

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Die Rolle des *Macrophage-migration-inhibitory-factor-*
Homologs D-dopachrome tautomerase
im murinen Tumormodell**

Dissertation

zum

Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Luisa Maria Hofer

aus München

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. rer. nat. Heike Pohla

Prof. Dr. med. Simon Rothenfuß

Priv. Doz. Dr. med. Dominik Rüttinger

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter:

Priv. Doz. Dr. med. Sebastian Kobold
Dr. rer. nat. Melanie Merk

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung:

23.07.2015

Für Sigrid, Beppo,
Ann-Kathrin, Christian
und Sebastian

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | EINLEITUNG..... | 1 |
| 1.1 | Zytokine als Mediatoren in der Tumorentwicklung..... | 1 |
| 1.2 | Die Rolle des proinflammatorischen Zytokins MIF im Tumor..... | 1 |
| 1.2.1 | MIF als Entzündungsmediator..... | 1 |
| 1.2.2 | MIF als Biomarker verschiedener Tumorentitäten | 2 |
| 1.2.3 | Der Wachstumsfaktor MIF | 3 |
| 1.2.4 | Inhibition von MIF als therapeutischer Ansatz | 4 |
| 1.3 | D-DT als weiterer Ligand für CD74 | 5 |
| 1.4 | D-DT als strukturelles Homolog von MIF..... | 5 |
| 1.5 | D-DT als funktionelles Homolog von MIF | 7 |
| 1.5.1 | Expressions- und Sekretionsmuster von D-DT..... | 7 |
| 1.5.2 | D-DT als proinflammatorisches Zytokin..... | 8 |
| 1.5.3 | Die Rolle von D-DT im Tumor | 9 |
| 2 | ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG | 12 |
| 3 | MATERIAL | 13 |
| 3.1 | Material..... | 13 |
| 3.2 | Geräte..... | 13 |
| 3.3 | Chemikalien und Reagenzien | 14 |
| 3.4 | Medien, Puffer und Lösungen | 16 |
| 3.5 | ELISA und <i>Western-blot</i> -Antikörper | 19 |
| 3.6 | <i>Fluorescence-activated cell sorting</i> (FACS)-Antikörper | 20 |
| 3.7 | DNA-Primer | 20 |
| 3.8 | siRNA-Sequenzen | 21 |
| 3.9 | Zelllinien, Bakterien und Plasmide | 21 |
| 4 | METHODEN..... | 22 |
| 4.1 | Molekularbiologische Methoden..... | 22 |
| 4.1.1 | Isolation von RNA und Herstellung von cDNA..... | 22 |
| 4.1.2 | PCR-Amplifikation und Agarosegel | 22 |
| 4.1.3 | Quantitative PCR | 23 |
| 4.1.4 | Lipofektion mit <i>Antisense</i> -siRNA | 23 |
| 4.2 | Proteinchemische und immunologische Methoden | 24 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.2.1 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 24 |
| 4.2.2 | <i>Western blot</i> | 24 |
| 4.2.3 | Muriner D-DT-ELISA..... | 25 |
| 4.3 | Funktionelle Assays..... | 25 |
| 4.3.1 | BrdU-Proliferations-Assay..... | 25 |
| 4.3.2 | Apoptose-Assay mit Annexin V/PI..... | 26 |
| 4.3.3 | LDH-Zellviabilitäts-Assay | 26 |
| 4.4 | Zellkultur | 26 |
| 4.5 | Herstellung von polyklonalem anti-D-DT-Antikörper..... | 27 |
| 4.5.1 | Überexpression von murinem D-DT | 27 |
| 4.5.2 | Aufreinigung von polyklonalem anti-D-DT-Antikörper..... | 28 |
| 4.6 | Tierexperimentelle Methoden..... | 28 |
| 4.6.1 | Tumorinduktion | 28 |
| 4.6.2 | Serum | 28 |
| 4.6.3 | Herstellung von Organlysaten zur Zytokinbestimmung..... | 29 |
| 4.6.4 | Isolierung von Splenozyten | 29 |
| 4.6.5 | Antikörperbehandlung | 29 |
| 4.7 | Statistische Analyse..... | 29 |
| 5 | ERGEBNISSE..... | 31 |
| 5.1 | Charakterisierung des Zytokins D-DT im murinen Tumormodell | 31 |
| 5.1.1 | D-DT-Konzentration in Seren von tumortragenden Mäusen..... | 31 |
| 5.1.2 | Expression und Sekretion von D-DT in Tumorzellen | 32 |
| 5.1.3 | Expressionsprofil von D-DT in tumortragenden Mäusen | 33 |
| 5.1.4 | Expression und Sekretion von D-DT in Splenozyten | 34 |
| 5.1.5 | Expression der Oberflächenrezeptoren CD74, CXCR2 und CXCR4 | 35 |
| 5.1.6 | <i>Antisense</i> -siRNA- <i>knock-down</i> von D-DT in Tumorzellen..... | 36 |
| 5.1.7 | Viabilität der siRNA-behandelten Zellen..... | 39 |
| 5.2 | Neutralisation von D-DT <i>in vivo</i> | 40 |
| 5.2.1 | Herstellung eines funktionellen anti-D-DT-Antikörpers | 40 |
| 5.2.2 | Anti-D-DT-Antikörperbehandlung im B16F10-Tumormodell | 42 |
| 6 | DISKUSSION | 43 |
| 6.1 | Erhöhte D-DT-Serumkonzentration im 4T1- und B16F10-Tumormodell..... | 43 |
| 6.1.1 | Mögliche Quellen für die erhöhte D-DT-Serumkonzentration | 43 |
| 6.1.2 | Diagnostische Relevanz der erhöhten Serumkonzentration | 46 |
| 6.2 | Auto- und parakrine Funktion von D-DT..... | 47 |
| 6.2.1 | Rezeptorprofil für autokrine Stimulation | 47 |
| 6.2.2 | Parakrine Immunmodulation durch D-DT in der Tumorgenese..... | 48 |
| 6.2.3 | Parakrine Rolle in der Angiogenese | 49 |
| 6.3 | Tumorfördernde Effekte von D-DT | 50 |
| 6.3.1 | D-DT als proliferativer Stimulus..... | 50 |
| 6.3.2 | Anti-apoptotische Eigenschaft von D-DT..... | 52 |
| 6.4 | D-DT-Inhibition verzögert das Tumorwachstum | 52 |

| | | |
|-----|--------------------------------------|----|
| 6.5 | Potenzielle klinische Bedeutung..... | 54 |
| 7 | ZUSAMMENFASSUNG | 56 |
| 8 | LITERATURVERZEICHNIS | 57 |
| 9 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | 65 |
| 10 | VERÖFFENTLICHUNGEN..... | 68 |
| 11 | DANKSAGUNG..... | 69 |

1 Einleitung

1.1 Zytokine als Mediatoren in der Tumorentwicklung

Zytokine sind Proteine oder Glykoproteine, die von Zellen des Körpers gebildet werden. Als extrazelluläre oder membrangebundene Botenstoffe dienen sie zur Regulierung verschiedener zellspezifischer Funktionen, vor allem der Immunantwort (Parmiani et al., 2000). Auto- und parakrine Sekretion führen zur Aktivierung oder Inhibition des angeborenen (Monozyten und Makrophagen) oder adaptiven (T- und B-Zellen) Immunsystems. Pleiotropismus und Redundanz erschweren die Erforschung der Eigenschaften von ausgewählten Zytokinen, deren individuelle Aktivität häufig wiederum von den in der Umgebung anwesenden weiteren Zytokinen abhängt (Dranoff, 2004).

Die Zusammensetzung des umgebenden Mikromilieus spielt in der Tumorentwicklung eine entscheidende Rolle. Meist steht eine zu geringe Aktivierung des körpereigenen Immunsystems zur Abwehr von Tumorzellen einem ungehinderten Tumorwachstum gegenüber. Zytokine spielen in beiden Prozessen eine Rolle. In den frühen Phasen der Tumorentwicklung werden durch die Zytokine Tumorwachstum, -differenzierung und Apoptose reguliert, später können sie die Invasion, Metastasierung und die Bildung neuer Blutgefäße ermöglichen (Dranoff, 2004).

1.2 Die Rolle des proinflammatorischen Zytokins MIF im Tumor

1.2.1 MIF als Entzündungsmediator

1966 wurde *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) als eines der ersten Zytokine beschrieben (Bloom und Bennett, 1966, David, 1966). MIF wurde zunächst als proinflammatorisches Zytokin mit Funktionen in der angeborenen und adaptiven Immunabwehr charakterisiert. Das als Homotrimer vorliegende Zytokin wird von T-Zellen und Makrophagen nach Stimulation mit Endotoxinen oder inflammatorischen Zytokinen, wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interferon- γ (IFN- γ), auto- und parakrin sezerniert (Calandra et al., 1994). Das freigewordene MIF bindet an den *Cluster of differentiation* (CD)74/CD44 –Rezeptorkomplex (Shi et al. 2006). Die *Extracellular-signal regulated kinase 1/2* (ERK1/2)-*Mitogen-activated protein* (MAP)-Kinase-Signalkaskade wird aktiviert, wodurch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IFN- γ , Interleukin (IL)-12 und IL-1 β freigesetzt werden. Durch Hemmung der erhöhten inhibitorischen κ B (I κ B α)-Transkription wirkt MIF der immunsuppressiven Wirkung

von Glukokortikoiden entgegen (Daun und Cannon, 2000). Nach Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulation kommt es trotz der Gabe von Dexamethason mit Hilfe von rekombinantem MIF zu einer vermehrten TNF- α -Produktion in Makrophagen (Merk et al., 2011). Eine Neutralisation von MIF limitiert akut und chronisch entzündliche Erkrankungen, wie Koliden (de Jong et al., 2001), Arteriosklerose (Schober et al., 2004) und Sepsis (Calandra et al., 2000). Zudem wirkt MIF als Ligand der beiden Chemokinrezeptoren CXC-Motiv Chemokinrezeptor (CXCR) 2 und CXCR4 auf T-Zellen und Makrophagen immunmodulatorisch (Bernhagen et al., 2007). Chemotaktisch werden Leukozyten angelockt und durch Hemmung der ungerichteten Migration zum Arrest im entzündlichen Gewebe gezwungen. Diese Wirkung war für dieses Zytokin namensgebend: *Macrophage migration inhibitory factor*.

1.2.2 MIF als Biomarker verschiedener Tumorentitäten

Neben den proinflammatorischen Eigenschaften scheint das Zytokin MIF in weiteren biologischen Prozessen, zum Beispiel in der Tumorentstehung, eine wichtige Rolle zu spielen. In mehreren Tumorentitäten, wie dem metastasierenden Adenokarzinom der Prostata (Meyer-Siegler et al., 1998), dem kolorektalen Karzinom (He et al., 2009), dem hepatozellulären Karzinom (Ren et al., 2003), dem Adenokarzinom der Lunge (Kamimura et al., 2000), dem Brustkrebs (Bando et al., 2002), dem Melanom (Shimizu et al., 1999), dem klarzelligen Nierenzellkarzinom (Du et al., 2013) und dem Glioblastom (Markert, JM 2001, Bacher et al. 2003) konnte eine Überexpression von MIF im Vergleich zu normalem Gewebe nachgewiesen werden.

In einigen Tumoren ist eine Korrelation zwischen Tumorstadium beziehungsweise Zelldifferenzierung und der Expression von MIF erkennbar. So kann immunhistochemisch mit zunehmender Entdifferenzierung des Adenokarzinoms der Prostata signifikant weniger MIF detektiert werden (del Vecchio et al., 2000). Anders bei Untersuchungen zum kolorektalen Karzinom: Hier konnte mit zunehmendem Schweregrad mehr Zytokin im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Die Zytokinmenge korrelierte außerdem positiv mit dem Risiko zur hepatischen Metastasierung und Lymphknoteninvasion (He et al., 2009).

Im Serum von Patienten mit Prostatakarzinom (Meyer-Siegler et al., 2002) und kolorektalem Karzinom (He et al., 2009) ist die Konzentration von MIF verglichen zu gesunden Probanden erhöht.

1.2.3 Der Wachstumsfaktor MIF

Die erhöhte Konzentration von MIF im Tumorgewebe und Serum von Krebskranken lässt eine wichtige Rolle des Proteins in der Tumorentstehung vermuten. Bekannt ist, dass einige inflammatorische Zytokine, wie zum Beispiel IL-6, als autokrine Wachstumsfaktoren im metastasierten Melanom zum Tumorwachstum beitragen (Lu und Kerbel, 1993). So könnte auch MIF einen autokrinen Wachstumsfaktor für Tumorzellen darstellen. Versuche in NIH/3T3-Fibroblasten zeigen MIF als exokrinen Wachstumsfaktor. Steigende Konzentrationen von rekombinantem Protein im Medium erhöhen das Zellwachstum. MIF unterhält den Zellzyklus, indem es zu einer MAP-Kinase-Kaskade-abhängigen Hochregulation von Zyklin D1 kommt (Mitchell et al., 1999, Liao et al., 2003). Eine anti-MIF-*short-hairpin*-Ribonukleinsäure (shRNA) supprimiert das Wachstum von CT26-Tumorzellen (Takahashi et al., 1998). Dies untermauert die Hypothese, dass MIF als autokriner Wachstumsfaktor die Proliferation immortalisierter Zellen fördert.

Tumore wachsen aufgrund der vermehrten Zellteilung, aber auch infolge verminderter Apoptose. Das Protein p53 als „Wächter“ der Desoxyribonukleinsäuren (DNA)-Stabilität verhindert durch Einleitung der Apoptose die weitere Proliferation von mutierten Zellen und somit die Tumorgenese. Behandelt man Fibroblasten mit rekombinantem MIF, werden die p53-abhängigen Transkriptionszielstrukturen p21 und Zyklin G vermindert exprimiert und es kommt seltener zur Induktion der p53-abhängigen Apoptose (Hudson et al., 1999). Fibroleiomyosarkome zeigen deshalb in *Wild-type (wt)*-Mäusen eine höhere Mitoserate und ein stärkeres Tumorwachstum, als in MIF-*knock-out*-Mäusen (Fingerle-Rowson et al., 2003).

Wichtig für das Tumorwachstum ist eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung, die durch die Bildung neuer Gefäßnetze in schnell wachsenden, soliden Tumoren ermöglicht wird. Die Behandlung von G361- beziehungsweise CT26-tumortragenden Mäusen mit anti-MIF-Antikörper reduzierte die Gefäßneubildung (Shimizu et al., 1999, Ogawa et al., 2000). Folglich unterstützt MIF die Neovaskularisation des Tumorgewebes und besitzt damit, neben Förderung des Tumorwachstums und Hemmung der Apoptose, eine weitere protumorale Funktion. Sowohl die Förderung der Tumorpheriferation als auch der Angiogenese konnten in einem Überexpressionsmodell nachgewiesen werden. Die Einführung einer MIF-komplementären DNA (cDNA) unter der Kontrolle eines Cytomegalievirus-Verstärkers und β -Aktin/ β -Globin-Promotors führte zu einem schnelleren Tumorwachstum und einer verstärkten Angiogenese von subkutan injizierten Sarkomzellen im Vergleich zu nicht-transgenen Mäusen (Nishihira et al., 2003).

1.2.4 Inhibition von MIF als therapeutischer Ansatz

Die protumoralen Eigenschaften von MIF rechtfertigen eine gezielte MIF-Inhibition beziehungsweise MIF-Neutralisation durch *small molecules*, *Antisense*-RNA oder Antikörper.

MIF besitzt eine enzymatische Aktivität und katalysiert die Umsetzung der (nicht-physiologischen) Reaktion von *D*-Dopachrom in 5,6-Dihydroxyindol-2-carboxylsäure. Die Insertion eines zusätzlichen Alanins nach der für die Struktur des aktiven Zentrums entscheidenden Aminosäure Prolin-1A führt nicht nur zu einem Verlust der Tautomerase-Aktivität *in vitro*, sondern auch zu einer verminderten, für MIF bekannten, Gegenregulation der immunsuppressiven Eigenschaften von Glukokortikoiden. Mutiertes MIF kann nach LPS-Stimulation von Makrophagen und Zugabe von Glukokortikoiden nicht den erwarteten TNF- α -Anstieg hervorbringen (Lubetsky et al., 2002). Dies führt zu der Annahme, dass das katalytische Zentrum neben der Tautomerase-Aktivität auch für andere biologische Funktionen eine Rolle spielt. Eine Erklärung liefern Experimente mit dem *Small molecule*-Inhibitor ISO-1 ((S,R)-3-(4-Hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-5-isoxazolessigsäuremethylester). Wird die Enzymbindungsstasche durch ISO-1 blockiert, zeigt sich nicht nur eine verminderte Tautomerase-Aktivität, sondern auch eine schwächere Bindung an den CD74-Rezeptor und die damit verbundene Unterdrückung des Zellwachstums. Die Anwendung von ISO-1 *in vitro* führt zu einer Reduktion der Proliferation von Androgen-unabhängigen, CD74-exprimierenden Prostatakarzinomzellen (Meyer-Siegler et al., 2006). Bei einer Behandlung von CT26-tumortragenden Mäusen mit ISO-1 zeigt sich sowohl eine verminderte Tumormasse als auch eine reduzierte Angiogenese (He et al., 2009).

Aufgrund dieser Ergebnisse befinden sich weitere *Small molecule*-Inhibitoren, wie zum Beispiel CPSI-1306, in der präklinischen Entwicklung (Choudhary et al., 2013). Eine weitere Strategie zur Hemmung des Tumorwachstums ist eine *Antisense*-MIF-RNA-Therapie. Nach Anlagerung eines komplementären *Antisense*-RNA-Stranges an die *messenger* RNA (mRNA) von MIF folgt die Degradation der mRNA, die Translation bleibt aus und es kommt zu einer verminderten MIF-Proteinexpression. Sowohl in humanen Melanomzellen als auch in murinen Kolonkarzinomzellen konnte eine Reduktion der Proliferation durch diese Methode erreicht werden (Shimizu et al., 1999, Takahashi et al., 1998).

Auch eine anti-MIF-Antikörpertherapie in Mausmodellen des kolorektalen Karzinoms und B-Zelllymphoms reduzierte das Wachstum der Tumoren (Ogawa et al., 2000, Chesney et al., 1999). Kürzlich wurde die erste klinische Phase I-Studie mit humanem anti-MIF-Antikörper in soliden Tumoren initiiert (Yazji et al., 2013).

Alle drei genannten Therapien (*small molecules*, *Antisense-RNA* oder Antikörper) stellen einen möglichen Ansatz für eine Tumorthherapie dar. Eine Neutralisation von MIF hat möglicherweise keine prohibitiven Nebenwirkungen, da *MIF-knock-out*-Mäuse keinen organpathogenen Phänotyp besitzen (Fingerle-Rowson et al., 2003).

1.3 D-DT als weiterer Ligand für CD74

Ein *knock-out* von MIF kommt dem Phänotyp einer *CD74-knock-out*-Maus nahe, ist aber schwächer ausgeprägt. Die Apoptoserate von *MIF-knock-out*-B-Zellen ist signifikant höher als in B-Zellen von *Wild-type*-Mäusen, aber nur halb so hoch wie in *CD74-knock-out*-Mäusen (Gore et al., 2008).

Ergänzend reduzieren sowohl anti-MIF-Antikörper (exogene Neutralisation) als auch *MIF-knock-out*-Tumorzellen (endogene Depletion) das Tumorwachstum nur moderat (Choi et al., 2012, Nishihira et al., 2003). Diese Unterschiede lassen einen weiteren Liganden für CD74 vermuten. 2011 konnte das Protein *D-dopachrome tautomerase* (D-DT), als weiterer Ligand für CD74 identifiziert werden (Merk et al., 2011). Das neben MIF als einziges der eukaryotischen MIF-Superfamilie zugehörige Protein war bereits 1993 erstmals charakterisiert worden, jedoch konnte ihm bis *dato* keine biologische Funktion zugeschrieben werden (Odh et al., 1993). Die erste funktionelle Charakterisierung von D-DT deutet auf Überschneidungen mit MIF als proinflammatorisches Zytokin hin (Merk et al., 2011).

1.4 D-DT als strukturelles Homolog von MIF

Die Gene für D-DT und MIF liegen sowohl im humanen (Chromosom 22) als auch im murinen (Chromosom 10) Genpool sehr nahe beieinander (0,1 Kilobasen). Der fast identische Aufbau der Exon-Intron-Struktur und drei sehr ähnliche Kodierungssequenzen erhärten die Hypothese, dass die beiden Gene für MIF und D-DT aus einer in einem früheren Stadium der Evolution stattgefundenen Duplikation hervorgegangen sind (Merk et al., 2011). Auf der posttranskriptionalen Ebene sind 50 % der humanen und 40 % der murinen mRNA identisch. Auch wenn sich die beiden Zytokine auf der Proteinebene nur noch zu 34 % (human) beziehungsweise 27 % (murin) ähneln, so ist die tertiäre, mit zwei $\beta\alpha\beta$ -Motiven, und die quartäre Struktur, mit aus drei Monomeren entstehendem zylindrisch geformtem Homotrimer (Abbildung 1), speziesübergreifend hoch konserviert (Sugimoto et al., 1999).

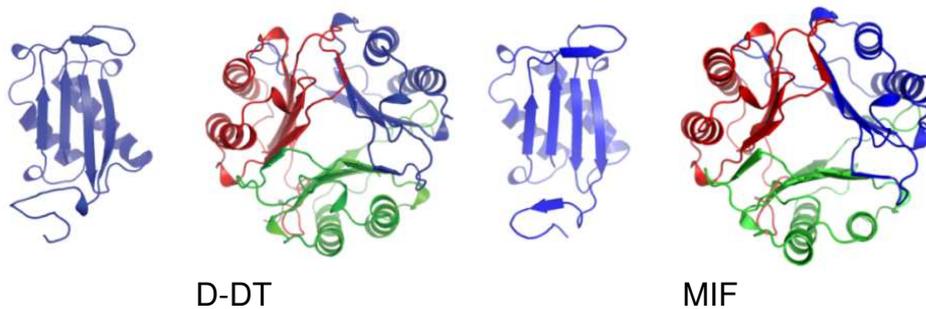


Abbildung 1: Humanes D-DT und MIF. Darstellung der homologen Zytokine in ihrer tertiären und quartären Struktur. Die tertiäre Struktur beinhaltet zwei aufeinanderfolgende $\beta\alpha\beta$ -Motive. Drei dieser Motive ergeben zusammen die quartäre Struktur. Im linken Teil der Abbildungen ist jeweils für D-DT oder MIF das Monomer zu sehen, rechts jeweils das Homotrimer. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. Melanie Merk aus (Merk et al., 2012).

Eine weitere strukturelle Ähnlichkeit bildet das N-terminale Prolin. Es ist sowohl für die Aktivität als Keto-Enol-Tautomerase für MIF und D-DT als auch für die physiologische Bindung von MIF an die Rezeptoren CD74 und CXCR2 (Fingerle-Rowson et al., 2009) entscheidend. Beide Proteine setzen das nicht-physiologische *D*-Dopachrom in 5,6-Dihydroxyindol-2-carboxylsäure (MIF) oder mit einer weiteren Decarboxylierung in 5,6-Dihydroxyindol (D-DT) um. Allerdings besitzt D-DT im Vergleich zu MIF eine deutlich reduzierte katalytische Aktivität.

Als einzige im menschlichen Organismus vorkommenden Substrate konnten bisher *p*-Hydroxyphenylpyruvat und Phenylpyruvat von MIF und D-DT umgesetzt werden (Rosengren et al., 1997a, Rosengren et al., 1997b). Eine zu hohe Michaelis-Konstante und erhebliche Substratkonzentrationen lassen aber auch diese Reaktion als nicht-physiologisch erscheinen. Die Reaktion wird aber als Marker für die biologische Aktivität der Proteine in *in vitro*-Untersuchungen eingesetzt.

Im Säugersystem existiert demnach kein physiologisches Substrat für die Tautomerase-Aktivität von D-DT und MIF. Die Enzymaktivität wird als ein Relikt der Evolution angesehen (Nishihira et al., 1998). Umstritten ist weiterhin, ob D-DT und MIF ihre biologischen Funktionen über eine Protein-Proteininteraktion mit dem N-terminalen Prolin der Enzymbindungs-tasche ausführen (Fingerle-Rowson et al., 2009).

