

Tumor/Stroma Interaktionen im B16
Melanommodell: Rolle von CD147 für MMP
Expression, Neoangiogenese und Metastasierung
und Einfluss von CD28 auf anti- tumorale
Immunantworten

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Heike Voigt

aus

Crailsheim

Würzburg im Mai 2007

Eingereicht am: 15.06.2007

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. M.J. Müller

Gutachter: Prof. Dr. J.C. Becker

Gutachter: Prof. Dr. T. Raabe

Tag des Promotionskolloquiums: 31.10.2007

Doktorurkunde ausgehändigt am:

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	DAS MALIGNNE MELANOM	1
1.2	TUMORSTROMA-INTERAKTIONEN	2
1.2.1	<i>Allgemeine Eigenschaften von CD147.....</i>	6
1.2.2	<i>Biochemische Eigenschaften und funktionelle Interaktionen von CD147</i>	7
1.2.3	<i>Rolle von CD147 bei der Tumorangiogenese.....</i>	10
1.3	ROLLE DES IMMUNSYSTEMS ZUR KONTROLLE DES TUMORS	10
1.3.1	<i>Induktion von Immunantworten</i>	11
1.4	FRAGESTELLUNGEN:	14
1.4.1	<i>Relevanz von CD147 für die Metastasierung und Tumorangiogenese.....</i>	14
1.4.2	<i>Relevanz von CD147 für die Entwicklung und den Verlauf von anti-Tumor-immunantworten</i>	14
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	VERSUCHSTIERE UND MATERIAL.....	15
2.1.2	<i>Versuchstiere</i>	15
2.1.3	<i>Chemikalien</i>	15
2.1.4	<i>Kits.....</i>	15
2.1.5	<i>Primer für PCR.....</i>	16
2.1.6	<i>Sonstige Verbrauchsmaterialien.....</i>	17
2.1.7	<i>Gebrauchsfertige Systeme.....</i>	17
2.1.8	<i>Puffer, Lösungen und Medien.....</i>	18
2.1.9	<i>Verwendete Antikörper und sekundäre Reagenzien.....</i>	22
2.2	VERWENDETE ZELLINIEN	23
2.2.1	<i>Plasmide und Vektoren</i>	24
2.2.1.1	<i>Vektor für die Subklonierung von PCR-Produkten</i>	24
2.2.1.2	<i>Vektoren für den siRNA knock down von CD147.....</i>	24
2.3	METHODEN.....	25
2.3.1	<i>Zellkultur.....</i>	25
2.3.1.1	<i>Zellzahlbestimmung</i>	25
2.3.1.2	<i>Zellpropagation.....</i>	25
2.3.1.3	<i>Kokultur von B16-Melanomzellen und Fibroblasten</i>	25
2.3.2	<i>Tierexperimente, DC Vakzinierung und Zellisolationstechniken.....</i>	26
2.3.2.1	<i>Induktion von Lungenmetastasen bzw. subkutanen Tumoren.....</i>	26
2.3.2.2	<i>Exzision subkutaner Tumore</i>	26
2.3.2.3	<i>Gewinnung von Dendritischen Zellen (DC) aus der Milz</i>	27
2.3.2.4	<i>Vakzinierungsprotokoll mit Dendritischen Zellen bzw. Peptid / IFA Gemisch</i>	27
2.3.2.5	<i>Gewinnung von PBL (periphere Blutlymphozyten) aus der Milz</i>	28
2.3.3	<i>In situ-Nachweismethoden.....</i>	28
2.3.3.1	<i>Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	28
2.3.3.2	<i>Immunhistologie</i>	28
2.3.3.3	<i>Immunfluoreszenzfärbungen</i>	29
2.3.4	<i>FACS-Analyse.....</i>	30
2.4	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	30
2.4.1	<i>Kultur von E. coli.....</i>	30

2.4.1.1	Bakterienstämme	30
2.4.2	<i>Transformation kompetenter Bakterien</i>	30
2.4.2.1	Plasmid-DNA Isolierung	31
2.4.3	<i>Restriktionsverdau</i>	31
2.4.4	<i>Gelelektrophoretische Analyse von DNA</i>	31
2.4.5	<i>Gelelektrophoretische Analyse von DGGE Gelen</i>	32
2.4.6	<i>Klonierung von cDNA-Fragmenten</i>	33
2.4.6.1	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	33
2.4.6.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	33
2.4.6.3	Ligation von DNA-Fragmenten.....	34
2.4.7	<i>cDNA Synthese</i>	34
2.4.7.1	<i>Real time PCR für VEGF</i>	35
2.4.7.2	<i>TCR Repertoire Analyse</i>	36
2.4.8	<i>Funktionelle Assays</i>	38
2.4.8.1	<i>Zytotoxizitäts-Assay</i>	38
2.4.8.2	<i>ELISPOT</i>	38
2.5	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	39
2.5.1	<i>Transfektion von Zellen</i>	39
2.5.1.1	<i>Transfektion mittels LipofectamineTM2000</i>	40
2.5.2	<i>Herstellung stabiler Zelllinien</i>	40
2.6	RNAI-TECHNOLOGIE	40
2.6.1	<i>Herstellung von siRNA-Expressionsvektoren</i>	41
2.7	PROTEINBIOCHEMISCHE ANALYSEN	42
2.7.1	<i>Herstellung von Zelllysaten</i>	42
2.7.2	<i>Konzentrationsbestimmung von Proteinen</i>	42
2.7.3	<i>Western Blot</i>	43
2.7.4	<i>Immunpräzipitation</i>	44
2.8	NACHWEIS DER GELATINOLYTISCHEN AKTIVITÄT VON PROTEINEN.....	44
2.8.1	<i>Gelatinzymographie</i>	44
2.9	GLYKOPROTEIN-ANALYSEN.....	46
2.9.1	<i>Inhibierung der N-Glykosylierung durch Tunikamycin</i>	46
2.9.2	<i>Glykosidasebehandlung von Protein</i>	46
2.9.2.1	<i>Behandlung mit PNGase F</i>	46
3	ERGEBNISSE	48
3.1	ANALYSE DER EXPRESSION VON CD147 IN MURINEN B16 MELANOMZELLINIEN	48
3.1.1	<i>Sequenzierung von CD147</i>	49
3.2	SIRNA-VERMITTELTE INHIBITION DER CD147 EXPRESSION	49
3.2.1	<i>Validierung einer geeigneten CD147-spezifischen siRNA</i>	50
3.2.1.1	<i>Nachweis des CD147 knock downs mittels FCM und Western Blot</i>	51
3.3	EINFLUSS DER CD147 REDUKTION AUF DIE PRODUKTION VON MMPs IN VIVO	55
3.3.1	<i>Der Level der CD147 Expression beeinflusst nicht die MMP-Expression</i>	55
3.4	EINFLUSS DER CD147 REDUKTION AUF DIE PRODUKTION VON MMPs IN VITRO	57
3.4.1	<i>Keine Beeinflussung der MMP Produktion in Kokulturen von murinen Fibroblasten und CD147⁺/CD147 Melanomzellen</i>	57
3.5	ANALYSE DER EXPRESSION VON CD147 IN MURINEN FIBROBLASTEN.....	60

3.5.1	<i>Expression von CD147 in murinen Fibroblasten</i>	60
3.5.2	<i>Einfluss des CD147 knock downs auf die Ausbildung spontaner Metastasen</i>	62
3.5.3	<i>Einfluss des CD147 knock downs auf die Angiogenese</i>	63
3.6	UNTERSUCHUNG DER RELEVANZ EINER CD28-VERMITTELTEN KOSTIMULATION IN EINEM MURINEN B16 MELANOMMODELL	66
3.6.1	<i>Verminderte Aktivität einer tumorspezifischen Vakzination in CD28 k.o. Mäusen- s.c. Tumore</i>	66
3.6.2	<i>Nachweis tumorinfiltrierender T-Zellen in CD28-defizienten Mäusen</i>	67
3.6.3	<i>Verminderte Aktivität einer tumor-spezifischen Vakzinierung in CD28 k.o. Mäusen - Lungenmetastasen</i>	70
3.6.4	<i>Reduzierte Anzahl an TRP-2-spezifischen IFN-γ produzierenden T-Zellen in CD28 k.o. Mäusen</i>	72
4	DISKUSSION	74
4.1	UNTERSUCHUNGEN VON CD147 IN EINEM B16 MELANOMMODELL	74
4.2	RELEVANZ VON CD28 BEI ANTI-TUMORIMMUNANTWORTEN	79
5	ZUSAMMENFASSUNG	84
5.1	ROLLE VON CD147 FÜR MMP EXPRESSION, NEOANGIOGENESE UND METASTASIERUNG	84
5.2	EINFLUSS VON CD28 AUF ANTITUMORALE IMMUNANTWORTEN	85
6	SUMMARY	86
6.1	ROLE OF CD147 IN MMP INDUCTION, NEOANGIOGENESIS AND METASTASIS FORMATION....	86
6.2	INFLUENCE OF CD28 ON ANTI-TUMORAL IMMUNE RESPONSES	87
7	ABKÜRZUNGEN	88
8	LITERATUR	90
9	PUBLIKATIONEN	100
10	DANKSAGUNG	102
11	LEBENS LAUF	103
12	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	104

1 EINLEITUNG

1.1 Das maligne Melanom

Das Melanom ist ein hoch metastasierender maligner Tumor, der vom melanozytären Zellsystem ausgeht. Das maligne Melanom entwickelt sich in über 90 % aller Fälle primär in der Haut, wo sich die Melanozyten in der basalen Schicht der Epidermis befinden. Das maligne Melanom gehört zu den 12 häufigsten Krebserkrankungen in Europa (Deutsches Krebsregister, <http://www.rki.de>). In den vergangenen Jahrzehnten konnte weltweit ein stetiger Anstieg der Inzidenz- und Mortalitätsrate beobachtet werden. In Deutschland ist das maligne Melanom die Ursache für den Tod von ca. 2000 Menschen im Jahr. Ultraviolette Strahlung, insbesondere während der Kindheit stellt den wesentlichen extrinsischen Risikofaktor dar [Marks, 2000]. Obwohl mehr als 90 % aller kutanen Melanome im Stadium des Primärtumors diagnostiziert werden, bestehen bei einem Teil der Patienten zu diesem Zeitpunkt bereits disseminierte Mikrometastasen. Die Zehn-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit beträgt bei Patienten mit manifestierten Satelliten- oder In-transit-Metastasen ca. 30-40 % und bei Patienten mit regionären Lymphknoten-Metastasen nur noch 15-30 %. Liegen Fernmetastasen (Stadium IV) vor, reduziert sich die mediane Überlebenszeit auf wenige Monate.

Für die Entstehung und Progression des Melanoms wurden fünf klinische Entitäten modellhaft als Zwischenschritte postuliert: (1) Nävus mit normalen Nävuszellen, (2) dysplastischer Nävus mit zytologischen Atypien, (3) radiale Wachstumsphase des primären Melanoms, (4) vertikale Wachstumsphase des primären Melanoms mit metastatischer Fähigkeit und (5) Metastase (zusammengefasst aus [Li und Herlyn, 2000]). Die Metastasierung des malignen Melanoms stellt einen komplexen und mehrstufigen Prozess dar. Erreicht der Primärtumor eine bestimmte Tumordicke (ca. 2 mm), bei der eine Nährstoffversorgung durch Diffusion nicht mehr ausreicht, werden zur Tumorversorgung

neue Blutgefäße gebildet, die von verschiedenen vom Tumor sezernierten angiogenetischen Faktoren, wie z.B. VEGF induziert werden [Erhard et al., 1997]. Die Anbindung an das Gefäßsystem erleichtert die Dissemination der Tumorzellen. Die Bildung von Metastasen stellt nach diesem Modell den Endpunkt einer Reihe aufeinander folgender genetischer und epigenetischer Aberrationen dar. Bisher wurde angenommen, dass nur Tumorzellklone mit fortgeschrittenen Veränderungen metastasieren. Neuere Untersuchungen an disseminierten Tumorzellen stellen dieses bisher favorisierte Modell in Frage. Es ergaben sich Hinweise, dass Zellen sich bereits in frühen Stadien vom Primärtumor lösen und nachfolgend an einem vom Primärtumor fernen Ort verharren und erst dort weitere Aberrationen erwerben [Schmidt-Kittler et al., 2003]. Dies legt nahe, dass das Mikroenvironment eine entscheidende Bedeutung für die Zellveränderungen bei der Metastasierung hat.

1.2 Tumorstroma-Interaktionen

Maligne Tumore stellen komplexe Gewebe dar, die nicht nur aus Tumorzellen, sondern auch aus der sie umgebenden extrazellulären Matrix (ECM) und Stromazellen bestehen. Zu den Stromazellen gehören Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen. Für die Progression des Tumors sind nicht nur die Eigenschaften der malignen Zellen selbst verantwortlich, sondern diese beruht auf einem komplexen Zusammenspiel von Tumorzellen, der ECM und den tumorumgebenden Stromazellen [Zigrino et al., 2005]. Stromazellen im Tumormikromilieu werden von den Tumorzellen getriggert und tragen daraufhin über Zell-Zell-Kontakte und die Freisetzung von löslichen Faktoren zur Tumorprogression bei. So ermöglichen z.B. Wachstumsfaktoren die Proliferation von Tumorzellen, Angiogenesefaktoren die Ausbildung von Blutgefäßen und Proteasen die Degradierung der ECM. Zudem sind Stromazellen, z.B. über die Inaktivierung von zytotoxischen Effektorzellen, auch an Immunevasionsmechanismen von Tumoren beteiligt.

Tumorstroma-Interaktionen involvieren eine Reihe proteolytischer Enzyme, einschließlich des Plasminogenaktivatorsystems [de Vries et al., 1996], die Aspartyl-, und Cysteinproteinasen [Ferrier et al., 1998; Hofmann et al., 2002] und die Matrixmetalloproteinasen (MMPs) [Hofmann et al., 2000]. Bei den MMPs handelt es sich um eine Familie Zn^{2+} -abhängiger Endopeptidasen, die die meisten Komponenten der Extrazellulärmatrix, wie fibrilläres und nicht-fibrilläres Kollagen, Gelatine, Fibronectin, Laminin und Basalmembranglykoproteine [Westermarck und Kahari, 1999] degradieren können (Tabelle 1). Die Expression der Proteasen ist nicht auf die Tumorzellen selbst beschränkt, sondern wurde auch in den umliegenden Tumorstromazellen beobachtet [Kurschat et al., 2002]. Somit scheinen Interaktionen von Tumor- und Stromazellen an der Regulation und Synthese von MMPs maßgeblich beteiligt zu sein. Bis heute wurden 24 unterschiedliche MMPs identifiziert, von denen 23 im Menschen exprimiert werden [Freije et al., 2003; Visse und Nagase, 2003]. Aufgrund der Spezifität, Proteinsequenzhomologie und der definierten Domänestrukturen werden MMPs in fünf Gruppen unterteilt: (1) Kollagenasen, (2) Gelatinasen, (3) Stromelysine, (4) Matrilysine und (5) membranständige MMPs (Tabelle 1). MMPs besitzen eine Reihe charakteristischer Eigenschaften (Abbildung 1). Alle enthalten eine Prodomäne, eine katalytische Domäne mit einer thermolysinähnlichen Zinkbindungsstelle im aktiven Zentrum, eine Hingeregion und eine Hemopexindomäne; eine Ausnahme stellen die Matrilysine dar, die keine Hemopexindomäne aufweisen. MMPs werden als Proenzyme synthetisiert und überwiegend als solche in latenter Form sezerniert. Die MMPs sind bei neutralem pH-Wert aktiv und lassen sich durch Metallochelatoren inhibieren [Nagase und Woessner, Jr., 1999]. Melanomzellen exprimieren zahlreiche MMPs, wie MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-13 und MT1-MMP und die MMP Inhibitoren TIMP-1,-2 und -3 [Hofmann et al., 2000]. Zahlreiche Studien zeigten, dass eine Balance zwischen MMPs und ihren Inhibitoren die Tumorprogression bestimmt [Henriet et al., 1999]. Eine hohe MMP-2 Expression ist durch eine frühzeitige hämatogene Metastasierung mit einer schlechteren

Prognose assoziiert [Väisänen et al., 1998]. Studien mit MMP-2 defizienten Mäusen zeigten, dass die MMP-2 Synthese für die Ausbildung experimenteller Metastasen essentiell ist [Itoh et al., 1998]. Darüber hinaus korrelierte die Induktion von MMP-1 mit der Melanomprogression [Väisänen et al., 1998; Woolley und Grafton, 1980] und die Invasion von Melanomzellen war von der Expression dieser MMPs abhängig [Durko et al., 1997]. Allerdings ist die Bildung von Metastasen in MMP-9 defizienten Tieren supprimiert [Itoh et al., 1999]. MMPs werden in der Regel weniger von den Tumorzellen selbst, sondern vielmehr von Stromazellen, insbesondere den Fibroblasten, exprimiert [Gabison et al., 2005]. Dabei geht man davon aus, dass diese Expression durch Interaktion mit den Tumorzellen stimuliert wird [Nabeshima et al., 2006].

Bis heute ist der komplexe Mechanismus wie maligne Zellen die Expression proteolytischer Enzyme in Stromazellen hochregulieren noch nicht vollständig verstanden. Es wird angenommen, dass entweder lösliche Faktoren oder direkte Zell-Zell-Kontakte eine entscheidende Rolle spielen [Ferrier et al., 1998]. Für die Aktivierung von MMPs wird eine wesentliche Funktion des Zelloberflächenmoleküls CD147 angenommen [Kanekura et al., 2002; Li et al., 2001; Tang et al., 2004b]. CD147 liegt in mikrometastatischen Zellen, die aus dem Knochenmark von Krebspatienten isoliert wurden, auf mRNA und Proteinebene sehr stark hochreguliert vor [Klein et al., 2002]. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass CD147 eine Schlüsselrolle bei der Tumorgenese und Metastasierung spielt. Im malignen Melanom korrelierte die CD147 Expression mit der Bildung von Metastasen [Kanekura et al., 2002]. Darüber hinaus konnte die Induktion mehrerer MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MT1-MMP (MMP-14) und MT2-MMP (MMP-15) durch CD147 beobachtet werden [Kanekura et al., 2002; Yang et al., 2003; Sameshima et al., 2000; Guo et al., 1997; Tang et al., 2004b; Kataoka et al., 1993].

<i>Proteinname</i>	<i>Synonym</i>	<i>M_w [kDa] von latenter Form</i>	<i>M_w [kDa] von aktiver Form</i>	<i>Substratspezifität</i>
MMP-1	Kollagenase-1	55	43	Typ I-, II-, III-, VII-, VIII-, X-, XI-Kollagen, Gelatine, Aggrecan, Casein, Nidogen, Serpin, Versican, Perlecan, Tenascin-C, Proteoglykane
MMP-2	Gelatinase-A	72	66	Typ I -, IV -, V -, VII -, X -, XI -, XIV-Kollagen, Gelatine, Aggrecan, Elastin, Fibronectin, Laminin, Nidogen, Proteoglykane, Versican
MMP-3	Stromelysin-1	57	43 und 45	Typ II -, IV -, IX -, X- Kollagen, Gelatine, Aggrecan, Casein, Decorin, Elastin, Fibronectin, Laminin, , Nidogen, Perlecan, Proteoglykane, Versican
MMP-7	Matrilysin-1	28	19	Typ I -, II -, III -, V -, IV -, X- Kollagen, Aggrecan, Casein, Elastin, Enactin, Laminin, Proteoglykane
MMP-8	Kollagenase-2	75	58	Typ I-, II-, III-, V-, VII-, VIII-, X-Kollagen, Gelatine, Aggrecan, Laminin, Nidogen
MMP-9	Gelatinase-B	92	86	Typ IV -, V -, VII -, X -, XIV- Kollagen, Gelatine, Fibronectin, Laminin, Nidogen, Proteoglykane, Versican
MMP-10	Stromelysin-2	57	44	Typ III -, IV -, V- Kollagen, Gelatine, Fibronectin, Laminin, Nidogen
MMP-11	Stromelysin-3	51	44	Laminin
MMP-12	Makrophagen Metalloelastase	54	45 und 22	Elastin
MMP-13	Kollagenase-3	60	48	Typ I-, II -, III -, IV -, V -, IX -, X -, XI - Kollagen, Gelatine, Aggrecan, Fibronectin, Laminin, Perlecan, Tenascin
MMP-14	MT1-MMP	66	56	Typ I -, II -, III- Kollagen, Gelatine, Aggrecan, Proteoglykane, Fibrin, Fibronectin, Laminin, Nidogen, Perlecan, Tenascin, Vitronectin
MMP-15	MT2-MMP	72	60	Typ I -, III- Kollagen, Gelatine, Aggrecan, Casein, Fibronectin, Laminin, Perlecan, Vitronectin
MMP-16	MT3-MMP	64	52	Typ I -, III- Kollagen, Gelatine, Aggrecan, Casein, Fibronectin, Laminin, Perlecan, Vitronectin
MMP-17	MT4-MMP	57	53	Gelatine, Fibrin, Fibronectin
MMP-18	Xenopus Kollagenase-4	70	53	Typ I – Kollagen
MMP-19	RASI-I	54	45	Typ I -, IV -Kollagen, Gelatine, Aggrecan, Casein, Fibronectin, Laminin, Nidogen, Tenascin
MMP-20	Enamelysin	54	22	Aggrecan, Amelogenin
MMP-21	Xenopus MMP			Nicht bekannt
MMP-23	CA-MMP			Nicht bekannt
MMP-24	MT5-MMP	63	29	Gelatine Fibronectin
MMP-25	MT6-MMP	34	28	Typ IV- Kollagen, Gelatine
MMP-26	Matrilysin-2			Typ IV - Kollagen, Gelatine, Casein, Fibrinogen, Fibronectin
MMP-28	Epilysin			Casein

Tabelle 1. MMP- Klassifikation (verändert nach Sommerville et. al Genome Biology 2003, Volume 4, Issue 6, Article 216). **MW**: Molekulargewicht; **RASI-1**: *Rheumathoid arthritis-1.ynovia inflammation*

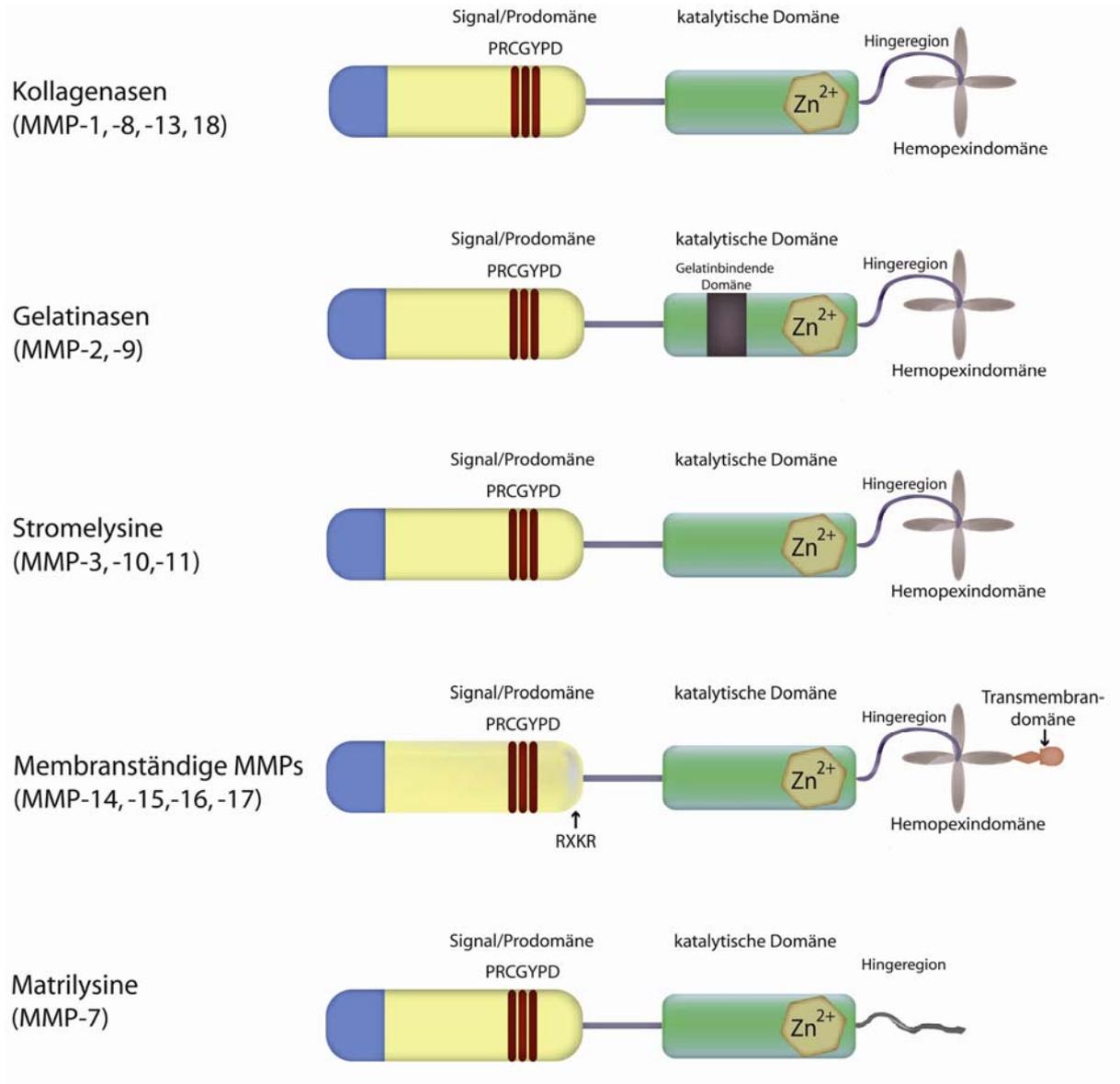


Abbildung 1. Struktur der MMPs. MMPs werden durch die Abspaltung der N-terminalen Propeptidomäne aktiviert.

1.2.1 Allgemeine Eigenschaften von CD147

CD147 (Emmprin, Basigin) ist ein ubiquitär exprimiertes integrales Membranglykoprotein, das zur Immunglobulin-Superfamilie gehört; es wurden sowohl Homologien zu der variablen Region der Immunglobuline als auch zu der β -Kette des MHC-II Komplexes beschrieben [Miyachi et al., 1990;Seulberger et al., 1990;Miyachi et al., 1991;Fossum et al., 1991]. CD147 wurde parallel unter einer Vielzahl von Namen in unterschiedlichen Spezies charakterisiert: in Ratten (OX-47 Antigen und CE9 [Fossum et al., 1991;Nehme et al., 1993],

Mäusen (gp42 und Basigin [Altruda et al., 1989;Miyachi et al., 1990] und Hühnern (Neurothelin HT7 und 5A11 Antigen [Seulberger et al., 1990;Fadool und Linser, 1993]). Bemerkenswerterweise wurde dieses Protein zuerst im Menschen als Faktor beschrieben, der von Tumorzellen exprimiert wird und die Produktion von MMP-1 in Fibroblasten stimuliert [Biswas, 1984]. Im Weiteren zeigt sich, dass dieser Faktor auch die Expression von weiteren MMPs (MMP-2, -3, -9 und -14) in Fibroblasten und Endothelzellen stimuliert. Dieser Faktor wurde zuerst als TCSF (*tumor cell derived collagenase stimulatory factor*) bezeichnet. TCSF wird nicht nur auf Tumorzellen, sondern auch auf normalen Zellen exprimiert [Biswas et al., 1995;DeCastro et al., 1996]. Später wurde TCSF in Emmprin umbenannt, um seine Rolle bei der Induktion von extrazellulären MMPs über normale sowie pathologische, zelluläre Wechselwirkungen hervorzuheben [Biswas et al., 1995].

1.2.2 Biochemische Eigenschaften und funktionelle Interaktionen von CD147

Das humane CD147 ist ein 269 Aminosäuren langes N-glykosyliertes Protein, das zur Typ I integralen Membranproteinfamilie gehört. Sein Molekulargewicht beträgt 28000 kDa. Es besteht aus zwei extrazellulären Immunglobulindomänen, einer Transmembranregion und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne [Biswas et al., 1995;Miyachi et al.,1991;Muramatsu und Miyachi, 2003] (Abbildung 2). Es besteht eine hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen zwischen Ratte und Maus CD147 (94 %), sowie auch etwas geringer zwischen Mensch und Maus (58 %) [Miyachi et al., 1991;Seulberger et al., 1992]. Insbesondere die Transmembrandomäne und die intrazelluläre Domäne sind hoch konserviert. Die Transmembrandomäne von CD147 weist im Vergleich zu anderen Membranproteinen eine Besonderheit auf. Diese besteht darin, dass in der Mitte der Transmembrandomäne eine positiv geladene Aminosäure (Glutaminsäure) vorkommt, wodurch CD147 mit anderen Transmembranproteinen einen Komplex bilden kann, wobei die Ladung in einen energetisch stabilen Zustand überführt wird [Muramatsu und Miyachi, 2003]. Es konnte demonstriert

werden, dass die Transmembrandomäne für zahlreiche Wechselwirkungen von CD147 mit seinen Interaktionspartnern, wie zum Beispiel den Cyclophilinen [Yurchenko et al., 2005] und Monocarboxylattransportern MCT1-MCT4 [Manoharan et al., 2006] verantwortlich ist. Die extrazelluläre Domäne, bei der sich der Glykananteil zwischen den jeweiligen Spezies unterscheidet, enthält drei Asn Glykosylierungsstellen [Muramatsu and Miyauchi, 2003]. Das unterschiedliche Glykosylierungsmuster des nativen 28 kDa schweren Proteins erklärt das variable Molekulargewicht, das zwischen 44 und 66 kDa liegt [Biswas et al., 1995]. Es wurde gezeigt, dass die Glykosylierung für die MMP stimulierende Aktivität notwendig ist [Guo et al., 1997; Sun und Hemler, 2001]. So induzierte aufgereinigtes deglykosyliertes CD147 nicht nur keine MMP Aktivität, sondern wirkte sogar der Aktivität des nativen Moleküls entgegen [Sun und Hemler, 2001]. Es konnte bereits im humanen und murinen System gezeigt werden, dass insbesondere die N-terminal lokalisierte Ig-ähnliche Domäne für die Stimulation der Fibroblasten-vermittelten MMP Expression essentiell ist [Sun und Hemler, 2001; Nabeshima et al., 2004; Li et al., 2001].

CD147 bildet analog zu anderen Mitgliedern der Ig-Superfamilie in der Plasmamembran Homooligomere. Die Bindungen zwischen CD147 Molekülen (homophile Interaktionen) werden vermutlich durch hydrophobe Interaktionen der N-terminalen Ig-ähnlichen Domänen vermittelt [Yoshida et al., 2000]. Bei der CD147-vermittelten MMP-Stimulation könnte CD147 vermutlich als Selbstrezeptor fungieren; die homophilen Rezeptor/Ligand Interaktionen werden ebenfalls durch die N-terminale Ig-Domäne vermittelt [Sun und Hemler, 2001]. Die homophilen CD147 Interaktionen können sowohl heterotypisch (Interaktion zwischen Tumorzellen und Fibroblasten) [Biswas et al., 1995; Guo et al., 1997] als auch homotypisch (Interaktion zwischen Tumorzellen und Tumorzellen) auftreten. Eine Glykosylierung von CD147 ist für die homophile Bindung nicht erforderlich, ist aber für die MMP Induktion notwendig [Sun und Hemler, 2001; Jia et al., 2006]. Neben homophilen Wechselwirkungen von CD147, die unter anderem zur Induktion von MMPs führen [Sun und

Hemler, 2001], sind darüber hinaus Interaktionen von CD147 mit einem noch unbekanntem Zelloberflächenmolekül möglich.

