomide (Temodal), interferon-alfa and interleukin-2 for metastatic melanoma: a phase II study. *Melanoma Res* 2006 February;16(1):65-9.

(34) Gonzalez CM, Malveyh J, Marti R, Conill C, Sanchez M, Martin M et al. Biochemotherapy with temozolomide, cisplatin, vinblastine, subcutaneous interleukin-2 and interferon-alpha in patients with metastatic melanoma. *Melanoma Res* 2006 February;16(1):59-64.

(35) Dorval T, Mathiot C, Chosidow O, Revuz J, Avril MF, Guillaume JC et al. IL-2 phase II trial in metastatic melanoma: analysis of clinical and immunological parameters. *Biotechnol Ther* 1992;3(1-2):63-79.

(36) Legha SS, Ring S, Bedikian A, Plager C, Eton O, Buzaid AC et al. Treatment of metastatic melanoma with combined chemotherapy containing cisplatin, vinblastine and dacarbazine (CVD) and biotherapy using interleukin-2 and interferon-alpha. *Ann Oncol* 1996 October;7(8):827-35.

(37) Atkins MB, Kunkel L, Sznol M, Rosenberg SA. High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update. *Cancer J Sci Am* 2000 February;6 Suppl 1:S11-S14.

(38) Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 1985 December 5;313(23):1485-92.

(39) Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S et al. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 1987 April 9;316(15):889-97.

(40) Dudley ME, Yang JC, Sherry R, Hughes MS, Royal R, Kammula U et al. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive

myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol* 2008 November 10;26(32):5233-9.

(41) Goff SL, Smith FO, Klapper JA, Sherry R, Wunderlich JR, Steinberg SM et al. Tumor infiltrating lymphocyte therapy for metastatic melanoma: analysis of tumors resected for TIL. *J Immunother* 2010 October;33(8):840-7.

(42) Dudley ME, Yang JC, Sherry R, Hughes MS, Royal R, Kammula U et al. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol* 2008 November 10;26(32):5233-9.

(43) Goff SL, Smith FO, Klapper JA, Sherry R, Wunderlich JR, Steinberg SM et al. Tumor infiltrating lymphocyte therapy for metastatic melanoma: analysis of tumors resected for TIL. *J Immunother* 2010 October;33(8):840-7.

(44) Hong JJ, Rosenberg SA, Dudley ME, Yang JC, White DE, Butman JA et al. Successful treatment of melanoma brain metastases with adoptive cell therapy. *Clin Cancer Res* 2010 October 1;16(19):4892-8.

(45) Riker AI, Jove R, Daud AI. Immunotherapy as part of a multidisciplinary approach to melanoma treatment. *Front Biosci* 2006;11:1-14.

(46) Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 1985 December 5;313(23):1485-92.

(47) Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S et al. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 1987 April 9;316(15):889-97.

- (48) Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, Aebersold PM, Linehan WM, Seipp CA et al. Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. *Ann Surg* 1989 October;210(4):474-84.
- (49) Rosenberg SA. Overcoming obstacles to the effective immunotherapy of human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 September 2;105(35):12643-4.
- (50) Hong JJ, Rosenberg SA, Dudley ME, Yang JC, White DE, Butman JA et al. Successful treatment of melanoma brain metastases with adoptive cell therapy. *Clin Cancer Res* 2010 October 1;16(19):4892-8.
- (51) Dudley ME, Gross CA, Langan MM, Garcia MR, Sherry RM, Yang JC et al. CD8+ enriched "young" tumor infiltrating lymphocytes can mediate regression of metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2010 July 28.
- (52) Besser MJ, Shapira-Frommer R, Treves AJ, Zippel D, Itzhaki O, Hershkowitz L et al. Clinical responses in a phase II study using adoptive transfer of short-term cultured tumor infiltration lymphocytes in metastatic melanoma patients. *Clin Cancer Res* 2010 May 1;16(9):2646-55.
- (53) Rosenberg SA, Sherry RM, Morton KE, Scharfman WJ, Yang JC, Topalian SL et al. Tumor progression can occur despite the induction of very high levels of self/tumor antigen-specific CD8+ T cells in patients with melanoma. *J Immunol* 2005 November 1;175(9):6169-76.
- (54) Bai A, Higham E, Eisen HN, Wittrup KD, Chen J. Rapid tolerization of virus-activated tumor-specific CD8+ T cells in prostate tumors of TRAMP mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 September 2;105(35):13003-8.
- (55) O'Garra A, Barrat FJ, Castro AG, Vicari A, Hawrylowicz C. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunol Rev* 2008 June;223:114-31.
- (56) Wrzesinski SH, Wan YY, Flavell RA. Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 2007 September 15;13(18 Pt 1):5262-70.

