

**Immunmodulatorische Konsequenzen einer
Eph-Rezeptorspaltung durch MMP-7**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Oliver Germandi

Mainz, 2009

Kapitel	Seite
ZUSAMMENFASSUNG	IV
1. EINLEITUNG	1
1.1 Wechselwirkungen zwischen dem Immunsystem und Tumoren	1
1.2 Matrix- Metalloproteinasen	2
1.2.1 Vorkommen und Struktur von MMP	2
1.2.2 Immunologische Rolle von MMP-7	4
1.3 Dendritische Zellen	7
1.4 Aktivierung und Funktionen von T-Lymphozyten	10
1.5 Aktindynamik	11
1.6 Erythropoetinproducing hepatocellular Rezeptoren und ihre Liganden	13
1.7 Endozytose	16
1.7.1 Clathrinvermittelte Endozytose	17
1.7.2 Phagozytose	18
1.7.3 Makropinozytose	18
1.8 Zielsetzung	19
2 MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 Geräte	20
2.2 Chemikalien	21
2.3 Kunststoff und Glaswaren	22
2.4 Antikörper	23
2.5 Kommerzielle Versuchskits	24
2.6 Software	24
2.7 Reagenzien, Lösungen und Medien für die Zellkultur	24
2.8 Zellkultur Medien	25
2.9 Eukaryotische Zelllinien	26
2.10 Zellbiologische Methoden	27
2.10.2 Mediumwechsel von Suspensionszellen	27
2.10.3 Mediumwechsel adhärenter Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung	28
2.10.4 Passage von Suspensionszellen	28
2.10.5 Split adhärenter Zellen	28
2.10.9 Zelllinien zur Produktion von murinem GM-CSF	31
2.10.11 Präparation humaner PBMCs	31
2.10.11 Isolierung von CD4 positiven oder CD8 positiven T-Lymphozyten aus PBMCs	32
2.10.12 Generierung von humanen dendritischen Zellen	33
2.10.13 Generierung von dendritischer Zellen aus Mausknochenmark	33
2.10.14 Isolierung von Maus-Milzzellen	34

Kapitel	Seite
2.10.15	35
2.10.16	35
2.10.17	36
2.11 Molekularbiologische Methoden	37
2.11.1	37
2.11.2	38
2.11.3	39
2.12 Protein-Biochemische und Immunologische Methoden	43
2.12.1	43
2.12.2	44
2.13 Rac- und Cdc42-Aktivitätsbestimmung	47
2.14 MMP-7 Sekretionsbestimmung	48
2.14 Ras-Aktivitätsbestimmung	49
2.15. Durchflusszytometrie (FACS)	49
2.15.1	51
2.15.2	52
2.15.3	53
2.16 Immunfluoreszenzfärbung für Laserscanmikroskopie	53
2.17 Zucht und Haltung von Experimentaltieren	54
2.18 Genotypisierung der MMP-7-Deletionsmutanten	55
2.18.1	55
2.18.2	56
3 ERGEBNISSE	57
3.1 Einfluss von MMP-7 auf die Immunantwort gegen Tumore	57
3.1.1	57
3.1.2	59
3.1.3	60
3.1.4	61
3.1.5	64
3.1.6	66
3.1.7	68
3.1.8	71
3.1.9	73
3.1.10	79
3.2 Einfluss von MMP-7 auf humane, dendritische Zellen	81
3.2.1	82
3.2.2	84
3.2.3	86
3.2.4	88
3.2.5	90
3.2.6	92
3.3 Vergleich der dendritischen Zellen aus MMP-7 Deletionsmutanten- mäuse und C57/Bl6-Wildtypmäusen	94
3.3.1	94
3.3.2	96

Kapitel	Seite
3.4 Einfluss von MMP-7 auf humane T-Zellen	98
3.4.1 EphB2-Oberflächenexpression auf T-Zellen nach MMP-7 Behandlung	98
3.4.2 Aktinpolymerisation in T-Zellen nach MMP-7 Behandlung	100
3.4.3 Einfluss von MMP-7 auf den Clathrin in T-Zellen	101
3.4.4 Funktionelle Analyse der T-Zellzytotoxizität nach MMP-7 Behandlung	103
3.4.5 T-Zellfunktionalität durch Antigenpräsentation nach MMP-7 Behandlung	104
4. DISKUSSION	107
4.1 Immunologische Konsequenzen einer MMP-7 Expression im Tumor	107
4.2 Einfluss von MMP-7 auf die Endozytose	109
4.3 Veränderte Aktivität von Ras- GTPasen durch MMP-7	110
4.4 MMP-7 vermittelte Spaltung von EphB2	110
4.5 Einfluss von EphB2 auf die Aktinpolymerisation	111
4.6 Aktivierung von Cdc42 und Rac1 durch EphB2	112
4.7 Einfluss von MMP-7 auf die Endozytose von dendritischen Zellen	113
4.8 MMP-7 Expression in dendritischen Zellen	114
4.9 Einfluss von MMP-7 auf die Aktinpolymerisation in T-Zellen	115
4.10 Immunologische Auswirkungen von MMP-7 auf T-Zellen	116
5.11 Ausblick	118
ABKÜRZUNGEN	120
ABKÜRZUNGEN FÜR AMINOSÄUREN	122
LITERATURVERZEICHNIS	123

Zusammenfassung

Tumore haben die Fähigkeit ihr Mikromilieu zu modulieren, um so ihre Entwicklung und ihre Ausbreitung zu fördern oder sich vor Angriffen des Immunsystems zu schützen. Die Expression der Matrix Metalloproteinasen 7 (MMP-7) wurde in vielen verschiedenen Tumoren analysiert. Neben prometastatischen und wachstumsfördernden Funktionen wurden auch antiapoptotische Wirkungen von MMP-7 auf die Tumorzellen belegt (Strand et al., 2004). Doch noch sind nicht alle immunmodulatorischen Eigenschaften von MMP-7 aufgeklärt worden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die immunologischen Konsequenzen einer MMP-7 Expression durch Tumorzellen zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MMP-7 über die Spaltung der Rezeptortyrosinkinase EphB2 die Aktinpolymerisation und dadurch auch die Endozytose in Zellen verändern kann. EphB2 wurde als Target einer MMP-7 vermittelten Spaltung identifiziert. Die Untersuchungen mit MMP-7 überexprimierenden Hek 293 EcR Zellen und MMP-7 behandelten DCs zeigten unter dem Einfluss von MMP-7 eine wesentlich geringere EphB2 Expression auf deren Zelloberflächen. Zudem konnte durch *in vitro* Spaltversuche und anschließende Sequenzierung die Schnittstelle der MMP-7 induzierten Spaltung von EphB2 bestimmt werden. Anschließende Analysen belegten, dass durch die MMP-7 vermittelte Spaltung von EphB2 die Aktivierung der kleinen GTPasen Rac1 und Cdc42 stark reduziert wurden. Die Funktion von Cdc42 und Rac1 während der Aktinpolymerisation, als auch innerhalb der EphB2- Signalkaskade wurde bereits beschrieben (Irie and Yamaguchi, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass MMP-7 die Aktinpolymerisation in Zellen reduzierte, was wahrscheinlich eine direkte Auswirkung der EphB2 Spaltung war.

Weitere Versuche ließen einen Zusammenhang zwischen der reduzierten Aktinpolymerisation und der verminderten Endozytose in MMP-7 behandelten Zellen erkennen. Unter dem Einfluss von MMP-7 konnte sowohl in Hek 293 EcR MMP7 Zellen als auch in unreifen DCs eine Reduktion der endozytotischen Aktivität ermittelt werden.

Untersuchungen mit humanen T-Zellen zeigten auch hier einen verminderten Nachweis von EphB2 auf den Zellen, wenn diese vorher mit MMP-7 inkubiert wurden. Zudem führte die Anwesenheit von MMP-7 in T-Zellen ebenfalls zu einer verminderten Aktinpolymerisation. Die mit der Aktinpolymerisation verbundene Restrukturierung des Zytoskeletts gilt als essentieller Prozess für die T-Zellaktivität (Tskvitaria-Fuller et al., 2003; Krummel et al., 2000). Anschließende Versuche konnte daher nicht nur eine Beeinträchtigung von MMP-7

auf die zytotoxische Aktivität von T-Zellen belegen, sondern deuteten auch auf eine verminderten Proliferation nach Antigenstimulation unter dem Einfluss von MMP-7 hin.

Die Rolle von MMP-7 aber auch die von EphB2 in der Tumorummunologie wurde bereits untersucht. So konnte eine induzierte Überexpression von EphB2 das Krebszellwachstum, die Adhäsion und die Migration inhibieren, während der Verlust der EphB2 Expression zu einer verstärkten Invasion und Metastisierung von Tumorzellen führte (Guo et al., 2006). Zudem konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen die Funktion von DCs beeinflussen können. DCs aus tumortragenden Mäusen zeigten im Vergleich zu Kontrollzellen eine reduzierte Aktivierung von Cdc42 und Rac1 und zudem eine verminderte Endozytoseaktivität (Tourkova *et al.*, 2007). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten MMP-7 bedingten Veränderungen der Aktinpolymerisation stellen womöglich eine Verbindung zwischen den genannten Untersuchungen her und offenbaren weitere immunologische Konsequenzen einer MMP-7 Expression im Tumor.

1. Einleitung

1.1 Wechselwirkungen zwischen dem Immunsystem und Tumoren

Zur Abwehr von Pathogenen und Tumorzellen regiert das Immunsystem mit zwei Formen der Immunabwehr (Janeway et al., 2005). Die erste Immunreaktion erfolgt durch das angeborene Immunsystem, welches in der Lage ist Pathogene und Tumorzelleantigen unspezifisch zu eliminieren. Zu den zellulären Bestandteilen des angeborenen Immunsystems gehören unter anderem Makrophagen, Granulozyten, natürliche Killerzellen (NK) und dendritische Zellen (DCs). Die Hauptaufgabe von DCs ist die Stimulation von T-Lymphozyten (T-Zellen) durch Präsentation pathogen- oder tumorspezifischer Peptide.

Die zweite Immunreaktion erfolgt durch das erworbene Immunsystem. Es setzt sich aus T- und B-Lymphozyten sowie deren löslichen Produkten, den Antikörpern, zusammen. T-Zellen werden entsprechend ihrer Funktionen und ihrer Oberflächenmoleküle in immunmodulatorische $CD4^+$ T-Helfezellen und $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen unterteilt. antigenspezifische $CD8^+$ T-Zellen töten infizierte Zellen und Tumorzellen durch Apoptoseinduktion ab.

Viele Tumore haben jedoch Mechanismen entwickelt, durch die sie einer Immunantwort entgehen können oder diese zumindest schwächen. Die molekularen Mechanismen, durch die Tumorzellen eine Immunantwort umgehen, sind Schwerpunkte der immunologischen Forschung und werden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht. So ist heute bekannt, dass Tumore durch Verlust der Tumorantigenexpression oder Veränderung der HLA Klasse I Antigene, durch Veränderungen der CD95/CD95L vermittelten Apoptose oder durch verstärkte Expression von immunsuppressiven Zytokinen einer Immunantwort gegen sich selbst entgehen (Kim et al., 2007; Rabinovich et al., 2007). Über diese Mechanismen sind Tumore in der Lage die Aktivität von T-Zellen und DC sowie die kostimulatorischen Eigenschaften von DC zu reduzieren (Kim et al., 2007; Strand et al., 2004; Troy et al., 1999). Eine wichtige Funktion in der Ausbreitung von Tumorzellen und ihrem Schutz vor Immunantworten haben Matrix Metalloproteinasen (MMP), insbesondere MMP-7, das von vielen Tumoren überexprimiert wird (Ii et al., 2006).

1.2 Matrix- Metalloproteinasen

Seit über 40 Jahren sind Matrix- Metalloproteinasen (MMP) Gegenstand der wissenschaftlichen Forschung. Als Beginn der MMP- Forschung gilt ein 1962 von J.Groos und Lampière vorgestelltes Experiment mit Kaulquappenschwänzen. Bei diesem Experiment wurde ein kollagenolytisches Enzym entdeckt, welches an der Involution des Kaulquappenschwanzes beteiligt ist (GROSS and LAPIERE, 1962). Heute zählt die Enzymfamilie der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) 28 Mitglieder, wovon 23 auch beim Menschen nachgewiesen wurden.

In nahezu allen Abteilungen mehrzelliger Lebewesen wurde eine Vielzahl unterschiedlicher MMPs beschrieben. Ihr Vorkommen in mehrzelligen Organismen lässt darauf schließen, dass für die Evolution mehrzelligen Lebens die Entwicklung matrixmodulierender Enzyme erforderlich war. Anhand unterschiedlicher Strukturen, Substratspezifitäten und Vorkommen lassen sich die MMPs in verschiedene Gruppen unterteilen.

MMPs werden in der Regel in einer inaktiven Form als Zymogen von den Zellen sezerniert und nachträglich proteolytisch aktiviert (Sternlicht and Werb, 2001). Aufgrund ihrer Matrix degradierenden Eigenschaft sind MMPs entscheidend am Gewebeumbau sowohl bei physiologischer- als auch vieler pathologischer Prozesse beteiligt (Nagase et al., 2006).

Durch ihren Einfluss auf die extrazelluläre Matrix (EZM) sind MMPs an der Zelladhäsion und Zellmigration, zum Beispiel bei Wundheilungsprozessen oder Ausbildung von neuen Blutgefäßen, sowie an intrazelluläre Prozesse wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung oder Apoptose beteiligt (Ortega and Werb, 2002; Comoglio and Trusolino, 2005).

Der kontrollierte Auf- und Abbau der EZM- Kompartimente wird in entscheidender Weise von MMPs und dem Zusammenspiel mit ihren natürlichen Inhibitoren, den TIMPs (engl.: *Tissue inhibitors of matrixmetalloproteinases*), reguliert. Sie ermöglichen die jeweilige Anpassung der EZM an ihre verschiedenen Funktionen (Parks et al., 2004).

1.2.1 Vorkommen und Struktur von MMP

Biochemisch betrachtet gehören MMPs zur Gruppe der Hydrolasen, speziell zu den Endopeptidasen. Innerhalb dieser Gruppe bilden sie neben den Serin-, Cystein- und Asparagin-Endopeptidasen eine eigene Familie. Alle Mitgliedern dieser MMP-Familie

zeichnen sich durch das Vorkommen eines zentralen Metallions (z. B. Zn^{2+}) im katalytisch aktiven Zentrum aus.

In der Regel bestehen MMPs aus drei Hauptdomänen und einem Signalpeptid, welches für die Sekretion verantwortlich ist.

Eine dieser Hauptdomänen ist die N-terminale Prodomäne durch deren proteolytische Spaltung und Entfernung die MMPs in ihre aktive Form überführt werden. Dies erfolgt bei fast allen MMPs nach der Sekretion in den extrazellulären Raum und ist wesentlicher Bestandteil bei der regulatorischen Kontrolle der Protease. Nach der Prodomäne folgt beim strukturellen Aufbau der MMPs eine katalytische Domäne. Sie ist der Träger des Zinkions und der Ort der eigentlichen Enzymkatalyse (Diaz et al., 2006). Innerhalb der Prodomäne liegt auch die Substratbindedomäne, die von drei Zinkionen umgeben ist und die Spezifität der MMPs definiert.

Der Prodomäne schließt sich C-terminal eine Hemopexindomäne an. Die Hemopexindomäne ist ebenfalls für die Erkennung und Bindung von Substraten verantwortlich. Sie spielt zudem eine funktionelle Rolle bei der Interaktion der MMPs mit ihren spezifischen endogenen Inhibitoren, den TIMPs und bei der Spaltung von interstitiellem Kollagen durch Kollagenasen (Nagase et al., 2006).

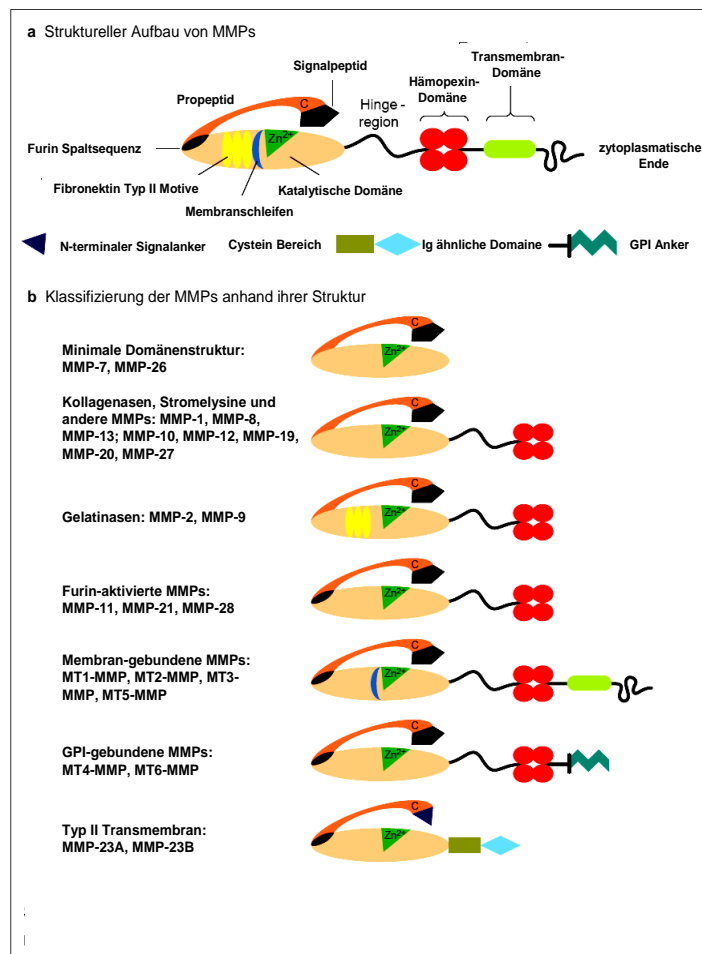


Abbildung 1.2.1: Strukturabhängige Unterscheidung von Matrix- Metalloproteinasen, modifiziert nach (Lafleur et al., 2003)

(a) Variable Struktur von MMPs. Alle MMPs weisen ein Signalpeptid auf, das sie für die Sekretion in den extrazellulären Raum markiert, zudem ein Propeptid sowie eine katalytische Domäne.

(b) Gruppierung der MMPs anhand ihrer Struktur. Die meisten MMPs (außer MMP-7 und MMP-26) besitzen eine C-terminale Hämopeptin-Domäne und eine „Hinge-Region“. MMP-Untergruppen zeigen gesonderte Merkmale wie Transmembran-Domänen und zytoplasmatische Enden und eine MT-Schleife (MT1-, MT2-, MT3- and MT5-MMP). Außerdem weisen MMPs ein Bindungsmotiv für GPI (MT4-MMP und MT6-MMP), eine Furin- Spaltsequenz (MT-MMPs, MMP-11, -21, -23, -28), Fibronectin Typ II-Module (MMP-2 und MMP-9) einen N-terminalen Signalanker, einen Cystein-haltigen Bereich sowie eine Ig-ähnliche Domäne (MMP-23) auf.

1.2.2 Immunologische Rolle von MMP-7

Lange Zeit wurde vermutet, dass die Aufgabe von MMPs ausschließlich in der proteolytischen Degradation von Matrixkomponenten liegt. In der Tat haben sie auch eine große Substratbandbreite unter den Matrixmolekülen. Von der in dieser Arbeit untersuchten Matrix-Metalloprotease-7 weiß man zum Beispiel, dass die Matrixkomponenten Fibronectin, Laminin-I, Gelatin, Elastin und Kollagen-Typ IV zu ihren Substraten zählen (Imai et al., 1995).

Spätere *in vivo* Studien belegen jedoch, dass MMPs in der Lage sind, Nicht-EZM-Proteine als Substrate zu erkennen und zu spalten (McCawley and Matrisian, 2001). Da diese Substrate in eine Vielzahl physiologischer Prozesse involviert sind, beeinflussen MMPs sowohl homöostatische Funktionen, wie Wachstum, Gewebereparatur oder Immunität als auch pathologischen Prozessen, wie chronische Entzündungen, Fibrosen oder Krebs (Fu et al., 2008).

Durch die Aktivierung von pro- α -Defensin, spielt MMP-7 eine wichtige immunologische Rolle in der bakteriellen Primärabwehr. So zeigen MMP-7 Knockout- Mäuse eine verminderte Bakterienabwehr gegen *Escherichia coli* (*Ecoli*) oder Salmonellen (Wilson et al., 1999). Aktiviertes α -Defensin ist in der Lage Bakterien abzutöten. Nach einer Bakterieninfektion des Magen-Darm-Traktes sekretieren Zellen dieser Organe (Paneth-Körnerzellen) α -Defensin als inaktives pro-Peptid. Durch Spaltung der Prodomäne durch MMP-7 wird α -Defensin aktiviert (Ouellette and Selsted, 1996).

MMP-7 ist auch ein wichtiger Faktor bei der Reepithelisierung von mukosalem Gewebe in der Lunge oder Darm nach deren Verletzung oder Entzündung. Es konnte gezeigt werden, dass Epithelzellen nach einer Schädigung vermehrt MMP-7 ausschütten (Dunsmore et al., 1998). Die gesteigerte Sekretion von MMP-7 nach Verletzungen aber vor allem bei Entzündungen hat eine weitere wichtige Funktion während der Immunabwehr. MMP-7 und andere MMPs sind in der Lage den Chemokingradient am Entzündungsort zu beeinflussen und die Invasion von neutrophilen Granulozyten zu fördern (Li et al., 2002).

Zudem fördert MMP-7 in Makrophagen die Sekretion von TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor alpha) eines der wichtigsten pro-inflammatorischen Zytokine. So steuert TNF- α über andere Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6) wesentliche lokale und systemische Entzündungsreaktionen und wirkt auch auf neutrophilen Granulozyten migrationsfördernd.

Genau wie MMP-7 den Verlauf von Entzündungen, die Reparatur von geschädigtem Gewebe oder die Bakterienabwehr positiv beeinflussen kann, hat MMP-7 auch funktionelle Eigenschaften bei pathologischen Veränderungen. Beispiele für solche Veränderungen sind die Metastasierung bzw. Invasivität von Tumoren und entzündliche Erkrankungen, wie Arthritis oder Sepsis (Mohan et al., 2002).

Die von MMPs hervorgerufene Spaltung von Matrixmolekülen und die damit verbundene verringerte Integrität der EZM kann die Invasion und Metastasierung von Krebszellen unterstützen. Ein Grund hierfür ist oft die Überexpression und/oder die verstärkte Aktivität

der MMPs in Tumorzellen. MMP-7 ist ein Beispiel für eine MMP, die von vielen epithelialen und mesenchymalen Tumoren überexprimiert wird. Höhere Konzentrationen von MMP-7 konnten in Tumoren von Magen, Darm, Leber, Bauchspeicheldrüse aber auch bei Haut-, Lungen-, Brust-, und Prostatakrebs nachgewiesen werden (Yamamoto et al., 1999; Aihara et al., 2005; Adachi et al., 1999; Yamamoto et al., 1997; Yamamoto et al., 2003; Jones et al., 2004; Bolon et al., 1997; Karelina et al., 1994; Heppner et al., 1996; Pajouh et al., 1991). Über die verstärkte Expression von MMP-7 verändern Tumore aber nicht nur ihr Mikromilieu um so ihre Ausbreitung zu fördern, sondern auch um sich vor Angriffen des Immunsystems zu schützen. Die Spaltung verschiedener Substrate, wie CD95 (Fas/Apo-1), CD95-Ligand, pro HB-EGF (engl.: *heparin-binding epidermal growth factor*) oder IGF- Bindungsproteine (engl.: *Insoline like growth factor- binding protein*) durch MMP-7 wirken antiapoptotisch auf die Tumorzellen (Vargo-Gogola et al., 2002; Yu et al., 2002; Miyamoto et al., 2004; Strand et al., 2004).

Durch die MMP-7 vermittelte Spaltung des CD95-Liganden (CD95-L) von der Zelloberfläche entsteht ein löslicher Ligand, der nach Bindung an den CD95 Rezeptor in den Zellen der Tumorumgebung Apoptose auslösen kann. Jedoch hat der lösliche CD95 Ligand eine geringere pro-apoptotische Potenz im Vergleich zu membrangebundenen CD95-L. Da Krebszellen oft weniger affin auf CD95 vermittelte Apoptose reagieren, hat der lösliche CD95 Ligand bei ihnen nicht die gleichen pro-apoptotischen Effekte wie auf ihre Nachbarzelle. So kann die Spaltung von CD95-L den MMP-7 überexprimierenden Tumorzellen einen Überlebensvorteil verschaffen (Powell et al., 1999; O'Connell et al., 1999). Die Spaltung des CD95 Rezeptors durch MMP-7 hat ebenfalls eine Apoptose reduzierende Wirkung, die MMP-7 überexprimierende Tumorzellen vor T-Zellangriffen schützen kann (Strand et al., 2004).

Die Substratspezifität von MMP-7 und ihre immunologischen Konsequenzen war und ist Gegenstand vieler Untersuchungen. Man muss davon ausgehen, dass viele Eigenschaften von MMP-7 noch nicht bekannt sind. Erste Untersuchungen im Labor Dr. Strand wiesen darauf hin, dass MMP-7 Einfluss auf die Endozytoseaktivität von Zellen hat. Entscheidend für eine antitumorale Immunantwort ist die Erkennung von Tumorantigenen durch Antigenpräsentierende Zellen (APZ) und deren Zusammenspiel mit Effektorzellen des Immunsystems. Eine MMP-7 vermittelte Störung der Antigenexpression auf Tumorzellen oder deren Aufnahme und Präsentation durch die Endozytoseaktivität von APZs würde die

Immunantwort gegen den Tumor entscheidend schwächen. Aus diesen Gründen beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit dieser interessanten Thematik.

1.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (engl.: Dendritic cells, DC) sind professionelle APZ und einzigartige Initiatoren primärer Immunantworten, da sie aufgrund ihrer hohen MHC-Klasse-II-Molekülexpression sehr effiziente Stimulatoren von B- und T-Lymphozyten sind (Banchereau and Steinman, 1998). Wenige DCs und niedrige Konzentrationen des Antigens reichen aus, um eine starke T-Zell-Antwort zu induzieren.

Die Aktivierung naiver Lymphozyten erfolgt in den lymphatischen Organen durch einen komplexen immunologischen Prozess, in dessen Verlauf inaktive B- und T-Zellen nach Antigenpräsentation proliferieren und anschließend zu spezifischen Effektorzellen oder langlebigen Gedächtniszellen differenzieren. Bei T-Zellen bedarf es einer Prozessierung des Antigens als kurzkettiges Peptid (Zinkernagel and Doherty, 1979), welches im Kontext mit syngenen Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplex (*engl.: Major histocompatibility complex*, MHC) auf der Zelloberfläche von DCs präsentiert wird (Zinkernagel and Doherty, 1997). DCs werden durch ihre Eigenschaft definiert, MHC- oder verwandte Moleküle auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. Über MHC-Moleküle können zuvor aufgenommene und prozessierte Antigene präsentiert werden, welche dann durch T-Zellen erkannt werden können (Austyn, 2000).

Auf die Aufnahme von Antigenen sind unreife/immature DCs (iDCs) spezialisiert. Sie zeichnen sich funktionell durch die effiziente Internalisierung und Prozessierung von Antigenen durch Endozytose aus und kommen als „Wächter“ des Immunsystems in allen peripheren Geweben vor (Steinman, 1991; Banchereau and Steinman, 1998). Hier sind sie strategisch günstig an den potentiellen Eintrittsstellen für Pathogene lokalisiert (Übersichtsartikel: (Banchereau et al., 2000).

Die Antigenaufnahme ist eine typische Eigenschaft unreifer DCs, die durch verschiedene Endozytosemechanismen erfolgt:

1. Durch Makropinozytose (Formung großer, Pinozytose ähnlicher Vesikel) können extrazelluläre Flüssigkeiten und Stoffe eingeschlossen werden (Sallusto et al., 1995).

2. Über Phagozytose können Partikel und Mikroben aufgenommen werden (Reis e Sousa et al., 1993).
3. Durch die membranständigen Rezeptoren, welche eine adsorptive Endozytose vermitteln wie Mannoserezeptoren (Sallusto et al., 1995) oder Fc-Rezeptoren (FcR) für Immunglobuline (Fanger et al., 1996).

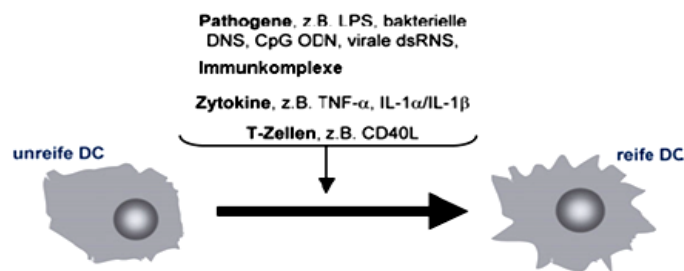
Die Makropinozytose tritt bei unreifen dendritischen Zellen konstitutiv in hohem Maße auf (Sallusto et al., 1995). So sind unreife DCs in der Lage extrazelluläre Flüssigkeit aufzunehmen, mit der auch mögliche Antigene in die Zelle gelangen können. Diese werden von den DCs prozessiert und als Peptid über den MHCI- oder MHCII- Komplex präsentiert (Inaba et al., 1993).

Einen wichtigen Mechanismus für die Antigenpräsentation von DCs stellt die Rezeptorvermittelte Endozytose dar. Unreife DCs tragen verschiedene Rezeptoren zur Antigenaufnahme auf ihrer Oberfläche. Beispiele hierfür sind die hochaffinen IgG- und IgE-Rezeptoren, Fc γ RI (CD64) und Fc γ RII (CD32) oder das Oberflächenprotein Dec-205 (CD 205), das an der Endozytose dendritischer Zellen maßgeblich beteiligt ist (Bonifaz et al., 2002). Auch findet sich auf DCs eine hohe Expression des Mannoserezeptors. Er stellt in Experimenten den Hauptweg für die Endozytose von FITC-Dextran dar (Sallusto et al., 1995) und vermittelt nativ die Phagozytose mannosereicher Partikel, wie Hefepilze und Bakterien (Pontow et al., 1992).

Nach der Antigenaufnahme erfolgt als weiterer Schritt der Immunantwort die Antigenpräsentation durch die Effektorzellen des Immunsystems stimuliert werden. Die internalisierten Antigene werden durch proteolytische Spaltung in kurze Peptidfragmente prozessiert und auf MHC-Moleküle geladen. Die Expression dieser Peptid/MHC Komplexe bezeichnet man als Antigenpräsentation.

DC exprimieren konstitutiv MHC-Klasse-I- und Klasse-II-Moleküle, daher sind sie in der Lage sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺ T-Zellen durch Antigenstimulation zu aktivieren. Unreife DCs sind jedoch nicht in der Lage Antigene effizient zu präsentieren und Immunantworten zu induzieren. Daher durchlaufen unreife DCs nach der Antigenaufnahme einen Maturierungsprozess, währenddessen die Endozytoseaktivität dieser Zellen schwindet. Die Reifung führt zunächst zum Verlust der Phagozytose-, später auch der Pinozytoseaktivität. Beide sind in terminal ausdifferenzierten DCs nicht mehr nachweisbar (Sallusto et al., 1995; Shortman and Liu, 2002). Verschiedene Faktoren wie inflammatorische Gefahrensignale, z.B.

inflammatorische Zytokine, bestimmte mikrobielle Strukturen so genannte PAMPs (pathogen associated moleculare patterns), aber auch T-Zellen können einen Maturierungsprozess der iDCs induzieren (Gallucci and Matzinger, 2001; Matzinger, 1994; Fraser et al., 1998; Gordon, 2002; Medzhitov and Janeway, Jr., 2000). Dieser Prozess geht einher mit der Migration der DCs in die regionalen Lymphknoten. Während der Migration wird der Maturierungsprozess abgeschlossen, welcher zu einer starken Veränderung des Phänotyps, der Morphologie und der funktionellen Eigenschaften der DCs führt (Guermontprez et al., 2002). So wird die Expression von MHC Molekülen gesteigert und inflammatorische Zytokine werden sezerniert, während die Zellen gleichzeitig ihre phagozytotische Aktivität verlieren.



Expression von Oberflächenmarkern

+	Adhäsionsmoleküle: CD11, CD54, CD58	+ + +
+	Antigenpräsentierende Moleküle: MHC I, MHC II	+ +
+	Kostimulatorische Moleküle: CD40, CD80, CD86	+ + +
-	Reifemarker: CD83	+ +

Funktionelle Eigenschaften

+ +	Endozytoseaktivität: Antigenaufnahme über Fcγ-, Mannose-, DEC-205- Rezeptoren	- / +
+ / -	Motilität	+ +
-	Il-12 Produktion	+ + +
+	T-Zell stimulatorische Kapazität	+ + +

Abbildung 1.3: Vergleich der Eigenschaften von unreifer und reifer DCs.

- nicht vorhanden, +/- schwach, + mäßig, ++ gut, +++ sehr gut

Die Reifung von DCs kann durch Pathogene, Zytokine und T-Zellen ausgelöst werden. Während unreife DCs auf die Antigenaufnahme spezialisiert sind, zeigen reife DCs Merkmale, die für die Spezialisierung auf Antigenpräsentation in Zusammenhang wichtig sind.

LPS: Lipopolysaccharide, CpG-ODN: CpG Oligodesoxydinukleotide, dsRNA: doppelsträngige RNA, TNF: Tumor-Nekrose-Faktor, IL: Interleukin, CD40L: CD40 Ligand, MHC II: MHC-Klasse-II, CCR1, CCR5, CCR6 = Chemokinrezeptoren, CD80, CD86, CD40 = kostimulatorische Signale, CD54 (ICAM-1): interzelluläres Adhisionsmolekül, CD83 = Reifungsmarker, LAMP: Lysosom-assoziierte Membranproteine. (Modifiziert nach (Banchereau et al., 2000) und (Timmerman and Levy, 1999))

Die resultierenden reifen/maturen DCs (mDCs) sind außerordentlich potente immunstimulatorische Zellen. Sie sind in der Lage, primäre T-Zell-vermittelte Immunantworten zu induzieren und darüber hinaus auch naive B-Zellen zu aktivieren.

Wichtig für eine hohe stimulatorische Potenz der DCs sind zudem kostimulatorische Moleküle, vor allem CD80 und CD86, deren Expression während der Reifung gesteigert wird und auf mDCs stark exprimiert werden (Banchereau *et al.*, 2000). Daher ist die Effizienz einer DC-T-Zell-Interaktion vom Reifestatus der DCs abhängig. Reife DCs fördern eine Immunantwort, während unreife DCs, die im nicht aktivierten Zustand den Lymphknoten erreichen eine T-Zell-Anergie oder T-Zell-Toleranz induzieren können (Steinman and Nussenzweig, 2002).

1.4 Aktivierung und Funktionen von T-Lymphozyten

Die Aktivierung von naiven T- Lymphozyten durch Antigenpräsentation kostimulierender Moleküle ist ein weiterer Schritt der Immunabwehr. Entscheidender Faktor für die T-Zellaktivierung ist der Kontakt zu Antigenpräsentierenden Zellen. Während der Aktivierung durchlaufen die Lymphozyten einen komplexen immunmodulatorischen Prozess. Sie proliferieren und differenzieren in spezifische Effektorzellen oder langlebige Gedächtniszellen. Bretscher und Cohn beschreiben ein Modell zur T-Zellaktivierung von zwei Signalen (Bretscher and Cohn, 1970). Das erste Signal beschreibt die Antigenerkennung durch die Bindung des T-Zell-Rezeptors (*engl.: T cell receptor, TCR*) an den spezifischen MHC/Peptid-Komplex von APZs. Dieses Signal führt nur dann zur Aktivierung von naiven Lymphozyten, wenn sie gleichzeitig kostimuliert werden (zweites Signal). Ohne die Kostimulation führt die TCR-Bindung an ein MHC-präsentiertes Antigen zur Apoptose oder Anergie des Lymphozyten. Daher ist die Expression von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen bei reifen DCs ebenso für die Aktivierung von T-Zellen notwendig, wie die Antigenpräsentation auf MHCI- oder MHCII-Molekülen.

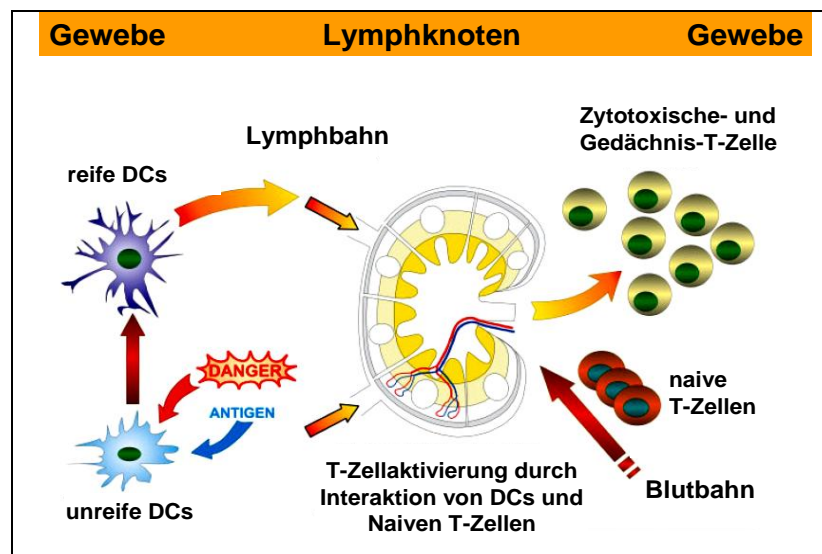


Abbildung 1.4: Aktivierung von T-Zellen durch Interaktion mit DCs. Nach Kontakt mit Antigenen werden DCs im Gewebe aktiviert und wandern in den Lymphknoten, wo sie mit T-Zellen interagieren. Diese werden wiederum aktiviert und differenzieren zu T-Effektorzellen. Sie migrieren in den Ort der Inflammation oder Gewebeschädigung, wo sie ihre Effektorfunktion ausüben können. Einige T-Zellen differenzieren zu Gedächtniszellen. (Modifiziert nach Gogolak et al., 2003).

Nach der Aktivierung und Migration haben $CD8^+$ T-Zellen die essentielle Aufgabe infizierte Zellen oder Tumorzellen zu eliminieren (Rosenberg et al., 1986; Kast et al., 1989; Greenberg, 1991). $CD4^+$ T-Zellen dagegen üben immunregulatorische Funktionen aus.

Sowohl die effiziente Stimulation von T-Zellen durch Antigenpräsentation als auch die endozytotische Eigenschaften von APZs werden durch viele Komplexe Mechanismen des Zytoskeletts reguliert (Billadeau et al., 2007). Für diese Mechanismen ist die Polymerisation von Aktin essentiell.

1.5 Aktindynamik

Neuere Untersuchungen gehen davon aus, dass die Aktinpolymerisation wichtige Funktionen bei endozytotischen Signalwegen und auch bei der T-Zellaktivierung hat (Engqvist-Goldstein and Drubin, 2003; Tskvitarua-Fuller et al., 2003). Die verschiedenen Formen der Endozytose von Säugerzellen werden über unterschiedliche Signalwege reguliert. Einige Komponenten kommen in mehreren Signalwegen vor. Dazu gehören neben dem Protein Dynamin auch Teile des Aktinzytoskeletts (Orth and McNiven, 2003; Welch and Mullins, 2002).

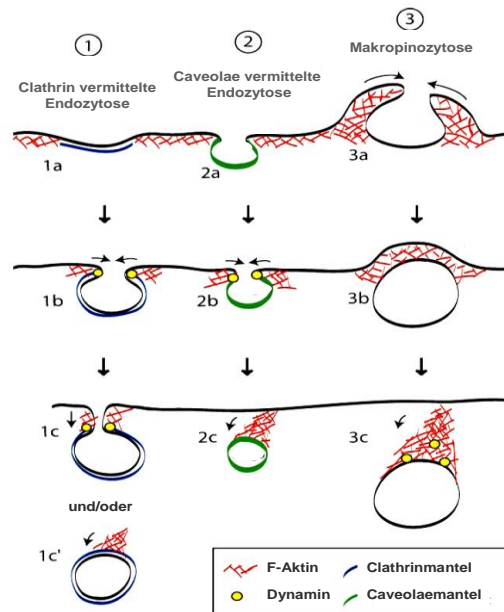


Abbildung 1.5: Mögliche Funktionen von Aktin bei der Endozytose (Clathrin- und Caveolae-vermittelte Endozytose und Makropinozytose). Aktin ist wahrscheinlich in mehreren Bereichen an der endozytotischen Internalisierung beteiligt. Zuerst scheint Aktin ein Grundgerüst zu bilden, das die Bildung von Clathrin- oder Caveolae-ummantelten Bläschen unterstützt (1a und 1b). Zudem könnte Aktin die Einstülpung und/oder Abspaltung von Clathrinhüllen und Caveolae ummantelten Bläschen vorantreiben (1b, 1c und 2b). Daneben könnte Aktin den Vesikeltransport von der Plasmamembran tiefer in die Zelle forcieren (1c, 2c und 3c). Letztlich spielt das Aktinskelett eine wichtige Rolle bei der Bildung von Membranüberständen, die für die Bildung von mikropinozytotischen Vesikeln essentiell sind (3a). Modifiziert nach Engqvist-Goldstein und Drubin, 2003.

In T-Zellen hat die Dynamik des Zytoskeletts und damit verbunden die Polymerisation von Aktin einen entscheidenden Einfluss auf die T-Zellaktivität. Die Aktinpolymerisation spielt eine wichtige Rolle bei der Kontaktaufnahme von T-Zellrezeptoren zu MHCII-Peptidkomplexen (Campi et al., 2005). Eine verminderte Aktindynamik reduziert die Bindung von T-Zellrezeptoren mit dem MHC-Komplex von antigenpräsentierenden Zellen und führt als Konsequenz daraus zu einer verringerten T-Zellproliferation (Tskvitaria-Fuller et al., 2003).

Die Aktindynamik beruht auf dem Auf- und Abbau von Aktinfilamenten. Die Aktinpolymerisation für die Neubildung von Aktinfilamenten (F-Aktin) beginnt mit dem Zusammenbau von drei globulären Aktinmonomeren (G-Aktin). Dieser Komplex (Nukleationskeim) ist für die Assoziation weiterer Aktinmonomere essentiell. Die Bildung von Aktinpolymeren wird von Proteinen katalysiert, den so genannten Aktinnukleationsfaktoren, zu denen unter anderem der Arp 2/3 Komplex (*engl.: Actin-related protein*) gehört. Es handelt sich dabei um einen Proteinkomplex aus sieben Proteinen, die durch Wiskott-Aldrich-Syndrom Proteine (WASP) aktiviert werden (Symons et al., 1996). Diese Proteine

besitzen sowohl eine Bindungsstelle für G-Aktin, also auch für die Proteine des Arp2/3-Komplexes.

Ausgelöst wird die Aktinpolymerisation als Reaktion auf äußere Signale, wie z. B. Lockstoffe (Chemokine). Auf molekularer Ebene kann die Bindung extrazellulärer Liganden an ihre membranständigen Rezeptoren wie Rezeptortyrosinkinasen zur Aktivierung von G-Proteinen führen. Die an der Signalübertragung zum Zytoskelett beteiligten G-Proteine sind in vielen Fällen Proteine der Ras-Superfamilie, mit den fünf Subfamilien Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf und Ran (Takai et al., 2001). Den Vertretern der Rho-GTPase-Familie kommt bei der Reorganisation des Zytoskeletts eine große Bedeutung zu (Hall, 1992). Prominenteste Vertreter dieser Subfamilie der kleinen Ras-GTPasen (**Guanosintriphosphatasen**) sind Rho, Rac und Cdc42. Die genauen Signalwege der Aktinpolymerisation durch Rho-GTPasen sind noch nicht vollständig erforscht. Für die GTPase Cdc42 konnte jedoch schon gezeigt werden, dass ihre aktivierte Form an die GTPase-Bindungsdomäne (GBD) von WASP bzw. N-WASP bindet, wodurch die Proteine eine Konformationsänderung vollziehen. Diese Konformationsänderung führt letztlich zur Aktinpolymerisation (Rohatgi et al., 1999).

Die Aktivierung der GTPasen erfolgt durch Signaltransduktion äußerer membranständiger Rezeptoren, deren Signal im Zellinneren die Aktivierung von GTPasen fördert (Boguski and McCormick, 1993; Rohatgi et al., 1999). So ist der Tyrosinkinase Rezeptor EphB2 (*engl.: Erythropoetinproducing hepatocellular receptor*) ein wichtiges Effektorprotein für die Signaltransduktion von Cdc42 (Nishimura et al., 2006). Das so aktivierte Cdc42 ist in der Lage die Polymerisation von Aktin durch N-WASP und den Arp2/3 Komplex auszulösen (Irie and Yamaguchi, 2002).

1.6 Erythropoetinproducing hepatocellular Rezeptoren und ihre Liganden

Die Eph-Rezeptoren stellen die größte bekannte Untergruppe der Rezeptortyrosinkinasen (RTK). Eine Überexpression des ersten beschriebenen Eph-Rezeptors, in einer Erythropoetin produzierenden humanen hepatozellulären Karzinomzelllinie (ETL-1) führte zur Entdeckung und Isolation dieses Rezeptors (Hirai et al., 1987). Dadurch hat diese Rezeptorfamilie ihren Namen erhalten (*engl.: Erythropoetinproducing hepatocellular receptor*). Heute sind in Vertebraten 15 Eph-Rezeptoren und 9 Ephrin-Liganden (**Eph-Rezeptor interagierendes**

Protein) identifiziert (Martinez und Soriano, 2005). Die Rezeptoren und Liganden werden entsprechend ihrer Sequenzhomologien und Bindungsaffinitäten in A- und B-Klassen unterteilt (Gale et al., 1996).

