

**Einfluss einer differentiellen Tumorglykosylierung  
auf die tumorassoziierte Entzündungsreaktion  
beim malignen Melanom der Maus  
(*Mus musculus*, Linnaeus, 1758)**

**Dissertation**

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften  
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik,  
Informatik und Naturwissenschaften,  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

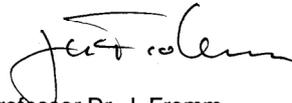
**Mike Jahn**

aus Gladbeck,  
Nordrhein-Westfalen

Hamburg, Juni 2012

Genehmigt vom Fachbereich Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Frau Dr. A. HORST  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Priv.-Doz. Dr. H. LÜTHEN  
Tag der Disputation: 04. Mai 2012

Hamburg, den 18. April 2012



Professor Dr. J. Fromm  
Vorsitzender des Promotionsausschusses  
Biologie

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2008 bis Oktober 2011 am Institut für Klinische Chemie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, durchgeführt, von Herrn Prof. Dr. Christoph Wagener angeleitet und von Frau Dr. Andrea Horst praktisch betreut.

Die Durchführung dieser Arbeit wurde gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des Arbeitsgruppenwettbewerbs Glykobiotechnologie, Projektnummer: 0315142

Eine Veröffentlichung dieser Arbeit ist in Vorbereitung.

**Poster:**

Early phases of tumour-mediated inflammation and angiogenesis in mouse melanoma: Effects of differential tumour glycosylation

Mike Jahn, Sabine Harenkamp, Alexandra Samsen, Inke Stange, Heike Pospisil, Christop Wagener, Andrea Kristina Horst

Die vier Kantischen Fragen:

Was kann ich wissen? (Erkenntnis)

Was soll ich tun? (Ethik)

Was darf ich hoffen? (Religion)

Was ist der Mensch? (Anthropologie)

*Was Gegenstände betrifft, so fern sie bloß durch Vernunft  
und zwar notwendig gedacht, die aber gar nicht in der Erfahrung gegeben  
werden können, so werden die Versuche sie zu denken hernach einen herrlichen  
Probierstein desjenigen abgeben, was wir als die veränderte Methode der  
Denkungsart annehmen, dass wir nämlich von den Dingen nur das a priori erkennen,  
was wir selbst in sie legen.*

*Immanuel Kant  
(1724 – 1804)  
aus  
„Kritik der reinen Vernunft“*

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Tumorgenese / emerging hallmarks of cancer.....	1
1.2 Zelluläre Oberflächenglykane und Tumorglykosylierung.....	3
1.3 Tumorale (Mikro-)Umgebung.....	9
1.3.1 Das hämatopoetische System.....	10
1.4 Das maligne Melanom .....	19
1.4.1 Therapie und Heilungschancen.....	21
1.4.2 Prä-klinische Melanommodelle.....	25
<b>2. Zielsetzung</b> .....	26
<b>3. Material</b> .....	27
3.1 Chemikalien .....	27
3.2 Antibiotika .....	28
3.3 Proteine und Enzyme.....	28
3.4 Molekulargewicht-Standards.....	28
3.5 Puffer und Lösungen.....	29
3.6 Oligonukleotide .....	31
3.7 Assays / Kits .....	31
3.8 Verbrauchsmaterialien .....	32
3.9 Geräte .....	33
3.10 Antikörper.....	34
3.11 Plasmide .....	37
3.12 Zelllinien.....	38
3.13 Mausstamm .....	38
3.14 Microarrays .....	38
3.15 Software.....	39
<b>4. Methoden</b> .....	40
4.1 Arbeiten mit Prokaryoten.....	40
4.1.1 Anzucht von E.coli Bakterien auf Agarplatten.....	40
4.1.2 Anzucht von E.coli-Bakterien in Flüssigkulturen.....	40
4.1.3 Transformation von E.coli- Bakterien mit Plasmid DNA.....	40
4.1.4 PCR- Screening von E.coli Kolonien .....	41
4.1.5 Maxipräparation von Plasmid-DNA.....	41
4.2 Molekularbiologische Methoden.....	42

4.2.1 Fotometrische Quantifizierung von DNA .....	42
4.2.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	42
4.2.3 Analytische PCR.....	43
4.2.4 Sequenzierung von Plasmid-DNA .....	43
4.3 Arbeiten mit Eukaryoten.....	44
4.3.1 Kultivierung von B16 Melanomzellen.....	44
4.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	44
4.3.3 Stabile Transfektion mittels Lipo-Transfektion.....	45
4.3.4 Herstellung einer Einzelzellsuspension aus in vitro-Kulturen .....	45
4.4 Proteinbiochemische Methoden.....	45
4.4.1 Herstellung von Proteinlysaten.....	46
4.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	46
4.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	46
4.4.4 Western Blot/Immundefektion .....	46
4.5 Tierexperimentelle Arbeiten .....	47
4.5.1 Aufbereitung einer in vitro Zellsuspension zur s.c. Injektion.....	47
4.5.2 Subkutane Injektion in C57BL/6J.....	47
4.5.3 Versuchsablauf zum B16 Tumorwachstum .....	48
4.5.4 Tötung von Tieren und Blutentnahme/Biopsie.....	48
4.5.5 Serumgewinnung und Metabolitenmessung mittels ELISA .....	49
4.5.6 Immunhistochemische Methoden.....	49
4.5.7 Immunhistochemie von Paraffinschnitten.....	50
4.5.8 Immunfluoreszenz von Kryoschnitten.....	51
4.5.9 Mikroskopische Auswertung.....	51
4.5.10 Tumor-, Blut- und Lymphgefäßflächenbestimmung.....	51
4.6 Durchflusszytometrie (FACS).....	53
4.6.1 Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Gewebeproben.....	54
4.6.2 Färbung, Messung und Analyse von Proben.....	54
4.6.3 Auswertungsstrategien zur Analyse von Zielpopulationen .....	55
4.7 Statistik/Mathematische Auswertung (T-Test).....	64
4.8 Darstellung von Zahlenwerten in einer Farbskala (Heatmap) .....	64
<b>5. Ergebnisse .....</b>	<b>65</b>
5.1 Analytische PCR zur Insertkontrolle der eingesetzten Vektoren.....	65
5.2 In vitro Expression von Ceacam1, Le <sup>x</sup> , sLe <sup>x</sup> und sLe <sup>a</sup> .....	66

5.3 Makroskopische Lokalisation und Vaskularisation von B16-Melanomen nach 10 Tagen Wachstum .....	69
5.4 Expression von Ceacam1, Le <sup>x</sup> , sLe <sup>x</sup> und sLe <sup>a</sup> in B16-Melanomen .....	70
5.5 Quantifizierung von B16-Melanom-, Blut- und Lymphgefäßflächen .....	74
5.5.1 Quantifizierung CD11b <sup>+</sup> /LYVE-1 <sup>+</sup> tumorassoziiertes Leukozyten .....	78
5.6 Genexpressionsanalyse (Microarray) inguinaler Lymphknoten .....	79
5.7 FACS-Analytik differentieller Leukozytenpopulationen .....	83
5.7.1 Quantifizierung myelomonozytärer Vorläuferzellen .....	84
5.7.2 Quantifizierung von F4/80 <sup>+</sup> -TAMs .....	85
5.7.3 Serumanalytik Leukozyten-polarisierender Zytokinen .....	86
5.7.4 Quantifizierung von TAMs mit einer phänotypischen M1/M2-Polarisation .....	88
5.7.5 Quantifizierung differentieller M2-TAM-Subpopulationen .....	89
5.7.6 Quantifizierung von <i>myeloid derived suppressor cells</i> (MDSCs) .....	92
5.7.7 Quantifizierung CD11c <sup>+</sup> dendritischer Zellen .....	98
5.7.8 Quantifizierung aktivierter CD11b <sup>+</sup> -B-Lymphozyten .....	102
5.7.9 Quantifizierung differentieller T-Lymphozytenpopulationen .....	104
5.7.10 Quantifizierung differentieller NK-Zellpopulationen .....	112
<b>6. Heatmap der untersuchten Leukozytenpopulationen .....</b>	<b>115</b>
<b>7. Diskussion .....</b>	<b>117</b>
7.1 Vergleich der in vitro/in vivo Expression von Ceacam1 .....	117
7.2 Vergleich der Vaskularisation und untersuchter Zellpopulationen mit potentiell pro-angiogenen Funktionen .....	120
7.3 Möglicher Einfluss untersuchter Leukozytenpopulationen der angeborenen und adaptiven Immunabwehr auf das B16-Melanomverhalten .....	127
<b>8. Zusammenfassung .....</b>	<b>137</b>
<b>9. Summary .....</b>	<b>138</b>
<b>10. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>139</b>
<b>11. Anhang .....</b>	<b>150</b>
11.1 Vektorkarten .....	150
11.2 ELISA-Assay Antikörpertestung .....	153
<b>12. Danksagung .....</b>	<b>154</b>
<b>13. Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>155</b>

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Konzept zur Selektion von <i>driver</i> und <i>passenger</i> Mutationen über die Zeit.....	2
Abbildung 2: emerging hallmarks of cancer.....	3
Abbildung 3: Hauptklassen von Glykokonjugaten auf Säugerzellen.....	4
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Biosynthese von Lewis-Antigenen .....	5
Abbildung 5: Einfluss der Glykosylierung auf die Oberflächenorganisation einer Zelle.....	7
Abbildung 6: Zellspezies der tumoralen (Mikro-) Umgebung.....	9
Abbildung 7: Adulte Hämatopoese .....	10
Abbildung 5: Klassische und alternative Aktivierung von Makrophagen.....	12
Abbildung 9: Histologischer Aufbau von Haut und histopathologische Abfolge der Entwicklung maligner Melanome.....	21
Abbildung 10: Fidler-Experiment zur Erzeugung der B16-Melanomzelllinien.....	25
Abbildung 11: pcDNA3.1-Vektorkarten mit Transgenen .....	37
Abbildung 12: <i>Standard operating protocoll</i> zum B16 in vivo Wachstum.....	48
Abbildung 13: Panorama eines Kryoschnitts aus 26 Einzelbildern.....	52
Abbildung 14: Negativ eines Panoramas zur Flächenberechnung.....	53
Abbildung 15: Auswertungsstrategie Expression von Ceacam1, Le <sup>x</sup> und sLe <sup>x/a</sup> .....	57
Abbildung 16: Auswertungsstrategie myelomonozytäre Vorläuferzellen und TAMs..	58
Abbildung 17: Auswertungsstrategie <i>myeloid derived suppressor cells</i> (MDSCs).....	59
Abbildung 18: Auswertungsstrategie CD11c <sup>+</sup> dendritische Zellen.....	60
Abbildung 19: Auswertungsstrategie CD11b <sup>+</sup> -B-Lymphozyten.....	61
Abbildung 20: Auswertungsstrategie differentielle T-Lymphozytenpopulationen.....	62
Abbildung 21: Auswertungsstrategie differentielle NK-Zellpopulationen.....	63
Abbildung 22: Heatmap einer Zahlenreihe als Schwarz/Gelb-Skala .....	64
Abbildung 23: Analytische PCR zur Insertkontrolle .....	65
Abbildung 24: In vitro Expression von Ceacam1 im Western Blot.....	66
Abbildung 25: In vitro Expression von Ceacam1, Le <sup>x</sup> , sLe <sup>x</sup> und sLe <sup>a</sup> im FACS.....	68
Abbildung 26: Makroskopische Lokalisation und Vaskularisation eines B16 <sup>mock</sup> -Melanoms nach 10 Tagen Wachstum.....	69
Abbildung 27: Expression von Ceacam1, Le <sup>x</sup> , sLe <sup>x</sup> und sLe <sup>a</sup> in B16-Melanomen.....	71
Abbildung 28: Ko-Expression von Le <sup>x</sup> , sLe <sup>x</sup> oder sLe <sup>a</sup> auf CC1 <sup>+</sup> Zelle in B16-Melanomen .....	72

Abbildung 29: Ko-Expression von sLe <sup>x</sup> oder sLe <sup>a</sup> auf CC1 <sup>+</sup> /Le <sup>x+</sup> Zellen in B16-Melanomen.....	73
Abbildung 30: Immunhistochemie α-LYVE-1 in Lymphknoten und B16-Melanom.....	75
Abbildung 31: Immunfluoreszenz Meca32 <sup>+</sup> -Blutgefäße, LYVE-1 <sup>+</sup> -Lymphgefäße und tumorassoziierte CD11b <sup>+</sup> /LYVE-1 <sup>+</sup> -Leukozyten in B16-Melanomen.....	76
Abbildung 32: DAPI <sup>+</sup> -Gesamtfläche von B16-Melanomen.....	77
Abbildung 33: Meca32 <sup>+</sup> -Blut- und LYVE-1 <sup>+</sup> -Lymphgefäßfläche.....	77
Abbildung 34: Anzahl tumorassoziiertes CD11b <sup>+</sup> /LYVE-1 <sup>+</sup> -Leukozyten.....	78
Abbildung 35: Kontext-abhängige Gruppierung hochregulierter mRNAs (Globalanalyse).....	80
Abbildung 36: FSC/SSC <i>height</i> Plots aus Milz, Lymphknoten und B16-Melanom im Vergleich.....	83
Abbildung 37: Quantifizierung CD11b <sup>+</sup> /Ly6C <sup>+</sup> myelomonocytyärer Vorläufer .....	84
Abbildung 38: Identifizierung von F4/80 <sup>+</sup> -TAMs.....	85
Abbildung 39: Quantifizierung von F4/80 <sup>+</sup> -TAMs.....	86
Abbildung 40: IFN $\gamma$ , IL-4, -10, -13 und PGE <sub>2</sub> Serumkonzentrationen.....	87
Abbildung 41: IFN $\gamma$ , IL-4, -10, -13 und PGE <sub>2</sub> -Serumzytokinprofil .....	87
Abbildung 42: Identifizierung von TAMs mit einer M1/2-Polarisation.....	88
Abbildung 43: Quantifizierung von TAMs mit einer M1/M2-Polarisation.....	89
Abbildung 44: Identifizierung differentieller M2-TAM-Subpopulationen .....	90
Abbildung 45: Quantifizierung von TEMs .....	90
Abbildung 46: Quantifizierung von CD36 <sup>+</sup> M2-TAMs.....	91
Abbildung 47: Identifizierung von CD11b <sup>+</sup> /Gr.1 <sup>+</sup> -MDSCs .....	93
Abbildung 48: Quantifizierung von CD11b <sup>+</sup> /Gr.1 <sup>+</sup> -MDSCs .....	93
Abbildung 49: Verteilung von VEGFR1, VEGFR3 und IGF1R auf CD11b <sup>+</sup> -Zellen ....	94
Abbildung 50: Identifizierung von VEGFR1 <sup>+</sup> -MDSCs .....	95
Abbildung 51: Quantifizierung von CD11b <sup>+</sup> /VEGFR1 <sup>+</sup> -Zellen.....	95
Abbildung 52: Identifizierung von IGF1R <sup>+</sup> -MDSCs .....	96
Abbildung 53: Quantifizierung von IGF1R <sup>+</sup> -G-MDSCs .....	97
Abbildung 54: Identifizierung CD11c <sup>+</sup> dendritischer Zellen (MDCs).....	99
Abbildung 55: Quantifizierung von CD11c <sup>+</sup> /CD11b <sup>+</sup> <i>versus</i> CD11c <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> MDCs.....	99
Abbildung 56: Identifizierung CD11c <sup>+</sup> /CD204 <sup>+</sup> dendritischer Zellen .....	101
Abbildung 57: Quantifizierung CD11c <sup>+</sup> /CD204 <sup>+</sup> dendritischer Zellen.....	101

Abbildung 58: Identifizierung aktivierter CD11b <sup>+</sup> -B-Lymphozyten .....	103
Abbildung 59: Quantifizierung aktivierter CD11b <sup>+</sup> -B-Lymphozyten.....	103
Abbildung 60: Quantifizierung CD4 <sup>+</sup> versus CD8 <sup>+</sup> -Gesamt .....	104
Abbildung 61: Verteilung einer CD127-Expression auf T-Lymphozyten .....	105
Abbildung 62: CD127-Expression auf CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten .....	106
Abbildung 63: Ratio CD4 <sup>+</sup> /CD127 <sup>low</sup> versus CD8 <sup>+</sup> /CD127 <sup>low</sup> .....	107
Abbildung 64: Identifizierung von +CD25 <sup>+</sup> versus +Klrg1 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten ...	108
Abbildung 65: Quantifizierung von +CD25 <sup>+</sup> versus +Klrg1 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten...	109
Abbildung 66: Identifizierung von +CD25 <sup>+</sup> versus +Klrg1 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten.....	110
Abbildung 67: Quantifizierung von +CD25 <sup>+</sup> versus +Klrg1 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten...	110
Abbildung 68: Identifizierung von CD8 <sup>+</sup> /CD11b <sup>+</sup> /CD11c <sup>-</sup> T-Lymphozyten .....	111
Abbildung 69: Quantifizierung von CD8 <sup>+</sup> /CD11b <sup>+</sup> /CD11c <sup>-</sup> T-Lymphozyten .....	111
Abbildung 70: Quantifizierung von CD49b <sup>+</sup> /CD244 <sup>+</sup> -NK-Zellen.....	112
Abbildung 71: Identifizierung differentieller NK-Zell-Populationen.....	113
Abbildung 72: Quantifizierung differentieller NK-Zell-Subpopulationen .....	114
Abbildung 73: Heatmap differentieller Leukozytenpopulationen in Milz, Lymphknoten und Melanom nach 10 Tagen B16 in vivo Wachstum	116
Abbildung 74: Hypothese der <i>in vitro/in vivo</i> Expression von Ceacam1-4L.....	120
Abbildung 75: Hypothese zum Zusammenhang der Meca32 <sup>+</sup> -Blutgefäßfläche, Le <sup>x</sup> -positiver Zellen und der Akkumulation pro-angiogener TAMs ....	122
Abbildung 76: Hypothese zum Zusammenhang zwischen der tumoralen Lymphvaskularisation und der Akkumulation von IGF1R <sup>+</sup> -G-MDSCs in B16 <sup>CC1</sup> -Tieren .....	126
Abbildung 77: Funktionen von CD36 <sup>+</sup> -Makrophagen.....	129
Abbildung 79: Vektorkarte pcDNA3.1(-) <sup>Zeo</sup> -hFUTIII .....	150
Abbildung 80: Vektorkarte pcDNA3.1(-) <sup>Zeo</sup> -hFUTIX .....	151
Abbildung 81: Vektorkarte pcDNA3.1(+) <sup>Neo</sup> -mCC1-4L.....	152
Abbildung 82: ELISA-Assay Antikörpertestung.....	153

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Zytokinprofil von T <sub>H</sub> und T <sub>Regs</sub> bei T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-vermittelten Immunantworten	16
Tabelle 2: Klinische Stadieneinteilung beim Melanom.....	22
Tabelle 3: Chemotherapeutika zur Therapie von Stadium III/IV Melanompatienten..	22
Tabelle 4: Oligonukleotide für Sequenzierungen und analytischer PCRs.....	31
Tabelle 5: Primärantikörper mit Verwendungszweck und Verdünnung .....	35
Tabelle 6: Sekundärantikörper mit Verwendungszweck und Verdünnung.....	35
Tabelle 7: Isotypkontrollen mit Verwendungszweck und Verdünnung.....	36
Tabelle 8: Standardprogramm für analytische PCRs.....	43
Tabelle 9: Standardprogramm für Sequenzierungen.....	44
Tabelle 10: Pixel/Längenverhältnis (µm) der verwendeten Objektive .....	52
Tabelle 11: Auswahl differentiell regulierter mRNAs in inguinalen Lymphknoten .....	81
Tabelle 12: Zellpopulationen mit Funktionen in angiogenen Prozessen.....	121
Tabelle 13: Auswahl aktivierender und inhibierender Rezeptoren auf NK-Zellen....	135

## Abkürzungsverzeichnis

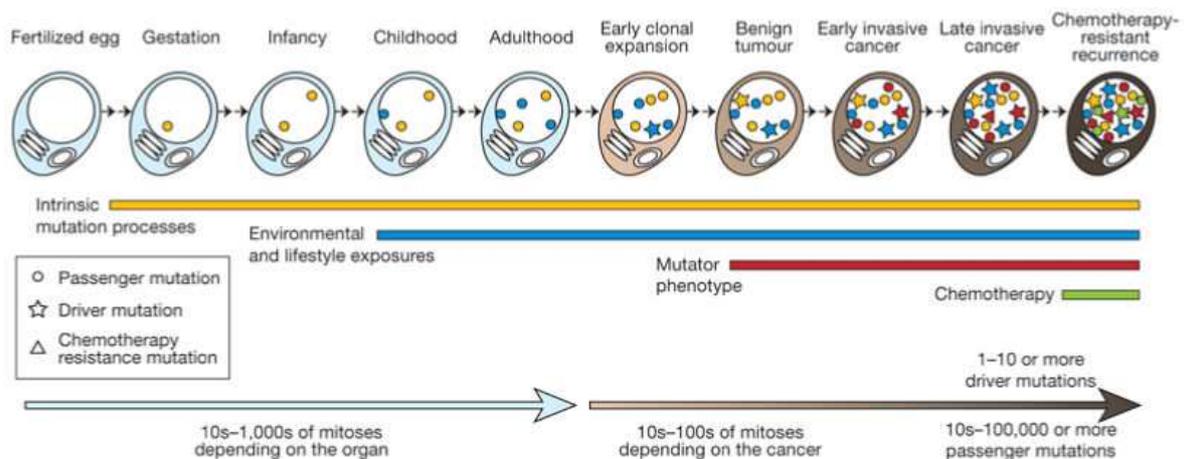
AK	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
BSA	Rinderserumalbumin
CLP	Gemeinsamer lymphoider Vorläufer
CLR	C-Typ Lektinrezeptor
CMP	Gemeinsamer myeloider Vorläufer
CMV	Cytomegalie Virus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fötales Kälberserum
IgG	Immunglobulin G
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
Le	Lewis Blutgruppen Antigen
LEC	Lymphatische Endothelzelle
MCS	multiple cloning site
MDSC	Myeloid-abgeleitete Suppressorzelle
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MTEC	Medulläre Thymusepithelzelle
NK	Natürliche Killerzelle
Pfu	Pyrococcus furiosus
poly (A)	Polyadenylierungssignal
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOB	super optimal broth-Medium
SOC	SOB + Glukose
sLe	Sialyl-Lewis Blutgruppen Antigen
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAM	Tumor-assoziiertes Makrophage
TE	Tris-EDTA
T <sub>H</sub>	T-Helfer-Lymphozyt
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur
T <sub>Reg</sub>	Regulatorischer T-Lymphozyt
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

# 1. Einleitung

## 1.1 Tumorgenese / emerging hallmarks of cancer

In höheren Organismen ist die kohärente Separierung der genetischen Erbinformation auf Tochterzellen nach einer Zellteilung von essentieller Bedeutung. Da Zellen jedoch ständig exo- und endogenen Schädigungen unterworfen sind, wurden im Lauf der zellulären Evolution Kontrollsysteme wie Reparatur-, Rekombinations-, oder Modifikationsmechanismen etabliert, mit denen die Zellen im Zuge des Zell-Zyklus darauf reagieren und entgegenwirken können. Alle bekannten Tumorerkrankungen resultieren dabei letztlich aus Mutationen des Erbguts, welche diese Kontrollsysteme an einer oder mehreren Stellen pathologisch verändern oder zu einer Dysfunktion führen. So war die erste, in einem Harnblasenkarzinom entdeckte Punktmutation, die der Auslöser für eine maligne (*bösartige*) Transformation von Zellen war, ein G>T Basenaustausch in Exon 12 des *hras*-Gens (p21), was zu einer Glycin>Valin-Substitution in translatiertem p21 führt<sup>1-2</sup>. Nach einem rezenten Modell kann Tumorgenese als ein evolutionär-dichotomer Prozess über die Zeit verstanden werden. Die Dichotomie bezieht sich dabei zum einen auf hereditäre Zufallsmutationen, die von Generation zu Generation akkumulieren (Keimbahnmutationen), als auch auf eine ontologische, *natürliche* Selektion auf Zellebene im Darwinistischen Sinne (somatische Mutationen). Bei dieser *natürlichen* Selektion können Mutationen sich entweder nachteilig auf z.B. die Proliferation oder das Überleben auswirken, was zu einer Eliminierung dieser Zellen führt (**negative** Selektion), oder aber vorteilhafte Mutationen führen zu einem klonalen Übergewicht betreffender Zellen in einem Gewebe/Organ (**positive** Selektion). Zellen einer positiv selektionierten Entität, die ein kritisches Maß an Mutationen erworben bzw. überschritten haben, durchlaufen als Folge eine benigne (*gutartige*) oder maligne Transformation, die mit dem Erwerb von Fähigkeiten zur z.B. autonomen Proliferation, der Invadierung von Gewebe oder dem Potential zur Fernmetastasierung einhergeht<sup>3-4</sup>. Verschiedene Arbeiten konnten allerdings zeigen, dass nicht zwangsläufig alle in einer Tumorzelle manifestierten Mutationen kausal für eine Tumorgenese sein müssen. Hieraus wurde das Konzept der sog. *driver* und *passenger*-Mutationen entwickelt (Abb.1). Unter *driver*-Mutationen werden dabei Mutationen zusammengefasst, die implizit kausal für die Tumorgenese sind und durch die spezifische Mikroumgebung eines Gewebes positiv selektioniert werden.

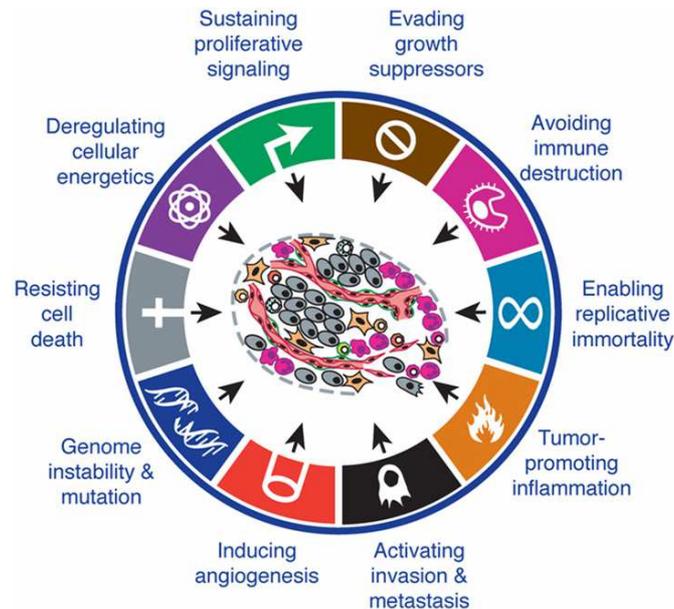
Die allelische Mutationsfrequenz bekannter *driver*, wie z.B. *p53* oder *myc*, ist bei verschiedenen Tumorerkrankungen unterschiedlich hoch <sup>5</sup>. Seit Technologien für genomweite Analysen (*screenings*) zur Verfügung stehen, ist die Aufklärung der Inzidenz von *driver*-Mutationen für spezifische Tumoren/Patientengruppen gegenwärtig Stand der Forschung zur Therapieverbesserung (individualisierte Therapie) <sup>6-8</sup>.



**Abbildung 1: Konzept zur Selektion von *driver* und *passenger* Mutationen über die Zeit**

Modell zum Ablauf mitotischer Zellteilungen von einer Zygote zu einer transformierten Zelle. Einige Mutationen werden bereits erworben während die Zelllinie selbst phänotypisch *gesund* ist. Durch die Akkumulation multipler Mutationen wird bei maligner Transformation durch sog. *driver*-Mutationen eine klonale Expansion betroffener Zellen ausgelöst <sup>8</sup>.

Auf Grundlage des Modells zur Tumorgenese auf Einzelzellebene wurde von Hanahan/Weinberg ein Modell für die Etablierung eines soliden Primärtumors vorgeschlagen, welches als ***emerging hallmarks of cancer*** bekannt ist (Abb.2) <sup>9</sup>. Das Hanahan/Weinberg-Modell versucht die Gesamtheit der molekularen und zellulären Wechselwirkungen der Beziehung Wirt↔Tumor zusammenzufassen, bzw. zu beschreiben, welche Eigenschaften ein Primärtumor adaptieren muss, um sich *in vivo* manifestieren und proliferieren zu können.



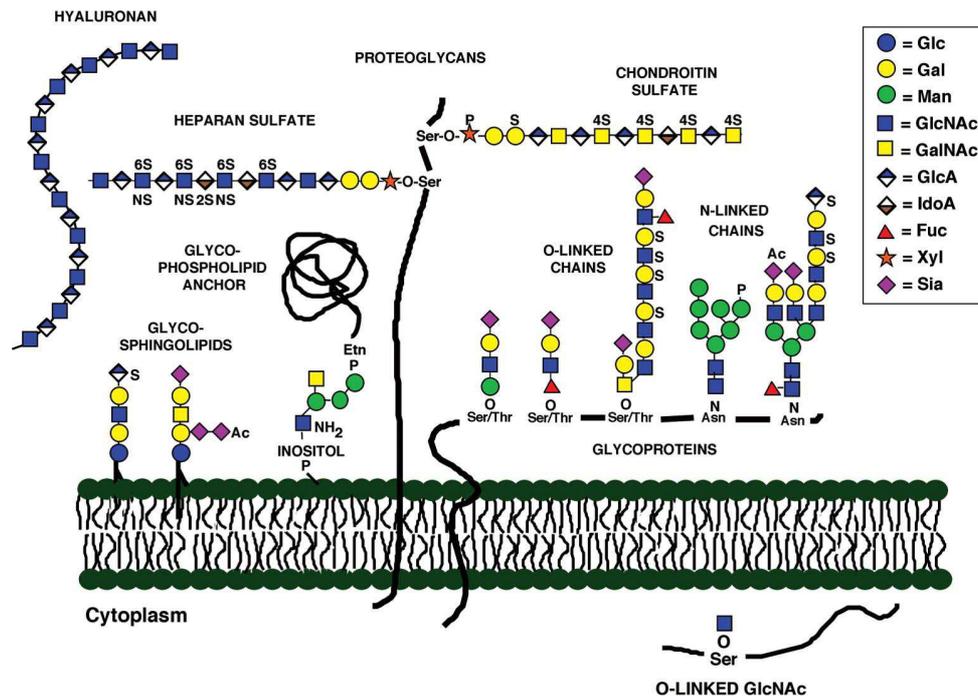
**Abbildung 2: emerging hallmarks of cancer**

Dieses von Hanahan/Weinberg vorgeschlagene Modell beinhaltet ursprünglich 6 *hallmarks*, welche auf aktuell 10 erweitert wurden<sup>9</sup>.

## 1.2 Zelluläre Oberflächenglykane und Tumorglykosylierung

Die Oberfläche aller bekannten Säugetierzellarten ist mit unterschiedlich komplex aufgebauten Kohlenhydratmolekülen (Glykokonjugaten) besetzt, welche in ihrer Gesamtheit als Glykokalyx bezeichnet werden. Die konkrete Zusammensetzung der Glykokalyx zu einem bestimmten Zeitpunkt auf der Oberfläche einer Zelle zeigt dabei ein multiples Expressionsmuster, das von Zelltyp, Umgebung und dem Entwicklungsgrad abhängt<sup>10-11</sup>. Die Kopplung von Glykokonjugaten kann sowohl auf Lipiden (Lipidoligosaccharide, Glykosphingolipide, Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker), als auch durch eine als *N*- oder *O*-Glykosylierung bezeichnete, posttranslationale Modifikation auf Proteinen erfolgen<sup>12</sup>. Abb.3 zeigt eine Übersicht der Hauptklassen von Glykokonjugaten, die auf Säugerzellen vorkommen. Aberrante Glykosylierungsmuster gehen dabei nicht selten mit pathologischen Veränderungen, inklusive maligner Transformation, der Zellen einher. Geht man davon aus, dass zelltypspezifische Glykokonjugate eine entscheidende Rolle in definierten Zell-Zell-Interaktionen spielen, bei denen sie als Liganden von z.B. Selektinen dienen, können Veränderungen der Glykosylierung, die aus einer malignen Transformation resultieren, neuartige bzw. pathologische Zell-Zell-Interaktionen nach sich ziehen. Hierbei wurde mehrfach beobachtet, daß in einem malignen Gewebe die Glykosylierung der Zelloberfläche oft einen fetalen oder undifferenzierten Zustand

widerspiegelt<sup>13-17</sup>. Sowohl *N*/*O*-Glykane als auch Spingolipide enthalten häufig poly-*N*-Acetylglukosamin-Ketten, die repetitiv aufgebaut sind (5-15<sub>n</sub>). Diese poly-*N*-Acetylglukosamin-Ketten werden im Golgi-Apparat durch spezifische Glykosyltransferasen modifiziert und erhalten dadurch verschiedene Funktionen. Tumorzellen überexprimieren regelmäßig poly-*N*-Acetylglukosamin-haltige Glykane, die häufig einen stark erhöhten Sialylierungs- und Fucosylierungsgrad aufweisen<sup>18</sup>.

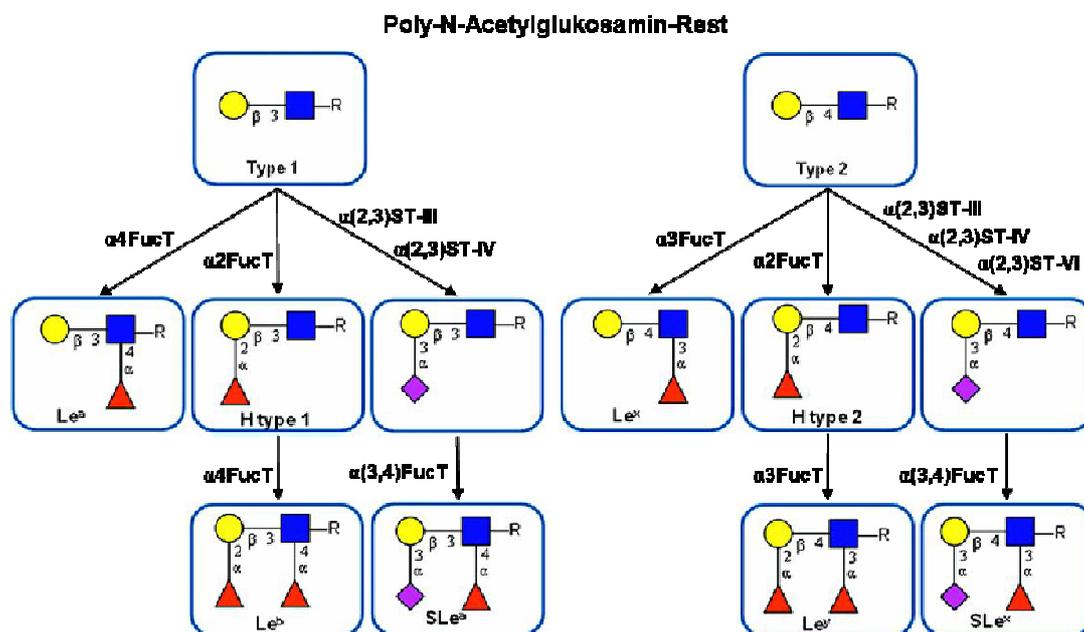


**Abbildung 3: Hauptklassen von Glykokonjugaten auf Säugerzellen**

Die Nomenklatur ist Übernommen aus: *Essentials of Glycobiology* (ISBN: 0-87969-560-9), Glc: Glukose; Gal: Galaktose; Man: Mannose; GlcNAc: N-acetylglukosamin; GalNAc: N-acetylgalaktosamin; GlcA: Glukuronsäure; IdoA: L-Iduronsäure; Fuc: L-Fucose; Xyl: Xylose; Sia: Sialinsäure; Ac: Acetyl; P: Phosphat; S: Sulfat; NS: N-Sulfat; Etn: Ethanolamin

Eine für die Krebsforschung wichtige Gruppe von Glykokonjugaten sind die sog. Lewis-Typ-Blutgruppen-Antigene (Le). Sie können terminal auf poly-*N*-Acetylglukosamin-Ketten vom Typ1 (GlcNAc $\beta$ 1,3Galaktose) oder Typ2 (GlcNAc $\beta$ 1,4Galaktose) synthetisiert werden. Die An-/Abwesenheit von Lewis-Antigenen hängt dabei von der An-/Abwesenheit spezialisierter Glykosyltransferasen ab, die eine Fucose (Fucosyltransferasen) oder eine Sialinsäure (Sialyltransferasen) anhängen können<sup>19</sup>. Abb.4 zeigt ein Schema zur Synthese von Lewis-Antigenen. Wird das interne *N*-Acetylglukosamin von  $\alpha$ 1,4-Fucosyltransferase (Typ1) oder  $\alpha$ 1,3-Fucosyltransferase (Typ2) fucosyliert, entstehen die Antigene Le<sup>a</sup> bzw. Le<sup>x</sup>. Wird die

terminale Galaktose durch die  $\alpha$ 1,2-Fucosyltransferase fucosyliert, entstehen die H Typ1/2 Lewis-Blutgruppenantigene, welche wiederum als Vorläufer zur Bildung von  $Le^b$  durch die  $\alpha$ 1,4-Fucosyltransferase, oder  $Le^y$  durch die  $\alpha$ 1,3-Fucosyltransferase dienen. Wird die terminale Galaktose stattdessen von  $\alpha$ 2,3-Sialyltransferasen sialyliert, können diese Epitope als Vorläufer zur Synthese sialylierter Lewis-Antigene ( $sLe$ ) durch  $\alpha$ 1,3/1,4-Fucosyltransferasen genutzt werden. Hierbei entstehen  $sLe^a$  (Typ1) oder  $sLe^x$  (Typ2).<sup>20-24</sup>.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Biosynthese von Lewis-Antigenen**

$sLe^x$ , sowie das Stereoisomer  $sLe^a$  entstehen durch einen Sialyierungsschritt ( $\alpha$ (2,3)Sialotransferase) an der terminalen Galaktose und einer internen  $\alpha$ (1,3) oder  $\alpha$ (1,4) fucosylierung an einem *N*-Acetylglukosaminrest. Die Synthese nicht-sialylierter Epitope ( $Le^{a,b,x,y}$ ) erfolgt durch direkte Fucosylierung. Bei der Biosynthese fucosylierter Glukosamine vom  $sLe^{a/x}$ -Typ stellt die terminale  $\alpha$ (1,3;1,4) Fucosylierung einen Schlüsselschritt dar.  $\alpha$ (2,3) Sialotransferasen können fucosylierte Kohlenhydrate nicht als Substrat benutzen, weshalb die Sialylierung vor der Fucosylierung erfolgen muss<sup>19</sup>.

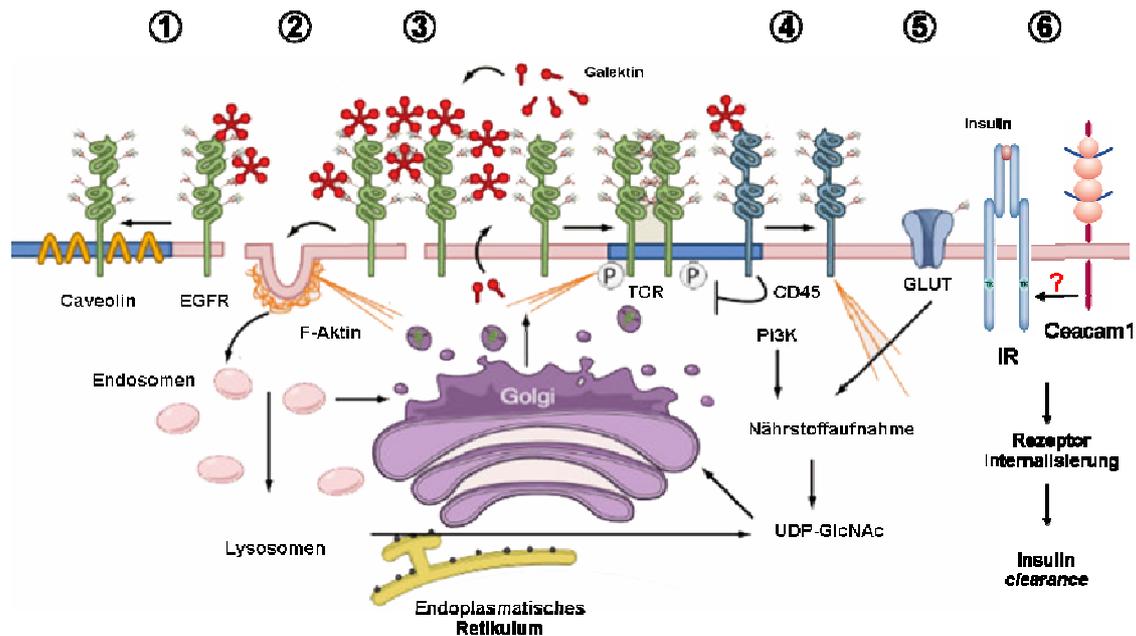
R: Poly-*N*-Acetylglukosaminrest; FucT: Fucosyltransferase; ST: Sialyltransferase;  $Le^a$ : LewisA;  $Le^b$ : LewisB;  $Le^y$ : LewisY;  $sLe^x$ : sialylLewisX;  $sLe^a$ : sialylLewisA; H type: ABH Blutgruppen System.

Die Relevanz sialylierter  $Le^{a/x}$ -Antigene bei der Progression und Metastasierung von Tumoren zeigte sich bereits Ende der 80er/20.Jhr. durch den Einsatz monoklonaler Antikörper gegen  $sLe^a$  und  $sLe^x$ . So konnte Dennis et al. zeigen, dass eine Erhöhung von poly-*N*-Acetylglukosamin-haltigen Glykanen auf der Oberfläche von Tumorzellen mit einer Erhöhung des Metastasierungspotentials assoziiert sein kann<sup>25</sup>. Darüber

hinaus deckten Studien verschiedener Gruppen mechanistische Parallelen zu bekannten inflammatorischen Prozessen bei der Adhäsion von Leukozyten aus der Blutzirkulation an Gefäßendothelien zu Adhäsions- und Invasionsprozessen metastasierender Tumoren auf. So konnte mehrfach gezeigt werden, dass bei einer hämatogenen Metastasierung Tumorzellen an E- (endotheliales) und P- (*platelet*) Selektin binden können und, analog zu Leukozyten, am Adhäsionsort in lokales Gewebe extravasieren. Das Potential zur Selektinbindung ist dabei abhängig von der Expression sialylierter und fucosylierter Glukosamine auf den Tumorzellen<sup>26-28</sup>.

Eine weitere Funktion der Glykosylierung einer Zelle ist deren Einfluss auf die Organisation von Subdomänen quervernetzter Makromoleküle. Die Plasmamembran einer Zelle verfügt über interne Subkompartimentierungen, in denen spezifische Moleküle lokal aufkonzentriert werden, z.B. zum Aufbau zellulärer Synapsen, spezifischer Zell-Zell-Kontakte, Membraninvaginationen oder der Regulierung des Influx/Efflux von Metaboliten<sup>29</sup>. Diese partielle Netzwerkbildung (*lattice*) kann über Glykanstrukturen selbst und/oder durch die Quervernetzung von Glykanen durch Galektine hergestellt werden. Durch den Auf-/Abbau solcher *lattices* kann die Zelle z.B. die Dauer und Stärke einer Signaltransduktion regulieren.

So konnten Partridge et. al und Lajoie et. al. zeigen, dass im Mammakarzinom die Bindung von Galektinen an die *N*-Glykane des EGFR (*epidermal growth factor receptor*) zu einer Verminderung der lateralen Diffusion und einer Verminderung der *coated-pit*-vermittelten Endozytose des EGFR führen<sup>30-31</sup>. Umgekehrt bewirkt in humanen Glioblastomen eine Mutation in der extrazellulären EGFRvIII-Domäne des EGFR, welche 4 von 12 möglichen *N*-Glykosylierungsstellen eliminiert, eine Erhöhung der Liganden-unabhängigen Rezeptordimerisierung des EGFR<sup>32</sup>. Detaillierte Strukturanalysen ergaben, dass Rezeptoren, welche bevorzugt Wachstum und Proliferation stimulieren, wie z.B. der IR (Insulin-Rezeptor), EGFR oder PDGFR (*platelet derived growth factor receptor*) ca. 5x mehr Glykosylierungsstellen haben als Rezeptoren, die in Organogenese, Differenzierung oder Wachstumskontrolle involviert sind<sup>33-34</sup>. Abb.5 zeigt einige Beispiele des Einflusses der Glykosylierung auf Oberflächenorganisation und Metabolismus einer Zelle.



**Abbildung 5: Einfluss der Glykosylierung auf die Oberflächenorganisation einer Zelle**

1/2) Kontrolle der Präsentation bzw. Internalisierung von Wachstumsfaktorrezeptoren durch Caveolin-1-positive Mikrovessikel (hier: EGFR, 2/3) Zusammenlagerung von Oberflächenproteinen durch Galektin-vermittelte Quervernetzung und *coated-pit* Endozytose 4) F-Aktin vermittelte Präsentation bzw. Internalisierung des T-Zell-Rezeptors und CD45 aus Gangliosid-GM1-positiven Mikrovessikeln 5) Regulation des Influx/Efflux von Nährstoffen 6) Mögliche Regulation der Insulinaufnahme durch eine CEACAM1-vermittelte Insulinrezeptor-Endozytose<sup>29</sup>.

EGFR: *epidermal growth factor receptor*; TCR: *T-cell receptor*; CD45: *Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C*; GLUT: *Glucose transporter*; IR: *Insulin receptor*; CEACAM1: *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule*

Beim IR, der 18 potentielle N-Glykosylierungsstellen hat, wird durch Insulinbindung die Oberflächenexposition von GLUT4 stimuliert, was zu einer massiven Aufnahme von Serumglukose führt<sup>35</sup>. Glukose und Glutamin stellen wiederum die Hauptmetaboliten des Energiestoffwechsels von Tumorzellen dar<sup>36</sup>. Als Bindungspartner des IR kommen, neben Insulin selbst, auch Mitglieder der IRS (*insulin receptor substrate family*) und der Immunglobulin-Superfamilie sog. CEACAMs (*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules*) in Frage<sup>37-38</sup>. CEACAMs sind in mannigfaltige, zelluläre Prozesse involviert, wie der Gewebsarchitektur<sup>39</sup>, Angiogenese<sup>40</sup>, Inflammation<sup>41</sup> oder als Rezeptoren wirtsspezifischer Viren<sup>42</sup> und Bakterien<sup>43</sup>. CEACAM1 ist ein hochglykosyliertes Transmembranprotein, dessen Extrazellulardomäne aus vier IgG-ähnlichen Domänen aufgebaut ist: eine N-terminale IgV-Domäne und drei aufeinanderfolgende IgC2-ähnliche Domänen (A1, B, A2). Bei der CEACAM1-mRNA-Prozessierung können durch alternatives Splicing die Isoformen 4L (*long*) und 4S (*short*) erzeugt

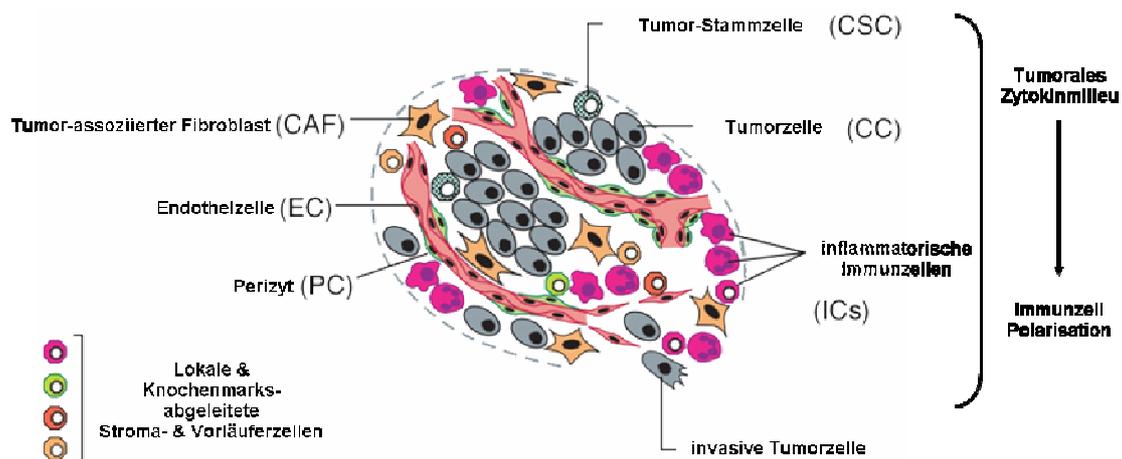
werden, wobei sich L und S auf die Anzahl der zytoplasmatischen Aminosäuren (AS) beziehen (in Maus: 4L=71 AS). Die 4L-Splicevariante enthält mehrere Serine, Threonine und Tyrosine, die potentielle Phosphorylierungsstellen sind. Zwei der Tyrosine bilden dabei ein sog. ITIM-Motiv (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*). Nach Bindung von Insulin an den IR kann CEACAM1 vom I/IR-Komplex direkt am Tyr-488 phosphoryliert werden (bei vorhandenem Ser-503). Tyr-488-phosphoryliertes CEACAM1 stimuliert die Endozytose des I/IR-Komplexes und lysosomale Insulindegradation, was letztlich eine CEACAM1-vermittelte negative Regulation der mitogenen Wirkung von Insulin auf die Zelle bedeutet (*insulin clearance*)<sup>37 44</sup>.

Ohtsubo et. al. konnte wiederum zeigen, dass die Glukosetransporter GLUT2 und GLUT4, welche jeweils eine N-Glykosylierungsstelle haben, für eine optimale Aktivitätsretention stark von der Verzweigung und einer Galektinbindung des N-Glykans abhängig sind<sup>45</sup>. Daraus folgte die Annahme, dass Glykoproteine mit nur ein oder zwei potentiellen Glykosylierungsstellen, wie GLUT2/4, ultrasensitiv für höhere Verzweigungsgrade (*branching*) vorhandener Glykane sind.

Zusammengefasst entsteht durch die Dynamik der glykan-abhängigen Netzwerkbildung eine Subkompartimentierung der Plasmamembran einer Zelle, durch die in höherer Ordnung die Gewebshomeostase je nach Bedarf gesteuert werden kann. Eine pathologische Glykansynthese nach maligner Transformation bringt diesen Zustand zwangsläufig ins Ungleichgewicht. So konnten Amano et. al und Stowell et. al. zeigen, dass eine terminale  $\alpha$ 2,6-Hypersialylierung auf N-Glykanen deren Affinität für Galektine vermindert, wohingegen eine GalNAc-Addition die Affinität und Avidität erhöht<sup>46-47</sup>.

### 1.3 Tumorale (Mikro-)Umgebung

Neben den Folgen, die eine maligne Transformation auf die Zellen selbst hat, befinden sich die Zellen bei der Entwicklung von einer Neoplasie zu einem soliden Primärtumor in Wechselwirkung mit ihrer unmittelbaren und mittelbaren Umgebung (*tumor micro-environment*). Sowohl die parenchymalen (neoplastische Epithelzellen), als auch die mesenchymalen (Stroma) Anteile eines Tumors beinhalten eine ganze Reihe verschiedener, spezialisierter Zelltypen, die in vielfältiger Weise wechselwirken. In Anlehnung an das *driver/passenger*-Modell zeigen Tumoren in der Histopathologie oft regionale, klonale Subpopulationen, die sich im Differenzierungsgrad, der Vaskularisation, oder der Immunzellinfiltration und -polarisation unterscheiden. Abb.6 zeigt eine Übersicht verschiedener Zellspezies, von denen im Allgemeinen angenommen wird, dass sie die Masse eines soliden Primärtumors ausmachen. Immunzellen (Leukozyten) sind Abkömmlinge des hämatopoetischen (Blut-) bildenden Systems. In adulten Säugern erfolgt die Hämatopoese primär im Knochenmark und z.T. in lymphatischen Geweben. Sie bildet den Ausgangspunkt der gesamten Neubildung des Blutes (Erythrozyten, Thrombozyten) und des Immunsystems.

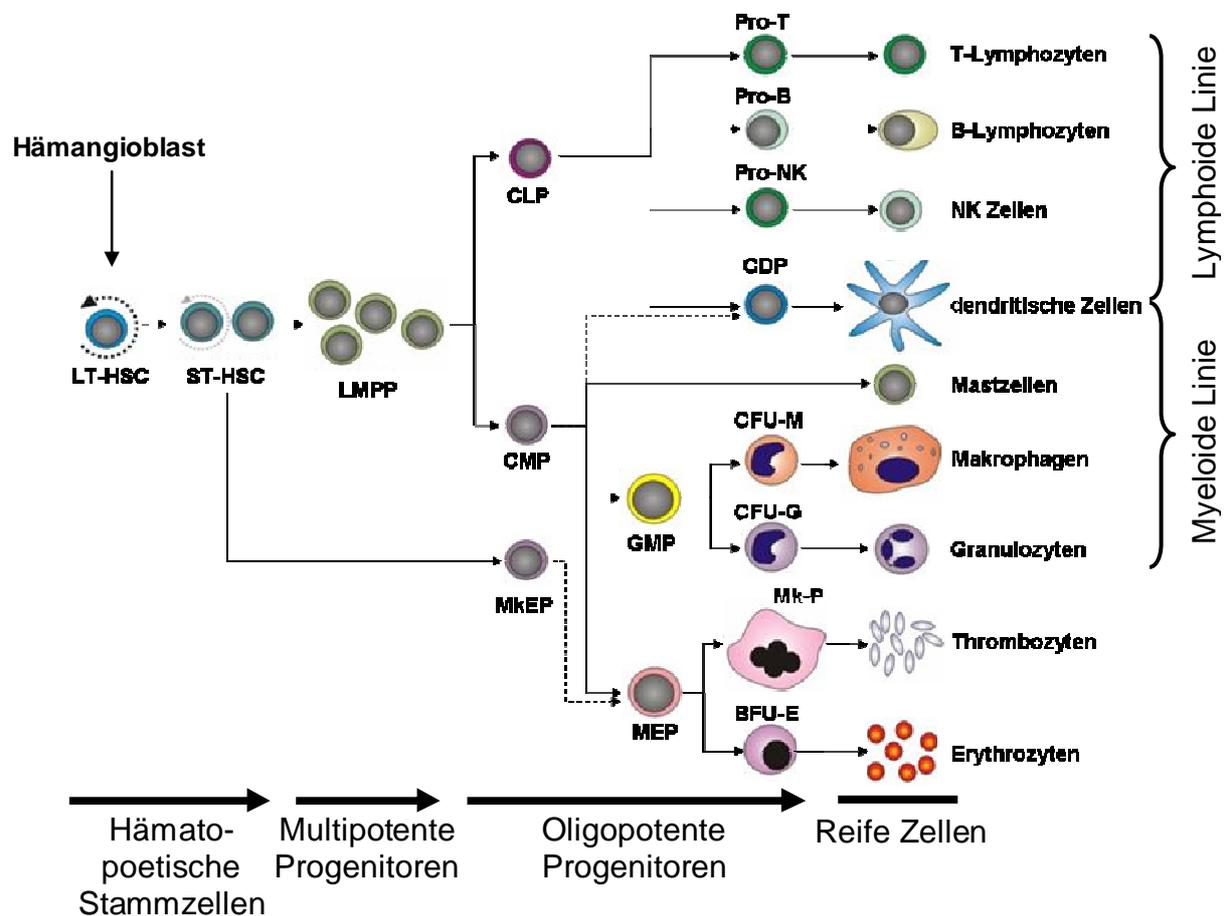


**Abbildung 6: Zellspezies der tumoralen (Mikro-) Umgebung**

CAF: Tumor-assoziiertes Fibroblast; EC: Endothelzelle; PC: Perizyt; CSC: Tumor-Stammzelle; CC: Tumorzelle; ICs: inflammatorische Immunzellen. Tumor-assoziierte inflammatorische Immunzellen repräsentieren häufig eine Populationsdiversität zwischen förderlichen (*tumor-promoting*) und zytotoxischen (*tumor-killing*) Subpopulationen (*polarisation*) in Abhängigkeit vom tumoralem Zytokinmilieu<sup>9</sup>.

### 1.3.1 Das hämatopoetische System

Das zelluläre Immunsystem besteht aus verschiedenen Leukozytenpopulationen, die sich aus einer gemeinsamen Stammzelle entwickeln (Hämangioblast). Der Hämangioblast fungiert dabei als eine gemeinsame, omnipotente Stammzelle, aus der sowohl hämatopoetische als auch endotheliale Zelltypen hervorgehen <sup>48</sup>. Die progressive Restriktion des Differenzierungsschicksals eines hämatopoetischen Progenitors wird dabei von Linien-spezifischen Transkriptionsfaktoren determiniert, die das Linien-spezifische Expressionsprofil kontrollieren <sup>49</sup>. Abb.7 zeigt ein Schema adulter Hämatopoese in der klassischen Darstellung der Differenzierung myeloider und lymphoider Leukozytenpopulationen.



**Abbildung 7: Adulte Hämatopoese**

In der klassischen Darstellung des hämatopoetischen Systems spalten sich differenzierte Leukozytenpopulationen in die myeloide und lymphoide Linie auf <sup>50</sup>.

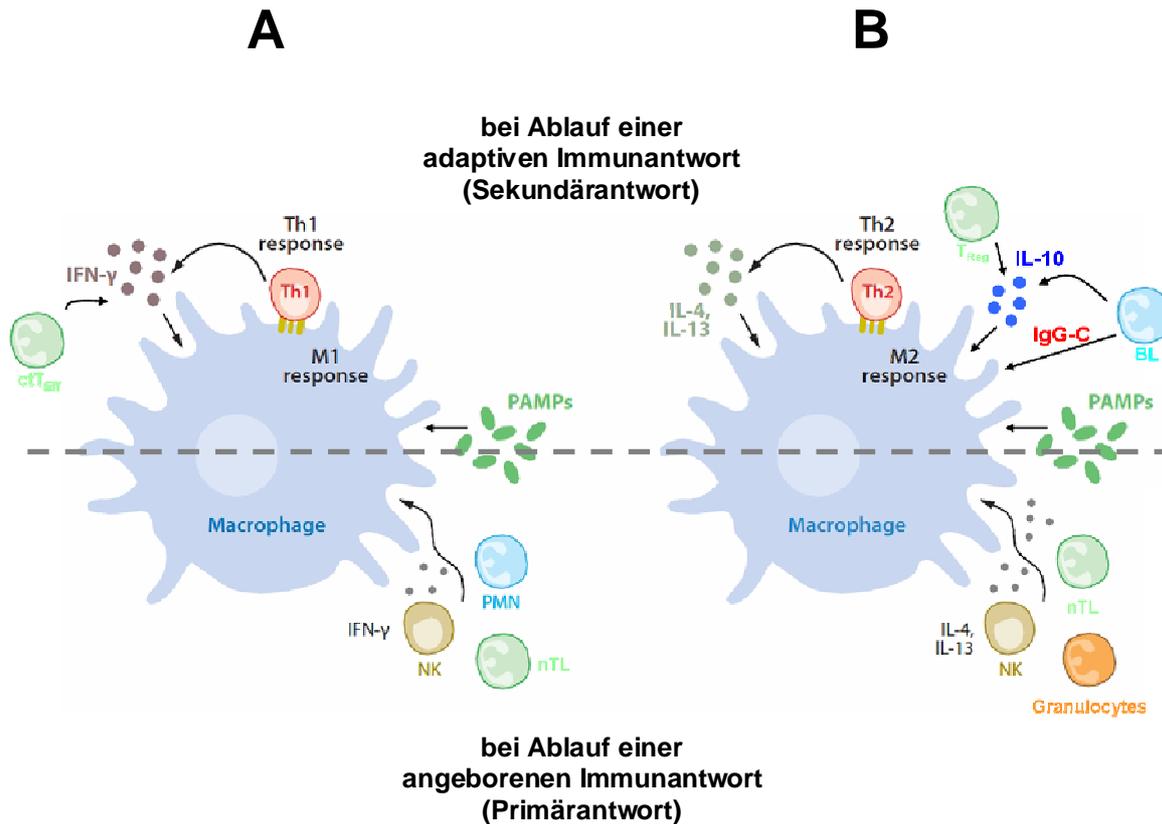
LT-HSC: *long-term haematopoietic stem cell*; ST-HSC: *short-term haematopoietic stem cell*; LMPP: *lymphoid primed multipotent progenitor*; CLP: *common lymphoid progenitor*; CMP: *common myeloid progenitor*; MEK: *megakaryocyte and erythrocyte progenitor*; GDP: *common dendritic progenitor*; GMP: *granulocyte and macrophage progenitor*; CFU-M: *colony-forming unit macrophages*; CFU-G: *colony-forming unit granulocytes*; Mk-P: *megakaryocyte progenitor*; BFU-E: *blast-forming unit erythrocyte*

Die Reaktion des Immunsystems auf ein Pathogen wird in zwei grundlegende Mechanismen eingeteilt, die als **angeborene (nicht-klonale) und adaptive (klonale) Immunabwehr (Immunität)** bezeichnet werden.

Zur zellulären, angeborenen Abwehr gehören Makrophagen, Mastzellen, Granulozyten, NK-Zellen und z.T. APCs (*antigen presenting cells*). Die humorale, angeborene Immunabwehr wird vom Komplementsystem und Zytokinen ausgemacht. Das Komplementsystem besteht aus ca. 30 Enzymen und Enzymvorstufen im Blutserum. Diese Proteine können Membranen von Mikroorganismen zerstören, bestimmte Proteine spalten und bereiten Bakterien auf den Zugriff von Makrophagen vor (Komplement-Opsonierung).

Bei Makrophagen unterscheidet man zwischen klassisch (M1) und alternativ (M2) aktivierten Makrophagen (Abb.8). Eine M1-Aktivierung wurde dabei als kanonisch destruktiver Phänotyp definiert. M2-Makrophagen zeigen hingegen eine erhöhte Phagozytoserate, erhöhte Expressionen von *scavenger*-, Mannose- und Galaktoserezeptoren, sowie ein anderes Zytokinprofil als M1-Makrophagen<sup>51-53</sup>.

Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs) konnte in vielen Tumormodellen/-erkrankungen ein M2-ähnliches Expressionsprofil zugeordnet werden, und eine erhöhte M2-TAM-Akkumulation ist häufig mit einer schlechteren Prognose assoziiert<sup>54</sup>. Die M2-phänotypische Konsistenz scheint bei TAMs aber weniger M2-stringent und stabil zu sein als in bakteriellen oder parasitären Infektionsmodellen. So konnte im Mammakarzinom gezeigt werden, dass TAMs in einem normoxischen Bereich des Tumors eher M1-Marker und pro-inflammatorische Zytokine wie IL-6 exprimierten, in hypoxischen Bereichen hingegen eher M2-Marker<sup>55</sup>. In *in vitro* Experimenten konnten ferner verschiedene Gruppen zeigen, dass isolierte M2-TAMs durch Supplementation mit IFN $\gamma$ , Blockierung des IL-10R, oder der Aktivierung des *Notch*-Signalweges in einen M1-Phänotyp umpolarisiert werden konnten<sup>56-58</sup>.



**Abbildung 8: Klassische und alternative Aktivierung von Makrophagen**

Eine Aktivierung erfordert zwei Hauptsignale: eine Erkennung von PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) durch PRRs (*pattern recognition receptors*) und eine Stimulation mit IFN $\gamma$  oder IL-4, -10, -13 oder IgG-Komplexen. M1-Makrophagen entstehen durch eine Stimulation mit IFN $\gamma$ , das von NK-Zellen, PMNs (polymorphonuclear leucocyte) und naiven T-Lymphozyten während einer Primärantwort, oder von Th1 und zytotoxischen T<sub>Eff</sub> während einer Sekundärantwort gebildet werden kann. M2-Makrophagen entstehen durch eine Stimulation mit IL-4, -10, -13 oder IgG-Komplexen. IL-4 und -13 können von NK-Zellen, Granulozyten und naiven T-Lymphozyten während einer Primärantwort, und von Th2 während einer Sekundärantwort gebildet werden. IL-10 kann von B-Lymphozyten und T<sub>Regs</sub> gebildet werden. B-Lymphozyten sekretieren ferner IgGs. PAMPs: Lipopolysaccharidpartikel (LPS) von gram<sup>+</sup>Bakterien, Peptidoglykane und Lipoteichonsäure von gram<sup>+</sup>Bakterien, bakterielle und virale CpG DNA, bakterielles Flagellin und N-formylmethionin, virale ss/dsDNA sowie einige Mykosa-spezifische Glykane. Körpereigene Zellen können in Folge von Stress, einer Verletzung, Infektion oder Transformation ebenfalls als PAMPs wirken<sup>53</sup>.

ctT<sub>Eff</sub>: zytotoxischer CD8<sup>+</sup>T-Effektor-Lymphozyt, IFN $\gamma$ : Interferon gamma, Th1/2: CD4<sup>+</sup>T-Helfer-Lymphozyt Typ1/2, T<sub>Reg</sub>: regulatorischer CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyt, IgG-C: Gamma-Immunglobulin-Komplex, BL: B-Lymphozyt, NK: Natürliche Killerzelle, IL: Interleukin

Eine Population mit steigender Bedeutung in der Krebsforschung sind die sog. myeloid-abgeleiteten Suppressorzellen (MDSCs, *myeloid derived suppressor cells*). MDSCs repräsentieren einen speziellen Subtyp myeloider Progenitoren, der als ein chimärer, unreifer Phänotyp zwischen ausdifferenzierten Makrophagen und neutrophilen Granulozyten beschrieben wird. MDSCs werden in zwei Subtypen unterteilt: monozytäre MDSCs (M-MDSC) und granulozytäre MDSCs (G-MDSC).

Charakteristikum für M-MDSCs ist ein CD11b<sup>+</sup>/Ly6C<sup>high</sup>/Ly6G<sup>-</sup>-Phänotyp, für G-MDSCs ein CD11b<sup>+</sup>/Ly6C<sup>low</sup>/Ly6G<sup>+</sup>-Phänotyp<sup>1</sup>. Beide Subtypen entwickeln unter inflammatorischen Bedingungen immunsuppressive Eigenschaften, nutzen zur Exekution aber unterschiedliche Mechanismen. M-MDSCs sezernieren häufig NOS (Stickstoffmonoxidspezies), Prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>) und diverse Zytokine zur Antigen-unabhängigen Immunsuppression, wohingegen G-MDSCs bevorzugt ROS (reaktive Sauerstoffspezies) sezernieren und eine Antigen-abhängige Immunsuppression bei direkten Zell-Zell-Kontakten entfalten<sup>59-60</sup>. Neben ihrer immunsuppressiven Funktion wurden MDSCs auch als Akteure in Prozessen wie Angiogenese, Tumorzellinvasion und Metastasierung beschrieben<sup>61-62</sup>.