CD147 liegt nicht nur in membrangebundener, sondern auch in löslicher Form vor [Nabeshima et al., 1991; Ellis et al., 1989; Tang et al., 2004b; Bordador et al., 2000; Ko et al., 2000; Sidhu et al., 2004]. Zwei Mechanismen werden für die Bildung von löslichem CD147 postuliert. Der erste Mechanismus schlägt die MMP-abhängige Bildung eines proteolytischen Spaltproduktes von CD147 vor, das keinen Karboxylterminus aufweist [Tang et al., 2004b]. Alternativ wird die Abgabe von „full-length“ CD147 über die Spaltung von Mikrovesikel postuliert [Sidhu et al., 2004]. Diese abgespaltenen Vesikel sind instabil und degradieren schnell, was zu einer zunehmenden Konzentration von CD147 in der nicht-vesikulären Fraktion führt. Bemerkenswert ist, dass lösliches CD147 funktionell aktiv ist, da auch in Stromazellen, die nicht in direktem Kontakt mit CD147-exprimierenden Tumorzellen stehen, MMP hochreguliert werden kann [Nabeshima et al., 2004; Sidhu et al., 2004; Kanekura et al., 2002].

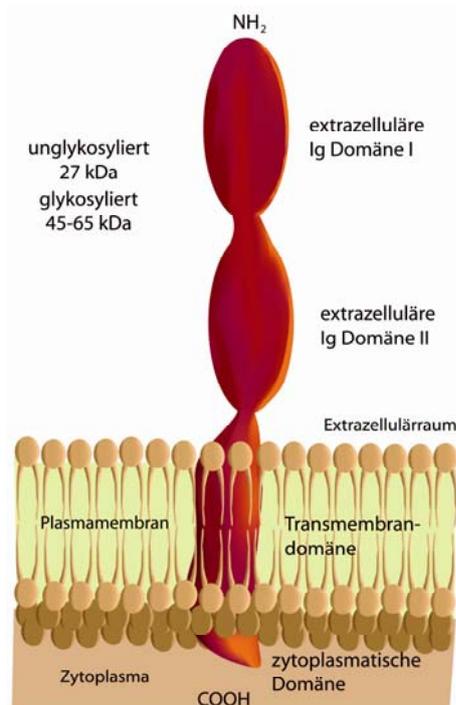


Abbildung 2. Schematische Darstellung des CD147 Proteins.

1.2.3 Rolle von CD147 bei der Tumorangiogenese

Das Wachstum solider Tumore hängt von der Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) ab. Die Angiogenese ist ein komplexer und mehrstufiger Prozess [Rundhaug, 2005]. Zu den kritischen Schritten der Tumorangiogenese gehört das Auswachsen von Endothelzellen aus bereits vorhandenen Kapillargefäßen und deren Migration. Dabei stellt der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) ein Schlüsselzytokin dar. In verschiedenen Tumorarten konnte eine Korrelation der VEGF Expression mit der Dichte der Mikrovaskulatur und Metastasierung beobachtet werden [List, 2001; Lee et al., 2000; Poon et al., 2001]. Auch Melanomzellen, die eine Überexpression von VEGF aufwiesen, induzieren *in vivo* die Bildung neuer Blutgefäße [Claffey et al., 1996]. Es konnte demonstriert werden, dass CD147 die VEGF Produktion sowohl auf Protein- als auch auf RNA Ebene induziert [Tang et al., 2005]; die CD147-vermittelte Regulation der VEGF Produktion erfolgt über den PI3K-Akt Signalweg [Tang et al., 2006]. Es besteht eine positive Korrelation zwischen der VEGF und der CD147 Expression. Eine Herunterregulierung der CD147 Expression führte über die Inhibierung der VEGF Expression zu einer verminderten Dichte der Mikrovaskulatur sowie zur Suppression der Tumorprogression in den transplantierten Tumoren [Chen et al., 2006]. Neben der Induktion von VEGF spielt CD147 auch für die MMP vermittelte Degradierung von Basalmembranen und das Umgestalten der ECM eine essentielle Rolle. Diese Veränderungen sind eine Voraussetzung für die Migration von Endothelzellen.

1.3 Rolle des Immunsystems zur Kontrolle des Tumors

Immunzellen spielen für die Kontrolle von malignen Tumoren eine wichtige Rolle [Shankaran et al., 2001]. Die Relevanz der Tumorimmunität wurde bereits in verschiedenen experimentellen Tiermodellen demonstriert. So weisen zum Beispiel Mäuse mit immunologischen Defekten eine größere Suszeptibilität gegenüber spontanen und induzierten Tumoren auf. Viele dieser Tumore werden dann aber abgestoßen, wenn diese in normale

Mäuse implantiert wurden [Dunn et al., 2004]. Zudem konnte gezeigt werden, dass spontane anti-tumorale T-Zellantworten in Melanompatienten existieren; dies spiegelt sich durch eine Akkumulation von Immunzellen am Tumor wieder [Boon et al., 2006].

1.3.1 Induktion von Immunantworten

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl Tumor-assoziiertes-Antigene (TAA) identifiziert, die auf der Oberfläche von Tumorzellen in einer MHC-restringierten Weise exprimiert und von T-Zellen erkannt werden. Dabei zeigte sich, dass ein Großteil dieser Antigene sich nicht von mutierten, sondern normalen Proteinen ableiten, die in den Tumorzellen vermehrt oder nur atypisch exprimiert werden. Die Identifizierung von Peptid-Epitopen, die von TAA abstammen, stellt bisher die Basis für eine zelluläre Immuntherapie gegen den Tumor dar. Hinsichtlich der Expressionsmuster in neoplastischen und normalen Geweben werden TAA in Differenzierungsantigene [Van den Eynde und van der Bruggen, 1997], tumorspezifische Antigene (z.B. MAGE) [Parmiani et al., 2002], individuelle Antigene, die von mutierten (z.B. BRaf, p53) [Andersen et al., 2004] überexprimierten Proteinen (z.B. Survivin) [Andersen et al., 2005] oder viralen Antigenen (HPV-Proteine E6 und E7) [Parkhurst et al., 1998] resultieren, klassifiziert [Van den Eynde und van der Bruggen, 1997]. Es wurden bereits zahlreiche TAA in therapeutischen Studien zur Behandlung von Brust-, Prostata-, Nierenkrebs und dem Melanom eingesetzt [Parmiani et al., 2002]. Somit basieren Immunantworten gegen Tumore, zumindest zum Teil, nicht auf hoch immunogenen Fremd-, sondern auf gering immunogenen Autoantigenen; eine optimale Induktion von spezifischen T-Zellantworten sollte daher neben einem T-Zellrezeptor (TCR) vermittelten Signal auch kostimulatorische Signale benötigen. Das Prinzip der Kostimulation bei der Aktivierung von T-Zellen wurde bereits Anfang der 70er Jahre postuliert [Bretscher und Cohn, 1970]. Es besagt, dass periphere T-Zellen für ihre Proliferation und die Aktivierung aller Effektorfunktionen zwei Signale benötigen: Signal 1 bedingt die Antigenspezifität der

Aktivierung und wird durch den TCR nach Erkennung eines Peptid/MHC Komplexes vermittelt; Signal 2 wird durch so genannte kostimulatorische Oberflächenrezeptoren weitergeleitet, deren Liganden sich nur auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC) finden (Abbildung 3A). Ohne entsprechende Kostimulation kommt es bei Antigenerkennung durch den TCR naiver T-Zellen nur zu einer teilweisen Stimulation und zur Anergie [Iwashima, 2003] (Abbildung 3B). Der Prototyp von kostimulatorischen Molekülen ist CD28. Wird CD28 durch die natürlichen Liganden B7.1 (CD80) bzw. B7.2 (CD86) zusammen mit dem TCR stimuliert, kommt es zur vollständigen Aktivierung von naiven T-Zellen (Proliferation, Induktion von Zytokinen und deren Rezeptoren sowie von anti-apoptotischen Molekülen) mit nachfolgender Differenzierung zu Effektorzellen [Holdorf et al., 2000; Lenschow et al., 1996; Sharpe und Freeman, 2002; Sperling und Bluestone, 1996]. Durch die Restriktion der Ligandenexpression kostimulatorischer Rezeptoren auf APC sowie deren Induktion durch sogenannte *danger signals*, (zusammengefasst in [Matzinger, 2002]), wird das Immunsystem befähigt, das Potential von adaptiven, zellulären Immunantworten zu kontrollieren, d.h. die Zerstörung neoplastischer oder viral-infizierter Zellen zu ermöglichen und gleichzeitig eine Selbstzerstörung des Körpers durch autoreaktive T-Zellen zu verhindern.

Die Zwei-Signal-Hypothese der T-Zellstimulation hat weit reichende Bedeutung für die Entwicklung von Immunantworten gegen Tumore. Während sich auf den meisten Tumoren TAA auf der Oberfläche finden, tragen sie nur ausnahmsweise Liganden für kostimulatorische Rezeptoren. Dementsprechend würde ein Tumor solange für das adaptive Immunsystem unsichtbar bleiben, bis zytotoxische T-Zellen über den Prozess des *crossprimings*, d.h. über die Präsentation von TAA auf der Oberfläche von APC aktiviert werden.

Erste Hinweise für die Gültigkeit dieser Annahme erbrachten Experimente in murinen Tumormodellen, die demonstrierten, dass eine induzierte Expression des Liganden für CD28

in Tumoren zu deren Abstoßung führt [Abken et al., 2002; Allison et al., 1995]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das Wachstum von immunogenen Tumoren durch eine Blockade der CD28-CD86-Interaktion beschleunigt werden konnte [Chambers et al., 2001]. CD28 besitzt aber auch eine funktionelle Rolle in späteren Phasen der Immunantwort (I) die Aktivität von tumorspezifischen T-Zellen konnte mittels bispezifischen anti-CD28/anti-TAA Antikörpern [Renner et al., 1994] oder einer lokalen Administration von stimulierenden anti-CD28-Antikörpern signifikant verstärkt werden [Bai et al., 2001]; (II) Fusionsproteine aus B7 und TAA-spezifischen Antikörpern führten zu einer Aktivierung von tumor-infiltrierenden T-Zellen [Marshall und Marks, 2001]. Auch im Menschen fanden sich mehrere Anhaltspunkte für die Relevanz einer CD28-vermittelten Kostimulation in späteren Phasen der zellulären Immunabwehr. *In vitro* Untersuchungen von Lymphozyten, die aus dem peripheren Blut von Tumorpatienten, bzw. aus den Tumoren selbst isoliert wurden, offenbarten deren eingeschränkte funktionelle Kapazität; diese Schwäche konnte durch eine Stimulation über CD28 aufgehoben werden [Dawicki et al., 2004; Hellstrom et al., 2001; Maccalli et al., 1999]. Dennoch wird die Rolle von CD28 bei der immunologischen Abwehr von Tumoren kontrovers diskutiert, da CD28 k.o. Mäuse sehr wohl unter anderem viral-induzierte Lymphome oder chemisch-induzierte Fibrosarkome abstoßen können [Wen et al., 1997].

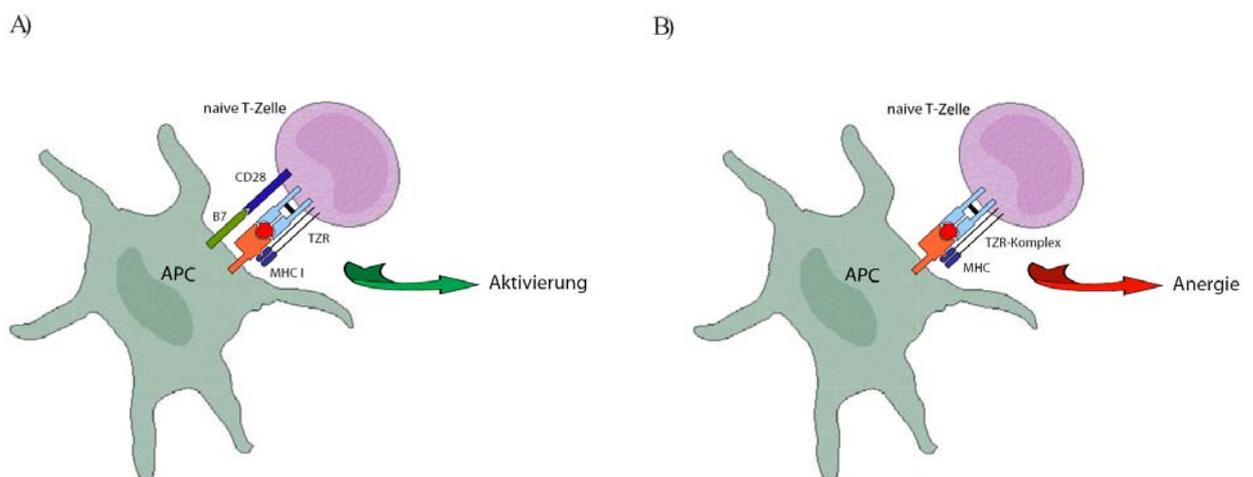


Abbildung 3. Modell der T-Zellaktivierung (A) und T-Zell-Anergie (B)

1.4 Fragestellungen:

1.4.1 Relevanz von CD147 für die Metastasierung und Tumorangiogenese

MMPs spielen nicht nur für den Umbau der ECM eine Schlüsselrolle [Malemud, 2006], sondern modulieren über die proteolytische Aktivierung bzw. Inaktivierung von Zytokinen und von Zelloberflächenproteinen auch die Interaktionen zwischen Tumor-, Immuno- und Tumorstromazellen [Nagase und Woessner, Jr., 1999]. Tumorassoziierte MMPs werden in der Regel weniger von den Tumorzellen selbst, sondern mehr von Stromazellen exprimiert [Gabison et al., 2005]. Dabei geht man davon aus, dass diese Expression durch Interaktionen der Stromazellen mit den Tumorzellen stimuliert wird [Nabeshima et al., 2006]. Ein Protein, das hierbei als Schlüsselmolekül für die Vermittlung der MMP Expression gilt, ist der auf Tumorzellen hoch exprimierte *Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer* (Emmprin). Unser Ziel war es, über das gezielte Ausschalten der Emmprin Expression in den Tumorzellen, die MMP Expression in den B16 Tumoren zu modifizieren und den resultierenden Effekt auf Metastasierung und Tumorangiogenese zu untersuchen.

1.4.2 Relevanz von CD28 für die Entwicklung und den Verlauf von anti-Tumorimmunantworten

Kostimulatorische Signale, die z.B. über CD28 vermittelt werden, sind grundsätzlich für die optimale Aktivierung von T-Zellen unerlässlich. Daher überraschte die Beobachtung, dass CD28 k.o. Mäuse Immunantworten gegen zahlreiche Antigene entwickeln können, darunter auch die immunologische Abwehr von Tumoren. Um die Funktion des kostimulatorischen CD28/B7 Systems bei therapeutisch induzierten T-Zellantworten gegen Tumoren im Detail zu analysieren, wurden in CD28 k.o. Mäusen DC basierte Vakzinierungen zur Therapie von experimentellen B16 Melanommetastasen eingesetzt, um die resultierenden Immunantworten zu untersuchen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere und Material

2.1.2 Versuchstiere

Für die Tierexperimente wurden sechs Wochen alte C57BL/6J Mäuse bzw. CD28-defiziente Sublinien verwendet. Die C57BL/6J Mäuse wurden von der Firma Charles River Laboratories (Sulzfeld), die CD28-defizienten Mäuse vom Jackson Laboratory, Maine USA über Charles River Laboratories bezogen und unter speziellen pathogenfreien Bedingungen gehalten. Alle Experimente wurden den gültigen Anforderungen für Tierversuche gerecht.

2.1.3 Chemikalien

Die im Labor routinemäßig vorhandenen und benutzten Chemikalien besaßen *pro analysis* Qualität und wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Amersham-Pharmacia (Freiburg), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Taufkirchen) bezogen. Im Folgenden sind Chemikalien aufgelistet, die nicht routinemäßig verwendet werden.

- Ethidiumbromid Sigma
- BSA (bovines Serum Albumin) Sigma
- TEMED Invitrogen
- Ammonium Persulfat (APS) Sigma

2.1.4 Kits

Die im Labor routinemäßig eingesetzten Kits wurden von den Firmen Dako (Hamburg), Biozym (Hess. Oldendorf), InvivoGen (San Diego, Californien) und Qiagen (Hilden) bezogen.

- Animal Research Kit ARK (Biotinylierung von Antikörpern) Dako
- Genra Purescript RNA Isolierungskit Biozym

- psiRNA-h7SKGFPzeo Kit InvivoGen
- QIAquick PCR Purification Kit Qiagen
- QIAquick Gel Extraction Kits Qiagen
- Qiaamp DNA Mini Kit Qiagen
- Qiafilter Plasmid Mini Kit Qiagen
- Qiafilter Plasmid Midi Kit Qiagen

2.1.5 *Primer für PCR*

Die Primer wurden von der Firma Metabion (Planegg-Martinsried) bzw. Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert. Für die Amplifikation von Emmprin wurde folgendes Primerpaar verwendet:

- Forward-Primer (Emmprin): 5`-CTC CTG GAC GAG GCG ACA TG-3`
- Reverse-Primer (Emmprin): 5`-CTG GAG TGG AGG TAG ACG CTG-3`

Für die klonotypische Kartierung kamen die Primer aus Tabelle 2 zum Einsatz, wobei die Voramplifikation mit dem familienspezifischen Primer und MBC4, die Amplifikation mit MBC-GC anstelle von MBC4 durchgeführt wurde.

Tabelle 2. Murine DGGE-Primer für BV-Familien

Primer	Sequenz (5' → 3')
MBV1	CGGTGCCAGTCGTTTTATAC
MBV2	CACACGGGTCACTGATACGGAG
MBV3	CACCTTGCAGCCTAGAAATTCAG
MBV4	CTGCCTCAAGTCGCTTCCAAC
MBV5	TGARATGAACATGAGTGCCTTGG
MBV6	TTCTCTCACTGTGACATCTGCCC
MBV7	AAGGATACAGGGTCTCACGGAAG
MBV8	TTGGCTTCCCTCTCTCAGACA
MBV9	TCTCTCTACATTGGCTCTGCAGG
MBV10	ATCAAGTCTGTAGAGCCGGAGG
MBV11	GCCCAATCAGTCGCACTCAAC
MBV12	ATGGTGGGGCTTTCAAGGATC
MBV13	CTGTGAGGCCTAAAGGAACTAAC
MBV14	ACGACCAATTCATCCTAAGCAC
MBV15	CCATCAGTCATCCCAACTTATCC
MBV16	CTCTCAAATCCAACCCACAGC
MBV17	ATTCTCAGCTAAGTGTTCCCTCGA
MBV18	CGGCCAAACCTAACATTCTC
MBC-GC	GCCGCCCGCCGCTCGCCCGCCGCGCCCTGCCCGCCG CCCCGCCCGCGCTGGAGTCACATTTCTCAGATC GGGTAGCCTTTTGTGGTTTGC

2.1.6 Sonstige Verbrauchsmaterialien

- Nitrozellulosemembran Amersham Pharmacia, Freiburg
- Röntgenfilm XBA Retina Noras, Würzburg

2.1.7 Gebrauchsfertige Systeme

- BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) Roche Diagnostics, Mannheim
- Calcium Phosphate Transfection Kit Invitrogen, Karlsruhe
- Lipofectamine 2000 Invitrogen, Karlsruhe

- PAGER Duramide Precast Gels (10 % oder 12 % Cambrex, Verviers, Belgien
Tris-Glyzin Gele)

2.1.8 Puffer, Lösungen und Medien

- 6 % Polyacrylamid, 0 % Denaturgenz (DGGE-Gel):
 - 75 ml 40 % Acrylamid
 - 20 ml 25 x TAE (A1-Biotech)
 - ad 500 ml H₂O
- 6 % Polyacrylamid, 80 % Denaturgenz (DGGE-Gel):
 - 75 ml 40 % Acrylamid
 - 20 ml 25 x TAE (A1 Biotech)
 - 168 g Urea
 - 160 ml Formamid
 - ad 500 ml H₂O
- 5 x Dye für DGGE-PCR
 - 10 ml Cresol Red
 - 6 g Succrose
- Blockierlösung (Western Blot)
 - 5 % Milchpulver
 - 0,05 % Tween 20
 - in 1 x PBS
- Bradford-Reagenz (Western Blot)
 - 0,01 % Coomassie Brilliant Blue G 250
 - 4,7 % Ethanol
 - 8,5 % Phosphorsäure

- Coomassiefärbelösung (Zymogramm)
 - 45 % Methanol
 - 10 % Eisessig
 - 0,1 % Coomassie Brilliant Blue R250

- Elektrophoresepuffer (Western Blot, Zymogramm)
 - 15 g Tris
 - 72 g Glycin
 - 50 ml 10 % SDS
 - ad 1 l destilliertes Wasser

- 2 x Laemmli-Puffer (Western Blot)
 - 200 mM Tris-Cl pH 6,8
 - 4 % SDS
 - 20 % Glycerol
 - 0,005 % Bromphenolblau
 - 4 % β -Mercaptoethanol

- Ligationspuffer (pH 7,5)
 - 50 mM Tris-HCl
 - 10 mM $MgCl_2$
 - 1 mM ATP
 - 10 mM Dithiothreitol
 - 25 μ g/ml BSA

- Loading-Dye (Zymogramm)
 - 200 mM Tris-Cl pH 6,8
 - 4 % SDS
 - 20 % Glycerol
 - 0,005 % Bromphenolblau

- RIPA Puffer (Lysepuffer) (Western Blot, Immunpräzipitation)

50 mM Tris pH 7,5

150 mM NaCl

1 mM EDTA

1 % NP40

0,5 % Natriumdesoxycholat

0,1 % SDS

- SOC-Medium (Transformation)

2 % Pepton 140

0,5 % Hefeextrakt

0,05 % NaCl

2,5 mM KCl

1 mM NaOH

20 mM Glucose

10 mM MgCl₂

- *Strip*-Puffer (Western Blot)

2 % SDS

62,5 mM Tris-HCl pH 6,8

100 mM β -Mercaptoethanol

- Substrat-Puffer (ELISPOT)

0,1 M NaCl

50 mM MgCl₂

0,1 M Tris-HCl [pH 9,5] g

- 1 x TAE (Tris-Acetate/EDTA)

40 mM Tris-Acetate

1 mM EDTA

- TE-Puffer (Elutionspuffer)
 - 10 mM Tris-HCl pH 8
 - 1 mM EDTA
- Transferpuffer (Western Blot)
 - 25 mM Tris
 - 190 mM Glycin
 - 20 % Methanol
- Waschpuffer 1 (Zymogramm)
 - 2,5 % (v/v) Triton X-100
 - Ad 500 ml Aqua dest
- Waschpuffer 2 (Zymogramm)
 - 50 mM Tris-HCl, pH 7,8
 - 2,5 ml 1M CaCl₂
 - 0,5 ml 2,5 % (v/v) Triton X-100
- Hämatoxylin (nach Mayer)
 - 1 g Hämatoxylin (Sigma, Taufkirchen) in 1000 ml H₂O lösen
 - 0,2 g Natriumjodat (Sigma, Taufkirchen)
 - 50 g Kalialaun (Merck, Darmstadt)

100 ml von dieser Stammlösung werden mit 5 g Chloralhydrat (Merck, Darmstadt) und 0,1 g Zitronensäure (Merck, Darmstadt) versetzt und vor Gebrauch filtriert.
- Kompletmedium (CM)
 - 500 ml RPMI 1640 mit L-Glutamin und Natriumbicarbonat [2 g/l]
(PAN, Aidenbach)
 - 50 ml FCS (Invitrogen, Karlsruhe)
 - 5 ml Penicillin [10000 U/ml] / Streptomycin [10 mg/ml] (PAN,
Aidenbach)
 - 6 ml Natriumpyruvat [100 mM] (PAN, Aidenbach)

Im Kompletmedium wurden die B16 Melanomzelllinien 12BM2 sowie die primären Fibroblasten und Fibroblastenzelllinien NIH3T3 und L929 kultiviert.

Für die B78D14 Zelllinie wurde das Medium zusätzlich mit Geneticin (G418) [Endkonzentration: 400 µg/ml] (PAN, Aidenbach) und Hygromycin B [Endkonzentration: 50 µg/ml] (Sigma, Taufkirchen) supplementiert.

2.1.9 Verwendete Antikörper und sekundäre Reagenzien

Die im Labor routinemäßig eingesetzten Primär- bzw. Sekundärantikörper wurden von den Firmen Sigma (Taufkirchen), BD-Bioscience (Heidelberg), BD-Pharmingen (Heidelberg), Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg), eBioscience (Frankfurt), Chemikon (Hofheim/Ts.) Dako (Hamburg) bezogen und sind in den Tabellen 3 und 4 aufgelistet.

Tabelle 3. Primärantikörper:

Zielstruktur	Isotyp/Spezies	Klon/Nummer	Verdünnung	Firma
β-Tubulin	Maus	T4026	1:5000 (WB*)	Sigma
CD4	IgG2a, Ratte	RM4-5	1:1000 (IC [§])	BD Biosciences
CD8	IgG2a, Ratte	53-6.7	1:400 (IC [§])	BD Biosciences
CD25	Ratte	7D4	1:20 (IC [§])	BD Biosciences
CD31	IgG2a, Ratte	MEC 13.3	1:50 (IC [§])	BD Pharmingen
Emmprin	Ziege	sc-9757	1:500 (WB*)	Santa Cruz Biotechnology
Emmprin	IgG2a, Ratte	RL73	1:500 (WB*)	eBioscience
F4/80	IgG2b/Ratte	--	1:100 (IC [§])	Überstand von HB 198 Hybridom
MMP-9	Kaninchen	AB19047	1:5000 (WB*), 1:4000 (IC [§])	Chemikon
MT1-MMP	Kaninchen	AB815	1:8000 (IC [§])	Chemikon
VEGF	IgG/Kaninchen	Sc-152	1:75 (IC [§])	Santa Cruz Biotechnology

* Western Blot, § Immunhistochemie

Tabelle 4. Sekundärantikörper:

Antikörper	Verdünnung	Firma
Anti-Kaninchen (HRP-konjugiertes Ziegen-Ig)	1:1000 (WB*)	Dako Cytomation PO448
Anti-Ziege (HRP-konjugiertes Kaninchen Ig)	1:1000 (WB*)	Dako Cytomation PO449
Anti-Maus (HRP-konjugiertes Kaninchen Ig)	1:1000 (WB*)	Dako Cytomation PO260
Anti-Ratte (PE-konjugiertes Esel Ig)	1:50 (FCM ⁺)	eBioscience
Anti-Kaninchen (Cy3-konjugiertes Ziege Ig)	1:50 (IF [§])	Dako Diagnostika
Anti-Ratte (FITC-konjugiertes Ziege IgG)	1:50 (IF [§])	Dako Diagnostika

* Western Blot, ⁺ Durchflusszytometrie (FCM), [§] Immunfluoreszenz (IF)

2.2 Verwendete Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und die jeweilige Bezugsquelle sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5. Zelllinien:

Bezeichnung	Beschreibung	Bezugsquelle
B16.G3.12.BM2	Besonders aggressive murine B16 Melanomzelllinie	Christopher W. Stackpole (New York Medical College, Valhalla, NY)
B16.G3.12II	Murine B16 Melanomzelllinie	Christopher W. Stackpole
B16.G3.26	Murine B16 Melanomzelllinie	Christopher W. Stackpole
B78D14	Murine B16 Melanomzelllinie	Ralph A. Reisfeld TSR, La Jolla
L929	Fibroblasten-Zelllinie	ATCC
NIH3T3	Fibroblasten-Zelllinie	ATCC
Fibroblasten	isoliert aus Mäuseohren	AG Dr. Eggert, Hautklinik Würzburg
HT1080	Humane Fibrosarkomazelllinie	Amercian Type Culture Collection (Rockville MD)

2.2.1 *Plasmide und Vektoren*

2.2.1.1 Vektor für die Subklonierung von PCR-Produkten

Für die Subklonierung von PCR-Produkten wurde der TA Cloning Kit pCRTM2.1 Vektor (Invitrogen, De Schelp, Niederlande) verwendet.

2.2.1.2 Vektoren für den siRNA *knock down* von CD147

Für den stabilen *knock down* von CD147 wurde der psiRNA-h7SK (3894 bp) Vektor (InvivoGen, Cayla SAS, Toulouse, Frankreich) mit den Sequenzen aus Tabelle 6 transfiziert.

Tabelle 6. siRNA Oligonukleotidsequenzen:

	Targetsequenzen
Scr (Negativkontrollsequenz)	GCATATGTGCGTACCTAGCAT
E1 (Emmprin)	GATGAGAGGTGGCAAGGTACT
E2 (Emmprin)	GACCTGCATACGAAGTACATA
E3 (Emmprin)	GCATCCTACCCTCCTATTACA
E4 (Emmprin)	GAACAGCAGTGGCGTTGACAT
E5 (Emmprin)	GGGCAGAAGCGAGATCAATGT
E6 (Emmprin)	GAGGCAATCACCAATAGCACT

2.3 Methoden

2.3.1 Zellkultur

2.3.1.1 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zahl lebender Zellen erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer und Trypanblau, welches sich in tote Zellen einlagert. Bei 10 x Vergrößerung wurden unter dem Mikroskop die ungefärbten Zellen in 2 x 16 Quadranten gezählt. Die Zellzahl pro ml ergibt sich aus:

$$\text{Anzahl der gezählten Zellen} \times \text{Verdünnung} \times \text{Kammerfaktor} (10^4)$$

2.3.1.2 Zellpropagation

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im CO₂-Brutschrank (HeraCell; Heraeus).

Alle verwendeten Zelllinien wurden in großen Zellkulturflaschen (175 cm²; Nunc) in 25 ml entsprechendem Medium kultiviert. Sobald der Zellrasen konfluent war, wurden die Zellen zweimal mit PBS (10 ml) gewaschen und mit 5 ml Trypsin-EDTA (0,05 %/0,02 % in PBS; PAN, Aidenbach) vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst, indem sie für 5 min in den Brutschrank gestellt wurden. Die Trypsinisierung wurde mit doppelter Menge CM abgestoppt. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 187 g (Rotanta/RP; Hettich) erfolgte die Aussaat mit einer Zellzahl von $\sim 2 \times 10^4/\text{cm}^2$ mit frischem Medium in neue Kulturflaschen. Zellen für die Induktion von Tumoren wurden nach dem Abstoppen der Trypsinierung mit CM mit PBS auf 50 ml verdünnt zentrifugiert (10 min bei 187 g), erneut mit PBS gewaschen und schließlich die gewünschte Zelldichte in PBS eingestellt.

2.3.1.3 Kokultur von B16-Melanomzellen und Fibroblasten

5×10^4 - 1×10^5 Fibroblasten wurden pro well einer 48-well-Platte ausgesät und mit jeweils 5×10^4 CD147⁺ (Scr) bzw. CD147⁻ (E6) Melanomzellen der 12BM2 oder B78D14 Sublinien

über Nacht mit serumhaltigem Medium kultiviert. Als Kontrolle wurden die jeweiligen Zellen einzeln kultiviert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, die Zellen mit PBS gewaschen und 80 µl serumfreies Medium zugegeben. Nach 30 Stunden wurden die serumfreien Überstände geerntet und im Gelatine-Zymogramm (siehe 2.8.1) untersucht. Als Positivkontrolle für MMP-2 und MMP-9 wurden Überstände der humanen Fibrosarkomazelllinie HT1080 verwendet.