Die folgenden strukturellen Unterschiede lassen die Vermutung zu, dass D-DT und MIF trotz ihrer Ähnlichkeit auch verschiedenartige biologische Funktionen im Körper übernehmen könnten: Der unterschiedliche Aufbau der Bindungstasche kann die Bindung an den CD74- und CXCR2-Rezeptor beeinflussen. D-DT besitzt nur drei (Prolin-1, Lysin-32 und Isoleucin-64) der fünf Aminosäuren, die für die Bindung von MIF an die Rezeptoren wichtig sind, sowie

eine negative anstatt positive Umgebungsladung (Lubetsky et al., 2002, Sugimoto et al., 1999). Außerdem fehlt D-DT das CXXC (zwei Cysteine umgeben zwei beliebige Aminosäuren) und pseudo-(E)LR (Arginin-11, Aspartat-44)-Motiv, die für die Bindung an den CXCR2-Rezeptor entscheidend sind (Weber et al., 2008).

Bisher ist eine Bindung von D-DT an den CD74/CD44-Komplex und das intrazelluläre *c-Jun activation domain-binding protein-1* (JAB1) bekannt. Mit Hilfe einer Oberflächen-Plasmonenresonanz-Spektroskopie konnte eine hoch affine, jedoch verglichen zu MIF 40 % schwächere Bindung von D-DT an den Oberflächenrezeptor CD74 ermittelt werden (Dissoziationskonstante (KD) MIF: $1,4 \times 10^{-9}$ M versus KD D-DT: $5,4 \times 10^{-9}$ M). Sowohl die Bindungsrate (dreifach) als auch die Dissoziationsrate (elffach) ist für D-DT an CD74 größer als für MIF. Aufgrund der durch die Bindungskinetik anzunehmenden kürzeren Verweildauer von D-DT am Rezeptor kann nur durch hohe D-DT-Konzentrationen eine abhängige Phosphorylierung der ERK1/2 MAP-Kinase erreicht werden. Fraglich ist, ob die Bindung von D-DT dieselben Signalkaskaden wie für MIF zur Inhibierung der Apoptose oder Aktivierung des Zellzyklus anstößt oder eine andere Funktion inne hat (Merk et al., 2011).

1.5 D-DT als funktionelles Homolog von MIF

1.5.1 Expressions- und Sekretionsmuster von D-DT

MIF wurde nach seiner Entdeckung aus humanen T-Zellen isoliert (Weiser et al., 1989). Auch in anderen Immunzellen, wie zum Beispiel Makrophagen und B-Zellen, fast ubiquitär in den murinen Organen Herz, Lunge, Leber, Darm, Niere, Milz, Haut und im neuroendokrinen Organ, der Hypophyse (Bernhagen et al., 1993) wird MIF exprimiert. Für das 12,5 Kilodalton (kDa) große und 118 Aminosäuren lange Schwesterprotein D-DT konnte bisher eine niedrige kontinuierliche und nach Stimulation mit Endotoxinen gesteigerte Expression in Makrophagen gezeigt werden. Außerdem wurde das Protein in den Organen Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz, Ovarien und Hoden der Maus nachgewiesen. Die stärkste Expression findet sich im Hoden und in der Leber (Merk et al., 2011). Da D-DT nicht nur in Säugetieren, sondern spezieübergreifend im Fisch, im Fadenwurm und in Protozoen aufzufinden ist, vermutet man, dass es wichtige Funktionen, unter anderem als Immunmodulator, besitzt (Merk et al., 2012).

1.5.2 D-DT als proinflammatorisches Zytokin

Die ersten funktionellen Eigenschaften von D-DT wurden im Rahmen von Entzündungen entdeckt und überschneiden sich weitestgehend mit MIF. Stimuliert man humane oder murine Makrophagen mit LPS, einem Membranbestandteil von Gram-negativen Bakterien, kommt es zu einem Anstieg der Sekretion von D-DT, der nach 16 Stunden seinen Höhepunkt erreicht. Eine ähnliche, aber 20-fach stärkere Dynamik zeigt sich bei MIF (Merk et al., 2011). In Mäusen misst man eine basale, im Vergleich zu MIF leicht erhöhte, D-DT-Plasmakonzentration von circa 6 ng/ml. Nach Injektion von LPS steigt die Plasmakonzentration auf 26 ng/ml an, erreicht jedoch nicht die Konzentration der MIF-Spiegel (Calandra et al., 1994).

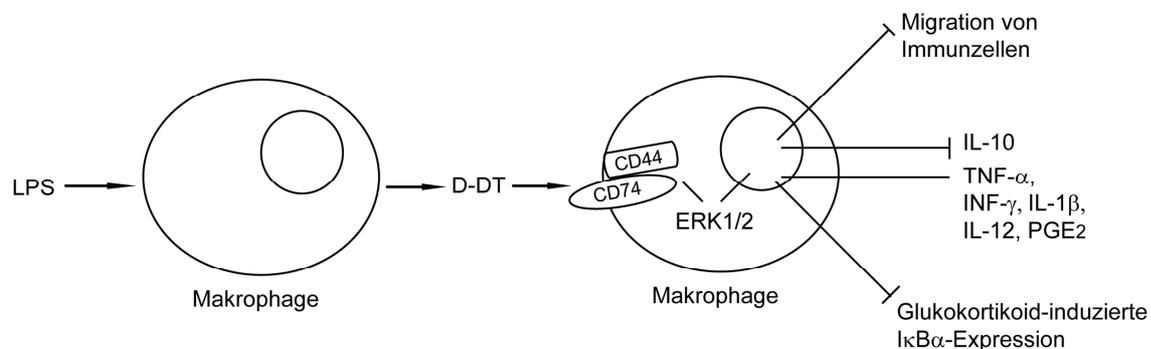


Abbildung 2: D-DT als proinflammatorisches Zytokin. Stimulation mit LPS führt zu einer Sekretion von D-DT in Makrophagen. Anschließende Bindung an den CD74/CD44-Komplex führt über den MAP-Kinase-Signalweg der ERK1/2 zur Hemmung der Migration von Makrophagen und verminderten Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10. Außerdem kommt es zu einer Überexpression von weiteren proinflammatorischen Zytokinen, wie zum Beispiel TNF- α und Prostaglandin E₂ (PGE₂). Durch Intervention in der Expression von I κ B α kommt es zudem zur Hemmung der immun-suppressiven Wirkung von Glukokortikoiden. Abbildung nach (Merk et al., 2011).

Das sezernierte D-DT bindet wiederum an einen CD74/CD44-Komplex auf Makrophagen, der nach Phosphorylierung zu einem Anstoß der ERK1/2-MAP-Kinase-Kaskade führt. Es folgt die Transkription und Expression von weiteren proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1 β und PGE₂ (Abbildung 2).

Weitere für MIF bekannte proinflammatorische Eigenschaften konnten für D-DT, wenn auch in schwächerer Ausprägung, nachgewiesen werden. Der geringe Effekt von D-DT kann durch die sehr kurze Bindung an den CD74-Rezeptor im Vergleich zu MIF erklärt werden. D-DT hemmt dosisabhängig die Monozyten-chemotaktisches Protein-1 (MCP-1)-abhängige Migrationsrate von Makrophagen. Somit kommt es zu einem Arrest der Immunzellen. D-DT hebt ebenso die immunsuppressive Wirkung von Glukokortikoiden im Rahmen einer LPS-

Stimulation auf. Trotz Dexamethasongabe kommt es zu einer Erhöhung der TNF- α -Produktion in Makrophagen (Merk et al., 2011).

Die Blockade von D-DT durch einen Antikörper vor der LPS-Stimulation reduziert die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-12 und führt zu einer Erhöhung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 im Serum. Dies schützt Mäuse vor einem letalen endotoxischen Schock. 79 % der mit anti-D-DT-Antikörper behandelten Mäuse überleben den Endotoxinschock im Vergleich zu 20 % in der Kontrollgruppe. Im Serum von Patienten mit Sepsis zeigt sich eine höhere D-DT-Konzentration verglichen mit gesunden Probanden (Sepsis Patienten: $55,5 \pm 61,3$ ng D-DT pro ml; Kontrollgruppe: $5,9 \pm 3,9$ ng D-DT pro ml). Für D-DT liegt die *receiver operating characteristic* (ROC) bei 0,99, was für eine hohe Spezifität und Sensitivität spricht und D-DT als Biomarker in der Sepsis empfiehlt. Auch deshalb, weil die D-DT-Konzentration mit dem *acute physiology and chronic health evaluation* (APACHE) II Score, der den Schweregrad der Sepsis angibt, positiv korreliert (Merk et al., 2011).

Auch im Rahmen der Ultraviolettstrahlung-B-induzierten Entzündung der Haut steigt die D-DT-Konzentration im Serum stark an (Sonesson et al., 2003). Die genannten Ergebnisse machen deutlich, dass D-DT unter anderem eine Rolle als Immunmodulator im Organismus besitzt.

1.5.3 Die Rolle von D-DT im Tumor

Als erste Funktion für D-DT in der Tumorentwicklung wurde die Induktion des vaskulären Wachstumsfaktors *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und des pro-angiogenetischen CXC-Motiv-Chemokin (CXCL) 8 in einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Modell beschrieben. VEGF und CXCL8 regen die Migration und Proliferation von Endothelzellen an und fördern dadurch die Neovaskularisation des Tumors. Dieser Vorgang ist essenziell für weiteres Tumorwachstum, so dass D-DT indirekt die Tumorprogression fördert.

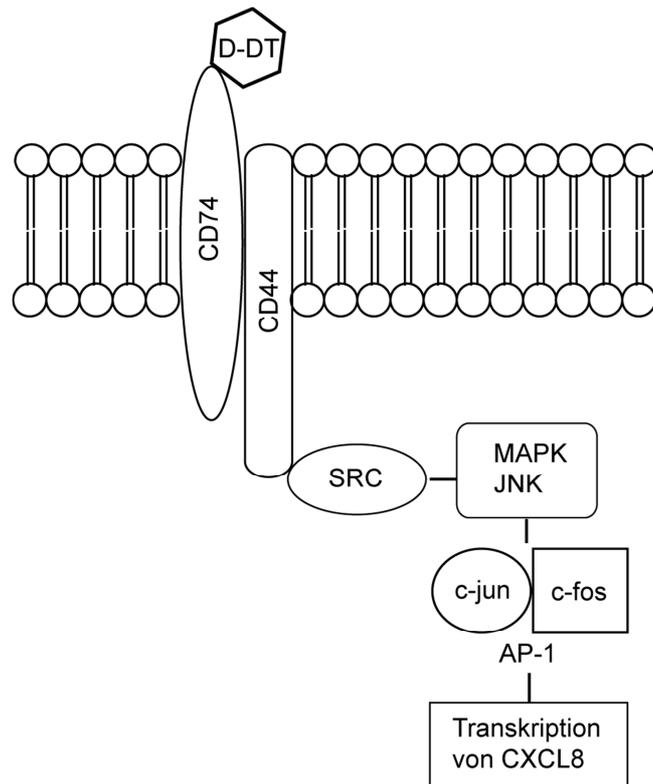


Abbildung 3: JNK- und AP-1-abhängige Signalkaskade. Bindung von D-DT an CD74 führt zu einer Rekrutierung von CD44 und der Tyrosinkinase *cellular and sarcoma* (SRC). Es folgt deren Phosphorylierung. SRC aktiviert daraufhin JNK. Es kommt zu einer Phosphorylierung von c-jun, das zusammen mit c-fos den Transkriptionsfaktor AP-1 bildet. AP-1 dringt in den Zellkern ein und führt zu einer gesteigerten Transkription von CXCL8. Abbildung nach (Noels et al., 2009).

Auf die Zellmigration und Ausbildung neuer Gefäße wirken D-DT und MIF additiv. So zeigt sich nach einem *knock-down* von D-DT oder MIF eine 40 bis 50 %ige Reduktion der basalen Sekretion von VEGF und CXCL8 sowie eine verminderte Endothelzellmigration. Bei simultaner Depletion von D-DT und MIF kommt es sogar zu einer Reduktion von 70 %. Dies macht deutlich, dass D-DT mit MIF kooperiert und nicht dessen biologische Funktion gegenreguliert. Der gemeinsame Rezeptor CD74 ist essenziell für die Aktivierung des c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK)- und Aktivator-Protein-1 (AP-1)- abhängigen Signalwegs (Abbildung 3) und somit für die Expression von CXCL8 (Coleman et al., 2008). Spätere immunhistologische Untersuchungen bestätigen im Nierenzellkarzinom-Modell *in vivo* die pro-angiogenetischen Eigenschaften von D-DT. In Tumorgewebe von D-DT-*knock-down*-Mäusen sind im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant weniger CD31-positive Endothelzellen zu detektieren (Pasupuleti et al., 2014).

D-DT unterstützt auch die Progression von kolorektalen Tumoren. D-DT wurde als Multiplikator der β -Catenin-abhängigen und β -Catenin-unabhängigen Cyclooxygenase (COX)-2-Expression identifiziert. Im β -Catenin-abhängigen Signalweg stabilisiert D-DT das Protein im

Cadherinkomplex, so dass es nicht degradiert und die Transkription von COX-2 anregt. Die Aktivierung der JNK/c-jun- und JAB1-Signalkaskade führt zu einer β -Catenin-unabhängigen Erhöhung von COX-2. Als Zielgen des in kolorektalen Tumoren mutierten *Wingless and Int-1* (Wnt)-Signalweges begünstigt COX-2 durch seine Metabolite die Apoptose, Angiogenese und Tumorzellinvasion. Der *knock-down* von D-DT mittels shRNA zeigt eine Reduktion der COX-2-Expression, die durch D-DT-Substitution wieder hergestellt werden kann (Xin et al., 2010).

In soliden Tumoren löst eine Hypoxie die Stabilisierung des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF) aus, der wiederum als Promotor für Targets der Tumorgenese gilt (Rankin und Giaccia, 2008). Auch MIF ist, wie in HeLa-Zellen gezeigt, als Zielgen von HIF1 α bekannt (Baugh et al., 2006). Kürzlich wurde D-DT als direktes Target von HIF1 α und HIF2 α im Nierenzellkarzinom entdeckt und ist somit Teil eines weiteren Signalweges in der Tumorgenese. Ein *knock-down* von HIF1 α und HIF2 α löste eine Mindereexpression von D-DT aus. Umgekehrt steigt die Expression von D-DT bei verminderter Sauerstoffzufuhr und damit einhergehender Stabilisierung von HIF an (Pasupuleti et al., 2014). D-DT gilt deshalb, analog zu anderen durch HIF-induzierte Proteine, als potenzielles Target in der Tumorthherapie.

D-DT könnte auch als Biomarker für Patienten mit Ovarialkarzinom eine klinische Bedeutung erlangen. Die D-DT-Konzentration im Serum der Patienten ist signifikant höher verglichen zu gesunden Probanden (Tumorpatienten: $15,2 \pm 13,8$ ng D-DT pro ml; Kontrollgruppe: $5,9 \pm 3,9$ ng D-DT pro ml). Die *area under the curve* von $R= 0,9$ entspricht einer hohen Spezifität und Sensitivität für das Erkennen der Erkrankung, so dass D-DT als Biomarker eingesetzt werden könnte (Merk et al., 2011).

Das Interesse an dem MIF strukturell und funktionell sehr ähnlichen Protein D-DT, auch MIF-2 genannt, wächst. Da D-DT nicht nur in der Pathogenese der Entzündung, sondern auch in der Tumorentstehung und -progression die biologischen Funktionen des protumoralen Zytokins MIF nachahmt, kommt das Zytokin als potenzielles Target für die Tumorthherapie in Frage. Eine zusätzliche Inhibition von D-DT könnte die bisherigen anti-MIF-Therapien verbessern. Deshalb ist es wichtig weitere Charakteristika von D-DT im Rahmen der Tumorgenese zu erörtern.

2 Zielsetzung und Fragestellung

Für die Tumorthherapie werden neue Zielstrukturen benötigt. Zytokine nehmen dabei eine besondere Rolle ein, da sie für eine Therapie zugänglich sind und ihr Wirkungsspektrum erkrankungsübergreifend ist. Zunehmend wird klar, dass das Zytokin D-DT ähnliche Funktionen wie MIF wahrnimmt. So ist die Frage naheliegend, ob sich Gemeinsamkeiten auch auf die Funktionen in der Tumorpromotion erstrecken. Erster Hinweis dafür ist der Nachweis der Förderung der Angiogenese im Lungenkarzinom (Coleman et al., 2008). Bisher wurde der Einfluss von D-DT auf das Tumorwachstum oder die Apoptose nicht geprüft. Das Ziel dieser Arbeit ist herauszufinden, ob D-DT wachstumsfördernde oder anti-apoptotische Eigenschaften besitzt und deshalb als potenzielles Target für die Tumorthherapie in Frage kommt. Erstmals soll dieser Frage auch mittels *in vivo*-Versuchen nachgegangen werden.

Folgende Fragen sollen in dieser Arbeit evaluiert werden:

1. Wird D-DT von murinen Tumorzelllinien exprimiert?
2. Wirkt D-DT proliferativ oder anti-apoptotisch *in vitro*?
3. Spielt D-DT *in vivo* im murinen Tumormodell eine Rolle?

3 Material

3.1 Material

Tabelle 1: Material

| Material | Firma | Herkunft |
|---|-------------------|--------------|
| BD Falcon <i>Cell Strainer</i> , 70 µm Nylon | BD Bioscience | USA |
| Gelelektrophorese und <i>Western-blot</i> -System | Bio-Rad | München, D |
| HisBind-Säulen | Merck | Darmstadt, D |
| HisTrap™ NHS-aktivierte Säulen HP 5ml | GE Healthcare | Schweden |
| Perfusorspritzen und Spritzen | BD Bioscience | USA |
| Pipetten (10µl, 100µl, 1000µl) | Eppendorf | Hamburg, D |
| Slide-A-Lyzer® 3.5 K-Dialysekassetten | Thermo Scientific | USA |
| Sterile Zellkulturflaschen und <i>Well</i> -Platten | Costar Corning | USA |

3.2 Geräte

Tabelle 2: Geräte

| Geräte | Firma | Herkunft |
|---|------------------------------|-----------------|
| Alphamager | Alpha Innotech | USA |
| Begasungsbrutschrank (BBD 6220) | Thermo Scientific Heraeus | Hanau, D |
| Digitale Schieblehre | VWR | Österreich |
| FACS Canto II | Becton Dickinson | USA |
| Inkubatorschüttler Thermoshake | Gerhardt | Königswinter, D |
| Light Cycler System 2.0 | Roche | Mannheim, D |
| Luminescent Image Analyzer LAS 4000 | Fujifilm | Japan |
| MilliQ water-Anlage | Millipore | USA |
| Multiplate Reader Mithras LB 940 | Berthold Technologies | Bad Wildbad, D |
| NanoDrop 2000c | ThermoScientific | USA |
| New Brunswick Incubator Shaker Innova® 44 | Eppendorf | Hamburg, D |
| Sterilbank | Thermo Scientific Heraeus | Hanau, D |
| Thermocycler | Biometra | Göttingen, D |
| Thermomixer 5436 | Eppendorf | Hamburg, D |
| Zentrifuge 3L-R Multifuge | Thermo Scientific Heraeus | Hanau, D |

3.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

| Chemikalien und Reagenzien | Firma | Herkunft |
|---|-------------------|---------------|
| 10x Taq Puffer (NH ₄) ₂ SO ₄ | Thermo Scientific | USA |
| 4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinethansulfonsäure (HEPES) | Sigma Aldrich | Steinheim, D |
| 4-p-Hydroxyphenylpyruvat | Sigma Aldrich | Steinheim, D |
| 6x Orange <i>DNA loading Dye</i> | Thermo Scientific | USA |
| Acrylamid Rotiphorese Gel 30 | Roth | Karlsruhe, D |
| Agarose | Biozym | Oldendorf, D |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Sigma Aldrich | Steinheim, D |
| Ampicillin-Natriumsalz | Roth | Karlsruhe, D |
| Bromphenolblau | Roth | Karlsruhe, D |
| BugBuster HAT Protein Extraktionsreagenz | Merck | Darmstadt, D |
| Coomassie Brilliant Blue R-250 | Roth | Karlsruhe, D |
| Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)-Mix | Thermo Scientific | USA |
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma Aldrich | Steinheim, D |
| Erylyse | BD Biosciences | USA |
| Essigsäure | Merck | Darmstadt, D |
| Ethanolamin | Sigma Aldrich | Steinheim, D |
| Ethidiumbromid | Sigma Aldrich | Steinheim, D |
| Glycerol | Roth | Karlsruhe, D |
| Glycin | Sigma Aldrich | Steinheim, D |
| HiPerfect Transfektionsreagenz | Qiagen | Düsseldorf, D |
| Imidazol | Roth | Karlsruhe, D |
| Isopropanol | Sigma Aldrich | Steinheim, D |
| Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) | Sigma Aldrich | Steinheim, D |
| Kalzimchlorid (CaCl ₂) | Roth | Karlsruhe, D |
| LB-Medium (Luria/Miller) | Roth | Karlsruhe, D |
| Magermilchpulver | Roth | Karlsruhe, D |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | Thermo Scientific | USA |
| Methanol | Sigma Aldrich | Steinheim, D |
| Mini Roche Protease Inhibitor-Tabletten | Roche | Mannheim, D |
| Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂) | Sigma Aldrich | Steinheim, D |
| Natriumchlorid (NaCl) | Merck | Darmstadt, D |
| Natriumfluorid (NaF) | Roth | Karlsruhe, D |

| | | |
|--|----------------------------|--------------|
| Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃) | Roth | Karlsruhe, D |
| Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄) | Roth | Karlsruhe, D |
| Natriumphosphat (Na ₃ PO ₄) | Sigma Aldrich | Steinheim, D |
| O'GeneRuler <i>DNA Ladder Mix</i> 0,1µg/µl | Thermo Scientific | USA |
| PageRulerTM <i>Prestained Protein Ladder</i> | Fermentas | USA |
| <i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS) | PAA | Pasching, D |
| Pierce ECL <i>Western-blot</i> -Substrat | Thermo Scientific | USA |
| Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Verstärker | Molzym | Bremen, D |
| Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran | GE Healthcare | UK |
| Rinderserumalbumin (BSA) | Sigma Aldrich | Steinheim, D |
| Saccharose | Roth | Karlsruhe, D |
| Salzsäure (HCl) | Merck | Darmstadt, D |
| Schwefelsäure | Apotheke Innenstadt LMU | München, D |
| Sodiumdodecylsulfat (SDS) | Roth | Karlsruhe, D |
| Staurosporin | Sigma Aldrich | Steinheim, D |
| Streptavidin- <i>horseradish peroxidase</i> (HRP)- Konjugat | Thermo Scientific | USA |
| Super signal west Femto max. sensitivity- Substrat | Thermo Scientific | USA |
| <i>Taq</i> DNA Polymerase | Thermo Scientific | USA |
| Tergitol NP-40 | Sigma Aldrich | Steinheim, D |
| Tetramethylethylendiamin (TEMED) | Roth | Karlsruhe, D |
| Trichlormethan/Chloroform | Roth | Karlsruhe, D |
| Tris | Sigma Aldrich | Steinheim, D |
| Tris- HCl | Sigma Aldrich | Steinheim, D |
| Triton X-100 | Sigma Aldrich | Steinheim, D |
| Trizol Reagenz | Invitrogen | Karlsruhe, D |
| Tween-20 | Sigma Aldrich | Steinheim, D |
| Universal Probe Library Sonden 17 + 69 | Roche | Mannheim, D |
| Urea | Roth | Karlsruhe, D |
| β-Glycerolphosphat | Sigma Aldrich | Steinheim, D |
| β-Mercaptoethanol | Sigma Aldrich | Steinheim, D |

Tabelle 4: Zellkultur

| Chemikalien und Reagenzien | Firma | Herkunft |
|--|--------------|-----------------|
| <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (DMEM) | PAA | Pasching, D |

| | | |
|--|-------------------|--------------|
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Sigma Aldrich | Steinheim, D |
| Fetales Rinderserum (FBS) | GibcoBRL | Karlsruhe, D |
| L-Glutamin | PAA | Pasching, A |
| Opti-MEM | Life Technologies | Darmstadt, D |
| Penicillin/Streptomycin (100 x) | PAA | Pasching, A |
| <i>Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI 1640)</i> | PAA | Pasching, D |
| Trypanblau | Sigma Aldrich | Steinheim, D |
| Trypsin (10 x) | PAA | Pasching, D |

Tabelle 5: Reagenzien-Kits

| Reagenzien-Kits | Firma | Herkunft |
|---|-------------------|-------------|
| BD OptEIA Tetramethylbenzidin (TMB) Substrate Reagent Set | BD Biosciences | USA |
| BioPlex Cell Lysis Kit | Bio-Rad | München, D |
| Bio-Rad DC Protein Assay | Bio-Rad | München, D |
| Chemolumineszenz Detektions Kit | Thermo Scientific | USA |
| First Strand cDNA Synthesis Kit | Roche | Mannheim, D |
| LDH Cytotoxicity Assay Kit | Cayman | USA |
| LightCycler 480 Probes Master Kit | Roche | Mannheim, D |