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind zytotoxische, zytokin-produzierende Lymphozyten, die für die Immunabwehr von viral-infizierten und maligne transformierten Zellen eine wichtige Rolle spielen. Die entscheidende Eigenschaft von NK-Zellen ist deren Fähigkeit zytotoxisch wirken zu können, ohne vorher von Außen speziell aktiviert werden zu müssen, und unabhängig von einer MHC-I-vermittelten Antigen-Erkennung unspezifisch Zielzellen abtöten zu können (MHC, *major histocompatibility complex*). Die Homeostase von NK-Zellen wird dabei durch eine kooperative Signaltransduktion aktivierender und inhibierender Rezeptoren reguliert. Zur Verhinderung einer Alloreaktivität können NK-Zellen über inhibitorische, MHC-I-bindende Rezeptoren zwischen Selbst- (*self*) und Nicht-Selbst (*non-self*) Zellen diskriminieren. Allogene Zellen, die entsprechende inhibitorische Liganden in Folge einer Infektion oder Transformation nicht mehr exprimieren, lösen bei Kontakt mit NK-Zellen eine alloreaktive Antwort (Induktion zur Zytolyse) in den NK-Zellen aus (*missing-self recognition*). Bei der *missing-self recognition* wird die Summe der Signale inhibitorischer Rezeptoren, durch das Fehlen von *self*-Liganden auf der Zielzelle, in den NK-Zellen kleiner. Die Summe der Signale aktivierender Rezeptoren bekommt dadurch ein Übergewicht. Folge: Induktion der NK-Zell-vermittelten Zytolyse der als *non-self* interpretierten Zielzelle.

---

<sup>1</sup> CD11b: Integrin  $\alpha M/\beta 2$   
Ly6C: Lymphocyte antigen 6 complex, locus C  
Ly6G: Lymphocyte antigen 6 complex, locus G

Bei einer Reifung durchlaufen NKPs (*NK cell progenitor*) einen Selektionsprozess, bei dem durch eine Stadien-abhängige Neoexpression inhibitorischer NK-Zell-Rezeptoren eine spezifische, MHC-I-vermittelte *self*-Antigenbindung an diese Rezeptoren als Reifungssignal wirkt („*arming*“). Von reifen NK-Zellen konnten mittlerweile mehrere Subtypen identifiziert werden:

- CD49b<sup>high</sup>/CD11b<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup>/CD27<sup>low</sup>-NK-Zellen<sup>2</sup>, wirken zytotoxisch, sezernieren IFN $\gamma$
- NK22-Zellen, sezernieren IL-22
- Klrg1<sup>high</sup>-NK-Gedächtniszellen (NK<sub>Memory</sub>)<sup>3</sup>
- Thymus-abgeleitete NK-Zellen (tNK), exprimieren CD127<sup>4</sup>, kommen hauptsächlich in Lymphknoten vor<sup>63</sup>.

Die adaptive Immunabwehr kommt ausschließlich bei Wirbeltieren vor. Sie ist erst nach Kontakt mit einem Pathogen möglich (Latenz). Neben dendritischen Zellen stellen zwei Leukozytenpopulationen die wesentlichen Elemente der adaptiven Immunität dar. T-Lymphozyten, welche die zelluläre Immunantwort gewährleisten, und B-Lymphozyten, die die humorale Immunantwort ausmachen. Hierbei werden von Plasmazellen (Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten) Antikörper sezerniert, die sich gegen Eindringlinge in den Körperflüssigkeiten (Humores) richten (Antikörper-Opsonierung). Nach einer Immunreaktion bleiben spezifische Gedächtniszellen erhalten (T-/B<sub>Memory</sub>), die bei erneutem Kontakt mit dem Pathogen binnen kurzer Zeit eine spezifische Abwehrreaktion ermöglichen.

T-Lymphozyten können in eine große Spannbreite diverser Subpopulationen ausdifferenzieren. Welche T-Lymphozytenpopulationen in welchem Ausmaß gebildet werden, ist abhängig von Art, Dauer und Schwere einer Erkrankung, fakultativer oder obligater Sekundärerkrankungen, oder dem Alter eines Individuums.

Die Reifung von T-Lymphozyten im Thymus folgt einer definierten Abfolge verschiedener Entwicklungsstadien. Aus dreifach-negativen CLPs (CD3<sup>-</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>)<sup>5</sup> entwickeln sich Prä-T-Lymphozyten, deren Merkmal der Beginn einer Expression des

---

<sup>2</sup> CD49b: Integrin  $\alpha 2/\beta 1$ , CD11b: Integrin  $\alpha M/\beta 2$ , CD43: Leukosialin, CD27: Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 7

<sup>3</sup> Klrg1: Killer cell lectin-like receptor, subfamily G, member 1

<sup>4</sup> CD127: Interleukin-7 receptor, subunit  $\alpha$

<sup>5</sup> CD3: T-cell surface glycoprotein CD3

CD4: T-cell surface glycoprotein CD4

CD8: T-cell surface glycoprotein CD8

CD3/TCR-Komplexes ist (TCR: *T cell receptor*). Es folgt ein Stadium mit einer Ko-Expression von CD4 und CD8 (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-DP, *double positive*). In diesem Stadium durchlaufen DP-T-Lymphozyten einen Selektionsprozess, der von medullären Epithelzellen des Thymus (MTECs) vermittelt wird<sup>64</sup>. MTECs exprimieren promiskuitiv körpereigene Antigene auf MHC I und II, an die der CD3/TCR der DP-T-Lymphozyten binden kann. Kommt diese MHC/TCR-Bindung nicht zustande, bekommen solche DP-T-Lymphozyten von den MTECs kein Überlebenssignal mehr und gehen in die Apoptose (*death by neglect*). Ist die MHC/CD3/TCR-Bindung hingegen zu stark (und zu lang), wird der DP-T-Lymphozyt „überaktiviert“ und geht ebenfalls in die Apoptose (negative Selektion). Das positive Selektionskriterium ist eine niedrig-affine Bindung zwischen körpereigenen MHCs und dem CD3/TCR. Solche DP-T-Lymphozyten können körpereigene MHCs erkennen, binden aber niedrig-affin genug um nicht von körpereigenen MHCs aktiviert zu werden, also nicht autoreaktiv sind (Selbsttoleranz). Je nachdem ob eine positiv selektierte Bindung über CD8/MHCI oder CD4/MHCII stattfand, entstehen als Folge einfach-positive CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten. Als Endergebnis verlassen nur T-Lymphozyten den Thymus, die diesen Selektionsprozess *erfolgreich* durchlaufen haben.

Reife T-Lymphozyten werden primär eingeteilt in:

- CD4<sup>+</sup>T-Helfer-Lymphozyten (T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17, T<sub>FH</sub>)
- regulatorische CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten (T<sub>Regs</sub>)
- zytotoxische CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten (T<sub>C</sub>1, T<sub>C</sub>2, T<sub>C</sub>17)
- NKT-Lymphozyten (Natürliche Killer T-Lymphozyten)
- γδ-T-Lymphozyten (gamma/delta-Antigenrezeptor-positive T-Lymphozyten)
- T-Gedächtniszellen (CD4<sup>+</sup>-T<sub>Memory</sub> versus CD8<sup>+</sup>-T<sub>Memory</sub>).

T<sub>Regs</sub> werden in zwei Hauptpopulationen eingeteilt: Natürlich auftretende T<sub>Regs</sub> (nT<sub>Reg</sub>), die im Thymus positiv selektioniert werden, und induzierte T<sub>Regs</sub> (iT<sub>Reg</sub>), die erst nach Verlassen des Thymus in der Peripherie ihren suppressiven Phänotyp durch Stimulation des CD3/TCR mit *self/non-self*-Antigenen erwerben. Die Aufrechterhaltung der Selbst-Toleranz peripherer T-Lymphozyten unter pathophysiologischen Bedingungen (*self/non-self discrimination*) wird dabei von immunsuppressiven iT<sub>Regs</sub> sichergestellt, für die mehrfach gezeigt werden konnte, dass sie essentiell für die Regulation immunologischer Selbst-Toleranz und Homeostase sind. Eine Depletion, bzw. zu niedrige Abundanz, führt sowohl im

murinen als auch im humanen System zur Entwicklung diverser Auto-Immunerkrankungen.

T<sub>Regs</sub> und T-Helfer-Lymphozyten (T<sub>H</sub>) koordinieren den Ablauf einer adaptiven Immunantwort durch die Aktivierung oder Suppression von Effektoren zytotoxischer CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten (T<sub>Eff</sub>) und B-Lymphozyten (B<sub>Eff</sub>). Anhand der von T<sub>H</sub>/T<sub>Reg</sub> ausgeschütteten Zytokine unterscheidet man zwischen einer T<sub>H</sub>Typ1 (T<sub>H</sub>1) und T<sub>H</sub>Typ2 (T<sub>H</sub>2)-vermittelten Immunantwort. Eine T<sub>H</sub>1-Antwort wirkt in der Summe pro-inflammatorisch, eine T<sub>H</sub>2/T<sub>Reg</sub>-Antwort anti-inflammatorisch. In Tabelle 1 ist eine Auswahl T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-typischer Zytokine gezeigt. Das tatsächlich sekretierte Zytokinprofil von T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Populationen ist variabel, und hängt stark vom Stimulus, bzw. der Art der Erkrankung ab.

T <sub>H</sub> Typ1 Antwort	T <sub>H</sub> Typ2 Antwort				
T <sub>H</sub> 1	T <sub>H</sub> 2	T <sub>H</sub> 17	T <sub>FH</sub>	T <sub>Reg</sub>	
IFN $\gamma$	IL-4	IL-17	IL-21	IL-10	IFN $\gamma$ inhibiert Proliferation von T <sub>H</sub> 2 <sub>Eff</sub> <sup>65</sup>
IL-2	IL-10	IL-21		TGF $\beta$	IL-4 inhibiert T <sub>H</sub> 1-Differenzierung und IFN $\gamma$ -Sekretion von T <sub>H</sub> 1 <sub>Eff</sub> <sup>66</sup>
IL-12	IL-13				IFN $\gamma$ und IL-4 inhibieren T <sub>H</sub> 17-Differenzierung und IL-17-Sekretion von T <sub>H</sub> 17 <sub>Eff</sub> <sup>67</sup>
IL-23	IL-21				IL-17 inhibiert T <sub>H</sub> 1-Differenzierung <sup>68</sup>
TNF $\alpha$	IL-33				IL-21 inhibiert Differenzierung von T <sub>H</sub> 0 zu IFN $\gamma$ -produzierenden T <sub>H</sub> 1 <sub>Eff</sub> <sup>69</sup>
	TGF $\beta$				

**Tabelle 1: Zytokinprofil von T<sub>H</sub> und T<sub>Regs</sub> bei T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-vermittelten Immunantworten**

IFN $\gamma$ : Interferon gamma; IL: Interleukin, T<sub>FH</sub>: follikulärer T-Helfer-Lymphozyte, TGF $\beta$ : *transforming growth factor  $\beta$* , TNF $\alpha$ : *tumor necrosis factor  $\alpha$*

Tumoren beeinflussen häufig die T<sub>H</sub>1-T<sub>H</sub>2-Balance zu ihren Gunsten (T<sub>H</sub>1 << T<sub>H</sub>2), durch z.B. der Induktion einer Apoptose zytotoxischer T<sub>Eff</sub>, oder der Förderung einer Expansion von IL-4, -10, -13-produzierenden T<sub>H</sub>2/T<sub>Regs</sub>.

An Tumoren lokalisierte iT<sub>Regs</sub> (*tumor-infiltrating T<sub>Regs</sub>*) sind ein stark beforschtes Feld, da eine erhöhte Akkumulation von iT<sub>Regs</sub> in verschiedenen prä-klinischen und klinischen Tumormodellen/-erkrankungen mit einer schlechteren Prognose in Zusammenhang gebracht werden konnte <sup>70</sup>.

B-Lymphozyten fungieren als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver, humoraler Immunantwort, und werden in zwei Haupttypen eingeteilt: B1-Lymphozyten, die von fötalen Vorläuferzellen der Leber abstammen und hauptsächlich in Mukosa und pleuralen und peritonealen Kavitäten vorkommen, und B2-Lymphozyten, die von Vorläuferzellen des Knochenmarks abstammen und vorwiegend in sekundären lymphatischen Organen auftreten. B-Lymphozyten können  $T_H$ -unabhängig oder -abhängig aktiviert werden. Bei der  $T_H$ -unabhängigen Aktivierung werden Pathogene direkt über den BCR (*B cell receptor*) erkannt, wonach B-Lymphozyten in kurzlebige Plasmazellen differenzieren, die Antikörper der IgM-Klasse bilden (angeborene, humorale Primärantwort). Bei der  $T_H$ -abhängigen Aktivierung binden  $T_H$ -Zellen über CD3/CD4 an MHCII-präsentierende B-Lymphozyten und aktivieren diese durch Ausschüttung von IL-2, -4 und -5. Nach einer  $T_H$ -abhängigen Aktivierung können B-Lymphozyten entweder direkt in Plasmazellen differenzieren, oder das sog. B-Lymphozyten-Keimzentrum (*germinal center*) bilden. Durch klonale Expansion und Selektion von *germinal-center*-B-Lymphozyten entstehen über die Zeit für das Antigen X affinere Subklone, die anschließend in langlebige Plasmazellen oder  $B_{\text{memory}}$ -Lymphozyten differenzieren. Bei *germinal-center* Plasmazellen und  $B_{\text{memory}}$ -Lymphozyten findet der Klassenwechsel der Antikörperproduktion von IgM zu IgA, IgG und IgE statt (adaptive, humorale Sekundärantwort).

Eine der entscheidenden Schaltstellen zwischen Primär- und Sekundärantwort der Immunabwehr ist dabei die APC-vermittelte Stimulation adaptiver Leukozytenpopulationen (APC, *antigen presenting cell*). Die hauptsächliche Funktion dendritischer Zellen ist die Regulation der adaptiven, zellulären Immunabwehr durch Aktivierung oder Suppression von T-Lymphozyten, wobei eine Wechselwirkung dendritischer Zellen mit ihrer Umgebung nicht ausschließlich auf T-Zellen beschränkt ist. Dendritische Zellen können ebenso mit Makrophagen, B-Lymphozyten und NK-Zellen interagieren <sup>71</sup>. Unreife dendritische Zellen halten sich vorwiegend in peripheren Geweben auf, wo sie durch ihre langgestreckten (dendritischen) Zellausläufer ein fein-verästeltes Netzwerk ausbilden, durch das sie permanent Antigene endozytieren. Nach Aufnahme eines Antigens wandern sie in sekundäre lymphatische Organe aus, wo sie als reife Dendriten Antigene über MHCII präsentieren. Die Präsentation körpereigener Antigene aus apoptotischen Zellen, im

Kontext der normalen, nicht-inflammatorischen Geweberegeneration, findet über MHC I statt und dient der Verhinderung einer Autoimmunreaktion durch selbstreaktive Immunzellen (Vermittlung von Toleranz). Die Präsentation fremder Antigene kann über MHC I oder II stattfinden, und diskriminiert eine Aktivierung von entweder naiven CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten, die über CD8 an MHC I binden, oder naiven CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten, die über CD4 an MHC II binden (MHC-Restriktion, Vermittlung von Immunität, „*priming*“).

Die Entdeckung, dass diverse tumorassoziierte Glykoformen spezifische Liganden für Siglecs (*sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins*) oder CLR<sub>s</sub> (*C-type lectin receptors*) auf APCs sind, eröffnete neue Forschungsmöglichkeiten, inwieweit spezifische, tumor-assoziierte Glykoformen eine APC-Differenzierung modulieren, und in der Folge die Immunantworten gegen Tumoren beeinflussen können. Siglecs erkennen und binden Sialinsäure-tragende Glykane, können aber, je nach Siglec, zwischen  $\alpha(2,3),\alpha(2,6)$  oder  $\alpha(2,3),\alpha(2,8)$ -verknüpften Sialinsäuren und spezifischen, strukturellen Eigenschaften entsprechender Glykane differentiell diskriminieren. CLR<sub>s</sub> wie DC-SIGN (*dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin*), CD206 (mannose receptor) oder MGL (*macrophage galactose-specific lectin*) besitzen bekannte Bindungsaffinitäten für *high*-Mannose, Fucose-tragende Glykane (Le<sup>a,b,x,y</sup>), GalNAc oder GlcNAc. Für eine DC-SIGN-vermittelte Signaltransduktion auf APCs konnte mehrfach gezeigt werden, dass sie darüber entscheidet, welche Stimuli von den APCs weitergegeben werden. So ist bekannt, dass:

-*Mycobacterium tuberculosis* an DC-SIGN auf APCs bindet, und in Folge APCs anti-inflammatorische Zytokine ausschütten<sup>72</sup>.

-*Helicobacter pylori*-Stämme die Le<sup>x</sup> exprimieren, an DC-SIGN auf APCs binden, wodurch in Folge eine APC-vermittelte Differenzierung von CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten in einen T<sub>H</sub>2-Phänotyp ausgelöst wird<sup>73</sup>

-Eier von *Schistosoma mansoni* die Le<sup>x</sup> exprimieren, an DC-SIGN auf APCs binden, und in Folge eine APC-vermittelte T<sub>H</sub>2-Antwort ausgelöst wird<sup>74</sup>

-in kolorektalen Karzinomen tumorassoziierte Glykoformen von CEACAM1 und CEA, die Le<sup>a,b,x,y</sup> tragen, spezifische Liganden für DC-SIGN auf APCs sind<sup>75-76</sup>.

Für das bessere Verständnis der Beziehung Inflammation *versus* Tumorverhalten, und zur Verbesserung/Neuentwicklung von Therapien ist es daher geboten, unterschiedliche Tumor(ab)arten und deren Leukozyten-Populationsplastizität im Idealfall artspezifisch zu beschreiben, bis hin zu einer (möglichen) Patienten-Individuellen Analyse.

In dem in dieser Arbeit eingesetzten Modell wurde die tumor-assoziierte Entzündungsreaktion, in Abhängigkeit zu einer differentiellen Tumorglykosylierung, beim malignen Melanom der Maus untersucht.

#### 1.4 Das maligne Melanom

Maligne Melanome sind die onkogene Entartung von Melanozyten, welche die Fähigkeit zur Melaninsynthese besitzen. Die Pigmentierung der Zellen durch Melaninsynthese ist kein konstitutiver Prozess, sondern hängt vom Entwicklungsgrad und stimulatorischen Faktoren wie z.B. der UV-Exposition ab. Während der Embryogenese wandern Vorstufen der Melanozyten, sog. Melanoblasten, aus dem Neuralrohr in die Basalmembran der Epidermis (*stratum basale*), in Haarwurzeln, die Aderhaut des Auges, diverse Schleimhäute und die Hirnhaut ein. Als Abkömmlinge des Neuralrohres sind Melanozyten somit Mitglieder des Neuroektoderms, also letztlich des ektodermalen Keimblattes<sup>77-78</sup>. Als adulte Zellen besitzen sie eine Tyrosinaseaktivität, mit der sie unter der Steuerung durch das melanozytenstimulierende Hormon (MSH), aus Tyrosin als Vorstufe, Melanin synthetisieren. Reifes Melanin wird in speziellen Endosomen, sog. Melanosomen, eingelagert und an benachbarte Keratinozyten weitertransportiert, welche die Melanosomen in ihrem eigenen Zytoplasma einlagern<sup>79</sup>. Die Entwicklung epidermaler, maligner Melanome ist ein mehrstufiger Prozess, der in der Regel von Nävi (Muttermalen) ausgeht. Diese Nävi sind benigne wachsende, lokal begrenzte Aggregate makroskopisch gesunder Melanozyten. Abb.9 zeigt einen Querschnitt des Aufbaus von Haut und der histopathologischen Abfolge der Entwicklung maligner Melanome mit einigen ausgewählten Beispielen einzelner Stufen<sup>80</sup>. An die Entwicklung eines dysplastischen Nävus, der sich histopathologisch durch ausgefranste Ränder und einen Durchmesser bis ca. 5mm auszeichnet, schließt sich der Eintritt in die *radial growth phase* (RPG) an. In dieser Phase weisen

dysplastische Melanozyten hyperchromatische Kerne auf. Die Nävi erreichen Durchmesser von  $\leq 10\text{mm}$ . Mitotische Melanozyten dringen dabei nur vereinzelt durch das *stratum basale* und Extravasieren nicht in das Gefäßsystem. Diese Vorstufen des malignen Melanoms können meistens chirurgisch leicht exzidiert und dadurch geheilt werden. Mit Eintritt in die *vertical growth phase* (VGP) erlangen Melanome das Potential sich innerhalb der Dermis auszubreiten und die Gefäßbarriere zum Blut- und Lymphkreislauf zu durchbrechen, und damit die Fähigkeit zur hämatogenen und/oder lymphatischen Metastasierung. Die letzte Stufe stellt das metastasierende Melanom dar, welches sich über den Blut- und/oder Lymphkreislauf im Organsystem des Wirts ausbreitet. Bevorzugte Fernmetastasierungsorte des Melanoms sind Lunge, Leber und Gehirn, allerdings konnten Metastasen auch in praktisch allen anderen Organen/Geweben einzelner Patienten gefunden werden <sup>81</sup>. Die Entwicklung eines Melanoms hängt von verschiedenen Risikofaktoren ab. Zu den Risikofaktoren eines kutanen Melanoms zählen helle Hautfarbe, häufige und starke Exposition von Sonnenbestrahlung, häufige Sonnenbrände in der Kindheit, eine erhöhte Anzahl von Nävi, hereditäre Prädispositionen und hohes Alter. Vor der Pubertät treten Melanome hingegen sehr selten auf. Melanome werden in vier Hauptklassen eingeteilt: 1) das oberflächlich-spreitende Melanom (SSM). Die Inzidenz liegt bei ca. 60-70% der Fälle und tritt vor allem im Alter zwischen 30 und 50 Jahren auf, 2) das noduläre Melanom (NM). Die Inzidenz liegt bei ca. 20% der Fälle. Es ulzeriert häufig und bereits bei kleineren Verletzungen können Blutungen auftreten, 3) das Lentigo-maligna Melanom (LMM). Die Inzidenz liegt bei ca. 10% der Fälle, besonders häufig auf UV-vorgeschädigter Haut älterer Menschen, und wächst über 5-20 Jahre, 4) das akrolentiginöse Melanom (ALM). Die Inzidenz liegt bei ca. 5% der Fälle. Es tritt bevorzugt an Handflächen, Fußsohlen und unter Nagelplatten auf.

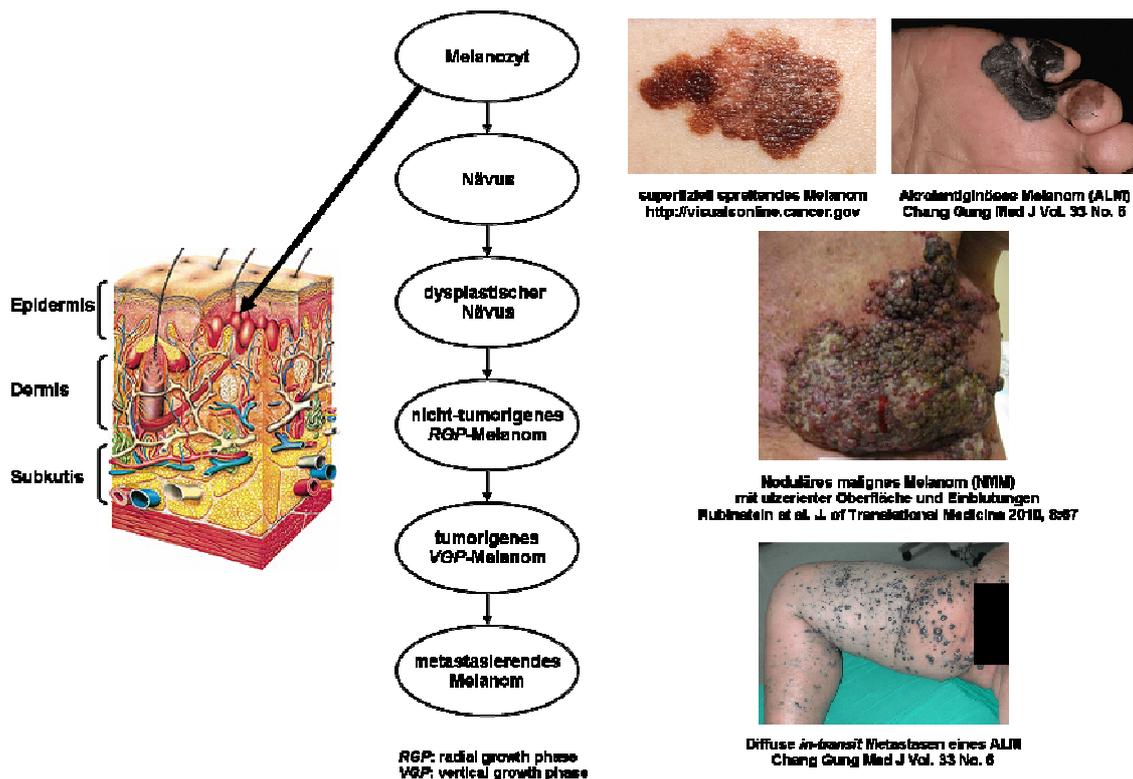


Abbildung 9: Histologischer Aufbau von Haut und histopathologische Abfolge der Entwicklung maligner Melanome <sup>80</sup>

### 1.4.1 Therapie und Heilungschancen

Epidemiologisch verursacht das Melanom zwar nur etwa 4% aller Hautkrebserkrankungen, jedoch wird es für fast 80% hautkrebsbedingter Mortalität verantwortlich gemacht. Die Früherkennung ist nach wie vor die beste Prävention zur Verringerung der Mortalität. Zur Anpassung der Therapie und Beurteilung der Prognose eines Melanompatienten gibt es ein klinisches Graduierungssystem (*Staging*, Tabelle 2). Es definiert die Stadien I und II durch die Tumordicke und den Grad lokaler Invasion. In Stadium III sind zusätzlich sog. regionale Wächter-Lymphknoten (*sentinel lymphnodes*) befallen, in Stadium IV befinden sich Fernmetastasen in der Haut, distalen Lymphknoten, im Peritoneum, im Skelettsystem und/oder dem ZNS <sup>82-83</sup>.

<b>Stadium 0</b>	Melanom ist auf äußere Hautschicht begrenzt.
<b>Stadium I</b>	Tumordicke 1 bis 2 mm. Die äußere Hautschicht kann abgeschürft aussehen. Das Melanom hat sich noch nicht in benachbarte Lymphknoten ausgebreitet
<b>Stadium II</b>	Tumordicke 1 bis 2 mm. Die Haut ulzeriert, d.h. es bildet sich ein Geschwür. Das Melanom hat sich noch nicht in benachbarte Lymphknoten ausgebreitet.
<b>Stadium III</b>	Disseminierte Melanomzellen haben sich in einen oder mehrere benachbarte Lymphknoten oder in Gewebe unmittelbar außerhalb des Primärtumors, jedoch nicht in entfernte Lymphknoten ausgebreitet.
<b>Stadium IV</b>	Disseminierte Melanomzellen haben sich in distale Organe, Lymphknoten oder in Hautbereiche weit entfernt vom Primärtumor ausgebreitet.

**Tabelle 2: Klinische Stadieneinteilung beim Melanom**

Bei Melanompatienten der Stadien I und II ist die chirurgische Exision des Tumors die Therapie der Wahl. Empfohlen wird bei Tumoren mit einer Dicke  $\leq 4$ mm eine radiale Totalsektion der betroffenen Stelle mit einem Abstand von 2cm vom äußeren Rand des Tumors. Bei fortgeschrittenem bzw. metastasiertem Melanom (Stadium III/IV) ist die Verfügbarkeit adjuvanter Chemotherapeutika zur systemischen Therapie von Patienten nach wie vor unbefriedigend. In Tabelle 3 ist eine Liste von Chemotherapeutika aufgeführt, die für die Behandlung von Melanompatienten eingesetzt wurden bzw. werden. Zu beachten ist allerdings, dass auf die hier angeführten Chemotherapeutika insgesamt nur 15-25% von Stadium III/IV-Patienten überhaupt ansprechen, und dass nach Therapie bisher kein klarer Zusammenhang zwischen Rezidiv-freiem Überleben und der Mortalitätsrate von Stadium III/IV-Patienten hergestellt werden konnte<sup>84-85</sup>.

Dacarbazine* <sup>86</sup>
Temozolomide <sup>87-88</sup>
Hoch-Dosis Interleukin-2* <sup>89</sup>
Kombinationstherapie: Dacarbazine oder Temozolomide (mit Cisplatin und Vinblastin) mit und ohne Interleukin-2 oder Interferon-alpha <sup>90-92</sup>
Paclitaxel <sup>93</sup>
Paclitaxel / Carboplatin <sup>94</sup>

**Tabelle 3: Chemotherapeutika zur Therapie von Stadium III/IV Melanompatienten**

\* Empfohlen von der Food & Drug Administration des US Gesundheitsministeriums

Aktuelle Melanomforschung konzentriert sich daher verstärkt auf Melanozyten/Melanom-spezifische Signalwege, die kritisch für Initiation und Progression von Melanomen sind. Erfolge wurden besonders durch genomweite Mutationsanalysen bei der Aufklärung von Signalwegen erzielt, die über Rezeptortyrosinkinasen wie c-KIT initiiert werden, und über mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP) wie NRAS entweder den sog. MAP-Signalweg über BRAF oder den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Signalweg aktivieren können<sup>7</sup>.

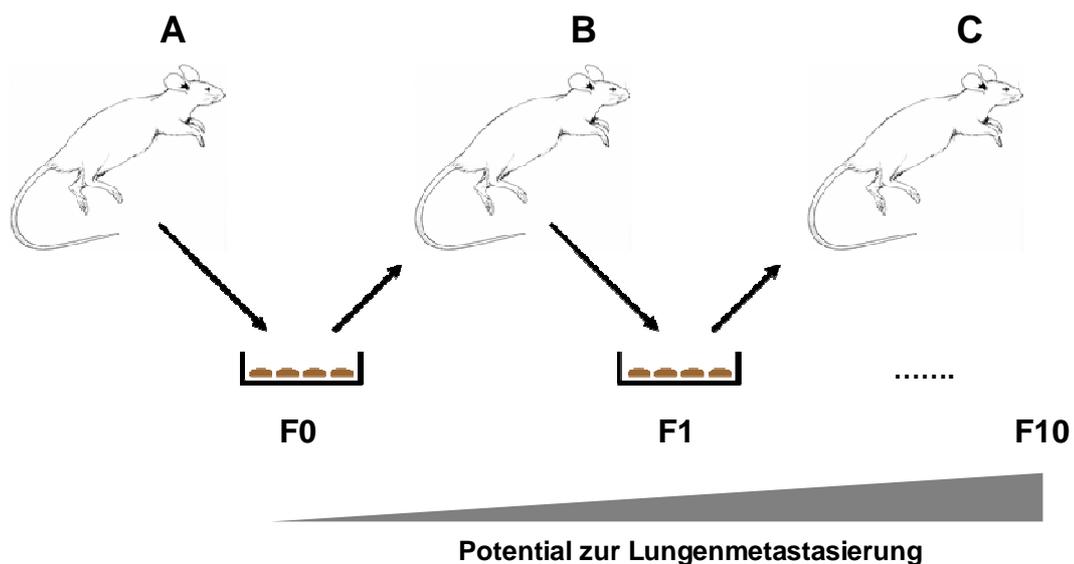
Besonders aufgrund der Prävalenz aktivierender Mutationen in BRAF besteht großes Interesse an der Erforschung selektiver BRAF-Inhibitoren (SBIs, *selective BRAF inhibitors*). Aktivierende BRAF-Mutationen konnten in 50-60% aller Melanomneuerkrankungen gefunden werden, wobei in ca. 90% dieser Fälle eine T1799A Punktmutation zu einer Substitution von Valin zu Glutaminsäure in der Aminosäuresequenz an Position 600 in BRAF führt (BRAF<sup>V600E</sup>). Dadurch nehmen BRAF<sup>V600E</sup>-Mutanten eine konstitutiv-aktive Konfiguration an<sup>95</sup>. Einer der ersten eingesetzten SBIs war der Multi-Kinase-Inhibitor Sorafenib, welcher sowohl BRAF und CRAF, als auch VEGFR2 und VEGFR3 inhibieren kann. Sorafenib ist ein relativ nicht-selektiver SBI, und zeigte bei Therapien von Melanompatienten eine größere therapeutische Wirksamkeit in Kombination mit chemotherapeutischen Agenzien wie Carboplatin, Paclitaxel oder Temozolomid<sup>96</sup>. Aus diesem Grund werden aktuell SBIs entwickelt, die möglichst selektiv BRAF-Mutanten inhibieren. Wichtige (Neu-)Entwicklungen sind dabei die SBIs RAF-265, PLX-4032, CHR-265 oder XL-281, mit denen in klinischen Studien z.T. bemerkenswerte therapeutische Erfolge bei der Behandlung von Melanompatienten erzielt werden konnten<sup>97</sup>.

Der Nachteil von adjuvanten Therapien, die auf mutationsspezifische Kinase-Inhibitoren abzielen ist, dass sie nur für Patienten in Frage kommen, deren Tumor die entsprechende Mutation erworben hat. Neben mutationsgerichteten Therapien werden deshalb auch z.B. anti-angiogene Therapien mit etablierten Behandlungsmöglichkeiten kombiniert. (Neo-)Angiogenese ist ein zwingend notwendiger Prozess für das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren. So konnten Sharma et. al. zeigen, dass in Melanomen eine onkogene BRAF<sup>V599E</sup>-Mutation Angiogenese induzieren kann, und Velazquez et. al., dass Melanommetastasen häufig stark vaskularisiert sind<sup>98-99</sup>. Pro-angiogene Faktoren wie VEGF oder PDGF können sowohl von Melanomzellen als auch von TAMs (*tumor associated macrophages*) in die tumorale Mikroumgebung abgegeben werden<sup>100</sup>.

Obwohl in einem Maus-*Xenograft*-Modell mit einem humanen Melanom Agenzien wie Bevacizumab (monoklonaler anti-VEGF-Antikörper), sowie die VEGF-Rezeptor-Inhibitoren Sorafenib und Axitinib anti-Tumorwirkung zeigten, scheinen sie allerdings in humanen Patienten in Kombination mit konventionellen Chemotherapien besser zu wirken<sup>101-102</sup>. Neben diesen Möglichkeiten ist ein weiterer Behandlungsansatz die sog. Immuntherapie (*aka* adaptiver Immunzelltransfer). Bei diesem Ansatz werden dem Patienten eigene Leukozyten entnommen (primär Dendriten, Makrophagen und T-Lymphozyten), die *in vitro* expandiert und nach speziellen Protokollen mit z.B. IL-2 oder Ipilimumab (anti-CTLA4; monoklonaler Antikörper; *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) behandelt, und anschließend in den Patienten zurückgegeben werden<sup>103</sup>. In Zusammenhang mit immuntherapeutischen Ansätzen gegen Melanomerkrankungen ist in jüngerer Zeit CEACAM1 (wieder) verstärkt in den Fokus dieses Forschungsfeldes gerückt. Nachdem bereits Ebrahimnejad et. al zeigen konnte, dass eine CEACAM1-Überexpression das Migrations- und Invasionspotential von Melanomzellen *in vitro* erhöhen kann, konnte Markel et. al. zeigen, dass bei Melanompatienten ein erhöhter CEACAM1-Serumpiegel mit einer verringerten Überlebenswahrscheinlichkeit korreliert ist, und dass Melanomzellen die quantitative Oberflächenpräsentation von CEACAM1 dynamisch auf die An-/Abwesenheit von TILs (*tumor infiltrating lymphocytes*) regulieren können. Bei Anwesenheit von IFN $\gamma$  und zytotoxischen CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten oder NK-Zellen wurde CEACAM1 von den Melanomzellen für die Dauer der Anwesenheit transient hochreguliert. Parallel dazu zeigten CEACAM1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten und CEACAM1<sup>+</sup>NK-Zellen eine verminderte Zytotoxizität. Daraus wurde spekuliert, dass eine (Über-)Expression von CEACAM1 unter immunologischem Druck es den Melanomzellen erlaubt, transient einen resistenteren Phänotyp annehmen zu können.<sup>104-106</sup>

### 1.4.2 Prä-klinische Melanommodelle

Die in dieser Arbeit eingesetzte Zelllinie B16 stammt aus der Serie der sog. B16-Maus-Melanome. I.J. Fidler selektierte die elterliche B16 Zelllinie Anfang der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts. Hierzu plattierte er Zellen eines endogen gewachsenen Maus-Melanoms *in vitro* aus, und erzeugte durch wiederholtes Injizieren der Zellen in die Schwanzvene der Tiere Subklone von Melanom-Lungenmetastasen, die er wiederum in Kultur nahm. Diese so erzeugten Zelllinien werden heutzutage als B16/F0; B16/F1; B16/F2.....usw. bezeichnet, wobei F1/2/3... sich auf die *in vitro*-Passage einer Melanom-Lungenmetastasen-Biopsie bezieht. Abb.10 zeigt ein Schema des Fidler-Experiments zur Erzeugung verschiedener B16/Fx-Subklone. Die B16-Subklone wurden nach ihrer Eigenschaft mit zunehmender *in vitro*-Passage verstärkt Lungenmetastasen in C57BL/6J-Mäusen zu bilden selektiert (F1 schwaches *versus* F10 starkes Potential zur Lungenmetastasierung)<sup>107</sup>. In größer angelegten *in vivo*-Studien konnten Raz et. al. zeigen, dass B16/F1 im Vergleich zu B16/F10 zwar ein vermindertes Potential zur Lungenmetastasierung zeigt, dafür aber häufiger in extrapulmonare Organe wie Lymphknoten, Leber oder Eierstöcke metastasiert<sup>108</sup>



**Abbildung 10: Fidler-Experiment zur Erzeugung der B16-Melanomzelllinien**

A) Ein Primärmelanom wurde durch Biopsie in Kultur genommen (F0). Nach Kultivierung wurden die Zellen in die Schwanzvene neuer C57BL/6J-Mäuse injiziert. B) Nach *in vivo*-Inokulation wurden Melanomlungenmetastasen biopsiert und wieder in Kultur genommen (F1). C) Wiederholung des Prozesses *in vitro versus in vivo* mit n-Wiederholungen (F3,4,5...)

## 2. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene Transfektome einer murinen Melanomzelllinie (B16) erzeugt werden, die durch eine CMV (Cytomegalievirus) Promotor gesteuerte Expression der humanen Fucosyltransferasen III oder IX ein differentielles Oberflächenglykosylierungsprofil mit sLe<sup>x/a</sup> (FUTIII) oder Le<sup>x</sup> (FUTIX) Epitopen annehmen können. Die verwendete B16/F0-Zelllinie wurde aus dem Grund gewählt, möglichst nah am Originalzustand des Primärmelanoms zu bleiben. Durch Ko-Transfektion mit murinem Ceacam1 sollte zusätzlich ein bekanntes Kohlenhydrat-Trägermolekül eingebracht werden, da Ceacam1 unter physiologischen Bedingungen als hochglykosyliertes Protein vorliegt, und über Le-Epitope von z.B. DC-SIGN erkannt werden kann. Durch subkutane Injektion verschiedener B16-Transfektome in Wildtyp C57BL/6J-Mäuse sollte untersucht werden, ob eine differentielle Tumorglykosylierung unter *in vivo* Bedingungen zu einer

A) Veränderung der Vaskularisierung des Tumors mit Blut- und Lymphgefäßen

B) Quantitativen Veränderung der Leukozyteninfiltration am Tumor und/oder im Lymphknoten

C) Qualitativen Veränderung der Polarisierung tumor-infiltrierender und/oder Lymphknoten-ständiger Leukozytenpopulationen führt.

Zu diesem Zweck wurden die erzeugten B16-Transfektome über einen definierten Zeitraum von 10 Tagen in den Mäusen inokuliert, anschließend biopsiert und entsprechend experimentell analysiert.

### 3. Material

#### 3.1 Chemikalien

Handelsübliche Chemikalien wurden von den Firmen Biorad (München), Sigma-Aldrich (Steinheim), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) oder Fluka (Neu-Ulm) in p.a. Qualität bezogen. Zusätzliche Chemikalien wie folgt:

<u>Chemikalie</u>	<u>Hersteller</u>
4x LDS Ladepuffer	Invitrogen, Groningen, NL
7-AAD (Viability Test)	BD Biosciences, Heidelberg, D
Agarose	Lonza, Vervieres, B
Antibody Diluent	Dako Cytomation, Glostrup, DK
Aqua PolyMount	Polysciences, Warrington, US
BactoAgar	Invitrogen, Groningen, NL
Bradford Reagenz	BioRad, München, D
DEMEM	Gibco, Eggenstein, D
DMSO	Merck, Darmstadt, D
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, Hamburg, D
ECL	Amersham, Buckinghamshire, UK
Fötales Kälberserum	PAA, Linz, A
Glyzerol	Invitrogen, Groningen, NL
Indomethacin	Sigma-Aldrich, Hamburg, D
MES SDS Laufpuffer	Invitrogen, Groningen, NL
Milchpulver	Spinrad, Bad Segeberg, D
Paraformaldehyd 16%	EM Science, Hatfield, US
<i>Posphate buffered saline</i>	Gibco, Eggenstein, D
Schweineserum, normal	Dako Cytomation, Glostrup, DK
Transferpuffer	Invitrogen, Groningen, NL
Triton X-100	Serva GmbH, Mannheim, D
Tween-20	Sigma-Aldrich, Hamburg, D
VectaMount	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Xylol-Ersatz (XEM-200)	DiaTec, Hallstadt, D
Ziegenserum, normal	Dako Cytomation, Glostrup, DK

### 3.2 Antibiotika

<u>Antibiotikum</u>	<u>Stammlösung</u>	<u>Hersteller</u>
Ampicillin	100mg/ml	Gibco, Eggenstein, D
Penicillin/Streptomycin	10000U/ml Pen 10000µg/ml Strep	Gibco, Eggenstein, D
Neomycin	30000U/ml	Biochrom, Berlin, D
Zeocin	100mg/ml	Invitrogen, Groningen, NL

### 3.3 Proteine und Enzyme

Sofern nicht anders erwähnt, erfolgten enzymatische Reaktionen in den von den Herstellern mitgelieferten Puffersystemen.

<u>Protein/Enzym</u>	<u>Hersteller</u>
Bovines Serumalbumin	PAA, Linz, A
Dispase	Gibco, Eggenstein, D
DNase I	Roche, Mannheim, D
Gamma-Globuline (Cohn II)	Sigma-Aldrich, Hamburg, D
Kollagenase IV	Worthington, Lakewood, US
Maus F <sub>C</sub> -Block (CD16/32)	BD Biosciences, Heidelberg, D
Pfu-DNA-Polymerase	Stratagene, Waldbronn, D

### 3.4 Molekulargewicht-Standards

<u>Marker</u>	<u>Hersteller</u>
1 Kb Plus DNA <i>Ladder</i>	Invitrogen, Groningen, NL
PageRuler prestained Protein <i>Ladder</i>	Fermentas, St.Leon-Rot, D

### 3.5 Puffer und Lösungen

Sofern nicht anders erwähnt, wurden sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Lösungen mit Milli-Q-Wasser angesetzt und durch Autoklavieren, oder bei Hitzeempfindlichkeit durch Sterilfiltration (Membranfilter 0,2µm), sterilisiert.

<u>10x DNA-Ladepuffer</u>	0,21% (v/v) Bromphenolblau 0,21% (v/v) Xylenzanol 0,2 M EDTA, pH8,0 50% (v/v) Glyzerin
<u>Einfriermedium</u>	10% DMSO in FCS (v/v)
<u>Erythrozyten Lysepuffer</u>	8,26g Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl) 1g Kaliumbicarbonat (KHCO <sub>3</sub> ) 37mg EDTA add 1L dH <sub>2</sub> O, pH 7,1-7,4
<u>FACS-Puffer</u>	2,5% (v/v) iFCS 0,05% (v/v) Natriumazid add 1xPBS
<u>Immunhistochemische Färbelösung für alkalische Phospatase</u>	150ml TBS, pH 8,24 300mg NaNO <sub>2</sub> in 7,5ml dH <sub>2</sub> O 300µl Neufuchsin 30mg Naphtol-Bi-phosphat/750µl DMF 60mg Levamisol 100µl Tween-20
<u>KLB-Puffer</u>	25 mM Tris/HCL 150mM NaCl 5mM EDTA 10% Glyzerol 1% Triton X-100 10mM Glyzerolphosphat 10mM Natriumpyrophosphat 1mM Natriumorthovanadat add 500ml dH <sub>2</sub> O
<u>Kulturmedium für B16 Melanom-Zellen</u>	500 ml DEMEM 10% FCS (v/v) 1% Penicillin/Streptomycin (v/v)
<u>-für B16-Transfektome:</u>	B16 Melanom Kulturmedium +600 U/ml Neomycin +500µg/ml Zeocin

<u>LB-Medium</u>	10g/L BactoTrypton 5g/L Bacto-Hefeextrakt 10g/L NaCl pH 7,0
<u>LB-Agar</u>	LB-Medium 15g/L Bacto-Agar
<u>Protein-Lysepuffer</u>	1mM PMSF 100µl Aprotinin 10mM Natriumfluorid add 10ml KLB-Puffer
<u>TAE (50 x)</u>	2 M Tris 0,5 M Essigsäure (100 %) 0,05 M EDTA add 1L dH <sub>2</sub> O
<u>TBS/T (10x)</u>	1,5M NaCl 0,1M Tris/HCl 0,1% (v/v) Tween-20 add 1L dH <sub>2</sub> O (1xTBS) add 0,1% (v/v) Tween-20 (1x TBS/T)
<u>Verdau-Cocktail für <i>ex situ</i> Melanome</u>	40 U/ml Kollagenase IV 0,1mg/ml DNase I 2 U/ml Dispase add 5ml serumfreies DEMEM
<u>Zelldissoziierungspuffer (10x)</u>	1,35M KCl 0,15M Na <sub>3</sub> -Zitrat add 100ml dH <sub>2</sub> O, sterilfiltrieren

### 3.6 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide wurden HPLC-gereinigt und von der Firma MWG Biotec, Ebersberg, D, bezogen. Tabelle 4 zeigt eine Übersicht der verwendeten Primer mit Sequenz.

Primerpaar	Transkriptionsrichtung	Sequenz (5' → 3')
mCC1-4L	forward	<i>caagcatacagcggcagaga</i>
	revers	<i>tggcaggagaggttgaggtt</i>
Neomycin	forward	<i>tggattgcacgcaggttctc</i>
	revers	<i>gtcaagaaggcgatagaagg</i>
Zeocin	forward	<i>atggccaagttgaccagtg</i>
	revers	<i>gccacgaagtgacgcagtt</i>
hFUTIII	forward	<i>tcagctgctggctgtgt</i>
	revers	<i>gctgagtccggctccagtt</i>
hFUTIX	forward	<i>atccaaggatgccatctcac</i>
	revers	<i>aggtaacagagccagccagaa</i>
CMV	forward	<i>cgggactttccaaaatgtcg</i>
BGHpolyA	revers	<i>acaacagatggctggcaact</i>

**Tabelle 4: Oligonukleotide für Sequenzierungen und analytischer PCRs**

### 3.7 Assays / Kits

Sofern nicht anders erwähnt, erfolgte die Durchführung nach den Protokollen der Hersteller.

#### Assay/Kit

dNTP Mix

DNA Sequencing Kit

Lipofectamine 2000

Quantikine ELISA Mausserum INF<sub>γ</sub>

Quantikine ELISA Mausserum IL4

Quantikine ELISA Mausserum IL10

Quantikine ELISA Mausserum IL13

Parameter ELISA Mausserum PGE<sub>2</sub>

Vecta Stain ABC

#### Hersteller

Invitrogen, Groningen, NL

ABI Prism, Warrington, US

Invitrogen, Groningen, NL

R&D Systems, Minneapolis, US

R&D Systems, Minneapolis, US

R&D Systems, Minneapolis, US

eBioscience, Frankfurt, D

R&D Systems, Minneapolis, US

Vector Laboratories, Burlingame, US

### 3.8 Verbrauchsmaterialien

<u>Material</u>	<u>Hersteller</u>
4-12% Bis/Tris SDS-Gele	Invitrogen, Groningen, NL
6-24-Well-Kulturschalen	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Antifekt N liquid	Schülke & Mays, Norderstedt, D
Bakterienschalen	Nunc, Wiesbaden, D
Cedex SmartSlides Zählkammern	Innovatis, Bielefeld, D
Chirurgische 1xSkalpelle	Aesculap, Tuttlingen, D
Deckgläser	Marienfeld, Lauda-Königshofen, D
Gewebekulturschalen Ø 5-20 cm	Sarstedt, Nümbrecht, D
Hyperfilm	Amersham, Buckinghamshire, UK
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden, D
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht, D
Maus Genom GenChips Version 430 2.0	Affymetrix, Santa Clara, US
Microvette Serumröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Mikroreaktionsgefäße (0,5-2 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Objektträger für Kryoschnitte	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Objektträger für Paraffinschnitte	Marienfeld, Lauda-Königshofen, D
Parafilm M	Pechiney, Chicago, US
PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, D
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D
PVDF- Membran	Millipore, Bedford, US
Sekusept Plus	Ecolab, Wien, A
Sterican 1xInjektionskanülen	Braun, Melsungen, D
Sterilfilter	Nalgene, Rochester, US
TissueTek O.C.T Compound	Sakura, Alphen aan den Rijn, N
Whatman Blotting-Papier	Schleicher & Schüll, Dassel, D
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zentrifugationsgefäße Falcon (5–50ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, D

### 3.9 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
Agarosegelelektrophorese	PEQLAB, Erlangen, D
Brutschrank	Heraeus, Hanau, D
Blotapparatur XCell Sure Lock Mini-Cell	Invitrogen, Groningen, NL
CEDEX XS Zellzähler	Roche, Mannheim, D
CO <sub>2</sub> -Inkubator (Hera Cell 240)	Heraeus, Hanau, D
Durchflusszytometer FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg, D
ELISA Multilabel Counter Victor <sup>3</sup>	Perkin Elmer, Rodgau, D
Entwickler (Curix 60)	AGFA, Düsseldorf, D
Feinwaage AE160	Mettler, Gießen, D
Fluoreszenzmikroskop DM5000B	Leica, Nußloch, D
Geldokumentation GelDoc XR+	BioRad, München, D
Heizblock	Medax, Kiel, D
Kryotom CM3050	Leica, Nußloch, D
Lichtmikroskop Axiovert135	Zeiss, Oberkochen, D
Mikrotom	Leitz, Wetzlar, D
NanoDrop <sup>®</sup> ND-1000	PEQLAB, Erlangen, D
Oberschalenwaage MXX-612	Denver Instruments, Göttingen, D
PCR-Cycler	BioRad, München, D
SDS-PAGE XCell Sure Lock Mini-Cell	Invitrogen, Groningen, NL
Sigma 3-1	Sigma-Aldrich, Hamburg, D
Sigma 6-10	Sigma-Aldrich, Hamburg, D
Sorvall RC5C	ThermoScientific, Bonn, D
Spannungsquelle Power Erase500	Invitrogen, Groningen, NL
Sterilwerkbank HeraSafe	Heraeus, Hanau, D
UV/Vis-160	Shimadzu, Duisburg, D

### 3.10 Antikörper

Sofern nicht anders erwähnt wurden die Antikörper in den Verdünnungen nach Protokoll der Hersteller verwendet. Andernfalls wurde die optimale Konzentration / Verdünnung selbst ausgetitriert. Tabelle 5 zeigt eine Liste aller Primärantikörper mit Verwendungszweck sortiert nach Konjugat. Tabelle 6 und 7 zeigen eine Liste der Isotypkontrollen und Sekundärantikörper sortiert nach Konjugat.

Primärer Antikörper	Isotyp	Konj.	Hersteller	Klon	Anwendung
Ceacam1	Poly Kaninchen-Serum "P1"	-	Dr. A.Horst UKE Hamburg	-	WB 1:2000
CD11b	Mono Ratte IgG2b	-	Millipore Cat.: CBL1313	M1/70.15	IF 1:100
CD15s	Mono Maus IgM	-	BD Pharmingen Cat.: 551344	CSLEX1	FACS 1:200
CA19-9	Mono Maus IgM	-	Abcam Cat.: ab3982	121SLE	FACS 1:400
CCR2	Mono Kaninchen IgG	-	Abcam Cat.: ab32144	E68	FACS 1:100
IGF1R	Poly Huhn IgY	-	Abcam Cat.: ab32823	-	FACS 1:100
Meca32	Mono Ratte IgG2a	Biotin	BD Pharmingen Cat.: 550563	Meca-32	IF 1:100
LYVE-1	Poly Ziege	Biotin	R&D Systems Cat.: BAF2125	-	IF 1:100
VEGFR3	Mono Ratte IgG2a	Biotin	eBioscience Cat.: 13-5988-82	AFL4	FACS 1:100
CD4	Mono Ratte IgG2b	FITC	BD Pharmingen Cat.: 553729	GK1.5	FACS 1:100
CD11c	Mono Hamster IgG1	FITC	BD Pharmingen Cat.: 557400	HL3	FACS 1:100
CD11b	Mono Ratte IgG2b	FITC	BD Pharmingen Cat.: 553310	M1/70	FACS 1:300
CD49b	Mono Ratte IgM	FITC	BioLegend Cat.: 108906	Dx5	FACS 1:100
CD23	Mono Ratte IgG2a	FITC	eBioscience Cat.: 11-0232	B3B4	FACS 1:100
CD15	Mono Maus IgM	PE	BD Pharmingen Cat.: 560142	MC480	FACS 1:5
CD11b	Mono Ratte IgG2b	PE	Catlag Laboratories Cat.: RM2804	M1/70.15	FACS 1:300
CD25	Mono Ratte IgG1	PE	eBioscience Cat.: 12-0251-82	PC61.5	FACS 1:200
CD127	Mono Ratte IgG2b	PE	eBioscience Cat.: 12-1273-82	SB/199	FACS 1:100
KLRG1	Mono Hamster IgG	PE	US Biological Cat.: K1893-18C	5K32	FACS 1:50
NK1.1	Mono Maus IgG2a	PE	BD Pharmingen Cat.: 553165	PK136	FACS 1:50
Klra2	Mono Hamster IgG	PE	GeneWay Cat.: 20-787-275604	14B11	FACS 1:50
Tie-2	Mono Ratte IgG1	PE	Biolegend Cat.: 124008	TEK4	FACS 1:50
CD36	Mono Hamster IgG	PE	BioLegend Cat.: 102606	HM36	FACS 1:100
Ly6C	Mono Ratte IgG2a	PE	Acris Antibodies Cat.: BM4019R	ER-MP20	FACS 1:200

Gr.1	Mono Ratte IgG2b	PE	BD Pharmingen Cat.: 553128	RB6-8C5	FACS 1:300
CD8a	Mono Ratte IgG2a	APC	BD Pharmingen Cat.: 553035	53-6.7	FACS 1:100
CD204	Mono Ratte IgG2b	APC	R&D Systems Cat.: FAB1797A	268318	FACS 1:5
CCR2	Mono Ratte IgG2b	APC	R&D Systems Cat.: FAB5538A	475301	FACS 1:10
VEGFR1	Mono Ratte IgG2b	APC	R&D Systems Cat.: FAB4711A	141522	FACS 1:10
CCR3	Mono Ratte IgG2a	Alexa647	BD Pharmingen Cat.: 557974	83103	FACS 1:100
F4/80	Mono Ratte IgG2a	Alexa647	Biologend Cat.: 123122	BM8	FACS 1:100
CD206	Mono Ratte IgG2a	Alexa647	Biologend Cat.: 123010	MR5D3	FACS 1:100
CD244.2	Mono Ratte IgG2a	Alexa647	eBioscience Cat.: 51-2441	eBio244F4	FACS 1:150
JAML	Mono Hamster IgG	Alexa647	BioLegend Cat.: 128506	4E10	FACS 1:200

**Tabelle 5: Primärantikörper mit Verwendungszweck und Verdünnung**

<b>Sekundäre Antikörper</b>	<b>Konj.</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Anwendung</b>
Poly Esel α-Ratte IgG (H+L)	Alexa488	Invitrogen Cat.: A21208	IF 1: 200
Poly Esel F(ab) <sub>2</sub> α-Kaninchen	PE	Abcam Cat.: ab7007	FACS 1:100
Streptavidin	Cy3	Dianova Cat.: 016-160-084	IF 1: 200
Streptavidin	APC	eBioscience Cat.: 17-4317-82	FACS 1:500
Poly Ziege Ig α-Maus	APC	BD Pharmingen Cat.: 550826	FACS 1:100
Poly Ziege IgG α-Huhn IgY	APC	Abcam Cat.: ab72578	FACS 1:200
DAPI	-	Invitrogen Cat.: D21490	IF 1: 300

**Tabelle 6: Sekundärantikörper mit Verwendungszweck und Verdünnung**

Isotyp Kontrollen	Konj.	Hersteller	Klon	Anwendung
Poly Kaninchen IgG	-	Abcam Cat.: ab37415	-	FACS 1:500
Poly Huhn IgY	-	Abcam Cat.: ab37382	-	FACS 1:500
Mono Maus IgM	-	BD Pharmingen Cat.: 555581	G155-228	FACS 1:200
Mono Ratte IgG2b	FITC	eBioscience Cat.: 11-4031-85	eB149/10H5	FACS 1:100
Mono Hamster IgG1	FITC	BD Pharmingen Cat.: 553953	G235-2356	FACS 1:100
Mono Ratte IgM	FITC	BioLegend Cat.: 400806	RTK2118	FACS 1:100
Mono Ratte IgG2a	FITC	eBioscience Cat.: 11-4321	-	FACS 1:100
Mono Ratte IgG2a	biotin	eBioscience Cat.: 13-4321-82	-	FACS 1:100
Mono Maus IgM	PE	BD Pharmingen Cat.: 555584	G155-228	FACS 1:167
Mono Hamster IgG	PE	Biolegend Cat.: 400908	HTK888	FACS 1:100
Poly Hamster IgG	PE	GeneWay Cat.: 26-787-278053	-	FACS 1:250
Mono Ratte IgG2b	PE	BD Pharmingen Cat.: 553989	A95-1	FACS 1:600
Mono Ratte IgG1	PE	eBioscience Cat.: 12-4301-82	mono	FACS 1:200
Mono Ratte IgG2b	PE	eBioscience Cat.: 12-4031-83	eB149/10H5	FACS 1:100
Mono Ratte IgG2a	PE	eBioscience Cat.: 12-4321-83	eBR2a	FACS 1:20
Poly Hamster IgG	PE	GeneWay Cat.: 26-787-278053	-	FACS 1:50
Mono Ratte IgG2a	APC	eBioscience Cat.: 17-4321-81	eBR2a	FACS 1:100
Mono Ratte IgG2b	APC	R&D Systems Cat.: IC013A	141945	FACS 1:5
Mono Ratte IgG2b	APC	R&D Systems Cat.: IC013A	141945	FACS 1:10
Mono Ratte IgG2a	Alexa647	BioLegend Cat.: 400526	RTK2758	FACS 1:100-400
Mono Hamster IgG	Alexa647	BioLegend Cat.: 400924	HTK888	FACS 1:200

**Tabelle 7: Isotypkontrollen mit Verwendungszweck und Verdünnung**

### 3.11 Plasmide

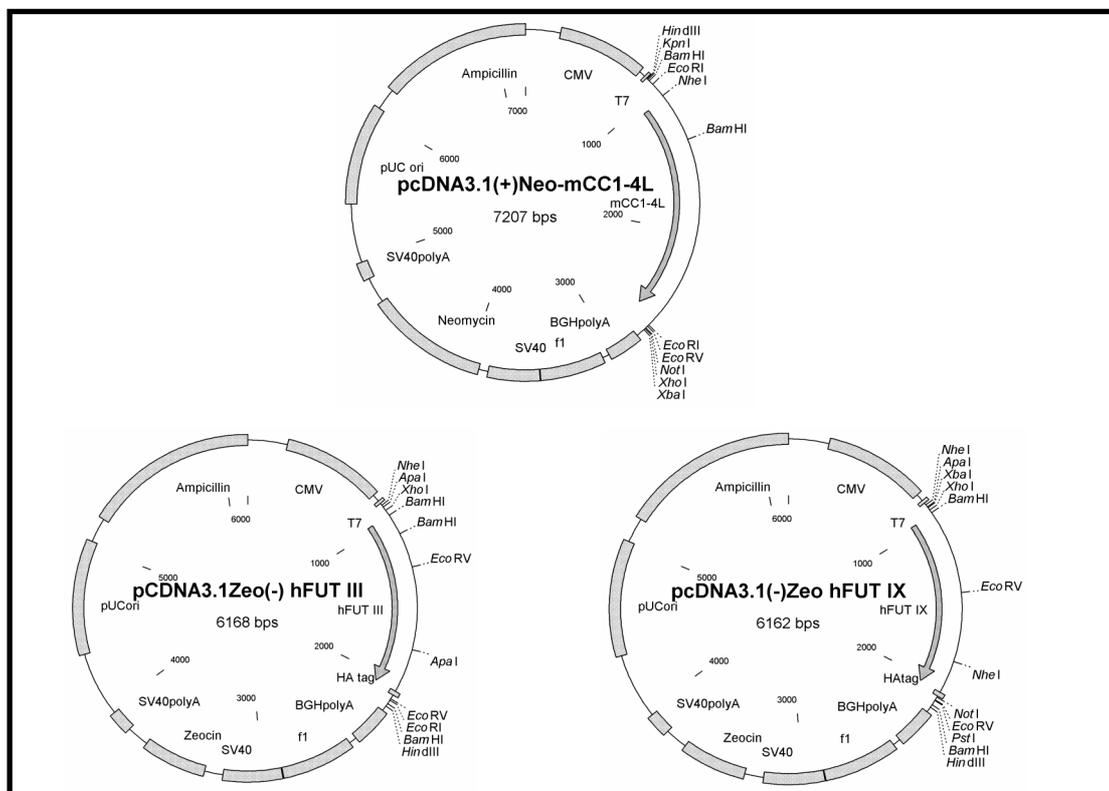
#### Plasmid

pcDNA3.1(+/-)

#### Hersteller

Invitrogen, Groningen, NL

Expressionsvektor unter der Kontrolle des CMV Promotors. (+/-) bezieht sich auf die Reihenfolge der Restriktionsschnittstellen in der *multiple cloning site*. Der Vektor trägt eine Ampicillin-Resistenz zur prokaryotischen Selektion. Für eine eukaryotische Selektion wurden Vektoren mit einem Resistenzgen für Neomycin oder Zeocin eingesetzt. Es wurden Vektoren mit entweder murinem Ceacam1-4L (pcDNA3.1(+)<sup>Neo</sup>) oder den humanen Fucosyltransferasen III oder IX eingesetzt (pcDNA3.1(-)<sup>Zeo</sup>). Sowohl die Leervektoren als auch die Transgen-Vektoren wurden freundlicherweise von Frau Dr. Andrea Horst und Dr. Peter Nollau zur Verfügung gestellt. In Abb.11 sind die eingesetzten Vektoren als Vektorkarte dargestellt. Detaillierte Karten und ein Ausschnitt der Sequenz vom T7 Promotor bis zum BGHpolyA sind im Anhang beigefügt.



**Abbildung 11: pcDNA3.1-Vektorkarten mit Transgenen**

mCC1-4L: murines Ceacam1-4L; hFUTIII: humane Fucosyltransferase III; hFUTIX: humane Fucosyltransferase IX

### 3.12 Zelllinien

#### Prokaryoten

One Shot InVαF' *competent cells*

Genotyp: F' *endA1 recA1 hsdR17* (rk-, mk+) *supE44 thi-1 gyrA96 relA1 φ80/lacZΔM15 Δ(lacZYA argF)U169 λ-*

#### Hersteller

Invitrogen, Groningen, NL

#### Eukaryoten

B16/F0 Mausmelanom

Adhärenz wachsende Melanomzelllinie aus einer Biopsie eines Primärmelanoms aus C57BL/6J. Die Zellen haben eine epitheliale-spindelförmige Morphologie und sind tumorigen (ATCC Cat.No.: CRL-6322).

#### Hersteller

LGC Standards, Wesel, D

### 3.13 Mausstamm

C57BL/6J Inzuchtstamm von Jackson Laboratories, Bar Harbor, US.

Für tierexperimentelle Arbeiten wurden ausschließlich männliche Exemplare mit einem Alter von 6-8 Wochen verwendet. Die Tiere wurden nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes bei einem künstlichen 12Std. Tag/Nacht Rhythmus in der Tierhaltung des UK Hamburg-Eppendorf gehalten und verpaart.

### 3.14 Microarrays

Die Genexpressionsprofile wurden in der Microarray Core Facility, geleitet von Dr. Thomas Streichert, Institut für klinische Chemie, UKE Hamburg auf einer Affymetrix-Plattform erstellt. Zur Analyse wurden jeweils die inguinalen Lymphknoten aus einer Kohorte tumortragender Tiere verwendet. Die Microarrayexperimente wurden von Sabine Harenkamp durchgeführt. Die bioinformatische Auswertung wurde von Kristin Klätschke und Dr. Heike Pospisil erstellt und zur Verfügung gestellt. Als signifikant differentiell regulierte Gene wurden nur Gene mit einem p-Wert von  $\leq 0,05$  und einer *signal log ratio* von 0,8 betrachtet.

### 3.15 Software

#### Software

Adobe Photoshop CS3

Cell Quest Pro

EndNote X3

GraphPad Prism 5

LAS V 2.8.1

LAS advanced fluorescence 2.0

Microsoft Office 2003

Microsoft Excel Heatmap Makro

SE Central/Clone Manager 5

#### Hersteller

Adobe Systems GmbH, München, D

BD Biosciences, Heidelberg, D

Thomson Reuters, New York, US

GraphPad Software Inc., San Diego, US

Leica, Nußloch, D

Leica, Nußloch, D

Microsoft, Unterschleißheim, D

Dr. Peter Nollau, UKE, D

Sci-ED Software, Cary NC, US

## 4. Methoden

### 4.1 Arbeiten mit Prokaryoten

Die Arbeiten mit Bakterien wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Für die Ausplattierung von Bakterien auf Agarplatten wurde ein vorher sterilisierter Drigalski-Spatel benutzt.