2.3.2 *Tierexperimente, DC Vakzinierung und Zellisolationstechniken*

2.3.2.1 Induktion von Lungenmetastasen bzw. subkutanen Tumoren

Für die Induktion von Lungenmetastasen wurden jeweils 5×10^5 B78D14 Zellen (in 500 µl PBS) in die laterale Schwanzvene von C57BL/6J und CD28-defizienten Mäusen injiziert. Um zu verhindern, dass die injizierten Tumorzellen eine Lungenembolie hervorrufen, wurden die Mäuse durch Halothaninhalation (Hoechst-Roussel) anästhesiert und die Zellen über einen Zeitraum von mindestens zwei Minuten gespritzt. Die Induktion von subkutanen Tumoren erfolgte durch s.c. Injektion von 5×10^5 B78D14 Zellen, bzw. für die Experimente in CD28^{-/-} Mäusen 1×10^6 B78D14 (B78D14-E6 und B78D14-Scr) Zellen und 1×10^5 B16.G3.12.BM2 (12BM2-E6 und 12BM2-Scr) in die laterale Flanke von syngen C57BL/6J Mäusen.

2.3.2.2 Exzision subkutaner Tumore

Die subkutanen Tumore wurden von jeder Maus bei Erreichen eines Volumens von 500 µl entnommen. Für die Anästhesie der Mäuse wurde Ketanest (Pfizer Pharma GmbH, Freiburg) welches i.p. (15 µl/g Körpergewicht) appliziert wurde, verwendet. Sobald die Mäuse anästhesiert waren, wurden die subkutanen Tumore operativ entnommen. Die Wunde wurde anschließend mit 2-3 OP-Klammern, je nach Größe der Wunde verschlossen. Nach 6 Monaten wurden die Mäuse geopfert und zusätzlich die Lungen und inguinalen Lymphknoten entfernt.

2.3.2.3 Gewinnung von Dendritischen Zellen (DC) aus der Milz

Zur Herstellung von DC wurden Milzzellen von syngen C57BL/6J Mäusen in Petrischalen vorsichtig zerkleinert, die fragmentierten Milzen in ein 50 ml Polypropylengefäß überführt und 1 mg/ml Kollagenase III und 10 µg/ml DNase I (Worthington Biochemical Corporation, USA) in 1 % Mäuseserum haltigem DMEM Medium für 30 Minuten bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach 25 Minuten Inkubationszeit wurde 10 mM EDTA zu den Milzfragmenten zugegeben, durch einen Metallsieb gefiltert und die Zellsuspension in ein neues 50 ml Röhrchen überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit einem 70 µm Zellsieb (Falcon, BD Bioscience, Heidelberg) gefiltert, zweimal mit Medium (5 mM EDTA, 10 µg/ml DNase I, 1 % Mäuseserum) gewaschen und in 5 ml kaltem 14,1 % Nycodenz (Nycomed, Pharma Oslo, Oslo) resuspendiert. Nach dem Transfer in ein 15 ml Röhrchen wurde die Zellsuspension mit 2 ml isoosmotischem Puffer langsam überschichtet und 25 Minuten bei 600 x g zentrifugiert. Die Zellen mit geringerer Dichte wurden zweimal mit PBS gewaschen und für 2 Stunden in 1 % haltigem Medium in 6-well Platten ausplattiert. Die nicht-adhären T-Zellen wurden vorsichtig abgenommen und verworfen. Die adhären DC wurden über Nacht in 2 ml 1 % Mäuseserum haltigem DMEM Medium unter Zugabe von 200 U/ml rmGM-CSF (Strathmann Biotech, Hamburg) inkubiert.

2.3.2.4 Vakzinierungsprotokoll mit Dendritischen Zellen bzw. Peptid / IFA Gemisch

Die aus den Milzzellen gewonnenen DC wurden mit 25 µM TRP-2₁₈₀₋₁₈₈ (*Tyrosinase-related protein-2*, Sequenz: SVYDFVWL) 2-3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden CD28-defiziente bzw. C57BL/6J Mäuse zweimal im Abstand von 2 Wochen mit jeweils 1×10^5 Peptid-gepulsten DC intradermal (i.d.) immunisiert. Bei einigen Experimenten erfolgten drei Vakzinierungen mit einer 25 µg TRP-2 Peptid/IFA (Inkomplettes Freundesches Adjuvans) Emulsion im Abstand von einer Woche s.c. in den rechten Oberschenkel.

2.3.2.5 Gewinnung von PBL (periphere Blutlymphozyten) aus der Milz

Nach Entnahme der Milz wurde diese mit Hilfe des Mattrandes von autoklavierten Objektträgern (R. Langenbrinck, Teningen) zerrieben. Die Kapsel der Milz wurde verworfen, die Zellen in Hank's (PAA, Cölbe) aufgenommen und in ein 15 ml Röhrchen transferiert. Die Zellsuspension wurde für 10 Minuten bei 187 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und in insgesamt 5 ml Hank's aufgenommen. Anschließend wurden 2 ml Lympholyte M mit diesen Zellen überschichtet. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 747 g wurde die Interphase mit den Lymphozyten abgenommen und die Zellen in Hank's aufgenommen. Die Zellen wurden danach für 10 Minuten bei 187 g zentrifugiert, zweimal mit CM gewaschen und gezählt. Anschließend wurden sie in CM mit 1000 i.E. Proleukin/ml Medium in einer Konzentration von 1×10^6 /ml kultiviert.

2.3.3 *In situ*-Nachweismethoden

2.3.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Um einen schnellen Überblick über das Gewebe zu erhalten, wurden Paraffinschnitte mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Hämatoxylin färbt dabei die Kerne blau, Eosin das Zytoplasma rot. Hierzu wurden die Schnitte für 10 Minuten in Hämatoxylinlösung gestellt. Nach einer weiteren 10-minütigen Inkubation in H₂O wurden die Schnitte in *Aqua dest.* gespült und für 1 Minute mit 1 % Eosin Y (Sigma, Taufkirchen) gegengefärbt. Bevor die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe (70 % Ethanol, 96 % Ethanol, absolutes Ethanol und absolutes Xylol) durchliefen, wurden sie kurz in *Aqua dest.* gespült. Schließlich wurden die Schnitte in Hyper-Mount (Shandon) eingedeckt.

2.3.3.2 Immunhistologie

Von dem zu untersuchendem Material wurden mittels eines Kryostaten (Cryostat 1720 Digital; Leitz) Gefrierschnitte von 6 µm Dicke hergestellt. Diese wurden dreimal mit Serumfreiem DMEM gewaschen und für 10 Minuten in Aceton bei RT fixiert. Zur Inaktivierung der

endogenen Peroxidase wurden die Schnitte mit einem spezifischen Blocking Puffer (Dako, Hamburg) blockiert. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht mit dem gewünschten Primärantikörper in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Die folgenden Schritte wurden bei RT durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit einem HRP-markierten Sekundärantikörper, nachfolgend erneut mit PBS gewaschen und mit dem Nova Red Substrat-Kit als Chromogen für 15 Minuten entwickelt. Anschließend wurde die Farbreaktion mit *Aqua dest.* abgestoppt und die Zellkerne mit Hematoxylin (Dako, Hamburg) für 30-60 Sekunden gefärbt. Die Schnitte wurden erst mit Wasser, dann mit destilliertem Wasser gewaschen und schließlich mit Aquatex (Merck, Darmstadt) eingedeckt.

2.3.3.3 Immunfluoreszenzfärbungen

Die im Folgenden beschriebenen Färbungen bzw. Arbeitsschritte wurden aufgrund der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen im Dunkeln durchgeführt. Von dem zu untersuchenden Gewebe wurden 6 µm dicke Kryostatschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden über Nacht bei RT getrocknet, am nächsten Tag zuerst für 5 Minuten in Azeton fixiert und anschließend nochmals für 30 Minuten bei RT getrocknet. Die nachfolgende Inkubation mit dem Primärantikörper (MMP-9) erfolgte bei 4°C für 30 Minuten. Nach zweimaligem Waschen mit 1 % BSA/PBS erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Cy3-markierten Antikörper für 30 Minuten bei RT. Nach dem Färben von MMP-9 wurden die Schnitte für 30 Minuten mit einem F4/80 Antikörper (Makrophagenmarker) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte zweimal mit 1 % BSA/PBS gewaschen und mit dem sekundären FITC-markierten Antikörper für 30 Minuten bei RT inkubiert. Die Präparate wurden nach den Färbeschritten mit Vectashield (Vector) eingedeckt. Im Anschluss an die Färbung konnten die Präparate unter dem Konfokal-Mikroskop (TCS SP2, Leica, Mannheim, Deutschland) betrachtet und dokumentiert werden.

2.3.4 FACS-Analyse

Nach dem Waschen von $2-4 \times 10^5$ Zellen mit 150 μl 0,1 % BSA/PBS (Zentrifugation für 4 Minuten, 4°C, 625 g) wurden sie in 50 μl 0,1 % BSA/PBS aufgenommen. Folgende Färbeschritte wurden durchgeführt:

- 1 μl Primärantikörper, Inkubation 30 Minuten im Dunkeln auf Eis
- 1 μl PE-konjugierter Sekundärantikörper, Inkubation 20 Minuten im Dunkeln auf Eis

Nach jedem Färbeschritt wurden die Zellen zweimal mit je 150 μl 0,1 % BSA/PBS gewaschen. Zum Schluss wurden die Zellen in je 250 μl 0,1 % BSA/PBS aufgenommen und im FACSCanto Durchflußzytometer (Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert. Bei der Analyse wurde die Fluoreszenzintensität der Zellen gemessen, die im charakteristischen FSC/SSC Gate lagen. Die Analyse erfolgte mit der frei erhältlichen Software WinMDI.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Kultur von *E. coli*

2.4.1.1 Bakterienstämme

Für die Transformationsexperimente und zur Vermehrung von Plasmiden wurden die *E.coli* Bakterienstämme LyoComp GT116 (InvivoGen, San Diego, USA) und TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

2.4.2 Transformation kompetenter Bakterien

Die kompetenten tiefgefrorenen Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut, mit 1-5 ng ungeschnittenem Plasmid oder 5-10 μl des Ligationsansatzes versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42°C für 30 Sekunden. Dann wurde der Ansatz sofort für 2 Minuten auf Eis gekühlt, mit 250 μl vorgewärmtem SOC-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) versetzt und für 1 Stunde bei 37°C in einem Schüttler (225 rpm) inkubiert.

Anschließend wurden jeweils 2 μ l und 200 μ l des Aliquots der Transformationsansätze auf LB-Platten (LB-Medium) mit dem erforderlichen Selektionsmedium ausplattiert.

Für die Blau-Weiß-Selektion wurden auf den Platten außerdem 40 μ l X-Gal (40 mg/ml in Dimethylformamid) ausgestrichen.

2.4.2.1 Plasmid-DNA Isolierung

Von den Platten wurde mit einer Pipettenspitze ein Klon gepickt und mit diesem 5 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum angeimpft. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C im Schüttler wurden 2 ml zur Präparation der DNA verwendet und mit dem Qiafilter Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Die in 50 μ l TE (pH 8,0) eluierte DNA wurde durch Restriktionsverdau charakterisiert oder bei -20°C gelagert.

Für die Isolierung größerer DNA Mengen wurden 100 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum mit 10 μ l einer Übernachtskultur angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde dann mit dem Qiafilter Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) isoliert, in 200 μ l TE (pH 8,0) eluiert und bei -20°C gelagert. Die Ausbeute betrug im Allgemeinen 500-1500 ng/ μ l. Der DNA-Gehalt und die DNA-Reinheit wurden durch Messung der OD₂₆₀ bzw. OD₂₆₀/OD₂₈₀ bestimmt.

2.4.3 *Restriktionsverdau*

Restriktionsenzyme und die dazugehörigen Reaktionspuffer wurden von der Firma Fermentas (St.Leon-Rot) bezogen. Restriktionsspaltungen wurden bei 37°C für 2-6 Stunden durchgeführt. Die DNA-Konzentration im Ansatz überstieg nicht 0,5 μ g/ μ l. Das Enzym wurde in leichtem Überschuss (3-5 U/ μ g DNA) eingesetzt.

2.4.4 *Gelelektrophoretische Analyse von DNA*

Für die Agarose-Gelelektrophorese von DNA für analytische und präperative Zwecke wurden TAE (0,5 x)-Gele verwendet. Die Agarose wurde in TAE-Puffer (0,8 - 2 % (w/v) Agarose) in

der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlen der Lösung wurde 10 µl Ethidiumbromid zugesetzt und in den Gelschlitten gegossen. Nach Entfernen des Kamms und Überschichten des Gels mit dem Laufpuffer (0,5 x TAE-Puffer) wurden die Proben mit 1 x Loading-Dye versetzt und in die Taschen geladen. Zur Abschätzung der Größe wurde eine DNA-Leiter (Fermentas, St.Leon-Rot) verwendet. Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung wurde mit Hilfe eines Transilluminators (Anregungswellenlänge 234 nm) die DNA durch eingelagertes Ethidiumbromid visualisiert und die Gele zur Dokumentation mit dem Easy Image Systems, Herolab fotografiert

2.4.5 Gelelektrophoretische Analyse von DGGE Gelen

Zunächst wurden die Glasplatten gründlich mit 80 %igem Ethanol und anschließend PhotoFlo (Kodak; 1:600 mit Wasser verdünnt) gereinigt und zusammengebaut (Protean II xi System; Biorad). Die Reinigung mit PhotoFlo sorgt für einen relativ geraden Lauf der Proben und das bessere Ablösen des Gels vom Glas. Danach wurden in je einem Falkonröhrchen folgende Lösungen angesetzt und gemixt:

- 20 %iges Detergenz
10,5 ml 6 % Polyacrylamid, 0 % Denaturgenz (siehe Punkt 2.1.8)
3,5 ml 6 % Polyacrylamid, 80 % Denaturgenz (siehe Punkt 2.1.8)
50 µl 20 % APS w/v
6 µl TEMED
- 80 %iges Detergenz
14 ml 6 % Polyacrylamid, 80 % Denaturgenz
50 µl 20 % APS
6 µl TEMED

Mit Hilfe des Gradientenformers (Biorad, München) wurde ein Gradient eingestellt, der von 20 % Denaturgenz oben bis 80 % am Boden des Gels verläuft. Nach der Polymerisation des

Gels wurden die Taschen mit 1 x TAE ausgespült. Vor dem Beladen mit jeweils 10 µl PCR-Produkt wurden die Taschen nochmals mit 56°C warmen TAE Puffer ausgespült, um mögliche Harnstoffbarrieren zu entfernen. Die Elektrophorese (Power Pac 300; Biorad) wurde bei 160 V und 300 mA in 56°C warmem TAE Puffer (Decode System; Biorad) für 270 Minuten durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 10 Minuten in einer Wanne mit Ethidiumbromidlösung (200 µl Ethidiumbromid/l H₂O) gefärbt. Nach dem Waschen mit Wasser wurde das Gel auf einen UV-Transilluminator transferiert und das Ergebnis mittels des Easy Image Systems (Herolab, Wiesloch) dokumentiert.

2.4.6 *Klonierung von cDNA-Fragmenten*

2.4.6.1 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Eine Behandlung der DNA mit alkalischer Phosphatase verhindert die Eigenligation der Vektor-DNA durch Entfernung der terminalen 5'-Phosphatgruppe. Nach Restriktionsverdau von 2-5 µg Vektor-DNA wurde die Vektor-DNA in 40 µl Aqua dest gelöst und zu dem Reaktionsansatz 1 µl Phosphatase (1 U/µl; Fermentas, St.Leon-Rot) und 5 µl 10 x Phosphatase-Reaktionspuffer zugegeben. Die Aktivität der Phosphatase wurde durch Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 85°C für 15 Minuten gestoppt. Nach Versetzen der DNA mit 1 x Loading-Dye wurde die Vektor-DNA elektrophoretisch in Agarosegelen aufgetrennt (siehe Punkt 2.4.4) und anschließend aus dem Gel eluiert (siehe Punkt 2.4.6.2).

2.4.6.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten wurden diese nach Restriktionsverdau (siehe Punkt 2.4.3) in Agarosegelen aufgetrennt und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) aus dem Agarosegel isoliert. Dazu wurde unter UV-Licht (UV Transilluminator) die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, die DNA entsprechend der Herstellerangaben isoliert und in 30 µl Elutionspuffer (10 mM

Tris, pH 8,5) eluiert. Die isolierte DNA wurde entweder direkt für die Ligation eingesetzt oder bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.4.6.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligation von Vektor- und Insert-DNA erfolgte in 10 µl Reaktionsansätzen mit Hilfe der T4-DNA Ligase (1 U/µl; Fermentas, St.Leon-Rot). Das Verhältnis von Vektor zu Insert-DNA betrug 1:3, um intermolekulare Ligationen zu begünstigen. Insert- und dephosphorylierte Vektor-DNA in Aqua dest. wurden mit 1 µl T4-DNA Ligase (5 Weiss U/µl) und 1 µl des entsprechenden 10 x konzentrierten Ligationspuffers versetzt. Zur Ligation wurde der Ansatz 16 Stunden bei 14°C inkubiert. Die Vermehrung des Konstruktes erfolgte durch Transformation von Bakterien mit dem Ligrationsansatz (siehe Punkt 2.4.2).

2.4.7 *cDNA Synthese*

Die cDNA-Synthese erfolgte mit der Superscript II Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe), welche eine mutierte, klonierte MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transkriptase darstellt. Neben dem Enzym wird vom Hersteller auch 5 x First-Strand Buffer und 100 mM DTT bereitgestellt.

Für die cDNA Synthese wurde zuerst pro 10 µl cDNA folgender Mix auf Eis angesetzt:

- 1,9 µl H₂O
- 2,0 µl 5 x First-Strand Buffer
- 1,0 µl DTT (100mM)
- 0,5 µl dNTP (jede Base 10 mM) (Pharmacia, Freiburg)
- 0,5 µl Oligo(dT) Primer (10 pmol/µl) (Invitrogen, Karlsruhe)
- 0,5 µl Random Primer (20 pg/µl) (Invitrogen, Karlsruhe)
- 0,6 µl Superscript II (200 Units/µl) [als letztes]

Pro 10 µl cDNA wurden dann die 7 µl dieses Mixes mit 3 µl RNA der Probe in ein PCR Reaktionsgefäß gemischt. Für die Analysen wurden üblicherweise 50 µl cDNA angesetzt. Der Ansatz wurde in eine PCR-Maschine (GeneAmp 9700; Applied Biosystems) transferiert und durchlief folgende Inkubationsschritte: 30 Minuten bei 42°C, 30 Minuten bei 45°C, 2 Minuten bei 72°C und anschließend bei 4°C bis die cDNA aus der PCR-Maschine entnommen wurde. Die generierte cDNA wurde bei –20°C gelagert.

2.4.7.1 Real time PCR für VEGF

Die relative Expression von VEGF wurde mittels Taqman *real time* PCR und der vergleichenden $\Delta\Delta C_T$ Methode bestimmt. Für VEGF wurde ein TaqMan Gen Expression Kit (Mm00437304_m1) von Applied Biosystem (Darmstadt) verwendet. Als endogene Kontrolle diente das *housekeeping* Gen HPRT mit folgenden Primern und *Probe*, die mittels Primer Express 3 (Applied Biosystems) entworfen wurden: 5'-GGG AAA GCA AAG TTT GCA TTGT-3' (Fw-Primer), 5'-AGT TAT TGG TGG AGA TGA TCT CTC AAC-3' (Rv-Primer) und VIC-5'-CAA TTA TAT CTT CAA CAA TCA AG-3'-BHQ1 (Probe) (Applied Biosystem, Darmstadt). Die relative Expression von VEGF zu NIH3T3 Zellen, normalisiert zu HPRT, wurde mit $2^{-\Delta\Delta C_T}$ berechnet, wobei $\Delta\Delta C_T = (C_{T \text{ VEGF, Probe}} - C_{T \text{ HPRT, Probe}}) - (C_{T \text{ VEGF, NIH3T3}} - C_{T \text{ HPRT, NIH3T3}})$. Dabei ist C_T als der Zyklus definiert, bei dem der Schwellenwert an Fluoreszenz überschritten wird.

Für die PCR wurde in Triplikaten für jede Probe durchgeführt und pro Reaktion wurde folgender Ansatz pipettiert:

- 5 μ l 2 x Taqman Universal PCR Mastermix (Eurogentech, Köln)
- 0,6 μ l 5 μ M Forward Primer (Endkonzentration: 300 nM)
- 0,6 μ l 5 μ M Reverse Primer (Endkonzentration: 300 nM)
- 0,2 μ l Probe HPRT (Endkonzentration: 100 nM)
- 0,5 μ l 20 x VEGF Gene Expression Kit (enthält die Primer und die Probe)
- 2,1 μ l H₂O
- 1 μ l cDNA

Die Amplifikationen erfolgten im GeneAmp SDS 7500 (Applied Biosystems) mit dem Standardprogramm:

95°C 10'	} hold	
95°C 15"	} 40 Zyklen	
60°C 60"	}	

2.4.7.2 TCR Repertoire Analyse

Die TCR Repertoire Analyse dient der Klonalitätsbestimmung von T-Zellen innerhalb einer Probe. Damit lässt sich bestimmen, ob innerhalb einer TCR BV-Familie die T-Zellen polyklonal sind oder ob eventuell klonal expandierte T Zellen präsent sind. Die β -Ketten der murinen T-Zellen lassen sich in 18 Familien unterteilen, wobei nur 16 klonotypisch kartiert wurden, da die Familien 17 und 18 stark unterrepräsentiert sind. Die angewandte Methode basiert auf einer Amplifikation der TCR β -Ketten und Auftrennung dieser Amplifikate aufgrund ihrer Schmelzeigenschaften im denaturierenden Gel (siehe 2.4.5). Sowohl für Voramplifikationen als auch für die eigentlichen Amplifikationen der einzelnen TCR BV-Ketten-Familien wurde jeweils ein Mastermix in einem Eppendorf Reaktionsgefäß hergestellt. Für die TCR Repertoire Analysen wurde folgender Mastermix angesetzt. Die Primer (Invitrogen, Karlsruhe) sind in Tabelle 2 angegeben, der Puffer und das Dye unter Punkt 2.1.8 beschrieben:

13 μl H₂O

1 μl Primer BV (5 pmol/ μl)

1 μl Primer MBC4 (für Voramplifikation) bzw. MBC-GC (für DGGE PCR) (5 pmol/ μl)

6 μl 5 x Dye

3 μl 10 x PCR Puffer

Vor der „eigentlichen“ DGGE PCR, dessen Amplifikate auf dem denaturierenden Gel aufgetragen wurden, erfolgte wegen dem geringen Ausgangsmaterial eine Voramplifikation. Bei der Voramplifikation handelte es sich um eine semi-nested PCR, da die BV Primer die gleichen für Voramplifikation und „eigentliche“ DGGE PCR sind und nur anstelle des MBC-GC Primers der MBC4 Primer verwendet wurde. Die Zugabe der Dye-Lösung erhöht die Effizienz der PCR und ermöglicht das direkte Auftragen des PCR Produkts in ein Gel. Zu 24 μl Mastermix wurde auf Eis jeweils 1 μl cDNA bzw. Voramplifikat und anschließend 5 μl Hot Start Mix (4,6 μl H₂O; 0,15 μl dNTP [jede Base 10 mM] und 0,25 μl AmpliTaq DNA Polymerase [5 U/ μl ; Applied Biosystems]) pipettiert. Die Proben wurden nachfolgend direkt vom Eis in die PCR-Maschine (GeneAmp 9700; Applied Biosystems) bei 94°C gestellt. Das thermale Profil gestaltete sich folgendermaßen:

94°C 60"	}	ein Zyklus
60°C 30"		
72°C 40"		
94°C 30"	}	33-43 Zyklen
60°C 30"		
72°C 40"		
4°C ∞ " hold		

Für die Voramplifikation wurden insgesamt 20-25 Zyklen amplifiziert, für die „eigentliche“ DGGE-PCR 35-43 Zyklen. Nach der PCR wurden die Produkte im Agarosegel kontrolliert, ob sie nicht unter- oder überamplifiziert waren, d.h. ob sie sich im Gel als einzelne Bande

darstellten. War dies der Fall, wurden jeweils 10 µl des Produkts auf ein DGGE-Gel aufgetragen (siehe 2.4.5).

2.4.8 Funktionelle Assays

2.4.8.1 Zytotoxizitäts-Assay

Um die Lyse von Zielzellen durch zytotoxische T-Lymphozyten nachzuweisen, wurde der Mikrozytotoxizitäts-Assay eingesetzt [Bröcker et al., 1977]. Dabei werden 2×10^2 adhärenente B78D14 Zellen (Zielzellen) / well in 10 µl auf eine Terasaki-Platte (Nunc, Wiesbaden) ausgesät und für 3-4 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Platten mit CM Medium aufgefüllt (6-8 ml) und die Zellen über Nacht bei 37°C im Brutschrank wachsen gelassen. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abgeschüttet und die Effektorzellen in unterschiedlichen Ratios (100:1, 30:1, 10:1, 3:1) zu den Targetzellen in einem Volumen von 10 µl/ well zugegeben. Bei der Negativkontrolle erfolgt keine Zugabe der Effektorzellen zu den Targetzellen. Nach einer 24 stündigen Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurde das Medium (10 µl/ well) vorsichtig abgenommen und die Platten zweimal mit PBS gewaschen, um die Effektorzellen vollständig zu entfernen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Targetzellen mit eiskaltem Methanol für 5 Minuten. Nach Abnahme des Methanols wurden die Platten 5 Minuten bei RT trocknen gelassen, bis das Methanol vollständig verdampft war. Im Anschluss werden die Zellen mit einer 1:100 verdünnten Giemsa-Lösung (Merck, Darmstadt) für 20-30 Minuten gefärbt. Nach Entfernen der Färbelösung werden die Platten vorsichtig mit Leitungswasser abgespült und bei RT im Dunklen trocknen gelassen. Alle gefärbten Zellen werden mikroskopisch ausgezählt und der prozentuale Anteil der lysierten Zellen bestimmt.

2.4.8.2 ELISPOT

Im ELISPOT Assay wird die Fähigkeit von T-Zellen gemessen, auf ein bestimmtes Antigen mit der Ausschüttung von Zytokinen, meistens Interferon (IFN)- γ , zu reagieren. Dazu wurden

zuerst 96 well-Filterplatten (MultiScreen-IP; Millipore) mit einem murinen anti-IFN γ -Antikörper (Becton Dickinson, Heidelberg; mit PBS auf 6 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt) beschichtet [0,45 $\mu\text{g/well}$] und über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Platten mit 6 x 200 μl PBS gewaschen und mit 200 μl CM für 2 Stunden bei 37°C inkubiert um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. In der Zwischenzeit wurden die zu untersuchenden Zellen verdünnt, so dass die gewünschten Zellzahlen (5×10^5 , 2×10^5 und 1×10^5 pro well) in 200 μl Medium vorlagen. Nach Abkippen des *Blocking*-Mediums wurden 200 μl der jeweiligen Zellkonzentrationen zusammen mit 5 μM TRP-2₁₈₀₋₁₈₈ über Nacht inkubiert. In der Negativkontrolle wurde kein Peptid zugegeben. Nach über Nacht Inkubation im Brutschrank, wurde jedes well sechsmal mit 200 μl Waschpuffer (PBS mit 0,05 % Tween-20) gewaschen. Es folgte eine 2-stündige Inkubation mit jeweils 56,3 ng des zweiten Antikörpers, einen biotinylierten anti-Maus IFN- γ -Antikörper (Becton Dickinson, Heidelberg), bei RT. Nach erneutem Waschen mit Waschpuffer (6 x 200 μl) wurden 75 μl Streptavidin-ALP (Calbiochem; 1:1000 mit Verdünnungspuffer verdünnt) zu jedem well zugegeben und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Platte sechsmal mit 200 μl Waschpuffer und einmal mit 200 μl Substrat-Puffer gewaschen. Die Farbentwicklung erfolgte nach Zugabe von 75 μl frisch angesetztem Substrat. Das BCIP/NBT Substrat (Mabtech, Hamburg) wurde vor Zugabe auf die wells 1:5 mit dem Substratpuffer verdünnt. Die Farbreaktion wurde bei entsprechender Färbung mit Leitungswasser abgestoppt.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Transfektion von Zellen

Für die Transfektionen verschiedener Zelllinien mit Plasmid-DNA wurde LipofectamineTM 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Das Transfektions-Reagenz gehört zur Gruppe der kationischen Liposom-Reagenzien, die im Komplex mit DNA an die negativ geladenen

Oberflächenstrukturen der Zellen binden. Anschließend erfolgt die endosomale Aufnahme der DNA in die Zelle.

2.5.1.1 Transfektion mittels LipofectamineTM2000

Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in einer Dichte von 50-60 % in T25-Zellkulturflaschen ausplattiert. Zur Durchführung der Transfektion wurden 8 µg Plasmid-DNA in einem Ansatz und in einem anderen Ansatz 20 µl LipofectaminTM2000-Transfektionsreagenz zu 500 µl serumfreiem Medium gegeben. Die Ansätze wurden 5 Minuten bei RT inkubiert und dann vermischt. Die so erhaltene Lösung wurde weitere 20 Minuten bei RT inkubiert und zu den Zellen gegeben. Nach 5 Stunden wurde das Medium gewechselt und durch Antibiotikum-enhaltendes Medium ausgetauscht. Nach weiteren 48 bis 72 Stunden wurden die Zellen schließlich geerntet und die Transfektionseffizienz analysiert.

2.5.2 *Herstellung stabiler Zelllinien*

Die Zellen wurden wie unter 2.5.1 beschrieben mit Plasmid-DNA transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen durch Trypsin abgelöst und in T75 Kulturflaschen ausgesät. 42-48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit G418 (Calbiochem, Schwalbach/Ts), Puromycin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) oder Zeozin (InvivoGen, San Diego, USA) selektioniert. (Zeozin: 50 µg/ml 12BM2 und 200 µg/ml B78D14; Puromycin: 6 µg/ml; G418: 500 mg/ml). Für die Gewinnung von stabilen Zelllinien wurden die Zelllinien für etwa sieben Wochen nach Beginn der Selektion unter erhöhter Zugabe der Selektionsreagenzien weiter expandiert. Die Expression des Zielproteins in den Zelllinien wurde mittels Western Blot und FCM untersucht.

2.6 **RNAi-Technologie**

Zur Untersuchung der Genfunktion in Eukaryoten hat sich die RNA-Interferenz (RNAi) zu einer wirkungsvollen Technologie entwickelt. Bei der RNAi handelt es sich um einen posttranskriptionalen Prozess, der durch die Einführung von *small interfering RNA* (siRNA)

ausgelöst wird und zum sequenzspezifischen Ausschalten von Genen („Gen-Silencing“) führt. siRNAs bestehen aus 19-21 mer doppelsträngiger RNA mit 3`Überhängen (2 Nukleotide) oder einem 43-51 mer RNA Molekül mit einer Hairpin-Struktur, die auch als kurze hairpin RNA (shRNA) bezeichnet wird. Diese Struktur ist homolog zu einer Region innerhalb des Zielgens [Elbashir et al., 2001;Tiscornia et al., 2003]. Die Einführung von siRNAs in Säugetierzellen induziert eine starke und spezifische Suppression des jeweiligen Zielgens. Da dieser Effekt jedoch aufgrund der kurzen Überlebenszeit synthetischer RNAs transient ist, wurde ein Vektor (psiRNA) verwendet, durch den die Produktion von siRNAs innerhalb von Zellen stabil möglich ist.