Allen Eph Rezeptoren gemein ist eine membrandurchspannende Struktur mit einer intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität. Der extrazelluläre Bereich der Eph-Rezeptoren besteht aus einer hochkonservierten N-terminalen globulären Ligandenbindungsdomäne (Labrador et al., 1997). Danach folgt eine cysteinreiche Region und zwei Fibronectin Typ III Motive, welche die Rezeptordimerisierung und die Interaktion mit anderen Proteinen vermitteln (Lackmann et al., 1998; Dalva et al., 2000). Intrazellulär folgt eine Juxtamembran-Region, welche die anschließende Kinasedomäne von der Zellmembran separiert. Das carboxyterminale Ende des Rezeptors bildet ein stabiles α -Motiv (SAM) und eine Bindungsstelle für Proteine mit einer PDZ-Domäne (engl.: *Postsynaptic density protein, discs large, zonaoccludens*) (Torres et al., 1998).

Alle Ephrin Liganden besitzen am N-Terminus eine Rezeptor-Bindedomäne, die von der Zellmembran durch ca. 40 Aminosäuren getrennt ist.

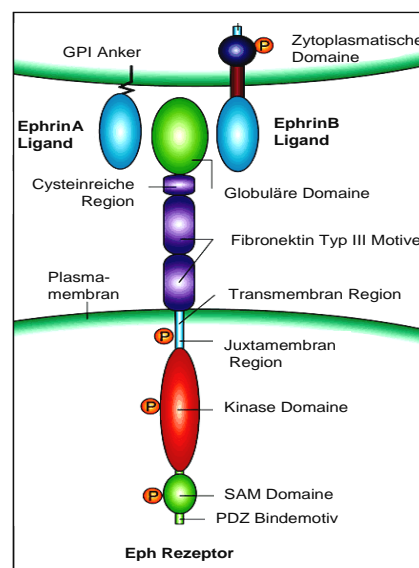


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des Aufbaus der Eph Rezeptoren und Ephrine

GPI: Glycosylphosphatidylinositol Verbindung; PDZ: konservierte Sequenz von 90 Aminosäuren in den Proteinen PSD95/SAP90, DLG (engl.: *Drosophila discs-large protein*) und Z01; SAM: steriles alpha Motiv. Verändert nach Kullander und Klein, 2002

Die Unterteilung der Eph Rezeptoren und ihrer Liganden spiegelt auch ihre Bindungseigenschaften wieder. Die Liganden einer Klasse können mit allen Rezeptoren derselben Klasse interagieren (Gale et al., 1996). EphrinA Liganden binden also an EphA-

Rezeptoren und EphrinB-Liganden binden an EphB-Rezeptoren. Dabei werden die Liganden mit unterschiedlichen Affinitäten von den verschiedenen Rezeptoren gebunden (Flanagan und Vanderhaeghen, 1998). Diese Unterscheidung der Bindungseigenschaften ist aber nicht absolut, da es Ausnahmen gibt (Orioli and Klein, 1997). So bindet zum Beispiel EphA4 verschiedene B-Liganden (Gale et al., 1996) und EphrinA5 aktiviert den EphB2-Rezeptor (Himanen et al., 2004).

Die Aktivierung der Rezeptoren erfolgt über zwei Schritte. Zunächst erfolgt eine Bindung zwischen Ligand und Rezeptor. Diese Heterodimere bilden dann Tetramere. Durch nachfolgende Konformationsänderungen an der globulären Domäne der Rezeptoren kommt es zur Annäherung der intrazellulären Domänen. Die räumliche Nähe begünstigt die Trans-autophosphorylierung der Kinasedomänen, die dadurch vollständig aktiviert werden (Pasquale, 2005). Die aktivierte Kinase kann dann durch Phosphorylierung anderer Moleküle, die Signalkaskade einleiten.

Zu den nachgeschalteten Molekülen gehören Nicht-Rezeptor Tyrosinkinasen, die Src-homologe (SH) Domänen 2 und 3 enthalten, so wie Mitglieder der Src Kinasefamilie (engl.: *Src family kinases*, kurz: SFK). Diese Kinasen binden über zwei hochkonservierte phosphorylierte Tyrosinreste an die juxtamembranale Region der Eph-Rezeptoren z.B. an EphB2 (Zisch et al., 1998). Nach der Bindung der SFKs an die Eph-Rezeptoren können diese weitere Signalmoleküle modulieren, zum Beispiel Bestandteile des Integrin-Adhäsions-Komplex, das Neural-Wiskott Aldrich Syndrom Protein (N-WASP) oder Cortactin (Aktivatoren des Arp2/3 Komplex) (Abram and Courtneidge, 2000). Weitere downstream-Moleküle, die durch die Tyrosinkinase direkt oder kinaseunabhängig durch das PDZ-Bindemotiv des Rezeptors aktiviert werden, sind die Guanin-Austauschfaktoren (engl.: *Guanine-nucleotide exchange factors*- GEF) Ephexin, Tiam1, Intersektin und Kalirin. Diese wiederum modulieren auf unterschiedliche Weise die GTPasen der Rho-Familie, wie z.B. RhoA, Rac1 und Cdc42 (Irie and Yamaguchi, 2002; Mishima et al., 2004). Viele dieser Moleküle sind an der Regulierung der Aktindynamik des Zytoskeletts beteiligt und können von Eph-Rezeptorsignalen reguliert werden (Yamaguchi and Pasquale, 2004).

Wie schon beschrieben, beeinflusst das Rezeptorsignal von EphB2 die Aktivität von Cdc42. Der Signalweg von EphB2 zu Cdc42 verläuft über die Aktivierung des GEF-Intersektin. Intersektin aktiviert Cdc42 durch den Austausch von Guanindiphosphat durch Guanintriphosphat (Irie and Yamaguchi, 2002). Das so aktivierte Cdc42 ist in der Lage, die Polymerisation von Aktin durch N-WASP und den Arp2/3 Komplex auszulösen.

Untersuchungen zur entwicklungsabhängigen Veränderung von DCs lassen vermuten, dass Cdc42 über diesen Signalweg auch an der Regulation der Endozytoseaktivität beteiligt ist. Die direkte Stimulation von Cdc42 bewirkte in DCs eine Hochregulation der Makropinozytose, während die Blockierung der Cdc42 Aktivität die Endozytose dieser Zellen stark reduzierte (Shurin et al., 2005).

1.7 Endozytose

Der selektive vesikuläre Transport von extrazellulären Komponenten zwischen den einzelnen Kompartimenten einer Zelle, der Plasmamembran und der Zellumgebung ist essentiell für die Ausübung verschiedener zellulärer Funktionen und dem Erhalt der spezialisierten Membranen. Die Aufnahme von extrazellulären Stoffen durch Bildung von kleinen Bläschen (Vesikeln) in das Zellinnere bezeichnet man als Endozytose (*griech. Endon* = innen, *Kytos* = Höhlung). Von Komponenten der Plasmamembran werden extrazelluläre Stoffe umschlossen und in das Zytoplasma transportiert.

Im Hinblick auf Antigenaufnahme und Antigenpräsentation durch APZs stellt die rezeptorvermittelte Endozytose den wichtigsten Endozytosemechanismus dar. Sie wird durch spezielle Rezeptoren an der Zelloberfläche gesteuert. Die Aufnahme der rezeptorgebundenen Antigene basiert auch hier auf der Bildung von Vesikeln. Die internalisierten Vesikel werden in Endosomen sortiert. Diese werden entweder wieder zur Plasmamembran transportiert oder von partikulären Systemen wie Liposomen eingeteilt (Lanzavecchia, 1990).

Die Clathrin-vermittelte Endozytose ist eine der am besten untersuchten Endozytosemechanismen und auch Teil der Aufnahme von Rezeptorgebundenen Stoffen. Charakteristisch für diesen Prozess ist die Bildung von Clathrin umhüllten Einstülpungen (*engl.: Clathrin coated pits*) an spezialisierten Bereichen der Plasmamembran.

Ein weiterer Mechanismus ist die Aufnahme von extrazellulärem Material durch die Caveolae- (*lat. Cavum*= Höhle) vermittelte Endozytose. Einige spezialisierte Zellen (Makrophagen, unreife dendritische Zellen) sind darüber hinaus in der Lage, große Mengen an extrazellulärem Fluid via Makropinozytose oder große Partikel über Phagozytose aufzunehmen (Mukherjee et al., 1997).

1.7.1 Clathrinvermittelte Endozytose

Die clathrinvermittelte Endozytose ist der wichtigste Mechanismus der rezeptorvermittelten Aufnahme von extrazellulären Stoffen.

Die selektive Aufnahme von extrazellulärem Material durch clathrinumhüllte Einstülpungen in bestimmten Regionen der Plasmamembran wurde erstmal 1964 beschrieben (ROTH and PORTER, 1964). Bei diesen Einstülpungen handelt es sich um Membranbereiche, die nach innen gerichtete Vertiefungen bilden und an der Zellsinnenseite von Clathrinmolekülen ausgekleidet sind (Mousavi et al., 2004).

Wichtiger Transportproteine wie LDL (low density lipoprotein) und Transferrin, aber auch Wachstumsfaktoren und Hormone werden von der Zelle über clathrinvermittelte Endozytose aufgenommen (Karin and Mintz, 1981; Lakkaraju et al., 2002). Die aufzunehmenden Makromoleküle müssen zunächst an einen spezifischen Rezeptor an die Zelloberfläche binden. Clathrin gewährleistet an der Innenseite der Zellmembran, die Ausbildung einer Vertiefung in der Zellmembran in der die Rezeptoren komprimiert werden. Diese Vertiefung (Durchmesser von $\sim 0,3 \mu\text{m}$) senkt sich ein und bildet so ein Vesikel, das den Rezeptor-Makromolekül-Komplex für den Transport in der Zelle umschließt. Während des Transports durch die Zelle wird die Clathrinhülle von den Vesikeln gelöst und die Clathrin-Monomere werden wieder zur Membran zurückgeführt und erneut eingebaut.

Die Vesikelbildung mit Hilfe einer Clathrinhülle ist ein komplizierter Prozess, an dem mehrere Proteinkomponenten beteiligt sind. Für die Vesikelbildung lagern sich clathrinbindende Adapterproteine wie AP-2 (Adapterprotein 2), Amphiphysin und AP-180 (Adapterprotein 180) in Komplexen an die Membran (Haucke and De Camilli, 1999; Morgan et al., 2000). Dieser Prozess wird durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung von Eps15 (engl.: *Epidermal growth factor receptor pathway substrate 15*) und Intersektin kontrolliert (Tebar et al., 1996; Sengar et al., 1999). Durch Anlagerung und Polymerisierung von Clathrin kommt es zu Einstülpungen der Membran. Nach Verengung des Vesikels polymerisiert Dynamin 1 spiralförmig um dessen Hals. Eine Konformationsänderung von Dynamin 1 durch GTP-Hydrolyse verengt dessen Spiralstruktur und führt zur Abschnürung des Vesikels (Sweitzer and Hinshaw, 1998). Nach der Entfernung der Clathrinhülle des Vesikels durch Synaptojanin kann dieser zum Beispiel durch Aktinpolymerisation zu seinem Bestimmungsort transportiert werden (Arneson et al., 1999; Rohatgi et al., 1999).

1.7.2 Phagozytose

Im Gegensatz zur clathrinvermittelten Endozytose werden durch die Phagozytose größere Partikel (ca. 0,5- 3 μm Durchmesser) von der Zelle aufgenommen. Mikroorganismen oder auch tote Zellen werden durch Ausstülpungen der Zellmembran (Pseudipodien) umschlossen welche durch Verschmelzung ihrer Enden ein Phagosom ausbilden (Anderson, 1992). Nach der Abschnürung der Phagosomen bzw. Makropinosomen (Makropinozytose) werden diese in mehreren Stufen biochemisch verändert. Nachfolgend werden die Phagosomen zu den Lysosomen transportiert, in denen sich abbauende Enzyme befinden. Die aufgenommenen Partikel werden hier so weit wie möglich verdaut und abgebaut.

1.7.3 Makropinozytose

Der Mechanismus der Makropinozytose ist dem der Phagozytose sehr ähnlich. Die dabei gebildeten Vesikel entsprechen mit einem Durchmesser von 1 bis 5 μm der Größe der Phagosomen. Es kommt jedoch nicht zur direkten Aufnahme von größeren Partikeln, sondern es werden größere Mengen an extrazellulärer Flüssigkeit aufgenommen. So gelangen die darin gelösten Nährstoffe und Makromoleküle in die Zelle (Sieczkarski and Whittaker, 2002). Phagozytose und Makropinozytose sind beides aktinabhängige Prozesse. Sie unterscheiden sich jedoch in den biochemischen Reaktionskaskaden, die an den jeweiligen Endozytosevorgängen beteiligt sind (Cardelli, 2001).

Intrazellulär werden die Makropinosomen zelltypabhängig verarbeitet. In der überwiegenden Anzahl der Zelltypen stehen sie in engem Kontakt mit dem endosomalen System und verschmelzen mit lysosomalen Kompartimenten.

1.8 Zielsetzung

MMP-7 ist in der Lage neben Proteinen der Extrazellulären Matrix (EZM) auch viele Nicht-EZM-Proteine als Substrate zu erkennen und zu spalten. Dadurch ist MMP-7 in physiologische aber auch pathologische Prozesse involviert. So wurde in verschiedenen Tumoren eine Expression von MMP-7 analysiert, welche mit verminderten Heilungschancen der Patienten korreliert. Erklärungen für diese Korrelation ist die Möglichkeit von MMP-7 immunrelevante Proteine spalten zu können, was die Sensitivität der Tumorzellen gegen Angriffe des Immunsystems reduziert. Neben den bekannten Eigenschaften von MMP-7 ist davon auszugehen, dass längst nicht alle immunmodulatorischen Eigenschaften von MMP-7 bekannt sind. Ziel dieser Arbeit war es daher neue MMP-7-spezifische Veränderungen zu identifizieren und auf ihre Auswirkungen auf das Immunsystem zu untersuchen.

Anhand der vorhandenen Voruntersuchung sollte insbesondere der Einfluss von MMP-7 auf Clathrin und die damit verbundene Endozytoseaktivität von Zellen untersucht werden.

Anschließend sollte erforscht werden über welchen Signalweg MMP-7 die Endozytose von Zellen beeinflussen kann.

Weitere Untersuchungen sollten klären, ob MMP-7 über diesen Signalweg immunrelevanten Einfluss auf die Zellen hat.

Durch eine mögliche MMP-7 vermittelte Veränderung der Endozytoseaktivität von Zellen, wurde besonders die Wirkung von MMP-7 auf unreife, dendritische Zellen untersucht und ihre Funktion als antigenpräsentierende Zellen des Immunsystems.

In diesem Zusammenhang sollte auch der Einfluss von MMP-7 auf Funktion und Stimulation von T-Zellen erforscht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
-20°C Tiefkühlschrank	Bosch, Deutschland
4°C Kühlschrank	Bosch, Deutschland
-80°C Ultratiefkühlschrank	Ultra-Low technology of laboratory equipment, USA
Durchflusszytometer, FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Elektrophoresekammer (Agarosegele)	OWL scientific, Wiesbaden, Deutschland
Filmentwicklermaschine	Fujitsu, Japan
Fluorometer Spectra FluorPlus	Tecan, Salzburg, Österreich
Gel Dokumentationssystem	Biostep, Jahnsdorf, Deutschland
Konfokales Laserscanmikroskop (LSM) 510-UV	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Kühlinkubator, Innova 4230	New Brunswick Scientific, NJ, USA
Lichtmikroskop	Leica, Portugal
Luminometer Safire	Tecan, Salzburg, Österreich
Magnetrührer, Heidolph	Brinkmann Instruments, NY, USA
Orbitalschüttler, Heidolph unimax 1010	Brinkmann Instruments, NY, USA
pH-Meter Toledo 320	Mettler Toledo, Schwerzenbach, Schweiz
Realtime PCR Maschine	Stratagene, La Jolla, USA
Spannungsgeber	Amersham pharmacia biotech, Schweden
Sterilwerkbank	Allerod, Dänemark
Sterilwerkbank (Typ S-2000 1.5)	Heto-Holten, Dänemark
Thermocycler, MyCycler	Biorad, München, Deutschland
Thermomixer, ThermoStat	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
UV/Spektralphotometer -Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Waage, Delat Rang AG204	Mettler Toledo, Schwerzenbach, Schweiz
Wasserbad, Typ 1004	Milian Labware, USA
Wasserbad, Typ 1003	Milian Labware, USA

Bezeichnung	Hersteller
Zellkulturmikroskop	Hund, Wetzlar, Deutschland
Zellkulturinkubator	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge, Megafuge 1.0R	Haeraeus, Hanau Deutschland

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte

2.2 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Acetyliertes Rinderserumalbumin (BSA)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Acrylamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Agarose für Elektrophorese	CalBiochem, Darmstadt, Deutschland
Aminoethylcarbazol (AEC)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ampicillin (Amp)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen, Deutschland
Benzonase	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromophenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Butanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
CDP Star	Tropix, Bedford, USA
Diethanolamin (DEA)	Tropix, Bedford, USA
Diethylenpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, St. Louis, USA
Di-nucleicacid tri-phosphate (dNTP)	Invitrogen, San Diego, USA
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dulbeccos modified eagle medium (DMEM)	Invitrogen, San Diego, USA
Eisessig	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol absolut 96-100% (v/v) p.A.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
I-Block	Tropix, Bedford, USA
IGEPAL (NP40)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumvanadat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nitroblock II	Tropix, Bedford, USA
Non-essential amino acids (NEAA)	Invitrogen, San Diego, USA
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
PCR- Reaktionspuffer (10-fach)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Penicillin-streptomycin	Invitrogen, San Diego, USA
Permafluor Endeckmedium	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Polyhydroxyalkanoat (PHA)	Sigma, St. Louis, Deutschland
Phosphate buffered saline (PBS)	Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgien
Phorbolster-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma, St. Louis, USA
Poly-D-Lysin	Sigma, St. Louis, USA
Ponceau S	Sigma, St. Louis, USA
Primer	MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma, St. Louis, USA
RNA Längenstandard (Century Marker)	Ambion, Huntingdon, GB
Roti Nanoquant	Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640	Lonza, Basel, Schweiz
Saponin	Invitrogen, San Diego, USA
SDS	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sucrose	Merck, Darmstadt, Deutschland
T4 DNA-Polymerase	MBI Fermentas, Burlington, USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Trichlooessigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan (TrisBase)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Triton X-100	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypsin	Invitrogen, San Diego, USA
Trypton	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tween 20	Merck, Darmstadt, Deutschland
Whatman Papier	Whatman International, Waitstone, England

Tabelle 2.2: Verwendete Chemikalien

2.3 Kunststoff und Glaswaren

Plastikwaren wie Zellkulturflaschen, Reagenzröhrchen und Kulturplatten wurden von Greiner Bio-One, Frickenhausen bezogen. Reagenzröhrchen für FACS-Analysen von Becton Dickinson, Heidelberg und Pipettenspitzen zum molekularbiologischen Arbeiten wurden von Starlab, Ahrensburg bezogen.

2.4 Antikörper

Primäre Antikörper für FACS und Westernblot-Analysen

Bezeichnung	Hersteller
Esel anti Ziege Cdc42	Pierce, Rockford, USA
Maus anti human β - Aktin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Maus anti human Adaptin α	R&D Systems, Minneapolis, USA
Maus anti human Adaptin β	R&D Systems, Minneapolis, USA
Maus anti human Adaptin γ	R&D Systems, Minneapolis, USA
Maus anti human AP 180	R&D Systems, Minneapolis, USA
Maus anti human CD 40 FITC	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
Maus anti human CD80 FITC	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Maus anti human HLA-DR FITC	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Maus anti human CD86 FITC	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
Ziege anti human Clathrin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ziege anti human EphB2	Santa Cruz, Heidelberg, Germany
Ziege anti Kaninchen Rac1	Cellsignaling, Boston, USA
Ziege anti Maus EphB2	R&D Systems, Minneapolis, USA

Tabelle 2.4A: Verwendete Primärantikörper

Sekundärantikörper für Westernblots

Bezeichnung	Hersteller
Esel anti Kaninchen ALP	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Esel anti Maus HRP	Pierce, Rockford; USA
Esel anti Ziege ALP	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Esel anti Ziege HRP	Pierce, Rockford; USA
Ziege anti Maus ALP	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Tabelle 2.4B: Verwendete Sekundärantikörper enzymgekoppelt

Fluoreszierende Sekundärantikörper und fluoreszierende Reagenzien

Bezeichnung	Spezifität	Hersteller
Alexa Fluor-488 Esel anti Ziege	Ziege IgG	Molecular Probes, Leiden, NL
Alexa-Fluor-488 Phalloidin	Aktinfilamente	Molecular Probes, Leiden, NL
Alexa-Fluor-488 Ziege anti Kaninchen	Kaninchen IgG	Molecular Probes, Leiden, NL
Alexa-Fluor-488 Ziege anti Maus	Maus IgG	Molecular Probes, Leiden, NL
Alexa-Fluor-448 Transferrin	Endozytose	Molecular Probes, Leiden, NL
FITC-Dextran 40 kDa	Endozytose	Molecular Probes, Leiden, NL
Hoechst 33342	Zellkern	Molecular Probes, Leiden, NL

Tabelle 2.4C: Verwendete Sekundärantikörper fluoreszenzfarbstoffgekoppelt

2.5 Kommerzielle Versuchskits

Bezeichnung	Hersteller
Active GTPase Pull-Down Kits	Pierce, Rockford, USA
Human MMP-7 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA
iScript cDNA Synthese Kit	Biorad, München, Deutschland
MACS LS / LD Separation Columns	Milteny Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS Micro Beads	Milteny Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
PCR core Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Rac/Cdc42 Activation Assay Kit	Cell Biolabs, Inc., San Diego, USA
Ras GTPase Chemi ELISA Kit	Active Motif, Carlsbad, USA
LeucoSep 50ml (Buffy-Coat-Präparation)	Greiner, Kremsmünster, Deutschland

Tabelle 2.5: Verwendete kommerzielle Versuchskits

2.6 Software

Adobe Photoshop CS2

BD CellQuest Pro

MagicScan V 4.5

Reference Manager 2.0

Tecan Xfluor

Adobe Acrobat 6.0

Macromedia Freehand 8.0.1

Microsoft Office 2003

Stratagene MxPro™ QPCR Software

Zeiss LSM 510

2.7 Reagenzien, Lösungen und Medien für die Zellkultur

Reagenz/Lösung	Ausgangskonzentration	Hersteller
RPMI-1640		Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DMEM		Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
ISCOV basal		Biochrom KG, Berlin, Deutschland
AIM V		Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Fötales Bovines Serum (FBS)		Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Humanes AB-Serum		Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz, Deutschland

Reagenz/Lösung	Ausgangskonzentration	Hersteller
HEPES Puffer	1M in 0,85% NaCl	BioWhittaker, Vervies, Belgien
Penicillin-Streptomycin	10000 U/ml Penicillin 10000 µg/ml Streptomycinsulfat in 0,85% NaCl	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	200 mM	PAA, Cölbe, Deutschland
Trypsin/EDTA	1% in PBS	PAA, Cölbe, Deutschland
G418 (Geneticin)	10 mg/ml	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Zeocin	100 mg/ml	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 2.7: Verwendete Chemikalien für die Zellkultur

2.8 Zellkultur Medien

DMEM komplett

- 500 ml DMEM-Medium
- 50 ml FCS
- 5 ml Pen/Strep (10mg/ml)
- 5ml L-Glutamin (200 mM)
- 5 ml Hepes Puffer (1M)

RPMI komplett

- 500 ml RPMI-Medium
- 50 ml FCS
- 5 ml Pen/Strep (10mg/ml)
- 5ml L-Glutamin (200 mM)

Humanes DC- Medium

- 500 ml DMEM-Medium
- 25 ml humanes AB-Serum
- 5 ml Pen/Strep (1%)
- 5 ml L-Glutamin (200 mM)
- 5 ml Natriumpyrovat (1mM)
- 5 ml nicht essentielle Aminosäuren (10mg/l)

Humanes DC- Medium mit Zytokinen

- X ml DC-Medium (s.o.)
- 1000 U/ml IL4
- 1000 U/ml GM-CSF

Humanes DC- Medium für Maturation

- X ml DC-Medium (s.o.)
- 500 U/ml IL4
- 800 U/ml GM-CSF
- 10 ng/ml IL1 β
- 10 ng/ml TNF- α
- 1000 U/ml IL6

Zellpräparationsmedium

- 500 ml RPMI-Medium
- 10 ml FCS (2%)
- 2,5 ml Pen/Strep (0,5%)

Maus DC-Medium

- 500ml RPMI 1640 Medium
- 5ml Pen/Strep (1%)
- 50ml (10%) FCS
- 50ml (10%) GM-CSF Überstand

X6310-Medium (Hybridomzelllinie,
GM-CSF produzierende Zellen)

- 500 ml basales Iscove-Medium
- 5 ml (1%) P/S
- 25 ml (5%) FCS

Erythrozytenlyse- Puffer (Erylysepuffer):

- 8,29g NH₄Cl
- 1g KHCO₃
- 0,0372g EDTA
- mit deionisiertem H₂O auf 1 Liter Endvolumen auffüllen und steril filtrieren

Einfriermedium

Zum Einfrieren von PBMCs, Hek 293-, Jurkat 16-, und X6310- Zellen wurde FCS-haltiges Medium verwendet.

Es bestand aus:

- 90% FCS
- 10% DMSO

2.9 Eukaryotische Zelllinien

Die in dieser Arbeit funktional eingesetzten Zelllinien werden folgend aufgeführt:

293EcR Zelllinie

Als Basis diente die Hek 293 Zelllinie, welche aus humanen, Embryonierenzellen etabliert und durch Adenovirustransfektion unsterblich wurde. Die 293EcR Zelllinien exprimiert stabil den modifizierten Ecdysonrezeptor. Die Zellen wurden unter Zeocin Selektion (200 µg/ ml) gehalten.

293EcR-MMP-7 Zellklon

293EcR-Zellen wurde stabil mit dem rekombinanten Plasmid pIND-MMP-7 transfiziert. Durch Behandlung mit dem Ecdysonanalogon Ponasteron A (PonA) kann in diesen Zellen die Expression und Sekretion von MMP-7 induziert werden. Das verwendete PonA wurde in 100% Ethanol gelöst daher wurden für Versuche die Kontrollzellen mit entsprechenden Mengen Ethanol behandelt. Die Behandlung der Zellen erfolgte mit einer Konzentration von 2

µg PonA je Milliliter Zellsuspension. Die Zellen wurden unter Selektion mit Zeocin und G418 (je 200 µg/ ml) kultiviert.

SK MEL 29 Zelllinie

Eine HLA-A2.1 positive Melanomzelllinie etabliert aus einer Lymphknotenmetastase eines Patienten mit der Studiennummer SK29. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Wölfel (III Med. Klinik, Universitätsklinik Mainz).

IVSB-Zelllinie

Die Zellen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Wölfel. Dieser zytotoxischer T-Lymphozyten Klon wurde aus dem Blut desselben Patienten isoliert wie die SK MEL 29-Zelllinie (s.o.). Die IVSB-Zellen erkennen spezifisch das Tyrosinase-Peptid Ty-2 (YMNGTMSQV) nach HLA-A2 Präsentation.

2.10 Zellbiologische Methoden

2.10.1 Kultivierung von Suspensionszellen und adhärenenten Zellen

Die Zellen wurden in Kunststoffgefäßen (Gewebekulturflaschen oder Multiwell-Platten der Fa. Greiner BioOne) bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ im Feuchtbrutschrank (Fa. Binder) kultiviert. Verwendet wurden die unter 2.8. aufgezählten Medien. Das Kulturvolumen richtete sich nach der Größe des Zellkulturgefäßes.

2.10.2 Mediumwechsel von Suspensionszellen

Zellkulturen, deren Kulturmedium verbraucht war (pH-Indikator des Kulturmediums verfärbte sich von rot nach gelb-orange), wurden in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 300 g und 21°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das

Zellpellet in entsprechendem Kulturmedium resuspendiert und in geeigneten Zellkulturgefäßen kultiviert.

2.10.3 Mediumwechsel adhärenter Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung

Das verbrauchte Kulturmedium (pH-Indikator des Kulturmediums verfärbte sich von rot nach gelb-orange) wurde aus der Gewebekulturflasche entnommen und verworfen. Die Zellen wurden anschließend mit einer geeigneten Menge PBS (37°C) gewaschen. Nach Zugabe von 2-10 ml Trypsin/EDTA-Lösung wurden die Zellen 3-5 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert (abhängig vom Zelltyp eventuell länger) und die Ablösung der Zellen mikroskopisch kontrolliert. Durch Zugabe von 5-10 ml FCS haltigem Kulturmedium folgte eine Inaktivierung des Trypsins und die Zellsuspension konnte aus der Gewebekulturflasche in ein 50 ml Röhrchen überführt werden. Die Zellen wurden danach 5 Minuten bei 324 g und 21°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet konnte dann in einem geeigneten Volumen des Kulturmediums resuspendiert werden und wurde anschließend in Zellkulturgefäßen weiter kultiviert.

2.10.4 Passage von Suspensionszellen

Weisen Zellkulturen eine sehr hohe Zelldichte auf, wurde ein Teil der Zellsuspension verworfen. Abhängig vom Zelltyp und Zellwachstum wurde die Hälfte (Passage 1:2) bis 9/10 (Passage 1:10) dieser Suspension verworfen. Der Rest wurde in ein geeignetes Zellkulturgefäß überführt, mit dem entsprechenden Kulturmedium auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt und weiter kultiviert.

2.10.5 Split adhärenter Zellen

Bei einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen verdünnt und in frische Zellkulturflaschen überführt. Dafür wurden die Zellen in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die

Ablösung der Zellen erfolgte wie in Kapitel 2.10.4 beschrieben mit Trypsin/EDTA-Lösung. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in 5-10 ml entsprechendem Kulturmedium resuspendiert und abhängig vom Zelltyp wurde die Hälfte (Split 1:2) bis 9/10 (Split 1:10) dieser Suspension verworfen. Die restliche Suspension wurde in ein geeignetes Zellkulturgefäß überführt, mit dem entsprechenden Kulturmedium auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt und weiter kultiviert.

2.10.6 Kryokonservierung von Zellen

Die Zelllinien wurden zur längeren Aufbewahrung in der Gasphase von flüssigem Stickstoff (-196°C) konserviert. Hierfür wurden die Zellen in einer Konzentration von $3,5-5 \times 10^6$ Zellen/ml in 1 ml Einfriermedium aufgenommen. Dieses bestand aus FCS und war mit 10% (v/v) DMSO supplementiert. Die Zellen wurden in Kryokonservierungsbehältnissen aliquotiert, 24 Stunden bei -80°C gelagert und in den flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Kryogefäße in 37°C warmen Wasser überführt. Aufgrund der Toxizität des DMSO im Einfriermedium für die Zellen war es wichtig, die Zellen zügig in Kulturmedium aufzunehmen. Nach einer Minute im warmen Wasser wurden die Zellen mit einer sterilen Kunststoffpipette tropfenweise in 5 ml erwärmtes Kulturmedium gegeben. Daraufhin erfolgte die Zentrifugation bei 300 g und 20°C für 5 Minuten. Nach dem Dekantieren des überstehenden Mediums wurden die Zellen in geeignetes Kulturmedium überführt.

2.10.7 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzählung erfolgte durch mikroskopisches Auszählen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 50 μl der Zellsuspension mit dem gleichen Volumen einer Trypanblaulösung (0,4 %) gemischt. Der Farbstoff diffundiert nur durch die Zellmembran von toten Zellen und färbt diese im Zytoplasma blau an. Dadurch können die toten Zellen bei der Zellzahlbestimmung von den vitalen Zellen unterschieden werden. 10 μl der Mischung wurden hierfür unter das Deckglas der Zählkammer pipettiert.

Ausgezählt wurden 4x16 Felder der Neubauer-Kammer unter dem Mikroskop. Um die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension zu ermitteln, wurde der Mittelwert berechnet und anschließend mit dem Verdünnungsfaktor durch die Zugabe der Trypanblaulösung (1:2) und dem Kammerfaktor (10000) multipliziert. So erhielt man die Zellzahl pro Milliliter.

2.10.8 Kultivierung des zytotoxischen T-Zellklons IVSB

Der in vorliegenden Studien verwendete zytotoxische T-Zellklon (CTL) IVSB wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. T. Wölfel freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Dieser CTL-Klon erkennt spezifisch das Tyrosinase-Peptid Ty-2 (YMNGTMSQV), in Verbindung mit dem HLA-A2 Antigen auf der Oberfläche von Tumorzellen, welche Tyrosinase endogen exprimieren (Wölfel et al., 1993). Um eine Langzeitkultur zu etablieren, wurde der Klon nach der Methode von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. T. Wölfel (Wölfel et al., 1994) restimuliert. Dazu wurden auf eine 24-Lochgewebeplatte 1×10^6 zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) pro Vertiefung in 1 ml AIM V Medium mit 10% Humanserum ausplattiert. Um eine Proliferation des Klons zu induzieren, wurden autologe SK-Mel 29 Tumorzellen (1×10^5 Zellen/Vertiefung) als Stimulatorzellen sowie Alex B eine MHCII und HLA-A2 exprimierende EBV B-Zelllinie (2×10^5 Zellen/Vertiefung) als Feederzellen zugegeben. Um einer Proliferation der Stimulatorzellen sowie der Feederzellen während des Experiments zu verhindern, wurden diese Zellen vor dem Ausplattieren mit 10 Gy bestrahlt. Zusätzlich wurden die Zellen durch die Zugabe von IL2 (250 U/ml) stimuliert. Für die weitere Kultur wurde dieses Verfahren nach 6 bis 7 Tagen wiederholt. In den Tagen zwischen den Restimulationen wurden alle zwei bis drei Tage die T-Zellzahl ermittelt. Bei einer hohen T-Zelldichte ($> 1,5 \times 10^6$ Zellen/ml) wurden die Zellen mit frischem AIM V Medium (mit 250 U/ml IL2) auf eine Dichte von $0,8$ bis 1×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Für Versuche wurden die Zellen am dritten bis fünften Tag nach der Restimulation verwendet.

2.10.9 Zelllinien zur Produktion von murinem GM-CSF

Rekombinantes mGM-CSF (*engl.*: Murine granulocyte macrophage-colony stimulating factor) für die Generierung von murinen DC wurde aus einer stabil transfizierten X6310-Mausmyelom Zelllinie gewonnen. Die Zellen dieser Transfektante wurden in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 50 cm² mit supplementiertem ISCOV Basalmedium bis zu einer Konfluenz von 90 bis 95% kultiviert. Danach wurden die geöffneten Zellkulturschalen unter den sterilen Bedingungen der Sicherheitswerkbank für 30 Minuten mit UV-Licht bestrahlt, um die Zellen abzutöten. Die Zellen wurden noch zwei bis drei Tage weiterkultiviert, bis alle Zellen abgetötet und das GM-CSF möglichst vollständig in das Medium sezerniert worden war. Anschließend wurden die Zelldebris bei 300 g für 10 Minuten abzentrifugiert, der Zellüberstand steril filtriert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte anhand der Ausdifferenzierung der DCs aus Knochenmark. Die Differenzierung wurde durch Membranfärbung der Maturationsmarker (CD80, CD86 und HLA-DR) und anschließender FACS-Analyse bestimmt.

In flüssigem Stickstoff eingefrorene X-6310 Zellen wurden bei Bedarf nach dem Auftauen für eine Passage in Medium kultiviert.

2.10.11 Präparation humaner PBMCs

Humane, periphere, mononukleäre Blutzellen (*engl.*: PBMC) wurden aus humanem Blut von gesunden Spendern mit Hilfe von LeucoSep (Greiner BioOne) nach Angaben des Herstellers präpariert. Zur Gewinnung von mononukleären Zellen wurde keine Vollblutprobe sondern der Leukozytenfilm (*engl.*: Buffy-Coat) des Spenderbluts verwendet. Das Blut wurde mit PBS (Phosphat gepufferte Saline), im Verhältnis 1:2, verdünnt und über das Polymer Percoll (Lonza) geschichtet. Durch eine anschließende Zentrifugation (15 Minuten, bei 800 g, 20°C und deaktivierter Zentrifugenbremse) trennten sich die mononukleären Zellen von den Erythrozyten, Leukozyten und Granulozyten. Die mononukleären Zellen bildeten über dem Percoll eine Grenzschicht während sich die polymorphen Zellen durch den Zentrifugationsschritt aufgrund der größeren Dichte unter dem Percoll ansammelten. Nach

dem Absaugen der mononukleären Zellen, mittels steriler Kunststoffpipette, folgten mehrere Waschschrte. Für diese wurde, nach Zentrifugation jeweils der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml PBS aufgenommen. Die Zellen wurden gezählt und zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

2.10.11 Isolierung von CD4 positiven oder CD8 positiven T-Lymphozyten aus PBMCs

Bei dieser Trennmethode wurden die zuvor isolierten PBMCs über monoklonale Antikörper mit superparamagnetischen Mikropartikeln (Durchmesser ca. 100nm) markiert. Die Zellsuspension mit den spezifisch markierten und den unmarkierten Zellen wurde auf eine Trennsäule aufgetragen, die sich in einem Permanentmagnetfeld befand und eine Matrix aus Polymerbeads besaß. Während die unmarkierten Zellen die Säule durchliefen, blieben die markierten Zellen zwischen den Matrixbeads der Säule haften. Sie konnten außerhalb des Magnetfeldes herausgewaschen werden. Das MACS System konnte entweder zur Positivselektion oder zur Depletion einer Zellpopulation verwendet werden.

Die Zellseparationen wurden gemäß den Herstellerprotokollen von Miltenyi Biotec durchgeführt. Die Art der verwendeten Säulen richtete sich nach der eingesetzten Zellzahl. Es wurden Säulen der Größe MS (bis 10^7 positive Zellen) verwendet.

Für die Negativisolation von humanen T-Zellen wurden 10^7 PBMCs in 40µl MACS-Puffer aufgenommen, es folgte die Zugabe von 10 µl eines Antikörpercocktail mit spezifischen Antikörpern gegen die Oberflächenmerkmale von nicht T-Zellen.

Antikörpercocktail für die Isolation von CD4 positiven T-Zellen:

CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ und Glycophorin.

Antikörpercocktail für die Isolation von CD8 positiven T-Zellen:

CD4, CD15, CD16, CD19, CD34, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ und Glycophorin.

Die Antikörper sind am Fc-Teil des Moleküls mit Biotin markiert. Die CD4 oder CD8 negativen Zellen, vor allem B-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, Granulozyten und Erythrozyten werden von den Antikörpern gebunden. Nach 10-minütiger Inkubation der Lösung bei 4°C erfolgte die Zugabe von weiteren 30 µl MACS-Puffer und 20 µl eines magnetisch aktiven Zweitantikörpers mit Spezifität für Biotin (Microbeads). Die

antikörpergebundenen Zellen werden damit magnetisch detektierbar. In einer Säule im Magnetfeld bleiben die magnetisch markierten Zellen haften, das Eluat enthält die gesuchten, nicht an Antikörper-gebundenen T-Zellen.

2.10.12 Generierung von humanen dendritischen Zellen

Für die Generierung von humanen dendritischen Zellen (*engl.*: DC) aus PBMCs wurde die so genannte Adhärenzmethode angewendet.

Monozyten können im Gegensatz zu Lymphozyten an unphysiologischen Oberflächen adhären. Diese Eigenschaft kann man für die Trennung der Zellen nutzen. So wird der Prozess der Adhärenz durch Anwesenheit von Serum- bzw. Plasmaproteinen sowie Wärme, Ca^{2+} und hydrophoben Plastikoberflächen der Kulturgefäße unterstützt, während Kälte und EDTA ihr entgegenwirken.

Für die DC-Generierung wurden aufgereinigte PBMCs in serumhaltigem Medium auf eine Zellzahl von $1 \times 10^7/\text{ml}$ eingestellt und 30 bis 40 ml dieser Zellsuspension in 175 cm^2 Zellkulturflaschen ausplattiert. Die ausplattierten PBMCs wurden für 30-60 Minuten bei 37°C in einem CO_2 -Brutschrank inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle der Adhärenz wurden das Medium abgenommen und die restlichen nicht adhärenen T- und B-Lymphozyten sowie NK-Zellen mit PBS abgespült.

1 bis $1,5 \times 10^7$ dieser Monozyten wurden in zytokinsupplementiertem, dendritischem Zellmedium aufgenommen. Durch die Zytokinzugabe wurden die Monozyten innerhalb von vier bis fünf Tagen zu unreifen dendritischen Zellen (iDCs) differenziert. Zur Induktion der Reifung wurden die iDCs für zwei Tage in Maturationsmedium kultiviert.

2.10.13 Generierung von dendritischer Zellen aus Mausknöchelmark

Durch zervikale Dislokation getötete Mäusen wurde anschließend das Fell und das Gewebe von den Beinen abgelöst und diese durch Zugbewegungen vom Hüftgelenk abgetrennt. Die gesäuberten Knochen wurden zur Desinfektion für wenige Sekunden in einer

Isopropanollösung (100%) gelegt, mit Präparationsmedium abgespült und bis zur Weiterverarbeitung in Präparationsmedium aufbewahrt.

Die Enden der Röhrenknochen wurden mit einer Schere aufgetrennt und das Knochenmark mit Hilfe einer Spritze, einer dünnen Kanüle und Präparationsmedium aus dem Knochen herausgespült. Das Knochenmark wurde im Weiteren mit einem 70 µm Zellsieb in Präparationsmedium resuspendiert und die Zellen bei 350 g für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Resuspension der Zellen in 5 ml Erythrosedimentationspuffer zur Erythrozytenlyse bei Raumtemperatur für ein bis zwei Minuten. Die Lyse wurde sodann durch Zugabe von 20 ml Präparationsmedium gestoppt und die Zellen wie zuvor zentrifugiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit 10 ml Präparationsmedium und eine Zählung der Zellen. Die Zellen wurden in Präparationsmedium aufgenommen. Je 10 ml dieser Zellsuspension mit einer Dichte von 3×10^6 Zellen/ml wurden in eine Zellkulturschale mit 10 cm Durchmesser gegeben und für 24 Stunden unter den üblichen Zellkulturbedingungen kultiviert. Danach wurden weitere 10 ml des DC-Mediums zugegeben. Für die weitere Kultur wurde alle weiteren 48 Stunden vorsichtig 10 ml des Kulturmediums erneuert. Dieses Verfahren wurde bis zur Verwendung der DC beibehalten. Nach fünf bis acht Tagen wurde die in Suspension befindlichen Zellen, als DC, durch Abpipettieren geerntet. Für Versuche zur Endozytosebestimmung wurden DC üblicherweise fünf Tage nach der Knochenmarkisolation verwendet, für Stimulationsexperimente im Zeitraum von sieben bis neun Tagen.

2.10.14 Isolierung von Maus-Milzzellen

Für die Gewinnung der Milzzellen von Mäusen wurden die Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet. Anschließend wurde ihnen die Milz entnommen. Das Organ wurde mit Hilfe eines Stempels durch ein engmaschiges Netz (40 oder 70 µm) passiert, um so Einzelzellen zu gewinnen. Durch Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen aus ihren Zellverbänden gelöst und anschließend in 50 ml Röhren überführt. Zur Abtrennung der groben Bestandteile wurde die Zellsuspension bei 300 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Zur Lyse der Erythrozyten wurde das Zellpellet in 5 ml Erythrozytenlysepuffer aufgenommen und ein bis zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 20 bis 30 ml PBS wurde die Erythrozytenlyse abgestoppt, die Zellen wurden pelletiert (300 g, RT, 8 min) und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Dabei sollten möglichst alle bei der

Erythrozytenlyse entstandenen Aggregate entfernt werden Die gewonnenen Milzzellen wurden für die Isolation von T-Lymphozyten verwendet.

2.10.15 Isolierung von T-Lymphozyten aus Maus-Milzzellen

Die CD4-positiven oder CD8-positiven murinen T-Zellen wurden wie unter 2.10.11 beschrieben durch indirekte Bindung an monoklonale Antikörper mit superparamagnetischen Mikropartikeln isoliert. Die Zellseparationen wurden, gemäß den Herstellerprotokollen von Miltenyi Biotec, mit Säulen der Größe MS (bis 10^7 positive Zellen) durchgeführt.

Der Antikörpercocktail für die Isolation muriner T-Zellen enthielt spezifische Antikörper gegen die Oberflächenmerkmale CD11b, CD45R, CD49b sowie CD8 oder CD4.

2.10.16 CFSE-Markierung und CFSE-Proliferationstest

Mit CFSE (5,6-Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester) lassen sich Zellen lang anhaltend fluoreszenzmarkieren. Das CFSE liegt zunächst als Ester vor und kann so die Zellmembran passieren. Im Zytosol wird die Estergruppe durch Esterasen verseift, so dass der Farbstoff in der Zelle zurück gehalten wird. Die Succinimid-Gruppe ist sehr reaktiv, der Farbstoff bindet darüber kovalent an Lysin-Reste und andere freie Amin-Gruppen intrazellulärer Proteine. Da das CFSE bei Zellteilungen zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben wird, lässt sich die Proliferation einer Zellpopulation anhand veränderter CFSE-Markierung verfolgen.

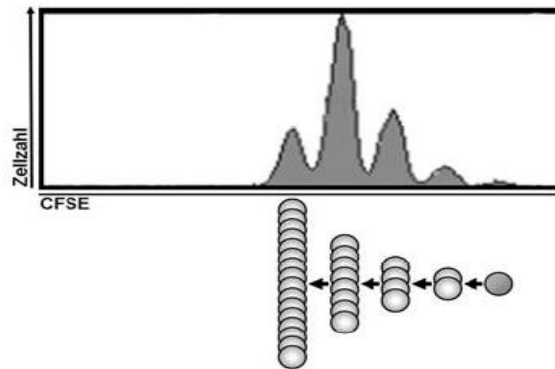


Abbildung 2.10.16: Schematische Darstellung des Prinzips des CFSE-Poliferationstests. Dargestellt ist das CFSE-Signal proliferierender T-Zellen. Die Proliferation korreliert mit einer schrittweisen Abschwächung des CFSE-Signals.