#### 4.1.1 Anzucht von *E.coli* Bakterien auf Agarplatten

Zur Selektion und Isolierung einzelner Kolonien wurden die Bakterienzellen aus einem Gefrierstock oder einem Transformationsansatz entweder mit einer sterilen Pipettenspitze oder einem sterilisierten Drigalski-Spatel auf einer neuen Agarplatte, mit einer angezeigten Kombination/Konzentration von Antibiotika ausplattiert. Die Agarplatten wurden dann ÜN bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

#### 4.1.2 Anzucht von *E.coli*-Bakterien in Flüssigkulturen

Flüssigkulturen dienen dem Zweck größere Mengen an Bakterien für die Isolierung von Plasmid-DNA anzuzüchten. Zur Selektion Plasmid-tragender Bakterien wurde vorher sterilisiertes LB-Nährmedium zusätzlich mit einer angezeigten Kombination/Konzentration von Antibiotika versetzt. Die Flüssigkulturen wurden anschließend mit einer einzelnen Plasmid-tragenden *E.coli*-Kolonie einer LB-Selektionsplatte angeimpft. Die Inkubation der Bakterien-Kulturen erfolgte ÜN im Schüttelinkubator bei 37°C und 180rpm.

#### 4.1.3 Transformation von *E.coli*- Bakterien mit Plasmid DNA

Je 100µl kompetenter *E.coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, vorsichtig etwas resuspendiert, und mit 5–20µl eines Plasmids versetzt. Der Transformationsansatz wurde vorsichtig gemischt und für 20min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 30 bis 90sek bei 42°C hitzegeschockt und unmittelbar anschließend für 5min wieder auf Eis inkubiert. Nach der Eis-Inkubation wurden dem Transformationsansatz 900µl SOC-Medium zugefügt und der Ansatz für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend

wurden die transformierten Zellen für 3min bei 5000rpm sedimentiert und der Überstand bis auf 100 – 300µl abgenommen. In dem Restvolumen wurden die Zellen vorsichtig resuspendiert und auf entsprechende LB-Selektivagarplatten mit Volumen von 50 bis 250 µl ausplattiert. Die Agarplatten wurden ÜN bei 37°C inkubiert.

#### **4.1.4 PCR- Screening von E.coli Kolonien**

Die schnelle und effiziente Durchmusterung von Kolonien kann alternativ zu einer Restriktionsanalyse auch mittels einer PCR durchgeführt werden. Hierzu wird von ausgestrichenen Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze eine Probe *gepickt*, in ein Reaktionsgefäß mit 20µl Wasser + 100µg/ml RNase A überführt und für 4 – 5 min bei 95°C inkubiert. Bei diesem Schritt werden die Bakterien aufgeschlossen und die Plasmid-DNA freigesetzt. Die einzelnen Ansätze wurden dann für 2min bei 14000rpm und RT zentrifugiert, wobei die Plasmid-DNA sich anschließend im Überstand befindet und die Bakterientrümmel pelletiert werden. Für die PCR wurden jeweils 1,5µl Plasmid-DNA aus dem Überstand und 8,5µl eines PCR-Master-Mixes (mit Polymerase, Puffer, Primern und dNTPs) zu einem Gesamtvolumen von 10µl zusammengegeben und in die PCR eingesetzt. Die Komposition des Master-Mixes wurde dabei so berechnet, dass die molaren Konzentrationen der einzelnen Bestandteile in dem 10µl-PCR-Reaktionsansatz den Endkonzentrationen wie unter Punkt 4.2.3 beschrieben entsprechen. Das PCR-Programm erfolgte wie in Tabelle 8 dargestellt. Eine anschließende Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte zeigte anhand der Banden und deren Größe, ob eine entsprechende Kolonie positiv war.

#### **4.1.5 Maxipräparation von Plasmid-DNA**

Die Maxipräparation von Plasmid-DNA in hoher Qualität wurde mit Hilfe des *Nucleobond<sup>®</sup> PC500 Kits* der Firma Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Plasmid-DNA-Isolierung basiert dabei auf einer alkalischen SDS-Lyse der Zellen und der anschließenden Aufreinigung mittels Anionenaustauscher-Chromatographie.

## 4.2 Molekularbiologische Methoden

Sofern nicht anders erwähnt wurde DNA in autoklaviertem MilliQ-Wasser (dH<sub>2</sub>O) aufgenommen, um die Aktivität von DNA-modifizierenden Enzymen in Folgereaktionen nicht unbeabsichtigt zu beeinflussen.

### 4.2.1 Fotometrische Quantifizierung von DNA

Die Bestimmung der DNA-Konzentration wurde spektralfotometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm (OD<sub>260</sub>), dem optimalen Absorptionsbereich von Purin-/Pyrimidin-Basen, durchgeführt. Eine OD<sub>260</sub> von 1,0 entspricht dabei einer Konzentration von 50µg/ml dsDNA bzw. 33µg/ml ssDNA/RNA (Sambroock et al., 1989). Die Konzentration für dsDNA errechnet sich nach der Formel:

$$c_{DNA} [\mu\text{g} / \text{ml}] = OD_{260} \times 50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Bei einer Konzentrationsbestimmung mit dem NanoDrop-Fotometer wurde die DNA-Lösung unverdünnt mit Volumina von 1-2 µl direkt auf einem Edelstahlstift appliziert.

### 4.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Übliche Agarose-Konzentrationen (0,7-2% w/v) richten sich jeweils nach dem entsprechenden Trennbereich bzw. der Fragmentgröße(n) der eingesetzten DNA. Die Agarose wird durch Aufkochen in 1xTAE gelöst und nach Abkühlung auf ca. 50°C mit 1µl EtBr-Lösung (1mg/ml Stock) vermischt. Die DNA-Proben wurden mit 10xDNA-Ladepuffer versetzt und zusammen mit einem Längenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in einem horizontalen Agarose-Gelsystem bei einer konstanten Spannung von 80 bis 100 V in 1xTAE-Puffer. Die Detektion der aufgetrennten DNA wurde mit Hilfe eines UV-Transilluminators durchgeführt und mittels einer Geldokumentationsanlage aufgenommen.

### 4.2.3 Analytische PCR

Die PCR ist ein Verfahren zur gezielten *in vitro*-Amplifizierung einer DNA-Zielsequenz (*target sequence*). Durch mehrfache Wiederholung von DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Elongation kommt es bei einer PCR zu einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA-Zielsequenz. Eine PCR von  $\pm 10\text{ng}$  *Template*-DNA erfolgte in Gegenwart von je  $0,5\mu\text{M}$  Primer,  $200\mu\text{M}$  dNTPs, 1U DNA-Polymerase und 1/10-Volumen Polymerase-Puffer in Reaktionsansätzen zwischen 10-  $100\mu\text{l}$  Gesamtvolumen. Tabelle 8 zeigt das Programm für eine Standard-PCR.

PCR-Programm		
Schritt	Temperatur/Dauer	Zyklen
1	94°C für 2min	1x
5	94°C für 30sek	} 25x
6	55°C für 30sek	
7	72°C für 45sek	
8	72°C für 5min	1x
9	4°C	$\infty$

Tabelle 8: Standardprogramm für analytische PCRs

### 4.2.4 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Eine modifizierte Variante der Didesoxynukleotid-Sequenzierung nach Sanger *et al.* (1977) stellt die *Thermal cycle sequencing*-Methode dar. Bei dieser Methode erfolgt die Sequenzierung in Gegenwart von fluoreszenz-markierten dNTPs, die als Reaktionsterminatoren dienen. Die Reaktion wurde mit dem *ABI Prism Big Dye™ Thermal cycle sequencing Kit* der Firma ABI Prism durchgeführt. Dabei wurden 500ng Plasmid-DNA,  $0,5\mu\text{M}$  Primer und  $3\mu\text{l}$  Big Dye™ mit sterilem Wasser auf ein Gesamtvolumen von  $20\mu\text{l}$  eingestellt. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte nach dem in Tabelle 9 dargestellten PCR-Programm. Nach der PCR wurde die DNA mit 1/10 Volumen 3M NaOAc, pH 5,2 und dem 2½-fachem Volumen an Ethanol (abs.) präzipitiert, durch mehrere Zentrifugations- (10-30min, 14000rpm, 4°C) und Waschschriffe (Ethanol 70%) gereinigt und anschließend bei RT getrocknet. Die Analyse wurde durch den Sequenzierungs-Service des UKE Hamburg in einem ABI-Sequenator 377 durchgeführt.

Sequenzierungsprogramm		
Schritt	Temperatur/Dauer	Zyklen
1	96°C für 1min	1x
2	96°C für 10sek	} 25x
3	50°C für 5sek	
4	60°C für 4min	
5	4°C	∞

Tabelle 9: Standardprogramm für Sequenzierungen

### 4.3 Arbeiten mit Eukaryoten

Die Kultivierung eukaryotischer Zellen erfolgte unter kontrollierten Bedingungen in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit. Sämtliche Arbeiten wurden mit sterilen Materialien unter einer Sterilwerkbank durchgeführt.

#### 4.3.1 Kultivierung von B16 Melanomzellen

Die B16/F0 Melanomzellen wurden als Monolayer-Kulturen in DEMEM 10%FCS (v/v), 1%Pen/Strep (v/v) und im Transfektom mit Neomycin (600U/ml) und Zeocin (500µg/ml) gehalten. Die Zellen wurden alle 2–3 Tage passagiert und je nach Konfluenz in Verhältnissen von 1:2 bis 1:5 verdünnt. Für die Passagierung wurden die Zellen einmal mit 1xPBS gewaschen und für 3-5min mit einer Trypsin/EDTA-Lösung behandelt (trypsiniert). Die Suspension wurde dann in eine Pipette aufgenommen und die Zellen in geeigneter Verdünnung in neuen Gewebekulturschalen mit frischem Selektionsmedium ausgesät.

#### 4.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für das Einfrieren wurden Zellen von der Gewebekulturschale trypsiniert, in ein 15ml-Reaktionsgefäß überführt und für 5min bei 300xg und 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 1ml Einfriermedium resuspendiert. Die Suspension wurde dann in ein Kryoröhrchen gegeben und unmittelbar auf Eis gestellt. Die Zellen wurden anschließend entweder bei -80°C oder

in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert. Zum Auftauen der Zellen wurde ein Kryoröhrchen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, in 10ml vorgewärmtes Haltungsmedium überführt und für 5min bei 300xg und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment in einem kleinen Volumen Haltungsmedium resuspendiert und in eine neue Gewebekulturschale mit frischem Haltungsmedium ausgesäht.

#### **4.3.3 Stabile Transfektion mittels Lipo-Transfektion**

Zur Herstellung stabiler Transfektome wurde Lipofektamine 2000 Transfektionsreagenz von Invitrogen verwendet. Eine ca. 80% konfluente *in vitro*-Kultur einer Zellkulturschale (Ø10cm) wurde mit PBS gewaschen und mit 3ml DEMEM (basal) beschichtet. 5µg Plasmid-DNA wurde mit 500µl DEMEM gemischt und 5min/RT inkubiert. Parallel wurden je Transfektionsansatz 25µl Lipofektamine mit 500µl DEMEM gemischt. Beide Lösungen wurden vereinigt und 20min/RT inkubiert. Dieser Ansatz (1ml) wurde dann auf die Zellen gegeben und für ca. 3Std. im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nochmals mit PBS gewaschen und mit frischen DEMEM beschichtet. 48Std. nach Transfektion wurde mit einer entsprechenden Selektion begonnen.

#### **4.3.4 Herstellung einer Einzelzellsuspension aus *in vitro*-Kulturen**

Eine ca. 80% konfluent bewachsene Zellkulturschale (Ø10cm) wurde mit PBS gewaschen, mit 5ml 1xZelldissoziierungspuffer beschichtet, und für 10min im Brutschrank inkubiert. Der Zellrasen wurde mit einer Pipette suspendiert und in ein 15ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde bei 500rpm/10min abzentrifugiert, der Überstand dekantiert, und das Zellpellet in einem geeigneten Puffervolumen resuspendiert. Anschließend wurde der Zelltiter mit dem CEDEX *cell counter* bestimmt.

### **4.4 Proteinbiochemische Methoden**

Sofern nicht anders erwähnt, erfolgte die Durchführung nach den Protokollen bzw. in den Puffersystemen der Hersteller.

#### 4.4.1 Herstellung von Proteinlysaten

Proteinlysate wurden sowohl aus *in vitro*-Kulturen als auch aus *ex vivo*-Gewebeproben hergestellt. Bei *in vitro*-Kulturen wurde der Zellrasen einer konfluent bewachsenen Zellkulturschale (Ø10cm) 2x mit kaltem PBS gewaschen, mit 1-2ml Proteinlysepuffer (siehe Punkt 3.4) beschichtet, die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt, und für 30min auf Eis inkubiert. Bei Gewebeproben wurde das Gewebe mit Skalpell möglichst fein zerschnitten, durch ein 40µm-Zellsieb gerieben, und in 1-2ml Proteinlysepuffer aufgenommen. In beiden Fällen wurden die Proben anschließend für 30min auf Eis inkubiert und bei 1400rpm/10min/4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in eine neues Reaktionsgefäß überführt.

#### 4.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Um einzelne Proben mit gleicher Gesamtproteinmenge in Methoden wie *Western blotting* einsetzen zu können, wurde die Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode bestimmt. Hierzu wird eine Eichgerade mit definierten Mengen *bovines serum albumin* von 30 bis 1µg in 800µl PBS hergestellt. Die Eichgerade und zu bestimmende Proben werden in Halbmikroküvetten mit 200µl Bradfordreagenz auf 1ml aufgefüllt, für 15min/RT inkubiert, und die Extinktion bei 595nm im UV/Vis-Photometer gemessen.

#### 4.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Eine definierte Menge Gesamtprotein (20-50µg) wurde mit 4xLDS Ladepuffer und 500mM DTT auf ein Volumen von 10-30µl gebracht, und für 10min/70°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben mit einem Molekulargewichtsstandard auf 4-12% Bis/Tris Gelen in *Xcell sure lock Minicell*-Kammern aufgetragen und für 30-60min bei 200V (konst.) aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde in MES/SDS Laufpuffer durchgeführt.

#### 4.4.4 Western Blot/Immundefektion

Die aufgetrennten Proteinproben wurden auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF-) Membran in *Xcell sure lock Minicell*-Kammern transferiert. Vorher wurde die

Membran für 20s in Methanol aktiviert und in Transferpuffer aufgenommen. Die Blot-Kammer wurde nach dem *Xcell-sandwich*-Protokoll zusammengebaut (2xSchwamm, Filterpapier, Gel, Membran, Filterpapier, 2xSchwamm). Der Transfer wurde bei 150mA (Konst.) für 75min/4°C durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen für 60min/RT in 5% Milchpulver/TBS/T behandelt. Der Primärantikörper wurde in 2% Milchpulver/TBS/T ÜN/4°C mit der Membran inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3x5min mit TBS/T gewaschen und mit dem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper in 2% Milchpulver für 60min inkubiert. Nach nochmaligem Waschen mit 3x5min/TBS/T wurde die Membran mit ECL-Reagenz auf Hyperfilm entwickelt.

## **4.5 Tierexperimentelle Arbeiten**

### **4.5.1 Aufbereitung einer in vitro Zellsuspension zur s.c. Injektion**

24Std. vor Injektion wurde eine ca. 80% konfluent bewachsene Zellkulturschale in serum-/selektionsfreies DEMEM umgesetzt. Am Tag der Injektion wurde der Zellrasen gewaschen (PBS), mit 5ml 1xZelldissoziierungspuffer beschichtet, und für 10min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Zellrasen vorsichtig mit einer Pipetten suspendiert, in ein 15ml Reaktionsgefäß überführt, und die Zellzahl mit dem CEDEX *cell counter* bestimmt. Die errechnete Zellzahl wurde so eingesetzt, dass  $4 \times 10^6$  Zellen gesamt/Tier in 400µl serum-/selektionsfreies DEMEM aufgenommen wurden. Von dieser Suspension wurden jeweils 200µl/Tier ( $2 \times 10^6$  Zellen) subkutan abdominal in die Flanken der Tiere mit Sterican 1xKanülen injiziert.

### **4.5.2 Subkutane Injektion in C57BL/6J**

Vor Injektion wurde die Zellsuspension in eine sterile 1,5ml Spritze aufgezogen und ggfs. resuspendiert. Für die Dauer der Injektion wurden die Tiere Kurzzeit-Narkotisiert. Dazu wurde ein einzelnes Exemplar in eine Begasungsglocke gesetzt und mit einem Gemisch aus 70% CO<sub>2</sub>/30% O<sub>2</sub> bis zum Einsetzen der sog. Schnappatmung begast. Nach Einsetzen der Schnappatmung wurden die Tiere dorsal in Normalatmosphäre auf eine PVC-Matte gelegt. Mit Daumen und Zeigefinger

wurde abdominal eine Hautfalte *gezogen* und von kaudal nach kranial mit einer 1xSterican Kanüle die Epidermis durchstoßen. 200µl Zellsuspension ( $2 \times 10^6$  Zellen) wurden je Körperhälfte möglichst etwas kranial zum inguinalen Lymphknoten injiziert.

#### 4.5.3 Versuchsablauf zum B16 Tumorwachstum

Die Inokulation der B16-Transfektome wurde ausschließlich in 8-10 Wochen alten C57BL/6J-Mäusen (♂) über einen Zeitraum von 10 Tagen durchgeführt. Dieses Zeitfenster wurde gewählt, weil es einen potentiellen Übergang zwischen prämetastatischem und metastasiertem Zustand widerspiegelt. Als SOP (*standard operating protocol*) wurden den Tieren jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen subkutan, abdominal in die Flanken gespritzt (ca. auf Höhe des *Lymphonodus inguinale*), für 10 Tage inokuliert, und anschließend routinemäßig eine Blutentnahme und eine Biopsie der B16-Melanome, der inguinalen Lymphknoten, der Milzen und der Lungen der Tiere vorgenommen. Abb.12 zeigt das SOP (*standard operating protocol*) der B16 Melanome in C57BL/6J-Mäusen.

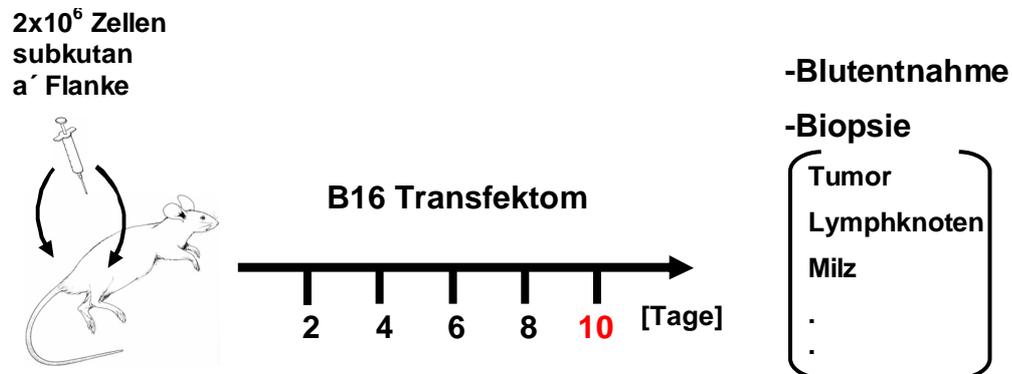


Abbildung 12: *Standard operating protocol* zum B16 in vivo Wachstum

#### 4.5.4 Tötung von Tieren und Blutentnahme/Biopsie

Nach Ablauf eines definierten Zeitfensters des Tumorwachstums wurden die Tiere zuerst mit 70% CO<sub>2</sub>/30% O<sub>2</sub> für ca. 5min narkotisiert und anschließend mit 99% CO<sub>2</sub> bis zum Eintritt des Todes begast. Zur *post mortem* Kontrolle wurde routinemäßig der sog. Pfotenreflex-Test durchgeführt. Zur Bluprobengewinnung wurde eine Herzpunktion ausgeführt. Hierzu wird eine Kanüle von kaudal nach kranial direkt

inferior zum Sternum bis ins Herz gestochen. Durch Aufbau eines Unterdrucks in der Spritze wurde eine möglichst große Menge an Herzblut gewonnen (ca. 1ml/Tier) und in *Microvette* Serumröhrchen überführt. Da ein solch großer Blutverlust, gerechnet auf Gesamtblutvolumen/Tier, auch unter *in vivo* Bedingungen tödlich wäre, wurde auf eine zervikale Dislokation (*Genickbruch*) als alternative Tötungsmethode verzichtet. Als Routinebiopsie wurden sowohl die Tumoren beidseitig, die inguinalen Lymphknoten beidseitig als auch die Milz jeweils *in toto* mit Skalpell herausgeschnitten. Je nach weiterem Verwendungszweck wurden die gewonnenen Proben entweder in einem geeigneten Volumen PBS aufgenommen oder in Kryoröhrchen überführt und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

#### **4.5.5 Serumgewinnung und Metabolitenmessung mittels ELISA**

Blutproben wurden in *Microvette* Serumröhrchen für 2Std./RT oder 4°C/ÜN agglutiniert. Diese Röhrchen sind auf ihrer Innenseite mit Gerinnungsfaktoren beschichtet, welche die Agglutination einer Blutprobe beschleunigen. Anschließend wurden die Serumröhrchen bei 10000g/5min zentrifugiert und das Serum (Überstand) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die so gewonnenen Primärserumproben wurden entweder zum sofortigen Gebrauch eingesetzt oder bei -20°C gelagert. Für eine Metabolitenmessung wurden ELISA-Assays der Firmen R&D Systems und eBiosciences (3.9) nach Protokoll der Hersteller durchgeführt. Geeignete Substrate zur Erstellung einer Eichgeraden für den jeweiligen Metaboliten sind im Assay mitgeliefert. Zur Bestimmung von Serum-Prostaglandin E<sub>2</sub> wurden die Proben zusätzlich mit Indomethacin versetzt (10µg/ml), um eine weitere Prostaglandinsynthese durch Zykllooxygenase 2 zu unterbinden. Die Bestimmung von Serum-IFN $\gamma$  wurde aus Primärserum gemacht. Die Messung der Assays erfolgte in einem Multilabel Counter Victor<sup>3</sup> ELISA-Reader bei 450nm.

#### **4.5.6 Immunhistochemische Methoden**

Zur Herstellung von Paraffinblöcken aus Gewebsbiopsien wurden die Proben unmittelbar nach Entnahme in 4%PFA/PBS aufgenommen und anschließend in 70% Isopropanol überführt. Die Einbettung erfolgte am Institut für Anatomie des UKE, Prof. Schumacher. Für immunhistochemische Färbungen wurden Gewebeschnitte

mit einer Dicke von 5µm angefertigt. Zur Herstellung von Kryoblöcken wurden die Proben unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und nach Bedarf bei konstant -20°C in O.C.T. *tissue tek compound* auspolymerisiert. Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden ebenfalls Gewebeschnitte mit einer Dicke von 5µm angefertigt. Sowohl von Paraffin- als auch Kryoschnitten wurden zur Negativkontrolle einer Färbung die entsprechenden Protokolle ohne jeweilige Primärantikörper durchgeführt.

#### 4.5.7 Immunhistochemie von Paraffinschnitten

Die Paraffinschnitte wurden 2x5min in Xylolersatz entparaffiniert, danach in einer absteigenden Alkoholreihe für 5min in 100%, 96%, 80% und 50% Ethanol rehydriert, und anschließend für jeweils 5min in dH<sub>2</sub>O und TBS gewaschen. Für die in dieser Arbeit eingesetzten Primärantikörper wurden die entsprechenden Antigene mit Proteinase K demaskiert. Dazu wurden die Schnitte mit 500µg/ml Proteinase K in 50mM Tris/HCl, pH7,5 für 15min/37°C inkubiert und danach 3x5min mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurden die Schnitte mit 10% Schweineserum in *Antibody Diluent* für 30min/RT behandelt und anschließend mit dem Primärantikörper in 2% Schweineserum/*Antibody Diluent* ÜN/4°C inkubiert. Nach Primär-Inkubation wurden die Schnitte 3x5min mit TBS gewaschen, danach mit biotinyliertem Sekundärantikörper in 2% Schweineserum/*Antibody Diluent* für 30min/RT inkubiert, und abermals 3x5min mit TBS gewaschen. Dieser Primär-/Sekundär<sup>biotin</sup>-Komplex wurde nun mit Streptavidin-konjugierter alkalischer Phosphatase aus dem Vectastain ABC Kit gekoppelt. Die Farbreaktion wurde mit einer Naphtol AS-BI-Phosphat-Färbelösung (3.4) für 15min/RT im Dunkeln durchgeführt. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Schnitte unter Leitungswasser gewaschen, und die Zellkerne für eine bessere Darstellung der Gewebemorphologie zusätzlich für 5s mit Mayer's Hämalaun angefärbt. Am Ende wurden die Schnitte nochmals mit Leitungswasser gewaschen, getrocknet, und mit Vecta Mount eingedeckelt.

#### 4.5.8 Immunfluoreszenz von Kryoschnitten

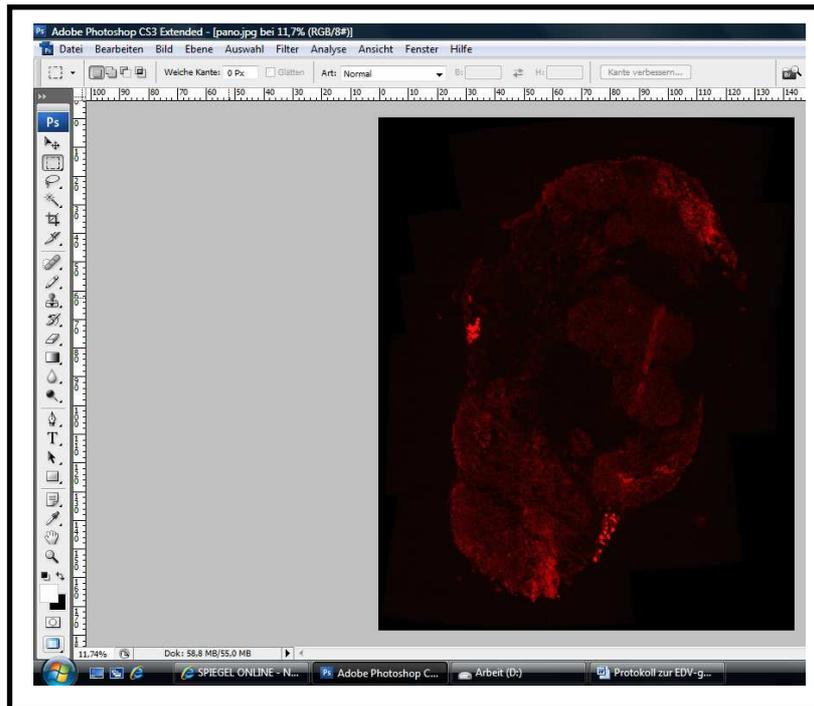
Die Gefrierschnitte wurden auf RT gebracht und mit 4% Paraformaldehyd/PBS für 10min/RT fixiert. Anschließend wurden die Schnitte 1x5min in PBS/T gewaschen und in einer feuchten Kammer mit 5% BSA/PBS/T für 30min/RT blockiert. Die Primärantikörper wurden dann in 1%BSA/PBS/T ÜN/4°C auf den Gefrierschnitten inkubiert. Nach Primär-Inkubation wurden die Schnitte 3x5min mit PBS/T gewaschen und mit entsprechenden fluochrom-konjugierten Sekundärantikörpern in 1%BSA/PBS/T für 45min/RT im Dunkeln inkubiert. Zur Darstellung der Zellkerne wurde bei der Sekundärinkubation zusätzlich mit DAPI gefärbt. Am Ende wurden die Schnitte nochmals 3x5min mit PBS/T gewaschen, getrocknet, und mit Aqua Polymount eingedeckelt.

#### 4.5.9 Mikroskopische Auswertung

Für die Bildgebung gefärbter Paraffin-/Kryoschnitte wurde ein Leica DM5000B-Mikroskop mit den Objektiven a) 5x0,11 NPLAN b) 10x0,3 HCX PL fluotar c) 20x0,5 HCX PL fluotar d) 40x0,75 HCX PL APO und e) 100x1,4 HCX PL APO (Öl) benutzt. Zur Darstellung von Hellfeld- und Fluoreszenzbildern wurden die Kameras DFC 290 (Hell) und DFC 360FX (Fluo) eingesetzt. Ausgewählte Bilder wurden mit der Leica LAS-Software V.2.8.1 (Hellfeld) und Leica *advanced fluorescence* V.2.0.0-Software aufgenommen.

#### 4.5.10 Tumor-, Blut- und Lymphgefäßflächenbestimmung

Zur Bestimmung von Parametern wie der Tumorgröße, oder der Fläche der tumoralen Blut-/Lymphvaskulatur nach 10 Tagen *in vivo*-Wachstum, wurden Tumoren aus den verschiedenen Kohorten/ B16-Transfektomen *in toto* präpariert und als Kryoblöcke aufbereitet. Von diesen Proben wurden Rasterschnitte ( $n \geq 12$ /Tumor) mit einer gleichmäßigen Verteilung über den ganzen Block angefertigt und nach dem entsprechenden Protokoll für Fluoreszenzaufnahmen gefärbt. Für die Rasteranalyse wurden die einzelnen Gefrierschnitte *in toto* abfotografiert, und mit der „Photomerge“-Funktion in Adobe Photoshop CS3 zu einem sog. Panorama zusammengefügt (Abb.13).



**Abbildung 13: Panorama eines Kryoschnitts aus 26 Einzelbildern**

Aus den Grundeinstellungen des Leica DM5000b-Mikroskops kann eine Messskala zur Umrechnung von Pixel in eine physikalische Längeneinheit erstellt werden. Das Pixel/Längenverhältnis richtet sich dabei nach dem Vergrößerungsfaktor der Objektive. Die Einstellungen der Messskala wurden nach Tabelle 10 übernommen und in Photoshop abgespeichert. Für die Rasteranalyse wurden Panoramen bei einer Vergrößerung von 10x ausgewertet.

Fluotar 10x (dry)	1 Pixel =	0,64 $\mu\text{m}$
Fluotar 20x (dry)	1 Pixel =	0,32 $\mu\text{m}$
Fluotar 40x (dry)	1 Pixel =	0,16 $\mu\text{m}$
Fluotar 100x (oil)	1 Pixel =	0,06 $\mu\text{m}$

**Tabelle 10: Pixel/Längenverhältnis ( $\mu\text{m}$ ) der verwendeten Objektive**

Zur Berechnung der Fläche eines ausgewählten Bereichs wurden die Panoramen schwarz/weiß invertiert (Negativ) und der gewünschte Bereich mit der sog. „Zauberstab“-Funktion markiert (Abb.14). Über die Analysefunktion „Messung

aufzeichnen“ konnte anhand der Messskala bei definierter Vergrößerung die Fläche des markierten Bereichs in  $\mu\text{m}^2$  ausgedrückt werden.

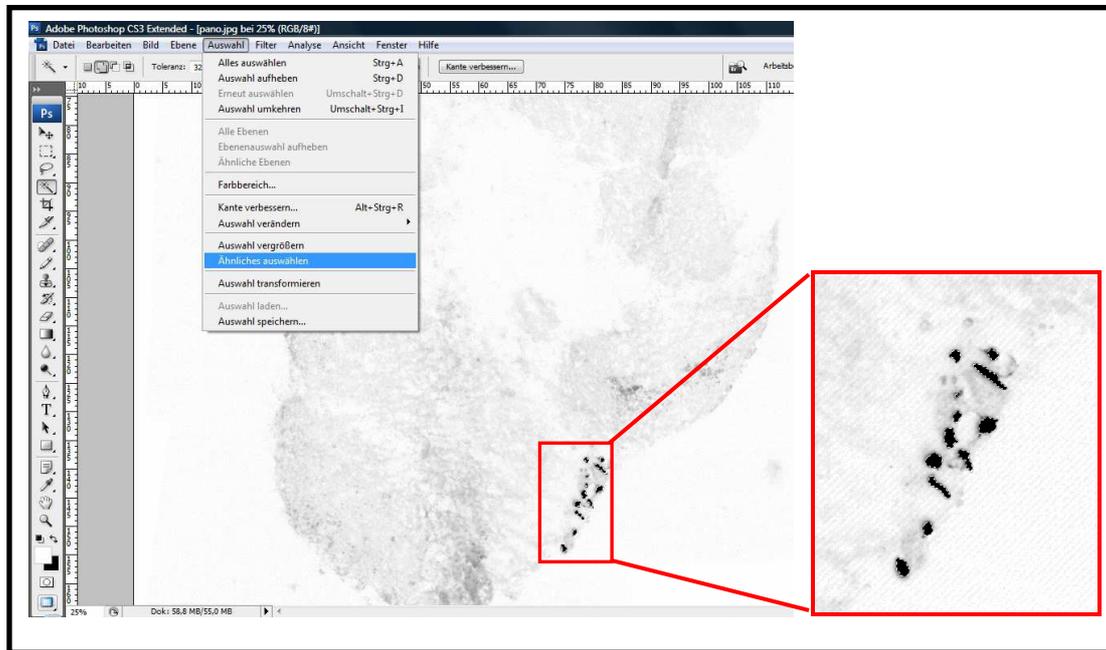


Abbildung 14: Negativ eines Panoramas zur Flächenberechnung

#### 4.6 Durchflusszytometrie (FACS)

Sämtliche durchflusszytometrischen Arbeiten wurden mit einem FACS Calibur™ Flow Cytometer der Firma BD Bioscience durchgeführt und dokumentiert.

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS) ist ein Verfahren zur qualitativen Bestimmung von Oberflächen- und intrazellulärer Proteine, und/oder zur Quantifizierung auf Einzelzellebene. Sie ermöglicht eine schnelle und genaue Multiparameter-Bestimmung vieler einzelner Partikel bzw. Zellen in Suspension. Dafür werden die Zellen durch hydrodynamische Fokussierung in einem Flüssigkeitsstrom an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge tropfenweise vorbeigeführt. Das daraufhin von den Zellen ausstrahlende Streu- und Fluoreszenzlicht wird durch Detektorsysteme erfasst und kann Aufschluss über die verschiedenen physikalischen und chemischen Eigenschaften der Zellen geben.

#### 4.6.1 Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Gewebeproben

Tumorproben wurden mit Skalpell von Rest- (z.B. Fett-) gewebe freipräpariert, möglichst fein zerschnitten, und zum Auflösen von Bindegewebsanteilen bzw. Kollagenmatrixes mit einer Verdauung aus DNase I, Dispase und Kollagenase IV (vgl. 3.5) für 45min/36°C behandelt. Die Suspension wurde anschließend durch ein 40µm-Zellsieb gerieben und bei 1400rpm/5min abzentrifugiert. Lymphknoten und Milzproben wurden freipräpariert, zerschnitten, unmittelbar durch ein 40µm-Zellsieb gerieben und ebenfalls bei 1400rpm/5min abzentrifugiert. Bei allen Proben wurde nach der Zentrifugation der Überstand dekantiert, und die Proben mit 5ml Erythrozytenlysepuffer (3.5) für 10min/RT inkubiert. Nach Inkubation wurde zum Ausverdünnen des Puffers mit PBS auf 10ml Gesamtvolumen aufgefüllt und die Proben bei 1400rpm/5min abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, die Proben in 1-2ml FACS-Puffer aufgenommen, und mit dem CEDEX *cell counter* der Zelltiter bestimmt.

#### 4.6.2 Färbung, Messung und Analyse von Proben

Bei einer Verwendung von Zellen für FACS-Analysen wurde eine Zellzahl von  $\pm 1 \times 10^6$  Zellen/Probe/Färbung eingesetzt. Vor der eigentlichen Färbung wurden alle Proben routinemäßig zur Hintergrundreduktion, bzw. dem Absättigen unspezifischer Bindungen, mit Maus F<sub>C</sub>-Block (CD16/32) und Cohn II behandelt („*geblockt*“).

Die Proben wurden mit der Blocklösung für 30min/4°C inkubiert und danach bei 1400rpm/5min/4°C abzentrifugiert. Für Färbungen wurden nach Möglichkeit nur direkt fluochrom-konjugierte Primärantikörper eingesetzt. War dies nicht möglich, und musste eine Färbung über einen fluochrom-konjugierten Sekundärantikörper durchgeführt werden, so wurde der Standard-Block um 5% Normalserum (v/v) der Spezies des Sekundärantikörpers ergänzt (es wurde gegen die Spezies des Sekundärantikörpers *geblockt*). Beispiel: Eine Färbung X zum Nachweis des Antigens Y setzt sich zusammen aus: unkonjugierter Kaninchen anti-Maus Primärantikörper und konjugiertem Ziege anti-Kaninchen Sekundärantikörper. Geblockt wurde dann entsprechend mit: Maus F<sub>C</sub>-Block 1:2; Cohn II 1:200 und 5% Ziegenserum, normal (v/v) in 100µl FACS-Puffer. Nach Blockierung wurden Färbungen mit den Verdünnungen aus Tabelle 4 in 100µl FACS-Puffer/Probe angesetzt und für 30min bei 4°C inkubiert. Alle in einer Färbung eingesetzten

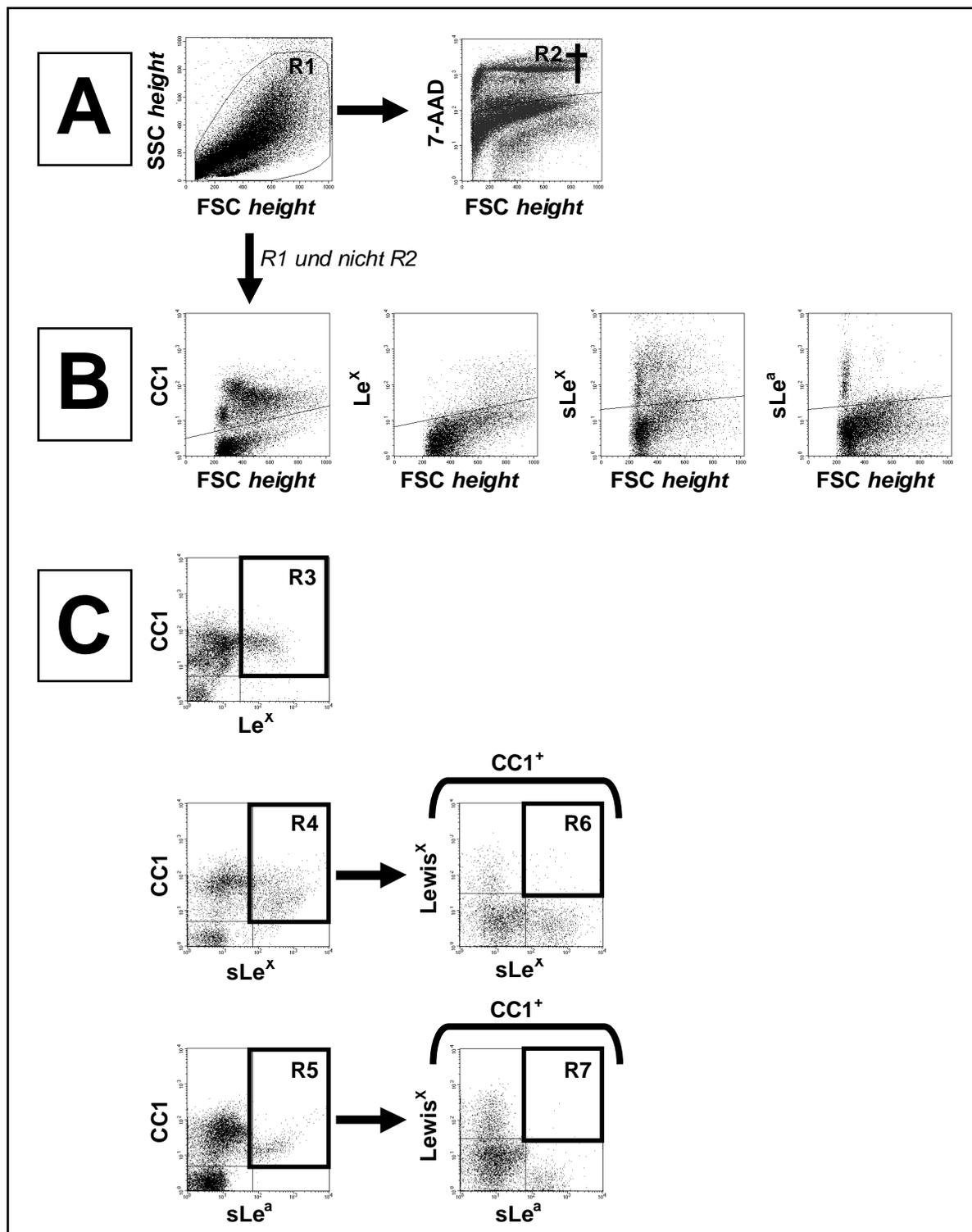
Primärantikörper wurden parallel mit einer korrespondierenden Probe isotypisiert. Dies dient dem Zweck das Hintergrundniveau des Isotypen eines Primärantikörpers X in einer Färbung Y bestimmen zu können. Durch die Isotypisierung können in einer Probe zusätzlich Schwellenwerte definiert werden zur Beurteilung ob eine Zelle X positiv oder negativ für das angefärbte Antigen Y war. Nach Färbung wurden die Proben mit PBS auf 1ml aufgefüllt, bei 1400rpm/5min/4°C abzentrifugiert, und nochmals mit 1ml PBS gewaschen. Für eine Messung wurden die Proben am Ende in 250µl PBS aufgenommen und ggfs. auf Eis gelagert. Unmittelbar vor einer Messung wurde jede Probe mit 10µl 7-AAD (BD Pharmingen) versetzt und für 10min/RT inkubiert. 7-AAD wird eingesetzt zur Diskriminierung zwischen lebenden und toten Zellen in einer Probe. Für Zielanalysen wurde mit Geräteeinstellungen gemessen, bei denen jede Färbung auf die jeweilige Quelle der Zellen (*in vitro*, Tumor, Lymphknoten, Milz) etabliert/optimiert war. Aufnahme und Dokumentation von Messungen erfolgte mit der *Cell Quest Pro* Software von BD Pharmingen. Ausgewertet und Analysiert wurden ausschließlich lebende Zellen.

#### 4.6.3 Auswertungsstrategien zur Analyse von Zielpopulationen

Zur *in vitro*-Analytik der B16-Transfektome auf eine Expression von CC1, Le<sup>x</sup>, und sLe<sup>x/a</sup> wurden die Messergebnisse als Histogramm abgebildet. Stellt man in der FACS das Messergebnis einer Färbung mit dem nachzuweisenden Antigen X als Histogramm dar, so ist der Grad der Rechtsverschiebung auf der x-Achse ein Grad für die Anzahl für das Antigen X positiver Zellen sowie des durchschnittlichen Expressionsniveau des Antigens. Beispiel: Wären alle Zellen einer Messprobe positiv für das nachzuweisende Antigen, so gäbe es zwischen der Isotypkontrolle und dem *Shift* für das Antigen keinen überlappenden Bereich auf der x-Achse (Rechtsverschiebung). Je mehr von dem Antigen X quantitativ von einzelnen Zellen exprimiert würde, umso weiter wandert der Antigen-*Shift* auf der x-Achse nach rechts. D.h. wäre jede einzelne Zelle der Messprobe positiv für das nachzuweisende Antigen X, und jede einzelne Zelle würde eine quantitativ sehr hohe Anzahl des Antigens exprimieren, so wäre der entsprechende *Shift* auf der x-Achse im Histogramm ganz rechts. Zur Analyse von *ex vivo*-Gewebeproben wurden je nach Zielpopulation individuelle Auswertungsstrategien (*Gatings*) entwickelt. Eine *Gating*-Strategie ist eine standardisierte Abfolge von Plots zur Analyse von Zielpopulationen aus einer Grundgesamtheit von Zellen aus einer *in vitro*-Reinkultur, einer Mischkultur

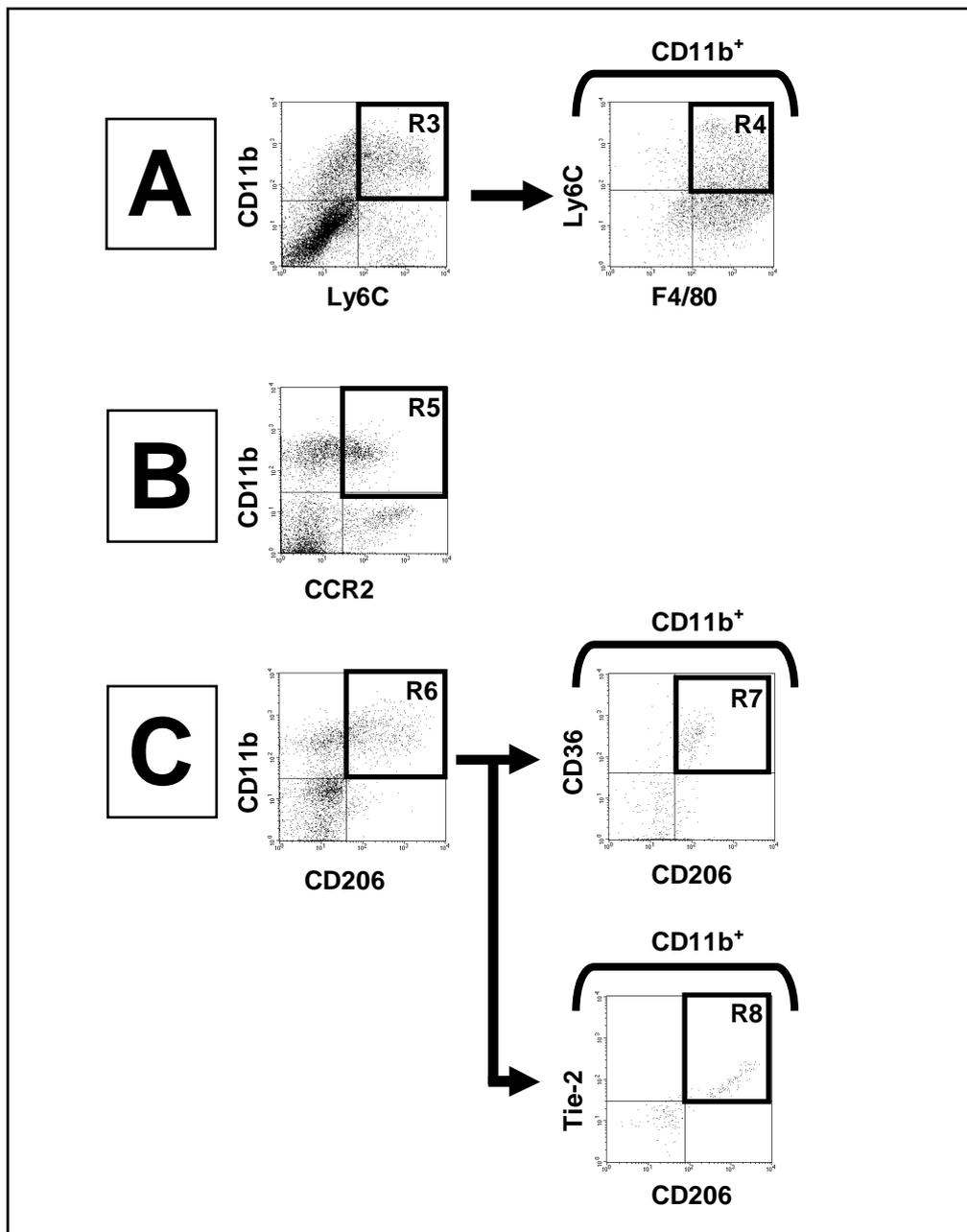
verschiedener Zelltypen oder von Gewebsbiopsien. Ziel ist die Identifikation von Populationen aufgrund eines definierten Expressionsprofils der Antigene X, Y, Z für die die Zielpopulation im FACS positiv ist oder nicht. Für den Fall, dass einzelne Zielpopulationen von anderen Zelltypen überlagert wurden, wurden regelmäßig sog. *backgate*-Kontrollen durchgeführt. *Backgates* sind interne Kontrollen einer Antigenfärbung X zurück auf den sog. FSC/SSC *height* Plot (FSC (*forward scatter*): Auftrennung der Zellen nach Zellgröße; SSC (*sideward scatter*): Auftrennung der Zellen nach Zellgranularität). Im FSC/SSC *height* Plot wird die Aufspaltung der Grundgesamtheit aller Zellen einer Probe nach Größe und Granularität abgebildet („*Rohdaten*“). In diesem Plot wird der gewünschte Gesamtanalysebereich definiert, und anschließend für die jeweilige Zielpopulation die entsprechende Auswertungsstrategie angewendet. In einem typischen FSC/SSC *height* Plot zur Darstellung der Gesamt-Leukozyten einer Probe Y teilen sich Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten, entsprechend ihrer Größe und Granularität, im FSC/SSC in drei distinkte, gut unterscheidbare Populationen auf. Durch das „*backgaten*“ für das Antigen X positiver Zellen auf den FSC/SSC kann man abbilden, ob das Antigen X hauptsächlich auf Lymphozyten oder Monozyten oder...vorkommt, oder redundant von mehreren Zellspezies exprimiert wird.

Im Folgenden sind die Auswertungsstrategien durchgeführter FACS-Analysen kurz erläutert:

Abb.15: Auswertungsstrategie Expression von Ceacam1,  $Le^x$  und  $sLe^{x/a}$ Abbildung 15: Auswertungsstrategie Expression von Ceacam1,  $Le^x$  und  $sLe^{x/a}$ 

A) Auftrennung der Proben im FSC/SSC *height* zur Diskriminierung von Debris und Definition des Gesamtanalysebereichs (R1). Lebend/Tot-Differenzierung über 7-AAD. Folgeanalytik nur mit lebenden Zellen aus R1 *und nicht* R2 (=R1<sup>7-AAD<sup>-</sup></sup>). B) Gesamtexpression von CC1,  $sLe^{x/a}$  oder  $Le^x$  aller Zellen aus R1<sup>7-AAD<sup>-</sup></sup> über den FSC *height*. C) Verteilung der Expression von  $sLe^{x/a}$  oder  $Le^x$  auf CC1<sup>+</sup>-Zellen (R3, R4, R5), sowie der Expression von  $sLe^{x/a}$  auf CC1<sup>+</sup>/Lex<sup>+</sup>-Zellen (R6, R7). FSC *height*: Auftrennung der Zellen nach Zellgröße; SSC *height*: Auftrennung der Zellen nach Zellgranularität; 7-AAD: 7-Amino-Actinomycin D; R<sub>1,2,3...</sub>: Analysebereich; CC1: murines Ceacam1;  $sLe^x$ : sialylLewisX;  $sLe^a$ : sialylLewisA;  $Le^x$ : LewisX

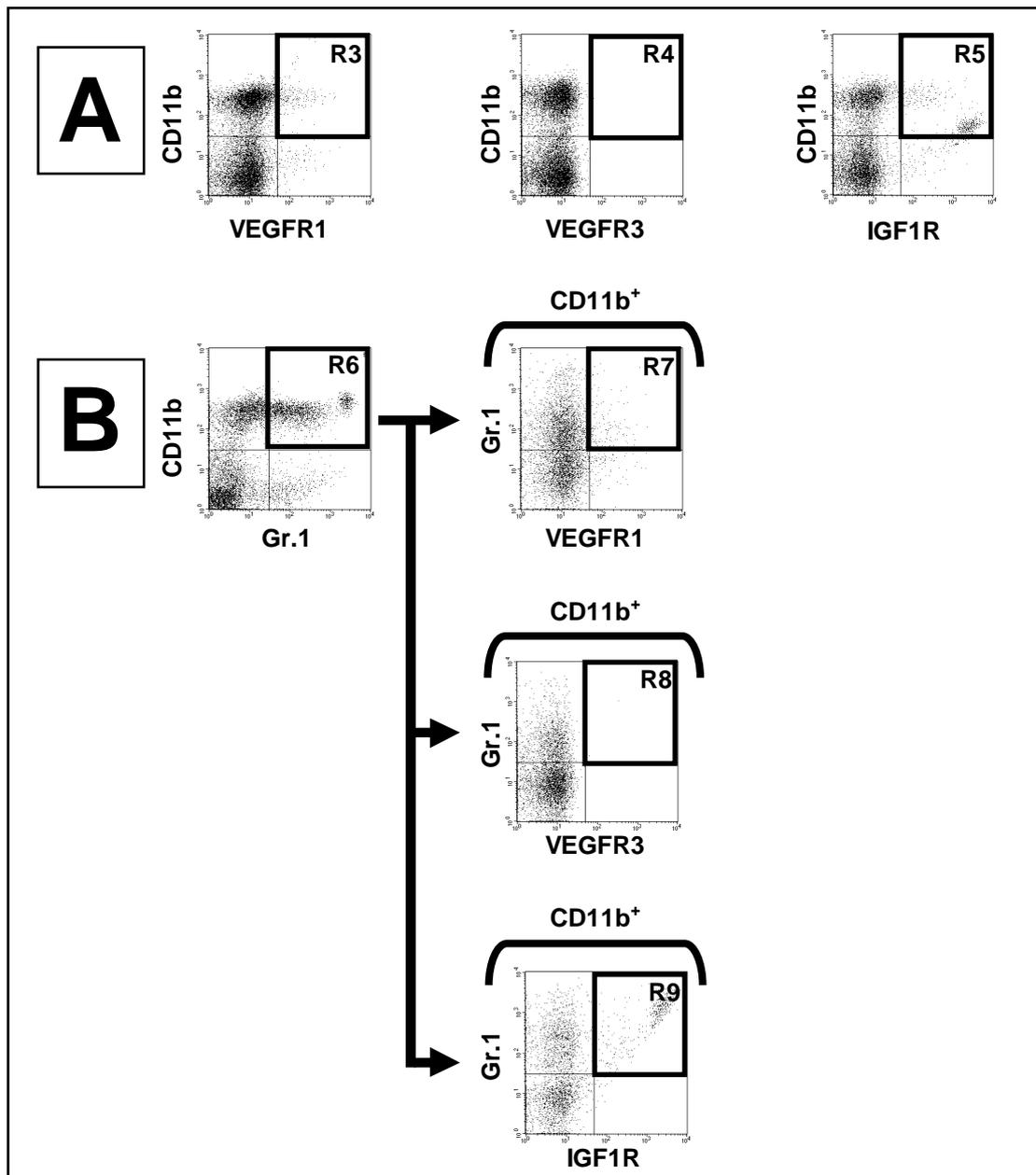
Abb.16: Auswertungsstrategie myelomonozytäre Vorläuferzellen und TAMs

**Abbildung 16: Auswertungsstrategie myelomonozytäre Vorläuferzellen und TAMs**

Aus R1<sup>7-AAD</sup>: A) Quantifizierung myelomonozytärer Vorläufer (R3/CD11b<sup>+</sup>/Ly6C<sup>+</sup>) und differenzierter Makrophagen (R4/CD11b<sup>+</sup>/Ly6C<sup>+</sup>/F4/80<sup>+</sup>). B) Quantifizierung von M1-TAMs (R5/CD11b<sup>+</sup>/CCR2<sup>+</sup>).

C) Quantifizierung von M2-TAMs (R6/CD11b<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>) und differenzieller M2-TAM-Subpopulationen über eine Ko-Expression von entweder CD36 (R7/CD11b<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>/CD36<sup>+</sup>) oder Tie-2 (R8/CD11b<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>/Tie-2<sup>+</sup>).

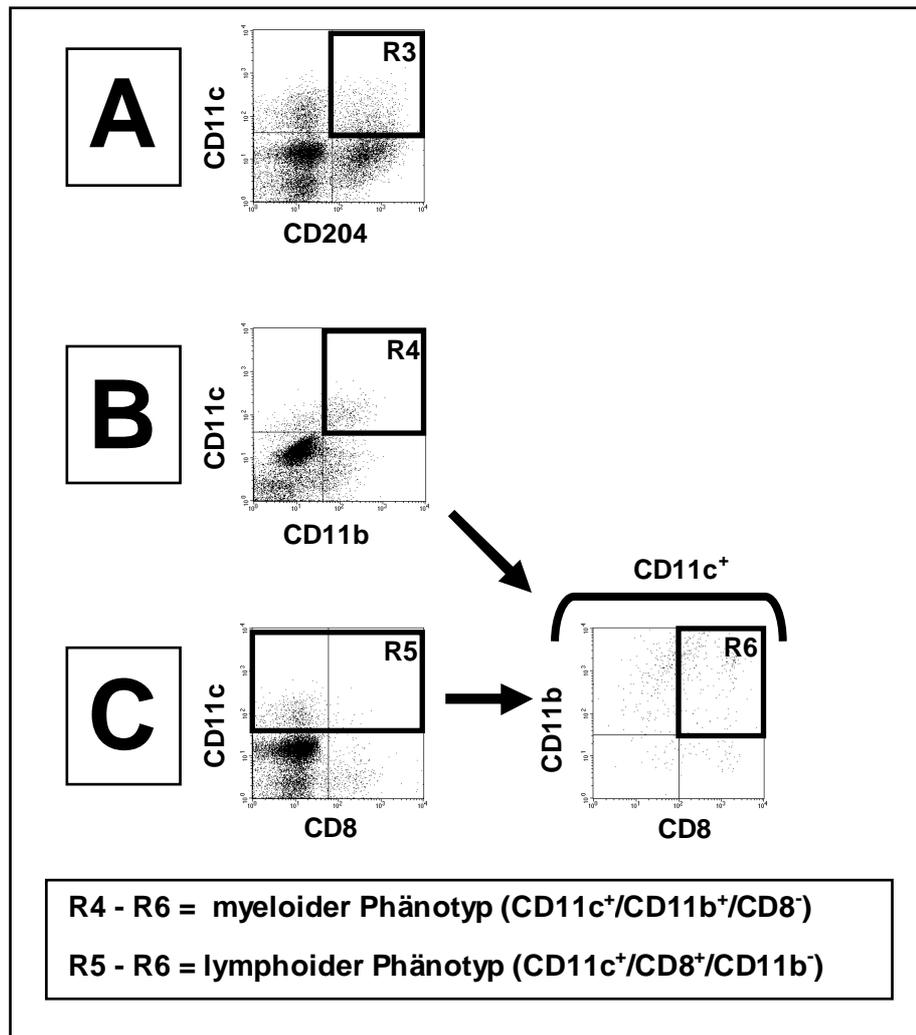
R<sub>1,2,3...</sub>: Analysebereich, CD11b: *Integrin $\alpha$ M $\beta$ 2* Leukocyte adhesion receptor MO1, Ly6C: *lymphocyte antigen 6 complex*, F4/80: *epidermal growth factor-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1*, CCR2: *C-C chemokine receptor type 2*, CD206: *Macrophage mannose receptor 1*, CD36: *fatty acid translocase*, Tie-2: *Angiopoietin-1 receptor*

Abb.17: Auswertungsstrategie *myeloid derived suppressor cells* (MDSCs)**Abbildung 17: Auswertungsstrategie *myeloid derived suppressor cells* (MDSCs)**

Aus R1<sup>7-AAD</sup>: A) Identifizierung von CD11b<sup>+</sup>-Zellen mit einer Ko-Expression von entweder VEGFR1 (R3/CD11b<sup>+</sup>/VEGFR1<sup>+</sup>), VEGFR3 (R4/CD11b<sup>+</sup>/VEGFR3<sup>+</sup>) oder IGF1R (R5/CD11b<sup>+</sup>/IGF1R<sup>+</sup>).

B) Quantifizierung von MDSCs (R6/CD11b<sup>+</sup>/Gr.1<sup>+</sup>) und differentieller MDSC-Subpopulationen mit einer Ko-Expression von VEGFR1 (R7/CD11b<sup>+</sup>/Gr.1<sup>+</sup>/VEGFR1<sup>+</sup>), VEGFR3 (R8/CD11b<sup>+</sup>/Gr.1<sup>+</sup>/VEGFR3<sup>+</sup>) oder IGF1R (R9/CD11b<sup>+</sup>/Gr.1<sup>high+</sup>/IGF1R<sup>+</sup>).

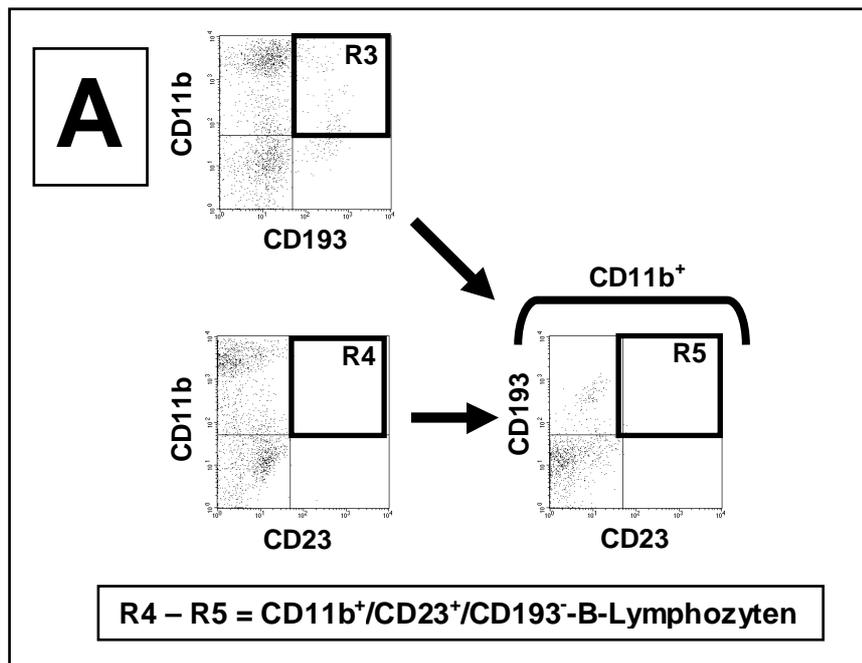
R<sub>1,2,3...</sub>: Analysebereich, CD11b: *Integrin $\alpha$ M $\beta$ 2* Leukocyte adhesion receptor MO1, Gr.1: *lymphocyte antigen 6 C/G*, VEGFR1: *vascular endothelial growth factor receptor 1*, VEGFR3: *vascular endothelial growth factor receptor 3*, IGF1R: *insulin-like growth factor 1 receptor*

Abb.18: Auswertungsstrategie CD11c<sup>+</sup> dendritische ZellenAbbildung 18: Auswertungsstrategie CD11c<sup>+</sup> dendritische Zellen

Aus R1<sup>7-AD</sup>: A) Quantifizierung CD11c<sup>+</sup> dendritischer Zellen mit einer Ko-Expression von CD204 (R3/CD11c<sup>+</sup>/CD204<sup>+</sup>). B) und C) Quantifizierung und Diskriminierung CD11c<sup>+</sup> dendritischer Zellen mit einem myeloiden (+CD11b<sup>+</sup>) oder lymphoiden (+CD8<sup>+</sup>) Phänotyp durch Ausschluss einer CD11b<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Ko-Expression. B: myeloider Phänotyp (R4-R6/CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>), C: lymphoider Phänotyp (R5-R6/CD11c<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD11b<sup>-</sup>).

R<sub>1,2,3...</sub>: Analysebereich, CD11b: *Integrin $\alpha$ M $\beta$ 2 Leukocyte adhesion receptor MO1*, CD11c: *Integrin $\alpha$ X $\beta$ 2 leukocyte adhesion receptor p150*, CD204: *scavenger receptor type A*, CD8: *T-cell surface glycoprotein CD8 alpha chain*, LDL: *low density lipoproteins*

**Abb.19: Auswertungsstrategie CD11b<sup>+</sup>-B-Lymphozyten**



**Abbildung 19: Auswertungsstrategie CD11b<sup>+</sup>-B-Lymphozyten**

Aus R1<sup>7-*AAD*</sup>: A) Diskriminierung aktivierter CD11b<sup>+</sup>-B-Lymphozyten von CD23<sup>+</sup>-dendritischen oder monozytären Zellen durch Ausschluss einer CD193<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup>-Ko-Expression.

