

Aus dem Institut für Immunologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Thomas Broker

## **Einfluss des PHLDA1 Proteins auf die MHC Klasse I Expression**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades  
der Humanbiologie an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
in München

vorgelegt von  
Elma Pröls  
aus Tesanj (BiH)

März 2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Judith P. Johnson
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Ursula Zimmer-Strobl
	Prof. Dr. Edgar Meinel
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	15.07.2010

## *Danksagung*

Mein erster Dank gehört Frau Prof. Dr. Judith P. Johnson für das in mich gesetzte Vertrauen, viel Geduld über zwei Babypausen und anschließend für die vielen anregenden Diskussionen über diese Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei allem momentanen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie für die Unterstützung, die Diskussionsbereitschaft, die Anteilnahme und letztendlich für eine schöne Zeit. Besonders erwähnt seien an dieser Stelle: Dr. Elfriede Nössner, Dr. Barbara Fellerhof, Dr. Rüdiger Neef, Marianne Scheuerecker, Ina Contag und noch viele mehr.

Zum größten Dank bin ich meinen Eltern und Schwiegereltern verpflichtet, die mich während meiner gesamten Promotionszeit in jeder nur erdenklichen Weise unterstützt haben.

Besonderer Dank gebührt meinem Ehemann, der mich während meiner gesamten Promotionszeit unterstützt hat und viel Geduld aufbringen musste.

Großer Dank an meine Freundin Mel Telgenkämper.

Ich widme diese Arbeit meinem verstorbenen Vater. Er hat mich immer motiviert eine Promotion anzustreben.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Melanom	2
1.2	Tumorgenese und genetische Veränderung	5
1.3	Metastasierung	9
1.3.1	Veränderung der Zellmobilität	11
1.3.2	Identifizierung von metastasierungs-assoziierten Molekülen	13
1.4	Tumor Escape Mechanismen	16
1.4.1	Apoptose und Apoptoseresistenz	16
1.4.2	Herunterregulierung der MHC Klasse I	19
1.5	Zielsetzung der Arbeit	20
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>21</b>
2.1	Chemikalien	21
2.2	Zelllinien	23
2.3	Medien	24
2.3.1	Zellkulturmedien für Mammalia-Zelllinien	24
2.3.2	Grundstoffe für Kulturmedien	25
2.4	Allgemeine Puffer und Lösungen	25
2.5	Monoklonale Antikörper	28
2.8	Enzyme	30
2.9	PCR Primer	31
2.9.1	Größenstandards	31
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>32</b>
3.1	Arbeiten mit Zelllinien	32
3.1.1	Zellkultur	32
3.1.2	Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen	32
3.1.3	Stimulation der Zellen mit Phorbol ester	33
3.1.4	T-Zellstimulation	33
3.2	Molekularbiologische Methoden	33
3.2.1	Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA	33
3.2.2	Fällung von DNA/RNA	34
3.2.3	Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA	34
3.2.4	Isolation von mRNA aus Säugerzelllinien	34
3.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
3.2.6	Reverse Transkription und PCR (RT-PCR)	36
3.2.7	Real time PCR /quantitative RT-PCR	37
3.2.8	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	40
3.3	Proteinbiochemische Methoden	40
3.3.1	Zellaufschluss von Mammalia-Zelllinien	40
3.3.2	Messung der Proteinkonzentration	40
3.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen	41
3.3.4	Coomassie Färbung	41

3.3.5	Western Blot	42
3.3.6	Immunodetektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	42
3.3.7	Immunopräzipitation	43
3.3.8	Isoelektrische Fokussierung	44
<b>3.4</b>	<b>Immunologische Methoden</b>	<b>46</b>
3.4.1	Immunfluoreszenz	46
3.4.2	ELISA	47
<b>3.5</b>	<b>Radioaktive Markierung</b>	<b>48</b>
3.5.1	Markierung mit S <sup>35</sup> -Methionin und S <sup>35</sup> -Cystein	49
3.5.2	Pulse/Chase Methode	50
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>51</b>
<b>4.1</b>	<b>Expression von PHLDA1 in den stabilen cDNA Transfektanten</b>	<b>51</b>
4.1.1	Zytoplasmatische Immunfluoreszenz	52
4.1.2	Western Blot	53
<b>4.2</b>	<b>Konstitutive PHLDA1 Expression ist mit einer erhöhten MHC Klasse I Expression assoziiert</b>	<b>54</b>
4.2.1	Adhäsionsmoleküle	55
4.2.2	MHC Expression	57
<b>4.3</b>	<b>Untersuchung der Ursache für die erhöhte MHC Klasse Expression bei konstitutiv PHLDA1 exprimierenden Zellen</b>	<b>62</b>
4.3.1	Analyse der gesamten HLA A2 und HLA B7 Proteinmenge bei PHLDA1 Transfektanten	62
4.3.2	Analyse der HLA A2 und HLA B7 mRNA Level	65
4.3.3	Untersuchung der MHC Klasse I Synthese in Neo und PHLDA1 Transfektanten	68
4.3.4	Untersuchung des Transportweges der MHC Klasse I in PHLDA1 Transfektanten	72
<b>4.4</b>	<b>PHLDA1 und MHC Klasse I Koimmunopräzipitation</b>	<b>75</b>
<b>4.5</b>	<b>Einfluss der konstitutiven PHLDA1 Expression auf die Erkennung durch CD8<sup>+</sup> T Zellen</b>	<b>82</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>90</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>92</b>
<b>Anhang</b>		<b>102</b>
<b>Abkürzungen</b>		<b>102</b>

# 1 EINLEITUNG

Laut Robert-Koch-Institut erkranken jedes Jahr 436.000 Menschen in Deutschland neu an Krebs und 211.500 Menschen sterben jährlich daran. Experten schätzen, dass die Zahl der Krebserkrankungen bis zum Jahr 2030 um 50 Prozent zunehmen wird (Quelle: Robert Koch-Institut, 2008). Der Grund dafür ist, dass die Menschen immer älter werden. Krebs ist eine Erkrankung, von der insbesondere ältere Menschen betroffen sind. Mit rund 58.570 Neuerkrankungen im Jahr ist Prostatakrebs heute in Deutschland die häufigste Krebsart beim Mann. An zweiter Stelle steht Darmkrebs mit 37.250 Neuerkrankungen und der Lungenkrebs belegt bei den Männern mit 32.850 Erkrankungen pro Jahr Platz drei. Häufigste Krebsart der Frau ist Brustkrebs. Jährlich erkranken 57.230 Frauen in Deutschland neu daran. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 63 Jahren. 40 Prozent der betroffenen Frauen sind jünger als 60 Jahre. An zweiter Stelle steht bei den Frauen Darmkrebs mit 36.000 Neuerkrankungen. Auch bei den Frauen steht Lungenkrebs mit 13.190 Neuerkrankungen mittlerweile auf Platz drei (<http://www.krebshilfe.de/krebszahlen.html>).

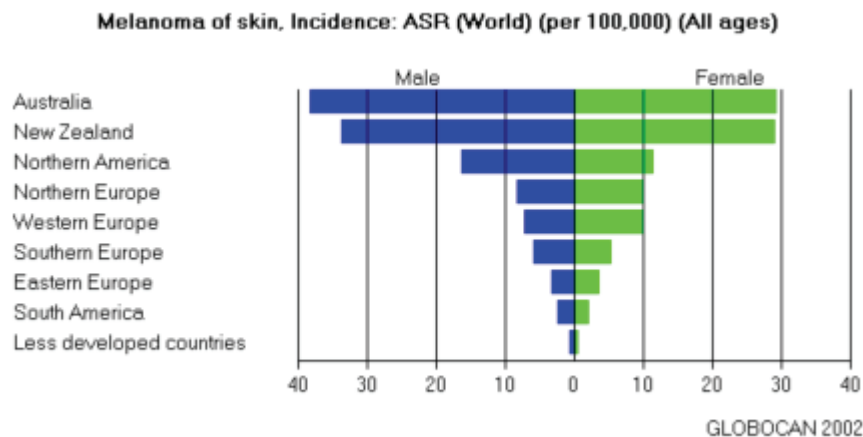
Auf dem Gebiet Tumorwachstum, Tumorentwicklung und Metastasierung wird seit Jahrzehnten intensiv geforscht. Dadurch erhofft man sich wichtige Erkenntnisse, die für die Krebsbehandlung von Bedeutung sein könnten. Ein Zusammenspiel von genetischen- und Umweltfaktoren führt zur Tumorentwicklung. An erste Stelle als Umweltfaktor wird das Rauchen genannt. Interessanteweise, laut WHO (World Health Organisation), wird nach dem Rauchen das Gas Radon, als ein weiterer sehr unterschätzter Umweltfaktor als Ursache für den Lungenkrebs betrachtet ([www.who.int/ionizing\\_radiation/env/radon/en/](http://www.who.int/ionizing_radiation/env/radon/en/)). Mehrere Studien auf diesem Gebiet konnten zeigen, dass es einen Zusammenhang zwischen Radonexposition und Lungenkrebs tatsächlich gibt (z.B. Bastide et al, 2009). Gut bekannt sind weitere Risikofaktoren für Tumore, wie eine starke Sonnenbestrahlung, die dem Hautkrebs und hier speziell dem malignen Melanom Vorschub leistet (Ivry et al, 2006). Darüber hinaus kann die Exposition gegen bestimmte Umwelt-Toxine die Krebsgefahr erhöhen. Hierfür bekannte Beispiele sind Asbest, Pestizide oder auch eine erhöhte Strahlenexposition. Auch von Infektionen weiß man, dass sie die Krebsentstehung fördern können. Diese Aussage gilt für Viren als auch für Bakterien und sogar für manche Parasiten. Eine der gut untersuchten Beispiele ist die Infektion mit dem Hepatitis B Virus, die den Weg in den Leberkrebs bahnen können (Pujol et al, 2009). Beim Gebärmutterhalskrebs und einer Infektion mit einem bestimmten Papillomvirus konnten eindeutige Zusammenhänge

nachgewiesen werden (Trimble and Frazer, 2009). 2007 veröffentlichte die in Deutschland zuständige Impfkommission am Robert-Koch-Institut (STIKO) diesbezüglich eine erste Impfpflicht und riet allen Mädchen zwischen 12 und 17 Jahren zu einer Impfung. Auch bei einer Infektion mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* konnte ein erhöhtes Risiko für Magenkrebs festgestellt werden (de Vries et al, 2009). Weltweit wird dabei rund jeder fünfte Krebsfall auf eine Infektion zurückgeführt. Europaweit ist es ungefähr jeder zehnte.

## 1.1 DAS MELANOM

Das Melanom (griechisch: schwarze Veränderung) ist eine maligne Entartung der Melanozyten, einer Zellpopulation in der Haut, die in der Lage sind, das Hautpigment Melanin zu produzieren. Die Fähigkeit zur frühen Metastasierung macht das Melanom zum gefürchtesten Hautkrebs, obwohl es sich nach seiner Häufigkeit erst an dritter Stelle der malignen Entartungen der Haut befindet (nach Basaliom und Spinaliom).

Vor 30 Jahren war nicht viel über die Entwicklung des Melanoms bekannt. Auch heute sind Ergebnisse im Bezug auf die Therapie, nach zwei Dekaden intensiver Forschung auf diesem Gebiet, enttäuschend. Die konservative Behandlung von Patienten mit diagnostizierten Metastasen hat kaum Fortschritte gemacht (Tsao und Sober 2005) und die Prognose für ein bereits fortgeschrittenes Melanom ist immer noch sehr schlecht. Dagegen hat sich die Zahl der Patienten zwischen 1971 und 1990 beinahe verdoppelt. In Europa werden jährlich ca. 63.000 neue Fälle diagnostiziert. Die Inzidenz des kutanen Melanoms ist in Europa bei Frauen etwas höher und beträgt ca. 8 Fälle pro 100.000, bei Männern 6 Fällen pro 100.000 pro Jahr. Die Inzidenzrate im Osteuropa ist etwas niedriger als im Nordeuropa (Abbildung 1. 1). In Nordamerika, Neuseeland und Australien ist die Inzidenzrate mit ca. 14 bis 34 Fällen pro 100.000 pro Jahr viel höher im Vergleich zu Europa. Dabei sind hier Männer 1,5 Mal häufiger betroffen als Frauen, was in Europa umgekehrt ist (Ferlay et al, 2004).



**Abbildung 1.1** Cancer incidence rate for skin melanoma in the world (Ferlay et al, 2004).

Als Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung eines Melanoms zählt die Gesamtzahl der Naevi (Gandini et al, 2005), ein allgemein höheres Risiko bei hellhäutigen Personen und Personen, die in der Kindheit viele Sonnenbrände erlebt haben (Abdulla et al, 2005), stärkere UV Strahlung (Ozonloch) und immer häufiger nicht ausreichend geschützte Sonnenbäder sowie die Benutzung der Sonnenbank (Westerdahl et al, 2000; Veierod et al, 2003). Zusätzlich der allgemein bessere Lebensstandard der westlichen Bevölkerung ermöglicht den Aufenthalt in Gebieten mit hoher UV-Strahlung, was wiederum das Risiko der Melanomentwicklung erhöht.

Das maligne Melanom zeigt, wie viele andere Tumore eine phasenhafte Entwicklung (Clark et al, 1984; Heryln et al, 1990). Die neoplastische Transformation beginnt mit der unregelmäßigen Proliferation von einzelnen Melanozyten in der basalen Zellschicht der Haut. Es entwickelt sich „Melanoma in situ“ das noch auf die Epidermis beschränkt ist. Der nächste Schritt ist die Invasion der Tumorzellen durch die Basalmembran in die Dermis. In diesem Stadium erhält der Primärtumor Anschluss an Blutbahnen, wodurch er wachsen und Metastasen bilden kann. Für die Morbidität und Mortalität bei Krebserkrankungen ist vor allem die Metastasierung verantwortlich. Dabei wandern Einzelzellen aus dem Tumor aus, gelangen ins Blut oder in die Lymphbahnen und können in anderen lebenswichtigen Organen neue Tumore bilden. Um jedoch den alten Zellverband zu verlassen und einen neuen zu bilden, müssen sich die Eigenschaften der Tumorzellen stark ändern. Tumorzellen zeigen ein verändertes Verhalten gegenüber extrazellulären Matrixproteinen. Anders als normale endotheliale und epitheliale Zellen treten sie bei fehlendem Kontakt zu extrazellulären Matrixproteinen nicht in die Apoptose ein (Frisch et al, 1994). In Melanoma ist die



Expression von mehreren Molekülen die Apoptosis reduzieren, bekannt. Um Gewebebarrieren während der Extravasion und der Intravasion zu überwinden, produzieren metastasierende Tumorzellen diverse proteolytische Enzyme wie Heparanasen, Serin- (Wang et al, 1988), Cystein-, Thiol- (Boike et al, 1992) und Metalloproteinasen (Ostrowski et al, 1988). Proteasen haben auch eine wichtige Rolle in anderen Prozessen der Tumorigenese als auch der Angiogenese (Stetler-Stevenson, 1999).

Neben dem Melanom sind auch gutartige Neoplasien der Haut, so genannte Naevi, bekannt. Naevi zeigen ein begrenztes Wachstum. Hier treten die Melanozyten oft in Nestern auf, halten ihr Melanin im Zytoplasma zurück, anstatt es umliegenden Keratinozyten abzugeben, wodurch die dunkle Pigmentierung der Naevi zustande kommt. Naevi werden oft als mögliche Melanomvorläufer betrachtet. Es ist aber nicht klar, ob immer aus einem Naevus ein Melanom entsteht. Der dysplastische Naevus stellt eine mögliche Übergangsform zwischen den benignen und malignen Neoplasien dar (Friedmann et al, 2009). Man unterscheidet zwischen horizontal und vertikal wachsenden Melanomen. Die ersten besitzen eine geringere Wachstumsrate und dazu zählt das *Superfiziell-Spitende-Melanom* (macht ca. 65% aller malignen Melanoma aus), sowie das *Lentigo-Maligna-Melanom*, eine Melanomvariante, die auf sonnengeschädigter Haut entsteht. *Noduläre Melanome* sind vertikal wachsende Melanomarten, die die Basalmembran ohne vorhergehende horizontale Wachstumsphase sehr schnell durchbrechen. Das Noduläre Melanom kann sich innerhalb von wenigen Monaten neu entwickeln. Eine zunehmende vertikale Tumordicke korreliert stark mit einer zunehmend schlechten Prognose für den Patienten. Bei einer vertikalen Tumordicke unter 0,75 mm liegt die 10 Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei 98%. Bei einer 3 mm Tumordicke liegt diese bei nur 30% (Breslow, 1970).

Die Fähigkeit zur frühen Metastasierung sowie eine hohe Mortalitätsrate und einer niedrigen 10 Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit macht das Melanom zum gefürchtesten Hautkrebs. Eine frühe Entdeckung durch Selbstbeobachtung von ABCD Zeichen (Veränderungen der Naevi bezüglich der **A**symetrie, **B**egrenzung, **C**olor und **D**urchmesser) und regelmäßige Kontrolluntersuchungen sind die wichtigsten Maßnahmen im Kampf gegen Melanome und dessen Vorbeugung.

## 1.2 TUMORGENESE UND GENETISCHE VERÄNDERUNG

Wie schon erwähnt, werden Naevi oft als mögliche Melanomvorläufer betrachtet. Aus diesem Grund werden diese bei den Untersuchungen auf genetische Veränderungen eingeschlossen. Das aktivierte B-RAF wurde bei bis zu 80% benignen Naevi und in bis zu 70% Melanom-Metastasen festgestellt (Pollock and Trent, 2000). Das lässt uns vermuten, dass eine Aktivierung von MAPK (**mitogen activated protein kinase**) Signalkaskade durch Mutationen notwendig für die Melanomentwicklung aber für die maligne Umwandlung allein nicht ausreichend ist. Das B-RAF nimmt eine wichtige Stellung in der Signalübertragung durch Tyrosinkinase-Rezeptoren wie MAPK Signalkaskade ein. Tyrosinkinasen kommt ein zentraler Stellenwert im Rahmen der Regulation von Wachstumsprozessen, morphogenetischen Programmen, aber auch der malignen Transformation zu. Nach der Bindung von Liganden an Tyrosinkinase-Rezeptoren beobachtet man eine schnelle Aktivierung von RAS. Produkte der K-RAS, H-RAS und N-RAS Gene werden entsprechend ihrer relativen Molmasse als p21<sup>RAS</sup> bezeichnet. Die Proteine sind in der Lage GTP zu binden und zu hydrolysieren. Da RAS Proteine nicht direkt mit Tyrosinkinasen assoziiert sind, spielt weiterhin das Adapterprotein GRB2 (**G**rowth factor **R**eceptor-**B**ound protein **2**) eine zentrale Rolle des Vermittlers in diese Kaskade. In der Signalübertragung hat RAS eine Zentralstelle. Die zwei am besten untersuchten Interaktionspartner sind RAF und PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase). RAF ist eine Phosphokinase mit Spezifität für Serin- und Threoninreste. In der Familie sind drei Proteine A-RAF, B-RAF und C-RAF bekannt. Die Entdeckung verschiedener retroviraler Isolate von RAF spricht dafür, dass RAF ein ausgeprägtes Potential für die maligne Transformation besitzt. Aktivierte RAF Proteine aktivieren weiter MAPK/ERK Kinase und diese wiederum aktivieren ERK1/2 (**E**xtracellular signal **R**egulated **K**inases). Es ergibt sich somit eine Aktivierungskaskade die von RAF über MEK1/2 nach ERK1/2 führt. Nach Aktivierung werden ERK1/2 rasch in den Zellkern transloziert. Dort phosphorylieren sie Transkriptionsfaktoren die dann mit anderen Proteinen an die sowohl regulatorische Sequenzen der DNA binden und somit z.B. über bcl-2 proapoptotisch und über Cyclin B auch in die Regulation des Zellzyklus eingreifen, als auch bei der Reorganisation der Mikrotubuli bei der Mitose eine Rolle spielen.

RAS Gene gehören zu den Genen, die in menschlichen Tumoren am häufigsten mutiert sind. Als Folge der Mutationen wird die GTPase Aktivität der RAS Proteine blockiert und die Proteine verbleiben in ihrer aktiven Form. Mutationen im RAS Protein sind in wenigen Melanomen detektiert. Die höchste Inzidenz für mutierte RAS Proteine konnte beim amelanotischen nodulären Subtyp festgestellt werden (Chin et al, 1998). Aus der RAS Familie

ist das mutierte N-RAS bei untersuchten Melanomzelllinien am häufigsten vertreten und zwar 56% bei kongenitalen Naevi (Papp et al, 1996), 33% bei primären Melanomen und 26% bei Melanom Metastasen (Demunter et al, 2001). B-RAF Mutationen sind allgemein bei allen menschlichen Tumoren mit einer Frequenz von über 7% vertreten (Davies et al, 2002).

Weitere Studien bei Familien mit genetischer Disposition zum Melanom identifizierten ein Genlokus, lokalisiert auf dem Chromosom 9p21, das bei 10 bis 30% aller untersuchten Familien Keimbahnmutationen aufweist (Hussussian et al, 1994). Die Bedeutung dieses Lokus liegt darin, dass es durch zwei verschiedene Leserahmen für Genprodukte kodiert, die sowohl den Rb-Signalweg als auch den p53-Signalweg beeinflussen. Ein Leserahmen kodiert für den Cyklin-abhängigen-Kinase4-Inhibitor p16<sup>Ink4a</sup> (auch als CDKN2A bekannt), welcher Cyklin abhängige Kinasen CDK4/6 blockiert (Sharpless and Chin, 2003). Die Aktivierung der CDKs kommt durch eine Reihe von Ereignissen wie: deren Phosphorylierung, Assoziation mit den D-Cyklinen und durch die Freisetzung der CKIs (Cyklin abhängigen Kinase Inhibitoren) zustande. CDKs phosphorylieren das Retinoblastomprotein (Rb), welches zusammen mit dem p53 im Zentrum der Zellzyklus- und Apoptoseregulation steht. Rb ist ein im Kern lokalisiertes Protein, welches in ruhenden Zellen (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>) hypophosphoryliert ist und somit an den Transkriptionsfaktor E2F sowie an die Histon-Deazetylase (HDAC1) gebunden ist. In diesem Komplex ist die HDAC1 aktiv und deazetyliert die Histone, wodurch sich die DNA in einem kompakten Zustand befindet und für die Transkriptionsfaktoren nicht zugänglich ist. Auf diese Weise wird die Genexpression blockiert (Lane AA, Chabner BA, 2009). Die wichtigste Aufgabe von p53 besteht darin, die genomische Integrität der Zellen zu überprüfen und bei vorhandenen Schäden entweder den Zellzyklus zu blockieren oder bei nicht reparablen DNA Schäden den Zelltod einzuleiten. Zellen mit reparablen Schäden werden im Zellzyklus angehalten, indem p53 als Transkriptionsfaktor die p21<sup>CIP</sup> Expression veranlasst, welcher wiederum D- und E-Cyklin-abhängige-Kinasen blockiert (Schäfer KA, 1998). Dadurch bleibt das Retinoblastom hypophosphoryliert und die Zellen können nicht in die S-Phase eintreten. Außerdem werden weitere proliferationsfördernde Gene wie *Jun*, *Fos*, *Interleukin 6* und das antiapoptotische Molekül Bcl2 durch Bindung von TATA-Box-Binding-Protein (TBP) auf der Transkriptionsebene blockiert, was durch p53 veranlasst wird. Der zweite Leserahmen im 9p21 Genlokus kodiert für ein Tumorsuppressorgen ARF (alternative reading frame). In Mäusen hat das Genprodukt ein Molekulargewicht von 19 kDa und wird als p19<sup>ARF</sup> bezeichnet, dagegen ist das humane Genprodukt 14 kDa groß und wird als p14<sup>ARF</sup> bezeichnet. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass p19<sup>ARF</sup> sowohl p53 bindet als auch seinen wichtigsten physiologischen Inhibitor MDM2 (**m**urine **d**ouble **m**inute

chromosome 2) binden kann und somit die Blockade aufhebt (Pomerantz et al, 1998). Außerdem verhindert p19<sup>ARF</sup> die MDM2 vermittelte Proteolyse von p53 und beschleunigt dagegen die Degradierung von MDM2. Das konnte auch für den humanen CDKN2A Locus gezeigt werden (Stott et al, 1998). Auf diese Weise bewirkt ein Verlust von p14<sup>ARF</sup>/p19<sup>ARF</sup> eine hohe Konzentration von MDM2 und wenig aktives p53 (Sharpless and Chin, 2003; Prives, 1998). In menschlichen Tumoren sind sowohl der Rb-Signalweg und als auch der p53-Signalweg sehr häufig unterbrochen und dadurch auch die Zellzyklusregulation sowie der Apoptoseweg. (Chin et al, 1998). Es kommt selten vor, dass das komplette *Rb*-Gen deletiert ist. Dagegen ist das Rb Protein in der Mehrzahl der menschlichen Tumoren durch Phosphorylierung inaktiviert, was auch z.B. durch das mutierte p16<sup>Ink4a</sup> oder das aktivierte CyclinD/CDK4 hervorgerufen wird. In vielen menschlichen Tumoren ist der CDKN2A Locus deletiert oder mutiert (Sharpless and Chin, 2003). In einer jüngeren Studie konnte eine p16<sup>Ink4a</sup> Inaktivierung durch veränderte Methylierung (epigenetisches gene silencing) bei 75% der untersuchten Melanome festgestellt werden (Marini et al, 2006). Expressionsverlust oder niedrigere Konzentration von p16<sup>Ink4a</sup> korreliert mit erhöhter Zellproliferation und einer schlechteren Prognose bei Melanopatienten mit der vertikalen Wachstumsphase (Straume et al, 2000). Beim Melanom wurde eine Überexpression von CDK6 (Tang et al, 1999) als auch eine Amplifikation von CDK4 (Curtin et al, 2005) beobachtet. Bei drei Familien, mit genetischer Disposition zum Melanom, konnte eine Keimbahnmutation im CDK4 Locus nachgewiesen werden (Ibrahim and Haluska, 2009). Bei vielen anderen untersuchten Melanomfamilien war der CDK4 Locus wiederum intakt. Trotz der Tatsache, dass p53 in menschlichen Tumoren ein am häufigsten mutiertes Gen ist, kommt dieses in Melanomen als auch in den Melanomzelllinien selten mutiert vor (0%-25%; Albino et al, 1994). Aber der wichtigste physiologische Inhibitor von p53 HDM2 (humane Homolog von MDM2) ist in mehr als 40 % der malignen Veränderungen wie z.B. solide Tumore, Sarcome und Leukämien überexprimiert (Rayburn et al, 2005) und es gibt eine Korrelation zwischen der Melanomprogression und einer erhöhten HDM2 Protein Expression, ohne eine Genamplifikation (Polsky et al, 2001). Wie auch immer, im Gegensatz zu den anderen Tumoren wird die Rolle von p53 bei Melanomen in der Literatur sehr kontrovers diskutiert. Bei einigen menschlichen Tumoren ist der PI3-Kinase-AKT-Signalweg aktiviert. Dieser fördert Überlebenssignale durch die Aktivierung oder Hemmung anderer wichtiger Kaskaden in der Zelle. Die Aktivierung des PI3-Kinase-AKT Signalweges ist auch bei Melanomen bekannt. Durch die Integrin- und Wachstumsfaktorenbindung an die entsprechenden Rezeptoren werden Wachstum und Überlebensrate von Melanomzellen begünstigt. Die

Aktivierung dieses Signalweges kann auch durch eine Überexpression von Ras (Ibrahim and Haluska, 2009) oder durch Verlust des *PTEN* Tumorsuppressorgenes zustande kommen. PTEN ist eine Phospholipid-Phosphatase, die das PI3-Kinase vermitteltes Überlebenssignal hemmt. Außerdem inhibiert dieser den MAPK Signalweg, reguliert die p27 Expression und dadurch den Zellzyklusarrest, erhöht die Zellmigration durch Dephosphorylierung von FAK (**focal adhesion kinase**), unterreguliert die Expression von proapoptotischen Proteinen wie bcl2 und vieles mehr (Fecher et al, 2007). Der Verlust von PTEN auf dem Chromosom 10q23.3 wurde bei vielen humanen Tumoren inklusive Melanom beschrieben. Somatische Punktmutationen wurden nur in einer Kombination mit aktivierten BRAF in Melanomen gesehen (Tsao et al, 2004). Ein sehr wichtiges Glied in dieser Kaskade ist auch das AKT Protein. Ein einmal aktiviertes AKT ist in der Lage, viele andere Substrate wie MDM2, NFkB, BAD und p27 zu phosphorylieren und führt dadurch zu Zellzyklusprogression oder inhibiert die Apoptose. Die erhöhte Expression des phosphorylierten AKT Proteins ist assoziiert mit einer Tumorprogression und einer niedrigen Überlebensrate bei Melanompatienten (Dai et al, 2005). Bei 54% Naevi, 71% primären Melanomen und bei 71% Melanommetastasen konnte eine erhöhte phosphorylierte AKT Expression festgestellt werden (Slipicevic et al, 2005). Zusätzlich konnte eine höhere Expression von AKT bei displastischen Naevi und Melanom Metastasen im Vergleich zu benignen Naevi beobachtet werden. AKT3 ist eine Form dessen Expression am häufigsten bei Melanomen gestört ist, wobei nur eine Überexpression aber keine Mutationen im *Akt3*-Gen festgestellt werden konnten (Stahl et al, 2004). Die gezielte Unterdrückung der AKT3 Expression in Melanom Zelllinien führte zu einer erhöhten Apoptoserate. Daraus könnte man schließen, dass die Überexpression von AKT3 für die Melanomentwicklung nur von Vorteil sei. Abgesehen von den Veränderungen in vielen, teilweise oben beschriebenen, Signalwegen zeigte auch die Herstellung des genomischen Profils von Melanomen wie komplex und heterogen diese Erkrankung ist (Plesance et al, 2009). Eine Genamplifikation von MTF (**microphthalmia-associated-transkription-factor**) konnte auf diese Weise in 10% der primären melanozytären Hautläsionen und in 15% bis 20% der Melanommetastasen detektiert werden, aber nicht in den benignen Naevi. Die Genamplifikation von MTF bei Patienten mit Melanommetastasen korrelierte mit einer niedrigeren 5 Jahres-Überlebensrate (Garraway et al, 2005). MTF gehört zu der MiT Familie und ist ein Transkriptionsfaktor, der für die Entwicklung von Melanozyten sehr wichtig ist. Es induziert die Transkription von Genen wie z.B. *tyrosinase* und *tyrp 1*, die wiederum wichtig für die Melaninproduktion sind. Eine MTF Expression wird hauptsächlich über den Wnt Signalweg reguliert. Kann aber auch z.B. durch  $\alpha$ MSH ( **$\alpha$ -melanocyte-stimulating-hormone**)

oder SCF (stem cell factor oder auch als c-KIT Ligand bekannt) über den MAPK Signalweg beeinflusst werden. Eine direkte Verbindung zwischen MITF und INK4A unterstützt die Erklärung, dass es eine starke Assoziation zwischen INK4A Mutationen und Melanomen gibt. Warum Melanozyten lieber INK4A als MITF oder Rb mutieren, könnte man eventuell dadurch erklären, dass diese beiden Gene *MITF* und *Rb* wichtig für das Überleben von Melanozyten sind, während *INK4A* anscheinend nur den Zellzyklus reguliert (Loercher et al, 2005).

Trotz der intensiven Forschung und Identifizierung von verschiedenen Onkogenen bzw. Tumorsuppressorgenen ist bis heute kein Gen beschrieben worden, das in der Mehrheit aller Melanome verändert exprimiert oder mutiert ist.

### 1.3 METASTASIERUNG

Während das Melanom im Primärstadium effektiv durch das Herausschneiden bekämpft werden kann, liegt die 5 Jährige-Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen bei nur 50%. Die Melanommetastasen in anderen Organen repräsentieren die resistentesten humanen Tumore und sind für die hohe Mortalitätsrate und die sehr niedrige durchschnittliche Überlebensrate von 6 bis 9 Monaten verantwortlich (Balch et al, 2001). Für eine erfolgreiche Metastasierung müssen die Tumorzellen eine ganze Reihe von Veränderungen durchlaufen. So müssen sich die Tumorzellen vom Primärtumor ablösen, durch das umliegende Gewebe in das Gefäßsystem einwandern, an einer anderen Stelle wieder auswandern und dort während der Proliferation ein eigenes Gefäßsystem anlegen (Angiogenese), um den neu entstandenen Tumor zu versorgen. Im Vergleich zu ihren Primärtumoren besitzen die metastasierenden Tumorzellen ein stark verändertes Genexpressionsmuster. Adhäsionsmoleküle spielen eine wichtige Rolle bei dem Wanderungsprozess von Zellen, aber auch in der Aufrechterhaltung des Zellverbandes. Sowohl die Interaktion mit den extrazellulären Matrixproteinen, als auch der Zell-Zell-Kontakt ist bei den meisten normalen Zellen für das Wachstum und Überleben nötig (*anchorage dependence*). Ist dieser Kontakt gestört, sterben normale endotheliale und epitheliale Zellen durch Apoptose (Ishizaki et al, 1995; Giancotti and Ruoslahti, 1999). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass ein gestörter Kontakt zu den extrazellulären Matrixproteinen eine Fas-Induzierte Apoptose bei epithelialen Zellen auslösen kann (Aoudjit and Vuori, 2001). Das Expressionsmuster von Zelladhäsionsmolekülen verändert sich während des Metastasierungsprozesses stark. Eines der ganz wichtigen

Adhäsionsmoleküle für die Epithelzellen ist E-Cadherin, welches eine  $\text{Ca}^{2+}$  abhängige homophile Adhäsion vermittelt (Takeichi, 1990). Dadurch spielt E-Cadherin eine tragende Rolle in der Integrität des Zellverbandes. In den meisten epithelialen Tumoren ist entweder deren Expression herunterreguliert oder deren Funktion gestört (Wijnhoven et al, 2000). In der Tumorgenese des Melanoms stellt E-Cadherin das Hauptadhäsionsmolekül für die Interaktion zwischen den Melanozyten und Keratinozyten dar. *In vitro* Studien haben gezeigt, dass dieser Zellkontakt die Proliferation und Differenzierung der Melanozyten reguliert. Bei einer Unterbrechung dieser Interaktion beginnen sich die Melanozyten schnell zu teilen und exprimieren zusätzlich Oberflächenmoleküle, die normalerweise mit Melanomen assoziiert sind (Johnson, 1999). So spielt in den ersten Schritten der Metastasierung die Herunterregulation von E-Cadherin eine entscheidende Rolle, denn dadurch können sich die Tumorzellen einerseits vom Primärtumor ablösen und andererseits leichter proliferieren. In späteren Phasen der Tumorigenese ist E-Cadherin dagegen wieder stärker exprimiert (Danan et al, 1996), vermutlich um einen neuen Zellverband aufzubauen. Die Signaltransduktion der E-Cadherine verläuft über die  $\beta$ -Catenine, mit denen sie zytoplasmatisch assoziiert sind. Die  $\beta$ -Catenine stellen über  $\alpha$ -Catenin den Kontakt zum Aktin-Zytoskelett her. Für Karzinome wird diskutiert, dass die Aktivierung des Wnt-Signalweges durch die unterregulierte Expression von E-Cadherinen die Zellen in eine leichter migrierende, mesenchymale Form transformiert. Des Weiteren könnten durch die Aktivierung des Wnt-Signalweges auch postembryonal die Anzahl der Stammzellen in den Epithelien verändert werden, die wiederum Ausgangspunkt einer Tumorentstehung sein können (Taipale and Beachy, 2001).

Ein anderes Beispiel für ein Adhäsionsmolekül, das während der Metastasierung im fortgeschrittenen Primärtumor verstärkt exprimiert wird, ist das Integrin VLA4 ( $\alpha 4\beta 1$ -Integrin). Physiologische Liganden sind Thrombospondin, Fibronectin und das endotheliale Adhäsionsmolekül VCAM1. Die Expression von VLA4 korreliert mit einer schlechten Prognose für Patienten mit einem malignen Melanom (Schadendorf et al, 1995).

Integrin  $\alpha V\beta 3$ , welches ein spezifischer Rezeptor für Fibronectin ist, könnte während der Metastasierung auch eine wichtige Rolle spielen.  $\alpha V\beta 3$  vermittelt den Zellen wachstumsinhibierende Signale und ist in vielen Tumoren niedrig exprimiert. Eine Überexpression von  $\alpha V\beta 3$  bewirkte dagegen eine verminderte Tumorigenität der Zellen (Giancotti and Ruoslahti, 1990; Varner et al, 1995).

MCAM/Muc18/Mel-Cam/CD146 (**m**elanoma **c**ell **a**dhesion **m**olecule) ist ein Melanomantigen das ebenfalls während des Metastasierungsprozesses verstärkt exprimiert wird. Es gehört zu der Immunglobulin-Superfamilie und gilt als ein wichtiger und

aussagekräftiger prognostischer Marker bei Melanompatienten (Rothberg et al, 2009). Es ist gering auf Naevi und dünnen Primärtumoren, jedoch stark in dicken Tumoren sowie Metastasen exprimiert. Abgesehen davon konnte ein Zusammenhang zwischen der MCAM Expressionsintensität und einer schlechter Überlebensrate bei Melanompatienten festgestellt werden (Zigler et al, 2008). Die Zunahme seiner Expression korreliert mit der zunehmenden vertikalen Tumordicke des Melanoms und dadurch einer schlechten Prognose für den Patienten (Lehmann, 1987 und 1989; Pearl et al, 2008). Außerdem haben Tierexperimente gezeigt, dass einer de novo Expression von MCAM in einer primären Melanomzelllinie, (welche keine Fähigkeit zu metastasieren besaß und die MCAM Expression ist negativ) hergestellt durch MCAM cDNA Transfektion, diesen Zellen eine Metastasierungsfähigkeit verleiht. Dieser Effekt konnte durch eine Behandlung mit  $\alpha$  MCAM Antikörpern wieder reversibel gemacht werden (Xie et al, 1997).