Diese beruht auf der gleichmäßigen Verteilung des CFSEs auf die jeweiligen Tochterzellen. Zur Markierung der Zellen mit CFSE wurden bis zu 10^7 Zellen/ml in einer $10\ \mu\text{M}$ CFSE-Lösung in PBS mit 0,1% BSA resuspendiert. Die $10\ \mu\text{M}$ CFSE-Lösung wurde kurz zuvor aus einer $10\ \text{mM}$ Stammlösung in DMSO hergestellt. Die Zellsuspension wurde unter gelegentlichem Umschwenken für 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Der Mischung wurde, zum Abstoppen der Reaktion, 10 ml kaltes RPMI-Medium zugesetzt und diese fünf Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und zweimal mit RPMI-Medium gewaschen und konnten dann direkt im Proliferationstest eingesetzt werden.

2.10.17 Zytotoxizitätsmessung mit dem CellTiter-Glo[®] Lumineszenz Zellviabilitätsassay

Die zytotoxische Aktivität des T-Zellklon IVSB wurde durch Viabilitätsmessung der Zielzellen (Target) mit der Methode des CellTiter-Glo[®] Lumineszenz Zellviabilitätsassay ermittelt.

Mit diesem Assay wird der ATP-Gehalt metabolisch aktiver Zellen in einer Luziferasereaktion bestimmt. Diese Ergebnisse erlauben Rückschlüsse auf die Zahl der lebenden Zellen. Das Lumineszenzsignal wird im Luminometer gemessen. Dafür wird das Reagenz direkt zu den Zellen in das Medium pipettiert, welches die Zellen lysiert, die endogenen ATPasen inhibiert und ein Lumineszenzsignal erzeugt.

Für die Zytotoxizitätsmessung wurden die Effektorzellen IVSB und die Zielzellen Alex B in einer 96-Lochplatte mit unterschiedlichen Verhältnissen zueinander ausgesät (Effektor-zu-Target-Verhältnis von 3:1 bis 1:6). Diese Kokulturen wurden für vier bis 24 Stunden bei 37°C im Zellkulturinkubator kultiviert. Vor und während der Kokultur wurden ein Teil der Zellen mit MMP-7 (200 ng/ml) behandelt. Als Positivkontrollen wurden gleichbehandelte AlexB-Zellen in entsprechender Zelldichte ohne Effektorzellen kultiviert. Nach der Kokultur wurden in jeder, mit 100 µl Zellkultursuspension gefüllte, Vertiefung der 96-Lochplatte 25 µl CellTiter-Glo® Reagenz pipettiert. Nach zweiminütigem Schütteln wurden 90 µl pro Vertiefung des Zelllysats in weiße 96-Lochplatten überführt und zur Stabilisierung des Lumineszenzsignals 10 Minuten stehen gelassen. Im Lumiometer wurden anschließend die Lumineszenzsignale gemessen.

Das Lumineszenzsignal von IVSB-Einzelkulturen wurde als Hintergrundaktivität von den Signalen der Kokulturen mit entsprechendem Effektor/Target-Verhältnis (E/T) subtrahiert. Als Blindwert wurde Medium verwendet.

2.11 Molekularbiologische Methoden

2.11.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine sehr effektive Methode zur selektiven Anreicherung definierter Nukleinsäuresequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen, die von Kary B. Mullis entwickelt wurde (Saiki et al., 1988). Hierbei werden zwei Oligodesoxynukleotide (Oligonukleotide oder Primer) synthetisiert, die jeweils komplementär zu einem der beiden 3'-Einzelstrangenden des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges sind. Im ersten Schritt wird die DNA-Matrize durch Hitzedenaturierung aufgeschmolzen. Hierdurch wird in einem zweiten Schritt die Bindung der Primer an ihre entsprechende Zielsequenz ermöglicht (Annealing). Von dem kurzen doppelsträngigen Bereich ausgehend wird im letzten Schritt der fehlende, komplementäre Einzelstrang in 5'-3'Richtung synthetisiert (Elongation). Durch mehrfache Wiederholung dieser Reaktionsfolge wird eine exponentielle, selektive Anreicherung des gewünschten Transkripts erreicht. Theoretisch entstehen bei n Zyklen $2n^{-1}$ amplifizierte Moleküle.

In einem PCR-Ansatz sind folgende Komponenten enthalten:

- 10µl 10x Reaktionspuffer
- 1µl 10 pmol/ml sense Primer
- 1µl 10 pmol/ml antisense Primer
- 2µl 5 U/ml DNA Polymerase
- 2µl 10 nM dNTPs
- mit deionisiertem H₂O auf 25µl Endvolumen auffüllen

Nachfolgend ist ein typisches PCR-Programm dargestellt:

1. 95°C / 15 min Aktivierung der Polymerase und Denaturierung
2. 94°C / 1 min Denaturierung
3. 55-70°C / 1 min Annealingtemperatur abhängig vom GC-Gehalt der Primer
4. 72°C / 1 min Elongation
5. *zurück zu Schritt zwei und Wiederholung des Ablaufes für 35 Zyklen*
6. 72°C / 6 min finale Elongation

Die Annealing- und Elongationszeiten wurden in dieser Arbeit je nach Größe des zu amplifizierenden Genabschnitts variiert. Die verwendeten Lösungen wurden den unterschiedlichen Protokollen der verwendeten DNA-Polymerasen angepasst. Nach Ablauf der Reaktion wurde jeweils ein Aliquot jedes Ansatzes auf einem Agarosegel kontrolliert.

2.11.2 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Molekülen verschiedener Größe erfolgt mittels Elektrophorese im Agarosegel. Negativ geladene DNA wandert im elektrischen Feld in Richtung der Kathode. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Makromoleküle ist dabei abhängig von der Form, Ladung und Größe der Moleküle. Durch den Siebeffekt des Agarosegels, welches aus einem komplexen Netz von Polysaccharidketten besteht, können kleinere Moleküle schneller in Richtung des positiven Pols wandern, als große Moleküle der gleichen Form. Das Gel wird

mit Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert, versetzt. Unter UV-Licht im Transilluminator werden die gefärbten Banden der gewanderten DNA-Moleküle sichtbar.

Zur Auftrennung wurden Gele mit 0,8 bis 1,5% (w/v) Agarose verwendet. Die Agarosekonzentration wurde an die Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente angepasst (Tab.2.11.2). Die Agarose wurde in 0,5 x TBE-Puffer gegeben und durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurde die Agaroselösung mit Ethidiumbromid (0,1 µg/ml Gel) versetzt, in einen Gelschlitten gegossen und der Kamm für die Geltaschen eingesetzt. Nach vollständigem Aushärten des Gels konnte der Kamm entfernt und das Gel in die Gelkammer eingesetzt und vollständig mit 0,5x TBE-Puffer überschichtet werden.

Die aufzutrennenden Proben wurden mit 5x Ladepuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgt bei 100-120 V für etwa 25 bis 45 Minuten.

Agarosekonzentration [%]	aufzutrennende Fragmentgrößen [kb]
0,7	0,8
0,9	0,5
1,2	0,4
1,5	0,2

Tabelle 2.11.2: Geeignete Agarosekonzentrationen bzgl. aufzutrennender Fragmentgrößen

2.11.3 RT-PCR

2.11.3.1 Quantitative PCR

Die Expression bestimmter Gene wurde in dieser Arbeit durch semiquantitative und quantitative real time PCR untersucht. Für beide Methoden wurde zuerst die gesamte RNA aus kultivierten oder primären Zellen isoliert und anschließend eine reverse Transkription zur Synthese von copy DNA (cDNA) durchgeführt. Die Sequenzen der verwendeten Primer und deren Annealingtemperatur sind in Tabelle 2.11.3.6 aufgelistet.

2.11.3.2 RNA-Isolation

Gesamt-RNA wurde von behandelten oder unbehandelten, kultivierten Zellen von Zelllinien oder primären Zellen isoliert. Für die RNA-Isolation wurde das RNeasyTM Kit (Stratagene) nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

Die Zellen wurden wie in den Ergebnissen beschrieben behandelt, geerntet und abzentrifugiert. Das Zellpellet in β -Mercaptoethanol haltigem Lysepuffer lysiert und anschließend durch vorsichtiges Pipetieren homogenisiert.

Aus dem Lysat wurden mit einer Vorreinigungssäule und einem Zentrifugationsschritt die Zellfragmente entfernt. Anschließend wurde das nun klare Lysat mit gleichem Volumen Ethanol (70 %) versetzt und schnell vermischt. Bis zu 700 μ l dieser Lösung wurden in eine RNA-Bindungssäule überführt und anschließend mit 10000g für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule wurde mit 600 μ l Niedrigsalzwaschpuffer gewaschen. Nach Zentrifugation und Verwerfen des Durchflusses wurde die Säule durch eine weitere Zentrifugation (10000g, 2 min) getrocknet. Danach folgte ein DNA-Abbau durch Zugabe von 50 μ l DNase auf die Reinigungssäule und anschließender Inkubation bei 37°C für 15 Minuten.

Nach der DNase-Behandlung wurde die Säule mit 600 μ l Hochsalzpuffer und anschließend mit der gleichen Menge Niedrigsalzpuffer, durch Zentrifugation (10000 g, 30 s) und Verwerfen des Durchflusses, gewaschen.

Die Säulen wurden in neue 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt und die RNA nach Zugabe von 30 μ l Elutionspuffer und Zentrifugation für eine Minuten mit 10000 g von der Säule eluiert. Die Konzentration und Reinheit der Gesamt-RNA wurde photometrisch ermittelt. Für die Konzentration wurde die Absorption bei 260 nm gemessen und für die Reinheit das Verhältnis der Absorption von 260 nm zu 280 nm berechnet.

Die RNA-Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

2.11.3.3 Reverse Transkription

Durch die reverse Transkription wird die, als Matrize dienende RNA, ausgehend von angelagerten Primern zu einer komplementären, einzelsträngigen DNA umgeschrieben. Dabei wird durch die Verwendung von Poly-dT-Primern spezifisch die poly-adenylierte mRNA

transkribiert. Die so hergestellte cDNA (*engl.*: Copy DNA) wurde für RT-PCR (*engl.*: Reverse transcriptase polymerase chain reaction) eingesetzt. Die reverse Transkription wurde mit 1 µg Gesamt-RNA in 20 µl Reaktionsvolumen mit Hilfe des iScript cDNA Synthese Kit (Biorad) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Reaktionsbedingungen:

25°C	5 Minuten
42°C	45 Minuten
85°C	5 Minuten
4°C	10 Minuten

2.11.3.4 Semiquantitative PCR

Für die semiquantitative PCR wurde das PCR core Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet.

Jede PCR wurde in einem Volumen von 25 µl mit 1 µg cDNA in einem PCR-Thermostaten (Biorad) durchgeführt. Alle PCR-Amplifikationen wurden mit 30 bis 40 Zyklen durchgeführt, wobei β-Aktin als Kontrolle für die Quantifikation verwendet wurde. Die weiteren Analysen erfolgten mittels Gelelektrophorese (2.11.2)

2.11.3.5 Quantitative real time PCR

Die real time (RT) -PCR erlaubt eine quantitative Echtzeitanalyse der PCR-Produkte über die Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen. Hierzu wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®]-Green genutzt, der in doppelsträngige DNA interkaliert. SYBR[®]-Green kann an die neue doppelsträngige DNA in einem Probenansatz binden. Durch diese Bindung ändert der Farbstoff seine Konformation so dass Fluoreszenz freigesetzt wird. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zu der Menge des spezifischen PCR-Produktes.

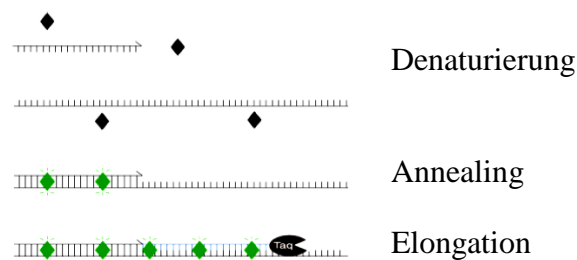


Abbildung 2.11.3.5: Schematische Darstellung einer RT-PCR mit dem SYBR[®] Green I Farbstoff. Der SYBR Green[®]-Farbstoff (schwarze Rauten) beginnt zu fluoreszieren (grüne Rauten), wenn er an doppelsträngige DNA bindet. (Homepage der Firma Invitrogen)

Nach jedem PCR-Zyklus wird mittels lasergesteuerter Analyse die Menge an doppelsträngiger DNA mit interkaliertem SYBR-Green[®] gemessen. Die Zyklenanzahl, bei der das gemessene Fluoreszenzsignal einen vorgegebenen Schwellenwert übersteigt ergibt den Ct-Wert (*engl.*: Threshold cycle). Für die relative Quantifizierung der Transkriptmenge wird der Ct-Wert der Proben durch einen Abgleich mit dem Ct-Wert eines Kontrolltranskripts normalisiert. Vor der Durchführung einer RT-PCR wurden die Primer und die Amplifikationsbedingungen mittels einer konventionellen RT-PCR etabliert.

Die real time PCR zur Quantifizierung von Genexpressionen in Zellen wurde mit Hilfe des Stratagene Mx 3000P[™] PCR System (La Jolla; USA) durchgeführt.

Für die Quantifizierung der Genexpression wurden die Zellen zu einem definierten Zeitpunkt geerntet. Die gesamte zelluläre RNA wurde extrahiert (2.4.3.2), reverse transkribiert (2.4.3.3) und die erhaltene cDNA in der real time RT-PCR eingesetzt. Die Reaktionen wurden in Triplikaten entsprechend den Vorgaben des Herstellers durchgeführt (Absolute 2X QPCR syber green mix; Abgene). Rox wurde als Referenzfarbstoff verwendet (Abgene). 15 µl des SYBR-Green Master-Mixes, 5 µl 1/10 verdünnte *first strand* cDNA und 100 nM genspezifische *forward* und *reverse* Primer wurden in einem Gesamtvolumen von 25µl eingesetzt. 40 PCR-Zyklen mit 30 Sekunden Denaturierung bei 95°C, 30 Sekunden Annealing bei der entsprechenden Temperatur und 30 Sekunden Elongation bei 72°C wurden durchgeführt.

Die Quantifikation erfolgte durch Normalisierung der Genexpression mit der Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

2.11.3.6 PCR Primer

Name		Sequenz	Annealing Temperatur [°C]	Fragmentgröße [bp]
β-Aktin	Sense	5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3'	58	286
	Antisense	5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG-3'		
Ephrin A5	Sense	5'-GGGGTGCAGAGTTTGTCTTTA-3'	58	286
	Antisense	5'-CATCCAGAGCACCAGAAACA-3'		
Ephrin B2	Sense	5'-TCCGTGTGGAGTACTGCTG-3'	59	308
	Antisense	5'-TCTGGTTTGGCACAGTTGAG-3'		
Ephrin B3	Sense	5'-CTGAAATGCCCATGGAAAGA-3'	62	181
	Antisense	5'-ACGCCAGCAAGAGCAGCGC-3'		
EphB2	Sense	5'-CACCAAGACCTTCCCCAACT-3'	56	436
	Antisense	5'-GACGGTGCCATTCTCAACGG-3'		
GAPDH	Sense	5'-CCCCTCCTCCACCTTTGAC-3'	55	210
	Antisense	5'-CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA-3'		
MMP-7 human	Sense	5'-TCAGACTTACCTCGGATCGT-3'	62	258
	Antisense	5'-GTGAGCATCTCCTCCGAGACCTGT-3'		
MMP-7 murin	Sense	5'-TGGAGTGCCAGATGTTGCAG-3'	54	520
	Antisense	5'-GACGGTGCCATTCTCAACGG-3'		

Tabelle 2.11.3.6: Verwendete PCR Primer. Aufgelistet sind der Name, die Sequenz und die Annealingtemperatur der verwendeten Primer sowie die Fragmentgröße des synthetisierten PCR- Produktes.

2.12 Protein-Biochemische und Immunologische Methoden

2.12.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Durch die Methode von Bradford (Bradford, 1976) ist es möglich Proteinkonzentrationen mit einfachem, quantifizierbarem Farbnachweis im Photometer bei 595 nm Wellenlänge zu bestimmen.

Für jeden Ansatz wurde das Bradfordreagenz (5 fach, Roti[®]-NanoquantTM, Roth GmbH & Co., Karlsruhe) frisch 1:5 (v/v) verdünnt. Die Probe wurde in 1:50 (v/v) mit H₂O verdünnt und 200 µl dieser Verdünnung für die Messung in eine Vertiefung einer 96-Lochplatte pipettiert. Zum Starten der Reaktion wurden 800 µl des verdünnten Bradfordreagenz zum Ansatz gegeben. Nach 10 Minuten Inkubation bei RT wurden die Ansätze bei OD₅₉₀ und bei OD₄₅₀ gemessen. Der Quotient OD₅₉₀/OD₄₅₀ wurde berechnet und in die Gleichung der Kalibriergeraden eingesetzt. Die Quantifizierung der Proteinmenge erfolgte durch einen direkten Vergleich der erstellten Kalibriergeraden und den ermittelten Werten der Proben.

2.12.2 Westernblot

2.12.2.1 Westernblot-Lösungen

- 50x Proteaseinhibitor-Lösung (Roche)
- Benzonase (Roche)

Probenpuffer (zweifach)

- 120 mM Tris-HCL pH 6.8
- 10% Glycerin
- 4% Meraptoethanol
- 0,02% Bromphenolblau
- in deionisiertem H₂O

Laufpuffer (10-fach Laemlipuffer)

- 30,25 g Tris
- 144 g Glycin
- 10 g SDS
- mit deionisiertem H₂O auf 1 Liter Endvolumen auffüllen.

Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele

Reagenzien	Trenngele			Sammelgele	Volumen
	8%	10%	12%	4%	
30% Acrylamide	10,8	13,3	15,5	3,0	mL
1.8 M Tris-HCl (pH-8.8)	8,0	8,0	8,0	4,0	mL
dest. H ₂ O	20,6	18,1	15,9	12,7	mL
10% SDS	400	400	400	200	μL
10% APS	200	200	200	75	μL
TEMED	8,0	8,0	8,0	10,0	μL

Tabelle 2.12.2.1: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für jeweils vier Gele

2.12.2.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes lassen sich Proteine in Polyacrylamid-Gelen gemäß ihrer Nettoladung und ihres Molekulargewichts auftrennen. Die Zugabe des anionischen Detergenz SDS führt zur Bildung negativ geladener SDS-Komplexe mit konstantem Ladungs- zu Masseverhältnis. SDS denaturiert die Proteine zudem und verhindert Protein-zu-Protein-Wechselwirkungen. Die SDS-Protein-Komplexe verschiedener Proteine unterscheiden sich somit nur in ihrer Größe und werden in der porösen Gelmatrix durch den

Molekularsiebeffekt gemäß ihres Stokes-Radius und damit ihres Molekulargewichts aufgetrennt.

Für die SDS-PAGE wurden die Proteine mit dem anionischen Detergenz SDS behandelt. Der Puffer enthielt 10% β -Mercaptoethanol zur reduktiven Spaltung von Disulfid-Brücken. Durch Erhitzen auf 99°C wurden die Proteine vollständig denaturiert, bevor sie anhand der Molekularmasse ihrer Polypeptidketten durch eine Gelelektrophorese getrennt wurden. Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte nach einer modifizierten Form des diskontinuierlichen Puffersystems von Laemmli (Laemmli, 1970). Für diese Arbeit wurden Polyacrylamidgele mit einer Konzentration von 8%, 10% oder 12% verwendet.

2.12.2.3 Vorbereitung der Proben für Westernblots

Für die Westernblots wurden 293EcR-MMP-7 Zellen für 72 Stunden mit 2 μ g PonA inkubiert, um so die Expression und Sekretion von MMP-7 zu induzieren. Kontrollzellen wurden mit 2 μ l Ethanol (100%) pro Milliliter Kulturmedium behandelt. DCs und T-Zellen wurden mit 200 ng/nl rekombinatem MMP-7 für mindestens zwei Stunden behandelt.

Jeweils 1×10^6 Zellen wurden durch Zentrifugation (300g, 10 Minuten, 20°C) pelletiert und einmal mit PBS gewaschen. Adhärente Zellen wurden vorher mit Trypsin vom Boden der Zellkultur gelöst. Die gewaschenen Zellen wurden in 100μ l/ 10^6 Zellen in Lysepuffer aufgenommen (1% NP40 in PBS mit Proteasinh inhibitor: Complete, Roche) und sofort für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Durch die Scherkräfte nach mehrmaligen Auf- und Abpipettieren wurde die Lyse der Zellen begünstigt. Das Lysat wurde dann mit 16000 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert, um die Zellbruchstücke abzutrennen. Der Überstand wurde in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt und die Proteinkonzentration der Lösung ermittelt. Die Lösung wurde mit der gleichen Menge 2x Ladepuffer vermischt, für 5 Minuten auf 99°C erhitzt und dann auf Eis gestellt. Die Proben wurden danach vorsichtig in die Taschen eines SDS-Polyacrylamidgel (10%) pipettiert und anschließend in einem elektrophoretisch Feld aufgetrennt. Die Beladung der SDS-Geltaschen mit gleicher Proteinmenge, wurde mit einer spezifischen Aktin-Immunfärbung kontrolliert. Als Referenz wurde ein Standardproteinmarker auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur und einer Spannung von 20 mA/Gel (Sammelgel) bzw. 30 mA/Gel (Trenngel) in einer Minigel-Kammer durchgeführt.

2.12.2.4 Blotten

Transferpuffer (einfach)

- 3,35 g Tris
- 14,4 g Glycerin
- 200 ml Methanol 100%
- mit deionisiertem H₂O auf 1 Liter Endvolumen auffüllen.

Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel für 5 Minuten in Tris-Glycerin-Puffer inkubiert, die PVDF-Membran (Millipore) wurde zur Aktivierung einige Sekunden lang mit 100% Methanol befeuchtet und in Transferpuffer eingelegt. Zwischen zwei puffergetränkte Schwämme wurden daraufhin Filterpapier, Gel, Membran und wieder Filterpapier luftblasenfrei aufeinander geschichtet. Dieses Sandwich wurde dann in der mit 800 ml Transferpuffer befüllten Blot-Apparatur (Biorad) fixiert und der Transfer durch Anlegen einer Spannung von 300 V (80 mA) für 90 Minuten unter Kühlung und kontinuierlichem Rühren durchgeführt.

2.12.2.5 Immunnachweis von Proteinen im Westernblot

Blocklösung

- 1 g I-Block Reagenz
- 500 µl Tween 20
- 500 ml PBS

Assaypuffer

- 10,6 g Diethanolamin
- 0,2 M MgCl
- 900 µl deionisiertes H₂O
- pH 9,5 mit HCL (1M) einstellen
- mit deionisiertem H₂O auf 1 Liter Endvolumen auffüllen.

Waschpuffer

- PBS mit 0.1% Tween 20

CDP-Star detection system

- Nitroblock: 1:200 in Assaypuffer
- CPD-Star: 1:1000 in Assaypuffer

Nach dem Blotten wurde die PVDF-Membran fünf Minuten in Waschpuffer gewaschen und eine Stunde in Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

Nach dem Waschen der abgesättigten Membran erfolgte die Inkubation mit dem in Blockpuffer vorverdünnten, primären Antikörpern über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln. Durch anschließendes dreimaliges Waschen für jeweils fünf Minuten wurden nicht spezifisch gebundene Antikörper entfernt. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation der

Membran mit der verdünnten Lösung des sekundären Antikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran wieder dreimal gewaschen und anschließend zweimal in Assaypuffer gewaschen (jeweils für zehn Minuten).

Zuletzt wurde die PVDF-Membran für zehn Minuten in verdünnter Nitroblocklösung inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit der verdünnten CDP-Star-Lösung (5 min). Die Membran wurde vorsichtig in eine Mappe aus Transparentfolie eingelegt und in eine Autoradiographybox überführt. Anschließend wurde für die jeweils notwendige Belichtungszeit ein Film aufgelegt, der maschinell entwickelt wurde.

2.13 Rac- und Cdc42-Aktivitätsbestimmung

Der Anteil von aktivem Rac und Cdc42 im Zelllysate von MMP-7 induzierten Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen oder MMP-7 behandelten dendritischer Zellen wurde unter Verwendung des Rac/Cdc42 Activation Assay Combo Kit (Cell Biolabs) ermittelt. Dieser Assay entspricht dem Prinzip einer Immunpräzipitation und nutzt die Eigenschaft, dass die aktive, GTP gebundene Form von Cdc42 und Rac spezifisch an die p21-Bindedomäne (PBD) der p21 aktivierenden Kinase 1 (Pak1) bindet. GDP gebundenes, nicht aktiviertes Rac oder Cdc42 bindet hingegen nicht an diese p21-Bindedomäne. Für die Bindung von aktivem Rac und Cdc42 wird in diesem Kit eine mit Glutathion-S-Transferase (GST) verbundene PBD von humanem Pak1 verwendet. GST ist in der Lage spezifisch an die, in diesem Assay verwendeten, Glutathion Sepharose Beads zu binden, um so aktives Cdc42 oder Rac selektiv aus dem Zelllysate zu präzipitieren und später durch Verwendung eines spezifischen Rac oder Cdc42 zu detektieren.

Die Durchführung der Rac- oder Cdc42-Aktivitätsbestimmung erfolgte nach Herstellerangaben. Hiefür wurden Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen oder primäre, humane, dendritische Zellen mit EphrinA5 und oder MMP-7 behandelt bzw. wurde die MMP-7 Expression induziert. Unbehandelte bzw. nicht induzierte Zellen wurden als Kontrollen verwendet. Die Zellen wurden in Zentrifugenröhrchen überführt und mit TBS gewaschen. Nach einer Zentrifugation (300 g, 5 Minuten, 20°C) wurde das Zellpellet in Lysepuffer gelöst und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Der Überstand des Zelllysats wurde nach einem Zentrifugationsschritt (14000 g, 15 Minuten 4°C) gesammelt und dessen Proteinkonzentration bestimmt. Die Menge an verwendetem Zelllysate wurde der jeweiligen Proteinkonzentration

angepasst. Es wurden Proben mit der Gesamtproteinkonzentration von 1 mg mit 20 µl PBD Pak1 Glutathion Sepharose Beads vermischt und eine Stunde bei 4°C schüttelnd inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Beads dreimal mit Waschpuffer gewaschen und zuletzt in 50µl 2x SDS Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden dann für 10 Minuten bei 99°C erhitzt anschließend auf Eis abgekühlt und auf 12 % SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Danach erfolgte eine Westernblotanalyse wie in 2.12.2.5 beschrieben. Proben der Lysate ohne nachfolgende Immunpräzipitation wurden als Kontrolle mitgeführt, um den Gehalt des gesamten Rac oder Cdc42 im Zelllysate zu ermitteln.

2.14 MMP-7 Sekretionsbestimmung

Für die Bestimmung der MMP-7 Sekretion von Zellen wurde das Quantikine® Human MMP-7 Immunoassay Kit (RnD Systems) nach Herstellerangaben angewendet. Dieser Assay basiert auf dem Prinzip eines Sandwich-ELISA. MMP-7 in Zellüberständen bindet an die Oberfläche einer mit MMP-7 spezifischen, monoklonalen Antikörpern beschichteten 96-Lochplatte. Nach dem Entfernen der ungebundenen Substanzen wird ein polyklonaler MMP-7 spezifischer und enzymmarkierter Antikörper (HRP konjugierter MMP-7 Antikörper) in die Vertiefungen der Platte gegeben. Nach einem weiteren Waschschrift findet nach Zugabe eines HRP-Substrats eine Farbreaktion in den Vertiefungen statt. Die Intensität der Farbreaktion wird durch Absorptionsmessung bei 450 nm ermittelt. Sie ist proportional zu dem gebundenen MMP-7 in der Vertiefung und erlaubt so Rückschlüsse auf die MMP-7 Konzentrationen der Zellüberstände.

Für die MMP-7 Sekretionsbestimmung wurden je 50 µl Zellüberstände von unbehandelten oder behandelten Zellen der Hek 293 EcR-MMP-7 Zelllinie oder von dendritischen Zellen verwendet. Zellkulturmedium diente der Ermittlung der Hintergrundaktivität. Zur Quantifizierung der MMP-7 Sekretion wurden die Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen mit 2 µM Ponasteron A (PonA) im Medium inkubiert und nach verschiedenen Zeitpunkten (0, 24, 48 und 72 Stunden) Proben vom Zellüberstand genommen. Das verwendete Ponasteron wurde in Ethanol (100%) gelöst (1M/ml), daher wurde als negative Kontrolle der MMP-7 Induktion, die Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen mit 100 prozentigen Ethanol behandelt (2 µl/ml).

Die MMP-7 Konzentrationsmessung im Überstand der Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen oder DCs wurde mit dem MMP-7 Quantikine ELISA Kit (RnD Systems) nach Herstellerangaben

durchgeführt. Durch eine Standardkurve von Proben mit bekannten Konzentrationen an rekombinantem MMP-7 wurden die Konzentrationen der Zellüberstände kalkuliert.

2.14 Ras-Aktivitätsbestimmung

Der Anteil von aktivem Ras in Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen wurde mit dem Ras-GTPase Chemi ELISA Kit (Active Motif) ermittelt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Dieser Assay basiert wie der MMP-7 Assay auf dem Prinzip eines Sandwich-ELISA. Die aktive, GTP gebundene Form der Ras-GTPasen aus Zelllysaten bindet an die mit Ras Bindungsdomäne (RBD) von Raf1 beschichtete Oberfläche einer 96 Lochplatte. Nach Inkubation mit einem Ras spezifischen Primärantikörper und einem HRP-konjugiertem Zweitantikörper findet nach Zugabe einer Substratlösung eine Chemilumineszenzreaktion statt. Die Intensität der Chemilumineszenz ist direkt proportional zu dem gebundenen aktiven Ras und wird in einem Luminometer gemessen.

Für diesen Assay wurden Zelllysate von nicht induzierten und induzierten Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen verwendet. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate wurden die Menge der verwendeten Lysate an die Proteinkonzentration angepasst. Als Positivkontrolle wurde das im Kit enthaltene HeLa- Zellextrakt verwendet.

2.15. Durchflusszytometrie (FACS)

Granularität und immunologischer Phänotyp von Zellen in Suspension können durch ihre Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften mit der FACS-Methode (*engl.*: Fluorescence Activated Cell Sorter) bestimmt werden. Die Zellsuspension wird durch eine Kapillare mit Überdruck in den Messbereich gesogen. Die Beschleunigung des Zellflusses bewirkt eine einzelne Hintereinanderreihung der Zellen. Im Messbereich kommt es durch Wechselwirkung der Zelle mit dem einfallenden Laserstrahl (Argonlaser, Wellenlänge 488 nm) zur Lichtstreuung. Diesen Vorgang bezeichnet man als hydrodynamische Fokussierung. Strukturen der Zellmembran und intrazelluläre Bestandteile werden durch die Richtungsveränderung des Lichtstrahls identifiziert, die von Photodetektoren wahrgenommen werden können.

Zur Vermessung werden zwei Parameter herangezogen:

- Vorwärtsstreulicht (*engl.*: Forward scatter = FSC) entlang des einfallenden Lichtstrahls als Maß für die Zellgröße und
- Seitwärtsstreulicht (*engl.*: Side scatter = SSC) im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl als Maß für die intrazelluläre Granularität.

Durch die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Reagenzien ist es möglich Zelloberflächenmoleküle, intrazelluläre Proteinen oder die Endozytoserate einer Einzelzellsuspension zu quantifizieren. Dabei absorbieren die Farbstoffe Lichtenergie des Messlasers. Die absorbierte Energie hebt Elektronen auf ein höheres Energieniveau. Beim Rücksprung auf das Ausgangsniveau emittieren die Elektronen ein Photon. Die Fluoreszenzenergie des Photons ist geringer, als die Absorptionsenergie und das abgestrahlte Licht ist langwelliger als das anregende Licht. Die Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zur Anzahl der Bindungsstellen oder Aufnahme rate einer Zelle, die mit Farbstoff gekoppeltem Reagenz (z.B. Antikörper) behandelt wurde.

Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden verwendet:

- Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Emissionsmaximum bei 520 nm
- Alexafluor 488 (Alexa 488), Emissionsmaximum bei 519 nm

Durch die Messung von Lichtstreuung und Fluoreszenz und die Umwandlung der Signale in elektrische Impulse konnten die Daten mit einem speziellen Mess- und Bearbeitungsprogramm ausgewertet werden. Durch das Setzen von Gates konnten einzelne Zellsubpopulationen abgegrenzt und genauer analysiert werden. Die Ergebnisse wurden meistens in Form eines Histogramms dargestellt. Die X-Achse der Histogramme zeigt die Fluoreszenzintensität, während die Y-Achse die Anzahl der Zellen innerhalb der Parameter abbildet.

Für die Durchflusszytometrie wurde folgendes System benutzt:

- Messeinheit: FACS Calibur von Becton Dickinson, besitzt vier Fluoreszenzkanäle.
- Computer von Apple (Macintosh).
- Auswertungsprogramm CellQuestPro (Becton Dickinson)

Benötigte Lösungen für FACS Untersuchungen und Immunfluoreszenzfärbungen

Blockpuffer

- 3% BSA
- 10 mM EDTA
- 0,1 % Tween 20
- gelöst in PBS
- steril filtriert

Permeabelisierungspuffer

- 10 mM EDTA
- 0,1 % Saponin
- gelöst in PBS

Fixierungslösung:

1. Methanol und Aceton im Verhältnis 1:1 (v:v)
oder
2. 2% PFA gelöst in PBS

Saurer Waschpuffer

- 0,5 M Natrium Chlorid
- 0,2 M Essigsäure
- gelöst in PBS

und PBS

2.15.1 Immunfluoreszenzfärbung von Membranproteinen

Um die Expression von Oberflächenmolekülen auf einer Zelle zu überprüfen, wurden diese mit einem antigenspezifischen Antikörper gefärbt. Dazu wurde entweder ein spezifischer, fluoreszenzmarkierter Antikörper eingesetzt oder der spezifische Antikörper wurde, mittels eines fluoreszenzmarkierter Zweitantikörpers, der gegen ein Epitop des Erstantikörpers gerichtet war, nachgewiesen. Die Färbung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Adhärente Zellen wurden abtrypsiniert, während Suspensionszellen in ihrem Medium abgenommen und anschließend zentrifugiert wurden (300 g, 5 Minuten, 20°C). Danach wurden alle Zellen mit PBS gewaschen und für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 100 µl des primären Antikörpers, verdünnt in Blockpuffer, inkubiert. Bei den nicht direkt fluoreszenzmarkierten Antikörpern erfolgte, nach dem Waschen der Zellen in Blockpuffer, die Inkubation mit 100 µl des verdünnten sekundären Antikörpers für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Vor der Analyse im FACS-Calibur wurden die Zellen ein weiteres Mal gewaschen und in 400 µl PFA-Fixierungspuffer aufgenommen.

2.15.1.1 Clathrin- und EphB2-Färbung

Für die Clathrin- und EphB2-Färbung wurden die für die FACS Analyse verwendeten Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS für eine Minute mit Methanol/Aceton- Fixierungslösung (-20°C) inkubiert, um so eine intrazelluläre Färbung zu ermöglichen. Nach einem Waschschrift folgte eine Inkubation mit 100 µl/Probe vorverdünnter Primärantikörperlösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Der Clathrinantikörper wurde im Verhältnis 1:100- der EphB2-Antikörper 1:50 (je v:v) in Blocklösung vorverdünnt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 100 µl Alexa-Fluor 488 Esel anti Ziege Sekundärantikörper (1:200 vorverdünnt in Blocklösung; v:v) aufgenommen und 15 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Nach einmaligem Waschen wurden die Zellen in 2% PFA in PBS aufgenommen und im FACS-Calibur analysiert.

2.15.2 F-Aktinfärbung

Für die F-Aktinfärbung wurden 1×10^6 Zellen mit Alexa-Fluor-488 konjugierten Phalloidin intrazellulär gefärbt. Zur Induktion der MMP-7 Expression wurde ein Teil der Hek 293 EcR-MMP-7 Zelle vor der Färbung für mindestens 72 Stunden mit 2 µg PonA inkubiert, der weitere Teil der Zellen wurde als Kontrolle mit 2 µl/ml Ethanol (100%) inkubiert. Die DC oder T-Zellen wurden vor der Färbung für mindestens zwei Stunden mit rekombinantem MMP-7 behandelt (200 ng/ml). Für die Färbung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 2% Paraformaldehydlösung bei Raumtemperatur fixiert und anschließend mit dem Detergenz Saponin permeabilisiert. Für die spezifische Färbung von polymerisiertem Aktin (F-Aktin) erfolgte eine Inkubation der Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in 2% PFA in PBS aufgenommen. Die Fluoreszenzmessung der Proben erfolgte anschließend mit der FACS-Methode. Als Negativkontrolle der Färbung wurden Zellen ohne Phalloidinbehandlung gemessen.

2.15.3 Endozytoseaktivitätsmessung

Um die Kapazität von MMP-7- oder Ephrin-behandelten Zellen in Bezug auf die Aufnahme von Antigenen über Endozytose zu vergleichen, wurden fluorochrommarkierte Tracer (Dextran- FITC 40 kDa und Transferrin- FITC) verwendet.

Die Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen wurden vor der Ausführung für mindestens 72 Stunden mit 2 µg PonA inkubiert. Die Kontrollzellen wurden nur mit 2 µl/ml Ethanol (100%) behandelt. Zur Untersuchung der Endozytoseaktivität wurden die Zellen zuerst auf Eis inkubiert, um die endozytotischen Aktivitäten erst einmal zu stoppen. Anschließend wurden die Zellen mit 20 µg/ml Dextran-FITC oder 10 µg/ml Transferrin-FITC (beide Invitrogen) versetzt und anschließend bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Aufnahme von Transferrin oder Dextran wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch die Zugabe von kaltem, saurem Waschpuffer (4 °C) und anschließender 20 minütiger Inkubation auf Eis unterbrochen. Danach wurden die Zellen noch zweimal mit saurem Waschpuffer gewaschen, um die nicht endozytierten Partikel von der Zelloberfläche zu lösen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in PFA-Fixierungspuffer aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert.

2.16 Immunfluoreszenzfärbung für Laserscanmikroskopie

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung wurde die Expression von Oberflächenrezeptoren oder die intrazelluläre Aktinpolymerisation von Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen und humanen dendritischen Zellen überprüft. Die Zellen wurden auf eine Zelldichte von 10^5 Zellen/ml Medium eingestellt. Anschließend wurden jeweils 500 µl pro Kammer dieser Zellsuspension in kollagenbeschichteten 4-Kammer-Objektträgern ausgesät. Um ein Anwachsen der Zellen auf dem Objektträger zu erreichen wurden die Objektträger jeweils für drei bis vier Stunden oder über Nacht im Inkubationsschrank bei 37°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Objektträger mit PBS gespült und die Zellen entweder für 15 Minuten mit 2% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur oder für eine Minute mit Methanol/Aceton (1:1; v:v, -20°C) fixiert und anschließend mit PBS gewaschen.

Für die intrazelluläre Aktinfärbung erfolgte eine Permeabilisierung der Zellmembran mit dem Detergenz Saponin (Sigma-Aldrich). Die Permeabilisierung ermöglicht den Durchtritt von Phalloidin und somit die intrazelluläre Färbung von F-Aktin.

Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit 200 µl des in Waschpuffer verdünnten, Primärantikörpers oder mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen mit 200 µl des in Waschpuffer verdünnten, sekundären Antikörpers für eine Stunde Raumtemperatur inkubiert. Nach 30 Minuten erfolgte die Zugabe des Kernfarbstoffs Hoechst 33342 in einer Verdünnung von 1:10000 (v:v). Für die Aktinpolymerfärbung erfolgte nur eine Inkubation mit vorverdünntem Kernfarbstoff Hoechst 33342 für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach kurzem Waschen wurden die aufgesetzten Kammern vom Objektträger entfernt. Die Zellen wurden zur Konservierung mit einigen Tropfen des Eindeckmediums Permafluor (Beckman Coulter) überschichtet, die Objektträger mit einem Deckglas versehen und zum Trocknen über Nacht bei 4°C in Dunkelheit gelagert. Die Auswertung der Färbungen erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laserscanmikroskopes (Zeiss 510-UV, Zeiss).

2.17 Zucht und Haltung von Experimentaltieren

Zucht und Haltung der für Experimente benötigten Mäuse erfolgte in der Zentralen Tierversuchseinrichtung (ZVTE) der Universität Mainz am Augustusplatz, Mainz. Alle Tierversuche wurden gemäß den genehmigten Richtlinien der ZVTE durchgeführt.

Für die Isolation und Generierung von murinen DC und murinen T-Zellen wurden männliche und weibliche Mäuse der Inzuchtstämme Balb/c, C57Bl/6 und der MMP-7-Deletionsmutante (MMP-7^{-/-}) verwendet.

BALB/c

Der MHC-Haplotyp dieses Mausstamms ist H-2Kd.

C57Bl/6

Der MHC-Haplotyp dieses Mausstamms ist H-2Kb.

MMP^{-/-}

MMP-7-Deletionsmutante mit C57Bl/6 Hintergrund. Diese Mäuse wurden vom Jackson Laboratory bezogen. Die MMP-7-Deletionsmutante wurde aus Mäusen des Stammes C57Bl/6

generiert (Wilson et al., 1997). Mit einem 6,5 kB großen BamHI DNA-Fragment aus einer 129/Sv Genbibliothek wurde in MMP-7 Knockoutmäusen ein Zielkonstrukt generiert. Hierzu wurde ein Exon3- und Exon4-überspannendes EcoRV-StuI Fragment (550 bp) durch eine Phosphoglycerat Kinase Neomycin Kasette (PGK-neo) ersetzt. Dieses Konstrukt wurde durch Elektroporation in R1-Stammzellen eingebracht. Schließlich wurden das Zielgen tragende Zellen in C57BL/6 Blastozysten injiziert (Kure et al., 2003).

Der MHC-Haplotyp dieser Mäuse ist H-2Kb.

2.18 Genotypisierung der MMP-7-Deletionsmutanten

Tail (Mausschwanz)-Puffer

- 100 mM Tris
- 1g KHCO₃
- 0,0372g EDTA
- mit deionisiertem H₂O auf 100 ml Endvolumen aufgefüllt.

Zur Genotypisierung der Mäuse wurden ca. 5 mm der Schwanzspitze entfernt und in 200 µl Tail-Puffer, versetzt mit 88 µg Proteinase K, über Nacht bei 55°C verdaut.

Das so gewonnene Lysat wurde zur Inaktivierung der Proteinase K für 10 Minuten auf 95°C erhitzt. Durch eine nachfolgende Zentrifugation (16.000g für 5 min) wurden die gelöste DNA von den restlichen Gewebefragmenten getrennt. Mit dem Überstand wurde eine PCR durchgeführt.

2.18.1 Primer zur Genotypisierung

Zur Genotypisierung der Wildtyp und MMP-7 ^{-/-} Mäuse wurden folgende Primer verwendet:

Primer für MMP7 Wildtyp

5'-TCAGACTTACCTCGGATCGT-3' (liegt im Exon 3) und

5'-GTCCTCACCATCAGTCCAG-3' (liegt in Exon 4),

Fragmentlänge: 700 bp

Primer für MMP-7 Deletionsmutante:

5'-TTGAGCCTGGCGAACAGT-3' und

5'-TGGATTGCACGCAGGTTC-3' (liegen beide in der PGK-neo Kasette)

Fragmentlänge: 500 bp

2.18.2 PCR für Genotypisierung

Für die PCR der Wildtypmäuse und der MMP-7-Knockoutmäuse wurde zum Nachweis des Wildtyp-Allels und des Mutanten-Allels die oben beschriebene Primerkombination verwendet.

PCR-Ansatz der Taq-Polymerase:

2µl	Taq-Puffer (10-fach)
1µl	Template (Überstand aus Gewebelysat)
0,5µl	dNTPs (10 nM)
0,5µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
0,5µl	je Primer (0,2µM)
5µl	H ₂ O
Σ 20 µl	Gesamtvolumen

Folgendes Temperaturprofil wurde für die PCR verwendet:

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Zyklenanzahl
Anfangsdenaturierung	95	190	1
Denaturierung	95	45	30-40
Annealing	57	45	
Elongation	68	45	
Abschlusselongation	68	120	1
Verweilzeit	12	∞	1

Tabelle 2.18.2 Temperaturprofil der PCR zur Genotypisierung

15 Mikroliter der jeweiligen PCR-Produkte wurden anschließend auf ein Agarosegel (1%, versetzt mit 4µg/ml Ethidiumbromid in TE-Puffer) aufgetragen. Als Basenleiter wurden 2 µl Mass-Ruler-DNA-Ladder-Marker (1µg/µl DNA) verwendet. Das Gel lief bei 120V für 40 Minuten. Anschließend wurde es unter UV-Licht (254nm) sichtbar gemacht und fotografiert.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von MMP-7 auf die Immunantwort gegen Tumore

Die Funktion und der Einfluss von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) auf eine Vielzahl von physiologischen Prozessen war und ist der Gegenstand vieler Untersuchungen. Ausgehend von ihrer degradierenden Wirkung auf die extrazelluläre Matrix (EZM), weiß man heute, dass MMPs auch in der Lage sind viele nicht EZM-Proteine als Substrate zu erkennen und zu spalten (McCawley and Matrisian, 2001).

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem physiologischen Einfluss von MMP-7 auf MMP-7-überexprimierende Hek 293-Zellen und der möglichen Ursache für immunmodulierende Veränderungen. Ausgangshypothese dieser Arbeit war, dass MMP-7 über einen noch nicht bekannten Signalweg die Endozytoseaktivität von Zellen beeinflussen kann. Eine MMP-7-bedingte Reduktion der Endozytoseaktivität könnten durch veränderte Antigenaufnahme und Antigenpräsentation die Immunantwort gegen MMP-7 exprimierende Tumorzellen modulieren.

Vorangegangene Untersuchung im Labor von Dr. Susanne Strand haben gezeigt, dass die Inkubation von Zellen mit MMP-7 zu einer Reduktion des Clathrin nachweises führt. Weitere Untersuchungen zeigten allerdings, dass Clathrin kein direktes Substrat von MMP-7 ist (Doktorarbeit von Vijay Alla, 2007).