R<sub>1,2,3...</sub>: Analysebereich, CD11b: *Integrin $\alpha$ M $\beta$ 2* Leukocyte adhesion receptor MO1, CD23: *low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor*, CD193: *chemokine (C-C motif) receptor 3 (CCR3)*

Abb.20: Auswertungsstrategie differenzielle T-Lymphozytenpopulationen

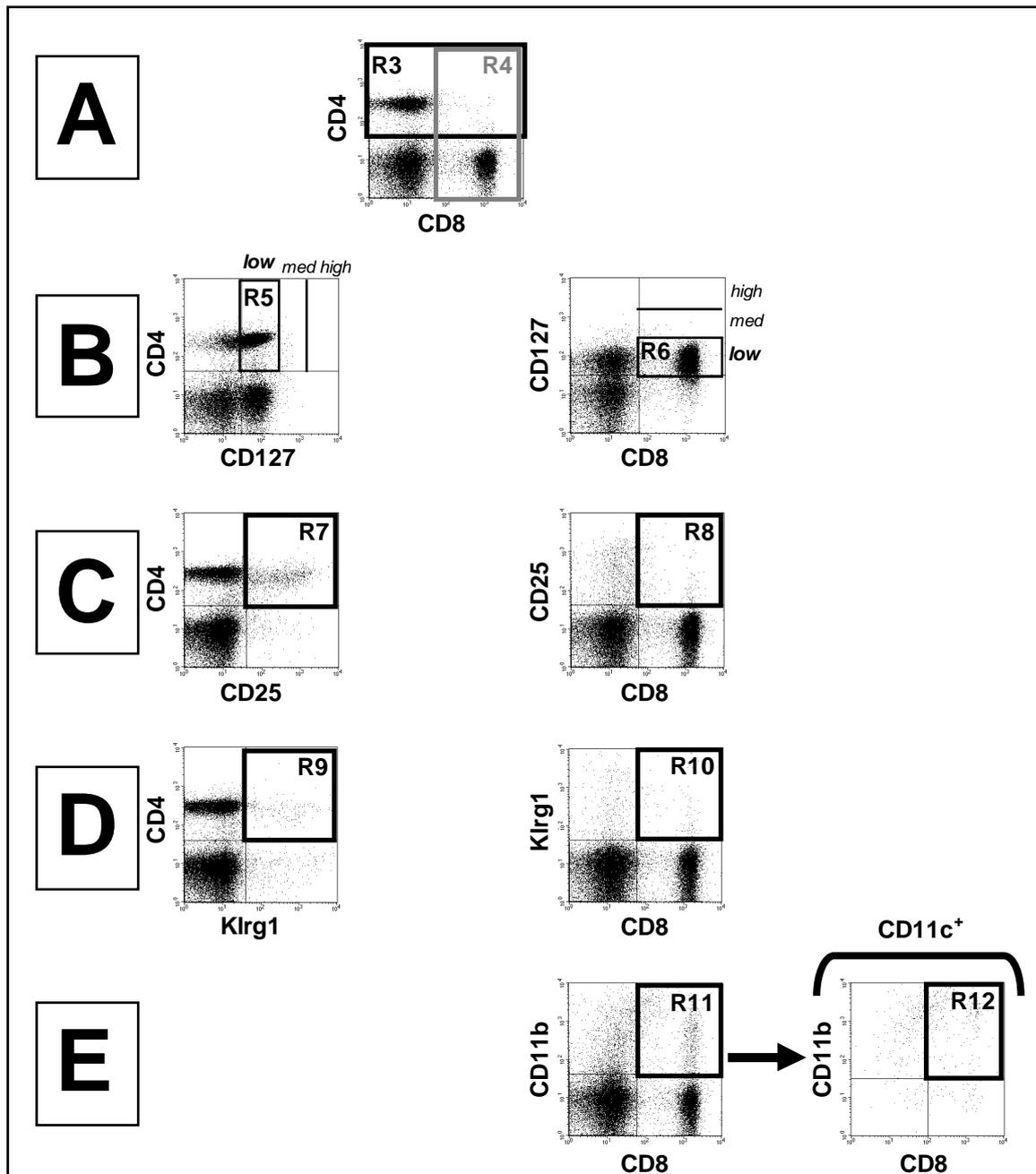
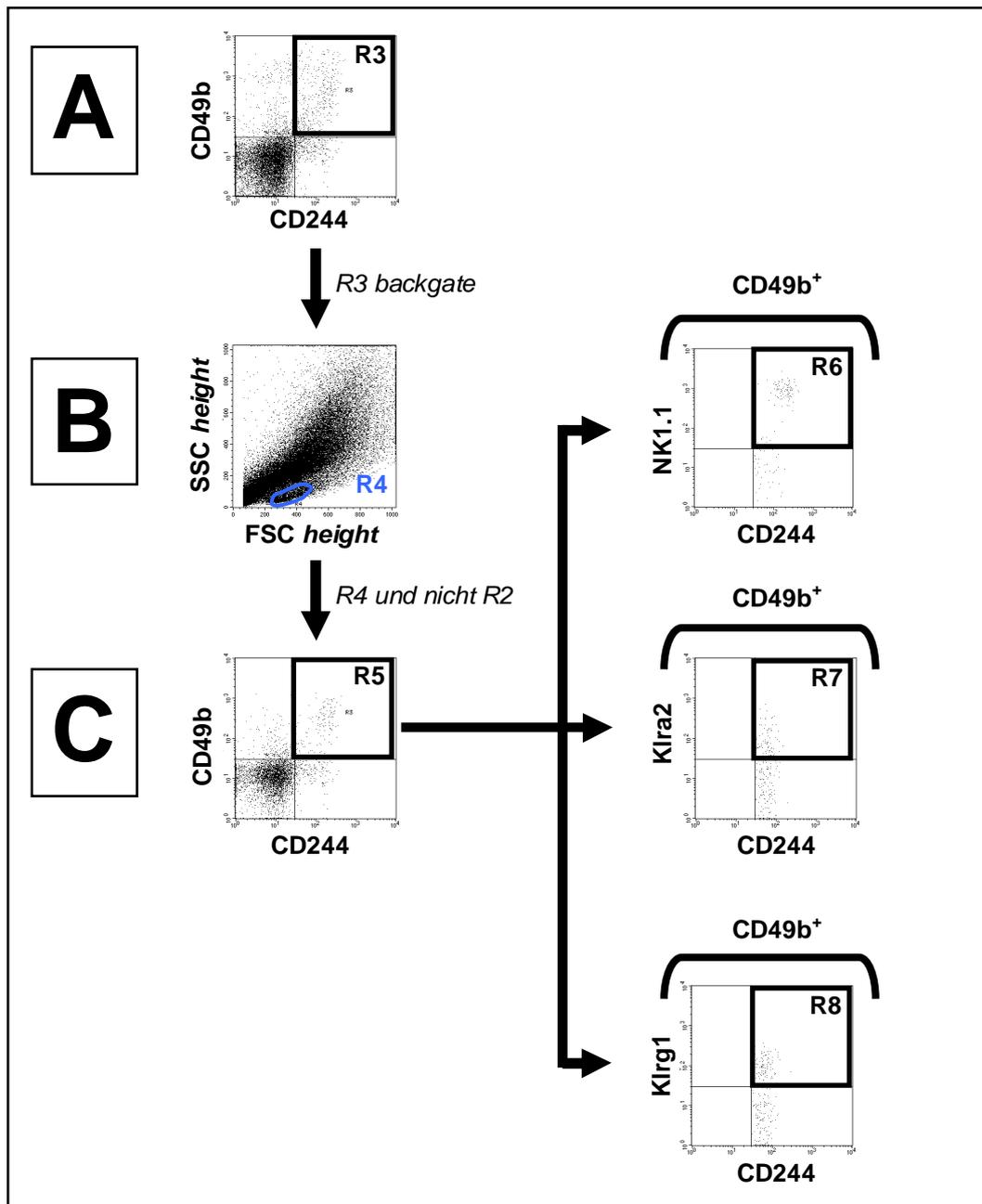


Abbildung 20: Auswertungsstrategie differenzielle T-Lymphozytenpopulationen

Aus R1<sup>7-AAD</sup>: A) Quantifizierung von CD4<sup>+</sup> (R3/CD4<sup>+</sup>) und CD8<sup>+</sup> (R4/CD8<sup>+</sup>) gesamt. B) Diskriminierung des Aktivierungsstatus von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten über eine CD127 Ko-Expression (R5/CD4<sup>+</sup>T<sub>Eff</sub> versus R6/CD8<sup>+</sup>T<sub>Eff</sub>). C) Quantifizierung der Expression von CD25 auf CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten (R7/CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>)(R8/CD8<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>). D) Quantifizierung der Expression von Klr1 auf CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten (R9/CD4<sup>+</sup>/Klr1<sup>+</sup>)(R10/CD8<sup>+</sup>/Klr1<sup>+</sup>). E) Diskriminierung von CD11b-exprimierender CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten von CD11b-exprimierenden CD11c<sup>+</sup> dendritischen Zellen durch Ausschluss einer CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> Ko-Expression (R11-R12/CD8<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup>).

R<sub>1,2,3...</sub>: Analysebereich, CD4: *T-cell surface glycoprotein CD4*, CD8: *T-cell surface glycoprotein CD8, alpha chain*, CD11b: *Integrin $\alpha$ M $\beta$ 2 leukocyte adhesion receptor MO1*, CD11c: *Integrin $\alpha$ X $\beta$ 2 leukocyte adhesion receptor p150*, CD25: *Interleukin-2 receptor, subunit alpha*, CD127: *Interleukin-7 receptor, subunit alpha*, Klr1: *Killer cell lectin-like receptor, subfamily G member 1*

Abb.21: Auswertungsstrategie differenzielle NK-Zellpopulationen

**Abbildung 21: Auswertungsstrategie differenzielle NK-Zellpopulationen**

Aus R1<sup>7-AAD</sup>: A) Identifizierung von NK-Zellen über eine Ko-Expression von CD49b und CD244 (R3/CD49b<sup>+</sup>/CD244<sup>+</sup>). B) *backgate*-Kontrolle (R4, blaue Region) zur Diskriminierung von NK-Zellen und T-Lymphozyten im FSC/SSC *height*. C) Quantifizierung von NK-Zellen (R5/CD49b<sup>+</sup>/CD244<sup>+</sup>) und NK-Zellen mit einer Ko-Expression von NK1.1 (R6/CD49b<sup>+</sup>/CD244<sup>+</sup>/NK1.1<sup>+</sup>), Klra2 (R7/CD49b<sup>+</sup>/CD244<sup>+</sup>/Klra2<sup>+</sup>) oder Klrg1 (R8/CD49b<sup>+</sup>/CD244<sup>+</sup>/Klrg1<sup>+</sup>). R<sub>1,2,3...</sub>: Analysebereich, CD49b: *Integrin*<sub>α2β1</sub>, CD244: *Natural killer cell receptor 2B4*, NK1.1: *killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1C*, Klra2: *killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 2*, Klrg1: *Killer cell lectin-like receptor, subfamily G member 1*

#### 4.7 Statistik/Mathematische Auswertung (T-Test)

Der T-Test ist ein mathematisch/statistisches Verfahren zur Hypothesenprüfung beim Vergleich der Mittelwerte & Standardabweichung zweier Gruppen (*Grundgesamtheit*). Er erlaubt eine Aussage, ob eine Messreihe mit einer anderen Messreihe konsistent ist oder nicht, so dass mit diesem Verfahren getestet werden kann, ob ein betrachtetes System (unter natürlichen oder experimentell gesteuerten Bedingungen) sich mit der Zeit ändert oder nicht. Der Test setzt voraus, dass die betrachteten Variablen in der Grundgesamtheit normalverteilt sind. In dieser Arbeit wurden zweiseitige, ungepaarte T-Test's auf 99%-Vertrauensniveau durchgeführt. D.h. dass nur p-Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\leq 0,01$  als signifikant betrachtet wurden. Positive Testergebnisse sind mit einem „\*“ gekennzeichnet.

#### 4.8 Darstellung von Zahlenwerten in einer Farbskala (Heatmap)

Das Programm wurde freundlicherweise von Dr. Peter Nollau, UKE, zur Verfügung gestellt. Es konvertiert Zahlenwerte reeller Zahlen (1, 2, 3...) nach dem RGB System (Rot,Grün,Blau) in eine Farbskala die den vorgegebenen Zahlenwerten entsprechen. Im RGB System werden auf einer Skala von 0-255 Helligkeitsabstufungen einer definierten Farbe von hell nach dunkel dargestellt. Das Heatmap-Programm ordnet in einer Grundgesamtheit von Zahlen einer einzelnen Zahl ein entsprechend helles Feld zu. Die in dieser Arbeit erzeugten Heatmaps sind als Schwarz/Gelb-Farbskala dargestellt (Schwarz=0). Abb.22 zeigt eine aufsteigende Zahlenreihe von 1 bis 20 mit einer entsprechenden Heatmap als Schwarz/Gelb-Skala.

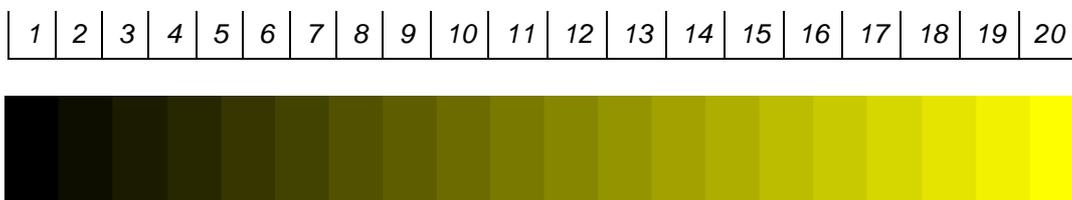
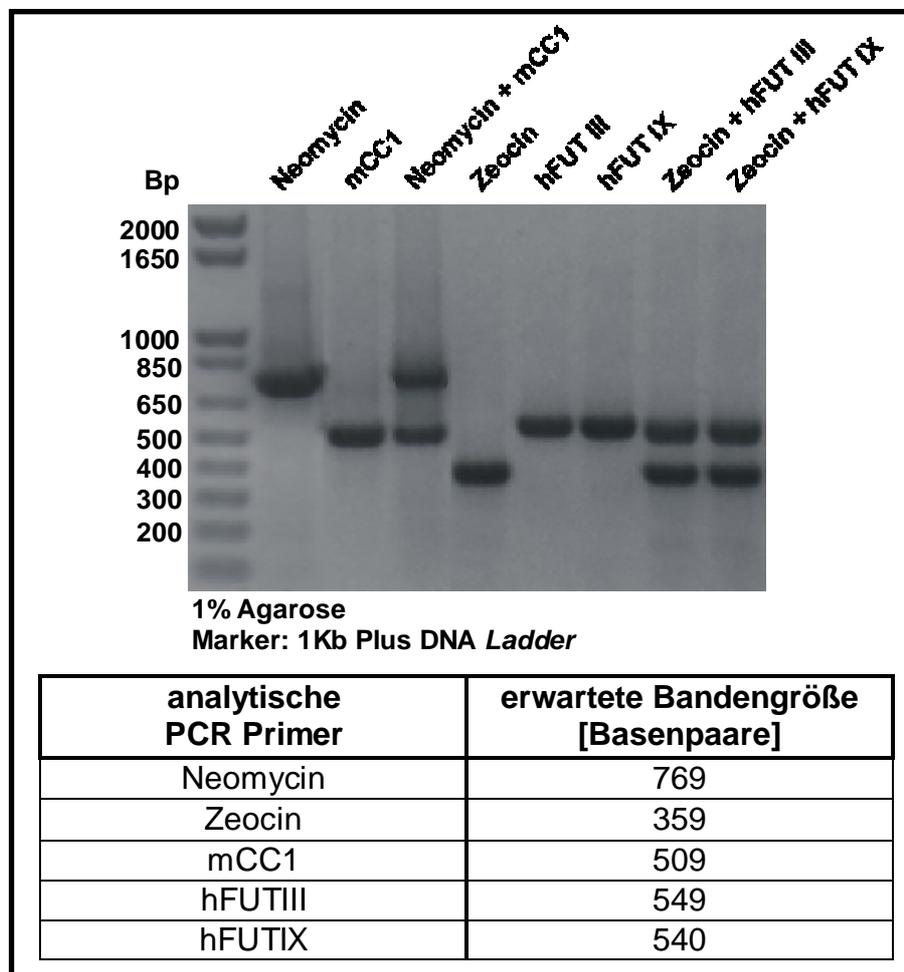


Abbildung 22: Heatmap einer Zahlenreihe als Schwarz/Gelb-Skala

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Analytische PCR zur Insertkontrolle der eingesetzten Vektoren

Vor Transfektion wurden die pcDNA3.1-Vektoren durch eine analytische PCR und eine Sequenzierung überprüft. Abb.23 zeigt die erwarteten Bandengrößen für die eukaryotischen Resistenzen Neomycin/Zeocin, und die Transgene murines Ceacam1-4L (mCC1), hFUTIII und hFUTIX. Mit beiden Methoden konnte die Sequenzintegrität bestätigt werden.



**Abbildung 23: Analytische PCR zur Insertkontrolle**

von links nach rechts

Spur 1-3: pcDNA3.1(+)-mCeacam1-4L mit eukaryotischer Neomycin-Resistenz.

PCR-Kontrollen jeweils einzeln und doppelt.

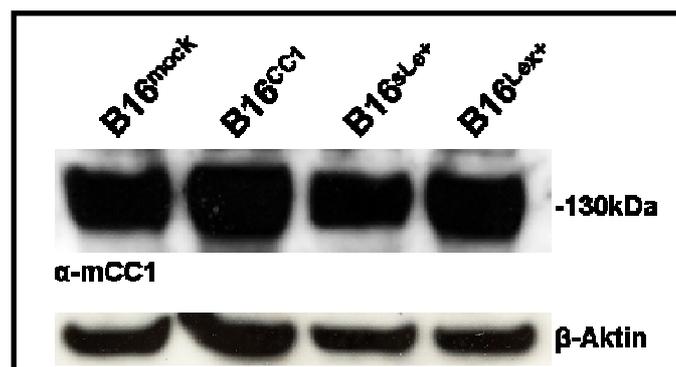
Spur 4-8: pcDNA3.1(-)-hFUTIII und pcDNA3.1(-)-hFUTIX mit eukaryotischer Zeocin-Resistenz. PCR-Kontrollen jeweils einzeln und doppelt.

Die B16/F0 Melanomzellen wurden nach folgendem Schema ko-transfiziert und positive Klone durch entsprechende Resistenzselektion selektioniert:

Zelllinie	Vektor	im Folgenden benannt als...
B16/F0	pcDNA3.1(+) <sup>Neo</sup> "leer" pcDNA3.1(-) <sup>Zeo</sup> "leer"	B16 <sup>mock</sup>
	pcDNA3.1(+) <sup>Neo</sup> -mCC1-4L pcDNA3.1(-) <sup>Zeo</sup> "leer"	B16 <sup>CC1</sup>
	pcDNA3.1(+) <sup>Neo</sup> -mCC1-4L pcDNA3.1(-) <sup>Zeo</sup> -hFUT III	B16 <sup>sLe+</sup>
	pcDNA3.1(+) <sup>Neo</sup> -mCC1-4L pcDNA3.1(-) <sup>Zeo</sup> -hFUT IX	B16 <sup>Lex+</sup>

## 5.2 In vitro Expression von Ceacam1, Le<sup>x</sup>, sLe<sup>x</sup> und sLe<sup>a</sup>

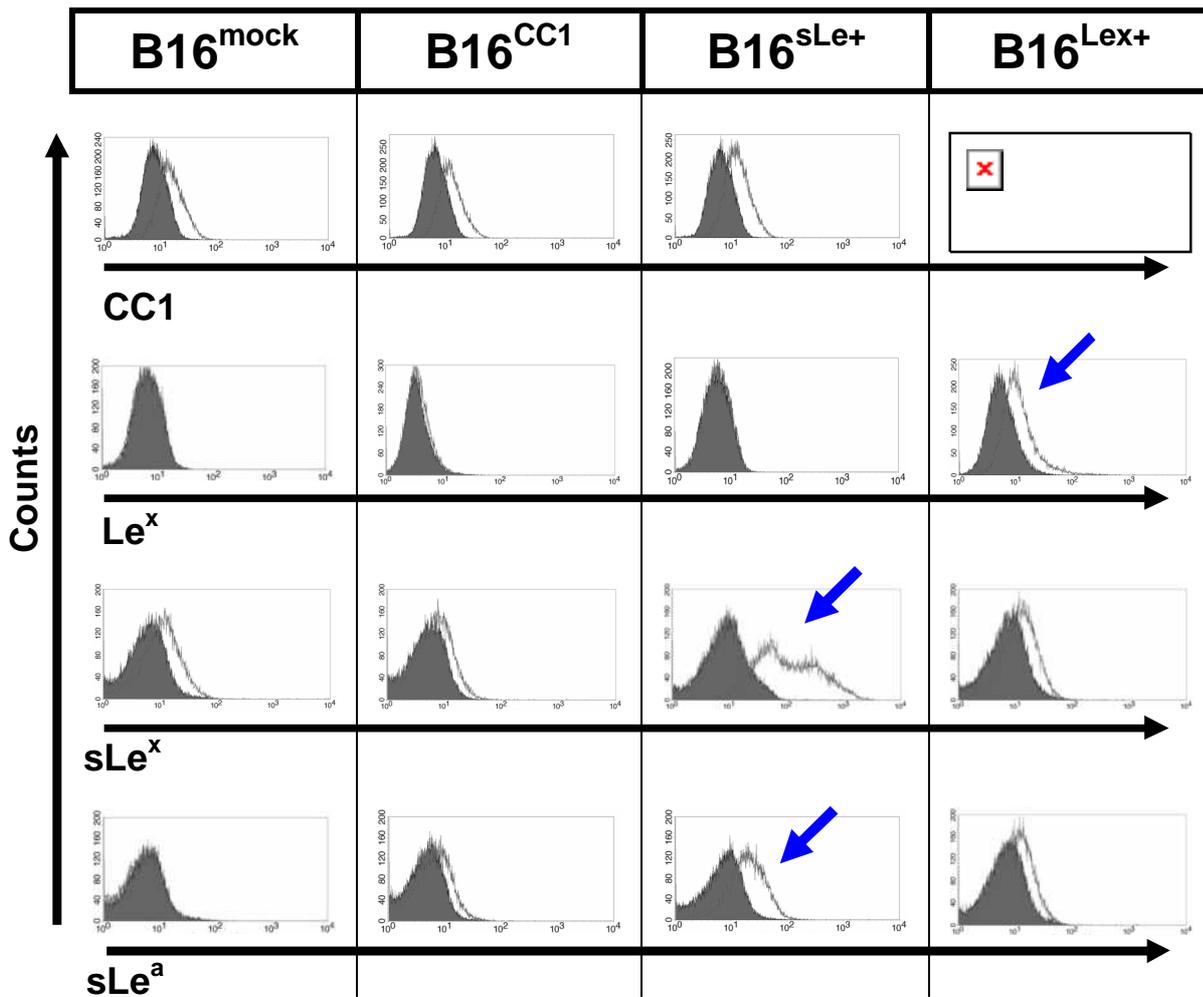
Nachdem *in vitro* stabile B16-Transfektome erzeugt worden waren, wurden diese zunächst im Western Blot auf die Expression von Ceacam1 (CC1) getestet (Abb.24). Glykosyliertes *full length* Ceacam1-4L wird bei ca. 130kDa detektiert. Wie zu sehen, wick in B16<sup>mock</sup> die Signalstärke für Ceacam1 nicht wesentlich von den Signalstärken in den anderen B16-Transfektomen ab.



**Abbildung 24: In vitro Expression von Ceacam1 im Western Blot**  
 4-12% Bis/Tris SDS-Gel (Invitrogen); 20µg/Spur  
 α-CC1: polyklonales Kaninchen anti-murines Ceacam1-Serum; 1:2000  
 β-Aktin: Ladekontrolle

Obwohl eine Überexpression von Ceacam1 in B16<sup>CC1</sup>, B16<sup>sLe+</sup> und B16<sup>Lex+</sup> erwartet worden war, konnte keine starke, sichtbare Zunahme des Ceacam1-Signals in diesen Zelllinien detektiert werden. Aus diesem Grund wurden die B16-Transfektome einer FACS-Analyse zugeführt, um die Oberflächenpräsentation von Ceacam1, Le<sup>x</sup>, sLe<sup>x</sup> und sLe<sup>a</sup> auf den Zellen zu bestimmen.

Hier bestätigte sich der Befund aus dem Western Blot. Neben B16<sup>CC1</sup>, B16<sup>sLe+</sup> und B16<sup>Lex+</sup> zeigte auch B16<sup>mock</sup> eine Rechtsverschiebung (*Shift*) für Ceacam1 im Histogramm, die vergleichbar mit denen der anderen B16-Transfektome war (Abb.25, Zeile 1). Für die Le<sup>x</sup>-Färbung wurde ein Le<sup>x</sup>-*Shift* ausschließlich in B16<sup>Lex+</sup> gemessen (Abb.25, Zeile 2, blauer Pfeil). Der Grad des Le<sup>x</sup>-*Shifts* war nicht sehr groß, doch konnte er in wiederholten Messungen bestätigt werden. In der sLe<sup>x</sup>-Färbung zeigte sich in allen B16-Transfektomen ein sLe<sup>x</sup>-*Shift*, allerdings mit einer deutlichen Überexpression von sLe<sup>x</sup>-Epitopen in B16<sup>sLe+</sup> (Abb.25, Zeile 3, blauer Pfeil). In der sLe<sup>a</sup>-Färbung wurden sLe<sup>a</sup>-*Shifts* in B16<sup>CC1</sup>, B16<sup>sLe+</sup> und B16<sup>Lex+</sup> gefunden. B16<sup>CC1</sup> und B16<sup>Lex+</sup> wiesen dabei für sLe<sup>a</sup> eine vergleichbare, basale Expression wie für sLe<sup>x</sup>-Epitope auf. In B16<sup>sLe+</sup> konnte hingegen ein erhöhtes Expressionsniveau festgestellt werden. (Abb.25, Zeile 4, blauer Pfeil). Im Vergleich zu den sLe<sup>x/a</sup>-*Shifts* in B16<sup>sLe+</sup> wurden die sLe<sup>x/a</sup>-*Shifts* in den anderen B16-Transfektomen als tolerabel erachtet.



**Abbildung 25: In vitro Expression von Ceacam1, Le<sup>x</sup>, sLe<sup>x</sup> und sLe<sup>a</sup> im FACS**  
 CC1: murines Ceacam1; Le<sup>x</sup>: LewisX; sLe<sup>x</sup>: sialylLewisX; sLe<sup>a</sup>: sialylLewisA

Insgesamt konnte somit das Ziel, verschiedene B16-Transfektome mit einer differentiellen Glykosylierung für Le<sup>x</sup> und sialylierte Lewis-Epitope zu erzeugen, erreicht werden. Die bestehenden Glykosylierungsprofile wurden für die weiteren Experimente als „gegeben“ definiert, und die Zellen nach entsprechender Behandlung in *in vivo* Experimente eingesetzt.

### 5.3 Makroskopische Lokalisation und Vaskularisation von B16-Melanomen nach 10 Tagen Wachstum

In Abb.26 ist exemplarisch die makroskopische Lokalisation und Vaskularisation eines B16<sup>mock</sup>-Melanoms nach 10 Tagen Wachstum im Vergleich zu einer naiven Maus gezeigt. B16-Melanome zeigten nach diesem Zeitraum typischerweise eine makroskopisch starke Schwarzfärbung (Melaninüberproduktion) und waren eingekapselt. In der Melanomperipherie war die tumorale Vaskularisation zu diesem Zeitpunkt makroskopisch ebenfalls gut sichtbar (Abb.26, unten links).

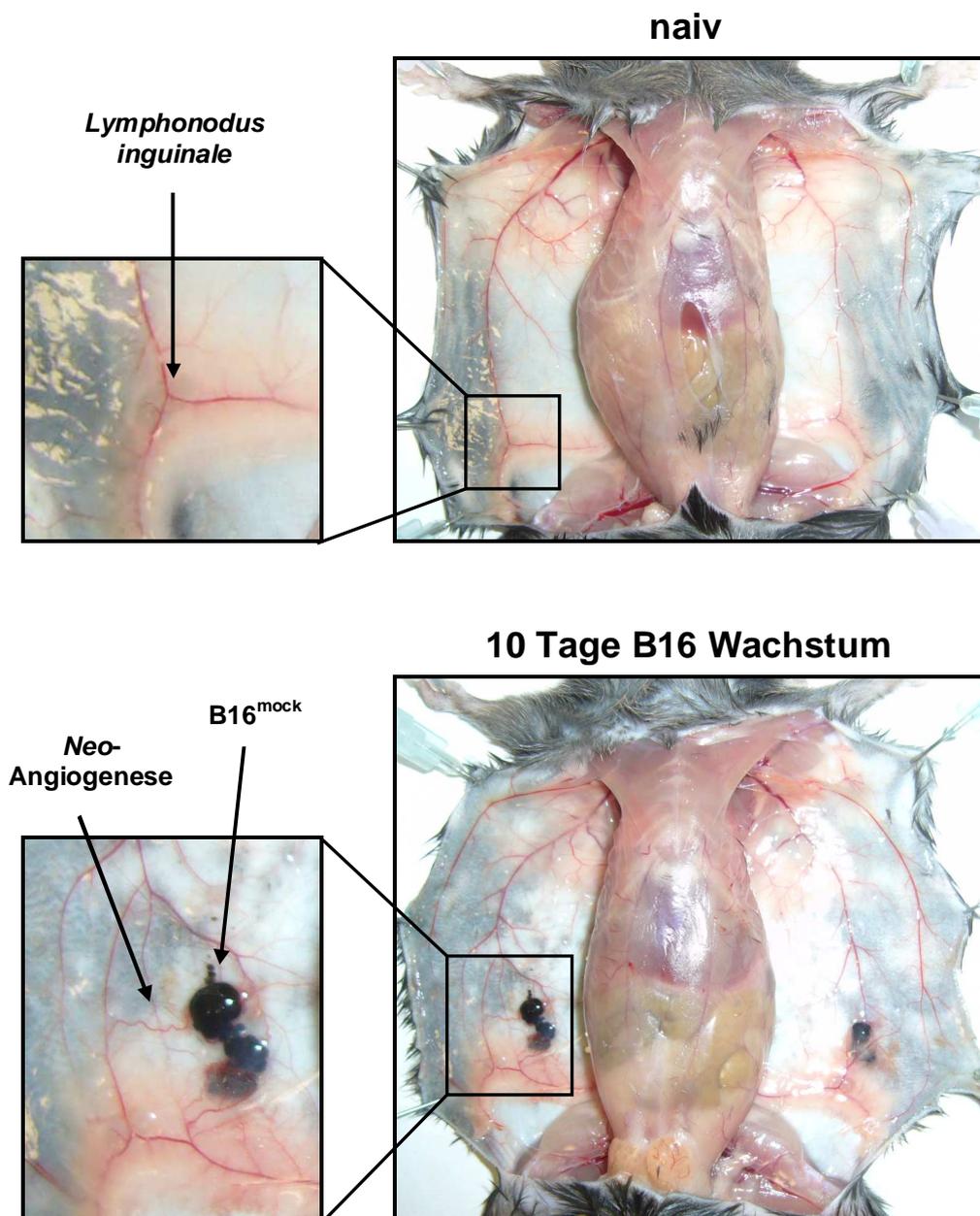


Abbildung 26: Makroskopische Lokalisation und Vaskularisation eines B16<sup>mock</sup>-Melanoms nach 10 Tagen Wachstum

#### 5.4 Expression von Ceacam1, Le<sup>x</sup>, sLe<sup>x</sup> und sLe<sup>a</sup> in B16-Melanomen

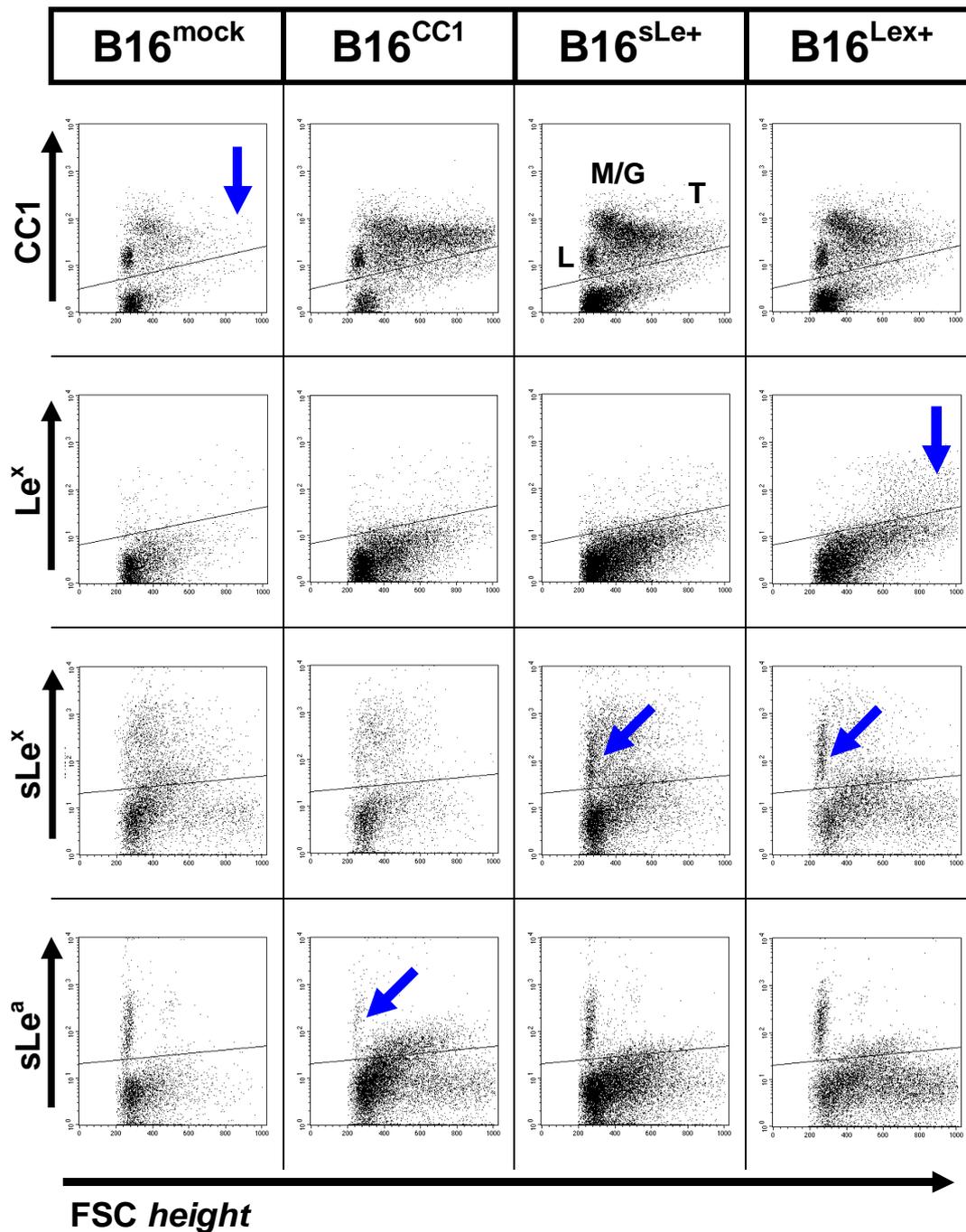
Um feststellen zu können, wie sich die verschiedenen B16-Melanome nach 10 Tagen Wachstum in ihrem Expressionsprofil für Ceacam1, Le<sup>x</sup>, sLe<sup>x</sup> und sLe<sup>a</sup> verhielten, wurde zuerst eine Abbildung der Ceacam1, Le<sup>x</sup> und sLe<sup>x/a</sup>-Gesamtexpression über den FSC *height* dargestellt (Abb.27).

In den B16-Melanomen mit einer Ceacam1-Transfektion (B16<sup>CC1</sup>; B16<sup>sLe+</sup>; B16<sup>Lex+</sup>) nahm der Gesamtanteil von Ceacam1<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu B16<sup>mock</sup> deutlich zu. Durch *backgates* (vgl. 4.6.3) konnte die Verteilung von Ceacam1<sup>+</sup>-Zellen verschiedenen Zellspezies höherer Ordnung zugeordnet werden (Lymphozyten, TAMs, Granulozyten, im Plot für B16<sup>sLe+</sup> exemplarisch gezeigt). Im Lokalbereich der Melanomzellen schien eine *in vivo* Exposition vor allem in B16<sup>CC1</sup> zu einer Zunahme Ceacam1<sup>+</sup>-Melanomzellen zu führen. In B16<sup>sLe+/Lex+</sup>-Melanomen war hingegen eine Zunahme von Ceacam1<sup>+</sup>-Monozyten und Granulozyten zu beobachten. In B16<sup>mock</sup> fiel der Anteil von Ceacam1<sup>+</sup>-Melanomzellen, als auch Ceacam1<sup>+</sup>-Monozyten/Granulozyten deutlich am niedrigsten aus (Abb.27, Zeile 1, blauer Pfeil). Analog zum *in vitro* Profil konnte der größte Anteil Le<sup>x+</sup>-Zellen in B16<sup>Lex+</sup>-Melanomen gefunden werden (Abb.27, Zeile 2, blauer Pfeil). In den anderen B16-Melanomen konnten zwar auch Le<sup>x+</sup>-Zellen nachgewiesen werden, allerdings mit niedrigerer Abundanz.

In B16<sup>Lex+/sLe+</sup>-Melanomen war eine sLe<sup>x+</sup>-Lymphozytenpopulation zu beobachten, die in B16<sup>mock/CC1</sup>-Melanomen fehlte (Abb.27, Zeile 3, blaue Pfeile). Der Gesamtanteil von sLe<sup>x+</sup>-Zellen fiel in B16<sup>CC1</sup> im Vergleich am niedrigsten aus.

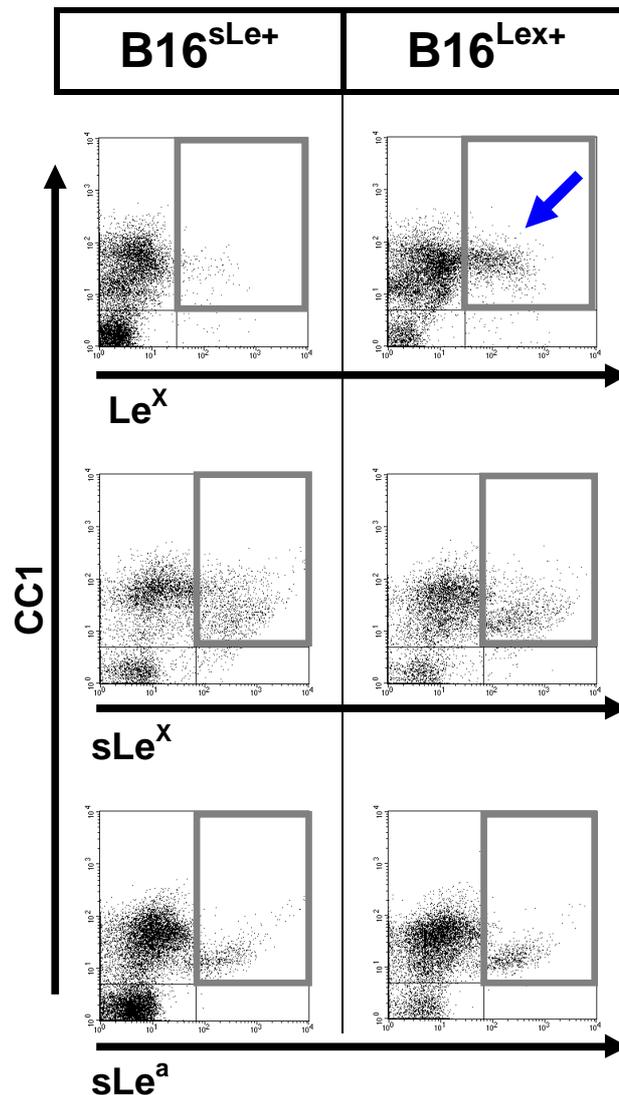
Für sLe<sup>a</sup> war in B16<sup>mock</sup> und B16<sup>Lex+/sLe+</sup>-Melanomen eine sLe<sup>a+</sup>-Lymphozytenpopulation auffällig, die in B16<sup>CC1</sup> nur schwach nachweisbar war (Abb.27, Zeile 4, blauer Pfeil).

Insgesamt trat nach 10 Tagen B16 Wachstum Ceacam1 in unterschiedlicher Abundanz sowohl auf Melanomzellen, als auch auf Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten auf. In B16<sup>Lex+/sLe+</sup>-Melanomen waren zusätzlich distinkte Lymphozytenpopulationen zu beobachten, die jeweils positiv für sLe<sup>x</sup> oder sLe<sup>a</sup> waren. Aus diesem Grund wurden in B16<sup>Lex+/sLe+</sup>-Melanomen Ceacam1<sup>+</sup>-Zellen auf eine Ko-Expression der verschiedenen Lewis-Epitope getestet (Abb.28 und 29).



**Abbildung 27: Expression von Ceacam1, Le<sup>x</sup>, sLe<sup>x</sup> und sLe<sup>a</sup> in B16-Melanomen**  
 CC1: murines Ceacam1; Le<sup>x</sup>: LewisX; sLe<sup>x</sup>: sialylLewisX; sLe<sup>a</sup>: sialylLewisA; FSC *height*: Auftrennung der Zellen nach Zellgröße. L: Lymphozyten, M/G: Monozyten/Granulozyten, T: Melanomzellen. Der graue Querstrich innerhalb eines Plots zeigt den Schwellenwert der Isotypkontrolle einer Färbung. Zellen oberhalb des Querstrichs sind positiv für das entsprechende Antigen (y-Achse).

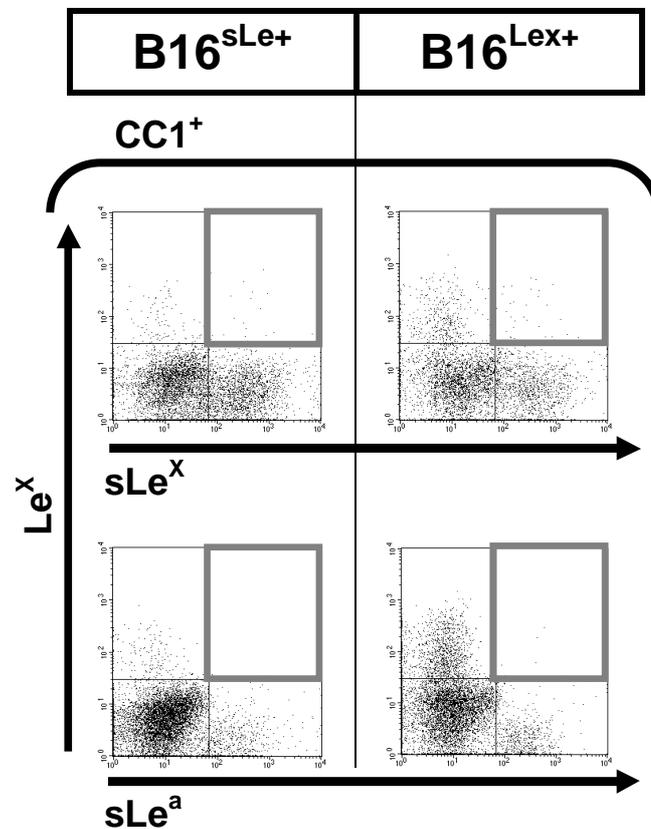
Abb.28 zeigt die Ko-Expression von  $\text{Le}^x$ ,  $\text{sLe}^x$  oder  $\text{sLe}^a$  auf  $\text{Ceacam1}^+$ -Zellen in  $\text{B16}^{\text{sLe}^+}$  und  $\text{B16}^{\text{Lex}^+}$ -Melanomen im Vergleich. Sowohl in  $\text{B16}^{\text{sLe}^+}$  als auch in  $\text{B16}^{\text{Lex}^+}$  waren  $\text{Ceacam1}^+/\text{Le}^x$ -Zellen nachweisbar, wobei der deutlich größere Anteil in  $\text{B16}^{\text{Lex}^+}$  auftrat (Abb.28, Zeile 1, blauer Pfeil).  $\text{Ceacam1}^+/\text{sLe}^x$ -Zellen und  $\text{Ceacam1}^+/\text{sLe}^a$ -Zellen konnten ebenfalls in beiden  $\text{B16}^{\text{Mel}}$ -Melanomen nachgewiesen werden. Wesentliche Unterschiede in der Quantität waren allerdings nicht festzustellen (Abb.28, Zeile 2 & 3).



**Abbildung 28: Ko-Expression von  $\text{Le}^x$ ,  $\text{sLe}^x$  oder  $\text{sLe}^a$  auf  $\text{CC1}^+$  Zelle in B16-Melanomen**  
 CC1: murines Ceacam1;  $\text{Le}^x$ : LewisX;  $\text{sLe}^x$ : sialylLewisX;  $\text{sLe}^a$ : sialylLewisA

Weil somit jedes der Lewis-Epitope auf Ceacam1<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde zusätzlich untersucht, ob Ceacam1<sup>+</sup>-Zellen Le<sup>x</sup> **und** sLe<sup>x</sup> oder sLe<sup>a</sup> ko-exprimierten. Hierzu wurden alle Ceacam1<sup>+</sup>-Zellen als Analysebereich definiert und auf Le<sup>x</sup> **und** jeweils sLe<sup>x</sup> oder sLe<sup>a</sup> abgebildet (Abb.29).

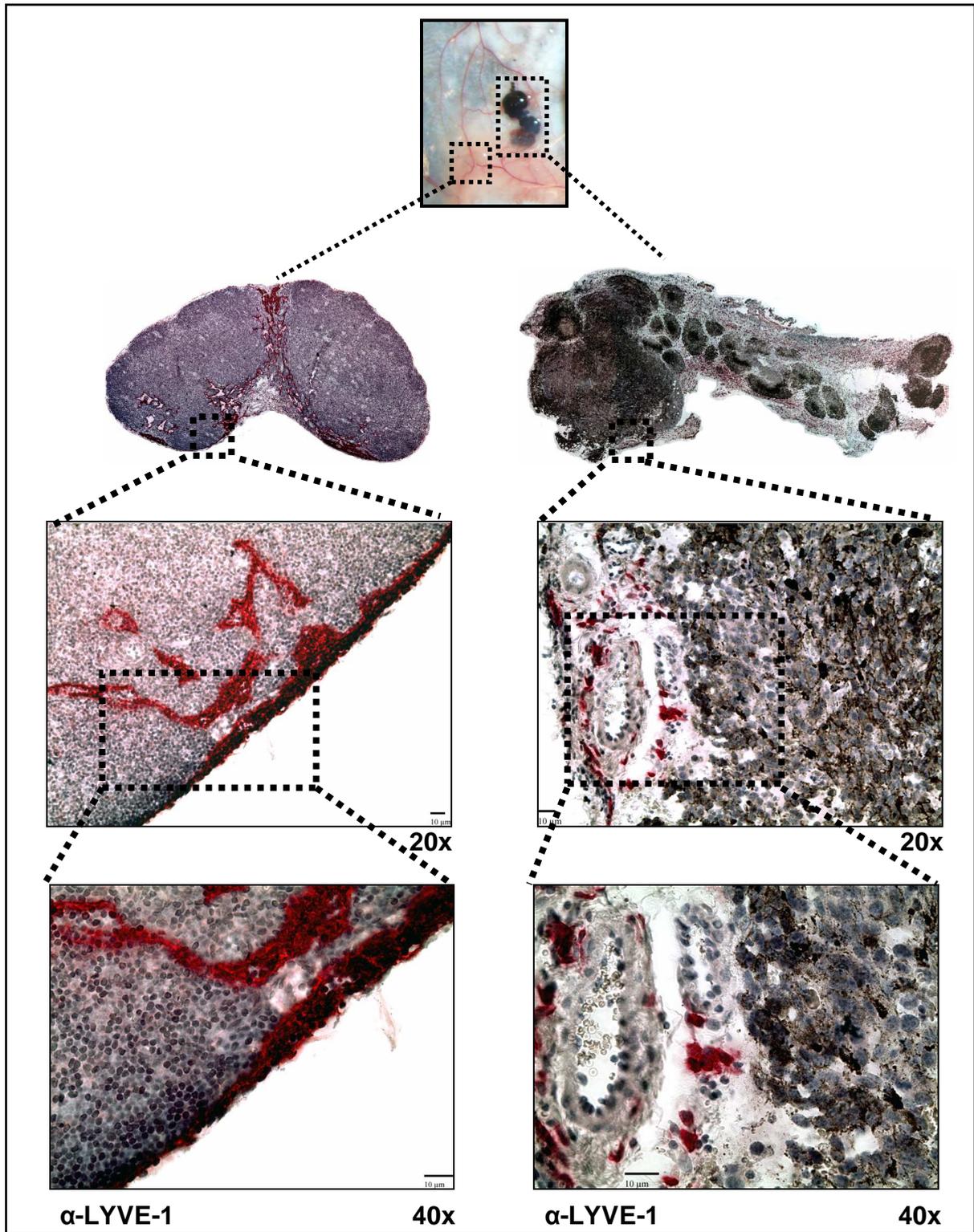
In beiden B16-Melanomen waren Ceacam1<sup>+</sup>/Le<sup>x+</sup>-Zellen mit einer Ko-Expression von entweder sLe<sup>x</sup> oder sLe<sup>a</sup> kaum bis gar nicht zu finden. Positive Zellen für Ceacam1<sup>+</sup>/Le<sup>x+</sup>/sLe<sup>x+</sup> traten wenn, dann nur vereinzelt und mit sehr niedriger Abundanz auf (Abb.29, Zeile 1). Positive Zellen für Ceacam1<sup>+</sup>/Le<sup>x+</sup>/sLe<sup>a+</sup> waren praktisch gar nicht nachweisbar (Abb.29, Zeile 2).



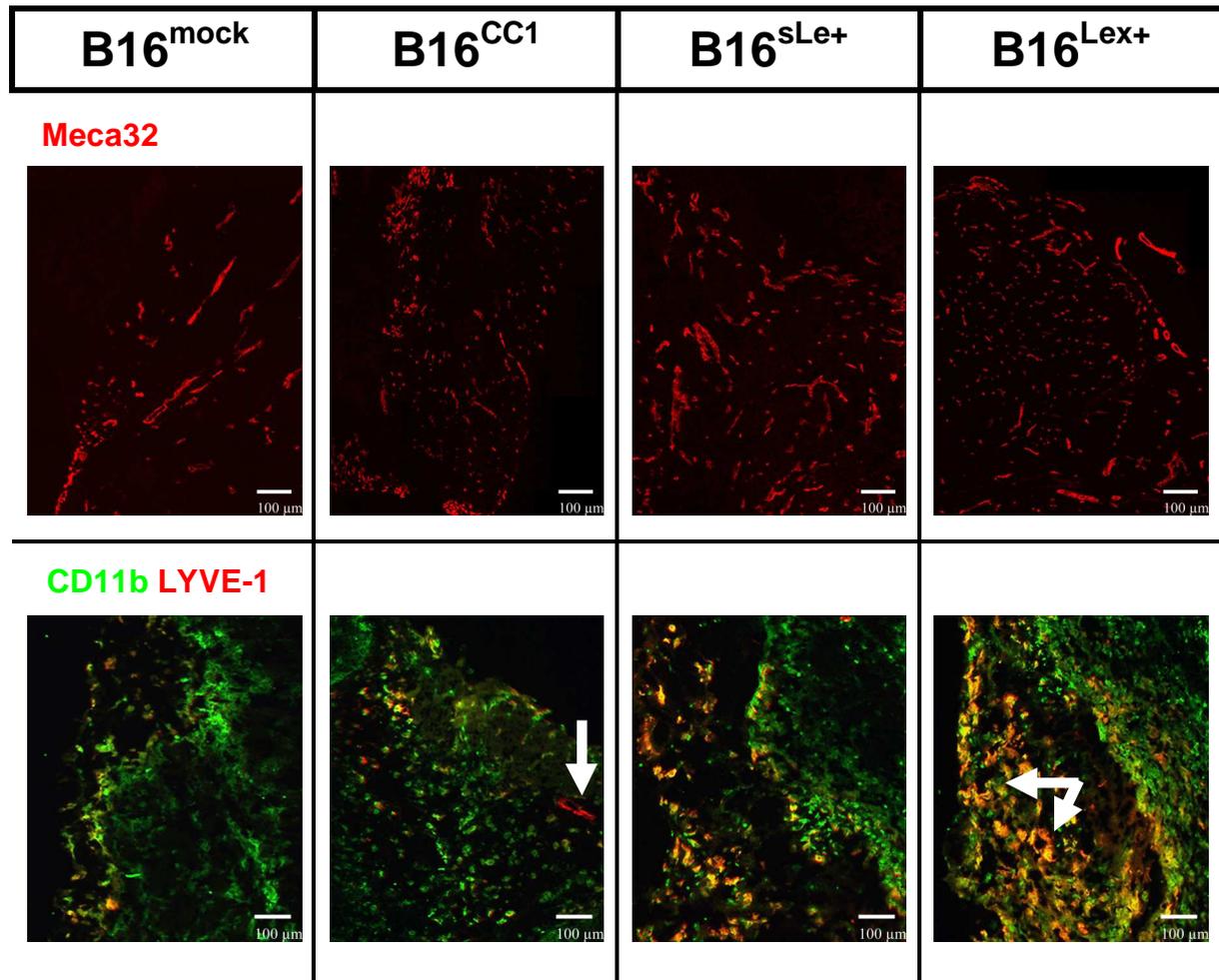
**Abbildung 29: Ko-Expression von sLe<sup>x</sup> oder sLe<sup>a</sup> auf CC1<sup>+</sup>/Le<sup>x+</sup> Zellen in B16-Melanomen**  
 CC1: murines Ceacam1; Le<sup>x</sup>: LewisX; sLe<sup>x</sup>: sialylLewisX; sLe<sup>a</sup>: sialylLewisA

## 5.5 Quantifizierung von B16-Melanom-, Blut- und Lymphgefäßflächen

Zur Bestimmung von Parametern wie der Größe oder der Vaskularisation nach 10 Tagen Wachstum wurden die B16-Melanome jeweils *in toto* biopsiert und in Paraffin oder Kryoblöcken aufbereitet. Von diesen Proben wurden Rasterschnitte mit einer gleichmäßigen Verteilung über die ganze Probe angefertigt. Für die Abbildung tumoraler Lymphgefäße wurde zunächst eine Immunhistochemie mit einer Färbung für LYVE-1 durchgeführt. LYVE-1 ist ein Hyaluronsäure-Rezeptor, der u. a. auf Endothelzellen von Lymphgefäßen vorkommt (LYVE-1: *lymphatic vessel endothelial hyalurononic acid receptor 1*). In Abb.30 ist eine Immunhistochemie einer  $\alpha$ -LYVE-1-Färbung eines B16-Melanoms und eines inguinalen Lymphknotens im Vergleich gezeigt. In den Ventrikeln der Lymphknoten ließen sich Lymphgefäße mit einer  $\alpha$ -LYVE-1-Färbung gut darstellen (Abb.30, linke Seite). In den B16-Melanomen hingegen zeigte sich ein indifferentes Bild. LYVE-1<sup>+</sup>-Zellen konnten auch hier angefärbt werden, eine Diskriminierung zwischen LYVE-1<sup>+</sup>-Endothelzellen und LYVE-1<sup>+</sup>-Leukozyten konnte aber nicht eindeutig getroffen werden (Abb.30, rechte Seite). Aus diesem Grund wurde eine Ko-Färbung für CD11b und LYVE-1 in der Immunfluoreszenz durchgeführt. CD11b (*Integrin $\alpha$ M $\beta$ 2 Leukocyte adhesion receptor MO1*) ist ein  $\alpha$ M/ $\beta$ 2-Integrin, das von einer ganzen Spannweite von Leukozyten, hauptsächlich von Monozyten, Makrophagen und Granulozyten exprimiert wird. Über die Ko-Lokalisation (*overlay*) von CD11b und LYVE-1 in der Immunfluoreszenz konnten über ein Ausschlussverfahren LYVE-1<sup>+</sup>-Lymphgefäße von tumorassoziierte CD11b<sup>+</sup>/LYVE-1<sup>+</sup>-Leukozyten unterschieden werden. Zur Abbildung der Blutgefäße wurde eine Färbung mit  $\alpha$ -Meca32 durchgeführt. Meca32 ist ein TypII-Membranprotein, das in der Plasmalemma von Blutgefäßen exprimiert wird (Meca32: *plasmalemma vesicle-associated protein 1*). Abb.31 zeigt die Immunfluoreszenzfärbungen von B16-Melanomen für Meca32 (Abb.31, Zeile 1, Meca32<sup>+</sup>-Blutgefäße in Rot) und CD11b/LYVE-1 im *overlay* (Abb.31, Zeile 2, LYVE-1<sup>+</sup>-Lymphgefäße in Rot, CD11b<sup>+</sup>/LYVE-1<sup>+</sup>-Leukozyten in Orange).



**Abbildung 30: Immunhistochemie  $\alpha$ -LYVE-1 in Lymphknoten und B16-Melanom**  
 LYVE-1: *lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1*; x: Vergrößerung

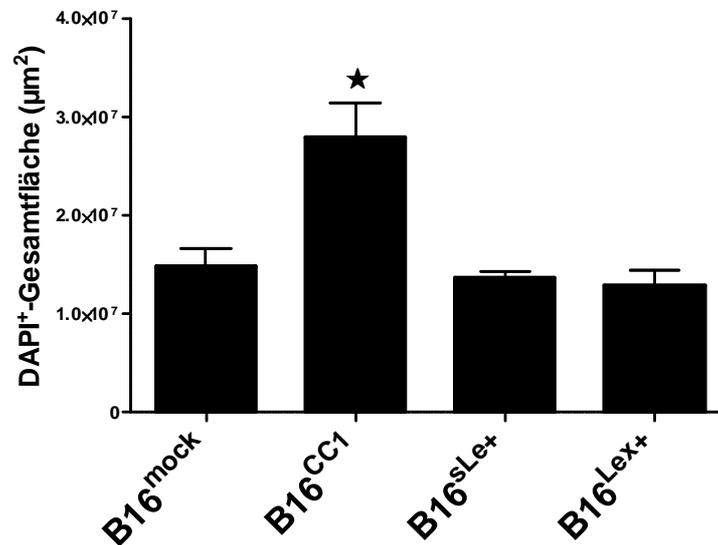


**Abbildung 31: Immunfluoreszenz Meca32<sup>+</sup>-BlutgefäÙe, LYVE-1<sup>+</sup>-LymphgefäÙe und tumorassoziierte CD11b<sup>+</sup>/LYVE-1<sup>+</sup>-Leukozyten in B16-Melanomen**

MECA32: *plasmalemma vesicle-associated protein 1*; CD11b: *Integrin $\alpha$ M $\beta$ 2* Leukocyte adhesion receptor MO1; LYVE-1: *lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1*  
 Orange zeigt die Ko-Lokalisation von CD11b (grün) und LYVE-1 (rot) im overlay.

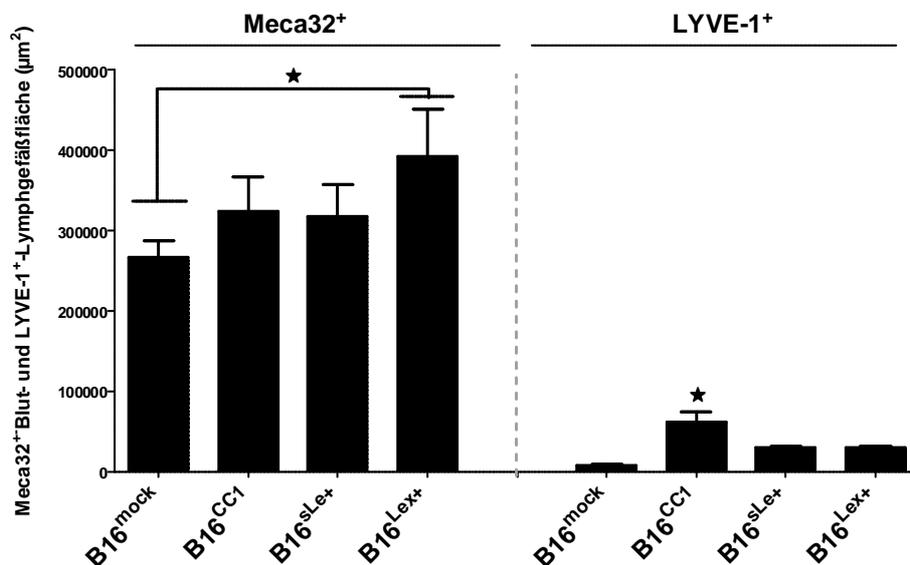
Zur Abbildung der Zellkerne wurde jeder Schnitt zusätzlich mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid) gefärbt (Daten nicht gezeigt). Aus der Fläche aller DAPI<sup>+</sup>-Zellen wurde die Gesamtfläche eines Präparats pro Schnitt berechnet und die Summe als Größenwachstum definiert. In der Gesamtflächenberechnung zeigten B16<sup>CC1</sup>-Melanome ein signifikant erhöhtes Größenwachstum nach 10 Tagen Wachstum. Das Größenwachstum von B16<sup>mock</sup>, B16<sup>sLe+</sup> und B16<sup>Lex+</sup>-Melanomen war annähernd auf demselben Niveau (Abb.32). Ein signifikanter Unterschied der Meca32<sup>+</sup>-BlutgefäÙfläche zeigte sich nur im Vergleich von B16<sup>mock</sup> zu B16<sup>Lex+</sup>. Unterschiede in der Meca32<sup>+</sup>-BlutgefäÙfläche zwischen den anderen B16-Melanomen konnten nicht beobachtet werden (Abb.33, links). Die LYVE-1<sup>+</sup>-

Lymphgefäßfläche war in B16<sup>CC1</sup> signifikant erhöht (Abb.33, rechts). In allen B16-Entitäten lag die LYVE-1<sup>+</sup>-Lymphgefäßfläche zur Meca32<sup>+</sup>-Blutgefäßfläche sehr viel niedriger.



**Abbildung 32: DAPI<sup>+</sup>-Gesamtfläche von B16-Melanomen**

6 Tieren/Kohorte/Transfektom, n≥12 Schnitten/Melanom, Mittelwert+SEM



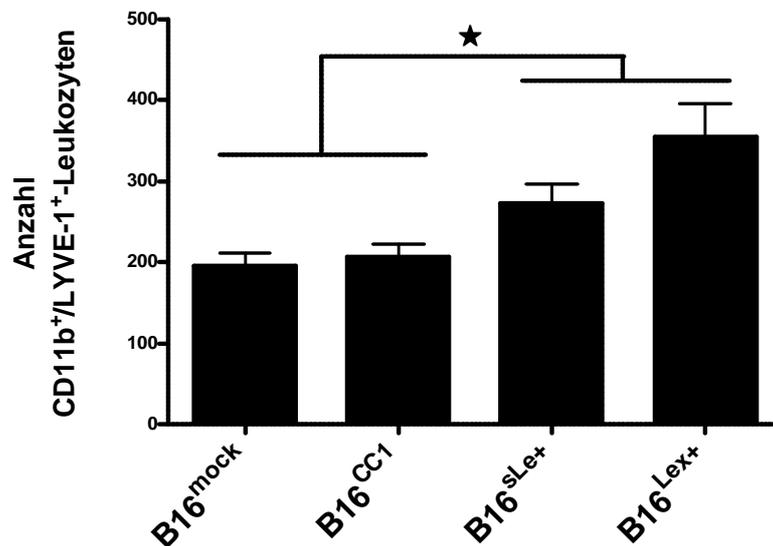
**Abbildung 33: Meca32<sup>+</sup>-Blut- und LYVE-1<sup>+</sup>-Lymphgefäßfläche**

6 Tieren/Kohorte/Transfektom, n≥12 Schnitten/Melanom, Mittelwert+SEM

MECA32: *plasmalemma vesicle-associated protein 1*, LYVE-1: *lymphatic vessel endothelial hyalurononic acid receptor 1*

### 5.5.1 Quantifizierung CD11b<sup>+</sup>/LYVE-1<sup>+</sup> tumorassoziierter Leukozyten

Über die Diskriminierung von CD11b<sup>+</sup>/LYVE-1<sup>+</sup> zu CD11b<sup>-</sup>/LYVE-1<sup>+</sup> konnten im Immunfluoreszenz-*overlay* CD11b<sup>+</sup>/LYVE-1<sup>+</sup>-Zellen als orangefarbene Zellen abgebildet werden. (Abb.31, Zeile 2, CD11b<sup>+</sup><sub>grün</sub>+LYVE-1<sup>+</sup><sub>rot</sub>=CD11b<sup>+</sup>/LYVE-1<sup>+</sup><sub>orange</sub>). Die Anzahl orangefarbener CD11b<sup>+</sup>/LYVE-1<sup>+</sup>-Zellen/Schnitt wurde als Maß für die Anzahl von CD11b<sup>+</sup>/LYVE-1<sup>+</sup>-Leukozyten in 10 Tage alten B16-Melanomen definiert. Zwischen B16<sup>mock/CC1</sup> und B16<sup>sLe+/Lex+</sup>-Melanomen zeigte sich eine *quasi*-Teilung der Anzahl von CD11b<sup>+</sup>/LYVE-1<sup>+</sup>-Leukozyten. Im Fall der B16<sup>sLe+/Lex+</sup>-Melanome waren CD11b<sup>+</sup>/LYVE-1<sup>+</sup>-Leukozyten jeweils signifikant erhöht (Abb.34).

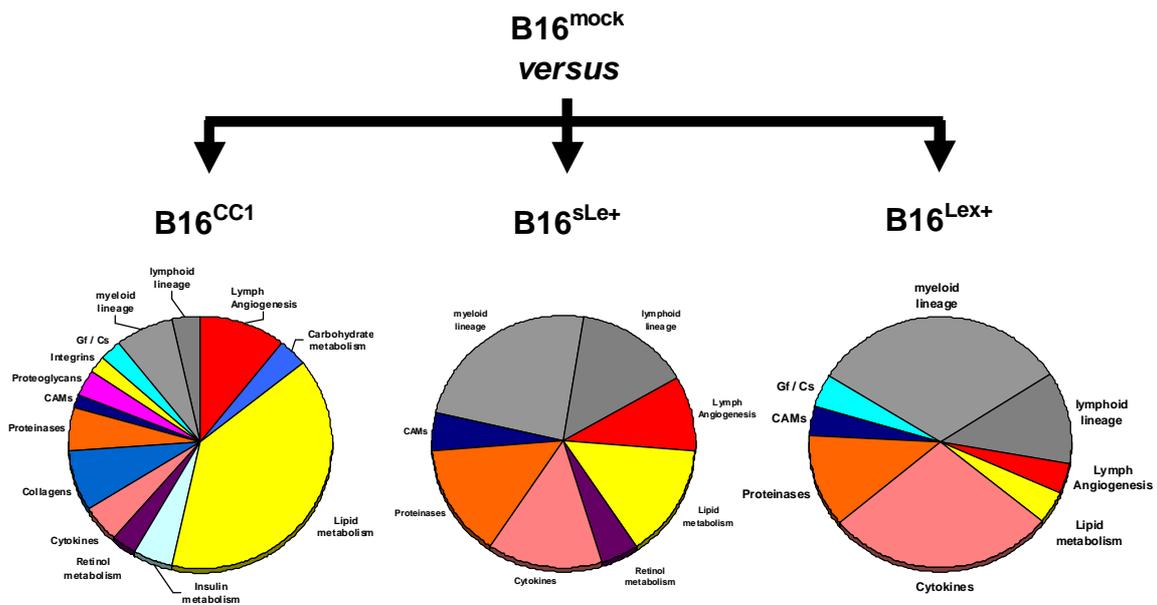


**Abbildung 34: Anzahl tumorassoziierter CD11b<sup>+</sup>/LYVE-1<sup>+</sup>-Leukozyten**

Rasteranalyse mit 6 Tieren/Kohorte/Transfektom, n≥12 Schnitten/Melanom, Mittelwert+SEM  
CD11b: *Integrin $\alpha$ M $\beta$ 2 Leukocyte adhesion receptor MO1*; LYVE-1: *lymphatic vessel endothelial hyalurononic acid receptor 1*

## 5.6 Genexpressionsanalyse (*Microarray*) inguinaler Lymphknoten

Aus den Ergebnissen in 5.4 und 5.5 wurde deutlich, dass sich die verschiedenen B16-Melanome sowohl bezüglich ihres Expressionsprofils von Ceacam1, Le<sup>x</sup> und sLe<sup>x/a</sup>, als auch ihrer Vaskularisation und einer Akkumulation von CD11b<sup>+</sup>/LYVE-1<sup>+</sup>-Leukozyten unterschiedlich verhielten. Auf Grundlage eines vermuteten *cross-talks* zwischen B16-Melanom und Lymphknoten (Interferone, Interleukine, Prostaglandine usw.), wurden von den tumor-nahen Lymphknoten Genexpressionsanalysen nach 10 Tagen B16 Wachstum erstellt. Als Referenz einer signifikant-differentiellen Regulation einzelner mRNAs wurden Lymphknoten aus Tieren mit einem B16<sup>mock</sup>-Melanom jeweils ins Verhältnis zu Lymphknoten aus B16<sup>CC1</sup>-, B16<sup>sLe+</sup>- und B16<sup>Lex+</sup>-Tieren gesetzt. Ziel der Analytik war herauszufinden, ob sich den verschiedenen B16-Melanomen stringente Expressionsprofile differentiell regulierter mRNAs in entsprechenden Lymphknoten zuordnen ließen. Zum einen wurde aus den erhaltenen Profilen eine global angelegte Analyse durchgeführt, in der einzelne Kandidaten nach ihrem physiologischen Kontext zu größeren Gruppen zusammengefasst wurden (*Globalanalyse*). Mit dieser Strategie wurde versucht abzubilden, ob komplexe Stoffwechselsysteme in den entsprechenden Lymphknoten einer B16-Entität auffällig oft betroffen waren oder nicht. Zum anderen sollten einzelne mRNAs identifiziert werden, die aufgrund ihrer beschriebenen oder vermuteten Funktion für die Pathogenese der B16-Melanome relevant erschienen. In Abb.35 ist das Ergebnis der Globalanalyse gezeigt. Die Expressionsprofile von Lymphknoten aus B16<sup>CC1</sup>-Tieren zeigten eine deutlich größere Gesamtzahl differentiell regulierter mRNAs, als Lymphknoten aus B16<sup>sLe+/Lex+</sup>-Tieren. Nimmt man nur die Zahl hochregulierter mRNAs, so waren in den Lymphknoten von B16<sup>CC1</sup>-Tieren ca. 1200 mRNAs differentiell hochreguliert. In den Lymphknoten von B16<sup>sLe+/Lex+</sup>-Tieren waren „nur“ jeweils ca. 70 mRNAs hochreguliert. Bei der Gruppierung zu Stoffwechselwegen zeigte sich, dass in den Lymphknoten von B16<sup>CC1</sup>-Tieren besonders oft mRNAs reguliert waren, die dem Lipidstoffwechsel (56 *versus* 3 *versus* 1) oder angiogenen Prozessen (15 *versus* 2 *versus* 1) zugeordnet werden konnten. Im Gegensatz dazu war die Anzahl differentiell regulierter mRNAs, die einer myeloischen oder lymphatischen Hämatopoese zugeordnet werden konnten, in Lymphknoten von B16<sup>sLe+/Lex+</sup>-Tieren im Vergleich zur Gesamtanzahl überrepräsentiert (B16<sup>sLe+</sup>: 8 von 21; B16<sup>Lex+</sup>: 11 von 25).