2.6.1 Herstellung von siRNA-Expressionsvektoren

Für die Herstellung der siRNA-Expressionsvektoren wurde der Vektor psiRNA-h7SKGFPzeo (Invivogen, San Diego, USA) verwendet. Die im psiRNA - Vektor enthaltene siRNA-Expressionskassette besteht aus einem 7SK Promotor, gefolgt von der genspezifischen siRNA-Sequenz, diese kann über die Restriktionsschnittstellen Bbs I oder Acc 65I/Hind III in den Vektor eingesetzt werden. Die genspezifische siRNA-Sequenz kodiert für 2 komplementäre 21 Nukleotide-lange Sequenzen, die homolog zur Zielsequenz sind und von einer kurzen Spacer-Region (5-9 Nukleotide) getrennt werden. Das Terminationssignal besteht aus 4 oder mehr aufeinander folgenden Thymidin-Nukleotiden. Das entstehende Transkript faltet sich auf sich selbst zurück, dadurch bildet sich eine kurze Haarnadelstruktur-RNA (short hairpin RNA = shRNA). Als Selektionsmarker für eukaryontische Zellen enthält der Vektor das Gen für die Zeozinresistenz.

2.6.1.1.1 Herstellung der doppelsträngigen Oligonukleotide zur Klonierung in den psiRNA-h7SKGFPzeo Vektor

Die Herstellung der CD147-spezifischen doppelsträngigen Oligonukleotide erfolgte durch das *Annealing* zweier 56 Bp langer Oligonukleotide. Die Auswahl der hierfür geeigneten CD147

spezifischen siRNA-Sequenzen wurde mittels des siRNA Wizard Programms (www.siRNA-wizard.com) ausgewählt (siehe Punkt 2.2.1.2, Tabelle 6). Zum *Annealing* der siRNA Oligonukleotide wurden jeweils 2 µl des *forward*- und des *reverse*-Primers (25 µM) zu 24 µl 0,5 M NaCl gegeben und mit Aqua dest. auf 100 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 2 Minuten bei 80°C im Heizblock inkubiert und auf 35°C abgekühlt.

Für die Ligation wurden 4 µl (100 ng) des mit den Restriktionsenzymen Bbs I linearisierten Plasmids psiRNA-h7SKGFPzeo (Invivogen, San Diego, USA) und 1 µl der doppelsträngigen siRNA Oligonukleotide eingesetzt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Die Ligation und die Vermehrung des Plasmids wurden wie unter den Punkten 2.4.6.3 und 2.4.2 beschrieben durchgeführt. Das so hergestellte Plasmid wurde zur stabilen Transfektion von Zelllinien verwendet.

2.7 Proteinbiochemische Analysen

2.7.1 Herstellung von Zelllysaten

Kultivierte Zellen wurden auf Eis zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 2 x Laemmli-Puffer versetzt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Kulturplatte geschabt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Lysat wurde für 5 Minuten aufgekocht und anschließend bei -20°C gelagert.

2.7.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentration in Lysaten wurde nach der Methode von Bradford ermittelt. Zur Erstellung einer Eichkurve wurden 2 - 20 µl in zweier Schritten einer BSA-Stammlösung (0,2 µg/µl) in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Von den zu bestimmenden Proben wurden jeweils 1 µl von einer 1:5, 1:10 oder 1:20 Verdünnung eingesetzt. Nach Zugabe von 150 µl Bradford-Reagenz erfolgte innerhalb von 15 Minuten die Messung der Absorption im Photometer (Eppendorf Bio Photometer).

2.7.3 Western Blot

Die Zellysate wurden auf ein *precastet* Polyacrylamidgel (Pierce) aufgetragen und in einer SDS-PAGE Kammer (BioRad, München) aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 125 V für ca. 90 Minuten durchgeführt.

Für die Coomassiefärbung wurden die Polyacrylamidgele 5 Minuten in 10 ml Färbelösung auf dem Schüttler bei RT gefärbt. Durch die Coomassiefärbung konnte die Proteinmenge auf dem Blot detektiert und dokumentiert werden. Anschließend wurden die Gele mehrmals mit 0,05 % Tween20/ PBS gewaschen, bis die Gele wieder farblos waren.

Die Proteine wurden durch Elektroblob in einer Bio-Rad Mini Protean II Apparatur aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham, Freiburg) überführt. Der Transfer fand bei 400 mA für 45 min unter Kühlung des Transferpuffers in einer Tank Blot Apparatur (BioRad, München) statt. Die Membran wurde für 1 Stunde bei RT in Blockierlösung und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem in Blockierlösung verdünnten Primärantikörper inkubiert. Nach dreimal 10-minütigem Waschen der Membran in 0,05 % Tween20 /PBS bei RT wurde diese mit dem entsprechenden Spezies-spezifischen, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper für 1 Stunde in 5 % Milchpulverlösung/0,05 % Tween20/PBS bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen der Membran erfolgte die Detektion der Chemilumineszenz unter Verwendung des BM Chemilumineszenz Blotting Substrats (POD) (Roche, Mannheim) durch Auflegen eines Films.

Für ein *Re-Probing* der Membran mit einem weiteren Antikörper wurden die bereits gebundenen Antikörper von der Membran durch *Stripping* entfernt. Dazu wurde die Membran für 30 Minuten bei 56°C in *Strip*-Puffer inkubiert. Nach dreimal 10-minütigem Waschen und einstündiger Blockierung der Membran wurde mit dem Western Blot Protokoll wie oben beschrieben fortgefahren.

2.7.4 Immunpräzipitation

Für Immunpräzipitationen wurden die Zellen bei 4°C in RIPA Puffer (+ Proteaseinhibitoren) resuspendiert und für 30 Minuten auf einem Drehinkubator lysiert. Anschließend wurden die Zelllysate für 1 Stunde bei 4°C mit äquilibrierten Protein G Agarose Beads (Boehringer, Mannheim) auf dem Drehinkubator inkubiert, um Proteine zu entfernen, die unspezifisch an die Beads binden. Nach Abzentrifugation der Beads wurden die gewonnenen Überstände zunächst 1 Stunde bei 4°C mit dem monoklonalen CD147 Antikörper (eBioscience, San Diego, USA; Klon RL73) inkubiert. Nachfolgend wurden 25 µl Protein G Agarose Beads zugegeben und die Proben über Nacht auf dem Drehinkubator bei 4°C durchmischt. Nach 4 Waschschritten mit RIPA-Puffer wurde das gebundene CD147 Protein von den Agarose Beads gelöst, indem die Überstände in Lämmli-Puffer 5 min bei 95°C gekocht wurden. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.8 Nachweis der gelatinolytischen Aktivität von Proteinen

2.8.1 Gelatinzymographie

Die Gelatinzymographie ist ein funktioneller Assay, mit dem eine Aktivitäts- und Größenbestimmung von Gelatine-verdauenden Proteasen möglich ist. Hierfür wird zu einem SDS-PAGE-Gel vor der Polymerisation 1 mg/ml Gelatine (Sigma-Aldrich, Steinheim) hinzugefügt wurde. Die Gelatine dient als Substrat für die in den Proben vorhandenen Proteasen, die Gelatine spezifisch verdauen. Durch den Vorgang der Elektrophorese liegen die Proteine der Größe nach aufgetrennt vor. Bei der Zymographie werden nur denaturierende, nicht-reduzierende Zusätze verwendet (ohne β -Mercaptoethanol): Dadurch ist eine Renaturierung der Matrixmetalloproteinasen, nach Entfernen des SDS in anschließenden Waschschritten (3 x 10 min Waschpuffer 1; 3 x 10 min Waschpuffer 2) möglich. Der Gelatineverdau findet während eines anschließenden Inkubationsschrittes in einem Waschpuffer 2 statt. Durch eine Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blue (Bio-Rad,

München) können die Zonen gelatinolytischer Aktivität nachgewiesen werden, die sich als ungefärbte Banden in dem blauen Gel abheben. Der Vergleich mit einem Größenmarker erlaubt die Zuordnung der Banden zu bekannten MMPs. Zum Nachweis der Gelatinaseaktivität von MMP-2 und MMP-9 in Zellkulturüberständen wurden Zymogramme mit gelatinehaltigen 7,5 % igen SDS-PAGE durchgeführt. Von Bedeutung ist, dass unter Bedingungen des Zymogramms auch die unter physiologischen Bedingungen inaktiven Proformen von MMP-2 und MMP-9 Gelatinaseaktivität zeigen. Da diese Proformen durch proteolytische Abspaltung von autoregulatorischen Domänen aktiviert werden, unterscheiden sie sich von den aktiven MMPs hinsichtlich ihrer Größe. Somit kann im Zymogramm sowohl die Expression als auch der Aktivitätszustand der MMPs erfasst werden.

Für 10 ml gelatinehaltiges Trenngel wurden 1 mg Gelatine (#G8150, Sigma-Aldrich, Steinheim) in 1 ml Aqua dest bei 55°C 10 min auf dem Heizblock gelöst. Nach Abkühlen auf RT wurden für ein 7,5 % iges Gel 2,5 ml einer 30 % igen Acrylamid/Bisacrylamidlösung, 2,5 ml einer 1,5 M Tris-HCl-Lösung (pH 8,8), 100 µl einer 10 % SDS-Lösung, 50 µl einer 10 %-Amoniumpersulfat-Lösung und 5 µl TEMED zugesetzt und mit Aqua dest auf 10 ml aufgefüllt. Das Trenngel wurde mit einem gelatine-enhaltenem Sammelgel überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation der Gele wurden der Kamm entfernt, die Gelapparatur zusammengesetzt und die Pufferreservoirs mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Anschließend wurden 20-25 µl Probe pro Spur geladen, wobei die Proben in einem Verhältnis von 4:1 mit Loadingpuffer (4 x konzentriert) versetzt waren. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 V bei 20°C. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde durch jeweils dreimal 10 minütiges Waschen unter leichter Bewegung auf dem Schüttler mit Waschpuffer 1 das denaturierende SDS entfernt und die katalytisch wirksame Tertiärstruktur der Proteasen wiederhergestellt. Die Gele wurden anschließend dreimal 10 min mit Waschpuffer 2 gewaschen und über Nacht bei 37°C unter leichter Bewegung auf dem Schüttler in Waschpuffer 2 (pH 7,8) inkubiert. Die Färbung der Gele erfolgte mittels

Coomassie Blue R250 (Bio-Rad, München). Nach Inkubation der Gele in Entfärberlösung (40 % Methanol; 10 % Essigsäure (JT Baker, Deventer, Holland)) stellen sich die lytischen Banden der latenten und aktivierten MMP-2 und MMP-9 als weiße Banden gegen den blauen Hintergrund dar. Zum Photographieren wurden die Gele in Klarsichtfolie gelegt und die Gele mittels Digitalkamera dokumentiert.

2.9 Glykoprotein-Analysen

2.9.1 Inhibierung der N-Glykosylierung durch Tunikamycin

Tunikamycin blockiert die Anheftung von N-Acetylglucosamin an Dolicholphosphat, und inhibiert somit den ersten Schritt der N-Glykosylierung. Aufgrund dieser Eigenschaft wird Tunikamycin zur Analyse der N-Glykosylierung von Proteinen eingesetzt. Die zu untersuchenden Zellen wurden in 6-well-Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von 30 % im entsprechenden Medium kultiviert. Für die Tunikamycinbehandlung wurde das Medium gegen 2 ml Medium, das 4 µg/ml bzw. 8 µg/ml Tunikamycin (Stammlösung 1mg/ml Tunikamycin in DMSO) enthielt, ausgetauscht und die Zellen für 24 Stunden im Brutschrank kultiviert. Als Kontrolle wurden Zellen nur mit entsprechender DMSO Konzentration kultiviert. In den behandelten Zellen wurde mittels Western Blot die Veränderung der Glykosylierung des Zielproteins untersucht.

2.9.2 Glykosidasebehandlung von Protein

Jede Glykosidase erkennt und hydrolysiert spezifische glykosidische Bindungen. Auf Grund ihrer Selektivität werden Glykosidasen auch zur Aufklärung von Kohlenhydratstrukturen an Glykoprotein eingesetzt.

2.9.2.1 Behandlung mit PNGase F

Für den N-Glykosidase-Verdau wurden die Zelllysate entsprechend der Angaben des Herstellers mit PNGase F (New England Biolabs, Beverl, MA, USA) behandelt. Als

Negativkontrolle fungierte 0,5 M Tris-HCl (pH 8,6). Die Ansätze wurden 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde zu den Proben 20 µl Loadingpuffer zugegeben und im Western Blot analysiert.

3 ERGEBNISSE

3.1 Analyse der Expression von CD147 in murinen B16 Melanomzelllinien

Um im murinen B16 Melanommodell den Einfluss von MMPs auf verschiedene Aspekte der Tumorprogression und insbesondere die Interaktion des Tumors mit Zellen des Immunsystems zu untersuchen, sollte die MMP Expression im Tumor moduliert werden. CD147/Emmprin ist ein Molekül, das in vielen Tumorzellen exprimiert wird und welches als der wesentliche Induzierer von MMP in Tumorstromazellen gilt. In einem ersten Experiment haben wir daher die CD147 Expression in vier verschiedenen B16 Sublinien untersucht. Sowohl durchflusszytometrische Messungen als auch Western Blots zeigten, dass CD147 in allen vier Zelllinien exprimiert wird (Abbildung 4A und B). Für den durchflusszytometrischen Nachweis von CD147 wurde ein anti-CD147 Antikörper verwendet, der die N-terminale Domäne des murinen CD147 Peptids erkennt. Die CD147 Expressionen waren in den vier Melomzelllinien annähernd gleich.

Da bekannt ist, dass unterschiedliche Glykosylierungsmuster von CD147 existieren, die sich hinsichtlich ihres Molekulargewichts unterscheiden [Biswas et al., 1995], wurde im Western Blot ein anti-CD147 Antikörper verwendet, der die C-terminale Domäne erkennt. Wie in Abbildung 5B dargestellt, fanden sich in den Zelllinien B78D14 und 12BM2 zwei Banden, entsprechend den Molekulargewichten von 56 und 36 kDa. Hierbei stellt die 56 kDa Bande glykosyliertes und die 36 kDa Bande die unglykosylierte Form von CD147 dar. Überraschenderweise fand sich in den Zelllinien B16G3.26 und B16G312II kein unglykosyliertes CD147.

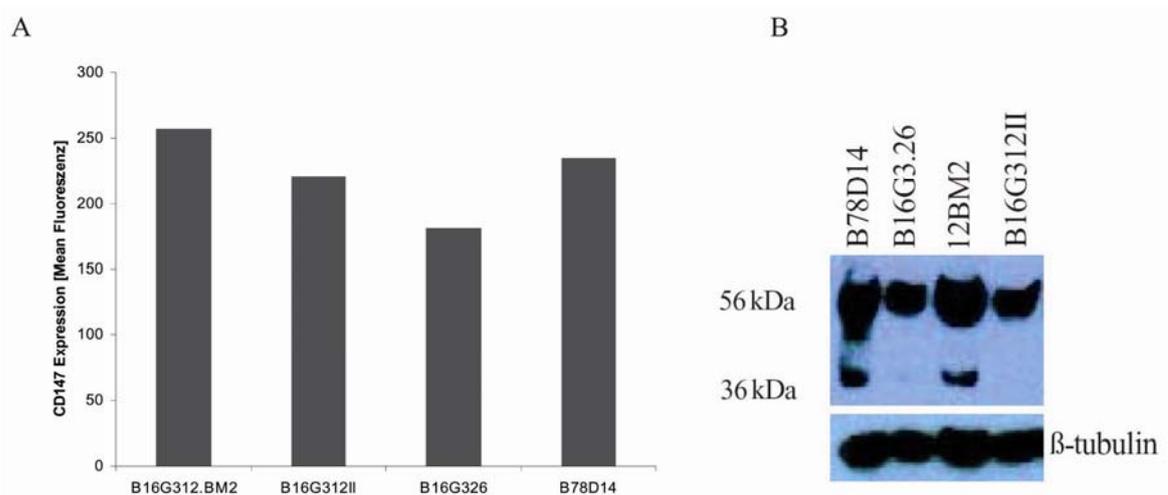


Abbildung 4. Analyse der CD147 Expression in murinen B16 Melanomzelllinien. (A) Bei vier verschiedenen murinen B16 Melanomzelllinien (B16G312.BM2, B16G312II, B16G326, B78D14) wurde die Expression von CD147 mittels FCM nachgewiesen. Um bei der Analyse tote von lebenden Zellen zu unterscheiden, wurden die Zellen vor der Analyse zusätzlich mit 7AAD gefärbt. **(B)** Für die CD147 Western Blot Analyse wurden Zelllysate von jeweils 5×10^5 Zellen der vier B16 Melanomzelllinien hergestellt.

3.1.1 Sequenzierung von CD147

Bevor *knock down* Studien von CD147 in dem murinen B16 Melanommodell begonnen wurden, wurde das auf den verwendeten Melanomzelllinien exprimierte CD147 Protein sequenziert. Für die Sequenzierung wurde eine cDNA von CD147, die von mRNA der B78D14 Zellen abstammt, verwendet. Es bestätigte sich eine 100 %ige Übereinstimmung mit der publizierten mRNA Sequenz (Zugangsnummer: NM 009768).

3.2 siRNA-vermittelte Inhibition der CD147 Expression

Mit dem Ziel, die Tumor-vermittelte Induktion von MMPs in Stromazellen zu modulieren, sollte die Expression von CD147 durch stabile Transfektion CD147-spezifischer siRNA Expressionskonstrukte inhibiert werden. Hierzu wurden die Melanomzelllinien B16G312.BM2 (12BM2) und B78D14 eingesetzt. Diese zwei Zelllinien wurden ausgewählt, da sie sich hinsichtlich ihres Wachstums *in vivo* stark unterscheiden. Die B78D14 Melanomzelllinie zeichnet sich *in vivo* durch ein langsames Wachstum aus, was die Ausbildung eines gut definierten Tumorstromas ermöglicht [Hofmann et al., 2005a].

Im Gegensatz dazu wachsen experimentelle Tumore, die durch die 12BM2 Zelllinie induziert werden, sehr schnell und bilden nur ein begrenztes Tumorstroma aus [Stackpole et al., 1991]. Darüber hinaus weist 12BM2 im Gegensatz zu der B78D14 Zelllinie eine spontane Metastasierung auf.

3.2.1 Validierung einer geeigneten CD147-spezifischen siRNA

Mit Hilfe des siRNA Wizardprogramms (www.siRNA-wizard.com) wurden sechs CD147 spezifische siRNA Targetsequenzen ausgewählt und die synthetisch hergestellten Oligonukleotide sowie ein scrambled (Scr) Oligonukleotid, welches keine Entsprechung mit Säugetier RNA aufweist, in den psiRNA-h7SKGFPzeo Vektor kloniert. Nach Transfektion und Selektion stabiler Transfektanten erfolgte die Kontrolle der CD147 Expression durchflusszytometrisch. Von den sechs siRNA Konstrukten zeigte sich der beste *knock down* von CD147 für das Konstrukt E6 (Abbildung 5 und Tabelle 6 Material und Methoden 2.2.1.2). Bei den übrigen Konstrukten war nur ein geringer bzw. kein *knock down* zu beobachten. Als Kontrolle dienten B78D14 Zellen, die entweder mit dem Leervektor oder mit dem Scr Konstrukt transfiziert wurden.

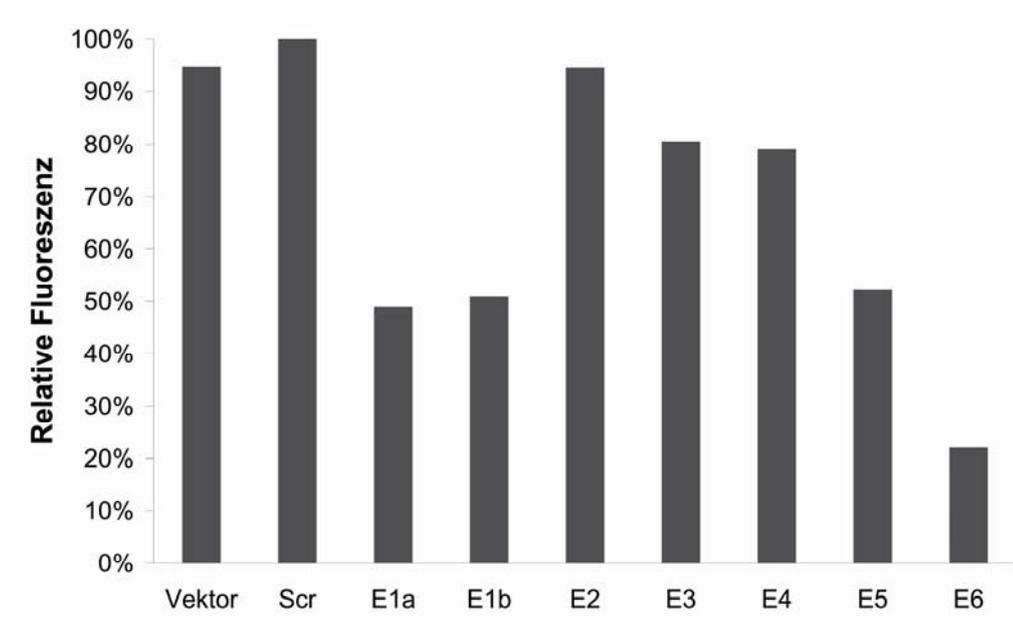


Abbildung 5. Untersuchung der verschiedenen Targetsequenzen für den CD147 knock down in B16 Melanomzelllinien durch stabile Transfektion mit siRNA Vektoren. Die B16 Subzelllinie B78D14 wurde mit Derivaten des Vektors psiRNA-h7SKGFPzeo transfiziert, die sechs verschiedene gegen CD147 gerichtete siRNA Sequenzen enthielten (E1-E6). Nach Selektion mit Zeozin, wurde die CD147 Expression mittels FCM analysiert. Es ist die relative, durchschnittliche Fluoreszenzintensität dargestellt. Als Kontrolle dienten B78D14 Zellen, die entweder mit dem leeren Vektor oder mit einem Vektor transfiziert wurden, der die scrambled (Scr) Targetsequenz enthält. Die Zelllinie mit der Bezeichnung B78D14 E1 wurde zweimal generiert (E1a und E1b).

3.2.1.1 Nachweis des CD147 knock downs mittels FCM und Western Blot

Im Weiteren wurde die Effizienz des CD147 knock downs in den stabil mit E6 und Scr Vektoren transfizierten 12BM2 und B78D14 Zelllinien durchflusszytometrisch untersucht. Bei beiden Zelllinien konnte eine deutliche Reduktion der Fluoreszenz beobachtet werden; diese lag bei der B78D14 bei 77 % (Abbildung 6A) und bei 12BM2 bei 88 % (Abbildung 6B).

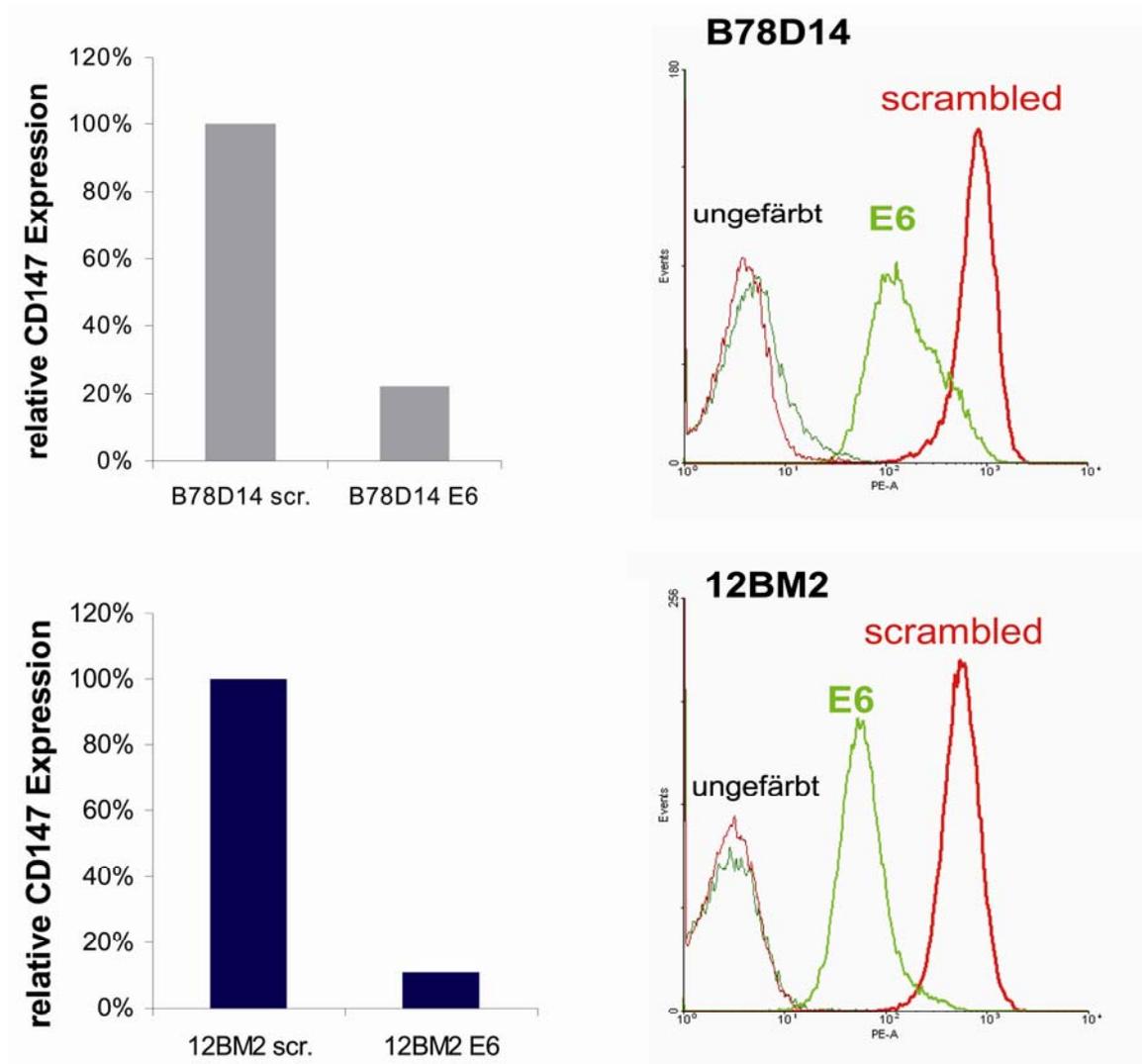


Abbildung 6. Analyse der CD147 Expression nach Transfektion von B78D14 und 12BM2 Zellen mit dem h7SKGFPzeo-E6 Konstrukt durch FCM. Zum Nachweis der Effizienz des CD147 *knock downs* wurden die transfizierten B78D14-E6 und 12BM2-E6 Zellen mit einem anti-CD147 Antikörper (eBioscience) gefärbt.

Zur weiteren Charakterisierung des *knock downs* wurden Western Blot Analysen durchgeführt (Abbildung 7A). In den E6 Lysaten konnte eine starke Reduktion sowohl der 55 kDa als auch der 44 kDa Bande im Vergleich zu Scr Lysaten beobachtet werden. Jedoch wurden zusätzliche Banden bei Molekulargewichten von ca. 48, 70 and 80 kDa in den Scr und E6 Lysaten detektiert. Um im Folgenden zu untersuchen, ob diese unspezifische Banden, oder CD147 Varianten darstellen, wurden die entsprechenden Zelllinien mit Tunikamycin bzw. die Lysate mit Glykosidase F behandelt; während Tunikamycin den ersten Schritt der N-Glykosylierung blockiert und somit die Synthese aller N-verknüpften Glykoproteine inhibiert,

spaltet die PNGase F (auch bekannt als N-Glykosidase F) alle N-glykosidisch gebundenen Kohlenhydrate ab. Für die Behandlung mit PNGase F wurden die Scr und E6 Zelllysate (Scr und E6 PNGase) jeweils für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurden Scr und E6 Lysate (Scr und E6 Lysate) verwendet und ohne Zugabe des Enzyms unter gleichen Bedingungen inkubiert. Die Scr und E6 Zellen wurden jeweils mit zwei unterschiedlichen Tunikamycin-Konzentrationen (4 µg/ml und 8 µg/ml) behandelt; da die effektiven Konzentrationen für Tunikamycin vom Hersteller in einem Bereich zwischen 1 µg/ml und 10 µg/ml angegebenen wurden, und eine zu hohe Tunikamycin-Konzentration zum Zelltod führen kann, wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen eingesetzt. Da die Tunikamycin-Stocklösung DMSO enthielt, wurden als Negativkontrolle Scr und E6 Zellen mit der entsprechenden Menge DMSO im Medium inkubiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 24 Stunden. Anschließend wurden die Proteine mit Lämmli-Lysispuffer extrahiert und anschließend im Western Blot analysiert. Beide eingesetzten Tunikamycin-Konzentrationen und die Behandlung der Scr Zelllysate (Scr PNGase) mit PNGase F führten zu einer sehr starken Reduktion der 55 kDa Bande; nach Behandlung mit PNGase F konnte außerdem eine Reduktion der 40 kDa schweren Bande beobachtet werden (Abbildung 7B). Diese Banden repräsentieren niedrig und hoch glykosylierte Formen von CD147, wohingegen die anderen Banden, die bei einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa und 80 kDa detektiert wurden, unverändert waren. Diese Banden sind daher auf eine unspezifische Bindung des Antikörpers zurückzuführen. Bei der 32 kDa schweren Bande, die nach der Deglykosylierung in den Scr Zelllysaten sichtbar wurde, handelt es sich wahrscheinlich um unglykosyliertes CD147. In Zelllysaten von 12BM2-E6 Zellen konnte diese 32 kDa schwere Bande nicht induziert werden. Dies deutet darauf hin, dass in dieser mit siRNA transfizierten Zelllinie, keine detektierbaren CD147 Level mehr exprimiert werden.

Zur Verifizierung der Western Blot Ergebnisse wurde das CD147 Protein mittels Immunpräzipitation (IP) nachgewiesen. CD147 wurde mit einem anti-CD147-Antikörper

angereichert und mit einem weiteren anti-CD147 Antikörper mittels Western Blot nachgewiesen. Hierbei konnte man ein starkes Signal für die hoch glykosylierte Form von CD147 (56 kDa) in beiden Scr-Zelllinien (12BM2-Scr und B78D14-Scr) beobachten (Abbildung 7A und B). Im Gegensatz dazu, war in den 12BM2-E6 Zellen überhaupt kein Signal und in B78D14-E6 Zellen lediglich eine sehr schwache Bande der hoch glykosylierten Form von CD147 vorhanden (Abbildung 7A und B). Demzufolge scheint die durchflusszytometrisch dargestellte Rest-Expression von CD147 auf unspezifische Bindungen des Antikörpers zurückzuführen zu sein.