Clathrin spielt als Bestandteil der Clathrin-umhüllten Vesikel eine wichtige Rolle bei der rezeptorvermittelten Endozytose (siehe 1.4.1.). Daher konzentrierten sich die Untersuchungen dieser Arbeit auf diese zelluläre Funktion und deren mögliche Veränderung durch MMP-7.

3.1.1 Analyse der MMP-7 Expression von transfizierten Hek 293 Zellen

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden die Zellen eines Hek 293 EcR-MMP-7 Zellklons verwendet. Dieser Zellklon wurde durch stabile Transfektion von Hek 293 EcR Zellen mit dem rekombinanten Plasmid pIND-MMP-7 erzeugt. Durch Behandlung mit dem Ecdysonanalogon Ponasteron A kann in diesen Zellen die Expression und Sekretion von MMP-7 induziert werden. Die MMP-7 Konzentrationsmessung im

Überstand der Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen wurde mit dem MMP-7 Quantikine ELISA Kit (RnD Systems) nach Herstellerangaben durchgeführt.

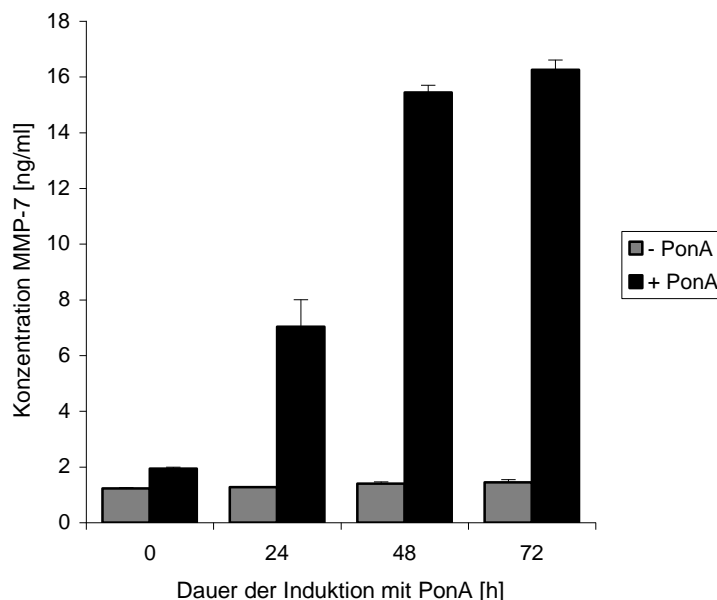


Abbildung 3.1.1: Zeitabhängige MMP-7 Sekretion von Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen nach PonA Inkubation. Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen wurden mit 2 μ M PonA inkubiert (+ PonA). Als negative Kontrolle der Induktion wurden Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen mit 2 μ l/ml EtOH inkubiert (- PonA). Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde je 50 μ l Überstand aus der Zellkultur entnommen. Die MMP-7 Konzentrationen der Proben wurden mit einem MMP-7 spezifischen ELISA-Test gemessen und mit den Daten einer Standardkurve quantifiziert.

Wie in Abbildung 3.1.1 gezeigt nimmt die Konzentration von MMP-7 im Zellüberstand der mit PonA inkubierten Zellen während des gemessenen Zeitraums stetig zu. Schon nach 24 Stunden konnte ein MMP-7 Konzentration von 7,03 ng/ml gemessen werden. In den folgenden Tagen konnten noch höhere Werte für die MMP-7 Konzentration ermittelt werden. Nach 72 Stunden war nur noch ein leichter Anstieg der MMP-7 Konzentration messbar. Im Vergleich dazu, konnte für die Ethanol behandelten Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen kein signifikanter Anstieg der MMP-7 Konzentration im Zellüberstand beobachtet werden. Die Messdaten indizieren, dass eine Inkubation von Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen zu einer MMP-7 Expression und Sekretion führte. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden für die folgenden Versuchen Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen verwendet, welche mindestens 72 Stunden mit PonA inkubiert wurden.

3.1.2 Einfluss von MMP-7 auf Clathrin

Um den Einfluss der induzierten MMP-7 Expression auf Clathrin in Hek 293 EcR MMP-7 Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen für mindestens 72 Stunden mit $2\mu\text{g}$ PonA inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit einem anti-human-Clathrinantikörper gefärbt. Die Analyse der Färbungen erfolgte durchflusszytometrisch. Zusätzlich wurden die gefärbten Zellen unter dem konfokalen Laserscannmikroskop betrachtet. Dafür wurden die Zellen auf einen Achtammer-Objektträger übertragen. Die Zellen wurden unter denselben Bedingungen behandelt und gefärbt.

A

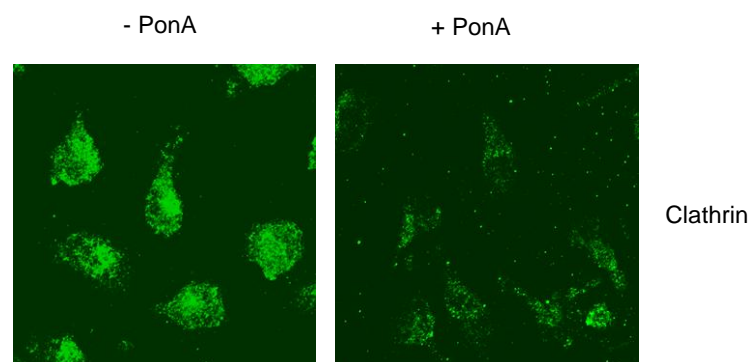
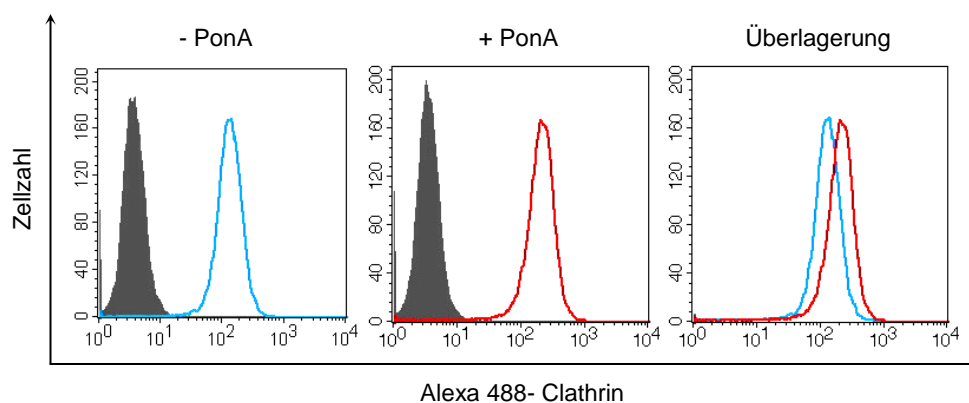


Abbildung 3.1.2: Analyse der Clathrinfärbung in Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen. (A) Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse: Jeweils 1×10^6 PonA ($2\mu\text{M}/72\text{h}$) behandelte Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen und Kontrollzellen wurden mit einem Clathrin spezifischen Antikörper und einem Alexa-Fluor-488-konjugierten Zweitantikörper gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. In den Histogrammen sind die Messergebnisse der unbehandelten Zellen blau dargestellt. Die Histogramme in rot zeigen die Messergebnisse der Pon-inkubierten Zellen. Die Daten der Zellen, die nur mit dem Zweitantikörper gefärbt wurden sind grau unterlegt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Färbungen wurden die Messdaten der Zellen zusätzlich überlagernd dargestellt. (B) Laserscannmikroskopische Aufnahmen der Clathrinfärbung von Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen: Die Zellen wurden mit $2\mu\text{M}$ PonA (+PonA) behandelt. Die Kontrollzellen wurden mit $2\mu\text{l/ml}$ Ethanol (100%) behandelt. Die Zellen wurden nach 72 Stunden mit einem Clathrin spezifischen Antikörper und einem Alexa-Fluor-488 konjugierten Zweitantikörper gefärbt. Die Clathrinfärbung ist grün dargestellt.

Die in Histogrammen dargestellten Messdaten (A), der gegen Clathrin gefärbten Zellen, zeigten eine Reduktion der Fluoreszenzintensität nach der PonA-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Daten wiesen darauf hin, dass die PonA induzierte MMP-7 Expression zu einer Reduktion des Clathrinlevels in den induzierten Zellen führte. Die Laserscanmikroskopische Untersuchung (B) der gefärbten Zellen bestätigte diese Annahme, auch hier ist nach der PonA-Inkubation eine wesentlich schwächere Clathrinfärbung der Zellen erkennbar.

3.1.3 Einfluss von MMP-7 auf die am Aufbau von Clathrinhüllen beteiligten Adapterproteinen

Am Aufbau von Clathrin-ummantelten Vesikeln sind mehrere Clathrin-bindende Adapterproteine beteiligt, unter anderem das Adapterprotein 2 (AP-2) und das Adapterprotein 180 (AP-180) (Haucke and De Camilli, 1999; Morgan et al., 2000). Sollte eines dieser Proteine ein Substrat von MMP-7 sein, könnte das eine Erklärung für den reduzierten Clathrinnachweis nach MMP-7 Induktion sein. Daher wurde in diesem Versuch die Expression des Adaptermoleküles AP180 und der Proteinkomponenten des Adaptermoleküls 2 (Adaptin alpha, -beta und -gamma) in einem Westernblot analysiert. Die Westernblotanalyse in Abbildung 3.1.3 zeigt die Expression der Adaptermoleküle AP180 und Proteinkomponenten von AP2: Adaptin α , Adaptin β und Adaptin γ , in PonA-behandelten Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen und Ethanol-behandelten Kontrollzellen.

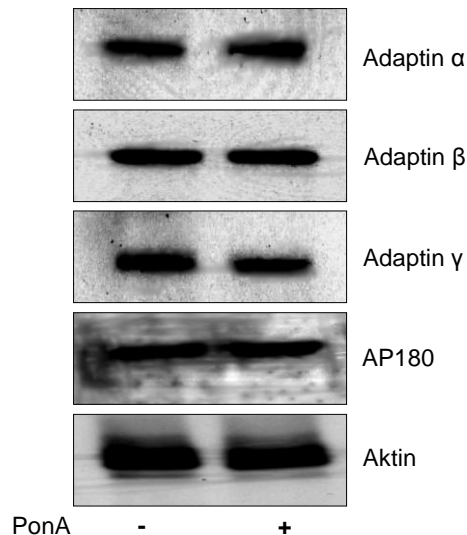


Abbildung 3.1.3: Westernblotanalyse der Expression von Clathrin-bindenden Adapterproteine in Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen. Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen wurden für 72 Stunden mit 2 μ M Ponasteron A inkubiert (PonA +). Kontrollzellen wurden mit 2 μ l/ml Ethanol (100%) behandelt (PonA -). Die Lysate wurden in einem Westernblot analysiert. Verwendet wurden spezifische Antikörper gegen das Clathrinadapterproteine AP-180 sowie die Proteinkomponenten von Adaptermolekül 2: Adaptin α , Adaptin β und Adaptin γ . Die Aktinfärbung diente als Kontrolle der Gelbeladung. Die Banden wurden mit dem Nitro-Block-IITM und CDP-Star[®] Chemilumineszenz-Detektionssystem visualisiert.

Die Resultate der Westernblot-Analyse in Abbildung 3.1.3 zeigten keine veränderte Expression der Clathrin bindenden Adapterproteine nach PonA-Inkubation. Die Proteinbanden der nicht induzierten Zellen (PonA -) zeigten eine vergleichbare Intensität wie die Banden der MMP-7 induzierten Zellen (PonA +). Die Daten der Westernblotanalyse ließen vermuten, dass MMP-7 keine Auswirkungen auf die Expression von AP180, Adaptin α , Adaptin β und Adaptin γ hat.

3.1.4 Veränderung der Endozytose nach MMP-7 Induktion

Vorangegangene Versuche zeigten, dass MMP-7 zu einer Reduktion von Clathrin in den Zellen führte. Eine direkte Einflussnahme von MMP-7 auf die Clathrin assoziierten Adaptermoleküle konnte nicht geklärt werden. Clathrin und die Bildung von Clathrin ummantelnden Vesikeln sind ein wichtiger Mechanismus der rezeptorvermittelnden Endozytose, daher sollte der Einfluss von MMP-7 auf die Endozytose der Hek 293 EcR-MMP-7 untersucht werden. Für eine funktionelle Analyse der Endozytoseaktivität wurden die Zellen einem Transferrinaufnahme-Assay unterzogen. Die Zellen wurden durchfluss-

zytometrisch analysiert. Die Ergebnisse der Analyse nach 2 Minuten, 5 Minuten oder 15 Minuten sind in den Histogrammen der Abbildung 3.1.4 dargestellt.

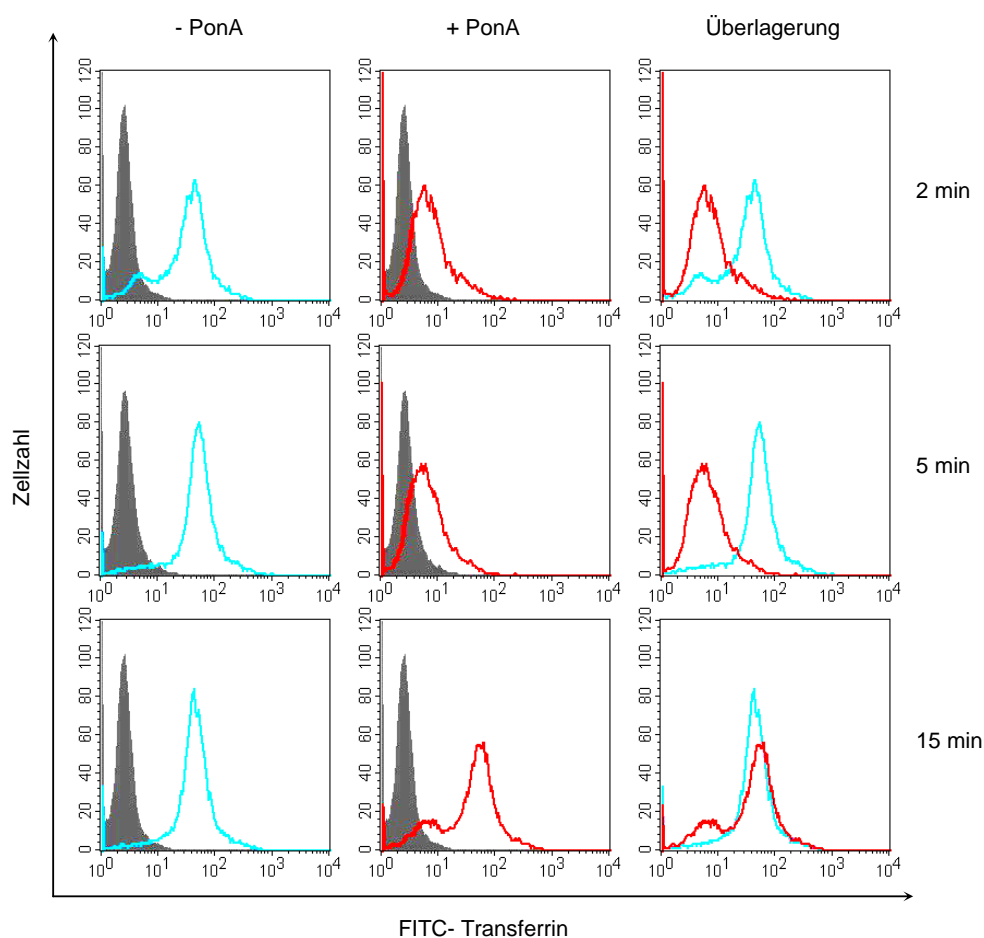


Abbildung 3.1.4A: Transferrinaufnahme von Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen mit und ohne PonA Behandlung. Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen wurden für mindestens 72 Stunden mit 2 μ M Ponasteron A inkubiert (+ PonA). Kontrollzellen wurden mit 2 μ l/ml Ethanol (100%) behandelt (- PonA). Die Abschätzung der Endozytoseaktivität erfolgte durch Inkubation der Zellen mit FITC markiertem Transferrin. Die Aufnahme von Transferrin wurde nach 2 Minuten, 5 Minuten oder 15 Minuten gestoppt. Die Zellen wurden mit der FACS-Methode gemessen. Als Negativkontrollen der Färbung wurden Zellen ohne Transferrin inkubiert (graue gefüllte Kurve). Die Fluoreszenzen der Kontrollzellen (- PonA) nach der Inkubation mit Transferrin sind blau dargestellt, die der mit PonA inkubierten Zellen (+ PonA) rot. Die Überlagerung zeigt die Daten mit und ohne PonA Behandlung.

Die Ergebnisse der Endozytoseanalysen zeigen eine deutliche Abnahme der Transferrinaufnahme in Zellen mit PonA induzierter MMP-7 Expression. Die Abnahme der Transferrinaufnahme bei Beendigung der Reaktion nach 2 Minuten und 5 Minuten deutet auf eine reduzierte Endozytoseaktivität der MMP-7 induzierten Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen hin. Wird die Endozytose erst nach 15 Minuten unterbrochen, lässt sich keine Veränderung der Transferrinaufnahme feststellen. Nach dieser längeren Reaktionsphase erreichen die MMP-7 induzierten Zellen eine mit den Kontrollzellen vergleichbare Transferrinaufnahmerate. Die

Kontrollzellen selbst weisen keine gesteigerte Transferrinaufnahme nach längerer Inkubation auf. Die Ergebnisse zeigen, dass MMP-7 die Transferrinaufnahme und somit die Endozytoseaktivität der Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen verringert. Nach längerer Reaktionsdauer kann dieser MMP-7 Einfluss kompensiert werden.

Zusätzlich zur Transferrinaufnahme wurde auch die Dextranaufnahme der MMP-7 induzierten oder nicht induzierten Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen analysiert. Die Aufnahme von Dextran in die Zelle wird hauptsächlich über Mannoserezeptoren vermittelt und stellt somit einen Transferrinrezeptor- unabhängigen Mechanismus der endozytotischen Aktivität dar. Die Behandlung der Zellen erfolgte wie für die Messung der Transferrinaufnahme beschrieben. Die Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert und die Ergebnisse der Analyse in den Histogrammen der Abbildung 3.1.4B dargestellt.

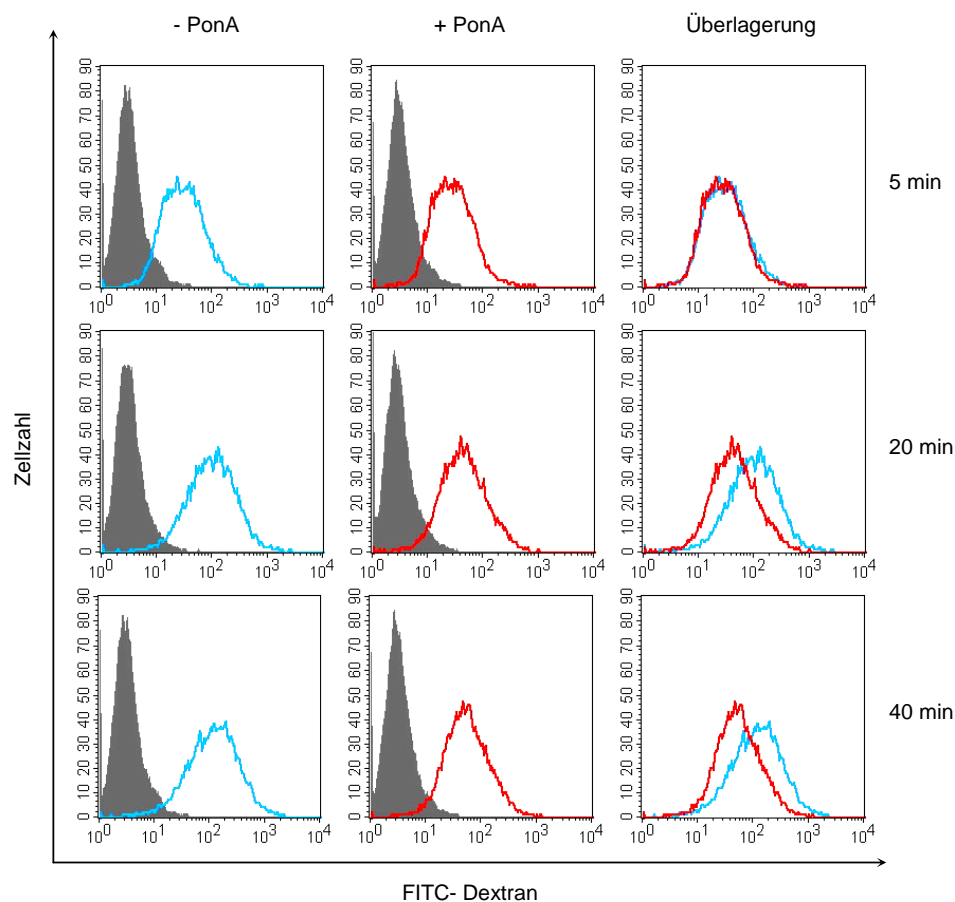


Abbildung 3.1.4B: Dextranaufnahme von Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen mit und ohne PonA Behandlung. Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen wurden für mind. 72 Stunden mit 2 μ M Ponasteron A inkubiert (+ PonA). Kontrollzellen wurden mit 2 μ l/ml Ethanol (100%) behandelt (- PonA). Die Aufnahme von Dextran wurde nach 5 Minuten, 20 Minuten, oder 40 Minuten gestoppt und mit der FACS-Methode gemessen. Als Negativkontrollen wurden Zellen ohne Dextran inkubiert (graue gefüllte Kurve). Die Fluoreszenzen der Kontrollzellen (- PonA) nach der Inkubation mit Dextran, sind blau dargestellt, die der PonA behandelten Zellen (+ PonA) rot. Die Überlagerung zeigt die Daten mit und ohne PonA-Behandlung nach der Dextraninkubation.

Die Analysen der Dextranaufnahme zeigten wie zuvor für die Transferrinaufnahme, eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität (rote Kurve) nach der PonA-Behandlung. Im Gegensatz zur Transferrinaufnahme, ließ sich bei der Dextraninkubation dieser Effekt erst nach längeren Reaktionsphasen (20 Minuten oder 40 Minuten) beobachten. Nach kurzer Reaktionsdauer (5 Minuten) wurde für PonA-behandelte Zellen und Kontrollzellen eine analoge Fluoreszenzintensität ermittelt. Wurde die Reaktion erst nach 20 Minuten unterbrochen, konnte eine gesteigerte Dextranaufnahme der Kontrollzellen beobachtet werden, die auch nach 40 minütiger Reaktion noch konstant blieb. Revers dazu, nahm die Dextranaufnahme der PonA-behandelten Zellen mit längerer Reaktionsdauer nicht weiter zu. Anhand der Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass die PonA induzierte MMP-7 Expression in Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen zu MMP-7 Expressionen die Dextranaufnahme verringerte. Die Dextranaufnahme der Kontrollzellen nahm offensichtlich mit zunehmender Inkubationszeit zu, während die PonA-induzierten MMP-7 Expressionen eine Steigerung der Dextranaufnahme hemmten.

3.1.5 Modifikation der Aktinpolymerisation nach MMP-7 Induktion

Die Analysen der Transferrin- und Dextranaufnahme verdeutlichten, dass MMP-7 die Endozytoseaktivität von Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen beeinflussen konnte. Über welchen Mechanismus diese Veränderung erfolgte, bzw. welcher Signalweg betroffen war, soll mit nachfolgenden Versuchen ermittelt werden.

Die Endozytosemechanismen von Säugerzellen werden durch verschiedene Signalwege reguliert. Neuere Studien gehen davon aus, dass Teilen des Aktinzytoskeletts eine bedeutende Rolle in unterschiedlichen Endozytosemechanismen zukommt (Orth and McNiven, 2003; Welch and Mullins, 2002). So wird vermutet, dass der dynamische Auf- und Abbau von Aktinfilamenten die intrazelluläre Bildung, Abspaltung und den Transport von Vesikeln unterstützen (Engqvist-Goldstein and Drubin, 2003). Ein wichtiger Bestandteil der Dynamik des Aktinzytoskeletts ist die Aktinpolymerisation zur Neubildung von Aktinfilamenten (F-Aktin) aus Aktinmonomeren (G-Aktin). Ob MMP-7 möglicherweise die Aktinpolymerisation in den Zellen verändert und so die Endozytose beeinflusst, sollte in diesem Versuch erforscht werden. Die Analyse einer spezifischen Färbung von F-Aktin mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin sollte Rückschlüsse auf die Aktinpolymerisation in den

Zellen geben. Die Fluoreszenzmessung der Proben erfolgte anschließend mit der FACS-Methode. Als Negativkontrolle der Färbung wurden Zellen ohne Phalloidinbehandlung gemessen. Die Ergebnisse der FACS-Messung sind in Abbildung 3.1.5A dargestellt.

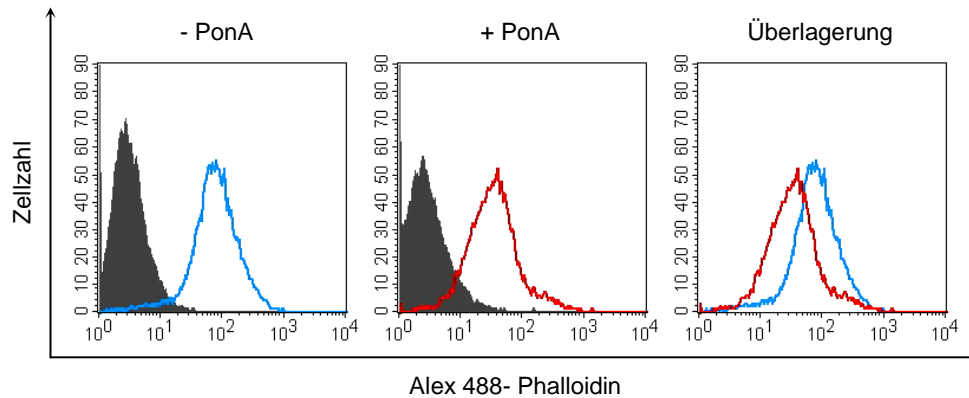


Abbildung 3.1.5A: Histogramme der Phalloidin-färbung in Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen. Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen wurden für mind. 72 Stunden mit $2\mu\text{M}$ Ponasteron A inkubiert (+ PonA). Kontrollzellen wurden mit $2\mu\text{l/ml}$ Ethanol (100%) behandelt (- PonA). Die Zellen wurden anschließend mit Alexa-Fluor-488 konjugiertem Phalloidin gefärbt. Die Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen wurde durchflusszytometrisch untersucht. In den Histogrammen sind die Messergebnisse der Kontrollzellen blau und die der PonA behandelten Zellen rot dargestellt. Die Messkurven der ungefärbten Zellen sind grau unterlegt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Färbungen wurden die Messdaten der mit und ohne PonA behandelten Zellen zusätzlich überlagernd dargestellt.

Bei den Auswertungen der FACS-Analysen in Abbildung 3.1.5A konnte für PonA behandelte Zellen und Kontrollzellen eine deutliche Fluoreszenzfärbung mit Alexa-Fluor-488 konjugiertem Phalloidin festgestellt werden. Es war jedoch erkennbar, dass die mit PonA inkubierten Zellen, im Vergleich zu den Kontrollzellen, eine reduzierte Fluoreszenzintensität aufwiesen. Diese Beobachtung sprach für einen reduzierten F-Aktin-Nachweis in den PonA behandelten Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen. Die Ergebnisse der Messung offenbarten, dass die PonA induzierte MMP-7 Expression in Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen die Polymerisation von Aktin herabsetzt.

Um die Ergebnisse der FACS-Messungen zu verifizieren, wurden Alexa-488-Phalloidin gefärbte Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen zusätzlich unter dem Laserscanmikroskop betrachtet.

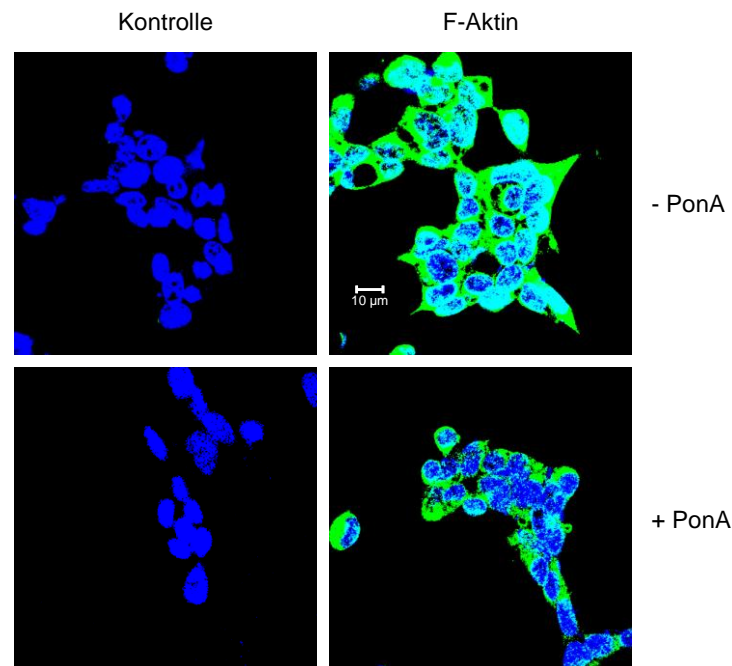


Abbildung 3.1.5B: Laserscannmikroskopische Aufnahmen der Phalloidinfärbung von Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen. Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen wurden in kollagenbeschichteten Vierkammer-Objektträgern ausgesät. Für den Versuch wurden die Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen für mind. 72 Stunden mit $2\mu\text{M}$ Ponasteron A inkubiert (+ PonA). Kontrollzellen wurden mit $2\mu\text{l/ml}$ Ethanol (100%) behandelt (- PonA). Die Zellen wurden für die Phalloidinfärbung mit 4% PFA fixiert, mit 0,1% Saponin permeabilisiert und anschließend mit Alex 488-Phalloidin gefärbt (grün). Hoechst 33342 wurde zur Visualisierung der Zellkerne verwendet (blau). Als Negativkontrollen von der Phalloidinfärbung wurden Zellen aus beiden Behandlungen ausschließlich einer Kernfärbung mit Hoechst 33342 unterzogen (Kontrolle).

Die in Abbildung 3.1.5B dargestellten Aufnahmen der Phalloidinfärbung zeigten eine reduzierte Intensität der Phalloidinfärbung für die PonA behandelten Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen. Die Ergebnisse waren vergleichbar mit den Resultaten der FACS-Analyse und bestärkten die Annahme, dass MMP-7 die Aktinpolymerisation reduzieren kann. Womöglich wurde durch diesen Mechanismus die Endozytoseaktivität der Zellen durch MMP-7 beeinflusst.

3.1.6 Einfluss von MMP-7 auf die Aktivierung kleiner GTPasen der Ras-Superfamilie

Die intrazelluläre Polymerisation von Aktin kann durch die Signale von membranständigen Rezeptoren oder extrazellulärer Chemokine ausgelöst werden. Diese Signale können intrazellulär weiter geleitet werden und zur Aktivierung von so genannten G-Proteinen

führen. Die an der Signalübertragung zum Zytoskelett beteiligten G-Proteine sind in vielen Fällen Mitglieder der Ras-Superfamilie. Vertreter dieser Proteinfamilie gehören zu den kleinen GTPasen (**Guanosintriphosphatasen**), deren Aktivierung durch den Austausch von Guanindiphosphat (GDP) gegen Guanintriphosphat (GTP) erfolgt. Die Signaltransduktion der aktivierten, kleinen GTPasen kann die Aktinpolymerisation auslösen. Eine veränderte Aktivierung der Ras-GTPasen durch MMP-7 könnte eine mögliche Erklärung für die reduzierte Aktinpolymerisation, nach induzierter MMP-7 Expression, sein. Die Ergebnisse der Phalloidininfärbung deuteten auf eine MMP-7 induzierte Reduktion der F-Aktinbildung hin. Die Aktivierung von Ras-GTPasen in MMP-7 exprimierenden Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen soll in folgendem Versuch analysiert werden. Die Ras-Aktivität von Hek 293 EcR MMP-7 Zellen wurde mit dem Ras-GTPase Chemi ELISA Kit (Active Motif) ermittelt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Für diesen Assay wurden Zelllysate von Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen verwendet die mit PonA oder Ethanol inkubiert wurden. Als Positivkontrolle für diesen Assay wurde das vom Hersteller bereitgestellte Extrakt von HeLa-Zellen verwendet. Die Lysate wurden mit gleicher Proteinkonzentration für den Assay verwendet. Die Intensität der Chemilumineszenzreaktion dieses Assays wurde in einem Lumniometer gemessen. Die Abbildung 3.1.6 zeigt die Auswertungen der Messung.

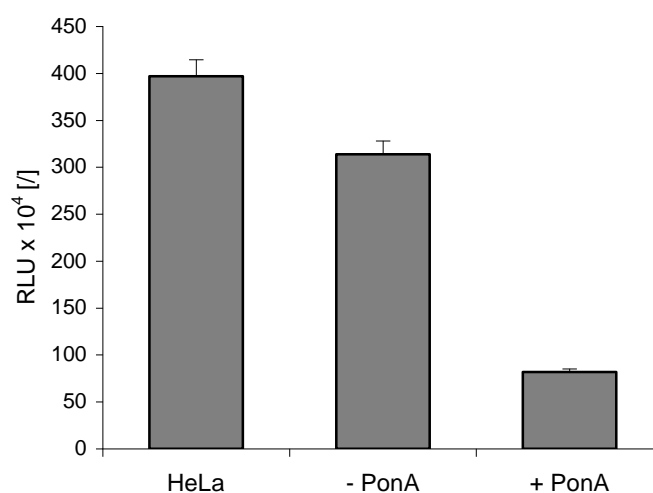


Abbildung 3.1.6: Aktivität von Ras-GTPasen in Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen mit und ohne PonA Inkubation. Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen wurden für 72 Stunden mit 2 μ M PonA inkubiert (+ PonA) und als Kontrolle (-PonA) mit 2 μ l/ml Ethanol (100%). Als Positivkontrolle der Versuchsdurchführung wurde HeLa-Zellextrakt verwendet (HeLa).

Zur Aktivitätsbestimmung von Ras-GTPasen, wurden die Lysate der Zellen mit einem Ras-GTPase Chemilumineszenz-ELISA, nach Angaben des Herstellers, untersucht. Die Auswertung der Chemilumineszenzreaktion wurde in einem Balkendiagramm zusammengefasst. Dargestellt sind die gemessenen Lumineszenzen der verschiedenen Zellextrakte. Die Diagramme zeigen exemplarisch die Daten eines Versuches von drei unabhängigen durchgeführten Experimenten. Die Daten wurden aus Dreifachwerten gemittelt.

Ergebnisse des Ras-GTPase Chemi ELISA zeigten, im direkten Vergleich zu den Signalen der Kontrollzellen, für die PonA behandelten Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen deutlich geringere Lumineszenzsignale. Es wird deutlich, dass in PonA-behandelten Zellen eine wesentlich geringere Konzentration von aktiven, GTP gebundenen Ras- GTPasen detektiert wurde. Dies ließ vermuten, dass die PonA-induzierte MMP-7 Expression zu einer dramatisch reduzierten Aktivierung von kleinen GTPasen der Ras-Superfamilie führte.

3.1.7 Einfluss von MMP-7 auf den GTPasen aktivierenden Ephrinrezeptor EphB2

Der EphB2-Rezeptor ist ein Transmembranrezeptor und wird zu der Gruppe der Tyrosinkinase gezählt. Die Rezeptoraktivität des EphB2-Rezeptors kann zur Aktivierung von Guanin-Austauschfaktoren (GEF) führen. Diese sind wiederum in der Lage, kleine GTPasen der Ras-Superfamilie auf unterschiedliche Weise zu modulieren (Irie and Yamaguchi, 2002; Mishima et al., 2004). Wie schon beschrieben sind viele dieser kleinen GTPasen an der Regulierung der Aktindynamik des Zytoskelett beteiligt. Eine Veränderung des Eph Rezeptorensignals könnte daher direkte Auswirkungen auf dessen Signaltransduktion und auf die Polymerisation von Aktin haben. Zudem enthält die extrazelluläre Domäne von EphB2 zwei Fibronektindomänen. Da bekannt ist, dass MMP-7 in der Lage ist Fibronektin zu spalten könnten diese Domänen eine Spaltsequenz für MMP-7 enthalten (Imai et al., 1995). Über eine Spaltung von EphB2 könnte MMP-7 Einfluss auf die Aktivierung von kleinen GTPasen nehmen. Daher sollte nachfolgend analysiert werden, ob MMP-7 die Expression des EphB2- Rezeptors auf der Zelloberfläche verändern kann. Für die Analysen der Rezeptorexpression wurden Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen mit einem EphB2 Antikörper gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Die Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen wurden mindestens 72 Stunden vor der Rezeptorfärbung mit PonA oder nur mit Ethanol (100%) behandelt. Die Proben wurden durchflusszytometrisch vermessen und die Intensität der Fluoreszenzfärbung analysiert.

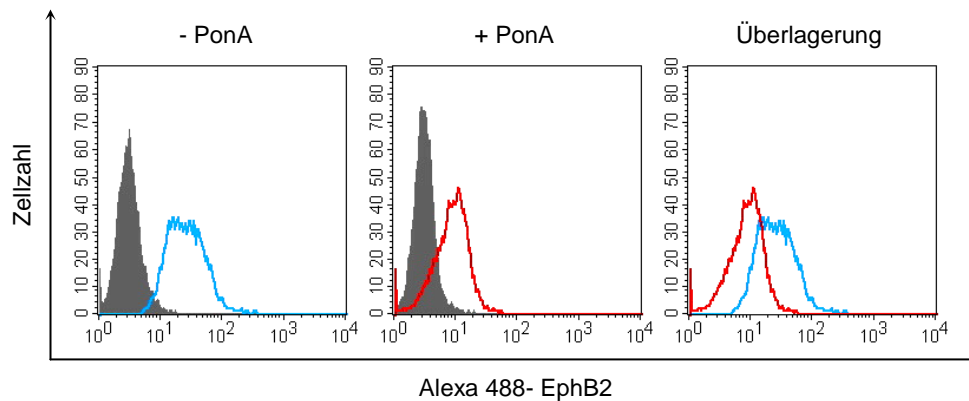


Abbildung 3.1.7A: EphB2 Oberflächenexpression von Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen. Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen wurden für mind. 72 Stunden mit 2 μ M Ponasteron A inkubiert (+ PonA). Kontrollzellen wurden mit 2 μ l/ml Ethanol (100%) behandelt (- PonA). Die Zellen wurden mit einem EphB2-spezifischen Antikörper und einem Alexa-Fluor-488-konjugierten Zweitantikörper gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. In den Histogrammen sind die Messergebnisse der nicht induzierten Zellen (- PonA) blau dargestellt. Die Histogramme in rot zeigen die Messergebnisse der MMP-7 induzierten Zellen (+ PonA). Die Daten der Zellen, die nur mit dem Zweitantikörper gefärbt wurden sind grau unterlegt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Färbungen, wurden die Messdaten der Zellen zusätzlich überlagernd dargestellt.

Wie die in Abbildung 3.1.7A aufgeführten Messdaten zeigten, ließen sich die Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen mit dem EphB2-spezifischen Primärantikörper und entsprechend konjugiertem Sekundärantikörper fluoreszenzmarkieren. Wobei die Fluoreszenzintensität der PonA behandelten Zellen, im Vergleich mit den Kontrollzellen, eindeutig geringer ausfiel. Dies ließ darauf schließen, dass der Anteil von EphB2 auf den Zelloberflächen von PonA inkubierten Zellen reduziert wurde. Diese Messdaten ließen vermuten, dass PonA induzierte MMP-7 Expression in Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen den Anteil von EphB2 auf der Zelloberfläche deutlich herabsetzen konnte.

Zur Überprüfung der Ergebnisse aus den durchflusszytometrischen Analysen wurden die antikörpermarkierten Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen zusätzlich laserscanmikroskopisch untersucht. Die Zellen wurden hierfür in kollagenbeschichteten Vierkammer-Objektträgern ausgesät. Nach dem Anwachsen der Zellen auf dem Objektträger wurden die Zellen, wie für die durchflußzytometrische Untersuchung, gefärbt. Die Visualisierung der Zellkerne erfolgte mittels des Kernfarbstoffs Hoechst 33342. Nach dem Waschen und Konservieren der Zellen erfolgte die Auswertung der Färbungen mit Hilfe eines konfokalen Laserscanmikroskopes (Zeiss 510-UV, Zeiss).

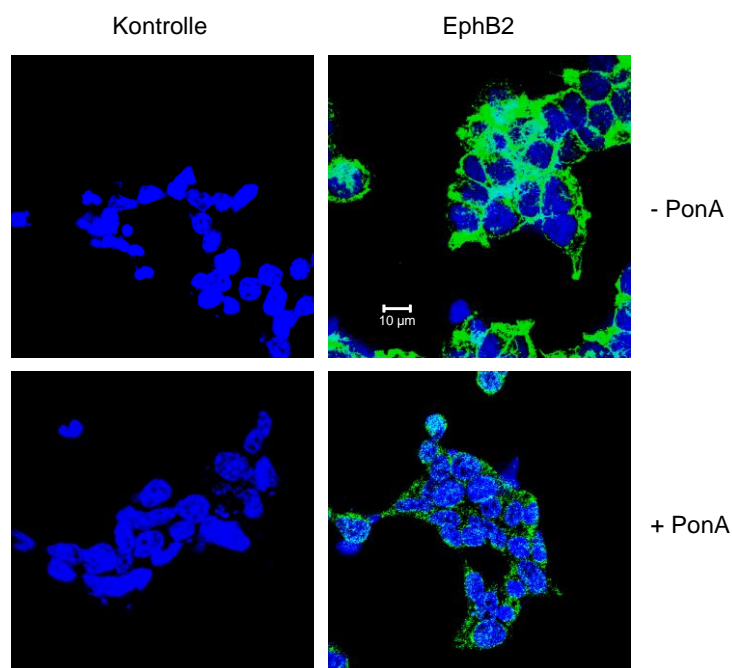


Abbildung 3.1.7B: Laserscannmikroskopische Aufnahmen der EphB2-Färbung von Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen. Die Zellen wurden für 72 Stunden mit $2\mu\text{M}$ PonA (+PonA) behandelt. Die Kontrollzellen wurden mit $2\mu\text{l/ml}$ Ethanol (100%) behandelt (-PonA). Die Zellen wurden nach 72 Stunden mit einem EphB2-spezifischen Antikörper und einem Alexa-Fluor-488-konjugierten Zweitantikörper gefärbt. Die EphB2 ist grün dargestellt. Hoechst 33342 wurde zur Visualisierung der Zellkerne verwendet (blau). Als Kontrolle von unspezifischen Antikörperbindungen wurden Zellen aus beiden Behandlungen ausschließlich mit dem Alexa-Fluor-488-konjugierten Zweitantikörper gefärbt (Kontrollen).

Die laserscannmikroskopische Untersuchung der gefärbten Zellen bestätigt die Ergebnisse der FACS-Analysen. Auf den mikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 3.1.7B) war nach der PonA-Inkubation eine wesentlich schwächere EphB2 Färbung der Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen erkennbar. Die optischen Analysen bestätigten die Vermutung, dass die PonA-induzierte MMP-7 Expression in Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen eine deutliche Reduktion der EphB2-Oberflächenexpression bewirkte.

Um zu analysieren, ob MMP-7 auch die EphB2- Expression auf mRNA Ebene beeinflussen kann, wurde diese durch RT-PCR untersucht. RNA von PonA und Ethanol behandelte Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen wurde isoliert. Jeweils $1\mu\text{g}$ RNA wurde in cDNA revers transkribiert und anschließend für eine PCR mit EphB2 spezifischen Primern (436 bp) verwendet. Ein PCR-Ansatz mit β -Aktin (286 bp) spezifischen Primern wurde als Kontrolle für die Quantifikation verwendet. Die Amplifikationsprodukte wurden auf ein Agarosegel (1%) geladen und im Spannungsfeld chromatographisch getrennt. Die DNA-Banden wurden durch

Färbung des Agarosegel mit Ethidiumbromidlösung unter UV-Licht sichtbar. Aufnahmen der UV-Lichtanalysen sind in Abbildung 3.1.7C gezeigt.

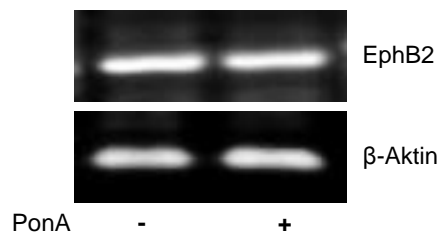


Abbildung 3.1.7C: EphB2-Expression in Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen. Die Expression von EphB2 in PonA (+ PonA) und Ethanol (-PonA) behandelte Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen wurde durch RT-PCR analysiert. RNA wurde aus den Zellen beider Behandlungsmethoden isoliert. Die RNA wurde revers transkribiert. Für die PCR mit EphB2 und β -Aktin (positive Kontrolle der PCR) spezifischen Primern wurden jeweils 1 μ g cDNA in 25 μ l Reaktionsvolumen verwendet. Die PCR wurde mit 35 Zyklen durchgeführt. 10 μ l der Amplifikationsprodukte wurde auf ein 1% Agarosegel geladen und die Banden durch Ethidiumbromidfärbung visualisiert.

Die Resultate der RT-PCR-Analyse zeigten eine ausgeprägte EphB2-Expression in Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen. Die EphB2 DNA-Banden der Zellen mit und ohne PonA Inkubation hatten eine vergleichbare Intensität. Im Gegensatz zu den FACS- Daten konnte die Ergebnisse der mRNA-Analysen zeigen, dass MMP-7 hier zu keiner Reduktion der EphB2-Expression führte. Zusammenfassend deuteten die Ergebnisse der FACS- und RT-PCR-Analysen darauf hin, dass MMP-7 nicht die Expression von EphB2 intrazellulär reduzierte, sondern ausschließlich zu einer Reduktion des EphB2-Rezeptors auf der Zelloberfläche führte.