- (57) Prandoni P. Deep vein thrombosis and occult cancer. *Ann Med* 1993 October;25(5):447-50.
- (58) Sparsa A, Durox H, Doffoel-Hantz V, Munyangango EM, Bedane C, Cendras J et al. High prevalence and risk factors of thromboembolism in stage IV melanoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010 July 13.
- (59) Heinmoller E, Schropp T, Kisker O, Simon B, Seitz R, Weinel RJ. Tumor cell-induced platelet aggregation in vitro by human pancreatic cancer cell lines. *Scand J Gastroenterol* 1995 October;30(10):1008-16.
- (60) Gasic GJ, Gasic TB, Stewart CC. Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968 September;61(1):46-52.
- (61) Amirkhosravi A, Mousa SA, Amaya M, Blaydes S, Desai H, Meyer T et al. Inhibition of tumor cell-induced platelet aggregation and lung metastasis by the oral GpIIb/IIIa antagonist XV454. *Thromb Haemost* 2003 September;90(3):549-54.
- (62) Palumbo JS, Kombrinck KW, Drew AF, Grimes TS, Kiser JH, Degen JL et al. Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells. *Blood* 2000 November 15;96(10):3302-9.
- (63) Palumbo JS, Potter JM, Kaplan LS, Talmage K, Jackson DG, Degen JL. Spontaneous hematogenous and lymphatic metastasis, but not primary tumor growth or angiogenesis, is diminished in fibrinogen-deficient mice. *Cancer Res* 2002 December 1;62(23):6966-72.
- (64) Nierodzik ML, Kajumo F, Karparkin S. Effect of thrombin treatment of tumor cells on adhesion of tumor cells to platelets in vitro and tumor metastasis in vivo. *Cancer Res* 1992 June 15;52(12):3267-72.
- (65) Im JH, Fu W, Wang H, Bhatia SK, Hammer DA, Kowalska MA et al. Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation. *Cancer Res* 2004 December 1;64(23):8613-9.

- (66) Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Mannel DN. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res* 1999 March 15;59(6):1295-300.
- (67) Suzuki K, Aiura K, Ueda M, Kitajima M. The influence of platelets on the promotion of invasion by tumor cells and inhibition by antiplatelet agents. *Pancreas* 2004 August;29(2):132-40.
- (68) Honn KV, Tang DG. Eicosanoid 12(S)-HETE upregulates endothelial cell alpha V beta 3 integrin expression and promotes tumor cell adhesion to vascular endothelium. *Adv Exp Med Biol* 1997;400B:765-73.
- (69) Trikha M, Nakada MT. Platelets and cancer: implications for antiangiogenic therapy. *Semin Thromb Hemost* 2002 February;28(1):39-44.
- (70) Hejna M, Raderer M, Zielinski CC. Inhibition of metastases by anticoagulants. *J Natl Cancer Inst* 1999 January 6;91(1):22-36.
- (71) Zacharski LR, Henderson WG, Rickles FR, Forman WB, Cornell CJ, Jr., Forcier RJ et al. Effect of warfarin anticoagulation on survival in carcinoma of the lung, colon, head and neck, and prostate. Final report of VA Cooperative Study #75. *Cancer* 1984 May 15;53(10):2046-52.
- (72) Blanckaert VD, Schelling ME, Elstad CA, Meadows GG. Differential growth factor production, secretion, and response by high and low metastatic variants of B16BL6 melanoma. *Cancer Res* 1993 September 1;53(17):4075-81.
- (73) Zhang XD, Gillespie SK, Hersey P. Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. *Mol Cancer Ther* 2004 February;3(2):187-97.
- (74) Manegold PC, Hutter J, Pahernik SA, Messmer K, Dellian M. Platelet-endothelial interaction in tumor angiogenesis and microcirculation. *Blood* 2003 March 1;101(5):1970-6.