3.4 Medien, Puffer und Lösungen

Tabelle 6: Zellkulturmedien

| DMEM-Vollmedium | Konzentration | RPMI 1640-Vollmedium | Konzentration |
|-----------------|---------------|----------------------|---------------|
| DMEM | | RPMI 1640 | |
| FBS | 10 % | FBS | 10 % |
| Penicillin | 100 IU/ml | Penicillin | 100 IU/ml |
| Streptomycin | 100 µg/ml | Streptomycin | 100 µg/ml |
| L-Glutamin | 1 mM | L-Glutamin | 1 mM |

Tabelle 7: Annexin-Puffer (10 x)

| Annexin-Puffer (10 x) | Konzentration |
|-----------------------|---------------|
| HEPES (pH 7,4) | 0,1 M |
| NaCl | 1,4 M |
| CaCl ₂ | 25 mM |

Tabelle 8: Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)-Puffer

| D-DT-ELISA-Puffer | Konz. | BSA-Lösung | Konz. | PBS-T | Konz. |
|--------------------------|--------------|-------------------|--------------|--------------|--------------|
| TBS (siehe TBS-T) | | PBS | | PBS | |
| BSA | 0,1 % | Saccharose | 1 % | Tween-20 | 0,05 % |
| Tween-20 | 0,05 % | BSA | 1 % | | |

Tabelle 9: SDS-Polyacrylamid-Gel und Western-blot-Puffer

| Lysepuffer (10 ml) | Konzentration |
|--|----------------------|
| NaCl | 150 mM |
| Tris pH 7,4 | 25 mM |
| EDTA | 2 mM |
| Tergitol NP-40 | 0,5 % |
| Na ₃ VO ₄ | 5 µM |
| NaF | 5 µM |
| β-Glycerolphosphat | 5 µM |
| Mini Roche Protease Inhibitor-Tablette | |
| DTT | 0,5 µM |

| Laemmli-Puffer, 6 x (10 ml) | Volumen |
|------------------------------------|----------------|
| SDS | 1,2 g |
| Bromphenolblau | 0,06 g |
| Glycerol | 4,7 ml |
| Tris pH 6,8 0,5 M | 1,2 ml |
| DTT | 0,939 g |

| Sammelgel, 5 % | Volumen in ml |
|-----------------------|----------------------|
| H ₂ O | 2,26 |
| 30 % Acrylamid | 0,68 |
| Sammelgelpuffer (4 x) | 1 |
| 10 % APS | 0,24 |
| TEMED | 0,02 |

Sammelgelpuffer (4 x) pH 8,5: 182 g Tris-HCl in 600 ml H₂O, einstellen von pH 8,8 mit HCl, mit H₂O zu 1000 ml auffüllen, durch 0,45 µm Membran filtern, 4 g SDS

| Trenngel, 15 % | Volumen in ml |
|-----------------------|----------------------|
| H ₂ O | 2,4 |
| 30 % Acrylamid | 5,0 |
| Trenngelpuffer (4 x) | 2,5 |
| APS | 0,6 |
| TEMED | 0,02 |

Trenngelpuffer (4 x) pH 6,8: 30,25 g Tris-HCl in 300 ml H₂O, einstellen von pH 6,8 mit HCl, mit H₂O auf 500 ml auffüllen, durch 0,45 µm Membran filtern, 2 g SDS

| SDS-Laufpuffer, pH 8,3 | Konzentration | Transferpuffer, pH 8,3 | Konzentration |
|-------------------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------|
| Tris | 25 mM | Tris | 25 mM |
| Glycin | 192 mM | Glycin | 190 mM |
| SDS | 1 g | Methanol | 20 % |

| Tris-buffered Saline (TBS) (-T), pH 7,8 (1000 ml) | | 5 % Magermilchpulverlösung | Konzentration |
|--|---------|-----------------------------------|----------------------|
| Tris | 53,99 g | TBS-T | |
| Tris-HCl | 261,4 g | Magermilchpulver | 5 % |
| NaCl | 876,6 g | | |
| (Tween-20 | 0,1 %) | | |

Tabelle 10: Coomassie-Färbung

| Färbelösung | Konzentration | Entfärbelösung | Konzentration |
|--------------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| Coomassie Brilliant Blue R-250 | 0,25 % (g/V) | Methanol | 40 % |
| Methanol | 40 % | Essigsäure | 10 % |
| Essigsäure | 10 % | H ₂ O | 50 % |
| H ₂ O | 49,75 % | | |

Tabelle 11: Agarosegel 2 %

| Agarosegel 2 % | Volumen |
|--|----------------|
| Agarose | 4 g |
| 1x TAE-Puffer (Tris 2,0 M, Essigsäure 100 % 1,0 M, EDTA-2 Na-2 H ₂ O 0,05 M) | 200 ml |
| Ethidiumbromid | 10 µl |

Tabelle 12: HisBind-Proteinaufreinigung

| Bindepuffer | Konzentration | Waschpuffer | Konzentration |
|--------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
| Tris, pH 8,5 | 20 mM | Tris, pH 8,0 | 20 mM |
| NaCl | 500 mM | NaCl | 500 mM |
| Imidazol | 5 mM | Imidazol | 20 mM |
| | | Urea | 6 M |

| Elutionspuffer | Konzentration |
|-----------------------|----------------------|
| Tris, pH 8,0 | 20 mM |
| Imidazol | 500 mM |
| Urea | 6 mM |
| NaCl | 500 mM |

Tabelle 13: Puffer für HisTrap-Säulenchromatographie

| Bindepuffer, pH 8,3 | Konzentration | HCl, 1 mM | Konzentration |
|----------------------------|----------------------|------------------|----------------------|
| NaHCO ₃ | 0,2 M | HCl | 0,2 M |
| NaCl | 0,5 M | NaCl | 0,5 M |

| Puffer A, pH 8,3 | Konzentration | Puffer B, pH 4 | Konzentration |
|-------------------------|----------------------|--|----------------------|
| Ethanolamin | 0,5 M | C ₂ H ₃ NaO ₂ | 0,5 M |
| NaCl | 0,5 M | NaCl | 0,5 M |

| Bindepuffer, pH 7 | Konzentration | Elutionspuffer, pH 3 | Konzentration |
|---------------------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------|
| Na ₃ PO ₄ | 20 mM | Glycin | 100 mM |
| NaCl | 0,15 M | HCl | |

3.5 ELISA und *Western-blot*-Antikörper

Tabelle 14: Primäre Antikörper

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|----------------------------|
| Polyklonaler Kaninchen anti-D-DT-Antikörper | Eigene Herstellung |
| Monoklonaler Maus anti-MIF-Antikörper | Bucala Labor, Yale, USA |
| Polyklonaler Kaninchen Immunglobulin(IgG)-Isotyp-Antikörper | Invitrogen, USA |

Tabelle 15: Sekundärer Antikörper

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|--------------------|
| Biotinylierter polyklonaler anti-D-DT-Antikörper | Eigene Herstellung |

Tabelle 16: Detektionsantikörper

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|---------------|
| Anti-Kaninchen IgG-Antikörper, HRP-gekoppelt | Santa Cruz, D |
| Anti-Maus IgG-Antikörper, HRP-gekoppelt | Santa Cruz, D |
| Anti-Maus β -Actin-Antikörper (C4), HRP-gekoppelt | Santa Cruz, D |

3.6 *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS)-Antikörper

Tabelle 17: FACS-Antikörper

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|------------------|
| Anti-Annexin V-Antikörper, Allophycocyanin (APC)-konjugiert | ImmunoTools, D |
| Anti-Propidiumiodid (PI)-Antikörper, Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugiert | Sigma-Aldrich, D |

3.7 DNA-Primer

Tabelle 18: Quantitative PCR-Primer

| Bezeichnung | Sequenz |
|----------------------|-------------------------------------|
| murin D-DT vorwärts | 5'-CCA GCT TCT TCA AGT TCC TCA-3' |
| murin D-DT rückwärts | 5'-GGG AAG AAG CGG ATA ACG AT-3' |
| murin HPRT vorwärts | 5'-GGA GCG GTA GCA CCT CCT-3' |
| murin HPRT rückwärts | 5'-CTG GTT CAT CAT CGC TAA TCA C-3' |

Tabelle 19: Oberflächenrezeptor PCR-Primer

| Bezeichnung | Sequenz |
|--------------------------------|----------------------------------|
| murin β -Aktin vorwärts | 5'-CTA AGG CCA ACC GTG AAA AG-3' |
| murin β -Aktin rückwärts | 5'-ACC AGA GGC ATA CAG GGA CA-3' |
| murin CD74 vorwärts | 5-GCA GTG GCT CTT GTT TGA GA-3' |
| murin CD74 rückwärts | 5'-TTC CTG GCA CTT GGT CAG TA-3' |
| murin CXCR2 vorwärts | 5'-CAG GAC CAG GAA TGG GAG TA-3' |
| murin CXCR2 rückwärts | 5'-TCC CCT CCA AAT ATC CCC TA-3' |

| | |
|-----------------------|----------------------------------|
| murin CXCR4 vorwärts | 5'-TGG AAC CGA TCA GTG TGA GT-3' |
| murin CXCR4 rückwärts | 5'-GGG CAG GAA GAT CCT ATT GA-3' |

3.8 siRNA-Sequenzen

Tabelle 20: siRNA-Sequenzen

| Bezeichnung | | Sequenz |
|-------------|------------------|---------------------------------|
| murin D-DT | <i>Sense</i> | 5'-CUU GGC AGA UCG GAA AG-3' |
| | <i>Antisense</i> | 5'-UUC UUU CCG AUC UGC CAA G-3' |
| murin MIF | <i>Sense</i> | 5'-UCA ACU AUU ACG ACA UGA A-3' |
| | <i>Antisense</i> | 5'-UUC AUG UCG UAA UAG UUG A-3' |
| Kontrolle | <i>Sense</i> | 5'-GCG CAU UCC AGC UUA CGU A-3' |

3.9 Zelllinien, Bakterien und Plasmide

Tabelle 21: Zelllinien

| Zelllinie | Zellart | Morphologie | Medium |
|-----------|---|-------------|--------|
| 4T1 | Metastasierende murine Brustkrebszellen | adhärent | RPMI |
| B16F10 | Murine Melanomzellen | adhärent | DMEM |

Tabelle 22: Bakterien

| Stamm | Hersteller |
|---|-----------------|
| <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) BL21 | Invitrogen, USA |

Tabelle 23: Plasmide

| Plasmid | Insert | Hersteller |
|---------|--------------------------|-------------------------|
| pET22b | Histidin-gebundenes D-DT | Bucala Labor, Yale, USA |

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Isolation von RNA und Herstellung von cDNA

Um die Expression von D-DT oder dessen Oberflächenrezeptoren auf post-transkriptionaler Ebene zu ermitteln, wurde zunächst die Gesamt-RNA aus Splenozyten beziehungsweise aus Tumorzellen isoliert, bevor diese mit der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden konnte. Isolierte Splenozyten oder Tumorzellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Circa 10^7 Zellen wurden in 1 ml phenolhaltigem Trizol Reagenz lysiert. Nach Zugabe von Chloroform kam es zur Phasentrennung. Die gewünschte RNA befand sich in der oberen wässrigen Phase und konnte nach Zentrifugation abgenommen werden. DNA und Proteine blieben in der unteren Phenol/Chloroformphase zurück. Nach Zugabe von Isopropanol präzipitierte die RNA und konnte nach Auswaschen des Alkohols in RNase-freiem Wasser aufgenommen werden.

Nach dem Herstellerprotokoll von First Strand cDNA Synthesis Kit wurde die isolierte RNA mit der reversen Transkriptase bei 42 °C für eine Stunde in cDNA umgeschrieben. Zu den Proben hinzugefügter Oligo-desoxythymidin (dT)-Primer lagerte sich an den Poly-A-Schwanz der RNA an und ermöglichte somit das Ablesen und Umschreiben in die cDNA.

4.1.2 PCR-Amplifikation und Agarosegel

Nach der oben beschriebenen Isolation von RNA aus Tumorzellen und dem Umschrieb in cDNA konnte gezielt nach vorhandener mRNA der Oberflächenrezeptoren untersucht werden. Dazu musste die cDNA mit Hilfe von spezifischen Intron-übergreifenden (für CXCR4 war dies nicht möglich, da CXCR4 ein Intron-freies Gen ist) Primern amplifiziert werden (Tabelle 24). Die PCR-Produkte wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Tabelle 24: Reagenzien für PCR-Amplifikation von spezifischer cDNA

| Komponente | Volumen in μ l | Konzentration |
|---|--------------------|---------------|
| 10x Taq Puffer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 5 | |
| dNTP Mix | 1 | 25 mM |
| MgCl ₂ | 4 | 25 mM |
| Vorwärtsprimer | 0,5 | 100 pm |

| | | |
|---------------------------|-----|-----------|
| Rückwärtsprimer | 0,5 | 100 pm |
| cDNA | 4 | 0,1 µg/µl |
| PCR-Verstärker | 2 | |
| <i>Taq</i> DNA Polymerase | 1 | 5 U/µl |
| H ₂ O | 32 | |

4.1.3 Quantitative PCR

Die quantitative PCR dient zur Messung der Expression spezifischer Zielgene relativ zu einem konstant exprimierten, nicht von den Experimenten abhängigen, Haushaltsgen. Für die Analyse von D-DT und MIF wurde das Haushaltsgen Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) gewählt und nach dem Herstellerprotokoll des LightCycler 480 Probes Master Kits vorgegangen (Tabelle 25). Spezifische Primer ermöglichten eine Amplifikation der cDNA der gesuchten Gene. Die im Light Cycler System 2.0 gemessene Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zu der Kopienanzahl des amplifizierten Zielgens.

Tabelle 25: Reagenzien für quantitative PCR

| Komponente | Volumen in µl |
|--|---------------|
| Light Cycler Probes 480 Master Kit (Polymerase, dNTPs) | 18 |
| Universal Probe Library Fluoreszenzsonde | 0,8 |
| Vorwärtsprimer | 0,4 |
| Rückwärtsprimer | 0,4 |
| cDNA | 3 |
| H ₂ O | 6 |

4.1.4 Lipofektion mit *Antisense*-siRNA

Die *small interfering RNA* (siRNA) ermöglicht den transienten *knock-down* eines gewünschten Zielproteins. Nach der Lipofektion bei der die doppelsträngige siRNA in Vesikeln, sogenannten Liposomen, in die Zelle gelangt, wird der *Dicer*-Komplex rekrutiert. Die siRNA wird entwunden und es kommt zur Bindung eines Einzelstranges der siRNA an den *Dicer*-Komplex. Daran kann eine homologe mRNA binden und löst die Aktivierung des *RNA-induced silencing complex* (RISC) aus. Es kommt zum Abbau der mRNA. Das führt dazu, dass keine neuen Proteine mehr produziert werden können und die Konzentration des Zielproteins rapide abfällt.

Kurz vor der Transfektion wurden 10^5 Zellen in 1 ml DMEM-Vollmedium in einer 12-Well-Platte ausplattiert. Pro ml DMEM-Vollmedium wurden in 100 μ l Opti-MEM ohne Serum und Antibiotika 75 ng siRNA und 6 μ l HiPerfect Transfektionsreagenz gegeben und durch Vortexen gut vermischt. Für den Doppel-*knock-down* wurden jeweils 75 ng D-DT-siRNA und 75 ng MIF-siRNA mit der doppelten Menge an Transfektionsreagenz gemischt. Nach einer mindestens zehnmütigen Inkubation bei Raumtemperatur hat sich aus siRNA und Lipiden ein Transfektionskomplex gebildet, der anschließend tropfenweise unter Schwenken der Platte zu den ausgesäten Zellen hinzugegeben wurde. Nach 48 Stunden wurde das Medium erneuert und ein zweites Mal eine Lipofektion durchgeführt. Nach weiteren 48 Stunden war ein optimales *gene silencing* erreicht.

4.2 Proteinchemische und immunologische Methoden

4.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglicht eine Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe im elektrischen Feld. Da die Proteine D-DT und MIF ein Molekulargewicht von circa 12 kDa besitzen, wurde ein 15 %iges, kleinporiges Gel angefertigt. Proteine wurden vor dem Auftragen durch überschüssige Zugabe von SDS negativ geladen und anschließend zehn Minuten bei 95 °C denaturiert. Die nun linearisierten Proteine wurden für eine Stunde bei 100 mA nach ihrer Molekularmasse aufgetrennt.

4.2.2 Western blot

Der *Western blot* dient zum spezifischen Nachweis von Proteinen auf einer PVDF- Membran. Diese musste zunächst in Methanol aktiviert werden. Die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden anschließend im elektrischen Feld bei 360 mA für 60 Minuten senkrecht zur Laufrichtung der Gelelektrophorese auf die PVDF-Membran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch eine einstündige Inkubation der Membran in 5 %iger Magermilchlösung bei Raumtemperatur blockiert. Der primäre Antikörper, der spezifisch gegen das gesuchte Protein (D-DT: polyklonaler Kaninchen anti-D-DT-Antikörper; MIF: monoklonaler Maus anti-MIF-Antikörper) gerichtet ist, wurde anschließend in einer Verdünnung von 1:1000 hinzugefügt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch drei Waschvorgänge à fünf Minuten in TBS-T entfernt, bevor der HRP-gekoppelte Detektionsantikörper (D-DT: anti-Kaninchen IgG, MIF: anti-Maus IgG) in einer Verdünnung von 1:2000 in 5 %iger Magermilchlösung dazugegeben wurde. Nicht gebundene Antikörper wurden nach

einer Stunde Inkubation durch erneutes Waschen mit TBS-T entfernt. Nach Zugabe des Substrats Luminol wurde durch Chemilumineszenz das gesuchte Protein auf der Membran sichtbar gemacht und im Luminescent Image Analyzer 4000 detektiert.

4.2.3 Muriner D-DT-ELISA

Für den murinen D-DT-ELISA wurde zunächst eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit 0,5 µg pro µl polyklonalem anti-D-DT-Antikörper beschichtet und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Platte dreimal mit PBS-T gewaschen und unspezifische Bindungsstellen mit 150 µl BSA-Lösung blockiert. Nach zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur und erneutem Waschvorgang konnte die Standardreihe mit rekombinantem, murinem D-DT und die verdünnten Proben in geeignetem Puffer aufgetragen werden. Nicht gebundenes Protein wurde durch mehrmaliges Waschen nach weiteren zwei Stunden Inkubation entfernt. Als sekundärer Antikörper wurde biotinylierter polyklonaler anti-D-DT-Antikörper hinzu-gegeben. Überschüssiger Antikörper wurde im nächsten Waschvorgang entfernt und die Platte mit einem Biotin-bindenden Streptavidin-Antikörper versehen. Dieser Detektions-antikörper hat zugleich das Enzym HRP gebunden. Nach einer Stunde Inkubationszeit im Dunkeln und einem letzten Waschschrift wurde das Substrat TMB dazugegeben. Sobald die Standardreihe durch einen deutlichen Farbumschlag ins bläuliche zu sehen war, wurde die Reaktion mit 1 M Schwefelsäure gestoppt und die Absorption mittels Multiplate Reader Mithras LB 940 bei 490 nm gemessen. Die Intensität des Farbumschlags war direkt proportional zu der Proteinkonzentration, die an der Standardkurve abgelesen werden konnte.

4.3 Funktionelle Assays

4.3.1 BrdU-Proliferations-Assay

Mit Hilfe des Bromdesoxyuridin (BrdU)-Proliferations-Assays wird die Zellvermehrung durch Einbau des Thymidinanalogons BrdU bei der DNA-Neusynthese quantifiziert. Je mehr Zellen proliferieren, desto mehr BrdU wird eingebaut und desto stärker ist die später auszulesende Chemilumineszenz. Der Proliferations-Assay wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.3.2 Apoptose-Assay mit Annexin V/PI

Zellen, die in Apoptose gehen, zeigen verschiedene phänotypische Veränderungen, die mittels Annexin V/PI-Färbung detektiert und somit die Apoptoserate quantifiziert werden kann. Annexin V bindet an durch die Apoptose erscheinenden Phospholipide an der äußeren Zellmembran und wird deshalb als frühapoptotischer Marker verwendet. Zur Bestimmung spätapoptotischer beziehungsweise toter Zellen wird der Lebend-Tod-Marker PI hinzugegeben, der nur bei perforierter Zellmembran in die Zelle eindringen und an die DNA binden kann.

24 Stunden nach der letzten siRNA-Transfektion (siehe oben) wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen pro 12-Well-Platte in 1 ml Vollmedium ausplattiert. Ein Tag später wurde mit Hilfe von $2 \mu\text{M}$ Staurosporin Apoptose induziert. Weitere 24 Stunden später wurde der Überstand und mittels Trypsin von der Platte abgelöste Zellen in FACS-Röhrchen überführt und bei 400 g 7 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden nach einem Waschvorgang in PBS in $150 \mu\text{l}$ Annexin-Puffer resuspendiert und mit $3 \mu\text{l}$ APC-konjugiertem anti-Annexin V-Antikörper versetzt. Kurz vor der Analyse in der Durchflusszytometrie wurde $1 \mu\text{l}$ PI hinzugegeben.

4.3.3 LDH-Zellviabilitäts-Assay

Nach dem Zelltod wird Laktatdehydrogenase (LDH) aus dem Zytosol durch die permeabel gewordene Membran ins Medium freigesetzt. Die Aktivität der freigesetzten LDH konnte mittels eines Farbumschlags gemessen werden und ist direkt proportional zu der Apoptoserate. Der LDH-Zellviabilitäts-Assay wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.4 Zellkultur

Allgemeine Kulturbedingungen

Zellen wurden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % Kohlenstoffdioxid in Kultur gehalten. Alle zwei bis drei Tage fand ein Mediumwechsel statt, nachdem unter einem Lichtmikroskop auf Vitalität und Konfluenz geprüft worden war. Ab einer Konfluenz von 80 % wurden die Tumorzellen passagiert.

Ermitteln der Lebendzellzahl

Die Zahl der lebenden Zellen wurde nach Anfärben mit Trypanblau in einer Neubauer-kammer unter dem Lichtmikroskop ermittelt ((gezählte Zellen/ausgezählte Quadrate) x Verdünnung x 10^4 (Volumenfaktor)) = Zellen pro ml).

Herstellung von Zelllysaten

Zellen wurden in Trypsin und EDTA aufgenommen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und 7minütigem Abzentrifugieren bei 400 g wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 50 μ l Lysatpuffer resuspendiert. Nach kräftigem Vortexen wurde das Lysat für zwei Stunden auf Eis gelagert. Anschließend wurde die Probe bei 16.000 g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

4.5 Herstellung von polyklonalem anti-D-DT-Antikörper

4.5.1 Überexpression von murinem D-DT

Zunächst erfolgte eine Transfektion von 1 μ l pET22b Vektor mit integrierter DNA für murines Histidin-gebundenes D-DT in den hitzekompetenten *E. coli*-Stamm BL21. Die transformierten Bakterien wurden über Nacht in LB-Medium expandiert. Am nächsten Tag wurden 500 ml LB-Medium mit Ampicillin mit 6 ml der Übernachtskultur angeimpft. War eine optische Dichte bei 600 nm von 0,5 erreicht, wurde die Überexpression mit Hilfe von 1 mM IPTG, einem Induktor des in der DNA vorgeschalteten Lac-Operons, aktiviert. Nach 4 Stunden Inkubation wurden die Bakterien bei 3000 Rotationen pro Minute (rpm) und 4 °C geerntet. Anschließend wurden die Bakterien mit BugBuster HAT Protein Extraktionsreagenz lysiert und das über-exprimierte murine D-DT über eine HisBind-Chromatographiesäule aufgereinigt. Zunächst wurde die Säule mit 10 ml Bindepuffer vorbereitet. Anschließend wurde das Lysat vollständig auf die Säule geladen. Hierbei band das Protein mit seinem Histidin-Schwanz an das an einer Metallionenchelate-Matrix immobilisierte Nickel. Nicht gebundene Proteine wurden mit zwei Waschvorgängen von der Säule gewaschen. Hochkonzentriertes Imidazol im Eluat-puffer verdrängte das Protein aus seiner Bindung und es kam zur Elution von murinem D-DT. Um Harnstoff und Imidazol aus dem Puffer zu entfernen, wurde mit Hilfe von Dialyse-kammern erst gegen TBS mit 5 mM DTT, anschließend gegen den Zielpuffer PBS dialysiert. Abschließend wurde eine Coomassie-Analyse der einzelnen Aufreinigungsschritte vollzogen und die Tautomerase-Aktivität mit Hilfe des 4-p-Hydroxyphenylpyruvat-Tests bestimmt.