3.1.8 *In vitro*-Spaltung von EphB2 durch MMP-7

Die FACS- und Mikroskop-Resultate der EphB2-Antikörperfärbung zeigten einen verringerten EphB2-Nachweis auf den Oberflächen der Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen nach PonA-induzierter MMP-7 Expression. Auf mRNA-Expressionsebene zeigten die MMP-7 exprimierenden Zellen, im Vergleich zu den Kontrollzellen, keine Unterschiede in der EphB2-Expression. Die Daten deuteten darauf hin, dass MMP-7 in der Lage sein könnte EphB2 in der extrazellulären Domäne zu spalten. Um diese Theorie weiter zu untersuchen wurde *in vitro* analysiert, ob die Inkubation von rekombinantem (rek.) EphB2 mit rekombinantem, aktivem MMP-7 zur Spaltung des EphB2-Rezeptors führt. Im Falle einer

Spaltung sollten die Spaltprodukte sequenziert werden, um so eine genaue Schnittstelle ermitteln zu können. Für diese Analyse wurden 1 µg EphB2 mit 100 ng MMP-7 für drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden danach einer SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese gefolgt von einem Westernblot unterzogen.

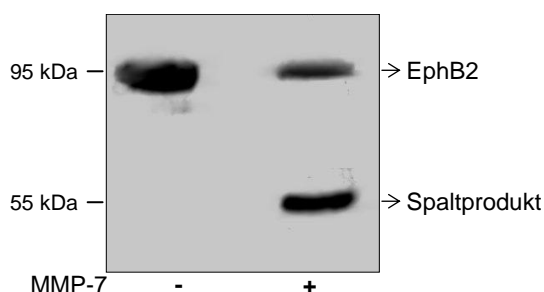


Abbildung 3.1.8A: *In vitro*-Spaltung von EphB2 nach Inkubation mit MMP-7. Rekombinantes EphB2 (1 µg) wurde mit 100 ng rekombinantes, aktivem MMP-7 koinkubiert (+ MMP-7). Als Kontrolle wurde rekombinantes EphB2 ohne MMP-7 für drei Stunden bei 37 °C inkubiert (- MMP-7). Die Proben wurden mit einem EphB2-spezifischen Antikörper durch Westernblotanalysen untersucht.

Die Westernblotanalyse der *in vitro*-Inkubation von EphB2 mit und ohne MMP-7 zeigte nach der MMP-7 Inkubation eine zweite deutliche Proteinbande. Diese Bande ist bei den Proben ohne MMP-7 Behandlung nicht erkennbar. Während die 95 kDa großen Fragmente der Proteingröße des rekombinanten EphB2 entsprach, deutete das 55 kDa große Fragment auf eine Spaltung von EphB2 hin. Nach der MMP-7 Behandlung nimmt die Intensität der 95 kDa großen Bande deutlich ab, was die Annahme verstärkt, dass das rek. EphB2 gespalten wurde. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass eine MMP-7 vermittelte Spaltung von EphB2 möglich ist. In nachfolgendem Versuch sollte ermittelt werden, an welcher Stelle MMP-7 den EphB2 Rezeptor spalten könnte.

Für die Sequenzierung der MMP-7 Schnittstellen innerhalb der Aminosäuresequenz von EphB2 wurde der oben beschriebene Versuch wiederholt. Nach der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese erfolgte ein Westernblot. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde die Membran mit Coomassie reversibel gefärbt. Die zwei Proteinfragmente, der mit MMP-7 inkubierten Probe, wurden aus der Membran geschnitten und für die Sequenzierung verwendet. Die Sequenzierung der Aminosäuresequenz wurde von Dr. Hans Heid (DKFZ, Heidelberg) durchgeführt. Ein Schaubild der Sequenzierungsergebnisse zeigt Abbildung 3.1.7B.

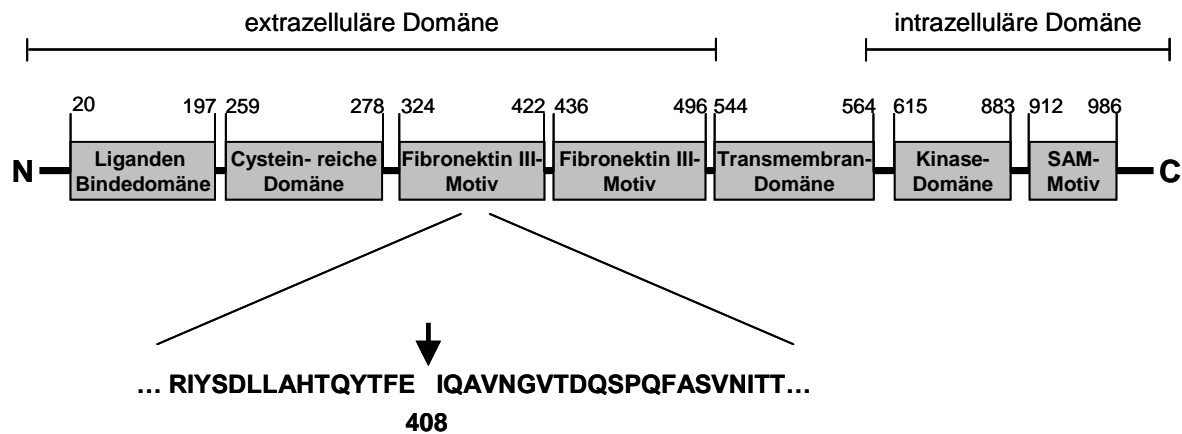


Abbildung 3.1.7B: Schematische Darstellung der Sequenzanalyse von EphB2-Spaltprodukten nach MMP-7 Inkubation. Rekombinantes EphB2 (1 µg) wurde mit und ohne MMP-7 für drei Stunden bei 37 °C koinkubiert. Die Spaltprodukte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung visualisiert. Die Banden der Proteinfragmente wurden aus der Membran geschnitten und die Aminosäuresequenz der jeweiligen Enden wurde sequenziert.

Die Sequenzanalyse der EphB2-Fragmente offenbarte die Aminosäuresequenz „IQAVNGVTDQSPF“, als Schnittstelle für MMP-7 innerhalb des Rezeptors. Die Sequenz der Schnittstelle wurde mit der Aminosäuresequenz des gesamten EphB2- Rezeptors (Akzessionsnummer: NM_017449) verglichen. Nach diesem Sequenzabgleich musste davon ausgegangen werden, dass die MMP-7 Schnittstelle in dem ersten Fibronektin III Motiv, der extrazellulären Domäne des EphB2- Rezeptors, lokalisiert ist.

3.1.9 Aktinpolymerisation und Endozytoseaktivität nach EphB2 Stimulation

Die unter 3.1.5 beschriebenen Versuchsergebnisse zeigten, dass PonA-induzierte MMP-7 Expressionen in Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen zu einer Reduktion der Aktinpolymerisation in diesen Zellen führt. In den darauf folgenden Untersuchungen wurde eine verringerte Aktivierung von kleinen GTPasen der Ras-Superfamilie in MMP-7 überexprimierenden Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen beobachtet. Dies lieferte eine mögliche Erklärung für die reduzierte Aktinpolymerisation. Weitere Versuche zeigten, dass MMP-7 in der Lage ist den EphB2-Rezeptor in dessen extrazellulären Domäne zu spalten. Die MMP-7 vermittelte Spaltung von EphB2 könnte eine mögliche Erklärung für die verringerte Aktivierung von kleinen GTPasen nach induzierter MMP-7 Expression sein. Über diesen Signalweg ist auch die beobachtete reduzierte Polymerisation von Aktin zu erklären. In folgendem Versuch sollte analysiert werden ob, eine Stimulation von EphB2, im Gegensatz zu einer MMP-7 vermittelten

Spaltung, zu einer Steigerung der Aktinpolymerisation führen kann. Damit könnte die Vermutung bestärkt werden, dass EphB2 für die Aktinpolymerisation von großer Bedeutung ist (Yamaguchi and Pasquale, 2004).

Die Polymerisation von Aktin in Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen wurde auch in dieser Untersuchung durch spezifische, intrazelluläre Färbung von F-Aktin analysiert. Für die Stimulation der EphB2-Rezeptoraktivität wurden die Zellen mit verschiedenen Ephrinen (Liganden der Eph- Rezeptoren) inkubiert. Um eine EphB2-bedingte Aktinpolymerisation zu untersuchen wurden für die Stimulation die kommerziell erhältlichen, rekombinanten Ephrine A5, B2 und B3 getestet. Von EphrinB-Liganden wurde beschrieben, dass sie an EphB Rezeptoren binden können (Gale et al., 1996), aber auch Ephrin A5 ist in der Lage EphB2 zu aktivieren (Himanen et al., 2004). Um die Bindungsaffinität der verwendeten humanen Ephrin-Liganden zu erhöhen, wurden jeweils 2 µg der Ephrine eine Stunde bei 4 °C mit 0,2 µg Kaninchen- anti- humanem IgG- Fc kreuzvernetzt.

3.1.9.1 EphB2-Stimulation durch Ephrin-Liganden

Vor der Untersuchung der Aktinpolymerisation wurde ermittelt, ob die verwendeten Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen nativ die gewählten Ephrine exprimieren. Für diesen Versuch wurden PonA- und Ethanol-inkubierte Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen verwendet. Ein möglicher Einfluss von MMP-7 auf die Expression der Ephrine sollte mit den PonA-behandelten Zellen ermittelt werden. Die Expression der Ephrine A5, B2 und B3 wurde auf mRNA- Ebene durch RT-PCR untersucht. Verwendet wurden die im Methodenteil aufgelisteten, spezifischen Primer von Ephrin A5 (286 bp), Ephrin B2 (308 bp), Ephrin B3 (181 bp) und als Kontrolle die Primer von β -Aktin (286 bp). Die Amplifikationsprodukte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und im Spannungsfeld chromatographisch getrennt. Nach Färbung des Agarosegels mit einer Ethidiumbromidlösung, wurden die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar. Aufnahmen der Banden sind in Abbildung 3.1.9.1 dargestellt.

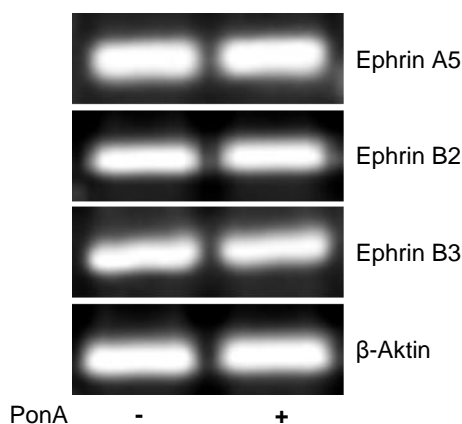


Abbildung 3.1.9.1: Ephrin-Liganden-Expression in Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen. Die Expression von Ephrin A5, Ephrin B2 und Ephrin B3 in PonA (+PonA) und Ethanol (-PonA) behandelten Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen wurde durch RT-PCR analysiert. RNA wurde aus den Zellen beider Behandlungsmethoden isoliert und revers transkribiert. Für die PCR mit spezifischen Primern von Ephrin A5 (286 bp), Ephrin B2 (308 bp), Ephrin B3 (181 bp) und als Kontrolle mit den Primer von β -Aktin (286 bp) wurden jeweils 1 μ g cDNA in 25 μ l Reaktionsvolumen verwendet. Die PCR wurde mit 35 Zyklen durchgeführt. 10 μ l der Amplifikationsprodukte wurden auf ein 1% Agarosegel geladen und die Banden durch Ethidiumbromidfärbung visualisiert.

Für die drei untersuchten Ephrine waren im Agarosegel deutliche Banden, in der jeweiligen Primer- definierten Größe erkennbar. Eine Expression von Ephrin A5, B2 und B3 in Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen ist anhand dieser Ergebnisse sehr wahrscheinlich. Zudem wird deutlich, dass die PonA-Behandlung und die so induzierte MMP-7 Expression keinen Einfluss auf die Expression der Ephrine auf mRNA- Ebene hat.

3.1.9.2 Aktinpolymerisation nach Behandlung mit verschiedenen Ephrinen

Die Analyse einer F-Aktin-Färbung von Ephrin behandelten Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen sollte Rückschlüsse auf die Aktinpolymerisation in den Zellen, nach EphB2 Stimulation geben. Hierzu wurden Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen für 30 Minuten, bei 37°C mit kreuzvernetztem Ephrin A5, Ephrin B2 oder Ephrin B3 (je 2 μ g/ml) inkubiert. Kontrollzellen wurden nur mit 0,2 μ g Kaninchen- anti- humanem IgG- Fc für 30 Minuten, bei 37°C inkubiert. Die spezifische Färbung von F-Aktin erfolgte durch eine Inkubation der Zellen mit fluoreszenzmarkierten Phalloidin. Die Fluoreszenz der Zellen wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Als Negativkontrolle der Färbung wurden Zellen ohne Phalloidinbehandlung gemessen. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 3.1.9.2A dargestellt.

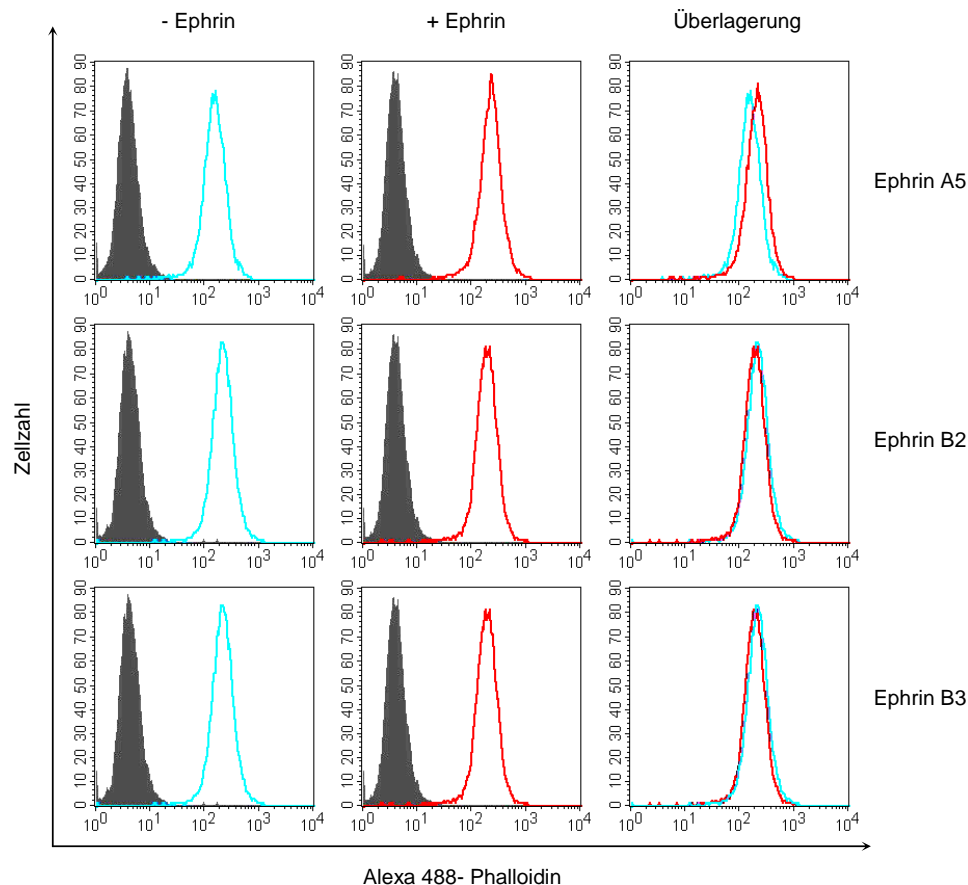


Abbildung 3.1.9.2A: Histogramme der Phalloidinfärbung nach Ephrin-Behandlung in Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen. Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen wurden für 30 Minuten mit 2 µg/ml mit Ephrin A5, Ephrin B2 oder Ephrin B3 inkubiert (+ Ephrin). Die verschiedenen Ephrine wurden jeweils für eine Stunde mit 0,2 µg Kaninchen- anti- humanem IgG- Fc Kreuzvernetzt. Die Kontrollzellen wurden nur mit 2 µg Kaninchen- anti- humanem IgG- Fc inkubiert (- Ephrin). Die Zellen wurden anschließend mit Alexa-Fluor-488 konjugiertem Phalloidin gefärbt. Die Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen wurde durchflusszytometrisch untersucht. In den Histogrammen sind die Messergebnisse der Kontrollzellen blau und die der Ephrin-behandelten Zellen rot dargestellt. Die Messkurven der ungefärbten Zellen sind grau unterlegt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Färbungen wurden die Messdaten der behandelten und der unbehandelten Zellen zusätzlich überlagernd dargestellt.

Die Histogramme der Phalloidinfärbung in Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen nach Ephrin-Behandlungen zeigten für alle Messungen eine starke Fluoreszenzintensität nach Alex 488-Phalloidin Inkubation. Eine Zunahme der Fluoreszenzintensität der Zellen nach Ephrin Behandlungen konnte nur für die Ephrin A5-behandelten Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen festgestellt werden. Die Inkubation mit Ephrin B2 und Ephrin B3 ergab keine Zunahme der gemessenen Fluoreszenz. Wahrscheinlich war nur Ephrin A5 in der Lage, durch EphB2-Stimulation die Polymerisation von Aktin zu steigern.

Ob die möglicherweise durch EphB2-Stimulation hervorgerufene Steigerung der Aktinpolymerisation, von der Dauer der EphB2-Stimulation abhängig ist, sollte nachfolgend untersucht werden. Hierfür wurden Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen mit Ephrin A5 für

verschiedene Zeitspannen, inkubiert. Die anschließende F-Aktin Färbung mit Alexa-Fluor-488-konjugiertem Phalloidin erfolgte wie vorher beschrieben. Die Fluoreszenz der Zellen wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Die Histogramme der Messungen sind in Abbildung 3.1.9.2B dargestellt.

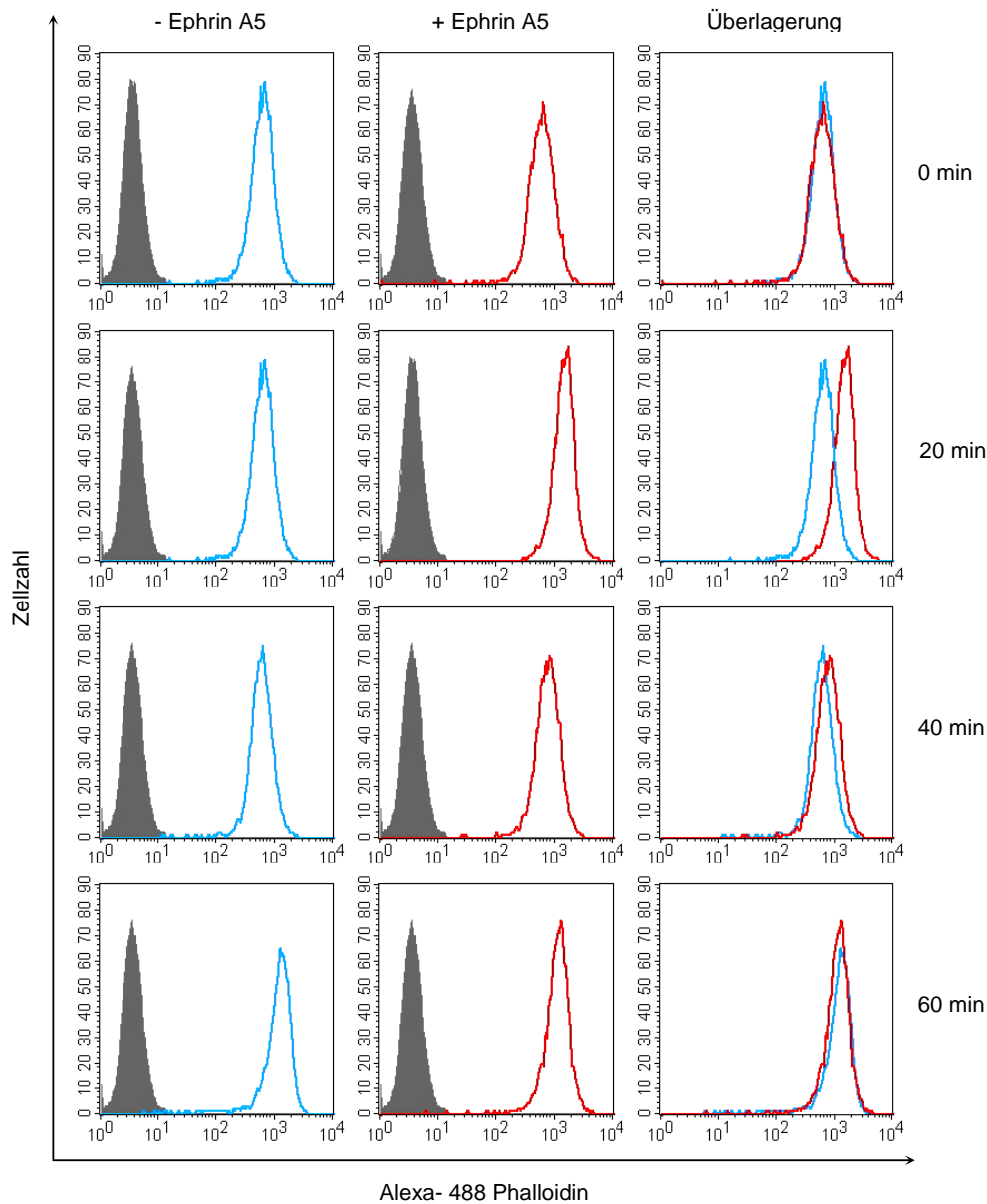


Abbildung 3.1.9.2B: Histogramme der Phalloidinfärbung nach Ephrin A5-Behandlung in Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen. Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen wurden mit 2 $\mu\text{g/ml}$ kreuzvernetztem Ephrin A5 behandelt (+ Ephrin A5). Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Ephrin A5 Behandlung wurden Zellen für eine anschließende Färbung entnommen. Die Kontrollzellen wurden nur mit 2 μg Kaninchen- anti- humanem IgG- Fc inkubiert (- Ephrin A5). Anschließend erfolgte eine Färbung der Zellen mit Alexa-Fluor-488-konjugierten Phalloidin. Die Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen wurde durchflusszytometrisch untersucht. In den Histogrammen sind die Messergebnisse der Kontrollzellen blau und die der Ephrin behandelten Zellen rot dargestellt. Die Messkurven der ungefärbten Zellen sind grau unterlegt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Färbungen wurden die Messdaten der behandelten und der unbehandelten Zellen zusätzlich überlagernd dargestellt.

Die Messung der F-Aktinfärbung in Ephrin A5 behandelten Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen ergab, dass die Zunahme der Fluoreszenzintensität anhängig von Dauer der Ephrin-Behandlung ist. Unmittelbar zu Beginn der EphrinA5-Inkubation (0 Minuten), konnte nach der Phalloidinfärbung noch keine gesteigerte Fluoreszenzintensität der Zellen ermittelt werden. Nach 20 minütiger Ephrin A5-Behandlung war, im Vergleich zu den Kontrollzellen, eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz-intensität erkennbar. Diese Zunahme war mit der Dauer der Ephrin-Behandlung rückläufig und spätestens nach 60 Minuten nicht mehr erkennbar. Ausgehend von diesen Ergebnissen muss man davon ausgehen, dass die Stimulation von EphB2 durch Ephrin A5 zeitabhängig war und ihren Höhepunkt nach 20 Minuten erreicht hatte.

Die Aktinpolymerisation in Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen nach unterschiedlich langen Ephrin B2- und Ephrin B3-Inkubationen wurde auch untersucht. Sie führten jedoch zu keiner gesteigerten F-Aktin Färbung (Ergebnisse wurden nicht dargestellt.)

Bezug nehmend auf die Ergebnisse der Aktinpolymerisation nach Ephrin-Behandlungen, wurde für weitere Versuche eine Behandlung mit Ephrin A5 für 20 Minuten gewählt.

Die Analyse der Aktinpolymerisation nach Ephrin-Behandlungen wurde auch mit PonA behandelten Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen durchgeführt. Die Durchführung der Analysen erfolgte, wie für die unbehandelten Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen beschrieben. Die Behandlung von PonA behandelten Zellen mit den Ephrinen A5, B2 und B3 und verschiedener Behandlungszeiten führte in keinem Fall zu einer Steigerung der F-Aktin Färbung beobachtet. Wahrscheinlich verhinderte die MMP-7 bedingte Spaltung von EphB2 auf der Zelloberfläche eine Steigerung der Aktinpolymerisation durch Ephrin-Stimulation. Exemplarisch für die Analysen der mit PonA behandelten Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen sind die Ergebnisse einer 20 minütigen Ephrin A5-Stimulation in Abbildung 3.1.9.2C dargestellt. Mit dieser Kombination konnte für unbehandelte Zellen die höchste Fluoreszenzzunahme ermittelt werden, daher wurden diese Daten noch einmal vergleichend dargestellt. Für PonA-behandelte Zellen führte selbst diese Stimulation zu keiner gesteigerten F-Aktin-Färbung.

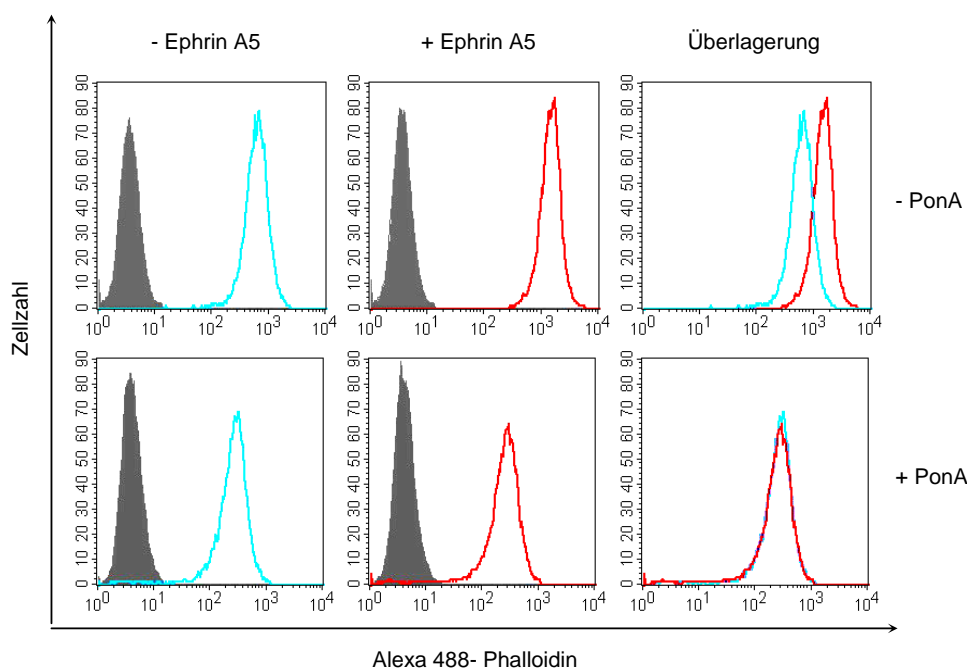


Abbildung: 3.1.9.2C Histogramme der Phalloidinfärbung nach Ephrin A5-Behandlung in PonA-inkubierten Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen. Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen wurden für mind. 72 Stunden mit 2 μ M Ponasteron A inkubiert. Die Zellen wurden für 20 Minuten mit 2 μ g/ml kruzvernetztem Ephrin A5 behandelt (+ Ephrin A5). Anschließend erfolgte eine Färbung der Zellen mit Alexa-Fluor-488 konjugiertem Phalloidin. Die Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen wurde durchflusszytometrisch untersucht. In den Histogrammen sind die Messergebnisse der Kontrollzellen blau und die der Ephrin behandelten Zellen rot dargestellt. Die Messkurven von ungefärbten Zellen (Kontrolle) sind grau unterlegt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Färbungen wurden die Messdaten der behandelten und der unbehandelten Zellen zusätzlich überlagernd dargestellt. Zum Vergleich wurde die Histogramme der nicht induzierten Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen nach 20 minütiger Ephrin A5-Behandlung aus Abbildung 3.1.9.2B mit dargestellt.

3.1.10 Aktivierung von Cdc42 und Rac1

Die kleinen GTPasen Cdc42 und Rac1 spielen eine wichtige Rolle bei der Polymerisation von Aktin und somit indirekt bei der Reorganisation des Zytoskelett und der Endozytose. Nach Induktion der MMP-7 Expression durch PonA-Behandlung von Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen wurde eine geringere Endozytoseaktivität, und eine reduzierte Aktinpolymerisation beobachtet werden. Weitere Untersuchung zeigten eine reduzierte Aktivierung von GTPasen nach induzierter MMP-7 Expression und die Spaltung von EphB2 nach MMP-7 Inkubation. Tyrosinkinase wie EphB2 sind in der Lage über die Aktivierung von Guaninnukleotid, Austauschfaktoren (engl.: GEF) und GTPasen der Rho-Familie wie Rac1 und Cdc42 zu modulieren (Irie and Yamaguchi, 2002; Mishima et al., 2004). Der Aktivierungsstatus von Cdc42 und Rac1 wird über die Bindung von GTP oder GDP gesteuert. Der Austausch von GDP/GTP wird von GEFs katalysiert.

In folgendem Experiment wurde untersucht, ob MMP-7 Einfluss auf den Aktivierungsstatus von Cdc42 und Rac1 hat. Durch eine zusätzliche Behandlung mit Ephrin A5 sollte analysiert werden, ob eine Stimulation von EphB2 die Aktivierung von kleinen GTPasen steigern kann. Dazu wurden die Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen PonA inkubiert. Kontrollzellen wurden nur mit Ethanol (100%) behandelt. Ein Teil der Zellen aus beiden Behandlungen wurden zusätzlich mit kreuzvernetztem Ephrin A5 inkubiert. Ein weiterer Teil der Zellen wurde als Kontrolle Kaninchen- anti- humanem IgG- Fc inkubiert. Die Detektion der Cdc42 und Rac1 Proteinbanden erfolgte durch Inkubation in spezifischen Antikörperlösungen. Um auszuschließen, dass die unterschiedliche Behandlung der Zellen schon die Gesamtmenge von Cdc42 und Rac1 veränderten, wurden zusätzlich Proteinproben des Gesamtzellsate (vor dem Pulldown) im Westernblot analysiert. Diese Proben repräsentieren den Gesamtgehalt von Cdc42 oder Rac1 in der Zelle und nicht nur die aktive Form. Die Entwicklung der in Abbildung 3.1.10 gezeigten Banden erfolgte mit Hilfe eines chemilumineszenzbasiertem Detektionssystem.

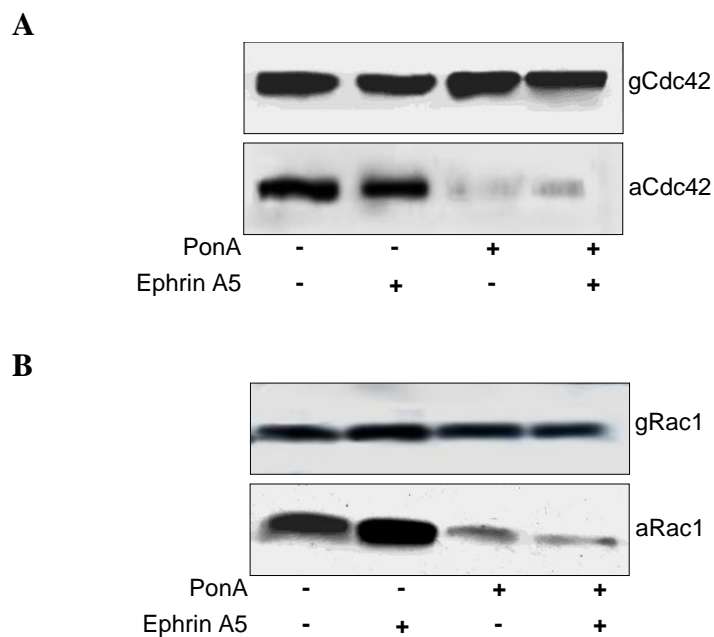


Abbildung 3.1.10 Einfluss von MMP-7 und Ephrin A5 auf die Aktivierung der kleinen GTPasen Cdc42 und Rac1. Mit 1 mg Gesamtlisat von PonA oder Ethanol inkubierten (mind. 72 Stunden) Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen (+/- PonA), behandelt mit 2 µg Ephrin A5 (kreuzvernetzt) oder 0,2 µg Kaninchen- anti- humanem IgG-Fc (+/- EphrinA5), wurde einen Pulldownassay für aktives Cdc42 (A) oder Rac1 (B) mit PAK PBD konjugierten Agarosebeads durchgeführt. Proben der Lysate vor dem Pulldownassay wurden als Kontrolle des Gesamtgehaltes von Cdc42 (gCdc42) oder Rac1 (gRac1) verwendet. Die Analyse von aktivem Cdc42 (aCdc42) oder aktivem Rac1 (aRac1) erfolgte durch jeweils spezifische Antikörper. Für die Visualisierung der Proteinbanden nach dem Westernblot wurde, nach Inkubation mit einem HRP konjugiertem anti-Maus Sekundärantikörper, ein ECL-Chemilumineszenz Detektionssystem verwendet.

(A) Im Zelllysate der Kontrollzellen (nur EtOH-Behandlung) wurde nach dem Pulldownassay aktives, GTP-gebundenes Cdc42 durch eine deutliche Bande detektiert. Die Banden von aktivem Cdc42 (aCdc42) im Zelllysate der PonA-inkubierten Zellen lieferten ein wesentlich schwächeres Signal, welches nahezu an der Nachweisgrenze lag. Die Ephrin A5-Behandlung der mit und ohne PonA inkubierten Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen brachte keine Veränderung in der Signalstärke der detektierten Banden von aCdc42.

Die Daten zeigten, dass sich durch induzierte MMP-7 Expression die Konzentration von aCdc42 dramatisch reduzieren ließ. Im Gegensatz dazu blieb die Konzentration des Cdc42 Gesamtgehaltes (gCdc42) konstant. Zudem blieb die Behandlung der Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen mit Ephrin A5 ohne erkennbare Auswirkungen auf die Aktivierung von Cdc42.

(B) Für die Detektion von aktivem Rac1 (aRac1) im Zelllysate von Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen konnten ähnliche Ergebnisse ermittelt werden wie zuvor mit dem Cdc42 Assay. Auch hier war eine deutliche Bande von aRac1 im Zelllysate der Kontrollzellen detektierbar. Die induzierte MMP-7 Expression führte zu einem stark reduzierten Nachweis von aRac1 wie zuvor schon für aCdc42. Allerdings bewirkte hier die Ephrin A5-Behandlung von Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen ohne PonA-Inkubation einen erhöhten aRac1 Nachweis. Eine Ephrin A5-Behandlung führte bei PonA-inkubierten Zellen zu keiner veränderten Aktivierung von Rac1. Ausgehend von diesen Ergebnissen führte die MMP-7 Expression zu einer drastisch reduzierten Rac1 Aktivierung. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung von nicht MMP-7 induzierten Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen mit Ephrin A5 zu verstärkter Aktivierung von Rac1.

3.2 Einfluss von MMP-7 auf humane, dendritische Zellen

Im Abschnitt 3.1 des Ergebnisteils dieser Arbeit konnte mit der Zelllinie Hek 293 gezeigt werden, dass MMP-7-Behandlung bzw. induzierte Überexpression zu Veränderung der Endozytoseaktivität dieser Zellen führte. Die Untersuchungen zur EphB2-Expression und zur Aktivierung von GTPasen der Rho-Familie ließen vermuten, dass eine MMP-7-vermittelte Spaltung von EphB2 auf der Zelloberfläche für die Veränderung der Endozytoseaktivität verantwortlich sein könnte.

Die Aktivierung naiver Lymphozyten ist für die Immunabwehr ein essentieller Prozess, bei dem die Antigenpräsentation durch Antigenpräsentierende Zellen (APZ) eine entscheidende

Rolle spielt. Dendritische Zellen (DCs) sind professionelle APZs und wichtige Initiatoren der primären Immunantworten (Banchereau and Steinman, 1998). DCs sind in der Lage, Antigene durch Endozytose zu internalisieren und anschließend zu prozessieren. Gerade unreife/immature DCs (iDCs) sind durch die effektive Antigenaufnahme und eine hohe Endozytoseaktivität gekennzeichnet. Ob sich durch MMP-7 auch in diesen immunrelevanten Zellen eine Veränderung der Endozytose feststellen lässt, soll in folgendem Teil der Arbeit untersucht werden.

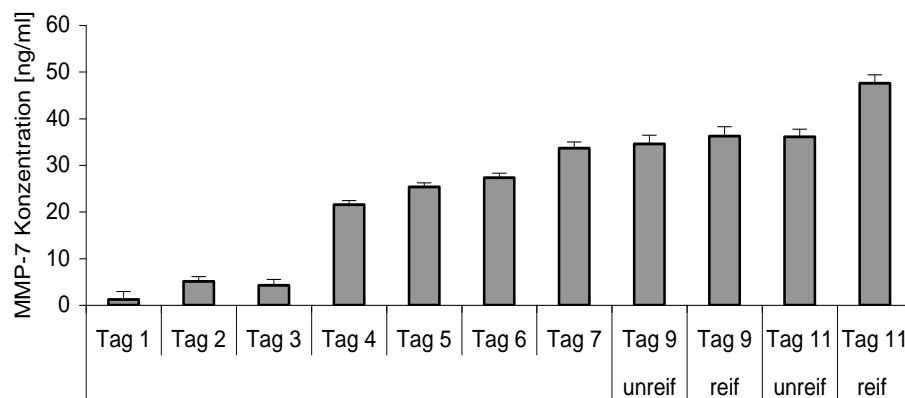
3.2.1 MMP-7 Sekretion während der Reifung von dendritischen Zellen (DC)

Bevor die Endozytoseaktivität der humanen primären DCs untersucht wurde, sollte ermittelt werden, ob diese Zellen während der Reifung physiologisch MMP-7 exprimieren. Für Macrophagen, die ebenfalls eine hohe endozytotische Aktivität zeigen und als antigenpräsentierende Zellen fungieren, wurde eine MMP-7 Sekretion bereits festgestellt (Tomlinson et al., 2008). Eine mögliche Expression und Sekretion von MMP-7 in primären humanen DCs während deren Reifung wurde mit einem MMP-7 spezifischen ELISA-Test und einer quantitativen RT-PCR mit MMP-7 spezifischen Primern untersucht. Für diese Versuche wurden DCs aus Monozyten generiert, welche aus humanen, peripheren, mononukleare Blutzellen. (*engl.*: PBMC) isoliert wurden. Die Monozyten wurden in zytokinsupplementiertem, dendritischem Zellmedium aufgenommen und acht Tage unter dem Zusatz von frischem Medium und Zytokingaben kultiviert. Zur Induktion der Ausreifung wurden die DCs ab dem achten Tag in Maturationsmedium kultiviert. Die Differenzierung der in Kultur befindlichen Monozyten zu DCs und der Maturierungsgrad der Zellen wurde mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, gegen DC-charakteristische Oberflächenmoleküle, ermittelt. Daher wurde alle zwei Tage die Expression des Reifungsmarkers CD83 und des kostimulatorischen Moleküles CD80 durchflusszytometrisch untersucht (Daten nicht gezeigt).

Für die Analyse der MMP-7 Sekretion von DCs während der Reifung wurde das Quantikine® Human MMP-7 Immoassay Kit (RnD Systems) nach Herstellerangaben angewendet. Dieser Assay basiert auf dem Prinzip eines Sandwich-ELISA mit einer enzymatischen Farbreaktion. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional zu dem gebundenen MMP-7 und erlaubt so Rückschlüsse auf die MMP-7 Konzentrationen der Zellkulturüberstände. Für die MMP-7

Sekretionsbestimmung wurden die DC-Kulturüberstände der Tage 1-8 verwendet. Ab dem 8. Tag wurden ein Teil der Zellen zusätzlich mit Maturierungszytokinen behandelt. Während der Endreifung der DCs wurden nur alle zwei Tage (Tag 9 und Tag 11) Zellüberstände genommen. Vergleichend wurden an Tag 9 und Tag 11 auch Überstände von DCs genommen, bei denen die vorherigen Kulturbedingungen nicht verändert wurden. Zellkulturmedium diente der Ermittlung der Hintergrundaktivität und Lösungen mit definierten MMP-7 Konzentrationen wurden zur Ermittlung einer Standardkurve verwendet.

A



B

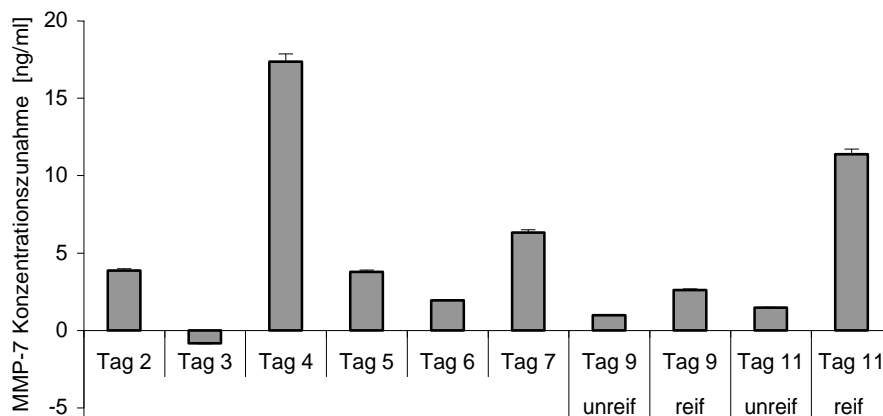


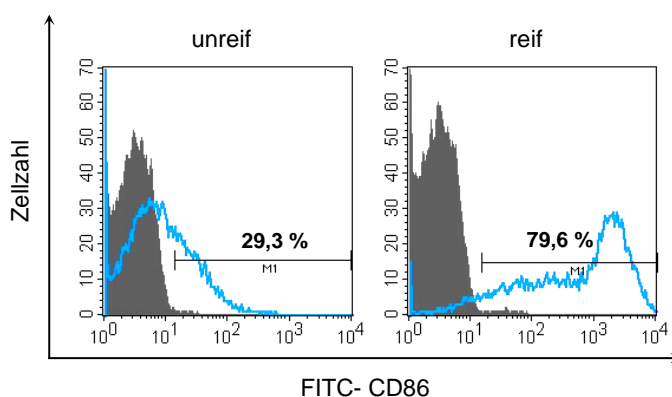
Abbildung 3.2.1: MMP-7 Expression während der Reifung von humanen, dendritischen Zellen. Jeweils 50 μ l der Zellkulturüberstände von primären, humanen DCs wurden zu verschiedenen Zeitpunkten während der Reifung gesammelt. Die Daten der MMP-7 Konzentrationen wurden mit einem MMP-7 spezifischen ELISA-Test ermittelt. Die Kalkulation der MMP-7 Konzentrationen erfolgte anhand einer Standardkurve mit definierten Konzentrationen von rekombinantem MMP-7. Dargestellt sind die Konzentrationen von MMP-7 in Nanogramm pro Milliliter in Kulturen mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen pro Milliliter (A). In Abbildung 3.2.1 B wurde die Veränderung der MMP-7 Konzentration im Vergleich zum Vortag dargestellt. Die Konzentration des Vortags stellt den Nullpunkt dar, die dargestellten Werte die Zu- oder Abnahme der MMP-7 Konzentration im Verhältnis zu dem Nullpunkt (B). Die Diagramme zeigen exemplarisch die Daten eines Versuches von drei unabhängigen durchgeführten Experimenten. Die Daten wurden, mit den entsprechenden Standardabweichungen, aus Dreifachwerten ermittelt.

Die MMP-7 Konzentrationsmessung in Überständen von DC-Kulturen zeigte, dass DC während ihrer Reifung MMP-7 exprimieren und in das Kulturmedium sezernieren. Hauptsächlich nach dem vierten Tag in Kultur konnte ein starker Anstieg der MMP-7 Konzentration im Zellkulturüberstand der DCs ermittelt werden. An den nachfolgenden Tagen konnte nur noch ein leichter Anstieg der MMP-7 Konzentration beobachtet werden. Bei den mit Maturierungszytokinen behandelten DCs konnte am 11. Tag, also drei Tage nach dem Maturierungsbeginn, ein weiterer stärkerer Anstieg der MMP-7 Konzentration im Zellkulturüberstand ermittelt werden. Die in Abbildung (B) dargestellten Veränderungen der MMP-7 Konzentrationen, im Vergleich zu den Werten der Vortage als Basis, verdeutlichen die Zunahme von MMP-7 im Zellkulturmedium am 4. und 11. Tag der DC-Maturierung.

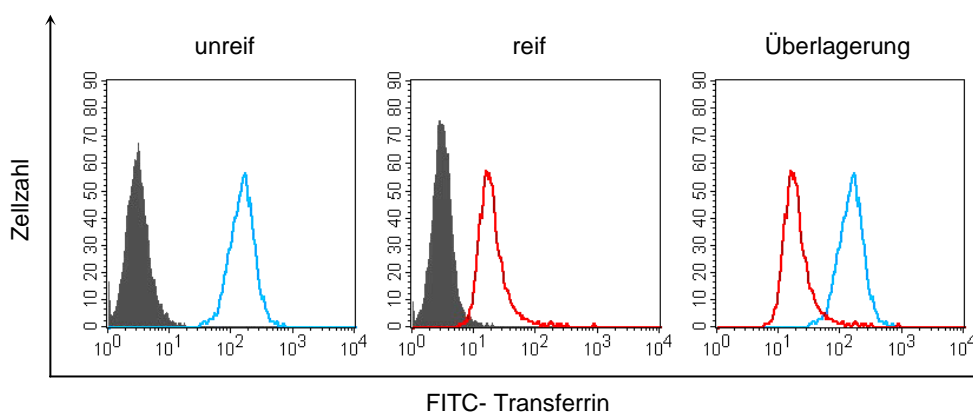
3.2.2 Endozytose von reifen und unreifen DCs

Es ist bekannt, dass dendritische Zellen während ihrer Reifung die Fähigkeit zur Aufnahme von extrazellulären Stoffen verlieren. Die Reifung führt zunächst zum Verlust der Endozytoseaktivität, die in terminal ausdifferenzierten DCs nicht mehr nachweisbar ist (Sallusto et al., 1995; Shortman and Liu, 2002). Diese Erkenntnis ist entscheidend für die nachfolgenden Untersuchungen, in denen die Endozytoseaktivität von DCs und der Einfluss von MMP-7 auf die Endozytose untersucht werden sollte. Für eine vorherige Abschätzung der Endozytoseaktivität wurde diese an unreifen und reifen DCs ermittelt. Dazu wurden DCs am 4. und 11. Tag der Reifung einem Transferrinaufnahme-Assay unterzogen. Die 11 Tage alten DCs wurden ab dem 8. Tag zusätzlich mit Maturierungszytokinen behandelt. Die Maturierung der DCs wurde durch fluoreszenzmarkierten CD86-Antikörpern durchflusszytometrisch ermittelt. Die Ergebnisse der Analyse sind in den Histogrammen der Abbildung 3.2.2 dargestellt.