(75) Dickfeld T, Ruf A, Pogatsa-Murray G, Muller I, Engelmann B, Taubitz W et al. Differential antiplatelet effects of various glycoprotein IIb-IIIa antagonists. *Thromb Res* 2001 January 15;101(2):53-64.

(76) Im JH, Fu W, Wang H, Bhatia SK, Hammer DA, Kowalska MA et al. Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation. *Cancer Res* 2004 December 1;64(23):8613-9.

(77) Cameron MD, Schmidt EE, Kerkvliet N, Nadkarni KV, Morris VL, Groom AC et al. Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Res* 2000 May 1;60(9):2541-6.

(78) Reinhardt C, von Bruhl ML, Manukyan D, Grahl L, Lorenz M, Altmann B et al. Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. *J Clin Invest* 2008 March;118(3):1110-22.

(79) Manegold PC, Hutter J, Pahernik SA, Messmer K, Dellian M. Platelet-endothelial interaction in tumor angiogenesis and microcirculation. *Blood* 2003 March 1;101(5):1970-6.

(80) Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Mannel DN. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res* 1999 March 15;59(6):1295-300.

(81) Dickfeld T, Ruf A, Pogatsa-Murray G, Muller I, Engelmann B, Taubitz W et al. Differential antiplatelet effects of various glycoprotein IIb-IIIa antagonists. *Thromb Res* 2001 January 15;101(2):53-64.

(82) Winter H, Hu HM, Urba WJ, Fox BA. Tumor regression after adoptive transfer of effector T cells is independent of perforin or Fas ligand (APO-1L/CD95L). *J Immunol* 1999 October 15;163(8):4462-72.

(83) Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful

extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 1998 September;153(3):865-73.

(84) Cameron MD, Schmidt EE, Kerkvliet N, Nadkarni KV, Morris VL, Groom AC et al. Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Res* 2000 May 1;60(9):2541-6.

(85) Wong CW, Lee A, Shientag L, Yu J, Dong Y, Kao G et al. Apoptosis: an early event in metastatic inefficiency. *Cancer Res* 2001 January 1;61(1):333-8.

(86) Chambers AF, Naumov GN, Varghese HJ, Nadkarni KV, MacDonald IC, Groom AC. Critical steps in hematogenous metastasis: an overview. *Surg Oncol Clin N Am* 2001 April;10(2):243-55, vii.

(87) Fidler IJ, Nicolson GL. Fate of recirculating B16 melanoma metastatic variant cells in parabiotic syngeneic recipients. *J Natl Cancer Inst* 1977 June;58(6):1867-72.

(88) Al-Mehdi AB, Tozawa K, Fisher AB, Shientag L, Lee A, Muschel RJ. Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat Med* 2000 January;6(1):100-2.

(89) Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* 1996 March 28;380(6572):364-6.

(90) Uehara H, Kim SJ, Karashima T, Shepherd DL, Fan D, Tsan R et al. Effects of blocking platelet-derived growth factor-receptor signaling in a mouse model of experimental prostate cancer bone metastases. *J Natl Cancer Inst* 2003 March 19;95(6):458-70.

(91) Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 1998 September;153(3):865-73.