Hochregulierte mRNAs im inguinalen Lymphknoten gruppiert nach physiologischem Kontext	B16 <sup>mock</sup> versus		
	B16 <sup>CC1</sup>	B16 <sup>sLe+</sup>	B16 <sup>Lex+</sup>
(Lymph-)Angiogenese	15	2	1
Kohlenhydratstoffwechsel	5	0	0
Lipidstoffwechsel	56	3	1
Insulinstoffwechsel	7	0	0
Retinolstoffwechsel	4	1	0
Zytokine	7	3	7
Kollagene	11	0	0
Proteinasen	8	3	3
Zelladhäsionsmoleküle	2	1	1
Proteoglykane	5	0	0
Integrine	3	0	0
Wachstum/Zytoskelett	4	0	1
Myeloische Hämatopoese	10	5	8
Lymphatische Hämatopoese	5	3	3
<b>Gesamt</b>	<b>142</b>	<b>21</b>	<b>25</b>

Abbildung 35: Kontext-abhängige Gruppierung hochregulierter mRNAs (Globalanalyse)

Diese Befunde spiegeln sich entsprechend in der Identifizierung einzelner, differentiell regulierter mRNAs wieder. In Tabelle 11 ist eine Auswahl aus Abb.35 gezeigt.

Hochregulierte mRNAs im inguinalen Lymphknoten	ID	B16 <sup>mock</sup> versus		
		B16 <sup>CC1</sup>	B16 <sup>sLe+</sup>	B16 <sup>Lex+</sup>
		fold change p ≤ 0.05 ; signal log ratio ± 0.8		
<b>VEGF-D</b> ( <i>c-fos induced growth factor</i> )	1438954_x_at	2,09		
<b>Angiopoietin 1</b>	1439066_at	1,38		
<b>CD36</b> ( <i>fatty acid translocase</i> )	1450884_at	2,57		
<b>Ptger3</b> (prostaglandin E receptor 3, subtype EP3)	1450344_a_at	3,12		
<b>Ptges</b> (prostaglandin E synthase)	1449450_at	1,29		
<b>CD163</b> (scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M130)	1419144_at	1,82		
<b>Igf1</b> (insulin-like growth factor 1)	1437401_at	1,08		
<b>CCR2</b> (chemokine (C-C motif) receptor 2)	1421188_at		1,31	1,16
<b>CD244</b> (natural killer cell receptor 2B4)	1449991_at		0,95	
<b>Klrg1</b> (killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1)	1420788_at		0,88	
<b>Klrb1b</b> (killer cell lectin-like receptor, subfamily B, member 1b)	1420421_s_at		0,95	
<b>Klra2</b> (killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 2)	1421304_at			1,16

**Tabelle 11: Auswahl differentiell regulierter mRNAs in inguinalen Lymphknoten**

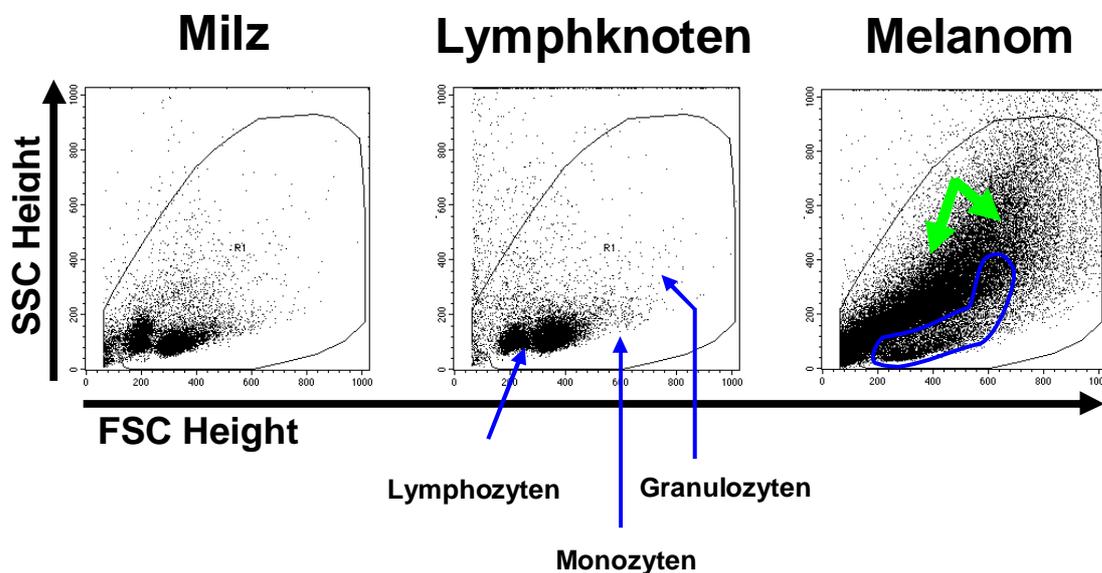
VEGF-D ist ein Ligand für VEGFR3 (*vascular endothelial growth factor receptor 3*), der eine zentrale Rolle in lymphangiogenen Prozessen spielt. Angiopoietin 1 ist ein Ligand für den Tie-2-Rezeptor, der u. a. von einer Makrophagenpopulation sog. Tie-2-exprimierender Makrophagen gebildet wird (TEMs). CD36 und CD163 gehören zur Klasse der *scavenger*-Rezeptoren. Die (Neo-)Expression von *scavenger*-Rezeptoren ist ein häufig auftretendes Merkmal alternativ aktivierter Makrophagen. Eine CCR2-Expression wird hingegen klassisch aktivierten Makrophagen zugeordnet.

CD244, Klrg1, Klrb1b und Klra2 werden hauptsächlich von NK-Zellen und T-Lymphozyten exprimiert. Dort spielen sie eine Rolle bei der Regulation der zytotoxischen Aktivität dieser Zellen.

Auf Grundlage der Genexpressionsanalytik wurde die Hypothese abgeleitet, dass es zwischen B16<sup>CC1</sup> und B16<sup>SLe+/Lex+</sup>-Tieren zu einer Verschiebung der Polarisation von Leukozytenpopulationen mit einem anti-inflammatorischen, oder inflammatorischen Phänotyp kommt. Zur Bestimmung einer differentiellen Immunantwort auf die verschiedenen B16-Melanome wurden aus den Melanomen, inguinalen Lymphknoten und Milzen der Tiere FACS-Analysen zur Validierung differentieller Leukozytenpopulationen nach den Auswertungsstrategien in 4.6.3, Abb.16-21 durchgeführt. Die Auswahl von Kandidaten richtete sich dabei prinzipiell nach identifizierten mRNAs aus den Expressionsprofilen (Tabelle11).

## 5.7 FACS-Analytik differentieller Leukozytenpopulationen

In Abb.36 sind aus den untersuchten Geweben FSC/SSC *height*-Plots mit einer typischen Aufspaltung von Leukozyten in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten, sowie der Melanomzellen im Vergleich gezeigt. Prominente Monozyten/Granulozytenpopulationen waren in Milzen und Lymphknoten nur schwach vertreten. Das liegt daran, dass in Milz und Lymphknoten, als Mitglieder des lymphatischen Systems, Gesamt-Monozyten/Granulozyten in Relation zu Gesamt-Lymphozyten unterrepräsentiert sind. In den Melanom-Plots kam es zu einer „Überlagerung“ der Leukozyten (blaue Region) durch die Melanomzellen (grüne Pfeile, schwarzer Schweif). Speziell in diesen Plots wurden wiederholt *backgate*-Kontrollen durchgeführt, um die jeweilige Leukozyten-Zielpopulation von Überlagerungseffekten, bzw. von falsch positiven Messergebnissen unterscheiden zu können. Aus diesen Plots wurden nach den Auswertungsstrategien die jeweiligen Zielpopulationen phänotypisch validiert und quantifiziert.



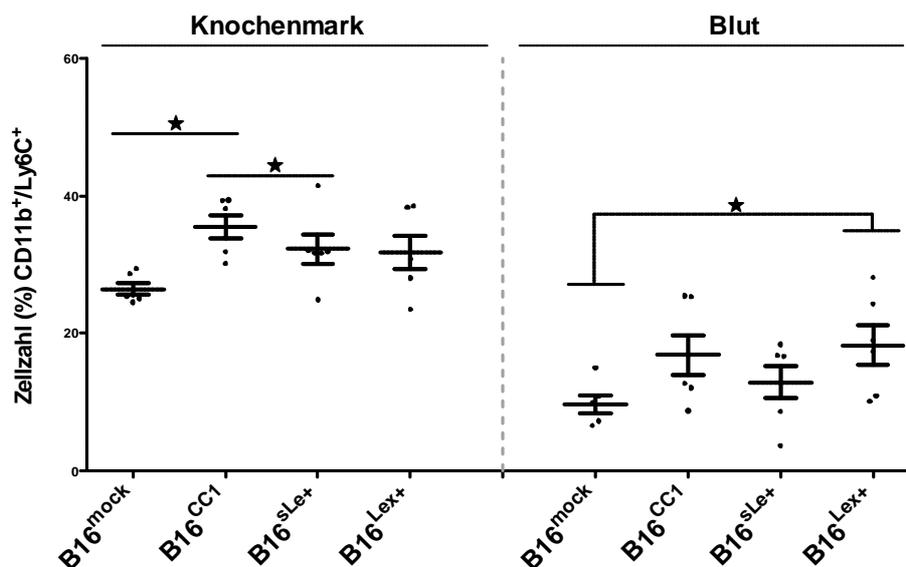
**Abbildung 36: FSC/SSC *height* Plots aus Milz, Lymphknoten und B16-Melanom im Vergleich**

Die blauen Pfeile zeigen am Beispiel eines Lymphknoten-Plots eine typische Aufspaltung der Leukozyten in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten. In Melanomplots überlagerten die Melanomzellen (grüne Pfeile) z. T. die Leukozyten (blaues Feld).

FSC *height* (*forward scatter*): Auftrennung der Zellen nach Zellgröße; SSC *height* (*sideward scatter*): Auftrennung der Zellen nach Zellgranularität

### 5.7.1 Quantifizierung myelomonozytärer Vorläuferzellen

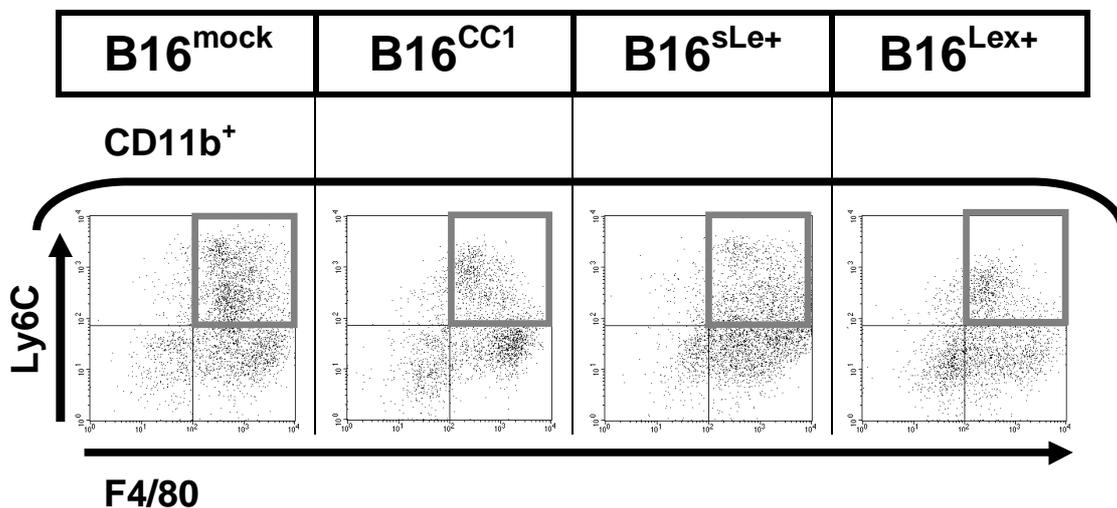
Zunächst sollte analysiert werden, ob die verschiedenen B16-Tiere sich bereits bezüglich einer Mobilisierung von myelomonozytären Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, bzw. einer Zirkulation von Vorläufern im Blutstrom, unterschiedlich verhielten. Durch eine mögliche Erhöhung oder Erniedrigung der Anzahl dieser Vorläufer sollte ein Eindruck gewonnen werden, ob es möglicherweise zu einer Retardierung bei der Mobilisierung myelomonozytärer Vorläufer zwischen B16-Tieren kam. Zur Quantifizierung wurden myelomonozytäre Vorläufer auf eine Ko-Expression von CD11b und Ly6C abgebildet (vgl. Abb.16). Ly6C gehört zur Ly6-Superfamilie, die im Menschen 27 und in *Mus musculus* 37 Mitglieder umfasst. Mitglieder dieser Familie wurden ursprünglich in *Mus musculus* als hämatopoetische Stammzell-Marker identifiziert<sup>109</sup>. B16<sup>mock</sup>-Tiere wiesen sowohl im Knochenmark als auch im Blut die niedrigsten Anteile CD11b<sup>+</sup>/Ly6C<sup>+</sup>-Vorläufer auf. Die stärkste Mobilisierung von CD11b<sup>+</sup>/Ly6C<sup>+</sup>-Vorläufern war im Knochenmark von B16<sup>CC1</sup>-Tieren zu beobachten (Abb.37, links). Eine signifikante Erhöhung von im Blut zirkulierenden CD11b<sup>+</sup>/Ly6C<sup>+</sup>-Vorläufern konnte im Vergleich zwischen B16<sup>mock</sup>- und B16<sup>Lex+</sup>-Tieren festgestellt werden (Abb.37, rechts).



**Abbildung 37: Quantifizierung CD11b<sup>+</sup>/Ly6C<sup>+</sup> myelomonozytärer Vorläufer**  
 CD11b: *Integrin $\alpha$ M $\beta$ 2*, Ly6C: *lymphocyte antigen 6 complex*  
 6 Tieren/Kohorte/B16-Entität, Mittelwert+SEM

### 5.7.2 Quantifizierung von F4/80<sup>+</sup>-TAMs

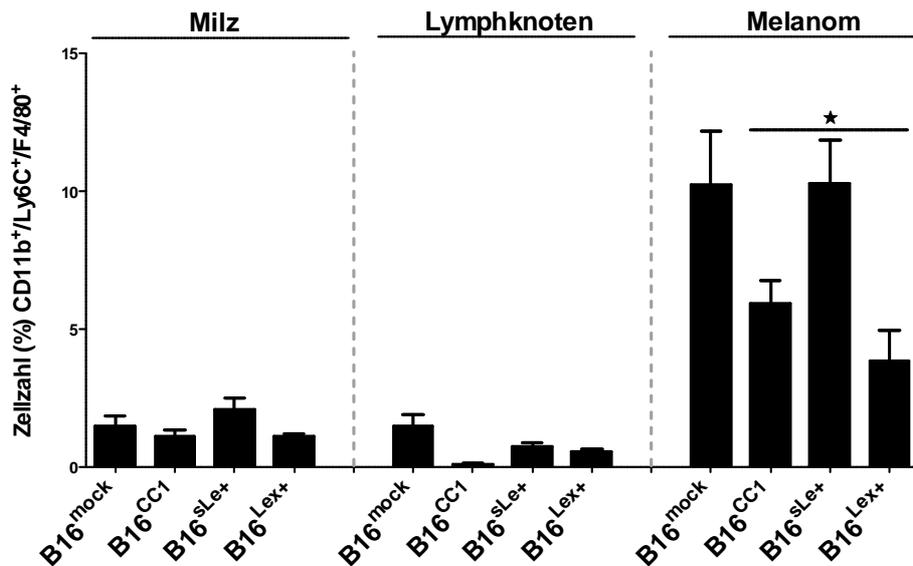
Nach der Quantifizierung von CD11b<sup>+</sup>/Ly6C<sup>+</sup>-myelomonozytären Vorläufern sollte der Anteil von F4/80<sup>+</sup>-TAMs bestimmt werden. Hierzu wurden Leukozyten auf eine Ko-Expression von CD11b, Ly6C und F4/80 abgebildet (vgl. Abb.16). F4/80 gehört zur *epidermal growth factor transmembrane 7*-Familie. Durch zelltypspezifische Screenings mit monoklonalen Antikörpern konnte gezeigt werden, dass eine Expression von F4/80 auf differenzierte Makrophagen beschränkt ist, und vor allem von gewebeinfiltrierenden, bzw. gewebeständigen Makrophagen exprimiert wird <sup>110</sup>. Durch die Quantifizierung von F4/80<sup>+</sup>-TAMs sollte bestimmt werden, ob verschiedene B16-Tiere unterschiedlich große F4/80<sup>+</sup>-TAM-Populationen in den Melanomen akkumulierten. In Abb.38 sind CD11b<sup>+</sup>/Ly6C<sup>+</sup>/F4/80<sup>+</sup>-Plots am Beispiel einer Melanomanalyse gezeigt. In der Quantifizierung zeigten B16<sup>mock</sup> und B16<sup>sLe+</sup>-Tiere die größten TAM-Populationen (Abb.39). Im Vergleich mit B16<sup>sLe+</sup> konnte in B16<sup>CC1</sup> und B16<sup>Lex+</sup>-Melanomen ein signifikanter Abfall der Populationsgröße von F4/80<sup>+</sup>-TAMs beobachtet werden (Abb.39, rechts).



**Abbildung 38: Identifizierung von F4/80<sup>+</sup>-TAMs**

CD11b: *Integrin $\alpha$ M $\beta$ 2*, Ly6C: *lymphocyte antigen 6 complex*,

F4/80: *epidermal growth factor-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1*



**Abbildung 39: Quantifizierung von F4/80<sup>+</sup>-TAMs**

CD11b: Integrin<sub>α</sub>Mβ<sub>2</sub>, Ly6C: lymphocyte antigen 6 complex

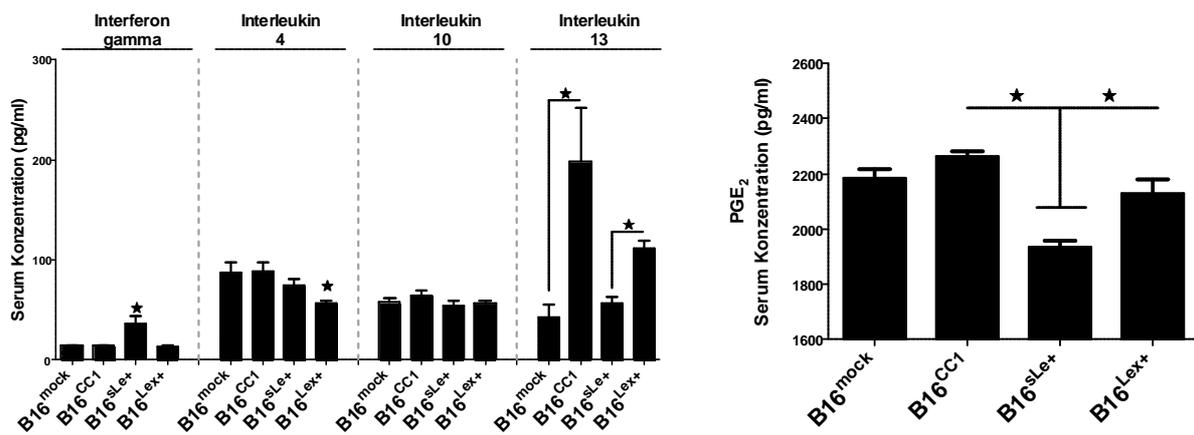
F4/80: *epidermal growth factor-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1*

6 Tieren/Kohorte/B16-Entität, Mittelwert+SEM

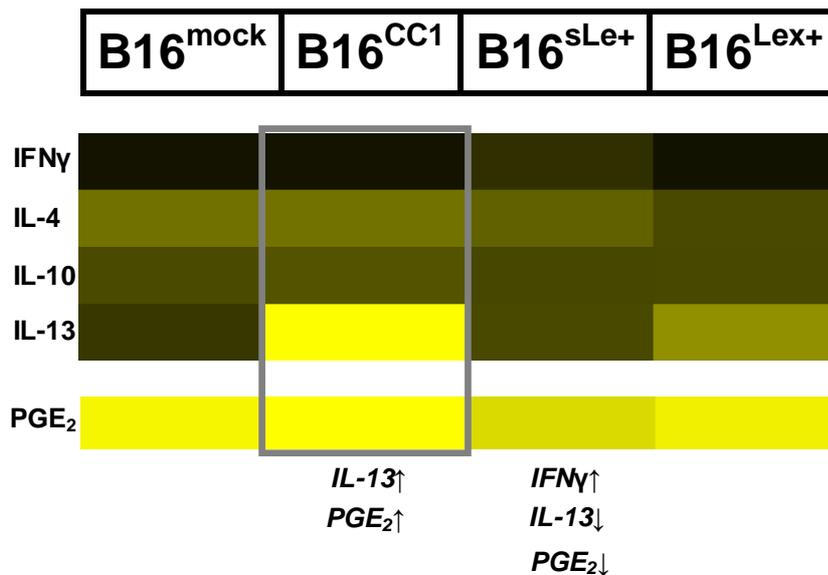
### 5.7.3 Serumanalytik Leukozyten-polarisierender Zytokinen

Vor der zellulären Analyse differentieller Leukozytenpopulationen sollte untersucht werden, ob sich bereits aus den Seren der Tiere ein Serumprofil Leukozyten-polarisierender Zytokine abbilden ließ, aus dem sich eine Voraussage einer dominanten M1/2 und/oder T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Antwort in den Tieren ableiten ließ. Um eine entsprechende Spannbreite Leukozyten-polarisierender Zytokine abzubilden, wurden die Serumkonzentrationen von IFN $\gamma$ , IL-4, -10 und -13, sowie von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) bestimmt. PGE<sub>2</sub> ist ein Derivat der Arachidonsäure, und wird durch die Prostaglandin E-Synthase aus Prostaglandin H<sub>2</sub> gebildet. M2-polarisierte Makrophagen sezernieren häufig große Mengen an PGE<sub>2</sub> und die Prostaglandin E-Synthase wurde als differentiell regulierter Kandidat in B16<sup>CC1</sup>-Tieren identifiziert (Tabelle 11). Für IFN $\gamma$  konnte eine signifikante Zunahme der Serumkonzentration in B16<sup>sLex+</sup>-Tieren gemessen werden. Bei IL-4 kam es zu einem signifikanten Konzentrationsabfall in B16<sup>Lex+</sup>-Tieren. Die IL-13-Konzentration war in B16<sup>CC1</sup> und B16<sup>Lex+</sup>-Tieren signifikant erhöht, mit der höchsten gemessenen Konzentration in B16<sup>CC1</sup>. Für IL-10 konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Die PGE<sub>2</sub>-

Konzentration war in B16<sup>sLe+</sup>-Tieren signifikant erniedrigt, die tendenziell höchste PGE<sub>2</sub>-Konzentration wurde in B16<sup>CC1</sup> gemessen (Abb.40). Für einen Gruppenvergleich der analysierten Zytokine wurden die gemessenen Serumkonzentrationen als Heatmap dargestellt. Im Profil der Zytokine untereinander ließ sich dadurch ein präferentielles M2/T<sub>H</sub>2-Serumzytokinprofil in B16<sup>CC1</sup>-Tieren ableiten (Abb.41).



**Abbildung 40: IFN $\gamma$ , IL-4, -10, -13 und PGE<sub>2</sub> Serumkonzentrationen**  
 PGE<sub>2</sub>: Prostaglandin E 2  
 6 Tieren/Kohorte/B16-Entität, Mittelwert+SEM

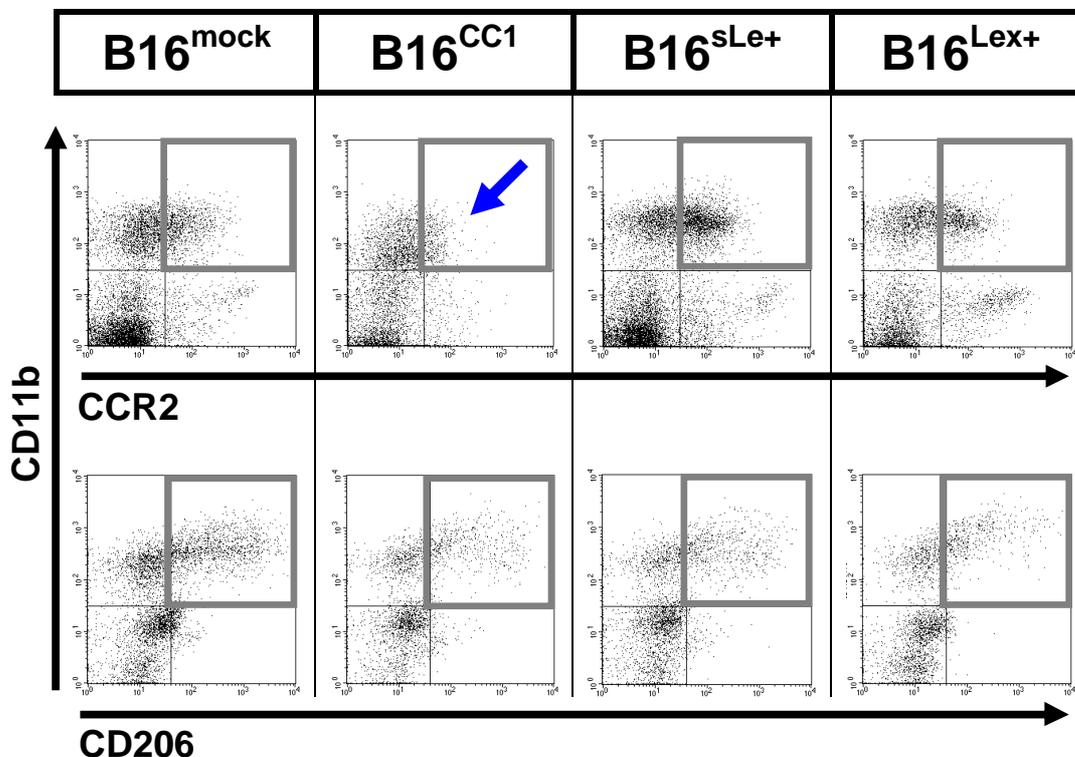


**M2 versus M1**

**Abbildung 41: IFN $\gamma$ , IL-4, -10, -13 und PGE<sub>2</sub>-Serumzytokinprofil**  
 IFN $\gamma$ : Interferon gamma; IL-4: Interleukin 4; IL-10: Interleukin 10;  
 IL-13: Interleukin 13; PGE<sub>2</sub>: Prostaglandin E 2

### 5.7.4 Quantifizierung von TAMs mit einer phänotypischen M1/M2-Polarisation

Nach der Serumanalytik sollte untersucht werden, ob es bei verschiedenen B16-Tieren auch auf zellulärer Ebene zu einer bevorzugten Polarisation von TAMs in einem dominant inflammatorischen (M1) oder anti-inflammatorischen (M2) Phänotyp kam. Phänotypische M1-TAMs wurden über eine Ko-Expression des Chemokin-Rezeptors CCR2, und phänotypische M2-TAMs über einer Ko-Expression des Mannose-Rezeptors CD206 diskriminiert (vgl. Abb.16). CCR2 wurde als differentiell regulierter Kandidat in B16<sup>sLe+</sup> und B16<sup>Lex+</sup>-Tieren identifiziert (Tabelle 11). In Abb.42 sind CD11b<sup>+</sup>/CCR2<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>-Plots am Beispiel einer Melanomanalyse gezeigt. In der Ratio konnte besonders in B16<sup>mock</sup> und B16<sup>CC1</sup>-Melanomen eine M2-Polarisation von TAMs zum dominant vorherrschenden Phänotyp beobachtet werden, wobei in B16<sup>CC1</sup>-Melanomen eine M1-Polarisation am schwächsten ausgeprägt (Abb.42, Zeile 1, blauer Pfeil, Abb.43, blaue Pfeile). In B16<sup>sLe+</sup> und B16<sup>Lex+</sup>-Melanomen fand eine M1/M2-Polarisation zu ca. gleichen Teilen statt, mit einer Tendenz zur M1-Polarisation (Abb.43).

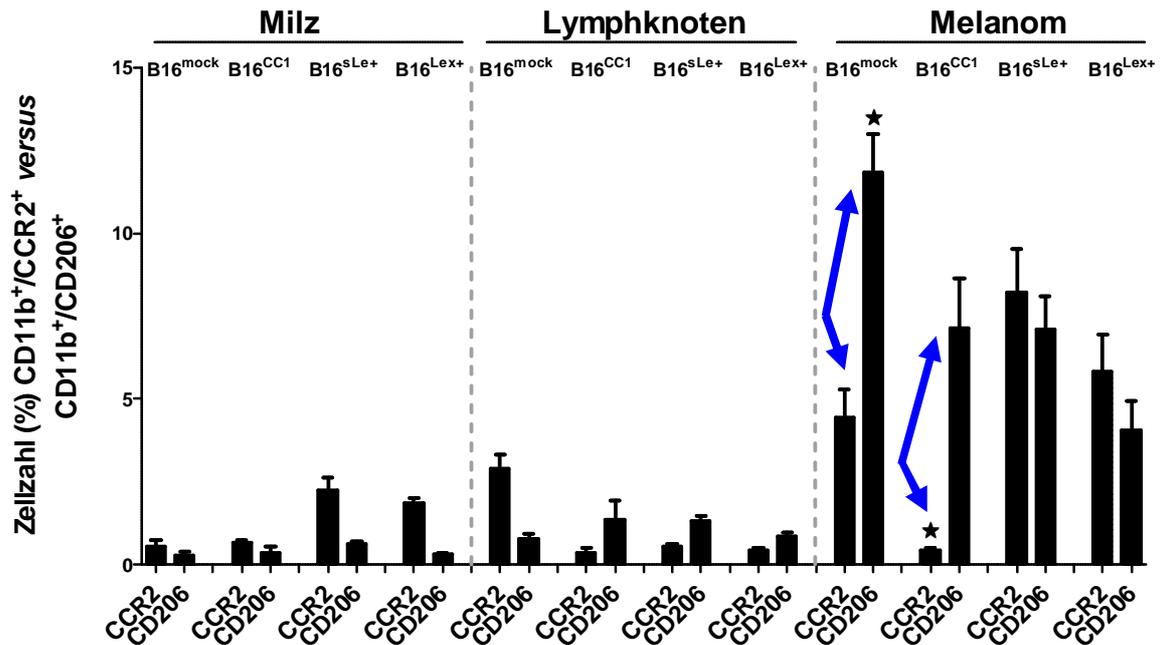


**Abbildung 42: Identifizierung von TAMs mit einer M1/M2-Polarisation**

Zeile 1: Identifizierung von M1-TAMs (CD11b<sup>+</sup>/CCR2<sup>+</sup>)

Zeile 2: Identifizierung von M2-TAMs (CD11b<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>)

CD11b: *Integrin $\alpha$ M $\beta$ 2*, CCR2: *C-C chemokine receptor type2*, CD206: *Macrophage mannose receptor 1*

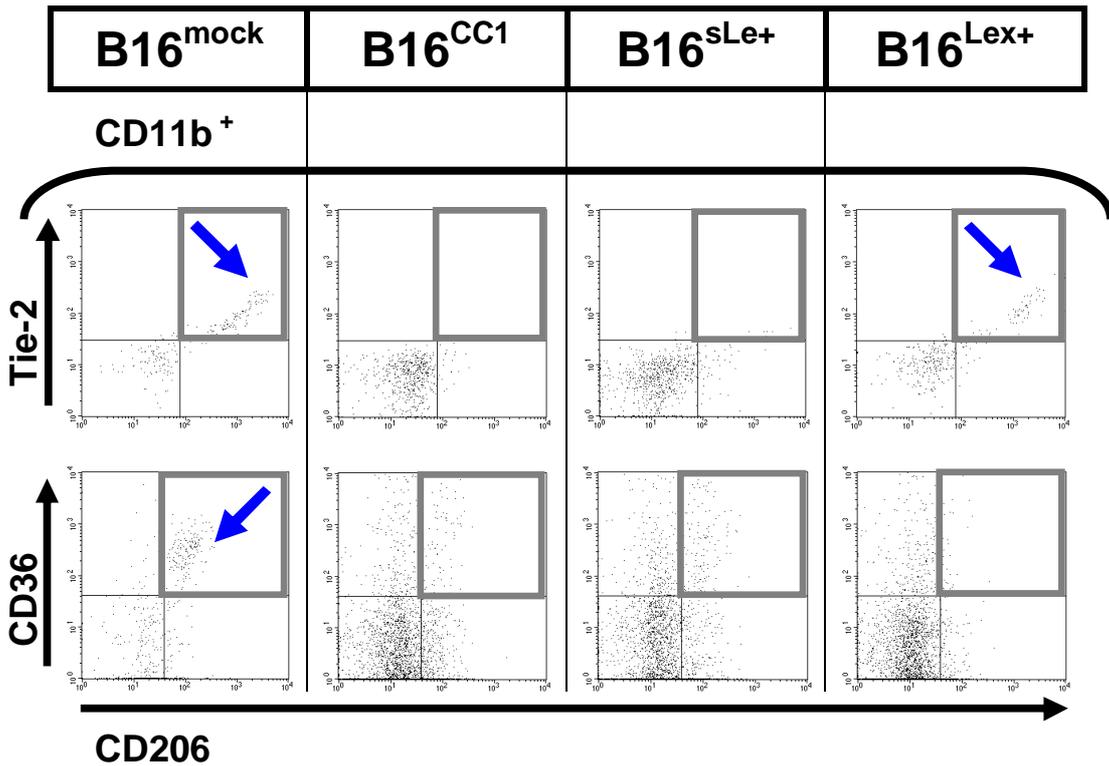


**Abbildung 43: Quantifizierung von TAMs mit einer M1/M2-Polarisation**

CD11b: *Integrin $\alpha$ M $\beta$ 2*, CCR2: *C-C chemokine receptor type2*, CD206: *Macrophage mannose receptor 1*  
6 Tieren/Kohorte/B16-Entität, Mittelwert+SEM

### 5.7.5 Quantifizierung differentieller M2-TAM-Subpopulationen

Zur Diskriminierung eventuell auftretender Subpopulationen sollten M2-TAMs auf eine Ko-Expression von Tie-2 oder CD36 untersucht werden (vgl. Abb.16). TEMs (*Tie-2 expressing monocytes*, definiert als CD11b<sup>+</sup>/Tie-2<sup>+</sup>) wurden in verschiedenen Tumormodellen als proangiogen wirkende Subpopulation beschrieben. CD36 kann an eine ganze Reihe verschiedener Liganden wie Thrombospondin, Kollagen, LDL (*low density lipoproteins*) oder langkettigen Fettsäuren binden. Tie-2 und CD36 wurden als differentiell regulierte Kandidaten in B16<sup>CC1</sup>-Tieren identifiziert (Tabelle 11). In Abb.44 sind CD11b<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>/Tie-2<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>/CD36<sup>+</sup>-Plots am Beispiel einer Melanomanalyse gezeigt. Prominente TEM-Populationen traten aber nicht in B16<sup>CC1</sup>, sondern in B16<sup>mock</sup> und B16<sup>Lex+</sup>-Tieren auf (Abb.44, Zeile 1, blaue Pfeile). Quantitativ war eine signifikante Abnahme von TEMs in B16<sup>CC1</sup> und B16<sup>sLe+</sup>-Tieren zu messen. In einem Vergleich von CD11b<sup>+</sup>/Tie-2<sup>+</sup> zu CD11b<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>/Tie-2<sup>+</sup> konnte gezeigt werden, dass nachgewiesenen TEMs zu annähernd 100% ein M2-Phänotyp zugeordnet werden konnte (Abb.45, rechts).

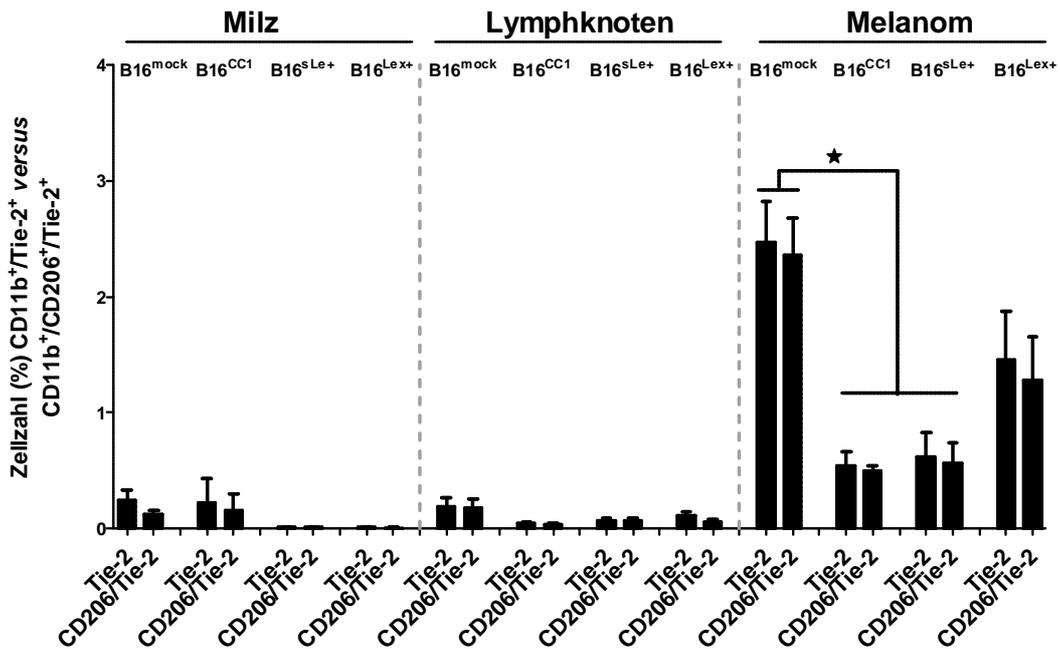


**Abbildung 44: Identifizierung differentieller M2-TAM-Subpopulationen**

Zeile 1: Identifizierung von M2-TEMs (CD11b<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>/Tie-2<sup>+</sup>).

Zeile 2: Identifizierung von CD36<sup>+</sup>M2-TAMs (CD11b<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>/CD36<sup>+</sup>).

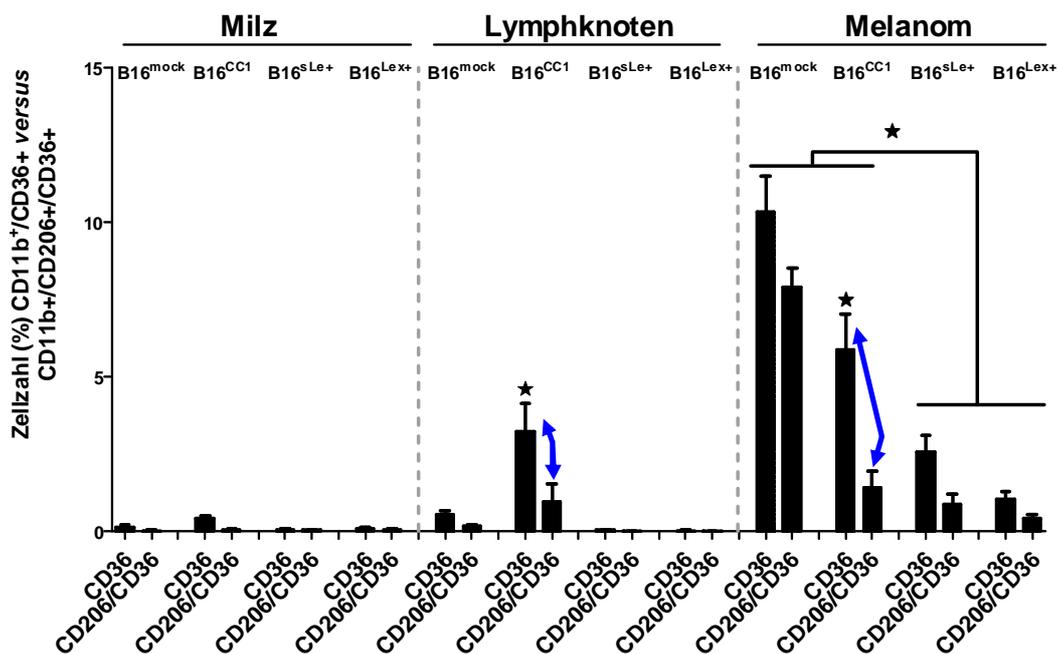
CD11b: *Integrin $\alpha$ M $\beta$ 2*, Tie-2: *Angiopoietin-1 receptor*, CD36: *fatty acid translocase*, CD206: *Macrophage mannose receptor 1*



**Abbildung 45: Quantifizierung von TEMs**

CD11b: *Integrin $\alpha$ M $\beta$ 2*, Tie-2: *Angiopoietin-1 receptor*, CD206: *Macrophage mannose receptor 1*  
 6 Tieren/Kohorte/B16-Entität, Mittelwert+SEM

Eine distinkte CD36<sup>+</sup>M2-TAM-Population konnte nur in B16<sup>mock</sup>-Tieren beobachtet werden. In den anderen B16-Entitäten konnten zwar auch CD36<sup>+</sup>M2-TAMs nachgewiesen werden, allerdings nur in einer diffusen Verteilung. Eine abgrenzbare Populationsbildung wie in B16<sup>mock</sup> war nicht festzustellen (Abb.44, Zeile 2, blauer Pfeil). Im Vergleich von CD11b<sup>+</sup>/CD36<sup>+</sup> zu CD11b<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>/CD36<sup>+</sup> war der Gesamtanteil von CD11b<sup>+</sup>/CD36<sup>+</sup>-Zellen in den Melanomen von B16<sup>mock</sup> und B16<sup>CC1</sup>-Tieren insgesamt signifikant höher als in B16<sup>sLe+</sup> und B16<sup>Lex+</sup>-Tieren (Abb.46). In B16<sup>CC1</sup>-Tieren konnte ein signifikantes Übergewicht von CD11b<sup>+</sup>/CD36<sup>+</sup>-Zellen zu CD11b<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>/CD36<sup>+</sup>-Zellen in den Melanomen und Lymphknoten gemessen werden (Abb.46, blaue Pfeile). Zusätzlich waren B16<sup>CC1</sup>-Tiere die einzige Entität, in der eine CD11b<sup>+</sup>/CD36<sup>+</sup>-Population in den Lymphknoten der Tiere nachgewiesen werden konnte (Abb.46, mitte).

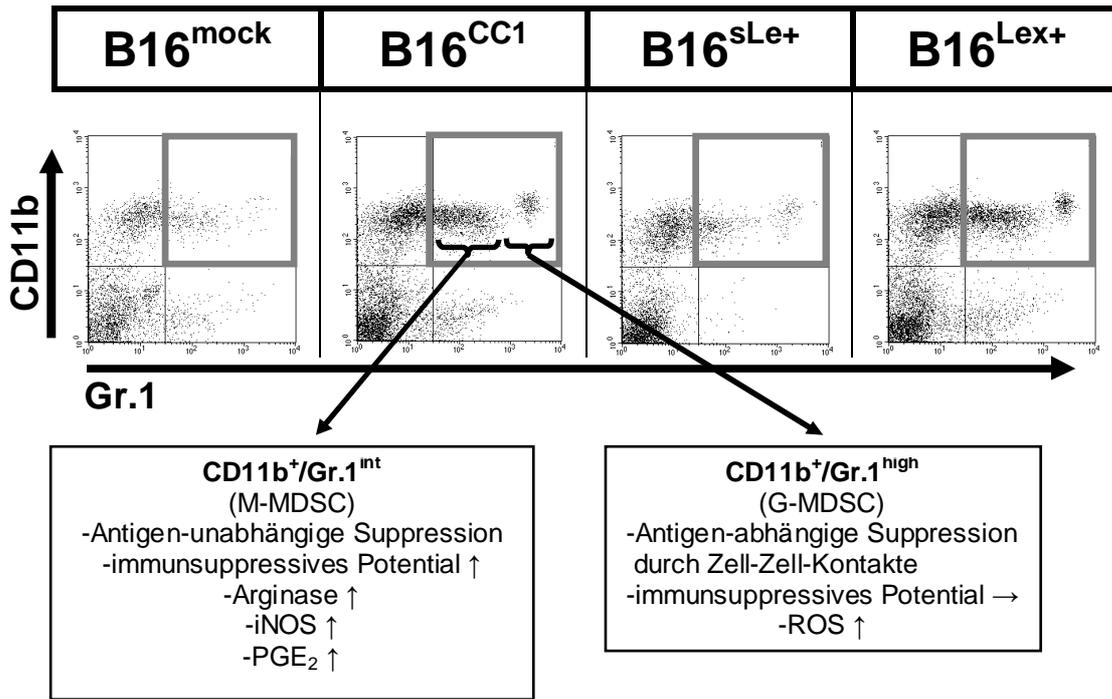


**Abbildung 46: Quantifizierung von CD36<sup>+</sup>M2-TAMs**

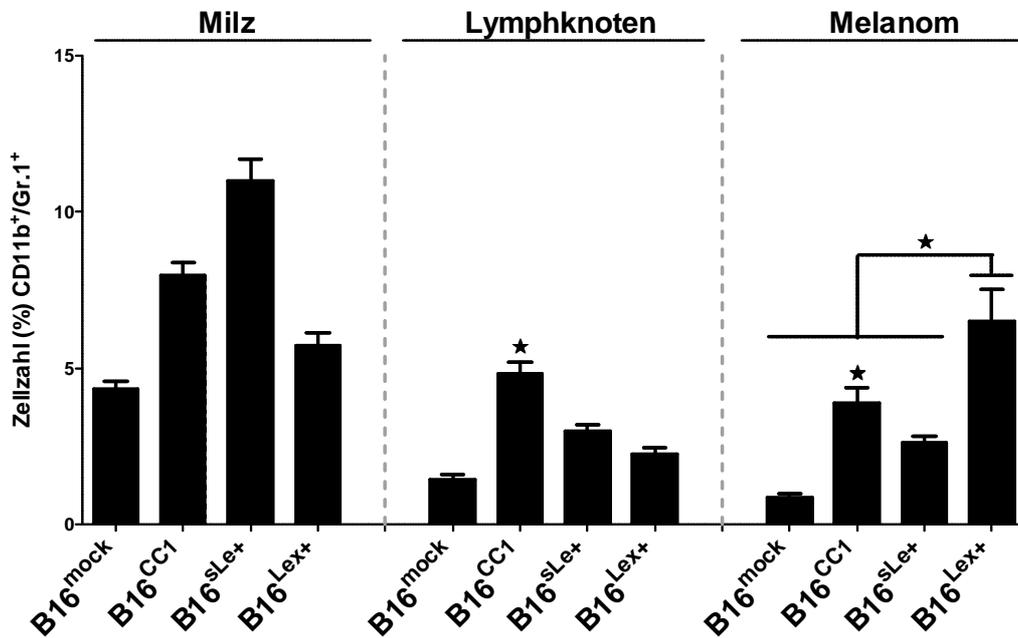
CD11b: Integrin<sub>αMβ2</sub>, CD36: *fatty acid translocase*, CD206: *Macrophage mannose receptor 1*  
6 Tieren/Kohorte/B16-Entität, Mittelwert+SEM

### 5.7.6 Quantifizierung von *myeloid derived suppressor cells* (MDSCs)

In Mäusen sind MDSCs als eine CD11b<sup>+</sup>/Gr.1<sup>+</sup>-definierte Population beschrieben, die negativ für Antigene ist, die typischerweise von ausdifferenzierten Makrophagen oder neutrophilen Granulozyten exprimiert werden<sup>111-112</sup>. In Tumormodellen wurden CD11b<sup>+</sup>/Gr.1<sup>int</sup> und CD11b<sup>+</sup>/Gr.1<sup>high</sup> MDSCs (int=*intermediate*) als nahezu deckungsgleich mit M-MDSCs (CD11b<sup>+</sup>/Ly6C<sup>high</sup>/Ly6G<sup>-</sup>), bzw. G-MDSCs (CD11b<sup>+</sup>/Ly6C<sup>low</sup>/Ly6G<sup>+</sup>) beschrieben<sup>113-114</sup>. Der eingesetzte Anti-Gr.1-Antikörper (Klon RB6-8C5, Tabelle 5) erkennt sowohl Ly6C als auch Ly6G-Epitope. Aufgrund dieser Eigenschaft sollten zunächst auftretende CD11b<sup>+</sup>/Gr.1<sup>+</sup>-MDSCs *in toto* bestimmt werden. Durch eine Ko-Expression der Wachstumsfaktor-Rezeptoren VEGFR1 (*vascular endothelial growth factor receptor 1*), VEGFR3 (*vascular endothelial growth factor receptor 3*) oder IGF1R (*insulin-like growth factor 1 receptor*) sollte untersucht werden, ob sich präsenten MDSCs ein Phänotyp für einen dieser Rezeptoren zuordnen lässt (vgl. Abb.17). VEGF-D (Ligand für VEGFR3) und IGF1 (Ligand für IGF1R) wurden als differentiell regulierte Kandidaten in B16<sup>CC1</sup>-Tieren identifiziert (Tabelle 11). In Abb.47 sind MDSCs am Beispiel einer Melanomanalyse gezeigt. Ein Merkmal war die in der Literatur beschriebene Aufspaltung von MDSCs in eine CD11b<sup>+</sup>/Gr.1<sup>int</sup> (M-MDSC) und eine CD11b<sup>+</sup>/Gr.1<sup>high</sup> (G-MDSC) Population (Abb.47, schwarze Pfeile). In der *in toto* Quantifizierung waren MDSCs in den Lymphknoten und Melanomen von B16<sup>CC1</sup>-Tieren, und in den Melanomen von B16<sup>Lex+</sup>-Tieren signifikant erhöht, wobei die *in toto* Abundanz an Melanomen von B16<sup>Lex+</sup>-Tieren am höchsten war (Abb.48).

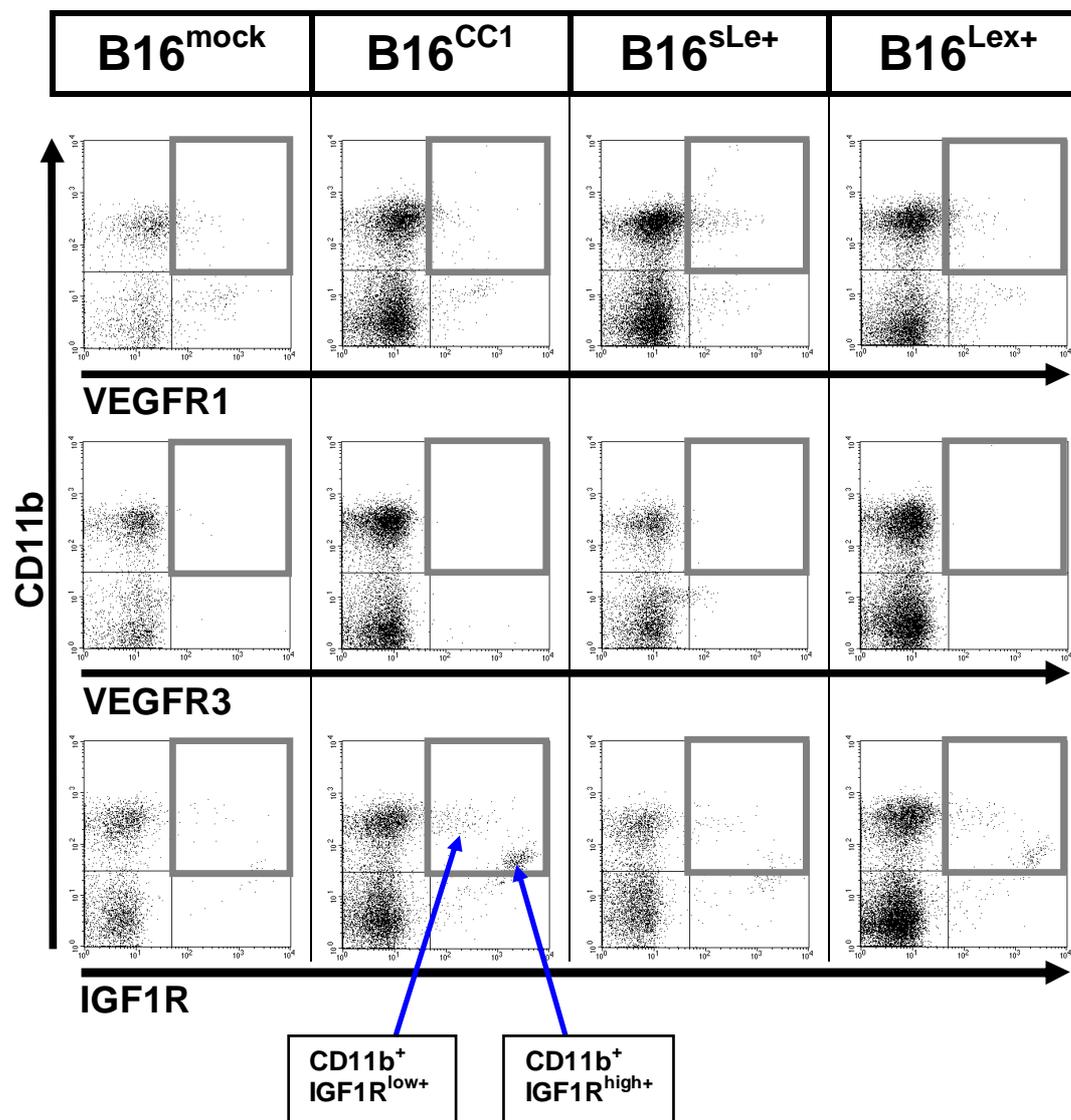


**Abbildung 47: Identifizierung von CD11b<sup>+</sup>/Gr.1<sup>+</sup>-MDSCs**  
 CD11b: Integrin<sub>α</sub>M<sub>β</sub>2, Gr.1: lymphocyte antigen 6 C/G



**Abbildung 48: Quantifizierung von CD11b<sup>+</sup>/Gr.1<sup>+</sup>-MDSCs**  
 CD11b: Integrin<sub>α</sub>M<sub>β</sub>2, Gr.1: lymphocyte antigen 6 C/G  
 6 Tieren/Kohorte/B16-Entität, Mittelwert+SEM

Um einen Eindruck von der Verteilung von VEGFR1, VEGFR3 und IGF1R zu bekommen, wurden diese zunächst auf CD11b<sup>+</sup>-Hintergrund abgebildet (Abb.49). CD11b<sup>+</sup>/VEGFR1<sup>+</sup>-Zellen konnten in unterschiedlicher Abundanz in allen B16-Tieren nachgewiesen werden (Abb.49, Zeile 1). VEGFR3 war nicht nachzuweisen (Abb.49, Zeile 2). In IGF1R-Plots spalteten sich CD11b<sup>+</sup>/IGF1R<sup>+</sup>-Zellen in zwei gut abgrenzbare CD11b<sup>+</sup>/IGF1R<sup>low</sup> und CD11b<sup>+</sup>/IGF1R<sup>high</sup>-Populationen auf (Abb.49, Zeile 3, blaue Pfeile).



**Abbildung 49: Verteilung von VEGFR1, VEGFR3 und IGF1R auf CD11b<sup>+</sup>-Zellen**

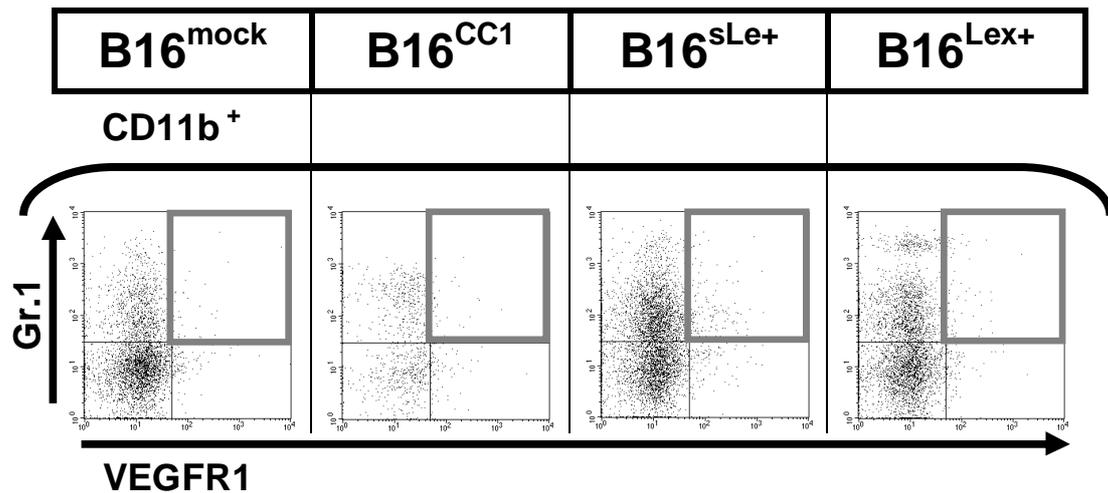
Zeile 1: Identifizierung von CD11b<sup>+</sup>/VEGFR1<sup>+</sup>-Zellen

Zeile 2: Identifizierung von CD11b<sup>+</sup>/VEGFR3<sup>+</sup>-Zellen

Zeile 3: Identifizierung von CD11b<sup>+</sup>/IGF1R<sup>+</sup>-Zellen

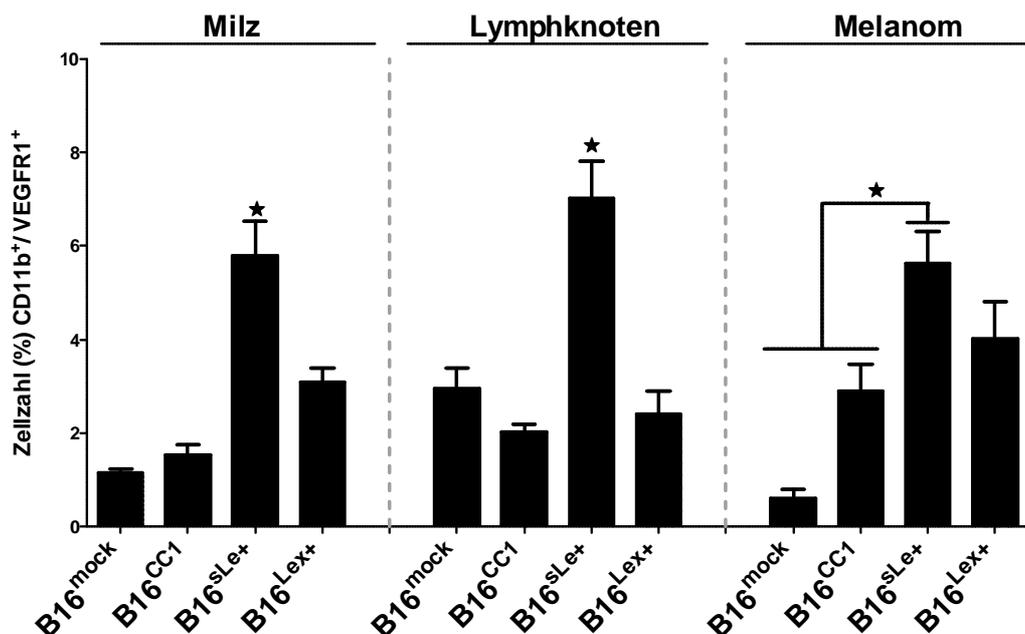
CD11b: *Integrin $\alpha$ M $\beta$ 2*, VEGFR1: *vascular endothelial growth factor receptor 1*, VEGFR3: *vascular endothelial growth factor receptor 3*, IGF1R: *insulin-like growth factor 1 receptor*

Bei der Abbildung von VEGFR1 auf MDSC-Hintergrund konnten vereinzelt VEGFR1<sup>+</sup>-MDSCs nachgewiesen werden, eine abgrenzbare Population war aber nicht festzustellen (Abb.50). Aus diesem Grund wurden stattdessen CD11b<sup>+</sup>/VEGFR1<sup>+</sup>-Zellen quantifiziert. Für diese Population zeigte sich in Milz, Lymphknoten und Melanom eine signifikante Zunahme in B16<sup>sLe+</sup>-Tieren (Abb.51).



**Abbildung 50: Identifizierung von VEGFR1<sup>+</sup>-MDSCs**

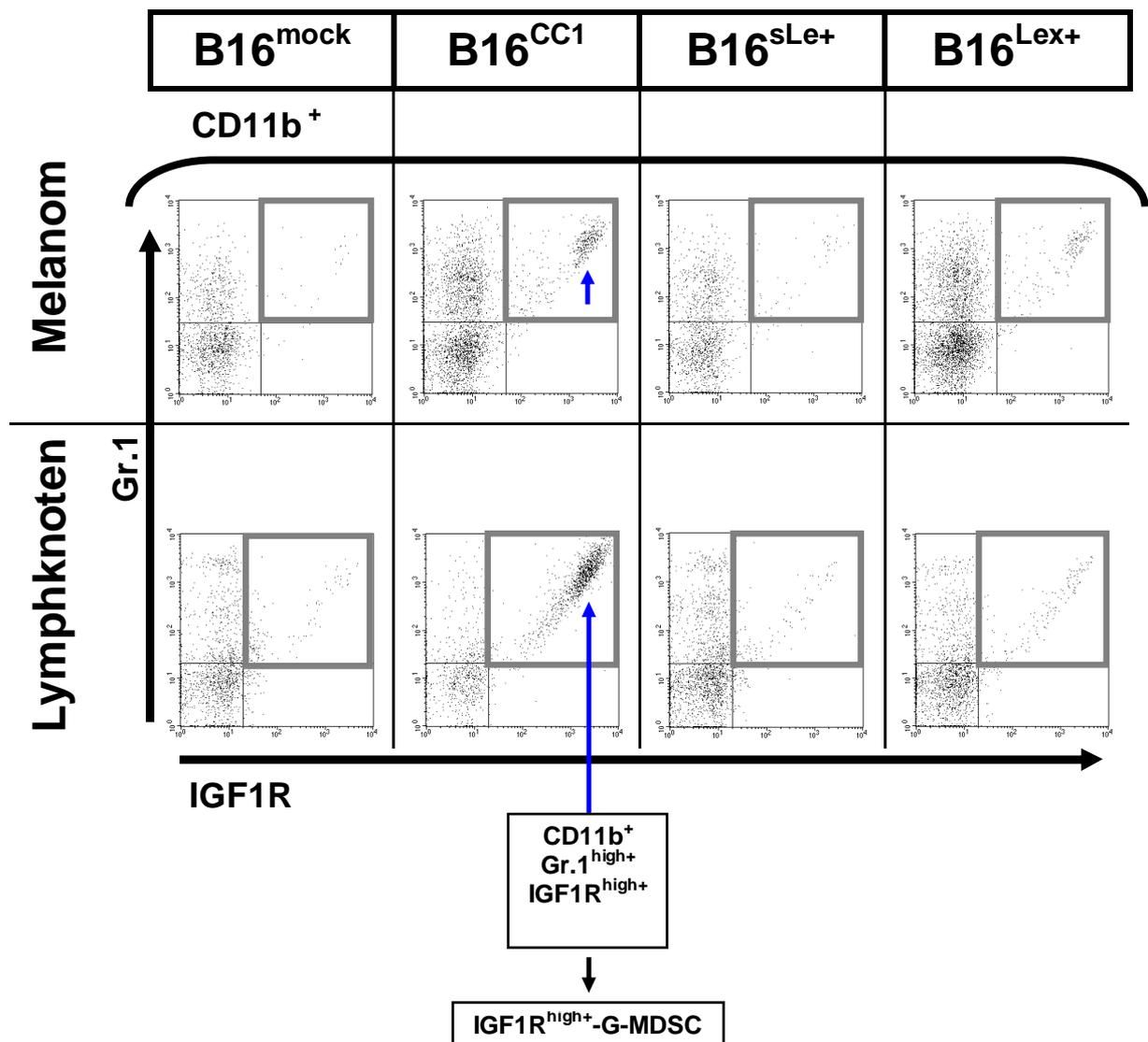
CD11b: Integrin<sub>α</sub>Mβ<sub>2</sub>, Gr.1: *lymphocyte antigen 6 C/G*, VEGFR1: *vascular endothelial growth factor receptor 1*



**Abbildung 51: Quantifizierung von CD11b<sup>+</sup>/VEGFR1<sup>+</sup>-Zellen**

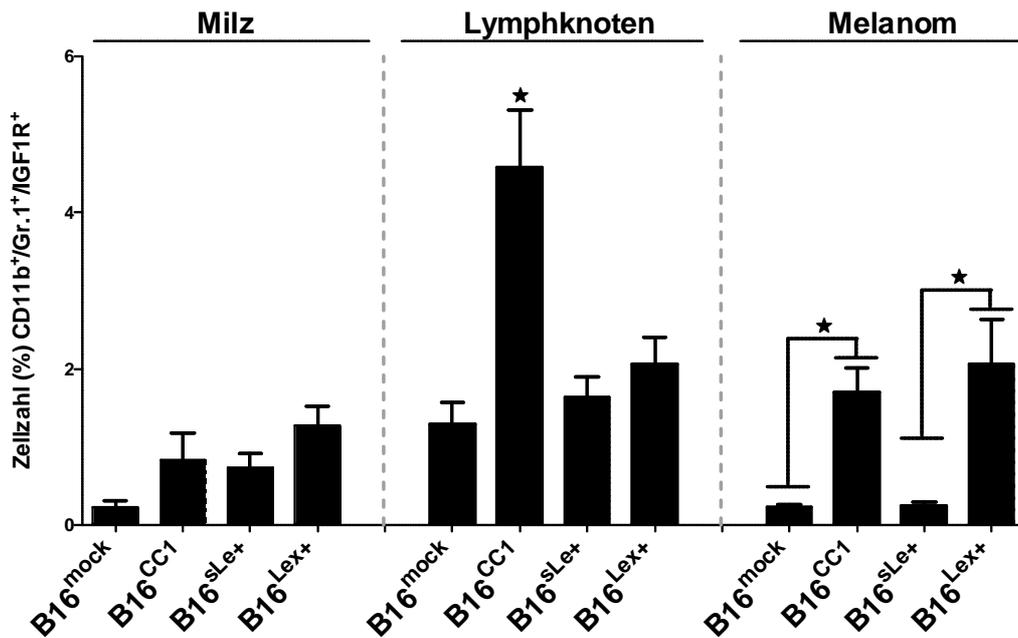
CD11b: Integrin<sub>α</sub>Mβ<sub>2</sub>, VEGFR1: *vascular endothelial growth factor receptor 1*  
6 Tieren/Kohorte/B16-Entität, Mittelwert+SEM

Bei der Abbildung von IGF1R auf MDSC-Hintergrund konnte eine prominente Ko-Expression von IGF1R auf  $CD11b^+/Gr.1^{high}$ -MDSCs (G-MDSC) beobachtet werden. In Abb.52 sind IGF1R<sup>+</sup>-MDSCs in Lymphknoten und Melanom im Vergleich gezeigt. Quantitativ konnte die signifikant deutlich größte IGF1R<sup>+</sup>-MDSC-Population in den Lymphknoten von B16<sup>CC1</sup>-Tieren gemessen werden. In den Melanomen konnte eine signifikante Zunahme dieser Populatoren in B16<sup>CC1</sup> und B16<sup>Lex+</sup>-Tieren gemessen werden (Abb.53, rechts).