A



B



Transferrinaufnahme von unreifen und reifen, humanen DCs. (A) Der Maturierungsgrad der DCs wurde vor der Transferrinaufnahme mit CD86-spezifischen Antikörpern untersucht. (B) Für die Analyse der Transferrinaufnahme wurden DCs für 5 Minuten mit FITC-markiertem Transferrin inkubiert. Die Transferrinaufnahme wurde mit der FACS- Methode gemessen. Als Negativkontrolle wurden Zellen ohne Transferrin inkubiert (grau gefüllte Kurve). Die Fluoreszenz der unreifen DCs nach der Transferrininkubation ist blau dargestellt, die der reifen DCs rot. Die Überlagerung zeigt die Kurven beider Versuche nach der Transferrininkubation.

(A) Die Histogramme der CD86-Färbung, zeigen eine erhöhte CD86-Expression der 11 Tage alten, mit Maturierungszytokinen behandelten DCs. Der prozentuale Anteil der CD86 positiv gemessenen DCs vom 4. Tag, ist mit 29,3 % wesentlich geringer, als der Anteil der 11 Tage alten DCs. Hier liegt der prozentuale Anteil der CD86-positiv gemessenen Zellen bei 79,6 %. Dieser Ergebnisse bestätigen, dass es sich bei den Zellen um unreife (vom 4.Tag) bzw. um reife (vom 11.Tag) DCs handelt.

(B) Im Vergleich zu den reifen DCs (vom 11. Tag der Reifung DCs) konnte nach der Transferrininkubation bei den unreifen DCs (vom 4. Tag der Reifung) eine deutlich stärkere Fluoreszenz gemessen werden. Dies lässt darauf schließen, dass die unreifen DCs über eine hohe endozytotische Aktivität verfügen, die in dieser Ausprägung bei den reifen DCs nicht

mehr beobachtet werden kann. Anhand der Ergebnisse aus diesem Versuch und der Analyse der MMP-7 Sekretion von DCs während der Reifung (3.2.1) wurden für die weiteren Untersuchungen der Endozytose unreife DCs am 4. Tag der Kultur verwendet.

3.2.3 Endozytose von unreifen DCs nach MMP-7 Behandlung

Der mögliche Einfluss von MMP-7 auf die Endozytoseaktivität von unreifen, humanen DCs soll in nachstehenden Versuchen analysiert werden. Bereits vorangegangene Versuche mit der Zelllinien Hek 293 EcR-MMP-7 zeigten, unter dem Einfluss von MMP-7. eine reduzierte Transferrin- und Dextran- Aufnahme. Ob sich diese Beobachtungen mit unreifen DCs wiederholen lassen, sollte folgende Untersuchung zeigen.

Dazu wurden DCs am 4. Tag der Reifung Tranferrin- und Dextranaufnahme-Assays unterzogen. Dextran wird dabei hauptsächlich über die Vermittlung von Mannoserezeptoren endozytiert und stellt damit einen Transferrinrezeptorunabhängigen Endozytoseweg dar. Mit den Ergebnissen aus beiden Versuchen, lässt sich eine Veränderung der Endozytose in DCs unabhängig von einander analysieren.

Für die Versuche wurde ein Teil der verwendeten DCs zwei Stunden mit MMP-7 behandelt, die anderen Zellen blieben unbehandelt. Für die Messung der Transferrinaufnahme wurden die Zellen, wie in 3.2.2 beschrieben, durchflusszytometrisch vermessen. Die MMP-7 Behandlung erfolgte mit unterschiedlichen MMP-7 Konzentrationen (100-, 200- und 400 ng/ml), um für folgende Versuche den Einfluss der MMP-7 Konzentration auf die Ergebnisse abschätzen zu können.

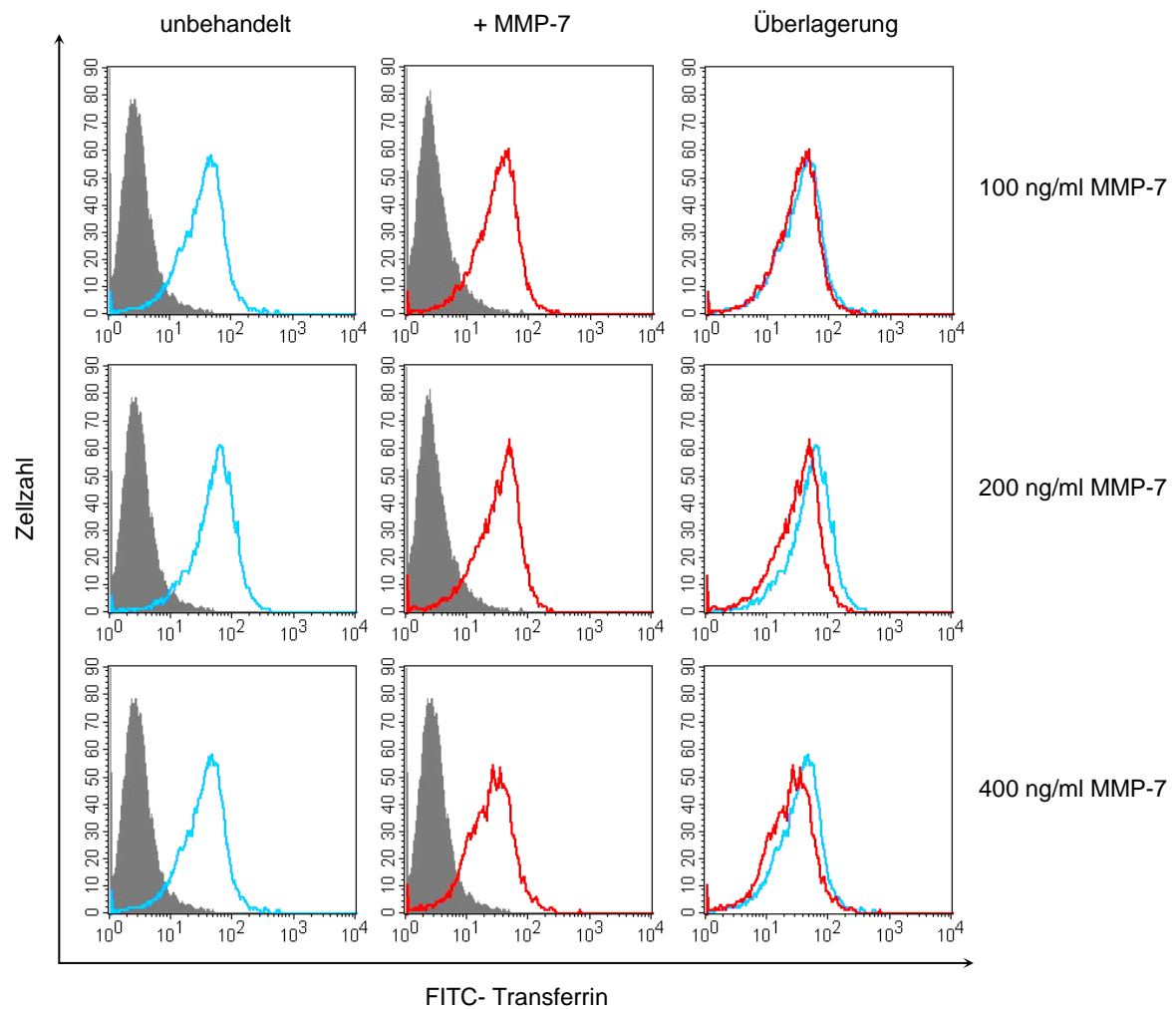


Abbildung 3.2.3A: Transferrinaufnahme von unreifen, humanen DCs mit und ohne MMP-7 Zugabe. DCs wurden mit unterschiedlichen MMP-7 Konzentrationen behandelt oder blieben unbehandelt. Anschließend wurden die DCs für 5 Minuten mit FITC-markiertem Transferrin inkubiert. Die Aufnahme von Transferrin wurde mit der FACS- Methode gemessen. Als Negativkontrolle wurden Zellen ohne Transferrin inkubiert (grau gefüllte Kurve). Die Fluoreszenz der unbehandelten DCs nach der Inkubation mit Transferrin ist blau dargestellt, die der MMP-7 behandelten DCs rot. Die Überlagerung zeigt die Daten mit und ohne MMP-7 Behandlung.

Die Messdaten der unreifen DCs, die mit 200- und 400 ng/ml MMP-7 behandelt wurden, zeigten nach Transferrininkubation eine geringere Fluoreszenzintensität, im Vergleich zu den Zellen ohne MMP-7 Behandlung. Bei den Zellen die mit 100 ng/ml MMP-7 inkubiert wurden konnte, nach der MMP-7 Behandlung, nahezu kein Unterschied der Fluoreszenzintensität ermittelt werden. Dies ließ darauf schließen, dass der Einfluss von MMP-7 auf die unreifen DCs konzentrationsabhängig ist, wobei eine Konzentration von über 200 ng/ml den MMP-7 Einfluss nicht mehr verstärkte. Eine Behandlung von unreifen DCs mit 200 ng/ml MMP-7 schien die Endozytoseaktivität dieser Zellen zu reduzieren. Für weitere Versuche mit MMP-7 behandelten, dendritischen Zellen wurde daher eine Konzentration von 200 ng/ml eingesetzt.

Zusätzlich zur Transferrinaufnahme wurde auch die Dextranaufnahme der MMP-7 behandelten oder unbehandelten, unreifen DCs analysiert. Wie schon erwähnt wird Dextran hauptsächlich über die Vermittlung von Mannoserezeptoren endozytiert und ist somit ein Transferrinrezeptor-unabhängiger Endozytosemechanismus. Die MMP-7 Konzentration für die Behandlung der DCs wurde anhand der Ergebnisse der Transferrinaufnahme gewählt. Die Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert und die Ergebnisse der Analyse in den Histogrammen der Abbildung 3.2.3B dargestellt.

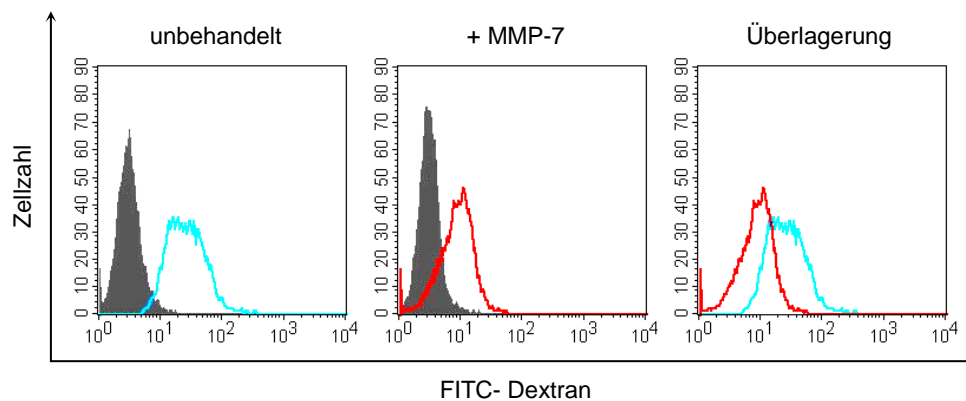


Abbildung 3.2.3: Dextranaufnahme von unreifen, humanen DCs mit und ohne MMP-7 Zugabe. DCs wurden mit 200 ng/ml MMP-7 behandelt oder blieben unbehandelt. Anschließend wurden die DCs für 20 Minuten mit FITC-markiertem Dextran inkubiert. Die Aufnahme von Dextran wurde mit der FACS- Methode gemessen. Als Negativkontrolle wurden Zellen ohne Dextran inkubiert (graue gefüllte Kurve). Die Fluoreszenz der unbehandelten DCs nach der Inkubation mit Dextran ist blau dargestellt, die der MMP-7 behandelten DCs rot. Die Überlagerung zeigt die Fluoreszenzen der behandelten und unbehandelten Zellen nach der Dextraninkubation.

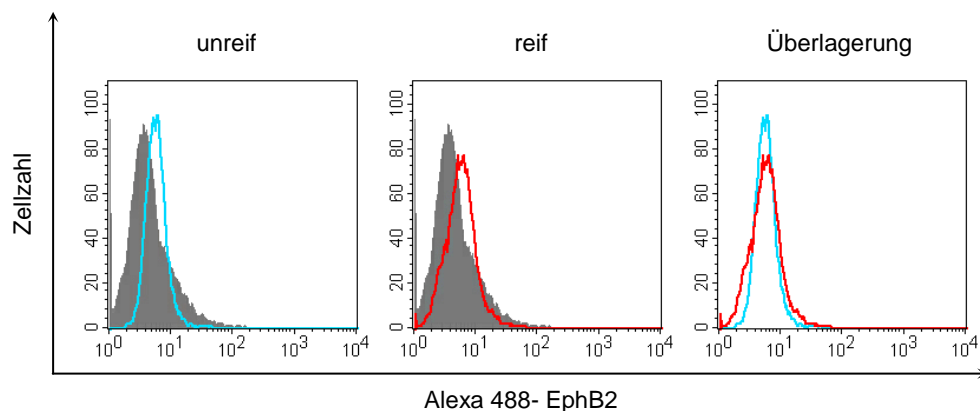
Die Ergebnisse nach der Dextraninkubation von unreifen DCs zeigten, im Vergleich zu den Zellen ohne MMP-7 Behandlung, eine geringere Fluoreszenzintensität der MMP-7 behandelten Zellen. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit den Resultaten der Transferrinaufnahme des vorherigen Versuchs und bestätigten die Annahme, dass MMP-7 die Endozytoseaktivität der unreifen DCs reduzieren kann.

3.2.4 EphB2-Expression auf DCs

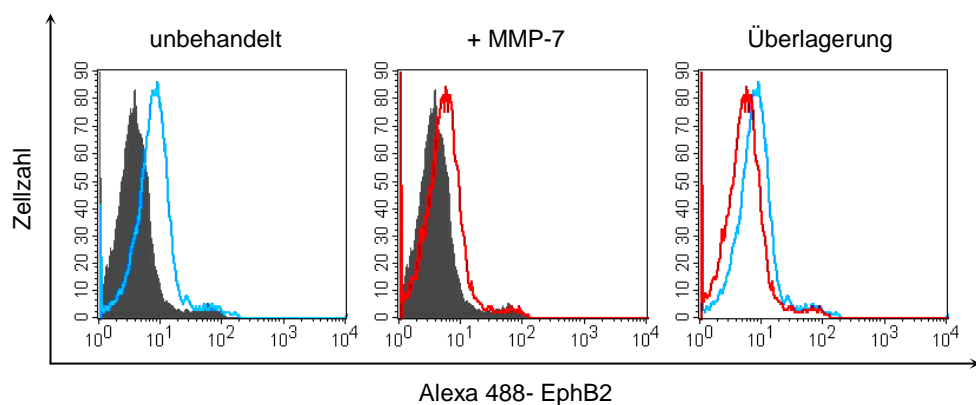
Ein möglicher Zusammenhang zwischen MMP-7-Behandlung oder MMP-7-Überexpression und einem reduzierten Nachweis von EphB2 auf den Oberflächen von EphB2-exprimierenden Zellen wurde bereits im Abschnitt 3.1.7 des Ergebnisteils beschrieben. Eine Wiederholung

der Versuche mit primären, humanen DCs soll zeigen, ob sich dieser Zusammenhang auch bei diesen Zellen beobachten lässt. Für die Analysen wurden primäre, humane, DCs mit einem EphB2-Antikörper gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Zuerst wurde die EphB2 Expression auf reifen und unreifen DCs ermittelt, um abschätzen zu können, ob sich die EphB2-Expression mit dem Maturierungsgrad der DCs verändert. Danach wurde der Einfluss von MMP-7 auf die EphB2 Oberflächenexpression von unreifen, humanen DCs untersucht. Für diese Untersuchung wurden die Zellen vor der Färbung für 2 Stunden mit 200 ng/ml MMP-7 behandelt. Die Proben wurden durchflusszytometrisch vermessen und die Intensität der Fluoreszenzfärbung analysiert.

A



B



EphB2 Oberflächenexpression von primären, humanen DCs. (A) DCs am 4. und 11. Tag der Reifung wurden mit einem EphB2 spezifischen Antikörper und einem Alexa-Fluor-488-konjugierten Zweitantikörper gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. In den Histogrammen sind die Messergebnisse der unreifen DCs (von Tag 4) blau und die der reifen DCs (von Tag 11) rot dargestellt. (B) Unreife, humane DCs (von Tag 4) wurden für 2 Stunden mit 200 ng/ml MMP-7 behandelt. Die Zellen wurden mit einem EphB2 spezifischen Antikörper und einem Alexa-Fluor-488-konjugierten Zweitantikörper gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. In den Histogrammen sind die Messergebnisse der unbehandelten Zellen blau dargestellt. Die Histogramme in rot zeigen die Messergebnisse der MMP-7 behandelten Zellen. In den Abbildungen (A) und (B) sind die Daten der Zellen, die nur mit dem Zweitantikörper gefärbt wurden, grau unterlegt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Färbungen wurden die Messdaten der Zellen zusätzlich überlagernd dargestellt.

(A) Die Histogramme der Messungen ließen darauf schließen, dass sowohl reife als auch unreife primäre, humane DCs EphB2 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Vergleicht man die Ergebnisse der reifen und unreifen DCs miteinander, so ist bei den Messkurven der reifen DCs, nach der EphB2-Antikörperfärbung, keine Veränderung der Fluoreszenzintensität erkennbar. Die Analysen deuten darauf hin, dass sich die EphB2-Oberflächenexpression nicht mit dem Maturierungsgrad der DCs veränderte.

(B) Die Histogramme der unreifen DCs mit und ohne MMP-7 Behandlungen zeigten, dass die Fluoreszenzintensität der MMP-7 behandelten Proben, im Vergleich mit den Kontrollproben, geringer ausfiel. Wie schon in vergleichbaren Versuchen mit anderen Zelltypen beobachtet werden konnte, scheint auch bei humanen, unreifen DCs der Nachweis von EphB2 auf den Zelloberflächen durch MMP-7 reduziert zu werden.

3.2.5 Aktivierung von Cdc42 und Rac1 in DCs nach MMP-7 Behandlung

Nach MMP-7 Behandlung von unreifen, humanen DCs mit MMP-7 wurde eine geringere Endozytoseaktivität, und eine reduzierte Oberflächendetektion von EphB2 ermittelt. In Untersuchungen mit Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen konnte ein Zusammenhang zwischen MMP-7 Expression und reduzierter Aktivierung von Cdc42 und Rac1 beobachtet werden. In folgendem Experiment wurde untersucht, ob MMP-7 auch bei DCs Einfluss auf den Aktivierungsstatus von Cdc42 und Rac1 hat. Eine MMP-7 vermittelte Spaltung von EphB2 hemmt offensichtlich den Signalweg dieses Rezeptors und somit wahrscheinlich auch die Aktivierung der GTPasen Rac1 und Cdc42. Daher sollte zudem untersucht werden, ob eine Stimulation des EphB2-Rezeptors mit seinem Liganden Ephrin A5 im Umkehrschluss die Aktivierung von Rac1 und Cdc42 begünstigt.

Für dieses Experiment wurden unreife, humane DCs am 4. Tag nach Isolation verwendet. Die DCs wurden mit MMP-7 behandelt oder blieben als Kontrolle unbehandelt. Zellen aus beiden Ansätzen wurden zusätzlich mit kreuzvernetztem Ephrin A5 inkubiert. Als Kontrolle der Ephrin A5-Stimulation wurde MMP-7 behandelte und unbehandelte Zellen nur mit dem IgG inkubiert, mit dem Ephrin A5 kreuzvernetzt wurde (Kaninchen- anti- humanem IgG- Fc). Der Aktivierungsstatus von Cdc42 und Rac1 wurde mit einem Pulldownassay ermittelt. Die

Durchführung und Auswertung des Pulldownassays erfolgte wie im Methodenteil dieser Arbeit beschrieben. Die Auswertungen sind in Abbildung 3.2.5 gezeigt.

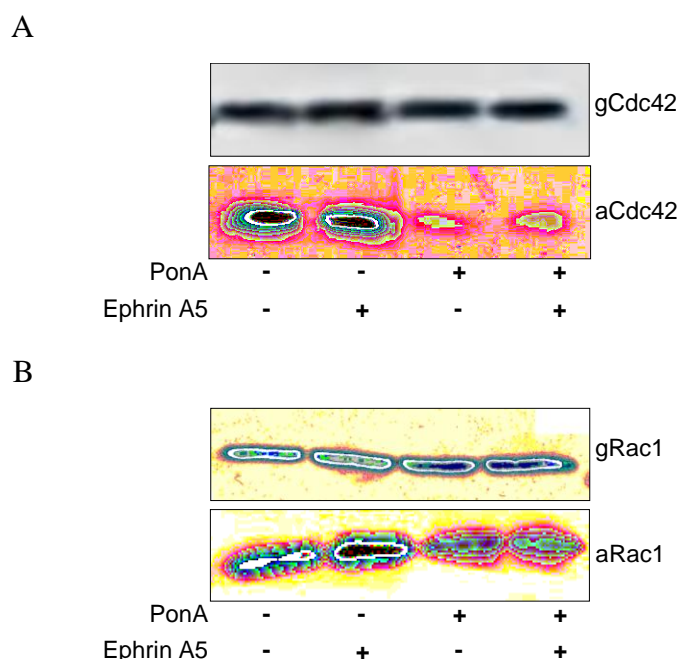


Abbildung 3.2.5 Einfluss von MMP-7 und Ephrin A5 auf die Aktivierung der kleinen GTPasen Cdc42 und Rac1. Mit 1 mg Gesamtlisat von unreifen, humanen DCs (von Tag 4) mit und ohne MMP-7 Inkubation (2 Stunden mit 200 ng/ml MMP-7), behandelt mit 2 µg Ephrin A5 (kruzvernetzt) oder 0,2 µg Kaninchen- anti-humanem IgG- Fc, wurden einen Pulldownassay für aktives Cdc42 (A) oder Rac1 (B) mit PAK PBD konjugierten Agarosebeads durchgeführt. Proben der Lysate vor dem Pulldownassay wurden als Kontrolle des Gesamtgehaltes von Cdc42 (gCdc42) oder Rac1 (gRac1) verwendet. Die Analyse von aktivem Cdc42 (aCdc42) oder aktivem Rac1 (aRac1) erfolgte durch jeweils spezifische Antikörper. Für die Visualisierung der Proteinbanden nach dem Westernblot wurde ein ECL Chemilumineszenz Detektionssystem, nach Inkubation mit einem HRP-konjugiertem anti-Maus Sekundärantikörper, verwendet.

Im Zelllysat der DCs ohne MMP-7 Behandlung wurde nach dem Pulldownassay aktives, GTP- gebundenes Cdc42 (A) und Rac1 (B) durch eine deutliche Bande detektiert. Die Banden der beiden aktiven GTPasen im Zelllysat der MMP-7 behandelten DCs waren dagegen wesentlich schwächer und für Cdc42 kaum noch detektierbar. Die Ephrin A5-Bandlung der unbehandelten DCs führte zu einer erhöhten Aktivierung von Rac1, jedoch zu keiner Veränderung der Aktivierung von Cdc42. Die Ephrin A5-Behandlung von MMP-7 inkubierten DCs brachte keine Veränderung der Aktivierung von Cdc42 und Rac1.

Die Daten wiesen darauf hin, dass sich durch Inkubation von DCs mit MMP-7 die Konzentration von aCdc42 und aRac1 dramatisch reduzieren ließ. Zudem schien die Stimulation von DCs ohne MMP-7 Behandlung mit Ephrin A5 zu einer gesteigerten Aktivierung von Rac1 zu führen. Gleichzeitig blieb die Konzentration des Gesamtgehaltes der beiden GTPasen konstant. Die Analysen der DCs zur Aktivierung von kleinen GTPasen

bestätigen die Ergebnisse der Hek 293 EcR-MMP-7 Zellen, die mit gleichen Methoden ermittelt wurden. In beiden Fällen führte MMP-7 zu einer reduzierten Aktivierung von Cdc42 und Rac1 und einer erhöhten Aktivierung von Rac1 nach Ephrin A5-Behandlung von Zellen ohne MMP-7 Inkubation oder Expression.

3.2.6 Aktinpolymerisation in humanen DCs nach MMP-7 Behandlung

Der mögliche Einfluss von EphB2 auf die Aktivität der kleinen GTPasen der Rho- Familie, welche letztlich die Polymerisation von Aktin beeinflusst wurde schon im vorangegangenen Ergebnisteil erörtert. Wie sich eine MMP-7 Inkubation auf die Polymerisation von Aktin in humanen, unreifen DCs auswirkt, wird in nachfolgendem Versuch untersucht. Durch eine spezifische Färbung von Aktinpolymeren (F-Aktin) mit Alexafluor-488-markiertem Phalloidin, sollte die Polymerisation von Aktin analysiert werden. Die Fluoreszenzmessung der Proben erfolgte anschließend mit der FACS-Methode. Zellen ohne Phalloidinbehandlung wurden als Negativkontrollen der Färbung gemessen.

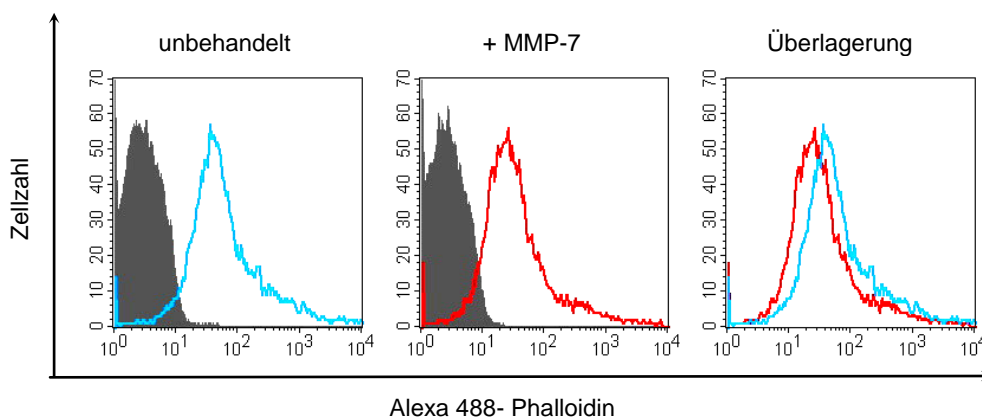


Abbildung 3.2.6A: Histogramme der Phalloidinfärbung in unreifen, humanen DCs. DCs wurden für 2 Stunden mit 200 ng/ml MMP-7 behandelt. Die Zellen wurden anschließend mit Alexa-Fluor-488-konjugiertem Phalloidin gefärbt. Die Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen wurde durchflusszytometrisch untersucht. In den Histogrammen sind die Messergebnisse der unbehandelten Zellen blau und die der MMP-7 behandelten Zellen rot dargestellt. Die Messkurven der ungefärbten Zellen sind grau unterlegt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Färbungen wurden die Messdaten der unbehandelten und MMP-7 behandelten Zellen zusätzlich überlagernd dargestellt.

Die Histogramme der FACS-Analysen in Abbildung 3.2.6A verdeutlichen, dass DCs mit und ohne MMP-7 Behandlung, durch die Inkubation mit Alexa-Fluor-488 konjugierten, Phalloidin

gefärbt wurden. Es war jedoch erkennbar, dass die mit MMP-7 inkubierten Zellen, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, eine reduzierte Fluoreszenzintensität aufwiesen. Diese Beobachtung sprach für eine Reduktion von F-Aktin in den MMP-7 behandelten DCs. Die Ergebnisse der Messung ließen vermuten, dass MMP-7 in DCs die Polymerisation von Aktin verändert.

Um die Ergebnisse der FACS-Messungen zu bestätigen, wurden FITC-Phalloidin-gefärbte DCs zusätzlich unter dem Laserscanmikroskop analysiert.

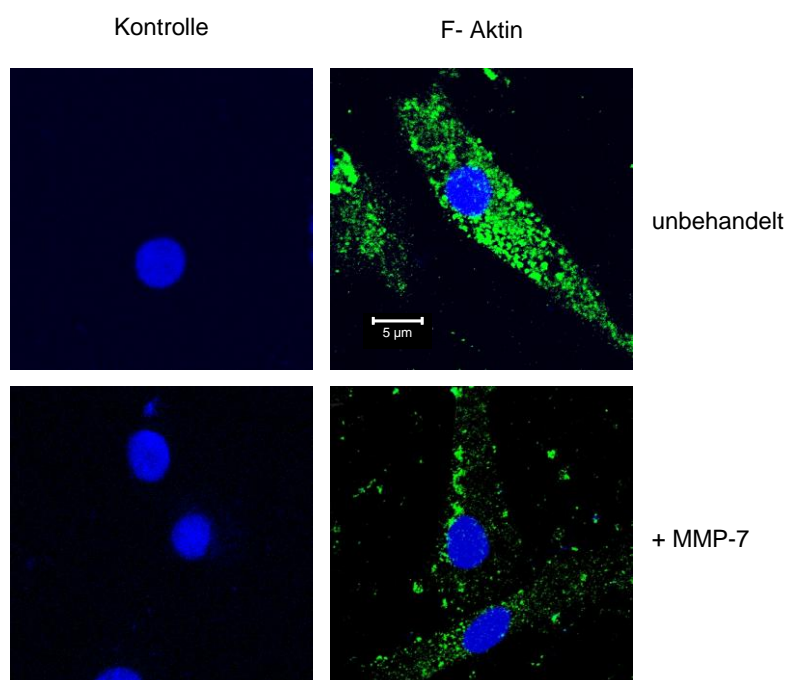


Abbildung 3.2.6B Laserscanmikroskopische Aufnahmen Phalloidin gefärbter, unreifer, humaner DCs. DCs wurden in kollagenbeschichteten Vierkammer-Objektträgern ausgesät und für 2 Stunden mit 200 ng/ml MMP-7 behandelt. Die DCs wurden anschließend mit 4% PFA fixiert und mit 0,1% Saponin permeabilisiert und FITC- Phalloidin gefärbt (grün). Hoecht 33342 wurde zur Visualisierung der Zellkerne verwendet (blau).

Die in Abbildung 3.2.6B dargestellten Ergebnisse der Laserscananalysen zeigen eine reduzierte Intensität der Phalloidinfärbung für die MMP-7 behandelten DCs. Die Ergebnisse bestätigten die Resultate der FACS- Analyse und bekräftigen die Annahme, dass MMP-7 die Aktinpolymerisation reduzieren kann und durch diesen Mechanismus die Endozytoseaktivität der Zellen beeinflusst.

3.3 Vergleich der dendritischen Zellen aus MMP-7 Deletionsmutantenmäusen und C57/Bl6- Wildtypmäusen

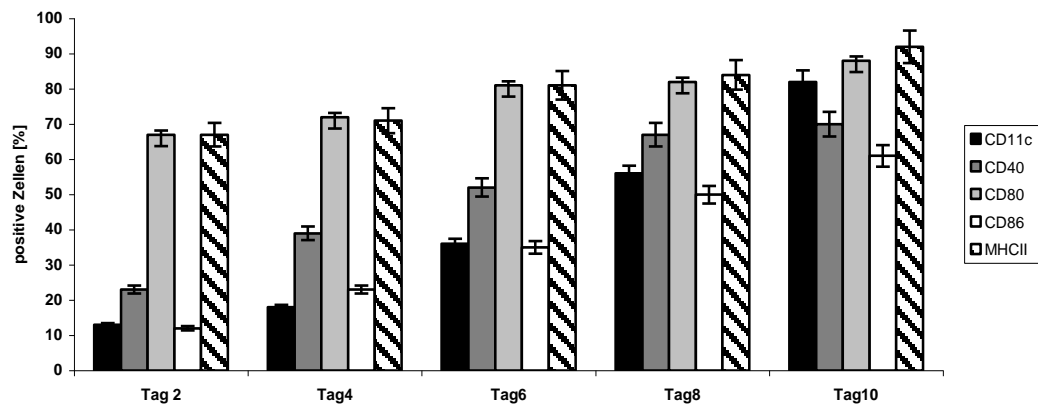
In folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob das Fehlen von MMP-7 Einfluss auf die Entwicklung, Reifung und Endozytoseaktivität von murinen, dendritischen Zellen hat. Hierfür wurden DCs aus dem Knochenmark zweier Mäusestämme generiert. Zum einen aus Mäusen eines MMP-7 -Deletionsmutantenstammes mit C57Bl/6-Hintergrund (MMP-7^{-/-}) und als Kontrolle aus Wildtypmäusen vom Stamm C57Bl/6 (WT). Die Generierung der in dieser Arbeit verwendeten murinen DCs, erfolgte wie im Methodenteil beschrieben.

3.3.1 Morphologie und Phänotypisierung von murinen DCs aus Knochenmark

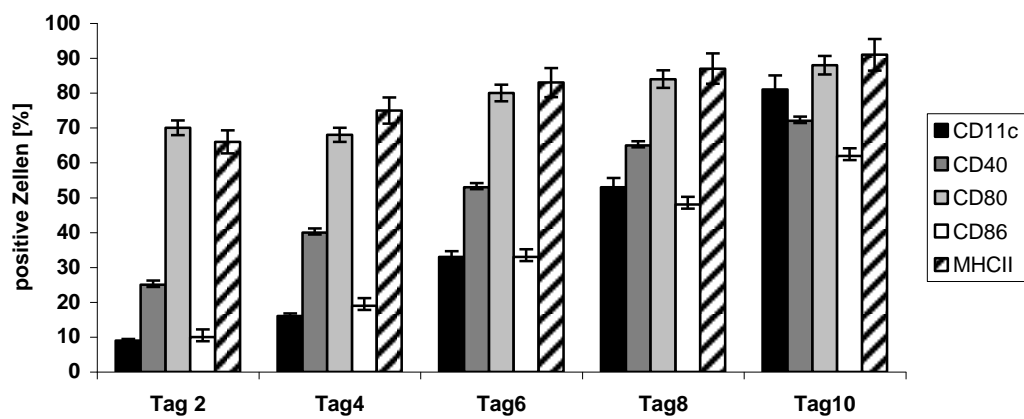
Während der Reifung wurde die Morphologie der murinen Knochenmarkszellen lichtmikroskopisch untersucht. Nach 3- 4 Tagen in Kultur konnte beobachtet werden, dass sich in der Kultur lokale Zellanhäufungen bildeten. Zudem zeigte sich mit Vorschreiten der Kultur und der damit verbundenen Maturierung der Zellen die Ausbildung von für DCs charakteristischen Zellfortsätzen. Die Ausbildung dieser Dendriten nahm bis zum achten Tag der Reifung weiter zu. Zwischen den Zellen, die aus dem Knochenmark von MMP-7-Deletionsmutantenmäusen generiert wurden und Zellen aus dem Knochenmark von Wildtypmäusen konnten keine Unterschiede in der Morphologie während der Reifung festgestellt werden.

Neben der optischen Beurteilung der morphologischen Veränderung der DCs während der Reifung, wurde auch deren Expression von verschiedenen Oberflächenmolekülen untersucht. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob die Zellen aus den MMP-7^{-/-} Mäusen, im Vergleich zu den Zellen aus den Kontrollmäusen, Unterschiede in der Expression der untersuchten differenzierungsspezifischen Oberflächenmoleküle zeigen würden. Für diese Untersuchung wurden die Zellen im Rahmen einer Kinetik alle zwei Tage mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD11c, den kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86, den Aktivierungsmarkern CD40 und die MHC-Klasse II-Moleküle gefärbt.

A



B



C

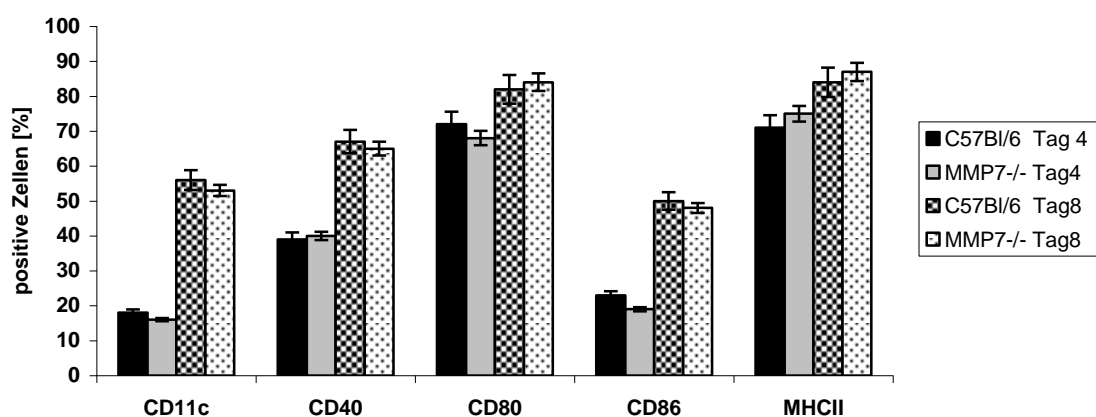


Abbildung 3.3.1: Expression DC spezifischer Oberflächenmoleküle auf murinen DCs während der Reifung. Im Rahmen einer Kinetik wurden die Zellen an den Tagen 2,4,6,8 und 10, nach der Isolation aus dem Knochenmark, untersucht. Die Expression verschiedener charakteristischer Oberflächenmarker wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Diagramm (A) zeigt den Verlauf der Oberflächenmarkerexpression während der Reifung von DCs aus dem Knochenmark von Mäusen des Stammes C57Bl/6 (Wildtyp). Diagramm (B) zeigt die Oberflächenexpression von DCs aus MMP7-/- Mäusen. In Diagramm (C) wurden die Werte beider

Mausstämme exemplarisch für den 4. und 8. Tag nach der Isolation gegenübergestellt. Gezeigt sind die Prozentzahlen positiv gemessener Zellen. Die Daten wurden gemittelt aus zwei unabhängigen Versuchen mit den entsprechenden Fehlerindikatoren.

Abbildungen 3.3.1 (A) und (B) zeigen die zunehmende Expression der kostimulatorischen Moleküle CD11c und CD86 während der Ausdifferenzierung der DCs. Die Expression, dieser für den DC Nachweis häufig verwendeten Marker, nahm bis zum Tag 10 stark zu. Sowohl die Zellen aus dem Knochenmark von MMP7^{-/-} Mäusen als auch Zellen aus dem Knochenmark der Kontrollmäuse wurden nach 10 Tagen in Kultur zu über 80% positiv auf CD11c und zu über 60% auf CD86 getestet. Auch CD40 und die MHC- Klasse II Moleküle wurden mit zunehmender Maturierung der DCs maximal exprimiert. Für diese Oberflächenmoleküle wurden an Tag 10 über 65% (CD40) und über 80% (MHCII) positiv getestet. Das Expressionsniveau des kostimulatorischen Moleküls CD80 der Zellen beider Mausstämme war schon im frühen Differenzierungsstadium der DCs (Tag 2) sehr hoch und nahm mit der zunehmenden Maturierung weiter zu.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen in Abbildung 3.3.1 zeigen, dass die Knochenmarkszellen nach einer Kultur von 8-10 Tagen die typischen Oberflächenexpressionsmuster von murinen DCs vorwiesen. Vergleicht man die Expressionsmuster der Zellen aus dem Knochenmark von MMP-7^{-/-} Mäusen mit dem der Kontrollmäusen (Abb. 3.3.1C beispielhaft für Tag 4 und 8) wurde deutlich, dass beide keinen Unterschiede zeigten. Die Zellen aus beiden Mausstämmen wiesen in allen untersuchten Oberflächenmolekülen, an den jeweiligen Kultivierungstagen, ein sehr ähnliches Expressionsniveau auf. Die Ergebnisse ließen darauf schließen, dass Knochenmarkszellen aus MMP7^{-/-} Mäusen und C57Bl/6 Mäusen keine Unterschiede in der Reifung von DCs zeigen.

3.3.2 Endozytoseaktivität von DCs aus Wildtyp und MMP-7^{-/-} Mäusen

Neben der morphologischen und phänotypischen Charakterisierung der DCs aus dem Knochenmark von MMP-7^{-/-} Mäusen und C57Bl/6-Wildtypmäusen, sollte auch deren funktionelle Eigenschaften ermittelt und miteinander verglichen werden. Wie schon bei den vorangegangenen Versuchen mit primären humanen DCs konzentrierten sich die Untersuchungen auf die Endozytoseaktivität von unreifen DCs beider Mausstämme. Für diese Versuchsreihe wurden die murinen DCs vom 4. bis 5. Tag nach der Knochenmarksisolierung

eingesetzt. In diesem Zeitraum entsprachen die morphologischen und phänotypischen Eigenschaften der Zellen denen von unreifen DCs. Um die Endozytoseaktivität zu bestimmen wurde der Transferrinaufnahme-Assay gewählt. Die Zellen wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die Ergebnisse der Analyse sind in den Histogrammen der Abbildung 3.3.2 dargestellt.

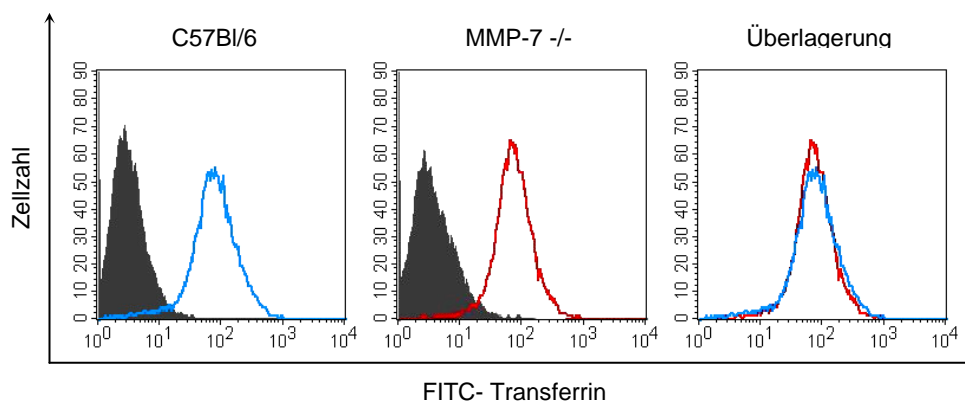


Abbildung 3.3.2: Transferrinaufnahme von unreifen, murinen DCs. Unreife DCs aus Knochenmarkszellen von C57Bl/6-Mäusen (Wildtyp) und MMP7^{-/-}-Mäusen, wurden für 5 Minuten mit FITC-markiertem Transferrin inkubiert. Die Transferrinaufnahme wurde mit der FACS-Methode gemessen. Als Negativkontrolle wurden Zellen aus beiden Mausstämmen ohne Transferrin inkubiert (grau gefüllte Kurve). Die Fluoreszenz der DCs aus Wildtypmäusen nach der Transferrininkubation ist blau dargestellt, die der Zellen aus MMP7^{-/-}-Mäusen rot. Die Überlagerung zeigt die Fluoreszenz beider Versuche nach der Transferrininkubation.

Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen konnte nach der Transferrininkubation mit den unreifen DCs aus beiden Mausstämmen eine starke Fluoreszenz gemessen werden. Dies ließ darauf schließen, dass diese Zellen über eine hohe endozytische Aktivität verfügen. Vergleicht man die Ergebnisse der FACS-Analyse der Zellen beider Mausstämmen miteinander, so war kein Unterschied in der Fluoreszenzintensität erkennbar. Die Histogramme der Zellen beider Mausstämmen zeigten nahezu identische Ausprägungen. Die fehlende MMP-7 Expression in den unreifen DCs aus dem Knochenmark der MMP7^{-/-}-Mäusen schien keinen Einfluss auf die Transferrinaufnahme dieser Zellen zu haben. Die Ergebnisse zeigten, dass eine fehlende MMP-7 Expression keinen Einfluss auf die Endozytoseaktivität von unreifen, murinen DCs hat.

3.4 Einfluss von MMP-7 auf humane T-Zellen

Der Einfluss von MMP-7 auf humane und murine DCs wurde in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben. In dem folgenden Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine MMP-7 Behandlung weitere Zellen des Immunsystems beeinflussen kann. Hierfür wurde der Einfluss von MMP-7 auf humane T-Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden primäre, humane, CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen und Zellen der T-Zelllinie IVSB mit MMP-7 behandelt und im Vergleich zu unbehandelten T-Zellen untersucht. Die primären, humanen T-Zellen wurden mittels magnetischer Zellsortierungsmethode (MACS) aus Buffycoats von gesunden Spendern isoliert. Die Zellen wurden in Kultur genommen und jeweils zwei Stunden vor den Versuchen mit 200 ng/ml MMP-7 behandelt, während die Kontrollzellen unbehandelt blieben. Der von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. T. Wölfel freundlicherweise zur Verfügung gestellte zytotoxische T-Zellklon IVSB wurde ebenfalls zwei Stunden vor den jeweiligen Versuchen mit MMP-7 behandelt, wobei auch hier die Kontrollen unbehandelt blieben. Für die Versuche wurden IVSB-Zellen am 3. bis 5. Tag nach der Restimulation verwendet.

3.4.1 EphB2-Oberflächenexpression auf T-Zellen nach MMP-7 Behandlung

Wie in den vorangegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, kann die MMP-7- Behandlung oder die induzierte Überexpression von MMP-7 zu einem reduzierten Nachweis von EphB2 auf den Oberflächen von Zellen führen. Ob sich dieser Zusammenhang auch bei humanen T-Zellen beobachten lässt, soll im nachfolgenden Versuch untersucht werden. Dazu wurden primäre, humane, CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen und IVSB-Zellen mit MMP-7 behandelt mit einem EphB2 Antikörper gefärbt und anschließend die EphB2-Färbung durchflusszytometrisch untersucht. Die Proben wurden mit der FACS-Methode gemessen und die Intensität der Färbung analysiert.