Nachdem sich die Tumorzellen vom Primärtumor abgelöst haben und durch das umliegende Gewebe in Blut- oder Lymphgefäße eingewandert sind, können sie in einem anderen Organ wieder auswandern und eine neue Tumorkolonie bilden. Um unabhängig von exogenen Faktoren wachsen zu können, werden in dieser Phase autokrine Wachstumsfaktoren verstärkt exprimiert (Rodeck, 1993; Lu and Kerbel, 1994). In einem Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass Interleukin 6 die Entwicklung und Progression von spontanen Melanomen fördert (von Felbert et al, 2005). Autokrine Wachstumsfaktoren wie bFGF, IL6 usw. fördern bei den Melanomzellen die Zellproliferation während parakrine Wachstumsfaktoren wie TGFbeta, PDGF, VEGF usw. eher die Umgebung verändern und dadurch Tumorwachstum sowie die Invasion des Tumors begünstigen (Lazar-Molnar et al, 2000). Die verstärkte Expression von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren ist eine weitere Strategie. So ist z.B. HER2 (**h**umane **e**pidermal **g**rowth **f**actor **r**eceptor **2**) in vielen verschiedenen Tumoren wie dem Ovarial- und Mammakarzinom sowie dem Pankreaskarzinom und NSCLC (Non-small-cell-lung-cancer) überexprimiert was mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Scholl et al, 2001). Mutationen in den Signalwegen der Wachstumsrezeptoren sind bei allen menschlichen Tumoren bekannt, was zu einer verstärkten Proliferation der Tumorzellen führt (Blumenjensen and Hunter, 2001).

### **1.3.1 VERÄNDERUNG DER ZELLMOBILITÄT**

Anschließend werden noch einige Gene erwähnt, die mit der Metastasierung von Melanomen und mit der Zellmobilität in Verbindung gebracht werden.



In einer Studie wurden Melanomzellen *in vivo* auf ein hohes Metastasierungspotential selektioniert und anschließend in einer vergleichenden genomischen Analyse mit den niedrig metastasierenden und parental Melanomzellen verglichen. Die RhoC GTPase wurde in den stark metastasierenden Melanomzellen als überexprimiert identifiziert. Eine normale physiologische Funktion von RhoC ist die Regulation der Aktin vermittelten Zytoskelettaufbaus. Dominant negative Formen von RhoC verändern den Phänotyp der Zellen und verhindern dadurch eine Metastasenbildung. Somit ist eine Überexpression von RhoC wahrscheinlich an der Tumor-Zell-Invasion beteiligt (Clark et al, 2000).

Durch subtraktive Hybridisierung zwischen metastasierenden und nicht metastasierenden Melanomzelllinien wurde das Metastasensuppressor-Gen *nm23* identifiziert. Der Verlust der *nm23* Expression ist mit dem metastasierenden Potential von einigen Tumoren im späten Stadium assoziiert (Freije et al, 1998). *Nm23*-Melanomzelltransfektanten reduzierten die Tumorzinzidenz, deren metastasierendes Potential und ihr Vermögen auf Zytokine zu antworten *in vivo* (Leone et al, 1991). Es wird vermutet, dass die metastasierungshemmende Wirkung durch eine Veränderung der Zellmobilität bewirkt wird (Freije et al, 1997).

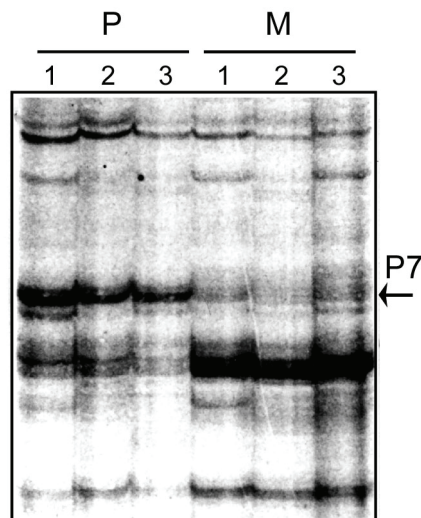
Ebenso mit einer subtraktiven Hybridisierung wurde das Metastasensuppressor-Gen *KiSS1* identifiziert (Lee et al, 1996). Das *KiSS*-Genprodukt, auch Metastin genannt, ist in einigen Tumorzellen geringer exprimiert und unterdrückt die Metastasenbildung in humanem Melanom und Brustkarzinom (Makri et al, 2008). Metastin wurde als extrazellulärer Peptidligand eines G Protein gekoppelten Orphan-Rezeptors gefunden und kann die Zellmobilität von rezeptortragenden Tumorzelllinien *in vitro* sowie die Fibronectin-induzierte Chemotaxis stabiler *Kiss1*-Rezeptor-Transfektanten in Melanomzelllinien inhibieren. Die den *KiSS*-Rezeptor exprimierenden Transfektanten aktivierten nach Metastinbehandlung die FAK (focal adhesion kinase) und bildeten Adhäsionsfoci. *In vivo* konnte die beginnende Metastasierung der *KiSS*-Rezeptor tragenden Melanomzelllinien durch Metastingabe drastisch reduziert werden (Ohtaki et al, 2001).

*NEDD9* ist ein neues Gen, das die Invasion *in vitro* und Metastasierung *in vivo* von normalen und transformierten Melanozyten erheblich steigert. Funktionsgemäß interagiert das *NEDD9* Protein mit FAK und zeigt häufig eine stabile Überexpression in humanen Melanom Metastasen im Vergleich zu primären Melanomen (Kim et al, 2006). Diese Studie demonstriert, wie wichtig die focal adhesion Komplex Komponente während des Metastasierungsprozesses ist und macht Hoffnung, dass durch die Hemmung dieses Komplexes eventuell die Progression von primären Melanomen zu Melanom Metastasen angehalten werden kann (Chin L. et al, 2007).

### 1.3.2 IDENTIFIZIERUNG VON METASTASIERUNGS-ASSOZIIERTEN MOLEKÜLEN

Der Vielzahl von Genen und Molekülen, die in den soeben beschriebenen Prozessen der Tumorigenese und Metastasierung involviert sein können, steht eine relativ kleine Anzahl an Genen gegenüber, für die tatsächlich gezeigt werden konnte, dass sie mit hoher Wahrscheinlichkeit am Metastasierungsprozess beteiligt sind. Hier zugehört z.B. die *RhoC* GTPase und das Metastasensuppressor-Gen *KiSS1*, bei denen jeweils in Mausmodellen eine Assoziation mit der Metastasierung gezeigt werden konnte.

Um auch direkt in humanen Tumoren Metastasierungsassoziierte Gene des Melanoms zu untersuchen, wurde in unserem Labor eine *mRNA differential display*-Analyse durchgeführt. Dabei wurde das Expressionsmuster von Zelllinien, die aus dem Primärtumor und der Metastase desselben Patienten generiert wurden, verglichen (Kuske, 1998).



**Abbildung 1.2** *mRNA differential display*-Analyse.

In jeweils drei Parallelreaktionen (1-3) wurde die mRNA von Zelllinien, aus einem Primärtumor (P) generiert und aus der autologen Melanommetastase (M) mit Oligo-dT-Primern in cDNA überschrieben. Nach einer PCR-Amplifikation mit einer Mischung aus mehreren Zufallsprimern welche mit  $P^{33}$  markiert wurden, die Reaktionsprodukte auf einem 6%igen, denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und per Autoradiographie sichtbar gemacht. Bei der hier mit P7 markierten Bande handelt es sich um ein PQ-reiches Genprodukt das PHLDA1 genannt wurde (Kuske, 1998).

Eine der cDNA, die in der Melanommetastase vermindert exprimiert war, codierte für ein *PQ-rich-protein* (mit P7 markierte Bande in der Abbildung 1.2). Das *PQ-rich-protein* war in drei unabhängigen Metastasezelllinien im Vergleich zu den autologen primären Melanomzelllinien vermindert exprimiert. Es scheint demnach häufiger in der Melanomtumorprogression herunterreguliert zu werden. Aufgrund seiner Pleckstrin ähnlichen

Domänen wurde es vom *Human Gene Nomenclature Committee* in London (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature>) in PHLDA1 für *pleckstrin homology-like domain family A member 1*, umbenannt (Frank et al, 1999).

Das *PHLDA1* Gen ist auf Chromosom 12q15 lokalisiert (Kuske and Johnson, 2000). Genomische Southernblotanalysen deuten darauf hin, dass PHLDA1 nur einmal im Genom vorkommt. Es sind keine großen Sequenzhomologien zu anderen humanen Genen bekannt. Northernblot-Analysen zeigten Transkripte von 2, 3, 5, und 6 kbp, die vermutlich durch alternatives Splicen und die Verwendung verschiedener Polyadenylierungssignale zustande kamen (Kuske, 1998). Der isolierte 4,5 kbp lange cDNA-Klon enthält am 5'-Ende einen offenen Leserahmen mit zwei potentiellen Translationsstartpunkten. Das erste ATG codiert für ein Molekül von 400 Aminosäuren (AA) und einem errechneten Molekulargewicht von 46 kDa, das zweite ATG für ein Molekül von 259 AA und einem Molekulargewicht von 29,5 kDa. Das PHLDA1 Protein enthält keine Transmembrandomäne, aber kurz nach dem zweiten ATG ein potentielles Kernlokalisationsignal und einige Motive, die für die Vermittlung von Protein-Protein Interaktionen bekannt sind (Abbildung 1. 3).

**M**<sup>1</sup>RRAPAAERLLELGFPFRCGRQEPPFPLGVTRGWGRWPIQKRREGARPVPFSERSQEDGRGPAA  
 RSSGTLWRIRTRLSLCRDPEPPPPLCLLRVSLLCALRAGGRGSRWGEDGARLLLLPPARAAGNGEAE  
 PSGGPSYAGRM<sup>2</sup>LESSGCKALKEGVLEKRSDGLLQLWKKKCCILTEEGLLLIPPKQLQHQQQQQQQ  
 QQQQQQPGQGPAEPSQPSGPAVASLEPPVKL**KELHFSNMKT**VDC**VERK**KGKMYFTV**MAE**GEI  
**DF**RCPQD**QGWNAEITLQMVQY**KNRQAILAVK**STR**QKQHLVQQQP**PSQPQPQLQPQPQPQPQ**  
**QPQPQSQPQPQPQPKQPQQLHPY**PHPHPHSHPHSHPHPHPHPHPHQIPHHPQP**HSQ**PHG  
 HRLLRSTNSA

**Abbildung 1. 3 Aminosäuresequenz und Proteinmotive von PHLDA1** (Neef et al, 2002).

Die beiden Translationsstartpunkte von PHLDA1 sind mit M<sup>1</sup> und M<sup>2</sup> angegeben, die Pleckstrin-Homologie-ähnlichen Domänen sind mit **fetten** Buchstaben hervorgehoben, die anderen Proteinmotive sind farbig dargestellt. **QQQ**, *opa*-repeats; **PQ/PH**-Domänen; **STR**, Phosphorylierungsstelle der Proteinkinase-C; **PXXP**, SH3-Bindedomäne. Das potentielle Kernlokalisationsignal ist unterstrichen und kursiv hervorgehoben.

Der Polyglutaminbereich besteht hier aus 14 aufeinander folgenden Glutaminen, die auch M- oder *opa*-repeat genannt werden. Solche Polyglutaminbereiche sind bei Genen beschrieben, die bei der neuronalen Entwicklung von Drosophila eine Rolle spielen (Wharton et al, 1985). Des Weiteren interagiert die Polyglutaminomäne des Transkriptionsfaktors SP1 mit verschiedenen Untereinheiten von TFIID (Hoey et al, 1993). Längere Polyglutaminbereiche sind auch in einigen neurodegenerativen Krankheiten wie z.B. Chorea Huntington beschrieben. Dabei handelt es sich aber um Mutationen, wodurch der Wildtyp-

Polyglutaminbereich von 6 bis 35 Glutaminen auf 36 bis 121 Glutaminen verlängert wird, was dann mit den neurodegenerativen Erscheinungen assoziiert ist (Orr, 2001). Auch die anderen Motive wie PQ/PH Domänen und die SH3 Bindedomäne sprechen dafür, dass PHLDA1 Protein-Protein Interaktionen eingeht. Auch die potentielle Phosphorylierungsstelle der Proteinkinase C (PKC) könnte ein Hinweis auf eine Vermittlung von Signalen durch PHLDA1 sein. PHLDA1 besitzt sieben Pleckstrin ähnliche Domänen. Von Pleckstrin Domänen wurde auch eine Bindung an biologische Membranen beschrieben, wodurch Signale an und von der Plasmamembran weitergeleitet werden können.

Northernblot-Analysen zeigten, dass PHLDA1 ubiquitär im Gewebe exprimiert wird, mit großen Unterschieden in der Expressionsstärke. Die stärkste Expression war in Herzmuskel-, Lungen-, und Nierengewebe sowie im Gehirn zu beobachten. In Zelllinien, lässt sich PHLDA1 durch Phorbol-12-myristat-13-azetat (PMA) induzieren. Dabei war eine Induktion der PHLDA1 mRNA nach 1 bis 2 Stunden zu beobachten, sie erreichte die stärkste Expression nach 3 bis 6 Stunden und konnte bis 48 Stunden nach der Stimulation detektiert werden. Eine Proteinbiosynthese war zur Expression der PHLDA1 mRNA nicht nötig, da Cycloheximid keinen Einfluss auf die PMA induzierte PHLDA1 Expression hatte (Kuske, 1998). PHLDA1 gehört damit zu einer Gruppe von Genen, die als *immediate early response genes* bezeichnet wird. Zu dieser Gruppe gehören Transkriptionsfaktoren, Zytokine, Membran- und Zytoskelettproteine, deren mRNA Expression Minuten nach Mitogenstimulation aktiviert wird (Lau and Nathans, 1987). Allerdings geht bei diesen „typischen“ *immediate early response* Genen wie z.B. *c-fos* das Expressionsmaximum nach wenigen Stunden wieder auf Basalniveau zurück.

Die Ergebnisse aus der *mRNA differential display* Analyse konnten auch immunhistochemisch auf dem Gewebe bestätigt werden. Immunhistochemische Untersuchungen auf Naevi und Melanomgewebe haben gezeigt, dass das PHLDA1 Protein stark in benignen Naevi exprimiert ist, während es im Verlaufe der Tumorprogression vom Primärtumor bis hin zu Metastase herunterreguliert wurde (Neef et al, 2002).

Weiter konnte in einer vorklinische Studie gezeigt werden, dass das PHLDA1 Protein wie mRNA in Mammakarzinom im Vergleich zu normalen Mammagewebe stark herunter reguliert war. Die herabgesetzte Expression von PHLDA1 in Mammakarzinom korrelierte stark mit einer schlechteren Prognose als bei Patientinnen, deren Tumore PHLDA1 positiv waren (Nagai et al, 2007).

## 1.4 TUMOR ESCAPE MECHANISMEN

Obwohl die genaue Funktion von PHLDA1 noch nicht bekannt ist, konnte bisher die PHLDA1 Expression in vielen verschiedenen Systemen mit einer erhöhten Apoptose Empfindlichkeit assoziiert werden.

### 1.4.1 APOPTOSE UND APOPTOSERESISTENZ

Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods bzw. ein „Selbstmordprogramm“ einzelner biologischer Zellen. Dieses kann von außen angeregt werden oder aufgrund von zellinternen Prozessen ausgelöst werden (etwa nach starker Schädigung der Erbinformation). Im Gegensatz zum anderen bedeutenden Mechanismus des Zelltodes, der Nekrose, wird die Apoptose von der betreffenden Zelle selbst aktiv durchgeführt und ist Teil des Stoffwechsels der Zelle. Während der Entwicklung eines Organismus ist die Apoptose essentiell. Im adulten Organismus ist sie unerlässlich z.B. zur Kontrolle der Zellzahl und der Größe von Geweben, bei der Erneuerung von Geweben (beim Riechepithel der Nase oder während der Menstruation), bei der Selektion und Abbau unnötiger oder potentiell schädlicher Zellen des Immunsystems, zur Eliminierung entarteter Zellen und so weiter. Gegenwärtig wird die Apoptose besonders im Zusammenhang mit der Krebsentstehung intensiv erforscht. Ein Ziel der Krebsforschung ist es, eine kontrollierte Apoptose bei entarteten Zellen auszulösen. Doch auch die Krebszellen nutzen den Apoptosemechanismus, um menschliche Abwehrzellen, so genannte tumorinfiltrierende Lymphozyten (TILs), auszuschalten. So findet man an der Oberfläche verschiedener Tumorzelllinien ein apoptoseauslösendes Protein, den CD95-Liganden (Fas Ligand). Diesen Mechanismus bezeichnet man als „*tumor counterattack*“ (Igney et al, 2000; Walker et al, 1998). Für die Tumorentwicklung neben der unkontrollierten Zellproliferation ist auch eine Resistenz gegenüber dem programmierten Zelltod notwendig. Die Expression von vielen Molekülen die Apoptose reduzieren oder vorbeugen, konnte in Melanomen identifiziert werden.

Die Apoptosemaschinerie kann grob in zwei Bereiche unterteilt werden: die Sensoren und die Effektoren. Sensoren überwachen die extrazelluläre und intrazelluläre Umgebung und leiten ihre Signale über Adaptermoleküle an spezifische Proteasen (Caspasen) weiter, die als Effektoren der Apoptose fungieren und das eigentliche Selbstmordprogramm in einer Zelle einleiten. Zu den Sensoren gehören zum einen die Zelladhäsionsmoleküle, zum anderen Rezeptoren der TNF-Familie wie der TNF-Rezeptor, Fas-Rezeptor (CD95/Apo1) und TRAIL-Rezeptor (DR, death receptor). Ein anderer, bereits erwähnter Sensor ist p53, der für

die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität nach DNA-Schäden verantwortlich ist. Ein wichtiger Signalweg der Apoptose wird über den Fas-Rezeptor vermittelt. Der Fas-Rezeptor trimierisiert nach Fas-Ligandbindung und rekrutiert das Adaptermolekül FADD (Fas associated death domain), das wiederum die Procaspase 8 aktiviert. Die aktivierten Effektorcaspasen (Caspasekaskade) spalten Strukturproteine (z.B. Actin, Zytokeratin-18, Laminine) sowie Signalproteine (MEKK1, PKCd, MDM2, Rb) und fragmentieren die DNA (Tan and Wang, 1998). Es gibt viele Möglichkeiten die Signalkaskaden in der Auslösung und Ausführung der Apoptose zu unterbrechen. Veränderungen in der Adhäsionsmolekülen Expression sowie Mutationen in den p53- und Rb-Signalwegen und konstitutive Aktivierung von MAPK Signalkaskade wurden schon erwähnt. Des Weiteren sind die Apoptose-Suppressoren Bcl2 und Bcl-X<sub>L</sub> in vielen Tumoren hochreguliert (Reed, 1998), das proapoptotische Molekül Bax dagegen herunterreguliert (Rampino et al, 1997; Meijerink et al, 1998). Bei einigen Tumoren werden durch die Aktivierung des PI3-Kinase-AKT-Signalweges (welcher wachstumsfördernde Signale von Wachstumsfaktor-Rezeptoren übermittelt) proapoptotische Signale gehemmt. Die Aktivierung des PI3-AKT Signalweges kann durch IGF1/2 oder Il3 (Evan and Littlewood, 1998), durch eine Überexpression von Ras oder durch den Verlust des PTEN-Tumorsuppressors zustande kommen. Der Verlust von PTEN auf Chromosom 10q23.3 wurde auch für Melanome beschrieben.

Einige Lungen- und Kolonkarzinome zeigen auch eine verstärkte Expression eines nicht signalleitenden Fas-Rezeptors und können so der Fas-vermittelten Apoptose entkommen (Pitti et al, 1998). Im Melanom korreliert die Expression des TRAIL-Rezeptors mit der Empfindlichkeit gegenüber TRAIL induzierter Apoptose. Die Expression von Fas als auch von TRAIL-Rezeptoren kann durch ultraviolettes Licht, einem Hauptrisikofaktor zur Entstehung des Melanoms, herunterreguliert werden (Bachmann et al, 2001).

Das TDAG51, das murine Homolog von PHLDA1, wurde in einem Screen identifiziert, als nach Molekülen gesucht wurde, die in dem T-Zellrezeptor (TCR) aktivierten Zelltod involviert sind (Park et al, 1996). Um Moleküle zu identifizieren, die in diesen Prozess involviert sind, verwendeten Park und Mitarbeiter eine T-Zell-Hybridomzelllinie, die nach Stimulation ihres TCR aktiviert wurde, Interleukin 2 produzierte und anschließend durch die Apoptose untergingen. Durch eine chemische Mutagenese erhielten sie eine mutante Zelllinie, die sich noch aktivieren ließ d.h. Interleukin 2 produzierte, aber nicht mehr apoptotisch war. Diese Zelllinie wurde in einer genomischen Hybridisierung mit der parentalen Zelllinie verglichen und es konnte festgestellt werden, dass das TDAG51 Gen durch ein Stopcodon mutiert war und keine Expression von TDAG51/PHLDA1 vorhanden war. Die mutanten

Zelllinien exprimierten weniger Fas auf der Zelloberfläche. Ihre Apoptoseresistenz wird durch die niedrige Fas-Expression erklärt. Durch TDAG51-cDNA Transfektion konnte dieser Defekt aufgehoben werden und die Zellen waren nach einer TCR Stimulation wieder sensitiv für Apoptose. Die Autoren postulierten daraus, dass TDAG51 eine Verbindung zwischen dem TCR und der Fas-Expression während der aktivierungsinduzierten Apoptose herstellt (Park et al, 1996).

In einem weiteren unabhängigen System konnte das Rattenhomolog von PHLDA1 (80% homolog mit dem humanen PHLDA1) identifiziert werden (Gomes et al, 1999). Gomes und Mitarbeiter verwendeten eine *mRNA differential display*-Analyse, um Gene zu identifizieren, die in der neuronalen Differenzierung bei Ratten eine Rolle spielen. Sie verglichen das Expressionsmuster von embryonalen Rattenhippocampuszellen mit und ohne FGF (fibroblast-growth-factor). FGF löst in diesen Zellen eine Differenzierung aus, der dann eine p53-abhängige Apoptose folgt. Das Rattenhomolog von PHLDA1, PQR (proline and glutamine rich), war in den apoptotischen Zellen stärker exprimiert. Eine Mikroinjektion eines Anti-PQR-Antikörpers in die apoptotischen Zellen erhöhte die Zahl der überlebenden Zellen um 50%, wohingegen eine transiente Expression der PQR-cDNA die Anzahl der überlebenden, differenzierten und noch nicht differenzierten Zellen um 30-50% reduzierte. Demnach scheint das endogene PQR in den neuronalen Zellen eine Apoptose zu vermitteln. Eine Korrelation der PHLDA1- und Fas-Expression konnte in diesem System jedoch nicht beobachtet werden (Gomes et al, 1999).

Ein zweiter wichtiger Signalweg der Apoptosekaskade geht über die Mitochondrien. Antiapoptotische Moleküle der Bcl2-Familie (Bcl2, Bcl-X<sub>L</sub>, CED9) sind in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und verhindern die Freisetzung des Cytochrom C. p53 kann die Apoptose durch Transkription des proapoptotischen, ebenfalls zur Bcl2-Familie gehörenden Moleküls Bax, auslösen. Bax und Bad hemmen die Wirkung von Bcl2 und tragen so zur Freisetzung des Cytochrom C bei. Dadurch wird die Konformation von Apaf1 (**apoptosis activating factor-1**) geändert, wodurch seine **caspase recruiting domain (CARD)** aktiviert wird, die die Procaspase 9 in die Caspase 9 überführt, welche dann wiederum die Effektorcaspasen rekrutiert (Adams and Cory, 1998; Hengartner, 2001).

Auch in Melanomzellen wurde die PHLDA1 Expression mit der Apoptose Empfindlichkeit in Verbindung gebracht. Melanomzellen mit einer konstitutive Überexpression von PHLDA1 zeigten eine höhere Apoptose Sensitivität und eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika (Neef et al, 2002).

In verschiedenen Proben von Melanomgeweben konnte auch eine Unterregulierung des Apoptoseeffektors Apaf1 festgestellt werden. In mehr als 40% der getesteten Melanome war eine LOH (*loss of heterozygosity*) zu beobachten. Die verminderte Expression von Apaf1 kam durch *epigenetisches gene silencing* des verbleibenden Allels zu stande. Durch die Behandlung der Melanomzellen mit Inhibitoren der Methyltransferase oder Inhibitoren der Histon-Deazetylase stieg die Expression von Apaf1 wieder an (Soengas et al, 2001). Diese Arbeit zeigt eine Inaktivierung des p53-Signalweges *downstream* von p53 und bietet somit eine mögliche Erklärung der Resistenz von Melanomen gegenüber Chemotherapeutika (auch bei nicht mutiertem p53). Auch *upstream* von p53 konnte eine Inaktivierung *genesilencing* von Molekülen im p53-Apoptoseweg gezeigt werden. So ist z.B. der Promotor des p53 stabilisierenden Moleküls p14<sup>ARF</sup> und der DAPK (**d**eath **a**ssociated **p**roteine **k**inase) in Tumoren verstärkt methyliert (Jones, 2001).

Neben der Inaktivierung von proapoptotischen Sensor-, Signal- und Effektormolekülen kann der Tumor auch Inhibitoren der Apoptose aktivieren oder überexprimieren, um nicht selbst durch die Apoptosemaschinerie zerstört zu werden. Zusätzlich zu den schon beschriebenen antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl2-Familie (Bcl2 und Bcl-X<sub>L</sub>) existieren viele weitere apoptoseinhibierende Moleküle, die man als IAPs bezeichnet (**i**nhibitors of **a**poptosis). IAPs inhibieren Caspase Aktivität (French and Tschopp, 2002).

Eine PHLDA1 Unterregulierung in Melanomen und Mammakarzinomen kann auch zu einer Apoptoseresistenz führen, was als ein Tumor Escape Mechanismus bezeichnet wird.

#### **1.4.2 HERUNTERREGULIERUNG DER MHC KLASSE I**

Ein zweiter wichtiger Tumor Escape Mechanismus der die Tumorzellen bei Prozessen der Tumorgenese und Metastasierung den Angriffen des Immunsystems entkommen läßt, ist die Herunterregulierung von MHC Klasse I Molekülen. Das MHC Klasse I Protein ist aus einem 45 kDa schweren Peptid, das im MHC Locus auf dem Chromosom 6 (HLA A, B und C Gene) kodiert ist und einem 12 kDa schweren  $\beta$ 2 Mikroglobulin zusammengesetzt. MHC Klasse I Moleküle binden Peptide aus dem Zellinneren und präsentieren diese Peptide den CD8 (cytotoxischen) T-Zellen. CD8 T-Zellen können über ihre T-Zell-Rezeptoren MHC Klasse I zusammen mit beladenen Peptiden erkennen. Sie haben die Aufgabe, die Zellen im Körper zu überwachen und pathogene Zellen durch direkte Lysemechanismen zu eliminieren. MHC Klasse I Peptide werden normalerweise von allen kernhaltigen Zellen exprimiert, sodass alle



Zellen im Körper durch die CD8 T-Zellen überwacht und zerstört werden können, wenn diese fremde Antigene über MHC Klasse I präsentiert bekommen.

Tumorzellen zeigen häufig eine geringe Dichte an HLA Molekülen auf, aber auch der komplette Verlust von HLA Molekülen wurde beobachtet. Mutationen in Proteinen, die am Antigenprozessierungsweg beteiligt sind wie z.B. TAP und LMP sind eine häufige Ursache dafür. Aber auch Mutationen in der Biosynthese des MHC Proteins selbst oder des  $\beta$ 2-Mikroglobulins wurden bei verschiedenen Tumorarten genauso häufig beobachtet wie der Verlust einzelner Allele oder auch ein kompletter Verlust aller MHC Klasse I Moleküle (Garrido et al, 1997). Das führt dazu, dass tumorassoziierte Peptide nicht mehr über MHC Moleküle den T Zellen präsentiert werden können, also keine Erkennung und Eliminierung stattfinden kann. Darüber hinaus verändert sich auch das Antigenprofil im Laufe der Tumorprogression und die Expression bestimmter Antigene kann verloren gehen, was wiederum dazu führt, dass manche Tumorvarianten nicht mehr von den T-Zellen erkannt werden können.

## **1.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT**

Um Aufschluss über die biologische Funktion von PHLDA1 zu bekommen, wurden in unserem Labor stabile Transfektanten mit einer konstitutiven PHLDA1 Expression generiert. Mit Hilfe dieser Transfektanten und den entsprechenden Kontrollzellen konnte gezeigt werden, dass die konstitutive PHLDA1 Expression mit erhöhter basaler Apoptose sowie einer höheren Apoptose Empfindlichkeit assoziiert ist (Neef et al, 2002). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass die PHLDA1 Transfektanten auch eine höhere MHC Klasse I Expression als die Kontrollzellen aufweisen. Verlust oder eine niedrige MHC Klasse I Expression bei PHLDA1 Unterregulierung könnte ein Teil des Tumor Escape Mechanismus sein. Um diesen Mechanismus besser zu verstehen, wurde die MHC Klasse Expression bei den PHLDA1 Transfektanten in dieser Arbeit näher untersucht.

## 2 MATERIAL

### 2.1 CHEMIKALIEN

3-Amino-9-Ethylcarbazol	Sigma, Deisenhofen
3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT)	Sigma, Deisenhofen
Acrylamid (30%)/Bisacrylamid (0,8%)	Roth, Karlsruhe
Adenin-Hemisulfat Salz	Sigma, Deisenhofen
Agarose G	Sigma, Deisenhofen
Aminopterin	Sigma, Deisenhofen
Aminosäuren	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin (Natriumsalz)	Sigma, Deisenhofen
Azeton	Merck, Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt
Brij96	Fluka, Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie Blue R250	Serva, Heidelberg
DAPI 4,6 Diamidino-2-phenylindone	Sigma, Deisenhofen
Digitonin	Fluka, Deisenhofen
Cycloheximide	Sigma, Deisenhofen
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
N, N'-Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Disuccinimidylsuberat (DSS)	Pierce,
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure (100%, 96%)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethanol, p. a.	Merck, Darmstadt
Ethanol, 99%, vergällt	Biesterfeld Graen & Co.KG, München
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Fötale Kälberserum	Biochrom KG, Berlin
Formaldehyd 37%	Merck, Deisenhofen
Gelatine	Sigma, Deisenhofen
Genticin (G-418 Sufat)	Life Technologies, Karlsruhe
β-D-Glucose	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	Serva, Heidelberg
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Serva, Heidelberg
HEPES	Sigma, Deisenhofen
8-Hydroxychinolin	Sigma, Deisenhofen
Interleukin-6 (Il-6)	Roche (Boehringer), Mannheim
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt

Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumazetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Laursulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
l-Glutamin	Serva, Heidelberg
Lithiumazetat	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver (Naturaflor)	Töpfer, Dietmannsried
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol, reinst	Roth, Karlsruhe
Methanol, p. a.	Merck, Darmstadt
Methylenblau	Sigma, Deisenhofen
Mineralöl (PCR)	Sigma, Deisenhofen
Natriumazetat	Sigma, Deisenhofen
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumkarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumzitat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenkarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Serva, Heidelberg
NP-40	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Orthophenyldiamine	Sigma, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penizillin	Sigma, Deisenhofen
Phenol	Merck, Darmstadt
Phenylendiamin	Merck, Darmstadt
Phorbol-12-myristat-13-azetat (PMA)	Sigma, Deisenhofen
Poly-L-Lysin	Sigma, Deisenhofen
Polyethylenglykol	Merck, Darmstadt
Protein-A Agarose	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA
Protein-A Sepharose	Sigma, Deisenhofen
Protein-G Plus Agarose	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA
Protein-G Sepharose	Sigma, Deisenhofen.
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Salzsäure, 25%, 37%	Roth, Karlsruhe
Sepharose CL-4b	Amersham Pharmacia, Karlsruhe
Streptavidin-POD	Roche (Boehringer), Mannheim
Streptomycin	Sigma, Deisenhofen
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Tween-20	Sigma, Deisenhofen
Wasserstoffperoxid, 30%ig	Merck, Darmstadt
Zitronensäure	Sigma, Deisenhofen

## 2.2 ZELLINIEN

Die transformierte Nierenepithelzelllinie 293 und das daraus generierte PHLDA1 sowie Neo Transfektanten sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Name	Klon	transfiziertes Gen	Herkunft
293 Ph Tr1	Tr1-D6-G10	4,5 kbp PHLDA1 in pcDNA3	Institut für Immunologie
293 Ph Tr2	Tr2-A5	4,5 kbp PHLDA1 in pcDNA3	Institut für Immunologie
293 Ph Tr3	Tr3-D11	4,5 kbp PHLDA1 in pcDNA3	Institut für Immunologie
293 Ph Tr4	Tr4-B3	4,5 kbp PHLDA1 in pcDNA3	Institut für Immunologie
293 Neo1	Tr1-D7	pcDNA3 Vektor	Institut für Immunologie
293 Neo2	Tr2-E8	pcDNA3 Vektor	Institut für Immunologie
293 Neo3	Tr3-E6	pcDNA3 Vektor	Institut für Immunologie
293 Neo4	Tr4-E6	pcDNA3 Vektor	Institut für Immunologie

**Tabelle 2.1 Transformierte Nierenepithelzelllinie 293 Transfektanten**

JB4 (A3910); alloreaktive CD8<sup>+</sup> T Zellen (E. Nösner, Helmholtz Zentrum München).

B-Lymphoblastoide Zelllinien: LCL26 (HLA A2/B7); HHKB (HLA A3/B7) und RML (HLA A2/B51). (*Reference: Charron, D, ed. Genetic Diversity of HLA. Functional and Medical Implications. France: EDK, 1996*), (E. Nösner, Helmholtz Zentrum München).

JY B-Zelllinie, Homozygot für HLA A2/B7 (E. Nösner, Helmholtz Zentrum München).

Melanomzelllinie Mel Juso (Institut für Immunologie, München).

## 2.3 MEDIEN

### 2.3.1 ZELLKULTURMEDIEN FÜR MAMMALIA-ZELLINIEN

PHLDA1 und Neo Transfektanten wurden im Basis Zellkulturmedium mit 10% FCS und 1 mg/ml G418 kultiviert.