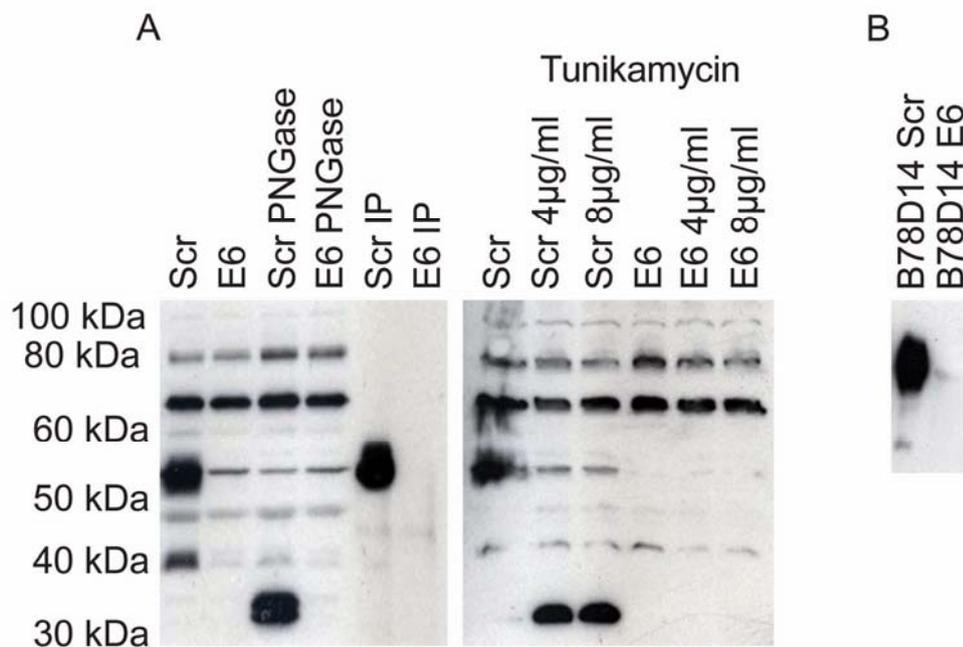


Abbildung 7. Einfluss von Tunikamycin und PNGase F auf die CD147 Varianten. (A) Für die Identifizierung von glykosylierten CD147 Varianten wurden Zelllysate der 12BM2-Scr und E6 Zellen hergestellt und mit PNGase F behandelt und im Western Blot analysiert. Als Kontrolle wurden parallel jeweils die gleichen Zelllysate, jedoch ohne Behandlung mit PNGase F verwendet. Die 12BM2 Zelllinie wurde mit den angegebenen Tunikamycin-Konzentrationen bzw. mit DMSO für 24 Stunden behandelt. (B) Die Immunpräzipitation (IP) von CD147 und anschließendem Western Blot zeigten eine vollständige Reduktion von hoch glykosyliertem CD147 in 12BM2-E6 Zellen in B78D14-E6 Zellen.

3.3 Einfluss der CD147 Reduktion auf die Produktion von MMPs *in vivo*

3.3.1 *Der Level der CD147 Expression beeinflusst nicht die MMP-Expression*

Um den Einfluss von CD147 auf die MMP Expression *in vivo* zu untersuchen, wurden die unter Punkt 3.1. beschriebenen B16 Melanomzelllinien (12BM2-Scr, 12BM2-E6, B78D14-Scr, B78D14-E6) verwendet, um durch subkutane Injektion Tumore in syngenen C57BL/6J Mäusen zu induzieren. Wie bereits unter Punkt 3.1 beschrieben, unterscheiden sich 12BM2 und B78D14 hinsichtlich des Tumorwachstums *in vivo*. Aus diesem Grund wurden jeweils 1×10^6 B78D14-E6 bzw. 1×10^5 12BM2-E6 Zellen in die laterale Flanke der Mäuse injiziert. Als Kontrolle wurde den Mäusen die entsprechende Anzahl B78D14-Scr bzw. 12BM2-Scr Zellen s.c. appliziert. Die subkutanen Tumoren wurden nach Erreichen eines Volumens von ca. 500 μ l operativ entfernt.

Die Tumore wurden im Folgenden immunhistologisch untersucht, um zu prüfen, ob der CD147 *knock down in vivo* stabil ist. In den Tumoren der B78D14-Scr Kontrollgruppe konnte eine starke CD147 Expression beobachtet werden (siehe Abbildung 8A), wohingegen in den B78D14-E6 Zellen kaum CD147-exprimierende Tumorzellen detektiert werden konnten (Abbildung 8E). Ähnliche Ergebnisse wurden für die 12BM2-E6 Zellen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Immunhistochemische Färbungen gegen MT1-MMP (Abbildung 8B) und MMP-2 (Abbildung 8C) zeigten in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen, dass diese Proteasen präferentiell an der Tumorstroma-Grenze in CD147⁺ Tumoren exprimiert werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass Stromazellen die Hauptquelle für diese Proteasen *in vivo* darstellen [Hofmann et al., 2005a]. Dagegen wurde MMP-9 deutlich von Einzelzellen exprimiert, die über den ganzen Tumor verteilt vorlagen (Abbildung 8D). Zur näheren Charakterisierung dieser MMP-9⁺ Zellen wurden Doppelfärbungen mit einem anti-MMP-9 und einen gegen Makrophagen gerichteten Antikörper (anti-F4/80 Überstand) durchgeführt und diese

konfokalmikroskopisch analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die MMP-9 Expression in der Regel mit der F4/80 Expression assoziiert war und dass somit tumorinfiltrierende Makrophagen als die MMP-9 exprimierenden Zellen anzusehen sind (Abbildung 9).

Überraschenderweise fanden sich in den CD147⁺ und CD147⁻ Tumoren hinsichtlich der MMP-2/-9 und MT1-MMP Expression keine Unterschiede (Abbildung 8F, G, H). Da in den Tumoren einerseits die Stromazellen als Quelle der MMP-Expression identifiziert wurden, andererseits die MMP Induktion unabhängig der CD147 Expression der Tumorzellen erfolgte, wurde im weiteren in *in vitro* Kokultur Experimenten die Interaktion von Fibroblasten und Melanomzellen untersucht.

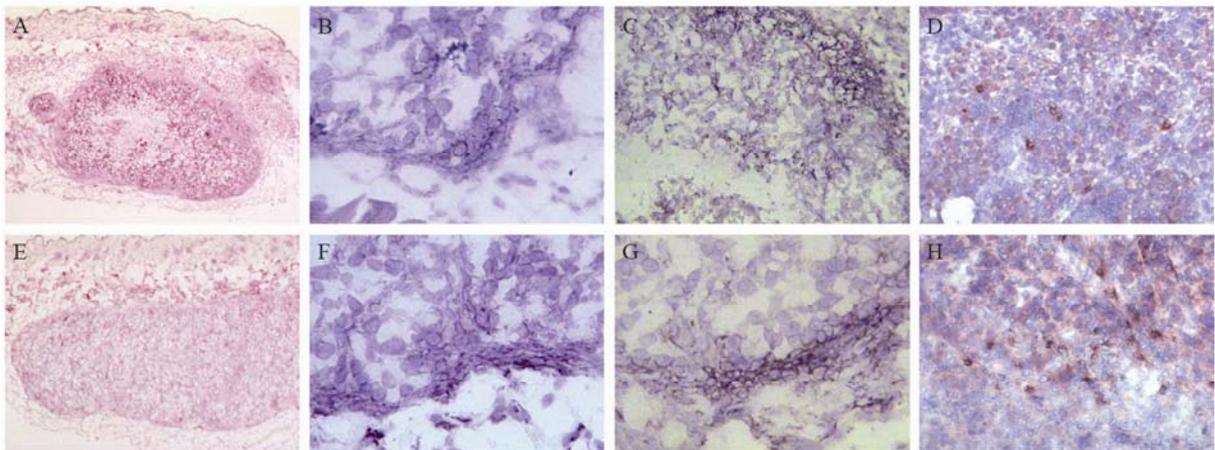


Abbildung 8. Die MMP Expression in subkutanen Tumoren korreliert nicht mit der CD147 Expression. Immunhistochemische Färbungen subkutaner Tumore, die durch Injektion von jeweils 1×10^6 B78D14-Scr (CD147⁺ Tumore in oberer Reihe) bzw. B78D14-E6 Zellen (CD147⁻ Tumore in unterer Reihe) in die Flanke von syngen C57BL/6J Mäusen induziert wurden. Nachweis der Expression von CD147 (**A und E**), MT1-MMP (**B und F**), MMP-2 (**C und G**) sowie MMP-9 (**D und H**).

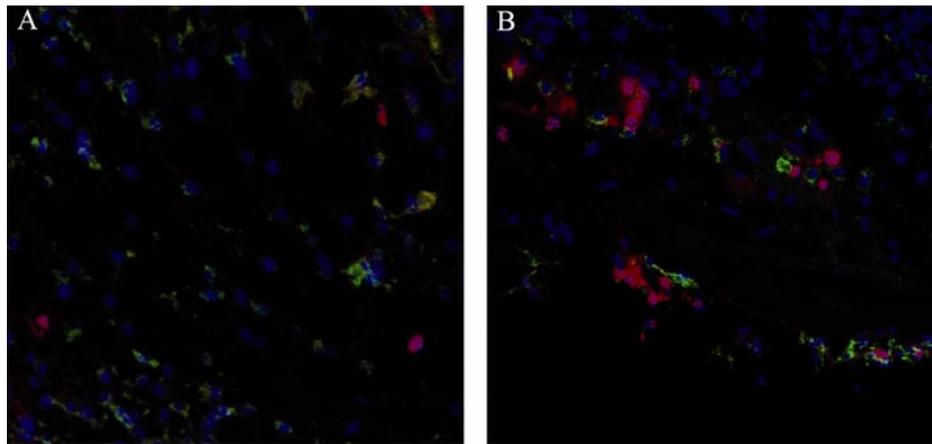


Abbildung 9. Charakterisierung MMP-9+ Zellen in subkutanen Tumoren. Dreifachfärbungen subkutaner Tumore, die durch 12BM2-E6 (**A**) und 12BM2-Scr (**B**) induziert wurden, erfolgten mit Antikörpern gegen den Makrophagen-Marker F4/80 (grün) und MMP-9 (rot) sowie durch Kernfärbung (DAPI, blau).

3.4 Einfluss der CD147 Reduktion auf die Produktion von MMPs *in vitro*

3.4.1 Keine Beeinflussung der MMP Produktion in Kokulturen von murinen Fibroblasten und CD147⁺/CD147 Melanomzellen

Primäre murine Fibroblasten (F) wurden jeweils mit CD147⁺ (Scr) bzw. CD147⁻ (E6) 12BM2 und B78D14 Melanomzellen kultiviert und die Überstände im Gelatine-Zymogramm analysiert. Als Kontrolle wurden die jeweiligen Zellen einzeln kultiviert; als Positivkontrolle wurden Überstände der humanen Fibrosarkomazelllinie HT1080 verwendet.

Es zeigte sich, dass primäre Fibroblasten (F) bereits spontan viel inaktives MMP-2 sezernierten (Abbildung 10A). In den Überständen der jeweils einzeln kultivierten 12BM2-Scr und 12BM2-E6 Zellen konnte dagegen nur wenig inaktives MMP-2 beobachtet werden. In den Kokulturüberständen von F/12BM2-Scr bzw. F/12BM2-E6 Zellen fanden sich keine Änderungen der MMP-2 oder -9 Sezernierung bzw. des Aktivierungsmusters der MMPs im Vergleich zu der Fibroblasten-Einzelkultur (Abbildung 10A exemplarisch für 12BM2 Zellen). Auch Kokulturexperimente der verschiedenen Melanomzellen mit den zwei Fibroblastenzelllinien NIH3T3 und L929 zeigten keine Modifikation der MMP Produktion. Die Fibroblastenzelllinie NIH3T3 sezernierte ähnlich wie die primären Fibroblasten *per se* beachtliche Mengen von inaktivem MMP-2. Nach Kokultur mit den CD147⁺ oder CD147⁻

Melanomzellen trat weder eine Aktivierung von MMP-2 noch eine Induktion von MMP-9 auf (Abbildung 10B). Entsprechende Ergebnisse wurden auch mit der Fibroblastenzelllinie L929 erhoben (siehe Abbildung 10C).

Ursache für das Fehlen einer MMP-2 und MMP-9 Induktion in Fibroblasten, die mit Tumorzellen kokultiviert wurden, könnte sein, dass die verwendeten Fibroblasten MMP-2 und MMP-9 bereits maximal exprimieren und somit keine Induktion durch Tumorzellen mehr möglich ist. Um dies abzuklären, wurde ein alternativer Weg gewählt, um MMP-2/-9 in den Fibroblasten zu induzieren. *Baluk und Kollegen* haben beschrieben, dass eine Mykoplasmeninfektion die Expressionen von MMP-2 und MMP-9 maximal induziert [Baluk et al., 2004]. Aufgrund dieser Beobachtung wurden primäre Fibroblasten (F M), NIH3T3 (NIH3T3 M) und Tumorzellen (Scr M und E6 M) jeweils mit Mykoplasmen-enthaltenen Überständen infiziert und dienten in den anschließend durchgeführten Kokulturrexperimenten als Positivkontrolle (Abbildung 11).

Durch die Mykoplasmeninfektion konnte bei den primären Fibroblasten (F M) und den NIH3T3 Zellen (NIH3T3 M) in der Tat die Produktion von aktiviertem MMP-2 induziert werden (Abbildung 11A). Interessanterweise war die Induktion von MMP-9 in primären Fibroblasten (F) von der Präsenz der Tumorzellen abhängig, allerdings unabhängig von deren CD147 Expression (Abbildung 11A und B); dies legt die Vermutung nahe, dass Mykoplasmen die Expression eines MMP-9 induzierenden Faktors in Melanomzellen stimulieren können. Da eine MMP-9 Induktion bereits durch mykoplasmen-infiziertes konditioniertes Medium von Melanomzellen erfolgte (Abbildung 11C), handelt es sich bei diesem Faktor vermutlich um ein lösliches Protein.

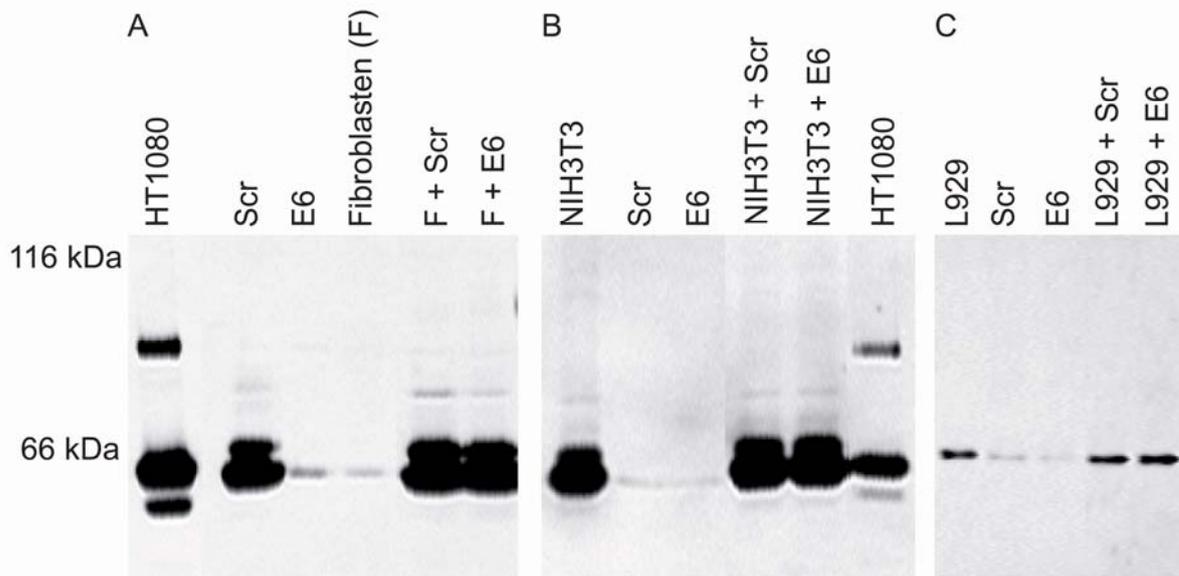


Abbildung 10. MMP-2 und MMP-9 Expression in Kokulturen von Fibroblasten mit Melanomzellen wird nicht von der CD147 Expression beeinflusst. Überstände von Kokulturen von (A) primären Fibroblasten (F), (B) NIH3T3, oder (C) L929 Fibroblastenzelllinien mit CD147⁺ (Scr) bzw. CD147⁻ (E6) Melanomzellen. Die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 wurden im Zymogramm nachgewiesen. Als Positivkontrolle wurden HT1080 Zellen verwendet.

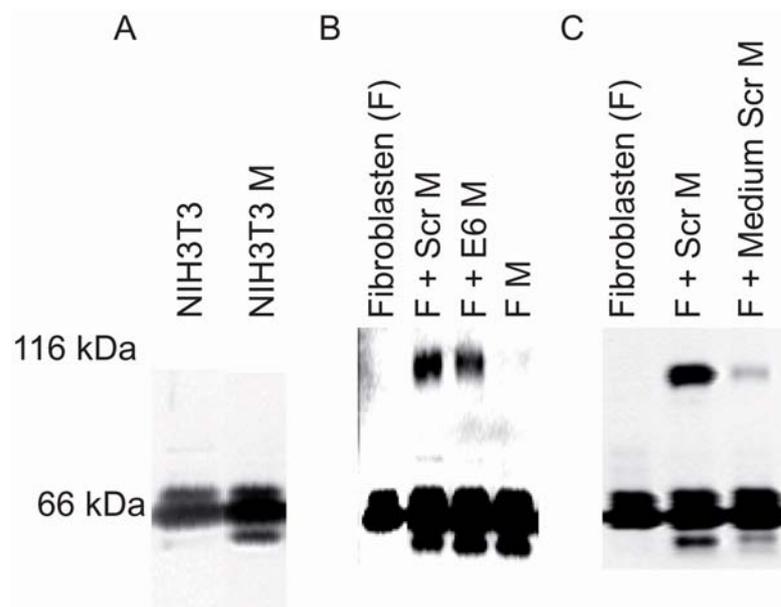


Abbildung 11. Induktion von MMP-2 und MMP-9 nach Mykoplasmeninfektion. (A) Überstände von jeweils mykoplasmen-infizierten NIH3T3 Zellen (NIH3T3 M) und primären Fibroblasten (F M) sowie (B) Überstände von Kokulturen von primären Fibroblasten (F) und mykoplasmen-infizierten Tumorzellen (Scr M bzw. E6 M). (C) Überstände von primären Fibroblasten (F) nach Kokultur mit mykoplasmen-infizierten Tumorzellen (Scr M) bzw. mykoplasmen-infiziertem konditioniertem Medium. Die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 wurden im Zymogramm nachgewiesen.

3.5 Analyse der Expression von CD147 in murinen Fibroblasten

3.5.1 Expression von CD147 in murinen Fibroblasten

Die unveränderte MMP Expression der Fibroblasten nach Kokultur mit CD147 exprimierenden Melanomzellen könnte u.a. darauf zurückzuführen sein, dass die Fibroblasten bereits selbst ausreichende CD147 Mengen exprimieren. Aus diesem Grund wurde die CD147 Expression auf Fibroblasten durchflusszytometrisch und mittels Western Blot untersucht. Bei den durchgeführten FCM Analysen konnte eine vergleichbare CD147 Expression in den primären Fibroblasten und den 12BM2-Scr Tumorzellen detektiert werden, wohingegen die Fibroblastenzelllinien NIH3T3 und L929 geringere CD147 Expressionen aufwiesen. (Abbildung 12A). Im Gegensatz dazu zeigte sich im Western Blot, dass primäre Fibroblasten im Vergleich zu den Melanomzellen nur eine geringe CD147 Expression aufwiesen, während diese bei den Fibroblastenlinien höher lag (Abbildung 12B). Diese Diskrepanz dürfte darin begründet sein, dass primäre Fibroblasten größer sind. Während bei FCM Analysen die CD147 Expression pro Zelle gemessen wird, erfolgt im Western Blot eine Normierung auf β -Tubulin.

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von CD147 auf die basale MMP-2 Expression in Fibroblasten wurde ein stabiler *knock down* der CD147 Expression in NIH3T3 Zellen, mittels des bereits beschriebenen E6 siRNA Vektors durchgeführt. Die Effizienz des *knock downs* wurde im Western Blot nach Immunpräzipitation überprüft, was eine starke Reduktion der CD147 Expression in NIH3T3-E6 transfizierten Zellen zeigte (Abbildung 12C). Aber auch in diesen CD147⁻ NIH3T3 Zellen blieb die MMP-2 Expression unverändert bestehen (Abbildung 13 unten). Kokulturrexperimente mit Mykoplasmen infizierten CD147⁺/CD147⁻ Melanomzellen und CD147⁻ NIH3T3 Zellen zeigten weiterhin, dass die MMP-2 Aktivierung auch in den Fibroblasten unabhängig von CD147 der kokultivierten Melanomzellen erfolgte

(Abbildung 13). Also CD147 auch keine Funktion als notwendiger Kofaktor bei der Mykoplasmen induzierten MMP-2 Aktivierung in der Fibroblastenzelllinie NIH3T3 hat.

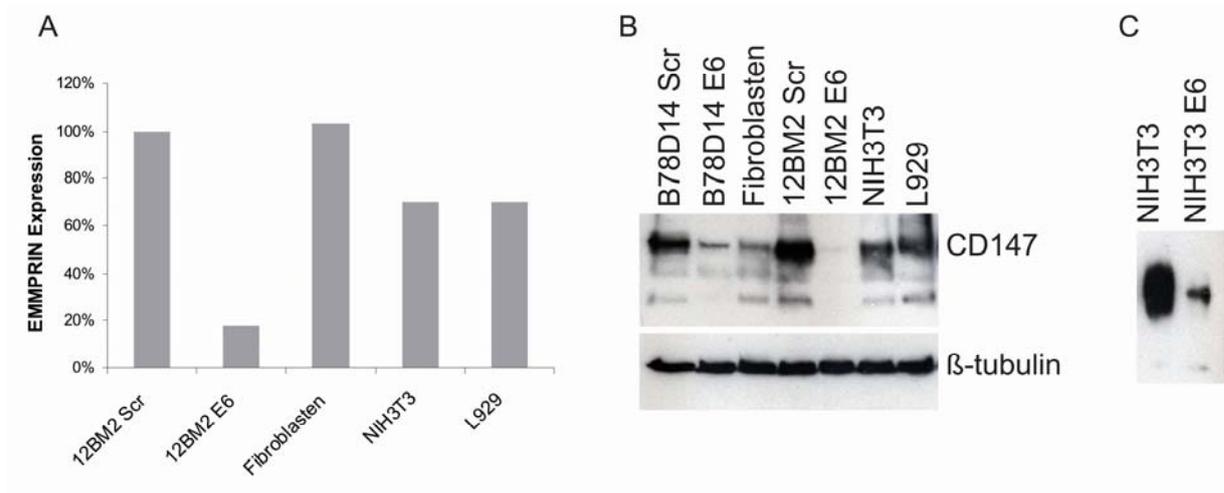


Abbildung 12. CD147 Expression in Fibroblasten. (A) Durchflusszytometrischer Nachweis der CD147 Expression von 12BM2-Scr, 12BM2-E6, Fibroblasten, L929 und NIH3T3 **(B)** CD147 Western Blot **(C)** CD147 Western Blot nach Immunpräzipitation von NIH3T3 und NIH3T3-E6 Zelllysaten.

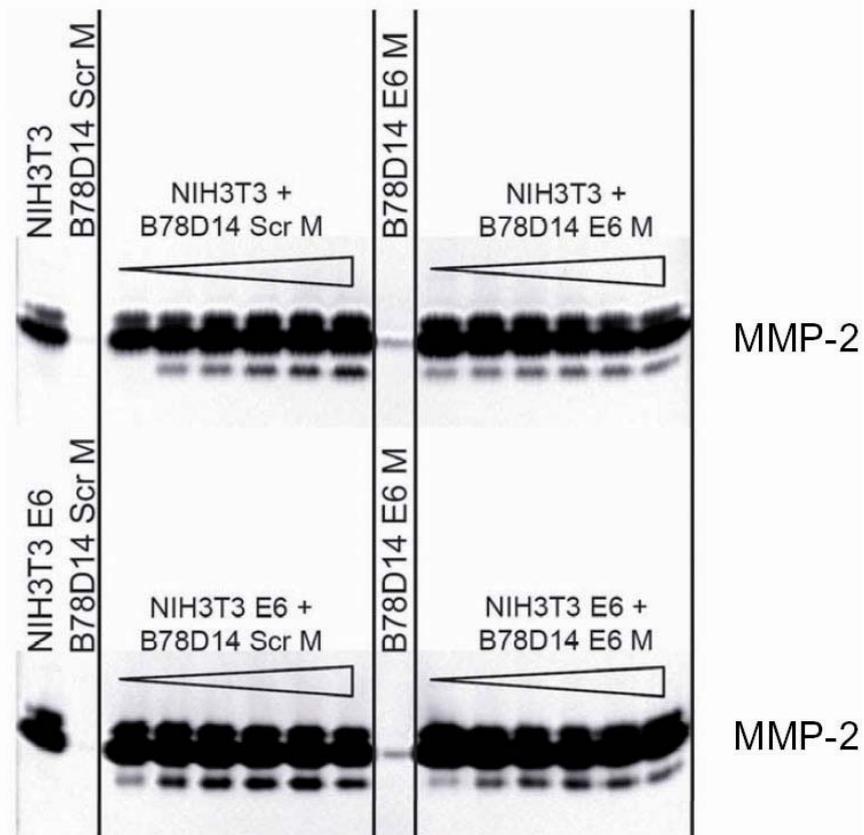


Abbildung 13. Kokultur von NIH3T3 und NIH3T3 E6 Zellen mit mykoplasmen-infizierten B78D14-Scr und B78D14-E6 Melanomzellen mit zunehmender Zahl von Melanomzellen. Im Zymogramm wurde die Induktion von MMP-2 gemessen.

3.5.2 Einfluss des CD147 knock downs auf die Ausbildung spontaner Metastasen

Obwohl der Nachweis einer CD147-abhängigen MMP-Regulation nicht gelang, wurde im Weiteren ein möglicher Effekt des CD147 *knock downs* auf das biologische Verhalten *in vivo*, insbesondere deren Metastasierung untersucht. Zunächst wurden subkutane Tumore der spontan metastasierenden B16 Sublinie 12BM2 induziert, indem jeweils 1×10^5 CD147⁺ bzw. CD147⁻ Zellen in die Flanke von syngenen C57Bl6/J Mäusen injiziert wurden. Die subkutanen Tumore wurden nach Erreichen eines Tumolvolumens von ca. 500 μ l entfernt. 12BM2 Melanomzellen metastasieren spontan bevorzugt in Lunge und Lymphknoten [Stackpole et al., 1991]. Sechs Monate nach Entfernung der Tumore wurden daher Lungen sowie die drainierenden (dr.) und nicht-drainierenden (ndr.) inguinalen Lymphknoten (LK) auf die Anwesenheit von Metastasen immunhistologisch untersucht. In den Lungen fanden sich in beiden Gruppen (Scr und E6) lediglich vereinzelt Tumorzellen (Abbildung nicht gezeigt). Es ist jedoch anzumerken, dass sich die Anzahl metastasierender Tumorzellen in den Lungen der Kontrollgruppe (Scr) nicht von der E6 Gruppe unterschied. In den dr. LK hingegen wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der 12BM2-Scr (CD147⁺) und 12BM2-E6 (CD147⁻) Gruppe beobachtet ($p < 0,05$) (Abbildung 14A). Während in der CD147⁻ Gruppe nur vereinzelt Tumorzellen in den LK nachzuweisen waren (Abbildung 14B), zeigten sich in der CD147⁺ Gruppe größere Tumorzellverbände (Abbildung 14C). In den nicht-drainierenden LK fanden sich nur vereinzelt Tumorzellen (Daten nicht gezeigt).

sich bei den braunen Bereichen, die sich über den ganzen CD147⁻ Tumor erstrecken, lediglich um eine starke Pigmentierung handelt und nicht um eine unspezifische Bindung des Antikörpers. Mittels RT-PCR wurde eine relative Quantifizierung der VEGF Expression von CD147⁺ (Scr) und CD147⁻ (E6) 12BM2 und B78D14 Tumorzelllinien durchgeführt. Wie in Abbildung 16C dargestellt, konnte jeweils in den CD147⁺ Tumorzellen eine erhöhte VEGF Expression detektiert und somit die immunhistologischen Färbungen bestätigt werden.

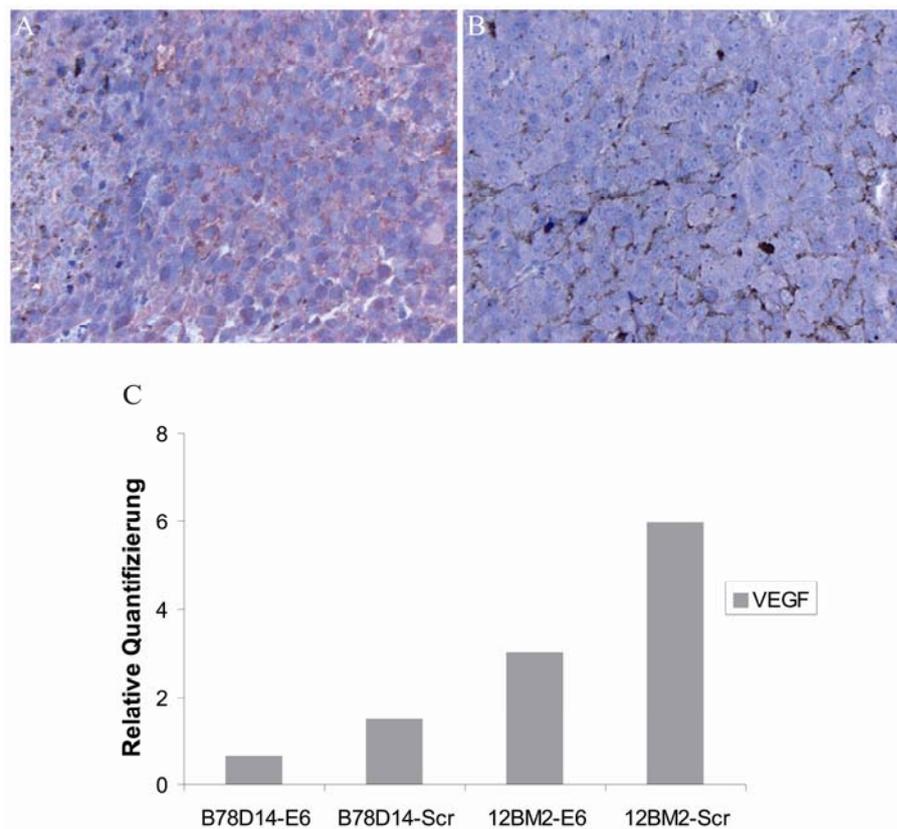


Abbildung 15. Reduzierte VEGF Expression in CD147⁻ Tumoren. Immunhistochemische Färbungen subkutaner Tumore, die durch Injektion von 1×10^5 (A) 12BM2-Scr (CD147⁺ Tumore) bzw. (B) 12BM2-E6 (CD147⁻ Tumore) in die Flanke von syngenem C57BL/6J Mäusen induziert wurden, wurden mit anti-VEGF gefärbt. Vergrößerungen: 40x. Relative Quantifizierung der VEGF Expression in B78D14-E6/ Scr und 12BM2-E6/Scr Tumorzellen mittels RT-PCR. Als Kalibrator wurden NIH3T3 Zellen verwendet (C).

Da bekannt ist, dass VEGF ein Schlüsselzytokin für die Neubildung von Blutgefäßen darstellt, wurde in den subkutanen Tumoren die Tumorangiogenese dargestellt. Zu diesem Zweck wurden Gefäße mit einem anti-CD31 Antikörper gefärbt (Abbildung 16A-D). In den CD147⁺ Tumoren konnten durch mikroskopische Auszählung der CD31⁺ Blutgefäße pro Gesichtsfeld, in der Tat eine höhere Dichte der CD31⁺ Mikrovaskulatur nachgewiesen werden als in den CD147⁻ Tumoren (Abbildung 16E und 16F). Es ist anzumerken, dass jeweils die Gebiete mit der größten Vaskularisierung ausgezählt wurden. Somit erscheint CD147 wesentlich für die Regulation der VEGF Produktion durch die Tumorzellen verantwortlich zu sein und es dadurch zur vermehrten Ausbildung von CD31⁺ Blutgefäßen in den CD147⁺ Tumoren zu kommen.