4.5.2 Aufreinigung von polyklonalem anti-D-DT-Antikörper

Zur Immunisierung von Kaninchen wurde das aufgereinigte, murine D-DT an die SEQLAB-Sequence Laboratories Göttingen GmbH geschickt. Anschließend wurden mit Hilfe einer Affinitätschromatographie an HisTrap™ NHS-aktivierten Säulen die anti-D-DT-Antikörper aus dem vom Kaninchen gewonnenen Serum in unserem Labor aufgereinigt. Zunächst wurde der gewünschte Ligand, in diesem Fall murines D-DT, in einer Konzentration von 1 bis 2 mg pro ml, für den zu gewinnenden Antikörper an die Säule gebunden. In den folgenden Waschsritten wurden nicht gebundene Liganden entfernt und freie Bindungsstellen inaktiviert. Daraufhin wurde Serum und Bindepuffer im Verhältnis 1:1 über die Säule laufen gelassen. Hier musste eine langsame Flussrate von circa 1 ml pro Minute eingehalten werden, damit der Antikörper Zeit hat an seinen Liganden zu binden. Es folgten wiederum mehrere Waschvorgänge (5 - 10 Säulenvolumen), bevor durch einen pH- Wechsel mit dem Elutionspuffer der Antikörper von der Säule eluiert werden konnte. Auch hier schloss sich eine zweitägige Dialyse gegen PBS in Slide-A-Lyzer® 3.5 K-Dialysekassetten an, um einen Antikörper in neutraler Lösung zu erhalten. Zuletzt wurde der Antikörper im *Western blot* mit Hilfe von rekombinantem D-DT auf Spezifität und mit rekombinantem MIF auf Kreuzreaktivität geprüft.

4.6 Tierexperimentelle Methoden

4.6.1 Tumorinduktion

B16F10-Tumore wurden auf C57Bl/6RJ Hintergrund nach subkutaner Injektion von $0,6 \times 10^6$ B16F10-Zellen beziehungsweise im Antikörperversuch mit $0,7 \times 10^6$ B16F10-Zellen induziert. 4T1-Tumore wurden in Balb/cJ-Mäusen nach subkutaner Injektion von 10^6 4T1-Zellen induziert. Die jeweils weiblichen *Wild-type*-Stämme C57Bl/6RJ und Balb/cJ wurden von Janvier (St. Berthevin, Frankreich) erworben. Alle Tierexperimente wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

4.6.2 Serum

Zur Gewinnung von Serum wurden den Tieren retrobulbär Blut abgenommen. 15 Minuten lang wurden bei 8000 rpm die zellulären Bestandteile des Blutes abzentrifugiert. Anschließend wurde das Serum vorsichtig abgenommen und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingelagert.

4.6.3 Herstellung von Organlysaten zur Zytokinbestimmung

Nach Erreichen einer durchschnittlichen Tumorgröße von 100 mm² wurden die Organe Milz, Leber und der Tumor entnommen und in flüssigen Stickstoff gelegt. Anschließend wurden die Organe in gekühlten Mörserschalen zerstampft. Das Pulver wurde dann in ein mit 50 bis 250 µl BioRad Lysepuffer gefülltes Eppendorf Röhrchen überführt und mindestens 30 Sekunden gevortext. Das Lysat taute dabei langsam auf und wurde zu einer zähen Masse. Bevor die Proben in einer vorgekühlten Zentrifuge bei 12.000 g für 15 Minuten abzentrifugiert wurden, wurden sie mindestens 15 Minuten auf Eis inkubiert. Später wurde der Überstand abgenommen und die Gesamtproteinkonzentration nach Bradford bestimmt. Die gewonnenen Proteine wurden bei -80 °C gelagert.

4.6.4 Isolierung von Splenozyten

Zur Isolation von Splenozyten wurde die Milz durch einen 70 µl Nylonfilter prozessiert. Nicht für die Versuche benötigte Erythrozyten und Thrombozyten wurden durch Zugabe von 1 bis 3 ml Erylyse lysiert. Mehrmaliges Waschen mit PBS entfernte Zelldebris und Mediumbestandteile.

4.6.5 Antikörperbehandlung

Ein Tag nach der Tumordinjektion mit $0,7 \times 10^6$ B16F10-Zellen wurden jeweils vier Mäuse in die Behandlungsgruppe und weitere vier Mäuse in die Kontrollgruppe randomisiert. Es erfolgte eine Behandlung durch eine intraperitoneale (i.p.) Injektion von 250 µg (in 200 µl aufgereinigtem Wasser) aufgereinigtem polyklonalen anti-D-DT-Antikörper oder eine Injektion von 250 µg (in 200 µl aufgereinigtem Wasser) polyklonalen IgG-Isotyp-Antikörper in der Kontrollgruppe. Im weiteren Verlauf wurde jeden zweiten Tag Antikörper injiziert, das Körpergewicht gemessen und die Tumorgröße mit Hilfe einer elektronischen Schiebelehre bestimmt (Länge x Breite).

4.7 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe der Software GraphPad Prism Version 5.0 durchgeführt. Experimentelle Daten wurden als Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Unterschiede in den experimentellen Ergebnissen von Expression und Sekretion von D-DT oder der Proliferation der Tumorzellen wurden mit Hilfe des zweiseitigen, ungepaarten

t-Tests ermittelt. p-Werte unter 0,05 wurden als signifikant angesehen. $p < 0,05$, $p < 0,01$ und $p < 0,001$ wurden mit *, ** oder *** kenntlich gemacht. Für den Neutralisationsversuch wurden die Unterschiede zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe mittels *two-way* ANOVA mit Korrektur der mehrfachen Testung ermittelt.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung des Zytokins D-DT im murinen Tumormodell

5.1.1 D-DT-Konzentration in Seren von tumortragenden Mäusen

Um eine mögliche Rolle von D-DT in murinen Tumormodellen zu identifizieren, wurden die beiden Modelle 4T1 und B16F10 auf ihre D-DT-Konzentration im Serum geprüft. Dabei wurden die Seren von tumortragenden Mäusen mit denen von alters-gematchten *Wild-type*-Mäusen verglichen.

Vier Mäusen wurde jeweils 10^6 4T1- oder $0,6 \times 10^6$ B16F10-Zellen subkutan injiziert. Weitere vier Kontrollmäuse blieben unbehandelt. Bei Erreichen einer Tumorgroße von circa 100 mm^2 wurde retrobulbär Blut entnommen. Das daraus gewonnene Serum wurde anschließend auf seine D-DT-Konzentration mittels ELISA untersucht. Bei einer durchschnittlichen Tumorgroße von 100 mm^2 wiesen tumortragende Mäuse signifikant mehr D-DT im Serum auf als gesunde Mäuse (Abbildung 4).

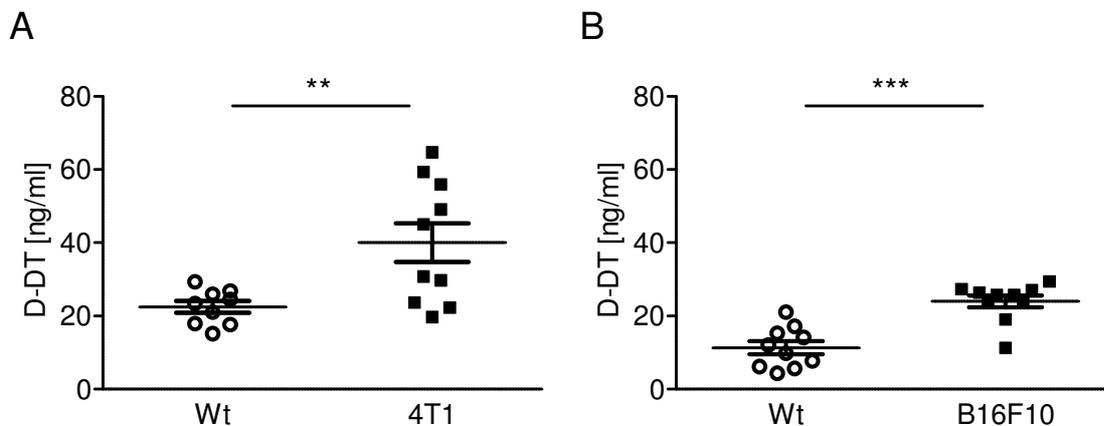


Abbildung 4: Serumkonzentration von D-DT im 4T1- und B16F10- Mausmodell verglichen zu einer gesunden Kontrollgruppe. (A) Die D-DT-Konzentration im Serum wurde mittels ELISA 21 Tage nach subkutaner Injektion von 10^6 4T1-Tumorzellen und einer durchschnittlichen Tumorgroße von 100 mm^2 gemessen. Im Vergleich zu *Wild-type*-Mäusen zeigte sich ein signifikanter Anstieg von D-DT im Serum ($p < 0,01$). (B) 14 Tage nach subkutaner Injektion von $0,6 \times 10^6$ B16F10-Tumorzellen wurde die D-DT-Konzentration bei einer durchschnittlichen Tumorgroße von 100 mm^2 gemessen. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg von D-DT im Serum ($p < 0,0001$). Auswertung erfolgte mit dem t-Test für unverbundene Stichproben. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwertes. Jeder Punkt entspricht der Serumkonzentration eines Tieres. Die Diagramme zeigen zusammengeführte Daten von drei (4T1) beziehungsweise zwei (B16F10) unabhängig ausgeführten Experimenten. Abbildung modifiziert aus (Kobold et al., 2014).

5.1.2 Expression und Sekretion von D-DT in Tumorzellen

Um einzugrenzen, woher das oben beschriebene D-DT in der tumortragenden Maus stammt, wurde untersucht, ob die beiden murinen Tumorzelllinien 4T1 und B16F10 D-DT exprimieren und sezernieren.

Zur Bestimmung der Expression von D-DT wurden gleiche Mengen an Gesamtprotein der Zelllysate von 4T1- und B16F10-Tumorzellen über ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und im *Western blot* mit Hilfe von anti-D-DT-Antikörper auf Höhe von 12 kDa visualisiert. In beiden Tumorzelllinien konnte eine Expression von D-DT nachgewiesen werden (Abbildung 5A). Densitometrisch exprimierten B16F10-Zellen mehr D-DT als 4T1-Zellen (Abbildung 5B).

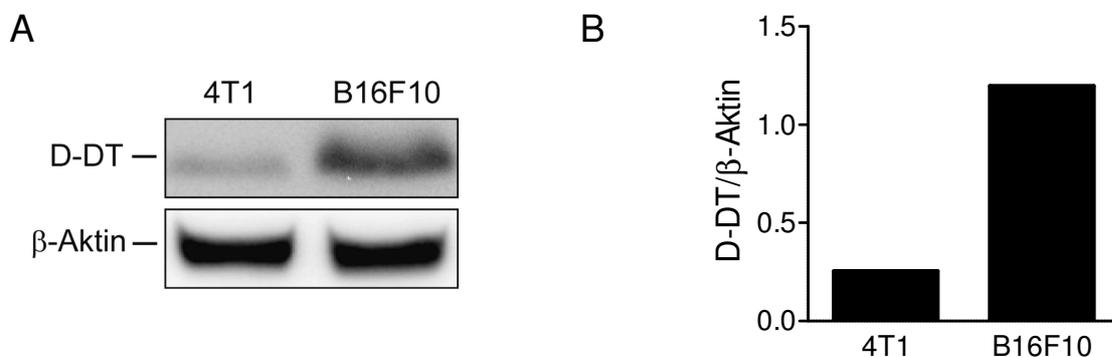


Abbildung 5: Expression von D-DT in 4T1- und B16F10-Tumorzellen. (A) Nachweis der Expression von D-DT im *Western blot*. Pro Probe wurden 50 μ g Gesamtprotein der 4T1- oder B16F10-Zelllysate aufgetragen und anschließend D-DT mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle diente das konstant exprimierte β -Aktin. Für D-DT ist eine stärkere Bande im B16F10-Zelllysate als im 4T1-Zelllysate zu sehen. (B) Densitometrische Auswertung der *Western-blot*-Banden. Die Ergebnisse sind jeweils im Verhältnis der Farbdichte D-DT/ β -Aktin dargestellt. Die Abbildungen zeigen jeweils eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Abbildung modifiziert aus (Kobold et al., 2014).

Die Spontansekretion des Zytokins aus Tumorzellen über 24 Stunden wurde durch einen D-DT-spezifischen ELISA bestimmt. Beide Tumorzelllinien sezernierten D-DT in ihren Überstand. Hier konnte gezeigt werden, dass B16F10-Tumorzellen nicht nur mehr D-DT als 4T1-Tumorzellen exprimieren, sondern auch mehr sezernieren (Abbildung 6).

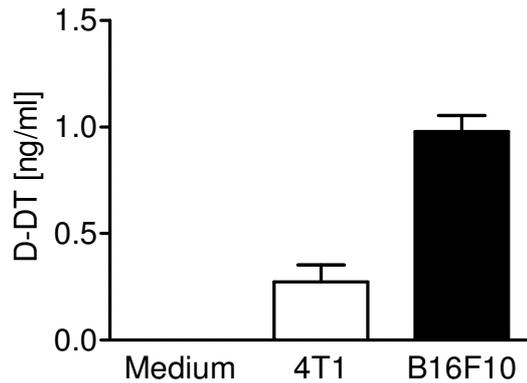


Abbildung 6: D-DT-Sekretion von 4T1- und B16F10-Tumorzellen. Es wurden 2×10^5 Zellen pro 12-Well-Platte ausplattiert. 24 Stunden später wurden die Überstände abzentrifugiert und abgenommen. Die D-DT-Konzentration wurde mittels ELISA ermittelt. Als Negativkontrolle diente Vollmedium. Für beide Tumorzelllinien konnte das Protein D-DT im Überstand detektiert werden. B16F10-Zellen zeigen eine stärkere Sekretion als 4T1-Zellen. Die Abbildung zeigt unter der Angabe der Standardabweichung des Mittelwertes ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Versuchen, jeweils in Triplikaten durchgeführt. Abbildung modifiziert aus (Kobold et al., 2014).

5.1.3 Expressionsprofil von D-DT in tumortragenden Mäusen

Um weitere D-DT-Quellen in der tumortragenden Maus zu ermitteln, wurde der D-DT-Gehalt verschiedener muriner Organe untersucht.

Zunächst wurden 10^6 4T1- oder $0,6 \times 10^6$ B16F10-Tumorzellen in jeweils vier Mäusen subkutan injiziert. Weitere vier unbehandelte Mäuse dienten als Kontrollgruppe. Bei einer durchschnittlichen Tumorgroße von 100 mm^2 wurden die Mäuse getötet und neben dem Tumorgewebe auch Milz und Leber entnommen. Aus den Organlysaten wurde die D-DT-Konzentration mit Hilfe des D-DT-spezifischen ELISAs gemessen und in Relation zu der Gesamtproteinkonzentration im jeweiligen Organlysat gesetzt.

In beiden Tumormodellen konnte sowohl in der Leber, in der Milz als auch im Tumor eine D-DT-Expression festgestellt werden (Abbildung 7). Die stärkste Expression fand sich in der Leber. Die Höhe der D-DT-Expression im Tumor und in der Milz sind vergleichbar. Signifikante Unterschiede in der Expression von D-DT in der Leber konnten nur im 4T1-, nicht aber im B16F10-Tumormodell gefunden werden (Abbildung 7A).

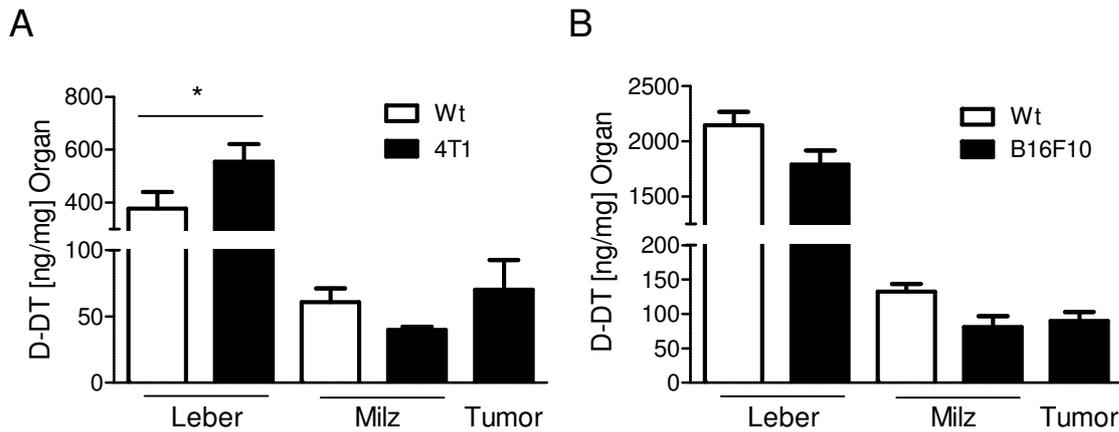


Abbildung 7: Expression von D-DT in Leber, Milz und Tumorgewebe. Nach subkutaner Injektion von (A) 10^6 4T1- oder (B) $0,6 \times 10^6$ B16F10-Tumorzellen und Erreichen einer durchschnittlichen Tumorgröße von 100 mm^2 wurden die Mäuse getötet und die Organe Leber, Milz und Tumor entnommen. Diese wurden anschließend lysiert und die Konzentration von D-DT mittels ELISA gemessen. Die höchste Organkonzentration war in der Leber sowohl tumortragender als auch *Wild-type*-Mäusen zu finden. In dem spontanmetastasierenden 4T1-Tumormodell konnte zudem eine signifikant höhere D-DT-Konzentration in der Leber von Mäusen mit Tumor gemessen werden ($p < 0,05$). Die Diagramme zeigen eines von mindestens zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.

5.1.4 Expression und Sekretion von D-DT in Splenozyten

Nicht nur Tumorzellen, sondern auch Immunzellen produzieren und sezernieren Zytokine (Dranoff, 2004). Es stellt sich daher die Frage, ob D-DT möglicherweise im Tumormodell vermehrt von Immunzellen produziert wird.

Nach subkutaner Injektion von 10^6 4T1- oder $0,6 \times 10^6$ B16F10-Zellen wurde nach Erreichen einer durchschnittlichen Tumorgröße von 100 mm^2 die Milz entnommen. Die D-DT-Expression wurde sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene untersucht. In Gesamtsplenozyten von Mäusen mit 4T1-Tumoren gab es keinen Unterschied in der D-DT-Expression im Vergleich zu Splenozyten gesunder Kontrollmäuse (Abbildung 8A). Im B16F10-Modell fand sich eine moderate Reduktion der mRNA-Expression in den Immunzellen (Abbildung 8B). Diese führte allerdings nicht zu einem Unterschied in der Sekretion von D-DT (Abbildung 8D). Die D-DT-Sekretion von Immunzellen, die aus der Milz einer 4T1- oder B16F10-tumortragenden Maus isoliert wurden, unterschied sich nicht zu der von Immunzellen gesunder Mäuse (Abbildung 8C, D). Die Sekretion als Funktion über die Zeit, mit einem Plateau 12 Stunden nach dem Ausplattieren bei circa $4,3 \text{ ng/ml}$ (4T1) D-DT beziehungsweise $2,3 \text{ ng/ml}$ (B16F10) D-DT, war unabhängig von dem Ursprung der Splenozyten (Abbildung 8C,D).

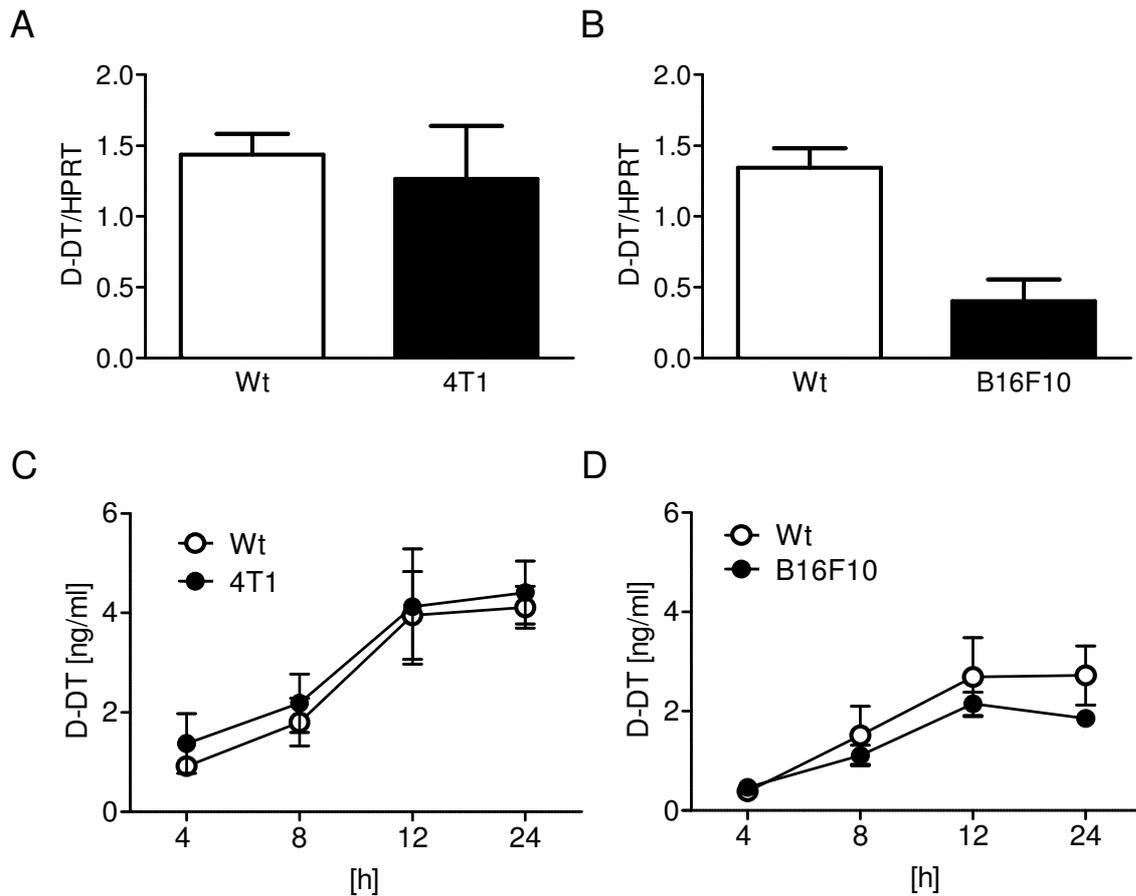


Abbildung 8: Vergleich der mRNA-Expression und Sekretion von D-DT in Splenozyten von tumortragenden und *Wild-type*-Mäusen. (A+B) Messung der mRNA-Expression von D-DT in 10^7 Gesamtsplenozyten mittels quantitativer PCR. D-DT zeigte in der Milz von tumortragenden Mäusen im B16F10-Tumormodell eine niedrigere mRNA-Expression ($p < 0,01$), im 4T1-Modell hingegen gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen tumortragenden und gesunden Tieren. Die Werte sind als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung im Verhältnis D-DT zu HPRT angezeigt. (C+D) Sekretionsanalyse von D-DT. In den Überständen von $2,5 \times 10^6$ Splenozyten pro 12-Well-Platte wurden in den Abständen 4, 8, 12 und 24 Stunden nach Aussaat die Konzentration von D-DT mittels ELISA gemessen. Es zeigte sich für beide Tumormodelle und die zugehörigen Kontrollgruppen eine ähnliche Zunahme der D-DT-Konzentration im Zeitverlauf, die nach 12 Stunden ein Plateau erreichte. Zu keinem Zeitpunkt war ein signifikanter Unterschied in der Sekretionskonzentration von D-DT zwischen Splenozyten von tumortragenden und *Wild-type*-Mäusen zu erkennen. Die gezeigten Daten repräsentieren mindestens zwei unabhängige Experimente mit jeweils $n = 2-4$ pro Gruppe.

5.1.5 Expression der Oberflächenrezeptoren CD74, CXCR2 und CXCR4

Um eine mögliche auto- oder parakrine Rolle von D-DT auf die Tumorzellen zu eruieren, stellte sich die Frage, ob der bekannte D-DT-Rezeptor CD74 und weitere potenzielle Rezeptoren, wie CXCR2 und CXCR4, von den Tumorzellen 4T1 und B16F10 exprimiert werden.