<u>Zellkulturmedium (Basis)</u>	RPMI 1640 supplementiert mit 5% FCS 1 mM Natriumpyruvat 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 U/ml Streptomycin
<u>Einfriermedium</u>	RPMI 1640 supplementiert mit 25% FCS 20% DMSO 1 mM Natriumpyruvat 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 U/ml Streptomycin
<u>HAT-Medium für Hybridome</u>	RPMI 1640 supplementiert mit $6 \times 10^{-5}$ M Hypoxanthin $4,5 \times 10^{-7}$ M Aminopterin $10^{-4}$ M Thymidin 10% FCS 300 U/ml rekombinantes Il6
<u>Waschmedium</u>	RPMI 1640 Medium mit 0,1 % Natriumazid
<u>Starving Medium</u>	DMEM (Gibco) supplementiert mit 5% FCS (dialysiert!!!) 1 mM Natriumpyruvat 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 U/ml Streptomycin
<u>Chase Medium</u>	DMEM (Gibco) supplementiert mit 5% FCS 1 mM Natriumpyruvat 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 U/ml Streptomycin 2 mM Methyionin 2 mM Cystein

<u>T-Zellstimulationsmedium</u>	RPMI 1640 supplementiert mit 7,5% FCS 7,5% XY 1 mM Natriumpyruvat 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 U/ml Streptomycin NEAE
---------------------------------	---

### 2.3.2 GRUNDSTOFFE FÜR KULTURMEDIEN

Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom KG, Berlin
RPMI 1640	Biochrom KG, Berlin
DMEM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Radioaktivität	MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege

### 2.4 ALLGEMEINE PUFFER UND LÖSUNGEN

aggregiertes humanes IgG: 1 mg/ml in H<sub>2</sub>O lösen  
45 min bei 60°C erhitzen, aliquotieren und bei -20°C lagern

Ampicillinlösung: 10 mg/ml Ampicillin  
in H<sub>2</sub>O, sterilfiltriert

Amplify Fluorographic Reagent: 30 min Inkubation; Amersham Biosciences, NAMP100

Antifade: 100 mg Phenylendiamin in 3 ml PBS auflösen, auf pH 8,0 mit 0,5 M Carbonat/Bicarbonatpuffer (pH 9,0) einstellen und mit PBS auf 5 ml auffüllen. 45 ml Glycerin zugeben, steril filtrieren, Aliquots bei -20°C lagern

Auftragspuffer DNA: 50% (m/v) Glycerin  
0,4% (m/v) Bromphenolblau  
0,4% (m/v) Xylencyanol  
in TE

Auftragspuffer Protein (6x): 350 mM Tris-HCl, pH 6,8  
10% (m/v) SDS  
30% (m/v) Glycerol  
9,3% (m/v) DTT  
0,01% (m/v) Bromphenolblau

<u>Auftragspuffer (IEF):</u>	57% Harnstoff 2% NP-40 1,53% DTT 0,01 % Bromphenolblau 0,75 ml Ampholine pH 3,5 – 10 für 15 ml Endvolumen
<u>Äquilibrierungspuffer (IEF):</u>	50%MetOH, 5mM TRIS pH 8,0, 1% SDS
<u>Blockinglösung ELISA:</u>	0,1% (m/v) Gelatine in PBS 0,1% (m/v) Natriumazid
<u>Blockinglösung Western:</u>	5% (m/v) Magermilchpulver in PBS
<u>Blotting-Puffer Western:</u>	10 mM NaHCO <sub>3</sub> 3 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 20% (v/v) Methanol
<u>1% (m/v) BSA-PBS:</u>	0,5 g BSA auf 50 ml PBS, sterilfiltrieren
<u>Carbazollösung:</u>	12,5 mg Carbazol (3-Amino-9-Ethycarbazol) in 2,5 ml DMSO lösen 0,5 ml Azetatpuffer (100x, 3,5 M Natriumazetat, 1,5 M Essigsäure, pH 5,0), auf 50 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen, 20µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , frisch herstellen
<u>Coomassie-Färbung:</u> <u>Fixierlösung:</u>	158 ml H <sub>2</sub> O 2 ml Orthophosphorsäure 40 ml Methanol
	<u>Färbelösung:</u> 120 ml H <sub>2</sub> O 40 ml Methanol 40 ml <i>Roti-Blue</i> <sup>®</sup>
	<u>Entfärbelös.:</u> 50 ml Methanol 150 ml H <sub>2</sub> O
<u>Chloramphenicollösung:</u>	34 mg/ml in EtOH, bei –20°C lagern
<u>EDTA-PBS:</u>	1 mM Na <sub>2</sub> -EDTA in PBS, autoklavieren
<u>Elutionspuffer für GS-beads:</u>	10 mM reduziertes Gluthation 50 mM Tris-HCl pH 8,0, sterilfiltrieren
<u>Glukose-PBS:</u>	100 mg Glukose in 100 ml PBS, sterilfiltrieren und bei 4°C aufbewahren
<u>Laufpuffer SDS-PAGE:</u>	50 mM Tris-HCl pH 8,3 380 mM Glycin 0,1% (m/v) SDS
<u>Lithiumazetat: (10x)</u>	1 M LiAz, pH 7,5, autoklavieren

<u>LysozymbLösung:</u>	10 mg/ml Lysozym 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 in H <sub>2</sub> O
<u>Lysepuffer (IEF):</u>	0,5% Triton-X 114 0,2 mM PMSF 50 mM TRIS 5 mM EDTA pH 7,4
<u>Mammalia-Lysepuffer:</u>	50 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 1% (m/v) NP-40, autoklavieren vor Gebrauch 1 <i>Complete</i> <sup>TM</sup> -Proteaseinhibitor- tablette/10ml Lysepuffer zugeben
<u>Na-Azetat pH 5,2:</u>	408,01 g NaCH <sub>3</sub> OOx3H <sub>2</sub> O, auf 800 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen mit 100% CH <sub>3</sub> OOH pH 5,2 einstellen, auf 1l auffüllen, autoklavieren
<u>PBS pH 7,2:</u>	2,7 mM KCl 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 137 mM NaCl 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
<u>PMA-Lösung:</u>	1 mg PMA (Phorbol-12-Myrestate-13-Acetate) in 250 µl Ethylazetat lösen (4 mg/ml) in 12,5 µl (50 µg) aliquotieren vor Gebrauch 30 min unter Abzug abdampfen lassen Aufnahme in 50 µl Azeton (1 mg/ml) in 5 ml Medium tropfen (10 µg/ml) 1:1000 verdünnen (10 ng/ml), verwendbar ca. 7 Tage bei 4°C gelagert
<u>RNAse-A-Lösung:</u>	10 mg/ml RNAse A in H <sub>2</sub> O 15 mM NaCl 10 mM Tris-HCl pH 8,0
<u>STET-Puffer:</u>	10 mM Tris-HCl pH 8,0 100 mM NaCl 1 mM Na <sub>2</sub> -EDTA 5% (v/v) Triton X-100 in H <sub>2</sub> O, autoklavieren
<u>Stripping-Puffer:</u>	100 mM Glycin pH 2,9
<u>Substratlösung für ELISA:</u>	2 mg/ml Orthophenyldiamine in 0,1 M Zitratpuffer pH 5,0 2 µg/ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , immer frisch herstellen



<u>10x TBE:</u>	900 mM Tris Base 900 mM Borsäure 20 mM EDTA pH 8,0 autoklavieren
<u>TE:</u>	10 mM Tris 1 mM EDTA mit HCl auf pH 7,0; 7,5 bzw. 8,0 einstellen und autoklavieren
<u>Tris pH 8,0:</u>	10 mM Tris mit HCl auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren
<u>Tris-gesättigtes Phenol:</u>	dest. Phenol mit 8-Hydroxychinolin versetzten und mit Tris Puffer pH 8,8 äquilibrieren
<u>Zitrat-Puffer (0,1M, pH 5,0)</u>	65 ml 1 M Natriumzitratlösung 35 ml 1 M Zitronensäure

## 2.5 MONOKLONALE ANTIKÖRPER

Eine Zusammenfassung, der in dieser Arbeit verwendeten, Antikörper ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

ANTIGENSPEZ.	NAME D.KLONS	ISOTYP	ENDKONZENTRATION	HERSTELLER
CD29 β1-Integrinkette	K20	IgG <sub>2a</sub>	20 µg/ml	Immunotech Kat. No. 0790
β-Actin	AC-15	IgG <sub>1</sub>	1:10 000	Sigma, Deisenhofen
GAPDH		IgG <sub>1</sub>	1:10 000; 1:2000	HyTest, Turku Finland, Kat.No.8G4
CD40	RO1	IgG <sub>1</sub>	20 µg/ml	Institut für Immunologie München
CD49b α2-Integrinkette	Gi9	IgG <sub>1</sub>	20 µg/ml	Immunotech Kat. No. 0717
CD49c α3-Integrinkette	P1B5	IgG <sub>1</sub>	20 µg/ml	Oncogene Kat. No. CP11
CD49d α4-Integrinkette	HP2/1	IgG <sub>1</sub>	20 µg/ml	Immunotech Kat. No. 0764
CD49e α5-Integrinkette	SAM1	IgG <sub>1</sub>	20 µg/ml	Immunotech Kat. No. 0771
CD49f α6 Integrinkette	GoH3	Ratte IgG <sub>1</sub>	20 µg/ml	Immunotech Kat. No. 0769
CD51 α- Integrinkette	AMF7	IgG <sub>1</sub>	20 µg/ml	Immunotech Kat. No. 0770
CD58, LFA 3	AICD58	IgG <sub>1</sub>	20 µg/ml	Immunotech Kat. No. 0861

CD61, $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrinkette	SZ21	IgG <sub>1</sub>	20 $\mu$ g/ml	Immunotech Kat. No. 0540
CD66c	FR4H12	IgG <sub>1</sub>	Kulturüberstand	Institut für Immunologie München
EpCAM	SS3B10-C9	IgG <sub>1</sub>	Kulturüberstand	Institut für Immunologie München
EpCAM	HGm74/74B7	IgG <sub>1</sub>	Kulturüberstand	Institut für Immunologie München
EpCAM	SS4F5	IgG <sub>1</sub>	Kulturüberstand	Institut für Immunologie München
E-Cadherin	6H9	IgG <sub>1</sub>	20 $\mu$ g/ml	Cellsystems Kat. No. 7022
ICAM-1	gp89-11	IgG <sub>1</sub>	Kulturüberstand	Institut für Immunologie München
ICAM-1	gp89-3	IgG <sub>1</sub>	Kulturüberstand	Institut für Immunologie München
ICAM-1	gp89-19	IgG <sub>1</sub>	Kulturüberstand	Institut für Immunologie München
ICAM-1	gp89-26	IgG <sub>1</sub>	Kulturüberstand	Institut für Immunologie München
HLA -B7, -B40	BB7.6	IgG <sub>1</sub>	Kulturüberstand	ATCC, Rockville, U.S.A.
MHC-Klasse-I HLA -A, -B, -C	MB40.5	IgG <sub>1</sub>	Kulturüberstand	ATCC, Rockville, U.S.A.
HLA A2,Aw69	PA2.1	IgG <sub>1</sub>	Kulturüberstand	ATCC, Rockville, U. S. A.
MHC-Klasse-I HLA -A, -B, -C	PA2.6	IgG <sub>1</sub>	Kulturüberstand	ATCC, Rockville, U. S. A.
$\beta$ <sub>2</sub> - Mikroglobulin	BBM.1	IgG <sub>2a</sub>	Kulturüberstand	ATCC, Rockville, U. S. A.
HLA -A2, -B17	MA2.1	IgG <sub>1</sub>	Kulturüberstand	ATCC, Rockville, U. S. A.
HLA -B7, -B40	MB40.2	IgG <sub>1</sub>	Kulturüberstand	ATCC, Rockville, U. S. A.
HLA-DR $\alpha$ -Kette	L243	IgG <sub>2a</sub>	Kulturüberstand	ATCC, Rockville, U. S. A.
HLA -B7/Bw22	ME-1	IgG <sub>1</sub>	Kulturüberstand	ATCC, Rockville, U. S. A.
MCAM (Muc18)	MucBA18.1	IgG <sub>1</sub>	Kulturüberstand	Institut für Immunologie München
MCAM Muc18	MucBA18.4	IgG <sub>1</sub>	Kulturüberstand	Institut für Immunologie München
MCAM Muc18	Muc 18 5D7	IgM	Kulturüberstand	Institut für Immunologie München
MCAM Muc18	Muc 18 1B4	IgM	Kulturüberstand	Institut für Immunologie München
H2-K <sup>k</sup>	141.11	IgM	Kulturüberstand	Institut für Immunologie München
H2-K <sup>k</sup>	11.4.1	IgG <sub>2a</sub>	Kulturüberstand	Institut für Immunologie München
PHLDA-1	RN6e2-B9-A4	IgG <sub>2a</sub>	Kulturüberstand	Institut für Immunologie München
Mausmyelom- Protein	UPC10	IgG <sub>2a</sub>	20 $\mu$ g/ml	Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.

MHC-Klasse I HLA -A, -B, -C	W6/32	IgG2a	Kulturüberstand	ATCC, Rockville, U. S. A.
MHC-Klasse I HLA -A, -B, -C	G46-2.6	IgG1	20 µg/ml	BD Biosciences, U. S. A.

**Tabelle 2.2 Angewendete Antikörper.** Isotyp: alle Maus wenn nichts anderes angegeben wurde.

## 2.6 ANTISEREN UND ANTIKÖRPERKONJUGATE

Rabbit $\alpha$ Maus-Immunglobulin	Dako, Hamburg
FITC-konjugiert; Best. Nr. F0261; 1:25 in 1% BSA-PBS	
Rabbit $\alpha$ Maus-Immunglobulin	Dako, Hamburg
Horseradish -Peroxidase-konjugiert; Best. Nr. P0161; 1:5000 in 5% Magermilch-PBS	
Kaninchen $\alpha$ HLA-Peptid; Serum 1:1500	Dauids Biotechnologie
Schwein $\alpha$ Kaninchen-Immunglobulin	Dako, Hamburg
Horseradish-Peroxidase-konjugiert; 1:2000 in 5% Magermilch-PBS	

## 2.7 KOMMERZIELLE ANALYSESYSTEME (KITS)

Seize X Protein A Kit (45215)	Pierce, USA
Fix & Perm	Caltag, Burlingame, CA, U. S. A.
Protein-Assay (Lowry)	Biorad, München
Chemolumineszenz Detektion, Western Lightning	PerkinElmer Life Sciences
OTTEIA™ HUMAN IFN- $\gamma$ Set (2613K1)	Biosciences BD, U. S. A.
RNeasy™-Mini-Kit	Quiagen, Hilden
TRI REAGENT™ (T9424)	Sigma, Deisenhofen
1 <sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR	Roche, Mannheim
LightCycler -h-G6PDH Set (3261883)	Roche, Mannheim
Roti-Blue® kolloidale Coomassie-Färbelösung	Roth, Karlsruhe

## 2.8 ENZYME

EndoH	New England Biolabs, Frankfurt
Neuraminidase (N'ase Typ 8 vib.chol.)	Sigma, Deisenhofen

## 2.9 PCR PRIMER

Primer, die in dieser Arbeit angewendet wurden, sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Name	Sequenz 5' → 3'	Ziel DNA	Bindungsposition
HLA A2 sense	CTTCATCGCAGTGGGCTACGT	HLA A Locus	bp 135-155 in Exon 2
HLA A2 antisense	TCCCACCTTGTGCTTGGTGGT	HLA A Locus	bp 495-515 in Exon 3
HLA B7 1A sense	GAACCTGCGCGGCTACTACAAC	HLA B Locus	bp 309-330 in Exon 2
HLA B7 1B antisense	CAGTGTGATCTCCGCAGGGTAG	HLA B Locus	bp 696-717 in Exon 4
HLA B7 2A sense	GCGCCGTGGATAGAGCAGG	HLA B Locus	bp 217-235 in Exon 2
HLA B7 2B antisense	CCAGCTTGTCTTCCCGTTCTC	HLA B Locus	bp 588-610 in Exon 3

**Tabelle 2.3** Eingesetzte Primer

### 2.9.1 GRÖSSENSTANDARDS

DNA Größenstandards:	- 100 bp Leiter	Life Technologies, Karlsruhe
	- 1 kb Leiter	Life Technologies, Karlsruhe
Protein Marker Rainbow high range	(14,3 - 200 kDa)	Amersham Pharmacia, Freiburg
	(14,3 -200 kDa)	Life Technologies, Karlsruhe

## **3 METHODEN**

### **3.1 ARBEITEN MIT ZELLINIEN**

#### **3.1.1 ZELLKULTUR**

Säugerzelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C, 6% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Zellkulturmedium wurde, soweit nicht anders vermerkt, mit 10% FCS supplementiert. Um die Komplementproteine zu inaktivieren, wurde das FCS vor der Anwendung 30 min bei 56°C erhitzt. Alle Arbeiten erfolgten unter einer Sterilbank. Die verwendeten Lösungen wurden autoklaviert oder durch 0,2 µm Filter sterilfiltriert. Zum Ablösen adhärent wachsender Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für ca. 5 min bei 37°C im Inkubator mit 3 ml steriler 1mM EDTA/PBS Lösung inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen durch leichtes Klopfen abgelöst und anschließend 7 min bei 400 g und bei Raumtemperatur abzentrifugiert.

#### **3.1.2 EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON SÄUGERZELLEN**

Zur Kryokonservierung wurden ca. 10<sup>6</sup> bis 10<sup>7</sup> Zellen 7 min bei 400 g abzentrifugiert, in 0,5 ml Medium resuspendiert und mit 0,5 ml Einfriermedium tröpfchenweise versetzt. Danach wurde die Zellsuspension in beschriftete 2 ml Kryoröhrchen mit Schraubdeckel überführt. Der Einfriervorgang soll möglichst langsam erfolgen, um das Auskristallisieren von Zellflüssigkeit zu vermeiden. Aus diesen Grund wurden die Kryoröhrchen mit viel Zellstoff Papier umwickelt und bei -80°C für 1 bis 2 Tage eingefroren und anschließend zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff bei -196°C aufbewahrt.

Das Auftauen soll dagegen schnell durchgeführt werden. Die Kryoröhrchen mit den Zellen wurden im 37°C Wasserbad aufgetaut bis nur noch ein kleiner Eiskern zu sehen war und dann auf ein 5 ml vorgewärmtes (37°C) Medium getropft. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in einem frischem Medium aufgenommen und in Zellkulturflaschen überführt.

### 3.1.3 STIMULATION DER ZELLEN MIT PHORBOLESTER

Phorbolster wie PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Azetat) ähnelt in seiner Struktur dem 1,2-Diacylglycerin und ist ein künstlicher Aktivator der Proteinkinase C. PMA gehört zu den derzeit stärksten Tumorpromotoren und wurde zur Stimulation der Zellen verwendet, da die Expression vieler Gene induziert wird.

$5 \times 10^6$  Zellen wurden in  $75 \text{ cm}^2$  Kulturflaschen ausgesät und nach 24 Stunden mit PMA Lösung in eine Endkonzentration von 10 ng/ml versetzt. Die Effekte der Stimulation wurden nach 4 bis 48 Stunden untersucht.

### 3.1.4 T-ZELLSTIMULATION

Adhärent wachsende Zellen werden, nachdem das Medium abgesaugt wurde, für ca. 5 min bei  $37^\circ\text{C}$  im Inkubator mit 3 ml steriler 1mM EDTA/PBS Lösung inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen durch leichtes Klopfen abgelöst und anschließend 7 min bei 400 g und bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Die Zellen wurden erneut mit dem vorgewärmten Medium einmal gewaschen, in einem 5 ml Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Zellzahl, bzw. 15.000 Zellen in 50  $\mu\text{l}$  Medium pro Well für jede Zelllinie eingestellt und in eine 96-Well U-Platte gegeben (Plattenrand frei lassen). Für jede Zelllinie wurden Duplikate angesetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 3000 Zellen/Well (im Medium resuspendiert, Endvolumen 50  $\mu\text{l}$ ) in unserem Fall HLA A2 spezifische T Zelllinie JB4 (T Zellklone bei den HLA A2 Erkennung unabhängig von Peptid oder HLA Subtyp erfolgt). Nach einer 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden 96 Well Platten abzentrifugiert und 50  $\mu\text{l}$  Überstand für die INF  $\gamma$  Zytokin ELISA eingesetzt. Der restliche 50  $\mu\text{l}$  Überstand wurde bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren.

## 3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

### 3.2.1 PHENOL/CHLOROFORM-EXTRAKTION VON DNA

Proteine und andere Verunreinigungen wurden aus der wässrigen DNA Lösung durch Extraktion mit Phenol entfernt. Die Probe wurde mit Phenol in einem Verhältnis 1:1 kurz gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei 13000 Upm und RT in einer Tischzentrifuge und der Überführung der oberen, wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß. In einem zweiten Schritt wurde die Probe mit gleichem Volumen

Phenol/Chloroform geschüttelt und die Phasen wie beschrieben getrennt. Die so gereinigte Nukleinsäure wurde anschließend mit Ethanol präzipitiert.

### 3.2.2 FÄLLUNG VON DNA/RNA

Die Reinigung und Konzentration der Nukleinsäure aus wässrigen Lösungen erfolgte durch Fällung. Hierfür wurde zur Probe 1/10 Volumen 3M Na-Azetat pH 5,2 plus das 2,5-fache Volumen an eiskaltem Ethanol zugegeben, gemischt und für 1 h bei -20°C gefällt. Das Präzipitat wurde durch 15 min. Zentrifugation bei 13000 Upm und 4°C in einer Tischzentrifuge pelletiert. Um Salze zu entfernen, wurde der Niederschlag mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert, das Pellet 10 min. bei RT getrocknet und in einem kleinen Volumen Tris-Puffer (pH 8,0) gelöst.

### 3.2.3 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNA/RNA

Die Konzentration der Nukleinsäure wurde mit einem Spektralfotometer bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht ein Absorptionswert von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 40 µg/ml RNA. Als Maß für die Reinheit der Nukleinsäure dient der Quotient bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Für reine DNA sollte er 1,8 und für reine RNA 1,8 bis 2,0 betragen. Niedrigere Werte deuten Verunreinigungen mit Proteinen, höhere Werte mit Salzen und Zuckern an.

### 3.2.4 ISOLATION VON MRNA AUS SÄUGERZELLINIEN

Um eine cDNA-Synthese durchführen zu können, wurde aus den Säugierzellen die gesamte mRNA isoliert und dann mit der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Das Problem beim Arbeiten mit RNA sind die sehr aktiven und schlecht inaktivierbaren RNAsen. Alle Lösungen wurden mit dem RNase-Inhibitor Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt und vor Verwendung autoklaviert. Für RNA-Arbeiten wurden separate Lösungen, Pipettenspitzen und Gefäße verwendet sowie Handschuhe getragen.

Zur Isolation der RNA wurde das *RNeasy<sup>TM</sup>-Mini Kit* verwendet.  $5 \times 10^6$  Zellen wurden abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und das Pellet mit 350 µl des mitgelieferten RLT-Puffer-1%-β-Mercaptoethanol versetzt. Die Zellen wurden mit einer G20 Kanüle homogenisiert und nach Zugabe von 350 µl 70% Ethanol auf eine *spin column* Säule gegeben. Es wurde einmal für 15 s bei 8000 Upm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, einmal mit

700 µl RW1 Puffer und zweimal mit je 500 µl RPE-Puffer gewaschen (15 s Zentrifugation bei 8000 Upm). Die RNA wurde mit 30-50 µl nukleasefreien H<sub>2</sub>O von der Säule eluiert.

Auch Tri Reagent<sup>TM</sup> Kit wurde für die Isolation von RNA oder DNA und Proteine verwendet. Direkt nach der Entfernung vom Medium wurde 1 ml Tri Reagent/10 cm<sup>2</sup> in die Kulturflasche gegeben und durch Auf- und Abpipettieren gut homogenisiert. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei RT folgte eine Phasentrennung durch Zugabe von Chloroform (1/5 Homogenat Vol.; 15 s vortexen und 10 min. Inkubation bei RT). Anschließend wurde die Suspension für 15 min. bei 12000g und 4°C zentrifugiert. Die obere farblose Phase (RNA) wurde in ein neues Eppi geben. In der Interphase befand sich die DANN, die Proteine in der unteren Phenol-Chloroform Phase. Die Präzipitation von RNA erfolgte mit 1 Volumen Isopropanol (gut vortexen und 10 min. Inkubation bei RT). Anschließend 12 min. bei 12000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Pellet mit 0,5 ml 75% Ethanol in DECP H<sub>2</sub>O gewaschen, gevortext und erneut 8 min. bei 12000g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde 3 bis 5 min. an der Luft getrocknet und durch Auf- und Abpipettieren in 20 µl DECP H<sub>2</sub>O gelöst. So gewonnene mRNA wurde bei -20°C bis -70°C gelagert. Vor eine cDNA Synthese wurde die RNA aufgetaut und 10 bis 15 min. bei 55° bis 60°C inkubiert.

### 3.2.5 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion oder *PCR* können definierte DNA-Sequenzen aus einem komplexen Gemisch von DNA selektiv angereichert werden (Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1988). Man benötigt hierzu zwei Oligonukleotide (Primer), von denen der eine zum 3'-Bereich der gewünschten DNA-Sequenz und der andere zum Gegenstrang des 5'-Bereichs komplementär ist. Die exponentielle Amplifikation der DNA wird durch wiederholte thermische Strangtrennung der DNA, Bindung der Primer und DNA-Synthese aus Desoxyribonukleotiden mit Hilfe der thermostabilen DNA-Polymerase erreicht. Die PCR wurde in 0,2 ml Reaktionsgefäßen im Themocycler durchgeführt. Ein typischer Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

- 1 µl DNA (10 ng/µl)
- 2 µl 10fach-konzentrierter Reaktionspuffer (ohne MgCl<sub>2</sub>)
- 1 µl 5'-Primer (10 pmol/µl)
- 1 µl 3'-Primer (10 pmol/µl)
- 0,2 µl dNTPs (je 10 mM/Nukleotid)
- 0,6 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM)
- 0,2 µl *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/µl)
- mit H<sub>2</sub>O auf 20 µl auffüllen und mit Mineralöl überschichten



Die jeweiligen exakten Bedingungen für die Amplifikation der DNA musste für jedes Primerpaar bestimmt werden. Für ca. 20 bp lange Primer und Amplifikation eines 1 kbp langen DNA-Fragments sah ein typischer Ablauf einer PCR wie folgt aus: 5 min 94°C zur anfänglichen, kompletten Strangtrennung der DNA und dann 25 bis 30 Zyklen, bestehend aus 35 sek. 94°C (Strangtrennung), 45 sek. 50 bis 60°C (Bindung der Primer) und 1 min 72°C (Verlängerung der Primer durch die *Taq*-Polymerase). Anschließend wurde noch einmal für 5 min bei 72°C zur Vervollständigung der DNA Synthese inkubiert. Die Bildung eines DNA-Fragmentes definierter Länge wurde anschließend anhand einer Gelelektrophorese sichtbar.

### 3.2.6 REVERSE TRANSKRIPTION UND PCR (RT-PCR)

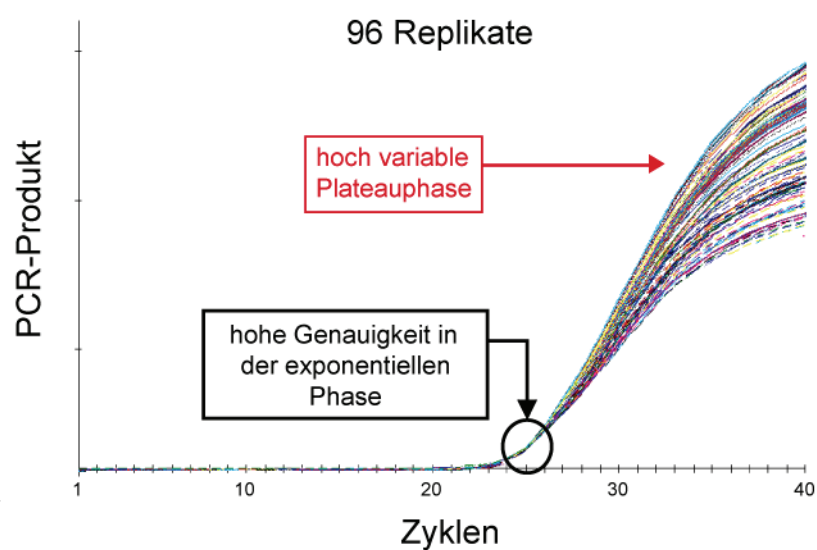
Mit Hilfe der RT-PCR kann man aus RNA die komplementäre DNA (cDNA) herstellen. Man verwendet diese Methode einerseits zum sehr sensitiven Nachweis bestimmter RNA-Transkripte, kann mit ihr andererseits auch cDNA-Genbanken aus dem Pool der RNA-Transkripte einer bestimmten Zelllinie oder eines bestimmten Gewebes herstellen. Für den ersten Schritt der RT-PCR benötigt man das Enzym virale *Reverse Transkriptase*. Sie ist eine RNA abhängige DNA-Polymerase, die ein kurzes Oligonukleotid mit einem freien 3'OH Ende und als Vorlage (*template*) RNA benötigt, um mit Hilfe von dNTPs den komplementären cDNA-Strang zu synthetisieren.

PCR Ansatz	Volumen 20 µl	Finale
10x Reaktionspuffer	2,0	1x
25mM MgCl <sub>2</sub>	4,0	5mM
nNTPs Mix	2,0	1mM
Oligo-p(dt)15 Primer	2,0	160 ng
Rnase Inhibitor	1,0	50 units
AMV Reverse Transkriptase	0,8	20 units
H <sub>2</sub> O sterile	variabel	
RNA (1µg gesamt RNA)	variabel	1µg
Programm: 1 Stunde 17 min		
Annealing	25 °C	10 min
Reverse Transkription	42 °C	60 min
AMV Denaturation	99 °C	05 min
Cooling	04 °C	Pause

**Tabelle 3.1      Reaktionsansatz für die RTPCR**

### 3.2.7 REAL TIME PCR /QUANTITATIVE RT-PCR

Die real time PCR ist eine äußerst sensitive Methode zur Quantifizierung von PCR-Produkten und wird z.B. zur Diagnostik von RNA-Viren, aber auch zur Quantifizierung der mRNA-Expression in Zelllinien und Geweben verwendet. Nach dem Umschreiben der Gesamt-RNA in cDNA wird in der anschließenden PCR-Reaktion die Amplifikatmenge mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende eines jeden PCR-Zyklus („*real time*“) quantifiziert und unterscheidet sich somit von anderen quantitativen (z.B. kompetitive PCR) und semiquantitativen PCR-Methoden, die erst nach Ablauf der PCR ausgewertet werden. Zur Detektion des PCR-Produkts können unter anderem fluoreszierende Farbstoffe verwendet werden, die sich unspezifisch an jede doppelsträngige DNA während der Amplifikation anlagern. Es ist möglich, auch fluoreszenzmarkierte sequenzspezifische Hydrolyse-Sonden zu verwenden. In beiden Fällen nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge an PCR-Produkt zu. Fluoreszierende Farbstoffe, wie z.B. SYBR<sup>®</sup> Green, interkalieren in die kleine Furche doppelsträngiger DNA, wodurch die Fluoreszenz um das 1000-fache angeregt wird. Der Nachteil dieses Verfahrens ist die geringe Spezifität, da zwischen verschiedenen PCR-Produkten nicht unterschieden werden kann, so dass nach der abgelaufenen PCR-Reaktion eine Schmelzkurvenanalyse zur Bestimmung der Fragmentlängen durchgeführt werden muss. In der Real time PCR kann, im Gegensatz zur semiquantitativen RT-PCR, die Amplifikation in der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion, in der eine sehr hohe Genauigkeit vorliegt, (Siehe Abbildung 3.1) analysiert werden.

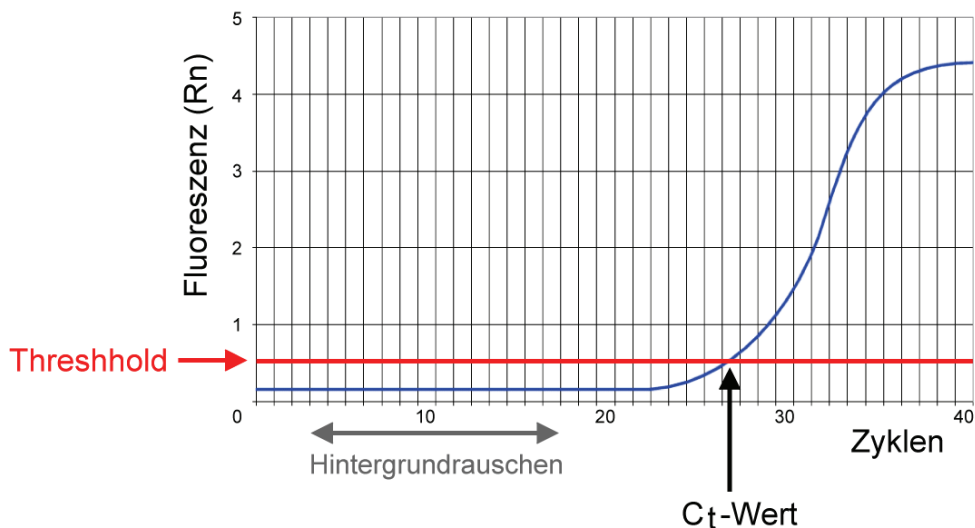


**Abbildung 3.1 Genauigkeit der PCR-Reaktion.**

Gezeigt ist der PCR-Verlauf von 96 Replikaten in der Real time PCR (nach Applied Biosystems).

### 3.2.7.1 RELATIVE QUANTIFIZIERUNG MIT HILFE DER $C_T$ -METHODE

Zum Vergleich der exprimierten mRNA-Mengen in verschiedenen Proben wurde eine relative Quantifizierung durchgeführt. Dazu wurde, um eventuelle Unterschiede in der eingesetzten cDNA-Menge zu relativieren, die Menge an cDNA des zu untersuchenden Gens auf die des als endogene Kontrolle fungierenden Haushaltsgens  $\alpha$  Enolase bezogen. Um eine Quantifizierung der Amplifikatmengen in der exponentiellen Phase zu gewährleisten, wurde der  $C_T$ -Wert („threshold cycle“) ermittelt. Der  $C_T$ -Wert gibt den Zyklus an, bei dem die normalisierte Reporter-Fluoreszenz erstmalig signifikant über den Grenzwert („threshold“) der Hintergrund-Fluoreszenz (Hintergrundrauschen) ansteigt (Abbildung 3. 2). Je größer die Ausgangsmenge an einer spezifischen cDNA ist, desto geringer ist die Anzahl der Zyklen, die erforderlich sind, um den Grenzwert des Hintergrundrauschens deutlich zu übersteigen.



**Abbildung 3. 2** Ermittlung des  $C_T$ -Werts („threshold cycle“).

Aufgetragen wurde die normalisierte Reporter-Fluoreszenz (Rn) gegen die Zyklenzahl. Der  $C_T$ -Wert gibt den Zyklus an, bei dem der Rn-Wert zum ersten Mal den Grenzwert („threshold“) des Hintergrundrauschens signifikant übersteigt.

Nachdem die real time PCR für das zu untersuchende Zielgen erfolgreich durchgeführt wurde, konnte die relative Expression der mRNA-Menge in verschiedenen Proben über die  $C_T$ -Methode verglichen werden.

### 3.2.7.2 DURCHFÜHRUNG DER REAL TIME PCR/LIGHT CYCLER PCR

Da die Real time PCR eine äußerst sensitive Methode ist, reichen bereits geringe Kontaminationen mit fremder DNA (im Prinzip ein DNA Molekül aus einer Hautschuppe) aus, um falsch-positive Ergebnisse zu erhalten. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde die Real time PCR unter Verwendung von Handschuhen am eigenen Arbeitsplatz mit eigenen Reagenzien, Pipetten, Filterpipettenspitzen in einer sterilen Werkbank pipettiert. Die Herstellung der cDNA, das Pipettieren der Real time PCR und die eigentliche PCR Reaktion inklusive der Auswertung erfolgten räumlich getrennt. Die Durchführung von Negativ-Kontrollen ist notwendig. Quantitative PCR wurde mit dem LightCycler System durchgeführt (Roche Diagnostics, Mannheim Germany).

Der PCR Mastermix wurde bei 4°C angesetzt (siehe Tabelle 3.2) und dazu der zu untersuchenden cDNA bzw. H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle zugegeben. Fertig gemixte Reaktionen wurden dann in vorgekühlte spezielle LightCycler Kapillaren gegeben und bei 3000 Upm in einer Standard Tischzentrifuge mit speziellen Kapillaradapter für 5 s zentrifugiert. Anschließend wurden die LightCycler Kapillare in den LightCycler Rotor eingesetzt und die Reaktion, unter folgenden, in der Tabelle zusammengefassten Bedingungen, gestartet.

PCR Ansatz (20 µl Ansatz)	α Enolase	HLA A/B Genprodukt
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	2,0	2,0
MgCl <sub>2</sub>	3,2 (5mM)	2,4 (4mM)
Forward Primer	0,5	2,0
Reverse Primer	0,5	2,0
H <sub>2</sub> O	10,8	9,6
Total:	17,0	18,0
cDNA	3,0	2,0

**Tabelle 3.2 Reaktionsansatz für LightCycler PCR**

	α Enolase (Produkt 619 bp)				HLA A2 (Produkt 380 bp) HLA B7 (Produkt 410 bp)			
	Zyklen	Temp.	Zeit	A.mode	Zyklen	Temp.	Zeit	A.mode
Denaturation	1	95°C	10 min.	none	1	95°C	10 min.	none
Amplifikation	38	95°C	0 s	none	40	95°C	10 s	none
		60	10 s	none		48	10 s	none
		72	25 s	single		72	60 s	single
Melting	1	95°C	0 s	none	1	95°C	0 s	none
		65	10 s	none		70	10 s	none
		95	0 s	cont.		95	0 s	cont.
Cooling	1	40°C	30 s	none	1	40°C	30 s	none

**Tabelle 3.3 Eingesetzte Laufbedingungen für LightCycler PCR**

### 3.2.8 GELELEKTROPHORESE VON NUKLEINSÄUREN

In einem Agarosegel können Nukleinsäuren im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, identifiziert und isoliert werden (Sambrook et al., 1989). In der Regel wurden Gele mit 1% Agarose hergestellt und in 100 ml Flachbettgelkammern eingesetzt. Dazu wurde die Agarose Typ II mit TBE Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, auf ca. 50°C abgekühlt und in einen Gelträger, mit möglichst wenig Luftblasen, gegossen. Zum Formen von Auftragstaschen wurde ein Kamm eingesetzt. Als Laufpuffer wurde TBE mit 0,03 µg/ml Ethidiumbromid benutzt. Die Proben wurden 6:1 mit 6-fach konzentriertem Auftragspuffer gemischt und in die Taschen beladen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung (5 bis 10 V/cm), was einer Spannung von ca. 100 bis 120 V entspricht. Die DNA konnte im UV-Licht bei 254 nm sichtbar gemacht und mit einer CCD Kamera fotografiert werden.

## 3.3 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

### 3.3.1 ZELLAUFSCHLUSS VON MAMMALIA-ZELLINIEN

Ca.  $9 \times 10^6$  Zellen wurden pelletiert, zweimal mit PBS gewaschen und in 500 µl Lysepuffer resuspendiert. Je nach Versuch wurden verschiedene Lysepuffer eingesetzt (Triton-X 100; Triton-X 114; Brij 96; CHAPS). Allen Lysepuffern wurden anschließend Proteaseinhibitoren zugegeben. Die Zellsuspension wurde 30 min auf Eis inkubiert, dann 10 min bei 1500 g und 4°C abzentrifugiert und der klare Überstand/Phase für weitere Untersuchungen abgenommen. Auf diese Weise konnten die unlöslichen Bestandteile (Chromatin, Membranfragmente, Zytoskelettanteile) von den löslichen Bestandteilen getrennt werden.

### 3.3.2 MESSUNG DER PROTEINKONZENTRATION

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Lowry (Lowry et al., 1951). Im alkalischen Milieu bildet sich hierbei ein Komplex aus  $\text{Cu}^{2+}$  und den freien Elektronenpaaren der Stickstoffatome in den Peptidbindungen der Proteine. Dadurch wird das  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  reduziert, das wiederum die Heteropolysäure  $\text{H}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$  im Folin-Reagenz zu einem tiefblauen kolloidalem Molybdän reduziert. Die Absorption dieser Lösung ist bei 750 nm proportional zur Proteinmenge. Die Proteinbestimmung wurde mit dem *DC-Protein Assay Kit* durchgeführt. 50 µl Zellysat, das vorher 1:10 mit Wasser verdünnt wurde, wurde mit 125

µl der mitgelieferten Lösung A (alkalische Kupfersulfatlösung) und 5 µl 1% SDS Lösung versetzt. Nach Zugabe von 1 ml Lösung B (Folin-Reagenz) und 15 bis 60 min. Inkubation bei RT wurde anschließend die Absorption bei 750 nm im Fotometer gemessen. Als Standard wurde Rinderserumalbumin in Konzentration von 1 mg/ml bei jeder Proteinmessung frisch eingesetzt.

### **3.3.3 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE VON PROTEINEN**

Die elektrophoretische Auftrennung von denaturierten Proteinen erfolgte durch vertikale, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970). Durch die Beladung der Proteine mit dem Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) erhalten sie eine negative Ladung und wandern weitgehend unabhängig von der Eigenladung im elektrischen Feld zur Anode, wodurch eine Auftrennung nach Molekulargewicht stattfindet.

Es wurden sowohl Gele mit Glasplatten (22 cm x 17 cm) und einem Abstandhalter von 1,5 mm, sowie Minigele mit Glasplatten von 10 cm x 8 cm und einem Abstandhalter von 1,5 mm verwendet. Die Trenn-Gele enthielten 10% (m/v) Acrylamid, 0,3% (m/v) Bisacrylamid, 0,1% (m/v) SDS, 0,1% (v/v) TEMED, 0,03% (m/v) APS und 375 mM Tris-HCl pH 8,8. Nach deren Polymerisation (ca. 30 min.) wurde mit Sammelgel überschichtet, das aus 3% (m/v) Acrylamid, 0,08% (m/v) Bisacrylamid, 0,1% (m/v) SDS, 0,1% (v/v) TEMED, 0,05% (m/v) APS und 125 mM Tris-HCl pH 6,8 besteht. Die Auftragstaschen wurden durch einen Kamm geformt, der nach vollständiger Polymerisierung des Sammelgels entfernt wurde. Pro Geltasche der großen Gele wurde in der Regel 300 µg Protein aufgetragen (max. 150 µl Volumen), das zuvor mit Proteinautragspuffer für reduzierende oder nicht reduzierende Gele für 5 min. bei 95°C erhitzt wurde. Für die Minigele verwendete man ca. 10 bis 150 µg Protein in max. 35 µl Volumen. Die Elektrophorese erfolgte für große Gele bei 45V, 18 bis 20 h und RT, für die Minigele bei 120 V für 1,5 h im Kühlraum mit dem Laufpuffer für SDS-PAGE. Anschließend wurden die Proteine durch Coomassie Färbung direkt im Gel sichtbar gemacht oder im Western Blot auf Nitrozellulosemembranen übertragen und detektiert.