- (92) Cameron MD, Schmidt EE, Kerkvliet N, Nadkarni KV, Morris VL, Groom AC et al. Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Res* 2000 May 1;60(9):2541-6.
- (93) Wong CW, Lee A, Shientag L, Yu J, Dong Y, Kao G et al. Apoptosis: an early event in metastatic inefficiency. *Cancer Res* 2001 January 1;61(1):333-8.
- (94) Qiu H, Orr FW, Jensen D, Wang HH, McIntosh AR, Hasinoff BB et al. Arrest of B16 melanoma cells in the mouse pulmonary microcirculation induces endothelial nitric oxide synthase-dependent nitric oxide release that is cytotoxic to the tumor cells. *Am J Pathol* 2003 February;162(2):403-12.
- (95) Im JH, Fu W, Wang H, Bhatia SK, Hammer DA, Kowalska MA et al. Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation. *Cancer Res* 2004 December 1;64(23):8613-9.
- (96) Kienast Y, von BL, Fuhrmann M, Klinkert WE, Goldbrunner R, Herms J et al. Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat Med* 2010 January;16(1):116-22.
- (97) Wong CW, Lee A, Shientag L, Yu J, Dong Y, Kao G et al. Apoptosis: an early event in metastatic inefficiency. *Cancer Res* 2001 January 1;61(1):333-8.
- (98) Del BD, Biroccio A, Leonetti C, Zupi G. Bcl-2 overexpression enhances the metastatic potential of a human breast cancer line. *FASEB J* 1997 October;11(12):947-53.
- (99) Weiss L. Biomechanical destruction of cancer cells in the heart: a rate regulator for hematogenous metastasis. *Invasion Metastasis* 1988;8(4):228-37.
- (100) Weiss L. Deformation-driven destruction of cancer cells in the microvasculature. *Clin Exp Metastasis* 1993 September;11(5):430-6.
- (101) Weiss L, Nannmark U, Johansson BR, Bagge U. Lethal deformation of cancer cells in the microcirculation: a potential rate regulator of hematogenous metastasis. *Int J Cancer* 1992 January 2;50(1):103-7.

(102) Frisch SM, Ruoslahti E. Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* 1997 October;9(5):701-6.

(103) Qiu H, Orr FW, Jensen D, Wang HH, McIntosh AR, Hasinoff BB et al. Arrest of B16 melanoma cells in the mouse pulmonary microcirculation induces endothelial nitric oxide synthase-dependent nitric oxide release that is cytotoxic to the tumor cells. *Am J Pathol* 2003 February;162(2):403-12.

(104) Min JK, Kim YM, Kim SW, Kwon MC, Kong YY, Hwang IK et al. TNF-related activation-induced cytokine enhances leukocyte adhesiveness: induction of ICAM-1 and VCAM-1 via TNF receptor-associated factor and protein kinase C-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells. *J Immunol* 2005 July 1;175(1):531-40.

(105) Weiss L. Biomechanical interactions of cancer cells with the microvasculature during hematogenous metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1992 November;11(3-4):227-35.

(106) Im JH, Fu W, Wang H, Bhatia SK, Hammer DA, Kowalska MA et al. Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation. *Cancer Res* 2004 December 1;64(23):8613-9.

(107) Sindelar WF, Tralka TS, Ketcham AS. Electron microscopic observations on formation of pulmonary metastases. *J Surg Res* 1975 February;18(2):137-61.

(108) Im JH, Fu W, Wang H, Bhatia SK, Hammer DA, Kowalska MA et al. Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation. *Cancer Res* 2004 December 1;64(23):8613-9.

(109) Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Mannel DN. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res* 1999 March 15;59(6):1295-300.

(110) Maloney JP, Silliman CC, Ambruso DR, Wang J, Tuder RM, Voelkel NF. In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. *Am J Physiol* 1998 September;275(3 Pt 2):H1054-H1061.

(111) Collins PD, Connolly DT, Williams TJ. Characterization of the increase in vascular permeability induced by vascular permeability factor in vivo. *Br J Pharmacol* 1993 May;109(1):195-9.

(112) Kopp HG, Placke T, Salih HR. Platelet-derived transforming growth factor-beta down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity. *Cancer Res* 2009 October 1;69(19):7775-83.

(113) Dinarello CA. Why not treat human cancer with interleukin-1 blockade? *Cancer Metastasis Rev* 2010 June;29(2):317-29.

(114) Brindley LL, Sweet JM, Goetzl EJ. Stimulation of histamine release from human basophils by human platelet factor 4. *J Clin Invest* 1983 October;72(4):1218-23.

(115) Kasper B, Brandt E, Bulfone-Paus S, Petersen F. Platelet factor 4 (PF-4)-induced neutrophil adhesion is controlled by src-kinases, whereas PF-4-mediated exocytosis requires the additional activation of p38 MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Blood* 2004 March 1;103(5):1602-10.

(116) Fleischer J, Grage-Griebenow E, Kasper B, Heine H, Ernst M, Brandt E et al. Platelet factor 4 inhibits proliferation and cytokine release of activated human T cells. *J Immunol* 2002 July 15;169(2):770-7.