Für beide Tumorzelllinien zeigte sich eine deutliche Bande in der qualitativen *Real-time*-PCR (RT-PCR) und somit eine Expression der Rezeptoren CD74 und CXCR2 (Abbildung 9). Für

den Rezeptor CXCR4 konnte nur in der Tumorzelllinie 4T1 eine Expression nachgewiesen werden. B16F10 exprimiert den Rezeptor nicht (Abbildung 9). Als Positivkontrolle diente die cDNA von murinen Splenocyten, da alle Rezeptormoleküle auf T-Zellen vorhanden sind. Als Negativkontrolle diente Wasser, um eine unspezifische Amplifikation durch die verwendeten Primer auszuschließen.

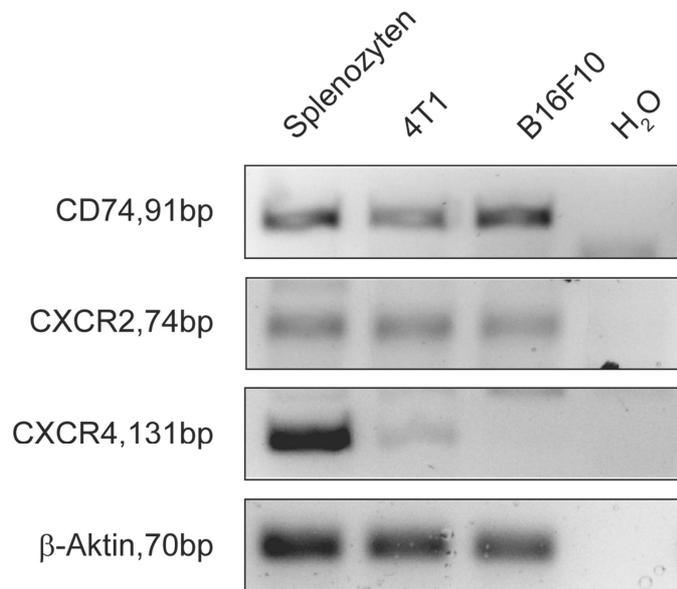


Abbildung 9: Expression der potenziellen Oberflächenrezeptoren von D-DT in 4T1- und B16F10-Tumorzellen. Der Nachweis von CD74-, CXCR2- und CXCR4-mRNA erfolgte nach PCR-Amplifikation von cDNA aus 4T1- und B16F10-Tumorzelllysaten. Als Positivkontrolle diente cDNA von murinen Splenocyten (Spalte 1), als Negativkontrolle Wasser (Spalte 4). Die Amplikonlänge beträgt bei CD74 91 Basenpaare (bp), bei CXCR2 74 bp und bei CXCR4 131 bp. Als Ladekontrolle diente β-Aktin (70 bp). Die Abbildung zeigt eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Abbildung modifiziert aus (Kobold et al., 2014).

5.1.6 *Antisense-siRNA-knock-down* von D-DT in Tumorzellen

Die gezeigte Expression der Rezeptoren von D-DT in Tumorzellen lässt eine auto- beziehungsweise parakrine Funktion vermuten. Da für MIF bereits im Melanom eine wachstumsfördernde Wirkung nachgewiesen wurde (Shimizu et al., 1999), sollte im Folgenden geprüft werden, ob D-DT eine ähnliche Funktion ausübt. In den vorangegangenen Experimenten zeigte die Zelllinie B16F10 im Vergleich zu 4T1 eine stärkere Expression und Sekretion von D-DT, so dass diese Zelllinie für alle folgenden Assays verwendet wurde.

Zunächst wurde die Effizienz des *Antisense-siRNA-knock-downs* von jeweils zwei verschiedenen siRNAs für MIF und D-DT zu den Zeitpunkten 48 oder 72 Stunden nach Transfektion oder mit einer zweiten Transfektion nach 48 Stunden im *Western blot* überprüft. Für D-DT zeigte sich bereits 48 Stunden nach Transfektion eine Verminderung der Expression. Diese nahm mit zeitlichem Abstand zur Transfektion zunächst zu. Am stärksten reduzierte sich die

Expression von D-DT, unabhängig von der verwendeten siRNA, in der Kondition mit zweimaliger Lipofektion. Für MIF zeigte sich der beste *knock-down* nach zweimaliger Lipofektion mit der siRNA MIF2 (Abbildung 10A). Die siRNA D-DT1 für D-DT und die siRNA MIF2 für MIF zeigten nach zweimaliger Transfektion im Abstand von 48 Stunden die stärkste Abnahme der Proteinexpression und wurden für die folgenden Versuche ausgewählt (Abbildung 10A).

Mit den oben genannten siRNAs konnte anschließend auch ein erfolgreicher Doppel-*knock-down* von D-DT und MIF in B16F10-Zellen erzielt werden (Abbildung 10B). Außerdem konnte eine Kreuzreaktivität zwischen der D-DT- und MIF-siRNA mittels *Western blot*-Analyse ausgeschlossen werden (Abbildung 10B).

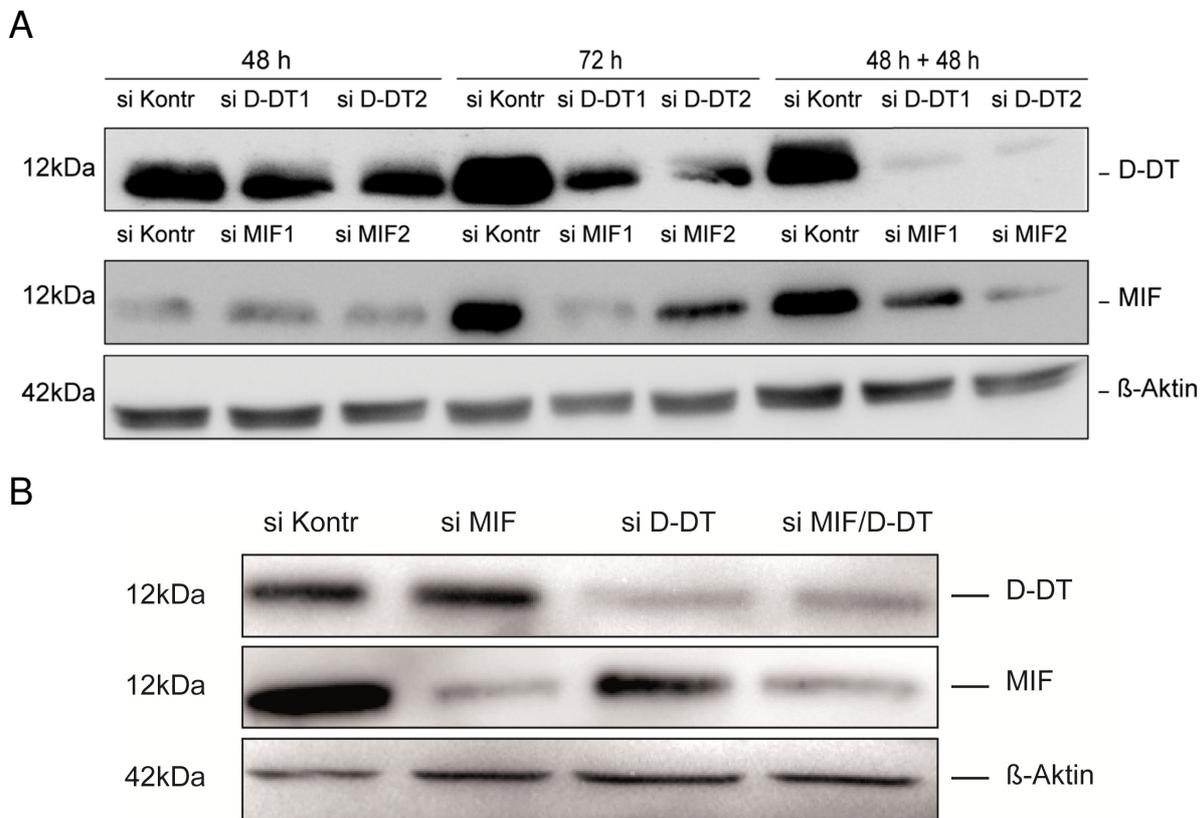


Abbildung 10: Nachweis des erfolgreichen siRNA-*knock-downs* auf Proteinebene. (A) Effizienz des siRNA-*knock-downs* verschiedener siRNAs gegen D-DT und MIF zu den Zeitpunkten 48, 72 oder bei zweifacher Transfektion im Abstand von 48 Stunden nach 96 Stunden. Nach der Herstellung von Zelllysaten wurde die Stärke des *knock-downs* im *Western blot* analysiert. Es zeigte sich vor allem eine verminderte Detektion von D-DT nach 96 Stunden und doppelter Transfektion für die siRNA D-DT1 und D-DT2, sowie von MIF für die siRNA MIF2. (B) Nach zweifacher Lipofektion von 10^5 B16F10-Zellen pro 12-Well-Platte im Abstand von 48 Stunden mit Kontroll-siRNA (si Kontr), siRNA MIF2 gegen MIF (si MIF), siRNA D-DT1 gegen D-DT (si D-DT) oder beiden siRNAs (si MIF/D-DT) wurden nach 96 Stunden Zelllysate hergestellt und mittels *Western blot* analysiert. Bei gleichmäßiger Ladung von β -Aktin war im Vergleich zu der Kontroll-siRNA eine deutlich schwächere Bande für D-DT in der si D-DT- und si MIF/D-DT-Kondition, nicht aber in der si MIF-Kondition zu erkennen. Auch für MIF zeigte sich eine schwächere Bande in der si MIF- und si MIF/D-DT-Bedingung verglichen mit der Kontrolle.

Zum Nachweis eines Einflusses von D-DT auf die Tumorzellproliferation wurde ein BrdU-Proliferations-Assay mit siRNA-behandelten Zellen durchgeführt. Je mehr Zellen proliferieren, desto mehr BrdU wird eingebaut und desto stärker ist die später auszulesende Chemilumineszenz. Als Kontrolle dienten Tumorzellen, die mit siRNA transfiziert wurden, die keine komplementäre RNA im murinen System aufweist. Es zeigte sich für alle drei Versuchsgruppen MIF-, D-DT- sowie dem D-DT und MIF-Doppel-*knock-down* eine signifikant reduzierte Proliferation im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Bei einem alleinigen *knock-down* von MIF zeigte sich eine Reduktion von 32 %. Fehlte den Zellen nur das Protein D-DT sank die Wachstumsrate um 84 % im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Weniger stark ausgeprägt war der Effekt, wenn vermindert D-DT und MIF vorhanden war (Abbildung 11).

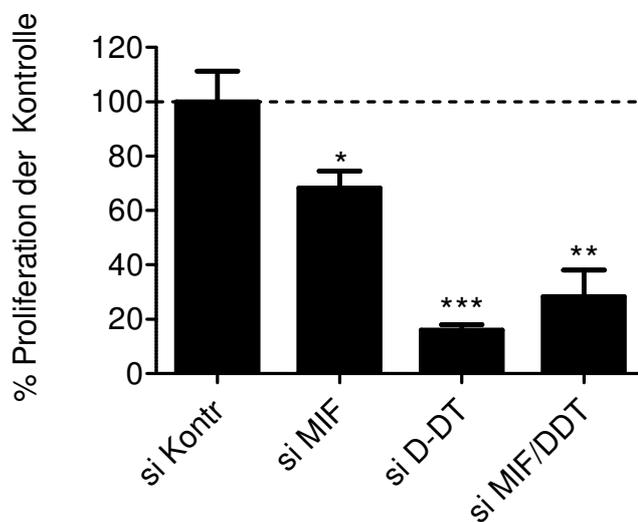


Abbildung 11: Proliferation von B16F10-Tumorzellen nach Herunterregulation von D-DT und MIF. Es wurden 10^4 B16F10-Tumorzellen nach zweimaliger Transfektion von D-DT-, MIF- oder Kontroll-siRNA im Abstand von 48 Stunden in eine 96-Well-Platte ausgesät. 24 Stunden später wurden die sich teilenden Zellen für 4 Stunden mit BrdU inkubiert. Mittels Chemilumineszenz-ELISA konnte die Proliferation der Tumorzellen quantifiziert werden. Es war eine signifikante Reduktion der Proliferation in allen *knock-down*-Gruppen im Vergleich zu der Kontrollgruppe zu sehen. In der Kondition des alleinigen MIF-*knock-downs* zeigte sich eine schwache Reduktion der Proliferation ($p < 0,05$). Am stärksten reduzierte sich das Wachstum durch den alleinigen D-DT-*knock-down* ($p < 0,001$). In der Bedingung des MIF- und D-DT-Doppel-*knock-downs* war die Reduktion stärker als in der des alleinigen MIF-*knock-downs*, aber schwächer als in der si D-DT-Gruppe ($p < 0,01$). Die gezeigten Daten repräsentieren eines von mindestens zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Anschließend wurde mit Hilfe von Staurosporin in den mit D-DT-siRNA-behandelten Zellen eine Apoptose induziert. Mittels des frühapoptotischen Markers Annexin V und des Lebend-Tod-Markers PI konnte die Apoptoserate dargestellt werden. In der Gruppe des D-DT-*knock-downs* zeigte sich eine erhöhte Apoptoserate verglichen zur Kontrollgruppe (si D-DT: 76 % Annexin V-positiv versus si Kontr. 50 % Annexin V-positiv) (Abbildung 12).

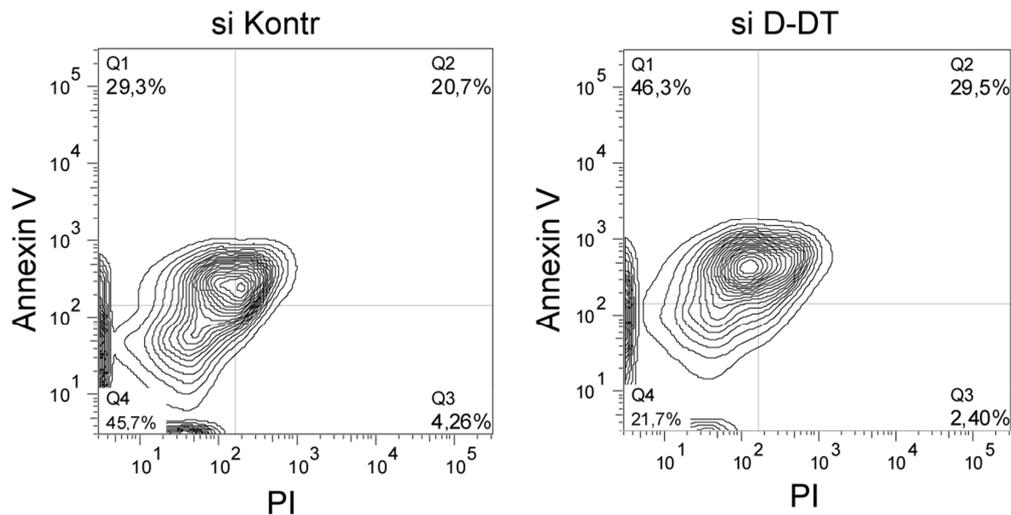


Abbildung 12: Apoptoseinduktion nach siRNA-Transfektion. Nach zweimaliger Transfektion mit Kontroll- beziehungsweise D-DT-siRNA im Abstand von 48 Stunden wurden 24 Stunden nach der zweiten Transfektion $1,5 \times 10^5$ Zellen pro 12-Well-Platte ausplattiert. Ein Tag später wurde mit $2 \mu\text{M}$ Staurosporin die Apoptose induziert. Mittels des Lebend-Tod-Markers PI (X-Achse) und des früh-apoptotischen Markers Annexin V (Y-Achse) wurde wiederum 24 Stunden später die Apoptoserate ermittelt. Es war eine deutliche Zunahme der frühen Apoptose in der D-DT-*knock-down* Gruppe (si D-DT) im Vergleich zur Kontrollgruppe (si Kontr) zu sehen. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente. Abbildung aus (Kobold et al., 2014).

5.1.7 Viabilität der siRNA-behandelten Zellen

Um abzuklären, ob die Reduktion der Proliferation nicht durch eine Zunahme von Zelltod nach siRNA-Transfektion bedingt war, wurde ein Zytotoxizitätstest durchgeführt.

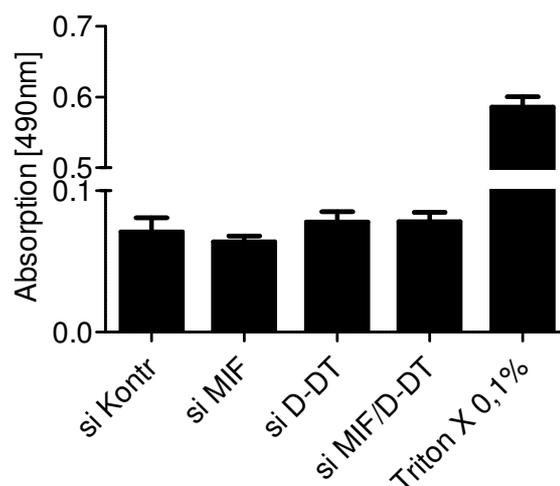


Abbildung 13: Viabilität von B16F10-Tumorzellen nach siRNA-Transfektion. Es wurden 10^4 B16F10-Tumorzellen nach zweimaliger Transfektion von siRNA im Abstand von 48 Stunden in eine 96-Well-Platte ausgesät. 24 Stunden später wurde indirekt mittels Messung von LDH im Überstand der Tumorzellen in den Konditionen siRNA-*knock-down* von D-DT (si D-DT), MIF (si MIF) sowie von MIF und D-DT (si D-DT/MIF) im Vergleich zur Kontrollgruppe (si Kontr) die Zellviabilität ermittelt. Als Positivkontrolle diente der Überstand von Tumorzellen, die zuvor mit Triton X-100 0,1 % behandelt wurden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Menge von LDH im Überstand. Diese

wurde durch den bei 490 nm gemessenen Farbumschlag quantifiziert. Die Abbildung zeigt eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Nach der Transfektion mit siRNA wurden 10^4 Zellen pro 96-Well-Platte ausplattiert und der Überstand 24 Stunden später auf LDH untersucht. Die Menge an LDH ist direkt proportional zu der Menge an untergegangenen Zellen. Hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Bedingungen festgestellt werden (Abbildung 13).

5.2 Neutralisation von D-DT *in vivo*

Nachdem das D-DT-*silencing in vitro* zu einer deutlich reduzierten Proliferation der Tumorzellen geführt hatte, war zu überprüfen, ob sich der Effekt auch *in vivo* nachahmen lässt. Mittels Neutralisation mit anti-D-DT-Antikörper sollte im murinen Melanom-Modell der Einfluss von D-DT auf das Tumorwachstum untersucht werden.

5.2.1 Herstellung eines funktionellen anti-D-DT-Antikörpers

Um diese Versuche durchzuführen, musste ein anti-D-DT-Antikörper in größeren Mengen hergestellt werden.

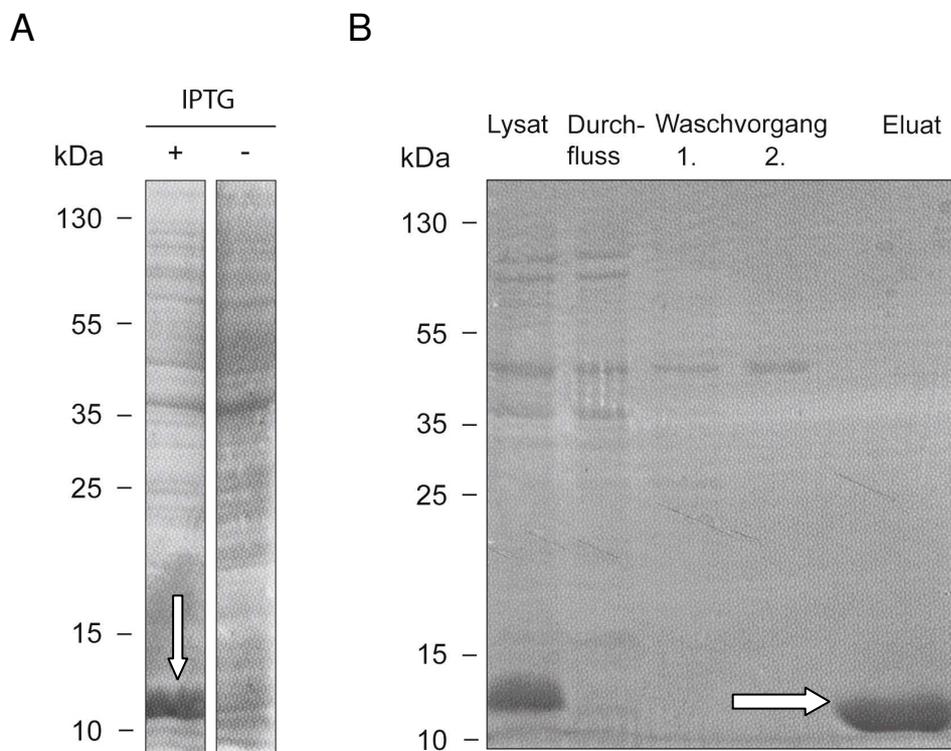


Abbildung 14: Überexpression und Aufreinigung von murinem D-DT. (A) Nach Transformation von *E. coli* BL21 mit einem murinen D-DT-Vektor wurde eine LB-Medium-Übernachtskultur angesetzt. Um eine gezielte Überexpression von murinen D-DT hervorzurufen, wurde das dem Gen vorgeschal-

tete Lac-Operon durch IPTG aktiviert. Erreichte die optische Dichte der Bakterienkultur 0,5 bei 600 nm wurden die Bakterien geerntet und lysiert. Es wurden 30 µl Gesamtprotein vor und nach IPTG-Stimulation aufgetragen. Auf der erwartenden Höhe von 12 kDa fand sich nach IPTG-Stimulation (IPTG+) eine stärkere Bande (siehe Pfeil), als in der vor der Stimulation entnommenen Lysatprobe (IPTG-). (B) Proteinaufreinigung von murinem D-DT. Das Bakterienlysate (Spalte 1) wurde auf die HisBind-Säulen aufgetragen. Das Histidin-gebundene murine D-DT band an das immobilisierte Nickel der Säule. Die zweite Spalte zeigt den Durchfluss mit einer schwachen Bande bei 12 kDa. Nicht gebundene Proteine wurden in zwei folgenden Waschvorgängen entfernt (Spalte 3 und 4, jeweils 10 µl des Durchlaufs). Anschließend wurde mit Imidazol das gewünschte Protein eluiert und aufgefangen (Spalte 5). Es ist nur noch eine deutliche Bande auf der Höhe von 12 kDa zu sehen (siehe Pfeil).

Zur Antikörperherstellung wurde murines D-DT mit synthetisiertem Histidinschwanz zunächst in *E. coli* überexprimiert und zur Immunisierung von Kaninchen aufgereinigt. Eine gesteigerte Expression des Proteins konnte nach Zugabe des Lac-Operon-induzierenden Proteins IPTG erreicht werden (Abbildung 14A, Pfeil). Das nach der Lyse der Bakterien freigewordene D-DT band mit seinem Histidinschwanz an das an der Chromatographiesäule gebundene Nickel. Durch diesen Vorgang konnte eine starke Anreicherung von D-DT erzielt werden (Abbildung 14B, Pfeil).

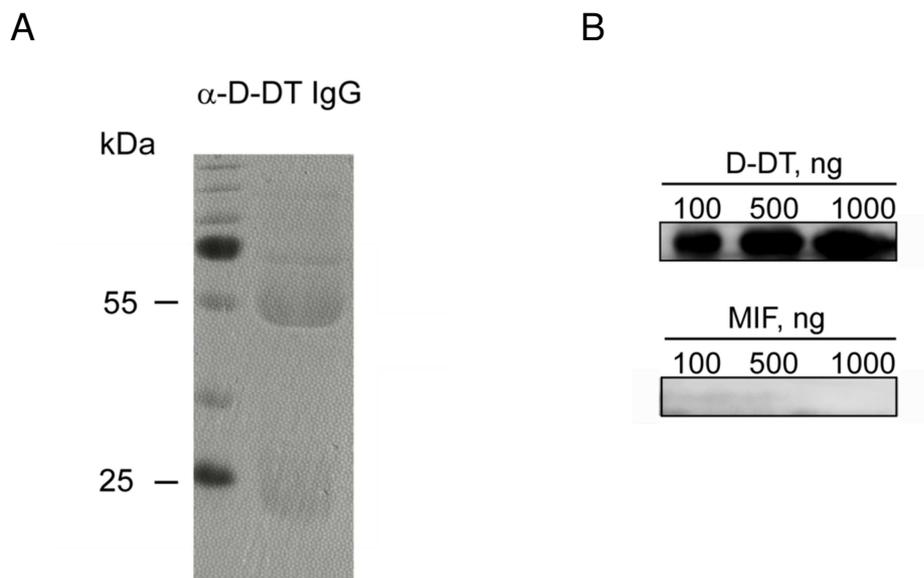


Abbildung 15: Darstellung des polyklonalen anti-D-DT-Antikörpers. (A) Nachweis der leichten (25 kDa) und schweren Kette (55 kDa) des aufgereinigten anti-D-DT-IgG-Antikörpers mittels SDS-Gel. (B) Nachweis der Spezifität des Antikörpers. Es wurden 100, 500 oder 1000 ng rekombinantes D-DT aufgetragen. Im *Western blot* zeigte sich eine deutliche Bindung des Antikörpers bei allen Konzentrationen. Es war keine Kreuzreaktivität mit rekombinantem MIF nachweisbar.