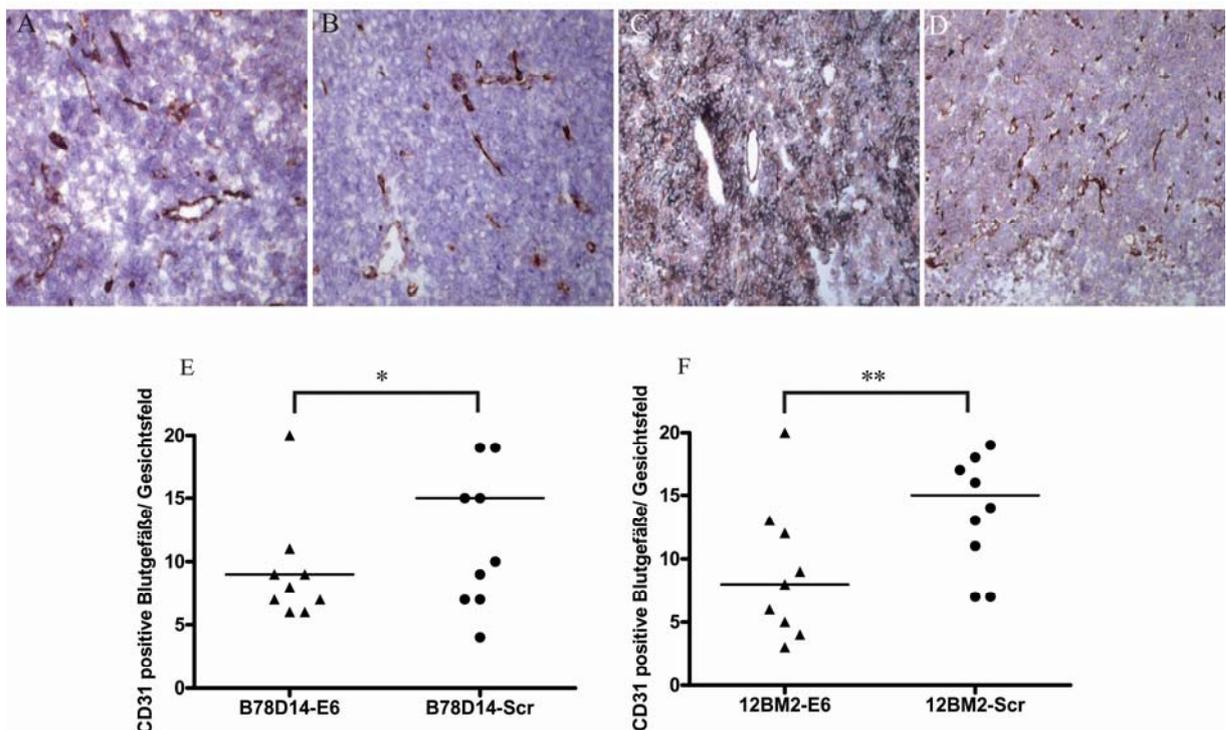


Abbildung 16. Abhängigkeit der Angiogenese von der CD147 Expression. Immunhistochemische Färbungen subkutaner Tumore mit anti-CD31 Antikörper, die durch Injektion von jeweils 10^6 B78D14-E6 (A) / B78D14-Scr (B) 105 12BM2-E6 (C) / 12BM2-Scr Zellen (D) in die Flanke von syngeneten C57BL/6J Mäusen induziert wurden. Quantifizierung der CD31-positiven Blutgefäße in B78D14-Scr und E6 (E) sowie 12BM2-Scr und -E6 (D). Vergrößerungen: A und B 20x; C und D 10x. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney two-tailed Test, p-Werte $< 0,5 = *$; $< 0,05 = **$

3.6 Untersuchung der Relevanz einer CD28-vermittelten Kostimulation in einem murinen B16 Melanommodell

3.6.1 Verminderte Aktivität einer tumorspezifischen Vakzination in CD28 k.o. Mäusen- s.c. Tumore

Pilotexperimente zeigten, dass die subkutane Injektion von B78D14 Melanomzellen in C57BL/6J Mäuse zu einem robusten Tumorwachstum führt. Ohne spezifische Vakzinierungen kam es zu nahezu keiner nachweisbaren Immunantwort gegen den Tumor. Über Vakzinierungen mit TRP-2₁₈₀₋₁₈₈ Peptid gepulsten Dendritischen Zellen (DC) [Eggert et al., 2002] war es aber möglich, messbare Immunantworten zu induzieren. Folglich wurden im Weiteren zur Untersuchung der Rolle der CD28-vermittelten Kostimulation, die Induktion und der Verlauf von Immunantworten von entsprechend geimpften Mäusen eingesetzt. Das für die Vakzinierungen verwendete Peptid besitzt eine hohe Affinität für MHC Klasse I K^b Moleküle und führt daher vorzugsweise zum *priming* von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen (CTL) [Schreurs et al., 2000].

Mäuse wurden zweimal mit TRP-2₁₈₀₋₁₈₈ - gepulsten DC immunisiert, eine Woche nach der zweiten Vakzinierung wurden durch die Injektion von 5×10^5 B78D14 Zellen subkutane Tumore induziert. Der Vergleich der Tumorumfänge zwischen CD28-defizienten Mäusen (Abbildung 17A) und Wildtypmäusen (wt) (Abbildung 17B) zeigte, dass in den CD28-defizienten Mäusen das Tumorwachstum früher einsetzt: 9 Tage nach Tumorinduktion litten bereits 7 von 9 Mäusen an einem messbaren Tumor, während in der wt-Gruppe nur 2 von 9 Mäusen einen Tumor aufwiesen ($p = 0,005$) (Abbildung 17A, B). Im weiteren Verlauf entwickelten aber alle Mäuse Tumore (Abbildung 17C). Das Ergebnis bestätigt die vorhergehende Beobachtung, dass eine alleinige Vakzinierung mit TRP-2 gepulsten DC nicht ausreicht, um das Wachstum der B16 Melanomzelllinie in C57BL/6J Mäusen komplett zu unterdrücken [Eggert et al., 2002].

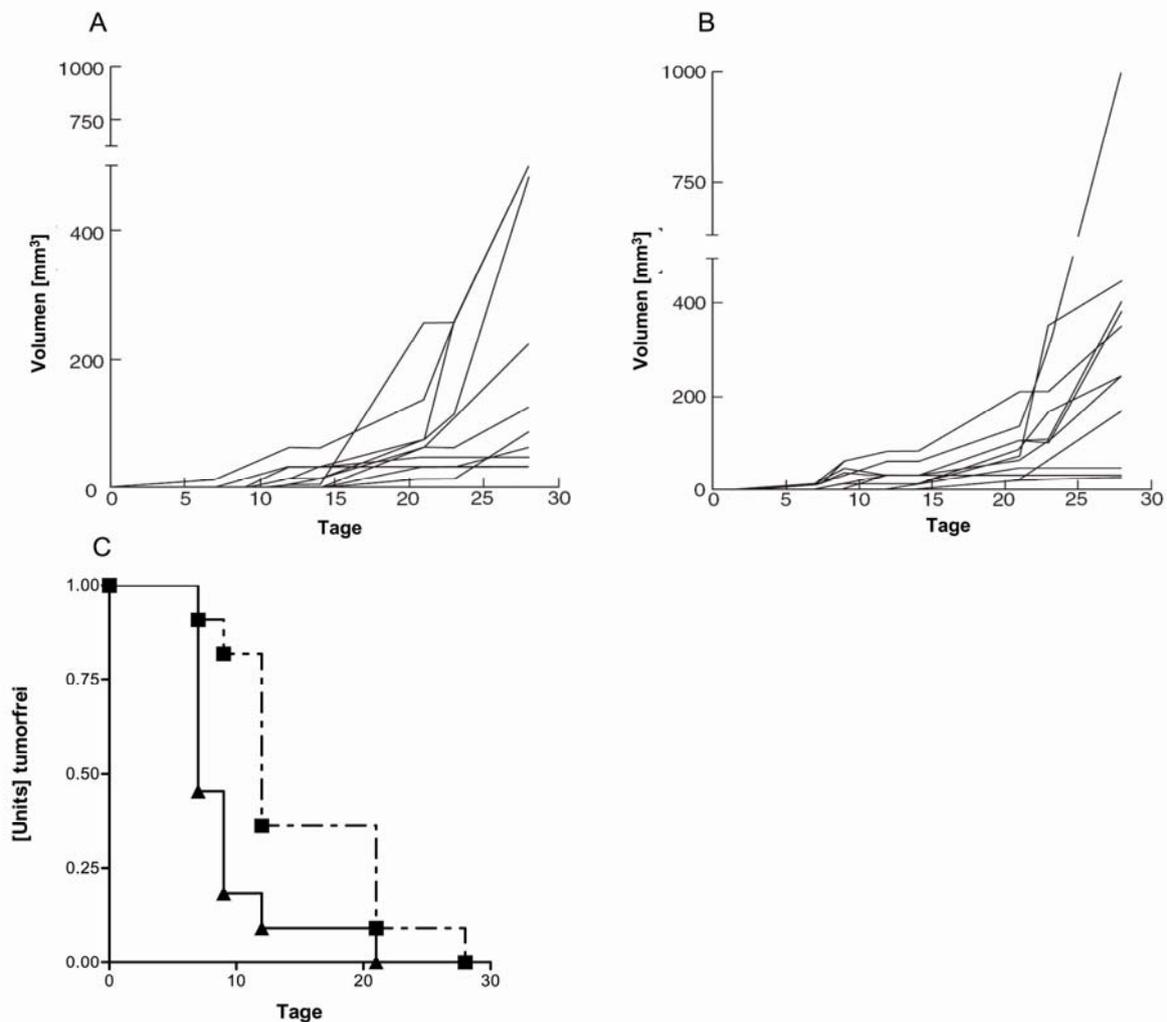


Abbildung 17. Tumorwachstum nach s.c. Challenge mit der B78D14 Melanomzelllinie. Eine Woche nach der zweiten Vakzinierung mit je 1×10^5 TRP-2₁₈₀₋₁₈₈-gepulsten DC wurden 5×10^5 B78D14 Zellen s.c. in C57BL/6J wt (A) und CD28 k.o. (B) Mäuse injiziert (n=11 für jede Gruppe). Die individuellen Tumolvolumina wurden nach der Formel: $V = a^2 \times b \times \pi / 6$ berechnet, wobei a der kurze und b der lange Tumordurchmesser ist, und einzeln für jedes individuelle Tier dargestellt. (C) Darstellung des tumorfreien Überlebens der C57BL/6J wt (Quadrate) und CD28 k.o. (Dreiecke) Mäuse als Kaplan-Meier Plot. Die Kurven unterscheiden sich signifikant (χ^2 Test, $p=0,0075$). Das Experiment wurde 42 Tage nach Tumorinduktion terminiert.

3.6.2 Nachweis tumorinfiltrierender T-Zellen in CD28-defizienten Mäusen

Um zu untersuchen, ob dieser Effekt auf eine verminderte Infiltration von Lymphozyten in die Tumore von CD28-defizienten Mäusen zurückzuführen ist, wurden immunhistologische Färbungen angefertigt. Diese zeigten, dass vergleichbare Frequenzen an CD4⁺ (Abbildung 18A und C) und CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 18B und D) im entzündlichen Infiltrat in Tumoren von wt und CD28 k.o. Mäusen vorhanden waren. Die fehlenden Unterschiede der Stärke des inflammatorischen Infiltrats in Tumoren von wt und CD28 k.o. Mäusen legt die

Vermutung nahe, dass durch die Vakzination TRP-2₁₈₀₋₁₈₈ reaktive T-Zellen in beiden Genotypen, also unabhängig von der CD28 Expression, mit der gleichen Effektivität induziert wurden. Der Nachweis von TRP-2₁₈₀₋₁₈₈/K^b-reaktiven T-Zellen im Infiltrat durch *in situ* Multimerfärbungen war mit dieser Vermutung im Einklang (Abbildung 19).

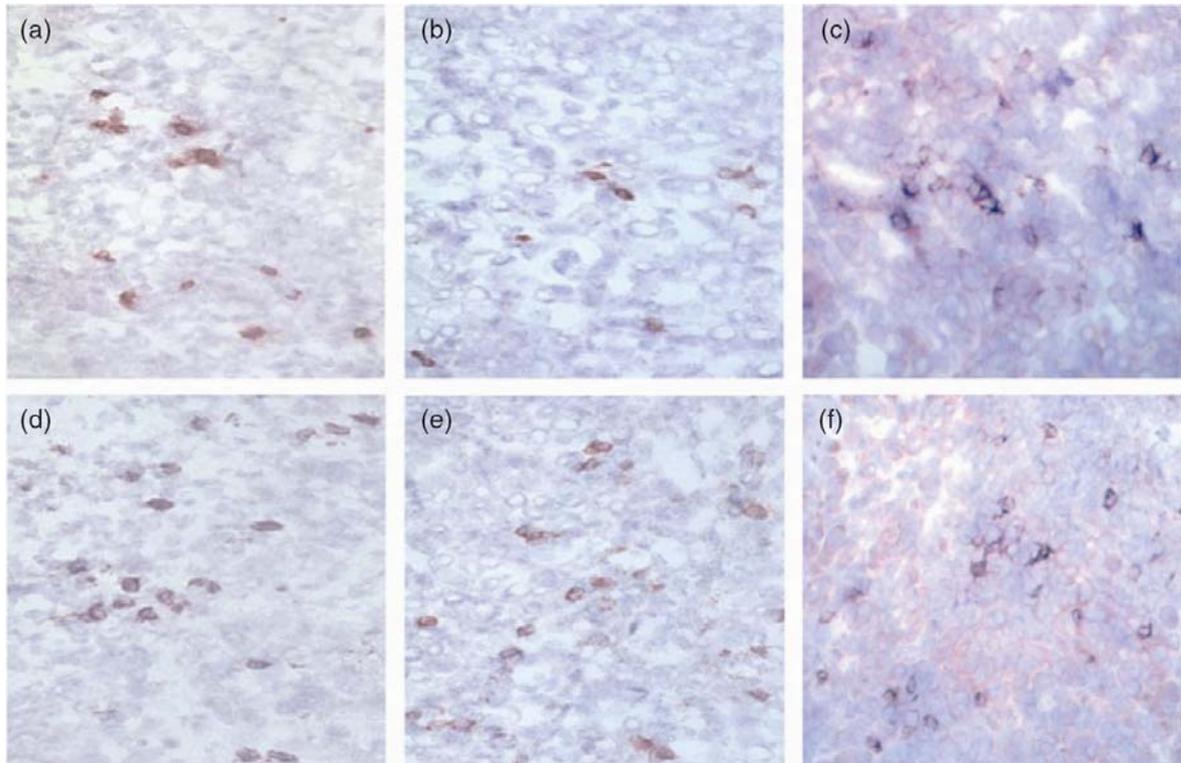


Abbildung 18. Immunhistologische Charakterisierung von TIL. Subkutane Tumore wurden durch s.c. Injektion von 5×10^5 B78D14 Zellen in C57BL/6J wt (**A-C**) und CD28 k.o. Mäusen (**D-F**) induziert. 14 Tage nach Tumorinduktion wurden die Tumore entfernt und Kryostatschnitte mit anti-CD4 (**A und D**), anti-CD8 (**B und E**) und anti-CD25 (**C und F**) Antikörpern gefärbt.

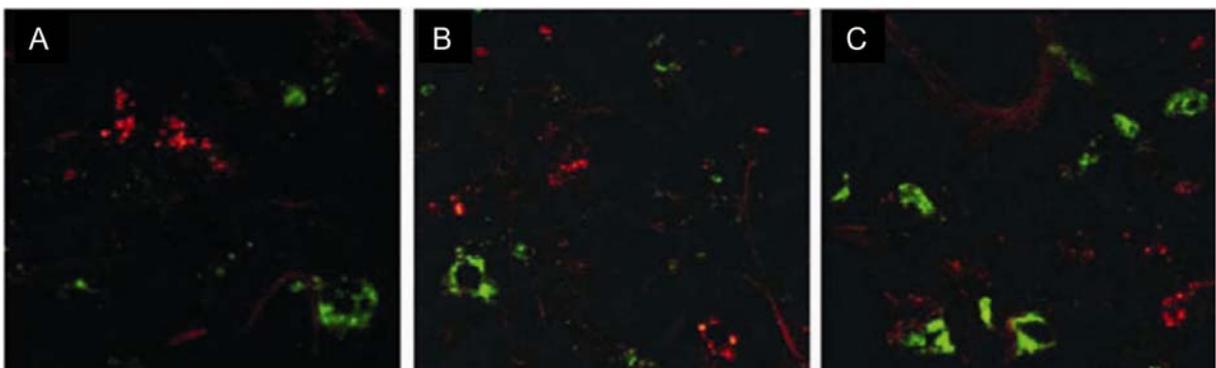


Abbildung 19. *In situ* Detektion von TRP-2₁₈₀₋₁₈₈-spezifischen T-Zellen in Lungenmetastasen. Nachweis von infiltrierenden TRP-2 reaktiven CD8⁺ T-Zellen durch Doppelfärbungen mit TRP-2₁₈₀₋₁₈₈/H2-K^b Tetrameren (rot) und anti-CD8 Antikörpern (grün) in Lungen von CD28 k.o. (**A und B**) und wt (**C**) Mäusen.

Um diese Hypothese weiter zu verfolgen, wurde das T-Zellrezeptor-Repertoire (TCR) der TIL analysiert. Bei der klonotypischen Kartierung handelt es sich um eine RT-PCR/DGGE basierte Methode, welche mit hoher Sensitivität klonale Expansionen von T-Zellen innerhalb einer TCR BV Familie enthüllen kann. Ein polyklonales Infiltrat weist dabei auf eine unspezifische, ein oligoklonales Infiltrat auf eine spezifische Immunreaktion hin. Zu diesem Zweck wurden die relativen Expressionen jeder TCR β -Ketten variablen (BV) Familie in den TIL der beiden Genotypen bestimmt, wobei diese Analyse mit spezifischen Primern für jede der murinen TCR BV Familie 1-16 erfolgte. In den Tumoren der wt und CD28 k.o. Mäuse konnte eine vergleichbare Überexpression einiger TCR BV Familien beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die klonotypische Kartierung des TCR-Repertoires zeigte, dass die beobachtete Überexpression der einzelnen TCR BV Familien in den TIL beider Gruppen in der Tat auf eine klonale Expansion von T-Zellen zurückzuführen war (Abbildung 20).

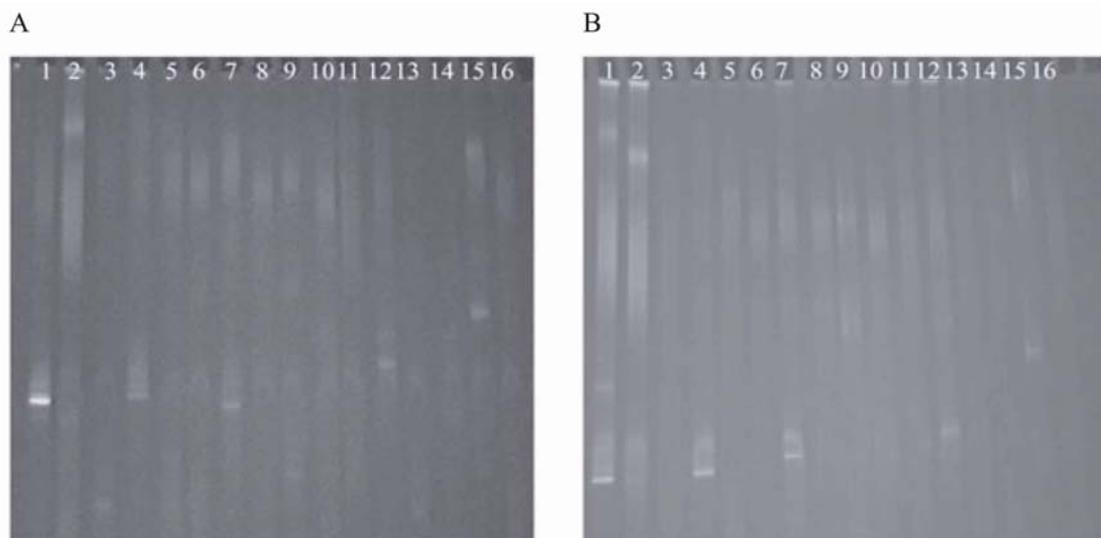


Abbildung 20. Klonotypische Kartierung von TIL. Subkutane Tumore wurden durch s.c. Injektion von 5×10^5 B78D14 Zellen induziert. Biopsien von Tumoren wurden 21 Tage nach Tumorinduktion entnommen und durch TCR klonotypische Kartierung analysiert. Die Abbildung zeigt die oligoklonale Expansion der β -variablen TCR Familie 1-16, von wt (**A**) und CD28-defizienten Mäusen (**B**) an Tag 21. Jede dargestellte Bande stellt ein klonotypisches Transkript dar.

3.6.3 *Verminderte Aktivität einer tumor-spezifischen Vakzinierung in CD28 k.o. Mäusen - Lungenmetastasen*

Die ersten Experimente deuten darauf hin, dass CD28 eine Rolle bei T-Zell-Immunantworten zur Kontrolle von subkutanen Tumoren spielt. Um diese Beobachtungen weiter zu untersuchen, wurde ein Lungenmetastasenmodell verwendet; in den C57BL/6J Mäusen wurden 7 Tage nach der zweiten Vakzinierung mit TRP-2₁₈₀₋₁₈₈/K^b-gepulsten DC 5×10^5 B78D14 Zellen i.v. injiziert. Obwohl Lungenmetastasen nicht ohne weiteres im Verlauf beobachtet werden können, zeigt dieser Ansatz sehr effektiv Unterschiede hinsichtlich der Effizienz therapeutischer Interventionen. Makroskopische Untersuchungen der Lungen zeigten, dass 5 von 9 der untersuchten Organe von CD28 k.o. Mäusen fast vollständig aus Tumorgewebe bestanden (Abbildung 21A). Im Gegensatz dazu, fanden sich auf den Lungen der wt Mäuse nur eine geringe Menge von Tumorfoci. Die Quantifizierung der Anzahl an Tumorfoci zeigte, dass diese in CD28 k.o. Mäusen signifikant erhöht war $p < 0,05$ (Abbildung 21B). Dieser Umstand spiegelt sich auch im Gewicht der Lungen wieder, welches bei den CD28 k.o. Mäusen deutlich höher lag als das von wt Tieren (Abbildung 21C).

3.6.4 Reduzierte Anzahl an TRP-2-spezifischen IFN- γ produzierenden T-Zellen in CD28 k.o.

Mäusen

Das beschleunigte Tumorwachstum in CD28 k.o. Mäusen im Vergleich zu wt Tieren konnte bisher nicht auf eine Beeinträchtigung des *primings* oder *homings* tumorspezifischer T-Zellen zurückgeführt werden, da sich die Quantität von TRP-2₁₈₀₋₁₈₈ reaktiven T-Zellen in den TIL der CD28 k.o. Mäuse nicht signifikant verändert hat. Außerdem erscheint es als unwahrscheinlich, dass die Effektorphase selbst durch das Fehlen von CD28 stark beeinträchtigt ist, da *geprimte* CD8⁺ T-Effektorzellen nur sehr geringfügig von CD28-vermittelten Signalen abhängig sind [Holdorf et al., 2000; Salomon und Bluestone, 2001]. Aus diesem Grund scheint sich das Fehlen des CD28-vermittelten kostimulatorischen Signals nach Aktivierung der T-Zellen auf die Differenzierung von TRP-2 spezifischen T-Zellen während oder kurz nach dem *priming* auszuwirken. Um dies zu untersuchen, wurden ELISPOT Analysen mit Milzzellen von entsprechend vakzinierten wt und CD28 k.o. Mäusen durchgeführt. Die Milzzellen wurden mit TRP-2₁₈₀₋₁₈₈ gepulsten syngenem LPS Blasten *in vitro* restimuliert und nach 6 Tagen wurde deren IFN- γ Produktion in Antwort auf TRP-2₁₈₀₋₁₈₈ im ELISPOT gemessen. Die Anzahl an IFN- γ produzierenden Zellen in CD28 k.o. Mäusen zeigte sich deutlich niedriger als in den wt Tieren (Abbildung 22A, B). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Effektorfunktion von TRP-2 spezifischen T-Zellen durch das Fehlen des CD28 Moleküls in CD28 k.o. Mäusen beeinträchtigt wird. Um diese Beobachtung weiter zu bestätigen, wurde ein Mikrozytotoxizitäts-Assay mit den *in vitro* stimulierten Milzzellen durchgeführt. Milzzellen von CD28-defizienten Mäusen zeigten in der Tat eine geringere Fähigkeit syngene Melanomzellen zu lysieren (Abbildung 22C).

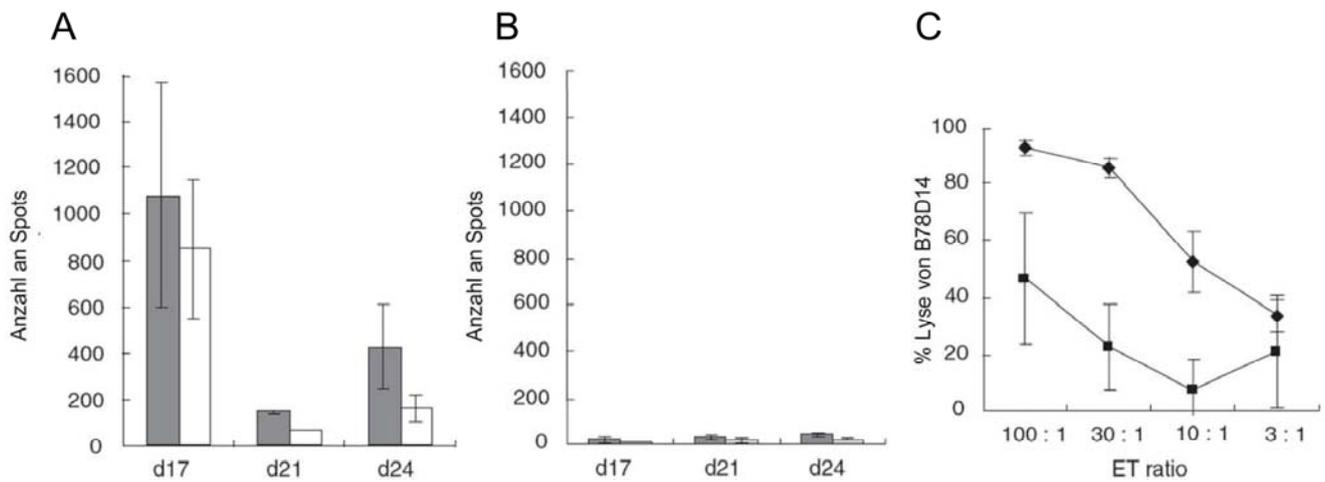


Abbildung 22. Funktionale Charakterisierung zirkulierender TRP-2₁₈₀₋₁₈₈/H2-K^b reaktiver IFN- γ -produzierender T-Zellen. Quantifizierung von IFN- γ produzierenden TRP-2₁₈₀₋₁₈₈/H2K^b-reaktiven T-Zellen in Milzzellen nach Vakzinierung mit Peptid-gepulsten DC aus wt **(A)** und CD28-defizienten Mäusen **(B)** an den Tagen 17, 21 und 24 nach der ersten Vakzinierung via ELISPOT. Der Versuch wurde in Triplikaten für n=2 Mäuse pro Gruppe durchgeführt und die Fehlerbalken stellen die SD dar. Der ELISPOT wurde mit 2 unterschiedlichen Zellkonzentrationen, 2×10^5 /well (grau) und 1×10^5 /well (weiss) nach *in vitro* Stimulation durchgeführt. Die Fähigkeit der entsprechenden Zellen von wt (Rauten) und CD28 k.o. (Quadrate) Mäusen, syngene Tumorzellen zu lysieren, wurde mittels eines Mikrozytotoxizitätstests ermittelt **(C)**. Die prozentuale spezifische Lyse ist gegen das Effektor:Target Verhältnis aufgetragen. Die Analyse wurde in Triplikaten durchgeführt.

4 DISKUSSION

Maligne Tumore stellen nicht nur eine Ansammlung genetisch, phänotypisch und funktionell pathologisch veränderter Zellen dar, sondern bilden zusammen mit der ECM und den Stromazellen vielmehr ein komplexes Gewebe, dessen zelluläre und strukturelle Komponenten miteinander in Kommunikation stehen und sich gegenseitig beeinflussen. Zusammen mit ortsständigen Zellen bilden tumorinfiltrierende Lymphozyten das Mikromilieu eines soliden Tumors. Die für das Tumorwachstum, Invasion und Metastasierung entscheidenden Vorgänge, wie Stromareaktion, Angiogenese, Ab- und Umbau der ECM werden durch ein komplexes Zusammenspiel von Tumorzellen, der ECM, Stromazellen und den infiltrierenden Entzündungszellen gesteuert [Zigrino et al., 2005]. Die im Tumormikromilieu durch Tumorzellen veränderten Stromazellen sind u.a. durch die Freisetzung von MMPs an der Tumorprogression, sowie durch die Inaktivierung von zytotoxischen T-Zellen, an Immunevasionsmechanismen des Tumors beteiligt.