### **3.3.4 COOMASSIE FÄRBUNG**

Um Proteine direkt im Gel sichtbar zu machen, wurde eine kolloidale Coomassie Färbung durchgeführt. Hierbei wird das Gel in einer sauren Methanollösung inkubiert, wodurch die Proteine durch Denaturierung im Gel fixiert werden. Nach Zugabe des Farbstoffes bildet sich ein tiefblauer Komplex. Überschüssiger Farbstoff im Gel muss durch mehrmaliges Waschen

mit einer verdünnten Methanollösung entfernt werden. Die Empfindlichkeit dieses Nachweises liegt bei etwa 30 ng Protein. Für die Coomassie Färbung wurde das Gel eine halbe bis eine Stunde in 200 ml Coomassie Färbelösung bei RT auf einem Schüttler gefärbt. Um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen, wurde ca. 3 Mal je 30 min. oder bei Bedarf über Nacht in der Coomassie Entfärbelösung geschüttelt.

### 3.3.5 WESTERN BLOT

Um mittels Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine immunologisch durch Antikörper nachweisen zu können, wurden sie auf Nitrozellulosemembranen transferiert (Towbin *et al.*, 1979). Dazu wurde die *Trans-Blot<sup>TM</sup>Cell* eine Nassblot Apparatur verwendet. Schwämme, Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran wurden vorher für ca. 10 min. in Blottingpuffer getränkt. In die Halterung wurde (in der Reihenfolge) ein Schwamm, ein Filterpapier, das Acrylamidgel, die Nitrozellulosemembran, ein weiteres Filterpapier und ein zweiter Schwamm, möglichst ohne Luftblasen, gelegt. Das „Sandwich“ wurde so in die Blotapparatur eingeklemmt. Die Nitrozellulosemembran befand sich auf der zur Anode gewandten Seite des Acrylamidgels. Die Blotapparatur wurde reichlich mit Blottingpuffer aufgefüllt. Der Transfer fand für 1,5 h bei 50 V, 1,5 A und unter Wasserkühlung oder im Kühlraum bei 4°C statt. Anschließend wurde die Rückseite der Nitrozellulosemembran markiert, in PBS gewaschen und in 5% Magermilch für 1h bei RT geschüttelt.

### 3.3.6 IMMUNODETEKTION VON PROTEINEN AUF NITROZELLULOSEMEMBRANEN

Nach dem Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen durch Western Blot wurden die unspezifischen Bindestellen auf der Membran durch eine einstündige Inkubation in 5% Magermilch/PBS abgeblockt. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h mit dem ersten AK inkubiert. Dazu wurde der gewünschte AK dünn auf eine in einer feuchten Färbekammer, horizontal liegenden Glasplatte aufgetragen. Die Membran wurde luftblasenfrei mit der Antigenseite nach unten darauf platziert. Anschließend wurde dreimal für je 10 min. mit 0,1% Tween/PBS auf dem Schüttler gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten Peroxidase gekoppelten Antikörper erfolgte wie beim ersten AK. Anschließend wurde wieder dreimal mit 0,1% Tween/PBS für je 10 min. gewaschen und die Membran kurz auf einem Papiertuch abgetrocknet. Zur Detektion wurde eine Chemolumineszenz Substratlösung durch das Mischen von einem Teil der Lösung 1 (Luminol) mit einem Teil der Lösung 2

(Wasserstoffperoxidlösung) hergestellt. Die Membran wurde darin 5 min. oder kürzer, je nach Bedarf, geschwenkt und anschließend kurz auf einem Papiertuch abgetrocknet. Die Chemolumineszenzreaktion wurde durch die, an den zweiten AK gekoppelte, Meerrettichperoxidase ausgelöst. Dabei oxidierte das Luminol und ging in einen angeregten Zustand über. Beim Übergang in den Grundzustand wird Energie in Form von Licht frei, die man mit einem Röntgenfilm detektieren kann. Die Belichtungszeiten betragen je nach Signalstärke zwischen 1 sek. bis 15 min. und länger.

### **3.3.6.1 ENTFERNUNG DER IMMUNKOMPLEXE VON NITROZELLULOSEMEMBRANEN**

Um dieselbe Membran mit anderen Antikörpern (z.B. mit Anti  $\beta$  Actin oder GAPDH zur Kontrolle eines gleichmäßigen Proteinauftrages) inkubieren zu können, müssten die ersten Immunkomplexe wieder entfernt werden (*stripping*). Dazu wurde die Membran nach der Detektion mit Chemolumineszenz Substratlösung zweimal kurz in 0,1% Tween/PBS gewaschen und dann zweimal für je 20 min. mit Stripping-Puffer bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Es wurde dreimal mit PBS gewaschen und mit der Nitrozellulosemembran für die Inkubation mit einem anderen Antikörper wie schon beschrieben verfahren.

### **3.3.7 IMMUNOPRÄZIPITATION**

Um Proteine aus dem Zelllysate nachweisen zu können, ist es notwendig diese zu isolieren. Das kann mit Hilfe der Immunopräzipitation erfolgen, vorausgesetzt man besitzt spezifische Antikörper für das gefragte Protein. Nicht alle spezifischen Antikörper sind auch für Immunopräzipitation geeignet. Am häufigsten wurden Hybridomüberstand Antikörper mit einer Konzentration von 10 bis 20  $\mu\text{g/ml}$  benutzt. Allgemein werden bei den gereinigten Antikörpern die Konzentrationen von 20  $\mu\text{g/ml}$  eingesetzt. 10 ml Hybridomüberstand wurden über Nacht mit 200  $\mu\text{l}$  Protein A Sepharose (geeignet für Antikörper mit Isotyp IgG2a/b) oder Protein G Sepharose (geeignet für Antikörper mit Isotyp IgG) 1:1 mit PBS verdünnt, inkubiert. Die so an Protein A/Sepharose gebundenen Antikörper wurden mit dem Zelllysate zwischen 3 h und 18 h bei 4°C gerollt bzw. das gewünschte Protein präzipitiert. Anschließend wurde das Präzipitat abzentrifugiert und für 1 min. bei 1500 Upm 3 mal mit PBS gewaschen und mit Proteinauftragspuffer (für reduzierende Gele mit DTT oder nicht reduzierende Gele ohne DTT) 1:6 verdünnt, anschließend für 5 min. bei 95°C erhitzt. Danach erfolgte eine 10%ige SDS PAGE (meistens Minigel), Western Blot und Immunodetektion, wie schon im vorherigen Kapitel beschrieben.



### **3.3.7.1 ANTIKÖRPER PROTEIN A/SEPHAROSE BEHANDLUNG MIT DSS**

Um die gewünschten Antikörper irreversibel an Protein A Sepharose zu binden, wurde die Antikörper/Protein A Sepharose Suspension mit DSS (2 mg gelöst in 80 µl DMSO) für 30 bis 60 min. bei RT gerollt bzw. behandelt. Anschließend wurde überschüssiges DSS durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt. Durch diese Behandlung konnte erreicht werden, dass die Antikörper zum größten Teil an die ProteinA/Sepharose gebunden bleiben und beim Kochen und nach einer 1 minütigen Zentrifugation nicht in den Überstand abgegeben und somit auch nicht auf das Gel mitaufgetragen wurden, sondern nur, im Optimalfall, das präzipitierte Protein. So könnte das Problem bei der Detektion, wenn das gesuchte Protein die gleiche oder ähnliche Größe wie die Schwere Kette besitzt, umgegangen werden.

### **3.3.7.2 KOIMMUNOPRÄZIPITATION**

Um eine Protein-Protein Interaktion von zwei bekannten Proteinen in Mammalia Zellen nachweisen zu können, wurde eine Koimmunopräzipitation durchgeführt. Dazu wurden die Zellen pelletiert, mit PBS gewaschen und mit einem sanften Detergenz wie Brij 96 in 1%iger Konzentration lysiert. Mit immobilisierten Antikörpern (irreversibel gebundene Antikörper an ProteinA/Sepharose) wurde über Nacht präzipitiert. Präzipitate wurden anschließend mehrmals mit PBS gewaschen, weiterhin wurde entweder eine klassische Immunopräzipitation durchgeführt (siehe 3.3.7) oder mit 50 µl Elutionspuffer von der Firma Pierce, das auf der sauren pH Wert Basis funktioniert, das präzipitierte Protein und sein mitpräzipitiertes Interaktionspartner isoliert. Der abgenommene Überstand wurde nach einer pH Neutralisierung mit 4 µl 1 M Tris Lösung mit Proteinauftragspuffer für reduzierende (mit DTT) oder nicht reduzierende (ohne DTT) Gele 1:6 verdünnt und für 5 min. bei 95°C erhitzt. Danach erfolgte eine 10%ige SDS PAGE (Minigel), Western Blot und Immunodetektion wie im vorherigen Kapitel schon beschrieben.

### **3.3.8 ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG**

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) ist ein elektrophoretisches Trennverfahren, bei welchem Proteine oder Peptide entsprechend ihrer Ladung aufgetrennt werden können. Proteine wandern im elektrischen Feld durch einen pH Gradienten in Richtung Anode oder Kathode, bis sie im Gradienten an den PH-Wert gelangen an dem ihre Nettoladung Null ist. Dieser pH-Wert ist der isoelektrische Punkt (pI) des jeweiligen Proteins (O'Farrell, 1975;

Yang SY, 1987). In diesem Fall ist auch seine Wanderungsgeschwindigkeit gleich Null.  $2 \times 10^6$  Zellen werden in 500  $\mu$ l Lysepuffer ( 0,5% Triton-X 114, 0,2 mM PMSF, 50 mM TRIS, 5 mM EDTA pH 7,4) für 30 min. bei 4°C inkubiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei maximaler Drehzahl und 4°C wird der Überstand abgenommen und bei 37°C inkubiert bis dieser trüb wird und danach 5 min. bei RT und 300g bis 500g abzentrifugieren. Dieser Schritt dient der Phasentrennung. Die wässrige obere Phase wird verworfen. Da alle MHC Klasse I schwere Ketten glykosyliert und endständig mindestens einen Neuraminsäurerest tragen, ist der, aus der Aminosäurezusammensetzung resultierende, pI überdeckt. Neuraminsäurereste müssen vor dem IEF entfernt werden, was durch Verdauung mit dem Enzym Neuraminidase geschieht. Die Detergensphase wird weiter mit Neuraminidase (N'ase Typ 8 vib.chol. SIGMA) in Konzentration 2U/ml für 6 h bei 37°C und im Schüttler verdaut. Danach folgt eine erneute Phasentrennung durch Zugabe von 1 ml 50 mM EDTA pH 6,5 und eine Inkubation bei 37°C sowie eine erneute 5-minütige Zentrifugation bei RT und 300 bis 500g. Die wässrige Phase wird verworfen und die Detergensphase wird 1:1 mit Auftragspuffer (57% Harnstoff, 2% NP-40, 1,53% DTT, 0,01 % Bromphenolblau mit Zusatz von 0,75 ml Ampholine pH 3,5 – 10 für 15 ml) vermischt und nach 30 min. Inkubation bei RT auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Es wurden Glasplatten von 16x18cm und ein Abstandshalter von 0,75 mm benutzt. Gelzusammensetzung: 11,4 g Harnstoff, 3ml 30%Acrylamid/Bisacrylamid, 4ml 10%NP-40 und 5ml ddH<sub>2</sub>O bei 37°C lösen, nach dem Abkühlen Zugabe von folgenden Ampholinen: 0,4ml pH 3,5-10, 0,3ml pH 5-7, 0,3 ml pH 6-8. Mittels 20 $\mu$ l TEMED und 20 $\mu$ l 25% APS wird die Polymerisation gestartet. Das Gel zügig mit einer Glaspipette bei eingesetztem Kamm bis zum Rand auffüllen und 1 h polymerisieren lassen. Den Kamm unter fließendem Wasser herausziehen und die Taschen gut mit Wasser spülen. Als Anoden-Puffer (+) wurde 15mM Phosphorsäure eingesetzt und als Kathoden-Puffer (-) 20mM Natriumhydroxid. Die Fokussierung läuft über Nacht ca.18 bis 20 h bei 400V und 10mA. Anschließend das Gel noch 1 h bei 800V laufen lassen und danach einmal mit Äquilibrierungspuffer (50%MetOH, 5mM TRIS pH 8,0, 1% SDS) waschen und darauf folgend alle 10 min. insgesamt 5 Mal im neuen Äquilibrierungspuffer inkubieren. Zum Schluss 1 Mal kurz im Transferpuffer waschen und Proteintransfer (Kapitel 3.3.5) vom Gel zur Nylonmembran (Immobilon P von Millipore) bei 4°C, 400mA 2 bis 4 h starten. Immunodetektion erfolgte mit Kaninchen  $\alpha$  HLA-Peptid, 1:1500 (Davids Biotechnologie) und Schwein  $\alpha$  Kaninchen-HRP,1:2000 (Amersham Life) für jeweils 1 h Inkubation mit anschließender Chemolumineszenz Detektion (PerkinElmer Life Sciences, Western Lightning).

### 3.4 IMMUNOLOGISCHE METHODEN

#### 3.4.1 IMMUNFLUORESZENZ

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz können oberflächen- als auch zytoplasmatische Antigene durch Bindung eines spezifischen Antikörpers und dessen Detektion mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten zweiten Antikörpers nachgewiesen werden (indirekte Immunfluoreszenz). Um eine Polarisation der Antigene (*Capping*) bei der Oberflächenimmunfluoreszenz zu vermeiden, wurden die lebenden Zellen mit 0,1%  $\text{NaN}_3$  in den Waschlösungen behandelt.

##### 3.4.1.1 IMMUNFLUORESZENZ VON OBERFLÄCHENANTIGENEN

Ca.  $10^6$  Zellen wurden 2-3 Mal in sterilem PBS gewaschen. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in einem 1,5 ml Eppendorfgesäß, 3 min bei 500 g und 4°C. Dann wurde mit 50  $\mu\text{l}$  des ersten AK (meistens Hybridomüberstände) für 45 min inkubiert. Es wurde 3 Mal mit je 1 ml kaltem 0,1%  $\text{NaN}_3$ /PBS gewaschen. Mit 50  $\mu\text{l}$  des zweiten Antikörpers Kaninchen-Anti-Maus FITC-konjugiert wurde 25 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Es wurde wieder 3 Mal mit 0,1%  $\text{NaN}_3$ /PBS gewaschen, das Zellpellet in 150  $\mu\text{l}$  0,25%iger Paraformaldehydlösung aufgenommen und im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt. Die Auswertung erfolgte im Fluoreszenzmikroskop oder im FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter).

##### 3.4.1.2 ZYTOPLASMATISCHE IMMUNFLUORESZENZ

Um Antigene im Zytoplasma nachweisen zu können, müssen die Zellen permeabilisiert werden.  $10^5$  Zellen wurden 2-3 Mal in PBS gewaschen und 15 min mit 500  $\mu\text{l}$  0,25%iger Paraformaldehydlösung bei RT inkubiert. Die Zellen wurden erneut 2 Mal in PBS gewaschen und anschließend in 500  $\mu\text{l}$  70%iger Methanol/PBS Lösung resuspendiert und bei 4°C eine Stunde lang im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden danach 3 Mal mit PBS gewaschen und in 50  $\mu\text{l}$  der Antigen spezifischen AK Lösung aufgenommen. Inkubation bei den spezifischen AK erfolgte zwischen 2 h und über Nacht bei 4°C im Dunkeln. Anschließend wurde 3 Mal mit PBS gewaschen. Die Inkubation des zweiten AK und die weitere Behandlung der Zellen erfolgte wie bei der Oberflächenimmunfluoreszenz.

### 3.4.1.3 AUSWERTUNG IM FLUORESZENZMIKROSKOP

10 µl der gefärbten Zellen wurden auf einen Objektträger getropft, mit einem Deckglas abgedeckt und unter einem Fluoreszenzmikroskop bei 495 nm betrachtet. Verglichen wurde die Färbeintensität von spezifischen Antikörpern mit der Färbeintensität der Isotypkontrolle.

Die Aufnahmen im Fluoreszenzmikroskop wurden mit FITC- und DAPI-Filter gemacht. Zur Auswertung wurde die *QFluoro*-Software Version 1.0-A von Leica verwendet.

### 3.4.1.4 AUSWERTUNG IM FACSCAN

Zur Quantifizierung der Immunfluoreszenz wurden jeweils 10000 Einzelzellen, die mit den Protokollen der oberflächen- (siehe Kap. 3.4.1.1) und zytoplasmatischen Immunfluoreszenz (siehe Kap. 3.4.1.2) gefärbt wurden, im *FACScan* gemessen und mit der *CellQuest<sup>TM</sup>*-Software Version 3.1f (Becton Dickinson) ausgewertet. Zur Beschreibung der Expressionsstärke wurde der *delta mean channel* ermittelt. Er ergibt sich aus der Differenz des *mean channels* (Fluoreszenzintensität der meisten Zellen) der Probe mit spezifischen Antikörper und dem *mean channel* der Isotypkontrolle.

## 3.4.2 ELISA

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bezeichnet einen enzymgekoppelten Immunadsorptionstest, bzw. ein immunologisches Nachweisverfahren, das im Gegensatz zum Radioimmunoassay (RIA) nicht auf einer Radioaktivitätsmessung, sondern auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Wie der Radioimmunoassay gehört auch ELISA zur Gruppe der Immunoassay-Verfahren. Mit Hilfe von ELISA können Proteine, Viren, aber auch niedermolekulare Verbindungen wie Hormone, Zytokine, Toxine und Pestizide in einer Probe nachgewiesen werden. Hierbei macht man sich die Eigenschaft spezifischer Antikörper zu Nutze, die an den nachzuweisenden Antigenen anbinden. Antikörper oder Antigen werden zuvor mit einem Enzym markiert. Die durch das Enzym katalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens. Das Substrat wird vom Enzym umgesetzt, das Reaktionsprodukt kann üblicherweise durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz nachgewiesen werden. Die Signalstärke ist im allgemeinen eine Funktion der Antigenkonzentration, so dass ELISA auch für quantitative Nachweise verwendet werden kann.

### 3.4.2.1 DER ZYTOKIN ELISA ASSAY

Mit dem OptEIA Elisa Set ist es möglich, natürliches oder rekombinantes INF  $\gamma$  im Serum, Plasma oder in der Zellkultur ins Medium freigesetzten INF  $\gamma$  zu untersuchen bzw. zu messen. Zuerst erfolgte eine Plattenbeschichtung (Nunc Immuno Maxi Sorb 96 Well) durch eine Inkubation mit monoklonalen Antikörpern, Maus  $\alpha$  humane INF  $\gamma$  im 0,1 M Carbonatpuffer pH 9,5 verdünnt (Endvolumen: 50  $\mu$ l /Well), über Nacht bei 4°C mit Folie abgedichtet. Anschließend wurde 3 Mal mit Waschpuffer (0,05% TWEEN20/PBS) großzügig gewaschen, zwischendurch auf Papiertüchern gut trocken geklopft. Nach einer Inkubation mit Blocklösung (1 %iges Magermilchpulver/PBS) für 1 Stunde bei RT mit Folie abgedichtet, erfolgten weitere 3 Waschschrte mit Waschpuffer wie zuvor beschrieben. Anschließend wurden die zu untersuchenden Proben (Endvolumen: 50  $\mu$ l/Well, siehe Abschnitt 3.1.4) und Verdünnungen für die Standardkurve (rekombinantes INF  $\gamma$  in folgenden Konzentrationen: 1000; 333; 166; 83,2; 41,6 und 0 pg/ml) auf die beschichtete 96 Well Platte gegeben und für eine weitere Stunde bei RT und mit Folie abgedichtet, inkubiert. Anschließend wurde die Platte fünf Mal, wie schon beschrieben, mit Waschpuffer gewaschen. Detektion erfolgte mit einem Gemisch (Endvolumen: 50  $\mu$ l /Well) aus biotinylierten Maus  $\alpha$  humane INF  $\gamma$  und Avidine-HRP, einem Enzymkonjugate in 1 % Magermilchpulver/PBS, für 30 min. bis 1 Stunde bei RT. Danach erfolgten sieben weitere Waschschrte mit Waschpuffer (wie schon beschrieben) und anschließend die Zugabe von Substrat (Endvolumen: 100  $\mu$ l/Well; Tertamethylbenzidine und Hydrogen im Verhältnis 1:1, kurz vor dem Einsatz hergestellt). Die Inkubation mit Substrat dauerte 30 bis 45 min. im Dunkeln bei RT. Die Enzymreaktion wurde anschließend durch Zugabe von 50  $\mu$ l 1M Phosphorsäure gestoppt. Messung der Farbreaktion erfolgte an einem Elisa Reader bei 450 nm.

## 3.5 RADIOAKTIVE MARKIERUNG

Diese Methode wurde benutzt um die Neusynthese sowie den Transport von MHC Klasse I näher zu untersuchen. Bei einer Inkubation mit radioaktivem Schwefel markierten Methionin und Cystein Aminosäuren bauen die Zellen diese markierten Aminosäuren während einer festgelegten Zeit und in der gesamten Proteinsynthese ein. Nach einer Zelllyse und anschließender Immunopräzipitation von gewünschten Proteinen mit entsprechenden spezifischen monoklonalen Antikörpern ist es möglich, die neusynthetisierten radioaktiv markierten Proteine zu detektieren. Das erfolgt durch eine 10%ige SDS PAGE bei 50V über

Nacht, anschließend das Gel trocknen für 1,5 h und Autoradiographie von 1 bis 3 Tagen bei -80°C.

### **3.5.1 MARKIERUNG MIT S<sup>35</sup>-METHIONIN UND S<sup>35</sup>-CYSTEIN**

In einer 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche wurden ca. 5x10<sup>6</sup> Zellen ausgesät, sodass die Zellen nach 24 h Inkubation im Brutschrank ca. 80% konfluent waren. Die Zellen wurden anschließend 1h mit Starving Medium (Gibco DMEM Medium mit L-Glu, Na-Pyr, Penc+, Strep+ und 5% dialysierten FCS ohne Met und Cys) inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 125 µCi/10<sup>6</sup> Zellen von S<sup>35</sup>radioaktiv markierten Met/Cys in das Medium und eine weitere Inkubation von 3 Stunden. Anschließend wurde das Medium mit Radioaktivität abgesaugt. Für eine weitere Analyse wurden die Zellen 2 Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden das Zellpellet mit 500 µl Lysepuffer (Taurocholic acid 1%) bei 4°C und 30 min lang lysiert. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert und dem klaren Lysatüberstand, der in ein neues Eppendorfgefäß überführt wurde, wurde FCS im Verhältniss 1:1 zugegeben. Danach erfolgten mehrere (4 bis 6) Waschschrte, indem das Lysat/FCS für 3 Stunden mit Protein A Sepharose bei 4°C gerollt und anschließend für 1 min. bei 10000 rpm abzentrifugiert wurde. Darauf folgende Immunopräzipitation wurde mit den α MHC Klasse I Antikörper (vorher gekoppelt an Protein A Sepharose) über Nacht bei 4°C durchgeführt. Bevor die Proben auf 10%ige SDS PAGE aufgetragen wurden, wurden diese 3 Mal mit PBS gewaschen und mit dem 6-fach Auftragspuffer im Verhältnis 1:6 versetzt und für 5 min. bei 95°C gekocht. Die Trennung erfolgte in 10% SDS PAGE bei 50V und ÜN. Anschließend wurde das Gel für ca. 1,5 Stunden getrocknet und in einer Filmkassette 1-3 Tage bei -80°C exponiert (Autoradiograph).

#### **3.5.1.1 AUSWERTUNG MIT SIGMAGEL PROGRAMM**

Die Banden wurden mittels Sigmagel Programm (Linien Methode) densitometrisch ausgewertet und im Exel/Microsoft Programm in Diagrammform dargestellt. Die relative MHC Klasse I Expression wurde im Verhältnis zum neusynthetisierten Actin, dargestellt. Gezeigt wurde die Intensität MHC Klasse I Bande / die Intensität Actin Bande.

### 3.5.2 PULSE/CHASE METHODE

Für die Untersuchung des MHC Klasse I Transports wurden die Zellen auf die gleiche Art und Weise vorbereitet wie für die  $S^{35}$  Markierung. In einer 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche wurden ca.  $5 \times 10^6$  Zellen ausgesät, sodass die Zellen nach 24 h Inkubation im Brutschrank ca. 80% konfluent waren. Die Zellen wurden anschließend 1h mit einem starving Medium (Gibco DMEM Medium mit L-Glu, Na-Pyr, Penc+, Strep+ und 5% dialysiertes FCS ohne Met und Cyst) inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 125  $\mu\text{Ci}/10^6$  Zellen von  $S^{35}$ radioaktiv markiertem Met/Cys in das Medium und es erfolgte eine weitere Inkubation von 1 Stunde (Pulse). Nach der Entfernung des radioaktiven Mediums ( $S^{35}$ -Met;  $S^{35}$ -Cys) erfolgte, um den Proteinsynthese/Transport in der Zelle weiterhin laufen zu lassen, eine Inkubation im Chase Medium (Gibco DMEM Medium mit L-Glu, Na-Pyr, Penc+, Strep+ und 10% FCS, 2mM Met und 2mMCyst) mit Überschuss an nicht radioaktiv markiertem Met und Cys (Chase) für folgende Zeitfenster: 30 min.; 60 min.; 90 min. und 120 min.. Während der MHC Klasse I Neusynthese im endoplasmatischen Retikulum sind die MHC Moleküle sensitiv gegenüber der Verdau mit dem Enzym Endoglykosidase H (Endo H) und weisen ein niedriges Molekulargewicht auf. Sobald die MHC Moleküle zum Golgi transportiert wurden, sind diese Moleküle resistent gegenüber dem Enzym Endo H und weisen ein hohes Molekulargewicht auf. Anschließend wurde das Chase Medium entfernt und die Zellen mit steriler 1mM EDTA/PBS Lösung abgelöst, danach 2 Mal mit PBS gewaschen und mit 500  $\mu\text{l}$  Lysepuffer (Taurocholic acid 1%) bei 4°C für 30 min. inkubiert. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert und dem klaren Lysatüberstand, der in ein neues Eppendorfgefäß überführt wurde, FCS im Verhältnis 1:1 zugegeben. Danach erfolgten mehrere (4 bis 6) Waschschrte, indem das Lysat/FCS immer für 3 Stunden mit neuer Protein A/ Sepharose bei 4°C gerollt wurde und anschließend für 1 min. bei 10000 Upm abzentrifugiert wurde. Anschließend erfolgte die Immunopräzipitation, über Nacht bei 4°C und beim ständigen Rollen, mit den  $\alpha$  MHC Klasse I Antikörpern (vorher gekoppelt an Protein A Sepharose). Bevor die Proben auf 10%iges SDS PAGE aufgetragen wurden, wurden diese nach 3 mal PBS Waschen mit 100.000 U/Probe Endoglykosidase H (Endo H) Enzym bei 37°C verdaut. Dieses Enzym schneidet Zuckerketten, die in einer Zelle nur im ER und cis Golgi als high mannose form vorkommen. Die Proben wurden nach der Verdau kurz abzentrifugiert, mit dem 6-fach Auftragspuffer im Verhältnis 1:6 versetzt und für 5 min. bei 95°C gekocht. Die Trennung erfolgte im 10% SDS PAGE bei 50V und ÜN. Anschließend wurde das Gel für ca. 1,5 Stunden getrocknet und in einer Filmkassette 1-3 Tage bei -80°C exponiert (Autoradiograph).

## 4 ERGEBNISSE

PHLDA1 wurde durch eine Differential-Display-Technik als ein Gen, das eine verminderte Expression in drei Melanometastasen Zelllinien im Vergleich zu den autologen Primärtumorzelllinien aufweist, identifiziert (Kuske, 1998). Weitere Studien haben gezeigt, dass das PHLDA1 Protein stark in benignen melanozytären Naevi exprimiert ist, aber im Lauf der Melanomprogression unterreguliert wird (Neef et al, 2002). Um die Funktion von Genen, die bei der Tumorprogression von Bedeutung sein könnten, näher untersuchen zu können, ist es notwendig, die exprimierten Genprodukte zuerst in Zellsystemen zu testen, die bis auf die Produktion des zu untersuchenden Genprodukts möglichst wenig voneinander abweichen. Auf diese Weise können aussagekräftige Thesen über die Funktion des zu untersuchenden Proteins getroffen werden. Die Funktion von PHLDA1 wurde deswegen durch die Verwendung von stabilen Transfektanten mit einer konstitutiven PHLDA1 Expression, untersucht. Für die Herstellung von PHLDA1 Transfektanten wurde die mit Adenovirus transformierte Nierenepithelzelllinie 293 ausgesucht, welche von sich aus wenig PHLDA1 Protein exprimiert. Die Zellen der humanen 293 Nierenepithelzelllinie wurden mit 4,7 kb PHLDA1 cDNA in pCDNA3 Vektor (Kuske, 1998) transfiziert. Es konnten vier unabhängige Transfektanten mit Bezeichnung: Ph T1, Ph T2, Ph T3 und Ph T4 isoliert werden. Für die Herstellung von Kontrollzellen wurde die 293 Nierenepithelzelllinie alleine mit dem gleichen Vektor ohne PHLDA1 cDNA transfiziert. Auch hier konnten erfolgreich vier unabhängige Transfektanten mit Bezeichnung: Neo1, Neo2, Neo3 und Neo4 isoliert werden (Neef et al, 2002). Mit Hilfe solcher Transfektanten war es möglich zu zeigen dass die PHLDA1-Expression mit einer erhöhten Apoptose assoziiert ist. In dieser Arbeit wurden die Transfektanten weiter auf die Expression von verschiedenen Molekülen untersucht.

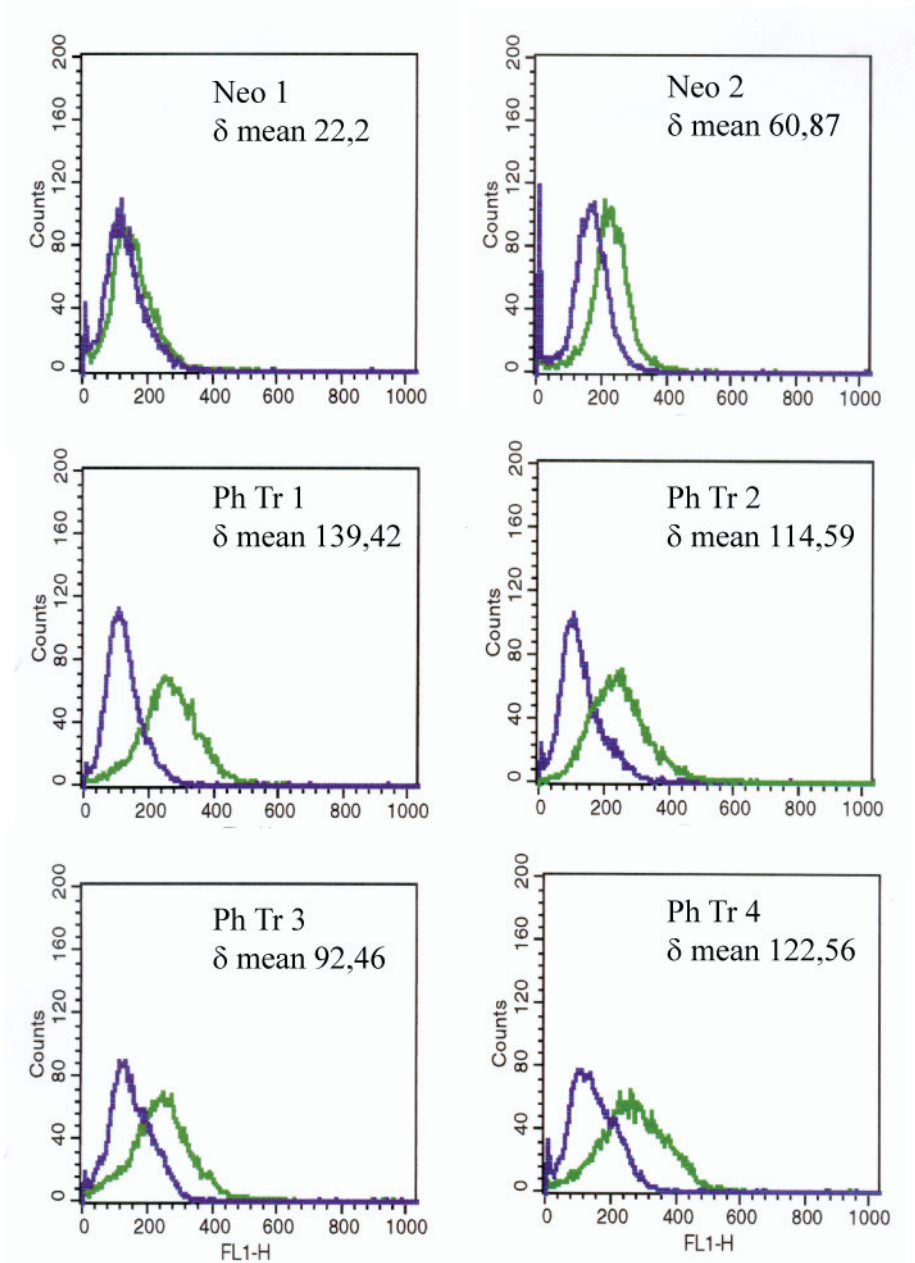
### 4.1 EXPRESSION VON PHLDA1 IN DEN STABILEN CDNA TRANSFEKTANTEN

Die PHLDA1 Expression in den stabilen Transfektanten wurde in regelmäßigen Abständen mittels zytoplasmatischer Immunfluoreszenz und Western Blot kontrolliert.



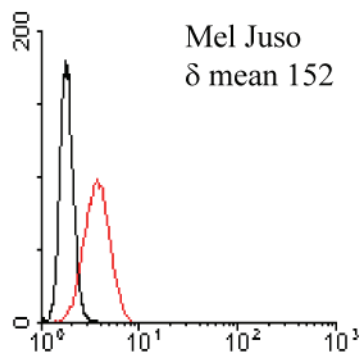
#### 4.1.1 ZYTOPLASMATISCHE IMMUNFLUORESCENZ

Um die PHLDA1 Expression der verschiedenen Transfektanten zu quantifizieren, wurden die Zellen, wie in 3.4.1.2 beschrieben, mit  $\alpha$  PHLDA1 monoklonalen Antikörpern gefärbt und mit Hilfe der Durchflußzytometrie (FACscan siehe 3.4.1.3) analysiert.



**Abbildung 4.1 PHLDA1 Expression in 293 Transfektanten.**

FACscan Histogramme zeigen die Expression von PHLDA1(Ph) in den Neo 1, Neo 2, Ph T1, Ph T2, Ph T3 und Ph T4. X-Achse: FLH-1 = Fluoreszenzintensität 1, Y-Achse: Counts = Anzahl der Zellen. Isotypkontrolle UPC10 (blau) ist gegenüber der Bindung von  $\alpha$  PHLDA1 Antikörpern (grün) dargestellt. Als sekundäre Antikörper wurden Kaninchen  $\alpha$  Maus IgG mit FITC markiert, verwendet. Der mean channel der Isotypkontrolle wurde von dem mean channel der Färbung mit dem  $\alpha$  PHLDA1 Antikörper subtrahiert und als delta ( $\delta$ ) mean dargestellt. Dargestellt sind die repräsentativen Daten aus einem von zahlreichen Experimenten.



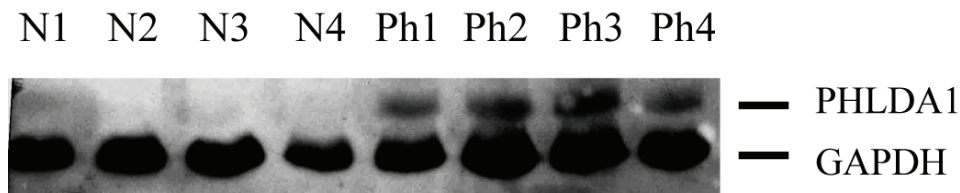
**Abbildung 4.2 PHLDA1 Expression in Mel Juso.**

Das FACScan Histogramm zeigt die Expression von PHLDA1 in einer etablierten Melanomzelllinie: Mel Juso. X-Achse: FLH-1 = Fluoreszenzintensität 1, Y-Achse: Counts = Anzahl der Zellen. Isotypkontrolle UPC10 (schwarz) ist gegenüber der Bindung von  $\alpha$  PHLDA1 Antikörpern (rot) dargestellt. Als sekundäre Antikörper wurden Kaninchen  $\alpha$  Maus IgG mit FITC markiert, verwendet. Der mean channel der Isotypkontrolle wurde von dem mean channel der Färbung mit dem  $\alpha$  PHLDA1 Antikörpern subtrahiert und als delta ( $\delta$ ) mean dargestellt.

Alle vier PHLDA1 Transfektanten der Zelllinie 293 zeigen eine starke PHLDA1 Expression im Vergleich zu den zwei Neo Kontrollzelllinien, die nur mit leerem Vektor ohne PHLDA1 Gen transfiziert wurden. Das *PHLDA1* Gen ist induzierbar. Es kann z.B. durch den Wechsel des Mediums induziert werden, was auch in den Neo Kontrollzelllinien manchmal detektierbar sein kann. Die Stärke der Expression von PHLDA1 Transfektanten der Zelllinie 293 ( $\delta$  mean zwischen 93 und 139) ist mit der natürlichen PHLDA1 Expression in Melanomzelllinien wie z.B. Mel Juso ( $\delta$  mean 152) vergleichbar.

#### 4.1.2 WESTERN BLOT

Als eine zusätzliche, unabhängige Methode, für die Überprüfung der PHLDA1 Expression in den stabilen Transfektanten, wurde das gesamte PHLDA1 Protein mittels SDS PAGE und Western Blot, wie in Abschnitt 3.3.3 und Abschnitt 3.3.5 beschrieben, analysiert.



**Abbildung 4.3 PHLDA1 Expression in stabilen 293 Transfektanten.**

150 µg Protein aus dem gesamten Zelllysat wurde pro Spur auf das SDS PAGE Gel aufgetragen, getrennt und auf die Nitrozellulosemembran transferiert wie in Kapitel 3.3.1 bis 3.3.6 beschrieben. Als primäre Antikörper wurden  $\alpha$  PHLDA1 und  $\alpha$  GAPDH eingesetzt. Als sekundäre Antikörper wurden Kaninchen  $\alpha$  Maus IgG mit Horseradish-Peroxidase konjugiert, verwendet. PHLDA1 Protein läuft bei ca. 40 kDa. Auftragskontrolle: GAPDH läuft bei 38 kDa. Bezeichnungen: 293 PHLDA1 Transfektanten: Ph1, Ph2, Ph3 sowie Ph4 und Neo Kontrollzellen: N1, N2, N3 und N4.