(117) Milsom C, Magnus N, Meehan B, Al-Nedawi K, Garnier D, Rak J. Tissue factor and cancer stem cells: is there a linkage? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009 December;29(12):2005-14.

(118) Schaffner F, Ruf W. Tissue factor and PAR2 signaling in the tumor microenvironment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009 December;29(12):1999-2004.

(119) Ruf W, Yokota N, Schaffner F. Tissue factor in cancer progression and angiogenesis. *Thromb Res* 2010 April;125 Suppl 2:S36-S38.

(120) Garnier D, Milsom C, Magnus N, Meehan B, Weitz J, Yu J et al. Role of the tissue factor pathway in the biology of tumor initiating cells. *Thromb Res* 2010 April;125 Suppl 2:S44-S50.

(121) Versteeg HH, Schaffner F, Kerver M, Petersen HH, Ahamed J, Felding-Habermann B et al. Inhibition of tissue factor signaling suppresses tumor growth. *Blood* 2008 January 1;111(1):190-9.

(122) Versteeg HH, Schaffner F, Kerver M, Petersen HH, Ahamed J, Felding-Habermann B et al. Inhibition of tissue factor signaling suppresses tumor growth. *Blood* 2008 January 1;111(1):190-9.

(123) Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW et al. Tumor cell-associated tissue factor and circulating hemostatic factors cooperate to increase metastatic potential through natural killer cell-dependent and-independent mechanisms. *Blood* 2007 July 1;110(1):133-41.

(124) Amirkhosravi A, Meyer T, Chang JY, Amaya M, Siddiqui F, Desai H et al. Tissue factor pathway inhibitor reduces experimental lung metastasis of B16 melanoma. *Thromb Haemost* 2002 June;87(6):930-6.

(125) Reinhardt C, von Bruhl ML, Manukyan D, Grahl L, Lorenz M, Altmann B et al. Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. *J Clin Invest* 2008 March;118(3):1110-22.

(126) Green D, Karparkin S. Role of thrombin as a tumor growth factor. *Cell Cycle* 2010 February 15;9(4):656-61.

(127) Snyder KM, Kessler CM. The pivotal role of thrombin in cancer biology and tumorigenesis. *Semin Thromb Hemost* 2008 November;34(8):734-41.

(128) Nierodzik ML, Karparkin S. Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell* 2006 November;10(5):355-62.

(129) Im JH, Fu W, Wang H, Bhatia SK, Hammer DA, Kowalska MA et al. Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation. *Cancer Res* 2004 December 1;64(23):8613-9.

(130) Frisch SM, Ruoslahti E. Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* 1997 October;9(5):701-6.

(131) Im JH, Fu W, Wang H, Bhatia SK, Hammer DA, Kowalska MA et al. Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation. *Cancer Res* 2004 December 1;64(23):8613-9.

(132) Erpenbeck L, Schon MP. Deadly allies: the fatal interplay between platelets and metastasizing cancer cells. *Blood* 2010 April 29;115(17):3427-36.

(133) Gupta GP, Massague J. Platelets and metastasis revisited: a novel fatty link. *J Clin Invest* 2004 December;114(12):1691-3.

(134) Nash GF, Turner LF, Scully MF, Kakkar AK. Platelets and cancer. *Lancet Oncol* 2002 July;3(7):425-30.

(135) Borsig L. The role of platelet activation in tumor metastasis. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008 August;8(8):1247-55.

(136) Timar J, Tovari J, Raso E, Meszaros L, Bereczky B, Lapis K. Platelet-mimicry of cancer cells: epiphenomenon with clinical significance. *Oncology* 2005;69(3):185-201.

(137) Camerer E, Qazi AA, Duong DN, Cornelissen I, Advincula R, Coughlin SR. Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis. *Blood* 2004 July 15;104(2):397-401.

(138) Pearlstein E, Ambrogio C, Karpatkin S. Effect of antiplatelet antibody on the development of pulmonary metastases following injection of CT26 colon adenocarcinoma, Lewis lung carcinoma, and B16 amelanotic melanoma tumor cells into mice. *Cancer Res* 1984 September;44(9):3884-7.