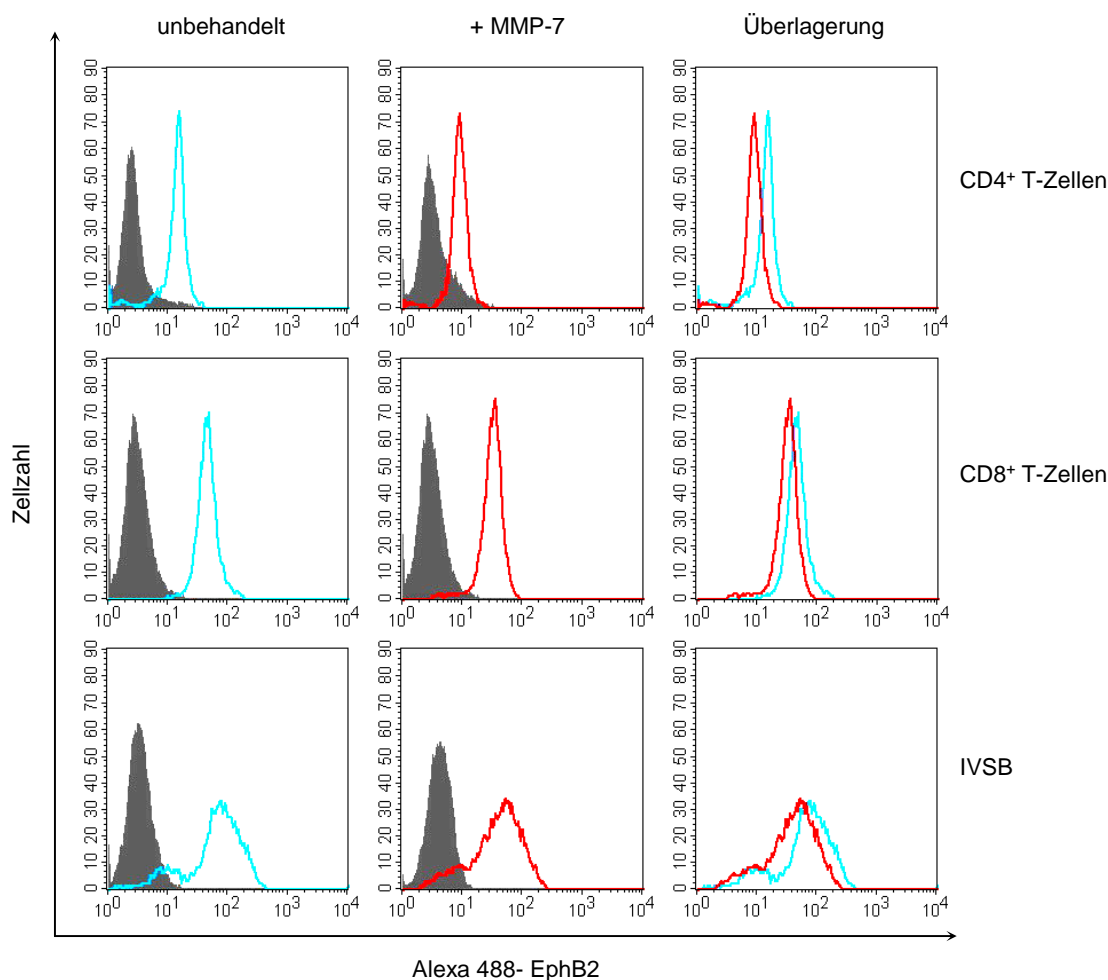


Abbildung 3.4.2: EphB2 Oberflächenexpression von verschiedene T-Zellkulturen mit und ohne MMP-7 Behandlung. Jeweils 1×10^6 $CD4^+$, $CD8^+$ T-Zellen und IVSB Zellen wurden für 2 Stunden mit 200 ng/ml MMP-7 behandelt. Die Zellen wurden mit einem EphB2-spezifischen Antikörper und einem Alexa-Fluor-488 konjugierten Zweitantikörper gefärbt und die Fluoreszenz im Durchflusszytometer untersucht. In den Histogrammen sind die Messergebnisse der unbehandelten Zellen blau dargestellt. Die Histogramme in rot zeigen die Messergebnisse der MMP-7 behandelten Zellen. Die Daten der Zellen, die nur mit dem Zweitantikörper gefärbt wurden sind grau unterlegt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Färbungen, wurden die Messdaten der unbehandelten und MMP-7 behandelten Zellen zusätzlich überlagernd dargestellt.

Wie die in Abbildung 3.4.2 aufgeführten Messdaten zeigen, ließen sich die Zellen unterschiedlicher T-Zellkulturen mit dem EphB2- Antikörper und entsprechend markiertem Zweitantikörper anfärben. Die Ergebnisse legten nahe, dass die Stärke der EphB2-Oberflächenexpression in $CD4^+$, $CD8^+$ T-Zellen und IVSB-Zellen eine vergleichbare Ausprägung hat, wobei die Fluoreszenzintensität der MMP-7 behandelten Proben im Vergleich mit den Kontrollproben geringer ausfiel. Dies ließ darauf schließen, dass der Nachweis von EphB2, auch auf den Zelloberflächen von T-Zellen, durch MMP-7 reduziert wurde. Diese Messdaten bekräftigen die Ergebnisse aus den vorangegangenen Versuchen, bei denen auch ein reduzierter EphB2-Oberflächennachweis nach MMP-7 Inkubation festgestellt wurde.

3.4.2 Aktinpolymerisation in T-Zellen nach MMP-7 Behandlung

Der Zusammenhang von MMP-7 Behandlung oder Induktion und dem verringerten Nachweis von polymerisiertem Aktin konnte in entsprechenden Versuchen mit Hek 293 EcR MMP-7 Zellen und dendritischen Zellen gezeigt werden. Daher sollte in folgenden Versuchen der Einfluss von MMP-7 auf die Aktinpolymerisation von T-Zellen untersucht werden. Hierzu wurden humane, primäre CD4⁺-, CD8⁺-T-Zellen und Zellen der T-Zelllinie IVSB mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin intrazellulär gefärbt. Die Hälfte der Zellen wurde zuvor mit MMP-7 behandelt. Die Fluoreszenzmessung der Proben erfolgte anschließend mit der FACS-Methode. Als Negativkontrolle der Färbung wurden Zellen ohne Phalloidinbehandlung vermessen.

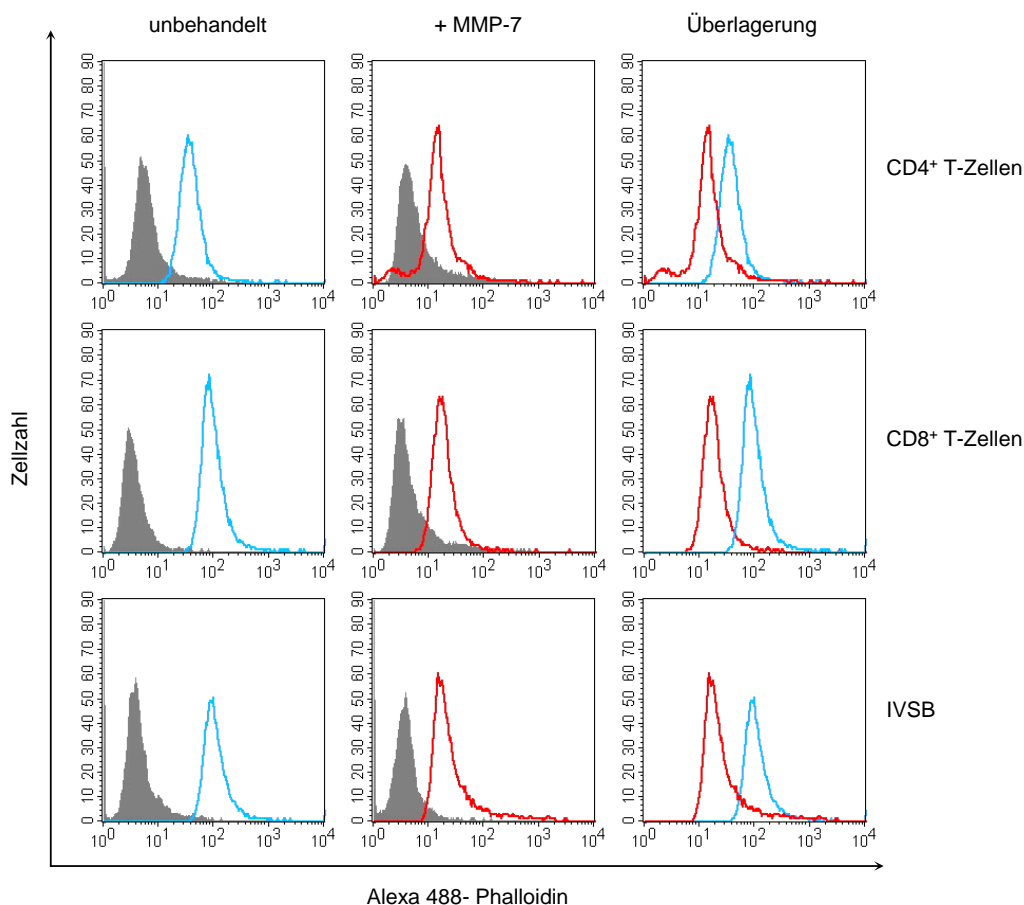


Abbildung 3.4.2 Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse der Phalloidin färbung in humanen T-Zellen. Jeweils 1×10^6 CD4⁺-, CD8⁺-T-Zellen und IVSB Zellen wurden für 2 Stunden mit 200 ng/ml MMP-7 behandelt. Die Zellen wurden mit Alexa-Fluor-488-konjugierten Phalloidin gefärbt. Die Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen werde durchflusszytometrisch untersucht. In den Histogrammen wurden die Messergebnisse der unbehandelten Zellen blau und die der MMP-7 behandelten Zellen rot dargestellt. Die Messkurven der ungefärbten Zellen wurden grau unterlegt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Färbungen wurden die Messdaten der unbehandelten und MMP-7 behandelten Zellen zusätzlich überlagernd dargestellt.

Die Auswertungen der FACS-Analysen in Abbildung 3.4.2 zeigten in allen drei T-Zellkulturen eine deutliche Fluoreszenzfärbung mit Alexa-Fluor-488-konjugiertem Phalloidin. Während die Zellen der CD8⁺-T-Zellen und der IVSB-Zellen eine vergleichbare Fluoreszenzintensität aufwiesen, war diese bei den CD4⁺ T-Zellen etwas schwächer. Bei allen drei T-Zelltypen war jedoch erkennbar, dass nach den MMP-7 Behandlungen die Fluoreszenzintensität deutlich reduziert wurde. Die Ergebnisse der Messung ließen vermuten, dass MMP-7 auch in T-Zellen die Polymerisation von Aktin negativ beeinflusste.

3.4.3 Einfluss von MMP-7 auf den Clathrin in T-Zellen

Die clathrinvermittelte Endozytose ist auch in T-Zellen ein wichtiger Mechanismus für die Oberflächenexpression von spezifischen Rezeptoren wie CD3, CD28 oder TGF- β . Neben dem Rezeptortransport an die Zelloberfläche, wird auch deren Internalisierung und Recycling von der clathrinvermittelten Endozytose verantwortet.

Dass Aktin wahrscheinlich die Bildung von Clathrin-ummantelten Bläschen unterstützt, die Einstülpung und/oder Abspaltung von Clathrinhüllen vorantreibt und den Vesikeltransport von der Plasmamembran tiefer in die Zelle forcieren kann, wurde in der Einleitung beschrieben. Die Ergebnisse des vorangegangenen Versuchen zeigten, dass sich MMP-7 auf die Bildung von F-Aktin negativ auswirkt. Ob auch das Clathrinniveau in T-Zellen von MMP-7 verändert wird, soll nachfolgend untersucht werden. Für diese Untersuchung wurden MMP-7 behandelte und unbehandelte CD4⁺-, CD8⁺-T-Zellen und IVSB Zellen mit einem humanen Clathrinantikörper gefärbt. Die Proben wurden anschließend durchflusszytometrisch untersucht.

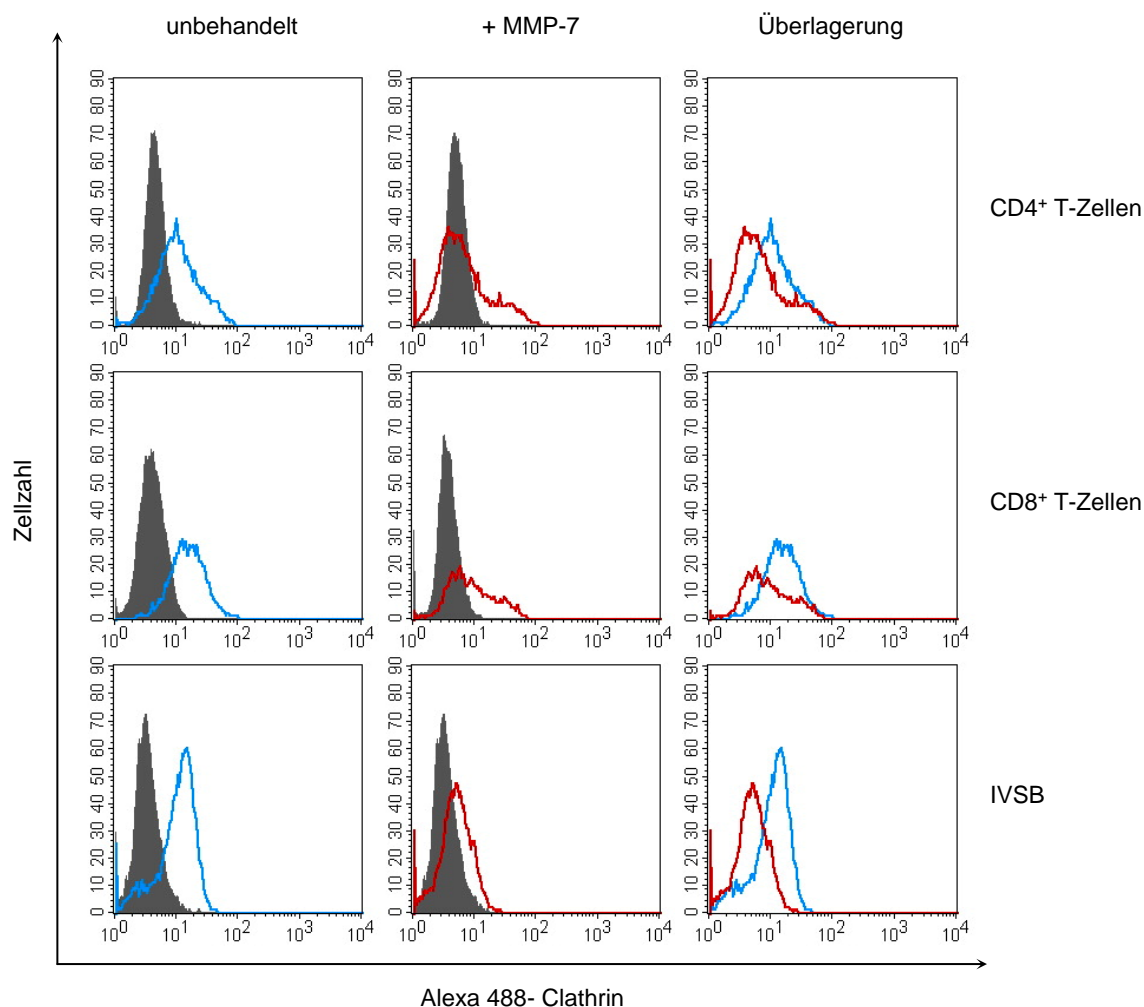


Abbildung 3.4.3 Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse der Clathrinfärbung in humanen T-Zellen. Jeweils 1×10^6 MMP-7 behandelte (200 ng/ml, 2 Stunden) und unbehandelte CD4⁺-, CD8⁺-T-Zellen und IVSB Zellen wurden mit einem clathrinspezifischen Antikörper und einem Alexa-Fluor-488-konjugierten Zweitantikörper gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. In den Histogrammen sind die Messergebnisse der unbehandelten Zellen blau dargestellt. Die Histogramme in rot zeigen die Messergebnisse der MMP-7 behandelten Zellen. Die Daten der Zellen, die nur mit dem Zweitantikörper gefärbt wurden, sind grau unterlegt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Färbungen wurden die Messdaten der unbehandelten und MMP-7 behandelten Zellen zusätzlich überlagernd dargestellt.

Die in Histogrammen der Abbildung 3.4.3 dargestellten Messdaten der gegen Clathrin gefärbten Zellen zeigten eine Reduktion der Fluoreszenzintensität nach der MMP-7 Behandlung. Bei allen drei T-Zelltypen konnte bei gleicher Behandlung eine vergleichbare Fluoreszenzintensität ermittelt werden. Es war jedoch deutlich erkennbar, dass nach den MMP-7 Behandlungen die Fluoreszenzintensität reduziert wurde. Die Ergebnisse der Messung ließen vermuten, dass MMP-7 auch in T-Zellen zu einem verringerten Clathrinniveau führte.

3.4.4 Funktionelle Analyse der T-Zellzytotoxizität nach MMP-7 Behandlung

Die letzten Versuche lassen darauf schließen, dass MMP-7 auch in T-Zellen Mechanismen der Endozytose beeinflussen kann. Sowohl die Polymerisation von Aktin als auch der Nachweis von Clathrin ist nach MMP-7 Behandlung in diesen Zellen reduziert.

Ob MMP-7 über diese Veränderung die Stimulation von T-Zellen beeinflusst, insbesondere die Proliferation der Zellen, soll in folgenden Untersuchungen untersucht werden. Für diese Versuche wurden Zellen des T-Zellklons IVSB verwendet. Diese Zellen erkennen spezifisch das Tyrosinase-Peptid Ty-2 (YMNGTMSQV) nach HLA-A2 Präsentation und bieten im Gegensatz zu primären Zellen gleich bleibende Eigenschaften, die nicht von verschiedenen Spendern abhängig sind. Bevor die Proliferation der IVSB-Zellen untersucht wurde, sollte überprüft werden, ob sich die Stimulation und Aktivität dieser T-Zellen überhaupt von MMP-7 beeinflussen lässt. Die T-Zellen wurden zusammen mit Alex B-Zellen (Target), einer MHCII und HLA-A2 exprimierende EBV B-Zelllinie, kokultiviert. Die zytotoxische Aktivität der IVSB wurde mit und ohne MMP-7 Behandlung mit der Methode des CellTiter-Glo[®] Lumineszenz-Zellviabilitätsassay analysiert. Die Lyse der Zellen wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die Proben im Lumniometer gemessen.

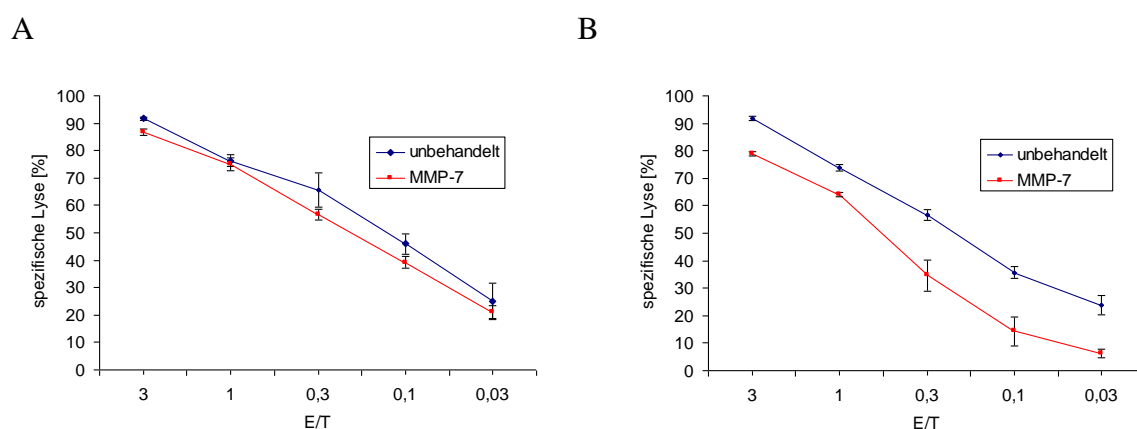


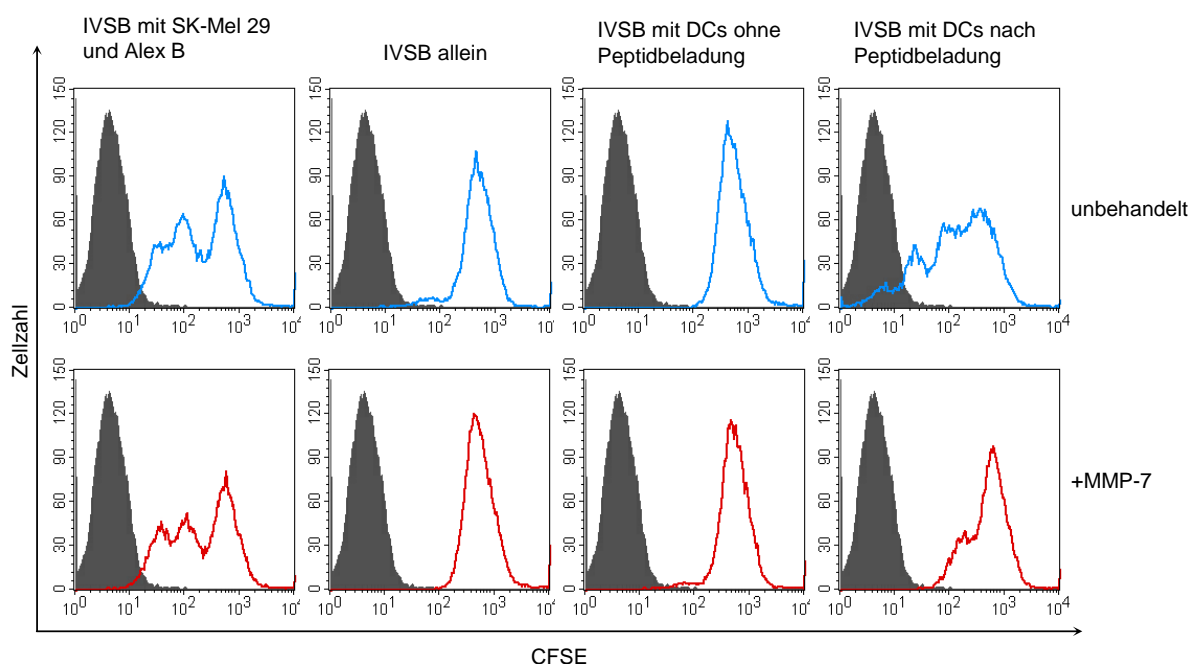
Abbildung 3.4.4: Zytotoxizität der IVSB-Zellen mit und ohne MMP-7 Behandlung. Die Effektorzellen IVSB und die Zielzellen Alex B wurden mit unterschiedlichen Verhältnissen zueinander ausgesät (Effektor-zu-Target-Verhältnis von 3:1 bis 1:6) und für 16 Stunden bei 37 °C kokultiviert. Während der Kokultur wurden ein Teil der Zellen mit 200 ng/ml MMP-7 behandelt (A). Ein Teil der IVSB wurde zusätzlich vor der Kokultur mit MMP-7 behandelt (B). Aufgetragen wurden die Effektor-Zielzellverhältnisse (E:T) und der Prozentsatz der Zytotoxizität der IVSB-Zellen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils drei Messwerten.

Die Inkubation der Alex B-Zellen mit den IVSB-Zellen führte zu spezifischen Lysen. Die Alex B-Zellen wurden bei einem E:T Verhältnis von 3:1 bis zu 92% lysiert. Die spezifische Lyse reduzierte sich mit der Abnahme der E/T-Verhältnisse. Gleichzeitig zeigte sich bei den Kokulturen mit MMP-7 Behandlungen, im Vergleich zu den unbehandelten Kulturen eine Abnahme der spezifischen Lyse. Dieser Effekt konnte bei allen getesteten E:T-Verhältnissen beobachtet werden. Nach zusätzlichen MMP-7 Behandlungen der IVSB-Zellen vor der Kokultur, verstärkte sich dieser Effekt deutlich. Die spezifische Lyse der Targetzellen, ohne zusätzliche Vorbehandlung der IVSB Zellen (A), verringerte sich bei Zugabe von MMP-7 um 2% bei einem E:T von 1:1 bis 10 % und bei einem E:T von 0,3:1. Bei einer zusätzlichen Vorbehandlung der IVSB-Zellen und Zugabe von MMP-7 während der Kultur (B) verringerte sich die spezifische Lyse der Targetzellen, bei einem E:T von 1:1, um mindestens 10% und um bis zu 20% bei E:T-Verhältnissen von 0,3 oder 0,1:1. Diese Ergebnisse zeigen, dass MMP-7 einen großen Einfluss auf die zytotoxische Aktivität der Zellen des IVSB-T-Zellklons hat, insbesondere wenn diese schon vor der Kokultur mit MMP-7 behandelt wurden.

3.4.5 T-Zellfunktionalität durch Antigenpräsentation nach MMP-7 Behandlung

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Zellen des T-Zellklons IVSB nach MMP-7 Behandlung eine verringerte zytotoxische Aktivität zeigen. Ob MMP-7 auch die Proliferation dieser T-Zellen trotz entsprechender Stimulation beeinflusst, soll in folgendem Versuch untersucht werden. Dafür wurden IVSB-Zellen mit verschiedenen Zellen unter dem Einfluss von MMP-7 kokubiert und die Proliferation durch CFSE-Markierung durchflusszytometrisch ermittelt. Als positive Kontrolle der Proliferation wurden die CFSE markierten IVSB-Zellen, wie im Methodenteil beschrieben, mit den autologen SK-Mel 29 Tumorzellen als Stimulatorzellen sowie der MHCII und HLA-A2 exprimierende EBV B-Zelllinie Alex B als Feederzellen stimuliert. Als negative Kontrolle wurden die IVSB ohne Stimulationszellen kultiviert. In einem weiteren Versuchsansatz wurden die IVSB-Zellen mit peptidbeladenen, primären, humanen DCs kultiviert. Dafür wurden DCs von einem HLA-A2 positiv getestetem Spender für eine Stunde mit 10 µg/ml des Tyrosinase-Peptids-2 (Ty-2) (YMNGTMSQV) behandelt. Dieses Peptid kann nach HLA-A2-Präsentation spezifisch von IVSB Zellen erkannt werden. Es wurden jeweils 1×10^6 CFSE-markierte IVSB-Zellen mit

0.3×10^6 Stimulationzellen (Alex +Sk-Mel oder DCs) für 5-7 Tage koinkubiert und anschließend mit der FACS-Methode vermessen.



Proliferationsmessung der IVSB Zellen. Gezeigt wird eine CFSE-Fluoreszenzmessung nach 6 Tagen Inkubation. Es wurden jeweils 1×10^6 CFSE-markierte IVSB-Zellen mit 0.3×10^6 Stimulationzellen (Alex + Sk-Mel oder DCs) koinkubiert. Während der Kultur wurden die Zellen mit 200 ng/ml MMP-7 behandelt oder blieben als Kontrolle unbehandelt. Dargestellt ist das CFSE- Signal proliferierender T-Zellen nach durchflusszytometrischer Messung. Die Proliferation korreliert mit einer schrittweisen Abschwächung des CFSE- Signals

Bei der CFSE-Markierung führte jede Zellteilung zu einer Aufteilung des CFSE- Fluoreszenzfarbstoffes auf die Tochterzellen. Mit zunehmender Proliferation nahm die gemessene Fluoreszenzintensität der Zellen ab. Der Peak mit der höchsten Fluoreszenzintensität repräsentiert dabei die ungeteilten Zellen, die Peaks mit schwächerer Fluoreszenzintensität stellen jeweils einen Zellteilungszyklus dar. Die Behandlung der IVSB-Zellen mit unbeladenen DCs wie auch die Kultur der IVSB-Zellen ohne jegliche koinkubierte Stimulationzellen, führte zu keinerlei Proliferationsaktivität. Nach sechs Tagen in Kultur zeigten die Histogramme der Fluoreszenzmessung dieser IVSB-Kulturen nur einen einzelnen Peak. Daher ist davon auszugehen, dass sich IVSB-Zellen durch fehlende Stimulation, unter diesen Kulturbedingungen, nicht teilen. Durch Kokultur der IVSB-Zellen mit den Feederzellen SK-Mel 29 und EBVB konnte eine Proliferation ermittelt werden. Die Histogramme der Zellen mit diesen Kulturbedingungen zeigten mehrere Peaks mit abnehmender Fluoreszenzintensität. Die Behandlung mit MMP-7 hatte bei dieser IVSB-

Kultur keinen messbaren Einfluss auf die Proliferation der T-Zellen. Anhand der Histogramme der IVSB-Zellen, kokultiviert mit peptidbeladenen DCs, konnte ebenfalls eine gesteigerte Proliferationsaktivität der CFSE markierten T-Zellen beobachtet werden. Hier führte die MMP-7 Inkubation der Kokultur zu einer verringerten Proliferation der IVSB-Zellen, im Vergleich zu den Kokulturen ohne MMP-7 Behandlung. Es ist zu vermuten, dass MMP-7 die Stimulation von IVSB-Zellen mit peptidbeladenen DCs beeinflusst und so möglicherweise zu einer verringerten Proliferation dieser T-Zellen führt.

4. Diskussion

4.1 Immunologische Konsequenzen einer MMP-7 Expression im Tumor

Die Funktion der Matrixmetalloprotease-7 (MMP-7) in physiologischen und pathogenen Prozessen der Zelle war und ist der Gegenstand von vielen Forschungsarbeiten. Erste Untersuchungen beschäftigten sich mit ihrer Funktion während des Auf- und Abbaus der Extrazellulären Matrix (EZM). Von MMP-7 weiß man, dass die Matrixkomponenten Fibronectin, Laminin-I, Gelatin, Elastin und Kollagen-Typ IV zu ihren Substraten zählen (Imai et al., 1995). Nachfolgende Veröffentlichungen zeigten, dass zu den Substraten der Matrixmetalloproteinasen auch viele Nicht-EZM-Moleküle gehören (McCawley and Matrisian, 2001). Da diese Substrate in eine Vielzahl physiologischer Prozesse involviert sind, beeinflussen MMPs sowohl homöostatische Funktionen, wie Wachstum, Gewebereparatur oder Immunität, als auch pathologische Prozesse, wie chronische Entzündungen, Fibrosen oder Krebs (Fu et al., 2008).

MMP-7 wird von vielen epithelialen und mesenchymalen Tumoren überexprimiert. Die funktionelle Eigenschaft von MMP-7 EZM-Proteine spalten zu können, führt zu einer verringerten Integrität der EZM und kann so die Invasion und Metastasierung von Krebszellen unterstützen. Höhere Konzentrationen von MMP-7 konnten in Tumoren von Magen, Darm, Leber und Bauchspeicheldrüse aber auch bei Haut-, Lungen-, Brust-, und Prostatakrebs nachgewiesen werden (Yamamoto et al., 1999; Aihara et al., 2005; Adachi et al., 1999; Yamamoto et al., 1997; Yamamoto et al., 2003; Jones et al., 2004; Bolon et al., 1997; Karelina et al., 1994; Heppner et al., 1996; Pajouh et al., 1991). Die Überexpression von MMP-7 in Tumorzellen kann nicht nur deren Ausbreitung und Metastasierung fördern, sondern auch die Sensitivität der Tumorzellen gegen Angriffe des Immunsystems. Die Spaltung von CD95 und CD95-Ligand durch MMP-7 wirkten anti-apoptotisch auf die Tumorzellen (Strand et al., 2004; Vargo-Gogola et al., 2002)). *In vivo* Versuche im Mausmodell konnten zeigen, dass MMP-7 die Entwicklung von Tumoren fördern konnte, während die Blockierung von MMP-7 durch antisense Oligonukleotide zu einer Reduktion der Tumorentwicklung führte (Hasegawa et al., 1998; Kioi et al., 2003; Wilson et al., 1997).

Neben CD95 und CD95L konnten eine Vielzahl von MMP-7 Substraten identifiziert und die Auswirkungen analysiert werden. Doch noch sind nicht alle Eigenschaften von MMP-7 und dessen Substraten bekannt.

Vorangegangene Untersuchungen in der Arbeitsgruppe Dr. Strand deuteten darauf hin, dass MMP-7 möglicherweise die Bildung von clathrinummantelten Vesikeln beeinflussen könnte. Durch 2-D-Gelelektrophoresen der Zellkulturüberstände von MMP-7 behandelten und unbehandelten Zellen wurde das Hitzeschockprotein Hsc70 im Überstand der MMP-7 behandelten Zellen entdeckt. Im Überstand von unbehandelten Zellen konnte Hsc70 nicht nachgewiesen werden. Hsc70 wurde als ein wichtiger Effektor bei der clathrinvermittelten Endozytose beschrieben (Yim *et al.*, 2005). *In vitro* Versuche im Labor Dr. Strand zeigten jedoch, dass weder Hsc70 noch Clathrin ein direktes Substrat von MMP-7 sind. Die Ergebnisse ließen allerdings vermuten, dass MMP-7 den Clathrin vermittelten Endozytosemechanismus beeinflussen kann. Über welchen Signalweg MMP-7 die Endozytose beeinflussen könnte blieb jedoch unklar.

In Bezug auf mögliche immunmodulatorische Effekte einer MMP-7 bedingten Reduktion der Endozytoseaktivität spielt die Antigenpräsentation eine wichtige Rolle. Eine funktionell wichtige Aufgabe bei der Antigenpräsentation haben dendritische Zellen, da sie in der Lage sind Antigene zu internalisieren zu prozessieren und diese anschließend zu präsentieren (Steinman, 1991; Banchereau and Steinman, 1998). Die Antigenpräsentation ist ein entscheidender Faktor für die T-Zellaktivierung. Eine Beeinträchtigung dieser Funktion durch MMP-7 könnte Tumorzellen einen Schutz vor Angriffen des Immunsystems bieten.

In früheren Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass sowohl die Erkennung von Antigenpräsentierenden Zellen (APZ), als auch deren endozytotische Eigenschaften durch viele Komplexe Mechanismen des Zytoskeletts reguliert werden (Billadeau *et al.*, 2007). Für diese Mechanismen ist die Polymerisation von Aktin essentiell. Die Aktinpolymerisation erfolgt als Reaktion auf äußere Signale. Ein Beispiel hierfür sind Signalübertragung von membranständigen Rezeptoren wie die Rezeptortyrosinkinasen EphB2 die über die Aktivierung von GTPasen eine wichtige Rolle bei der Aktinpolymerisation übernehmen (Irie and Yamaguchi, 2002).

Eine Veränderung des Eph-Rezeptorsignals könnte daher direkte Auswirkungen auf die Polymerisation von Aktin haben und somit auch auf die Endozytoseaktivität von Zellen. Zudem enthält die extrazelluläre Domäne von EphB2 zwei Fibronektindomänen, die eine mögliche Spaltstelle für MMP-7 darstellen (Imai *et al.*, 1995). Über eine Spaltung von EphB2

könnte MMP-7 indirekt die Antigenpräsentation beeinflussen und so die Immunantwort gegen MMP-7 exprimierende Tumorzellen schwächen. Daher beschäftigt sich diese Arbeit mit EphB2, als mögliches Substrat von MMP-7 und den daraus resultierenden immunologischen Konsequenzen.

4.2 Einfluss von MMP-7 auf die Endozytose

Die Veränderung des Clathrinlevels von Zellen unter dem Einfluss von MMP-7 wurde an Hek 293 EcR MMP-7 Zellen analysiert. Mit diesen Versuchen konnten die Ergebnisse der früheren Analysen bestätigt werden. Ausgehend von den Daten, dass Clathrin kein direktes MMP-7 Substrat ist, wurde die Expression von clathrinassoziierten Adaptermolekülen untersucht. Clathrinbindende Adapterproteine, wie das Adapterprotein 2 (AP-2) und AP-180 (Adapterprotein 180) sind essentiell für den Aufbau von clathrinumhüllter Vesikel (Morgan et al., 2000). Die Westernblotanalysen der Zellextrakte von MMP-7 induzierten und nativen Hek 293 EcR MMP-7 Zellen zeigten, dass MMP-7 keinen Einfluss auf die Expression der clathrinassoziierten Adapterproteine hatte.

Obwohl MMP-7 keinen direkten Einfluss auf Clathrin oder seine Adapterproteine zu haben schien, zeigte die Analysen der Transferrin und Dextran Aufnahme, dass MMP-7 wahrscheinlich zur Reduktion der Endozytoseaktivität von Hek 293 EcR MMP-7 Zellen führte. Die Induktion der MMP-7 Expression in diesen Zellen führte zu einer deutlich verminderten Transferrin- oder Dextranaufnahme.

Die Funktion des Aktinzytoskeletts während verschiedener Endozytosemechanismen wurde vielfach untersucht. Die veröffentlichten Analysen zur Polymerisation von F-Aktin im Zusammenspiel mit clathrinvermittelter Endozytose, Phagozytose und Makropinozytose führten zu den Vermutungen, dass Aktin die Bildung von clathrinummantelten Bläschen unterstützt, den Vesikeltransport innerhalb der Zelle forciert und den Einstülpungsvorgang der Plasmamembran bei der Phagozytose unterstützt (Merrifield *et al.*, 2002; Merrifield *et al.*, 1999; May and Machesky, 2001). Im Umkehrschluss konnte belegt werden, dass die Behandlung von Zellen mit Latunkulin A, ein Toxin zur Unterbindung der Aktinpolymerisation, zu einer Inhibierung der rezeptorvermittelten Endozytose führte (Lamaze *et al.*, 1997).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen der F-Aktinpolymerisation zeigten, dass auch MMP-7 einen negativen Einfluss auf die Polymerisation von Aktin hatte. Untersuchungen der F-Aktin Formation in nativen und MMP-7 induzierten Zellen zeigten eine starke Reduktion der F-Aktin Färbung mit Phalloidin-Alexa-488 nach induzierter MMP-7 Expression. Die Ergebnisse legen nahe, dass MMP-7 durch eine verminderte Aktin Polymerisation und die damit verbundene reduzierte Reorganisation des Zytoskeletts die Endozytoseaktivität der Zellen beeinflussen konnte. MMP-7 exprimierende Tumorzellen könnten über diesen Mechanismus die Endozytoseaktivität der sie umgebenden Immunzellen verändern und so einer Immunantwort entgehen oder diese zumindest schwächen.

4.3 Veränderte Aktivität von Ras- GTPasen durch MMP-7

Die Aktinpolymerisation wird durch äußere Signale ausgelöst zu denen sowohl Chemokine gehören als auch die Signal von membranständigen Rezeptoren, wie zum Beispiel EphB2 (Engqvist-Goldstein and Drubin, 2003; Irie and Yamaguchi, 2002). Die membranständigen Rezeptoren sind in der Lage über Signalübertragungen an GTPasen die Reorganisation des Zytoskellets zu beeinflussen (Hall, 1992). Hall beschrieb 1992, dass vor allem die Mitglieder der Ras- GTPasen- Superfamilie an der Signalübertragung zum Zytoskelett beteiligt sind. Die Untersuchungen zur Aktivierung von kleinen GTPasen zeigten, dass MMP-7 auf die GTPase-Aktivierung reduzierend wirkt. ELISA-Analysen zur Detektion und Quantifizierung von GTP-gebundenen Ras-GTPasen aus Zellextrakten (aus MMP-7 induzierten Hek 293 EcR MMP-7 Zellen) führten zu deutlich niedrigeren Signalen, im Vergleich zu Extrakten aus unbehandelten Zellen. Wahrscheinlich konnte die Aktinpolymerisation über den Signalweg der GTPasen von MMP-7 moduliert werden.

4.4 MMP-7 vermittelte Spaltung von EphB2

EphB2 gehört zu den membranständigen Rezeptortyrosinkinasen deren Rolle als Aktivator von GTPasen während der Aktinpolymerisation beschrieben wurde (Bruckner and Klein, 1998). In dieser Arbeit wurde dargestellt, dass EphB2 von MMP-7 gespalten werden konnte.

Untersuchungen an Hek 293 EcR MMP- Zellen offenbarten eine verminderte Expression des EphB2-Rezeptors auf der Zelloberfläche nach induzierter MMP-7 Expression. Eine verminderte Expression des EphB2-Rezeptors durch MMP-7 auf mRNA-Ebene konnte durch RT-PCR Analysen mit entsprechenden Primern ausgeschlossen werden. Daher war anzunehmen, dass MMP-7 in der Lage ist EphB2 auf der Zelloberfläche, also in der extrazellulären Domäne des Rezeptors, zu spalten. Diese Hypothese konnte *in vitro* durch eine Spaltung von rekombinanten EphB2-Rezeptorproteinen nach MMP-7 Inkubation belegt werden. Die Sequenzanalyse der EphB2-Spaltprodukte ermittelte die Spaltstelle von MMP-7 im ersten Fibronectinmotiv der extrazellulären Domäne des EphB2-Rezeptors. Die Spaltung des EphB2-Rezeptors an dieser Stelle war erwartet worden, da Fibronectin ein bekanntes Substrat von MMP-7 ist (Imai et al., 1995).

Eine Spaltung von EphB2, vermittelt durch die Metallopeptidase ADAM10, wurde von Litterst *et al.* beschrieben. Diese Schnittstelle liegt sieben Aminosäuren oberhalb der in dieser Arbeit analysierten Schnittstelle von MMP-7. Die ADAM10-vermittelte Spaltung von EphB2 wurde als ein physiologischer Prozess nach Aktivierung des Rezeptors durch Ligandenbindung beschrieben und könnte eine wichtige Etappe der Internalisierung des Rezeptors darstellen (Litterst *et al.*, 2007).

4.5 Einfluss von EphB2 auf die Aktinpolymerisation

Eine Reduktion der Aktinpolymerisation unter dem Einfluss von MMP-7 wurde bereits diskutiert. Die gezeigte Spaltung von EphB2 durch MMP-7 wäre eine mögliche Erklärung für die verringerte Polymerisation von Aktin. Wie schon beschrieben wurden, ist EphB2 in der Lage über Signalübertragungen an GTPasen die Reorganisation des Zytoskellets zu beeinflussen. Himanen *et al.* beschrieben 2004, dass die Bindung des Ephrin A5-Liganden zur Aktivierung des EphB2-Rezeptorsignals führte (Himanen et al., 2004). Die von Himanen *et al.* durchgeführte Behandlung von Cos-1 Zellen mit EphrinA5 überexprimierenden Hek 293 Zellklonen führte zu einer veränderten Morphologie der Cos-1-Zellen, die auf eine Reorganisation des Aktinzytoskellets deutete.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Inkubation von nicht induzierten Hek 293 EcR MMP-7 Zellen mit rekombinanten Ephrin A5 führte auch zu einer zeitabhängigen Steigerung der F-Aktininformation in der Zelle. Analysen der Ephrin A5-Expression durch RT-PCR führten zu

der Erkenntnis, dass Hek 293 EcR Zellen Ephrin A5 physiologisch exprimieren. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass die EphB2-Rezeptoren durch Ephrin A5-tragende Nachbarzellen stimuliert werden und die Zugabe von rekombinantem Ephrin A5 nur eine leichte Steigerung der natürlichen Rezeptoraktivität bewirkte. Die Zeitabhängigkeit der Ephrin A5-Stimulation ist wahrscheinlich auf die Beobachtung von Litterst *et al.* zurückzuführen, dass Ligandenbindung zu einer Spaltung und Internalisierung von EphB2 führt, um so die Dauer der Rezeptoraktivität zu begrenzen.

Im Gegensatz dazu konnte nach induzierter MMP-7 Expression in Hek 293 EcR MMP-7 Zellen keine Steigerung der EphB2-Rezeptoraktivität durch EphrinA5 beobachtet werden. Die F-Aktin Formation nahm nach EphrinA5 Inkubation nicht zu und blieb, im Vergleich zu den nicht induzierten Zellen, auf einem niedrigeren Niveau. Die MMP-7 induzierte Reduktion der EphB2-Oberflächenexpression könnte einer Stimulation der Rezeptoraktivität durch Ligandenbindung entgegen gewirkt haben. Durch die MMP-7 bedingte Spaltung des EphB2 Rezeptors auf der Zelloberfläche wurde dessen Signaltransduktion unterbrochen und die Polymerisation von Aktin nicht oder unzureichend stimuliert.

4.6 Aktivierung von Cdc42 und Rac1 durch EphB2

Eine Verbindung zwischen der MMP-7 vermittelten Spaltung von EphB2 und der reduzierten Aktinpolymerisation konnte nach Analyse der Aktivität von GTPasen hergestellt werden. In Zellextrakten aus MMP-7 induzierten Hek 293 EcR MMP-7 Zellen wurde, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen und im Vergleich zum Gesamtanteil von Cdc42 und Rac1 in den Zellen, deutlich weniger der aktiven/GTP gebundene Form von Cdc42 und Rac1 detektiert. Im Gegensatz dazu führte eine Behandlung der Hek 293 EcR MMP-7 mit EphrinA5, bei den nicht induzierten Zellen, zu einer leichten Steigerung der GTPase-Aktivität. Dieser Zusammenhang wurde auch in der Literatur beschrieben. So konnte die Reorganisation des Aktinzytoskeletts über Cdc42 durch EphB2 Rezeptorsignale beeinflusst werden (Murai and Pasquale, 2003; Irie and Yamaguchi, 2002). Die Interaktion von EphB2 mit Cdc42 erfolgt jedoch nicht direkt, sondern über die Aktivierung von Guanin Austauschfaktoren (*engl.*: GEF) wie Intersektin (Nishimura *et al.*, 2006). Misra und Ziff konnten zudem zeigen, dass EphB2 über die GEFs Kalirin und Tiam1 mit Rac1 interagieren

konnte, was auch in diesem Fall zu Veränderungen im Aktinzytoskelett führte (Misra and Ziff, 2005).