4.1 Untersuchungen von CD147 in einem B16 Melanommodell

Das Melanom ist ein aggressiver durch eine frühzeitige Metastasierung gekennzeichneter Tumor. Für die Metastasierung ist ein komplexes Zusammenwirken von Melanomzellen und Stromazellen sowie deren Umbau der ECM nötig. Letzteres erfordert die koordinierte Expression und Aktivierung von proteolytischen Enzymen [Ferrier et al., 1998; Hofmann et al., 2005b]. Die Familie der MMPs besteht aus mehr als 20 Mitgliedern [Sternlicht et al., 2000; Visse and Nagase, 2003] und verschiedene Tiermodelle legen nahe, dass MMP-2 und MMP-9 für die Metastasierung maßgeblich sind [Itoh et al., 1998; Itoh et al., 1999; MacDougall et al., 1995; Suzuki et al., 2004]. MMPs können zwar sowohl von Tumor als auch von Tumorstromazellen, wie z.B. Fibroblasten produziert werden, jedoch werden die tumorassoziierten Stromazellen als entscheidende MMPs Produzenten angesehen [Gabison et al., 2005]. In diesem Zusammenhang konnte in zahlreichen Arbeiten demonstriert werden,

dass Tumorzellen über CD147 die Produktion von MMPs in Stromazellen erhöhen. Bei CD147 handelt es sich um ein Zelloberflächenglykoprotein der IgG Superfamilie, das in unterschiedlichen Glykosylierungsformen vorkommt [Tang et al., 2004a]. In zahlreichen experimentellen *in vitro* Untersuchungen mit humanen Zellen konnte CD147 als ein kritisches Molekül für die Aktivierung/ Induktion von MMP-2 und/ oder MMP-9 dargestellt werden [Liang et al., 2005; Suzuki et al., 2004; Tang et al., 2004b; Yang et al., 2003]. CD147 wird auf zahlreichen humanen Tumoren [Riethdorf et al., 2006] und Tumorzellen stark exprimiert [Muraoka et al., 1993; Polette et al., 1997]. In den eingesetzten murinen B16 Melanomzelllinien konnte jeweils eine starke CD147 Expression gemessen werden. Um die Funktion von CD147 in einem syngenem murinen B16 Melanommodell näher zu untersuchen, wurde die Expression von CD147 in zwei B16 Sublinien, B78D14 und 12BM2 über siRNA inhibiert. In humanen U251 Glioblastomzellen [Liang et al., 2005] und Prostatakrebszellen [Wang et al., 2006] führte ein solcher *knock down* der CD147 Expression zur Inhibierung der Tumorzellinvasion, was mit einer reduzierten Sekretion von MMP-2 und MMP-9 assoziiert war. In den präsentierten Arbeiten konnte überraschenderweise weder *in vitro* noch *in vivo* eine Korrelation zwischen der CD147 Expression und der Fähigkeit die MMP-2/ MMP-9 Expression/ Aktivierung in Stromazellen zu induzieren, demonstriert werden. So wurde in Kokultorexperimenten von CD147⁺ bzw. CD147⁻ B16 Melanomzellen mit verschiedenen Fibroblastenzelllinien (primäre Fibroblasten, NIH3T3 und L929) kein Effekt auf die MMP-2/MMP-9 Expression beobachtet. Die Suszeptibilität der murinen Fibroblasten bezüglich einer Induktion von MMPs wurde *in vitro* in Kokultorexperimenten durch die Induktion der MMP-9 Expression und einer MMP-2 Aktivierung mit mykoplasmeninfizierten Zellen demonstriert. Die Mykoplasmeninfektion der Zellen wurde als Kontrolle ausgewählt, da die Induktion von MMP-2 und MMP-9 durch *Mycoplasma pulmonis* infizierte murine Zellen gut etabliert ist [Baluk et al., 2004; Tsai et al., 1995; Zhang et al., 2000; Zhang et al., 1997]. Ebenso bestand *in vivo* in experimentellen subkutanen CD147⁺ bzw. CD147⁻

Tumoren kein Unterschied hinsichtlich der Expression von MMP-2 und MMP-9. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass MMP-2 und MT1-MMP präferentiell von Stromazellen an der Tumorstromagrenze exprimiert werden. Diese Expression wird daher vermutlich durch Tumorzellen, jedoch unabhängig der CD147 Expression, induziert. Vorarbeiten zeigten bereits, dass in subkutanen Tumoren sowie spontanen und experimentellen Lungenmetastasen von B16 Melanomzellen hohe Expressionslevel von MMP-2 und MT1-MMP vorwiegend auf Stroma- und Immunzellen begrenzt war [Hofmann et al., 2003]. Andererseits wurde MMP-9 deutlich von Einzelzellen exprimiert, die über den ganzen Tumor verteilt vorlagen. Diese Zellen zeigten jedoch keine tumorzell-ähnliche Morphologie. Eine nähere Charakterisierung der MMP-9⁺ Zellen machte deutlich, dass es sich bei den MMP-9⁺ Zellen um tumorinfiltrierende Makrophagen handelt. Dieses Ergebnis bestätigt Studien von *Coussens und Kollegen*, die zeigen konnten, dass MMP-9 exprimierende inflammatorische Zellen funktionell an der Tumorentstehung und Progression beteiligt sind [Coussens et al., 2000]. Jedoch fand die Induktion von MMP-2 und MT1-MMP im hier eingesetzten Modell wiederum unabhängig von der CD147 Expression der Tumorzellen statt. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte an der fehlenden Glykosylierung von CD147 liegen. CD147 wird auf der Zelloberfläche in verschiedenen Formen, einschließlich hoch glykosylierter (HG 45-65 kDa) und niedrig glykosylierter (LG 32-44 kDa) Fraktionen exprimiert; wobei das Kernprotein von CD147 ein Molekulargewicht von 27 kDa hat [Tang et al., 2004a]. Die Glykosylierung von CD147 variiert in Abhängigkeit des Zell- und Gewebetyps auf dem es exprimiert wird [Li et al., 2001; Nehme et al., 1995; Tang et al., 2004a]. Die N-Glykosylierung ist für eine korrekte Faltung und Zelloberflächenexpression erforderlich [Tiffet et al., 1992; Tropak und Roder, 1997]. Unglykosyliertes bzw. wenig glykosyliertes CD147 führt nicht zur Induktion, sondern zur Inhibition der MMP Produktion [Sun und Hemler, 2001; Jia et al., 2006]. Nur die hochglykosylierte H-Form von CD147 führt über die Bildung von homophilen Oligomeren zur

Stimulation der MMP-Produktion [Tang et al., 2004a]. In der 12BM2 und B78D14 Zelllinie wurden zwei CD147 Varianten, ein kleineres von ca. 36 kDa und ein größeres von ungefähr 56 kDa detektiert. Nach Tunikamycin bzw. PNGaseI Behandlung konnte eine Reduktion der 56 kDa schweren Bande auf 32 kDa beobachtet werden, was diese eindeutig als stark glykosyliertes CD147 identifizierte.

Die Induktion von MMPs in Stromazellen kann jedoch nicht nur über CD147 erfolgen, sondern auch über alternative Signalwege. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass CD166 (*activated leukocyte cell adhesion molecule* - ALCAM) die Aktivierung von MMP-2 reguliert [Lunter et al., 2005]. Tatsächlich korreliert die Expression von ALCAM im Melanom mit der Tumorprogression [van Kempen et al., 2000]. Außerdem können zahlreiche Zytokine und Wachstumsfaktoren die MMP Expression aktivieren. Somit können diese löslichen Faktoren die zelluläre Kommunikation zwischen Krebs- und Stromazellen vermitteln [Van den Steen et al., 2002; Wandel et al., 2002]. *Basic fibroblast growth factor* (bFGF) und Interleukin (IL)-1 α gelten als hauptsächliche von Tumoren produzierte Faktoren, die die MMP-1 Synthese in Fibroblasten induzieren [Loffek et al., 2005]. Neben Wachstumsfaktoren und Chemokin-induzierten Signalen konnte gezeigt werden, dass Integrine und ECM-vermittelte Signale die Expression von MMP-2 regulieren [Sugiura und Berdichevski, 1999]. Außerdem wurde eine bemerkenswerte Erhöhung der MMP-2/ MT1-MMP Genexpression und die MMP-2 Aktivität in choroid-retinalen Endothelzellen als Antwort auf Hypoxie demonstriert [Ottino et al., 2004]; diese Beobachtung scheint von besonderer Wichtigkeit für das kutane Melanom zu sein, da eine Hyperaktivierung von Akt und eine Induktion von HIF- α durch Hypoxie in der Haut zur Melanomentwicklung beitragen [Bedogni et al., 2005].

Neben der Funktion als MMPs Induktor fungiert CD147 als wichtiges Chaperon für die Anordnung der Monocarboxylattransporter, MCT-1 und MCT-4 in die Plasmamembran, fungiert als Rezeptor für Cyclophilin A und spielt bei der Entwicklung der Retina eine

wichtige Rolle (zusammengefasst in [Nabeshima et al., 2006]). Außerdem wird CD147 als positiver Regulator bei der Metastasierung angesehen [Kanekura et al., 2002;Zheng et al., 2006], da in metastasierenden Tumorzellen eine erhöhte CD147 Expression *in vivo* beobachtet werden konnte [Kanekura et al., 2002]. Außerdem führte eine experimentelle Überexpression von CD147 in MDA-MB436 Brustkrebszellen zu einer erhöhten Invasion der Tumorzellen [Zucker et al., 2001]. In den dargestellten Arbeiten konnte eine vermehrte Invasion CD147⁺ Tumorzellen in die drainierenden Lymphknoten beobachtet werden. Die drainierenden Lymphknoten stellen eine bevorzugte Lokalisation für eine frühe Metastasierung dar [Bostick et al., 1999;Gershenwald et al., 1999]. Humane Melanomzelllinien, die mit einer CD147-spezifischen siRNA transfiziert wurden, zeigten *in vivo* ein supprimiertes Metastasierungspotential [Chen et al., 2006]. Jedoch war die Metastasierung nicht von der MMP Expression abhängig.

In mehreren Arbeiten konnte eine MMP-unabhängige Migration beobachtet werden; so führte eine Blockierung von MMPs oder Serinproteasen nicht zur Inhibition der Zellmigration [Kruger et al., 2001;Della et al., 1999]. Eine Behandlung mit dem MMP-Inhibitor Batimastat konnte zwar das Tumorwachstum inhibieren, jedoch wurde die Tumorzellinvasion in die Leber sogar gefördert [Kruger et al., 2001]. Eine Protease-unabhängige amoeboiden Dissemination von HT-1080 Zellen in die Mausdermis konnte durch intravitale Multiphotonenmikroskopie beobachtet werden [Wolf et al., 2003]. Somit scheint generell eine Migration von Tumorzellen ohne MMPs möglich zu sein.

Neben den zuvor beschriebenen Eigenschaften ist CD147 auch für die Angiogenese relevant, indem es die VEGF (*vascular endothelial growth factor*) Produktion sowohl auf Protein- als auch auf RNA Ebene induziert [Tang et al., 2005]. Die CD147-vermittelte Regulation der VEGF Produktion erfolgt über den PI3K-Akt Signalweg [Tang et al., 2006]. VEGF stellt ein Schlüsselzytokin für die spontane Neubildung von Blutgefäßen dar. Melanomzellen, die eine

Überexpression von VEGF aufwiesen, induzieren *in vivo* die Bildung neuer Blutgefäße [Claffey et al., 1996]. Dementsprechend wurde in CD147⁺ Tumoren im Vergleich zu CD147⁻ Tumoren eine erhöhte Produktion von VEGF detektiert. Eine erhöhte VEGF Expression konnte darüber hinaus auch in CD147⁺ Tumorzelllinien beobachtet werden. Diese Ergebnisse bestätigen Studien von *Tang und Kollegen*, die zeigen konnten, dass in humanen MDA-MB-231 Brustkrebszellen CD147 die VEGF Produktion sowohl in Tumor- als auch Stromakompartimenten stimuliert [Tang et al., 2005]. In einer weiteren Arbeit konnte demonstriert werden, dass eine positive Korrelation zwischen der VEGF und der CD147 Expression besteht. Der *knock down* von CD147 führte in diesen Experimenten nicht nur zur Inhibition der VEGF Expression, sondern auch zu einer verminderten Dichte der Mikrovaskulatur in den Tumoren [Chen et al., 2006]. Ebenso konnte in der hier präsentierten Arbeit eine höhere VEGF Produktion in CD147⁺ Tumoren und eine signifikant höhere Dichte der CD31⁺ Mikrovaskulatur im Vergleich zu den CD147⁻ Pendants detektiert werden. Dies ging mit einer stärkeren Metastasierung einher, womit Studien bestätigt wurden, die eine Korrelation der VEGF Expression, der Dichte der Mikrovaskulatur und der Metastasierung beschrieben [List, 2001; Lee et al., 2000; Poon et al., 2001].

CD147 begünstigt im hier beschriebenen B16 Melanommodell ohne erkennbaren Effekt auf die MMPs Expression die Metastasierung, was auf eine Induktion von VEGF und der damit verbundenen Tumorangiogenese zu beruhen scheint.

4.2 Relevanz von CD28 bei anti-Tumorimmunantworten

CD28 wurde vor mehr als 20 Jahren identifiziert und wird als eines der wirksamsten kostimulatorischen Moleküle während der Aktivierung von naiven T-Zellen angesehen. Jedoch wird die Rolle von CD28 bei anti-Tumorimmunantworten noch kontrovers diskutiert. Die Beobachtung einer verstärkten Abstoßung von Tumoren, die mit den Liganden von CD28 transfiziert wurden, unterstützt die Relevanz von CD28 bei anti-Tumorimmunantworten

[Baskar et al., 1993;Chen et al., 1994;Townsend and Allison, 1993]. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung wird das Wachstum bestimmter Tumore verstärkt, wenn man die CD28/B7 Interaktion blockiert [Chambers et al., 2001;Leach et al., 1996]. Allerdings können CD28-defiziente Mäuse Virus-induzierte Lymphome und chemisch induzierte Fibrosarkome [Wen et al., 1997] abstoßen. Die Rolle von CD28 in syngenem Melanommodellen wurde aber noch nicht im Detail adressiert. Obwohl kürzlich gezeigt werden konnte, dass die Verabreichung von anti-B7-1 bzw. anti-B7-2 Antikörpern zu einer verringerten anti-Melanomimmunantwort führt [Hu et al., 2002], fehlen bislang Untersuchungen in CD28-defizienten Mäusen. Wir konnten in einem prophylaktischen Vakzinierungsmelanommodell zeigen, dass in CD28-defizienten Mäusen Tumore schneller wachsen und dass die Tumoralast verglichen mit Wildtyptieren größer ist. Als mögliche Erklärung für fehlende anti-Tumorantworten in CD28 k.o. Mäusen wurde eine unvollständige Proliferation der tumorspezifischen T-Zellen aufgeführt. Dies scheint aber in den vorliegenden Arbeiten nicht zuzutreffen. Die Induktion von Tumor spezifischen T-Zellen durch DC Vakzinierung, führte zu einer Infiltration von TRP-2 spezifischen CD8⁺ T-Zellen in den Tumor, unabhängig von An- oder Abwesenheit von CD28. Daher scheint weder die Induktion noch das *homing* von spezifischen CD8⁺ T-Zellen in CD28-defizienten Mäusen beeinträchtigt zu sein. Funktionelle Analysen zeigten aber wesentliche Unterschiede in den jeweils induzierten CTL auf. In den CD28-defizienten Mäusen war die Zahl IFN- γ produzierender Zellen als Antwort auf TRP-2 im Vergleich zu Milzzellen aus Wildtyptieren wesentlich geringer. Obwohl dieser durch eine direkte Störung der CD8⁺ T-Zelleffektorfunktion durch das Fehlen von CD28 zu erklären wäre, scheint diese Möglichkeit unwahrscheinlich, da kürzlich gezeigt werden konnte, dass Effektorzellen weniger von einer CD28-vermittelten Kostimulation abhängig sind, als naive T-Zellen [Holdorf et al., 2000;Salomon and Bluestone, 2001]. Allerdings scheint die Differenzierung in *bona fide* Effektorzellen durch die Abwesenheit von CD28 beeinträchtigt zu sein. Diese Beobachtung ist im Einklang mit Studien in denen gezeigt werden konnte, dass

CD8⁺ T-Zellen nach Vakzinierung mit Hitze-getöteten *L. monocytogenes* expandierten und sich sogar in Gedächtniszellen differenzierten, obwohl sie keine Effektorfunktion erwarben [Lauvau et al., 2001]. In diesem Zusammenhang sollte angemerkt werden, dass eine CD28 Defizienz eine Resistenz gegenüber der experimentellen autoimmunen Gehirnentzündung (EAE) verursacht. Dies ist nicht auf eine beeinträchtigte proliferative Antwort von enzephalitogenen T-Zellen zurückzuführen [Chang et al., 1999; Girvin et al., 2000], sondern auf eine beeinträchtigte Effektorfunktion [Chitnis et al., 2001]. Auch in anderen Autoimmunerkrankungsmodellen, wie zum Beispiel der experimentellen Myokarditis oder bei der Kollagen-induzierten Arthritis ist die CD28-vermittelte Kostimulation entscheidend [Bachmaier et al., 1996; Tada et al., 1999]. Folglich scheinen T-Zellen durch schwache Antigene, wie auf Selbst- oder Tumorantigene, ohne Kostimulation nur unvollständig aktiviert zu werden. Solche *unfit* T-Zellen sind durch eine insuffiziente Expression homeostatischer Zytokine bzw. dessen jeweiligen Rezeptoren gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu werden nach optimaler Stimulation ausreichende Mengen an Zytokinen, antiapoptotischen Molekülen und Zytokinrezeptoren induziert, um eine adäquate Effektorfunktion sicherzustellen [Gett et al., 2003; Lanzavecchia und Sallusto, 2002].

Kürzlich wurde demonstriert, dass induzierte Immunantworten gegen virale Peptide in CD28-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen sich zwar quantitativ, aber nicht qualitativ unterscheiden [Wolkers et al., 2001]. In dem hier eingesetzten Modellsystem konnten keine quantitativen wohl aber qualitative Unterschiede bezüglich T-Zellantworten in CD28-defizienten und Wildtypmäusen, aufgedeckt werden. Diese Diskrepanz könnte darauf zurückzuführen sein, dass in unserem Modell wiederholte Vakzinierungen durchgeführt wurden und somit eine wiederholte TCR Stimulation die *T-Zell-unresponsiveness* von CD28-defizienten Mäusen überwunden wurde [Kundig et al., 1996]. Ebenso sollte angemerkt werden, dass virale Epitope *per se* stärkere Immunantworten *in vivo* induzieren als solche gegen Selbstantigene [Speiser et al., 1997]. Somit könnte die kontroverse Rolle von CD28 in

den genannten Tumormodellen, damit erklärt werden, dass starke Antigene auch in Abwesenheit von CD28 ausreichende T-Zellantworten induzieren, wohingegen schwache Antigene von der CD28 Kostimulation abhängig sind.

Kostimulatorische Signale sind grundsätzlich für die optimale Aktivierung von T-Zellen unerlässlich. Die Relevanz einer CD28-vermittelten Kostimulation wurde in CD28-defizienten Mäusen untersucht, bei denen das CD28 Gen durch *Gentargeting* inaktiviert und damit die Oberflächenexpression des Proteins auf T-Zellen verhindert wurde (klassische CD28 k.o. Maus) [Shahinian et al., 1993]. *In vitro* zeigten sich beträchtliche Defekte in Proliferation, Differenzierung und Effektorfunktionen nach T-Zellstimulation. Trotzdem weisen CD28 k.o. Mäuse insgesamt aber einen überraschend unauffälligen Phänotyp auf, insbesondere in Bezug auf mögliche Immundefekte [Brown et al., 1996; Egen et al., 2002; Shahinian et al., 1993]. Die genauere Analyse zeigt weiter, dass *in vitro* nach Antigenexposition [Egen et al., 2002] die T-Zellaktivierung zunächst normal verläuft mit entsprechender Proliferation und der Expression von Aktivierungsmarkern; das Aufrechterhalten dieser Immunantworten über einen längeren Zeitraum ist jedoch gestört [Bachmann et al., 1997; Brown et al., 1996; Lucas et al., 1995; Brown et al., 2005]. Die vorliegenden Arbeiten demonstrieren, dass sich die Immunantworten in den CD28-defizienten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen weniger quantitativ, als qualitativ unterscheiden. Eine Erklärung für die Unterschiede in den *in vitro* und *in vivo* Beobachtungen wäre, dass bei vollständiger Abwesenheit von CD28, entsprechende Adaptationsprozesse das Fehlen des Moleküls kompensieren. Diese Adaptationsprozesse basieren darauf, dass andere kostimulatorische Moleküle die Funktion des fehlenden CD28 übernehmen könnten. Mögliche Kandidaten stellen unter anderem CD40, ICOS, NKG2D, OX40, HVEM oder 4-1BB dar [Croft, 2003; Greenwald et al., 2005; Schrama et al., 2006]. Eine genaue Untersuchung der zugrunde liegenden Mechanismen liegt bisher noch nicht vor. Zur detaillierten Analyse einer CD28-vermittelten Kostimulation während der Induktion und dem

Erhalt von T-Zellantworten, wären konditionale CD28 k.o. Mäuse von Vorteil, da nur dann der Einfluss von CD28 während der verschiedenen Phasen der Immunreaktion unter Vermeidung möglicher Adaptationsprozesse untersucht werden könnte.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Ein Tumor stellt nicht nur eine Ansammlung entarteter Zellen dar, sondern ist vielmehr ein komplexes *Pseudoorgan*, das aus Tumorzellen und aus mit ihnen assoziierten „normalen“ Zelltypen, wie Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen, den sogenannten Tumorstromazellen, besteht. Die Tumorstromazellen wurden von den Tumorzellen dahingehend konditioniert, dass sie das Tumorwachstum und -progression fördern. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von zwei Oberflächenmolekülen, nämlich CD147 und CD28, für solche im Tumorstroma stattfindenden Interaktionen im syngenem murinen B16 Melanommodell untersucht.

5.1 Rolle von CD147 für MMP Expression, Neoangiogenese und Metastasierung

CD147, das von Tumorzellen exprimiert wird, wird als ein Faktor angesehen, der auf benachbarten Stromazellen die Expression von MMPs induziert. MMPs sind essentiell für den Umbau der extrazellulären Matrix und der Basalmembranen und somit für die Invasion und Metastasierung des Tumors essentiell. Daneben gibt es erste Hinweise, dass CD147 auch die Induktion von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) vermittelt und damit die Tumorangiogenese fördert. In dem eingesetzten Melanommodell war überraschenderweise kein Unterschied hinsichtlich der Expression von MMP-2, MMP-9 und MT1-MMP in Abhängigkeit von der CD147 Expression nachweisbar. Die *in vitro* Kokultur der Melanomzellen mit unterschiedlichen murinen Fibroblasten zeigte zudem, dass weder CD147⁺ noch CD147⁻ Melanomzellen die Expression von MMP-2 oder MMP-9 in den Fibroblasten veränderten. Als eindeutige Effekte des CD147 *knock downs* wurde aber eine reduzierte VEGF Expression *in vivo* einhergehend mit einer gehemmten Tumorangiogenese, sowie einer reduzierten Metastasierung festgestellt. Es konnte somit die Funktion von CD147 in dem gewählten Modell als angiogenetischer, jedoch als MMP unabhängiger, Metastasierungsfaktor demonstriert werden.

5.2 Einfluss von CD28 auf antitumorale Immunantworten

CD28 ist ein kostimulatorisches Molekül, das zusammen mit dem TCR für eine effiziente Stimulation von T-Lymphozyten wesentlich ist. In CD28 k.o Mäusen fand sich im Vergleich zu Wildtyp Kontrolltieren eine verminderte Effektivität von prophylaktischen anti-Tumor Impfungen, die sich in einem beschleunigten Tumorwachstum sowie einer erhöhten Tumorlast auswirkten. Die Frequenz von Vakzine induzierten TRP-2₁₈₀₋₁₈₈ /K^b reaktiven CD8⁺ T-Zellen in TIL von Tumoren war aber in beiden Genotypen gleich. Dagegen war die Anzahl IFN- γ produzierender TRP-2₁₈₀₋₁₈₈ /K^b reaktiver T-Zellen sowie die Fähigkeit der TRP-2₁₈₀₋₁₈₈ /K^b reaktiven T-Zellen zu lysieren, in den CD28-defizienten Mäusen deutlich geringer. Diese Beobachtungen legen nahe, dass CD28-vermittelte kostimulatorische Signale im gewählten Modell weniger für die initiale Expansion als für die Differenzierung funktioneller tumorspezifischer CD8⁺ T-Effektorzellen eine wesentliche Funktion einzunehmen scheinen.

6 SUMMARY

Malignant tumors not only represent an accumulation of neoplastic cells but should be seen as a complex pseudoorgan, which consists on tumor cells and tumor-associated *normal* cell types, e.g. fibroblasts, endothelial cells and macrophages, the so-called tumorstroma cells. Tumorstroma cells were unprogrammed from tumor cells, facilitating both tumor growth and progression. In the present work, the significance of two cell surface molecules, CD147 and CD28, was investigated in a syngeneic melanoma model.

6.1 Role of CD147 in MMP induction, neoangiogenesis and metastasis formation

CD147, which is expressed by tumor cells, is regarded as a key factor, which induces the expression of MMPs in adjacent stroma cells. MMPs are essential for degradation of the extracellular matrix and basal membranes and consequently important for invasion and metastasis formation of tumors. Furthermore, there are some indices, that CD147 can mediate also the induction of *vascular endothelial growth factor* (VEGF) and therefore promote neoangiogenesis. In the B16 melanoma model, surprisingly no differences were detectable, regarding the expression of MMP-2, MMP-9 and MT1-MMP in dependence of CD147 expression. Co-culture of melanoma cells with different fibroblast cell lines demonstrated that neither CD147⁺ nor CD147⁻ melanoma cells altered the expression of MMP-2 or MMP-9 in the fibroblasts. As distinct results of the CD147 *knock down* a reduced VEGF expression *in vivo* accompanied by inhibited angiogenesis as well as reduced metastasis was observed. Thus, in the used model, CD147 can be regarded as angiogenic, however, MMP independent metastasis formation factor.

6.2 Influence of CD28 on anti-tumoral immune responses

CD28 is a costimulatory molecule which is essential in conjunction with the TCR for efficient stimulation of T lymphocytes. In CD28 k.o. mice a reduced efficacy of prophylactic anti-tumor vaccinations, which resulted both in an accelerated tumor development and an increased tumor load compared with wildtyp mice was detected. The frequency of TRP-2₁₈₀₋₁₈₈/K^b-reactive CD8⁺ T cells among TILs, however, was similar in both genotypes. In contrast, the number of IFN- γ -producing TRP-2₁₈₀₋₁₈₈/K^b-reactive T cells and the efficiency of the TRP-2₁₈₀₋₁₈₈/K^b-reactive T cells lysing target cells, was reduced in CD28-deficient mice.

These results suggest that CD28-mediated costimulatory signals, at least in the used model of CD28 k.o. mice, seem to be less essential for the initial expansion than for the differentiation of functional tumor-specific CD8⁺ T-effector cells.

7 ABKÜRZUNGEN

APC	Antigenpräsentierende Zellen
APS	Ammonium Persulfat
BSA	Rinderserumalbumin
Bp	Basenpaar
CD147	extrazellulärer Matrixmetalloproteinase-Induzierer
cDNA	komplementäre DNA
CM	Komplettmedium
Da	Dalton
DAPI	DAPI 4,6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DC	Dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMMPRIN	extrazellulärer Matrixmetalloproteinase-Induzierer
ECM	extrazelluläre Matrix
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting)
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G418	Geneticin 418
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IFA	Inkomplettes Freundsches Adjuvans
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin

i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kDa	Kilo Dalton
μ	micro
MMPs	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
PBS	<i>Phosphate buffered salt</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
RT-PCR	reversen Transkriptase-PCR
RNase A	Ribonuklease A
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
s.c.	subkutan
Scr	<i>Scrambled</i>
SDS	Sodiumdodecylsulphat
siRNA	small interfering RNA
TAA	Tumorassoziertes Antigen
TCR	T-Zellrezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
TIL	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
wt	Wildtyp

8 LITERATUR

- Abken H, Hombach A, Heuser C, Kronfeld K, Seliger B (2002) Tuning tumor-specific T-cell activation: a matter of costimulation? 95. *Trends Immunol* 23: 240-245
- Allison JP, Hurwitz AA, Leach DR (1995) Manipulation of costimulatory signals to enhance antitumor T-cell responses 131. *Curr Opin Immunol* 7: 682-686
- Altruda F, Cervella P, Gaeta ML, Daniele A, Giancotti F, Tarone G, Stefanuto G, Silengo L (1989) Cloning of cDNA for a novel mouse membrane glycoprotein (gp42): shared identity to histocompatibility antigens, immunoglobulins and neural-cell adhesion molecules. *Gene* 85: 445-451
- Andersen MH, Becker JC, Straten P (2005) Regulators of apoptosis: suitable targets for immune therapy of cancer. *Nat Rev Drug Discov* 4: 399-409
- Andersen MH, Fensterle J, Ugurel S, Reker S, Houben R, Guldborg P, Berger TG, Schadendorf D, Trefzer U, Brocker EB, Straten P, Rapp UR, Becker JC (2004) Immunogenicity of constitutively active V599EBRaf. *Cancer Res* 64: 5456-5460
- Bachmaier K, Pummerer C, Shahinian A, Ionescu J, Neu N, Mak TW, Penninger JM (1996) Induction of autoimmunity in the absence of CD28 costimulation. *J Immunol* 157: 1752-1757
- Bachmann MF, McKall-Faienza K, Schmits R, Bouchard D, Beach J, Speiser DE, Mak TW, Ohashi PS (1997) Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity* 7: 549-557
- Bai XF, Bender J, Liu J, Zhang H, Wang Y, Li O, Du P, Zheng P, Liu Y (2001) Local costimulation reinvigorates tumor-specific cytolytic T lymphocytes for experimental therapy in mice with large tumor burdens 69. *J Immunol* 167: 3936-3943
- Baluk P, Raymond WW, Ator E, Coussens LM, McDonald DM, Caughey GH (2004) Matrix metalloproteinase-2 and -9 expression increases in Mycoplasma-infected airways but is not required for microvascular remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L307-L317
- Baskar S, Ostrand-Rosenberg S, Nabavi N, Nadler LM, Freeman GJ, Glimcher LH (1993) Constitutive expression of B7 restores immunogenicity of tumor cells expressing truncated major histocompatibility complex class II molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 5687-5690
- Bedogni B, Welford SM, Cassarino DS, Nickoloff BJ, Giaccia AJ, Powell MB (2005) The hypoxic microenvironment of the skin contributes to Akt-mediated melanocyte transformation. *Cancer Cell* 8: 443-454
- Biswas C (1984) Collagenase stimulation in cocultures of human fibroblasts and human tumor cells. *Cancer Lett* 24: 201-207
- Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, Guo H, Nakamura T, Kataoka H, Nabeshima K (1995) The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res* 55: 434-439
- Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der BP (2006) Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 24: 175-208
- Bordador LC, Li X, Toole B, Chen B, Regezi J, Zardi L, Hu Y, Ramos DM (2000) Expression of emmprin by oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 85: 347-352

- Bostick PJ, Morton DL, Turner RR, Huynh KT, Wang HJ, Elashoff R, Essner R, Hoon DS (1999) Prognostic significance of occult metastases detected by sentinel lymphadenectomy and reverse transcriptase-polymerase chain reaction in early-stage melanoma patients. *J Clin Oncol* 17: 3238-3244
- Bretscher P, Cohn M (1970) A theory of self-nonsel discrimination 52. *Science* 169: 1042-1049
- Brown CE, Wright CL, Naranjo A, Vishwanath RP, Chang WC, Olivares S, Wagner JR, Bruins L, Raubitschek A, Cooper LJ, Jensen MC (2005) Biophotonic cytotoxicity assay for high-throughput screening of cytolytic killing. *J Immunol Methods* 297: 39-52
- Brown DR, Green JM, Moskowitz NH, Davis M, Thompson CB, Reiner SL (1996) Limited role of CD28-mediated signals in T helper subset differentiation. *J Exp Med* 184: 803-810
- Bröcker EB, Kuhlencordt KM, Müller-Ruchholtz W (1977) Microcytotoxicity test in allograft immunity: specificity and kinetics of effector T cells. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 53(3): 234-41
- Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP (2001a) CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 19: 565-594
- Chang TT, Jabs C, Sobel RA, Kuchroo VK, Sharpe AH (1999) Studies in B7-deficient mice reveal a critical role for B7 costimulation in both induction and effector phases of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 190: 733-740
- Chen L, McGowan P, Ashe S, Johnston J, Li Y, Hellstrom I, Hellstrom KE (1994) Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity. *J Exp Med* 179: 523-532
- Chen X, Lin J, Kanekura T, Su J, Lin W, Xie H, Wu Y, Li J, Chen M, Chang J (2006) A small interfering CD147-targeting RNA inhibited the proliferation, invasiveness, and metastatic activity of malignant melanoma. *Cancer Res* 66: 11323-11330
- Chitnis T, Najafian N, Abdallah KA, Dong V, Yagita H, Sayegh MH, Khoury SJ (2001) CD28-independent induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 107: 575-583
- Claffey KP, Brown LF, del Aguila LF, Tognazzi K, Yeo KT, Manseau EJ, Dvorak HF (1996) Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis, and experimental metastasis. *Cancer Res* 56: 172-181
- Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z (2000) MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 103: 481-490
- Croft M (2003) Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? 23. *Nat Rev Immunol* 3: 609-620
- Dawicki W, Bertram EM, Sharpe AH, Watts TH (2004) 4-1BB and OX40 act independently to facilitate robust CD8 and CD4 recall responses 18. *J Immunol* 173: 5944-5951
- de Vries TJ, van Muijen GN, Ruiter DJ (1996) The plasminogen activation system in tumour invasion and metastasis. *Pathol Res Pract* 192: 718-733
- DeCastro R, Zhang Y, Guo H, Kataoka H, Gordon MK, Toole B, Biswas G (1996) Human keratinocytes express EMMPRIN, an extracellular matrix metalloproteinase inducer. *J Invest Dermatol* 106: 1260-1265
- Della PP, Soeltl R, Krell HW, Collins K, O'Donoghue M, Schmitt M, Kruger A (1999) Combined treatment with serine protease inhibitor aprotinin and matrix metalloproteinase inhibitor Batimastat