**Abbildung 52: Identifizierung von IGF1R<sup>+</sup>-MDSCs**

CD11b: *Integrin $\alpha$ M $\beta$ 2*, Gr.1: *lymphocyte antigen 6 C/G*, IGF1R: *insulin-like growth factor 1 receptor*



**Abbildung 53: Quantifizierung von IGF1R<sup>+</sup>-G-MDSCs**

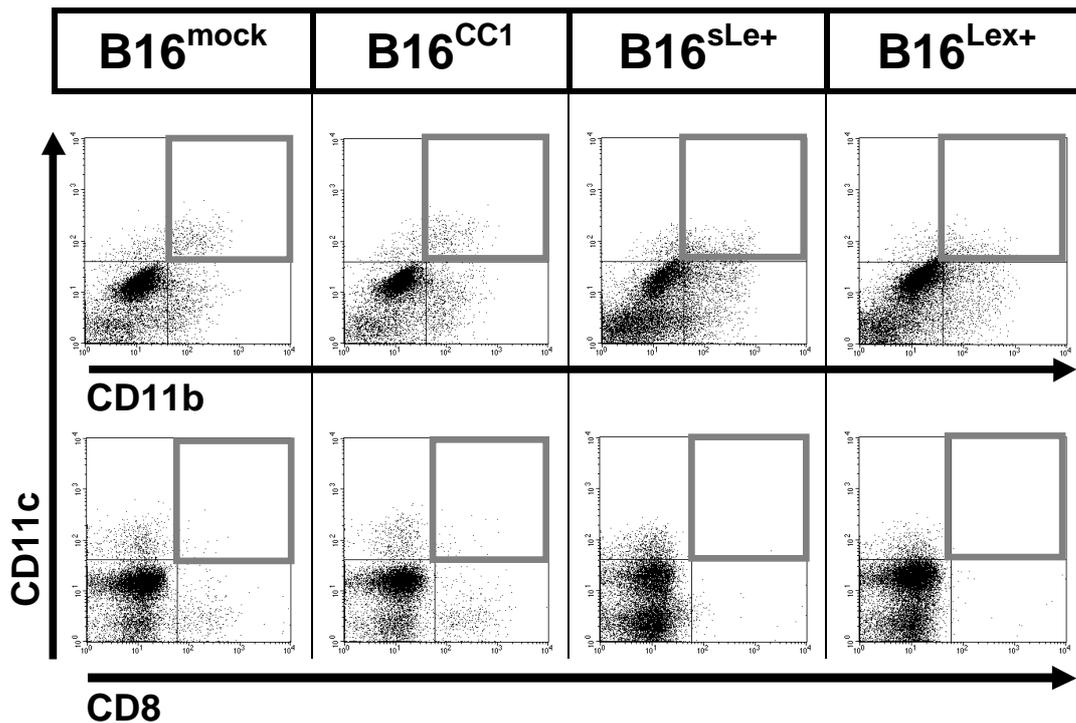
CD11b: Integrin $\alpha$ M $\beta$ 2, Gr.1: *lymphocyte antigen 6 C/G*, IGF1R: *insulin-like growth factor 1 receptor*  
 6 Tieren/Kohorte/B16-Entität, Mittelwert+SEM

Insgesamt konnte somit von den drei untersuchten Wachstumsfaktor-Rezeptoren VEGFR1, VEGFR3 und IGF1R eine IGF1R-Ko-Expression einer definierten MDSC-Population zugeordnet werden (IGF1R<sup>high</sup>-G-MDSC; Abb.52). VEGFR1 konnte zwar auf CD11b<sup>+</sup>-Hintergrund abgebildet werden, eine abgrenzbare VEGFR1<sup>+</sup>-MDSC-Population schien im hier eingesetzten B16-Melanommodell aber nicht vorzuliegen (Abb.50). VEGFR3 war nicht nachzuweisen (Abb.49).

### 5.7.7 Quantifizierung CD11c<sup>+</sup> dendritischer Zellen

Dendritische Zellen (DCs) stellen keine homogene Population dar, sondern unterscheiden sich in ihrem hämatopoetischen Ursprung (Abb.7), ihrer Differenzierung und ihrem migratorischen Potential. Im murinen und humanen System lassen sich phänotypisch zwei verschiedene DC-Populationen unterscheiden: CD11c<sup>+</sup> myeloide (MDCs, „konventionell“) und CD11c<sup>-</sup> plasmazytoide (PDCs) dendritische Zellen. MDCs können effizient Antigene prozessieren und präsentieren, PDCs sekretieren hohe Dosen von IFN $\alpha$  als Antwort auf virale Infektionen<sup>115</sup>. CD11c<sup>+</sup>MDCs können weiter eingeteilt werden in +CD11b<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> und +CD8<sup>+</sup>-Subpopulationen. Beide Subpopulationen reifen unter inflammatorischen Bedingungen aus und können IL-12 sekretieren, jedoch konnte für CD8<sup>-</sup>MDCs gezeigt werden, dass sie bevorzugt eine T<sub>H</sub>2-Antwort stimulieren, und dass CD8<sup>+</sup>MDCs ein erhöhtes Potential zur MHCII-vermittelten Kreuzpräsentation (*cross presentation*) von Antigenen zur Induktion zytotoxischer CD8<sup>+</sup>T<sub>Eff</sub>-Lymphozyten besitzen und bevorzugt eine T<sub>H</sub>1-Antwort stimulieren<sup>116-117</sup>.

CD11c<sup>+</sup>MDCs wurden zunächst auf eine Ko-Expression von entweder +CD11b<sup>+</sup> oder +CD8<sup>+</sup> untersucht (vgl. Abb.18). CD11c (*integrin alpha-X/beta-2*) ist ein Rezeptor für Fibrinogen und wird häufig als Marker für MDCs eingesetzt. In Abb.54 sind CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> versus CD11c<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> dendritische Zellen am Beispiel einer Melomanalyse gezeigt. In allen Tieren traten überwiegend CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> dendritische Zellen auf (Abb.54, Zeile 1). In den Melanomen von B16<sup>mock</sup> und B16<sup>CC1</sup>-Tieren waren CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>MDCs signifikant erhöht (Abb.55). CD11c<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>MDCs waren wenn, nur vereinzelt nachweisbar (Abb.54, Zeile 2), quantitative Unterschiede von CD11c<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>MDCs konnten in keiner B16-Entität gemessen werden (Abb.55).

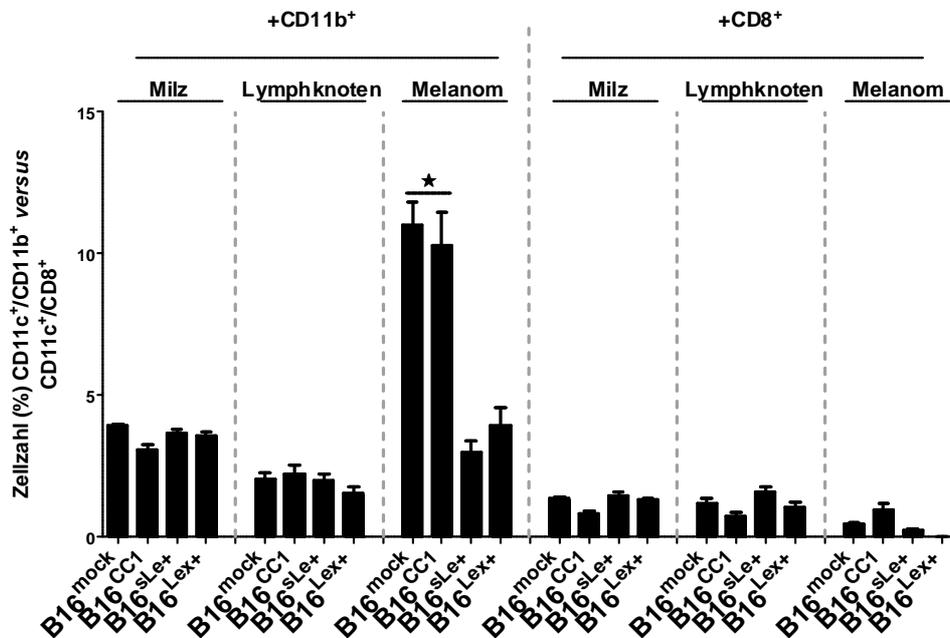


**Abbildung 54: Identifizierung CD11c<sup>+</sup> dendritischer Zellen (MDCs)**

Zeile 1: Identifizierung von CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>MDCs

Zeile 2: Identifizierung von CD11c<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>MDCs

CD11b: *Integrin<sub>α</sub>M<sub>β2</sub>*, CD11c: *Integrin<sub>α</sub>X<sub>β2</sub>*, CD8: *T-cell surface glycoprotein CD8 alpha chain*



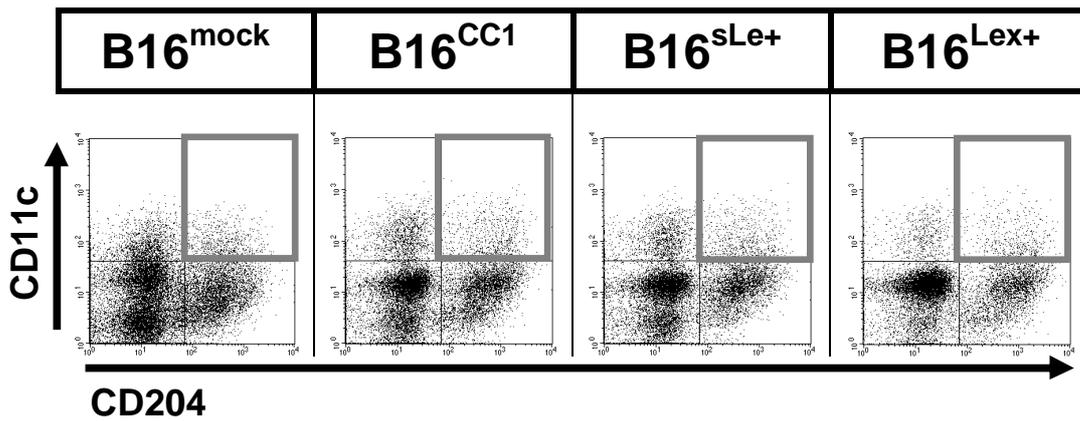
**Abbildung 55: Quantifizierung von CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> versus CD11c<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>MDCs**

CD11b: *Integrin<sub>α</sub>M<sub>β2</sub>*, CD11c: *Integrin<sub>α</sub>X<sub>β2</sub>*, CD8: *T-cell surface glycoprotein CD8 alpha chain*

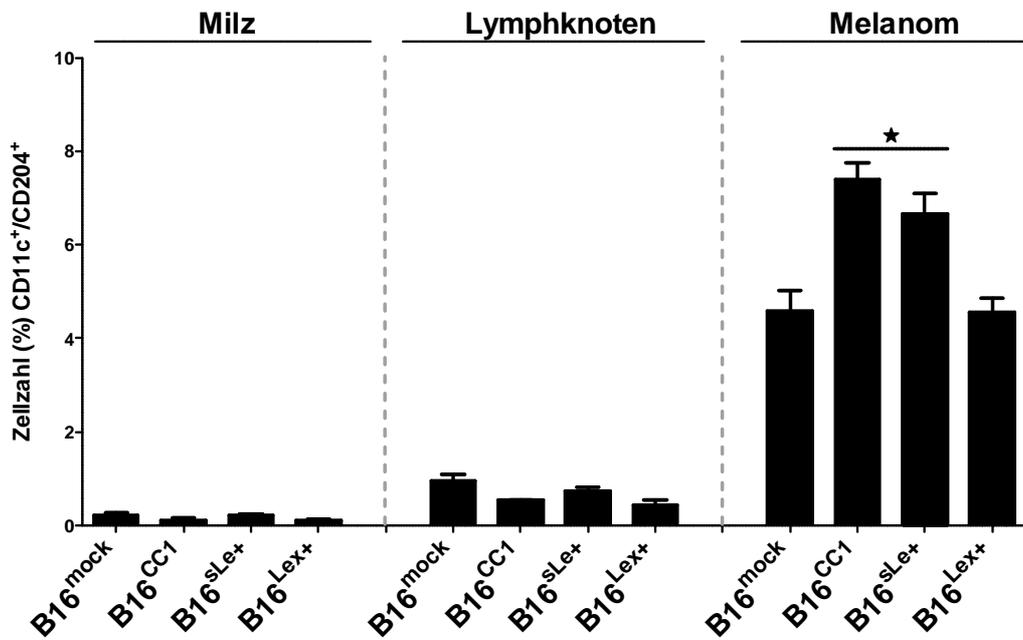
6 Tieren/Kohorte/B16-Entität, Mittelwert+SEM

Zusätzlich sollten CD11c<sup>+</sup>MDCs auf eine Ko-Expression des *class A scavenger*-Rezeptors CD204 getestet werden. CD204 gehört zur Gruppe der sog. *pattern recognition* Rezeptoren (PRR), und wird präferentiell von myeloischen Zellen wie Monozyten und Dendriten exprimiert. Herber et. al. konnte zeigen, dass eine Erhöhung der Konzentration extrazellulärer Lipidderivate wie Triglyzeride oder LDL häufig von einer parallelen Heraufregulation entsprechender *scavenger*-Rezeptoren auf DCs begleitet werden, und dass in murinen und humanen Tumormodellen/-erkrankungen DCs mit großen Mengen eingelagerter Lipidderivate nur noch stark vermindert in der Lage waren, Antigene prozessieren und T-Lymphozyten stimulieren zu können <sup>118</sup>. Umgekehrt konnte Yi et. al. zeigen, dass eine Herabregulation von CD204 auf APCs zu einer Erhöhung der Immunität gegen niedrig-immunogene Tumoren führen <sup>119</sup>.

In Abb.56 sind CD11c<sup>+</sup>/CD204<sup>+</sup> dendritische Zellen am Beispiel einer Melanomanalyse gezeigt. Eine Ko-Expression von CD11c<sup>+</sup>/CD204<sup>+</sup> fand fast ausschließlich in den Melanomen statt, mit einer signifikanten Zunahme in B16<sup>CC1</sup> und B16<sup>SLE+</sup>-Tieren (Abb.57). In Milz und Lymphknoten war keine auffällige CD204-Expression nachweisbar (Abb.57, links, mitte).



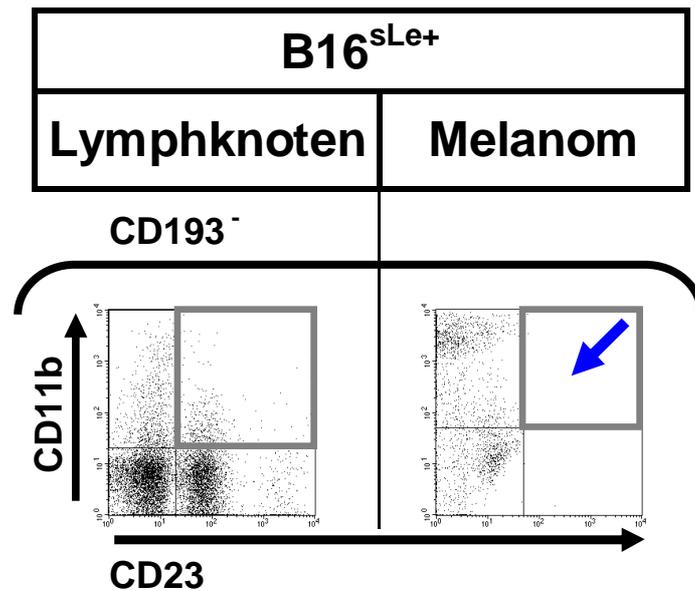
**Abbildung 56: Identifizierung CD11c<sup>+</sup>/CD204<sup>+</sup> dendritischer Zellen**  
 CD11c: Integrin $\alpha$ X $\beta$ 2, CD204: *scavenger receptor type A*



**Abbildung 57: Quantifizierung CD11c<sup>+</sup>/CD204<sup>+</sup> dendritischer Zellen**  
 CD11c: Integrin $\alpha$ X $\beta$ 2, CD204: *scavenger receptor type A*  
 6 Tieren/Kohorte/B16-Entität, Mittelwert+SEM

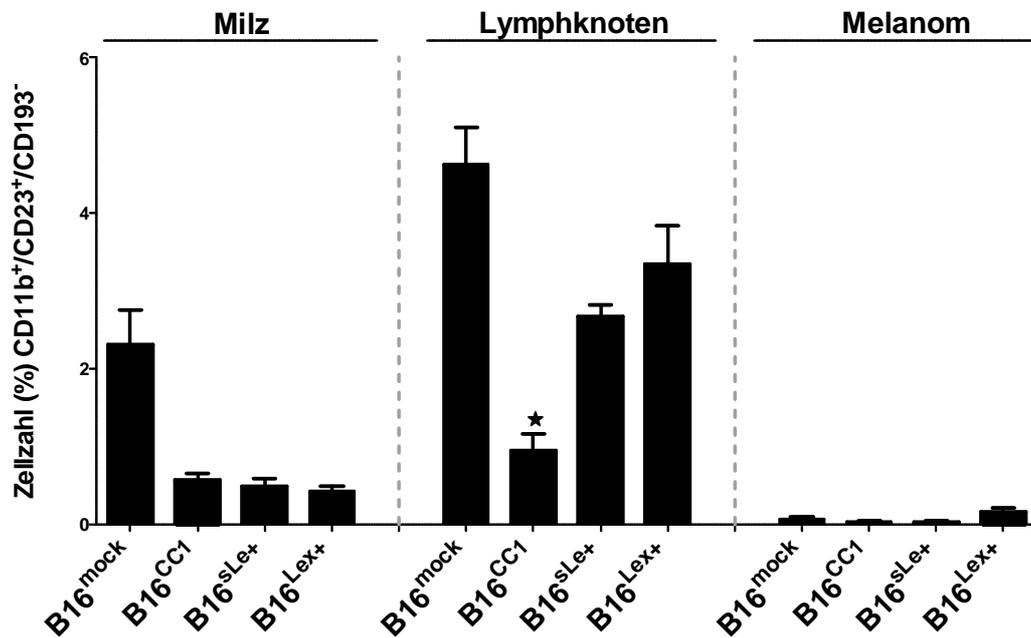
### 5.7.8 Quantifizierung aktivierter CD11b<sup>+</sup>-B-Lymphozyten

Bei einer Expression von CD11b auf B-Lymphozyten wurde CD11b als Rezeptor für *complement C3b*-Peptide bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose von *complement coated particles* beschrieben. Über diese Rezeptoraktivität wird für CD11b eine Funktion bei der Antigen-Prozessierung in B-Lymphozyten diskutiert<sup>120</sup>. CD23 (*low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor*) wird von B2-Lymphozyten exprimiert und ist zusammen mit CD21 (*complement receptor type 2*) in der Literatur als B2-Lymphozyten-Aktivierungsmarker beschrieben<sup>121</sup>. Über eine Ko-Expression von CD23 und CD11b sollten aktivierte B2-Lymphozyten quantifiziert werden, die positiv für CD11b sind. Durch Ausschluss einer CD193<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup>-Ko-Expression wurden aktivierte B2-Lymphozyten (CD11b<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup>/CD193<sup>-</sup>) von möglicherweise CD23<sup>+</sup>-dendritischen und/oder monozytären Zellen diskriminiert (CD193: *chemokine (C-C motif) receptor 3*) (vgl. Abb.19). In Abb.58 sind CD11b<sup>+</sup>/CD23<sup>+</sup>/CD193<sup>-</sup> B-Lymphozyten am Beispiel von B16<sup>sLe+</sup>-Tieren in Lymphknoten und Melanom im Vergleich gezeigt. CD11b<sup>+</sup>-B-Lymphozyten kamen hauptsächlich in Milz und Lymphknoten vor. Melanom-residente CD11b<sup>+</sup>-B-Lymphozyten konnten nicht nachgewiesen werden (Abb.58, rechts, blauer Pfeil). In der Milz waren CD11b<sup>+</sup>-B-Lymphozyten in B16<sup>mock</sup>-Tieren erhöht. Die größten CD11b<sup>+</sup>-B-Lymphozyten-Populationen konnten in den Lymphknoten gemessen werden, wobei in B16<sup>CC1</sup>-Tieren CD11b<sup>+</sup>-B-Lymphozyten signifikant erniedrigt waren. Die größte gemessene Population lag auch hier in B16<sup>mock</sup>-Tieren vor (Abb.59).



**Abbildung 58: Identifizierung aktivierter CD11b<sup>+</sup>-B-Lymphozyten**

CD11b: Integrin $\alpha$ M $\beta$ 2, CD23: *low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor*, CD193: *chemokine (C-C motif) receptor 3*



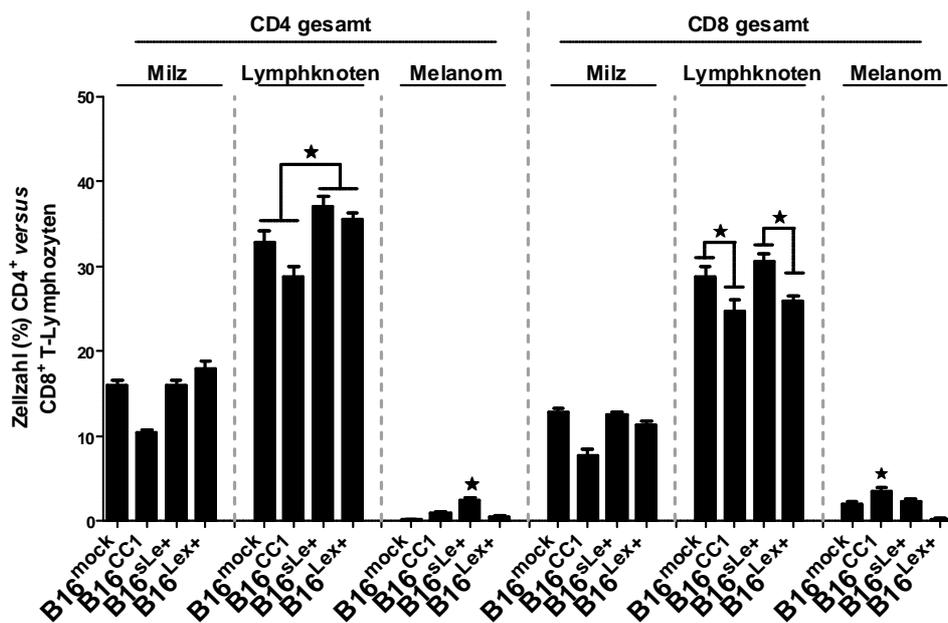
**Abbildung 59: Quantifizierung aktivierter CD11b<sup>+</sup>-B-Lymphozyten**

CD11b: Integrin $\alpha$ M $\beta$ 2, CD23: *low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor*, CD193: *chemokine (C-C motif) receptor 3*

6 Tieren/Kohorte/B16-Entität, Mittelwert+SEM

### 5.7.9 Quantifizierung differentieller T-Lymphozytenpopulationen

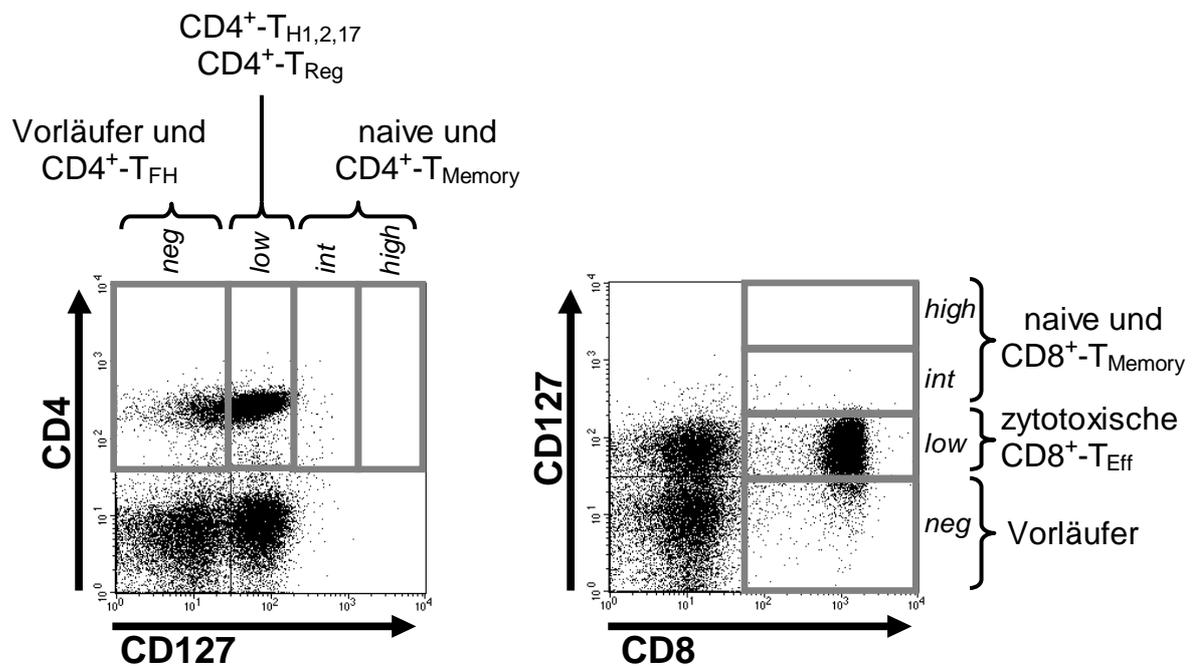
Zur Analyse differentieller CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>T-Lymphozytenpopulationen wurde zunächst der CD4<sup>+</sup> versus CD8<sup>+</sup>-Gesamtanteil bestimmt (vgl. Abb.20). Die größten Populationen wurden erwartungsgemäß in den Lymphknoten der Tiere gefunden. In B16<sup>sLe+</sup> und B16<sup>Lex+</sup>-Tieren konnte in den Lymphknoten eine signifikante Zunahme des CD4<sup>+</sup>-Gesamtanteils gemessen werden, in den Melanomen war in B16<sup>sLe+</sup>-Tieren der CD4<sup>+</sup>-Gesamtanteil signifikant erhöht (Abb. 60, links). Im CD8<sup>+</sup>-Gesamtanteil zeigte sich ein differentielleres Bild. So war der CD8<sup>+</sup>-Gesamtanteil in den Lymphknoten von B16<sup>mock</sup> und B16<sup>sLe+</sup>-Tieren signifikant erhöht, während in den Melanomen der CD8<sup>+</sup>-Gesamtanteil in B16<sup>CC1</sup>-Tieren signifikant erhöht war (Abb.60, rechts).



**Abbildung 60: Quantifizierung CD4<sup>+</sup> versus CD8<sup>+</sup>-Gesamt**

CD4: T-cell surface glycoprotein CD4, CD8: T-cell surface glycoprotein CD8, alpha chain  
6 Tieren/Kohorte/B16-Entität, Mittelwert+SEM

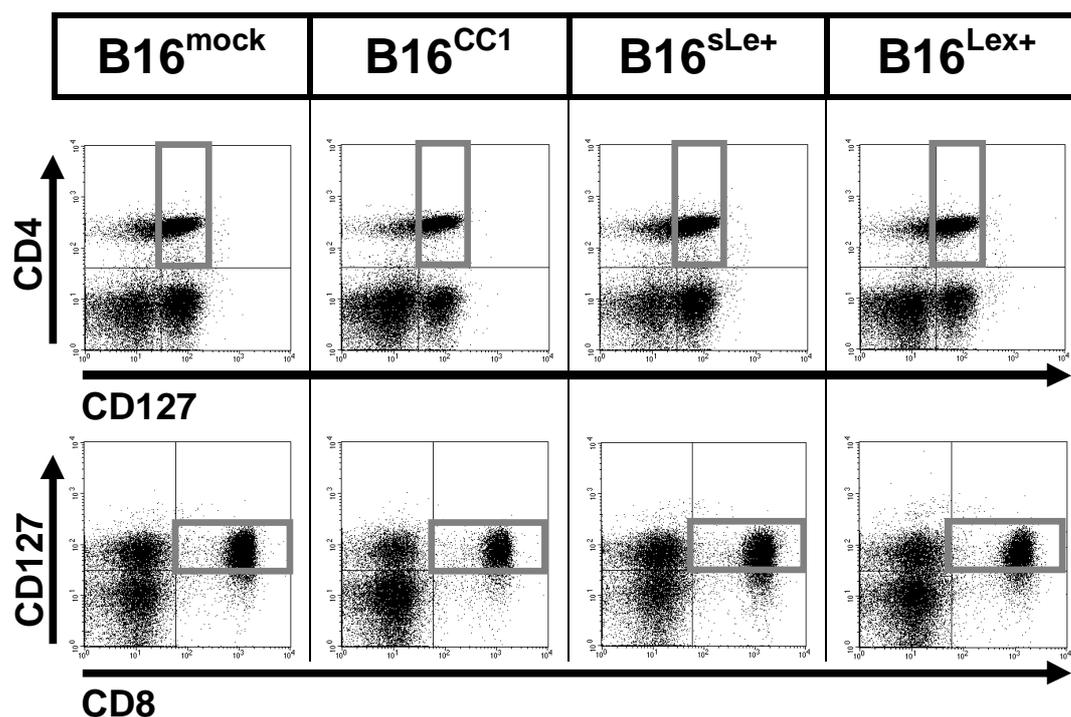
Zur Diskriminierung aktivierter  $T_{\text{Eff}}$ -Lymphozyten wurde als nächstes der T-Lymphozyten-Aktivierungsstatus in den Lymphknoten der Tiere über eine Ko-Expression von CD127 (*Interleukin-7 receptor, subunit alpha*) bestimmt. CD127 gehört zur gamma-Ketten Zytokin-Rezeptor-Familie ( $\gamma\text{C}$ ), und reguliert durch Bindung von IL-7 u.a. die Homeostase von T-Lymphozyten. Eine differentielle CD127-Expression auf aktivierten  $T_{\text{Eff}}$  ist bereits in der Frühphase einer adaptiven Immunantwort nachweisbar. Während naive und anerge  $T_{\text{Memory}}$ -Lymphozyten eine hohe CD127-Expression zeigen ( $\text{CD127}^{\text{high}}$ ), regulieren die meisten  $\text{CD4}^+$  und  $\text{CD8}^+$ -T-Lymphozyten-Populationen innerhalb von 48 Stunden nach Antigen-Stimulation ihre CD127-Expression auf ein basales Niveau herab ( $\text{CD127}^{\text{low}}$ ). Bei folliculären T-Helferzellen ( $T_{\text{FH}}$ ) kann unter inflammatorischen Bedingungen häufig ein völliger, transientser Verlust einer CD127-Expression beobachtet werden, während naive und  $T_{\text{Memory}}$ -Lymphozyten auch unter inflammatorischen Bedingungen eine hohe CD127-Expression beibehalten <sup>122</sup>. Zur Identifizierung differentieller T-Lymphozyten-Populationen wurde in den Lymphknoten die Verteilung der CD127-Expression auf  $\text{CD4}^+$  und  $\text{CD8}^+$ -T-Lymphozyten getestet. Abb.61 zeigt die gesetzten Schwellenwerte zur Diskriminierung einer hohen (*high*) versus mittleren (*intermediate*) versus niedrigen (*low*) CD127-Expression.



**Abbildung 61: Verteilung einer CD127-Expression auf T-Lymphozyten**

$T_{\text{FH}}$ : folliculäre T-Helferzellen;  $T_{\text{REG}}$ : regulatorische  $\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten;  $T_{\text{Memory}}$ : T-Gedächtnis-Lymphozyt; CD4: *T-cell surface glycoprotein CD4*, CD8: *T-cell surface glycoprotein CD8, alpha chain*, CD127: *Interleukin-7 receptor, subunit alpha*

In Abb.62 ist die Verteilung der CD127-Expression auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten gezeigt. CD127<sup>low</sup>-Populationen sind grau eingerahmt. Auffälligstes Merkmal war, dass CD127<sup>high</sup>-Populationen weder auf CD4<sup>+</sup> noch auf CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten vorkamen. Um den Anteil von CD127<sup>low</sup>-T<sub>Eff</sub>-Lymphozyten zu bestimmen, wurde die Ratio aus CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>Gesamt zu CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>/CD127<sup>low</sup> gebildet (Abb.63). Ca. 70% aller CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten der Lymphknoten hatten nach 10 Tagen B16 *in vivo*-Wachstum einen CD127<sup>low</sup>-T<sub>Eff</sub>-Phänotyp angenommen. Signifikante Unterschiede in der CD4<sup>+</sup>/CD127<sup>low</sup>-Ratio konnten zwischen den Tieren nicht festgestellt werden (Abb.63, links). CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten hatten z.T. zu mehr als 80% einen CD8<sup>+</sup>/CD127<sup>low</sup>-T<sub>Eff</sub>-Phänotyp angenommen, wobei eine signifikante Abnahme der CD8<sup>+</sup>/CD127<sup>low</sup>-Populationsgröße in B16<sup>Lex+</sup> zu B16<sup>mock</sup>-Tieren gemessen werden konnte (Abb.63, rechts).

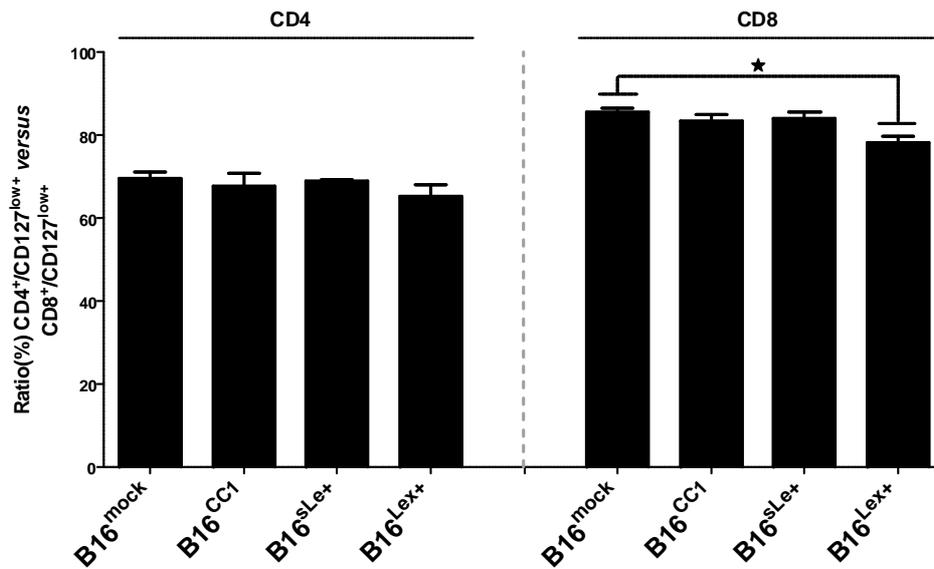


**Abbildung 62: CD127-Expression auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten**

Zeile 1: Identifizierung von CD4<sup>+</sup>T<sub>Eff</sub> anhand des Niveaus einer CD127-Expression (CD4<sup>+</sup>/CD127<sup>low</sup>).

Zeile 2: Identifizierung von CD8<sup>+</sup>T<sub>Eff</sub> anhand des Niveaus einer CD127-Expression (CD8<sup>+</sup>/CD127<sup>low</sup>).

CD4: T-cell surface glycoprotein CD4, CD8: T-cell surface glycoprotein CD8, alpha chain, CD127: Interleukin-7 receptor, subunit alpha



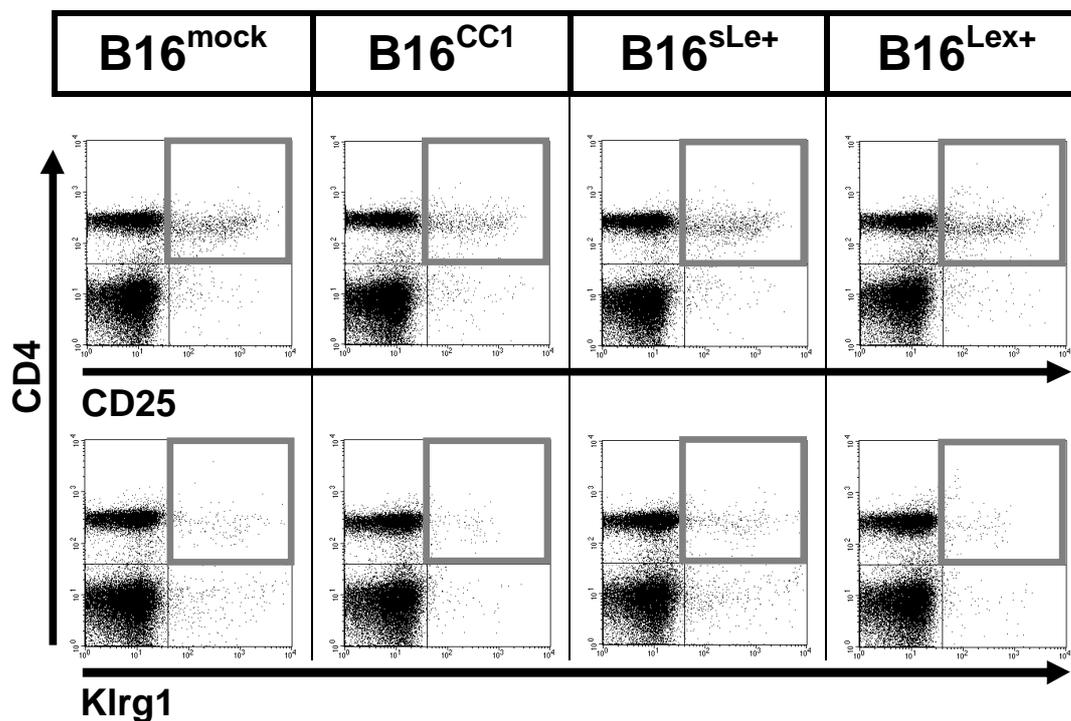
**Abbildung 63: Ratio CD4<sup>+</sup>/CD127<sup>low</sup> versus CD8<sup>+</sup>/CD127<sup>low</sup>**

CD4: T-cell surface glycoprotein CD4, CD8: T-cell surface glycoprotein CD8, alpha chain, CD127: Interleukin-7 receptor, subunit alpha  
6 Tieren/Kohorte/B16-Entität, Mittelwert+SEM

Nachdem gezeigt werden konnte, dass 70-80% aller T-Lymphozyten der Lymphknoten einen CD127<sup>low</sup>-Effektor-Phänotyp angenommen hatten, sollten aus den CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-Gesamtpopulationen differentielle Subpopulationen auf eine Ko-Expression von CD25 (*Interleukin-2 receptor, subunit alpha*) oder Klr1 (*killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1*) untersucht werden. Eine Expression von Markern wie FOXP3, CD25, CD62L oder CTLA-4, die in der Literatur lange zur Diskriminierung von T<sub>Regs</sub> eingesetzt wurden, wird zunehmend kontrovers diskutiert, da mittlerweile bekannt ist, dass alle diese Marker während einer Aktivierung oder Differenzierung, oder unter chronisch-inflammatorischen Bedingungen von CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten differentiell reguliert werden können<sup>123</sup>. Einem Gebrauch dieser Marker zur Diskriminierung von T<sub>Regs</sub> wird daher zunehmend die Suche nach Markern zur Diskriminierung von sog. *bona fide* T<sub>Regs</sub> als „echten“ regulatorischen CD4<sup>+</sup>T-Suppressor-Lymphozyten entgegengesetzt (lat. *bona fides*; *guter Glaube*).

Klr1 wurde ursprünglich als inhibitorischer Rezeptor auf NK-Zellen beschrieben, und kann als Liganden E-, N- und R-Cadherine binden. Klr1 wurde als differentiell regulierter Kandidat in B16<sup>sLex+</sup>-Tieren identifiziert (Tabelle 11). In Abb.64 ist die Expression von CD25 oder Klr1 auf CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten am Beispiel einer Lymphknotenanalyse gezeigt. In den Lymphknoten von B16<sup>CC1</sup>-Tieren waren CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>T-Lymphozyten signifikant erniedrigt, die größten CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>-

Populationen traten in B16<sup>mock</sup> und B16<sup>sLe+</sup>-Tieren auf. In den Melanomen waren CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in B16<sup>sLe+</sup>-Tieren signifikant erhöht (Abb.65, links). CD4<sup>+</sup>/Klrg1<sup>+</sup>-Populationen waren in den Lymphknoten von B16<sup>mock</sup> und B16<sup>sLe+</sup>-Tieren, und in den Melanomen von B16<sup>sLe+</sup>-Tieren signifikant erhöht (Abb.65, rechts). Zusammengefasst zeigte sich, dass vor allem in Lymphknoten und Melanomen von B16<sup>sLe+</sup>-Tieren eine auffällige Zunahme von CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>/Klrg1<sup>+</sup>-T-Lymphozyten gemessen werden konnte.

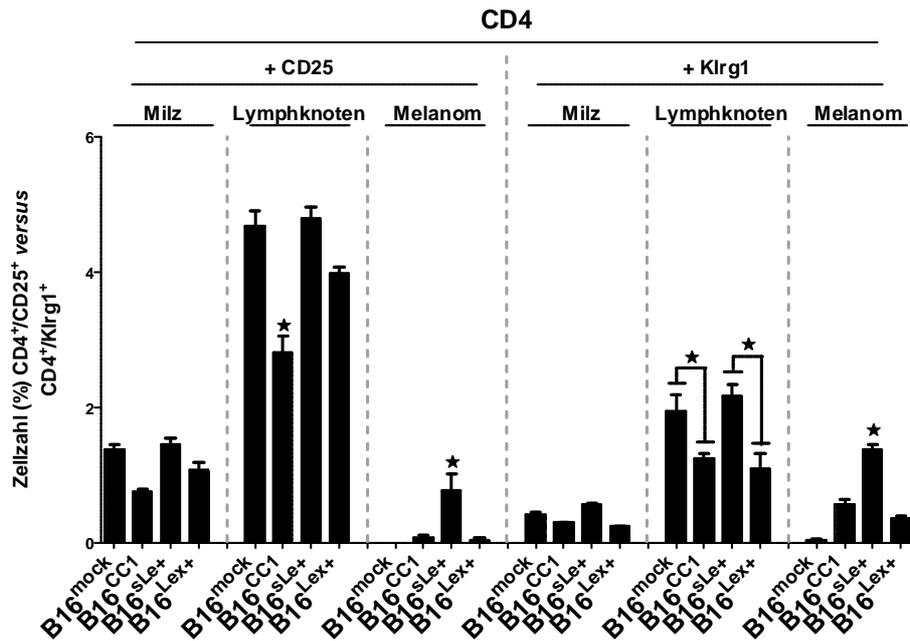


**Abbildung 64: Identifizierung von +CD25<sup>+</sup> versus +Klrg1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten**

Zeile 1: Identifizierung von CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>-T-Lymphozyten

Zeile 2: Identifizierung von CD4<sup>+</sup>/Klrg1<sup>+</sup>-T-Lymphozyten

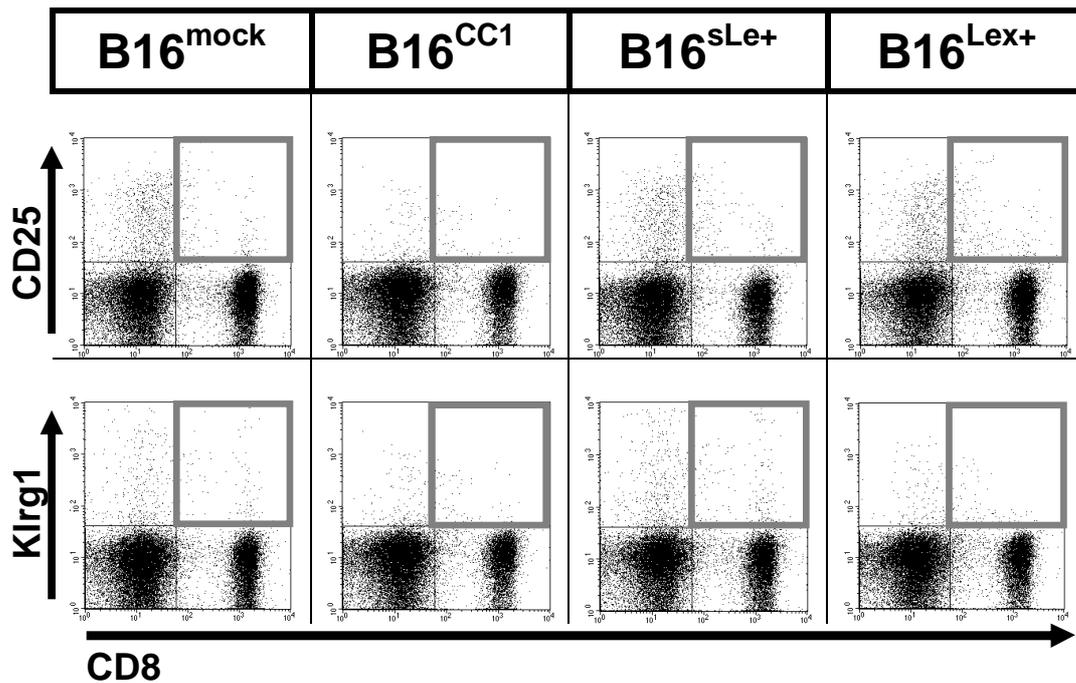
CD4: *T-cell surface glycoprotein CD4*, CD25: *Interleukin-2 receptor, subunit alpha*, Klrg1: *Killer cell lectin-like receptor, subfamily G member 1*



**Abbildung 65: Quantifizierung von +CD25<sup>+</sup> versus +Klrg1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten**

CD4: T-cell surface glycoprotein CD4, CD25: Interleukin-2 receptor, subunit alpha, Klrg1: Killer cell lectin-like receptor, subfamily G member 1: 6 Tieren/Kohorte/B16-Entität, Mittelwert+SEM

In Abb.66 ist zu sehen, dass eine Ko-Expression von CD25 oder Klrg1 auf CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten insgesamt deutlich weniger prominent ausgeprägt war als auf CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten (Abb.66, vgl. Abb.65). Quantitativ konnten nennenswerte Populationen ( $\leq 0,5\%$ ) nur in den Lymphknoten nachgewiesen werden, mit einer signifikanten Abnahme beider Populationen in B16<sup>CC1</sup>-Tieren (Abb.67). Die Populationsgrößen von CD8<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>/Klrg1<sup>+</sup> in Milz und Melanom bewegten sich in allen Tieren konstant unter 0,5%, so dass hier auf eine Signifikanz-Testung verzichtet wurde.

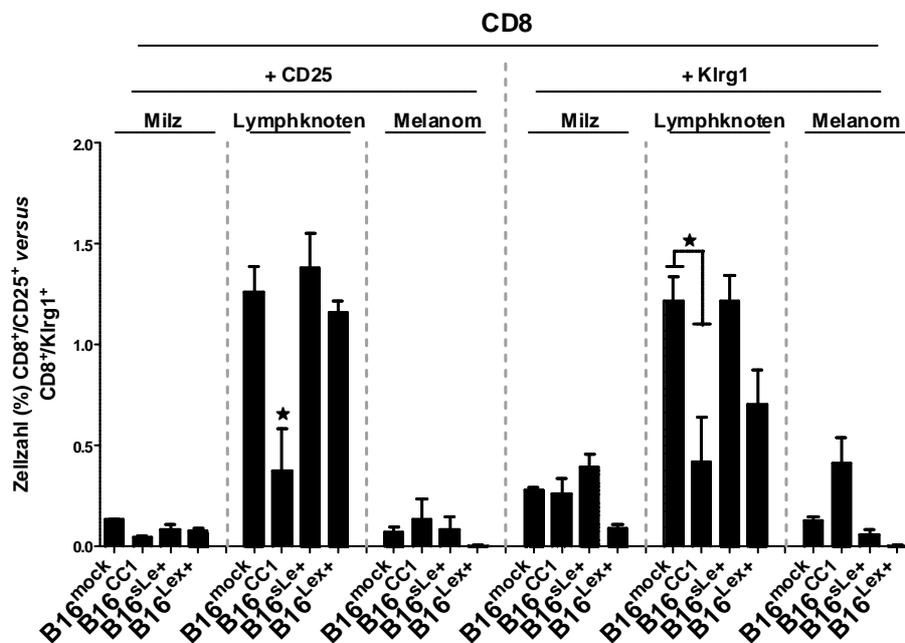


**Abbildung 66: Identifizierung von +CD25<sup>+</sup> versus +KlrG1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten**

Zeile 1: Identifizierung von CD8<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>T-Lymphozyten

Zeile 2: Identifizierung von CD8<sup>+</sup>/KlrG1<sup>+</sup>T-Lymphozyten

CD8: *T-cell surface glycoprotein CD8, alpha chain*, CD25: *Interleukin-2 receptor, subunit alpha*,  
KlrG1: *Killer cell lectin-like receptor, subfamily G member 1*

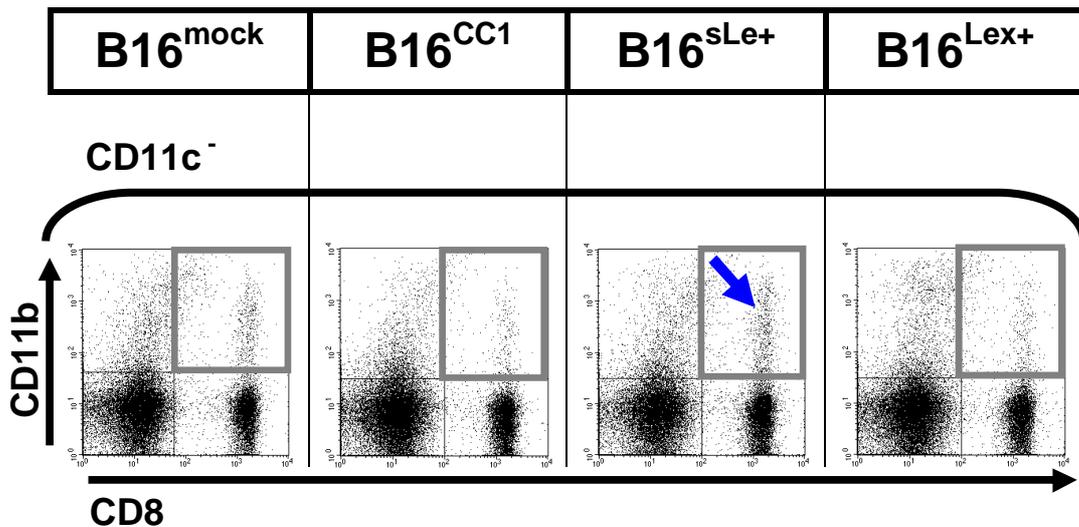


**Abbildung 67: Quantifizierung von +CD25<sup>+</sup> versus +KlrG1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten**

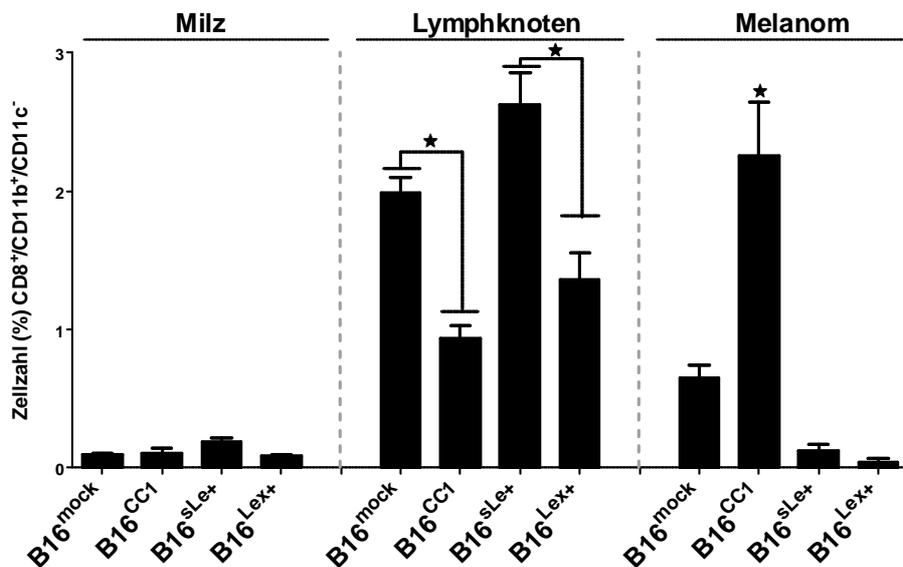
CD8: *T-cell surface glycoprotein CD8, alpha chain*, CD25: *Interleukin-2 receptor, subunit alpha*,  
KlrG1: *Killer cell lectin-like receptor, subfamily G member 1*

6 Tieren/Kohorte/B16-Entität, Mittelwert+SEM

Auffälliger war hingegen eine klar abgrenzbare CD8<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>-</sup>-Population, die in der Analyse CD11c<sup>+</sup> dendritischer Zellen über Ausschluss von CD11c auftrat (Abb.68, blauer Pfeil). In den Lymphknoten konnten die signifikant größten CD8<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>-</sup>-Populationen in B16<sup>mock</sup> und B16<sup>sLe+</sup>-Tieren gemessen werden. In B16<sup>CC1</sup>-Tieren konnte in den Melanomen eine CD8<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>-</sup>-Population nachgewiesen werden, deren Gesamtgröße ca. auf dem Niveau der Lymphknoten-Populationen in B16<sup>mock</sup> und B16<sup>sLe+</sup>-Tieren lag (Abb.69).



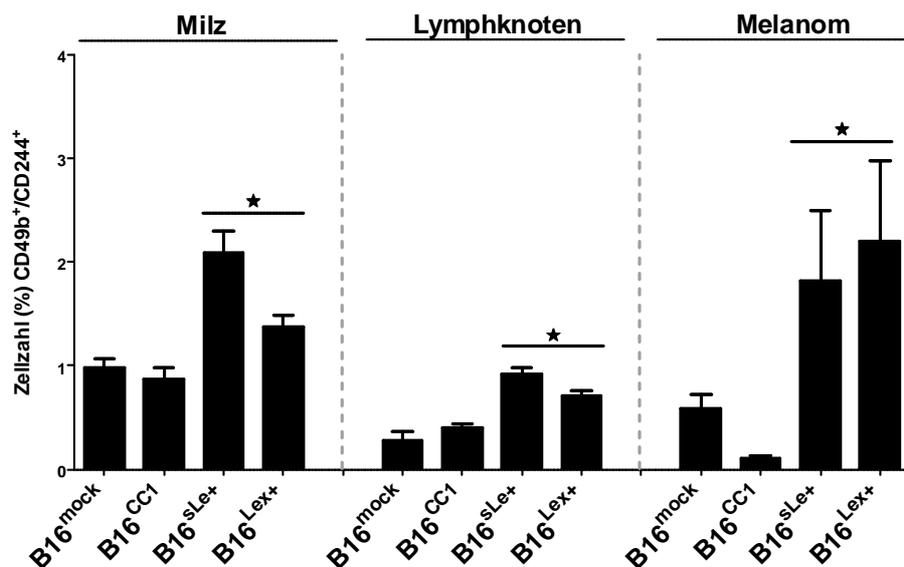
**Abbildung 68: Identifizierung von CD8<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>-</sup>T-Lymphozyten**  
 CD8: T-cell surface glycoprotein CD8, alpha chain, CD11b: Integrin<sub>αMβ2</sub>, CD11c: Integrin<sub>αXβ2</sub>



**Abbildung 69: Quantifizierung von CD8<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>-</sup>T-Lymphozyten**  
 CD8: T-cell surface glycoprotein CD8, alpha chain, CD11b: Integrin<sub>αMβ2</sub>, CD11c: Integrin<sub>αXβ2</sub>  
 6 Tieren/Kohorte/B16-Entität, Mittelwert+SEM

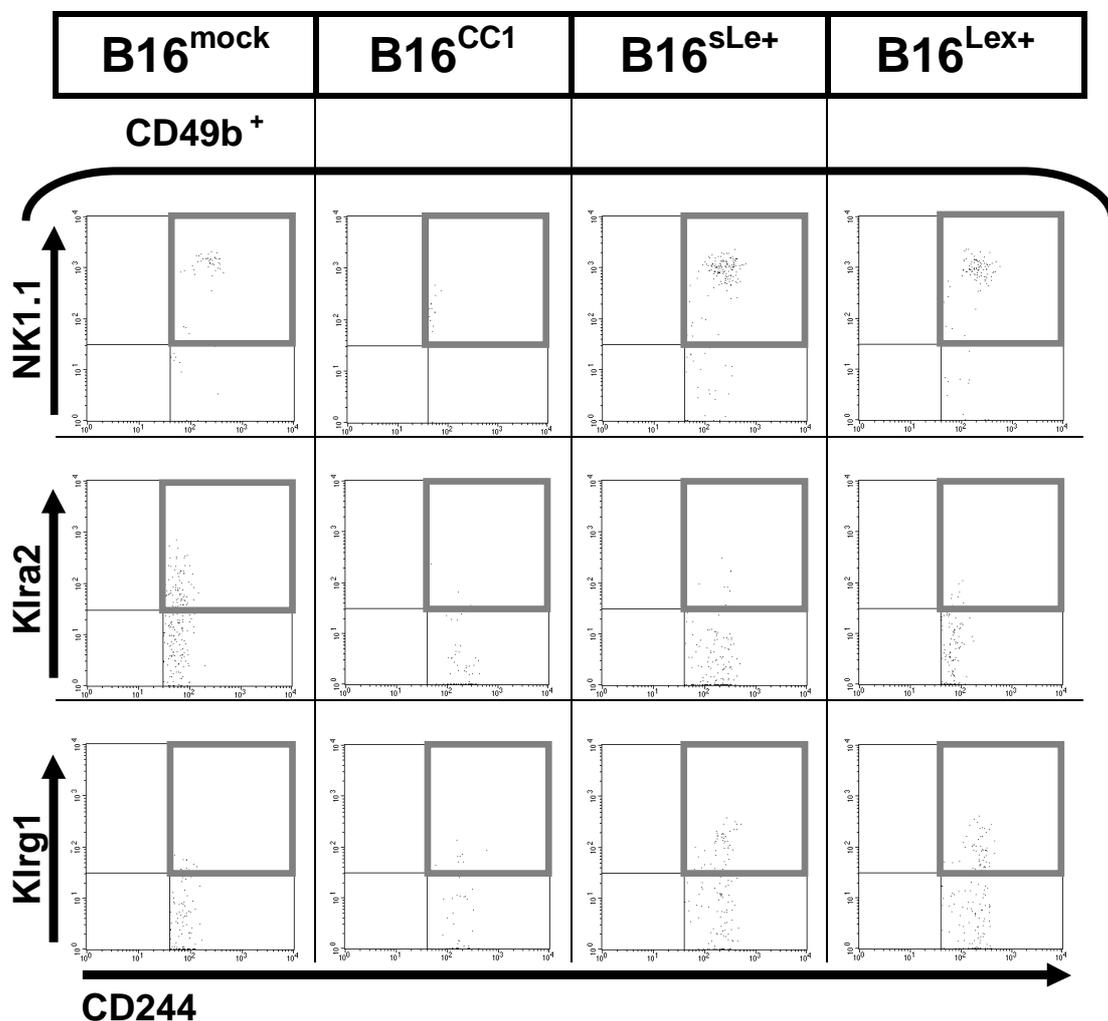
### 5.7.10 Quantifizierung differentieller NK-Zellpopulationen

Als NK-Zellen wurden Zellen klassifiziert, die positiv für eine Ko-Expression von CD49b und CD244 waren (vgl. Abb.21). CD49b (*integrin alpha-2/beta-1*) ist ein *single-pass* Typl-Transmembran-Rezeptor und als *pan*-NK-Zell-Marker für reife NK-Zellen beschrieben. CD244 (*natural killer cell receptor 2B4*) gehört auf NK-Zellen zu den aktivierenden Rezeptoren, und bindet als Ligand CD48. CD244 wurde als differentiell regulierter Kandidat in B16<sup>sLe+</sup>-Tieren identifiziert (Tabelle11). Es wurden zunächst CD49b<sup>+</sup>/CD244<sup>+</sup>NK-Zellen *in toto* quantifiziert (Abb.70). In B16<sup>sLe+</sup> und B16<sup>Lex+</sup>-Tieren konnte in Milz, Lymphknoten und Melanom jeweils eine signifikante Zunahme von CD49b<sup>+</sup>/CD244<sup>+</sup>NK-Zellen im Vergleich zu B16<sup>mock</sup> und B16<sup>CC1</sup>-Tieren gemessen werden. Der deutlichste Unterschied zeigte sich in den Melanomen (Abb.70). Auffällig war hier, dass in B16<sup>CC1</sup>-Tieren so gut wie gar keine CD49b<sup>+</sup>/CD244<sup>+</sup>-NK-Zellen nachgewiesen werden konnten. Eine Akkumulation von CD49b<sup>+</sup>/CD244<sup>+</sup>-NK-Zellen in Melanomen fand im Wesentlichen nur in B16<sup>sLe+</sup> und B16<sup>Lex+</sup>-Tieren statt. CD49b<sup>+</sup>/CD244<sup>+</sup>-NK-Zellen wurden anschließend auf eine Ko-Expression von NK1.1 (Klrb1b/c), Klrg1 oder Klra2 (*killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 2*) untersucht. Klrb1b, Klrg1 und Klra2 wurden als differentiell regulierte Kandidaten in B16<sup>sLe+</sup> oder B16<sup>Lex+</sup>-Tieren identifiziert (Tabelle 11).



**Abbildung 70: Quantifizierung von CD49b<sup>+</sup>/CD244<sup>+</sup>-NK-Zellen**  
 CD49b: *Integrin $\alpha$ 2 $\beta$ 1*, CD244: *Natural killer cell receptor 2B4*  
 6 Tiere/Kohorte/B16-Entität, Mittelwert+SEM

In Abb.71 ist die Ko-Expression von NK1.1, Klrg1 oder Klra2 am Beispiel einer Melanomanalyse gezeigt. Eine Ko-Expression von NK1.1 auf CD49b<sup>+</sup>/CD244<sup>+</sup>-NK-Zellen beschränkte sich hauptsächlich auf B16<sup>sLe+</sup> und B16<sup>Lex+</sup>-tragende Tiere, und wurde in den Melanomen auf vergleichsweise hohem Niveau exprimiert (Abb.71, Zeile 1). Eine Klra2-Expression konnte nur in B16<sup>mock</sup>-Tieren nachgewiesen werden, die Expression selbst fand nur auf niedrigem Niveau statt (Abb.71, Zeile 2). Klrg1 wurde in den Melanomen nur in B16<sup>sLe+</sup> und B16<sup>Lex+</sup>-Tieren exprimiert, die Expression fand wie bei Klra2 nur auf niedrigen Niveau statt (Abb.72, Zeile 3).