4.7 Einfluss von MMP-7 auf die Endozytose von dendritischen Zellen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MMP-7 in der Lage ist den EphB2-Rezeptor an der Zelloberfläche zu spalten. In Versuchen mit MMP-7 überexprimierenden Hek 293 EcR MMP-7 Zellen wurde eine Veränderung der Endozytose festgestellt. Diese war wahrscheinlich eine Auswirkung der reduzierten Aktinpolymerisation, ausgelöst durch die MMP-7 induzierte Spaltung von EphB2. Die Beeinträchtigung der Endozytose ist im Hinblick auf mögliche immunmodulatorische Eigenschaften von MMP-7, besonders bei Antigenpräsentierenden-Zellen von großer Bedeutung. Aus diesem Grund wurden die vorherigen Analysen mit primären, humanen DCs wiederholt. Besondere Bedeutung hatte hier die Untersuchungen der Endozytose unter MMP-7 Einfluss, daher wurden für die Versuche unreife DCs verwendet. Frühere Forschungen belegten, dass DCs während der Reifung ihre endozytotische Aktivität verlieren. Im Vergleich zu unreifen DCs, konnte in terminal ausdifferenzierten DCs keine, für die Antigenpräsentation essentielle, phagozytische oder pinozytische Aktivität ermittelt werden (Sallusto et al., 1995; Shortman and Liu, 2002). Diese Ergebnisse konnten auch in dieser Arbeit beobachtet werden. DCs, entnommen am vierten Tag der Reifung aus Monozyten, wiesen eine wesentlich höhere Transferrinaufnahmeaktivität auf als DCs, die am 11. Tag der Reifung für den Versuch entnommen wurden.

Die anschließenden Ergebnisse mit unreifen, humanen DCs bestätigen die Beobachtung der Versuche mit Hek 293 EcR MMP-7 Zellen. Auch mit DCs konnte unter dem Einfluss von MMP-7 eine verminderte EphB2-Oberflächenexpression nachgewiesen werden. Zudem belegen die Daten aus Transferrin- und Dextanaufnahmeassays eine geringere endozytotische Aktivität der unreifen DCs nach MMP-7 Inkubation. Wahrscheinlich war auch hier die Beeinträchtigung der Endozytose durch verminderte Polymerisation von Aktin eine Folge der MMP-7 Inkubation. Der mögliche Einfluss der MMP-7 vermittelten Spaltung von EphB2 auf die Polymerisation von Aktin wurde durch Analysen der GTPasen-Aktivitäten in unreifen DCs gezeigt. Sowohl die aktive/GTP-gebundene Form von Rac1 als auch die von Cdc42 wurde unter Einfluss von MMP-7 in unreifen DCs drastisch reduziert. Ein Zusammenhang zwischen der Endozytoseaktivität und der Aktivität der kleinen GTPase Cdc42 konnte bereits

gezeigt werden (Irie and Yamaguchi, 2002). So wurden in unreifen DCs wesentlich höhere Konzentrationen von Cdc42 festgestellt als in reifen DCs. In transfizierten DCs führte die Stimulation von Cdc42, durch eine induzierte Überexpression von GEFs, zu einer Hochregulation der Makropinozytose in reifen DCs (Garrett *et al.*, 2000). Im Umkehrschluss führte eine Transfektion von unreifen DCs mit einem dominant negativen Cdc42-Vektorkonstrukt zu einer stark reduzierten endozytotischen Aktivität dieser DCs (Shurin *et al.*, 2005).

4.8 MMP-7 Expression in dendritischen Zellen

Über einen physiologischen Einfluss von MMP-7 während der Reifung von DCs wurde bisher noch nicht berichtet. Die hier durchgeführten Analysen der MMP-7 Konzentration im Zellkulturüberstand reifender DCs deuten auf eine verstärkte Sekretion von MMP-7 während den frühen Tagen der Reifung hin. Bisher wurden im Bezug auf Antigenpräsentierenden-Zellen nur bei Makrophagen eine MMP-7 Sekretion nachgewiesen (Webster and Crowe, 2006; Burke, 2004). Es wurde berichtet, dass die Sekretion von MMP-7 in Makrophagen durch Endotoxine, Zytokine oder Hormone ausgelöst werden kann. So führte die Stimulation von Makrophagen mit LPS zu verstärkter MMP-7 Expression (Busiek *et al.*, 1995). Eine mögliche Funktion der MMP-7 Expression in Makrophagen ist die Sekretion von TNF- α durch die Makrophagen, die von MMP-7 unterstützt wird (Burke, 2004). Ob MMP-7 auch eine Rolle während der DC-Reifung spielt, wurde bis jetzt nicht beschrieben. Auffällig ist, dass die Beobachtungen dieser Arbeit über die reduzierte Cdc42-Aktivierung und der verminderten endozytotischen Aktivität nach MMP-7 Behandlung auch als natürliche Prozesse der DC-Reifung beschrieben wurden, allerdings ohne Bezug zu MMP-7 Expressionen. Gegen eine Rolle von MMP-7 während der Reifung von DCs sprechen die Ergebnisse der Untersuchungen mit murinen DCs aus MMP-7 Knockoutmäusen. Zwischen murine DCs aus C57Bl/6- Kontrollmäusen und DCs aus MMP-7 Knockoutmäusen konnten keine Unterschiede in der Reifung oder Endozytose festgestellt werden.

4.9 Einfluss von MMP-7 auf die Aktinpolymerisation in T-Zellen

Der Einfluss von MMP-7 auf die Aktinpolymerisation in T-Zellen war ein weiterer Untersuchungsschwerpunkt dieser Arbeit. Eine verminderte Aktinpolymerisation nach MMP-7 Behandlung oder induzierter MMP-7 Expression konnte in Hek 293 EcR MMP-7 Zellen und primären, unreifen DCs beobachtet werden. Die weiterführenden Versuche zeigten in diesen Zellen eine verminderte endozytotische Aktivität in Gegenwart von MMP-7. Die Ergebnisse der Versuche deuteten darauf hin, dass eine reduzierte Aktinpolymerisation eine Ursache für die verringerte Endozytose von DCs und Hek 293 EcR MMP-7 Zellen in Gegenwart von MMP-7 war. Für die Untersuchung der T-Zellen konzentrierten sich die Versuche auf die Aktinpolymerisation. Unter dem Einfluss von MMP-7 wurden zudem die Proliferation von T-Zellen nach Stimulation und deren Zytotoxizität untersucht.

Billadeau *et al* beschrieben, dass die effiziente Erkennung von Antigenpräsentierenden Zellen und deren endozytotische Eigenschaften ein entscheidender Faktor für die T-Zellaktivierung ist, der durch viele komplexe Mechanismen des Zytoskeletts reguliert wird (Billadeau *et al.*, 2007). Für diese Mechanismen ist die Polymerisation von Aktin essentiell.

Die hier durchgeführten Versuche zur Aktinpolymerisation in humane, primäre CD4⁺- CD8⁺-T-Zellen und Zellen der T-Zelllinie IVSB zeigten eine deutlich reduzierte F-Aktin-Färbung nach MMP-7 Behandlung. Die Anwesenheit von MMP-7 schien auch in T-Zellen zu einer verminderten Aktinpolymerisation zu führen. Die Ergebnisse belegten zudem, dass diese Beobachtung unabhängig von der Art der T-Zelle ist. Die verminderte F-Aktin Färbung nach MMP-7 Behandlung konnte sowohl in humanen, primären CD4⁺-und CD8⁺-T-Zellen, als auch in Zellen der T-Zelllinie IVSB nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung für die verminderte Aktinpolymerisation in T-Zellen nach MMP-7 Behandlung lieferte die Analyse der EphB2-Oberflächenexpression auf diesen Zellen. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigten einen verminderten Nachweis von EphB2 auf den Zellen, wenn diese vorher mit MMP-7 inkubiert wurden. Dies bestätigte die Ergebnisse dieses Versuchs mit humanen DCs und Hek 293 EcR MMP-7 Zellen. Auch hier waren die Ergebnisse von T-Zelltyp unabhängig und ließen sich in primären humanen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, als auch in Zellen der T-Zelllinie IVSB reproduzieren. Die Ergebnisse verdeutlichen die Vermutung, dass eine MMP-7 bedingte Spaltung von EphB2 auf der Zelloberfläche zu einer reduzierten Polymerisation von Aktin führte. Durch die Spaltung von EphB2 wurde wahrscheinlich die Stimulation von EphB2 durch seine Liganden herabgesetzt und somit die Signaltransduktion des Rezeptors in die Zelle reduziert. Dies könnte die Aktivierung von kleinen GTPasen

negativ beeinträchtigt haben und so auch indirekt die Polymerisation von Aktin beeinflusst haben.

Die Rolle des Zytoskeletts bei der Aktivierung von T-Zellen wurde mehrfach untersucht. Gezeigt wurde bereits, dass die Aktinfilamente (F-Aktin) für die Morphologie, die Formbarkeit und Beweglichkeit der T-Zellen verantwortlich sind (Sancho *et al.*, 2002). Die Restrukturierung des Zytoskeletts wurde als essentieller Prozess für die Bildung von immunologischen Synapsen und die Strukturierung der Rezeptorenexpression an der Zelloberfläche, dargestellt (Tskvitaria-Fuller *et al.*, 2003; Krummel *et al.*, 2000). Während des Kontakts von T-Zellen zu Antigenpräsentierenden-Zellen konnte neben der Polarisation der T-Zelle auch eine verstärkte F-Aktin Polymerisation beobachtet werden (Bunnell *et al.*, 2001; Valitutti *et al.*, 1995). In der Literatur wurden aktinregulierende-, aktinbildende- und aktinspaltende Proteine beschrieben (zu denen auch Cdc42 und Rac1 gezählt werden), die durch ihre Aktivität die Polymerisation von F-Aktin in T-Zellen regulieren (Turner and Billadeau, 2002).

Die in dieser Arbeit beobachtete verminderte Oberflächenexpression von EphB2 bei MMP-7 behandelten T-Zellen könnte eine mögliche Erklärung für die veränderte Aktinpolymerisation dieser Zellen gewesen sein. Durch Spaltung des EphB2-Rezeptors von der Zelloberfläche wurde wahrscheinlich dessen Signaltransduktion über GTPasen bis zur Stimulation der Aktinpolymerisation verringert.

4.10 Immunologische Auswirkungen von MMP-7 auf T-Zellen

Die immunologischen Folgen der reduzierten Aktinpolymerisation auf MMP-7 behandelte T-Zellen konnte durch Analyse der T-Zellzytotoxizität gezeigt werden. Die Inkubation mit MMP-7 in einer Kokultur mit IVSB T-Zellen und den Targetzellen AlexB führte zu einer verminderten Zytotoxizität der T-Zellen. Die spezifische Lyseaktivität der IVSB-Zellen verringerte sich unter dem Einfluss von MMP-7 um bis zu 10% im Vergleich zu den Kokulturversuchen ohne MMP-7 Zugaben. Wurden die Zellen des T-Zellklons IVSB nicht nur während, sondern bereits vor der Kokultur mit MMP-7 inkubiert, reduzierte sich die spezifische Lyse der Targetzellen um bis zu 20%.

Den Zusammenhang von Aktinpolymerisation mit der Aktivität von T-Zellen wurde von Campi *et al.* beschrieben. So führte eine Behandlung von T-Zellen mit Latrunculin A, einem

Inhibitor der Aktinpolymerisation, zu einer Inhibition der Bildung von T-Zellrezeptor-Mikroclustern und der Fähigkeit der betroffenen T-Zelle, mit MHC II-Peptidkomplexen in Kontakt zu treten (Campi et al., 2005). Untersuchungen dieser Arbeit lassen vermuten, dass MMP-7 ähnliche Auswirkungen auf T-Zellen haben könnte. Eine MMP-7 bedingte Reduktion der Aktinpolymerisation in T-Zellen könnte Tumorzellen vor Angriffen des Immunsystems schützen.

Dass MMP-7 nicht nur die zytotoxische Aktivität von T-Zellen beeinflusst, sondern möglicherweise auch deren Proliferation nach Antigenstimulation, konnte in nachfolgenden Versuchen gezeigt werden. Hierfür wurde die Proliferation der Zellen des T-Zellklons IVSB durch CFSE-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Kontrollen von IVSB-Kulturen, die mit unbeladenen DCs oder gänzlich ohne Feederzellen kultiviert wurden, zeigten keine messbaren Proliferation. Bei den IVSB-Kulturen, die mit peptidbeladenen DCs stimuliert wurden, konnte unter dem Einfluss von MMP-7 eine drastisch verringerte Proliferation beobachtet werden. Während IVSB-Zellen mit dieser Stimulation, ohne der Zugabe von MMP-7, nach fünf Tagen drei Zellteilungszyklen durchliefen, konnte bei Zellen mit MMP-7 Behandlung nur noch ein Zellteilungszyklus analysiert werden. Überraschenderweise wurde bei der im Methodenteil beschriebenen IVSB Restimulation kein Unterschied der Proliferation nach MMP-7 Behandlung festgestellt. Mit und ohne MMP-7 Behandlung konnten bei dieser IVSB- Restimulationsmethode drei Zellteilungszyklen innerhalb von fünf Tagen analysiert werden. Ausgehend von diesen Ergebnissen schien MMP-7 die Stimulation von IVSB Zellen durch antigenpräsentierende Zellen negativ zu beeinflussen. Auch hierfür könnte die reduzierte Aktinpolymerisation unter dem Einfluss von MMP-7 verantwortlich sein. So wurde beschrieben, dass die selektive Blockierung der Aktindynamik in T-Zellen zu einer stark verminderten Akkumulation der T-Zellrezeptoren (TZR) mit dem MHC- Komplex von Antigenpräsentierenden Zellen führte und als Konsequenz daraus zu einer verringerten T-Zellproliferation (Tskvitaria-Fuller et al., 2003). Zudem wurde in der Literatur beschrieben, dass die Spaltung des Aktinzytoskeletts die Aktivierung von T-Zellen durch peptidbeladene APC verhindert, nicht aber die Aktivierung durch Crosslinken des TZR mit löslichen Antikörpern (Valitutti *et al.*, 1995). Im Vergleich zu diesen Daten ist es wahrscheinlich, dass MMP-7 über die Spaltung von EphB2 die Aktinpolymerisation und dadurch die Aktivität von T-Zellen vermindern konnte. Besonders die Stimulation der T-Zellen durch peptidbeladene APZ wurde anscheinend durch MMP-7 reduziert. Allerdings ist zu vermuten, dass die reduzierte Aktinpolymerisation nicht die einzige Ursache für die verminderte Zytotoxizität

der MMP-7 behandelten IVSB-T-Zellen war. Die Veränderung der Zytotoxizität von T-Zellen beziehungsweise die erhöhte Überlebensrate ihrer Targetzellen unter dem Einfluss von MMP-7 wurde schon in früheren Studien untersucht und diskutiert. *In vivo* und *in vitro* Versuche zeigten eine Veränderung der Apoptosesensitivität von MMP-7 behandelten oder überexprimierenden Targetzellen gegenüber T-Zellen oder pro-apoptotische Detergenzien (Vargo-Gogola et al., 2002; Powell et al., 1999). Diese Beobachtungen wurden auf die Fähigkeit von MMP-7 zurückgeführt sowohl CD95 als auch den CD95 Liganden (CD95-L) spalten zu können (Vargo-Gogola et al., 2002; Strand et al., 2004). Während die Spaltung von CD95 durch MMP-7 eindeutig anti-apoptotische Wirkungen auf Targetzellen zu haben schien, wird die Auswirkungen der MMP-7 vermittelten Spaltung von CD95-L auf die Apoptose kontrovers diskutiert. So wurde gezeigt, dass die Spaltung von CD95-L anti-apoptotische auf MMP-7 überexprimierende Tumorzellen wirkte und ihnen damit einen Überlebensvorteil verschaffen konnte (Mitsiades et al., 2001; O'Connell et al., 1999). Gleichzeitig wirkte die MMP-7 vermittelte Spaltung von CD95-L in seine lösliche Form pro apoptotische auf Epithelzellen (Powell et al., 1999). Anhand dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass MMP-7 einen großen Einfluss auf die CD95 und CD95-L vermittelte Apoptose ausüben kann. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass MMP-7 die Zytotoxizität der in dieser Arbeit untersuchten IVSB-Zellen, nicht allein durch den Rückgang der Aktinpolymerisation beeinflusste.

5.11 Ausblick

Ein interessantestes Ergebnis dieser Arbeit ist die Spaltung von EphB2 durch MMP-7. Unter dem Einfluss von MMP-7 konnte eine Reduktion der EphB2-Expression auf Zelloberflächen belegt werden. Zudem wurde die Schnittstelle der MMP-7 induzierten Spaltung von EphB2 bestimmt. Die Aktivierung der kleinen GTPasen Rac1 und Cdc42 wurde unter MMP-7 Einfluss stark reduziert. Diese GTPasen können durch die EphB2-Rezeptorsignalkaskade aktiviert werden und spielen eine wichtige Rolle bei der Aktinpolymerisation (Irie and Yamaguchi, 2002). Daher ist die Beeinträchtigung der Rezeptorsignalfunktion von EphB2 durch MMP-7 eine wahrscheinliche Erklärung für die ermittelte reduzierte Polymerisation von F-Aktin durch MMP-7. Weitere Versuche dieser

Arbeit ließen einen Zusammenhang zwischen der reduzierten Aktinpolymerisation und der verminderten Endozytose in MMP-7 behandelten Zellen erkennen.

Der genaue Signalweg von EphB2 bis zur Aktinpolymerisation konnte abschließend nicht vollkommen aufgeklärt werden. Es bleibt zu untersuchen, über welche GEFs im Zusammenhang mit der Aktinpolymerisation die Aktivität von Cdc42 und Rac1 beeinflusst werden kann. Zudem muss geklärt werden, welche GEF durch MMP-7 bedingte Spaltungen von EphB2 nicht mehr stimuliert werden konnte beziehungsweise in seiner Aktivität eingeschränkt wurde. Besonders Interesse sollte hierbei auf Intersektin und Kalerin liegen, von denen bekannt ist, dass sie von EphB2 aktiviert werden können und Einfluss auf die Aktivität von Cdc42 und Rac1 haben (Nishimura et al., 2006; Misra and Ziff, 2005). Auch der Einfluss von MMP-7 auf die den GTPasen nachgeschalteten Molekülen in der Aktinpolymerisationssignalkaskade wie N-WASP und der Arp2/3 Komplex sollte untersucht werden.

Eine Beeinträchtigung der endozytotischen Aktivitäten von DCs konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Inwieweit diese Veränderungen auch Einfluss auf die Antigenaufnahme und Antigenprozessierung der DCs hat könnte in nachfolgenden Analysen weiter erforscht werden.

Weitere Versuche dieser Arbeit ließen vermuten, dass eine verminderte Aktinpolymerisation auch die T-Zellstimulation beeinträchtigen konnte. Die genaue Einflussnahme der MMP-7 bedingten Reduktion der Aktinpolymerisation bei der Aktivierung von T-Zellen durch Antigenpräsentierende Zellen konnte in dieser Arbeit nicht endgültig geklärt werden. Diese Ergebnisse bieten einen viel versprechenden Ausgangspunkt für weitere Analysen.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APC	Antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
APS	Ammoniumpersulphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphate
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum Albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
°C	Grad Celsius
CD	Oberflächenantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
Cdc42	Zellteilungszyklus 42 (<i>Cell division cycle 42</i>)
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
CMV	Zytomegalievirus (<i>cytomegalovirus</i>)
CFSE	Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt (<i>cytotoxic T lymphocyte</i>)
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DMEM	<i>Dulbeccos modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulphoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
E-Cadherin	Epithel Catherin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler-Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
eGFP	verbessertes grünfluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescence protein</i>)
ELISA	Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>)
engl.	englisch
Eph	<i>Erythropoetinproducing hepatocellular receptor</i>
Erk	Extrazelluläre Rezeptorkinase
E:T	Effektor-zu-Target-Verhältnis
EZM	Extrazelluläre Matrix
Fa.	Firma
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter (<i>fluorescence activated cell sorter</i>)
F-Aktin	Aktinfilamente (filamentous actin)
FCS	Fötale Kälberserum (<i>foetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung ($g = 9,80665 \text{ m/s}^2$)
GEF	Guanin- Austauschfaktoren (<i>guanine-nucleotide exchange factors</i>)
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
GPI	<i>Glycosylphosphatidylinositol</i>
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde/Stunden
HEK	Humane Embryonale Niere (<i>human embryonic kidney</i>)
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horseradish peroxidase</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
mAb	monoklonaler Antikörper (<i>monoclonal antibody</i>)
MACS	Magnetische Zelltrennung (<i>magnetic cell sorting</i>)
MEM	<i>minimal essential medium</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
μ g	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute/Minuten
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MMP	Matrix Metalloproteinase
MT-MMP	Membranständige Metalloproteinase
mRNA	messenger ribonucleic acid
mt.	mutiert
ng	Nanogramm
N-WASP	Neurales Wiskott Aldrich Syndrom Protein
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	Periphere mononukleare Zellen (<i>peripheral blood monocytes</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDZ	<i>postsynaptic density protein, discs large, zonaoccludens</i>
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PUMP	Putative Metalloproteinase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rac1	RAS ähnliches C3 Botulinumtoxin Substrat 1 (<i>ras-related C3 botulinum toxin</i>)
RAS	Ratten-Sarkom (<i>rat sarcoma substrate 1</i>)
RASI-1	Rheumatoide arthritische Synovia Inflammation-1
Rho	RAS-entsprechendes Guanintriphosphatras (<i>homologous guanosine triphosphatases</i>)
RLU	Relative Lumineszenzeinheit (<i>relative luminescence unit</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
RT	Real time/ Reverse transcriptase
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SAM	stabiles α - Motiv
SDS	Sodiumdodecylsulphat
TAA	Tumorassoziertes Antigen (<i>tumor associated antigen</i>)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TCR	T-Zellrezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TGF	Transforming growth factor
TIMPs	Gewebsspezifische Metalloproteinasen-Inhibitoren (<i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor
Ty-2	Tyrosinase-Peptid-2
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
WASP	Wiskott Aldrich Syndrom Protein
Wnt	Wingless
wt.	Wildtyp

Abkürzungen für Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Aspartat
E	Glutamat
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

Literaturverzeichnis

- Abram, C.L. and Courtneidge, S.A. (2000). Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. *Exp. Cell Res.* 254, 1-13.
- Adachi, Y., Yamamoto, H., Itoh, F., Hinoda, Y., Okada, Y., and Imai, K. (1999). Contribution of matrilysin (MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers. *Gut* 45, 252-258.
- Aihara, R., Mochiki, E., Nakabayashi, T., Akazawa, K., Asao, T., and Kuwano, H. (2005). Clinical significance of mucin phenotype, beta-catenin and matrix metalloproteinase 7 in early undifferentiated gastric carcinoma. *Br. J. Surg.* 92, 454-462.
- Anderson, R.G. (1992). Multiple endocytic pathways. *J. Invest Dermatol.* 99, 7S-9S.
- Arneson, L.S., Kunz, J., Anderson, R.A., and Traub, L.M. (1999). Coupled inositide phosphorylation and phospholipase D activation initiates clathrin-coat assembly on lysosomes. *J. Biol. Chem.* 274, 17794-17805.
- Austyn, J.M. (2000). Antigen-presenting cells. Experimental and clinical studies of dendritic cells. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 162, S146-S150.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 767-811.
- Banchereau, J. and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Billadeau, D.D., Nolz, J.C., and Gomez, T.S. (2007). Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 131-143.
- Boguski, M.S. and McCormick, F. (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366, 643-654.
- Bolon, I., Devouassoux, M., Robert, C., Moro, D., Brambilla, C., and Brambilla, E. (1997). Expression of urokinase-type plasminogen activator, stromelysin 1, stromelysin 3, and matrilysin genes in lung carcinomas. *Am. J. Pathol.* 150, 1619-1629.
- Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M.C., and Steinman, R.M. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8⁺ T cell tolerance. *J. Exp. Med.* 196, 1627-1638.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Bretscher, P. and Cohn, M. (1970). A theory of self-nonsel discrimination. *Science* 169, 1042-1049.
- Bruckner, K. and Klein, R. (1998). Signaling by Eph receptors and their ephrin ligands. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8, 375-382.

- Bunnell,S.C., Kapoor,V., Tribble,R.P., Zhang,W., and Samelson,L.E. (2001). Dynamic actin polymerization drives T cell receptor-induced spreading: a role for the signal transduction adaptor LAT
1. *Immunity*. *14*, 315-329.
- Burke,B. (2004). The role of matrix metalloproteinase 7 in innate immunity. *Immunobiology* *209*, 51-56.
- Busiek,D.F., Baragi,V., Nehring,L.C., Parks,W.C., and Welgus,H.G. (1995). Matrilysin expression by human mononuclear phagocytes and its regulation by cytokines and hormones. *J. Immunol.* *154*, 6484-6491.
- Campi,G., Varma,R., and Dustin,M.L. (2005). Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *J. Exp. Med.* *202*, 1031-1036.
- Comoglio,P.M. and Trusolino,L. (2005). Cancer: the matrix is now in control. *Nat. Med.* *11*, 1156-1159.
- Diaz,N., Suarez,D., and Sordo,T.L. (2006). Quantum chemical study on the coordination environment of the catalytic zinc ion in matrix metalloproteinases. *J. Phys. Chem. B* *110*, 24222-24230.
- Dunsmore,S.E., Saarialho-Kere,U.K., Roby,J.D., Wilson,C.L., Matrisian,L.M., Welgus,H.G., and Parks,W.C. (1998). Matrilysin expression and function in airway epithelium. *J. Clin. Invest* *102*, 1321-1331.
- Engqvist-Goldstein,A.E. and Drubin,D.G. (2003). Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *19*, 287-332.
- Fanger,N.A., Wardwell,K., Shen,L., Tedder,T.F., and Guyre,P.M. (1996). Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J. Immunol.* *157*, 541-548.
- Fraser,I.P., Koziel,H., and Ezekowitz,R.A. (1998). The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin. Immunol.* *10*, 363-372.
- Fu,X., Parks,W.C., and Heinecke,J.W. (2008). Activation and silencing of matrix metalloproteinases. *Semin. Cell Dev. Biol.* *19*, 2-13.
- Gale,N.W., Flenniken,A., Compton,D.C., Jenkins,N., Copeland,N.G., Gilbert,D.J., Davis,S., Wilkinson,D.G., and Yancopoulos,G.D. (1996). Elk-L3, a novel transmembrane ligand for the Eph family of receptor tyrosine kinases, expressed in embryonic floor plate, roof plate and hindbrain segments. *Oncogene* *13*, 1343-1352.
- Gallucci,S. and Matzinger,P. (2001). Danger signals: SOS to the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* *13*, 114-119.
- Garrett,W.S., Chen,L.M., Kroschewski,R., Ebersold,M., Turley,S., Trombetta,S., Galan,J.E., and Mellman,I. (2000). Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell* *102*, 325-334.
- Gogolak,P., Rethi,B., Hajas,G., and Rajnavolgyi,E. (2003). Targeting dendritic cells for priming cellular immune responses. *J. Mol. Recognit.* *16*, 299-317.

- Gordon,S. (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111, 927-930.
- Greenberg,P.D. (1991). Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. *Adv. Immunol.* 49, 281-355.
- GROSS,J. and LAPIERE,C.M. (1962). Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 48, 1014-1022.
- Guermonez,P., Valladeau,J., Zitvogel,L., Thery,C., and Amigorena,S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 621-667.
- Guo,D.L., Zhang,J., Yuen,S.T., Tsui,W.Y., Chan,A.S., Ho,C., Ji,J., Leung,S.Y., and Chen,X. (2006). Reduced expression of EphB2 that parallels invasion and metastasis in colorectal tumours. *Carcinogenesis* 27, 454-464.
- Hall,A. (1992). Ras-related GTPases and the cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* 3, 475-479.
- Hasegawa,S., Koshikawa,N., Momiyama,N., Moriyama,K., Ichikawa,Y., Ishikawa,T., Mitsuhashi,M., Shimada,H., and Miyazaki,K. (1998). Matrilysin-specific antisense oligonucleotide inhibits liver metastasis of human colon cancer cells in a nude mouse model. *Int. J. Cancer* 76, 812-816.
- Haucke,V. and De Camilli,P. (1999). AP-2 recruitment to synaptotagmin stimulated by tyrosine-based endocytic motifs. *Science* 285, 1268-1271.
- Heppner,K.J., Matrisian,L.M., Jensen,R.A., and Rodgers,W.H. (1996). Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am. J. Pathol.* 149, 273-282.
- Himanen,J.P., Chumley,M.J., Lackmann,M., Li,C., Barton,W.A., Jeffrey,P.D., Vearing,C., Geleick,D., Feldheim,D.A., Boyd,A.W., Henkemeyer,M., and Nikolov,D.B. (2004). Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nat. Neurosci.* 7, 501-509.
- Hirai,H., Maru,Y., Hagiwara,K., Nishida,J., and Takaku,F. (1987). A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *Science* 238, 1717-1720.
- Ii,M., Yamamoto,H., Adachi,Y., Maruyama,Y., and Shinomura,Y. (2006). Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* 231, 20-27.
- Imai,K., Yokohama,Y., Nakanishi,I., Ohuchi,E., Fujii,Y., Nakai,N., and Okada,Y. (1995). Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) from human rectal carcinoma cells. Activation of the precursor, interaction with other matrix metalloproteinases and enzymic properties. *J. Biol. Chem.* 270, 6691-6697.
- Inaba,K., Inaba,M., Naito,M., and Steinman,R.M. (1993). Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J. Exp. Med.* 178, 479-488.
- Irie,F. and Yamaguchi,Y. (2002). EphB receptors regulate dendritic spine development via intersectin, Cdc42 and N-WASP. *Nat. Neurosci.* 5, 1117-1118.
- Jones,L.E., Humphreys,M.J., Campbell,F., Neoptolemos,J.P., and Boyd,M.T. (2004). Comprehensive analysis of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor expression in pancreatic cancer: increased expression of matrix metalloproteinase-7 predicts poor survival. *Clin. Cancer Res.* 10, 2832-2845.

- Jones,L.E., Humphreys,M.J., Campbell,F., Neoptolemos,J.P., and Boyd,M.T. (2004). Comprehensive analysis of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor expression in pancreatic cancer: increased expression of matrix metalloproteinase-7 predicts poor survival. *Clin. Cancer Res.* *10*, 2832-2845.
- Karelina,T.V., Goldberg,G.I., and Eisen,A.Z. (1994). Matrilysin (PUMP) correlates with dermal invasion during appendageal development and cutaneous neoplasia. *J. Invest Dermatol.* *103*, 482-487.
- Karin,M. and Mintz,B. (1981). Receptor-mediated endocytosis of transferrin in developmentally totipotent mouse teratocarcinoma stem cells. *J. Biol. Chem.* *256*, 3245-3252.
- Kast,W.M., Offringa,R., Peters,P.J., Voordouw,A.C., Meloen,R.H., van der Eb,A.J., and Melief,C.J. (1989). Eradication of adenovirus E1-induced tumors by E1A-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cell* *59*, 603-614.
- Kim,R., Emi,M., and Tanabe,K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape
2. *Immunology* *121*, 1-14.
- Kioi,M., Yamamoto,K., Higashi,S., Koshikawa,N., Fujita,K., and Miyazaki,K. (2003). Matrilysin (MMP-7) induces homotypic adhesion of human colon cancer cells and enhances their metastatic potential in nude mouse model. *Oncogene* *22*, 8662-8670.
- Krummel,M.F., Sjaastad,M.D., Wulfig,C., and Davis,M.M. (2000). Differential clustering of CD4 and CD3zeta during T cell recognition. *Science* *289*, 1349-1352.
- Kullander,K. and Klein,R. (2002). Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 475-486.
- Kure,T., Chang,J.H., Kato,T., Hernandez-Quintela,E., Ye,H., Lu,P.C., Matrisian,L.M., Gatinel,D., Shapiro,S., Gosheh,F., and Azar,D.T. (2003). Corneal neovascularization after excimer keratectomy wounds in matrilysin-deficient mice. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* *44*, 137-144.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
- Laflleur,M.A., Handsley,M.M., and Edwards,D.R. (2003). Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis. *Expert. Rev. Mol. Med.* *5*, 1-39.
- Lakkaraju,A., Rahman,Y.E., and Dubinsky,J.M. (2002). Low-density lipoprotein receptor-related protein mediates the endocytosis of anionic liposomes in neurons. *J. Biol. Chem.* *277*, 15085-15092.
- Lamaze,C., Fujimoto,L.M., Yin,H.L., and Schmid,S.L. (1997). The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* *272*, 20332-20335.
- Lanzavecchia,A. (1990). Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes
2. *Annu. Rev. Immunol.* *8*, 773-793.
- Li,Q., Park,P.W., Wilson,C.L., and Parks,W.C. (2002). Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury. *Cell* *111*, 635-646.
- Litterst,C., Georgakopoulos,A., Shioi,J., Ghersi,E., Wisniewski,T., Wang,R., Ludwig,A., and Robakis,N.K. (2007). Ligand binding and calcium influx induce distinct ectodomain/gamma-secretase-processing pathways of EphB2 receptor. *J. Biol. Chem.* *282*, 16155-16163.

- Matzinger,P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* *12*, 991-1045.
- May,R.C. and Machesky,L.M. (2001). Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* *114*, 1061-1077.
- McCawley,L.J. and Matrisian,L.M. (2001). Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr. Opin. Cell Biol.* *13*, 534-540.
- Medzhitov,R. and Janeway,C., Jr. (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol. Rev.* *173*, 89-97.
- Merrifield,C.J., Feldman,M.E., Wan,L., and Almers,W. (2002). Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits. *Nat. Cell Biol.* *4*, 691-698.
- Merrifield,C.J., Moss,S.E., Ballestrem,C., Imhof,B.A., Giese,G., Wunderlich,I., and Almers,W. (1999). Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells. *Nat. Cell Biol.* *1*, 72-74.
- Mishima,W., Suzuki,A., Yamaji,S., Yoshimi,R., Ueda,A., Kaneko,T., Tanaka,J., Miwa,Y., Ohno,S., and Ishigatsubo,Y. (2004). The first CH domain of affixin activates Cdc42 and Rac1 through alphaPIX, a Cdc42/Rac1-specific guanine nucleotide exchanging factor. *Genes Cells* *9*, 193-204.
- Misra,C. and Ziff,E.B. (2005). EphB2 gets a GRIP on the dendritic arbor. *Nat. Neurosci.* *8*, 848-850.
- Mitsiades,N., Yu,W.H., Poulaki,V., Tsokos,M., and Stamenkovic,I. (2001). Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Res.* *61*, 577-581.
- Miyamoto,S., Yano,K., Sugimoto,S., Ishii,G., Hasebe,T., Endoh,Y., Kodama,K., Goya,M., Chiba,T., and Ochiai,A. (2004). Matrix metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor bioavailability through its proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein 3. *Cancer Res.* *64*, 665-671.
- Mohan,M.J., Seaton,T., Mitchell,J., Howe,A., Blackburn,K., Burkhart,W., Moyer,M., Patel,I., Waitt,G.M., Becherer,J.D., Moss,M.L., and Milla,M.E. (2002). The tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE): a unique metalloproteinase with highly defined substrate selectivity. *Biochemistry* *41*, 9462-9469.
- Morgan,J.R., Prasad,K., Hao,W., Augustine,G.J., and Lafer,E.M. (2000). A conserved clathrin assembly motif essential for synaptic vesicle endocytosis. *J. Neurosci.* *20*, 8667-8676.
- Mousavi,S.A., Malerod,L., Berg,T., and Kjekken,R. (2004). Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem. J.* *377*, 1-16.
- Mukherjee,S., Ghosh,R.N., and Maxfield,F.R. (1997). Endocytosis. *Physiol Rev.* *77*, 759-803.
- Murai,K.K. and Pasquale,E.B. (2003). 'Eph'ective signaling: forward, reverse and crosstalk. *J. Cell Sci.* *116*, 2823-2832.
- Nagase,H., Visse,R., and Murphy,G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* *69*, 562-573.
- Nishimura,T., Yamaguchi,T., Tokunaga,A., Hara,A., Hamaguchi,T., Kato,K., Iwamatsu,A., Okano,H., and Kaibuchi,K. (2006). Role of numb in dendritic spine development with a Cdc42 GEF intersectin and EphB2. *Mol. Biol. Cell* *17*, 1273-1285.

- O'Connell,J., Bennett,M.W., O'Sullivan,G.C., Collins,J.K., and Shanahan,F. (1999). Fas counter-attack--the best form of tumor defense? *Nat. Med.* *5*, 267-268.
- Orioli,D. and Klein,R. (1997). The Eph receptor family: axonal guidance by contact repulsion. *Trends Genet.* *13*, 354-359.
- Ortega,N. and Werb,Z. (2002). New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens. *J. Cell Sci.* *115*, 4201-4214.
- Orth,J.D. and McNiven,M.A. (2003). Dynamin at the actin-membrane interface. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 31-39.
- Ouellette,A.J. and Selsted,M.E. (1996). Paneth cell defensins: endogenous peptide components of intestinal host defense. *FASEB J.* *10*, 1280-1289.
- Pajouh,M.S., Nagle,R.B., Breathnach,R., Finch,J.S., Brawer,M.K., and Bowden,G.T. (1991). Expression of metalloproteinase genes in human prostate cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *117*, 144-150.
- Parks,W.C., Wilson,C.L., and Lopez-Boado,Y.S. (2004). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 617-629.
- Pasquale,E.B. (2005). Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 462-475.
- Pontow,S.E., Kery,V., and Stahl,P.D. (1992). Mannose receptor. *Int. Rev. Cytol.* *137B*, 221-244.
- Powell,W.C., Fingleton,B., Wilson,C.L., Boothby,M., and Matrisian,L.M. (1999). The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr. Biol.* *9*, 1441-1447.
- Rabinovich,G.A., Gabrilovich,D., and Sotomayor,E.M. (2007). Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells
1. *Annu. Rev. Immunol.* *25*, 267-296.
- Reis e Sousa, Stahl,P.D., and Austyn,J.M. (1993). Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J. Exp. Med.* *178*, 509-519.
- Rohatgi,R., Ma,L., Miki,H., Lopez,M., Kirchhausen,T., Takenawa,T., and Kirschner,M.W. (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* *97*, 221-231.
- Rosenberg,S.A., Spiess,P., and Lafreniere,R. (1986). A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* *233*, 1318-1321.
- ROTH,T.F. and PORTER,K.R. (1964). YOLK PROTEIN UPTAKE IN THE OOCYTE OF THE MOSQUITO Aedes Aegypti. *J. Cell Biol.* *20*, 313-332.
- Saiki,R.K., Gelfand,D.H., Stoffel,S., Scharf,S.J., Higuchi,R., Horn,G.T., Mullis,K.B., and Erlich,H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* *239*, 487-491.
- Sallusto,F., Cella,M., Danieli,C., and Lanzavecchia,A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* *182*, 389-400.

- Sancho,D., Vicente-Manzanares,M., Mittelbrunn,M., Montoya,M.C., Gordon-Alonso,M., Serrador,J.M., and Sanchez-Madrid,F. (2002). Regulation of microtubule-organizing center orientation and actomyosin cytoskeleton rearrangement during immune interactions. *Immunol. Rev.* 189, 84-97.
- Sengar,A.S., Wang,W., Bishay,J., Cohen,S., and Egan,S.E. (1999). The EH and SH3 domain Ese proteins regulate endocytosis by linking to dynamin and Eps15. *EMBO J.* 18, 1159-1171.
- Shortman,K. and Liu,Y.J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 151-161.
- Shurin,G.V., Tourkova,I.L., Chatta,G.S., Schmidt,G., Wei,S., Djeu,J.Y., and Shurin,M.R. (2005). Small rho GTPases regulate antigen presentation in dendritic cells. *J. Immunol.* 174, 3394-3400.
- Sieczkarski,S.B. and Whittaker,G.R. (2002). Dissecting virus entry via endocytosis. *J. Gen. Virol.* 83, 1535-1545.
- Steinman,R.M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 271-296.
- Steinman,R.M. and Nussenzweig,M.C. (2002). Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 351-358.
- Sternlicht,M.D. and Werb,Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 463-516.
- Strand,S., Vollmer,P., van den,A.L., Gottfried,D., Alla,V., Heid,H., Kuball,J., Theobald,M., Galle,P.R., and Strand,D. (2004). Cleavage of CD95 by matrix metalloproteinase-7 induces apoptosis resistance in tumour cells. *Oncogene* 23, 3732-3736.
- Sweitzer,S.M. and Hinshaw,J.E. (1998). Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell* 93, 1021-1029.
- Symons,M., Derry,J.M., Karlak,B., Jiang,S., Lemahieu,V., McCormick,F., Francke,U., and Abo,A. (1996). Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell* 84, 723-734.
- Takai,Y., Sasaki,T., and Matozaki,T. (2001). Small GTP-binding proteins 13. *Physiol Rev.* 81, 153-208.
- Tebar,F., Sorkina,T., Sorkin,A., Ericsson,M., and Kirchhausen,T. (1996). Eps15 is a component of clathrin-coated pits and vesicles and is located at the rim of coated pits. *J. Biol. Chem.* 271, 28727-28730.
- Timmerman,J.M. and Levy,R. (1999). Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annu. Rev. Med.* 50, 507-529.
- Tomlinson,M.L., Garcia-Morales,C., Abu-Elmagd,M., and Wheeler,G.N. (2008). Three matrix metalloproteinases are required in vivo for macrophage migration during embryonic development. *Mech. Dev.* 125, 1059-1070.
- Tourkova,I.L., Shurin,G.V., Wei,S., and Shurin,M.R. (2007). Small rho GTPases mediate tumor-induced inhibition of endocytic activity of dendritic cells. *J. Immunol.* 178, 7787-7793.

- Troy,A.J., Davidson,P.J., Atkinson,C.H., and Hart,D.N. (1999). CD1a dendritic cells predominate in transitional cell carcinoma of bladder and kidney but are minimally activated
1. *J. Urol.* *161*, 1962-1967.
- Tskvitaria-Fuller,I., Rozelle,A.L., Yin,H.L., and Wulfing,C. (2003). Regulation of sustained actin dynamics by the TCR and costimulation as a mechanism of receptor localization. *J. Immunol.* *171*, 2287-2295.
- Turner,M. and Billadeau,D.D. (2002). VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 476-486.
- Valitutti,S., Dessing,M., Aktories,K., Gallati,H., and Lanzavecchia,A. (1995). Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton
1. *J. Exp. Med.* *181*, 577-584.
- Vargo-Gogola,T., Fingleton,B., Crawford,H.C., and Matrisian,L.M. (2002). Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) selects for apoptosis-resistant mammary cells in vivo. *Cancer Res.* *62*, 5559-5563.
- Webster,N.L. and Crowe,S.M. (2006). Matrix metalloproteinases, their production by monocytes and macrophages and their potential role in HIV-related diseases. *J. Leukoc. Biol.* *80*, 1052-1066.
- Welch,M.D. and Mullins,R.D. (2002). Cellular control of actin nucleation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *18*, 247-288.
- Wilson,C.L., Heppner,K.J., Labosky,P.A., Hogan,B.L., and Matrisian,L.M. (1997). Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 1402-1407.
- Wilson,C.L., Ouellette,A.J., Satchell,D.P., Ayabe,T., Lopez-Boado,Y.S., Stratman,J.L., Hultgren,S.J., Matrisian,L.M., and Parks,W.C. (1999). Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science* *286*, 113-117.
- Wolfel,T., Hauer,M., Klehmann,E., Brichard,V., Ackermann,B., Knuth,A., Boon,T., and Meyer zum Buschenfelde,K.H. (1993). Analysis of antigens recognized on human melanoma cells by A2-restricted cytolytic T lymphocytes (CTL). *Int. J. Cancer* *55*, 237-244.
- Wolfel,T., Van Pel,A., Brichard,V., Schneider,J., Seliger,B., Meyer zum Buschenfelde,K.H., and Boon,T. (1994). Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* *24*, 759-764.
- Yamaguchi,Y. and Pasquale,E.B. (2004). Eph receptors in the adult brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* *14*, 288-296.
- Yamamoto,H., Adachi,Y., Itoh,F., Iku,S., Matsuno,K., Kusano,M., Arimura,Y., Endo,T., Hinoda,Y., Hosokawa,M., and Imai,K. (1999). Association of matrilysin expression with recurrence and poor prognosis in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* *59*, 3313-3316.
- Yamamoto,H., Iku,S., Adachi,Y., Imsumran,A., Taniguchi,H., Noshok,K., Min,Y., Horiuchi,S., Yoshida,M., Itoh,F., and Imai,K. (2003). Association of trypsin expression with tumour progression and matrilysin expression in human colorectal cancer. *J. Pathol.* *199*, 176-184.

- Yamamoto,H., Itoh,F., Adachi,Y., Sakamoto,H., Adachi,M., Hinoda,Y., and Imai,K. (1997). Relation of enhanced secretion of active matrix metalloproteinases with tumor spread in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* *112*, 1290-1296.
- Yim,Y.I., Scarselletta,S., Zang,F., Wu,X., Lee,D.W., Kang,Y.S., Eisenberg,E., and Greene,L.E. (2005). Exchange of clathrin, AP2 and epsin on clathrin-coated pits in permeabilized tissue culture cells. *J. Cell Sci.* *118*, 2405-2413.
- Yu,W.H., Woessner,J.F., Jr., McNeish,J.D., and Stamenkovic,I. (2002). CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. *Genes Dev.* *16*, 307-323.
- Zinkernagel,R.M. and Doherty,P.C. (1979). MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv. Immunol.* *27*, 51-177.
- Zinkernagel,R.M. and Doherty,P.C. (1997). The discovery of MHC restriction. *Immunol. Today* *18*, 14-17.
- Zisch,A.H., Kalo,M.S., Chong,L.D., and Pasquale,E.B. (1998). Complex formation between EphB2 and Src requires phosphorylation of tyrosine 611 in the EphB2 juxtamembrane region. *Oncogene* *16*, 2657-2670.