- (BB-94) does not prevent invasion of human esophageal and ovarian carcinoma cells in vivo. *Anticancer Res* 19: 3809-3816
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004) The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22: 329-360
- Durko M, Navab R, Shibata HR, Brodt P (1997) Suppression of basement membrane type IV collagen degradation and cell invasion in human melanoma cells expressing an antisense RNA for MMP-1. *Biochim Biophys Acta* 1356: 271-280
- Egen JG, Kuhns MS, Allison JP (2002) CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat Immunol* 3: 611-618
- Eggert AO, Becker JC, Ammon M, McLellan AD, Renner G, Merkel A, Bröcker EB, Kämpgen E (2002) Specific peptide-mediated immunity against established melanoma tumors with dendritic cells requires IL-2 and fetal calf serum-free cell culture. *Eur J Immunol* 32: 122-127
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15: 188-200
- Ellis SM, Nabeshima K, Biswas C (1989) Monoclonal antibody preparation and purification of a tumor cell collagenase-stimulatory factor. *Cancer Res* 49: 3385-3391
- Erhard H, Rietveld FJ, van Altena MC, Brocker EB, Ruiter DJ, de Waal RM (1997) Transition of horizontal to vertical growth phase melanoma is accompanied by induction of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *Melanoma Res* 7 Suppl 2: S19-S26
- Fadool JM, Linser PJ (1993) 5A11 antigen is a cell recognition molecule which is involved in neuronal-glia interactions in avian neural retina. *Dev Dyn* 196: 252-262
- Ferrier CM, van Muijen GN, Ruiter DJ (1998) Proteases in cutaneous melanoma. *Ann Med* 30: 431-442
- Fossum S, Mallett S, Barclay AN (1991) The MRC OX-47 antigen is a member of the immunoglobulin superfamily with an unusual transmembrane sequence. *Eur J Immunol* 21: 671-679
- Freije JM, Balbin M, Pendas AM, Sanchez LM, Puente XS, Lopez-Otin C (2003) Matrix metalloproteinases and tumor progression. *Adv Exp Med Biol* 532: 91-107
- Gabison EE, Hoang-Xuan T, Mauviel A, Menashi S (2005) EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair. *Biochimie* 87: 361-368
- Gershenwald JE, Thompson W, Mansfield PF, Lee JE, Colome MI, Tseng CH, Lee JJ, Balch CM, Reintgen DS, Ross MI (1999) Multi-institutional melanoma lymphatic mapping experience: the prognostic value of sentinel lymph node status in 612 stage I or II melanoma patients. *J Clin Oncol* 17: 976-983
- Gett AV, Sallusto F, Lanzavecchia A, Geginat J (2003) T cell fitness determined by signal strength. *Nat Immunol* 4: 355-360
- Girvin AM, Dal Canto MC, Rhee L, Salomon B, Sharpe A, Bluestone JA, Miller SD (2000) A critical role for B7/CD28 costimulation in experimental autoimmune encephalomyelitis: a comparative study using costimulatory molecule-deficient mice and monoclonal antibody blockade. *J Immunol* 164: 136-143
- Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH (2005) The B7 family revisited 16. *Annu Rev Immunol* 23: 515-548

- Guo H, Zucker S, Gordon MK, Toole BP, Biswas C (1997) Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 272: 24-27
- Hellstrom I, Ledbetter JA, Scholler N, Yang Y, Ye Z, Goodman G, Pullman J, Hayden-Ledbetter M, Hellstrom KE (2001) CD3-mediated activation of tumor-reactive lymphocytes from patients with advanced cancer 72. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6783-6788
- Henriet P, Blavier L, Declerck YA (1999) Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in invasion and proliferation. *APMIS* 107: 111-119
- Hofmann UB, Becker JC, Bröcker EB (2002) [Role of matrix-degrading enzymes in melanoma progression]. *Hautarzt* 53: 587-595
- Hofmann UB, Eggert AA, Blass K, Bröcker EB, Becker JC (2003) Expression of matrix metalloproteinases in the microenvironment of spontaneous and experimental melanoma metastases reflects the requirements for tumor formation. *Cancer Res* 63: 8221-8225
- Hofmann UB, Eggert AA, Blass K, Bröcker EB, Becker JC (2005a) Stromal cells as the major source for matrix metalloproteinase-2 in cutaneous melanoma. *Arch Dermatol Res* 1-7
- Hofmann UB, Houben R, Bröcker EB, Becker JC (2005b) Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie* 87: 307-314
- Hofmann UB, Westphal JR, van Muijen GN, Ruiter DJ (2000) Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J Invest Dermatol* 115: 337-344
- Holdorf AD, Kanagawa O, Shaw AS (2000a) CD28 and T cell co-stimulation. *Rev Immunogenet* 2: 175-184
- Hu HM, Winter H, Ma J, Croft M, Urba WJ, Fox BA (2002) CD28, TNF receptor, and IL-12 are critical for CD4-independent cross-priming of therapeutic antitumor CD8+ T cells. *J Immunol* 169: 4897-4904
- Itoh T, Tanioka M, Matsuda H, Nishimoto H, Yoshioka T, Suzuki R, Uehira M (1999) Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice. *Clin Exp Metastasis* 17: 177-181
- Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S (1998) Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* 58: 1048-1051
- Iwashima M (2003) Kinetic perspectives of T cell antigen receptor signaling. A two-tier model for T cell full activation 53. *Immunol Rev* 191: 196-210
- Jia L, Zhou H, Wang S, Cao J, Wei W, Zhang J (2006) Deglycosylation of CD147 down-regulates Matrix Metalloproteinase-11 expression and the adhesive capability of murine hepatocarcinoma cell HcaF in vitro. *IUBMB Life* 58: 209-216
- Kanekura T, Chen X, Kanzaki T (2002) Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts. *Int J Cancer* 99: 520-528
- Kataoka H, DeCastro R, Zucker S, Biswas C (1993) Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial collagenase, stromelysin, and 72-kDa gelatinase. *Cancer Res* 53: 3154-3158

- Klein CA, Seidl S, Petat-Dutter K, Offner S, Geigl JB, Schmidt-Kittler O, Wendler N, Passlick B, Huber RM, Schlimok G, Baeuerle PA, Riethmuller G (2002) Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. *Nat Biotechnol* 20: 387-392
- Ko K, Yazumi S, Yoshikawa K, Konda Y, Nakajima M, Chiba T, Takahashi R (2000) Activation of fibroblast-derived matrix metalloproteinase-2 by colon-cancer cells in non-contact Co-cultures. *Int J Cancer* 87: 165-171
- Kruger A, Soeltl R, Sopov I, Kopitz C, Arlt M, Magdolen V, Harbeck N, Gansbacher B, Schmitt M (2001) Hydroxamate-type matrix metalloproteinase inhibitor batimastat promotes liver metastasis. *Cancer Res* 61: 1272-1275
- Kundig TM, Shahinian A, Kawai K, Mittrucker HW, Sebzda E, Bachmann MF, Mak TW, Ohashi PS (1996) Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells. *Immunity* 5: 41-52
- Kurschat P, Wickenhauser C, Groth W, Krieg T, Mauch C (2002) Identification of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) as the main gelatinolytic enzyme in malignant melanoma by in situ zymography. *J Pathol* 197: 179-187
- Lanzavecchia A, Sallusto F (2002) Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nat Rev Immunol* 2: 982-987
- Lauvau G, Vijh S, Kong P, Horng T, Kerksiek K, Serbina N, Tuma RA, Pamer EG (2001) Priming of memory but not effector CD8 T cells by a killed bacterial vaccine. *Science* 294: 1735-1739
- Leach DR, Krummel MF, Allison JP (1996) Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271: 1734-1736
- Lee JC, Chow NH, Wang ST, Huang SM (2000) Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer patients. *Eur J Cancer* 36: 748-753
- Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation 54. *Annu Rev Immunol* 14: 233-258
- Li G, Herlyn M (2000) Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Mol Med Today* 6: 163-169
- Li R, Huang L, Guo H, Toole BP (2001) Basigin (murine EMMPRIN) stimulates matrix metalloproteinase production by fibroblasts. *J Cell Physiol* 186: 371-379
- Liang Q, Xiong H, Gao G, Xiong K, Wang X, Zhao Z, Zhang H, Li Y (2005) Inhibition of Basigin Expression in Glioblastoma Cell Line via Antisense RNA Reduces Tumor Cell Invasion and Angiogenesis. *Cancer Biol Ther* 4: 759-762
- List AF (2001) Vascular endothelial growth factor signaling pathway as an emerging target in hematologic malignancies. *Oncologist* 6 Suppl 5: 24-31
- Loffek S, Zigrino P, Angel P, Anwald B, Krieg T, Mauch C (2005) High invasive melanoma cells induce matrix metalloproteinase-1 synthesis in fibroblasts by interleukin-1alpha and basic fibroblast growth factor-mediated mechanisms. *J Invest Dermatol* 124: 638-643
- Lucas PJ, Negishi I, Nakayama K, Fields LE, Loh DY (1995) Naive CD28-deficient T cells can initiate but not sustain an in vitro antigen-specific immune response. *J Immunol* 154: 5757-5768

- Lunter PC, van Kilsdonk JW, van Beek H, Cornelissen IM, Bergers M, Willems PH, van Muijen GN, Swart GW (2005) Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166/MEMD), a novel actor in invasive growth, controls matrix metalloproteinase activity. *Cancer Res* 65: 8801-8808
- Maccalli C, Pissarra P, Vegetti C, Sensi M, Parmiani G, Anichini A (1999) Differential loss of T cell signaling molecules in metastatic melanoma patients' T lymphocyte subsets expressing distinct TCR variable regions 71. *J Immunol* 163: 6912-6923
- MacDougall JR, Bani MR, Lin Y, Rak J, Kerbel RS (1995) The 92-kDa gelatinase B is expressed by advanced stage melanoma cells: suppression by somatic cell hybridization with early stage melanoma cells. *Cancer Res* 55: 4174-4181
- Malemud CJ (2006) Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci* 11: 1696-1701
- Manoharan C, Wilson MC, Sessions RB, Halestrap AP (2006) The role of charged residues in the transmembrane helices of monocarboxylate transporter 1 and its ancillary protein basigin in determining plasma membrane expression and catalytic activity. *Mol Membr Biol* 23: 486-498
- Marks R (2000) Epidemiology of melanoma. *Clin Exp Dermatol* 25: 459-463
- Marshall KW, Marks JD (2001) Engineering and characterization of a novel fusion protein incorporating B7.2 and an anti-ErbB-2 single-chain antibody fragment for the activation of Jurkat T cells 70. *J Immunother* 24: 27-36
- Matzinger P (2002) The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296: 301-305
- Miyauchi T, Kanekura T, Yamaoka A, Ozawa M, Miyazawa S, Muramatsu T (1990) Basigin, a new, broadly distributed member of the immunoglobulin superfamily, has strong homology with both the immunoglobulin V domain and the beta-chain of major histocompatibility complex class II antigen. *J Biochem (Tokyo)* 107: 316-323
- Miyauchi T, Masuzawa Y, Muramatsu T (1991) The basigin group of the immunoglobulin superfamily: complete conservation of a segment in and around transmembrane domains of human and mouse basigin and chicken HT7 antigen. *J Biochem (Tokyo)* 110: 770-774
- Muramatsu T, Miyauchi T (2003) Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histol Histopathol* 18: 981-987
- Muraoka K, Nabeshima K, Murayama T, Biswas C, Kono M (1993) Enhanced expression of a tumor-cell-derived collagenase-stimulatory factor in urothelial carcinoma: its usefulness as a tumor marker for bladder cancers. *Int J Cancer* 55: 19-26
- Nabeshima K, Iwasaki H, Koga K, Hojo H, Suzumiya J, Kikuchi M (2006) Emmprin (basigin/CD147): matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression. *Pathol Int* 56: 359-367
- Nabeshima K, Lane WS, Biswas C (1991) Partial sequencing and characterization of the tumor cell-derived collagenase stimulatory factor. *Arch Biochem Biophys* 285: 90-96
- Nabeshima K, Suzumiya J, Nagano M, Ohshima K, Toole BP, Tamura K, Iwasaki H, Kikuchi M (2004) Emmprin, a cell surface inducer of matrix metalloproteinases (MMPs), is expressed in T-cell lymphomas. *J Pathol* 202: 341-351
- Nagase H, Woessner JF, Jr. (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274: 21491-21494

- Nehme CL, Cesario MM, Myles DG, Koppel DE, Bartles JR (1993) Breaching the diffusion barrier that compartmentalizes the transmembrane glycoprotein CE9 to the posterior-tail plasma membrane domain of the rat spermatozoon. *J Cell Biol* 120: 687-694
- Nehme CL, Fayos BE, Bartles JR (1995) Distribution of the integral plasma membrane glycoprotein CE9 (MRC OX-47) among rat tissues and its induction by diverse stimuli of metabolic activation. *Biochem J* 310 (Pt 2): 693-698
- Ottino P, Finley J, Rojo E, Otlecz A, Lambrou GN, Bazan HE, Bazan NG (2004) Hypoxia activates matrix metalloproteinase expression and the VEGF system in monkey choroid-retinal endothelial cells: Involvement of cytosolic phospholipase A2 activity. *Mol Vis* 10: 341-350
- Parkhurst MR, Fitzgerald EB, Southwood S, Sette A, Rosenberg SA, Kawakami Y (1998) Identification of a shared HLA-A*0201-restricted T-cell epitope from the melanoma antigen tyrosinase-related protein 2 (TRP2). *Cancer Res* 58: 4895-4901
- Parmiani G, Castelli C, Dalerba P, Mortarini R, Rivoltini L, Marincola FM, Anichini A (2002) Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: what have we achieved? Where are we going? *J Natl Cancer Inst* 94: 805-818
- Polette M, Gilles C, Marchand V, Lorenzato M, Toole B, Tournier JM, Zucker S, Birembaut P (1997) Tumor collagenase stimulatory factor (TCSF) expression and localization in human lung and breast cancers. *J Histochem Cytochem* 45: 703-709
- Poon RT, Fan ST, Wong J (2001) Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 19: 1207-1225
- Renner C, Jung W, Sahin U, Denfeld R, Pohl C, Trumper L, Hartmann F, Diehl V, van Lier R, Pfreundschuh M (1994) Cure of xenografted human tumors by bispecific monoclonal antibodies and human T cells 68. *Science* 264: 833-835
- Riethdorf S, Reimers N, Assmann V, Kornfeld JW, Terracciano L, Sauter G, Pantel K (2006) High incidence of EMMPRIN expression in human tumors. *Int J Cancer* 119: 1800-1810
- Rundhaug JE (2005) Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 9: 267-285
- Salomon B, Bluestone JA (2001) Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol* 19: 225-252
- Sameshima T, Nabeshima K, Toole BP, Yokogami K, Okada Y, Goya T, Koono M, Wakisaka S (2000) Glioma cell extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) (CD147) stimulates production of membrane-type matrix metalloproteinases and activated gelatinase A in co-cultures with brain-derived fibroblasts. *Cancer Lett* 157: 177-184
- Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJ, Kaufmann M, Diebold J, Arnholdt H, Muller P, Bischoff J, Harich D, Schlimok G, Riethmuller G, Eils R, Klein CA (2003) From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7737-7742
- Schrama D, Terheyden P, Otto K, Kammerer U, Bröcker EB, Lühder F, Cosman D, Andersen MH, Becker JC (2006) Expression of the NKG2D ligand UL16 binding protein-1 (ULBP-1) on dendritic cells 27. *Eur J Immunol* 36: 65-72
- Schreurs MW, Eggert AA, de Boer AJ, Vissers JL, van Hall T, Offringa R, Figdor CG, Adema GJ (2000) Dendritic cells break tolerance and induce protective immunity against a melanocyte differentiation antigen in an autologous melanoma model. *Cancer Res* 60: 6995-7001

- Saulberger H, Lottspeich F, Risau W (1990) The inducible blood-brain barrier specific molecule HT7 is a novel immunoglobulin-like cell surface glycoprotein. *EMBO J* 9: 2151-2158
- Saulberger H, Unger CM, Risau W (1992) HT7, Neurothelin, Basigin, gp42 and OX-47--many names for one developmentally regulated immuno-globulin-like surface glycoprotein on blood-brain barrier endothelium, epithelial tissue barriers and neurons. *Neurosci Lett* 140: 93-97
- Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP, Kundig TM, Kishihara K, Wakeham A, Kawai K, Ohashi PS, Thompson CB, Mak TW (1993) Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 261: 609-612
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD (2001) IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410: 1107-1111
- Sharpe AH, Freeman GJ (2002) The B7-CD28 superfamily 15. *Nat Rev Immunol* 2: 116-126
- Sidhu SS, Mengistab AT, Tauscher AN, LaVail J, Basbaum C (2004) The microvesicle as a vehicle for EMMPRIN in tumor-stromal interactions. *Oncogene* 23: 956-963
- Speiser DE, Miranda R, Zakarian A, Bachmann MF, McKall-Faienza K, Odermatt B, Hanahan D, Zinkernagel RM, Ohashi PS (1997) Self antigens expressed by solid tumors Do not efficiently stimulate naive or activated T cells: implications for immunotherapy. *J Exp Med* 186: 645-653
- Sperling AI, Bluestone JA (1996) The complexities of T-cell co-stimulation: CD28 and beyond 56. *Immunol Rev* 153: 155-182
- Stackpole CW, Valle EF, Alterman AL (1991) B16 melanoma metastasis to an "artificial organ" implant. *Cancer Res* 51: 2444-2450
- Sternlicht MD, Bissell MJ, Werb Z (2000) The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. *Oncogene* 19: 1102-1113
- Sugiura T, Berditchevski F (1999) Function of alpha3beta1-tetraspanin protein complexes in tumor cell invasion. Evidence for the role of the complexes in production of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2). *J Cell Biol* 146: 1375-1389
- Sun J, Hemler ME (2001) Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res* 61: 2276-2281
- Suzuki S, Sato M, Senoo H, Ishikawa K (2004) Direct cell-cell interaction enhances pro-MMP-2 production and activation in co-culture of laryngeal cancer cells and fibroblasts: involvement of EMMPRIN and MT1-MMP. *Exp Cell Res* 293: 259-266
- Tada Y, Nagasawa K, Ho A, Morito F, Ushiyama O, Suzuki N, Ohta H, Mak TW (1999) CD28-deficient mice are highly resistant to collagen-induced arthritis. *J Immunol* 162: 203-208
- Tang W, Chang SB, Hemler ME (2004a) Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin-1. *Mol Biol Cell* 15: 4043-4050
- Tang Y, Kesavan P, Nakada MT, Yan L (2004b) Tumor-stroma interaction: positive feedback regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) expression and matrix metalloproteinase-dependent generation of soluble EMMPRIN. *Mol Cancer Res* 2: 73-80
- Tang Y, Nakada MT, Kesavan P, McCabe F, Millar H, Rafferty P, Bugelski P, Yan L (2005) Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases. *Cancer Res* 65: 3193-3199

- Tang Y, Nakada MT, Rafferty P, Laraio J, McCabe FL, Millar H, Cunningham M, Snyder LA, Bugelski P, Yan L (2006) Regulation of vascular endothelial growth factor expression by EMMPRIN via the PI3K-Akt signaling pathway. *Mol Cancer Res* 4: 371-377
- Tiffit CJ, Proia RL, Camerini-Otero RD (1992) The folding and cell surface expression of CD4 requires glycosylation. *J Biol Chem* 267: 3268-3273
- Tiscornia G, Singer O, Ikawa M, Verma IM (2003) A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1844-1848
- Townsend SE, Allison JP (1993) Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells. *Science* 259: 368-370
- Tropak MB, Roder JC (1997) Regulation of myelin-associated glycoprotein binding by sialylated cis-ligands. *J Neurochem* 68: 1753-1763
- Tsai S, Wear DJ, Shih JW, Lo SC (1995) Mycoplasmas and oncogenesis: persistent infection and multistage malignant transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10197-10201
- Van der Auwera, I, Cao Y, Tille JC, Pepper MS, Jackson DG, Fox SB, Harris AL, Dirix LY, Vermeulen PB (2006) First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. *Br J Cancer* 95: 1611-1625
- Van den Eynde BJ, van der BP (1997a) T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 9: 684-693
- Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G (2002) Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37: 375-536
- van Kempen LC, van den Oord JJ, van Muijen GN, Weidle UH, Bloemers HP, Swart GW (2000) Activated leukocyte cell adhesion molecule/CD166, a marker of tumor progression in primary malignant melanoma of the skin. *Am J Pathol* 156: 769-774
- Väisänen A, Kallioinen M, Taskinen PJ, Turpeenniemi-Hujanen T (1998) Prognostic value of MMP-2 immunoreactive protein (72 kD type IV collagenase) in primary skin melanoma. *J Pathol* 186: 51-58
- Visse R, Nagase H (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92: 827-839
- Wandel E, Raschke A, Hildebrandt G, Eberle J, Dummer R, Anderegg U, Saalbach A (2002) Fibroblasts enhance the invasive capacity of melanoma cells in vitro. *Arch Dermatol Res* 293: 601-608
- Wang L, Wu G, Yu L, Yuan J, Fang F, Zhai Z, Wang F, Wang H (2006) Inhibition of CD147 Expression Reduces Tumor Cell Invasion in Human Prostate Cancer Cell Line via RNA Interference. *Cancer Biol Ther* 5: 608-614
- Wen T, Kono K, Shahinian A, Kiessling R, Mak TW, Klein G (1997a) CD28 is not required for rejection of unmanipulated syngeneic and autologous tumors. *Eur J Immunol* 27: 1988-1993
- Westermarck J, Kahari VM (1999) Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 13: 781-792
- Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI, Strongin AY, Bocker EB, Friedl P (2003) Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* 160: 267-277

- Wolkers MC, Stoetter G, Vyth-Dreese FA, Schumacher TN (2001) Redundancy of direct priming and cross-priming in tumor-specific CD8+ T cell responses. *J Immunol* 167: 3577-3584
- Woolley DE, Grafton CA (1980) Collagenase immunolocalization studies of cutaneous secondary melanomas. *Br J Cancer* 42: 260-265
- Yang JM, Xu Z, Wu H, Zhu H, Wu X, Hait WN (2003) Overexpression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in multidrug resistant cancer cells. *Mol Cancer Res* 1: 420-427
- Yoshida S, Shibata M, Yamamoto S, Hagihara M, Asai N, Takahashi M, Mizutani S, Muramatsu T, Kadomatsu K (2000) Homo-oligomer formation by basigin, an immunoglobulin superfamily member, via its N-terminal immunoglobulin domain. *Eur J Biochem* 267: 4372-4380
- Yurchenko V, Pushkarsky T, Li JH, Dai WW, Sherry B, Bukrinsky M (2005) Regulation of CD147 cell surface expression: involvement of the proline residue in the CD147 transmembrane domain. *J Biol Chem* 280: 17013-17019
- Zhang B, Shih JW, Wear DJ, Tsai S, Lo SC (1997) High-level expression of H-ras and c-myc oncogenes in mycoplasma-mediated malignant cell transformation. *Proc Soc Exp Biol Med* 214: 359-366
- Zhang S, Wear DJ, Lo S (2000) Mycoplasmal infections alter gene expression in cultured human prostatic and cervical epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 27: 43-50
- Zheng HC, Takahashi H, Murai Y, Cui ZG, Nomoto K, Miwa S, Tsuneyama K, Takano Y (2006) Upregulated EMMPRIN/CD147 might contribute to growth and angiogenesis of gastric carcinoma: a good marker for local invasion and prognosis. *Br J Cancer* 95: 1371-1378
- Zigrino P, Loffek S, Mauch C (2005) Tumor-stroma interactions: their role in the control of tumor cell invasion. *Biochimie* 87: 321-328
- Zucker S, Hymowitz M, Rollo EE, Mann R, Conner CE, Cao J, Foda HD, Tompkins DC, Toole BP (2001) Tumorigenic potential of extracellular matrix metalloproteinase inducer. *Am J Pathol* 158: 1921-1928

9 PUBLIKATIONEN

EGGERT, A.O.; ANDERSEN, M.H.; **VOIGT, H.**; SCHRAMA, D.; KÄMPGEN, E.; THOR STRATEN, P.; BECKER, J.C. 2004. Characterization of mouse MAGE-derived H-2 K(b)-restricted CTL epitopes. *Eur. J. Immunol.* 34(11):3285-90.

SCHRAMA, D.; **VOIGT, H.**; EGGERT, A.O., XIANG, R.; REISFELD, R.A.; BECKER, J.C. 2005. Therapeutic efficacy of tumor-targeted IL2 in LTalpha (^{-/-}) mice depends on conditioned T cells. *Cancer Immunol Immunother.* 13: 1-6.

VOIGT, H.; SCHRAMA, D.; EGGERT, A.O., VETTER, C.S.; MÜLLER-BLECH, K.; REICHARDT, H.M.; ANDERSEN, M.H.; BECKER, J.C.; LÜHDER, F. 2005. CD28-mediated costimulation impacts on the differentiation of DC vaccination-induced T cell responses. *Clinical and Experimental Immunology* 143:93-102.

WOBSER, M.; **VOIGT, H.**; HOUBEN, R.; EGGERT, A.O., FREIWALD, M.; KÄMMERER, U.; KÄMPGEN, E.; SCHRAMA, D.; BECKER, J.C. 2006. Dendritic cell based antitumor vaccination: impact of functional Indoleamine 2,3-Dioxygenase expression. *Cancer Immunol Immunother.* 56(7):1017-24.

VOIGT, H.; HOUBEN, R.; SCHRAMA, D.; HOFMANN, U.B.; VETTER-KAUCZOK, C.S.; BECKER, J.C. 2007. MMP induction in the tumor stroma does not depend on CD147 expression in murine B16 melanoma. *TumorBiology* 28(4):229-237.

WOBSER, M.; **VOIGT, H.**; HOUBEN, R.; VETTER-KAUCZOK, C.S.; EGGERT, A.O.; BRÖCKER, E.B.; BECKER, J.C. 2007. Bcl-2 expression in rituximab refractory cutaneous B-cell lymphoma. *British Journal of Cancer* 96(10):1540-3.

SCHRAMA, D.; **VOIGT, H.**; EGGERT, A.O.; XIANG, R.; ZHOU, H.; SCHUMACHER, T.N.M.; ANDERSEN, M.H.; THOR STRATEN, P.; REISFELD, R.A.; BECKER, J.C. 2007. Immunological tumor destruction in a murine melanoma model by targeted LTα independent of secondary lymphoid tissue. *Cancer Immunology Immunotherapy* 57(1):85-95.

UGUREL, S.; HOUBEN, R.; SCHRAMA, D.; **VOIGT, H.**; ZAPATKA, M.; SCHADENDORF, D.; BRÖCKER, E.B.; BECKER, J.C. 2007. Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) gene amplification in metastatic melanoma is a prognostic marker for patient survival, but not a predictive marker for chemosensitivity and chemotherapy response. *Clin Cancer Res* [in press].

Konferenzbeiträge:

VOIGT, H.; SCHRAMA, D.; EGGERT, A.O.; KÄMPGEN, E. AND BECKER, J.C. (2004): Shift from systemic to site specific memory by tumor-targeted interleukin 2. *31te Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der dermatologischen Forschung*. Ausgewählt als Vortrag

VOIGT, H.; EGGERT, A.O.; SCHRAMA, D.; VETTER, C.S.; MÜLLER-BLECH, K.; LÜHDER, F. AND BECKER, J.C. (2004): CD28-mediated costimulation impacts on differentiation of DC-vaccination induced T cell response. (2004). *14te Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für dermatologische Onkologie*. Ausgewählt als Poster

VOIGT, H.; EGGERT, A.O.; SCHRAMA, D.; VETTER, C.S.; MÜLLER-BLECH, K.; LÜHDER, F. AND BECKER, J.C. (2005): CD28-mediated costimulation impacts on differentiation of DC-vaccination induced T cell response. *32te Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der dermatologischen Forschung*. Ausgewählt als Vortrag

VOIGT, H.; HOFMEISTER, V.; ULLRICH, R.; EGGERT, A.O. AND BECKER, J.C. (2006): Immunogenicity of seprase-derived peptide epitopes in mice. *16th European Congress of Immunology – ECI*. Ausgewählt als Poster

10 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Prof. Jürgen Becker für die Bereitstellung des interessanten Themas, seiner stetigen Förderung, sein Interesse am Fortgang der Arbeit und seiner ständigen Bereitschaft, wissenschaftliche Probleme und Ergebnisse zu diskutieren.

An dieser Stelle sei auch Frau Prof. Dr. Bröcker, der Leiterin der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie gedankt.

Herrn Prof. Dr. Thomas Raabe danke ich für seine Bereitschaft diese Dissertation als Vertreter des Fachbereiches Biologie zu begutachten.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei David bedanken, der mir als ständiger Ansprechpartner eine sehr große Hilfe und Stütze war. Außerdem möchte ich mich für die wöchentlichen Treffen bei Deiner Familie, bestehend aus Susi, Jann, Marten und Paula bedanken.

Mein großer Dank gilt auch Roland für das Korrekturlesen der Arbeit und für seine große Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Natürlich möchte ich auch dem ganzen Laborteam, bestehend aus Valeska, Orti, Uli, Sue, Eva-Maria, Claudia S, Claudia K, Manni, Wobsi, Tom, Katharina, Christiane und Miriam bedanken, die mich beim Gelingen meiner Arbeit in jeglicher Hinsicht unterstützt haben. Danke Euch allen!!

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Fred Lühder ganz herzlich für seine Unterstützung und für die Bereitstellung der CD28 k.o. Mäuse bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Tierpflegerin Susan Schellworth für die Pflege der Mäuse. Mein Dank geht auch an die DFG und an Frau Gabriele Nelkenstock, die im Rahmen der „Hilfe im Kampf gegen den Krebs e.V.“ Initiative für die finanzielle Absicherung des Projekts und meiner Arbeitskraft gesorgt hatten.

Meinen Eltern und Armin danke ich ganz besonders dafür, dass sie mich während meiner gesamten Studien- und Promotionszeit unterstützt haben und immer für mich da waren.

11 LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Heike Voigt
Geburtsdatum: 29. November 1978
Geburtsort: Crailsheim
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig

Schulausbildung

1984-1988 Grundschole Crailsheim
1989-1998 Albert-Schweitzer-Gymnasium Klasse 5-11
Mai 1998 Abitur

Hochschulausbildung

1999-2003 Studium der Biologie an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
Dezember 2002 Diplom mit den Hauptfächern Immunologie, Genetik und Mikrobiologie
2002 Beginn der Diplomarbeit am Institut für Immunologie der Universität Mainz in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Schmidt mit dem Thema: „Untersuchungen zu einer KLH-induzierten Immunantwort: Vergleich der T-Zell-aktivierenden Eigenschaften von frisch isolierten gegenüber *in vitro* generierten dendritischen Zellen“.
Oktober 2003 Beginn der Promotionsarbeit in der Hautklinik Würzburg in der Arbeitsgruppe von Prof Dr. Jürgen C. Becker mit dem Thema: „Tumor/Stroma Interaktionen im B16 Melanommodell: Rolle von CD147 für MMP Expression, Neoangiogenese und Metastasierung und Einfluss von CD28 auf anti- tumorale Immunantworten“.

12 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe und dabei keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher, noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsantrag urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Heike Voigt