Aus dem Bild in Abbildung 4. 3 ist eindeutig ersichtlich, dass alle 293 PHLDA1 Transfektanten (Ph1 bis Ph4) eine höhere PHLDA1 Expression im Vergleich zu Neo Kontrollzellen (N1 und N2) zeigen. Alle PHLDA1 Transfektanten zeigen im oben dargestellten SDS PAGE Gel eine Bande auf der Höhe von ca. 40 kDa welche eindeutig zu erkennen ist. Im Gegensatz dazu ist bei Neo Kontrollzellen keine Bande im Bereich des PHLDA1 Proteins zu identifizieren. Um sicherzustellen, dass in etwa gleiche Mengen an Gesamtprotein auf das SDS PAGE Gel geladen wurden und als gleichzeitige Transferkontrolle bei der Proteinübertragung auf die Nitrozellulosemembran, wurde die Membran auch mit einem Antikörper gegen GAPDH gefärbt. Das GAPDH Protein zeigt eine Bande auf der Höhe von ca. 38 kDa, was in der Abbildung 4. 3 bei allen untersuchten Zelllinien zu erkennen ist.

## **4.2 KONSTITUTIVE PHLDA1 EXPRESSION IST MIT EINER ERHÖHTEN MHC KLASSE I EXPRESSION ASSOZIIERT**

PHLDA1 wurde als Genprodukt, das mit Apoptose Empfindlichkeit assoziiert ist, identifiziert. In manchen Systemen wurde die PHLDA1 Expression mit einer höheren Fas Expression assoziiert, obwohl PHLDA1 keine erkennbare DNA-Bindungsdomäne aufweist. Es wäre durchaus möglich, dass PHLDA1 als ein regulatorisches Molekül agiert, welches die Expression von verschiedenen anderen Genen in einer Zelle beeinflussen kann. Um den Einfluss von PHLDA1 auf die Expression anderer Moleküle zu untersuchen, wurden die stabilen Transfektanten als erste mit einer Reihe von Oberflächenmolekülen auf eine Veränderung hingetestet mit besonderem Blick auf verschiedene Zelloberflächenmoleküle, die bei der Tumorentstehung und bei der Tumorprogression bekanntlich eine große Rolle spielen, wie z.B. Adhäsionsmoleküle, MHC Klasse I und Klasse II Moleküle. Die

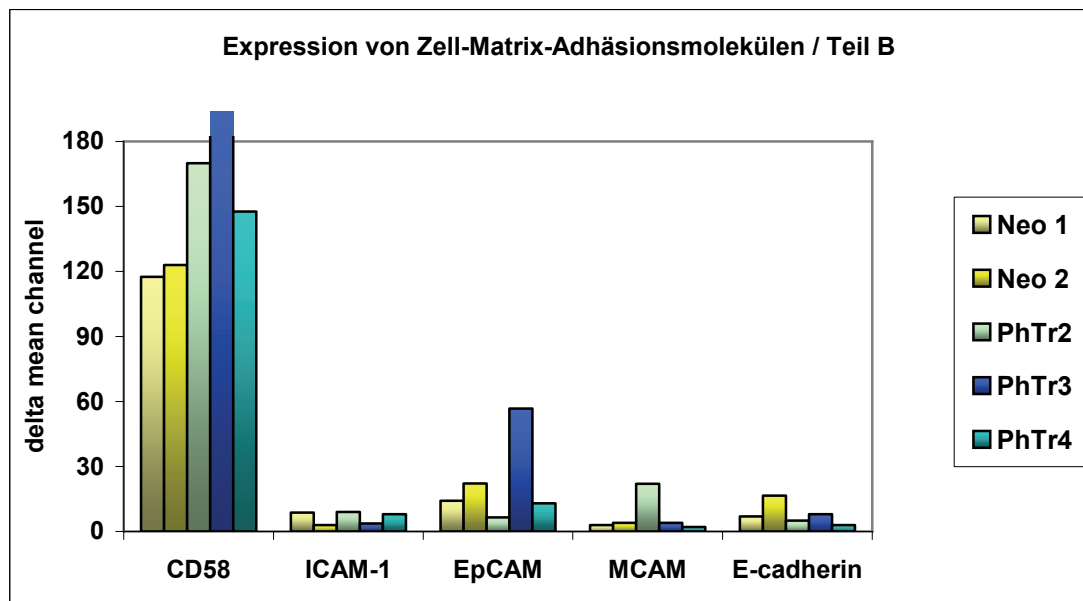
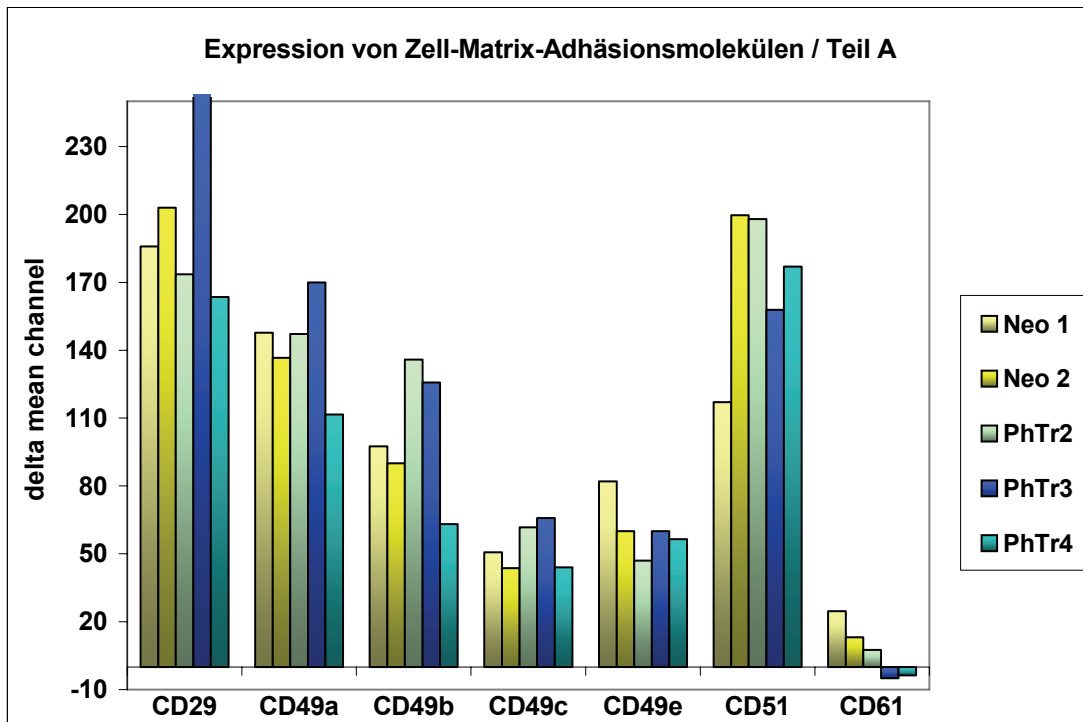
Oberflächenimmunfluoreszenz bzw. Antikörperfärbung wurde, wie in 3.4.1.1 beschrieben, durchgeführt. Die Auswertung erfolgte, wie in 3.4.1.3 beschrieben, mit Hilfe der Durchflußzytometrie (FACscan). Bei jeder Färbung und für alle Moleküle wurde eine Isotypkontrolle durchgeführt, die als Hintergrund für die Auswertung diente. Der mean channel der Isotypkontrolle wurde vom mean channel der Färbung mit dem entsprechenden Antikörper subtrahiert und als delta mean auf der Y-Achse in folgenden Abbildungen dargestellt.

#### **4.2.1 ADHÄSIONSMOLEKÜLE**

Folgende Adhäsionsmoleküle wurden ausgewählt:

- Integrine ( $\beta 1$  sowie Vitronectin Rezeptor als CD51 bekannt und platelet glycoprotein IIIa als CD61 bekannt), die für die Zell-Zell Interaktion genauso wie für die Zell-Matrix Interaktion wichtig sind. Diese sind wiederum für die Metastasierung entscheidend.
- Immunglobulinsuperfamilie-CAMs wie ICAM-1, LFA-3 (CD58) und MCAM (Muc 18). Die Expression dieser Moleküle ist häufig bei verschiedenen Tumoren verändert.
- EpCAM und E-cadherin, Epithel-CAMs, welche bei den verschiedenen Tumoren auch häufig disreguliert sind.

In der Abbildung 4. 4 sind auf der Y-Achse die Werte im Form von delta mean channel aus den Färbungen mit Antikörpern, die gegen verschiedenen Adhäsionsmoleküle gerichtet sind, dargestellt.



**Abbildung 4.4 Expression von Zell-Matrix-Adhäsionsmolekülen in 293 Transfektanten.**

In Teil A ist die Bindung der verschiedenen Integrine dargestellt. In Teil B ist die Bindung der Immunglobulinsuperfamilie CAM's sowie zusätzlich E-Cadherin und EpCAM gezeigt. Primäre Antikörper sind näher im Material beschrieben (Kap.2.5). Als sekundäre Antikörper wurden Kaninchen  $\alpha$  Maus IgG mit FITC markiert, eingesetzt. Für jede Färbung wurde eine Isotypkontrolle durchgeführt. Der mean channel der Isotypkontrolle wurde von dem mean channel der Färbung mit dem jeweiligen Antikörper subtrahiert und als delta mean ermittelt. Auf der Y-Achse sind die Werte der „delta mean channel“ dargestellt. Neo 1, Neo 2 bezeichnen Neo Kontrollzelllinie und Ph T2, Ph T3 und Ph T4 bezeichnen PHLDA1 Transfektanten. Dargestellt sind die repräsentativen Daten aus einem von zahlreichen Experimenten.

Aus der Abbildung 4. 4 ist ersichtlich, dass kein einheitlicher Unterschied in der Integrinexpression bei Neo Kontrollzellen und PHLDA1 Transfektanten festzustellen ist. Eine Expression von Immunglobulinsuperfamilie-CAMs wie ICAM1 und MCAM (Muc 18), sowie E-Cadherin ist nicht zu erkennen. Nur PHLDA1 Transfektante 2 im oben dargestellten Experiment zeigte eine positive EpCAM Expression, welche in weiteren Färbungen stark zwischen den verschiedenen Transfektanten und verschiedenen Färbungen variierte. Es konnte keine signifikante Korrelation mit der PHLDA1 und EpCAM Expression festgestellt werden. Im Gegensatz dazu schien in diesem Experiment die Expression von LFA3 (CD58) in den PHLDA1 Transfektanten hochreguliert zu sein. Allerdings musste nach mehrmaliger Wiederholung festgestellt werden, dass dieser Effekt unter gleichen experimentellen Bedingungen nicht stabil ist, d.h. die Expression von LFA3 (CD58) in den PHLDA1 und Neo Transfektanten variierte stark. Aus diesem Grund wurde die LFA3 Expression nicht weiter verfolgt.

#### **4.2.2 MHC EXPRESSION**

MHC Klasse I und MHC Klasse II sind Zelloberflächenmoleküle, die für die Antigenerkennung durch das Immunsystem notwendig sind. Die Expression dieser Moleküle ist oft in Tumoren gestört, wobei MHC Klasse I Moleküle häufig unterreguliert sind. Bis heute konnten viele genetische Veränderungen von Proteinen, die im Antigenprozessierungsweg beteiligt sind, wie z.B. TAP und LMP, beobachtet werden, die für die Unterregulierung von MHC Klasse I verantwortlich sind. Aber auch Veränderungen in der Biosynthese des MHC Proteins selbst, oder des  $\beta$ 2-Mikroglobulins sind bei verschiedenen Tumorarten bekannt, genauso wie der Verlust von nur einem spezifischen Allel oder sogar der komplette MHC Klasse I Verlust (Sette et al, 2001). Solche Tumorzellen können von CD8<sup>+</sup> cytotoxischen T-Zellen nicht erkannt und eliminiert werden.

Die Expression von MHC Klasse I in den stabilen, konstitutiv 293 PHLDA1 exprimierenden Transfektanten und deren Kontrollzellen wurde mit sehr oft verwendeten, monoklonalen Antikörpern W6/32 (Barnstable et al, 1978) welche mit allen MHC Klasse I Produkten (HLA A, B, C) reagieren, überprüft. Zusätzlich wurde die MHC Klasse I Expression auch mit den Antikörpern, die gegen spezifische Allele wie HLA A2 und HLA B7 (Brodsky und Parham, 1982) gerichtet sind, überprüft. Als zusätzliche Kontrolle wurden Färbungen mit Antikörpern, welche  $\beta$ 2 Mikroglobulin (BBM.1, Brodsky et al, 1979) erkennen, durchgeführt. Die Expression von MHC Klasse II wurde mit monoklonalen Antikörpern L243, welche alle

HLA-DR Allele erkennen, untersucht. In den folgenden Abbildungen sind die Daten aus einem repräsentativen Experiment von vielen zahlreichen Oberflächenimmunfluoreszenz Färbungen dargestellt. Bei jeder Färbung und für alle Antikörper wurde eine Isotypkontrolle durchgeführt, die als Hintergrund für die Auswertung diente. Der mean channel der Isotypkontrolle wurde vom mean channel der Färbung des entsprechenden Antikörpers subtrahiert und als delta mean auf der Y-Achse der folgenden Diagramme dargestellt:

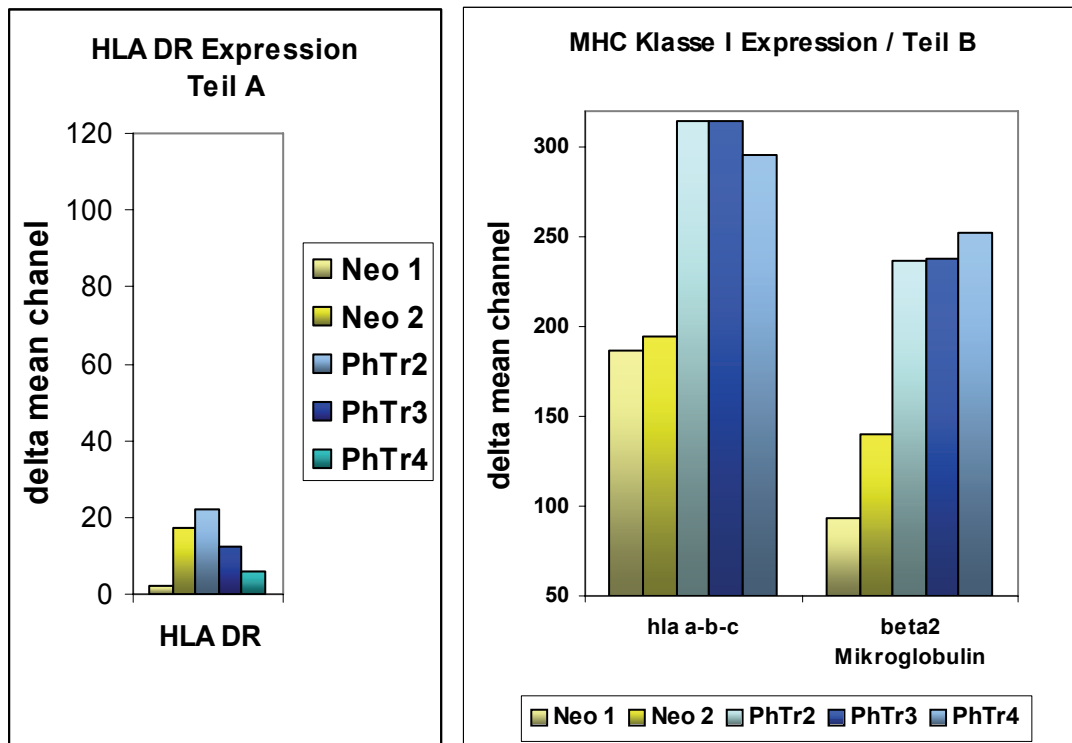
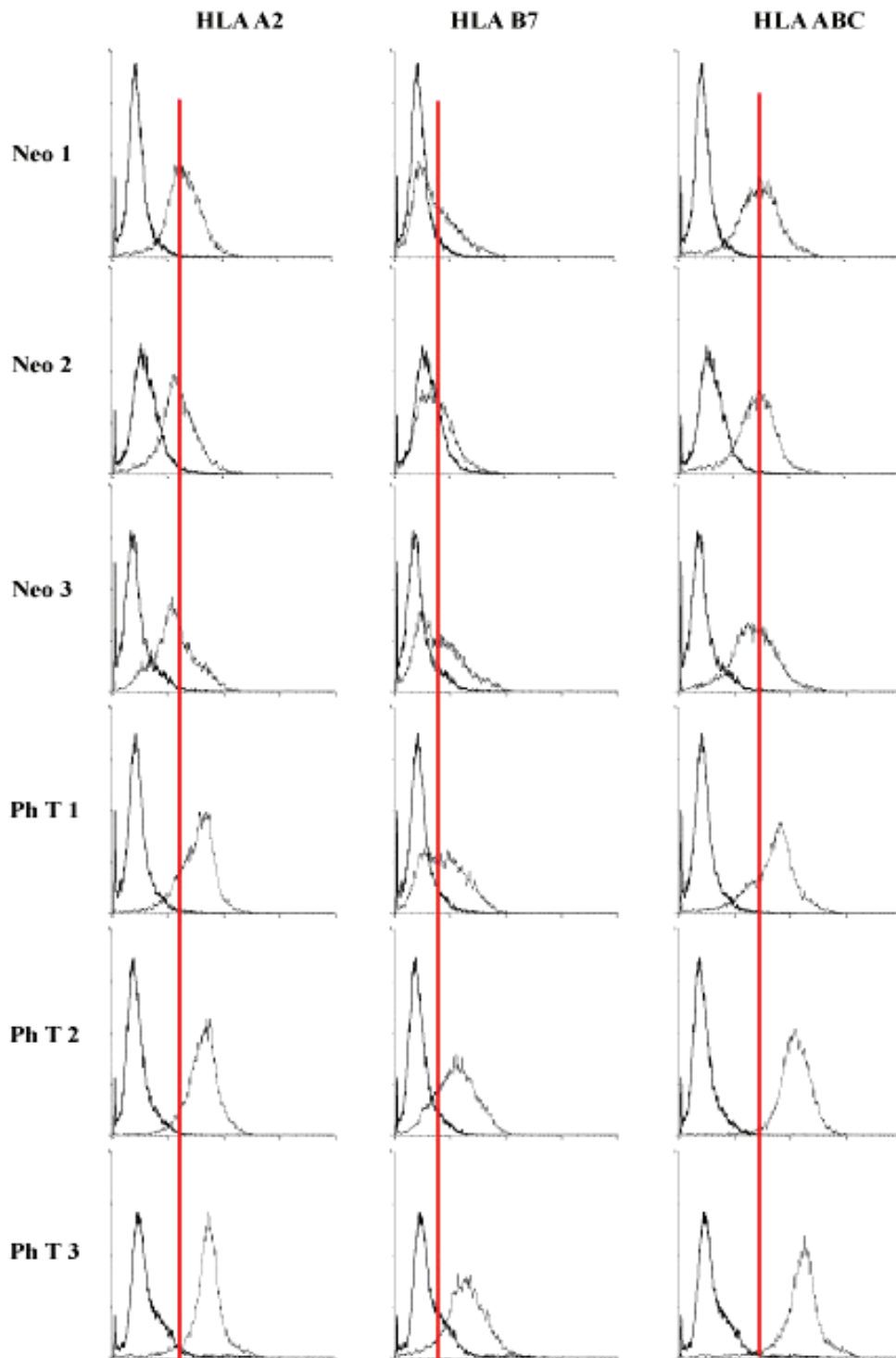


Abbildung 4.5 Expression von MHC Klasse I und II in 293 Transfektanten.

Im Teil A ist die Expression von MHC Klasse II (L243:  $\alpha$  HLA DR) dargestellt. Im Teil B ist die Expression von MHC Klasse I mit zwei unabhängigen Antikörpern  $\alpha$  HLA ABC (W6/32) und  $\alpha$   $\beta$ 2 Mikroglobulin (BBM.1) dargestellt. Primäre Antikörper sind im Material (Kap.2.5) beschrieben. Als sekundäre Antikörper wurden FITC markierte Kaninchen  $\alpha$  Maus IgG verwendet. Bei jeder Färbung wurde eine Isotypkontrolle durchgeführt. Der mean channel der Isotypkontrolle wurde vom mean channel der Färbung des entsprechenden Antikörpers subtrahiert und als delta mean ermittelt. Auf der Y-Achse sind die Werte der „delta mean channel“ dargestellt. Neo 1, Neo 2 bezeichnen Neo Kontrollzelllinien und Ph T2, Ph T3 und Ph T4 bezeichnen PHLDA1 Transfektanten.

Monoklonale Antikörper L243 erkennen alle HLA-DR Allele. Aus den Ergebnissen der Abbildung 4. 5 Teil I dargestellt, ist es ersichtlich, dass keine der 293 Transfektanten, weder PHLDA1 noch Neo Kontrollzellen, diese MHC Klasse II Moleküle auf der Oberfläche exprimieren. Im Gegensatz dazu zeige, nach einer Färbung mit monoklonalen W6/32 Antikörpern, welche alle HLA A, B und C Allele erkennen, alle PHLDA1 Transfektanten eine höhere MHC Klasse I Expression als die entsprechenden Neo Kontrollzellen. Auch die Oberflächenfärbung mit Antikörpern gegen  $\beta$ 2-Mikroglobulin, welches zusammen mit MHC Klasse I auf der Zelloberfläche exprimiert wird, bestätigt die Ergebnisse der W6/32 Oberflächenfärbung (Abbildung 4. 5). FACscan Histogramme in der Abbildung 4. 6 zeigen die Expression von MHC Klasse I bei Neokontrollen und PHLDA1 Transfektanten der Nierenepithelzelllinie 293 mit einem weiteren Antikörper MB40.5, welcher genauso wie W6/32 alle HLA A, B, C Allele erkennen. Die Expression von einzelnen, für die Nierenepithelzelllinie 293 spezifischen, Allele (Routes and Cook, 1990; sowie persönlicher Mitteilung E.Nösner, Helmholtz Zentrum München), HLA A2 (PA2.1) und HLA B7 (MB40.2) sind ebenso in der Abbildung 4. 6 dargestellt.



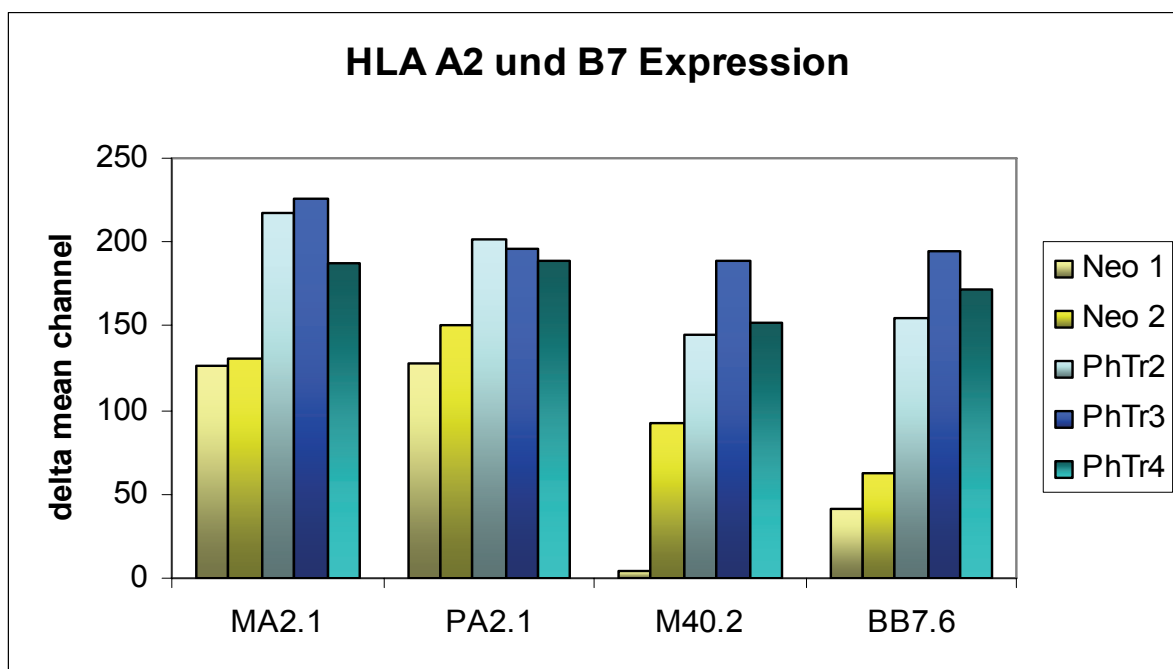


**Abbildung 4.6 MHC Klasse I Expression in 293 Transfektanten.**

FACscan Histogramme zeigen die Expression von MHC Klasse I allgemein sowie die Expression von spezifischen Allele HLA A2 und HLA B7 in den Neo 1, Neo 2, Neo 3, Ph T1, Ph T2 und Ph T3. X-Achse: Fluoreszenzintensität 1, Y-Achse: Anzahl der Zellen. In den Histogrammen sind Isotypkontrollen (Fr4H12) gegenüber der Bindung von  $\alpha$  HLA A2 (PA2.1),  $\alpha$  HLA B7 (MB40.2) oder  $\alpha$  HLA ABC (MB40.5), dargestellt. Primäre Antikörper sind näher im Material (Kap.2.5) beschrieben. Als sekundäre Antikörper wurden FITC markierte Kaninchen  $\alpha$  Maus IgG verwendet. Neo1, Neo2 und Neo3 bezeichnen Neo Kontrollzelllinien und Ph T1, Ph T2, Ph T3 bezeichnen PHLDA1 Transfektanten. Die rote Linie markiert das Maximum des Bindungsprofils der jeweiligen Neo Kontrolle. Dargestellt sind die repräsentativen Daten aus einem von zahlreichen Experimenten.

Aus den präsentierten Histogrammen ist ersichtlich, dass ein einheitlicher Unterschied in der MHC Klasse I Expression auf der Zelloberfläche bei Neo Kontrollzellen und PHLDA1 Transfektanten festzustellen ist. Alle fünf eingesetzten Antikörper:  $\alpha$  HLA A2,  $\alpha$  HLA B7 und drei verschiedene  $\alpha$  HLA ABC (W6/32, MB40.5 und  $\alpha$   $\beta$ 2 Mikroglobulin BBM.1) bestätigen eine erhöhte Expression von MHC Klasse I bei PHLDA1 Transfektanten im Vergleich zu Neo Kontrollzellen.

In der Abbildung 4. 7 sind weitere Daten aus einer repräsentativen Färbung dargestellt, welche die Expression von MHC Klasse I mit weiteren zusätzlichen Antikörpern  $\alpha$  HLA A2 (MA2.1 und PA2.1) und  $\alpha$  HLA B7 (BB7.6 und MB40.2) bei 293 Neo und PHLDA1 Transfektanten erneut bestätigen. Der mean channel der Isotypkontrolle wurde vom mean channel der Färbung mit dem  $\alpha$  HLA A2 bzw.  $\alpha$  HLA B7 Antikörpern subtrahiert und als delta mean auf der Y-Achse dargestellt.



**Abbildung 4. 7 Expression von spezifischen MHC Klasse I Allele bei 293 PHLDA1 Transfektanten.**

Die Expression von MHC Klasse I ist mit jeweils zwei unabhängigen Antikörpern  $\alpha$  HLA A2/B17 und  $\alpha$  HLA A2/Aw69 (MA2.1 und PA2.1) und zwei  $\alpha$  HLA B7/B40 (BB7.6 und MB40.2 im Diagramm als M40.2 bezeichnet) dargestellt. Primäre Antikörper sind näher im Material (Kap.2.5) beschrieben. Als sekundäre Antikörper wurden FITC markierte Kaninchen  $\alpha$  Maus IgG eingesetzt. Bei jeder Färbung wurde eine entsprechende Isotypkontrolle durchgeführt. Der mean channel der Isotypkontrolle wurde vom mean channel der entsprechenden Färbung subtrahiert und als delta mean dargestellt. Auf der Y-Achse sind die Werte der „delta mean channel“ dargestellt. Neo 1, Neo 2 bezeichnen Neo Kontrollzelllinie und Ph T2, Ph T3 und Ph T4 bezeichnen PHLDA1 Transfektanten. Dargestellt sind die repräsentativen Daten aus einem von zahlreichen Experimenten.

Eine erhöhte Oberflächenexpression von HLA A2 und B7 Allelprodukten bei 293 PHLDA1 Transfektanten im Vergleich zu Neo Kontrollzelllinien ist eindeutig zu erkennen. Zusammenfassend ist eine konstitutive PHLDA1 Expression bei 293 Zellen mit einer erhöhten Expression von MHC Klasse I auf der Zelloberfläche assoziiert. An dieser Stelle stellt sich die Frage, ob MHC Klasse I nur auf der Oberfläche oder das gesamte MHC Klasse I Protein in der Zelle erhöht ist.

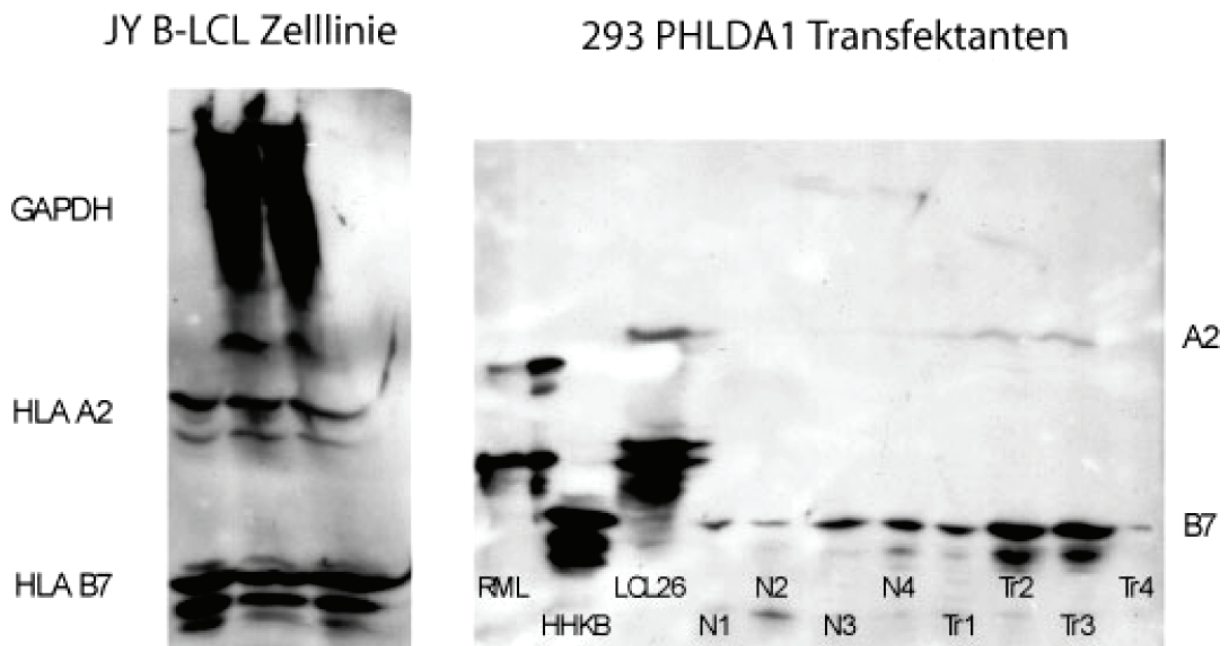
### **4.3 UNTERSUCHUNG DER URSACHE FÜR DIE ERHÖHTE MHC KLASSE EXPRESSION BEI KONSTITUTIV PHLDA1 EXPRIMIERENDEN ZELLEN**

Um die Fragestellung zu klären, ob MHC Klasse I nur auf der Oberfläche oder das gesamte MHC Klasse I Protein in der Zelle bei den 293 PHLDA1 Transfektanten erhöht ist, war es notwendig, weitere Experimente durchzuführen.

#### **4.3.1 ANALYSE DER GESAMTEN HLA A2 UND HLA B7 PROTEINMENGE BEI PHLDA1 TRANSFEKTANTEN**

PHLDA1 Transfektanten zeigen eine höhere Oberflächen MHC Klasse I Expression als die Neo Kontrollzelllinien. Um zu untersuchen, ob das gesamte MHC Klasse I Protein in der Zelle erhöht ist, wäre eine Bestimmung mit SDS PAGE und Western Blot hilfreich. Leider gibt es keine Western Blot fähigen Antikörper, die alle HLA A, B und C Allelprodukte erfassen bzw. erkennen. Weiterhin können im SDS PAGE einzelne Allelprodukte nicht voneinander unterschieden werden. Wie die vorherigen Oberflächenimmunfluoreszenz Färbungen zeigen konnten, exprimieren PHLDA1 und Neo Transfektanten der Nierenepithelzelllinie 293 HLA A2 sowie HLA B7 Allelprodukte. Es ist bekannt, dass mittels isoelektrischer Fokussierung viele MHC Klasse I Allelprodukte entsprechend ihres pI (Isoelektrischer Punkt) aufgetrennt werden können (Yang SY, 1987). Die isoelektrische Fokussierung ist ein Trennverfahren, bei welcher Substanzen entsprechend ihrer Ladung aufgetrennt werden können (O'Farrell, 1975). Die Anwendung ist auf die Trennung von amphoteren Substanzen beschränkt, sprich Molekülen, die nach außen positiv und negativ geladen sind. Die Elektrophorese findet in einem pH-Gradienten statt. Die Proteine wandern im elektrischen Feld je nach Ladung in Richtung Kathode (+) oder Anode (-), bis diese im Gradienten an dem pH-Wert ankommen, an dem ihre Nettoladung Null ist. Dieser pH-Wert wird als isoelektrischer Punkt (pI) des jeweiligen Proteins bezeichnet. Da das Protein an

dieser Stelle nicht mehr geladen ist, hat das elektrische Feld keinen Einfluss mehr auf dieses Protein. So ergibt sich ein Konzentrierungseffekt, woher auch der Name Fokussierung stammt. Diese Methode wurde benutzt, um die MHC Klasse I Expression von HLA A2 und HLA B7 auf der Proteinebene in den stabilen 293 PHLDA1 Transfektanten und Kontrollzellen zu überprüfen und zu vergleichen.



**Abbildung 4.8 Bestimmung der HLA A2 und B7 Expression mittels isoelektrischer Fokussierung.**

Links: Kontrollexperiment mit einer B Zelllinie, JY, die bekanntlich für HLA A2/B7 homozygot ist. Rechts: stabile PHLDA1 Transfektanten, bezeichnet als Tr1 bis Tr4 sowie mit Kontrollzellen Neo Transfektanten, bezeichnet als N1 bis N4. Als weitere Kontrollen wurden folgende B-Lymphoblastoide Zelllinien eingesetzt (*Reference: Charron, D, ed. Genetic Diversity of HLA. Functional and Medical Implications. France: EDK, 1996*): LCL26 (HLA A2;A33/B41;B51); HHKB (HLA A3/B7) und RML (HLA A2/B51). Es wurde die gesamte Zellysatsmenge von  $2 \times 10^6$  Zellen / Zelllinie auf das Gel aufgetragen. Das Gel enthält ein Gemisch aus Ampholinen pH 3,5-10, pH 5-7 und pH 6-8. Nach Western Blot (Kap.3.3.5) erfolgte eine Immunodetektion mit Kaninchen  $\alpha$  HLA Peptid (Davids Biotechnologie) und im Kontrollexperiment mit  $\alpha$  GAPDH Antikörper. Als zweite Antikörper wurden Schwein  $\alpha$  Kaninchen konjugiert mit Horseradish-Peroxidase konjugiert (Amersham Life) sowie im Kontrollexperiment Rabbit  $\alpha$  Maus-Immunglobulin Horseradish-Peroxidase konjugiert, benutzt.

Für dieses Experiment wurden verschiedene B-Lymphoblastoide Zelllinien mit einer sehr hohen MHC Klasse I Expression als Referenz ausgesucht, welche bekanntlich für HLA A2 oder B7 Allele positiv sind, wie z.B. JY (Homozygot für HLA A2/B7), LCL26 (HLA A2;A33/B41;B51); HHKB (HLA A3/B7) und RML (HLA A2/B51). Es sind oft mehrere Banden untereinander im Gel zu sehen, was sich damit erklären lässt, dass die MHC Klasse I Moleküle in verschiedenen Glykosylierungsstadien in einer Zelle vorkommen. Die RML Zelllinie trägt einen Subtyp des HLA A2 Allels und zwar HLA A\*0202. Deshalb zeigt diese Zelllinie eine Bande, die eine Stufe niedriger ist als die der LCL26 und 293 Transfektanten, welche HLA A\*0201 positiv sind. HHKB trägt zwei Allele HLA A3 und B7, welche in IEF auf der gleichen Höhe fokussieren, was im Gel in der Abbildung 4. 8 auch zu erkennen ist. Diese Zellen zeigen drei untereinander liegende, starke Banden, in der Abbildung 4. 8 als B7 bezeichnet. Aus den oben dargestellten Ergebnissen ist ersichtlich, dass eine signifikant höhere HLA B7 Expression bei PHLDA1 Tr2 und Tr3, im Vergleich zu Neo Kontrollzellen zu erkennen ist. Eine schwache HLA A2 Bande ist nur bei PHLDA1 Tr2 und Tr3 identifizierbar. Die HLA A2 Expression bei PHLDA1 Tr1 und Tr4, sowie die Neo Kontrollzellen N1 bis N4 waren in diesem Bild nicht identifizierbar. In weiteren IEF Experimenten blieb dieser Trend erhalten. Aus den FACs Experimenten, in der Abbildung 4. 6 und 4. 7 dargestellt, ist ersichtlich, dass das HLA A2 Allelprodukt bei 293 PHLDA1 Transfektanten meistens stärker als das HLA B7 Allelprodukt exprimiert war. Es ist denkbar, dass das verwendete Kaninchen  $\alpha$  HLA Serum möglicherweise das HLA A2 Allelprodukt nicht so gut erkennt. Auch bei den B-Zelllinien JY und LCL 26 ist erkennbar, dass die HLA A2 Banden schwächer als HLA B7 Banden sind. Die HLA B7 Expression ist im oben dargestellten Experiment bei PHLDA1 Tr1 und Tr4 niedriger als bei PHLDA1 Tr2 und Tr3 und ähnlich oder schwächer als die Neo Kontrollzelllinien. In anderen IEF Experimenten (Daten nicht dargestellt) zeigten PHLDA1 Tr1 und Tr4 eine immer etwas niedrigere HLA B7 Expression als Tr2 und Tr3, häufig, allerdings nicht immer, mehr als Neo Kontrollzellen. Eine Auftragskontrolle im Form von GAPDH oder  $\beta$  Actin Detektion, wie im SDS PAGE, war hier nicht möglich, was aus dem Kontrollexperiment im linken Bild dargestellt, ersichtlich ist. Hier ist nach der Färbung mit  $\alpha$  GAPDH Antikörpern eine im oberen Bereich nicht auswertbare, große, schwarze Schmier zu sehen. Ähnliche Ergebnisse wurden mit  $\alpha$  Actin Antikörpern beobachtet (Daten nicht dargestellt). Aus diesem Grund wurden in den IEF Experimenten immer  $2 \times 10^6$  Zellen pro Zelllinie und pro Versuch in 500  $\mu$ l Lysepuffer aufgenommen und weiterhin wie im 3.3.8 beschrieben, behandelt. Das gesamte Zelllysate wurde auf das Gel aufgetragen.