(139) Kato Y, Fujita N, Yano H, Tsuruo T. Suppression of experimental lung colonization of mouse colon adenocarcinoma 26 in vivo by an anti-idiotypic monoclonal antibody recognizing a platelet surface molecule. *Cancer Res* 1997 July 15;57(14):3040-5.

(140) Kienast Y, von BL, Fuhrmann M, Klinkert WE, Goldbrunner R, Herms J et al. Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat Med* 2010 January;16(1):116-22.

(141) Nierodzik ML, Plotkin A, Kajumo F, Karpatkin S. Thrombin stimulates tumor-platelet adhesion in vitro and metastasis in vivo. *J Clin Invest* 1991 January;87(1):229-36.

(142) Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Mannel DN. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res* 1999 March 15;59(6):1295-300.

(143) Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW et al. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood* 2005 January 1;105(1):178-85.

(144) Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW et al. Tumor cell-associated tissue factor and circulating hemostatic factors cooperate to increase metastatic potential through natural killer cell-dependent and-independent mechanisms. *Blood* 2007 July 1;110(1):133-41.

(145) Palumbo JS, Kombrinck KW, Drew AF, Grimes TS, Kiser JH, Degen JL et al. Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells. *Blood* 2000 November 15;96(10):3302-9.

(146) Palumbo JS, Potter JM, Kaplan LS, Talmage K, Jackson DG, Degen JL. Spontaneous hematogenous and lymphatic metastasis, but not primary tumor growth or angiogenesis, is diminished in fibrinogen-deficient mice. *Cancer Res* 2002 December 1;62(23):6966-72.

(147) Kumar S, Weaver VM. Mechanics, malignancy, and metastasis: the force journey of a tumor cell. *Cancer Metastasis Rev* 2009 June;28(1-2):113-27.

(148) Miles FL, Pruitt FL, van Golen KL, Cooper CR. Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2008;25(4):305-24.

(149) Dickfeld T, Ruf A, Pogatsa-Murray G, Muller I, Engelmann B, Taubitz W et al. Differential antiplatelet effects of various glycoprotein IIb-IIIa antagonists. *Thromb Res* 2001 January 15;101(2):53-64.

(150) Amirkhosravi A, Mousa SA, Amaya M, Blaydes S, Desai H, Meyer T et al. Inhibition of tumor cell-induced platelet aggregation and lung metastasis by the oral GpIIb/IIIa antagonist XV454. *Thromb Haemost* 2003 September;90(3):549-54.

(151) Kienast Y, von BL, Fuhrmann M, Klinkert WE, Goldbrunner R, Herms J et al. Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat Med* 2010 January;16(1):116-22.

(152) Honn KV, Chen YQ, Timar J, Onoda JM, Hatfield JS, Fligiel SE et al. Alpha IIb beta 3 integrin expression and function in subpopulations of murine tumors. *Exp Cell Res* 1992 July;201(1):23-32.

(153) Chang YS, Chen YQ, Timar J, Nelson KK, Grossi IM, Fitzgerald LA et al. Increased expression of alpha IIb beta 3 integrin in subpopulations of murine melanoma cells with high lung-colonizing ability. *Int J Cancer* 1992 May 28;51(3):445-51.

(154) Borsig L. The role of platelet activation in tumor metastasis. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008 August;8(8):1247-55.

(155) Gasic GJ, Gasic TB, Stewart CC. Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968 September;61(1):46-52.

(156) Dickfeld T, Ruf A, Pogatsa-Murray G, Muller I, Engelmann B, Taubitz W et al. Differential antiplatelet effects of various glycoprotein IIb-IIIa antagonists. *Thromb Res* 2001 January 15;101(2):53-64.

(157) Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005 December 8;438(7069):820-7.

(158) Key ME, Hanna MG, Jr. Mechanism of action of BCG-tumor cell vaccines in the generation of systemic tumor immunity. II. Influence of the local inflammatory response on immune reactivity. *J Natl Cancer Inst* 1981 October;67(4):863-9.

(159) Halpern BN, Biozzi G, Stiffel C, Mouton D. Inhibition of tumour growth by administration of killed corynebacterium parvum. *Nature* 1966 November 19;212(5064):853-4.

(160) Chen L, McGowan P, Ashe S, Johnston J, Li Y, Hellstrom I et al. Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity. *J Exp Med* 1994 February 1;179(2):523-32.