Anschließend wurde das aufgereinigte murine D-DT an die Firma SEQLAB-Sequence Laboratories Göttingen GmbH zur Immunisierung von Kaninchen weitergegeben. Aus dem von den Kaninchen gewonnenen Serum wurde in unserem Labor mit Hilfe einer HisTrap™ NHS-aktivierten Säule der durch die Immunisierung entstandene polyklonale anti-D-DT-Antikörper isoliert und im *Western blot* getestet. Die leichte (25 kDa) und schwere (55 kDa)

Antikörperketten ließen sich in der Coomassie-Färbung darstellen (Abbildung 15A). Entscheidend für eine getrennte Untersuchung der biologischen Funktionen von MIF und D-DT ist, dass der selbsthergestellte anti-D-DT-Antikörper an das Antigen D-DT bindet, aber keine Kreuzreaktivität mit MIF zeigt (Abbildung 15B).

5.2.2 Anti-D-DT-Antikörperbehandlung im B16F10-Tumormodell

Für den folgenden Versuch wurden zunächst allen acht Mäusen am Tag 0 $0,7 \times 10^6$ B16F10-Zellen in die rechte Flanke subkutan injiziert. Am Folgetag wurden jeweils vier Mäuse in die Gruppe mit anti-D-DT-Behandlung und vier in die Kontrollgruppe randomisiert. Am selben Tag erfolgte nach der Gewichtsmessung die erste i.p.-Injektion von 250 μg aufgereinigtem polyklonalen anti-D-DT-Antikörper. Die Kontrollmäuse erhielten 250 μg polyklonalen IgG-Isotyp-Antikörper. Im weiteren Verlauf erfolgte jeden zweiten Tag die Behandlung mit Antikörpern. Die Behandlung mit anti-D-DT-Antikörper führte zu einer Verzögerung des Tumorwachstums bis Tag 17 (mittlere Tumorgröße an Tag 17: anti-D-DT-IgG: $18 \pm 20 \text{ mm}^2$ versus Isotyp-IgG: $79 \pm 89 \text{ mm}^2$) (Abbildung 16). Das mittlere Überleben der mit anti-D-DT-Antikörper behandelten Mäuse war nur gering gegenüber der Kontrollgruppe angestiegen (mittleres Überleben von zwei Versuchen zusammengefasst: anti-D-DT: 23 Tage, Kontrolle: 18,5 Tage; Daten nicht in der Abbildung). Im Verlauf unterschieden sich die zwei Gruppen im Gewicht und Allgemeinbefinden nicht.

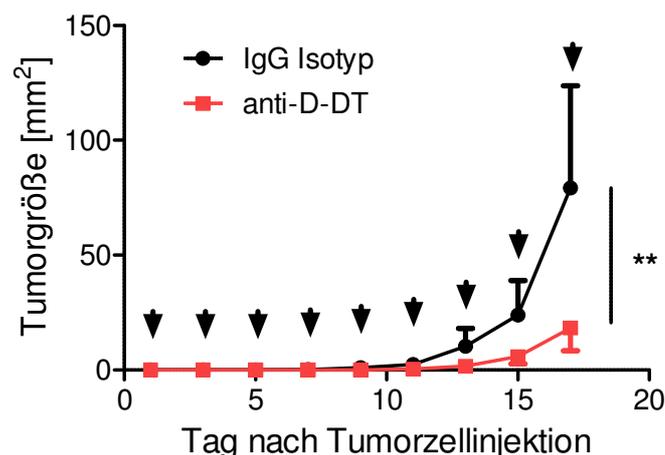


Abbildung 16: Therapieversuch mit anti-D-DT-Antikörper im B16F10-Tumormodell. Am Tag 0 wurde jeder Maus $0,7 \times 10^6$ B16F10-Zellen in die rechte Flanke injiziert. Anschließend fand am Tag 1 eine Randomisierung der Mäuse in eine Behandlungs- (rot)- und Kontroll- (schwarz)- gruppe statt. Jeden zweiten Tag wurden 250 μg polyklonaler anti-D-DT-Antikörper (anti-D-DT) ($n = 4$) oder 250 μg polyklonaler IgG-Isotyp-Antikörper (IgG Isotyp) ($n = 4$) als Kontrolle i.p. injiziert und die Tumorgröße (Länge x Breite) gemessen. Jede Pfeilspitze entspricht einer Behandlung. Im two-way ANOVA-Test ist über den Zeitverlauf bis Tag 17 eine signifikant verminderte Tumormasse in der Gruppe der mit anti-D-DT-Antikörper behandelten Mäuse verglichen zur Kontrollgruppe vorzufinden ($p < 0,01$). Abbildung modifiziert aus (Kobold et al., 2014).

6 Diskussion

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass D-DT sowohl von den murinen Tumorzelllinien 4T1 und B16F10 exprimiert und *in vitro* sezerniert wird als auch im Serum tumortragender Mäuse erhöht ist. Eine Expression von D-DT ist nicht nur, wie bereits bekannt, in der Leber und Milz, sondern auch im Tumorgewebe zu finden. Immunzellen tumortragender Mäuse zeigten keine Veränderung in der Expression oder Sekretion von D-DT im Vergleich zu *Wild-type*-Mäusen. Eine Expression des für D-DT bekannten Rezeptors CD74 konnte in 4T1- und B16F10-Tumorzellen belegt werden. Zudem wurde erstmals für D-DT ein proliferativer und anti-apoptotischer Effekt auf Tumorzellen nachgewiesen. Mittels eines siRNA-*knock-downs* von D-DT oder einer Antikörpertherapie mit polyklonalen anti-D-DT-Antikörpern in einem subkutanen Tumormodell konnte eine Reduktion des Wachstums von B16F10-Tumorzellen erreicht werden.

6.1 Erhöhte D-DT-Serumkonzentration im 4T1- und B16F10-Tumormodell

6.1.1 Mögliche Quellen für die erhöhte D-DT-Serumkonzentration

Um neue potenzielle Targets der Tumorthherapie zuzuführen, wird unter anderem auf eine verstärkte Expression von Genen oder auf eine vermehrte Sekretion von Proteinen in Tumorpatienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe untersucht. In dieser Arbeit steht das Zytokin D-DT im Fokus. Nach Etablierung von subkutanen 4T1- beziehungsweise B16F10-Tumoren konnte erstmals im Serum von tumortragenden Mäusen eine signifikante, bis zu dreifach, höhere D-DT-Konzentration als im Serum nicht-tumortragender Mäuse gefunden werden. Es stellte sich somit die Frage, woher das zusätzliche D-DT stammt.

Eine mögliche Quelle sind die Tumorzellen selbst. Die in dieser Arbeit gezeigte hohe Expression und Sekretion von D-DT aus den murinen Tumorzelllinien 4T1 und B16F10 bekräftigt diese Hypothese. Außerdem ist die Annahme vereinbar mit bisher publizierten Arbeiten, die D-DT in den humanen Tumorzelllinien HT-29 und HCT-116 (jeweils Kolon) (Xin et al., 2010), A549 und H23 (jeweils Lunge) (Coleman et al., 2008), RCC4 und 786-O (jeweils klarzelliges Nierenzellkarzinom) (Pasupuleti et al., 2014) und IGR-1 (Melanom) (Odh et al., 1993) nachweisen konnten.

Auch *in vivo* konnte eine D-DT-Expression im Tumorgewebe aufgezeigt werden. Für beide Tiermodelle wurde eine der Milz entsprechende D-DT-Konzentration gemessen (4T1: 70 +/-

54 ng D-DT pro mg Organ, B16F10: 90 +/-25 ng D-DT pro mg Organ). Es wurde damit eine Expression von D-DT im Tumorgewebe belegt. Für das Homolog MIF wurde bereits *in vivo* eine Expression in Tumorzellen, wie die des Kolonkarzinoms oder des Larynxkarzinoms, nachgewiesen (He et al., 2009), (Kindt et al., 2013). Der aus einer Tumoringokulation von CT26-Zellen in MIF-*knock-out*-Mäusen resultierende Serumanstieg ist ein weiterer Beweis, dass das Zytokin verstärkt durch den Tumor produziert wird (Choi et al., 2012). Überträgt man diese Ergebnisse auf das Zytokin D-DT und greift die in dieser Arbeit gezeigte Expression von D-DT in Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* auf, liegt es nahe, dass die erhöhte Serumkonzentration von D-DT in den tumortragenden Mäusen unter anderem durch die Tumorzellen selbst bedingt sein kann.

Hierbei ist zu beachten, dass auch die tumorassoziierten Stromazellen, wie zum Beispiel Fibroblasten und Endothelzellen, Zytokine produzieren. In einer Immunfärbung von Brustkrebsgewebe konnte das Homolog MIF neben den Tumorzellen auch in Stromazellen, vornehmlich in Fibroblasten, im Vergleich zu normalem Gewebe verstärkt detektiert werden (Richard et al., 2014). Auch aus gastrointestinalen Tumoren isolierte Fibroblasten zeigten eine gesteigerte Sekretion von MIF (Morris et al., 2014). Von Endothelzellen freigesetztes MIF führt zu einer gesteigerten Proliferation von B-Zelllymphomzellen (Chesney et al., 1999). Auf das Zytokin D-DT abgebildet, stellen tumorassoziierte Stromazellen eine mögliche weitere Quelle für den erhöhten Serumspiegel dar.

Es ist bekannt, dass die 4T1-Tumorzelllinie spontan in die Leber metastasiert (Pulaski und Ostrand-Rosenberg, 2001). In dieser Arbeit konnte in beiden Tumormodellen eine erhöhte D-DT-Konzentration in der Leber im Vergleich zur Milz und dem Tumorgewebe gemessen werden. Auffällig ist, dass im 4T1-Modell ein signifikanter Unterschied zwischen der D-DT-Expression in der Leber tumortragender und gesunder Mäuse bestand. Bei immunhistochemischen Untersuchungen von Metastasen in der Leber von Patienten mit kolorektalem Karzinom stellte sich in tumorinfiltrierten Arealen eine gesteigerte Produktion des Homologs MIF dar (He et al., 2009). Übertragen auf das 4T1-Modell lässt sich die erhöhte D-DT-Konzentration vermutlich auf eine Überexpression des Zytokins der in der Leber befindlichen Metastasen zurückführen. In gesunden Arealen bleibt die D-DT-Expression, wie im B16F10-Modell angedeutet, unverändert. Tumorzellen aus Metastasen tragen im 4T1-Modell im Unterschied zum B16F10-Modell vermutlich zusätzlich zu der erhöhten Serumkonzentration von D-DT in tumortragenden Mäusen bei.

Die hohe Serumkonzentration im Brustkrebs-Modell im Vergleich zum Melanom-Modell ist widersprüchlich zu der *in vitro* gezeigten geringeren D-DT-Sekretion der 4T1-Zellen. Neben

den oben genannten Lebermetastasen kann im Gegensatz zum B16F10-Modell eine weitere D-DT-Quelle für das 4T1-Modell vermutet werden. Die für das Brustkrebs-Modell bekannte massive Expansion von myeloiden Zellen, vor allem CD11b⁺-Zellen, führt zu einer Splenomegalie und einer starken Infiltration der Immunzellen in den Tumor (DuPre und Hunter, 2007). Da D-DT nicht nur von Tumorzellen, sondern auch von Makrophagen produziert und sezerniert wird, könnte die Sekretion aus Immunzellen, insbesondere aus myeloiden Zellen, die erhöhte Serumkonzentration erklären.

Um die Immunzellen als Quelle für die erhöhte D-DT-Serumkonzentration zu prüfen, wurde die Milz als lymphatisches Organ untersucht. Weder im 4T1- noch im B16F10-Tumormodell konnte eine signifikant veränderte D-DT-Konzentration im Organlysat ermittelt werden. Es zeigte sich die Tendenz zu einer verminderten Expression von D-DT in der Milz von tumortragenden Mäusen. Ein ähnliches ungeklärtes Phänomen wurde bereits für das Homolog MIF gezeigt. Splenozyten in Mäusen mit fortgeschrittenem Tumor verlieren die Eigenschaft nach Antigenstimulation MIF zu produzieren (Oisgold-Daga et al., 1982). Dies würde auch einen leichten Rückgang der gemessenen D-DT-Expression in der Milz erklären.

Um die Regulation von D-DT in Immunzellen weiter zu untersuchen, wurde die Expression und Sekretion von D-DT in isolierten Splenozyten ermittelt. In beiden Tumormodellen konnte wie erwartet eine Expression und Sekretion von D-DT in Splenozyten gezeigt werden. Im 4T1-Tumormodell zeigte sich weder auf posttranskriptionaler Ebene noch in der Sekretion von D-DT ein Unterschied zu Splenozyten von gesunden Kontrollmäusen. Die mRNA-Expression von D-DT im B16F10-Tumormodell ist moderat, aber signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Die Gesamtheit der Immunzellen aus der Milz tumortragender Mäuse kann also die höhere Serumkonzentration nicht erklären. Trotzdem könnte die D-DT-Expression in bestimmten Immunzellsubgruppen durch den Tumor hoch oder herunter reguliert sein. Sind diese jedoch prozentual zu gering vertreten, fallen sie bei der Analyse der gesamten Immunzellen nicht ins Gewicht.

Außerdem wurden in dieser Arbeit Splenozyten aus tumortragenden Mäusen *in vitro*, jedoch nicht tumorinfiltrierende Immunzellen untersucht. Frühere immunhistologische Untersuchungen zeigen, dass sowohl in Brustkrebszellen als auch in tumorassoziierten Makrophagen das Homolog MIF zu finden ist (Bando et al., 2002). Durch den Einfluss des Tumormikromilieus kann sich das Expressionsprofil von Immunzellen stark verändern. So tragen tumorassoziierte Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) ein anderes Rezeptorprofil als im peripheren Blut von Patienten mit Kolonkarzinom und zeigen deshalb eine schlechtere NK-Zellfunktionalität (Rocca et al., 2013). Es ist also vorstellbar, dass tumorassoziierte Immunzellen, wie *myeloid-*

derived suppressor cells (MDSC) oder *tumor-associated macrophages* (TAM) die Fähigkeit zur verstärkten D-DT-Sekretion besitzen.

Somit stellen vornehmlich die Tumorzellen mit dem umgebenden Stroma und die Metastasen, nicht aber die in der Milz befindlichen Immunzellen, eine Quelle für die erhöhte D-DT-Serumkonzentration in tumortragenden Mäusen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe dar.

6.1.2 Diagnostische Relevanz der erhöhten Serumkonzentration

Um der erhöhten Serumkonzentration eine diagnostische Relevanz im Rahmen der Tumorgenese zusprechen zu können, ist zu beachten, dass für MIF zwischen Gesunden und Tumorpatienten, jedoch nicht zwischen Patienten mit benignen und malignen Läsionen der Mammæ Unterschiede in den Serumkonzentrationen gemessen werden konnten (Jesneck et al., 2009). Wahrscheinlich ist dieses Phänomen auf eine inflammatorische Reaktion zurückzuführen, die in beiden Dignitäten eine Rolle spielt und zu einer Erhöhung der MIF-Serumkonzentration führt. Da auch D-DT als inflammatorisches Zytokin bekannt ist, sollten für D-DT die Serumkonzentrationen von benignen und malignen Tumoren verglichen werden.

Zudem sollte geprüft werden, ob das Expressionsprofil von D-DT in entarteten Zellen im Vergleich zu gesunden verändert ist. Für das Homolog MIF konnte eine deutlich höhere Expression in neoplastisch veränderten Zellen verglichen mit dem Ursprungsgewebe aufgezeigt werden. Im Vergleich zu Melanozyten ist die Produktion von MIF in Melanomzellen hochreguliert. In der Immunhistochemie zeigt sich neben der normalen Verteilung von MIF im Zytoplasma eine verstärkte Färbung des Nukleus der Tumorzellen (Shimizu et al., 1999). Weder Melanozyten noch Brustdrüsenzellen, die Ursprungsgewebe der beiden verwendeten Modelle, wurden bisher auf ihren D-DT-Gehalt untersucht. Es gilt diejenigen Tumorerkrankungen zu identifizieren, die D-DT verglichen zum Ursprungsgewebe verstärkt exprimieren, da D-DT als Target in diesen Identitäten für eine gezielte Tumorthapie in Frage kommt.

Inwiefern die Tumorgröße und die D-DT-Serumkonzentration miteinander korrelieren ist noch unklar. Allerdings werden die dazu erforderlichen Versuche, angenommen D-DT verhält sich wie das Homolog MIF, durch eine vermehrte Ausschüttung des Zytokins aus Zellen der vorderen Hypophyse bei Stresssituationen, wie zum Beispiel Blutabnahmen, erschwert (Bernhagen et al., 1993). Eine direkte Korrelation von Tumorgröße zu Serumkonzentration

festzustellen, ist deshalb schwierig. Die MIF-Serumkonzentrationen von Patienten mit Brustkrebs zeigten keine Korrelation mit der TumorgroÙe, jedoch mit dem Lymphknotenbefall. Je mehr Lymphknoten befallen waren, desto stärker sank die MIF-Serumkonzentration (Bando et al., 2002). Offen bleibt also, ob D-DT eine diagnostische Relevanz bei der Einstufung der TumorgroÙe und eventuell sogar eine prognostische Bedeutung besitzt.

6.2 Auto- und parakrine Funktion von D-DT

6.2.1 Rezeptorprofil für autokrine Stimulation

Die Expression von D-DT in den beiden Tumorzelllinien 4T1 und B16F10 lässt eine auto- oder parakrine Stimulation durch D-DT vermuten.

Die Expression des Rezeptors CXCR2 konnte in 4T1- und B16F10-Zellen, die Expression des Rezeptors CXCR4 ausschlieÙlich in 4T1-Zellen nachgewiesen werden. Erstmals wurde die Expression des für D-DT bekannten Rezeptors CD74 in den Tumorzelllinien 4T1 und B16F10 gezeigt. CD74 wurde bisher in einigen epithelialen Tumorentitäten, wie zum Beispiel dem B-Zelllymphom, nachgewiesen (Stein et al., 2004).

Eine autokrine Schleife, die zur autonomen Proliferation anregt, ist zwischen sezerniertem D-DT und dem Rezeptor CD74 in den untersuchten Tumormodellen denkbar. Beide Tumorzellreihen sezernieren das Zytokin D-DT und exprimieren gleichzeitig den Rezeptor CD74. Die Bindung von D-DT an CD74 ist funktionell wirksam, da eine CD74-abhängige Aktivierung der ERK1/2 MAP-Kinase (Merk et al., 2011) oder der JNK (Coleman et al., 2008) durch D-DT resultiert. Der Nachweis eines Wachstumsstimulus durch die Bindung an den Rezeptor konnte bisher nur für das Homolog MIF gezeigt werden. In einem humanen Brustkrebs-Modell zeigt sich für die CD74-exprimierenden Tumorzellen durch Zugabe von rekombinantem MIF eine maximale Proliferation im Vergleich zu CD74-negativen Tumorzellen (Verjans et al., 2009). Noch deutlicher wird der autokrine Signalweg MIF/CD74 durch eine mittels CD74-*knock-down* hervorgerufene Hemmung des Tumorwachstums (Du et al., 2013). Auch die Inhibition der Zellproliferation mit dem kleinen Molekül ISO-1 zeigt nur in CD74-positiven Prostatakarzinomzellen einen Effekt (Meyer-Siegler et al., 2006). Vorstellbar ist auch, dass D-DT über den potenziellen Rezeptor CXCR4 eine Signalkaskade im Rahmen der Tumorgenese anstoÙen kann. Im 4T1-Modell konnten bereits CXCR4-abhängige Proliferations- und Uberlebensstimuli nachgewiesen werden (Smith et al., 2004).

Ungeklärt ist, ob D-DT an die, bisher nur für MIF bekannten, Chemokinrezeptoren CXCR2 und CXCR4 binden kann. Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit zu MIF sind sie jedoch potenzielle Rezeptoren für D-DT. Beide Zytokine besitzen das für die Bindung an den Rezeptor CXCR2 entscheidende N-terminale Prolin (Fingerle-Rowson et al., 2009). Jedoch könnte die Affinität durch das fehlende pseudo-(E)LR (Arg-11, Asp-44)-Motiv, das für eine besonders hohe Affinität von MIF an den CXCR2-Rezeptor entscheidend ist, geringer ausfallen (Weber et al., 2008). Für die Bindung an CXCR4 ist das Motiv nicht entscheidend, so dass eine stärkere Bindung an CXCR4, als an CXCR2 von D-DT zu erwarten ist.

Weiterhin bleibt die funktionelle Bedeutung von D-DT und seinen potenziellen Rezeptoren CD74, CXCR2 und CXCR4 im murinen Tumormodell offen. Möglich ist, dass das Zytokin autokrin auf die Tumorzelle wirkend, diese zur Proliferation oder Ausschüttung weiterer proneoplastischer Faktoren wie *transforming growth factor-β* (TGF-β) anregt.

6.2.2 Parakrine Immunmodulation durch D-DT in der Tumorgenese

Die Rezeptoren CXCR2 und CXCR4 finden sich nicht nur auf Tumorzellen, sondern auch auf Immunzellen. MIF löst Chemotaxis und Zellmigrationsarrest von Makrophagen und T-Zellen aus (Bernhagen et al., 2007). Ob auch D-DT eine parakrine Funktion als Zytokin zwischen Immunzellen oder Immun- und Tumorzellen besitzt, soll im Folgenden diskutiert werden.

Immunzellen spielen in der Tumordestruktion, aber auch in der Tumortoleranz eine wichtige Rolle. Auf der einen Seite gibt es die zytotoxischen T-Zellen, die nach tumorspezifischer oder tumorassoziierter Antigenpräsentation die Apoptose von Tumorzellen einleiten können. Es kann jedoch im Verlauf zu einer Toleranz des Immunsystems kommen. Rekrutiert der Tumor vermehrt immunsuppressive Zellen, wie regulatorische T-Zellen oder MDSC aus dem Knochenmark oder der Milz (Cortez-Retamozo et al., 2012), werden antitumoröse Aktivitäten der zytotoxischen T-Zellen aktiv unterdrückt.

Studien über MIF sprechen für eine immunsuppressive Rolle und damit eine Förderung des Tumorwachstums. MIF wird vor allem von aktivierten T-Zellen sezerniert (Bacher et al., 1996). Autokrin regt MIF die T-Zelle zu einer erhöhten IL-2-Produktion an. Ist die IL-2-Produktion aufgrund von MIF-*knock-out*-Mäusen vermindert, kommt es zu einer geringeren Bildung von immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen in der Milz und im Tumor (Choi et al., 2012). Die Bildung und Aktivität zytotoxischer T-Zellen aus Splenozyten nimmt nach anti-MIF-Antikörpertherapie zu (Abe et al., 2001). TAM und MDSC zeigen eine verminderte immunsuppressive Wirkung in MIF-*knock-out*-Mäusen (Yaddanapudi et al., 2013). Der

Anstieg von monozytären MDSCs im Tumor nach erhöhter MIF-Sekretion aus Tumorzellen bestätigt (Simpson et al., 2012), dass MIF parakrin eine aktive Immunabwehr gegen den Tumor mittels TAM und MDSC zu unterdrücken versucht. Auch für D-DT ist eine solche Funktion denkbar. Hierzu müssen spezifische Immunzellsubgruppen, wie regulatorische T-Zellen, MDSCs oder TAMs, auf ihr Verhalten nach D-DT-Stimulation untersucht werden.