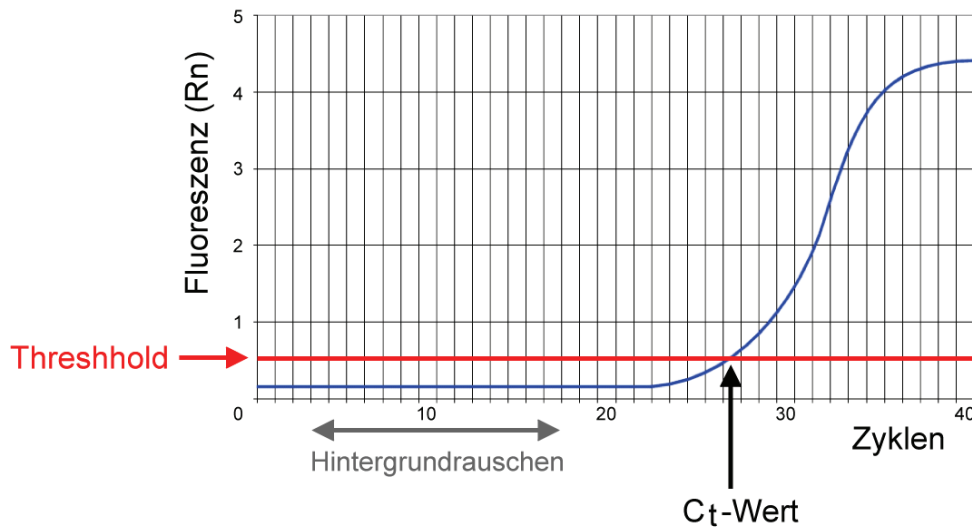
An dieser Stelle kann postuliert werden, dass neben der erhöhten MHC Klasse I Oberflächenexpression auch auf der Proteinebene, zumindest bei den PHLDA1 Tr2 und Tr3 eine erhöhte HLA B7, sowie HLA A2 Expression festzustellen ist. Anschließend stellt sich die Frage, ob ein Unterschied in der HLA A2 und HLA B7 Expression auf der mRNA Ebene zwischen Neo Kontrollzellen und PHLDA1 Transfektanten vorhanden ist.

#### **4.3.2 ANALYSE DER HLA A2 UND HLA B7 MRNA LEVEL**

Um die Frage zu beantworten, ob es einen Unterschied zwischen Neo und PHLDA1 Transfektanten auf der mRNA Expressionsebene bei HLA A2 und HLA B7 gibt, wurde eine real time PCR durchgeführt. Die real time PCR ist eine äußerst sensitive Methode zur Quantifizierung von PCR Produkten und wird z.B. zur Diagnostik von RNA-Viren, aber auch zur Quantifizierung der mRNA Expression in Zelllinien und Geweben verwendet. Nach dem Umschreiben der gesamten RNA in cDNA wird in der anschließenden PCR-Reaktion die Amplifikatmenge mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende eines jeden PCR Zyklus („*real time*“) quantifiziert und unterscheidet sich somit von anderen quantitativen (z.B. kompetitive PCR) und semiquantitativen PCR Methoden, die erst nach Ablauf der PCR ausgewertet werden. Zur Detektion des PCR Produkts können unter anderem fluoreszierende Farbstoffe, wie z.B. SYBR<sup>®</sup> Green, welche unspezifisch an jede doppelsträngige DNA während der Amplifikation anlagern, verwendet werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge des PCR Produkts zu.

Fluoreszierende Farbstoffe interkalieren in die kleine Furche doppelsträngiger DNA, wodurch die Fluoreszenz um das 1000-fache angeregt wird. Der Nachteil dieses Verfahrens ist die geringe Spezifität, da zwischen verschiedenen PCR Produkten nicht unterschieden werden kann, so dass nach der abgelaufenen PCR Reaktion eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt werden muss. Zum Vergleich der exprimierten mRNA-Mengen in verschiedenen Proben wurde eine relative Quantifizierung durchgeführt. Dazu wurde, um eventuelle Unterschiede in der eingesetzten cDNA-Menge zu relativieren, die Menge an cDNA des zu untersuchenden Gens auf die des, als endogene Kontrolle fungierenden, Haushaltgens  $\alpha$  Enolase bezogen. Um eine Quantifizierung der Amplifikatmengen in der exponentiellen Phase zu gewährleisten, wurde der C<sub>T</sub>-Wert („*threshold cycle*“) ermittelt. Der C<sub>T</sub>-Wert gibt den Zyklus an, bei dem die normalisierte Reporter-Fluoreszenz erstmalig signifikant über den Grenzwert der Hintergrund-Fluoreszenz (Hintergrundrauschen) ansteigt. Je größer die Ausgangsmenge

an einer spezifischen cDNA ist, desto geringer ist die Anzahl der Zyklen, die erforderlich sind, um den Grenzwert des Hintergrundrauschens deutlich zu übersteigen.



**Abbildung 4.9** Ermittlung des  $C_t$ -Werts („threshold cycle“).

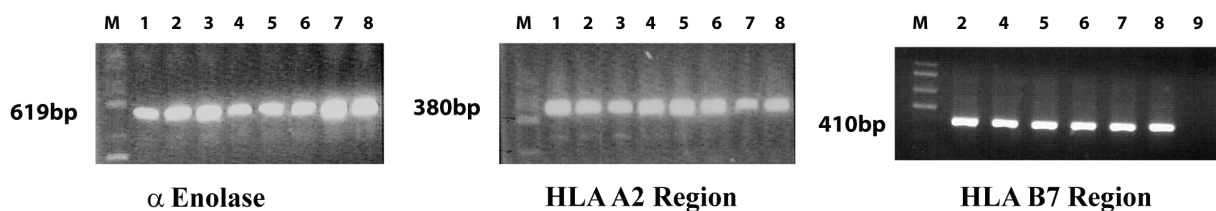
Aufgetragen wurde die normalisierte Reporter-Fluoreszenz (Rn) gegen die Zyklenzahl. Der  $C_t$ -Wert gibt den Zyklus an, bei dem der Rn-Wert zum ersten Mal den Grenzwert („threshold“) des Hintergrundrauschens signifikant übersteigt.

Diese Methode wurde zur Quantifizierung und zum Vergleich der mRNA Expression von MHC Klasse I, genauer der HLA A2 und HLA B7 Allele, bei PHLDA1 Transfektanten eingesetzt. Zuerst wurden die spezifischen Primerpaare für HLA A und HLA B Regionen aus der Veröffentlichung Willers et al, 2001 angewendet. Leider konnten mit diesen Primerpaaren keine verwertbaren Ergebnisse produziert werden. Nach vielen fehlgeschlagenen Versuchen konnten für HLA A2 und HLA B7 Regionen erfolgreich neue spezifische Primer, in folgender Tabelle zusammengefasst, kreiert werden.

Name	Sequenz 5'→3'	Ziel DNA	Bindungsposition
HLA A2 sense	CTTCATCGCAGTGGGCTACGT	HLA A Locus	bp 135-155 in Exon 2
HLA A2 antisense	TCCCACTTGTGCTTGGTGGT	HLA A Locus	bp 495-515 in Exon 3
HLA B7: 1A sense	GAACCTGCGCGGCTACTACAAC	HLA B Locus	bp 309-330 in Exon 2
HLA B7: 1B antisense	CAGTGTGATCTCCGCAGGGTAG	HLA B Locus	bp 696-717 in Exon 4
HLA B7: 2A sense	GCGCCGTGGATAGAGCAGG	HLA B Locus	bp 217-235 in Exon 2
HLA B7: 2B antisense	CCAGCTTGTCTTCCCGTTCTC	HLA B Locus	bp 588-610 in Exon 3

**Tabelle 4.1 Angewendete Primerpaare für die Amplifikation von HLA A2 und HLA B7 Produkten.**

Die Primer für die HLA A2 Region liegen im Exons 2/3 und ergeben ein 380 bp großes PCR Produkt. Die Primer für die HLA B7 Region, 1A sense/1B antisense, liegen im Exons 2/4 und ergeben ein 410 bp großes PCR Produkt. Die Bildung eines DNA Fragmentes definierter Länge aus den durchgeführten PCR Reaktionen wurde anhand einer Gelelektrophorese sichtbar gemacht und die Größe des Produkts überprüft, was in der Abbildung 4. 10 dargestellt ist.

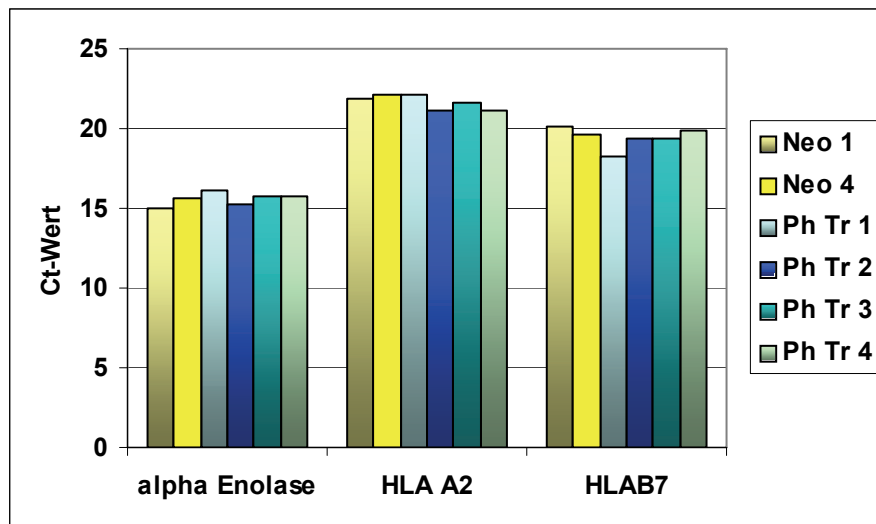


**Abbildung 4. 10 Analyse der PCR Produkte.**

PCR Produkte folgender PCReaktionen: α Enolase, HLA A2 Region und HLA B7 Region (1A sense/1B antisense) wurden auf einem 1%igen Agarosegel getrennt und analysiert. Legende: M= Marker; 1= 293 ATCC parentale Zelllinie; 2=Neo1; 3=Neo2; 4=Neo4; 5=PhTr1; 6=PhTr2; 7=PhTr3; 8=PhTr4; 9=H2O.

Für das gesamte Experiment wurden drei unabhängige Gesamt-RNA-Isolationen durchgeführt und untersucht. Anschließend real time PCR Ergebnisse aus einem repräsentativen Experiment sind in der Abbildung 4. 11 zusammengefasst.





**Abbildung 4.11 Real time PCR zur Quantifizierung von der HLA A2/B7 mRNA Expression.**

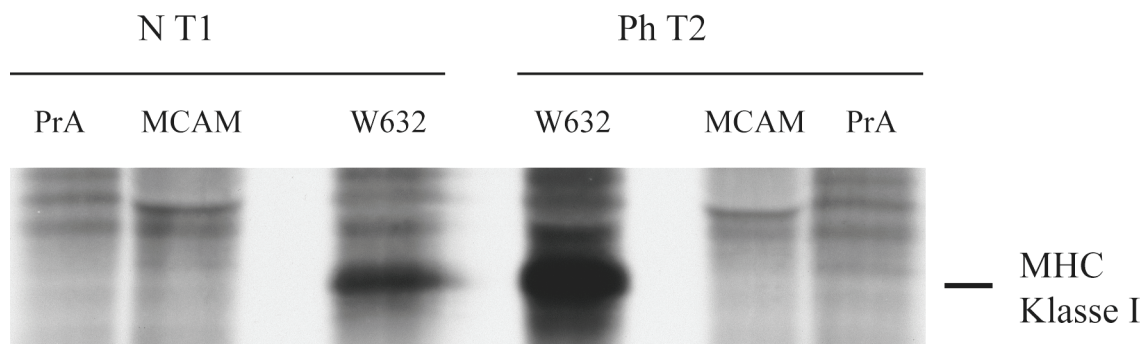
Auf der Y- Achse ist der Ct-Wert angegeben, bei der der Fluoreszenz-Wert zum ersten Mal den Grenzwert („threshold“) des Hintergrundrauschens signifikant übersteigt (siehe Abbildung 4.9). Dargestellt sind die repräsentativen Daten aus einem Experiment.

Daraus ist ersichtlich, dass bei PHLDA1 Transfektanten und Neo Kontrollzellen für zwei Allele, HLA A2 und HLA B7, auf der mRNA Expressionsebene kein Unterschied festzustellen ist. Alle untersuchten Transfektanten zeigten eine vergleichbar ähnliche mRNA Menge der hier untersuchten Allele. Wenn es keinen Unterschied auf der mRNA Expressionsebene gibt, stellt sich die Frage, wie sich die erhöhte MHC Klasse I Expression in PHLDA1 Transfektanten erklären lässt

### 4.3.3 UNTERSUCHUNG DER MHC KLASSE I SYNTHESE IN NEO UND PHLDA1 TRANSFEKTANTEN

Aus den bisherigen Experimenten ist ersichtlich, dass 293 PHLDA1 Transfektanten im Vergleich zu den Neo Kontrollzelllinien eine signifikant höhere MHC Klasse I Konzentration auf der Zelloberfläche aufweisen. Zumindest konnte bei PHLDA1 Tr2 und Tr3 eine höhere gesamte HLA A2 und HLA B7 Proteinmenge nachgewiesen werden. Dieser Unterschied findet allerdings nicht auf der Transkriptionsebene statt, wie die mRNA Quantifizierung im vorherigen Experiment zeigte. MHC Klasse I Moleküle werden im endoplasmatischen Retikulum (ER) zusammgebaut und von dort aus weiterhin auf die Zelloberfläche transportiert. Während der Synthese von MHC Klasse I im ER werden viele andere Proteine (Chaperone) zur Stabilisierung und Peptidbeladung benötigt. An dieser Stelle stellt sich die Frage, ob es eventuelle Unterschiede zwischen PHLDA1 Transfektanten und Neo

Kontrollzelllinien während der Synthesephase gibt. Möglicherweise begünstigt das PHLDA1 Protein in den PHLDA1 Transfektanten die MHC Klasse I Synthese oder die MHC Klasse I Stabilität. Um diese Frage zu klären, wurden die PHLDA1 und Neo Transfektanten mit radioaktivem Schwefel, markierten Aminosäuren Methionin (Met) und Cystein (Cys) kultiviert. Diese Methode benutzt man, um die Neusynthese sowie den Transport zur Oberfläche von MHC Klasse I näher zu untersuchen. Während einer Inkubation mit radioaktiv markierten Aminosäuren bauen die Zellen diese markierten Aminosäuren in die gesamte Proteinsynthese ein. Nach einer Zellyse und der anschließenden Immunopräzipitation der gewünschten Proteine mit entsprechenden spezifischen, monoklonalen Antikörper ist es möglich, die neusynthetisierten, gleichzeitig radioaktiv markierten, Proteine zu detektieren.

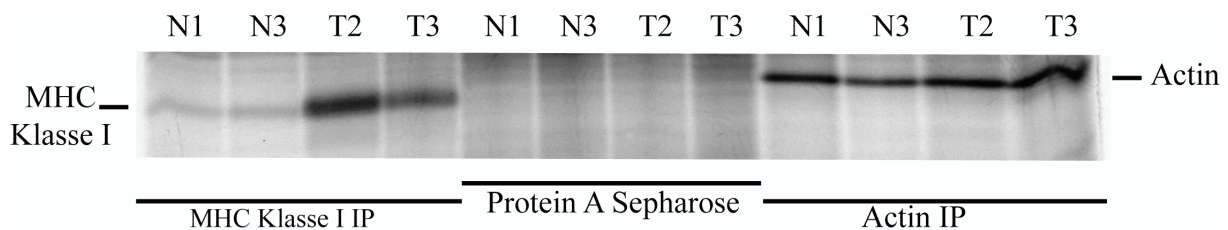


**Abbildung 4. 12 Identifizierung von neusynthetisierten MHC Klasse I Molekülen.**

Nach einer 3h radioaktiven Met und Cys Markierung ( $125 \mu\text{Ci}/10^6$  Zellen von Met  $\text{S}^{35}$ /Cys  $\text{S}^{35}$  wie im Kap. 3.5 beschrieben) von PHLDA1 Tr2 und Neo 1 folgte eine Zellyse und anschließend eine Immunopräzipitation (IP) in folgender Reihe: als Kontrolle zuerst Protein A Sepharose/FCS ohne spezifische Antikörper, darauf folgende spezifische IP mit Protein A Sepharose/  $\alpha$  MCAM als zusätzliche Isotypkontrolle (112 kDa) und zum Schluss spezifische IP mit Protein A Sepharose/ W6/32 ( $\alpha$  HLA ABC; MHC klasse I; 45 kDa). (Ph T2 = PHLDA1 Tr 2; N T1 = Neo 1 Kontrollzelllinie). IP wurde auf SDS PAGE (Kap.3.3.3) getrennt, Gele wurden im Amplify-Reagenz 30 min. inkubiert, getrocknet und anschließend wurde eine Autoradiografie mit Film Exposition bei  $-80^\circ\text{C}$  durchgeführt.

Aus der Abbildung 4. 12 ist ersichtlich, dass nach einer 3-stündigen Radioaktivmarkierung unter gleichen Bedingungen bei PHLDA1 Transfektanten im Vergleich zu Neo Transfektanten eindeutig mehr neu synthetisierte MHC Klasse I Moleküle präzipitiert wurden. Um eventuelle unspezifische Bindungen auszuschließen, wurde die Immunopräzipitation (IP) mit Protein A Sepharose/FCS ohne spezifische Antikörper als Hintergrundkontrolle durchgeführt. Auf der Höhe von MHC Klasse I sind keine Banden zu erkennen bzw. keine unspezifischen Bindungen in diesem Bereich zu identifizieren.

Die darauf folgende spezifische Immunopräzipitation mit Protein A Sepharose/ $\alpha$  MCAM (Muc 18) wurde als zusätzliche Antikörper Isotypkontrolle durchgeführt. 293 PHLDA1 und Neo Transfektanten sind für MCAM Expression negativ, siehe auch Abschnitt 4.2. Im Bereich von MHC Klasse I ist keine Bande bzw. keine unspezifische Bindung zu erkennen. Bei allen drei Immunopräzipitationen sind oberhalb von MHC Klasse I unspezifische Banden identifizierbar. Solche Banden sind aber auf der Höhe von MHC Klasse I nicht vorhanden. Somit können unspezifische Bindungen im Bereich von MHC Klasse I ausgeschlossen werden. Es folgte eine Wiederholung der Radioaktivmarkierung von Neo 1 und PHLDA1 Tr2 mit weiteren Transfektanten (jeweils 1 Neo und 1 PHLDA1 Transfektante) sowie eine weitere Immunopräzipitation mit Protein A Sepharose/ $\alpha$  Actin als zusätzliche Auftragskontrolle. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 4. 13 und Abbildung 4. 14 dargestellt.

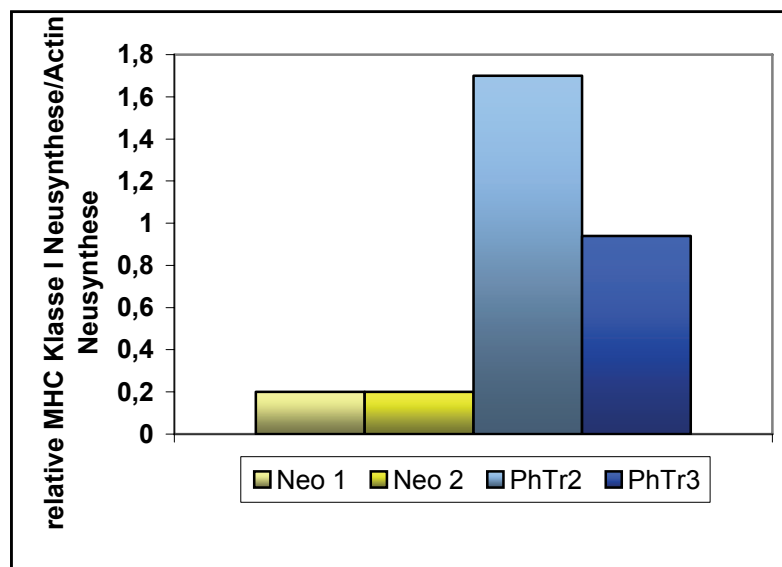


**Abbildung 4. 13 MHC Klasse I und Actin Neusynthese bei PHLDA1 und Neo Transfektanten.**

Nach einer 3h Met  $S^{35}$ /Cys  $S^{35}$  Markierung ( $125 \mu\text{Ci} / 10^6$  Zellen, wie im Kap. 3.5 beschrieben) folgte die Zellyse und anschließend Immunopräzipitation (IP) in folgender Reihe: zuerst Protein A Sepharose/FCS ohne spezifische Antikörper als Kontrolle, darauf folgende spezifische IP mit Protein A Sepharose/W6/32 ( $\alpha$  HLA ABC; MHC Klasse I; 45 kDa). Anschließend spezifische IP mit Protein A Sepharose/ $\alpha$  Actin ( $\beta$  Actin läuft bei 46 kDa) als eine weitere Kontrolle. (T2; T3 = PHLDA1 Tr 2 und 3; N1; N3 = Neo Kontrollzelllinie). IP wurde auf SDS PAGE (Kap.3.3.3) getrennt, Gele wurden im Amplify-Reagenz inkubiert, dann getrocknet. Anschließend erfolgte Autoradiografie mit Film Exposition bei  $-80^\circ\text{C}$ .

In der Abbildung 4. 13 ist in der Mitte die Protein A Sepharose/FCS Immunopräzipitation als Hintergrundkontrolle dargestellt. Es ist keine unspezifische Proteinbindung bei allen untersuchten Transfektanten im Bereich von MHC Klasse I zu erkennen.  $\beta$ -Actin ist ein hoch konserviertes Protein, welches in allen eukaryotischen Zellen ubiquitär exprimiert ist. Bei der Actin Immunopräzipitation, rechts im Bild dargestellt, sind bei allen Zelllinien, sowohl PHLDA1 als auch bei Neo Kontrollzelllinien, vergleichbar starke Banden zu identifizieren. Links im Bild ist die für MHC Klasse I spezifische Immunopräzipitation mit Protein A Sepharose/W63/2 ( $\alpha$  HLA ABC) dargestellt. Bei PHLDA1 Tr2 und Tr3 ist eine signifikant höhere Menge an MHC Klasse I im Vergleich zu den Neo Kontrollzelllinien N1 und N3 identifizierbar. Nach einer densitometrischen Auswertung der Banden, bei der die Stärke der

MHC Klasse I zur Stärke von Actin normalisiert wurde, ist in der folgenden Abbildung 4. 14 in Diagrammform dargestellt. Diese Ergebnisse zeigen, dass während einer 3-stündigen Proteinsynthese unter gleichen Bedingungen bei PHLDA1 Transfektanten 4,5-fach (PhTr3) bis 8,5-fach (PhTr2) mehr neu synthetisierte MHC Klasse I Moleküle vorhanden sind als bei Neo Kontrollzellen. Bei allen untersuchten Transfektanten, sowohl PHLDA1 als auch Neo Kontrollen, konnten während der Radioaktivmarkierung vergleichbare Mengen an neu synthetisiertem Actin identifiziert werden, was aus der Bandenstärke in der Abbildung 4. 13 eindeutig ersichtlich ist.



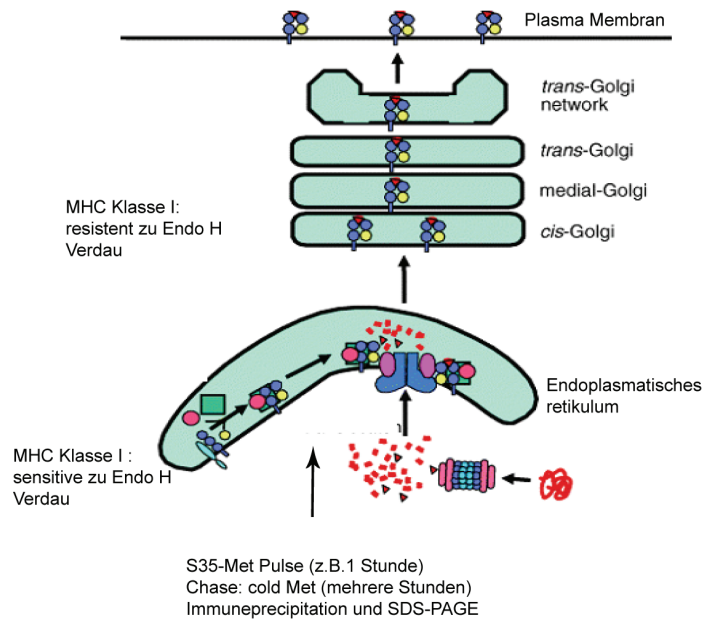
**Abbildung 4. 14**      **Relative MHC Klasse I Neusynthese.**

Nach densitometrischer Auswertung der Banden aus der Abbildung 4.13 ist die relative MHC Klasse I Expression im Verhältnis zum neusynthetisiertem Actin, dargestellt. Gezeigt ist die Intensität MHC Klasse I Bande/die Intensität Actin Bande.

An dieser Stelle kann postuliert werden, dass das PHLDA1 Protein in den 293 Nierenepithelzelllinie die MHC Klasse I Neusynthese auf eine noch unbekannte Art und Weise begünstigt.

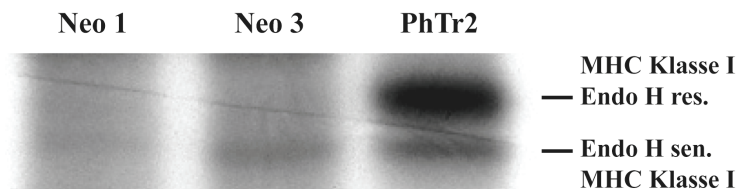
#### 4.3.4 UNTERSUCHUNG DES TRANSPORTWEGES DER MHC KLASSE I IN PHLDA1 TRANSFEKTANTEN

Ob es Unterschiede in dem Transport von MHC Klasse I von ER zu der Zelloberfläche zwischen Neo Kontrollen und PHLDA1 Transfektanten gibt, wurde mittels Pulse/Chase Experiment untersucht. MHC Klasse I wird, wie schon kurz beschrieben, im ER synthetisiert und mit einem Peptid beladen. Über den vesikulären Transport wird es zum Golgi Apparat und weiterhin auf die Zelloberfläche befördert. Die Oberflächenexpression von MHC Klasse I ist entscheidend von der stabilen Integration eines Peptids in der Bindungsgrube des MHC Moleküls abhängig. Für den Fall, dass die Bindung nicht stabil genug ist, verschwindet der MHC/Peptid Komplex von der Zelloberfläche. Hoch affine Peptid/MHC Komplexe haben eine größere Stabilität und bleiben länger auf der Zelloberfläche präsent. Um zu klären, ob es zwischen PHLDA1 und Neo Kontrollzelllinien Unterschiede im Transport gibt, wurden die Transfektanten, wie im vorherigen Experiment, mit radioaktivem Schwefel ( $S^{35}$ ) markierten Aminosäuren Methionin und Cystein für eine Stunde inkubiert (Pulse genannt). Nach der Entfernung vom radioaktiven Medium ( $S^{35}$ -Met;  $S^{35}$ -Cys) folgte, um die Proteinsynthese in der Zelle sowie den Transport von MHC Klasse I weiterhin laufen zu lassen, eine Inkubation mit dem Überschuss an nicht radioaktiv markiertem Met und Cys (Chase genannt) für folgende Zeitfenster: 30 min.; 60 min.; 90 min und 120 min.. Während der Neusynthese von MHC Klasse I im ER sind die MHC Moleküle sensitiv gegenüber dem Verdau mit dem Enzym Endoglykosidase H (Endo H). Dieses Enzym schneidet Zuckerketten, die in einer Zelle nur im ER als high mannose form bezeichnet, vorkommen. Sobald die MHC Moleküle zum Golgi Apparat transportiert werden, wurden diese N-gekoppelten Kohlenhydratketten verkürzt und anschließend erneut glycosyliert, was den MHC Molekülen die Resistenz gegenüber dem Enzym Endo H verleiht. Dieses Prozess wird als Maturation oder die Reifung von MHC Klasse I bezeichnet. Zum besseren Verständnis ist das Prinzip des Experiments in der Abbildung 4. 15 schematisch dargestellt.



**Abbildung 4. 15 Schematische Darstellung des MHC Klasse I Transports sowie des Pulse/Chase Experiments.**

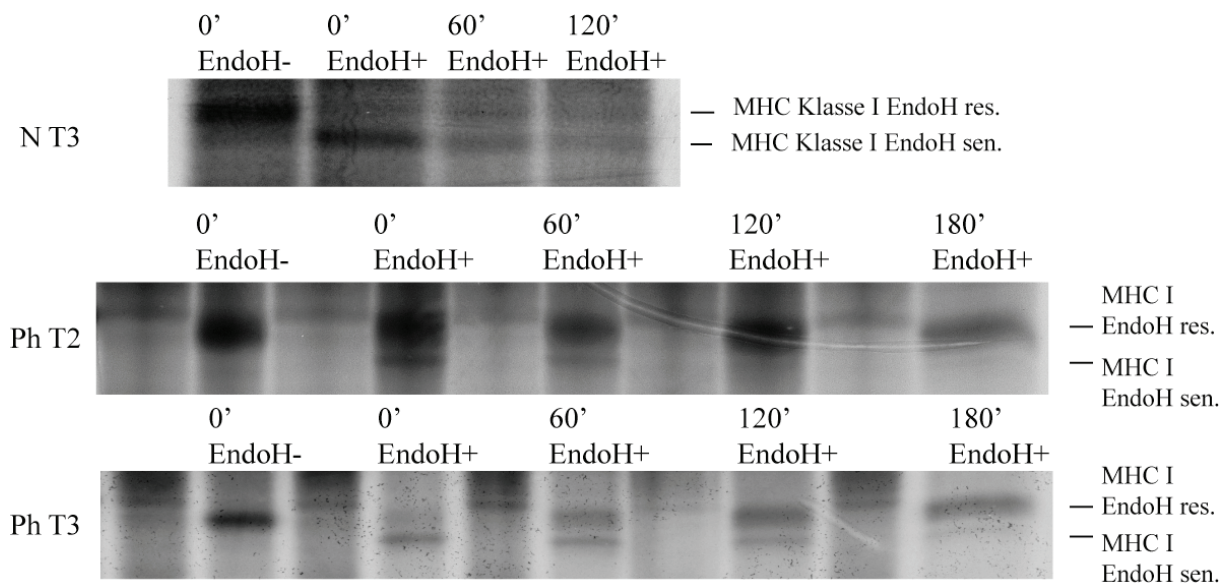
Diesen Effekt nutzt man, um messen zu können, wie schnell MHC Klasse I Moleküle vom ER weiter zum Golgi Apparat transportiert werden (Ackermann und Cresswell, 2003).



**Abbildung 4. 16 Maturation („Reifung“) von neu synthetisierten MHC Klasse I Molekülen.**

Nach einer 3h Met  $S^{35}$ /Cys  $S^{35}$  Markierung (Pulse; 125  $\mu$ Ci /  $10^6$  Zellen, wie im Kap. 3.5.1 beschrieben) folgte Chase für 30 min. (wie im Kap. 3.5.2 beschrieben) bei 293 PHLDA1 Tr2 (PhTr2) und 2 Kontrollzellen (Neo 1; Neo3). Nach der Zellyse folgte die Immunopräzipitation mit Protein A-Sepharose/W6/32 ( $\alpha$  HLA ABC). Anschließend erfolgte die Endo H Verdau, danach wurde IP auf SDS PAGE (Kap.3.3.3) getrennt, Gele wurden im Amplify-Reagenz 30 min. inkubiert und das Gel getrocknet. Anschließend erfolgte eine Autoradiografie mit Film Exposition bei  $-80^{\circ}$ C.

In der Abbildung 4. 16 sind die mit Endo H verdaute, präzipitierte neu synthetisierte MHC Klasse I Moleküle der 293 Transfektanten nach 3 Stunden Pulse und 30 min. Chase wie im Kap. 3.5.1/3.5.2 beschrieben) dargestellt. Bei PHLDA1 Transfektanten sind eindeutig 2 Banden erkennbar. Eine größere, Endo H resistente Bande, welche die neu synthetisierten MHC Klasse I Moleküle, die schon weiter zum Golgi Apparat transportiert wurden, darstellt und eine kleinere Endo H sensitive (durch Endo H verdaut) Bande, welche die neu synthetisierten MHC Klasse I Moleküle, die sich noch im ER befinden, darstellt. Bei Neo Kontrollzellen sind im Bereich der Endo H sensitiven MHC Moleküle jeweils schwache Bande zu erkennen. Das deutet darauf hin, dass nach 3 Stunden Pulse und 30 min. Chase in der PHLDA1 Tr2 im Vergleich zu zwei Neo Kontrollzelllinien Neo 1 und Neo 3 viel mehr MHC Klasse I Protein vorhanden ist, sowie weiter zum Golgi Apparat transportiert wurde. In beiden Neo Kontrollzellen sind nach 3 1/2 Stunden (Pulse und Chase) wenig neu synthetisierte MHC Moleküle identifizierbar. Die meisten identifizierbaren, neu synthetisierten MHC Moleküle befinden sich hier immer noch in ER. Um die Kinetik der MHC Klasse I Moleküle bei Neo Kontrollzellen besser untersuchen zu können, wurde im folgenden Experiment die 3-fache Menge an Neo Kontrollzellen eingesetzt.



**Abbildung 4. 17 Maturation von MHC Klasse I in 293 PHLDA1 und Neo Transfektanten (Pulse/Chase).**

Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen bei 293 PHLDA1 T2 und T3 und  $3 \times 10^6$  bei Neo T3 Kontrollzellen) wurden für 1 Stunde radioaktiv markiert (Pulse,  $125 \mu\text{Ci}/10^6$  Zellen von Met  $\text{S}^{35}$ /Cys  $\text{S}^{35}$  wie in Kap.3.5.1/3.5.2 beschrieben) und nach verschiedenen Chase Zeitfenstern (0 min.; 60 min.; 120 min. und 180 min.) lysiert. Nach der Zellyse folgte die Immunopräzipitation mit Protein A-Sepharose/W6/32 ( $\alpha$  HLA ABC), Endo H Verdau, die Trennung von IP im SDS PAGE (Kap.3.3.3). Die Gele wurden für 30 min. im Amplify-Reagenz inkubiert und darauf folgend das Gel getrocknet. Anschließend erfolgte eine Autoradiografie mit Film Exposition bei  $-80^\circ\text{C}$ .

In der Abbildung 4. 17 sind die Ergebnisse aus einem Versuch nach 1 Stunde Pulse und verschiedenen Chase Zeitfenstern dargestellt. Hieraus ist ersichtlich, dass bei beiden PHLDA1 Transfektanten nach 120 min. großteils und nach 180 min. alle, während der Pulse Zeitfenster radioaktivmarkierte (neu synthetisierte) MHC Klasse I Moleküle, aus dem ER weiter zum Golgi Apparat transportiert wurden. Im Gegensatz dazu wurde bei der Neo Tr3 Kontrollzelllinie nach 120 min. gerade einmal die Hälfte der radioaktivmarkierten (neu synthetisierten) MHC Klasse I aus dem ER weiter zum Golgi Apparat transportiert. Zusätzlich ist zwischen PHLDA1 Tr2 und Tr3 ein Unterschied im Transport zu erkennen. Für dieses Experiment wurde die 3-fache Menge an Neo 3 (N T3) Kontrollzellen eingesetzt, um einigermaßen identifizierbare Banden nach der Endo H Verdau zu bekommen. Während bei PHLDA1 Tr2 (PhT2) zum Zeitpunkt Null (d.h. 60 min. nach Anfang der Markierung) neu synthetisierte MHC Klasse I Moleküle zum größten Teil zum Golgi Apparat transportiert wurden, läuft der Transport von neu synthetisierten MHC Klasse I Molekülen bei PhT3 etwas langsamer ab. Zum Zeitpunkt Null sind hier überwiegend Endo H sensitive MHC Klasse I Moleküle in der Zelle vorhanden, welche sich noch im ER befinden. Erst 120 min. nach Anfang der Markierung werden diese MHC Klasse I Moleküle bei PHLDA1 Tr3 (PhT3) zum Golgi Apparat transportiert und damit Endo H resistent. Ähnliche Unterschiede in der Transport Rate zwischen PHLDA1 Tr.2 (PhTr2) und Neo Kontrollzellen (Neo 1 und Neo 3) sind in der Abbildung 4. 16 zu erkennen.

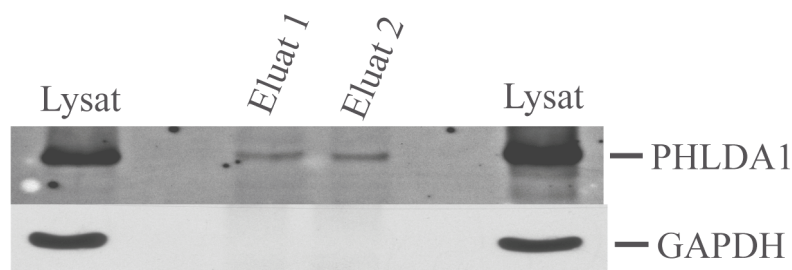
Vermutlich besitzen PHLDA1 Transfektanten mehr MHC Klasse I auf der Oberfläche, weil diese Zellen mehr neu synthetisierte MHC Klasse I aufweisen und diese Moleküle schneller aus den ER über den Golgi Apparat auf die Oberfläche transportieren können, als die Kontrollzellen, die kein PHLDA1 Protein konstitutiv exprimieren.

#### **4.4 PHLDA1 UND MHC KLASSE I KOIMMUNOPRÄZIPITATION**

Vorherige Experimente haben gezeigt, dass 293 PHLDA1 Transfektanten mehr MHC Klasse I auf der Zelloberfläche exprimieren als Neo Kontrollzellen. Weiter konnten bei verschiedenen Zeitpunkten mehr neu synthetisierte MHC Klasse I Moleküle in der Zelle in PHLDA1 Transfektanten als bei Neo Kontrollzellen detektiert werden. Deren Transport von ER zum Golgi Apparat ist in PHLDA1 Transfektanten schneller als bei Neo Kontrollzellen. An dieser Stelle stellt sich die Frage, ob die Möglichkeit besteht, dass das PHLDA1 Protein an das MHC Klasse I Molekül bindet und somit die MHC Klasse I während des Transports auf die Zelloberfläche stabilisiert. Wenn das der Fall wäre, müsste es theoretisch möglich



sein, nach einer MHC Klasse I Immunopräzipitation auch das PHLDA1 Protein in diesem Präzipitat nachzuweisen. Mit Hilfe von milden Detergenzien, wie z.B. Brij 96 in 1%iger Konzentration, die die schwache Protein-Protein Interaktionen nicht stören, konnten MHC Klasse I Moleküle, zusammen mit assoziierten Molekülen, präzipitiert werden. Falls, wie schon erwähnt, der PHLDA1 Protein mit dem MHC Klasse I Molekül in einer Zelle eine Protein-Protein Bindung eingeht, müsste auch PHLDA1 nach der W6/32 Immunopräzipitation mitpräzipitiert werden und somit im SDS PAGE mit  $\alpha$  PHLDA1 Antikörpern nachweisbar sein. In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse aus verschiedenen Immunopräzipitationen mit W6/32 Antikörpern in verschiedenen PHLDA1 Transfektanten sowie einer Melanomzelllinie, Mel Juso, dargestellt.

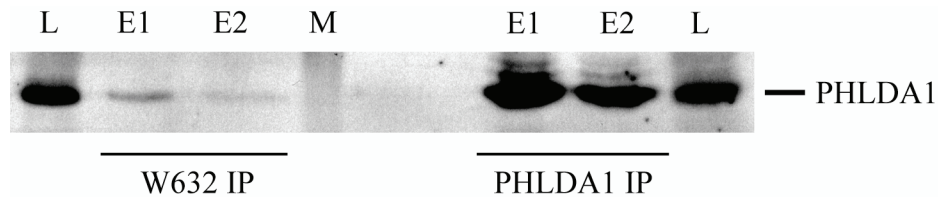


**Abbildung 4. 18 Koimmunopräzipitation von MHC Klasse I mit PHLDA1 in PHLDA1 Tr2 Zellen.**

Nach einer Zellyse von  $1 \times 10^6$  Zellen in  $500 \mu\text{l}$  1%-iger Brij 96 Lysepuffer, erfolgte Immunopräzipitation (IP) mit W6/32 (wie im 3.3.7 beschrieben), Elution (Eluat1: erste Elution; Eluat2: wiederholte Elution von der gleichen IP), die Trennung von IP im SDS PAGE, und Transfer auf die Membran. Anschließend folgte die Detektion mit  $\alpha$  PHLDA1 sowie  $\alpha$  GAPDH Antikörpern. Als sekundäre Antikörper wurden Kaninchen  $\alpha$  Maus mit Peroxidase konjugiert, eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden  $10 \mu\text{l}$  Zellysate auf das SDS PAGE aufgetragen. Im oben dargestellten Experiment sind 2 Lysat- Gelspuren zu erkennen: links im Bild wurde Lysat unmittelbar nach einer Zellyse aufgetragen, rechts im Bild wurde Lysat nach der Zellyse und anschließender Präzipitation aufgetragen. PHLDA1 läuft bei ca. 40 kDa und GAPDH bei 37 kDa.

Für dieses Experiment wurde das Seize X Protein A Kit von Pierce benutzt, wobei die, für die IP benötigten Antikörper (W6/32), irreversibel an Protein A Sepharose gebunden werden. Nach solch einer IP wurde nur das gebundene Antigen ohne Antikörper isoliert, auf SDS PAGE getrennt und auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Dadurch konnte erreicht werden, dass die Antikörper an Protein A/Sepharose gebunden bleiben und nicht in das Eluat abgegeben werden. Aus der Abbildung 4. 18 ist ersichtlich, dass bei 293 PHLDA1 Tr2 nach einer Immunopräzipitation mit W6/32 Antikörpern, welche für HLA A, B und C spezifisch sind, auch das PHLDA1 Protein mitpräzipitiert wurde. In den Geltaschen mit Bezeichnung Eluat 1 und 2 sowie Lysat, sind Banden bei ca. 40 kDa, des PHLDA1 Proteins, zu identifizieren. Als Spezifitätskontrolle wurde auch die Färbung mit  $\alpha$  GAPDH Antikörpern

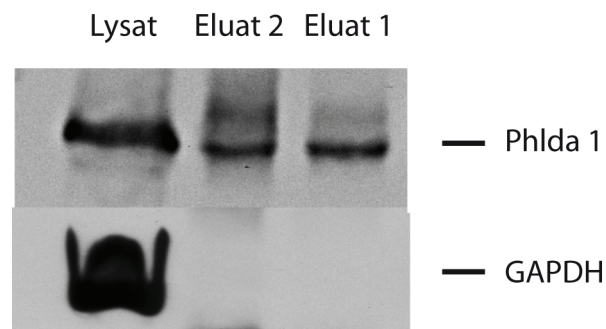
durchgeführt. Wie aus der Abbildung 4. 18 erkennbar, ist nur im Lysat und nicht im Eluat 1 und 2 eine GAPDH Bande zu erkennen. Das PHLDA1 Protein konnte im Eluat detektiert werden, nicht aber andere Proteine, wie z.B. GAPDH. Weiterhin wurden zwei voneinander unabhängige Immunopräzipitationen mit  $\alpha$  W6/32 und  $\alpha$  PHLDA1 Antikörpern mit PHLDA1 Tr3 durchgeführt und miteinander verglichen. Detektiert wurde in beiden Fällen mit  $\alpha$  PHLDA1 Antikörpern. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 4. 19 dargestellt.



**Abbildung 4. 19 PHLDA1 IP versus PHLDA1/MHC Klasse I KoIP in PHLDA1 Tr3 Zellen.**

Nach einer Zellyse von  $1 \times 10^6$  Zellen in  $500 \mu\text{l}$  1%-iger Brij 96 Lysepuffer, erfolgte die Koimmunopräzipitation mit  $\alpha$ W6/32 (KoIP) sowie Immunopräzipitation (IP) mit  $\alpha$  PHLDA1 Antikörpern (wie im 3.3.7 beschrieben). Nach der Elution (Eluat1:erste Elution; Eluat2: wiederholte Elution von der gleichen KoIP/IP) erfolgte die Trennung in 10%igen SDS PAGE, Transfer auf die Membran und anschließend die Detektion mit  $\alpha$  PHLDA1 Antikörpern. Als sekundäre Antikörper wurden Kaninchen  $\alpha$  Maus mit Peroxidase konjugiert, eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde  $10 \mu\text{l}$  Zellysate mit aufs SDS PAGE aufgetragen. PHLDA1 läuft bei ca. 40 kDa. (E1=Eluat1, E2= Eluat2, L=Lysat ).

Bei der PHLDA1 Immunopräzipitation in der Abbildung 4. 19 sind in den Eluatextraktionen 1 und 2 natürlich stärkere Banden zu sehen, da hier größere Mengen des PHLDA1 Proteins direkt über  $\alpha$  PHLDA1 Antikörper präzipitiert werden konnten. Bei der  $\alpha$  W6/32 Koimmunopräzipitation, links im Bild dargestellt, sind auf der gleiche Höhe schwächere Banden zu identifizieren. Hier wird PHLDA1 indirekt über die MHC Klasse I mitpräzipitiert und dadurch steht weniger PHLDA1 Protein für die Detektion zur Verfügung. Es stellte sich die Frage, ob das PHLDA1 Protein auch bei anderen Zelllinien mit einer natürlich starken PHLDA1 Expression wie z.B. der Zelllinie Mel Juso, über die  $\alpha$  MHC Klasse I Antikörper genauso gut mitpräzipitiert werden kann. Mel Juso Zellen wurden hierfür vor der Zellyse 18 Stunden mit PMA in der Zellkultur stimuliert.

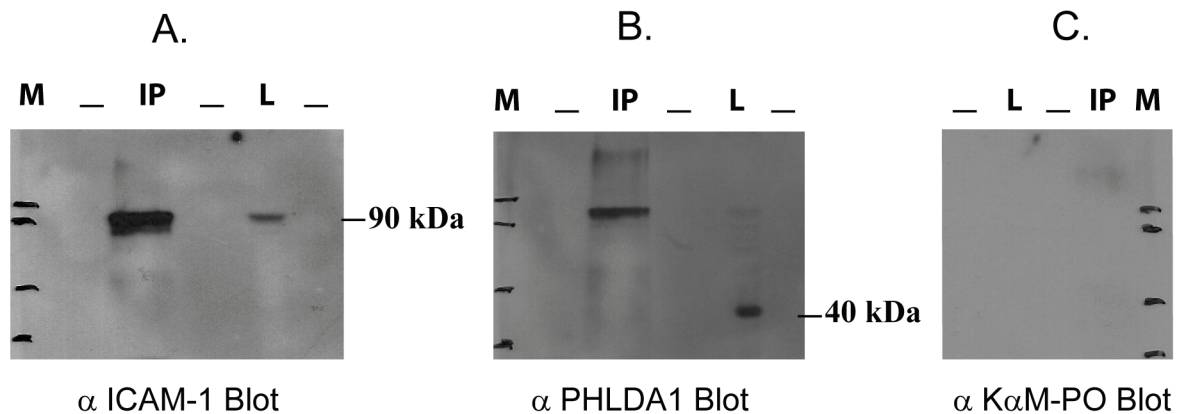


**Abbildung 4. 20 PHLDA1/MHC Klasse I Koimmunopräzipitation in Mel Juso.**

Nach einer Zelllyse von  $1 \times 10^6$  Zellen in  $500 \mu\text{l}$  1%-iger Brij 96 Lysepuffer, erfolgte Immunopräzipitation (IP) (wie im 3.3.7 beschrieben) mit  $\alpha$  W6/32 Antikörpern. Nach der Elution (Eluat1: erste Elution; Eluat2: wiederholte Elution von der gleichen IP) erfolgte eine Trennung im SDS PAGE, der Transfer auf die Membran und anschließend die Detektion mit  $\alpha$  PHLDA1 und  $\alpha$  GAPDH Antikörpern. Als sekundäre Antikörper wurden Kaninchen  $\alpha$  Maus mit Peroxidase konjugiert, eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden  $10 \mu\text{l}$  Zelllysat mit auf das SDS PAGE aufgetragen. Das PHLDA1 Protein läuft bei 40 kDa und das GAPDH Protein bei 37 kDa.

Wie in Abbildung 4. 20 zu sehen ist, konnte das PHLDA1 Protein auch in der Mel Juso Zelllinie nach einer Immunopräzipitation mit W6/32 Antikörpern welche spezifisch für HLA A, B und C Produkt sind, mitpräzipitiert werden. In den Geltaschen mit Bezeichnung Eluat 1 und 2 sowie Zelllysat sind PHLDA1 Banden bei ca. 40 kDa zu identifizieren. Als Spezifitätskontrolle wurde die Färbung mit GAPDH Antikörpern durchgeführt. Nur im Lysat und nicht den Eluaten 1 und 2 ist eine GAPDH Bande zu erkennen. Das weist daraufhin, dass das PHLDA1 Protein im Eluat detektiert werden konnte, nicht aber andere Proteine wie z.B. GAPDH. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass das PHLDA1 Protein irgendwelche unspezifischen Bindungen mit Protein A, Sepharose oder Ig Molekülen eingeht, wurden Kontroll-IP mit zwei weiteren Antikörpern  $\alpha$  ICAM-1 und  $\alpha$  MCAM (MUC 18) mit der Melanomzelllinie Mel Juso, welche bekanntlich beide Proteine exprimiert, durchgeführt. Um sicher zu stellen, dass genügend ICAM-1 für die IP in der Zelle vorhanden ist, wurden die Mel Juso Zellen für 18 Stunden in der Zellkultur mit PMA stimuliert. Nach der Zelllyse, IP, Elution, SDS PAGE sowie dem Transfer auf die Nitrozellulosemembran wurden diese Membranen mit verschiedenen Antikörpern einzeln detektiert. Die ICAM-1 Immunopräzipitation wurde mit folgenden Antikörpern detektiert:  $\alpha$  ICAM-1,  $\alpha$  PHLDA1 und alleine mit Kaninchen  $\alpha$  Maus konjugiert mit Peroxidase ( $\text{K}\alpha\text{MPO}$ ). Die MCAM Immunopräzipitation wurde mit  $\alpha$  MCAM,  $\alpha$  PHLDA1 und alleine mit  $\text{K}\alpha\text{MPO}$  detektiert. Die Ergebnisse sind in folgenden Abbildungen dargestellt.

## ICAM-1 Immunopräzipitation

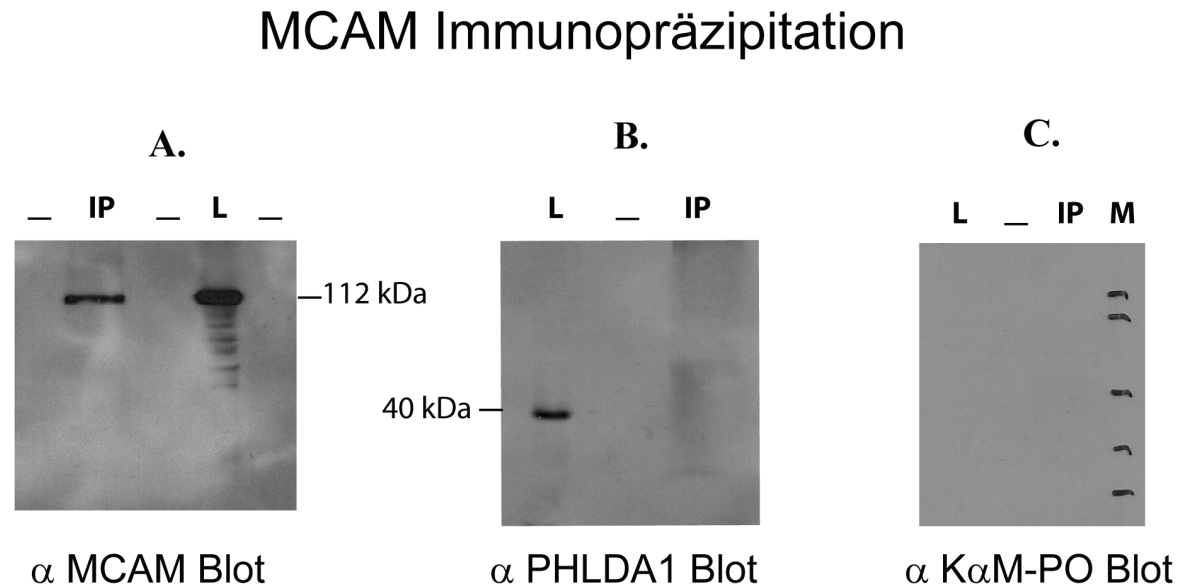


**Abbildung 4. 21 Immunopräzipitation mit spezifischen  $\alpha$  ICAM-1 Antikörpern in MEL JU50.**

Nach einer Zelllyse von  $1 \times 10^6$  Zellen in 500  $\mu$ l 1%-iger Brij 96 Lysepuffer, erfolgte Immunopräzipitation (IP) (wie im 3.3.7 beschrieben) mit spezifischen  $\alpha$  ICAM-1 Antikörpern. Nach der Elution von Präzipitat (IP) erfolgte die Trennung in 10%iges SDS PAGE sowie der Transfer auf die Nitrozellulosemembran. Anschließend wurde mit folgenden Antikörpern,  $\alpha$  ICAM-1 (A.),  $\alpha$  PHLDA1 (B.) und Kaninchen  $\alpha$  Maus, konjugiert mit Peroxidase (C.; K $\alpha$ M-PO), geblotet. Als zweite Antikörper wurden Kaninchen  $\alpha$  Maus, konjugiert mit Peroxidase, eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden 10  $\mu$ l Zellysate (ohne Immunopräzipitation) auf das SDS PAGE aufgetragen. ICAM-1 läuft bei 90 kDa und PHLDA1 bei 40 kDa. (M=Proteinmarker; IP=Eluat von der Immunopräzipitation; L=Zellysate).

Nach der Immunopräzipitation bei der Melanomzelllinie Mel Juso mit spezifischen  $\alpha$  ICAM-1 Antikörpern ist das ICAM-1 Protein wie erwartet im Eluat, hier bezeichnet als IP, sowie auch im Zellysate (L) eindeutig identifizierbar (Abbildung 4. 21/A.). Um Antikörperkomplexe der ersten  $\alpha$  ICAM-1 Färbung von der Membran zu entfernen, wurde diese Membran im Stripping Puffer inkubiert (siehe Methoden). Anschließend wurde diese Membran mit weiteren  $\alpha$  PHLDA1 Antikörpern detektiert. Aus dem mittleren Bild in der Abbildung 4. 21 unter B. ist zu erkennen, dass das PHLDA1 Protein auf der Höhe von 40 kDa nur im Zellysate und nicht im Eluat (IP) nachweisbar ist. Im Eluat (IP) ist hier die ICAM-1 90 kDa Bande immer noch erkennbar, was man mit viel Antigen auf der Nitrozellulosemembran und einer nicht optimalen Antikörperkomplex-Entfernung durch den Stripping-Vorgang der vorherigen Färbung erklären könnte. Um sicher zu stellen, dass es auch bei den zweiten K $\alpha$ MPO Antikörpern zu keinen unspezifischen Bindungen, wurde ein weiteres Membranstück mit absolut identischen Proben aus der gleichen Immunopräzipitation nur mit dem zweiten Antikörper detektiert. Aus dem rechten Bild in der unteren Abbildung 4. 21/C. dargestellt, ist eindeutig zu erkennen, dass es zu keinen unspezifischen Bindungen bei den K $\alpha$ MPO Antikörpern kommt. Es sind keine Banden zu erkennen.

Eine weitere Kontroll-Immunopräzipitation mit  $\alpha$  MCAM Antikörpern kann diese Ergebnisse bestätigen. In der Abbildung 4. 22 sind die Ergebnisse nach einer spezifischen  $\alpha$  MCAM IP dargestellt.



**Abbildung 4. 22 Immunopräzipitation mit spezifischen  $\alpha$  MCAM Antikörpern in Mel Juso.**

Nach einer Zelllyse von  $1 \times 10^6$  Zellen in  $500 \mu\text{l}$  1%-iger Brij 96 Lysepuffer, erfolgte Immunopräzipitation (IP) (wie im 3.3.7 beschrieben) mit spezifischen  $\alpha$  MCAM Antikörpern. Nach der Elution von Präzipitat (IP) erfolgte die Trennung in 10%iges SDS PAGE, Transfer auf die Nitrozellulosemembran. Anschließend wurde mit folgenden Antikörpern,  $\alpha$  MCAM (A.),  $\alpha$  PHLDA1 (B.) und Kaninchen  $\alpha$  Maus konjugiert mit Peroxidase (C.; K $\alpha$ M-PO) geblotet. Als zweite Antikörper wurden Kaninchen  $\alpha$  Maus konjugiert mit Peroxidase eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden  $10 \mu\text{l}$  Zelllysate (ohne Immunopräzipitation) auf das SDS PAGE aufgetragen. MCAM läuft bei 112 kDa und PHLDA1 bei 40 kDa. (M=Proteinmarker; IP=Immunopräzipitat nach der Elution; L=Zelllysate).

Aus der oben dargestellten Abbildung 4. 22 unter A. ist zu erkennen, dass nach der Immunopräzipitation mit spezifischen  $\alpha$  MCAM Antikörpern in der Zelllinie Mel Juso das MCAM Protein auf der Höhe von 112 kDa, wie erwartet, im Eluat (IP) und im Zelllysate (L) eindeutig identifizierbar ist. Nach einer  $\alpha$  PHLDA1 Antikörper Detektion konnte das PHLDA1 Protein nur im Zelllysate und nicht im Eluat nachgewiesen werden, was aus der Abbildung 4. 22 unter B. zu erkennen ist. Um sicher zu stellen, dass es auch hier zu keinen unspezifischen Bindungen bei den zweiten K $\alpha$ MPO Antikörpern kommt, wurde die Membran alleine mit dem zweiten Antikörper detektiert. In der Abbildung 4. 22 unter C. ist eindeutig zu erkennen, dass es zu keinen unspezifischen Bindungen bei den K $\alpha$ MPO Antikörpern kommt. Es sind keine Banden zu erkennen.

Zusammenfassend konnte das PHLDA1 Protein in verschiedenen Zelllinien mit MHC Klasse I Molekülen präzipitiert werden: 293 konstitutiv PHLDA1 exprimierenden Transfektanten sowie in Mel Juso mit einer natürlichen PHLDA1 Expression. Mit anderen Antikörpern, welche gegen ICAM-1 und MCAM gerichtet sind, war PHLDA1 nicht mitpräzipitierbar. Es ist durchaus vorstellbar, dass das PHLDA1 Protein an die MHC Klasse I Moleküle in der Zelle bindet und diese stabilisiert oder dadurch ihren Transport auf die Zelloberfläche begünstigt.

#### 4.5 EINFLUSS DER KONSTITUTIVEN PHLDA1 EXPRESSION AUF DIE ERKENNUNG DURCH CD8<sup>+</sup> T ZELLEN

Die PHLDA1 exprimierenden 293 Transfektanten zeigen eine höhere MHC Klasse I Oberfläche Expression als die 293 Neo Kontrollzellen. Um zu prüfen, ob die erhöhte MHC Klasse I mit einer besseren Erkennung von antigenspezifischen T-Zellen assoziiert ist, wurden die PHLDA1 Transfektanten und die Neo Kontrollzellen mit alloreaktiven T-Zellen inkubiert. Die in diesem Experiment eingesetzte T-Zelllinie, JB4 A3910 genannt, erkennt das HLA A2 Allelprodukt unabhängig von seinem HLA Subtyp oder dem gebundenen Peptid. Solche T-Zellen werden als alloreaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen bezeichnet. Bei einer Erkennung von HLA A2, proliferieren diese T-Zellen und produzieren INF  $\gamma$ . Dabei freigesetztes INF  $\gamma$  wurde mit Hilfe der Elisa Methode gemessen. In der Abbildung 4. 23 ist das Prinzip dieses Experiments vereinfacht schematisch dargestellt.

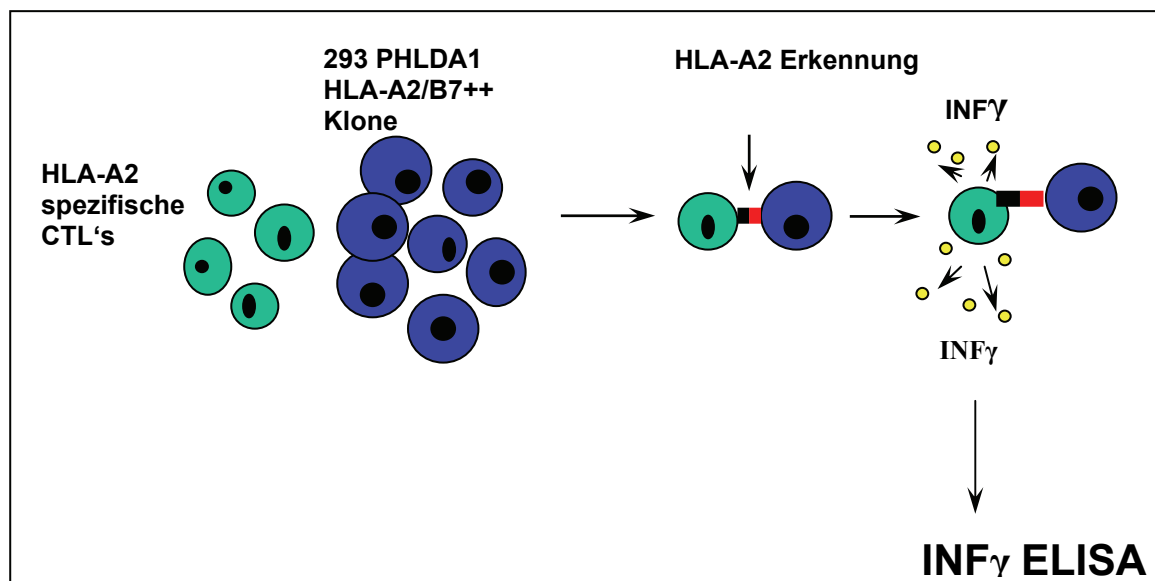
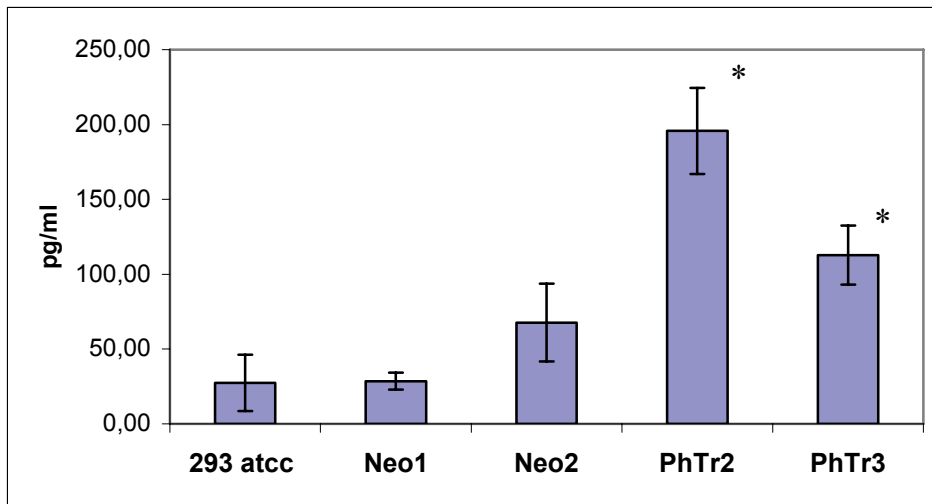


Abbildung 4. 23 Schematische Darstellung der CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Erkennung.

Nach einer gemeinsamen, zwanzigstündigen Inkubation von 15.000 PHLDA1 Transfektanten oder Kontrollzellen zusammen mit 3000 alloreaktiven T-Zellen, wurde die Menge von freigesetzten INF  $\gamma$  in dem Medium-Überstand mit Hilfe der Elisa Methode ermittelt. In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse aus einem repräsentativen Experiment zusammengefasst.



**Abbildung 4. 24 Erkennung von 293 PHLDA1 Transfektanten und Kontrollzellen von HLA A2 spezifischen alloreaktiven T-Zellen.**

Gezeigt ist die pg/ml IFN  $\gamma$  Ausschüttung in Überstand nach 20 Stunden Inkubation von Neo Kontrollen oder PHLDA1 Transfektanten mit alloreaktiven T-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Duplikaten mit Standardabweichung. 293 atcc stellt die nicht transfizierten, parentalen Zellen dar, Neo Kontrollzellen sind als Neo 1 und Neo 2 und PHLDA1 Tr. als PhTr2 und PhTr3 bezeichnet. Eine Analyse von IFN  $\gamma$  Ergebnissen im T Test bei unabhängigen Stichproben mit Hilfe des SPSS Programms, zeigte einen Signifikanzwert von  $p=0.02$  (signifikant\*) bei PHLDA1 Transfektante 2 und  $p=0.047$  (signifikant\*) bei PHLDA1 Transfektante 3 im Vergleich zu 293 atcc. Neo Kontrollzelllinien zeigten vergleichbar ähnliche Werte wie die 293 ATCC Zelllinie (Neo 1  $p=0.943$ , ist nicht anders als 293 sowie Neo 2  $p=0.218$ , nicht anders als 293).

Aus diesen Ergebnissen in der Abbildung 4. 24 ist erkennbar, dass JB4 T-Zellen nach einer Stimulation mit den Zellen den PHLDA1 Transfektanten 2 und 3 signifikant mehr IFN $\gamma$  produzieren als die 293 atcc, die untransfizierten Ausgangszellen. IFN $\gamma$  Produktion nach der Stimulation mit Neo Kontrollzellen, Neo 1 und Neo 2, ist nicht signifikant höher als bei einer Stimulation mit untransfizierten 293 Zellen. Die beobachtete erhöhte MHC Klasse I Expression auf der Oberfläche bei PHLDA1 Transfektanten könnte eine Auswirkung auf die CD8 T Zellerkennung haben.



## 5 DISKUSSION

Das PHLDA1 (*pleckstrin homology-like domain family A member 1*) ist ein induzierbares zytoplasmatisches Protein, welches einige Motive, die für die Vermittlung von Protein-Protein Interaktionen bekannt sind (Polyglutaminbereich auch M- oder *opa*-repeat genannt, SH3-Bindedomäne, potentielle Phosphorylierungsstelle der Proteinkinase C, Pleckstrin ähnliche Domänen), enthält.

Humane PHLDA1 wurde auf der Suche nach Molekülen, die im Metastasierungsprozess bei der Melanomentwicklung involviert sind, identifiziert. Immunhistochemisch zeigten Haut und Lymphknoten keine PHLDA1 Expression. Dagegen ist dessen Expression in melanozytären Läsionen entweder kontinuierlich induziert oder wird durch eine veränderte Regulation konstitutiv exprimiert, wie z.B. in den benignen melanozytären Naevi, welche für PHLDA1 stark positiv sind. Die PHLDA1 Expression wird während der Tumorprogression des humanen Melanoms vom Primärtumor bis hin zur Metastase herunterreguliert (Neef et al, 2002). Auch in Mammakarzinom, im Vergleich zum normalen Mammagewebe, ist PHLDA1 stark herunter reguliert. Die herabgesetzte Expression von PHLDA1 in Mammakarzinomen korrelierte stark mit einer schlechten Prognose. Gene, die während der Tumorigenese oder des Metastasierungsprozesses in ihrer Expression herunterreguliert oder mutiert werden, sind möglicherweise Tumorsuppressorgene. Vermutlich handelt es sich hier bei PHLDA1 auch um ein Tumorsuppressorgen.

Die Entwicklung einer Resistenz gegenüber der Apoptose ist eine der wichtigsten Eigenschaften, die maligne Zellen erwerben müssen, um trotz Apoptose induzierender Signale und fehlender Überlebenssignale, selbst zu überleben (Hanahan and Weinberg, 2000). In mehreren Systemen scheint PHLDA1 als proapoptotisches Molekül zu fungieren. In dem murinen Modellsystem mit einer T-Zell Hybridomzelllinie konnte gezeigt werden, dass die PHLDA1 Expression bei der T-Zell-Rezeptor vermittelten Apoptose für die Fas-Induktion nötig ist (Park et al, 1996). Hayashida und Mitarbeiter fanden 2006 heraus, dass HSF1 (major heat shock transkription factor 1) den programmierten Zelltod von männlichen Keimzellen, *in vivo*, direkt über das PHLDA1 einleiten kann und dass PHLDA1 für die Hochregulation von Fas notwendig ist. Dagegen konnte bei der Differenzierung neuronaler Zellen bei Ratten keine Korrelation zwischen der PHLDA1 Expression und der Fas-Induktion beobachtet werden (Gomes et al, 1999). Auch bei PHLDA1 konstitutiv exprimierenden Transfektanten,

die eine 2,5- bis 8-fach höhere basale Apoptoserate besaßen und eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber dem Chemotherapeutikum Doxorubicin im Vergleich zu den Neo Kontrollzellen zeigten, ist die Fas Expression nicht hoch reguliert (Neef et al, 2002). Des Weiteren war bei den untersuchten humanen Geweben die Fas Expression nicht von der PHLDA1 Expression abhängig. Der Mechanismus, der über das PHLDA1 Einfluss auf die Apoptose ausübt, ist noch nicht bekannt. Es konnte sogar gezeigt werden, dass PHLDA1 mit IGF I (insulin-like growth factor I) als ein antiapoptotisches Molekül fungiert und dass IGF I die Expression von PHLDA1 in NIH-3T3 Zellen steigert (Toyoshima et al, 2004).

Zusätzlich zu einer erhöhten Apoptose Empfindlichkeit weisen stabile 293 PHLDA1 Transfektanten eine höhere MHC Klasse I Oberflächenexpression im Vergleich zu den Neo Kontrollzellen auf. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Eigenschaft der PHLDA1 exprimierenden Zellen genauer untersucht.

Nach der Färbung mit monoklonalen W6/32 Antikörpern, welche alle HLA A, B und C Allele erkennen, zeigten alle PHLDA1 Transfektanten eine höhere MHC Klasse I Expression als die entsprechenden Neo Kontrollzellen. Auch die Oberflächenfärbung mit anderen monoklonalen Antikörpern wie MB40.5, welche auch alle HLA A, B, C Produkte erkennen, als auch  $\alpha$   $\beta$  2 Mikroglobulin, welches zusammen mit den MHC Klasse I exprimiert wird, bestätigten die Ergebnisse von der W6/32 Oberflächenfärbung (siehe Abschnitt 4.2.2). Allelspezifische Antikörper gegen HLA A2 und HLA B7 zeigten auch eine hohe Expression auf den PHLDA1 Transfektanten. Nicht nur die Oberflächenexpression sondern auch die gesamte HLA A2 und HLA B7 Proteinexpression, gemessen mit Hilfe IEF und Western Blot, war erhöht besonders in PHLDA1 Tr2 und Tr3. (Abbildung 4.8). Durch real time PCR mit HLA A2 und HLA B7 spezifischen Primern konnte kein Unterschied zwischen PHLDA1 und Neo Kontrollzellen in der HLA Expression auf der mRNA Expressionsebene festgestellt werden. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass der Unterschied in der MHC Klasse I Expression bei PHLDA1 und den Neo Kontrollzellen in dem MHC Klasse I Transport oder in der MHC Klasse I Proteinsynthese liegen. Um die Biosynthese von MHC Klasse I Molekülen näher zu untersuchen, wurden 2 PHLDA1 und 2 Neo Transfektanten mit radioaktiven Aminosäuren kultiviert. Nach einer 3-stündigen Inkubation, unter gleichen Zellkulturbedingungen, weisen PHLDA1 Transfektanten 4,5- bis 8,5-fach mehr neu synthetisierte MHC Klasse I Moleküle im Vergleich zu den Kontrollzellen auf. Gleichzeitig zeigten alle vier Transfektanten eine vergleichbar gleiche Menge an neu synthetisiertem Actin (siehe Abschnitt 4.3.3). Es ist noch nicht klar, ob dieser Effekt durch eine höhere Syntheserate oder durch eine erhöhte Stabilität

(d.h. weniger Abbau) von MHC Klasse I Molekülen bei PHLDA1 Transfektanten hervorgerufen wird.

Auf die Frage, ob es Unterschiede zwischen Neo Kontrollzellen und PHLDA1 Transfektanten im Transport von MHC Klasse I auf die Zelloberfläche gibt, konnte eine weitere Methode, die so genannte Pulse/Chase, einen Einblick geben. Die MHC Klasse I Moleküle in ER tragen high mannose Kohlenhydratketten. Diese Moleküle sind empfindlich für den Endoglycosidase H Verdau und werden als Endo H sensitiv bezeichnet. Die MHC Klasse I Moleküle, welche schon zum Golgi Apparat transportiert wurden, sind nicht mehr durch Endoglycosidase H spaltbar und werden als Endo H resistent bezeichnet. Die immunopräzipitierten MHC Klasse I Moleküle wurden mit dem Enzym Endoglycosidase H verdaut und im SDS PAGE analysiert. Anhand der Größe, die diese Moleküle anschließend aufweisen, können sie dem ER oder dem Golgi Apparat zugeteilt werden. PHLDA1 Transfektanten zeigten, im Vergleich zu Neo Kontrollzellen, einen schnelleren MHC Klasse I Transport vom ER zum Golgi Apparat, da alle neu synthetisierten MHC Klasse I Moleküle bei PHLDA1 Transfektanten nach 120 bis 180 Minuten zum Golgi Apparat transportiert wurden. Dagegen bleibt bei den Neo Kontrollen etwa die Hälfte der MHC Klasse I Moleküle während dieser Zeit noch im ER (siehe Abschnitt 4.3.4). Durch die Immunopräzipitation der MHC Klasse I Moleküle mit W6/32 Antikörpern unter schonenden Bedingungen, welche die schwachen Protein-Protein Bindungen nicht stören, konnte das PHLDA1 Protein mitpräzipitiert werden, was man durch Western Blot mit  $\alpha$  PHLDA1 Antikörpern nachweisen konnte (siehe Abschnitt 4.4). Andere Proteine, wie z.B. das GAPDH Protein, waren nicht mit den MHC Klasse I mitpräzipitiert (Abbildungen 4.18 und 4.20). Das PHLDA1 wurde nicht mit ICAM-1 und MCAM mitpräzipitiert, was die Vermutung über eine spezifische Bindung von PHLDA1 an MHC Klasse I unterstützt (Abbildungen 4.21 und 4.22).

Die MHC Klasse I Synthese im ER ist ein komplexer Vorgang und von verschiedenen Hilfsproteinen, Chaperone genannt, abhängig. Die MHC Klasse I Schwere Kette assoziiert schon während der Synthese im ER mit Calnexin und BiP, welche sich nach der Bindung von  $\beta$ 2 Mikroglobulin abspalten. Mit Hilfe weiterer Chaperone (ERp57, Calreticulin und Tapasin) erfolgt die Bindung von MHC Klasse I  $\alpha$ Kette/ $\beta$ 2m an den TAP Komplex im ER und es kommt zur Peptidbeladung. Nach einer erfolgreichen Beladung mit einem Peptid verlässt der MHC Klasse I Komplex das ER und gelangt mittels vesikulärem Transport über den Golgi Apparat auf die Zelloberfläche. Die Oberflächenexpression von MHC Klasse I ist entscheidend für die stabile Integration eines Peptids in der Bindungsgrube des MHC Moleküls. Für den Fall, dass die Bindung nicht stabil genug ist, verschwindet der

MHC/Peptid Komplex von der Zelloberfläche. Hoch affine Peptid/MHC Komplexe haben eine größere Stabilität und bleiben länger auf der Zelloberfläche präsent. Die präsentierte Ergebnisse sprechen dafür, dass PHLDA1 eine Rolle als Chaperon in der MHC Klasse I Synthese ausübt. Warum die Transfektion von PHLDA1 neben so vielen anderen Chaperone zu einer höheren MHC Klasse I Oberflächenexpression führt, ist nicht klar.

Die 293 Nierenepithelzelllinie ist mit dem Adenovirus *E1a* und *E1b* Genen transformiert (Whittaker et al, 1986). Für das Adenovirus E3 DNA Segment ist bekannt, dass dessen Genprodukt gp19 an die MHC Klasse I Moleküle bindet und dadurch deren Transport aus dem ER hemmt (Routes and Cook, 1990). Die Zellen der 293 Nierenepithelzelllinie besitzen aber nicht dieses Adenovirus E3 DNA Segment, sondern nur Adenovirus E1a und E1b DNA Segmente. Grand et al. (1987) konnte zeigen, dass nach einer Adenovirus 5 *E1a* und *E1b* Gen Transformation in die humane Zellen die MHC Klasse I Expression herunter reguliert worden war. Wie Adenovirus 5 *E1a* und *E1b* Gene zu einer MHC Klasse I Unterregulierung führen, ist unbekannt. Es ist durchaus möglich, dass das PHLDA1 Protein in den konstitutiv exprimierenden PHLDA1 Transfektanten diesen Effekt von Adenovirus *E1a* und *E1b* Genen aufhebt.

Insgesamt lassen die Struktur und die Motive vermuten, dass es sich bei PHLDA1 um ein Molekül handelt, das Protein-Protein Interaktionen eingehen kann. Die Koimmunopräzipitation vom PHLDA1 Protein mit  $\alpha$  HLA A,B,C Antikörpern bestätigt die Vermutung, dass das PHLDA1 Protein mit der MHC Klasse I im Zytoplasma eine Protein-Protein Bindung eingeht. Ob andere Chaperone beteiligt sind und in welchem Stadium diese Interaktion stattfindet, ist noch unklar. Aber eines steht fest: Das PHLDA1 Protein begünstigt auf irgendeine Art und Weise die Synthese und die Reifung von MHC Klasse I in den konstitutiv PHLDA1 exprimierenden Transfektanten, welche aus 293 Nierenepithelzellen hergestellt wurden. Auch in anderen Systemen gibt es Hinweise, dass PHLDA1 andere Proteine binden kann. Drei verschiedene Proteine, die mit der Regulation der Translation assoziiert sind, konnten mit PHLDA1 kopräzipitiert werden: das ribosomale Protein L14 und die mRNA-bindenden Proteine eIF3-p66 sowie iPABP (**i**nducible **p**oly(**A**) **b**inding **p**rotein; Hinz et al, 2001). Weiter konnten Hayashida und Mitarbeiter die Bindung des PHLDA1 Proteins an die Hsp110, Hsp70 und Hsp 40 Proteine zeigen. Diese Bindung ist durch N-Terminus von PHLDA1 (**p**lekstrin **h**omologie like Domäne) vermittelt. Obwohl PHLDA1 als apoptoseassoziiertes Genprodukt identifiziert wurde, bleibt der Mechanismus noch unbekannt. Die Tatsache, dass PHLDA1 die anderen Moleküle binden kann, lässt uns

vermuten, dass es sich hier um ein regulatorisches Molekül handelt, das die Expression und die Funktion von verschiedenen Proteinen beeinflussen kann.

Die Analysen der klonierten PHLDA1 Transfektanten in unserem Labor ergaben ein langsames Wachstum der PHLDA1 Transfektanten im Vergleich zu den Neo Kontrollzelllinien, zusätzlich eine reduzierte Klonierungseffizienz sowie ein reduziertes Vermögen Kolonien zu bilden. Des Weiteren zeigten die PHLDA1 Transfektanten beim Wachstum eine verstärkte Kontaktinhibition. Diese Beobachtungen von Neef et al. (2002) könnten eine Erklärung dafür geben, warum das Melanom oder Mammakarzinom während seiner Progression die PHLDA1 Expression reduziert, denn der Tumor kann mit weniger PHLDA1 besser wachsen. Zusätzlich ist der Tumor während des Wachstums unabhängiger von Zell-Zell Kontakten, über die normalerweise antiapoptotische Signale vermittelt werden. Möglicherweise sind alle diese Eigenschaften auf die proapoptotische Funktion des PHLDA1 zurück zu führen.

Die hohe PHLDA1 Proteinmenge in den melanozytären Naevi sowie die Resultate der funktionellen Studien mit den PHLDA1 Transfektanten lassen vermuten, dass PHLDA1 für den benignen Charakter der Naevi mitverantwortlich sein könnte. Normale Melanozyten liegen als einzelne Zellen in der Epidermis vor und haben dabei einen engen Kontakt zu den Keratinozyten, von denen sie auch wachstumshemmende Signale bekommen (Johnson, 1999). Im Gegensatz dazu treten die Melanozyten sowohl in Naevi als auch in Melanomen als Zellkluster auf, wodurch sie nicht mehr der Proliferationsregulation durch die Keratinozyten unterliegen. Dennoch sind Naevi durch ihr streng begrenztes Wachstum und ihre hohe Apoptoserate als gutartige Läsionen bekannt (Mancianti et al, 1993; Sprecher et al, 1999). PHLDA1 könnte demnach die Aufgabe der Keratinozyten, die Apoptosevermittlung sowie die Wachstumsregulation, übernehmen. Wenn dann im weiteren Verlauf der Tumorprogression die PHLDA1 Expression herunterreguliert wird, verliert der Naevus seine gutartigen Eigenschaften und differenziert zum malignen Melanom.

Bisher konnte beobachtet werden, dass viele Tumorzellen eine geringe Dichte an präsentierenden HLA Klasse I Molekülen aufweisen. Häufige Ursachen dafür könnten in den mutierten Proteinen des Antigenprozessierungsweges, als auch in der gestörten Biosynthese des MHC Proteins selbst oder des  $\beta 2$  Mikroglobulins gefunden werden. Weiterhin konnte der Verlust einzelner Allelprodukte bis zum vollständigen Verlust aller MHC Klasse I Moleküle beobachtet werden. Alle diese Prozesse führen zur einer gestörten Expression des MHC/Peptidkomplexes auf der Zelloberfläche, was wiederum zur einer schlechten Antigenpräsentation führt. Eine schlechte Antigenpräsentation führt weiterhin zu einer

schlechten oder fehlenden T-Zell Erkennung wodurch die Beseitigung von Tumorzellen durch das Immunsystem erschwert ist (Ferrone and Marincola, 1995; Garrido et al, 1997; Garrido and Algarra, 2001; Seliger et al, 2002; Paschen et al, 2003). Hier konnte gezeigt werden, dass eine konstitutive Expression vom PHLDA1 Protein in der 293 Nierenepithelzelllinie die MHC Klasse I Expression auf der Zelloberfläche begünstigt, was für eine gute Antigenpräsentation von Vorteil sein könnte. Tatsächlich wurden die PHLDA1 Transfektanten von den HLA A2 spezifischen CD8 T-Zellen besser als Neo Kontrollzellen erkannt (siehe Abschnitt 4.5). Eventuell führt die Unterregulierung von PHLDA1 in den Melanomen und Mammakarzinomen nicht nur zum Verlust von wachstumssupprimierenden Eigenschaften und der Apoptose Empfindlichkeit, sondern auch zu einem Verlust der CD8 T-Zellerkennung.

Bisherige Chemotherapien haben bei der Behandlung von Melanomen nur geringe Erfolge erzielt, da die verwendeten Chemotherapeutika in den Tumoren normalerweise Apoptose induzieren und gerade Melanome häufig Mutationen in den Apoptoseassoziierten Molekülen zeigen (Serrone and Hersey, 1999). Der Mechanismus, über den das PHLDA1 Protein Apoptose vermittelt, ist noch nicht eindeutig geklärt. Dennoch ist das PHLDA1 durch seine ubiquitäre Expression und Induzierbarkeit ein interessantes Zielgen für die Entwicklung neuer Antitumorthérapien beim Melanom.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Das PHLDA1 (*pleckstrin homology-like domain family A member 1*) ist ein induzierbares zytoplasmatisches Protein, das einige Motive, die für die Vermittlung von Protein-Protein Interaktionen bekannt sind, enthält. Die PHLDA1 ist stark in gutartigen melanozytären Läsionen (Naevi) exprimiert und wird während der Tumorprogression des humanen Melanoms vom Primärtumor bis hin zur Metastase herunterreguliert. Auch im Mammakarzinom, im Vergleich zu normalen Mammagewebe, ist das PHLDA1 Protein und die mRNA stark herunterreguliert. In diesen Tumoren ist der Verlust von PHLDA1 mit einer schlechten Prognose korreliert. Das PHLDA1 Protein scheint als ein proapoptotisches Molekül zu fungieren. Das Mechanismus ist allerdings noch nicht bekannt. In manchen Modellsystemen ist PHLDA1 für die Fas-Induktion nötig und in anderen wieder nicht. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die 293 PHLDA1 Transfektanten zusätzlich zu einer erhöhten Apoptose Empfindlichkeit auch eine höhere MHC Klasse I Oberflächenexpression im Vergleich zu Neo Kontrollzellen aufweisen. Das konnte mit mehreren monoklonalen Antikörpern, gegen HLA A,B,C und  $\beta 2$  Mikroglobulin, bestätigt werden. Die allelspezifische HLA A2 und HLA B7 Expression auf der Zelloberfläche, im Vergleich zu den Kontrollzellen, war bei PHLDA1 Transfektanten höher. Auch mittels IEF, konnte auf der gesamten Proteinebene, bei zwei PHLDA1 Transfektanten eine höhere Expression der Allelprodukte HLA A2 und HLA B7 bestätigt werden. Auf der mRNA Expressionsebene für die Allele HLA A2 und HLA B7 wurde mit Hilfe der real time PCR kein Unterschied zwischen PHLDA1 und den Neo Kontrollzellen festgestellt. Nach einer 3-stündigen Inkubation mit radioaktivmarkierten Aminosäuren weisen die PHLDA1 Transfektanten 4,5- bis 8,5-fach mehr neu synthetisierte MHC Klasse I Moleküle, im Vergleich zu den Kontrollzellen, auf. Gleichzeitig war die Menge an neu synthetisierten  $\beta$  Actin in allen untersuchten Zelllinien vergleichbar. Mit Hilfe der Pulse/Chase Methode konnte gezeigt werden, dass PHLDA1 Transfektanten, im Vergleich zu den Neo Kontrollzellen, einen schnelleren MHC Klasse I Transport vom ER zum Golgi Apparat aufweisen. Während sich bei den Neo Kontrollzellen etwa die Hälfte der neu synthetisierten MHC Klasse I Moleküle immer noch im endoplasmatischen Retikulum befanden, waren bei den PHLDA1 Transfektanten alle neu synthetisierten MHC Klasse I Moleküle nach 120 bis 180 Minuten zum Golgi Apparat transportiert worden. Durch die Immunopräzipitation von MHC Klasse I Molekülen, unter

schonenden Bedingungen, um die schwachen Protein-Protein Bindungen nicht zu stören, konnte auch das PHLDA1 Protein mitpräzipitiert werden. Andere Proteine wie z.B. das GAPDH Protein wurde dabei nicht mitpräzipitiert. Das PHLDA1 Protein war nicht mit ICAM-1 oder MCAM mitpräzipitiert, was eine spezifische Bindung des PHLDA1 Proteins an die MHC Klasse I bestätigt. Es ist denkbar, dass das PHLDA1 Protein als Chaperon fungiert und durch die Bindung an die MHC Klasse I Moleküle diesen eine höhere Stabilität verleiht. Dadurch können die MHC Klasse I Moleküle schneller an die Oberfläche transportiert werden. PHLDA1 Transfektanten wurden von HLA A2 allospezifischen T-Zellen besser als die Neo Kontrollzellen erkannt. So könnte der Verlust des PHLDA1 Proteins bei Melanomen und Mammakarzinomen auch zum Verlust der T-Zellerkennung beitragen.



## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abdulla FR, Feldmann SR, Williford PM, Krowchuk D, Kaur M. (2005). Tanning and Skin Cancer. *Pediatric Dermatol*, 22: 501-512.
- Adams JM and Cory S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 281, 1322-1326.
- Ackerman und Cresswell. (2003). Regulation of MHC Class I Transport in Human Dendritic Cells and the Dendritik-Like Cell Line KG-1. *The Journal of Immunology*, 170:4178-4188.
- Albino, AP, Vidal MJ, McNutt NS, Shea CR, Prieto VG, Nanus DM, Palmer JM and Hayward NK. (1994). Mutation and expression of the p53 gene in human malignant melanoma. *Melanoma Res*, 4: 35-45.
- Aoudjit F and Vuori K. (2001). Matrix attachment regulates Fas-induced apoptosis in endothelial cells: a role for c-flip and implications for anoikis. *J. Cell. Biol.* 152: 633-643
- Ashkenazi A and Dixit VM. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281: 1305-1308.
- Ashkenazi A and Dixit VM. (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr. Opin. Cell. Biol*, 11: 255-260.
- Bachmann F, Buechner SA, Wernli M, Strebel S and Erb P. (2001). Ultraviolet light downregulates CD95 ligand and TRAIL receptor expression facilitating actinic keratosis and squamous cell carcinoma formation. *J. Invest. Dermatol*, 117: 59-66.
- Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, Zhang Y, Liu PY, Lymor GH, Morakito A, Urist M, Mc Musters KM, Ross MI, Kirkwooh JM, Atkins MB, Thompson JA, Ciol DG, Byrd D, Desmond R. (2001). Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol*, 19: 3622-3634.
- Barnstable CJ, Jones EA, Crumpton MJ. (1978). Isolation, structure and genetics of HLA-A, -B, -C and -DRw (Ia) antigens. *Br Med Bull*, 34:241-6.
- Bastide K, Guilly MN, Bernaudin JF, Joubert C, Lectard B, Levalois C, Malfoy B, Chevillard S.(2009). Molecular analysis of the Ink4a/Rb1-Arf/Tp53 pathways in radon-induced rat lung tumors. *Lung Cancer*, 63:348-53.
- Blume-Jensen P and Hunter T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411:355-365.
- Boike G, Lah T, Sloane BF, Rozhin J, Honn K, Guirguis R, Stracke ML, Liotta LA, Schiffmann EA. (1992). Possible role for cysteine proteinase and its inhibitors in motility of malignant melanoma and other tumor cells. *Melanoma Res*, 1: 333-40.
- Breslow A. (1970). Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann. Surg*, 172: 902-908.
- Brodsky FM, Parham P. (1982). Evolution of HLA antigenic determinants: species cross-reactions of monoclonal antibodies. *Immunogenetics*, 15:151-66.

- Brodsky FM, Bodmer WF, Parham P. (1979). Characterization of a monoclonal anti-beta 2-microglobulin antibody and its use in the genetic and biochemical analysis of major histocompatibility antigens. *Eur J Immunol*, 9:536-45.
- Carreira S, Goodall J, Aksan I, La Rocca SA, Galibert MD, Denat L, Larue L, Goding CR. (2005). Mitf cooperates with Rb1 and activates p21Cip1 expression to regulate cell cycle progression. *Nature*, 433:764-9.
- Chin L, Pomerantz J and DePinho RA. (1998). The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene--two products--two pathways. *Trends Biochem Sci*, 23: 291-296.
- Chin L, Pomerantz J, Polsky D, Jacobson M, Cohen C, Cordon-Cardo C, Horner JW and DePinho RA. (1997). Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility in vivo. *Genes Dev*, 11: 2822-2834.
- Chin L, Garraway LA, Fisher D. (2007). Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev*, 20: 2149-82.
- Clark EA, Golub TR, Lander ES and Hynes RO. (2000). Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature*, 406,: 532-535.
- Clark WHJ, Elder DE, Guerry D, Epstein MN, Greene MH and Van Horn M. (1984). A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum. Pathol*, 15:1147-1165.
- Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Bröcker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC. (2005). Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*, 353:2135-47.
- Dai DL, Martinka M, Li G. (2005). Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. *J Clin Oncol*, 23:1473-82.
- Danen EH, van Kraats AA, Cornelissen IM, Ruiter DJ, and van Muijen, G.N. (1996). Integrin beta 3 cDNA transfection into a highly metastatic alpha v beta 3-negative human melanoma cell line inhibits invasion and experimental metastasis. *Biochem Biophys Res Commun*, 226: 75-81.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417: 949-54.
- Demunter A, Stas M, Degreef H, De Wolf-Peeters C, van den Oord JJ. (2001). Analysis of N- and K-ras mutations in the distinctive tumor progression phases of melanoma. *J Invest Dermatol*, 117:1483-9.
- Dupont J, LeRoith D. (2001). Insulin and insulin-like growth factor I receptors: similarities and differences in signal transduction. *Horm Res*, 55 Suppl 2:22-6.
- Elwood JM, Jopson J. (1997). Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int J Cancer*, 73:198-203.
- Evan G and Littlewood T. (1998). A matter of life and cell death. *Science*, 281: 1317-1322.

- Fecher LA, Cummings SD, Keefe MJ, Alani RM. (2007). Toward a molecular classification of melanoma. *J Clin Oncol*, 25:1606-20.
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. (2004). Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC CancerBase No. 5, version 2.0 IARC Press, Lyon.
- Ferrone S, Marincola FM. (1995). Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol Today*, 16:487-94.
- Frank D, Mendelsohn CL, Ciccone E, Svensson K, Ohlsson R and Tycko B. (1999). A novel pleckstrin homology-related gene family defined by Ipl/Tssc3, TDAG51, and Tih1: tissue-specific expression, chromosomal location, and parental imprinting. *Mamm. Genome*, 10: 1150-1159.
- Freije JM, Blay P, MacDonald NJ, Manrow RE and Steeg PS. (1997). Site-directed mutation of Nm23-H1. Mutations lacking motility suppressive capacity upon transfection are deficient in histidine-dependent protein phosphotransferase pathways in vitro. *J. Biol. Chem*, 272: 5525-5532.
- Freije JM, MacDonald NJ and Steeg PS. (1998). Nm23 and tumour metastasis: basic and translational advances. *Biochem. Soc. Symp*, 63: 261-271.
- French LE, Tschopp J. (2002). Defective death receptor signaling as a cause of tumor immune escape. *Semin Cancer Biol*, 12:51-5.
- Friedman RJ, Farber MJ, Warycha MA, Papathasis N, Miller MK, Heilman ER. (2009). The „dysplastic“ nevus. *Clin Dermatol*, 27: 103-115.
- Frisch SM and Francis H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell. Biol*, 124: 619-626.
- Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, Melchi CF. (2005). Meta-Analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical Naevi. *Eur J Cancer*, 41:28-44.
- Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Pérez-Villar JJ, López-Botet M, Duggan-Keen M, Stern PL. (1997). Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today*, 18:89-95.
- Garrido F and Algarra I. (2001). MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv Cancer Res*, 83:117-58.
- Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, Beroukhi R, Milner DA, Granter SR, Du J, Lee C, Wagner SN, Li C, Golub TR, Rimm DL, Meyerson ML, Fisher DE, Sellers WR. (2005). Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature*, 436:117-22.
- Giancotti FG and Ruoslahti E. (1999). Integrin signaling. *Science*, 285:1028-1032.
- Gomes I, Xiong W, Miki T and Rosner MR. (1999). A proline- and glutamine-rich protein promotes apoptosis in neuronal cells. *J. Neurochem*, 73: 612-622.
- Grand JA, Rowe M, Byrd PJ, Gallimore PH. (1987). The level of expression of class-I MHC antigens in adenovirus-transformed human cell lines. *Int.J.Cancer*, 40: 213-219.
- Hanahan D and Weinberg RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70.
- Hengartner MO. (2001). Apoptosis. DNA destroyers. *Nature*, 412: 27, 29.

- Herlyn M, Ferrone S, Ronai Z, Finerty J, Pelroy R and Mohla S. (2001). Melanoma biology and progression. *Cancer Res*, 61: 4642-4643.
- Hinz T, Flindt S, Marx A, Janssen O and Kabelitz D. (2001). Inhibition of protein synthesis by the T cell receptor-inducible human TDAG51 gene product. *Cell. Signal*, 13: 345-352.
- Hoey T, Weinzierl RO, Gill G, Chen JL, Dynlacht BD and Tjian R. (1993). Molecular cloning and functional analysis of Drosophila TAF110 reveal properties expected of coactivators. *Cell*, 72: 247-260.
- Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, Higgins PA, Ally DS, Sheahan MD, Clark WHJ, Tucker MA and Dracopoli NC. (1994). Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat. Genet*, 8: 15-21.
- Ibrahim N and Haluska FG. (2009). Molecular Pathogenesis of Cutaneous Melanocytic Neoplasms. *Annu Rev Pathol MechDis*, 4: 551-579.
- Igney FH, Behrens CK and Krammer PH. (2000). Tumor counterattack-concept and reality. *Eur J Immunol* 30: 725-31.
- Ishizaki Y, Cheng L, Mudge AW and Raff MC. (1995). Programmed cell death by default in embryonic cells, fibroblasts, and cancer cells. *Mol. Biol. Cell*, 6:1443-1458.
- Ivry GB, Ogle CA, BSE, Shim EK. (2006). Role of Sun Exposure in Melanoma. *Dermatol Surg*, 32: 481-492.
- Johnson JP. (1999). Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev*, 18: 345-357.
- Jones PA. (2001). Cancer, death and methylation. *Nature* 409, 141-144.
- Kim M, Gans JD, Nogueira C, Wang A, Paik JH, Feng B, Brennan C, Hahn WC, Cordon-Cardo C, Wagner SN, Flotte TJ, Duncan LM, Granter SR, Chin L. (2006). Comparative oncogenomics identifies NEDD9 as a melanoma metastasis gene. *Cell*, 125:1269-81.
- Krammer PH. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407: 789-795.
- Kuske MD. (1998). Identifizierung und Charakterisierung von Phrip, einem differentiell exprimierten Gen in autologen Primärtumor- und Metastasezelllinien. Doktorarbeit an der Fakultät für Biologie der LMU-München.
- Kuske MD and Johnson JP. (2000). Assignment of the human PHLDA1 gene to chromosome 12q15 by radiation hybrid mapping. *Cytogenet. Cell Genet*, 89: 1.
- Kwong L, Chin L, Wagner SN. (2007). Growth factors and oncogenes as targets in melanoma: lost in translation? *Adv Dermatol*, 23: 99-129.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lane AA, Chabner BA. (2009). Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *J Clin Oncol*. 27:5459-68.
- Lau LF and Nathans D. (1987). Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: coordinate regulation with c-fos or c-myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 84: 1182-1186.
- Lázár-Molnár E, Hegyesi H, Tóth S, Falus A. (2000). Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine*. 12:547-54.

- Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE and Welch DR. (1996). KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J. Natl. Cancer Inst*, 88: 1731-1737.
- Lehmann JM, Holzmann B, Breitbart EW, Schmiegelow P, Riethmuller G and Johnson JP. (1987). Discrimination between benign and malignant cells of melanocytic lineage by two novel antigens, a glycoprotein with a molecular weight of 113,000 and a protein with a molecular weight of 76,000. *Cancer Res*, 47:841-845.
- Lehmann JM, Riethmuller G and Johnson JP. (1989). MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 86: 9891-9895.
- Leone A, Flatow U, King CR, Sandeen MA, Margulies IM, Liotta LA and Steeg PS. (1991). Reduced tumor incidence, metastatic potential, and cytokine responsiveness of nm23-transfected melanoma cells. *Cell*, 65: 25-35.
- Loercher AE, Tank EM, Delston RB, Harbour JW. (2005). MITF links differentiation with cell cycle arrest in melanocytes by transcriptional activation of INK4A. *J Cell Biol*, 168:35-40.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J.Biol.Chem*, 193: 265-275.
- Lu C and Kerbel, RS. (1994). Cytokines, growth factors and the loss of negative growth controls in the progression of human cutaneous malignant melanoma. *Curr. Opin. Oncol*, 6: 212-220.
- Makri A, Pissimissis N, Lembessis P, Polychronakos C, Koutsilieris P. (2008). The kisspeptin (Kiss-1)/GPR54 system in cancer biology. *Canz Treat Rev*, 34: 682-692.
- Mancianti ML, Gyorfi T, Shih IM, Valyi-Nagy I, Levengood G, Menssen HD, Halpern AC, Elder DE and Herlyn M. (1993). Growth regulation of cultured human nevus cells. *J. Invest. Dermatol*, 100: 281S-287S.
- Marini A, Mirmohammadsadegh A, Nambiar S, Gustrau A, Ruzicka T, Hengge UR. (2006). Epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in serum of patients with cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol*, 126: 422-31.
- Meijerink JP, Mensink EJ, Wang K, Sedlak TW, Sloetjes AW, de Witte T, Waksman G and Korsmeyer SJ. (1998). Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood*, 91: 2991-2997.
- Mendez R, Aptsiauri N, Del Campo A, Maleno I, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F, Garcia-Lora A. (2009). HLA and melanoma: multiple alterations in HLA class I and II expression in human melanoma cell lines from ESTDAB cell bank. *Cancer Immunol Immunother*, 58:1507-15.
- Moretta L, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta A.(2000). Human NK-cell receptors. *Immunol Today*, 21:420-2.
- Nagai MA, Fregnani JH, Netto MM, Brentani MM, Soares FA. (2007). Down-regulation of PHLDA1 gene expression is associated with breast cancer progression. *Breast Cancer Res Treat*, 106:49-56.
- Neef R, Kuske MA, Pröls E, Johnson JP. (2002). Identification of the human PHLDA1/TDAG51 gene: down-regulation in metastatic melanoma contributes to apoptosis resistance and growth deregulation. *Cancer Res*, 62:5920-9.

- O'Farrell (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis proteome. *J. Biol. Chem*, 250: 4007-4021
- Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O and Fujino M. (2001). Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, 411: 613-617.
- Orr, HT. (2001). Beyond the Qs in the polyglutamine diseases. *Genes Dev*, 15: 925-932.
- Ostrowski E, Finch J, Krieg P, Matrisian L, Patskan G, O'Connell JF, Phillips J, Slaga TJ, Breathnach R, Bowden GT. (1988). Expression pattern of a gene for a secreted metalloproteinase during late stages of tumor progression. *Mol Carcinog*, 1: 13-9.
- Papp T, Jafari M and Schiffmann D. (1996). Lack of p53 mutations and loss of heterozygosity in non-cultured human melanocytic lesions. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*, 122: 541-548.
- Park CG, Lee SY, Kandala G and Choi Y. (1996). A novel gene product that couples TCR signaling to Fas (CD95) expression in activation-induced cell death. *Immunity*, 4: 583-591.
- Paschen A, Méndez RM, Jimenez P, Sucker A, Ruiz-Cabello F, Song M, Garrido F, Schadendorf D. (2003). Complete loss of HLA class I antigen expression on melanoma cells: a result of successive mutational events. *Int J Cancer*, 103:759-67.
- Pearl RA, Pacifico MD, Richman PI, Wilson GD, Grover R. (2008). Stratification of patients by melanoma cell adhesion molecule (MCAM) expression on the basis of risk: implications for sentinel lymph node biopsy. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 61:265-71.
- Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, Roy M, Kischkel FC, Dowd P, Huang A, Donahue CJ, Sherwood SW, Baldwin DT, Godowski PJ, Wood WI, Gurney A.L., Hillan KJ, Cohen RL, Goddard AD, Botstein D and Ashkenazi A. (1998). Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature*, 396: 699-703.
- Pleasant ED, Cheetham RK, Stephens PJ, McBride DJ, Humphray SJ, Greenman CD, Varela I, Lin ML, Ordóñez GR, Bignell GR, Ye K, Alipaz J, Bauer MJ, Beare D, Butler A, Carter RJ, Chen L, Cox AJ, Edkins S, Kokko-Gonzales PI, Gormley NA, Grocock RJ, Haudenschild CD, Hims MM, James T, Jia M, Kingsbury Z, Leroy C, Marshall J, Menzies A, Mudie LJ, Ning Z, Royce T, Schulz-Trieglaff OB, Spiridou A, Stebbings LA, Szajkowski L, Teague J, Williamson D, Chin L, Ross MT, Campbell PJ, Bentley DR, Futreal PA, Stratton MR. (2009). A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature*, 463:191-6.
- Pollock PM and Trent JM. (2000). The genetics of cutaneous melanoma. *Clin. Lab. Med*, 20: 667-690.
- Polsky D, Bastian BC, Hazan C, Melzer K, Pack J, Houghton A, Busam K, Cordon-Cardo C, Osman I. (2001). HDM2 protein overexpression, but not gene amplification, is related to tumorigenesis of cutaneous melanoma. *Cancer Res*, 61:7642-6.
- Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee HW, Cordon-Cardo C and DePinho RA. (1998). The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*, 92: 713-723.
- Prives C. (1998). Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell*, 95: 5-8.

- Pujol FH, Navas MC, Hainaut P, Chemin I. (2009). Worldwide genetic diversity of HBV genotypes and risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*, 286:80-8.
- Rayburn E, Zhang R, He J, Wang H. (2005). MDM2 and human malignancies: expression, clinical pathology, prognostic markers and implications for chemotherapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 5:27-41.
- Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC and Perucho M. (1997). Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science*, 275: 967-969.
- Reed JC. (1998). Bcl-2 family proteins. *Oncogene*, 17: 3225-3236.
- Rodeck U. (1993). Growth factor independence and growth regulatory pathways in human melanoma development. *Cancer Metastasis Rev*, 12: 219-226.
- Rosenberg SA. (2001). Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature*, 411: 380-384.
- Rothberg Gould, Bracken MB, Rimm DL. (2009). Tissue biomarkers for prognosis in cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*, 101:452-74.
- Routes JM, Cook JL. (1990). Resistance of human cells to the adenovirus E3 effect on class I MHC antigen expression. Implications for antiviral immunity. *J Immunol*, 144:2763-70.
- Sager R. (1989). Tumor suppressor genes: the puzzle and the promise. *Science*, 246: 1406-1412.
- Saida T. (2001). Recent advances in melanoma research. *J. Dermatol. Sci*, 26: 1-13.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA and Arnheim N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350-1354.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning*, second edition edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Schadendorf D, Heide J, Gawlik C, Suter L and Czarnetzki BM. (1995). Association with clinical outcome of expression of VLA-4 in primary cutaneous malignant melanoma as well as P-selectin and E-selectin on intratumoral vessels. *J. Natl. Cancer Inst*, 87: 366-371.
- Schafer KA. (1998). The cell cycle: a review. *Vet Pathol*. 35:461-78.
- Sharpless NE, Chin L. (2003). The INK4a/ARF locus and melanoma. *Oncogene*, 22: 3092-3098.
- Scholl S, Beuzeboc P, Pouillart P. (2001). Targeting HER2 in other tumor types. *Ann Oncol*. 1:81-7.
- Seliger B, Cabrera T, Garrido F Ferrone S. (2002). HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin.Cancer Biol*, 12:3-13.
- Serrone L and Hersey P. (1999). The chemoresistance of human malignant melanoma. *Melanoma Res*, 9, 51-58.

- Sette A, Chesnut R, Fikes J. (2001). HLA expression in cancer: implications for T cell-based immunotherapy. *Immunogenetics*, 53:255-63.
- Shi YE, Ni J, Xiao G, Liu YE, Fuchs A, Yu G, Su J, Cosgrove JM, Xing L, Zhang M, Li J, Aggarwal BB, Meager A and Gentz R. (1997). Antitumor activity of the novel human breast cancer growth inhibitor, mammary-derived growth inhibitor-related gene, MRG. *Cancer Res*, 57: 3084-3091.
- Slipicevic A, Holm R, Nguyen MT, Böhler PJ, Davidson B, Flørenes VA. (2005). Expression of activated Akt and PTEN in malignant melanomas: relationship with clinical outcome. *Am J Clin Pathol*, 124: 528-36.
- Soengas MS, Capodici P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardo C and Lowe SW. (2001). Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature*, 409: 207-211.
- Sprecher E, Bergman R, Meilick A, Kerner H, Manov L, Reiter I, Shafer Y, Maor G and Friedman-Birnbaum R. (1999). Apoptosis, Fas and Fas-ligand expression in melanocytic tumors. *J. Cutan. Pathol.*, 26: 72-77.
- Stahl JM, Sharma A, Cheung M, Zimmerman M, Cheng JQ, Bosenberg MW, Kester M, Sandirasegarane L, Robertson GP. (2004). Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res*, 64:7002-10.
- Stetler-Stevenson WG. (1999). Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J. Clin. Invest*, 103: 1237-1241.
- Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Vousden KH and Peters G. (1998). The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *Embo J.*, 17: 5001-5014.
- Straume O, Sviland L, Akslen LA. (2000). Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. *Clin Cancer Res*. 6:1845-53.
- Taipale J and Beachy PA. (2001). The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature*, 411:349-354.
- Takeichi M. (1990). Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu. Rev. Biochem*, 59: 237-252.
- Tan X and Wang JY. (1998). The caspase-RB connection in cell death. *Trends Cell Biol*, 8: 116-120.
- Tang L, Li G, Tron VA, Trotter MJ, Ho VC. (1999). Expression of cell cycle regulators in human cutaneous malignant melanoma. *Melanoma Res*, 9:148-54.
- Towbin H, Staehelin T and Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 76: 4350-4354.
- Toyoshima Y, Karas M, Yakar S, Dupont J, Lee Helman, LeRoith D. (2004). TDAG51 mediates the effects of insulin-like growth factor I (IGF-I) on cell survival. *J Biol Chem*, 279:25898-904.
- Trimble CL, Frazer IH. (2009). Development of therapeutic HPV vaccines. *Lancet Oncol*, 10:975-80.



- Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG. (2004). Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol*, 122: 337-41.
- Tsao H and Sober A. (2005). Melanoma treatment update. *Dermatol Clin*, 23: 323-333.
- Varner JA, Emerson DA and Juliano RL. (1995). Integrin alpha 5 beta 1 expression negatively regulates cell growth: reversal by attachment to fibronectin. *Mol Biol Cell*, 6: 725-740.
- Veierød MB, Weiderpass E, Thörn M, Hansson J, Lund E, Armstrong B, Adami HO. (2003). A prospective study of pigmentation, sun exposure, and risk of cutaneous malignant melanoma in women. *J Natl Cancer Inst*, 95: 1530-8.
- V. von Felbert, F. Cordoba, J. Weissenberger, C. Vallan, M. Kato, I. Nakashima, L. R. Braathen, J. Weis. (2005). Interleukin-6 Gene Ablation in a Transgenic Mouse Model of Malignant Skin Melanoma. *American Journal of Pathology*, Vol. 166, No.3.
- de Vries AC, Kuipers EJ, Rauws EA. (2009). Helicobacter pylori eradication and gastric cancer: when is the horse out of the barn? *Am J Gastroenterol*, 104: 1342-5.
- Walker PR, Saas P and Dietrich PY. (1998). Tumor expression of Fas ligand (CD95L) and the consequences. *Curr Opin Immunol*, 10: 564-72.
- Wang M, Liu YE, Ni J, Aygun B, Goldberg ID and Shi YE. (2000). Induction of mammary differentiation by mammary-derived growth inhibitor-related gene that interacts with an omega-3 fatty acid on growth inhibition of breast cancer cells. *Cancer Res*, 60,: 6482-6487.
- Wang M, Stearns ME (1988): Blocking of collagenase secretion by estramustine during in vitro tumor cell invasion. *Cancer Res*, 48: 6262-71.
- Westerdahl J, Ingvar C, Måsbäck A, Jonsson N, Olsson H. (2000). Risk of cutaneous malignant melanoma in relation to use of sunbeds: further evidence for UV-A carcinogenicity. *Br J Cancer*, 82:1593-9.
- Wharton KA, Yedvobnick B, Finnerty VG and Artavanis-Tsakonas S. (1985). opa: a novel family of transcribed repeats shared by the Notch locus and other developmentally regulated loci in *D. melanogaster*. *Cell*, 40: 55-62.
- Whittaker JL, Byrd PJ, Garnd RJA, Gallimore PH. (1984). Isolation and characterization of four adenovirus type 12-transformed human embryo kidney cell lines. *Mol.Cell.Biol.*,4: 110-116.
- Willers J, Urosevic M, Laine E, Geertsen R, Kündig T, Burg G, Dummer R.(2001). Decreased intraindividual HLA class I expression is due to reduced transcription in advanced melanoma and does not correlate with HLA-G expression. *J Invest Dermatol*, 117:1498-504.
- Wijnhoven BP, Dinjens WN, Pignatelli M. (2000). E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg*. 87:992-1005.
- Xie S, Luca M, Huang S, Gutman M, Reich R, Johnson JP and Bar-Eli M. (1997). Expression of MCAM/MUC18 by human melanoma cells leads to increased tumor growth and metastasis. *Cancer Res*, 57: 2295-2303.

- Yang SY: Population analysis of class I HLA antigens by one-dimensional isoelectric focusing gel electrophoresis: Workshop summary report. In: Dupont B, (ed): Immunobiology of HLA, vol. 1: histocompatibility testing 1987. *New York: Springer Verlag*, 1998: 308–331.
- Zigler M, Villares GJ, Lev DC, Melnikova VO, Bar-Eli M. (2008). Tumor immunotherapy in melanoma: strategies for overcoming mechanisms of resistance and escape. *Am J Clin Dermatol*, 9:307-11.

## ANHANG

### ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATG	Startcodon der Translation
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Bindedomäne
bp	Basenpaar
BSA	Rinder-Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotide
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
h	Stunde
HCl	Salzsäure
FACS	fluorescence activated cell sorter
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
g	Gramm
G418	Geneticin
K $\alpha$ M-FITC	Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper, FITC-fluoreszenzmarkiert
K $\alpha$ M-POD	Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper, Peroxidase-konjugiert
Kap.	Kapitel
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
M	Molar
mAK	monoklonaler Antikörper
min.	Minute
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA oder Boten Ribonukleinsäure
m/v	Masse pro Volumen (Gewichtsprozent)
Na	Natrium
OD	optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
POD	(Meerrettich-)Peroxidase
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Laurylsulfat oder Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	(SDS) denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Tab.	Tabelle
TdT	Terminale Desoxyribonukleotid Transferase
Upm	Umdrehung pro Minute

**Abkürzungen der Aminosäuren**

C	Cys	Cystein
E	Glu	Gluthaminsäure
K	Lys	Lysin
M	Met	Methionin
Q	Gln	Glutamin