(161) Wu TC, Huang AY, Jaffee EM, Levitsky HI, Pardoll DM. A reassessment of the role of B7-1 expression in tumor rejection. *J Exp Med* 1995 November 1;182(5):1415-21.

(162) Winter H, Hu HM, Urba WJ, Fox BA. Tumor regression after adoptive transfer of effector T cells is independent of perforin or Fas ligand (APO-1L/CD95L). *J Immunol* 1999 October 15;163(8):4462-72.

(163) Winter H, Hu HM, Urba WJ, Fox BA. Tumor regression after adoptive transfer of effector T cells is independent of perforin or Fas ligand (APO-1L/CD95L). *J Immunol* 1999 October 15;163(8):4462-72.

(164) Amirkhosravi A, Mousa SA, Amaya M, Blaydes S, Desai H, Meyer T et al. Inhibition of tumor cell-induced platelet aggregation and lung metastasis by the oral GpIIb/IIIa antagonist XV454. *Thromb Haemost* 2003 September;90(3):549-54.

(165) Kienast Y, von BL, Fuhrmann M, Klinkert WE, Goldbrunner R, Herms J et al. Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat Med* 2010 January;16(1):116-22.

(166) Ruoslahti E, Reed JC. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* 1994 May 20;77(4):477-8.

(167) Palumbo JS, Potter JM, Kaplan LS, Talmage K, Jackson DG, Degen JL. Spontaneous hematogenous and lymphatic metastasis, but not primary tumor growth or

angiogenesis, is diminished in fibrinogen-deficient mice. *Cancer Res* 2002 December 1;62(23):6966-72.

(168) Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 1998 September;153(3):865-73.

(169) Cameron MD, Schmidt EE, Kerkvliet N, Nadkarni KV, Morris VL, Groom AC et al. Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Res* 2000 May 1;60(9):2541-6.

(170) Wong CW, Lee A, Shientag L, Yu J, Dong Y, Kao G et al. Apoptosis: an early event in metastatic inefficiency. *Cancer Res* 2001 January 1;61(1):333-8.

(171) Kienast Y, von BL, Fuhrmann M, Klinkert WE, Goldbrunner R, Herms J et al. Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat Med* 2010 January;16(1):116-22.

(172) Kienast Y, von BL, Fuhrmann M, Klinkert WE, Goldbrunner R, Herms J et al. Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat Med* 2010 January;16(1):116-22.

(173) Kienast Y, von BL, Fuhrmann M, Klinkert WE, Goldbrunner R, Herms J et al. Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat Med* 2010 January;16(1):116-22.

(174) Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005 December 8;438(7069):820-7.

(175) Padua D, Massague J. Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Res* 2009 January;19(1):89-102.

(176) Massague J. TGFbeta in Cancer. *Cell* 2008 July 25;134(2):215-30.

(177) Fan D, Liaw A, Denkins YM, Collins JH, Van AM, Chang JL et al. Type-1 transforming growth factor-beta differentially modulates tumoricidal activity of murine peritoneal macrophages against metastatic variants of the B16 murine melanoma. *J Exp Ther Oncol* 2002 September;2(5):286-97.

(178) Wojtowicz-Praga S, Verma UN, Wakefield L, Esteban JM, Hartmann D, Mazumder A. Modulation of B16 melanoma growth and metastasis by anti-transforming growth factor beta antibody and interleukin-2. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1996 May;19(3):169-75.

(179) Yang YA, Dukhanina O, Tang B, Mamura M, Letterio JJ, MacGregor J et al. Lifetime exposure to a soluble TGF-beta antagonist protects mice against metastasis without adverse side effects. *J Clin Invest* 2002 June;109(12):1607-15.

(180) Naama HA, Mack VE, Smyth GP, Stapleton PP, Daly JM. Macrophage effector mechanisms in melanoma in an experimental study. *Arch Surg* 2001 July;136(7):804-9.

(181) Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005 December 8;438(7069):820-7.

(182) Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 2005 October;9(4):777-94.

(183) Amirkhosravi A, Meyer T, Warnes G, Amaya M, Malik Z, Biggerstaff JP et al. Pentoxifylline inhibits hypoxia-induced upregulation of tumor cell tissue factor and vascular endothelial growth factor. *Thromb Haemost* 1998 October;80(4):598-602.