#### Abbildung 71: Identifizierung differenzieller NK-Zell-Populationen

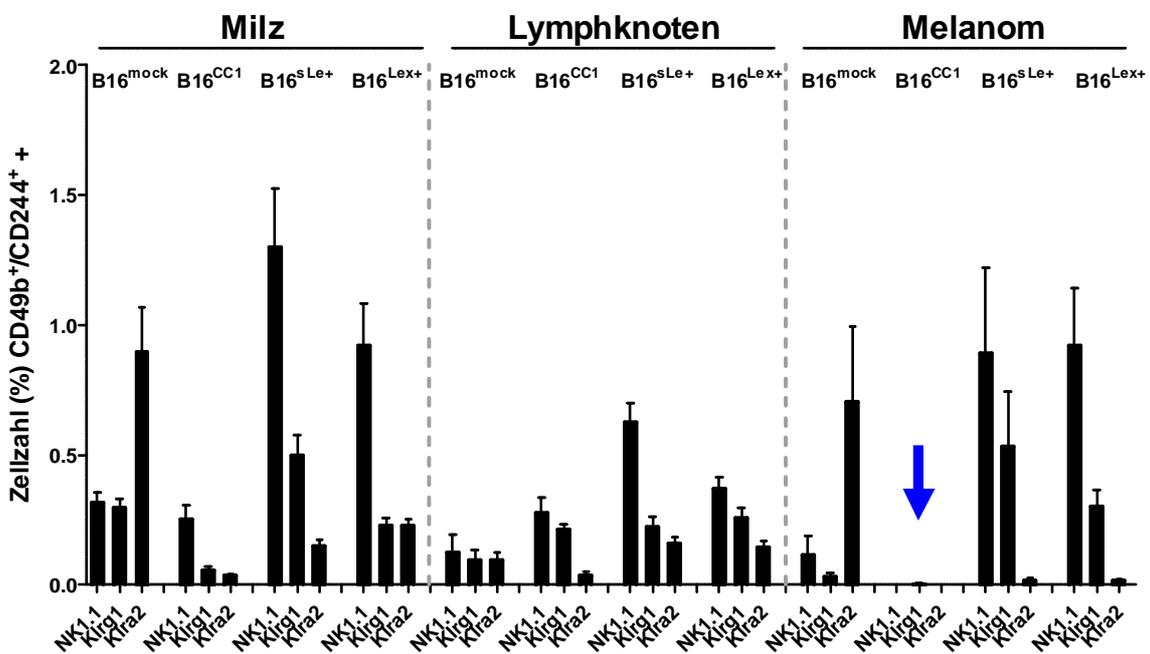
Zeile 1: Identifizierung von NK-Zellen mit einer Ko-Expression von NK1.1 (CD49b<sup>+</sup>/CD244<sup>+</sup>/NK1.1<sup>+</sup>).

Zeile 2: Identifizierung von NK-Zellen mit einer Ko-Expression von Klra2 (CD49b<sup>+</sup>/CD244<sup>+</sup>/Klra2<sup>+</sup>).

Zeile 3: Identifizierung von NK-Zellen mit einer Ko-Expression von Klrg1 (CD49b<sup>+</sup>/CD244<sup>+</sup>/Klrg1<sup>+</sup>)

CD49b: *Integrin $\alpha_2\beta_1$* , CD244: *Natural killer cell receptor 2B4*, NK1.1: *killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1B/C*, Klra2: *killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 2*, Klrg1: *Killer cell lectin-like receptor, subfamily G member 1*

In der Quantifizierung spiegeln sich die Befund aus Abb.70 wieder. In B16<sup>CC1</sup>-Tieren war in Melanomen gar keine NK1.1, Klra2 oder Klrg1 Expression nachweisbar (Abb.72, blauer Pfeil), eine messbare NK1.1 oder Klrg1 Ko-Expression in Melanomen beschränkte sich auf B16<sup>sLe+</sup> und B16<sup>Lex+</sup>-Tiere. Eine Klra2 Ko-Expression fand nur in B16<sup>mock</sup>-Tieren statt. Interessanterweise konnte für NK1.1, Klrg1 und Klra2 in den Milzen ein Profil gefunden werden, dass insgesamt (auf etwas höheren Niveau) annähernd 1:1 das NK-Zell-Profil an den Melanomen wiedergab (Abb.72, vgl. Milz versus Melanom).



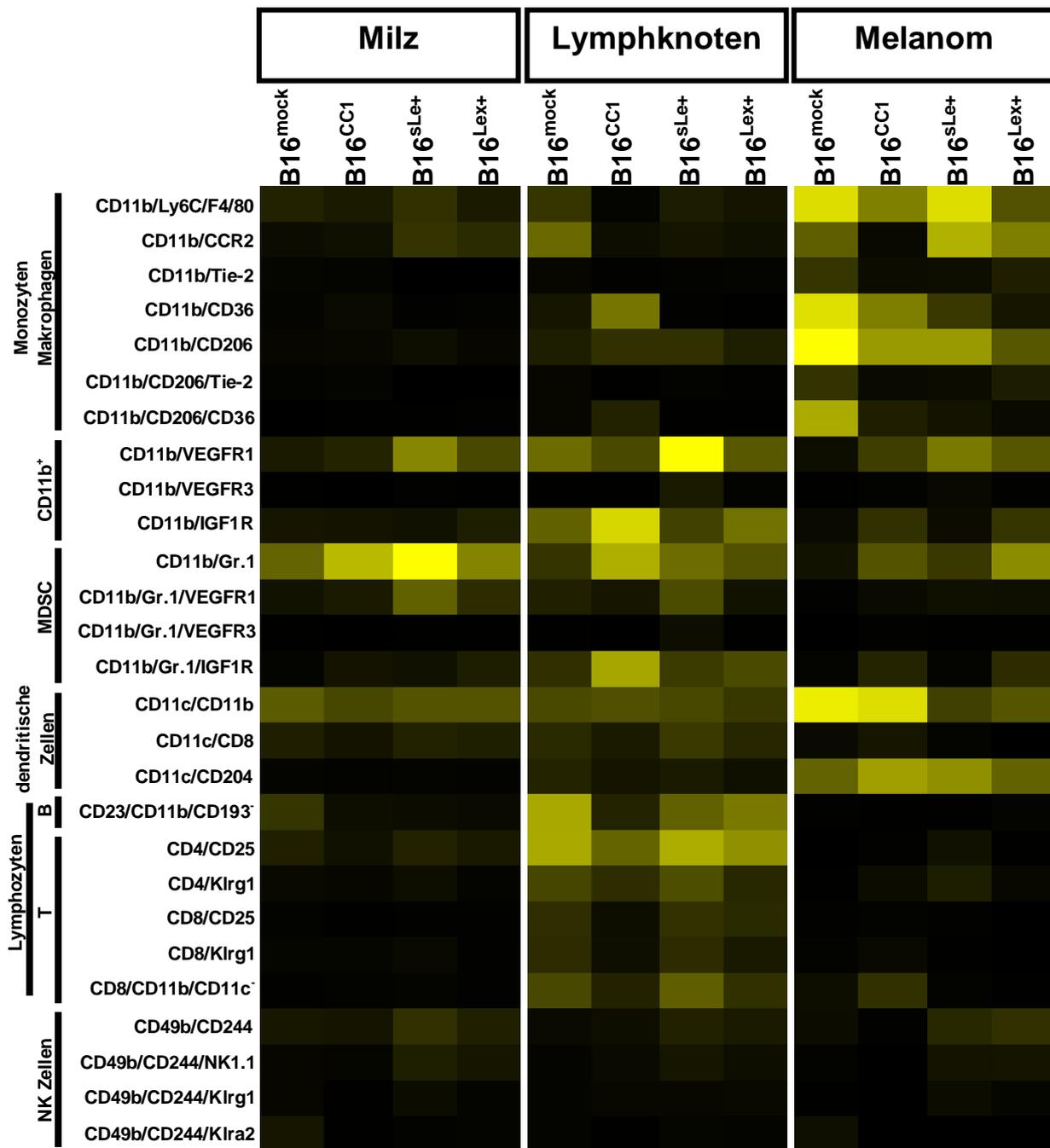
**Abbildung 72: Quantifizierung differentieller NK-Zell-Subpopulationen**

CD49b: Integrin $\alpha_2\beta_1$ , CD244: *Natural killer cell receptor 2B4*, NK1.1: *killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1B/C*, Klra2: *killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 2*, Klrg1: *Killer cell lectin-like receptor, subfamily G member 1*  
6 Tiere/Kohorte/B16-Entität, Mittelwert+SEM

## 6. Heatmap der untersuchten Leukozytenpopulationen

Für eine bessere Vergleichbarkeit aller untersuchten Leukozytenpopulationen wurden die %-Werte entsprechender Populationen als Heatmap zusammengefasst (Abb.73). Dazu wurden die Gewebe auf Null normalisiert und die %-Werte je Population als aufsteigende Helligkeitswerte der Farbe Gelb dargestellt (0= Schwarz; vgl. 4.8). Mit dieser Darstellungsweise wurde versucht abzubilden, ob sich für eine (oder mehrere) der B16-Entitäten ein Entität-spezifisches Leukozytenprofil ableiten ließ. In Abb.73 sind die einzelnen Leukozytenpopulationen entsprechend der Reihenfolge der Ergebnisse ab 5.7 von oben nach unten pro Gewebe aufgelistet. Besonders im Vergleich von B16<sup>CC1</sup> versus B16<sup>sLe+/Lex+</sup>-Tieren konnte eine differentielle Akkumulation von TAMs, dendritischen Zellen, B- und T-Lymphozyten und NK-Zellen beobachtet werden. Am deutlichsten war dieser Unterschied in den Lymphknoten ausgeprägt (Abb.73, mitte). Während in B16<sup>CC1</sup> offenbar eine bevorzugte Akkumulation myeloischer Leukozyten mit einem anti-inflammatorischen Phänotyp der angeborenen Immunabwehr stattfand, zeigten B16<sup>sLe+/Lex+</sup>-Tiere eine erhöhte Akkumulation von Leukozyten der adaptiven Immunabwehr. Ausnahme waren die NK-Zellen der angeborenen Abwehr, die redundant in den untersuchten Geweben im Wesentlichen nur in B16<sup>sLe+/Lex+</sup>-Tieren nachgewiesen werden konnten (Abb.73, unteren vier Zeilen).

Basierend auf diesen Befunden soll in der Diskussion versucht werden, einzelne untersuchte Leukozytenpopulationen näher zu bewerten, und in einen sinnvollen Zusammenhang zur Pathogenese einzelner B16-Melanome einzuordnen.



**Abbildung 73: Heatmap differentieller Leukozytenpopulationen in Milz, Lymphknoten und Melanom nach 10 Tagen B16 in vivo Wachstum**

CD11b: Integrin $\alpha$ M $\beta$ 2 Leukocyte adhesion receptor MO1, Ly6C: lymphocyte antigen 6 complex, F4/80: epidermal growth factor-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1, CCR2: C-C chemokine receptor type 2, CD206: Macrophage mannose receptor 1, CD36: fatty acid translocase, Tie-2: Angiopoietin-1 receptor, Gr.1: lymphocyte antigen 6 C/G, VEGFR1: vascular endothelial growth factor receptor 1, VEGFR3: vascular endothelial growth factor receptor 3, IGF1R: insulin-like growth factor 1 receptor, CD11c: Integrin $\alpha$ X $\beta$ 2 leukocyte adhesion receptor p150, CD204: scavenger receptor type A, CD23: low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor, CD193: chemokine (C-C motif) receptor 3 (CCR3), CD4: T-cell surface glycoprotein CD4, CD8: T-cell surface glycoprotein CD8, alpha chain, CD25: Interleukin-2 receptor, subunit alpha, CD127: Interleukin-7 receptor, subunit alpha, Klrg1: Killer cell lectin-like receptor, subfamily G member 1, CD49b: Integrin $\alpha$ 2 $\beta$ 1, CD244: Natural killer cell receptor 2B4, NK1.1: killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1B/C, Klra2: killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 2

## 7. Diskussion

### 7.1 Vergleich der *in vitro*/*in vivo* Expression von Ceacam1

Nach dem Einbringen eines Transgens in eine Zelle/Zelllinie mittels einer Transfektionsmethode wie der Lipotransfektion wird bei einem Einsatz vektorieller Expressionssysteme, die unter der Kontrolle starker Promotoren wie dem CMV Promotor stehen, üblicherweise eine erhöhte Syntheserate des entsprechenden Transgens nach Transfektion erwartet. *A priori* wurde folglich nach dem *in vitro* Transfektionsschema der B16-Zellen eine entsprechende Ceacam1-Signalzunahme in B16<sup>CC1</sup>, B16<sup>sLe+</sup> und B16<sup>L<sup>ex+</sup></sup>-Transfektomen erwartet. Tatsächlich konnte in B16<sup>mock</sup>, sowohl im WB als auch in der FACS, ein ca. gleichstarkes Ceacam1-Signal wie in den anderen B16-Transfektomen gemessen werden. (Abb.24/25). Berücksichtigt man, dass physiologisch gesunde Melanozyten in *Homo sapiens* und *Mus musculus* normalerweise CEACAM1<sup>-</sup> sind, so schien es sich im Fall der endogenen Ceacam1-Expression auf B16<sup>mock</sup> um eine generelle, ektopische Neoexpression von Ceacam1 auf B16-Zellen zu handeln.

2002 wurde eine positive Assoziation zwischen membrangebundenem CEACAM1 auf Melanomen und dem Metastasierungspotential aufgedeckt, dessen prognostische Zuverlässigkeit z.T. besser als der sog. Breslow Score<sup>6</sup> ist<sup>106 124</sup>. Obwohl CEACAM1 bei Kolon- und Prostatakarzinompatienten tumorsuppressive Eigenschaften zugeordnet werden, gilt für Melanompatienten, deren Melanome CEACAM1<sup>+</sup> sind, eine deutlich schlechtere Prognose, als bei Patienten mit CEACAM1<sup>-</sup>Melanomen<sup>125-127</sup>. Allerdings konnten mittlerweile mehrere Studien zeigen, dass eine CEACAM1-Expression auf Melanomen nicht konstitutiv stattfindet, sondern sowohl *in vitro* als auch *in vivo* einer dynamischen Regulation unterliegt. Eine aktuelle Hypothese postuliert für eine adaptive CEACAM1-Expression auf Melanomzellen einen *sense* Mechanismus als Teil einer tumoralen *immune escape* Strategie, der es Melanomen erlaubt, einen transient resistenten Phänotyp bei einem Angriff durch TILs anzunehmen (vgl. 1.4.1).

---

<sup>6</sup> : Breslow Score: vierstufiges, histopathologisches Klassifikationssystem, bei dem die absolute Dicke eines exzidierten Melanoms von der Hautoberfläche bis zur tiefsten Eindringstelle von ≤0,75mm bis ≥4mm gemessen wird. Bei Melanomen mit ≤0,75mm liegt die Fünfjahresüberlebensrate ≥ 90%. Der Breslow Score wird bei Melanompatienten häufig zur pathologischen Risikoabschätzung herangezogen.

So konnte gezeigt werden, dass:

-CEACAM1<sup>+</sup>Melanomzellen eine Killeraktivität von TILs in *in vitro* Zytotoxizitätsassays inhibieren, und eine *in vitro* Ko-Kultivierung mit TILs deutlich länger überleben als CEACAM1<sup>-</sup>Melanomzellen <sup>128</sup>.

-eine adaptive CEACAM1-Expression in allogenen Ko-Kultivierungsexperimenten mit TILs MHC-I-unabhängig ist, aber häufig von einer parallelen MHC-I-Heraufregulation begleitet wird. MHC-I wird zwar vom CD3/TCR-Komplex erkannt, ist aber ebenso ein Ligand für inhibitorische Rezeptoren der KIR-Familie<sup>7</sup>, die von einigen T-Lymphozytenpopulationen exprimiert werden. In Ko-Kultivierungsexperimenten mit inerten *mismatch* Haplotypen eingesetzter TILs konnte die parallele MHC-I-Heraufregulation nicht beobachtet werden <sup>129-130</sup>.

-eine Interaktion *in trans* von CEACAM1<sup>+</sup>Melanomzellen mit Opa-Proteinen<sup>8</sup>

(i) auf dendritischen Zellen zu einer inkompletten Ausreifung

(ii) auf CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten zu einer Suppression der Aktivierung und Proliferation

(iii) auf B-Lymphozyten zu einer verminderten Immunglobulinproduktion führt <sup>131-132</sup>.

-bei adaptiven Zelltransfertherapien (ACT, *adoptive cell transfer*) die homophile CEACAM1 Interaktion *in trans* zwischen Melanom und TILs die *in vivo* Effizienz von ACT-behandelten Melanompatienten vermindert <sup>133-134</sup>.

Als Ableitung aus diesen Faktoren soll eine Hypothese für die Ceacam1-Expressionen auf den verschiedenen B16-Transfektomen/Melanomen unter *in vitro* versus *in vivo* Bedingungen nach Abb.74 vorgeschlagen werden.

---

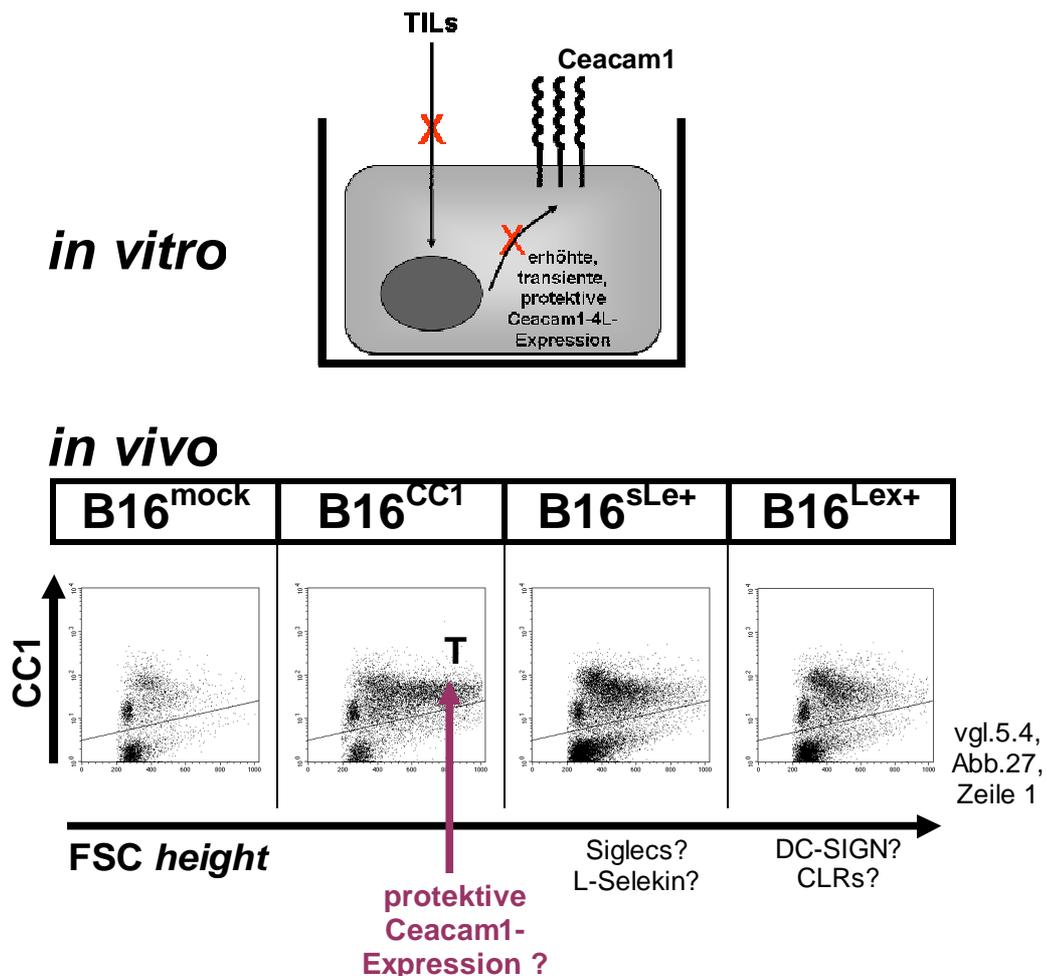
<sup>7</sup> KIRs: *killer immunoglobulin-like receptor family*

<sup>8</sup> Opa: *opacity-associated protein*

Abb.74:

**In vitro:** Eine Ko-Kultivierung der B16-Transfektome mit TILs fand nicht statt. Die Notwendigkeit einer erhöhten Ceacam1-Expression zum *immune escape* bestand für die Zellen *in vitro* somit nicht. Geht man davon aus, dass es sich bei den gemessenen Ceacam1-Shifts in den *in vitro* Histogrammen in Abb.25 nicht um ein *in vitro* Artefakt gehandelt hat, so könnten die B16<sup>CC1</sup>, B16<sup>sLe+</sup> und B16<sup>Lex+</sup>-Transfektome möglicherweise aktiv eine Ceacam1-Expression *in vitro* auf ein konstitutives, basales Niveau herabgeregelt haben.

**In vivo:** Unter dem Einfluss von TAMs/TILs exprimierten besonders B16-Melanome mit einer *in vitro* Ko-Transfektion mit pcDNA3.1(+)<sup>Neo</sup>-mCC1-4L adaptiv Ceacam1 (B16<sup>CC1</sup>, B16<sup>sLe+</sup>, B<sup>Lex+</sup>). Eine initiale *nicht*-Glykosylierung (B16<sup>CC1</sup>) führte dabei offenbar zu einer erhöhten, adaptiven Ceacam1-Expression, einer effektiven M2-Polarisation von Leukozyten, sowie letztlich einem Selektionsvorteil im Größenwachstum (Abb.32). Eine initiale Glykosylierung mit sLe<sup>x/a</sup> (B16<sup>sLe+</sup>) oder Le<sup>x</sup> (B16<sup>Lex+</sup>) wirkte für TAMs/TILs immunogen, d.h. eine Erkennung von B16-Zellen durch Leukozyten-Rezeptoren wie C-Typ-Lektinen, Siglecs, L-Selektin (B16<sup>sLe+</sup>) oder CLRs wie DC-SIGN (B16<sup>Lex+</sup>) wurde erleichtert, was möglicherweise die erhöhte Akkumulation von adaptiven Leukozytenpopulationen + NK-Zellen in B16<sup>sLe+/Lex+</sup>-Tieren erklären könnte.



**Abbildung 74: Hypothese der *in vitro/in vivo* Expression von Ceacam1-4L**

CC1: murines Ceacam1, CLRs: *C-type lectin receptors*, DC-SIGN: *dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin*, SHP1: *src homology domain 2-containing tyrosine phosphatase-1*, Siglecs: *sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins*, TILs: *Tumor infiltrating lymphocytes*

## 7.2 Vergleich der Vaskularisation und untersuchter Zellpopulationen mit potentiell pro-angiogenen Funktionen

Konzeptionell sollten die inguinalen Lymphknoten bei fortschreitendem B16 *in vivo* Wachstum die ersten drainierenden Lymphknoten des Tumors sein. Mit Einsetzen einer hämatogenen und/oder lymphatischen Metastasierung der B16-Melanome wurden die inguinalen Lymphknoten der Tiere daher als erste potentielle Rezipientengewebe vermutet. Umgekehrt bilden Lymphknoten ein natürliches Reservoir für diverse Leukozytenpopulationen, die im Fall eines inflammatorischen Ereignisses aus den Lymphknoten zum Inflammationsherd auswandern. Mit der Quantifizierung von Zellpopulationen, die pro-angiogene Wachstumsfaktorrezeptoren

exprimierten (Tie-2, VEGFR1, VEGFR3, LYVE-1) sollte untersucht werden, ob die festgestellte Vaskularisation mit dem B16 *in vivo* Glykosylierungsprofil und der Abundanz dieser Populationen in einen Zusammenhang gebracht werden kann. In Tabelle 12 sind die untersuchten Populationen mit ihrer relativen Abundanz (+/++/+++) an den Melanomen kurz zusammengefasst (Abb.34, 45, 51).

<b>Melanom</b>				
	<b>B16<sup>mock</sup></b>	<b>B16<sup>CC1</sup></b>	<b>B16<sup>sLe+</sup></b>	<b>B16<sup>Lex+</sup></b>
<b>CD11b<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>/Tie-2<sup>+</sup></b>	<b>+++</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>++</b>
<b>CD11b<sup>+</sup>/VEGFR1<sup>+</sup></b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+++</b>	<b>++</b>
<b>CD11b<sup>+</sup>/LYVE-1<sup>+</sup></b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>+++</b>

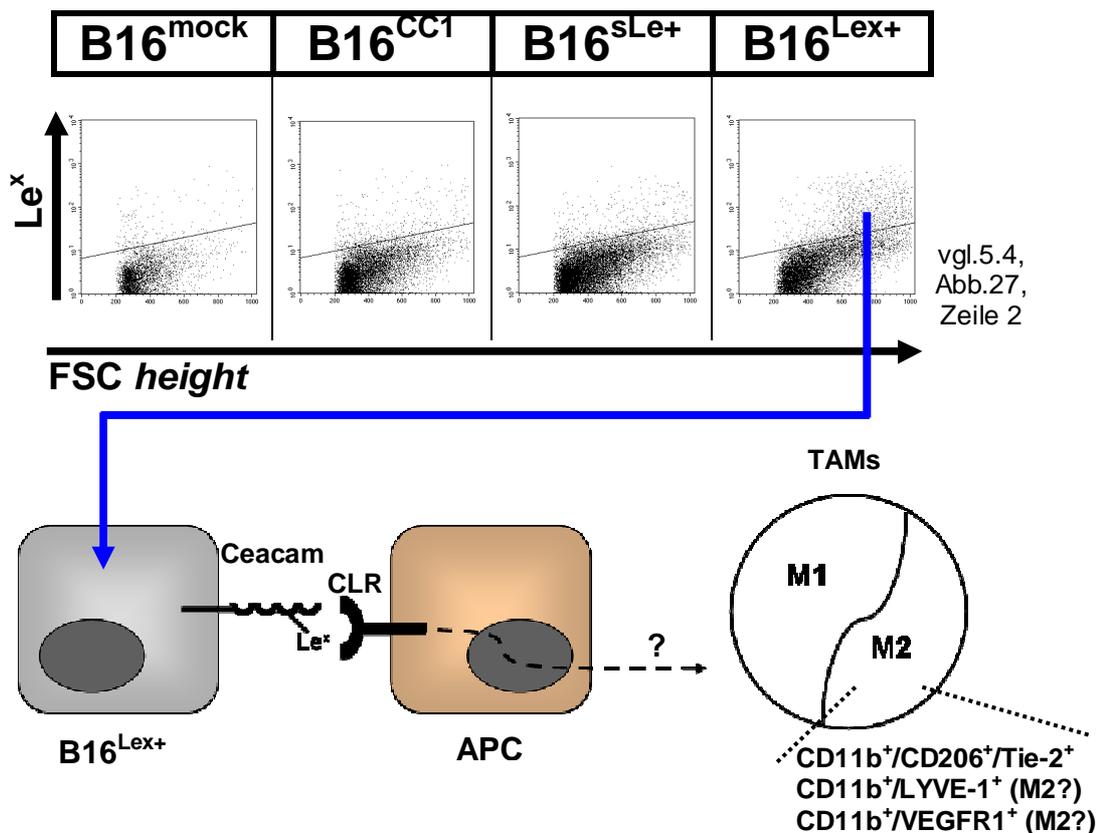
**Tabelle 12: Zellpopulationen mit Funktionen in angiogenen Prozessen**

Aufgelistet ist ein relativer Vergleich der Abundanz (+/++/+++) an den Melanomen.

CD11b: Integrin $\alpha$ M $\beta$ 2, CD206: *Macrophage mannose receptor 1*, Tie-2: *Angiopoietin-1 receptor*, VEGFR1: *vascular endothelial growth factor receptor 1*, LYVE-1: *lymphatic vessel endothelial hyalurononic acid receptor 1*

Von TAMs ist seit längerem bekannt, dass sie eine tumorale Neoangiogenese durch die Sekretion pro-angiogener Faktoren wie VEGF-A, VEGF-C oder EGF positiv beeinflussen können<sup>135-136</sup>. Bei TEMs konnte durch Transkriptomanalysen gezeigt werden, dass TEMs ein überlappendes Expressionsprofil zu M2-Makrophagen zeigen, und in metastasierenden Tumormodellen in der Regel einem M2-Phänotyp zugeordnet werden können<sup>137-138</sup>. Dieser Befund konnte bei nachgewiesenen TEMs im hier eingesetzten B16-Modell bestätigt werden (Abb.45). In einem Adipositasmodell konnte für Makrophagen, die LYVE-1 exprimierten, eine pro-angiogene Funktion nachgewiesen werden, zusätzlich zeigten diese Makrophagen ein M2-typisches Expressionsprofil<sup>139</sup>. In einem Mammakarzinommodell diskriminierte Movahedi *et.al.* TAMs in MHCII<sup>high</sup> und MHCII<sup>low</sup>-Subpopulationen, und konnte zeigen, dass MHCII<sup>low</sup>-TAMs bevorzugt M2-typische Marker exprimierten, und dass MHCII<sup>low</sup>-TAMs, die sich in hypoxischen Bereichen des Tumors aufhielten, eine Heraufregulation von LYVE-1, und starke, pro-angiogene Eigenschaften zeigten<sup>55</sup>. VEGFR1 wird häufig als *decoy* Rezeptor für VEGFR2 beschrieben, um durch das Abfangen freien VEGFs eine VEGFR2-vermittelte Signaltransduktion zu regulieren. Jedoch konnte für eine VEGFR1-vermittelten Signaltransduktion gezeigt werden, dass sie in endothelialen Gefäßzellen eine pathologische Angiogenese induzieren

kann <sup>140-141</sup>. Die stärkste Vaskularisation mit Meca32<sup>+</sup>-Blutgefäßen fand in B16<sup>Lex+</sup>-Melanomen statt (Abb.33), die auch übergreifend die höchste Akkumulation pro-angiogen wirkender Zellpopulationen aufwiesen (Tabelle 12). Ein weiteres Merkmal von B16<sup>Lex+</sup>-Melanomen war der höchste nachgewiesene Anteil Le<sup>x</sup>-positiver Zellen (Abb.27.) Fügt man hinzu, dass Ceacam1<sup>+</sup>-Zellen, die zusätzlich Le<sup>x+</sup> waren, nur eine geringe bis gar keine Ko-Expression von sLe<sup>x</sup> oder sLe<sup>a</sup> zeigten (Abb.29), und dass eine Le<sup>x</sup>-Interaktion mit CLR (C-type lectin receptors) wie DC-SIGN auf APCs zu einer bevorzugten M2/T<sub>H</sub>2-Antwort dieser APCs führt (vgl. 1.3.1) soll als Zusammenfassung dieser Befunde eine Hypothese nach Abb.75 vorgeschlagen werden. Grundannahme ist, dass eine Le<sup>x</sup>↔CLR-Interaktion zwischen Ceacam1<sup>+</sup>/Le<sup>x+</sup>B16-Zellen und CLR<sup>+</sup>APCs in diesen APCs möglicherweise eine Antwort auslöste, die letztlich zu einer erhöhten Akkumulation pro-angiogenen differenzierter M2-TAMs innerhalb der M2-TAM-Population an B16<sup>Lex+</sup>-Melanomen führte (Abb.75).



**Abbildung 75: Hypothese zum Zusammenhang der Meca32<sup>+</sup>-Blutgefäßfläche, Le<sup>x</sup>-positiver Zellen und der Akkumulation pro-angiogener TAMs**

APC: *antigen presenting cell*, CLR: *C-type lectin receptor*, TAM: *tumor associated macrophage*; Le<sup>x</sup>: LewisX; CD11b: Integrin<sub>α</sub>Mβ<sub>2</sub>, CD206: *Macrophage mannose receptor 1*, Tie-2: *Angiopoietin-1 receptor*, VEGFR1: *vascular endothelial growth factor receptor 1*, LYVE-1: *lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1*

Bei B16<sup>CC1</sup> und B16<sup>sLe<sup>a+</sup></sup>-Tieren waren vor allem die Expression von VEGFR1 oder IGF1R im Vergleich der untersuchten Gewebe untereinander auffällig. Residenten MDSCs konnte ein CD11b<sup>+</sup>/Gr.1<sup>+</sup>/VEGFR1<sup>+</sup>-Phänotyp zwar nicht zugeordnet werden, bei der Quantifizierung von CD11b<sup>+</sup>/VEGFR1<sup>+</sup> Zellen zeigten B16<sup>sLe<sup>a+</sup></sup>-Tiere aber in Milz, Lymphknoten und Melanom konstant die signifikant größten CD11b<sup>+</sup>/VEGFR1<sup>+</sup> Populationen (Abb.51). Es gibt Hinweise darauf, dass VEGFR1<sup>+</sup> hämatopoetische Vorläuferzellen in distalen Organen eine sog. prä-metastatische Nische<sup>9</sup> bilden, und dass eine VEGF/VEGFR1-vermittelte Signaltransduktion auf aktivierten Endothelzellen in diesen Nischen zu einer erhöhten MMP9-Sekretion<sup>10</sup> führt<sup>142-143</sup>. Für sLe<sup>x/a+</sup>-Tumoren konnte mehrfach gezeigt werden, dass eine Hypersialylierung u.a. mit einem verstärkten Metastasierungspotential korreliert. Als zugrundeliegender Mechanismus wird dabei eine Mimikry disseminierender Tumorzellen nach dem Selektin-vermittelten *leucocyte rolling*-Konzept angenommen. Selektine und ihre Liganden bilden ein Zell-Zell-Adhäsionssystem, das essentiell für das Adhären (tethering), die Wanderung (rolling), sowie ein Integrin-vermitteltes Abstoppen von blutzirkulierenden Leukozyten entlang von Gefäßwänden ist (vgl. 1.2). Sialyliertes Le<sup>x</sup> kann sowohl von P-, E-, als auch L-Selektin gebunden werden, die Bindungsaffinität hängt dabei von verschiedenen, weiteren Modifikationen ab. So bindet sLe<sup>x</sup> z.B. erst nach einer zusätzlichen Sulfatierung am C6-Kohlenstoff des N-Acetylglukosamins mit hoher Affinität an L-Selektin. Bereits 1991 konnten Berg & Takada zeigen, dass sLe<sup>x/a+</sup>-Tumorzellen an E-Selektin auf aktivierten Endothelien binden können, und diesen Mechanismus für eine hämatogene Metastasierung ausnutzen<sup>144-145</sup>.

---

<sup>9</sup> Prä-metastatische Nische: Tumoren zeigen häufig eine Präferenz zur Metastasierung spezifischer Organe. Gewebssareale, in denen metastatische Tumorzellen proliferieren können, werden als metastatische Nische bezeichnet. Daneben gibt es das Konzept der prä-metastatischen Nische, welche durch die Sekretion humoraler Faktoren durch den Primärtumor aktiv determiniert wird, bevor sie durch disseminierende Tumorzellen besiedelt wird (sog. *seed and soil* Konzept). Kaplan et. al. konnte zeigen, dass GFP (*green fluorescent protein*) markierte VEGFR1<sup>+</sup>-Knochenmarkszellen nach einer intradermalen Tumorzelltransplantation u. a. in die Lunge einwanderten, und dass mit Beginn einer Metastasierung bevorzugt Cluster von VEGFR1<sup>+</sup>-Knochenmarkszellen in den Lungen von disseminierenden Tumorzellen besiedelt wurden<sup>139</sup>.

<sup>10</sup> MMP: *matrix metalloproteinase*

Fasst man diese Befunde zusammen, besteht die Möglichkeit, dass:

- eine initiale Hypersialylierung mit sLe<sup>x/a</sup> auf B16-Zellen (Abb.25) in den Lymphknoten und Milzen von B16<sup>sLe+</sup>-Tieren zur Bildung einer potentiellen, CD11b<sup>+</sup>/VEGFR1<sup>+</sup> prä-metastatischen Nische führte
- in Folge eine erhöhte Wahrscheinlichkeit einer hämatogenen Metastasierung in B16<sup>sLe+</sup>-Tieren über B16sLe<sup>x/a</sup> / E-Selektin naheliegt.

In B16<sup>CC1</sup>-Tieren war in den Melanomen die LYVE-1<sup>+</sup>-Lymphgefäßfläche signifikant erhöht (Abb.33), gleichzeitig konnte in B16<sup>CC1</sup>-Tieren aber keine auffällige Akkumulation potentiell pro-lymphangiogen wirkender Zellpopulationen gefunden werden. CD11b<sup>+</sup>/LYVE-1<sup>+</sup>-Leukozyten waren in B16<sup>CC1</sup>-Melanomen signifikant weniger häufig vertreten als in B16<sup>sLe+</sup> oder B16<sup>Lex+</sup>-Melanomen (Abb.34), VEGFR3 konnte generell nicht nachgewiesen werden (Abb.44). Ein wesentlicher Unterschied in B16<sup>CC1</sup>-Tieren war hingegen die Akkumulation einer IGF1R<sup>+</sup>-G-MDSC-Population, die in den Melanomen, und besonders in den Lymphknoten signifikant erhöht war (Abb.53). Die physiologische Funktion von IGF1R hat dichotomen Charakter. Auf Leukozyten, Fibroblasten und Tumorzellen ist ein IGF/IGF1R-Signal als starkes Proliferations- und Überlebenssignal bekannt. Im Kontext einer Lymphangiogenese konnte hingegen Bjorndahl *et. al.* zeigen, dass ein IGF/IGF1R-Signal auf LECs<sup>11</sup> eine Neolymphangiogenese induzieren kann. Eine IGF/IGF1R-vermittelte Induktion zur Lymphangiogenese konnte dabei sowohl *in vitro* als auch *in vivo* unabhängig zur VEGFR3-Achse ausgelöst werden <sup>146</sup>.

Rezente Forschung zu MDSCs konzentriert sich hauptsächlich auf deren immunsuppressive Eigenschaften gegen andere Leukozytenpopulationen. Jedoch konnte in einigen Studien MDSCs eine direkte Funktion bei einer tumoralen Neoangiogenese nachgewiesen werden. Yang *et. al.* konnte in einem kolorektalen Karzinommodell (Dickdarmkrebs) zeigen, dass Tumoren, die einen erhöhten Anteil CD11b<sup>+</sup>/Gr.1<sup>+</sup>-Zellen inokulierten, parallel eine erhöhte Gefäßreifung und -dichte aufwiesen, und weniger nekrotisch waren. Bemerkenswert hierbei war die Beobachtung, dass tumorale CD11b<sup>+</sup>/Gr.1<sup>+</sup>-Zellen direkt in tumorales Endothel inkorporiert wurden, und nach Inkorporation typische Eigenschaften vaskulärer

---

<sup>11</sup> LECs: *lymphatic endothelial cells*

Endothelzellen annehmen<sup>61</sup>. Die Differenzierung von Vorläuferzellen zu vaskulären Endothelzellen zum Aufbau einer Vaskulatur ist unter entwicklungsphysiologischer Hinsicht bei adulten Individuen als Prozess der sog. *postnatalen Vaskulogenese* bekannt. Bei diesem Prozess wandern Knochenmarks-abgeleitete EPCs<sup>12</sup> in bereits existierende Gefäßendothelien ein, und Reifen dort zu Gefäßendothelzellen aus. Für Tumoren konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass sie diesen Prozess für ihre eigene Vaskularisation ausnutzen können<sup>147</sup>.

Als mögliche Erklärung zum Zusammenhang der tumoralen Lymphvaskulatur und der Akkumulation von IGF1R<sup>+</sup>-G-MDSCs in B16<sup>CC1</sup>-Tieren soll eine Hypothese nach Abb.76 vorgeschlagen werden. Abb.76:

A)

(1) Ein B16<sup>CC1</sup>-Melanom-abgeleitetes, endokrines Signal (?) führt in den inguinalen Lymphknoten zu einer differentiellen Hochregulation von IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*).

(2) IGF-1 wirkt auf G-MDSCs des Lymphknotens über IGF1R als Differenzierungs- und Proliferationssignal

(3) IGF1R<sup>+</sup>-G-MDSCs wandern vom Lymphknoten in den Tumor ein.

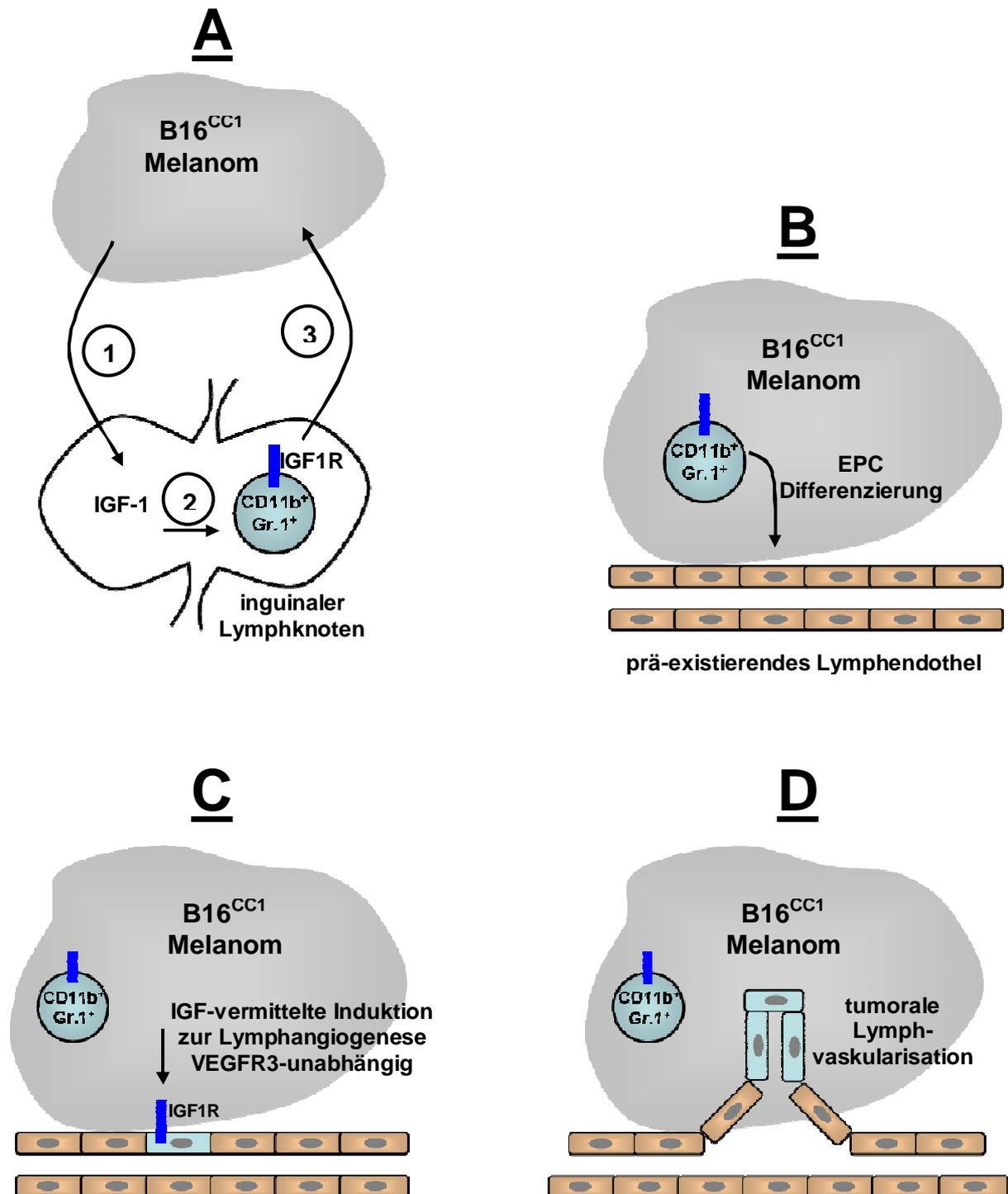
B) B16<sup>CC1</sup>-Melanome nutzen Mechanismen der Vaskulogenese (*pathologische Vaskulogenese*) zur Re-Differenzierung von IGF1R<sup>+</sup>-G-MDSCs zu IGF1R<sup>+</sup>-EPCs, die sich in prä-existierendes Lymphendothel einbetten und dort zu IGF1R<sup>+</sup>-LECs ausreifen.

C) IGF1R<sup>+</sup>-LECS werden durch ein IGF/IGF1R-Signal, VEGFR3-unabhängig, zur Induktion einer Lymphangiogenese angeregt.

D) B16<sup>CC1</sup>-Melanome generierten dadurch in der Summe eine erhöhte, IGF1R-vermittelte Lymphvaskulatur unabhängig zur VEGFR3-Achse.

---

<sup>12</sup> EPCs: *endothelial progenitor cells*



**Abbildung 76: Hypothese zum Zusammenhang zwischen der tumoralen Lymphvaskularisation und der Akkumulation von IGF1R<sup>+</sup>-G-MDSCs in B16<sup>CC1</sup>-Tieren**

- A) 1: Ein Melanom-abgeleitetes, endokrines Signal (?) induziert IGF-1 in den Lymphknoten  
 2: IGF-1 wirkt auf MDSCs über IGF1R als Proliferationssignal  
 3: IGF1R<sup>+</sup>-G-MDSCs wandern vom Lymphknoten in den Tumor aus  
 B) *Pathologische Vaskulogenese*; Re-Differenzierung von IGF1R<sup>+</sup>-G-MDSCs zu IGF1R<sup>+</sup>-EPCs  
 C) IGF1R<sup>+</sup>-LECs werden durch IGF/IGF1R-Signale zur Lymphangiogenese angeregt  
 D) B16<sup>CC1</sup>-Melanome generieren eigene Lymphvaskulatur

EPC: *endothelial progenitor cell*, LEC: *lymphatic endothelial cell*, MDSC: *myeloid derived suppressor cell*, IGF: *insulin-like growth factor*, IGF1R: *insulin-like growth factor-1 receptor*

### 7.3 Möglicher Einfluss untersuchter Leukozytenpopulationen der angeborenen und adaptiven Immunabwehr auf das B16-Melanomverhalten

In der Serumanalytik konnte in den Seren von B16<sup>CC1</sup>-Tieren ein präferentielles M2-Serumzytokinprofil abgebildet werden (Abb.41). Der Nachteil einer solchen Analyse ist, dass man *a priori* zunächst nicht zwischen *actio* und *reactio* unterscheiden kann, d.h. ist das vorhandene Zytokinprofil ursächlich vom Tumor verursacht, und polarisiert in Folge Leukozyten in die Phänotypen XY, oder polarisieren die Leukozyten durch Kontakt mit Tumorantigenen in die Phänotypen XY und produzieren ihrerseits die Zytokine, die im Serum gemessen werden können. Von Melanomen weiß man, dass sie, in Abhängigkeit ihrer äußeren Bedingungen, selbst eine große Spannbreite sowohl pro- als auch anti-inflammatorischer Zytokine produzieren können, so z.B. IL-1, -6, -10 oder TGF- $\beta$  <sup>148-150</sup>. IL-10 wirkt auf Leukozyten als Inhibitor einer Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und polarisiert Monozyten in einen M2-Phänotyp. Allerdings kann IL-10 auf Tumorzellen auch autokrin als Proliferationsstimulus wirken, und IL-10-positive Melanome sind bei Patienten mit fortgeschrittenem Melanom mit einer signifikant kürzeren Lebenserwartung korreliert <sup>151</sup>. Die gemessenen IL-10-Spiegel waren aber konstant niedrig, signifikante Unterschiede zwischen den B16-Entitäten konnten nicht festgestellt werden. Die auffälligsten, signifikanten Schwankungen anti-inflammatorischer Zytokine waren bei IL-13 und PGE<sub>2</sub> festzustellen (Abb.40). Mögliche IL-13-Produzenten können Mastzellen, basophile Granulozyten, T<sub>H2</sub> und NKT-Zellen sein. PGE<sub>2</sub> kann von Monozyten produziert werden, die vorher über eine IgG/Fc $\gamma$ R-vermittelte Interaktion mit B-Lymphozyten in einen M2-Phänotyp polarisiert wurden. Eine besondere IL-13 oder PGE<sub>2</sub>-Produktion von Melanomen ist nicht bekannt. Daraus lag nahe, dass die erhöhten IL-13 und PGE<sub>2</sub>-Spiegel in den B16<sup>CC1</sup>-Seren offenbar eine Folge einer bereits stattgefundenen M2/T<sub>H2</sub>-Polarisation waren, und von entsprechenden Leukozytenpopulationen produziert wurden <sup>152</sup>.

Um die Abundanz von TAMs, und deren Ratio einer phänotypischen M1 *versus* M2-Polarisation zu bestimmen, wurden die Populationsgrößen tumorinfiltrierender CD11b<sup>+</sup>-Zellen auf die Ko-Expression eines pro-inflammatorischen M1 (CCR2), oder anti-inflammatorischen M2-Marker (CD206) untersucht. Tumoren beinhalten oft eine große Fraktion CD11b<sup>+</sup>-Zellen, wobei tumor-infiltrierende CD11b<sup>+</sup>-Zellen in der Regel von Monozyten aus der Blutzirkulation abstammen. Auf Leukozyten spielt CD11b in

seiner Funktion als Adhäsionsrezeptor bei der transendothelialen Migration von Leukozyten eine Rolle. Bei Adhäsions- und Migrationsprozessen heterodimerisiert CD11b mit CD18<sup>13</sup>, und unterstützt durch Bindung an seine endothelialen Liganden wie ICAM1<sup>14</sup> oder JAM3<sup>15</sup> die transendotheliale Migration<sup>153</sup>. Bei der M1/2-Validierung von TAMs ist zunächst hervorzuheben, dass eine deutliche Verschiebung zugunsten einer phänotypischen M2-Polarisation besonders in den beiden *in vitro* nicht-initial glykosylierten B16-Entitäten stattfand (Abb.43, B16<sup>mock/CC1</sup> versus B16<sup>sLe+/Lex+</sup>). B16<sup>CC1</sup>-Tiere waren ferner die B16-Entität, in der

-an den Melanomen die absolute Akkumulation von M1-TAMs (CD11b<sup>+</sup>/CCR2<sup>+</sup>) mit Abstand am niedrigsten war (Abb.43).

-als Einzige bei der Analyse differentieller M2-TAM-Populationen eine CD36-Expression in den Lymphknoten nachgewiesen werden konnte (Abb.46).

CD36 wurde ursprünglich als Rezeptor für Thrombospondin-1 (TSP-1) entdeckt, mittlerweile konnten CD36 aber aufgrund seiner großen Spannweite möglicher Liganden vielfältige Funktionen in verschiedensten (patho-)physiologischen Prozessen zugeordnet werden. Auf Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen kann eine CD36-vermittelte Signaltransduktion sowohl eine pro- als auch eine anti-inflammatorische Antwort auslösen. Die CD36-abhängige Regulation der Homeostase CD36<sup>+</sup>-Makrophagen hängt dabei stark von den Umgebungsbedingungen ab, in der sich der Makrophage befindet. In Abb.77 ist eine schematische Übersicht einer pro- oder anti-inflammatorischen Antwort von CD36<sup>+</sup>-Makrophagen in Abhängigkeit zur Umgebung gezeigt (Abb.77).

Für den Immunstatus von CD36<sup>+</sup>-Makrophagen konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation mit TSP-1, IL-4 oder oxLDL<sup>16</sup> zu einer Hochregulation von CD36 auf Makrophagen führt, und dass bei der Phagozytose apoptotischer Zellen/Zelldebris durch CD36<sup>+</sup>-Makrophagen eine CD36/TSP-1-Interaktion: **a)** zu einer Unterbrechung pro-inflammatorischer, LPS-vermittelter Signalkaskaden, **b)** zu einer Inhibition der Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, und **c)** zu einer Induktion der Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 führt.

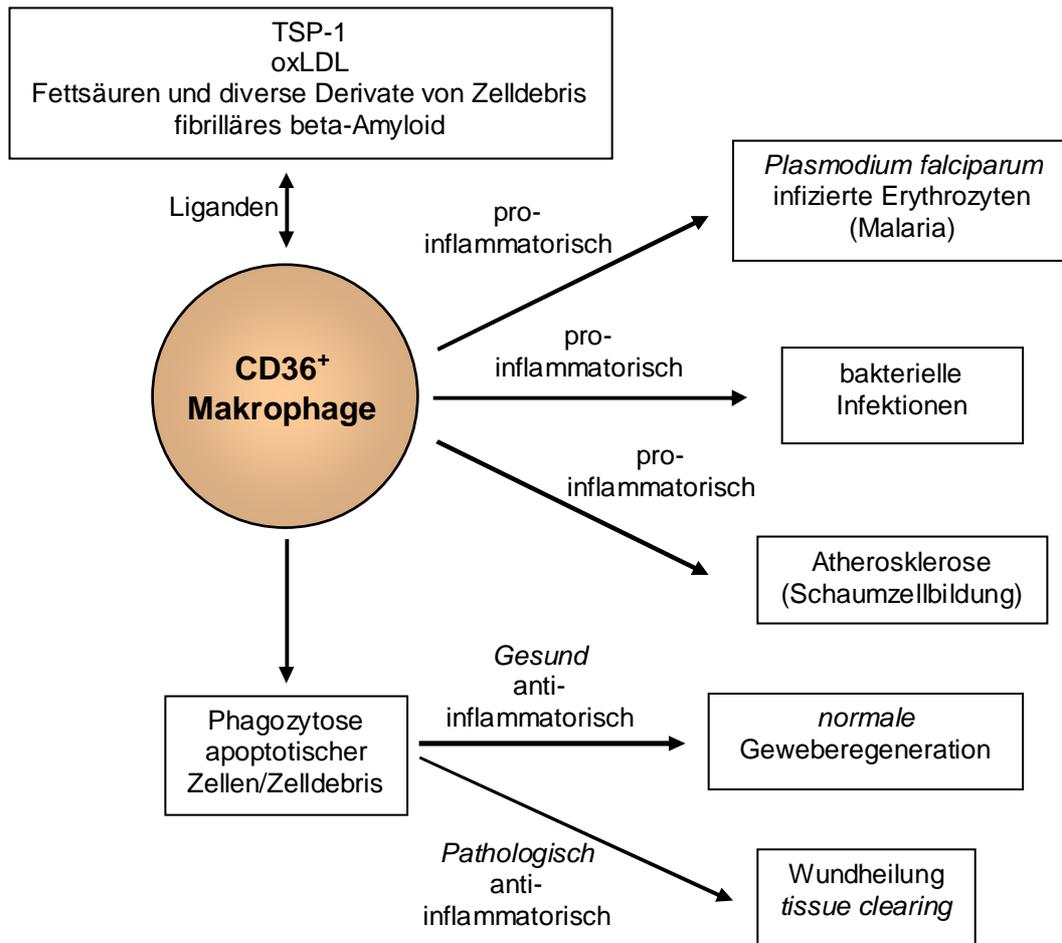
---

<sup>13</sup> CD18: Integrin $\beta$ 2

<sup>14</sup> ICAM1: *intercellular adhesion molecule 1*

<sup>15</sup> JAM3: *junction adhesion molecule 3*

<sup>16</sup> oxLDL: oxidierte Lipoproteine, geringe Dichte



**Abbildung 77: Funktionen von CD36<sup>+</sup>-Makrophagen**

TSP-1: Thrombospondin-1, oxLDL: oxidierte Lipoproteine, geringe Dichte

Zusätzlich kann eine massive Einlagerung von oxLDL und Glukocerebrosiden, und/oder eine Bindung von Glukocortikoidsteroiden an phagozytierende Makrophagen zu einer „Deaktivierung“ dieser Makrophagen führen (sog. erworbene Inaktivierung), wodurch diese in Folge einen de-differenzierten, immunsuppressiven Phänotyp annehmen<sup>154-158</sup>.

Eine Besonderheit von B16<sup>CC1</sup>-Tieren in der Genexpressionsanalyse war der große Anteil differentiell regulierter Kandidaten im Lymphknoten, die dem Lipidstoffwechsel zugerechnet wurden (Abb.35, B16<sup>CC1</sup>, 56 von 142 Kandidaten). Gleichzeitig zeigten B16<sup>CC1</sup>-Melanome das stärkste Größenwachstum nach 10 Tagen *in vivo* (Abb.32). Setzt man bei einer erhöhten Proliferationsrate von Tumorzellen eine erhöhte Energieumsatzbilanz nach dem Warburg-Effekt voraus, so erscheint für die B16<sup>CC1</sup>-Melanome eine verstärkte  $\beta$ -Oxidation von Speicherfetten als kooperative Alternative einer zusätzlichen Verfügbarmachung von Energieträgern. Parallel trat in den

Lymphknoten von B16<sup>CC1</sup>-Tieren eine große Population von IGF1R<sup>+</sup>-G-MDSCs auf (Abb.53). Neben ihrer möglichen Involvierung in lymphangiogene Prozesse nach der Hypothese in Abb.76 supprimieren (töten) G-MDSCs andere Leukozyten (hauptsächlich CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten) bei direkten Zell-Zell-Kontakten durch die Sekretion von ROS. Nach dieser Voraussetzung befanden sich CD36<sup>+</sup>-Makrophagen in den Lymphknoten (und Melanomen) von B16<sup>CC1</sup>-Tieren in einer hyperlipemischen Situation, mit großen Mengen von Zelldebris abgetöteter T-Lymphozyten. Dadurch erscheint es wahrscheinlich, dass CD36<sup>+</sup>-Makrophagen in den Lymphknoten (und Melanomen) von B16<sup>CC1</sup>-Tieren hauptsächlich in die Phagozytose apoptotischer Zellen/Zelldebris eingebunden waren (anti-inflammatorisch, Abb.77), und zum Zeitpunkt von 10 Tagen Tumorwachstum Zeichen einer erworbenen Inaktivierung aufwiesen, was eine Erklärung für die Abnahme einer Ko-Expression von CD206 sein könnte (Abb.46).

Bei der Analyse CD11c<sup>+</sup> dendritischer Zellen fiel zunächst die asymmetrische Akkumulation CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> dendritischer Zellen zugunsten der beiden *in vitro* nicht-initial glykosylierten B16-Entitäten auf, welche auch die beiden B16-Entitäten mit einer verstärkten M2-Polarisation von TAMs waren (Abb.55; B16<sup>mock/CC1</sup> versus B16<sup>sLe+/Lex+</sup>). Eine initiale *in vitro* Glykosylierung der B16-Zellen mit sLe<sup>x</sup> oder Le<sup>x</sup> schien demnach die Rekrutierung CD11c<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> dendritischer Zellen aus CD11b<sup>+</sup>-CMPs (*common myeloid progenitors*), aus denen auch Monozyten, Makrophagen/TAMs hervorgehen, *in vivo* negativ zu beeinträchtigen. Eine CD204 Ko-Expression war im Wesentlichen auf CD11c<sup>+</sup>-Zellen beschränkt, die sich in den Melanomen aufhielten, mit einer signifikanten Erhöhung in B16<sup>CC1</sup> und B16<sup>sLe+</sup>-Tieren (Abb.57). CD204 gehört zu den PRRs<sup>17</sup>, und wurde ursprünglich in Zusammenhang mit der Pathogenese von Atherosklerose und diversen bakteriellen Infektionen beschrieben. Yi et.al. konnte jedoch in einem Lymphom-Tumormodell zeigen, in dem Wildtyp und CD204 *knock out* C57BL/6J-Mäuse, die mit einer adjuvanten TLR4-Agonisten-Therapie<sup>18</sup> behandelt wurden, in den *knock out* Mäusen eine erhöhte Expansion und Aktivierung antigen-spezifischer, zytotoxischer CD8<sup>+</sup>T<sub>Eff</sub>-Lymphozyten zu beobachten war. Eine TLR-vermittelte Signaltransduktion führt in APCs zu einer erhöhten Expression von MHCII und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine.

---

<sup>17</sup> PRRs: *pattern recognition receptors*

<sup>18</sup> TLR: *toll-like receptor*

Daraus wurde postuliert, dass eine Expression von CD204 auf APCs ein antagonistisches System zu einer TLR-vermittelten Stimulierung von APCs zur Kontrolle einer CD8<sup>+</sup>T<sub>Eff</sub>-Antwort darstellt <sup>119</sup>.

Nach diesem Postulat könnte demnach eine protektive Ceacam1-Expression (B16<sup>CC1</sup>), und/oder initiale Hypersialylierung mit sLe<sup>x/a</sup> (B16<sup>sLe+</sup>) in diesen beiden B16-Entitäten zu einer verminderten Induktion einer APC-vermittelten CD8<sup>+</sup>T<sub>Eff</sub>-Antwort gegen die entsprechende B16-Melanome geführt haben.

Bei der Quantifizierung aktivierter CD11b<sup>+</sup>-B-Lymphozyten über CD23 war in den Lymphknoten von B16<sup>CC1</sup>-Tieren die signifikant kleinste Population aktivierter B-Lymphozyten festzustellen (Abb.59). Jacobson *et. al.* konnte zeigen, dass die Expression von CD11b auf B-Lymphozyten der Milz von der An-/Abwesenheit von C3b-Peptiden abhing, und dass eine verminderte CD11b-Expression mit einem vermindertem Potential zur Präsentation von MHCII einherging <sup>120</sup>. Eine Antigen-abhängige Aktivierung über MHCII durch CD4<sup>+</sup>T<sub>H</sub>-Lymphozyten ist aber Voraussetzung für die Differenzierung von B-Lymphozyten in langlebige, IgG-produzierende Plasmazellen oder B<sub>Memory</sub>-Lymphozyten. Durch die De-, bzw. *Nicht*-Aktivierung von B-Lymphozyten in B16<sup>CC1</sup>-Tieren konnten B16<sup>CC1</sup>-Melanome demnach möglicherweise einer adaptiven, humoralen Sekundärantwort durch Plasmazellen entgehen. Bei Wegfall einer Antikörper-Opsonierung von Tumorantigenen durch IgGs würde eine Fc<sub>γ</sub>R-vermittelte Zielfindung/-erkennung opsonierter Zellen durch Phagozyten deutlich erschwert, bzw. verringert, was wiederum für den Tumor (B16<sup>CC1</sup>) einen Selektionsvorteil gegenüber einer sekundären, humoralen Immunantwort des Wirts in einer chronischen Entzündungssituation bedeuten würde.

In der Analyse differentieller T-Lymphozytenpopulationen wurden CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten auf eine Ko-Expression von CD25 oder Klr1g1 untersucht.

In einer Studie von Beyersdorf *et. al.* konnte dieser zeigen, dass CD4<sup>+</sup>/Klr1g1<sup>+</sup>T-Lymphozyten hauptsächlich von peripheren CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten abstammten, und dass die Majorität von CD4<sup>+</sup>/Klr1g1<sup>+</sup>T-Lymphozyten nach ihren Eigenschaften den *bona fides* T<sub>Regs</sub> zugeordnet werden konnte. CD4<sup>+</sup>/Klr1g1<sup>+</sup>T-Lymphozyten waren insensitiv gegenüber Proliferationsstimuli über ihren eigenen CD3/TCR, und bei einem Vergleich mit einer Ko-Expression von CD25 erwiesen sich sowohl

CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/Klrg1<sup>+</sup> als auch CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>-</sup>/Klrg1<sup>+</sup>-T-Lymphozyten als hochpotente Proliferationssuppressoren benachbarter T-Lymphozyten<sup>159</sup>.

In B16<sup>sLe+</sup>-Tieren waren an den Melanomen jeweils CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>/Klrg1<sup>+</sup>-Populationen signifikant erhöht (Abb.60). Die initiale Hypersialylierung mit sLe<sup>x/a</sup> in B16<sup>sLe+</sup>-Melanomen schien demnach einer der Faktoren zu sein, die den Aufbau dieser CD4<sup>+</sup>-Populationen an den Tumoren begünstigten. Eine erhöhte Akkumulation von CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>-Populationen ist bei verschiedenen Tumorerkrankungen seit längerem als negativer prognostischer Indikator bekannt<sup>70 160</sup>. Klrg1 besitzt zwar eine extrazelluläre C-Typ Lektin-ähnliche Domäne, über eine Kohlenhydratbindung, bzw. Bindungsspezifität dieser Domäne ist aktuell aber nichts bekannt.

Bei einer Expression von Klrg1 auf CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wird häufig zwischen CD8<sup>+</sup>/Klrg1<sup>high</sup> und CD8<sup>+</sup>/Klrg1<sup>low</sup>-Populationen unterschieden, denen durch die Expression weiterer spezifischer Antigene verschiedene CD8<sup>+</sup>-Phänotypen zugeordnet werden. In Infektionsmodellen (*Influenza*, *Listeria monocytogenes*) wird Klrg1 auf murinen CD8<sup>+</sup>T<sub>Eff</sub> und reaktivierten CD8<sup>+</sup>T<sub>Memory</sub>-Effektor-Lymphozyten nach Infektion transient stark heraufreguliert. Aufgrund der inhibitorischen Rezeptorfunktion der intrazellulären ITIM-Domäne von Klrg1 wird diskutiert, dass Klrg1 auf CD8<sup>+</sup>T<sub>Eff</sub>-Populationen möglicherweise als Attenuator einer CD8<sup>+</sup>T<sub>Eff</sub>-Antwort zur Prävention einer Auto-Reaktion während der Expansionsphase einer Immunantwort dient<sup>161</sup>. Eine Expression von CD25 auf CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wird, ähnlich wie Klrg1, in Infektionsmodellen nach Infektion transient hochreguliert. CD25<sup>high</sup>/CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten werden in diesen Modellen als kurzlebige, terminal differenzierte CD8<sup>+</sup>T<sub>Eff</sub>-Lymphozyten beschrieben, die häufig eine parallele Klrg1<sup>high</sup> und AnnexinV<sup>high</sup>-Expression aufweisen. Solche CD25<sup>high</sup>/Klrg1<sup>high</sup>/AnnexinV<sup>high</sup>/CD8<sup>+</sup>T<sub>Eff</sub>-Lymphozyten zeigten in diesen Modellen eine erhöhte Apoptoserate<sup>162</sup>. Im Gegensatz dazu regulieren CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, die Klrg1<sup>low</sup> exprimieren auch häufig die CD25 Expression herab. Dieser Population wird ein Vorläuferphänotyp langlebiger CD127<sup>high</sup>CD8<sup>+</sup>T<sub>Memory</sub>-Lymphozyten zugeordnet.

Distinkte CD8<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup>/Klrg1<sup>+</sup>-Populationen konnten im Wesentlichen nur in den Lymphknoten nachgewiesen werden. Die Expression von CD25 oder Klrg1 lag dabei hauptsächlich auf niedrigem oder intermediärem Niveau (Ausnahme: CD8<sup>+</sup>/Klrg1<sup>+</sup> in B16<sup>sLe+</sup>, Abb.66). Nach allgemeiner Vorstellung entstehen T<sub>Memory</sub>-Lymphozyten in der Kontraktionsphase einer Immunantwort. Die erzielten Befunde in

Abb.62 (CD127-Aktivierungsstatus) und Abb.64/66 legen nahe, dass zum Zeitpunkt der Analyse CD127<sup>high</sup>T<sub>Memory</sub>-Populationen nicht von den Tieren aufgebaut werden konnten, was dafür spricht, dass sich die Tiere nach wie vor in der Expansionsphase der Immunantwort befanden, und nachgewiesene CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten-Populationen in entsprechende Effektor-Phänotypen ausdifferenziert waren.