Bisher wurde für D-DT eine parakrine Funktion als proinflammatorisches Zytokin nachgewiesen. Neutralisiert man von Makrophagen freigesetztes D-DT kommt es zu einer Senkung der Serumspiegel der Zytokine TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , und IL-12p70 (Merk et al., 2011). Im Umkehrschluss unterhält D-DT ein entzündliches Geschehen. Es ist seit langem bekannt, dass chronische Entzündungen mit der Tumorentstehung im Zusammenhang stehen können. Erstens kommt es durch Mutationen zur Aktivierung von Onkogenen und Suppression von Tumorsuppressorgenen, die die Tumorzelle anregen inflammatorische Mediatoren freizusetzen und eine entzündliche, den Tumor aufrechterhaltende Umgebung, entstehen lassen (Mantovani et al., 2008). Zweitens stellt eine chronische Entzündung bereits einen Risikofaktor für eine Karzinogenese dar (Bucala und Donnelly, 2007). Ein führendes Beispiel ist das Kolonkarzinom, das sich aus chronisch entzündlichen Darmerkrankungen entwickeln kann (Lukas, 2010). Für das Mutterprotein MIF wurden bereits mehrere Verbindungen zwischen seinen proinflammatorischen Eigenschaften und dem Tumorwachstum erörtert. Zum Beispiel löst MIF durch die Unterdrückung von p53-abhängigem Zelltod von Makrophagen eine anhaltende Entzündung aus (Mitchell et al., 2002). Es wird diskutiert, dass die Entzündung wiederum die Tumorgenese und das Tumorwachstum unterhält (Coussens und Werb, 2001). Da die Dynamik der Sekretion und die Serumkonzentration von D-DT nach LPS-Stimulation von Makrophagen mit den Ergebnissen von MIF vergleichbar sind, erscheinen auch Überschneidungen auf immunmodulatorischer Ebene in der Tumorgenese möglich (Merk et al., 2011).

Es ist vorstellbar, dass D-DT als parakrin wirkendes Zytokin sowohl durch immunsuppressive, als auch durch proinflammatorische Eigenschaften prokanzerös wirkt.

6.2.3 Parakrine Rolle in der Angiogenese

MIF und D-DT beeinflussen parakrin nicht nur die Tumorzellen und die umgebenden Immunzellen, sondern auch das Endothel. Eine verminderte Expression von CD31 in den Tumoren von MIF-*knock-down*-Mäusen zeigt, dass das Zytokin für die Angiogenese und somit für das weitere Tumorwachstum entscheidend ist (Girard et al., 2012). Die durch MIF ausgelöste Migration von Endothelzellen und die sich dadurch entwickelnde Gefäßneubil-

dung ist MAP-Kinasen und Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)-abhängig (Amin et al., 2003). Auch D-DT scheint parakrin Einfluss auf das Endothel zu nehmen. SiRNA-vermittelter Verlust von D-DT in Lungenkarzinomzellen führt zu einer verminderten *Human umbilical vein endothelial cell* (HUVEC)-Migration und Gefäßformation (Coleman et al., 2008).

6.3 Tumorfördernde Effekte von D-DT

Die ungehinderte Proliferation ist eines der Grundcharakteristiken von Krebszellen. Wird normalerweise in gesundem Gewebe ein Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose aufrechterhalten, kommt es in Krebszellen zu einer erhöhten Expression von Wachstumsfaktoren, die die Zellteilung anregen und Überlebenssignale geben, so dass es zum Tumorstadium und vermindertem Zelltod kommt (Hanahan und Weinberg, 2011).

6.3.1 D-DT als proliferativer Stimulus

Um den Einfluss von D-DT auf die Proliferation der Tumorzellen herauszufinden, wurde zunächst ein *in vitro*-Proliferations-Assay durchgeführt. Zum Vergleich wurde das Mutterprotein MIF herangezogen. Um eine mögliche additive Wirkung der beiden Zytokine festzustellen, wurde mit einem Doppel-*knock-down* von MIF und D-DT gearbeitet. Hier zeigte sich, dass D-DT stärker noch als MIF die Proliferation der Zellen beeinflusst, dieser Effekt allerdings weder synergistisch noch additiv ist.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal *in vitro* für D-DT eine proliferative Rolle in Tumorzellen dargestellt werden. Bisher war nur eine pro-angiogenetische und somit nur indirekt das Tumorstadium unterstützende Funktion bekannt (Coleman et al., 2008). In der Zwischenzeit wurde auch eine D-DT-abhängige Tumorstadiumproliferation in humanen Nierenkarzinomzellen gefunden, was das Ergebnis dieser Arbeit bekräftigt. Fehlt in diesen Versuchen aufgrund eines shRNA-*knock-downs* D-DT, wird das Zellwachstum um 50 % reduziert. Als Ursache wird unter anderem der Anstieg des Zellzyklusinhibitors p27 vermutet (Pasupuleti et al., 2014). In dieser Doktorarbeit konnte eine Reduktion des Zellwachstums auf 16 % verglichen zur Kontrolle gezeigt werden. Damit ist die antiproliferative Wirkung von D-DT im Melanom-Modell um ein Vielfaches stärker als die von MIF (Reduktion auf 68 %). Bei gleichem *Knock-down*-Level der Zytokine D-DT und MIF kann diese Aussage auch im Modell des humanen Nierenzellkarzinoms bestätigt werden (Pasupuleti et al., 2014). Für spätere Therapieansätze ist entscheidend, ob der proliferative Stimulus allein auf Tumorzellen oder auch auf gesundes Gewebe wirkt. Für MIF konnte bereits gezeigt werden,

dass vor allem das Zellwachstum undifferenzierter Gewebe beeinflusst wird. So führte ein *shRNA-knock-down* nur in Melanomzellen zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation, der Migration und der Angiogenese. Das Wachstum der Melanozyten war von dieser Therapie kaum beeinträchtigt (Shimizu et al., 1999). Die in dieser Arbeit gezeigte starke Expression und Sekretion von D-DT in den Tumorzellen spricht für eine ähnliche Wirkungsweise.

Die Reduktion der Proliferation war auch in der *MIF-knock-down*-Gruppe signifikant, wenn auch, wie oben genannt, schwächer als in der *D-DT-knock-down*-Gruppe. In verschiedenen Tumorentitäten, wie auch kürzlich in *high grade* Blasen Tumoren (Choudhary et al., 2013), konnte ein fördernder Einfluss von MIF auf die Tumorpheriferation nachgewiesen werden. Da MIF jedoch über mehrere Mechanismen, wie zum Beispiel Förderung der Angiogenese (Girard et al., 2012) und Immunregulation (Simpson et al., 2012), das Tumorzellwachstum beeinflussen kann, ist die alleinige Reduktion der MIF-Produktion in den Tumorzellen sicher nicht ausreichend für eine adäquate Tumorthherapie.

Fehlen aufgrund des *Doppel-knock-downs* beide Proteine D-DT und MIF, wachsen B16F10-Zellen vermindert. Im Umkehrschluss konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass D-DT und MIF gemeinsam einen proliferativen Effekt auf Tumorzellen besitzen. Später konnte die Gruppe um Pasupuleti mit einem *Doppel-shRNA-knock-down* in humanen Nierenkarzinomzellen die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen. Hier wirkten die beiden Zytokine sogar additiv (Pasupuleti et al., 2014). Dies ist möglicherweise mit einer unzureichenden Depletion beider Zytokine durch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten siRNA zu erklären. Eine siRNA wird im Gegensatz zu der von der Wirtszelle ständig nachproduzierten *shRNA* schnell abgebaut, so dass der Effekt nicht lange anhält und deswegen schwächer ausgeprägt ist (Rao et al., 2009).

Durch den *knock-down* von D-DT wird die Expression von MIF und vice versa nicht beeinflusst. Obwohl beide Proteine eine ähnliche Funktion besitzen, findet bei der Depletion des einen Proteins keine funktionelle Kompensation durch das Andere statt, was bereits anhand des endotoxischen Schocks gezeigt wurde (Merk et al., 2011). Auch in der Studie von Pasupuleti et al. bleibt die Proliferation trotz erhaltenem MIF beziehungsweise D-DT reduziert (Pasupuleti et al., 2014). Dies spricht dafür, dass beide Zytokine trotz ähnlicher Struktur und Funktion möglicherweise keine vollkommen überlappenden Signalwege besitzen. Hier besteht gerade für D-DT noch weiterer Forschungsbedarf.

6.3.2 Anti-apoptotische Eigenschaft von D-DT

In dieser Arbeit wurde erstmals eine anti-apoptotische Eigenschaft für D-DT nachgewiesen. Induziert man den Zelltod mittels Staurosporin, zeigen mit D-DT-siRNA-behandelte Zellen verglichen zur Kontrollgruppe eine verstärkte frühe Apoptose. In neueren Studien bewirkt ein Doppel-shRNA-*knock-down* von MIF und D-DT eine gesteigerte Apoptose in Bronchialkarzinomzellen (Brock et al., 2014). Auch für MIF konnte in humanen Pankreaskarzinomzellen ein anti-apoptotischer Effekt gezeigt werden (Denz et al., 2010). Sowohl über den PI3K/Proteinkinase B (PKB)-Signalweg (Lue et al., 2007), als auch durch die Unterdrückung von p53 wird die Apoptose durch MIF verhindert (Fingerle-Rowson et al., 2003). D-DT führt nur gemeinsam mit MIF zu einer verminderten Expression von p53 in Bronchialkarzinomzellen. Fehlt D-DT nach einem siRNA-*knock-down* ist nur der Zellzyklusinhibitor p27 erhöht (Brock et al., 2014). D-DT wirkt durch Inhibition des Zelltodes und Förderung des Zellzyklus auf die Tumorzellen wachstumsfördernd.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass D-DT eine proliferative und anti-apoptotische Wirkung auf Tumorzellen *in vitro* besitzt, die sich der bereits bekannten pro-angiogenetischen Funktion anschließen (Coleman et al., 2008). Durch diese sich ergänzenden Effekte stellt die Neutralisation von D-DT einen therapeutischen Ansatz in der Onkologie dar.

6.4 D-DT-Inhibition verzögert das Tumorwachstum

Die anti-D-DT-Antikörpertherapie in dieser Arbeit führte zu einem verzögerten Tumorwachstum verglichen zur Kontrollgruppe, so dass erstmalig eine das Tumorwachstum fördernde Funktion von D-DT im murinen Tumormodell *in vivo* nachgewiesen werden konnte. Hiermit ergibt sich eine weitere Überschneidung der protumoralen Eigenschaften der beiden Zytokine D-DT und MIF. Die Ergebnisse spiegeln die bereits *in vitro* gezeigten antiproliferativen Eigenschaften nach D-DT-Suppression wieder. Die später veröffentlichte Arbeit von Pasupuleti et al. untermauert diese Daten zusätzlich. Mittels shRNA-*knock-down* von D-DT konnte in einem orthotopen Tumormodell eines humanen klarzelligen Nierenzellkarzinoms (786-O) ein wachstumsfördernder Effekt von D-DT *in vivo* nachgewiesen werden. Die stärkste Reduktion des Tumorwachstums zeigte sich im Mausmodell nach shRNA-*knock-down* von D-DT (Pasupuleti et al., 2014). D-DT scheint also auch *in vivo* das Tumorwachstum zu beeinflussen. Um zudem einen möglichen Effekt auf die Gesamtmortalität zeigen zu können, wäre eine größere Fallzahl notwendig. Die kleine Gruppengröße in dieser Arbeit ist auf die

limitierte Verfügbarkeit des für die *in vivo*- Studie entwickelten polyklonalen Antikörpers zurückzuführen.

Die Möglichkeit der D-DT-Neutralisation mittels eines polyklonalen Kaninchen anti-D-DT-Antikörpers *in vivo* wurde bisher nur in einem Sepsis-Modell gezeigt (Merk et al., 2011). Mittels anti-MIF-Antikörpertherapie konnten bereits im murinen Kolonkarzinom-Modell deutliche wachstumshemmende Effekte hervorgerufen werden (He et al., 2009, Nishihira et al., 2003). Zudem konnte Hussain et al. mit einem voll humanisierten monoklonalen anti-MIF-Antikörper das Tumorwachstum von Prostatakarzinomzellen hemmen (Hussain et al., 2013). Dies ebnete den Weg für eine erste klinische Phase I-Studie mit anti-MIF- Antikörpern in soliden Tumoren (Yazji et al., 2013). Generell sind D-DT und MIF gut für eine Antikörpertherapie geeignet, da sie sezernierte Zytokine sind und somit bereits extrazellulär abgefangen werden können. Zu beachten ist, dass andere Daten darauf hinweisen, dass eine Antikörpertherapie nur in frühen Tumorstadien effektiv sein kann. In einem Lymphom-Modell war der therapeutische Effekt bei einer fortgeschrittenen Tumorgröße nur sehr schwach ausgeprägt (Chesney et al., 1999). Es scheinen auch nicht alle Tumorerkrankungen gleich gut auf Antikörpertherapien anzusprechen, so dass geklärt werden muss, welche Tumorarten in welcher klinischen Situation für eine anti-D-DT-Antikörpertherapie zugänglich sind.

Unklar bleibt, durch welchen Mechanismus die Antikörpertherapie das Wachstum des Tumors verzögert. Zum einen könnte die Neutralisation direkt zu einer Hemmung der Zellproliferation führen. Ein Wachstumsstimulus über den CD74/CD44-Komplex und anschließende Aktivierung des ERK1/2-MAP-Kinase-Signalweges ist für das Homolog MIF bereits bekannt (Leng et al., 2003). Die *in vitro* gezeigte Reduktion der Proliferation nach D-DT-siRNA-Behandlung unterstützt diese These. Es ist auch vorstellbar, dass eine verstärkte Apoptose stattfindet. Für MIF ist eine Hemmung von p53 bekannt. In MIF-*knock-out*-Mäusen zeigt sich dementsprechend ein p53-abhängiger Wachstumsstopp (Hudson et al., 1999, Fingerle-Rowson et al., 2003). Zum anderen spielt D-DT eine indirekte Rolle in der Tumorentwicklung. So wurde bereits gezeigt, dass D-DT über den CD74-Rezeptor und die JNK-, c-phos-, AP-1-Kaskade zur Stimulation von Gefäßwachstumsfaktoren, wie VEGF und CXCL8 führt (Coleman et al., 2008). Eine Hemmung der parakrinen Aktivierung der Angiogenese würde ebenfalls ein vermindertes Tumorwachstum hervorrufen. Die aufgezählten Mechanismen sind für das B16F10-Modell möglich, besonders da der Tumor, wie oben gezeigt, den Rezeptor CD74 besitzt. Denkbar ist auch, dass D-DT die Ausschüttung weiterer Wachstumsfaktoren, wie IL-1 und TNF- α (Merk et al., 2011), auslöst und damit das Tumorwachstum unterstützt.

Eine Limitation der vorliegenden Studie ist der Einsatz eines polyklonalen Antikörpers zur D-DT-Neutralisation. Zwar erlaubt ein polyklonaler Antikörper grundsätzlich das Angreifen mehrerer Epitope zur gleichen Zeit (Sharon et al., 2005), doch ist eine Harmonisierung der Chargen schwierig und die Affinität der einzelnen Antikörper häufig unterschiedlich (Lipman et al., 2005). Für MIF wurde sowohl in einem murinen Lymphom-Modell (Chesney et al., 1999) als auch in einem humanen Prostatakarzinom-Modell (Hussain et al., 2013) die Wirksamkeit eines monoklonalen Antikörpers belegt.

Bei einer Antikörpertherapie ist die Diffusionskapazität in das Zielgewebe wichtig. Mit zunehmendem Tumorwachstum verdichtet sich die Extrazellulärmatrix und schon nach 500 µm ist nur noch eine zehnfach geringere Diffusion möglich (Williams et al., 1993, Thiagarajah et al., 2006). Eine Kombination der anti-D-DT-Therapie mit konventioneller Chemo- oder Radiotherapie würde zur Verkleinerung der Tumormasse und dadurch entstehenden größeren Angriffsfläche für die Antikörpertherapie führen (Beckman et al., 2007, Thurber et al., 2008). Möglicherweise kann die Kombination mit einer Chemo- oder Radiotherapie die durch die anti-D-DT-Therapie hervorgerufene Apoptose fördern.

Mit zunehmender Tumorgroße treten weitere Faktoren in den Vordergrund, so dass die Blockade einzelner Elemente nur geringe Effekte aufweisen kann (Hanahan und Weinberg, 2011). So könnten mit der Zeit andere Wachstumsfaktoren, wie TGF-β, IL-8 und VEGF mehr an Bedeutung gewinnen und den Verlust von D-DT kompensieren. Daher ist eine multimodale Therapie mit anti-D-DT-Antikörpern in Kombination mit anderen Tumorthérapien zu erwägen. Durch eine Optimierung des Therapieverfahrens (Dosisanpassung, Behandlungsschema, monoklonaler Antikörper) und gleichzeitiger Inhibition von MIF mit einem zweiten oder einem bispezifischen Antikörper, einer doppelten *Antisense*-Therapie oder ein Antikörper gegen den gemeinsamen Rezeptor CD74 könnte das Tumorwachstum noch stärker eingedämmt werden und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

6.5 Potenzielle klinische Bedeutung

Die speziesübergreifende Konservierung der Struktur (Sugimoto et al., 1999) und der Expression (Merk et al., 2012) von D-DT bietet eine gute Grundlage für eine Übertragung der Experimente im murinen Modell auf die Forschung mit humanem Material. Erste Ergebnisse weisen daraufhin, dass D-DT sehr ähnliche Eigenschaften im Menschen besitzt. Es zeigten sich, wie für das Homolog MIF (Mor et al., 2005), erhöhte D-DT-Werte im Serum von Patienten mit Ovarialkarzinom im Vergleich zu gesunden Probanden (Merk et al., 2011).

Möglicherweise lassen sich die erhöhten Serumwerte, die in dieser Arbeit verwendeten murinen Melanom- und Brustkrebs-Modelle, auch in entsprechenden humanen Proben wiederfinden, um D-DT als neuen Biomarker zu validieren. Für MIF konnten in Patienten mit Brustkrebs bereits erhöhte Serumkonzentrationen gefunden werden (Xu et al., 2008). Zu beachten ist, dass es speziesspezifische Unterschiede in der Serumkonzentration gibt, die vermutlich auf einen leicht veränderten Basislevel in der Maus verglichen zum Mensch zurückzuführen sind. Auch die erhöhte Freisetzung von D-DT im Serum von Patienten mit Sepsis konnte von dem murinen auf das humane System übertragen werden (Merk et al., 2011). Die in dieser Arbeit gezeigte tumorproliferative Eigenschaft von D-DT konnte anschließend in humanisierten Bedingungen im Nierenzellkarzinom nachgewiesen werden (Pasupuleti et al., 2014). Aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit und bisher stark überlappenden Funktionen geben Studien zum Homolog MIF Grund zur Annahme, dass auch D-DT in humanen Tumorerkrankungen Relevanz besitzt. So wurde der erste humanisierte anti-MIF-Antikörper erfolgreich *in vivo* im Prostatakarzinom angewandt und wird derzeit in einer klinischen Studie erprobt (Hussain et al., 2013), (Yazji et al., 2013). Künftige Studien sollen zeigen, ob die hier erhobenen Daten, wie die Literatur vermuten lässt, zu translatieren sind.

7 Zusammenfassung

D-dopachrome Tautomerase (D-DT) ist nicht nur ein strukturelles, sondern auch ein funktionelles Homolog des Zytokins *macrophage migration inhibitory factor* (MIF). Ob dies auch in Tumoren zutrifft war bisher ungeklärt. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass D-DT von den murinen Tumorzellen 4T1 und B16F10 *in vitro* und *in vivo* exprimiert und sezerniert wird. Die erhöhten Serumkonzentrationen in tumortragenden Mäusen sind am ehesten auf die Tumorzellen zurückzuführen, da weder in Organgeweben noch in Immunzellen tumortragender Mäuse mehr D-DT als in gesunden Mäusen nachweisbar war. D-DT könnte autokrin auf die Tumorzelle über seinen Rezeptor CD74 wirken. Durch einen siRNA-*knock-down* von D-DT konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass D-DT proliferativ und anti-apoptotisch auf Tumorzellen wirkt. In einer Pilotstudie mit einem eigens dafür produzierten und aufgereinigten Antikörper, konnte gezeigt werden, dass eine D-DT-Neutralisation das Tumorstadium in der Maus *in vivo* verlangsamt. Diese Arbeit ist die erste Charakterisierung von D-DT in einem murinen Tumormodell und deutet auf das therapeutische Potenzial einer D-DT-gerichteten Tumorthherapie hin.

8 Literaturverzeichnis

Amin, M. A., Volpert, O. V., Woods, J. M., Kumar, P., Harlow, L. A. und Koch, A. E. Migration inhibitory factor mediates angiogenesis via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol kinase.
Circ Res, 2003, 93, 321-9.

Bacher, M., Metz, C. N., Calandra, T., Mayer, K., Chesney, J., Lohoff, M., Gemsa, D., Donnelly, T. und Bucala, R. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93, 7849-54.

Bando, H., Matsumoto, G., Bando, M., Muta, M., Ogawa, T., Funata, N., Nishihira, J., Koike, M. und Toi, M. Expression of macrophage migration inhibitory factor in human breast cancer: association with nodal spread.
Jpn J Cancer Res, 2002, 93, 389-96.

Baugh, J. A., Gantier, M., Li, L., Byrne, A., Buckley, A. und Donnelly, S. C. Dual regulation of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in hypoxia by CREB and HIF-1.
Biochem Biophys Res Commun, 2006, 347, 895-903.

Beckman, R. A., Weiner, L. M. und Davis, H. M. Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors.
Cancer, 2007, 109, 170-9.

Bernhagen, J., Calandra, T., Mitchell, R. A., Martin, S. B., Tracey, K. J., Voelter, W., Manogue, K. R., Cerami, A. und Bucala, R. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia.
Nature, 1993, 365, 756-9.

Bernhagen, J., Krohn, R., Lue, H., Gregory, J. L., Zerneck, A., Koenen, R. R., Dewor, M., Georgiev, I., Schober, A., Leng, L., Kooistra, T., Fingerle-Rowson, G., Ghezzi, P., Kleemann, R., Mccoll, S. R., Bucala, R., Hickey, M. J. und Weber, C. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment.
Nat Med, 2007, 13, 587-96.

Bloom, B. R. und Bennett, B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity.
Science, 1966, 153, 80-2.

Brock, S. E., Rendon, B. E., Xin, D., Yaddanapudi, K. und Mitchell, R. A. MIF Family Members Cooperatively Inhibit p53 Expression and Activity.
PLoS One, 2014, 9, e99795.

Bucala, R. und Donnelly, S. C. Macrophage migration inhibitory factor: a probable link between inflammation and cancer.
Immunity, 2007, 26, 281-5.

Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R. A. und Bucala, R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor.
J Exp Med, 1994, 179, 1895-902.

Calandra, T., Echtenacher, B., Roy, D. L., Pugin, J., Metz, C. N., Hultner, L., Heumann, D., Mannel, D., Bucala, R. und Glauser, M. P. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor.
Nat Med, 2000, 6, 164-70.

Chesney, J., Metz, C., Bacher, M., Peng, T., Meinhardt, A. und Bucala, R. An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma.

Mol Med, 1999, 5, 181-91.

Choi, S., Kim, H. R., Leng, L., Kang, I., Jorgensen, W. L., Cho, C. S., Bucala, R. und Kim, W. U. Role of macrophage migration inhibitory factor in the regulatory T cell response of tumor-bearing mice.

J Immunol, 2012, 189, 3905-13.

Choudhary, S., Hegde, P., Pruitt, J. R., Sielecki, T. M., Choudhary, D., Scarpato, K., Degraff, D. J., Pilbeam, C. C. und Taylor, J. A., 3rd. Macrophage migratory inhibitory factor promotes bladder cancer progression via increasing proliferation and angiogenesis.

Carcinogenesis, 2013.

Coleman, A. M., Rendon, B. E., Zhao, M., Qian, M. W., Bucala, R., Xin, D. und Mitchell, R. A. Cooperative regulation of non-small cell lung carcinoma angiogenic potential by macrophage migration inhibitory factor and its homolog, D-dopachrome tautomerase.

J Immunol, 2008, 181, 2330-7.

Cortez-Retamozo, V., Etzrodt, M., Newton, A., Rauch, P. J., Chudnovskiy, A., Berger, C., Ryan, R. J., Iwamoto, Y., Marinelli, B., Gorbatov, R., Forghani, R., Novobrantseva, T. I., Koteliansky, V., Figueiredo, J. L., Chen, J. W., Anderson, D. G., Nahrendorf, M., Swirski, F. K., Weissleder, R. und Pittet, M. J. Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils.

Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109, 2491-6.

Coussens, L. M. und Werb, Z. Inflammatory cells and cancer: think different!

J Exp Med, 2001, 193, F23-6.

Daun, J. M. und Cannon, J. G. Macrophage migration inhibitory factor antagonizes hydrocortisone-induced increases in cytosolic I κ B α .

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000, 279, R1043-9.

David, J. R. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction.

Proc Natl Acad Sci U S A, 1966, 56, 72-7.