(184) Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 1996 September 1;184(3):1101-9.

(185) Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a

new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med* 1997 January 6;185(1):111-20.

(186) Amirkhosravi A, Meyer T, Warnes G, Amaya M, Malik Z, Biggerstaff JP et al. Pentoxifylline inhibits hypoxia-induced upregulation of tumor cell tissue factor and vascular endothelial growth factor. *Thromb Haemost* 1998 October;80(4):598-602.

(187) Weis SM, Cheresh DA. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* 2005 September 22;437(7058):497-504.

(188) Vianello F, Papeta N, Chen T, Kraft P, White N, Hart WK et al. Murine B16 melanomas expressing high levels of the chemokine stromal-derived factor-1/CXCL12 induce tumor-specific T cell chemorepulsion and escape from immune control. *J Immunol* 2006 March 1;176(5):2902-14.

(189) Hussein MR. Tumour-associated macrophages and melanoma tumourigenesis: integrating the complexity. *Int J Exp Pathol* 2006 June;87(3):163-76.

(190) Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW et al. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood* 2005 January 1;105(1):178-85.

(191) Grundy MA, Zhang T, Sentman CL. NK cells rapidly remove B16F10 tumor cells in a perforin and interferon-gamma independent manner in vivo. *Cancer Immunol Immunother* 2007 August;56(8):1153-61.

(192) Wu J, Lanier LL. Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res* 2003;90:127-56.

(193) Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004 September;10(9):909-15.

(194) Gattinoni L, Powell DJ, Jr., Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat Rev Immunol* 2006 May;6(5):383-93.

X. DANKSAGUNG

Zunächst besten Dank an meinen Doktorvater, **Professor Georg Enders**, der mich seit 2004 mit Kompetenz, Hilfsbereitschaft und viel Geduld betreut. Von ihm habe ich viel gelernt und ich bin ihm dafür sehr dankbar.

Danke an **Claudia Fahney** und an **Bärbel Lorenz** für ihre Hilfe mit den molekularbiologischen Methoden, für ihre freundliche und kompetente Unterstützung in diesen Jahren.

Danke an die anderen Doktoranden unserer Arbeitsgruppe **Dr. Birgit Lieske** und **Benedikt Kellermann**, die mich eingearbeitet und bei vielen Versuchen ausgeholfen haben.

Danke an **Sylvia Münzing** für ihre Unterstützung mit dem FACS-Scanner.

Schließlich bedanke ich mich bei dem Direktor, **Professor U. Pohl** und bei allen Mitarbeitern des Walter-Brendel-Instituts für die lehrerreiche und angenehme Zeit, in der ich die Versuche durchführen durfte.

Und nun zu meinem neuen Leben nach dem Studium:

Danke an meine Chefs **Professor W. Mutschler** und **Professor K. Hallfeldt**, die mir die Möglichkeit geben, den Beruf auszuüben, den ich liebe.

Danke an meine Mentoren **Professor A. Muntau** und **Professor M. Siebeck**, die mich seit Jahren mit ihren Ratschlägen durch mein Leben begleiten.

Danke an meine Kollegen **Professor T. Mussack**, **Dr. R. Ladurner**, **Dr. F. Hohenbleicher** und **Dr. U. Stocker**, die mich jeden Tag auf meinem Weg in der Chirurgie begleiten und danke an meine Freunde **Marianne Müller**, **Jens Müller-Starck** und **Jasmin Schellong**, die in diesen Jahren immer für mich da waren.

Danke meinem Freund, **Bertram Volkwein**, der mich häufig am Wochenende ins Labor gefahren hat und mich mit der deutschen Sprache beraten hat.

Grazie **ai miei genitori**, che dopo la prima laurea in Letteratura mi hanno lasciata studiare medicina e per di piú in Germania, dove il cuore mi ha portata.

Danke meinem Oberarzt **PD Dr. K.G. Kanz**, der mich seitdem ich in der Chirurgischen Klinik der Nussbaumstr. arbeite fast täglich mit der Frage motivierte: „Frau Chiapponi, wann geben Sie die Doktorarbeit ab?“.

München, 11.11.2010