Eine Besonderheit bei der Analyse CD8<sup>+</sup>Zellen war das Auftreten einer CD8<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>-</sup>-Population bei der Analyse CD11c<sup>+</sup> dendritischer Zellen über Ausschluss von CD11c. Eine Ko-Expression von CD11b als Subpopulation zytotoxischer CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten kann als Vorläuferpopulation interpretiert werden, aus der sog. LAK-Zellen<sup>19</sup> hervorgehen (Abb.68). Natürlich auftretende LAK-Zellen besitzen die Fähigkeit einer HLA/MHC<sup>20</sup>-unabhängigen Zytolyse von Zielzellen, und entstehen aus PBLs<sup>21</sup> des peripheren Blutstroms. Dadurch können sie z.B. Tumoren entgegenwirken, die als Fluchtmechanismus eine (Über-)Expression von Selbst-HLA nutzen, um einer Erkennung durch zytotoxische CD8<sup>+</sup>T<sub>Eff</sub> oder NK-Zellen zu entgehen. Bei einer Behandlung von Krebspatienten mit ACT-Therapien<sup>22</sup> versucht man sich dieses Phänomen z.T. zunutze zu machen. Grundlage dieses Ansatzes ist die *in vitro* Kultivierung von TILs aus Gewebeproben von Tumorpatienten, mit einer Re-Injektion nach *in vitro*-Expansion und -Modifikation dieser TILs. So basieren z.B. viele Protokolle, nach denen isolierte T-Lymphozyten aus TILs behandelt werden, auf der Idee einer Induktion/Provozierung von LAK-ähnlichen Eigenschaften. Bei der Kultivierung werden häufig Protokolle mit Kombinationen von IL-2 ± anti-CD3, anti-CD25 oder anti-CTLA-4 eingesetzt<sup>163-164</sup>.

Eine CD8<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>-</sup>-Population trat prominent in den Melanomen von B16<sup>CC1</sup>-Tieren auf (Abb.69). Dies war, in Hinsicht auf das Größenwachstum von B16<sup>CC1</sup>-Melanomen, möglicherweise der alternative Versuch des Wirts, eine Population am Tumor zu erzeugen, die MHC-unabhängig zytotoxisch gegen den Tumor wirksam werden konnte. Da diese Population in B16<sup>mock</sup> / sLe<sup>+</sup> / Lex<sup>+</sup>-Tieren zwar in den Lymphknoten, aber nicht in den Melanomen auftrat (Abb.69), war das positive Selektionskriterium offenbar die (protektive) Ceacam1-Expression in B16<sup>CC1</sup>-Melanomen. Reziprok scheint demnach das Fehlen (B16<sup>mock</sup>) und/oder eine initiale

---

<sup>19</sup> LAK: *lymphokine IL-2-activated killer cells*

<sup>20</sup> HLA: *human leukocyte antigen*

<sup>21</sup> PBLs: *peripheral blood lymphocytes*

<sup>22</sup> ACT: *adoptive cell transfer*

Glykosylierung mit sLe<sup>x</sup> oder Le<sup>x</sup> eine tumorale Akkumulation einer solchen Population effektiv zu verhindern.

Bei der Quantifizierung von NK-Zellen fiel in allen untersuchten Geweben zunächst die deutliche Vermehrung von CD49b<sup>+</sup>/CD244<sup>+</sup>-NK-Zellen zugunsten der beiden glykosylierten B16-Entitäten (B16<sup>sLe<sup>x</sup>/Le<sup>x</sup></sup>) auf (Abb.70).

Garrod *et. al.* konnten für eine CD49b-Expression auf NK-Zellen zeigen, dass CD49b über die Bindung an Kollagenfasern an der Eliminierung von syngenen oder allogenen MHC-*mismatch*-Zellen beteiligt ist, und dass eine CD49b/Kollagenbindung die Mobilität von NK-Zellen für die Dauer der Bindung deutlich einschränkt <sup>165</sup>. CD244 gehört im humanen und murinem System zu den aktivierenden Rezeptoren. Jedoch konnten Margraf-Schonfeld *et. al.* zeigen, dass die Rezeptorfunktion von CD244 stark von dessen Glykosylierungsstatus abhängt. CD244 kommt natürlicherweise als N- und O-glykosyliertes Protein vor, und die Glykane selbst sind stark sialyliert. Die Bindungsaffinität von CD244 an seinen Liganden CD48 war in dieser Studie anti-proportional zum Sialyierungsgrad von CD244 (wenig Sialinsäure→hohe CD48-Affinität), und einer CD244-vermittelten Zytolyse von Zielzellen ging eine vorherige De-Sialylierung voraus <sup>166</sup>. Analoge Beobachtungen sind auch von T-Lymphozyten bekannt. So sind naive T-Lymphozyten in der Regel stärker sialyliert als aktivierte T<sub>Eff</sub>. Auf CD8<sup>+</sup>T<sub>Eff</sub> wiederum führt eine De-Sialylierung zu einer Erhöhung der Bindungsaffinität zwischen CD8 und MHCI, und einer erhöhten Sensitivität für eine Stimulation durch MHCI-präsentierende APCs <sup>167-168</sup>.

In Tabelle 13 ist eine Auswahl aktivierender und inhibierender Rezeptoren auf NK-Zellen gezeigt, mit einem Fokus auf untersuchte Rezeptoren. Von murinem CD161 sind mehrere Isoformen bekannt, wobei die CD161b-Variante eine inhibitorische, und die CD161c-Variante eine aktivierende Rezeptorfunktion ausübt. Der eingesetzte anti-NK1.1-Antikörper (PK136) erkennt die Varianten CD161b (Klrb1b, Tabelle 11) und CD161c (Isoform-spezifische Antikörper waren nicht verfügbar). In der Analyse zur Ko-Expression von NK1.1, Klrg1 oder Klra2 auf CD49b<sup>+</sup>/CD244<sup>+</sup>-NK-Zellen war die CD49b<sup>+</sup>/CD244<sup>+</sup>/NK1.1+-Population zwar die größte nachweisbare Population. Eine Aussage, welche der CD161-Isoformen dominant exprimiert wurde, ist über NK1.1 aber leider somit schwerlich möglich. Allerdings war das durchschnittliche NK1.1-Expressionsniveau generell höher als bei Klra2 (B16<sup>mock</sup>) oder Klrg1 (B16<sup>sLe<sup>x</sup>/Le<sup>x</sup></sup>) (Abb.71).

Rezeptor	Ligand	Funktion
CD49b	Kollagen	MHCI <i>match</i> → Inhibierend
		MHCI <i>mismatch</i> → Aktivierend

Aktivierender Rezeptor	Ligand	Inhibierender Rezeptor	Ligand
NKp30	BAT3, B7-H6	Klrg1	E-, N-, P-Cadherin
NKp46	Virales Hämagglutinin	Siglec-7 (CD328)	Sialinsäure
CD244	CD48	Siglec-9 (CD329)	Sialinsäure
NKG2D	MIC-A, MIC-B, ULBP-1, 2, 3	LAIR-1	Ep-CAM

<i>Homo sapiens</i>			<i>Mus musculus</i>		
Rezeptor	Ligand	Funktion	Rezeptor	Ligand	Funktion
CD161	LLT1	Inhibierend	CD161a	?	Aktivierend
			CD161b	Clec2d	Inhibierend
			CD161c	Clec2d (?)	Aktivierend
			CD161f	Clec2i	Aktivierend
-	-	-	Klra2	MHCI	Inhibierend

**Tabelle 13: Auswahl aktivierender und inhibierender Rezeptoren auf NK-Zellen**

CD48: *B-lymphocyte activation marker BLAST-1*, CD49b: *Integrin $\alpha$ 2 $\beta$ 1*, CD161: *Killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1*, CD244: *Natural killer cell receptor 2B4*, EpCAM: *Epithelial cell adhesion molecule*, Klra2: *killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 2*, Klrg1: *Killer cell lectin-like receptor, subfamily G member 1*, LAIR-1: *Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1*, LLT1: *C-type lectin domain family 2 member D*, Clec2d: *C-type lectin domain family 2 member D*, Clec2i: *C-type lectin domain family 2 member i*

Auffälliger war hingegen, dass über CD49b/CD244 eine Akkumulation von NK-Zellen an B16<sup>CC1</sup>-Melanomen so gut wie gar nicht gefunden werden konnte (Abb.70).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen bei Kontakt mit CEACAM1<sup>+</sup>-Melanomen einen abnormen Phänotyp annehmen. Aktivierende NK-Zellrezeptoren wie CD16<sup>23</sup>, NKp30<sup>24</sup>, NKp46<sup>25</sup> oder NKG2D<sup>26</sup> werden nach Kontakt herabreguliert. Die inverse Korrelation aktivierender NK-Zellrezeptoren bei Kontakt mit CEACAM1<sup>+</sup>-Melanomen ist positiv mit einem erhöhten Metastasierungspotential in Melanompatienten korreliert <sup>106 169</sup>.

Geht man davon aus, dass es sich im hier benutzten B16-Modell bei einem Wachstum in C57BL/6J um ein allogenes Transplantationsmodell handelt, und fügt man hinzu, dass in der Genexpressionsanalyse nur in B16<sup>CC1</sup>-Tieren differentiell

<sup>23</sup> CD16: *low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III*

<sup>24</sup> NKp30: *natural cytotoxicity triggering receptor 3*

<sup>25</sup> NKp46: *natural cytotoxicity triggering receptor 1*

<sup>26</sup> NKG2D: *killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1*

regulierte Kollagen-Transkripte gefunden wurden (Abb.35), so erscheint es zumindest möglich, dass NK-Zellen in den Lymphknoten von B16<sup>CC1</sup>-Tieren a) durch die Bindung an Kollagene immobil wurden, und b) es sich bei der MHC-I-Präsentation im Lymphknoten allgemein um MHC-I-*match* gehandelt hat, und somit die CD49b/Kollagenbindung letztlich inhibitorisch auf die NK-Zellen wirkte. In der Folge wanderten quasi keine CD49b<sup>+</sup>/CD244<sup>+</sup>-NK-Zellen aus den Lymphknoten zu den B16<sup>CC1</sup>-Melanom aus. Bei einem direkten Kontakt mit B16<sup>CC1</sup>-Melanomen von peripheren NK-Zellen traten wohl die Folgeeffekte des abnormen Phänotyps auf.

Hochregulierte mRNAs im inguinalen Lymphknoten gruppiert nach physiologischem Kontext	B16 <sup>mock</sup> <i>versus</i>		
	B16 <sup>CC1</sup>	B16 <sup>sLe+</sup>	B16 <sup>Lex+</sup>
Kollagene	11	0	0

(Ausschnitt aus Abb.35)

In B16<sup>sLe+/Lex+</sup>-Tieren akkumulierten zwar die quantitativ größten NK-Zell-Populationen in den Melanomen, es besteht hier aber die Möglichkeit, dass

- durch die negative Abstossung zwischen Sialinsäuren auf B16-Zellen und CD244 dessen aktivierende Rezeptorfunktion vermindert wurde
- durch die Induktion inhibitorischer Rezeptoren wie CD161b oder Klrg1, die alle C-Typ-ähnliche Dömanen tragen, tumorale NK-Zellen wenn, dann nur schwach zytotoxisch aktiv waren.

## 8. Zusammenfassung

Nach der Erzeugung verschiedener B16-Entitäten ( $B16^{\text{mock}}$ ,  $B16^{\text{CC1}}$ ,  $B16^{\text{CC1/sLe}^+}$ ,  $B16^{\text{CC1/Le}^+}$ ) mit einem differentiellen Glykosylierungsprofil für  $sLe^{x/a}$  (benannt als  $B16^{\text{sLe}^+}$ ) oder  $Le^x$ -Epitopen (benannt als  $B16^{\text{Le}^+}$ ), konnten nach 10 Tagen B16 Wachstum Unterschiede sowohl im Größenwachstum ( $B16^{\text{CC1}\uparrow}$ ), der Vaskularisation mit Blut- ( $B16^{\text{Le}^+\uparrow}$ ) oder Lymphgefäßen ( $B16^{\text{CC1}\uparrow}$ ), als auch in der Akkumulation differentieller Leukozytenpopulationen gefunden werden. In  $B16^{\text{mock}}$  und  $B16^{\text{CC1}}$ -Tieren konnte eine erhöhte Akkumulation  $CD11c^+/CD11b^+$  dendritischer Zellen in den Melanomen, sowie eine bevorzugte Polarisation myeloider Leukozyten der angeborenen Immunabwehr in anti-inflammatorische Phänotypen festgestellt werden, was sich zusätzlich auf humoraler Ebene in den Seren von  $B16^{\text{CC1}}$ -Tieren über erhöhte Spiegel anti-inflammatorischer Zytokine (IL-13,  $PGE_2$ ) abbilden ließ. Unterstützt wurden diese Befunde durch eine Genexpressionsanalyse inguinaler Lymphknoten, in der eine auffällig hohe Zahl differentiell regulierter Kandidaten gefunden wurde, deren Expression auf untersuchten Leukozytenpopulationen anti-inflammatorischen, bzw. immunsuppressiven Phänotypen zugeordnet werden konnte. In  $B16^{\text{CC1}}$ -Tieren war eine besonders hohe Akkumulation einer immunsuppressiven  $IGF1R^+$ -Population von granulozytären *myeloid-derived suppressor cells* (G-MDSCs) zu finden. In  $B16^{\text{sLe}^+}$  und  $B16^{\text{Le}^+}$ -Tieren war hingegen eine myeloide M1/M2-Polarisation gleichmäßiger ausgeprägt,  $B16^{\text{Le}^+}$ -Tiere zeigten dabei innerhalb ihrer myeloiden M2-Population einen erhöhten Aufbau pro-angiogen wirkender Subtypen. Ferner konnten Leukozytenpopulationen der adaptiven Immunabwehr häufiger in  $B16^{\text{sLe}^+}$  und  $B16^{\text{Le}^+}$ -Tieren validiert werden. Am deutlichsten ausgeprägt war dieser Unterschied zwischen  $B16^{\text{mock/CC1}}$  und  $B16^{\text{sLe}^+/Le}^+$ -Tieren in den Lymphknoten. In den Melanomen von  $B16^{\text{sLe}^+}$ -Tieren konnte eine erhöhte Akkumulation von  $CD4^+/CD25^+$  und  $CD4^+/Klrg1^+$ -Populationen gefunden werden. Bei  $CD204^+$  dendritischen Zellen konnten auffällige Veränderungen in den Melanomen ( $B16^{\text{CC1}\uparrow}$ ,  $B16^{\text{sLe}^+\uparrow}$ ), bei  $CD11b^+$ B-Lymphozyten in den Lymphknoten ( $B16^{\text{CC1}\downarrow}$ ) festgestellt werden.  $CD49b^+/CD244^+$ NK-Zellen traten fast ausschließlich nur in  $B16^{\text{sLe}^+/Le}^+$ -Tieren auf, mit einer erhöhten Akkumulation in den Melanomen. Präsenzte NK-Zellen waren aber vermutlich nur schwach zytotoxisch aktiv.

## 9. Summary

According to the generation of various B16 entities ( $B16^{\text{mock}}$ ,  $B16^{\text{CC1}}$ ,  $B16^{\text{CC1/sLe}^+}$ ,  $B16^{\text{CC1/Lex}^+}$ ) with different glycosylation profiles for  $s\text{Le}^{\text{x/a}}$  (as  $B16^{\text{sLe}^+}$  named) or  $\text{Le}^{\text{x}}$ -epitopes (as  $B16^{\text{Lex}^+}$  named) after 10 days of B16 growth, disparities in melanoma size ( $B16^{\text{CC1}\uparrow}$ ), establishment of blood- ( $B16^{\text{Lex}^+\uparrow}$ ) and lymph vessels ( $B16^{\text{CC1}\uparrow}$ ), as well as the accumulation of differential leukocyte populations could be observed. In  $B16^{\text{mock}}$  and  $B16^{\text{CC1}}$ -mice, increased levels of  $\text{CD11c}^+/\text{CD11b}^+$  dendritic cells at melanoma site, together with a favoured M2-polarisation of innate myeloid leukocyte populations could be discovered, additionally displayed in  $B16^{\text{CC1}}$ -mice through increased serum concentrations of anti-inflammatory cytokines (IL-13,  $\text{PGE}_2$ ). These findings are supported by a gene expression analysis of inguinal lymph nodes, where a noticeable high number of differentially regulated transcripts could be found, whose expression could be attributed to anti-inflammatory, respectively immunosuppressive phenotypes of examined leukocyte populations. Particularly in  $B16^{\text{CC1}}$ -mice, a pronounced occurrence of an immunosuppressive  $\text{IGF1R}^+\text{MDSC}$  population could be revealed. In contrast, in  $B16^{\text{sLe}^+}$  and  $B16^{\text{Lex}^+}$ -mice a myeloid M1/M2-polarisation was less unequally distributed, where  $B16^{\text{Lex}^+}$ -mice showed a heightened assembly of pro-angiogenic subtypes within their M2-population. Furthermore, adoptive leukocyte populations could be validated more often in  $B16^{\text{sLe}^+}$  and  $B16^{\text{Lex}^+}$ -mice, with the clearest distinction between  $B16^{\text{mock/CC1}}$  and  $B16^{\text{sLe}^+/\text{Lex}^+}$ -mice in the lymph nodes. At melanoma sites significantly increased levels of  $\text{CD4}^+/\text{CD25}^+$  and  $\text{CD4}^+/\text{Klrg1}^+$ -populations were found in  $B16^{\text{sLe}^+}$ -mice. For  $\text{CD204}^+$  dendritic cells, alterations could be observed at melanoma sites ( $B16^{\text{CC1}\uparrow}$ ,  $B16^{\text{sLe}^+\uparrow}$ ), for  $\text{CD11b}^+\text{B-lymphocytes}$  in the lymph nodes ( $B16^{\text{CC1}\downarrow}$ ). The appearance of  $\text{CD49b}^+/\text{CD244}^+\text{NK}$  cells was essentially restricted to  $B16^{\text{sLe}^+/\text{Lex}^+}$ -mice, with the highest accumulation at melanoma sites. However, present NK cells were presumably only weakly cytotoxically active.

## 10. Literaturverzeichnis

1. Reddy EP, Reynolds RK, Santos E, Barbacid M. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 1982;300(5888):149-52.
2. Tabin CJ, Bradley SM, Bargmann CI, Weinberg RA, Papageorge AG, Scolnick EM, et al. Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 1982;300(5888):143-9.
3. Beerenwinkel N, Antal T, Dingli D, Traulsen A, Kinzler KW, Velculescu VE, et al. Genetic progression and the waiting time to cancer. *PLoS Comput Biol* 2007;3(11):e225.
4. Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 2007;446(7132):153-8.
5. Olivier M, Hussain SP, Caron de Fromentel C, Hainaut P, Harris CC. TP53 mutation spectra and load: a tool for generating hypotheses on the etiology of cancer. *IARC Sci Publ* 2004(157):247-70.
6. Haferlach T. Molecular genetic pathways as therapeutic targets in acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008:400-11.
7. Hocker TL, Singh MK, Tsao H. Melanoma genetics and therapeutic approaches in the 21st century: moving from the benchside to the bedside. *J Invest Dermatol* 2008;128(11):2575-95.
8. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature* 2009;458(7239):719-24.
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646-74.
10. Hiraoka N, Petryniak B, Nakayama J, Tsuboi S, Suzuki M, Yeh JC, et al. A novel, high endothelial venule-specific sulfotransferase expresses 6-sulfo sialyl Lewis(x), an L-selectin ligand displayed by CD34. *Immunity* 1999;11(1):79-89.
11. Becker DJ, Lowe JB. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology* 2003;13(7):41R-53R.
12. Brown JR, Crawford BE, Esko JD. Glycan antagonists and inhibitors: a fount for drug discovery. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2007;42(6):481-515.
13. Feizi T. Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. *Nature* 1985;314(6006):53-7.
14. Hounsell EF, Lawson AM, Feeney J, Gooi HC, Pickering NJ, Stoll MS, et al. Structural analysis of the O-glycosidically linked core-region oligosaccharides of human meconium glycoproteins which express oncofoetal antigens. *Eur J Biochem* 1985;148(2):367-77.
15. Pennington JE, Rastan S, Roelcke D, Feizi T. Saccharide structures of the mouse embryo during the first eight days of development. Inferences from immunocytochemical studies using monoclonal antibodies in conjunction with glycosidases. *J Embryol Exp Morphol* 1985;90:335-61.
16. Rastan S, Thorpe SJ, Scudder P, Brown S, Gooi HC, Feizi T. Cell interactions in preimplantation embryos: evidence for involvement of saccharides of the poly-N-acetyllactosamine series. *J Embryol Exp Morphol* 1985;87:115-28.
17. Ito H, Hiraiwa N, Sawada-Kasugai M, Akamatsu S, Tachikawa T, Kasai Y, et al. Altered mRNA expression of specific molecular species of fucosyl- and sialyl-

- transferases in human colorectal cancer tissues. *Int J Cancer* 1997;71(4):556-64.
18. Ronin C. Remodeling of glycoprotein and carbohydrate antigens. *Clin Chem Lab Med* 1998;36(6):373-8.
  19. Reis CA, Osorio H, Silva L, Gomes C, David L. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. *J Clin Pathol* 2010;63(4):322-9.
  20. Fukuta S, Magnani JL, Gaur PK, Ginsburg V. Monoclonal antibody CC3C195, which detects cancer-associated antigens in serum, binds to the human Lea blood group antigen and to its sialylated derivative. *Arch Biochem Biophys* 1987;255(1):214-6.
  21. Hirohashi S, Shimosato Y, Ino Y, Tome Y, Watanabe M, Hirota T, et al. Distribution of blood group antigens and CA 19-9 in gastric cancers and non-neoplastic gastric mucosa. *Gann* 1984;75(6):540-7.
  22. Hirohashi S, Ino Y, Kodama T, Shimosato Y. Distribution of blood group antigens A, B, H, and I(Ma) in mucus-producing adenocarcinoma of human lung. *J Natl Cancer Inst* 1984;72(6):1299-305.
  23. Akamatsu S, Yazawa S, Tachikawa T, Furuta T, Okaichi Y, Nakamura J, et al. Alpha 2-->3sialyltransferase associated with the synthesis of CA 19-9 in colorectal tumors. *Cancer* 1996;77(8 Suppl):1694-700.
  24. Majuri ML, Niemela R, Tiisala S, Renkonen O, Renkonen R. Expression and function of alpha 2,3-sialyl- and alpha 1,3/1,4-fucosyltransferases in colon adenocarcinoma cell lines: role in synthesis of E-selectin counter-receptors. *Int J Cancer* 1995;63(4):551-9.
  25. Dennis JW, Laferte S, Waghorne C, Breitman ML, Kerbel RS. Beta 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. *Science* 1987;236(4801):582-5.
  26. Hiller KM, Mayben JP, Bendt KM, Manousos GA, Senger K, Cameron HS, et al. Transfection of alpha(1,3)fucosyltransferase antisense sequences impairs the proliferative and tumorigenic ability of human colon carcinoma cells. *Mol Carcinog* 2000;27(4):280-8.
  27. Maehara M, Yagita M, Isobe Y, Hoshino T, Nakagawara G. Dimethyl sulfoxide (DMSO) increases expression of sialyl Lewis x antigen and enhances adhesion of human gastric carcinoma (NUGC4) cells to activated endothelial cells. *Int J Cancer* 1993;54(2):296-301.
  28. Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S, Furukawa H, Ishikawa O, Sasaki Y, et al. Involvement of carbohydrate antigen sialyl Lewis(x) in colorectal cancer metastasis. *Dis Colon Rectum* 1997;40(4):420-31.
  29. Dennis JW, Nabi IR, Demetriou M. Metabolism, cell surface organization, and disease. *Cell* 2009;139(7):1229-41.
  30. Lajoie P, Partridge EA, Guay G, Goetz JG, Pawling J, Lagana A, et al. Plasma membrane domain organization regulates EGFR signaling in tumor cells. *J Cell Biol* 2007;179(2):341-56.
  31. Partridge EA, Le Roy C, Di Guglielmo GM, Pawling J, Cheung P, Granovsky M, et al. Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science* 2004;306(5693):120-4.
  32. Fernandes H, Cohen S, Bishayee S. Glycosylation-induced conformational modification positively regulates receptor-receptor association: a study with an aberrant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII/DeltaEGFR) expressed in cancer cells. *J Biol Chem* 2001;276(7):5375-83.

33. Lau KS, Partridge EA, Grigorian A, Silvescu CI, Reinhold VN, Demetriou M, et al. Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. *Cell* 2007;129(1):123-34.
34. Lau KS, Dennis JW. N-Glycans in cancer progression. *Glycobiology* 2008;18(10):750-60.
35. Coster AC, Govers R, James DE. Insulin stimulates the entry of GLUT4 into the endosomal recycling pathway by a quantal mechanism. *Traffic* 2004;5(10):763-71.
36. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 2008;7(1):11-20.
37. Najjar SM. Regulation of insulin action by CEACAM1. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13(6):240-5.
38. Kuespert K, Pils S, Hauck CR. CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Curr Opin Cell Biol* 2006;18(5):565-71.
39. Ordonez C, Screaton RA, Ilantzis C, Stanners CP. Human carcinoembryonic antigen functions as a general inhibitor of anoikis. *Cancer Res* 2000;60(13):3419-24.
40. Horst AK, Ito WD, Dabelstein J, Schumacher U, Sander H, Turbide C, et al. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 modulates vascular remodeling in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 2006;116(6):1596-605.
41. Horst AK, Bickert T, Brewig N, Ludewig P, van Rooijen N, Schumacher U, et al. CEACAM1+ myeloid cells control angiogenesis in inflammation. *Blood* 2009;113(26):6726-36.
42. Dveksler GS, Dieffenbach CW, Cardellichio CB, McCuaig K, Pensiero MN, Jiang GS, et al. Several members of the mouse carcinoembryonic antigen-related glycoprotein family are functional receptors for the coronavirus mouse hepatitis virus-A59. *J Virol* 1993;67(1):1-8.
43. Muenzner P, Rohde M, Kneitz S, Hauck CR. CEACAM engagement by human pathogens enhances cell adhesion and counteracts bacteria-induced detachment of epithelial cells. *J Cell Biol* 2005;170(5):825-36.
44. Dai T, Abou-Rjaily GA, Al-Share QY, Yang Y, Fernstrom MA, Deangelis AM, et al. Interaction between altered insulin and lipid metabolism in CEACAM1-inactive transgenic mice. *J Biol Chem* 2004;279(43):45155-61.
45. Ohtsubo K, Takamatsu S, Minowa MT, Yoshida A, Takeuchi M, Marth JD. Dietary and genetic control of glucose transporter 2 glycosylation promotes insulin secretion in suppressing diabetes. *Cell* 2005;123(7):1307-21.
46. Amano M, Galvan M, He J, Baum LG. The ST6Gal I sialyltransferase selectively modifies N-glycans on CD45 to negatively regulate galectin-1-induced CD45 clustering, phosphatase modulation, and T cell death. *J Biol Chem* 2003;278(9):7469-75.
47. Stowell SR, Arthur CM, Mehta P, Slanina KA, Blixt O, Leffler H, et al. Galectin-1, -2, and -3 exhibit differential recognition of sialylated glycans and blood group antigens. *J Biol Chem* 2008;283(15):10109-23.
48. Tavian M, Cortes F, Robin C, Schiavon V, Hallais MF, Coulombel L, et al. [The hemangioblast, common precursor of endothelial and hematopoietic cells]. *Transfus Clin Biol* 2000;7(3):238-41.
49. Chambers SM, Boles NC, Lin KY, Tierney MP, Bowman TV, Bradfute SB, et al. Hematopoietic fingerprints: an expression database of stem cells and their progeny. *Cell Stem Cell* 2007;1(5):578-91.

50. Miranda-Saavedra D, De S, Trotter MW, Teichmann SA, Gottgens B. BloodExpress: a database of gene expression in mouse haematopoiesis. *Nucleic Acids Res* 2009;37(Database issue):D873-9.
51. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005;5(12):953-64.
52. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003;3(1):23-35.
53. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 2009;27:451-83.
54. Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2010;362(10):875-85.
55. Movahedi K, Laoui D, Gysemans C, Baeten M, Stange G, Van den Bossche J, et al. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Res* 2010;70(14):5728-39.
56. Stout RD, Watkins SK, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: in situ reprogramming of tumor-associated macrophages. *J Leukoc Biol* 2009;86(5):1105-9.
57. Guiducci C, Vicari AP, Sangaletti S, Trinchieri G, Colombo MP. Redirecting in vivo elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection. *Cancer Res* 2005;65(8):3437-46.
58. Wang YC, He F, Feng F, Liu XW, Dong GY, Qin HY, et al. Notch signaling determines the M1 versus M2 polarization of macrophages in antitumor immune responses. *Cancer Res* 2010;70(12):4840-9.
59. Ochoa AC, Zea AH, Hernandez C, Rodriguez PC. Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13(2 Pt 2):721s-26s.
60. Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, Kinarsky L, Sherman S, Kang L, et al. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med* 2007;13(7):828-35.
61. Yang L, DeBusk LM, Fukuda K, Fingleton B, Green-Jarvis B, Shyr Y, et al. Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 2004;6(4):409-21.
62. Yang L, Huang J, Ren X, Gorska AE, Chytil A, Aakre M, et al. Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. *Cancer Cell* 2008;13(1):23-35.
63. Ramirez K, Kee BL. Multiple hats for natural killers. *Curr Opin Immunol* 2010;22(2):193-8.
64. Mazzucchelli R, Durum SK. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev Immunol* 2007;7(2):144-54.
65. Gajewski TF, Fitch FW. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol* 1988;140(12):4245-52.
66. Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol* 1990;145(11):3796-806.
67. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6(11):1123-32.

68. Wang L, Yi T, Kortylewski M, Pardoll DM, Zeng D, Yu H. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J Exp Med* 2009;206(7):1457-64.
69. Wurster AL, Rodgers VL, Satoskar AR, Whitters MJ, Young DA, Collins M, et al. Interleukin 21 is a T helper (Th) cell 2 cytokine that specifically inhibits the differentiation of naive Th cells into interferon gamma-producing Th1 cells. *J Exp Med* 2002;196(7):969-77.
70. Corthay A, Lundin KU, Lorvik KB, Hofgaard PO, Bogen B. Secretion of tumor-specific antigen by myeloma cells is required for cancer immunosurveillance by CD4+ T cells. *Cancer Res* 2009;69(14):5901-7.
71. Villadangos JA, Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* 2007;7(7):543-55.
72. van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* 2003;3(9):697-709.
73. Bergman M, Del Prete G, van Kooyk Y, Appelmek B. Helicobacter pylori phase variation, immune modulation and gastric autoimmunity. *Nat Rev Microbiol* 2006;4(2):151-9.
74. van Liemt E, van Vliet SJ, Engering A, Garcia Vallejo JJ, Bank CM, Sanchez-Hernandez M, et al. Schistosoma mansoni soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation. *Mol Immunol* 2007;44(10):2605-15.
75. Nonaka M, Ma BY, Murai R, Nakamura N, Baba M, Kawasaki N, et al. Glycosylation-dependent interactions of C-type lectin DC-SIGN with colorectal tumor-associated Lewis glycans impair the function and differentiation of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2008;180(5):3347-56.
76. Aarnoudse CA, Garcia Vallejo JJ, Saeland E, van Kooyk Y. Recognition of tumor glycans by antigen-presenting cells. *Curr Opin Immunol* 2006;18(1):105-11.
77. Satyamoorthy K, Herlyn M. Cellular and molecular biology of human melanoma. *Cancer Biol Ther* 2002;1(1):14-7.
78. Della Porta G. Cellular and molecular biology of melanoma. *Semin Surg Oncol* 1992;8(6):353-7.
79. Tang A, Eller MS, Hara M, Yaar M, Hirohashi S, Gilchrist BA. E-cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes in vitro. *J Cell Sci* 1994;107 ( Pt 4):983-92.
80. Nesbit M, Herlyn M. Adhesion receptors in human melanoma progression. *Invasion Metastasis* 1994;14(1-6):131-46.
81. Clark WH, Jr., Elder DE, Guerry Dt, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol* 1984;15(12):1147-65.
82. Tsao H, Atkins MB, Sober AJ. Management of cutaneous melanoma. *N Engl J Med* 2004;351(10):998-1012.
83. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001;19(16):3635-48.
84. Tarhini AA, Agarwala SS. Cutaneous melanoma: available therapy for metastatic disease. *Dermatol Ther* 2006;19(1):19-25.
85. Fecher LA, Flaherty KT. Where are we with adjuvant therapy of stage III and IV melanoma in 2009? *J Natl Compr Canc Netw* 2009;7(3):295-304.

86. Serrone L, Zeuli M, Sega FM, Cognetti F. Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. *J Exp Clin Cancer Res* 2000;19(1):21-34.
87. Middleton MR, Lorigan P, Owen J, Ashcroft L, Lee SM, Harper P, et al. A randomized phase III study comparing dacarbazine, BCNU, cisplatin and tamoxifen with dacarbazine and interferon in advanced melanoma. *Br J Cancer* 2000;82(6):1158-62.
88. Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, Fierlbeck G, Tilgen W, Seiter S, et al. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol* 2000;18(1):158-66.
89. Smith FO, Downey SG, Klapper JA, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, et al. Treatment of metastatic melanoma using interleukin-2 alone or in conjunction with vaccines. *Clin Cancer Res* 2008;14(17):5610-8.
90. Atkins MB, Hsu J, Lee S, Cohen GI, Flaherty LE, Sosman JA, et al. Phase III trial comparing concurrent biochemotherapy with cisplatin, vinblastine, dacarbazine, interleukin-2, and interferon alfa-2b with cisplatin, vinblastine, and dacarbazine alone in patients with metastatic malignant melanoma (E3695): a trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 2008;26(35):5748-54.
91. Legha SS, Ring S, Eton O, Bedikian A, Buzaid AC, Plager C, et al. Development of a biochemotherapy regimen with concurrent administration of cisplatin, vinblastine, dacarbazine, interferon alfa, and interleukin-2 for patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 1998;16(5):1752-9.
92. Eton O, Legha SS, Bedikian AY, Lee JJ, Buzaid AC, Hodges C, et al. Sequential biochemotherapy versus chemotherapy for metastatic melanoma: results from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 2002;20(8):2045-52.
93. Wiernik PH, Einzig AI. Taxol in malignant melanoma. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1993(15):185-7.
94. Rao RD, Holtan SG, Ingle JN, Croghan GA, Kottschade LA, Creagan ET, et al. Combination of paclitaxel and carboplatin as second-line therapy for patients with metastatic melanoma. *Cancer* 2006;106(2):375-82.
95. Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* 2004;6(4):313-9.
96. Amaravadi RK, Schuchter LM, McDermott DF, Kramer A, Giles L, Gramlich K, et al. Phase II Trial of Temozolomide and Sorafenib in Advanced Melanoma Patients with or without Brain Metastases. *Clin Cancer Res* 2009;15(24):7711-18.
97. Smalley KS, Nathanson KL, Flaherty KT. Genetic subgrouping of melanoma reveals new opportunities for targeted therapy. *Cancer Res* 2009;69(8):3241-4.
98. Sharma A, Trivedi NR, Zimmerman MA, Tuveson DA, Smith CD, Robertson GP. Mutant V599EB-Raf regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors. *Cancer Res* 2005;65(6):2412-21.
99. Velazquez OC, Herlyn M. The vascular phenotype of melanoma metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2003;20(3):229-35.
100. Rofstad EK, Halsor EF. Vascular endothelial growth factor, interleukin 8, platelet-derived endothelial cell growth factor, and basic fibroblast growth factor promote angiogenesis and metastasis in human melanoma xenografts. *Cancer Res* 2000;60(17):4932-8.

101. Bartlett JB, Michael A, Clarke IA, Dredge K, Nicholson S, Kristeleit H, et al. Phase I study to determine the safety, tolerability and immunostimulatory activity of thalidomide analogue CC-5013 in patients with metastatic malignant melanoma and other advanced cancers. *Br J Cancer* 2004;90(5):955-61.
102. Perez DG, Suman VJ, Fitch TR, Amatruda T, 3rd, Morton RF, Jilani SZ, et al. Phase 2 trial of carboplatin, weekly paclitaxel, and biweekly bevacizumab in patients with unresectable stage IV melanoma: a North Central Cancer Treatment Group study, N047A. *Cancer* 2009;115(1):119-27.
103. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363(8):711-23.
104. Ebrahimnejad A, Streichert T, Nollau P, Horst AK, Wagener C, Bamberger AM, et al. CEACAM1 enhances invasion and migration of melanocytic and melanoma cells. *Am J Pathol* 2004;165(5):1781-7.
105. Markel G, Seidman R, Cohen Y, Besser MJ, Sinai TC, Treves AJ, et al. Dynamic expression of protective CEACAM1 on melanoma cells during specific immune attack. *Immunology* 2009;126(2):186-200.
106. Markel G, Ortenberg R, Seidman R, Sapoznik S, Koren-Morag N, Besser MJ, et al. Systemic dysregulation of CEACAM1 in melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 2010;59(2):215-30.
107. Fidler IJ. Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nat New Biol* 1973;242(118):148-9.
108. Raz A, McLellan WL, Hart IR, Bucana CD, Hoyer LC, Sela BA, et al. Cell surface properties of B16 melanoma variants with differing metastatic potential. *Cancer Res* 1980;40(5):1645-51.
109. Mallya M, Campbell RD, Aguado B. Characterization of the five novel Ly-6 superfamily members encoded in the MHC, and detection of cells expressing their potential ligands. *Protein Sci* 2006;15(10):2244-56.
110. Gordon S. Macrophage-restricted molecules: role in differentiation and activation. *Immunol Lett* 1999;65(1-2):5-8.
111. Bronte V, Wang M, Overwijk WW, Surman DR, Pericle F, Rosenberg SA, et al. Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells. *J Immunol* 1998;161(10):5313-20.
112. Gabrilovich D, Ishida T, Oyama T, Ran S, Kravtsov V, Nadaf S, et al. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* 1998;92(11):4150-66.
113. Yamamoto Y, Ishigaki H, Ishida H, Itoh Y, Noda Y, Ogasawara K. Analysis of splenic Gr-1<sup>int</sup> immature myeloid cells in tumor-bearing mice. *Microbiol Immunol* 2008;52(1):47-53.
114. Narita Y, Wakita D, Ohkur T, Chamoto K, Nishimura T. Potential differentiation of tumor bearing mouse CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> immature myeloid cells into both suppressor macrophages and immunostimulatory dendritic cells. *Biomed Res* 2009;30(1):7-15.
115. Cao W, Liu YJ. Innate immune functions of plasmacytoid dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 2007;19(1):24-30.
116. Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* 2000;1(3):199-205.

117. den Haan JM, Bevan MJ. Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 2002;196(6):817-27.
118. Herber DL, Cao W, Nefedova Y, Novitskiy SV, Nagaraj S, Tyurin VA, et al. Lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer. *Nat Med* 2010;16(8):880-6.
119. Yi H, Yu X, Gao P, Wang Y, Baek SH, Chen X, et al. Pattern recognition scavenger receptor SRA/CD204 down-regulates Toll-like receptor 4 signaling-dependent CD8 T-cell activation. *Blood* 2009;113(23):5819-28.
120. Jacobson AC, Roundy KM, Weis JJ, Weis JH. Regulation of murine splenic B cell CR3 expression by complement component 3. *J Immunol* 2009;183(6):3963-70.
121. Cheng LE, Wang ZE, Locksley RM. Murine B cells regulate serum IgE levels in a CD23-dependent manner. *J Immunol* 2010;185(9):5040-7.
122. Rochman Y, Spolski R, Leonard WJ. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat Rev Immunol* 2009;9(7):480-90.
123. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008;133(5):775-87.
124. Thies A, Moll I, Berger J, Wagener C, Brummer J, Schulze HJ, et al. CEACAM1 expression in cutaneous malignant melanoma predicts the development of metastatic disease. *J Clin Oncol* 2002;20(10):2530-6.
125. Schuchter L, Schultz DJ, Synnestvedt M, Trock BJ, Guerry D, Elder DE, et al. A prognostic model for predicting 10-year survival in patients with primary melanoma. The Pigmented Lesion Group. *Ann Intern Med* 1996;125(5):369-75.
126. Beauchemin N, Kunath T, Robitaille J, Chow B, Turbide C, Daniels E, et al. Association of biliary glycoprotein with protein tyrosine phosphatase SHP-1 in malignant colon epithelial cells. *Oncogene* 1997;14(7):783-90.
127. Busch C, Hanssen TA, Wagener C, B OB. Down-regulation of CEACAM1 in human prostate cancer: correlation with loss of cell polarity, increased proliferation rate, and Gleason grade 3 to 4 transition. *Hum Pathol* 2002;33(3):290-8.
128. Markel G, Seidman R, Stern N, Cohen-Sinai T, Izhaki O, Katz G, et al. Inhibition of human tumor-infiltrating lymphocyte effector functions by the homophilic carcinoembryonic cell adhesion molecule 1 interactions. *J Immunol* 2006;177(9):6062-71.
129. Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 2002;20:217-51.
130. Markel G, Lieberman N, Katz G, Arnon TI, Lotem M, Drize O, et al. CD66a interactions between human melanoma and NK cells: a novel class I MHC-independent inhibitory mechanism of cytotoxicity. *J Immunol* 2002;168(6):2803-10.
131. Boulton IC, Gray-Owen SD. Neisserial binding to CEACAM1 arrests the activation and proliferation of CD4+ T lymphocytes. *Nat Immunol* 2002;3(3):229-36.
132. Pantelic M, Kim YJ, Bolland S, Chen I, Shively J, Chen T. Neisseria gonorrhoeae kills carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 (CD66a)-expressing human B cells and inhibits antibody production. *Infect Immun* 2005;73(7):4171-9.
133. Besser MJ, Shapira-Frommer R, Treves AJ, Zippel D, Itzhaki O, Hershkovitz L, et al. Clinical responses in a phase II study using adoptive transfer of short-

- term cultured tumor infiltration lymphocytes in metastatic melanoma patients. *Clin Cancer Res* 2010;16(9):2646-55.
134. Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive cell transfer therapy. *Semin Oncol* 2007;34(6):524-31.
135. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008;8(8):618-31.
136. Lin EY, Li JF, Gnatovskiy L, Deng Y, Zhu L, Grzesik DA, et al. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res* 2006;66(23):11238-46.
137. Pucci F, Venneri MA, Biziato D, Nonis A, Moi D, Sica A, et al. A distinguishing gene signature shared by tumor-infiltrating Tie2-expressing monocytes, blood "resident" monocytes, and embryonic macrophages suggests common functions and developmental relationships. *Blood* 2009;114(4):901-14.
138. Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest* 2007;117(5):1155-66.
139. Shaul ME, Bennett G, Strissel KJ, Greenberg AS, Obin MS. Dynamic, M2-like remodeling phenotypes of CD11c+ adipose tissue macrophages during high-fat diet-induced obesity in mice. *Diabetes* 2010;59(5):1171-81.
140. Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, Carmeliet P. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat Rev Cancer* 2008;8(12):942-56.
141. Schwartz JD, Rowinsky EK, Youssoufian H, Pytowski B, Wu Y. Vascular endothelial growth factor receptor-1 in human cancer: concise review and rationale for development of IMC-18F1 (Human antibody targeting vascular endothelial growth factor receptor-1). *Cancer* 2010;116(4 Suppl):1027-32.
142. Duda DG, Jain RK. Premetastatic lung "niche": is vascular endothelial growth factor receptor 1 activation required? *Cancer Res* 2010;70(14):5670-3.
143. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005;438(7069):820-7.
144. Berg EL, Robinson MK, Mansson O, Butcher EC, Magnani JL. A carbohydrate domain common to both sialyl Le(a) and sialyl Le(X) is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1. *J Biol Chem* 1991;266(23):14869-72.
145. Takada A, Ohmori K, Takahashi N, Tsuyuoka K, Yago A, Zenita K, et al. Adhesion of human cancer cells to vascular endothelium mediated by a carbohydrate antigen, sialyl Lewis A. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;179(2):713-9.
146. Bjorndahl M, Cao R, Nissen LJ, Clasper S, Johnson LA, Xue Y, et al. Insulin-like growth factors 1 and 2 induce lymphangiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(43):15593-8.
147. Brantley-Sieders DM, Fang WB, Hicks DJ, Zhuang G, Shyr Y, Chen J. Impaired tumor microenvironment in EphA2-deficient mice inhibits tumor angiogenesis and metastatic progression. *FASEB J* 2005;19(13):1884-6.
148. Singh RK, Gutman M, Radinsky R. Heterogeneity of cytokine and growth factor gene expression in human melanoma cells with different metastatic potentials. *J Interferon Cytokine Res* 1995;15(1):81-7.
149. Reed JA, McNutt NS, Prieto VG, Albino AP. Expression of transforming growth factor-beta 2 in malignant melanoma correlates with the depth of tumor invasion. Implications for tumor progression. *Am J Pathol* 1994;145(1):97-104.

150. Yurkovetsky ZR, Kirkwood JM, Edington HD, Marrangoni AM, Velikokhatnaya L, Winans MT, et al. Multiplex analysis of serum cytokines in melanoma patients treated with interferon-alpha2b. *Clin Cancer Res* 2007;13(8):2422-8.
151. Nemunaitis J, Fong T, Shabe P, Martineau D, Ando D. Comparison of serum interleukin-10 (IL-10) levels between normal volunteers and patients with advanced melanoma. *Cancer Invest* 2001;19(3):239-47.
152. Zhang Y, Liu S, Liu J, Zhang T, Shen Q, Yu Y, et al. Immune complex/Ig negatively regulate TLR4-triggered inflammatory response in macrophages through Fc gamma RIIb-dependent PGE2 production. *J Immunol* 2009;182(1):554-62.
153. Dunne JL, Collins RG, Beaudet AL, Ballantyne CM, Ley K. Mac-1, but not LFA-1, uses intercellular adhesion molecule-1 to mediate slow leukocyte rolling in TNF-alpha-induced inflammation. *J Immunol* 2003;171(11):6105-11.
154. Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature* 1988;334(6179):260-2.
155. Lang R, Rutschman RL, Greaves DR, Murray PJ. Autocrine deactivation of macrophages in transgenic mice constitutively overexpressing IL-10 under control of the human CD68 promoter. *J Immunol* 2002;168(7):3402-11.
156. Montaner LJ, da Silva RP, Sun J, Sutterwala S, Hollinshead M, Vaux D, et al. Type 1 and type 2 cytokine regulation of macrophage endocytosis: differential activation by IL-4/IL-13 as opposed to IFN-gamma or IL-10. *J Immunol* 1999;162(8):4606-13.
157. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 2001;409(6817):198-201.
158. Feng J, Han J, Pearce SF, Silverstein RL, Gotto AM, Jr., Hajjar DP, et al. Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR-gamma. *J Lipid Res* 2000;41(5):688-96.
159. Beyersdorf N, Ding X, Tietze JK, Hanke T. Characterization of mouse CD4 T cell subsets defined by expression of KLRG1. *Eur J Immunol* 2007;37(12):3445-54.
160. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnica-Worms DR, et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 2007;27(4):635-46.
161. Colonna M. Cytolytic responses: cadherins put out the fire. *J Exp Med* 2006;203(2):261-4.
162. Kalia V, Sarkar S, Subramaniam S, Haining WN, Smith KA, Ahmed R. Prolonged interleukin-2Ralpha expression on virus-specific CD8+ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. *Immunity* 2010;32(1):91-103.
163. Hershkovitz L, Schachter J, Treves AJ, Besser MJ. Focus on adoptive T cell transfer trials in melanoma. *Clin Dev Immunol* 2010;2010:260267.
164. Guo H, Qian X. Clinical applications of adoptive natural killer cell immunotherapy for cancer: current status and future prospects. *Onkologie* 2010;33(7):389-95.
165. Garrod KR, Wei SH, Parker I, Cahalan MD. Natural killer cells actively patrol peripheral lymph nodes forming stable conjugates to eliminate MHC-mismatched targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(29):12081-6.
166. Margraf-Schonfeld S, Bohm C, Watzl C. Glycosylation affects ligand binding and function of the activating natural killer cell receptor 2B4 (CD244) protein. *J Biol Chem* 2011;286(27):24142-9.

167. Daniels MA, Devine L, Miller JD, Moser JM, Lukacher AE, Altman JD, et al. CD8 binding to MHC class I molecules is influenced by T cell maturation and glycosylation. *Immunity* 2001;15(6):1051-61.
168. Crespo HJ, Cabral MG, Teixeira AV, Lau JT, Trindade H, Videira PA. Effect of sialic acid loss on dendritic cell maturation. *Immunology* 2009;128(1 Suppl):e621-31.
169. Konjevic G, Mirjagic Martinovic K, Vuletic A, Jovic V, Jurisic V, Babovic N, et al. Low expression of CD161 and NKG2D activating NK receptor is associated with impaired NK cell cytotoxicity in metastatic melanoma patients. *Clin Exp Metastasis* 2007;24(1):1-11.

# 11. Anhang

## 11.1 Vektorkarten

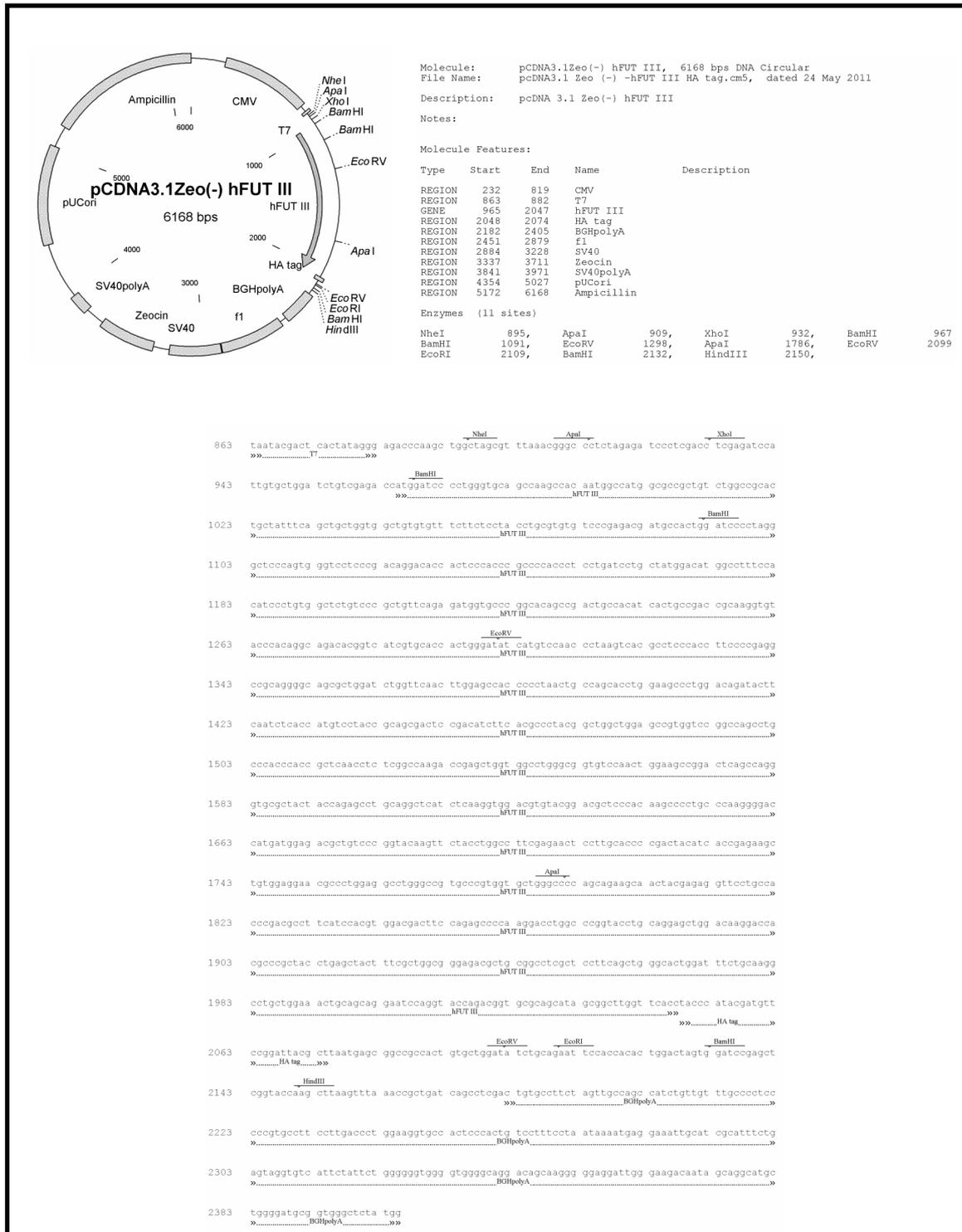


Abbildung 78: Vektorkarte pCDNA3.1(-)<sup>Zeo</sup>-hFUTIII

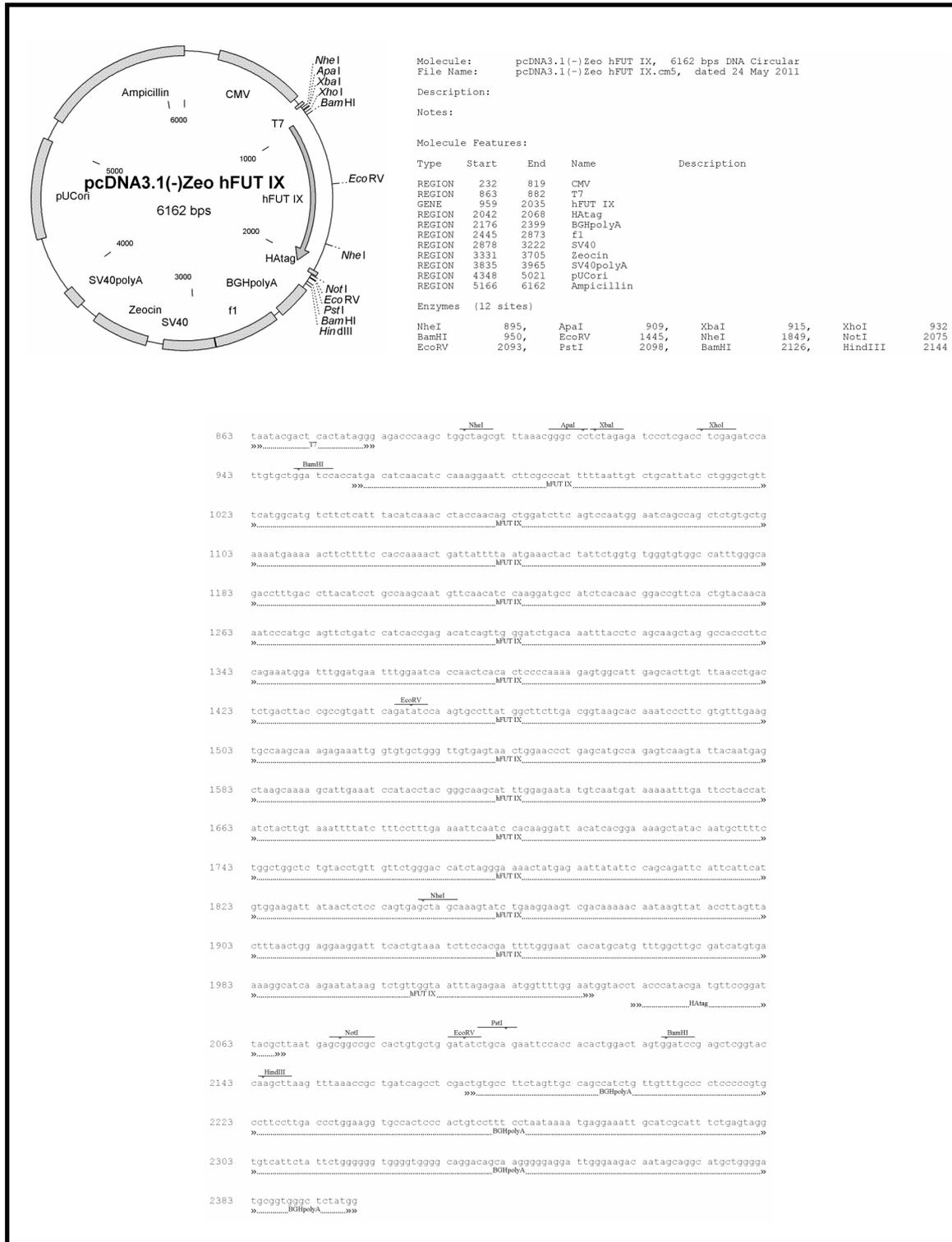


Abbildung 79: Vektorkarte pcDNA3.1(-)<sup>Zeo</sup>-hFUTIX

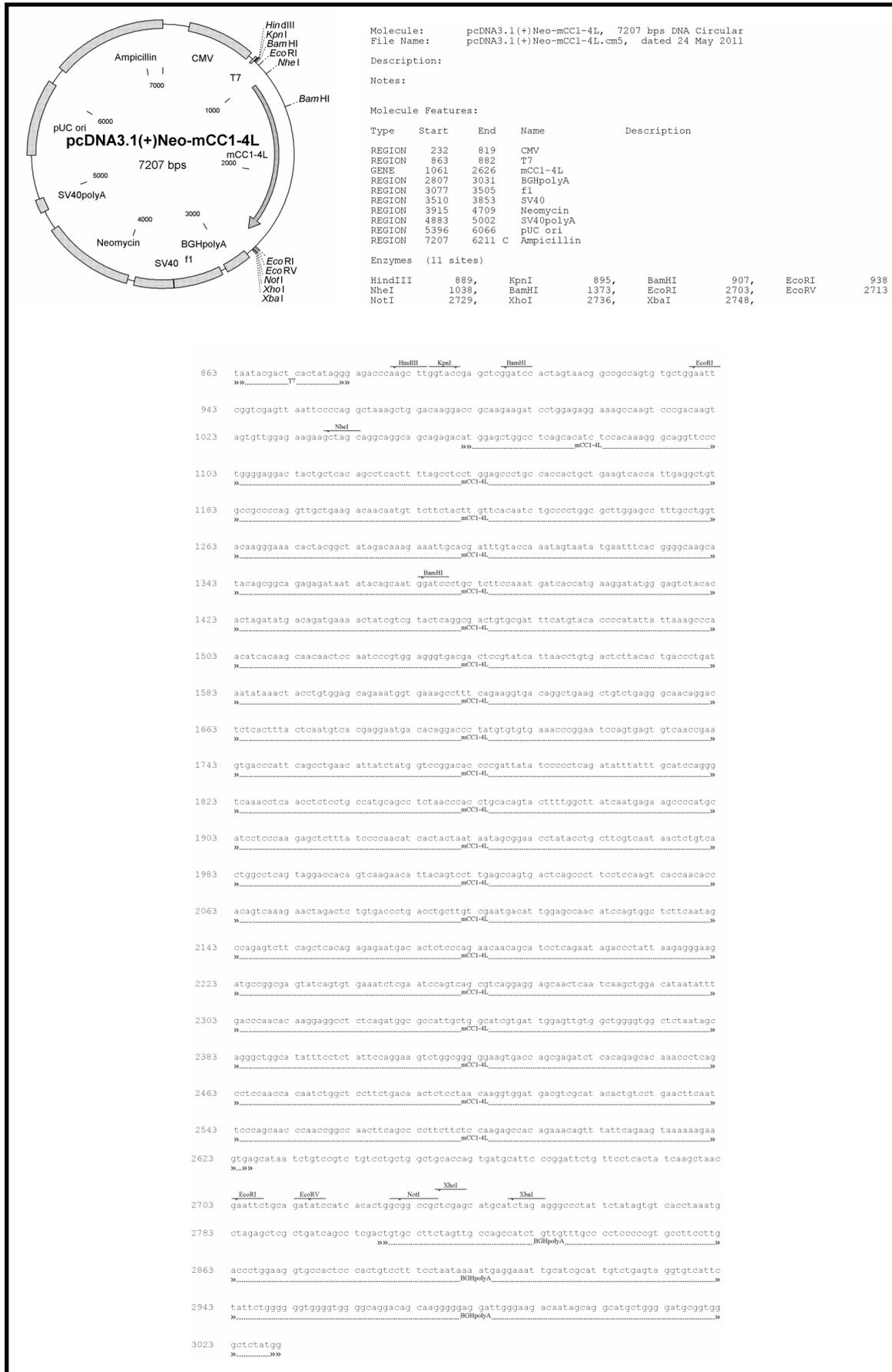
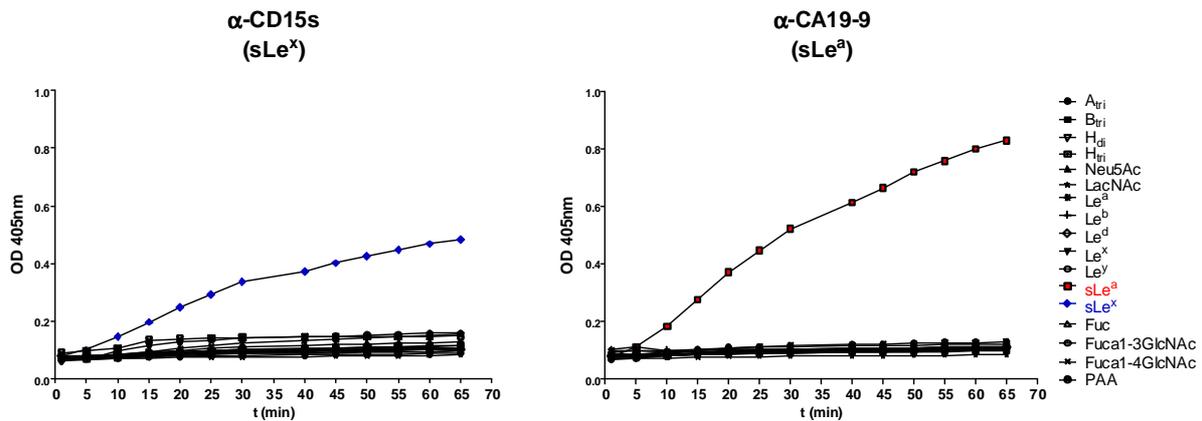


Abbildung 80: Vektorkarte pcDNA3.1(+)<sup>Neo</sup>-mCC1-4L

## 11.2 ELISA-Assay Antikörperprüfung



Glykokonjugat	Saccharid-Einheiten	Struktur
α-N-Acetylneuraminsäure	Mono	Neu5Acα-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH-
α-L-fucose	Mono	Fuca-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH-
Fuca3GlcNAc	Di	Fuca1-3GlcNAcβ-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH-
Fuca4GlcNAc	Di	Fuca1-4GlcNAcβ-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH-
H <sub>di</sub>	Di	Fuca1-2Galβ-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH-
Lac-di-NAc	Di	GalNAcβ1-4GlcNAcβ-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH-
A <sub>tri</sub>	Tri	Fuca1-2 Galβ-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH- GalNAcα1-3
B <sub>tri</sub>	Tri	Fuca1-2 Galβ-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH- Galα1-3
H <sub>tri</sub>	Tri	Fuca1-2Galβ1-3GalNAcα-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH-
Le <sup>a</sup>	Tri	Fuca1-4 GlcNAcβ-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH- Galβ1-3
Le <sup>d</sup>	Tri	Fuca1-2Galβ1-3GlcNAcβ-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH-
Le <sup>x</sup>	Tri	Fuca1-3 GlcNAcβ-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH- Galβ1-4
Le <sup>b</sup>	Tetra	Fuca1-4 GlcNAcβ-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH- Fuca1-2Galβ1-3
Le <sup>y</sup>	Tetra	Fuca1-3 GlcNAcβ-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH- Fuca1-2Galβ1-4
sLe <sup>a</sup>	Tetra	Fuca1-4 GlcNAcβ-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH- Neu5Acα2-3Galβ1-3
sLe <sup>x</sup>	Tetra	Fuca1-3 GlcNAcβ-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH- Neu5Acα2-3Galβ1-4

**Abbildung 81: ELISA-Assay Antikörperprüfung**

Kontrolle der Bindungsspezifität der eingesetzten α-CD15s (sLe<sup>x</sup>) und α-CA19-9 (sLe<sup>a</sup>) Antikörper zum Ausschluss einer Kreuzreaktivität zwischen sLe<sup>x</sup> und sLe<sup>a</sup> Kohlenhydratepitopen. Der Assay wurde durchgeführt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Naghmeh Mortezaei, Institut für Klinische Chemie, UKE, Hamburg. Die Glykokonjugate wurden bezogen von der Firma Lectinity, Moskau, Russland.

## 12. Danksagung

Diese Arbeit wurde nur durch die Mithilfe und Unterstützung vieler Menschen möglich. All jenen möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Wagener, der mich in seine Abteilung aufnahm und mir damit die Anfertigung dieser Arbeit überhaupt erst ermöglichte, und Frau Dr. Andrea Horst für ihre fachmännische Betreuung *vor Ort* und unerlässliche Unterstützung und Hilfe bei allen großen und kleinen Problemen.

Ferner möchte ich mich zunächst im Allgemeinen bei der gesamten Abteilung der Klinischen Chemie für die freundliche Aufnahme *in ihre Mitte* bedanken.

Und im Besonderen bei Christa Reinhold, Krimhild Scheike, Inke Stange, Birgitt Klampe, Helwe Gerull und Julia Kemmling, die immer für mich mit Rat und Tat, und zur Not auch mit aufmunternden Worten, bereit standen.

Bei Dr. Thomas Bickert für die Einführung und Analytik der FACS und überhaupt, bei Dr. Naghmeh Mortezaei und Dr. Annika Kurze für ihre Hilfe und die witzigen Gespräche, bei den Mitgliedern der Microarray-Gruppe unter Dr. Thomas Streichert, Dr. Benjamin Otto, Dr. Heike Pospisil und Kristin Klätschke für die Lymphknotenanalysen, bei Dr. Peter Nollau für das Philosophieren beim gemeinsamen „Beine vertreten“, bei Dr. Daniel Wicklein für die vielen Tipps und Tricks, bei Dr. Alexandra Samsen für die nette gemeinsame Zeit am Schreibplatz und bei Prof. Hans-Willi Mittrücker und Dr. Timo Lischke für die spontanen Flurgespräche zu immunologischen Fragen (und bestimmt hab´ ich noch jemanden vergessen).

Und schlussendlich bei meinen geliebten Eltern, die mich bei meinen Besuchen in der Heimat immer wieder motiviert haben *durchzuhalten...*

### **13. Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den

---

(Autor)