De Jong, Y. P., Abadia-Molina, A. C., Satoskar, A. R., Clarke, K., Rietdijk, S. T., Faubion, W. A., Mizoguchi, E., Metz, C. N., Alsahli, M., Ten Hove, T., Keates, A. C., Lubetsky, J. B., Farrell, R. J., Michetti, P., Van Deventer, S. J., Lolis, E., David, J. R., Bhan, A. K. und Terhorst, C. Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF.

Nat Immunol, 2001, 2, 1061-6.

Del Vecchio, M. T., Tripodi, S. A., Arcuri, F., Pergola, L., Hako, L., Vatti, R. und Cintorino, M. Macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma: correlation with tumor grading and combination endocrine treatment-related changes.

Prostate, 2000, 45, 51-7.

Denz, A., Pilarsky, C., Muth, D., Ruckert, F., Saeger, H. D. und Grutzmann, R. Inhibition of MIF leads to cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer cells.

J Surg Res, 2010, 160, 29-34.

Dranoff, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy.

Nat Rev Cancer, 2004, 4, 11-22.

Du, W., Wright, B. M., Li, X., Finke, J., Rini, B. I., Zhou, M., He, H., Lal, P. und Welford, S. M. Tumor-derived macrophage migration inhibitory factor promotes an autocrine loop that enhances renal cell carcinoma.
Oncogene, 2013, 32, 1469-74.

Dupre, S. A. und Hunter, K. W., Jr. Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: association with tumor-derived growth factors.
Exp Mol Pathol, 2007, 82, 12-24.

Fingerle-Rowson, G., Kaleswarapu, D. R., Schlander, C., Kabgani, N., Brocks, T., Reinart, N., Busch, R., Schutz, A., Lue, H., Du, X., Liu, A., Xiong, H., Chen, Y., Nemajerova, A., Hallek, M., Bernhagen, J., Leng, L. und Bucala, R. A tautomerase-null macrophage migration-inhibitory factor (MIF) gene knock-in mouse model reveals that protein interactions and not enzymatic activity mediate MIF-dependent growth regulation.
Mol Cell Biol, 2009, 29, 1922-32.

Fingerle-Rowson, G., Petrenko, O., Metz, C. N., Forsthuber, T. G., Mitchell, R., Huss, R., Moll, U., Muller, W. und Bucala, R. The p53-dependent effects of macrophage migration inhibitory factor revealed by gene targeting.
Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100, 9354-9.

Girard, E., Strathdee, C., Trueblood, E. und Queva, C. Macrophage migration inhibitory factor produced by the tumour stroma but not by tumour cells regulates angiogenesis in the B16-F10 melanoma model.
Br J Cancer, 2012, 107, 1498-505.

Gore, Y., Starlets, D., Maharshak, N., Becker-Herman, S., Kaneyuki, U., Leng, L., Bucala, R. und Shachar, I. Macrophage migration inhibitory factor induces B cell survival by activation of a CD74-CD44 receptor complex.
J Biol Chem, 2008, 283, 2784-92.

Hanahan, D. und Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation.
Cell, 2011, 144, 646-74.

He, X. X., Chen, K., Yang, J., Li, X. Y., Gan, H. Y., Liu, C. Y., Coleman, T. R. und Al-Abed, Y. Macrophage migration inhibitory factor promotes colorectal cancer.
Mol Med, 2009, 15, 1-10.

Hudson, J. D., Shoaibi, M. A., Maestro, R., Carnero, A., Hannon, G. J. und Beach, D. H. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity.
J Exp Med, 1999, 190, 1375-82.

Hussain, F., Freissmuth, M., Volkel, D., Thiele, M., Douillard, P., Antoine, G., Thurner, P., Ehrlich, H., Schwarz, H. P., Scheiflinger, F. und Kerschbaumer, R. J. Human Anti-Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Antibodies Inhibit Growth of Human Prostate Cancer Cells In Vitro and In Vivo.
Mol Cancer Ther, 2013.

Jesneck, J. L., Mukherjee, S., Yurkovetsky, Z., Clyde, M., Marks, J. R., Lokshin, A. E. und Lo, J. Y. Do serum biomarkers really measure breast cancer?
BMC Cancer, 2009, 9, 164.

Kamimura, A., Kamachi, M., Nishihira, J., Ogura, S., Isobe, H., Dosaka-Akita, H., Ogata, A., Shindoh, M., Ohbuchi, T. und Kawakami, Y. Intracellular distribution of macrophage migration inhibitory factor predicts the prognosis of patients with adenocarcinoma of the lung.
Cancer, 2000, 89, 334-41.

Kindt, N., Preillon, J., Kaltner, H., Gabius, H. J., Chevalier, D., Rodriguez, A., Johnson, B. D., Megalizzi, V., Decaestecker, C., Laurent, G. und Saussez, S. Macrophage migration inhibitory factor in head and neck squamous cell carcinoma: clinical and experimental studies.

J Cancer Res Clin Oncol, 2013, 139, 727-37.

Kobold, S., Merk, M., Hofer, L., Peters, P., Bucala, R. und Endres, S. The macrophage migration inhibitory factor (MIF)-homologue D-dopachrome tautomerase is a therapeutic target in a murine melanoma model.

Oncotarget, 2014, 5, 103-7.

Leng, L., Metz, C. N., Fang, Y., Xu, J., Donnelly, S., Baugh, J., Delohery, T., Chen, Y., Mitchell, R. A. und Bucala, R. MIF signal transduction initiated by binding to CD74.

J Exp Med, 2003, 197, 1467-76.

Liao, H., Bucala, R. und Mitchell, R. A. Adhesion-dependent signaling by macrophage migration inhibitory factor (MIF).

J Biol Chem, 2003, 278, 76-81.

Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J. und Weis-Garcia, F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources.

ILAR J, 2005, 46, 258-68.

Lu, C. und Kerbel, R. S. Interleukin-6 undergoes transition from paracrine growth inhibitor to autocrine stimulator during human melanoma progression.

J Cell Biol, 1993, 120, 1281-8.

Lubetsky, J. B., Dios, A., Han, J., Aljabari, B., Ruzsicska, B., Mitchell, R., Lolis, E. und Al-Abed, Y. The tautomerase active site of macrophage migration inhibitory factor is a potential target for discovery of novel anti-inflammatory agents.

J Biol Chem, 2002, 277, 24976-82.

Lue, H., Thiele, M., Franz, J., Dahl, E., Speckgens, S., Leng, L., Fingerle-Rowson, G., Bucala, R., Luscher, B. und Bernhagen, J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/JAB1 in the control of autocrine MIF activity.

Oncogene, 2007, 26, 5046-59.

Lukas, M. Inflammatory bowel disease as a risk factor for colorectal cancer.

Dig Dis, 2010, 28, 619-24.

Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. und Balkwill, F. Cancer-related inflammation.

Nature, 2008, 454, 436-44.

Merk, M., Mitchell, R. A., Endres, S. und Bucala, R. D-dopachrome tautomerase (D-DT or MIF-2): doubling the MIF cytokine family.

Cytokine, 2012, 59, 10-7.

Merk, M., Zierow, S., Leng, L., Das, R., Du, X., Schulte, W., Fan, J., Lue, H., Chen, Y., Xiong, H., Chagnon, F., Bernhagen, J., Lolis, E., Mor, G., Lesur, O. und Bucala, R. The D-dopachrome tautomerase (DDT) gene product is a cytokine and functional homolog of macrophage migration inhibitory factor (MIF).

Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108, E577-85.

Meyer-Siegler, K. L., Bellino, M. A. und Tannenbaum, M. Macrophage migration inhibitory factor evaluation compared with prostate specific antigen as a biomarker in patients with prostate carcinoma.
Cancer, 2002, 94, 1449-56.

Meyer-Siegler, K. L., Iczkowski, K. A., Leng, L., Bucala, R. und Vera, P. L. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor or its receptor (CD74) attenuates growth and invasion of DU-145 prostate cancer cells.
J Immunol, 2006, 177, 8730-9.

Mitchell, R. A., Liao, H., Chesney, J., Fingerle-Rowson, G., Baugh, J., David, J. und Bucala, R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response.
Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99, 345-50.

Mitchell, R. A., Metz, C. N., Peng, T. und Bucala, R. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action.
J Biol Chem, 1999, 274, 18100-6.

Mor, G., Visintin, I., Lai, Y., Zhao, H., Schwartz, P., Rutherford, T., Yue, L., Bray-Ward, P. und Ward, D. C. Serum protein markers for early detection of ovarian cancer.
Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102, 7677-82.

Morris, K. T., Nofchissey, R. A., Pinchuk, I. V. und Beswick, E. J. Chronic macrophage migration inhibitory factor exposure induces mesenchymal epithelial transition and promotes gastric and colon cancers.
PLoS One, 2014, 9, e98656.

Nishihira, J., Fujinaga, M., Kuriyama, T., Suzuki, M., Sugimoto, H., Nakagawa, A., Tanaka, I. und Sakai, M. Molecular cloning of human D-dopachrome tautomerase cDNA: N-terminal proline is essential for enzyme activation.
Biochem Biophys Res Commun, 1998, 243, 538-44.

Nishihira, J., Ishibashi, T., Fukushima, T., Sun, B., Sato, Y. und Todo, S. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): Its potential role in tumor growth and tumor-associated angiogenesis.
Ann N Y Acad Sci, 2003, 995, 171-82.

Noels, H., Bernhagen, J. und Weber, C. Macrophage migration inhibitory factor: a noncanonical chemokine important in atherosclerosis.
Trends Cardiovasc Med, 2009, 19, 76-86.

Odh, G., Hindemith, A., Rosengren, A. M., Rosengren, E. und Rorsman, H. Isolation of a new tautomerase monitored by the conversion of D-dopachrome to 5,6-dihydroxyindole.
Biochem Biophys Res Commun, 1993, 197, 619-24.

Ogawa, H., Nishihira, J., Sato, Y., Kondo, M., Takahashi, N., Oshima, T. und Todo, S. An antibody for macrophage migration inhibitory factor suppresses tumour growth and inhibits tumour-associated angiogenesis.
Cytokine, 2000, 12, 309-14.

Oisgold-Daga, S., Jasnis, M. A., Klein, S. und De Bonaparte, Y. P. Immune reactivity of spleen cells in advanced stages of tumor growth.
Biomed Pharmacother, 1982, 36, 319-23.

- Parmiani, G., Rivoltini, L., Andreola, G. und Carrabba, M. Cytokines in cancer therapy. *Immunol Lett*, 2000, 74, 41-4.
- Pasupuleti, V., Du, W., Gupta, Y., Yeh, I. J., Montano, M., Magi-Galuzzi, C. und Welford, S. M. Dysregulated D-dopachrome tautomerase, a hypoxia-inducible factor-dependent gene, cooperates with macrophage migration inhibitory factor in renal tumorigenesis. *J Biol Chem*, 2014, 289, 3713-23.
- Pulaski, B. A. und Ostrand-Rosenberg, S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol*, 2001, Chapter 20, Unit 20 2.
- Rankin, E. B. und Giaccia, A. J. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ*, 2008, 15, 678-85.
- Rao, D. D., Vorhies, J. S., Senzer, N. und Nemunaitis, J. siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61, 746-59.
- Ren, Y., Tsui, H. T., Poon, R. T., Ng, I. O., Li, Z., Chen, Y., Jiang, G., Lau, C., Yu, W. C., Bacher, M. und Fan, S. T. Macrophage migration inhibitory factor: roles in regulating tumor cell migration and expression of angiogenic factors in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 2003, 107, 22-9.
- Richard, V., Kindt, N., Decaestecker, C., Gabius, H. J., Laurent, G., Noel, J. C. und Saussez, S. Involvement of macrophage migration inhibitory factor and its receptor (CD74) in human breast cancer. *Oncol Rep*, 2014, 32, 523-9.
- Rocca, Y. S., Roberti, M. P., Arriaga, J. M., Amat, M., Bruno, L., Pampena, M. B., Huertas, E., Loria, F. S., Pairola, A., Bianchini, M., Mordoh, J. und Levy, E. M. Altered phenotype in peripheral blood and tumor-associated NK cells from colorectal cancer patients. *Innate Immun*, 2013, 19, 76-85.
- Rosengren, E., Aman, P., Thelin, S., Hansson, C., Ahlfors, S., Bjork, P., Jacobsson, L. und Rorsman, H. The macrophage migration inhibitory factor MIF is a phenylpyruvate tautomerase. *FEBS Lett*, 1997a, 417, 85-8.
- Rosengren, E., Thelin, S., Aman, P., Hansson, C., Jacobsson, L. und Rorsman, H. The protein catalysing the conversion of D-dopachrome to 5,6-dihydroxyindole is a phenylpyruvate tautomerase (EC 5.3.2.1). *Melanoma Res*, 1997b, 7, 517-8.
- Schober, A., Bernhagen, J., Thiele, M., Zeiffer, U., Knarren, S., Roller, M., Bucala, R. und Weber, C. Stabilization of atherosclerotic plaques by blockade of macrophage migration inhibitory factor after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 2004, 109, 380-5.
- Sharon, J., Liebman, M. A. und Williams, B. R. Recombinant polyclonal antibodies for cancer therapy. *J Cell Biochem*, 2005, 96, 305-13.
- Shimizu, T., Abe, R., Nakamura, H., Ohkawara, A., Suzuki, M. und Nishihira, J. High expression of macrophage migration inhibitory factor in human melanoma cells and its role in tumor cell growth and angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 264, 751-8.

- Simpson, K. D., Templeton, D. J. und Cross, J. V. Macrophage migration inhibitory factor promotes tumor growth and metastasis by inducing myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment.
J Immunol, 2012, 189, 5533-40.
- Smith, M. C., Luker, K. E., Garbow, J. R., Prior, J. L., Jackson, E., Piwnica-Worms, D. und Luker, G. D. CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer.
Cancer Res, 2004, 64, 8604-12.
- Sonesson, B., Rosengren, E., Hansson, A. S. und Hansson, C. UVB-induced inflammation gives increased d-dopachrome tautomerase activity in blister fluid which correlates with macrophage migration inhibitory factor.
Exp Dermatol, 2003, 12, 278-82.
- Stein, R., Qu, Z., Cardillo, T. M., Chen, S., Rosario, A., Horak, I. D., Hansen, H. J. und Goldenberg, D. M. Antiproliferative activity of a humanized anti-CD74 monoclonal antibody, hLL1, on B-cell malignancies.
Blood, 2004, 104, 3705-11.
- Sugimoto, H., Taniguchi, M., Nakagawa, A., Tanaka, I., Suzuki, M. und Nishihira, J. Crystal structure of human D-dopachrome tautomerase, a homologue of macrophage migration inhibitory factor, at 1.54 Å resolution.
Biochemistry, 1999, 38, 3268-79.
- Takahashi, N., Nishihira, J., Sato, Y., Kondo, M., Ogawa, H., Ohshima, T., Une, Y. und Todo, S. Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mechanism of tumor cell growth.
Mol Med, 1998, 4, 707-14.
- Thiagarajah, J. R., Kim, J. K., Magzoub, M. und Verkman, A. S. Slowed diffusion in tumors revealed by microfiberoptic epifluorescence photobleaching.
Nat Methods, 2006, 3, 275-80.
- Thurber, G. M., Schmidt, M. M. und Wittrup, K. D. Antibody tumor penetration: transport opposed by systemic and antigen-mediated clearance.
Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60, 1421-34.
- Verjans, E., Noetzel, E., Bektas, N., Schutz, A. K., Lue, H., Lennartz, B., Hartmann, A., Dahl, E. und Bernhagen, J. Dual role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human breast cancer.
BMC Cancer, 2009, 9, 230.
- Weber, C., Kraemer, S., Drechsler, M., Lue, H., Koenen, R. R., Kapurniotu, A., Zerneck, A. und Bernhagen, J. Structural determinants of MIF functions in CXCR2-mediated inflammatory and atherogenic leukocyte recruitment.
Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105, 16278-83.
- Weiser, W. Y., Temple, P. A., Witek-Giannotti, J. S., Remold, H. G., Clark, S. C. und David, J. R. Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86, 7522-6.
- Williams, L. E., Bares, R. B., Fass, J., Hauptmann, S., Schumpelick, V. und Buell, U. Uptake of radiolabeled anti-CEA antibodies in human colorectal primary tumors as a function of tumor mass.
Eur J Nucl Med, 1993, 20, 345-7.

Xin, D., Rendon, B. E., Zhao, M., Winner, M., Mcghee Coleman, A. und Mitchell, R. A. The MIF homologue D-dopachrome tautomerase promotes COX-2 expression through beta-catenin-dependent and -independent mechanisms.
Mol Cancer Res, 2010, 8, 1601-9.

Xu, X., Wang, B., Ye, C., Yao, C., Lin, Y., Huang, X., Zhang, Y. und Wang, S. Overexpression of macrophage migration inhibitory factor induces angiogenesis in human breast cancer.
Cancer Lett, 2008, 261, 147-57.

Yaddanapudi, K., Putty, K., Rendon, B. E., Lamont, G. J., Faughn, J. D., Satoskar, A., Lasnik, A., Eaton, J. W. und Mitchell, R. A. Control of tumor-associated macrophage alternative activation by macrophage migration inhibitory factor.
J Immunol, 2013, 190, 2984-93.

Yazji, S., Baxter Healthcare Corporation. Phase I study of anti-macrophage migration inhibitory factor (anti-MIF)-antibody in solid tumors.
URL: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01765790?term=anti-mif&rank=1&view=record>, eingesehen am 29.08.2014, 17:11 Uhr

9 Abkürzungsverzeichnis

A

| | |
|-----------|--|
| AP-1 | Aktivator-Protein-1 |
| APACHE II | <i>Acute physiology and chronic health evaluation II</i> |
| APC | Allophycocyanin |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| Asn | Asparagin |

B

| | |
|------|--------------------|
| bp | Basenpaar |
| BrdU | Bromodesoxyuridin |
| BSA | Rinderserumalbumin |

C

| | |
|---------------|-----------------------------------|
| $C_2H_3NaO_2$ | Natriumacetat |
| $CaCl_2$ | Kalziumchlorid |
| CD | <i>Cluster of differentiation</i> |
| cDNA | Komplementäre DNA |
| COX | Cyclooxygenase |
| CXCL | CXC-Motiv-Chemokin |
| CXCR | CXC-Motiv-Chemokinrezeptor |

D

| | |
|------|---|
| D-DT | <i>D-dopachrome tautomerase</i> |
| DMEM | <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| dT | Desoxythymidin |
| DTT | Dithiothreitol |

E

| | |
|----------------|--|
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELISA | <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> |
| ERK1/2 | <i>Extracellular-signal regulated kinase 1/2</i> |

F

| | |
|------|--|
| FACS | <i>Fluorescence-activated cell sorting</i> |
| FBS | Fetales Rinderserum |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |

H

| | |
|-------|--|
| h | Stunde |
| HCl | Salzsäure |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure |

| | |
|-------|--|
| HIF | Hypoxie-induzierter Faktor |
| HPRT | Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase |
| HRP | <i>Horseradish peroxidase</i> |
| HUVEC | <i>Human umbilical vein endothelial cell</i> |

I

| | |
|-----------------------|--|
| i.p. | Intraperitoneal |
| IgG | Immunglobulin G |
| IL | Interleukin |
| IFN- γ | Interferon- γ |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid |
| ISO-1 | (S,R)-3-(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-5-isoxazoleessigsäuremethylester |
| I κ B α | Inhibitorische κ B |

J

| | |
|------|--|
| JAB1 | <i>c-Jun activation domain-binding protein-1</i> |
| JNK | c-Jun N-terminale Kinasen |

K

| | |
|-----|------------------------|
| KD | Dissoziationskonstante |
| kDa | Kilodalton |

L

| | |
|-----|---------------------|
| LDH | Lactatdehydrogenase |
| LPS | Lipopolysaccharid |

M

| | |
|-------------------|---|
| mA | Milliampere |
| MAP | <i>Mitogen-activated protein</i> |
| Max. | Maximum |
| MCP-1 | Monozyten chemotaktisches Protein-1 |
| MDSC | <i>Myeloid-derived suppressor cell</i> |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| MIF | <i>Macrophage migration inhibitory factor</i> |
| mRNA | <i>Messenger RNA</i> |

N

| | |
|---------------------------------|-------------------------|
| Na ₃ PO ₄ | Natriumphosphat |
| Na ₃ VO ₄ | Natriumorthovanat |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaF | Natriumfluorid |
| NaHCO ₃ | Natriumhydrogencarbonat |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen |

P

| | |
|-----|----------------------------------|
| PBS | <i>Phosphate-buffered saline</i> |
|-----|----------------------------------|

| | |
|------------------|------------------------------|
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PGE ₂ | Prostaglandin E ₂ |
| PI | Propidiumiodid |
| PI3K | Phosphoinositid-3-Kinasen |
| PKB | Proteinkinase B |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |

R

| | |
|--------|--|
| RISC | <i>RNA-induced silencing complex</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROC | <i>Receiver operating characteristic</i> |
| rpm | Rotationen pro Minute |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute 1640 medium</i> |
| RT-PCR | <i>Real-time-PCR</i> |

S

| | |
|-------|------------------------------|
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| shRNA | <i>Short hairpin RNA</i> |
| siRNA | <i>Small interfering RNA</i> |
| SRC | <i>Cellular and sarcoma</i> |

T

| | |
|-------|-------------------------------------|
| TAM | <i>Tumor-associated macrophages</i> |
| TBS | <i>TRIS-buffered saline</i> |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TGF-β | <i>Transforming growth factor-β</i> |
| TMB | Tetramethylbenzidin |
| TNF-α | Tumornekrosefaktor-α |

V

| | |
|------|---|
| VEGF | <i>Vascular endothelial growth factor</i> |
|------|---|

W

| | |
|-----|---------------------------|
| Wnt | <i>Wingless and Int-1</i> |
| wt | <i>Wild-type</i> |

10 Veröffentlichungen

Originalarbeit

Kobold S, Merk M, **Hofer L**, Peters P, Bucala R, Endres S.

The macrophage migration inhibitory factor (MIF)-homologue *D*-dopachrome tautomerase is a therapeutic target in a murine melanoma model.

Oncotarget, 2014, 5, 103-7

Abstract und Poster

Hofer L, Merk M, Peters P, Endres S, Kobold S

Evaluation of the macrophage migration inhibitory factor (MIF)-homologue *D*-dopachrome tautomerase as a new target in cancer therapy.

10th Annual Meeting CIMT, Mainz, Mai 2013

Hofer L, Merk M, Peters P, Kobold S, Endres S.

First characterization of the cytokine D-DT in tumorigenesis.

DoktaMed, München, Mai 2012

Vorträge

Hofer L

D-dopachrome tautomerase— an important cytokine for tumor growth?

Results colloquium, Graduiertenkolleg 1202 der DFG, München, Oktober 2012

Hofer L

The cytokines macrophage migration inhibitory factor (MIF) and *D*-dopachrome tautomerase (D-DT) in cancer.

7th Annual Retreat, Graduiertenkolleg 1202 der DFG, Frauenwörth, Juli 2012

Hofer L

Fashionable science: the use of hairpins to style MIF and D-DT.

ICE-School, Boscha, Schweiz, März 2012

11 Danksagung

Bei Prof. Dr. med. Stefan Endres möchte ich mich für die einmalige Möglichkeit bedanken meine experimentelle Promotionsarbeit in der Abteilung für Klinische Pharmakologie durchzuführen. Sein persönliches Interesse an dem Thema und Fortschritt der Arbeit, sowie seine Förderung waren eine Motivation und ihm gilt daher mein besonderer Dank. Zudem möchte ich mich auch für die Aufnahme in das Förderprogramm des Graduiertenkollegs 1202 „Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie“ sowie die Möglichkeit meine Daten auf dem internationalen Kongress CIMT 2013 in Mainz zu präsentieren, bedanken.

Meinen Dank möchte ich auch meinen betreuenden Post-docs, Dr. rer. nat. Melanie Merk und PD Dr. med. Sebastian Kobold, aussprechen, die mich mit viel Geduld und Engagement an das wissenschaftliche Denken und Arbeiten im Labor herangeführt und mit Ihrer Begeisterung und Expertise in der immunologischen Grundlagenforschung kontinuierlich unterstützt und motiviert haben.

Allen weiteren Post-Docs, Mitdoktoranden und technischen Assistenten möchte ich für konstruktive Gespräche und außerordentliche Hilfsbereitschaft, die eine produktive und gemeinschaftliche Arbeitsatmosphäre entstehen ließen, danken.

Schließlich möchte ich meiner Familie und meinem Freund für die immerwährende Unterstützung, ihre Anregungen und ihr stetiges Interesse an meiner Arbeit danken.

Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Die Rolle des *Macrophage-migration-inhibitory-factor-*
Homologs D-dopachrome tautomerase
im murinen Tumormodell

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin