

Expression und Funktion des Apoptose-assoziierten Moleküls PHLDA1 im humanen Melanom

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Rüdiger Neef
München
November 2001

Dissertation eingereicht am 20.11.2001

Tag der mündlichen Prüfung: 17.06.2002

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. T. Cremer

Zweitgutachter: Herr Dr. H. Weiher

Sondergutachter: Frau Prof. Dr. J.P. Johnson

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Melanozytäre Läsionen	1
1.2	Genetische Veränderungen während der Tumorigenese.....	3
1.3	Veränderte Genexpressionen während der Metastasierung.....	8
1.3.1	Zelladhäsionsmoleküle im Metastasierungsprozess	8
1.3.2	Auflösung der Gewebebarrieren	10
1.3.3	Autokrines Wachstum des Tumors	11
1.3.4	Supprimierung der Immunantwort.....	12
1.3.5	Apoptoseresistenz	12
1.3.6	Veränderung der Zellmobilität.....	14
1.4	Identifizierung von Metastasierungs-assoziierten Molekülen mit Hilfe der <i>mRNA differential display</i> -Methode.....	15
1.5	PHLDA1.....	17
1.6	Zielsetzung der Arbeit	20
2	Ergebnisse	22
2.1	PHLDA1-Expression in Zelllinien, die aus Melanomprimärtumoren und Melanommetastasen generiert wurden	22
2.2	Generierung und Charakterisierung monoklonaler Anti-PHLDA1-AK	23
2.2.1	Expression und Reinigung von rekombinantem PHLDA1-Protein.....	24
2.2.2	Immunisierung, Fusion und Test der Hybridomzellen auf PHLDA1-reaktive monoklonale Antikörper	25
2.2.3	Reaktivität der monoklonalen Anti-PHLDA1-AK im Westernblot	26
2.2.4	Reaktivität der monoklonalen Anti-PHLDA1-AK auf intakten Zellen.....	27
2.2.5	Spezifität der monoklonalen Anti-PHLDA1-AK	28
2.2.5.1	Inhibition der monoklonalen Anti-PHLDA1-AK.....	28
2.2.5.2	Monoklonale Anti-PHLDA1-AK auf induzierbaren Zelllinien.....	29
2.2.6	Zusammenfassung der monoklonalen Anti-PHLDA1-Antikörper.....	31
2.3	PHLDA1-Expression auf Gewebeschnitten.....	31
2.4	PHLDA1-Expression in verschiedenen Zelllinien	38
2.4.1	Induktion der PHLDA1-Expression durch Phorbol ester	41
2.5	Lokalisation von PHLDA1 in Zellen	43
2.6	Bestimmung des Translationsstartpunktes von PHLDA1	44
2.7	Charakterisierung stabiler PHLDA1-Transfektanten	47
2.7.1	PHLDA1-Expression stabiler Transfektanten	47
2.7.2	Wachstumsmorphologie der PHLDA1-Transfektanten.....	49
2.8	Klonierungseffizienz	52

2.9	Einfluss der konstitutiven PHLDA1-Expression auf das Wachstum.....	53
2.9.1	Einfluss von PHLDA1 auf die Fähigkeit Kolonien zu formen.....	53
2.9.2	Wachstumskurven.....	54
2.9.3	Zellzyklus.....	55
2.10	Apoptose.....	57
2.10.1	Annexin-V-Bindung	57
2.10.2	TdT-abhängiger Einbau von FITC-dUTP (<i>TUNEL</i> -Assay)	59
2.10.3	Einfluss der PHLDA1-Expression auf den Effekt von Chemotherapeutika....	59
2.11	Suche nach Interaktionspartnern von PHLDA1	61
2.11.1	Gst-Bindeexperimente (<i>Gst pull down</i>)	61
2.11.2	Suche nach PHLDA1-bindenden Proteinen mit Hilfe des <i>yeast two hybrid screen</i>	63
2.11.3	Expression der PHLDA1- <i>baits</i> in <i>S. cerevisiae</i>	63
2.11.3.1	Test auf autonome Aktivierung der Transkription durch die <i>baits</i>	64
2.11.3.2	<i>Yeast two hybrid screen</i>	67
2.11.4	Koimmunpräzipitation	73
3	Diskussion.....	76
3.1	PHLDA1-Expression im humanen Melanom.....	76
3.2	Struktur und zelluläre Lokalisation von PHLDA1.....	77
3.3	Funktion von PHLDA1 im humanen Melanom.....	79
3.4	Zelluläre Interaktionspartner von PHLDA1.....	83
3.5	Die Rolle von PHLDA1 während der Tumorigenese des Melanoms	87
3.6	Ausblick	88
4	Material	91
4.1	Material und Bezugsquellen	91
4.1.1	Gewebe	91
4.1.2	Zelllinien.....	93
4.1.3	Transfektanten.....	94
4.1.4	<i>S. cerevisiae</i> -Stämme.....	95
4.1.5	<i>E. coli</i> -Stämme.....	95
4.1.6	Polyklonale Seren und Antikörperkonjugate.....	96
4.1.7	Monoklonale Antikörper.....	97
4.1.8	Enzyme	98
4.1.9	Nukleinsäuren	99
4.1.9.1	Plasmide.....	99
4.1.9.2	Primer.....	99
4.1.10	Sonstige Nukleinsäuren und Oligonukleotide	101
4.1.11	Größenstandards	101
4.1.12	Chemikalien	101
4.1.13	Kommerzielle Analysesysteme und vorgefertigte Lösungen	103
4.1.14	Verbrauchsmaterial	104

4.1.15	Geräte.....	105
4.2	Medien.....	106
4.2.1	Zellkulturmedien für Mammalia-Zelllinien.....	106
4.2.2	<i>S. cerevisiae</i> -Medien.....	106
4.2.3	<i>E. coli</i> -Medien.....	107
4.3	Allgemeine Puffer und Lösungen	108
5	Methoden.....	112
5.1	Arbeiten mit menschlichem Gewebe.....	112
5.1.1	Herstellung von Gewebeschnitten	112
5.2	Arbeiten mit Zelllinien	112
5.2.1	Zellkultur.....	112
5.2.2	Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen.....	112
5.2.3	Stimulation der Zellen mit Phorbol ester	113
5.2.4	Transfektion von Säugerzellen in der Zellkultur	113
5.2.4.1	Transiente Transfektionen	113
5.2.4.2	Stabile PHLDA1-Transfektanten.....	114
5.2.5	Wachstumskurven und MTT-Elisa.....	114
5.2.6	Kolonie-Formations-Assay.....	115
5.2.7	Klonierungseffizienz.....	115
5.2.8	Herstellung von Zytospinpräparaten.....	115
5.3	Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	116
5.3.1	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	116
5.3.2	Transformation von Plasmid-DNA in <i>S. cerevisiae</i>	116
5.3.3	<i>Yeast two hybrid screen</i>	117
5.3.3.1	Vorarbeiten für den <i>yeast two hybrid screen</i>	117
5.3.3.2	Überprüfung auf autonome Aktivierung der Transkription.....	118
5.3.3.3	Ablauf des <i>yeast two hybrid screens</i>	119
5.3.3.4	Kreuzung von <i>S. Cerevisiae</i> im <i>yeast two hybrid screen</i>	121
5.3.3.5	Bestimmung der Kreuzungseffizienz und der Anzahl der gescreenten Klone	123
5.3.3.6	Bestimmung der Transformationseffizienz und Anzahl der gescreenten Klone	123
5.3.3.7	LacZ-Filterassay für den <i>yeast two hybrid screen</i>	124
5.4	Arbeiten mit <i>Escherichia Coli</i>	124
5.4.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	124
5.4.2	Transformation von <i>E. coli</i>	125
5.4.2.1	Transformation von CaCl ₂ behandelten <i>E. coli</i>	125
5.4.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation	125
5.4.3	Amplifikation einer cDNA Genbank in <i>E. coli</i>	126
5.5	Molekularbiologische Methoden	127
5.5.1	Handhabung von Nukleinsäuren nach Sambrook <i>et al.</i> , 1989.....	127
5.5.1.1	Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA.....	127
5.5.1.2	Fällung von DNA/RNA	127

5.5.1.3	Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA	127
5.5.2	Isolierung von Nukleinsäuren	128
5.5.2.1	Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	128
5.5.2.2	Präparation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i> mit <i>spin column</i> -Säulen	128
5.5.2.3	Maxipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	129
5.5.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	129
5.5.2.5	Isolation von mRNA aus Säugerzelllinien	130
5.5.3	Amplifikation von DNA mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	130
5.5.4	Reverse Transkription und PCR (RT-PCR)	131
5.5.5	<i>in vitro</i> -Modifikation von DNA nach Sambrook <i>et al.</i> , 1989	132
5.5.5.1	Restriktion von DNA	132
5.5.5.2	Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente	132
5.5.5.3	Phosphorylierung linearer DNA-Fragmente	132
5.5.5.4	Entfernung von 3'-überhängenden DNA-Fragment-Enden	132
5.5.5.5	Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Fragment-Enden	133
5.5.5.6	Ligation von DNA-Fragmenten	133
5.5.6	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	133
5.5.6.1	Isolation von DNA aus Agarosegelen	134
5.5.7	Klonierungen	134
5.5.7.1	PHLDA1 in pAS2-1	135
5.5.7.2	PHLDA1 in pcDNA3	136
5.5.7.3	PHLDA1 in pcDNA3.1	136
5.5.7.4	PHLDA1 in pGEX4T	137
5.5.7.5	Gst-Fusionskonstrukte zur Expression in Mammalia-Zellen	138
5.6	Proteinbiochemische Methoden	138
5.6.1	Zellaufschluß von Mammalia-Zelllinien	138
5.6.2	Zellaufschluß von <i>S. cerevisiae</i>	139
5.6.3	Zellaufschluß von <i>E. coli</i>	139
5.6.3.1	Direkte Lyse von <i>E. coli</i> für die SDS-PAGE	139
5.6.4	Messung der Proteinkonzentration	140
5.6.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	140
5.6.6	Coomassie-Färbung	141
5.6.7	Western Blot	141
5.6.8	Immundetektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	142
5.6.8.1	Entfernung von Immunkomplexen von Nitrozellulosemembranen	142
5.6.9	Etablierung der Expression von Gst-PHLDA1 in <i>E. coli</i>	143
5.6.10	Reinigung von heterolog exprimierten Gst-Fusionsproteinen	145
5.6.11	Gst-Binde-Experimente (<i>Gst pull down</i>)	145
5.6.12	Koimmunpräzipitation	146
5.7	Immunologische Methoden	147
5.7.1	Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen PHLDA1	147
5.7.1.1	Immunisierung	147
5.7.1.2	Fusion von Milz- und Maus-Myelomzellen	147
5.7.1.3	Test der Hybridomüberstände im ELISA	148
5.7.1.4	Isotypbestimmung der monoklonalen Antikörper	148
5.7.2	Immunhistochemie	148
5.7.3	Immunfluoreszenz	149
5.7.3.1	Immunfluoreszenz von Oberflächenantigenen	150
5.7.3.2	Zytoplasmatische Immunfluoreszenz	150

5.7.3.3	Auswertung im Fluoreszenzmikroskop	150
5.7.3.4	Auswertung im FACScan	151
5.7.4	Annexin-V-Bindung	151
5.7.5	Apoptoseinduktion mit Doxorubicin	152
5.7.6	<i>TUNEL</i> -Assay	152
5.7.7	Zellzyklusanalysen.....	153
5.8	Computeranalysen	154
5.8.1	Sequenzalignement mit Genbank DNA-Sequenzen	154
5.8.2	Sequenzalignement von Proteinen	154
6	Zusammenfassung	155
7	Literaturverzeichnis.....	157

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATG	Startcodon der Translation
ATP	Adenosintriphosphat
Az	Azetat
BD	Bindedomäne
bp	Basenpaar
BSA	Rinder-Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cfu	colonie forming unit (Anzahl der Klone)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotide
DTT	Dithioerytrol
<i>E. coli</i>	Escherichia Coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
h	Stunde
HCl	Salzsäure
IPTG	Isopropylthiogalactoside
FACS	fluorescence activated cell sorter
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung in m/s^2
G418	Geneticin
GS	Gluthathion-Sepharose
K α M-FITC	Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper, FITC-fluoreszenzmarkiert
K α M-POD	Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper, Peroxidase-konjugiert
K α Z-POD	Kaninchen-Anit-Ziege-Antikörper, Peroxidase-konjugiert
Kap.	Kapitel
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	<i>E. coli</i> -Medium
LiAz	Lithiumazetatpuffer
M	Molar
MM	Molekulargewichtsmarker
mAK	monoklonaler Antikörper
min	Minute
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA oder Boten Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5, -dimethylthiazol-2-yl)-2,3-diphenyltetrazolium bromide

m/v	Masse pro Volumen (Gewichtsprozent)
Na	Natrium
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
POD	(Meerrettich-)Peroxidase
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccaromyces cerevisiae</i>
SD	synthetic dropout (Selektions- bzw. Mangelmedium)
SDS	Laurylsulfat oder Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	(SDS) denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TdT	Terminale Desoxyribonukleotid Transferase
Upm	Umdrehung pro Minute
UTR	untranslationierte Region
v/v	Volumen pro Volumen (Volumenprozent)
w/v	Gewichtsprozent pro Volumen

Abkürzungen der Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Gluthaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Abkürzungen der Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

1 Einleitung

Jährlich erkranken in Deutschland ca. 6900 Menschen an einem malignen Melanom der Haut. Damit macht das Melanom 2% aller Tumoren aus und steht nach dem Basaliom und dem Spinaliom an dritter Stelle der Hautkrebserkrankungen (Batzler *et al.*, 1999). Die Inzidenz nimmt weltweit aber stärker zu als bei jeder anderen Krebsart (Rigel und Carucci, 2000; Howe *et al.*, 2001). Auch in Deutschland hat sich die Anzahl der Neuerkrankungen für beide Geschlechter in dem Zeitraum von 1970 bis 1997 verdreifacht. Dagegen ist die Mortalität über diesen Zeitraum aufgrund einer besseren Aufklärung und der damit verbundenen Früherkennung der Primärtumoren sowie deren chirurgischer Entfernung annähernd gleich geblieben (Batzler *et al.*, 1999). Dennoch ist das Melanom aufgrund seiner schnellen und hohen Metastasierungsrate sowie seiner Resistenz gegenüber Chemotherapeutika einer der bösartigsten Tumoren überhaupt (Balch *et al.*, 1998). Dies spiegelt sich auch in der Tatsache wider, dass die 5-Jahres-Überlebensraten zwischen 69% bei Männern und 80% bei Frauen liegen, aber bei eingetretener Metastasierung auf unter 10% fallen (Batzler *et al.*, 1999). Demnach ist in der Metastasierung die Hauptursache der Mortalität zu sehen. Im Gegensatz zu der seit langer Zeit durchgeführten histopathologischen Einteilung der Melanome, der Vielfalt der epidemiologischen Studien und den chirurgischen Erfolgen bei der Behandlung der Primärtumoren, ist über die molekularen Mechanismen der Tumorigenese und Metastasierung bisher wenig bekannt. Somit ist die Identifizierung von Genen, die in diesen Prozessen eine Rolle spielen von größter Bedeutung. Die Entdeckung und Charakterisierung von solchen Molekülen liefert nicht nur ein besseres Verständnis zur Biologie der Tumorprogression, sondern bietet auch neue Angriffspunkte, um therapeutische Strategien in der Tumorbehandlung zu entwickeln.

1.1 Melanozytäre Läsionen

Das Melanom (gr. *melan*, schwarz; gr. *-om*, Geschwulst) ist ein maligner Tumor neuroektodermalen Ursprungs, der aus den pigmentbildenden Melanozyten der Haut entsteht. Seltener kommt er in der Schleimhaut (*Mukosa*), der Aderhaut (*Choroidea*) und der Hirnhaut (*Meningen*) vor (Riede und Schaefer, 1993).

Die Melanozyten sind zur Melaninbildung befähigte Zellen in der Basalschicht (*Stratum basale*) der Epidermis und geben das Melaninpigment in Form von Melanosomen an die

Keratinocyten ab. Ein Melanozyt ist mit seinen langen, dendritischen Ausläufern mit 20-30 Keratinocyten verbunden, die er mit Melanosomen versorgt. Die Keratinocyten nehmen die Melanosomen endozytotisch auf und lagern das Melaninpigment ein, um die Chromosomen vor ultraviolettem Licht zu schützen. Melanozyten haben als Antwort auf die Stimulation mit UV-Licht ihre Fähigkeit zur Proliferation behalten (Jimbow *et al.*, 1975), treten aber selten zusammengelagert in der Haut auf.

In den Nävi (lat. *naevus*, Mal) dagegen, die aufgrund ihres scharf begrenzten Wachstums als gutartige Läsionen der Haut bezeichnet werden, treten die Melanozyten oft in Nestern auf. Sie haben histologisch keine erkennbaren Dendriten mehr und behalten ihr Melanin oft im Zytoplasma zurück, woher ihre dunkle Pigmentierung zustande kommt. Nävi können angeboren sein (kongenitale Nävi) oder erworben werden, wobei man bei den letzteren nach ihrer Entwicklung und Lokalisation unterscheidet. Bei Kindern liegen die Nävi zwischen Epidermis und Dermis, man spricht von einem Grenzflächen- oder *Junktions*-Nävus. Im Laufe des Nävuswachstums wandern diese nesterartig wachsenden Zellen in das *Stratum papillare* ab, wodurch der epidermodermale oder zusammengesetzte (*Compound*-) Nävus entsteht (Riede und Schaefer, 1993). Beim Erwachsenen befinden sich die Nävuszellen meist nur noch in der Dermis (intradermaler Nävus) (Elder *et al.*, 1981).

Der dysplastische Nävus stellt eine mögliche Übergangsform zwischen den benignen und malignen Neoplasien dar (Clark *et al.*, 1984; Friedman *et al.*, 1985; Seykora und Elder, 1996). Auch hier unterscheidet man zwischen der erblichen und der sporadisch erworbenen Form der Läsion. Bei dem erblich bedingten dysplastischen Nävussyndrom (Greene *et al.*, 1985) treten die flachen, großen Nävi meist nach Ende der Pubertät auf und vergrößern sich bis Ende des zweiten Lebensjahrzehnts. In der 4. bis 5. Dekade können nochmals Wachstumsschübe der dysplastischen Nävi auftreten. Diese Phase ist dann besonders kritisch und führt oft zur Entstehung eines malignen Melanoms (Riede und Schaefer, 1993).

Das Melanom zeichnet sich durch seine hohe Metastasierungsfähigkeit aus, nach der es auch klassifiziert werden kann (McGovern *et al.*, 1986; Schuchter, 2001). Grundsätzlich unterscheidet man zwischen horizontal wachsenden Melanomen, die meist eine geringere Wachstumsrate besitzen und den schneller wachsenden Melanomen, die sich vorwiegend vertikal ausbreiten. Zu den horizontal wachsenden Melanomen zählt man das *Superfiziell*-

Spreitende-Melanom, das etwa 65% aller malignen Melanome ausmacht und das *Lentigo-Maligna-Melanom*, das eine Melanomvariante auf sonnengeschädigter Haut darstellt. Solange die Basalmembran noch nicht durchbrochen ist, spricht man von einem *Melanoma in situ*. Vertikal wachsende Melanome, wie das *Noduläre Melanom*, durchbrechen die Basalmembran ohne eine vorhergehende horizontale Wachstumsphase sehr schnell (Riede und Schaefer, 1993). Dementsprechend korreliert eine zunehmende vertikale Dicke des Tumors mit einer zunehmend schlechten Prognose für den Patienten (Breslow, 1970). So liegt die 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei einer Tumordicke unter 0,75 mm bei 98% und sinkt bei einer Tumordicke über 3 mm auf 30%.

Als Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung eines Melanoms gilt die Gesamtzahl der Nävi, die Anzahl der dysplastischen Nävi, eine helle Haut- und Haarfarbe und eine - besonders in der Kindheit - intensive UV-Exposition (Herlyn *et al.*, 2001).

1.2 Genetische Veränderungen während der Tumorigenese

Die Entwicklung eines Tumors kann formell mit der Darwinschen Evolutionslehre verglichen werden, in der genetische Veränderungen in einer Zelle und deren Manifestierung einen Wachstumsvorteil bedingen, der dann selektioniert wird, bis eine normale Zelle zu einer Krebszellen entartet (Foulds, 1954; Nowell, 1976). Dabei sind mehrere unabhängige Mutationseignisse innerhalb der Zelle nötig, damit sich die Transformation zu einem malignen Phänotyp vollziehen kann (Bishop, 1991). Aber auch epigenetische Effekte wie DNA-Methylierung mit ihrer Auswirkung auf die Genexpression (Lewin, 1998; Baylin und Herman, 2000) sowie Zell-Zell-Interaktionen spielen bei diesem Prozess eine wichtige Rolle (Ponder, 2001). Von Hanahan und Weinberg wurde vorgeschlagen, dass unabhängig von der Art des Tumors, sechs grundsätzliche Veränderungen der normalen Zellphysiologie vollzogen werden müssen, damit die Zellen ein malignes Wachstum zeigen. Diese sind: Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, Nicht-Ansprechen auf wachstumsinhibitorische Signale, Entkommen von dem programmierten Zelltod (Apoptose), unbegrenzte Proliferation, Aufrechterhaltung der Angiogenese und Einwanderung in die Gewebe mit folgender Metastasierung (Hanahan und Weinberg, 2000). Die einzelnen Mechanismen und die Reihenfolge der Mutationen können dabei sehr unterschiedlich sein.

Zum einen können Gene aktiviert werden, welche die Zellproliferation begünstigen. Solche Mutationen wirken sich phänotypisch oft bei der Veränderung eines Allels aus und haben deshalb einen dominanten Charakter. Für die Zellen spricht man dann von einer *gain of function* (Park, 1998). Das mutierte Allel wird als Onkogen (*gr.* onkos, Tumor), das entsprechende Wildtyp-Allel als Proto-Onkogen bezeichnet (Bishop, 1981; Bishop, 1996). Viele Proto-Onkogene sind Moleküle der Signaltransduktion, die z.T. als Homologe von transformierenden Viren identifiziert wurden. Das erste gefundene Molekül war das Src-Gen, des *Rous sarcoma virus*, eine Tyrosinkinase, die auch in normalen Zellen vorkommt (Duesberg und Vogt, 1970; Stehelin *et al.*, 1976; Spector *et al.*, 1978). Weitere Gene wurden durch Transfektionsexperimente von normalen Zellen mit fragmentierter DNA aus Tumorzellen identifiziert, wie z.B. das Ha-ras-Gen (Parada *et al.*, 1982). Es können auch Proto-Onkogene durch chromosomale Translokationen aktiviert werden wie z.B. c-Myc im Burkitt-Lymphom oder Bcr-Abl in der chronischen myeloischen Leukämie (Maru und Witte, 1991; Rabbitts, 1994; Mitelman *et al.*, 1997). Mittlerweile ist die Liste der Proto-Onkogene lang (Park, 1998) und umfasst Serin-, Threonin- und Tyrosinkinasen (Hunter, 2000; Blume-Jensen und Hunter, 2001), GTPasen wie z.B. Ras, Rac und Rho (Exton, 1998) und Adapterproteine wie Crk (Mayer und Hanafusa, 1990) und Nck (Lee *et al.*, 1993) sowie Transkriptionsfaktoren wie Jun, Fos und Myc (Bohmann *et al.*, 1987; Lewin, 1991).

Zum anderen gibt es neben den *gain of function* Mutationen auch *loss of function* Mutationen, bei denen ein Gen mit antiproliferativen Eigenschaften inaktiviert wird. Zur Inaktivierung müssen oft beide Allele mutiert sein, d.h. es handelt sich um rezessive Gene (Comings, 1973). Da ihr Verlust zur Manifestierung der Tumoreigenschaften nötig ist, werden sie auch als Tumorsuppressorgene bezeichnet (Sager, 1989; Weinberg, 1991; Knudson, 1993). Das erste identifizierte Tumorsuppressorgen war das Retinoblastomgen (Rb) (Cavenee *et al.*, 1983; Sparkes *et al.*, 1983), das zusammen mit p53 im Zentrum der Zellzyklus- und Apoptoseregulation steht. Rb ist ein nukleäres Phosphoprotein, das den Zellzyklus beeinflusst. In ruhenden Zellen (G_0/G_1), ist Rb hypophosphoryliert und bindet den Transkriptionsfaktor E2F und die Histon-Deazetylase HDAC1. In dem Komplex E2F-Rb-HDAC1 ist HDAC1 aktiv und deazetyliert die Histone. Dadurch nimmt die DNA einen kompakten Zustand an und ist nicht für Transkriptionsfaktoren zugänglich wodurch wiederum die Genexpression blockiert ist (DePinho, 1998). Zusätzlich ist der Transkriptionsfaktor E2F gebunden, der zusammen mit DP1 als Heterodimer Gene wie

Myc, DNA-Polymerase- α , Thymidinkinase, Dihydrofolat-Reduktase und p19^{ARF} aktiviert, die zum Eintritt in die S-Phase des Zellzyklusses nötig sind (Johnson *et al.*, 1993; Wagener, 1999; Evan und Vousden, 2001). Äußere Faktoren (Wachstumsfaktoren, Steroide, Zelladhäsion und extrazelluläre Matrixbestandteile) können über verschiedene Rezeptoren (Tyrosinkinase-Rezeptoren, TGF- β -Rezeptoren, G-Protein gekoppelte Rezeptoren) die Cyclin abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 aktivieren. Die Aktivierung der CDKs kommt durch eine Reihe von Ereignissen wie deren Phosphorylierung, der Assoziation mit den D-Cyclinen und durch die Freisetzung der Cyclin dependent Kinase Inhibitoren (CKI) zustande. Die CDKs phosphorylieren dann ihrerseits Rb (Hinds *et al.*, 1992), wodurch E2F und HDAC1 freigesetzt werden und der Eintritt in die S-Phase des Zellzyklusses stattfinden kann (Weinberg, 1995).

Auch p53 ist ein Tumorsuppressorgen (Finlay *et al.*, 1989), wobei seine wichtigste Aufgabe darin besteht, die genomische Integrität der Zellen zu überprüfen und bei vorhandenen Schäden entweder den Zellzyklus zu blockieren oder die Apoptose einzuleiten (Lane, 1992). Zellen, die einen reparablen Schaden der DNA haben, werden im Zellzyklus angehalten (Livingstone *et al.*, 1992; Yin *et al.*, 1992) wodurch Zeit vor der nächsten Replikation gewonnen wird, um die Schädigungen zu reparieren. Der Zellzyklusblock wird dadurch bewirkt, dass p53 als Transkriptionsfaktor die Expression des CDK-Inhibitors p21^{CIP} bewirkt, der wiederum D- und E-Cyclin-abhängige-Kinasen blockiert (Harper *et al.*, 1993), sodass Rb hypophosphoryliert bleibt und die Zellen nicht in die S-Phase eintreten können. Außerdem wird durch p21^{CIP} und das ebenfalls durch p53 induzierte Gen GADD45 (growth arrest and damage dependent) das PCNA (proliferating cell nuclear antigen), eine Untereinheit der DNA-Polymerase- δ gebunden, wodurch die DNA-Replikation in der S-Phase blockiert wird (Di Cunto *et al.*, 1998). Weitere proliferationsfördernde Gene wie Fos, Jun, Interleukin-6 und das antiapoptotische Molekül Bcl2 werden durch Bindung des TATA-Box-Binding Proteins (TBP) auf Transkriptionsebene durch p53 blockiert (Ko und Prives, 1996). Bei irreparablen DNA-Schäden wird die Apoptose eingeleitet (Yonish-Rouach *et al.*, 1991; Symonds *et al.*, 1994) indem p53-vermittelt das proapoptotische Gen Bax transkribiert wird, welches wiederum Bcl2 hemmt (s.u.).

Die meisten Tumore besitzen inaktivierte Rb- und p53-Signalwege, da dadurch die Zellzyklusregulation und die Apoptosewege unterbrochen sind (Chin *et al.*, 1998). So liegt

p53 in über 55% der menschlichen Tumoren mutiert vor (Greenblatt *et al.*, 1994) und auch sein wichtigster physiologischer Inhibitor MDM2 (murine double minute chromosome-2) ist in ca. einem Drittel aller humanen Sarkome amplifiziert (Oliner *et al.*, 1992). Im Gegensatz zu den anderen Tumoren wird die Rolle von p53-Mutationen beim Melanom in der Literatur recht kontrovers diskutiert. So beschreiben einige Arbeitsgruppen eine sehr niedrige Inzidenz für Punktmutationen oder den allelischen Verlust (Castresana *et al.*, 1993; Albino *et al.*, 1994; Lubbe *et al.*, 1994; Papp *et al.*, 1996) und können keine Korrelation zwischen der p53-Überexpression und den Stadien der Melanomprogression feststellen (Rhim *et al.*, 1994; Essner *et al.*, 1998). Andere Arbeitsgruppen hingegen beschreiben p53-Mutationsraten von 15% bis 25% in Primärtumoren und Metastasen (Akslen *et al.*, 1998; Zerp *et al.*, 1999) und wieder andere Arbeitsgruppen sehen eine Korrelation zwischen dem p53-Verlust und der Tumorprogression (Grant *et al.*, 1998). Insgesamt scheint aber die Bedeutung von p53-Mutationen beim Melanom aufgrund der geringeren Mutationsraten eine eher untergeordnete Rolle zu spielen.

In relativ wenigen Tumoren wie Retinoblastomen, Osteosarkomen und dem kleinzelligen Lungenkarzinomen ist das komplette Rb-Gen deletiert oder mutiert. Dagegen ist in der Mehrzahl der menschlichen Tumoren, die ein defektes Rb-Protein besitzen, dieses durch Phosphorylierung inaktiviert (Wagener, 1999). So wurde z.B. eine Überexpression von D1-Cyclinen in Adenomen, zentrozytischen B-Zell-Lymphomen sowie in Mamma-, Oesophagus- und Magenkarzinomen beschrieben, die durch verschiedene chromosomale Translokationen und der damit verbundenen konstitutiven Aktivierung des D1-Zyklingens (CCND1) zustande kommt (Hall und Peters, 1996; Sherr, 1996). Analog dazu wurde beschrieben, dass eine Überexpression der CDK4 zu einer malignen Transformation führen kann (Hall und Peters, 1996).

Beim Melanom wurde für drei Familien mit genetischer Disposition zum Melanom, Keimbahnmutationen im CDK4-Lokus (Chromosom 12q14) beschrieben (Greene, 1999). Es gibt jedoch andere Melanom-Familien, bei denen der CDK4-Lokus intakt ist.

Deshalb wird aufgrund von zytogenetischen-, molekularen- und funktionellen Studien vermutet, dass noch weitere Gene für die Melanomentstehung verantwortlich sind, die in den chromosomalen Regionen 1p, 6q, 7p, 11p und eventuell 10q liegen (Pollock und Trent, 2000). Eine besondere Bedeutung für die Tumorigenese beim Melanom hat jedoch der Genlokus 9p21, der bei 20% aller Familien mit erblicher Disposition für ein Melanom, Keimbahnmutationen aufweist (Hussussian *et al.*, 1994). Er ist außerdem bei 75% aller

kultivierten humanen Zelllinien deletiert oder rearrangiert (Nobori *et al.*, 1994) und gehört zu den Genloci, die sehr häufig bei menschlichen Tumoren mutiert sind (Rocco und Sidransky, 2001), bzw. deren Genprodukte durch Methylierung nicht mehr transkribiert werden können (Hall und Peters, 1996). In einem Knockout-Mausmodell konnte direkt gezeigt werden, dass dieser Locus die Fähigkeit besitzt, neoplastisches Wachstum zu verhindern (Serrano *et al.*, 1996).

Die Bedeutung dieses Locus in der Tumorigenese besteht darin, dass er durch zwei verschiedene Leserahmen für Genprodukte codiert, die sowohl den Rb- als auch den p53-Signalweg beeinflussen (Zhang *et al.*, 1998). Ein Leserahmen codiert für den Cyclin-abhängigen-Kinase-Inhibitor p16^{Ink4a} (oder CDKN2A), der CDK4 und CDK6 blockiert. Beide Kinasen sind für die Hyperphosphorylierung von Rb bei der G₁/S-Transition nötig (Serrano *et al.*, 1995). Der zweite Leserahmen codiert für den Tumorsuppressor ARF (alternative reading frame), der zu p16^{Ink4a} strukturell nicht verwandt ist (Quelle *et al.*, 1995; Kamijo *et al.*, 1997; Chin *et al.*, 1998). In Mäusen hat das Genprodukt von ARF ein Molekulargewicht von 19 kDa und wird als p19^{ARF} bezeichnet, bei dem Menschen ist es 14 kDa groß und wird demnach als p14^{ARF} bezeichnet. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass p19^{ARF} sowohl p53 als auch MDM2 bindet (Kamijo *et al.*, 1998) und die MDM2 vermittelte Blockade von p53 aufhebt (Pomerantz *et al.*, 1998). Außerdem verhindert p19^{ARF} die MDM2 vermittelte Proteolyse von p53 und beschleunigt dagegen die MDM2-Degradierung (Zhang *et al.*, 1998). Dies konnte mittlerweile auch für den humanen CDKN2A Locus und sein Genprodukt p14^{ARF} gezeigt werden (Stott *et al.*, 1998). Somit bewirkt ein Verlust von p14^{ARF}/p19^{ARF}, eine hohe MDM2-Konzentration und wenig aktives p53 (Prives, 1998).

Des Weiteren konnte Ras (Chin *et al.*, 1997) und Myc (Steiner *et al.*, 1995) eine Rolle in der Tumorigenese beim Melanom zugeschrieben werden. Es konnte kürzlich in einem Maus-Melanommodell gezeigt werden, dass RAS-induzierte Melanome in einer p53-Knockoutmaus, klinisch nicht von Melanomen in p16^{Ink4a}-Knockoutmäusen zu unterscheiden waren. Zusätzlich war die Rb-vermittelte G₁/S-Transition mit den beteiligten Genen (unter anderem c-Myc, Cyclin D1, und p21^{CIP}) verändert, weshalb vermutet wurde, dass normalerweise sowohl der Rb- als auch der p53-Signalweg melanozytäre Transformation *in vivo* verhindern (Bardeesy *et al.*, 2001). Dies ist insofern von besonderer Bedeutung, da die Rolle von p53 in der Tumorigenese des Melanom bisher recht

kontrovers diskutiert wurde und nun ein weiterer Hinweis gebracht wurde, dass die p53-Signalwege daran beteiligt sind.

Trotz der Identifizierung verschiedener Onkogene bzw. Tumorsuppressorgene im Melanom, ist bisher kein Gen beschrieben worden, das in der Mehrheit aller Melanome verändert exprimiert oder mutiert ist. Vermutlich gibt es deshalb noch weitere wichtige, bisher nicht identifizierte Gene, die eine Bedeutung in der Tumorigenese des Melanoms haben.

1.3 Veränderte Genexpressionen während der Metastasierung

Die bisher beschriebenen Gene spielen während der Tumorigenese eine wichtige Rolle, besonders der Genlokus p16^{Ink4a}-ARF, der in der frühen Phase der malignen Transformation von Bedeutung ist (Saida, 2001). Wie zuvor beschrieben, ist jedoch für die Mortalität beim Melanom hauptsächlich dessen Metastasierung verantwortlich. Für eine erfolgreiche Metastasierung müssen die Tumorzellen eine ganze Reihe von Veränderungen durchlaufen, wodurch sie im Vergleich zu ihren Primärtumoren ein teilweise verändertes Genexpressionsmuster besitzen. So müssen sich die Tumorzellen von dem 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 entstehenden Tumor zu versorgen.

1.3.1 Zelladhäsionsmoleküle im Metastasierungsprozess

Adhäsionsmoleküle haben eine tragende Rolle in der Aufrechterhaltung des Zellverbandes und besitzen eine wichtige Funktion bei dem Wanderungsprozess von Zellen. Während des Metastasierungsprozesses werden einige Zelladhäsionsmoleküle deshalb vermindert, andere verstärkt exprimiert.

Eines der ersten Ereignisse im Metastasierungsprozess ist die Auflösung des Zellverbandes (Fidler und Hart, 1982). E-Cadherin (epithelial) vermittelt eine Ca²⁺ abhängige homophile Adhäsion zwischen Epithelzellen (Takeichi, 1990) und spielt eine tragende Rolle in der Integrität des Zellverbandes. In den meisten epithelialen Tumoren ist entweder seine Expression herunterreguliert oder seine Funktion gestört (Buck, 1995). In der Tumorigenese des Melanoms hat E-Cadherin insofern eine besondere Bedeutung, da es das Hauptadhäsionsmolekül für die Interaktion zwischen den Melanozyten und Keratinozyten

darstellt. *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 eine 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 (Danen *et al.*, 1996), vermutlich um einen neuen Zellverband aufzubauen.

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), dessen physiologische Liganden Thrombospondin, Fibronectin und das endotheliale Adhäsionsmolekül VCAM1 sind. Die Expression von VLA4 korreliert mit einer schlechten Prognose für Patienten mit einem malignen Melanom (Schadendorf *et al.*, 1995), da wahrscheinlich die Einwanderung der melanozytären Zellen in das Gewebe erleichtert wird.

Muc18/MCAM/Mel-Cam/CD146 gehört zu der dritten großen Gruppe von Adhäsionsmolekülen, der Immunglobulin-Superfamilie und ist ebenfalls verstärkt während des Metastasierungsprozess exprimiert. MCAM (melanoma cell adhesion molecule) ist als Melanomantigen identifiziert worden, da es gering auf Nävi und Primärtumoren, jedoch stark auf Melanomen exprimiert wurde. Die Zunahme seiner Expression korreliert mit der zunehmenden vertikalen Dicke des Melanoms und einer schlechten Prognose für den Patienten (Lehmann *et al.*, 1987; Lehmann *et al.*, 1989). (Schlagbauer-Wadl *et al.*, 1999)

Nicht nur während des Ablösens vom Primärtumor, der Ein- und Auswanderungsprozesse und der Bildung neuer Tumornester haben die Adhäsionsmoleküle eine Bedeutung im Metastasierungsprozess, sondern auch durch ihre Adhäsionsvermittlung an extrazelluläre Matrixproteine. Diese Interaktion ist wie auch der Zell-Zell-Kontakt für die meisten normalen Zellen zum Überleben und für das Wachstum nötig (*anchorage dependence*). Ist dieser Kontakt gestört, sterben normale endotheliale und epitheliale Zellen durch Apoptose (Ishizaki *et al.*, 1995; Giancotti und Ruoslahti, 1999), was auch *Anoikis* genannt wird (Frisch und Francis, 1994). In diesem Zusammenhang konnte kürzlich gezeigt werden, dass ein gestörter Kontakt zu den extrazellulären Matrixproteinen eine Fas-induzierte Apoptose bei epithelialen Zellen auslösen kann (Aoudjit und Vuori, 2001). Solche

Signalwege, die ebenfalls von den Zelladhäsionsmolekülen vermittelt werden (Aplin *et al.*, 1998), muss der Tumor ausschalten, um zu überleben. So können Mutationen zur Inaktivierung der Apoptosewege die Adhäsionsmoleküle selbst oder deren Signalmoleküle betreffen.

Die Signaltransduktion der E-Cadherine verläuft über die β -Catenine, mit denen sie zytoplasmatisch assoziiert sind. Die β -Catenine wiederum stellen über α -Catenin den Kontakt zum Aktin-Zytoskelett her. Außerdem können nach E-Cadherininteraktion wachstumshemmende Signale zu den Lef/Tcf Transkriptionsfaktoren des *wnt-wingless* Signalweges liefern (Christofori und Semb, 1999), die normalerweise für die anterior-posterior sowie dorsal-ventral Achsenausbildung in der Embryonalentwicklung nötig sind. Für Karzinome wird diskutiert, dass die Aktivierung des *wnt*-Signalweges 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 und Beachy, 2001).

Neben E-Cadherin könnte in diesem Zusammenhang auch das Integrin $\alpha 5 \beta 1$, ein spezifischer Rezeptor für Fibronectin, eine wichtige Rolle spielen. $\alpha 5 \beta 1$ vermittelt wachstumshemmende Signale in die Zellen und ist in vielen Tumoren gering exprimiert. Eine Überexpression von $\alpha 5 \beta 1$ bewirkte dagegen eine verminderte Tumorigenität der Zellen (Giancotti und Ruoslahti, 1990; Varner *et al.*, 1995).

In einer späteren Phase der Metastasierung werden dann verstärkt solche Adhäsionsmoleküle exprimiert, die durch ihren Kontakt zu den extrazellulären Matrixproteinen wachstumsfördernde Signale vermitteln (Lukashev und Werb, 1998; Giancotti und Ruoslahti, 1999). So wurde z.B. nach einer MCAM-Stimulation bei Zelllinien die Aktivierung der *focal adhesion kinase* (FAK) beobachtet (Anfosso *et al.*, 1998), die an Prozessen wie Migration, Adhäsion und der Übertragung von Matrix-Überlebenssignalen beteiligt ist (Liotta und Kohn, 2001).

1.3.2 Auflösung der Gewebebarrieren

Die sich vom Primärtumor ablösenden metastasierenden Zellen müssen nicht nur den Zell-Zell- und Matrixkontakt lösen, sondern auch eine Reihe von Zellbarrieren und die Basallamina durchdringen. Defekte in der Basalmembran sind bei allen soliden Tumoren

mit einer Invasivität und Metastasierung assoziiert (Barsky *et al.*, 1983). Das Durchdringen der Gewebebarrieren erreichen die Tumorzellen durch eine verstärkte Expression von diversen proteolytischen Enzymen wie Heparanasen, Serin-, Cystein-, Carboxyl-, Thiol- und Metalloproteasen (Liotta *et al.*, 1980; Coussens und Werb, 1996; Liotta und Kohn, 2001). Zusätzlich können Inhibitoren von solchen Proteasen herunterreguliert werden und inaktive zymogene Formen der Proteasen in aktive überführt werden (Hanahan und Weinberg, 2000). So wurden den TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) (Carmichael *et al.*, 1986) und PAIs (*plasminogen activator inhibitors*) Metastasierungsunterdrückende Eigenschaften zugeschrieben. Außerdem wird die Rolle der Proteasen auch in anderen Prozessen der Tumorigenese und Metastasierung wie der Angiogenese (Stetler-Stevenson, 1999) und der Proteolyse von extrazellulären Oberflächenmolekülen (und der damit verbundenen Vermittlung von Signalen während des Wachstums) diskutiert (Werb, 1997; Bergers und Coussens, 2000).

1.3.3 Autokrines Wachstum des Tumors

Nachdem sich die Tumorzellen vom Primärtumor abgelöst haben und durch das umliegende Gewebe in Blut- oder Lymphgefäße eingewandert sind, können sie an anderer Stelle wieder auswandern und dort eine neue Tumorkolonie bilden. Dabei werden autokrine Wachstumsfaktoren verstärkt exprimiert, um unabhängig von exogenen Faktoren wachsen zu können (Rodeck, 1993; Lu und Kerbel, 1994). So können z.B. Glioblastome und Sarkome Wachstumsfaktoren wie PDGF (*platelet-derived growth factor*) und TGF α selbst produzieren (Fedi *et al.*, 1997). Eine andere Strategie ist die verstärkte Expression von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, um eine erhöhte Sensitivität gegenüber den vorhandenen Wachstumsfaktoren zu erreichen. So sind z.B. die Rezeptoren für Wachstumsfaktoren EGF-R/*erbB* in Gehirntumoren, Magen-, Mammakarzinomen und HER2/*neu* in Magen- und Mammakarzinom überexprimiert (Slamon *et al.*, 1987; Yarden und Ullrich, 1988). Zusätzlich können sich auch Mutationen in den Signalwegen der Wachstumsrezeptoren durch eine verstärkte Proliferation der Tumorzellen auswirken (Blume-Jensen und Hunter, 2001).

1.3.4 Supprimierung der Immunantwort

Bei allen Prozessen der Tumorigenese und Metastasierung müssen die Tumorzellen den Angriffen des Immunsystems entkommen. Das kann der Tumor durch eine Reihe von Strategien erreichen. Die wichtigsten Mechanismen sind dabei, Tumorantigene, MHC-I-Moleküle sowie Adhäsionsmoleküle nicht mehr zu exprimieren. Der Tumor kann auch die TCR-vermittelte Signaltransduktion herunterregulieren oder die Tumor-infiltrierenden T-Lymphozyten durch Apoptose eliminieren. Zusätzlich kann der Tumor den Patienten aktiv durch Substanzen wie z.B. TGF- β lokal immunsupprimieren (Rosenberg, 2001).

1.3.5 Apoptoseresistenz

Letztendlich muß der Tumor auch seine Resistenz gegenüber der Apoptose erhöhen, die in vielen Stadien der Tumorigenese und Metastasierung zur Begrenzung des Wachstums induziert werden kann und folglich vom Tumor unter Kontrolle gebracht werden muss.

Die Apoptosemaschinerie kann grob in zwei Bereiche unterteilt werden, die Sensoren und die Effektoren. Zu den Sensoren gehören zum einen die Zelladhäsionsmoleküle, die bei einem Anker-Verlust (*anchorage dependence*) Apoptose auslösen können (siehe auch Kap. 1.3.1), zum anderen aber auch Rezeptoren der TNF-Familie wie der TNF-Rezeptor, Fas-Rezeptor (CD95/Apo1) und TRAIL-Rezeptor (DR, death receptor) (Ashkenazi und Dixit, 1999). Ein anderer bereits erwähnter Sensor ist p53, der für die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität nach DNA-Schäden verantwortlich ist. Die Sensoren geben ihre Signale über Adaptermoleküle an spezifische Proteasen (Caspasen) weiter, die als Effektoren der Apoptose fungieren.

Ein wichtiger Signalweg der Apoptose wird über den Fas-Rezeptor vermittelt. Der Fas-Rezeptor trimierisiert nach Fas-Ligandbindung und rekrutiert als Adaptermolekül FADD (Fas associated death domain), das wiederum die Procaspase-8 aktiviert. Dadurch werden in einer Caspasekaskade die Effektorcaspasen aktiviert (Ashkenazi und Dixit, 1998), die letztendlich Strukturproteine (z.B. Actin, Zytokeratin-18, Laminine) sowie Signalproteine (MEKK1, PKCd, MDM2, Rb) spalten und die DNA fragmentieren (Tan und Wang, 1998). Ein zweiter wichtiger Signalweg der Apoptosekaskade geht über die Mitochondrien. Antiapoptotische Moleküle der Bcl2-Familie (Bcl2, Bcl-X_L, CED9) sind in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und verhindern die Freisetzung von 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 von 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, die dann wiederum die Effektorcaspasen rekrutiert (Adams und Cory, 1998; Hengartner, 2001)

Der Tumor hat bei der Vielfalt von Molekülen, die in der Auslösung und Ausführung der Apoptose beteiligt sind, auch dementsprechend viele Möglichkeiten, die Signalkaskaden zu unterbrechen. Auf eine Veränderung der Adhäsionsmoleküle, sowie Mutationen in den p53- und Rb-Signalwegen wurde schon eingegangen. Des Weiteren sind die Apoptose-Suppressoren Bcl2 und Bcl-X_L 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 – der wachstumsfördernde Signale von Wachstumsfaktor-Rezeptoren übermittelt – proapoptotische Signale gehemmt. Die Aktivierung des PI3-AKT Signalweges kann durch IGF1/2 oder I13 (Evan und Littlewood, 1998), durch eine Überexpression von Ras (Downward, 1998) oder durch den Verlust des PTEN-Tumorsuppressor zustande kommen. PTEN ist eine Phospholipid-Phosphatase, die die von AKT vermittelten Überlebenssignale hemmt (Cantley und Neel, 1999). Der Verlust von PTEN auf Chromosom 10q23.3 wurde auch für Melanome beschrieben und scheint in der späteren Phase der Tumorentwicklung eine Rolle zu spielen (Saida, 2001).

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. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass sowohl die Expression von Fas als auch von TRAIL-Rezeptoren durch ultraviolettes Licht, einem Hauptrisikofaktor zur Entstehung des Melanoms, herunterreguliert werden kann (Bachmann *et al.*, 2001).

Eine ganz andere Strategie, der Apoptose zu entgehen, wurde kürzlich ebenfalls für das Melanom beschrieben. Soengas *et al.*, beobachteten eine geringe Expression des Apoptoseeffektors Apaf1 in verschiedenen Proben von Melanomgeweben. In mehr als 40% der getesteten Melanome war eine LOH (*loss of heterozygosity*) zu beobachten. Dabei kam die verminderte Expression von Apaf1 auf dem verbleibenden Allel durch

epigenetisches gene silencing zustande. Durch die Behandlung der Melanomzellen mit Inhibitoren der Methyltransferase oder Inhibitoren der Histon-Deazetylase stieg die Apaf1-Expression wieder an. Allerdings war der Promotor von Apaf1 nicht verändert methyliert, sodass der genaue Mechanismus dieser Inaktivierung noch nicht geklärt ist (Soengas *et al.*, 2001). Die Arbeit ist aber insofern von Bedeutung, da sie eine Inaktivierung des p53-Signalweges *downstream* von p53 aufzeigt und somit eine mögliche Erklärung der Resistenz von Melanomen gegenüber Chemotherapeutika, auch bei nicht mutiertem p53, bietet. Aber auch *upstream* von p53 wurde *genesilencing* zur Inaktivierung von Molekülen im p53-Apoptosesignalweg gezeigt. So ist z.B. der Promotor des p53 stabilisierenden Moleküls p14^{ARF} und der *death associated proteine kinase* (DAPK), die p14^{ARF} aktiviert (Saida, 2001; Raveh *et al.*, 2001), in Tumoren verstärkt methyliert (Jones, 2001).

Neben der Inaktivierung von proapoptotischen Sensor-, Signal- und Effektor-Molekülen 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_L) gibt es eine Gruppe von apoptoseinhibierenden Molekülen, den sogenannten IAPs (*inhibitors of apoptosis*), die ursprünglich in Bakuloviren aufgrund ihres antiapoptotischen p35-Genproduktes identifiziert wurden (Birnbaum *et al.*, 1994). Homologe von IAPs mit einem charakteristischen Baculovirus-IAP-Motiv wurden dann auch in Vertebraten gefunden (LaCasse *et al.*, 1998).

1.3.6 Veränderung der Zellmobilität

Abschließend seien noch einige Gene erwähnt, die mit der Metastasierung von Melanomen assoziiert sind und mit der Zellmobilität in Verbindung gebracht werden.

Das Metastasensuppressorgen nm23 wurde durch subtraktive Hybridisierung zwischen metastasierenden und nicht metastasierenden Melanomzelllinien identifiziert. Der Verlust der nm23-Expression ist mit dem metastatischen Potential von einigen Tumoren im späten Stadium assoziiert (Freije *et al.*, 1998). Nm23-Melanomzelltransfektanten reduzierten die Tumorinzidenz, 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).

In einer anderen Studie wurden Melanomzellen *in vivo* auf ein hohes Metastasierungspotential selektioniert und anschließend in einer vergleichenden genomischen Analyse mit den niedrig metastasierenden, parental Melanomzellen verglichen. Es wurde die kleine GTPase RhoC in den stark metastasierenden Melanomzellen als überexprimiert identifiziert. Eine normale physiologische Funktion von RhoC ist die Regulation des 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).

Mit einer subtraktiven Hybridisierung wurde das Metastasen-Suppressorgen KiSS1 identifiziert (Lee *et al.*, 1996), das Metastasen im humanem Melanom (Lee und Welch, 1997) und Brustkarzinom supprimiert (Lee und Welch, 1997) und in einigen Tumorzellen geringer exprimiert ist. Kürzlich wurde die Funktion von KiSS1 aufgeklärt und ein möglicher Mechanismus für die Tumorsuppression diskutiert (Ohtaki *et al.*, 2001). Das KiSS-Genprodukt, auch *Metastin* genannt, wurde als extrazellulärer Peptidligand eines G-Protein gekoppelten Orphan-Rezeptors gefunden. Metastin inhibierte die Zellmobilität von rezeptortragenden Tumorzelllinien *in vitro* und konnte die Fibronectin-induzierte Chemotaxis stabiler Kiss1-Rezeptor-Transfektanten in Melanomzelllinien inhibieren. Die den KiSS-Rezeptor exprimierenden Transfektanten aktivierten nach Metastinbehandlung die *focal adhesion kinase* (FAK) und bildeten Adhäsionsfoci. *In vivo* konnte die beginnende Metastasierung von den KiSS-Rezeptor tragenden Melanomzelllinien durch Metastingabe drastisch reduziert werden (Ohtaki *et al.*, 2001).

1.4 Identifizierung von Metastasierungs-assoziierten Molekülen mit Hilfe der *mRNA differential display*-Methode

Der Vielzahl von Genen und Molekülen, die in den soeben beschriebenen Prozessen der Tumorigenese und Metastasierung involviert sein können, steht die relativ kleine Anzahl an Genen gegenüber, für die gezeigt werden konnte, dass sie wahrscheinlich an dem Metastasierungsprozess des Melanom beteiligt sind. Dabei handelt es sich um die GTPase RhoC und das Metastasen-Suppressorgen KiSS1, bei denen jeweils in Mausmodellen eine Metastasierungs-Assoziation gezeigt werden konnte (siehe auch Kap. 1.3.6).

Jedoch sind die meisten Gene in heterologen Systemen identifiziert worden, bei denen humane Tumoren in verschiedenen Mausmodellen untersucht wurden. Um nun direkt in humanen Tumoren Metastasierungs-assoziierte Gene des Melanoms zu identifizieren, wurde in unserem Labor eine *mRNA differential display*-Analyse durchgeführt. Dabei wurde das Expressionsmuster von Zelllinien verglichen, die aus dem Primärtumor und der Metastase desselben Patienten generiert wurden (Kuske, 1998).

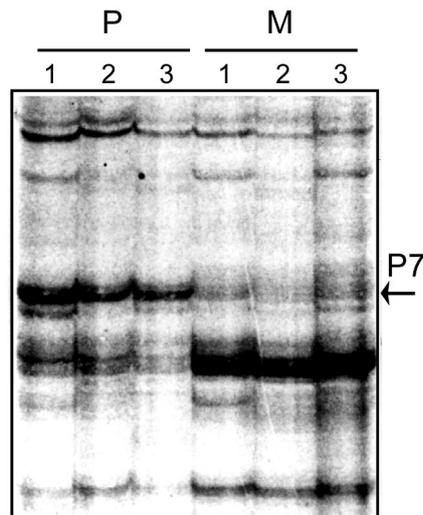


Abb. 1.1 *mRNA differential display*-Analyse. In jeweils drei Parallelreaktionen (1-3) wurde die mRNA von Zelllinien, generiert aus einem Primärtumor (P) und aus der autologen Melanommetastase (M) mit Oligo-dT-Primern in cDNA überschrieben. Nach PCR-Amplifikation mit P^{33} -markierten Primern wurden die Reaktionsprodukte auf einem 6%igen, denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und per Autoradiographie sichtbar gemacht. Bei der mit P7 markierten Bande handelt es sich um ein PQ-reiches Genprodukt (Phrip/PHLDA1) (Kuske, 1998).

Eine der cDNA, die in der Melanommetastase vermindert exprimiert war, codierte für ein *PQ-rich-protein* (mit P7 markierte Bande in Abb. 1.1). Es handelt sich um eine bis zu diesem Zeitpunkt nicht genauer charakterisierte cDNA, die aufgrund ihrer Kreuzreaktivität mit Anti-Blutgruppenantikörpern isoliert worden war (Wagner und Flegel, 1995). 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. Das Protein wurde deshalb in der Doktorarbeit von Martina Kuske genauer charakterisiert und von ihr aufgrund seiner vielen Proline und Histidine *Phrip* (*prolin and histinine rich protein*) genannt. Mittlerweile wurde es aufgrund seiner Pleckstrin-ähnlichen Domänen von dem *Human Gene Nomenclature*

Committee in London (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature>) in PHLDA1 für *pleckstrin homology-like domain family A member L*, umbenannt (Frank *et al.*, 1999).

1.5 PHLDA1

Das PHLDA1-Gen ist auf Chromosom 12q15 lokalisiert (Kuske und Johnson, 2000) und 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 44,9 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 (siehe Abb. 1.2).

M¹RRAPAAERLLELGFPPRCGRQEPPFPLGVTRGWGRWPIQKRREGARVPVFSERSQEDGRGP
 AARSSGTLWRIRTRLSLCRDPEPPPPLCLLRVSLLCALRAGGRGSRWGEDGARLLLLPPARAAGN
 GEAEPSSGGPSYAGR**M**²LESSGCKALKEGVLE**KRSDGLLQLWKKKCCILTEEGLLLIPPQQLQH**
QQQQQQQQQQQQQPGQG**PAEPSQPSGP**AVASLEPPVKL**KELHFSNMKTVD**CV**ERKGYMYFT**
VVMAEGKEIDFRCPQD**QGWNAEITLQMVQYKNR**QAILAVK**STR**QKQQLVQQQP**PSQPQPQPQ**
LQPQPQPQPQPQPQSQ**PQPQPQPKPQPQ**QLHPY**PHPHPHPHSHPHSHPHPHPHPHQIP**
HPHPQPPHSQ**PHGH**LLRSTNSA

Abb. 1.2 Aminosäuresequenz und Proteinmotive von PHLDA1. Die beiden Translationsstartpunkte von PHLDA1 sind mit M¹ und M² 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.

Auffällig ist der aus 14 aufeinanderfolgenden Glutaminen bestehende Bereich, der auch M- oder *opa*-repeat genannt wird. Solch ein Polyglutaminbereich wurde zuerst für *notch* beschrieben, ein Gen, das bei der neuronalen Entwicklung von *Drosophila* eine Rolle spielt (Wharton *et al.*, 1985). Polyglutaminbereiche wurden auch in weiteren homeotischen

Genen, die während der Embryogenese von *Drosophila* exprimiert werden, gefunden. Viele solcher Gene mit einer Homeobox enthalten auch *opa-repeats* z.B. der Antennapedia-Komplex (Schneuwly *et al.*, 1986), aber auch *bithorax*, *engrailed*, und *bicoid* (Wharton *et al.*, 1985). Des Weiteren interagiert die Polyglutamindomäne 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 6-35 Glutaminen auf 36-121 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. Die PQ-Domänen zeigen eine starke Homologie zu dem transkriptionsaktivierenden Protein UL36 des Herpes Simplex Virus (McNabb und Courtney, 1992) und die PH (PX)-Wiederholungen besitzen eine starke Homologie zu den PRD-Wiederholungen verschiedener Homeoboxdomän-Proteinen (Gehring *et al.*, 1994). SH3-Bindedomänen binden mit hoher Affinität Liganden mit SH3-Domänen. SH3-Domänen sind an einer Vielzahl von Protein-Protein Interaktionen beteiligt, unter anderem an der Aktivierung und Signalweiterleitung der SRC-Kinasen (Pawson, 1995; Pawson und Scott, 1997). Auch die potentielle Phosphorylierungsstelle der Proteinkinase-C (PKC) könnte ein Hinweis auf eine Vermittlung von Signalen durch PHLDA1 sein, da viele an der Signaltransduktion beteiligte Proteine durch die PKC phosphoryliert werden.

PHLDA1 besitzt sieben Pleckstrin-Homologie-ähnlichen Domänen. Diese Domänen haben auf Aminosäureebene eine Sequenzhomologie von 50% zu dem Gen *Ipl/Tssc* auf Chromosom 11p15.5 und zu seinem Sequenzhomolog *Tih1* auf Chromosom 1q31 (Qian *et al.*, 1997; Frank *et al.*, 1999). Die Funktion von *Ipl/Tssc* und *Tih* ist noch nicht bekannt, jedoch wurde von Frank *et al.*, vorgeschlagen, sie zusammen mit PHLDA1 in einer Familie von Genen zusammenzufassen, die eine Homologie zu Pleckstrin-Domänen besitzen (Frank *et al.*, 1999).

Von Pleckstrin-Domänen wurde auch eine Bindung an biologische Membranen beschrieben, wodurch Signale an- und von der Plasmamembran weitergeleitet werden können (Shaw, 1996). So bindet z.B. Cytohesin-1, das eine Pleckstrin-Domäne enthält, den zytoplasmatischen Schwanz von LFA1, wodurch LFA1 aktiviert wird und an seinen

Liganden ICAM1 binden kann (Kolanus *et al.*, 1996; Nagel *et al.*, 1998; Blomberg *et al.*, 1999).

Insgesamt lassen die Struktur und die Motive vermuten, dass es sich bei PHLDA1 um ein regulatorisches Molekül handelt, das Protein-Protein-Interaktionen eingeht und eventuell durch sein Kernlokalisierungssignal in den Kern transportiert wird. Jedoch hat PHLDA1 kein bekanntes DNA-Bindemotiv, sodass eine DNA-Interaktion als eher unwahrscheinlich gilt.

Northernblot-Analysen zeigten, dass PHLDA1 ubiquitär im Gewebe exprimiert wird, wobei es große Unterschiede in der Expressionsstärke gibt. Die stärkste Expression war in Herzmuskel-, Lungen-, und Nierengewebe sowie im Gehirn zu beobachten. In Zelllinien, ließ sich PHLDA1 durch Phorbol-ester wie Phorbol-12-myristat-13-azetat (PMA) induzieren. Dabei war eine Induktion der PHLDA1-mRNA nach 1-2 Stunden zu beobachten, sie erreichte die stärkste Expression nach 3-6 Stunden und blieb bis 48 Stunden nach der Stimulation zu detektieren. 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 und 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.

Das murine TDAG51 ist auf Aminosäureebene zu 85% homolog zu PHLDA1. Es wurde in einem Screen identifiziert, in dem nach Molekülen gesucht wurde, die in dem T-Zellrezeptor (TCR) aktivierten Zelltod involviert sind (Park *et al.*, 1996). Autoreaktive T-Zellen werden während ihrer Entwicklung durch eine negative Selektion (klonale Deletion) (MacDonald und Lees, 1990; Murphy *et al.*, 1990) und auch später in der Peripherie durch Apoptose eliminiert (Webb *et al.*, 1990). Um Moleküle zu identifizieren, die in diesem Prozess involviert sind, verwendeten Park *et al.* eine T-Zell-Hybridomzelllinie, die nach Stimulation ihres TCR aktiviert wurde, Interleukin-2 produzierte und anschließend der Apoptose untergingen. Durch 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. Dabei war in der apoptoseresistenten Zelllinie TDAG51/PHLDA1 nicht mehr exprimiert, sowie das TDAG51-Gen durch ein Stopcodon mutiert. Die mutanten Zelllinien exprimierten weniger Fas auf der Zelloberfläche, wodurch ihre Apoptoseresistenz erklärt wurde. Durch TDAG51-cDNA-Transfektion konnte dieser Defekt komplementiert werden und die Zellen waren nach TCR-Stimulation wieder apoptosesensitiv. Die Autoren folgerten daraus, das TDAG51 eine Verbindung zwischen dem TCR und der Fas-Expression während der aktivierungs-induzierten Apoptose herstellt (Park *et al.*, 1996).

In einem weiteren unabhängigen System konnte das Rattenhomolog von PHLDA1 identifiziert werden (Gomes *et al.*, 1999). Es ist auf Aminosäureebene zu 80% homolog zu dem humanen PHLDA1. 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 (Fibroblastenwachstumsfaktor). FGF löst in diesen Zellen eine Differenzierung aus, der dann eine p53-abhängige Apoptose folgt. Das Rattenhomolog zu PHLDA1 (PQR für 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 Apoptose zu vermitteln. Eine Korrelation der PHLDA1- und Fas-Expression konnte in diesem System jedoch nicht beobachtet werden (Gomes *et al.*, 1999).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

PHLDA1 wurde als Gen identifiziert, dessen mRNA in Zelllinien aus Melanommetastasen geringer exprimiert war, als in Zelllinien aus autologen Primärtumoren (Kuske, 1998). Somit liegt nahe, dass PHLDA1 eine Rolle im Metastasierungsprozess beim Melanom besitzt. Die Aufklärung seiner Funktion soll dazu beitragen, die multifaktoriellen Prozesse der Tumorigenese und Metastasierung besser zu verstehen. In der vorliegenden Arbeit

wurde deshalb PHLDA1 charakterisiert und seine Expression sowie Funktion im humanen Melanom untersucht.

Zunächst sollte überprüft werden ob Zelllinien aus melanozytären Läsionen das PHLDA1-Protein exprimieren und ob die PHLDA1-Proteinmenge mit dem auf mRNA-Ebene gefundene Expressionsmuster korreliert.

Da sich Zelllinien bei ihrer Generierung und auch während der Kultivierung verändern können, stellte sich als eine der wichtigsten Fragen, ob auch *in vivo*, also in den humanen Tumoren, PHLDA1 in melanozytärem Gewebe exprimiert ist und seine Expression im Verlauf der Tumorprogression vom Primärtumor zu den Metastasen abnimmt. Um die PHLDA1-Expression auf Gewebeschnitten untersuchen zu können, war es nötig, monoklonale Anti-PHLDA1-Antikörper zu generieren. Des Weiteren sollte der Translationsstartpunkt des PHLDA1-Moleküls sowie seine zelluläre Lokalisation bestimmt werden.

Über die Funktion des humanen PHLDA1 war bisher noch nichts bekannt, die PHLDA1-Homologe von Maus und Ratte wurden mit einer Apoptosevermittlung assoziiert. Um Aufschluss über die biologische Funktion von PHLDA1 zu bekommen, sollten stabile Transfektanten generiert werden, die PHLDA1 im Vergleich zu ihren parentalen Zelllinien verstärkt exprimierten. Mit Hilfe dieser Transfektanten sollte die Rolle von PHLDA1 während des Wachstums, in der Apoptose sowie im Zellzyklus bestimmt werden.

Da die Struktur von PHLDA1 vermuten lässt, dass PHLDA1 Protein-Protein-Interaktionen eingeht, sollte mit biochemischen Methoden *in vitro* sowie mit dem *yeast two hybrid screen* nach Bindungspartnern gesucht werden, die dann auch Aufschluß über die molekulare Wirkung von PHLDA1 geben könnten. Die *in vitro* und in Hefe gefundenen Bindungspartner von PHLDA1 sollten dann zur Bestätigung der Interaktion in Zelllinien koimmunpräzipitiert werden.

2 Ergebnisse

2.1 PHLDA1-Expression in Zelllinien, die aus Melanomprimärtumoren und Melanometastasen generiert wurden

PHLDA1 wurde als Gen in einer *mRNA differential display*-Analyse gefunden, bei der das Expressionsmuster von einem Melanomprimärtumor mit dem von einer Melanometastase verglichen wurde. Dabei sollten Gene gefunden werden, die während des Metastasierungsprozesses eine Rolle spielen. PHLDA1 war in einer Zelllinie, die aus einer Melanometastase generiert wurde, geringer exprimiert als in der Zelllinie, die aus dem autologen Primärtumor stammte (Kuske, 1998). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die PHLDA1-mRNA in zwei weiteren autologen Tumorzellpaaren jeweils in den Zelllinien, die aus der Metastase generiert wurden, geringer exprimiert war. Dies lässt vermuten, dass die PHLDA1-mRNA häufig während der Melanomtumorprogression herunterreguliert wird. Um eine mögliche Rolle von PHLDA1 in der Tumorprogression zu bestimmen, ist es nötig über die Expression von PHLDA1 in verschiedenen Zelllinien *in vitro* und in melanozytären Geweben *in vivo* Bescheid zu wissen.

Zunächst stellte sich die Frage, ob die verringerte mRNA-Expression auch Einwirkung auf die PHLDA1-Proteinmenge in den Zelllinien hat. Um dies zu bestimmen, wurden drei autologen Zelllinienpaare in der Westernblot-Analyse untersucht (siehe Abb. 2.1.)

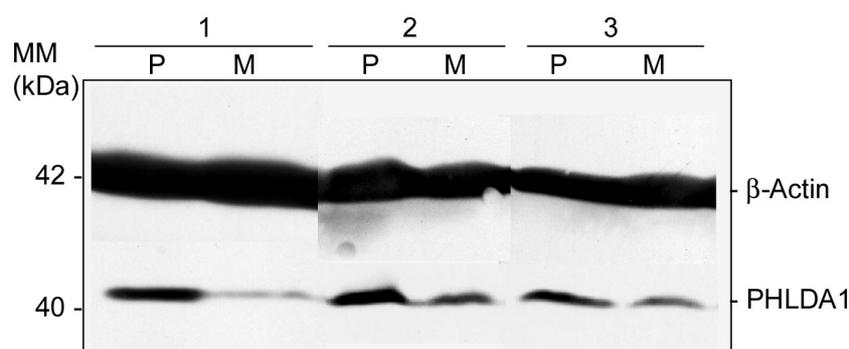


Abb. 2.1 Westernblot-Analyse mit drei autologen Zelllinienpaaren 1) IgR39 (Primärtumor, P) und IgR37 (Metastase, M); 2) GTBS (P) und GTBSA (M) und 3) WM115 (P) und WM266-4 (M). Von jeder Zelllinie wurden 100 µg Gesamtzelllysat auf einem reduzierenden 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran übertragen und mit dem polyklonalen Anti-PHLDA1-Serum L19 und Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-Anti-Ziege-AK P449 (K α Z-POD) detektiert. Von dem Blot wurden die Antikörper eluiert und zur Kontrolle eines gleichmäßigen Proteinauftrages mit Anti- β -Actin und mit Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-Anti-Maus-AK P161 (K α M-POD) detektiert.

Wie man in Abb. 2.1 sehen kann, wird das PHLDA1-Protein in allen Zelllinien exprimiert. Jedoch ist die PHLDA1-Expression in den Zelllinien, die aus einer Melanommetastase (M) etabliert wurden, geringer als in den entsprechenden autologen Zelllinien, die aus den Primärtumoren (P) etabliert wurden. Um die Verminderung der Expression von PHLDA1 in den Metastasezelllinien zu quantifizieren, wurden die Banden densitometrisch vermessen und der relative Grad der PHLDA1-Expression in Abb. 2.2 angegeben.

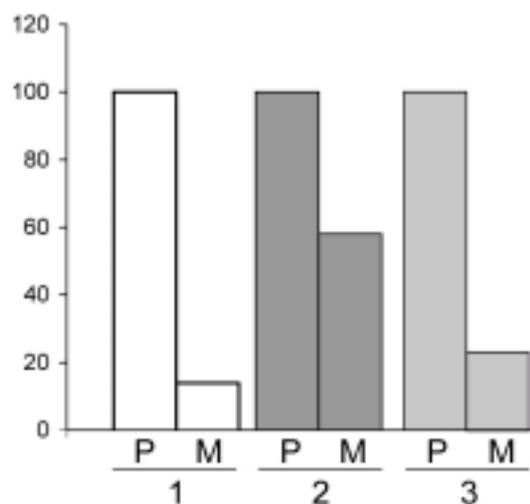


Abb. 2.2 Quantifizierung der PHLDA1-Proteinmenge der drei autologen Zelllinienpaare. Die Banden des Westernblots von Abb. 2.1 wurden densitometrisch vermessen und jeweils mit der Auftragskontrolle β -Actin korrigiert. Die PHLDA1-Proteinmenge der Primärtumore (P) wurden als 100 gesetzt und die der dazugehörigen Metastasen in Relation angegeben. Auf der y-Achse ist die relative Proteinmenge angegeben. 1, IgR39 (Primärtumor, P) und IgR37 (Metastase, M); 2, GTBS (P) und GTBSA (M) und 3, WM115 (P) und WM266-4 (M).

Die aus den Metastasen generierten Zelllinien exprimieren zwischen 14% und 58% der PHLDA1-Proteinmenge, verglichen mit den Zelllinien, die aus dem jeweiligen autologen Primärtumor generiert wurden (siehe Abb. 2.1 und Abb. 2.2). Somit korreliert die von Kuske beschriebene PHLDA1-Expression auf mRNA-Ebene (Kuske, 1998) mit der in diesem Experiment bestimmten auf Proteinebene und zeigt, dass in Zelllinien aus Melanommetastasen die PHLDA1-Expression herunterreguliert ist.

2.2 Generierung und Charakterisierung monoklonaler Anti-PHLDA1-Antikörper

Die PHLDA1-Expression war in Zelllinien generiert aus Melanommetastasen im Vergleich zu den autologen Primärtumorzelllinien herunterreguliert. Wenn PHLDA1 während der

Melanomtumorsektion eine Rolle spielt, sollten humane Melanome PHLDA1 exprimieren und das Expressionsmuster auf melanozytären Gewebe *in vivo* mit dem Expressionsmuster der Zelllinien *in vitro* korrelieren. Das heißt, bei immunhistochemischen Analysen von Gewebeschnitten sollten die Melanommetastasen auch weniger PHLDA1 exprimieren als die Primärtumore.

Um die Expression auf Gewebegefrierschnitten ermitteln zu können, war es nötig monoklonale Anti-PHLDA1-Antikörper zu generieren. Die für die Westernblot-Analyse verwendeten, kommerziell erworbenen polyklonalen Anti-PHLDA1-Seren zeigten in der Immunhistochemie keine Reaktivität auf Zelllinien, die im Westernblot eine PHLDA1-Expression aufwiesen und mittels Zytospin fixiert worden waren. Auch auf Gefrierschnitten von humanem Gewebe konnte mit diesen Seren keine PHLDA1-spezifische Färbung nachgewiesen werden.

2.2.1 Expression und Reinigung von rekombinantem PHLDA1-Protein

Sowohl für die Immunisierung von Mäusen als auch bei dem anschließenden Test der Hybridome auf Reaktivität gegenüber PHLDA1 im ELISA, benötigte man größere Mengen an PHLDA1-Protein. Deshalb wurde ein Gst-PHLDA1-Fusionskonstrukt zur Expression in *E. coli* hergestellt, das mithilfe des Gst-Tags leicht über Glutathionsepharose-beads (GS-beads) gereinigt werden kann. Es wurde PHLDA1 ab dem zweiten Startcodon (siehe Sequenz Abb. 1.2) als Gst-Fusionsprotein in pGEX4T (Gst-PHLDA1, siehe Kap. 5.5.7.4) kloniert und in *E. coli*-Stamm *BL21-Codon-PlusTM-RP* exprimiert. Bei diesem Stamm wurden Plasmide eingefügt, die für zusätzliche Prolin-t-RNAs codieren. Dadurch kann der *Codonbias*, d.h. die Verwendung unterschiedlicher Codons für eine Aminosäure, zwischen Pro- und Eukaryonten ausgeglichen werden. So kann ein möglicher Kettenabbruch der Proteinbiosynthese aufgrund zuwenig vorhandener t-RNAs verhindert werden (siehe ausführliche Beschreibung in Kap 5.6.9).

Um genügend Protein für eine Immunisierung aufzureinigen zu können, wurde ein präparativer Ansatz der Expression in *E. coli* durchgeführt und das Gst-PHLDA1-Fusionsprotein mit GS-beads isoliert (siehe Kap. 5.6.10). Sowohl Coomassie-Färbung als auch Westernblot von dieser Präparation sind in Abb. 2.3 gezeigt.

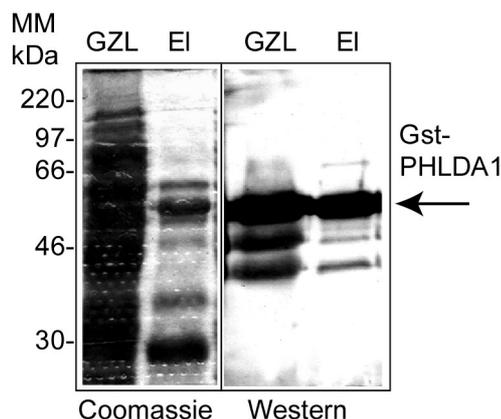


Abb. 2.3 Reinigung von Gst-PHLDA1. Von der Gst-PHLDA1 Proteinpräparation wurden 10 μ l Gesamtzelllysat (GLZ) und 10 μ l 1:60 verdünntes Eluat (EI) auf einem reduzierenden 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (zweimal jeder Ansatz). Der linke Teil des Gels wurde Coomassie gefärbt, der rechte Teil auf Nitrozellulosemembran geblottet und mit dem polyklonalen Anti-PHLDA1-Serum M20 und K α Z-POD detektiert. Mit dem Pfeil ist das Gst-PHLDA1-Fusionsprotein bei 57,3 kDa markiert. MM, Molekulargewichtsmarker.

Es konnten 4,8 mg angereichertes und gereinigtes Gst-PHLDA1-Fusionsprotein in einer Konzentration von 3 mg/ml hergestellt werden. Die Präparation wurde für die Immunisierung der Maus sowie zum Beschichten der ELISA-Platten für den Hybridomtest verwendet.

2.2.2 Immunisierung, Fusion und Test der Hybridomzellen auf PHLDA1-reaktive monoklonale Antikörper

Eine männliche CB6F1 Maus wurde wie in Kap. 5.7.1.1 beschrieben mit rekombinantem PHLDA1-Protein immunisiert. Drei Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Milzzellen mit der Maus-Myelomzelllinie X63Ag8.653 fusioniert (siehe Kap. 5.7.1.2). 514 Hybridomüberstände wurden im ELISA auf Reaktivität gegenüber Gst-PHLDA1 getestet (siehe Kap. 5.7.1.2). Zunächst waren 23 Hybridomüberstände positiv, fünf von ihnen reagierten aber auch gegen Gst-Muc18, einem zu PHLDA1 nicht verwandten Gen, das in die gleichen Restriktionsschnittstellen des Gst-Expressionsvektors pGEX4T kloniert wurde. Diese fünf Hybridome produzierten Antikörper gegen Gst oder gegen den kurzen Linker zwischen Gst- und Fusionsgen. Die anderen 18 Hybridome wurden kloniert und weiter auf PHLDA1-Reaktivität getestet. Es konnten letztendlich sechs verschiedene Hybridome isoliert werden, die stabil Anti-PHLDA1-Antikörper produzierten.

2.2.3 Reaktivität der monoklonalen Anti-PHLDA1-AK im Westernblot

Die sechs Hybridome reagierten alle mit dem denaturierten rekombinanten Gst-PHLDA1 im ELISA. Als nächstes wurde getestet, ob sie auch das endogene, in humanen Zelllinien produzierte PHLDA1 im denaturierten Zustand im Westernblot erkennen können (Abb. 2.4).

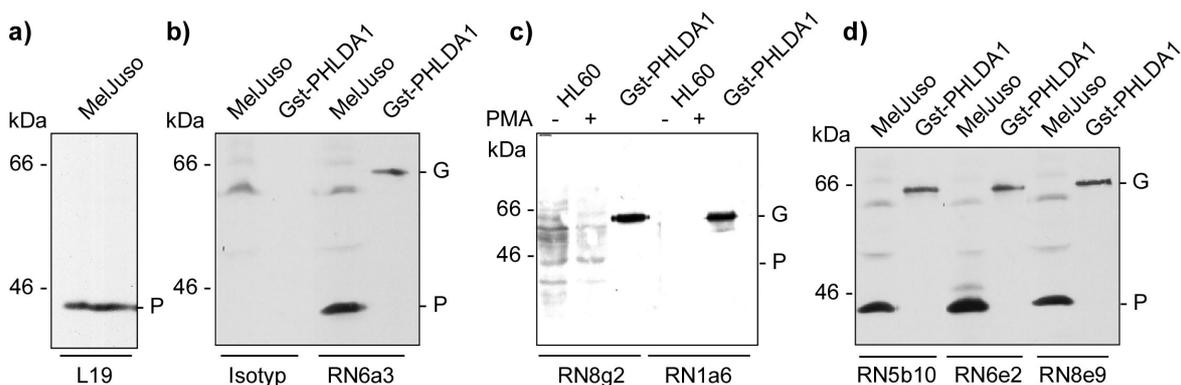


Abb. 2.4 Anti-PHLDA1-mAK in der Westernblot-Analyse. Es wurden pro Gelspur 300 µg Gesamtzelllysat der Zelllinien MelJuso bzw. HL60 und 250 ng des rekombinanten Gst-PHLDA1-Proteins auf mehreren reduzierenden 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Proteine wurden von den Gelen auf Nitrozellulosemembranen übertragen und mit den angegebenen Anti-PHLDA1-AK und $\text{K}\alpha\text{M-POD}$ detektiert b-d). Blot a) wurde mit dem polyklonalen Anti-PHLDA1-Serum L19 und $\text{K}\alpha\text{Z-POD}$ detektiert. G, rekombinantes Gst-PHLDA1-Protein bei 57,3 kDa; P, PHLDA1-Bande bei 40 kDa; PMA+/-, Zellen ohne bzw. mit 24 h PMA-Stimulation; Isotyp, Hybridom Fr4H12 als Isotypkontrolle für IgG1.

Der mit dem Anti-PHLDA1-Serum L19 detektierte Blot (Abb. 2.4 a) zeigt, dass die aus einem Melanomprimärtumor isolierte Zelllinie MelJuso PHLDA1 exprimiert. Ebenso war für die hämatopoetische Zelllinie HL60 bekannt, dass sie nach PMA-Stimulation stark PHLDA1 exprimiert. Alle sechs Hybridome erkannten das rekombinante Gst-PHLDA1-Protein bei 57,3 kDa (Abb. 2.4 b-d), nicht aber die Isotypkontrolle (Abb. 2.4 b). Der Antikörper RN1a6 erkannte kein, der Antikörper RN8g2 nur sehr schwach das endogene PHLDA1 (Abb. 2.4 c), die Antikörper RN6a3, RN5b10, RN6e2 und RN8e9 dagegen eine starke Bande bei 40 kDa (Abb. 2.4 d). Somit reagierten vier der sechs Antikörper auch gegen das in humanen Zellen produzierte, denaturierte PHLDA1.

2.2.4 Reaktivität der monoklonalen Anti-PHLDA1-AK auf intakten Zellen

Um die monoklonalen Anti-PHLDA1-Antikörper für die Immunhistochemie auf Gewebeschnitten einsetzen zu können, müssen sie das endogene PHLDA1 im nativen Zustand erkennen. Dazu wurde zunächst ihre Reaktivität in der Immunfluoreszenz auf fixierten Zellen getestet (siehe Abb. 2.5). Es wurde die PHLDA1-positive Zellen MelJuso für eine zytoplasmatische Immunfluoreszenzfärbung (siehe Kap. 5.7.3.2) und anschließender FACS-Auswertung verwendet.

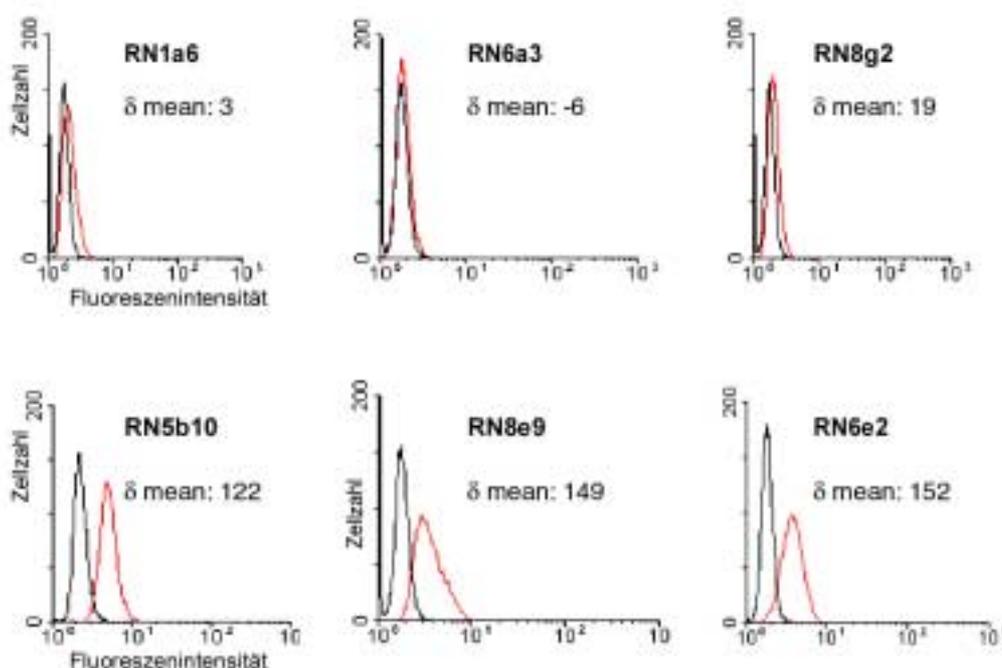


Abb. 2.5 FACS-Analyse mit den monoklonalen Anti-PHLDA1-AK. Die Anti-PHLDA1-mAK wurden auf der Zelllinie MelJuso inkubiert und die Bindung mit α M-FITC detektiert (rote Linien). Die jeweilige Isotypkontrolle ist in schwarzer Linie dargestellt und die *delta mean channel* (δ) (siehe Kap. 5.7.3.4) sind angegeben. In den Histogrammen sind die Fluoreszenzintensitäten gegen die Zellzahlen dargestellt.

Die Antikörper RN1a6, RN6a3 und RN8g2 zeigten keine Reaktivität auf der Melanomzelllinie MelJuso in der Immunfluoreszenzfärbung (siehe Abb. 2.5, obere Reihe). Die Antikörper RN1a6 und RN8g2 erkannten demnach nur rekombinantes, bakteriell hergestelltes PHLDA1, aber kein humanes denaturiertes oder natives PHLDA1. Der Antikörper RN6a3 erkannte sowohl das bakterielle als auch das humane denaturierte PHLDA1 in der Westernblot-Analyse, nicht aber das native PHLDA1 in Zellen. Die Antikörper RN5b10, RN8e9 und RN6e2 dagegen zeigten in der FACS-Analyse eine starke

Bindung gegenüber den Isotypkontrollen mit *delta mean channel* Werten von 122 bis 152 (siehe Abb. 2.5). Sie detektierten also sowohl das rekombinante und humane denaturierte PHLDA1 in der Westernblot-Analyse, wie auch das native PHLDA1 in der Immunfluoreszenz.

2.2.5 Spezifität der monoklonalen Anti-PHLDA1-AK

Bisher wurde gezeigt, dass drei der Anti-PHLDA1-mAK das gereinigte, isolierte, rekombinante PHLDA1-Protein erkannten, in PHLDA1-positiven Zellen eine einzige Bande im Westernblot detektierten und Zellen in der Immunfluoreszenz anfärben konnten. Jedoch ist die Spezifität der Immunfluoreszenzfärbung noch nicht eindeutig, es könnten durch die AK auch andere Proteine mit gleichen oder ähnlichen Epitopen gebunden werden. Man kann die Spezifität von mAK durch Kompetition ihrer Bindestelle oder durch Induktion des Proteins, das sie detektieren sollen, nachweisen.

2.2.5.1 Inhibition der monoklonalen Anti-PHLDA1-AK

Als Nachweis für die Spezifität von Antikörpern kann man deren Bindung durch isoliertes, rekombinantes Protein kompetieren. Dazu wurden 50 µl der Hybridomüberstände RN5b10, RN8e9 und RN6e2 jeweils mit 100 µg Gst-PHLDA1 für 1 h inkubiert, als Kontrolle wurde Gst-cMuc18 verwendet. Anschließend wurde die Bindung auf der Melanomzelllinie MelJuso wie unter Kap. 2.2.4 beschrieben getestet.

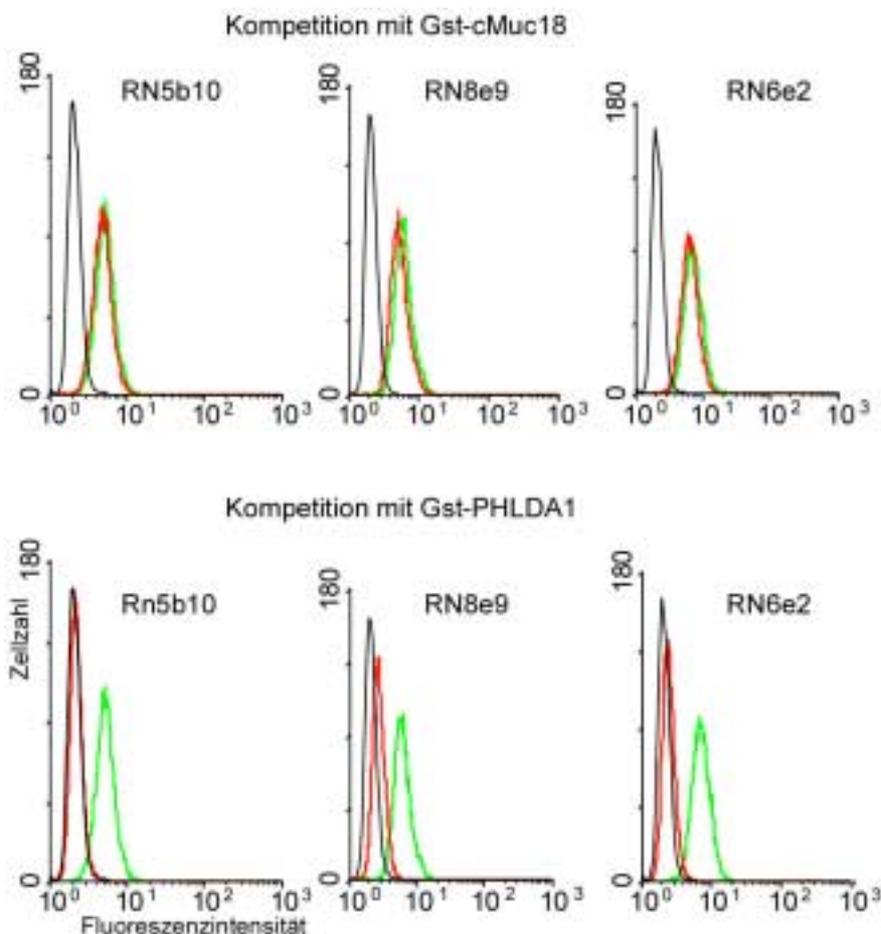


Abb. 2.6 **Kompetition der monoklonalen Anti-PHLDA1-AK in der FACS-Analyse.** Die Anti-PHLDA1-mAK wurden mit 1,25 bis 1,4 mg/ml Gst-cMuc18-Protein (rote Kurven in der oberen Reihe) oder Gst-PHLDA1-Protein (rote Kurven in der unteren Reihe) inkubiert und anschließend auf Bindung auf der Zellen MelJuso in der Immunfluoreszenz getestet. Die grünen Kurven sind Bindungen ohne Konkurrenz, die schwarzen Kurven die der Isotypkontrollen. Die Bindung aller Antikörper wurde mit K α M-FITC-AK detektiert. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl.

Die Bindung der drei monoklonalen Anti-PHLDA1-AK RN5b10, RN8e9 und RN6e2 (grüne Kurven in allen Diagrammen) konnte durch Vorinkubation mit rekombinanten PHLDA1-Protein vollständig inhibiert werden (Abb. 2.6 rote Kurven in der unteren Reihe), nicht aber durch ein rekombinantes Kontrollprotein in der gleichen Konzentration (Abb. 2.6, rote Kurven in der oberen Reihe).

2.2.5.2 Monoklonale Anti-PHLDA1-AK auf induzierbaren Zelllinien

Eine Konkurrenz der Antikörperbindung durch das rekombinante Protein bedeutet, dass die AK-Bindestelle durch den Überschuss dieses Proteins besetzt wird und dadurch das endogene Protein nicht mehr erkannt werden kann. Dieses Ergebnis erwartet man, wenn

eine homogene Population eines monoklonalen Antikörpers vorliegt. Ob der Antikörper eine Kreuzreaktivität gegenüber Molekülen hat, die gleiche oder ähnliche Epitope besitzen wie das rekombinante Protein, mit dem immunisiert wurde, kann man damit nicht bestimmen. Um diese Spezifität der Antikörper zu testen, wurden Zelllinien verwendet, die kein PHLDA1 exprimieren und die Antikörperbindung in der Immunfluoreszenz getestet. Anschließend wurde die PHLDA1-Expression in diesen Zelllinien induziert und die Antikörperbindung erneut ermittelt. PHLDA1-negativ auf mRNA-Ebene sind Zelllinien hämatopoetischen Ursprungs wie die Zelllinie HL60, bei der PHLDA1 aber stark durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) induziert werden kann (Kuske, 1998) und Kap. 2.4.1). Es wurde eine zytoplasmatische Immunfluoreszenz auf den Zelllinien HL60 ohne PMA-Stimulation und nach 24 h PMA-Stimulation durchgeführt.

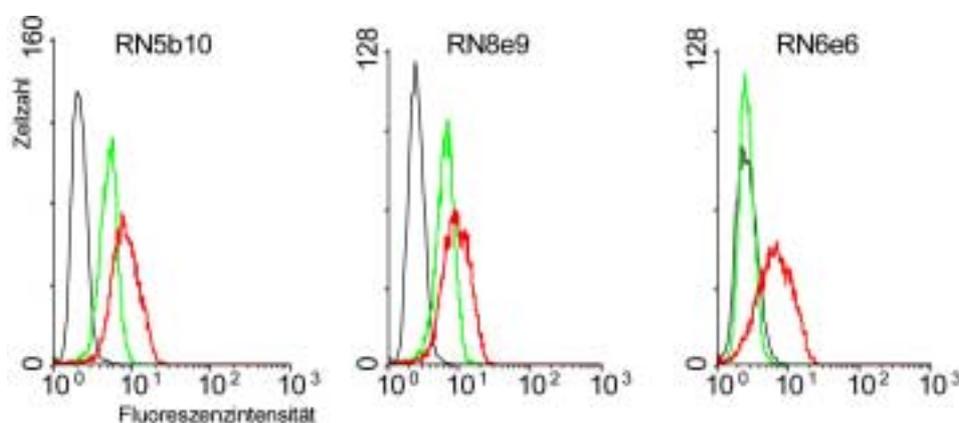


Abb. 2.7 Spezifität der PHLDA1-mAK auf induzierbarer Zelllinien der FACS-Analyse. Dargestellt sind die Bindungen der PHLDA1-mAK auf der Zelllinie HL60 ohne PMA (grüne Kurven) und nach 24 h PMA-Stimulation (rote Kurven) in der Immunfluoreszenz und FACS-Auswertung. In schwarzen Kurven sind die Isotypkontrollen dargestellt. Die Antikörperbindung wurde mit einem κ M-FITC-AK nachgewiesen. Es wurde Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl aufgetragen.

Wie man in Abb. 2.7 sieht, zeigten die Antikörper RN5b10 und RN8e9 auch ohne PMA-Stimulation eine Bindung auf der PHLDA1-negativen Zelllinie HL60, nicht aber der Antikörper RN6e2 (grüne Kurven). Bei allen Antikörpern war die Bindung nach PMA-Stimulation (rote Kurven), d.h. nach PHLDA1-Induktion, wesentlich stärker, da die uninduzierten Zellen kein PHLDA1 exprimierten. So erkannten die Antikörper RN5b10 und RN8e9 vermutlich zusätzlich zu PHLDA1 noch ein anderes Molekül. Der Antikörper RN6e2 reagierte ausschließlich mit den Zellen in denen PHLDA1 induziert wurde und ist demnach spezifisch für PHLDA1. So kann der Anti-PHLDA1-AK RN6e2 für die Färbung von Gewebeschnitten verwendet werden.

2.2.6 Zusammenfassung der monoklonalen Anti-PHLDA1-Antikörper

Die zuvor beschriebenen Eigenschaften der isolierten Anti-PHLDA1 Antikörper sind noch einmal in Tab. 2.1 zusammengefasst. Die Isotypen der AK wurden wie unter Kap. 5.7.1.4 beschrieben, bestimmt.

AK	Isotyp (leichte Kette)	Westernblot- Analyse mit Gst-PHLDA1	Westernblot- Analyse mit endogem PHLDA1	Immun- fluores- zenz	FACS δ -mean
RN1a6	IgG1 (κ)	+++	-	-	3
RN6a3	IgM (κ)	+++	+++	-	-5.5
RN8g2	IgG1 (κ)	++	+/-	-	19
RN5b10	IgG2a (κ)	+++	+++	*	122
RN8e9	IgG1 (κ)	+++	+++	*	149
RN6e2	IgG2a (κ)	+++	+++	+++	154

Tab. 2.1 Eigenschaften der monoklonalen Anti-PHLDA1-AK. Die Isotypen der mAK wurden mit dem *mAb based Mouse Ig Isotyping Kit* (siehe Kap. 5.7.1.4) bestimmt. Für die Westernblot- sowie FACS-Analysen sind die Stärken der Reaktionen angegeben: +++, sehr starke Reaktion; ++, starke Reaktion; +/-, ganz schwache Reaktion; -, keine Reaktion. Die mit (*) markierten AK erkannten zusätzliche zu der PHLDA1-Reaktivität vermutlich noch ein anderes Molekül in der Immunfluoreszenz. Die Werte sind die *delta mean channel* (δ -mean) der FACS-Auswertung der Immunfluoreszenz.

2.3 PHLDA1-Expression auf Gewebeschnitten

Um die Expression von PHLDA1 in Normalgewebe und Tumorgewebe zu untersuchen, wurden Gefrierschnitte von humanen Gewebeproben angefertigt und immunhistochemisch gefärbt. Es wurden serielle Schnitte hergestellt, um in dem Gewebe die Lymphozyten und die melanozytären Zellen zu lokalisieren und die PHLDA1-positiven Zellen zu bestimmen. Dazu wurde das Gewebe wie in Kap. 5.1.1 beschrieben geschnitten und mit einer sensitiven Färbemethode detektiert (siehe Kap. 5.7.2). Es wurde ein biotinylierter Anti-Maus-Antikörper, Streptavidin-Peroxidase sowie Carbazol als Substrat verwendet, wodurch die Bindung der monoklonalen Antikörper als rote Färbung sichtbar gemacht wurde. In Abb. 2.8 bis Abb. 2.11 sind als Beispiele Färbungen der Gewebeschnitte von zwei verschiedenen Nävi, einem Melanomprimärtumor und einer Lymphknotenmetastase melanozytären Ursprungs gezeigt. Alle untersuchten Gewebe sind in Kap. 4.1.1 aufgelistet und näher charakterisiert.

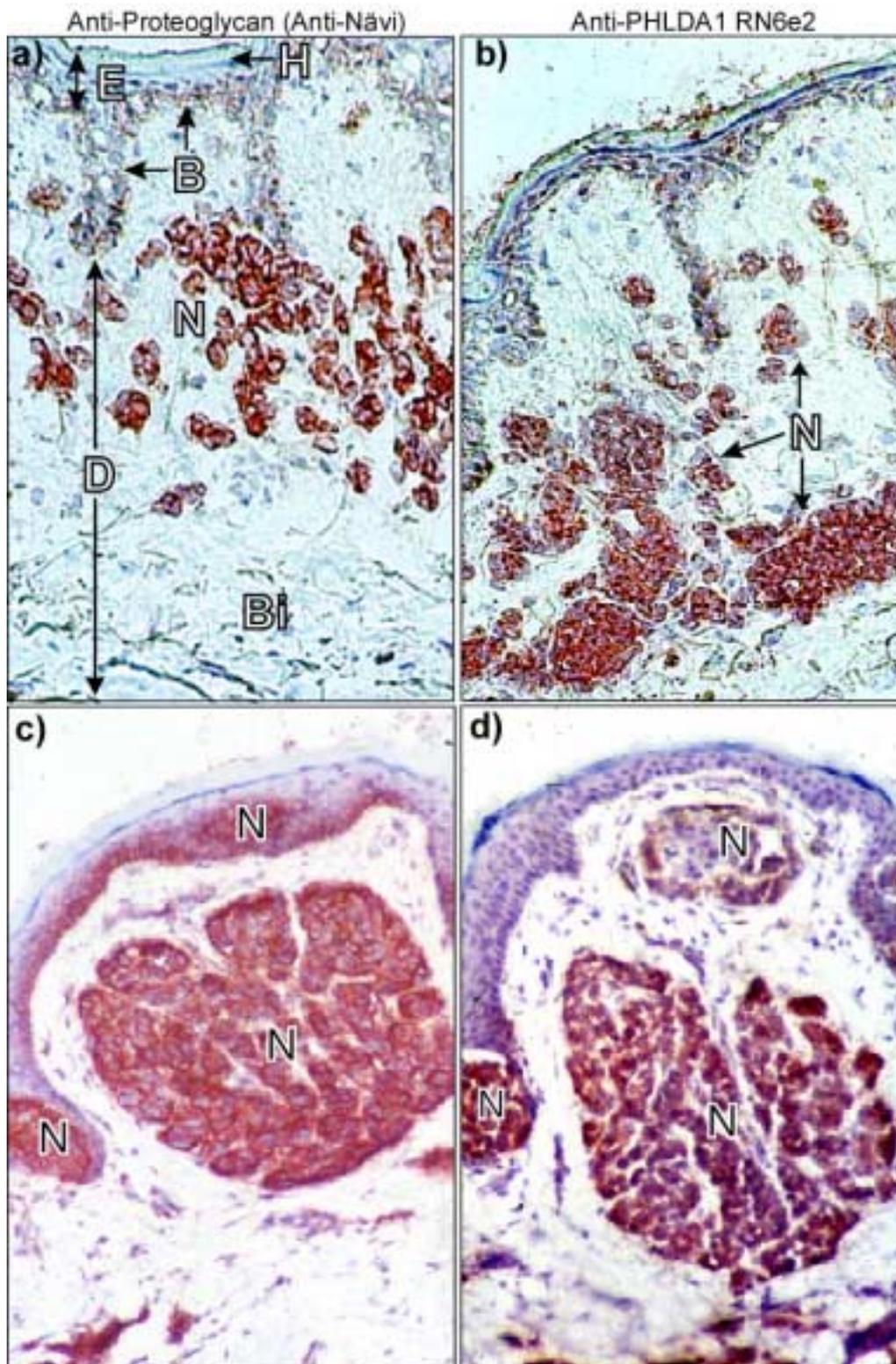


Abb. 2.8 Immunhistochemie auf Nävi. Es ist der Nävus N11 in a) und b) sowie der Nävus N1 in c) und d) jeweils in 125facher Vergrößerung gezeigt. Die Gewebeschnitte a) und c) wurden mit dem Anti-Proteoglykan-AK (Anti-Melanom bzw. Anti-Nävus) und die Schnitte b) und d) mit dem Anti-PHLDA1-AK RN6e2 gefärbt. Die Nävinester sind mit (N) angegeben. In a) ist die Histologie der Haut angegeben: H, Hornschicht (Stratum corneum); E, Epidermis; B, Basalzellschicht; D, Dermis; Bi, Bindegewebe.

Der Anti-PHLDA1-AK RN6e2 zeigte eine starke und scharf abgegrenzte Färbung der Nävi (N, z.T. mit Pfeil markiert) nicht aber bei normalen Melanozyten, Keratinozyten, Lymphozyten, die sich in der Epidermis, Basalzellschicht und der Dermis befinden (siehe Abb. 2.8 b und d). Auch das umliegende Gewebe mit seinen Gefäßen sowie die glatte Muskulatur war nicht gefärbt. Das Färbemuster von RN6e2 war identisch mit dem Anti-Proteoglykan-AK, der Nävi und Melanomzellen, nicht aber normale Melanozyten färbte (Abb. 2.8 a und c). Demnach exprimierten die humanen Nävi stark PHLDA1, nicht aber die umgebenden Zellen und Gewebe.

Auch in Melanomprimärtumoren zeigte der AK RN6e2 eine Färbung wenn auch nicht so stark wie bei den Nävi (siehe Abb. 2.9 b). Wie in den Nävi zeigten auch hier die Zellen der Epidermis und der Basalzellschicht keine PHLDA1-Färbung. Der in Abb. 2.9 abgebildete Melanomprimärtumor P5 besaß eine sehr starke, dunkle Pigmentierung, die von dem Melanin der Melanozyten bzw. des Tumors stammte und die Färbung der Melanomzellen teilweise überdeckte. Dennoch ist zu sehen, dass die PHLDA1-Färbung nicht mit der Lokalisation der Lymphozyten (L) übereinstimmte, die z.T. in dem Gewebeschnitt verteilt waren, oder auch in Nestern als Tumor-infiltrierende Lymphozyten auftraten (siehe Abb. 2.9 c). Die Isotypkontrolle zu dem Anti-PHLDA1-AK RN6e2 zeigte keine Färbung (siehe Abb. 2.9 d). So exprimiert der Melanomprimärtumor P5 PHLDA1, wenn auch weniger als die beiden Nävi in Abb. 2.8. Das nicht melanozytäre Hautgewebe sowie die Lymphozyten exprimierten dagegen kein PHLDA1.

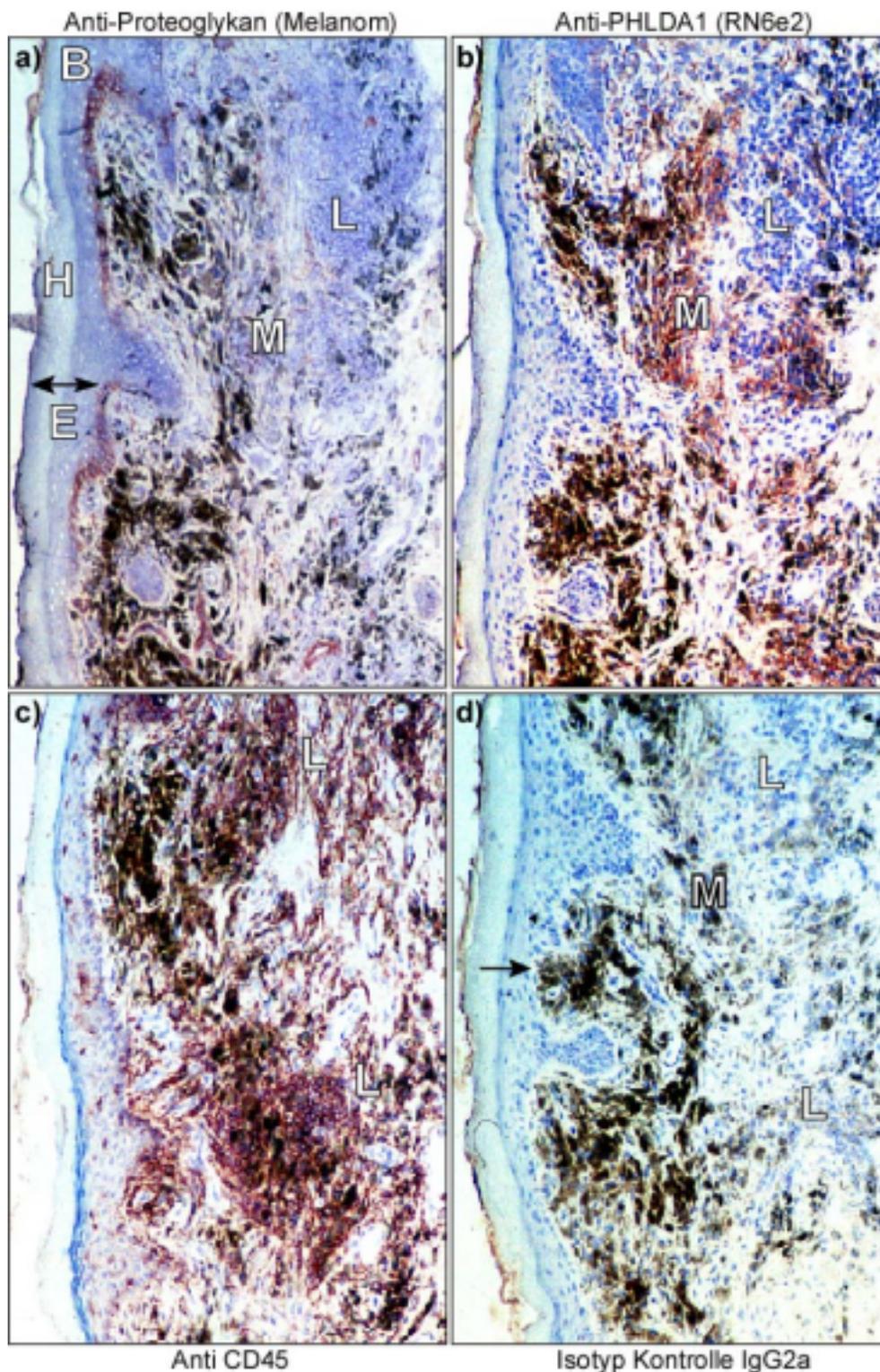


Abb. 2.9 Immunhistochemie auf Gewebeschnitten des Primärtumors P5. Gezeigt sind serielle Schnitte des Primärtumors P5 in 125facher Vergrößerung, gefärbt mit a) dem Anti-Proteoglykan-AK (Anti-Melanom-AK), b) dem Anti-PHLDA1-AK RN6e2, c) einem Anti-CD45-AK zur Lokalisation der Lymphozyten und d) der Isotypkontrolle zu RN6e2. H, Hornschicht (Stratum corneum); E, Epidermis; B, Basalzellschicht; M, Melanomzellen; L, Lymphozyten. In d) sind mit dem Pfeil stark pigmentierte Zellen gezeigt, die auch in a)-c) vorhanden sind.

In Abb. 2.10 ist die Lymphknotenmetastase M7 in 125facher und in Abb. 2.11 dieselbe Lymphknotenmetastase in 250facher Vergrößerung gezeigt.

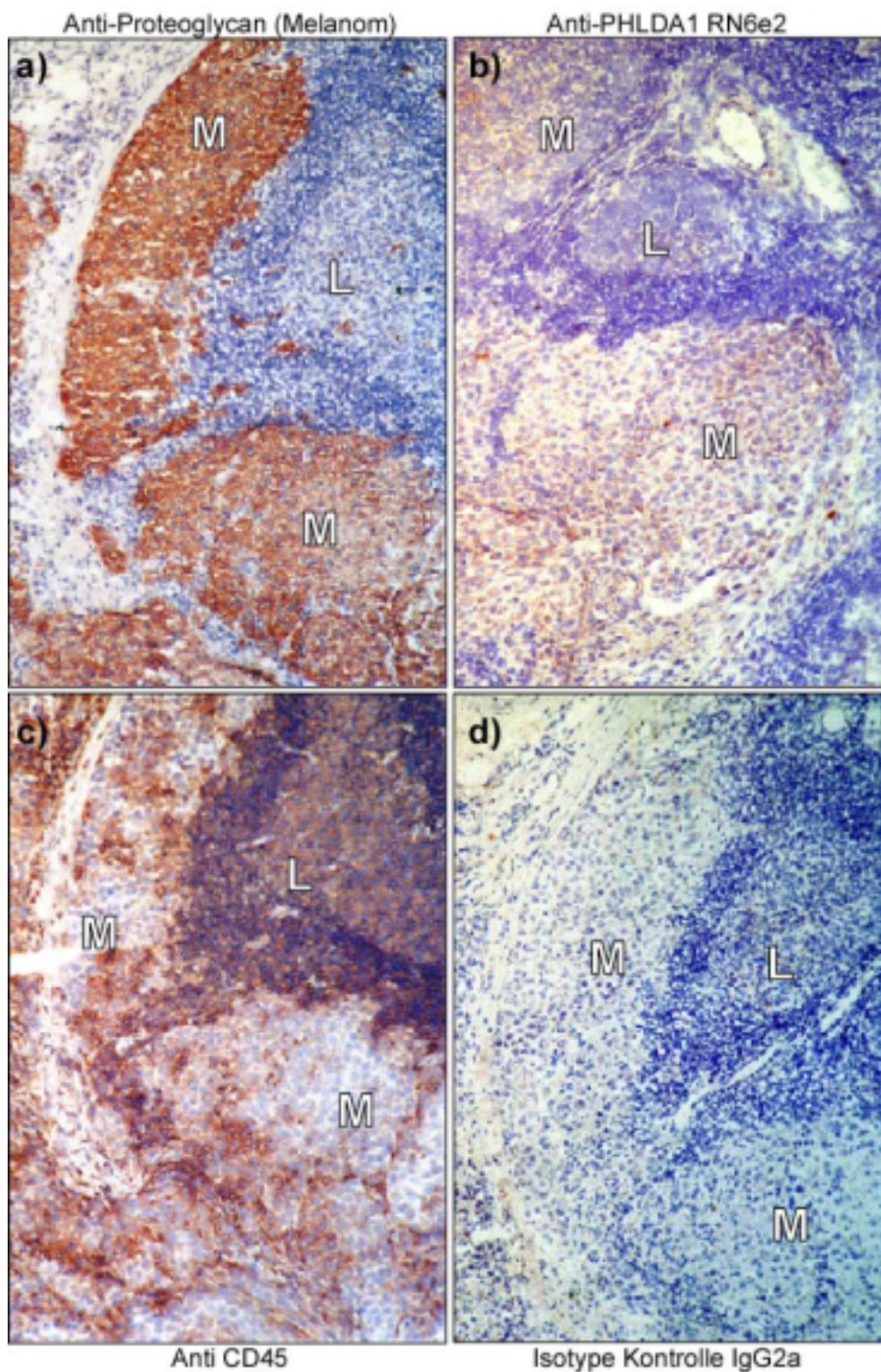


Abb. 2.10 Immunhistochemie von Lymphknotenmetastase M7. Serielle Schnitte der LKM M7 in 125facher Vergrößerung. In a) Färbung mit dem Anti-Proteoglykan-AK (Anti-Melanom), b) mit Anti-PHLDA1-AK RN6e2, c) Anti-CD45 (Lymphozyten) und d) Isotypkontrolle zu RN6e2. M, Melanomzellen; L, Lymphozyten.

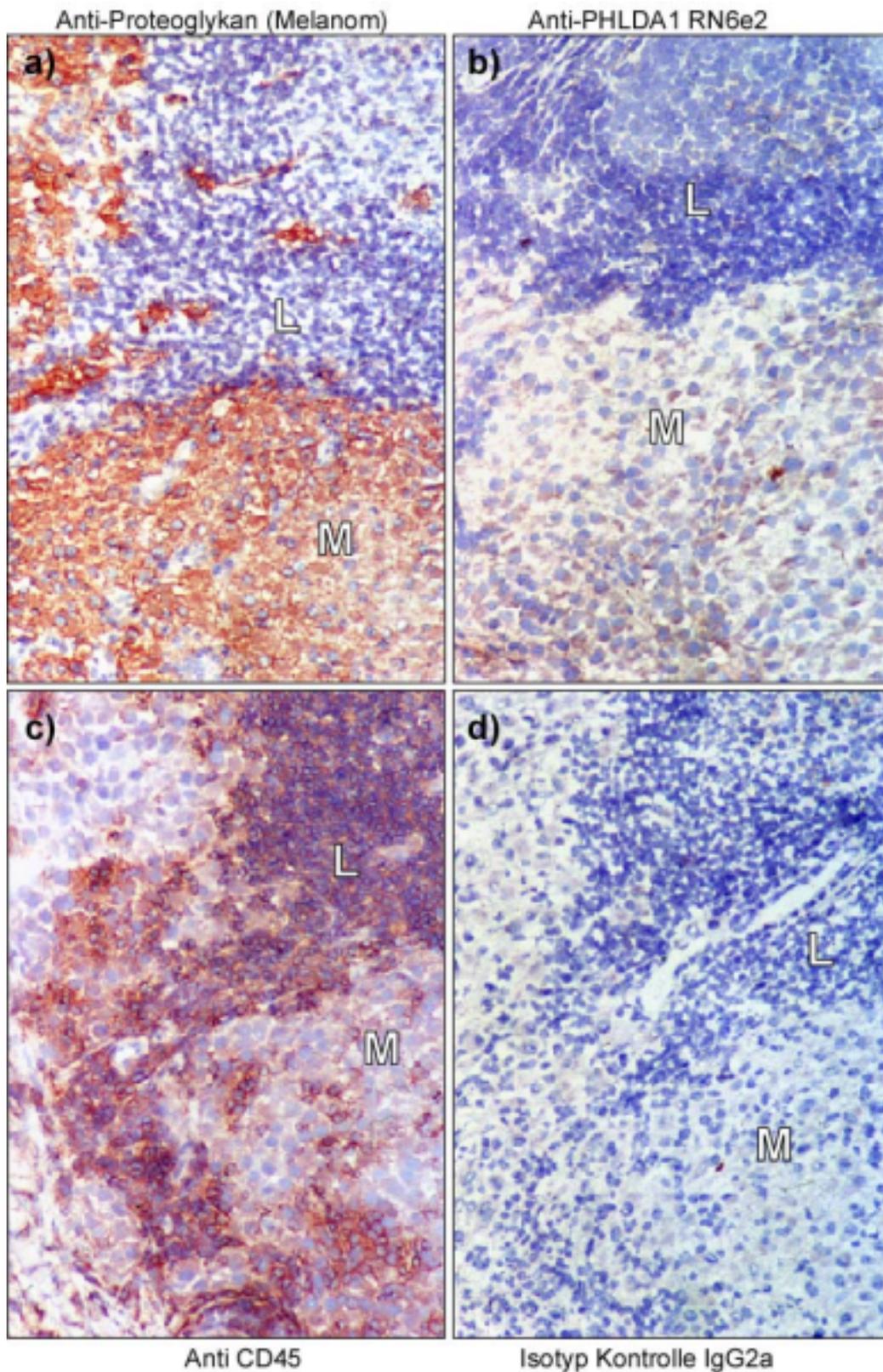


Abb. 2.11 Immunhistochemie von Lymphknotenmetastase M7. Serielle Schnitte der LKM M7 in 250facher Vergrößerung. In a) Färbung mit dem Anti-Proteoglykan-AK (Anti-Melanom), b) mit Anti-PHLDA1-AK RN6e2, c) Anti-CD45 (Lymphozyten) und d) Isotypkontrolle zu RN6e2. M, Melanomzellen; L, Lymphozyten.

Die Lymphknotenmetastase M7 besaß sowohl was die Intensität als auch die Anzahl der gefärbten Zellen betrifft, eine wesentlich geringere PHLDA1-Färbung als die Nävi in Abb. 2.8 und der Primärtumor Abb. 2.9. Es waren etwa 60% der Melanomzellen (Vergleich zu Anti-Proteoglykan) schwach gefärbt (vergleiche in Abb. 2.10 und Abb. 2.11 jeweils a und b). Deutlich ist auch hier zu sehen, dass die Lymphozyten, die das Melanomgewebe umgeben hatten, nicht angefärbt waren (siehe Abb. 2.11 b und c).

Insgesamt wurden 15 Nävi, 22 Melanomprimärtumore und 18 Melanommetasen gefärbt. Sie wurden anhand ihrer Reaktivität in Abb. 2.12 dargestellt. Es wurde der prozentuale Anteil an PHLDA1-positiven Zellen, im Vergleich zu den melanozytären Zellen abgeschätzt und die Stärke der PHLDA1-Färbung in stark wie z.B. bei Nävi N11 und N1 oder in schwach wie z.B. bei Lymphknotenmetastase M7 eingeteilt.

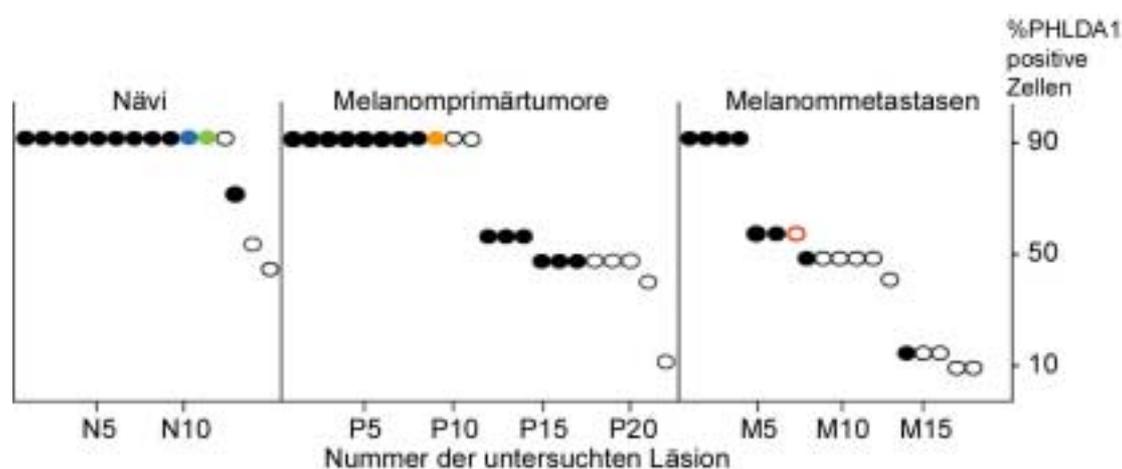


Abb. 2.12 Zusammenfassung der Gewebeschnitte. Jede untersuchte Läsion ist als Kreis dargestellt (X-Achse) und anhand ihrer %-PHLDA1-positiver Zellen in das Diagramm (Y-Achse) eingetragen. Dabei sind Läsionen N1-N15 Nävi, P1-P22 Melanomprimärtumore und M1-M18 Melanommetastasen (siehe auch Kap. 4.1.1 für eine genauere Beschreibung der Läsionen). Gewebeschnitte mit starker Färbung sind ausgefüllt gezeichnet und Gewebe mit schwacher Färbung als nicht ausgefüllte Kreise. Die in Abb. 2.8 bis Abb. 2.11 gezeigten Gewebeschnitte sind farbig dargestellt: blau Nävus N11, grün ist Nävus N1, orange Primärtumor P5 (alle Beispiele für eine starke Färbung) und rot Lymphknotenmetastase M7 (als Beispiel für eine schwache Färbung).

80% der untersuchten Nävi zeigten eine starke und gleichmäßige PHLDA1-Expression, unabhängig von der Art der Nävi, die aus angeborenen (kongenitalen) Nävi oder erworbenen Nävi bestanden. Dagegen zeigten nur 41% der Primärtumore und 22% der Metastasen ein gleiches Expressionsmuster. Bei Melanomen korreliert eine schlechte Prognose für den Patienten mit der vertikalen Dicke des Tumors (Breslow, 1970). Für die getesteten Primärtumore war jedoch keine Korrelation zwischen der PHLDA1-Expression

und dem Tumorstadium (Dicke der Tumoren) zu beobachten. Sowohl dünne Tumore, (< 0,75 mm, Gewebe P3, P15, P16, P20) als auch dicke Tumore (> 3,5 mm, Gewebe P1 und P11) zeigten ein gleichmäßiges PHLDA1-Expressionsmuster. Auch scheint die Art der Primärtumore keine Rolle zu spielen. Gewebe P6 war ein Melanoma in situ, Gewebe P5, P7, P11 und P20 waren noduläre Melanome und Gewebe P2, P3, P8, P10, P12, P15, P16, P18, P19 und P22 Superfiziell Spreitende Melanome. Für all diese verschiedenen Primärtumore konnte keine Korrelation zwischen der Art des Tumors und der PHLDA1-Expression festgestellt werden.

Auch bei den Melanommetastasen war kein Unterschied zu sehen, ob es sich um Haut- (Gewebe M4, M5, M6, M8, und M18), Lungen (Gewebe M3) oder Lymphknotenmetastasen (Gewebe M1, M2, M7, M9-M17) handelte. Die PHLDA1-Expression der Melanomzellen war auch nicht von dem Grad der Lymphozyteninfiltration abhängig.

Dagegen war im Vergleich zu den Nävi, die PHLDA1-Expression in den Primärtumoren und besonders in den Metastasen heterogen und schwach. Diese Beobachtungen zeigen, dass die PHLDA1-Expressionen *in vitro* mit der *in vivo* korrelieren. Die stärkste PHLDA1-Expression ist in den Nävi zu beobachten, die dann im Verlauf der Tumorprogression vom Primärtumor bis hin zur Melanommetastase wieder abnimmt.

2.4 PHLDA1-Expression in verschiedenen Zelllinien

Um einen Anhaltspunkt davon zu bekommen, ob die in melanozytären Geweben gefundene PHLDA1-Expression auch in anderen Tumoren vorhanden ist, wurden weitere Zelllinien aus Tumoren verschiedenster Herkunft auf PHLDA1-Expression in der Westernblot-Analyse untersucht. Zusätzlich sollten Zelllinien gefunden werden, die wenig endogenes PHLDA1 exprimierten. Solche Zelllinien können dann stabil mit PHLDA1 transfiziert werden, um den biologischen Effekt der PHLDA1-Expression in den Transfektanten im Vergleich zu den parentalen Kontrollzellen bestimmen und somit Aufschlüsse über die Funktion von PHLDA1 zu bekommen (siehe Kap. 2.7 bis 2.10).

In Abb. 2.13 sind einige Melanomzelllinien im Westernblot gezeigt.

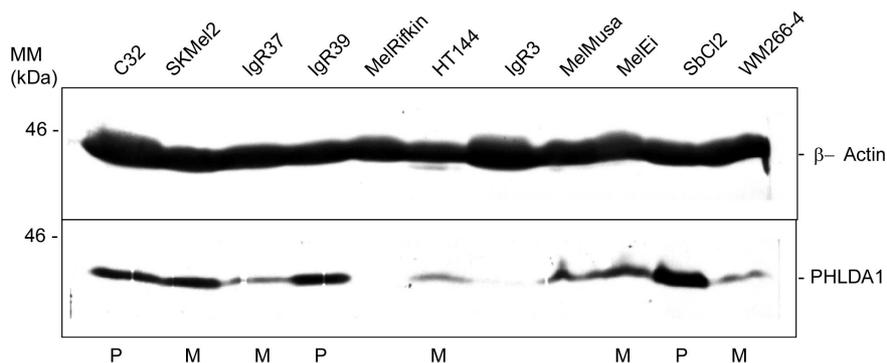


Abb. 2.13 PHLDA1-Expression in Melanomzelllinien in der Westernblot-Analyse. Jeweils 500 μ g Gesamtzelllysat der angegebenen Melanomzelllinien wurden auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran übertragen und das PHLDA1-Protein mit Serum-L19 und $\text{K}\alpha\text{Z}$ -POD detektiert. Von der Membran wurden die Antikörper eluiert und zur Auftragskontrolle mit Anti- β -Actin und $\text{K}\alpha\text{M}$ -POD detektiert. Mit M sind Zelllinien angegeben, die aus Melanommetastasen etabliert wurden, mit P Zelllinien, die aus Melanomprimärtumoren etabliert wurde.

Alle Melanomzelllinien exprimierten das PHLDA1-Protein, wenn auch in unterschiedlichen Mengen, besonders wenig exprimierten die Zelllinien MelRifkin und IgR3, bei der eine kaum sichtbare Bande des Proteins vorhanden war. Keine der Zelllinien exprimierte im Vergleich zu β -Actin sehr viel PHLDA1. Die Zelllinien, die aus einem Primärtumorpaar generiert wurden (mit P bezeichnet) exprimieren wie schon in Abb. 2.1 gesehen mehr PHLDA1, als die Zelllinien, die aus Melanommetastase (M) generiert wurden.

Es wurden auch Zelllinien hämatopoetischen Ursprungs und Zelllinien, die aus Karzinomen etabliert wurden untersucht, ein Beispiel davon ist in Abb. 2.14 gezeigt.

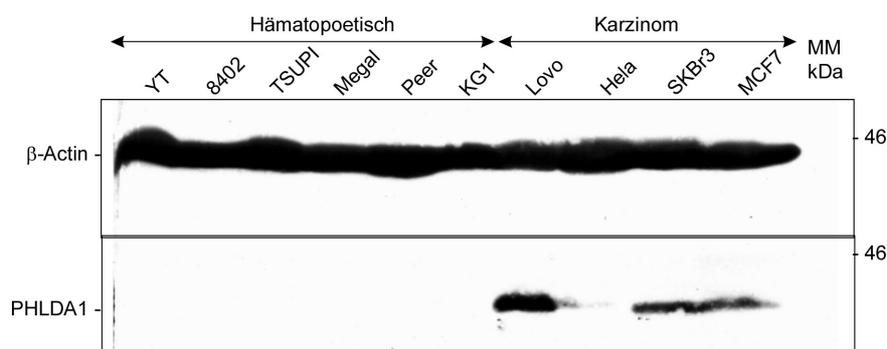


Abb. 2.14 PHLDA1-Expression in Tumorzelllinien in der Westernblot-Analyse. Von jeder Zelllinie wurden 500 μ g Gesamtzelllysat auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit dem Serum L19 und $\text{K}\alpha\text{Z}$ -POD detektiert. Vom Gel wurden die Antikörper eluiert und zur Auftragskontrolle mit Anti- β -Actin und $\text{K}\alpha\text{M}$ -POD detektiert. Tab. 2.2 gibt Auskunft über die Zelllinien.

Alle Zelllinien, die aus Karzinomen etabliert wurden, exprimierten PHLDA1, nicht aber die Zelllinien hämatopoetischen Ursprungs. Es wurde noch eine Reihe anderer Zelllinien untersucht, die aus Melanomen, verschiedenen Karzinomen und Tumoren hämatopoetischer Zellen etabliert wurden. Die Ergebnisse der Expression sind in Tab. 2.2 aufgelistet.

Melanom		Karzinom		Hämatopoetisch	
MelHo (P)	+++	Mamma		T-Zell-Lymphom	
SKMel28 (P)	+++	MDAM	+++	Molt4	-
WM35 (P)	+++	Skbr3	++	8402 (prä-T-Zelllinie)	-
1552(P)	+++	MCF7	++	TSUPI (frühe T-Zell-Leukämie)	-
C32(P)	+++	207	+	Peer (T-Zell-Leukämie)	-
IgR39 (P)	+++				
SbCl2 (P)	+++	Zervix		B-Zell-Lymphom	
MelJuso (P)	+++	Catti	+++	Ramos	-
GTBS (P)	+++	C4 II	+	Raji	-
WM115 (P)	+++	Hela	+	Daudi	-
SbCl3 (P)	++				
MelWei (P)	+	Kolon		Vater Lutz (LCL)	-
Mel888 (P)	+	DLD1	+++		
SKMel31 (P)	+	LS174T	+++	KG1 (akute myeloide Leukämie)	-
MelBühler (M)	+++	SW40	+++	Megal (Megakaryozytische Leukämie)	-
SKMel2 (M)	+++	Lovo	+++	YT (NK-Zelllinienähnliches-Lymphom)	-
MelJu (M)	+	Colo829	+++		-
HT144 (M)	+				
MelEi (M)	+	SK HepI (Häpato)	+++		-
GTBSA (M)	+	CRL173 (AGS)	++		
WM266-4 (M)	+	SSC9 (Epithel)	+	K562 (myeloische Leukämie)	-
IgR37 (M)	+/-	A427 (Lunge)	+	HL60 (myeloische Leukämie)	-
MelGerlach	+++				
MelMusa	+				
SKMel25	+				
IgR3	+/-				
MelRifkin	+/-				
A172 (Gliom)	++				
LN18 (Gliom)	++				

Tab. 2.2 Liste der im Westernblot auf PHLDA1-Expression getesteten Zelllinien. Die Stärke der Expression ist angegeben: +++, stark; ++, mittelstark; +, schwach; +/-, sehr schwach; -, nicht vorhanden. P, Melanomzelllinien aus Primärtumoren etabliert; M, Melanomzelllinien aus Melanommetastase etabliert.

Es waren alle 29 getesteten Melanomzelllinien sowie alle der 16 getesteten Karzinomzelllinien PHLDA1 positiv, dagegen keine der 13 Zelllinien hämatopoetischen

Ursprunges. Somit sind Zellen hämatopoetischen Ursprunges die einzigen getesteten Zelllinien, die kein PHLDA1 exprimieren.

Eine statistische Auswertung von 22 Melanomzelllinien mit bekanntem Ursprung, zeigte eine starke Korrelation zwischen der PHLDA1-Expression und der Herkunft der Zelllinien.

Herkunft der Zelllinien \ Expression	starke PHLDA1 Proteinexpression	schwache PHLDA1 Proteinexpression
Melanomprimärtumore	11	3
Melanommetastasen	2	6

$p < 0,0046$

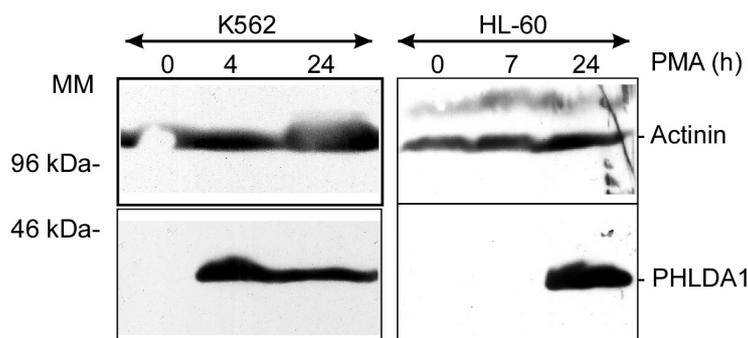
Tab. 2.3 Korrelation zwischen der PHLDA1-Expression und Herkunft der Zelllinien. Angegeben sind die jeweiligen Anzahlen der Zelllinien mit einer starken PHLDA1-Expression (in Tab. 2.2 mit +++ und ++ bezeichnet) und einer schwachen PHLDA1-Expression (in Tab. 2.2 mit + und +/- bezeichnet). Sie sind nach der Herkunft der Zelllinien aufgelistet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Fisher's Exact Test.

Die Melanomzelllinien, die aus einem Primärtumor generiert wurden, exprimierten signifikant mehr PHLDA1-Protein ($p < 0,0046$) als die Zelllinien, die aus einer Melanommetastase generiert wurden (siehe Tab. 2.3). Diese Resultate bestätigen die Ergebnisse mit den drei autologen Tumorzellpaaren, in denen PHLDA1 als differentiell exprimiertes Gen identifiziert wurde (siehe Kap. 2.1, Abb. 2.1 und Abb. 2.2).

2.4.1 Induktion der PHLDA1-Expression durch Phorbolster

PHLDA1 ist ein *immediate early response gene*, dessen mRNA Cycloheximid unabhängig durch Phorbolster (PMA) induziert werden kann (Kuske, 1998). Bei den Zelllinien hämatopoetischen Ursprunges könnte die PHLDA1-Expression herunterreguliert- oder aber das PHLDA1-Gen deletiert oder seine Expression inaktiviert worden sein. Um zu testen, ob ein funktionell-transkribierbares Gen vorhanden war, wurden die Zelllinien hämatopoetischen Ursprunges und einige der Melanomzelllinien, die wenig PHLDA1 exprimieren, mit PMA behandelt, und dann erneut auf PHLDA1-Expression mit Hilfe der Westernblot-Analyse getestet.

a) Zelllinien hämatopoetischen Ursprunges



b) Melanomzelllinien

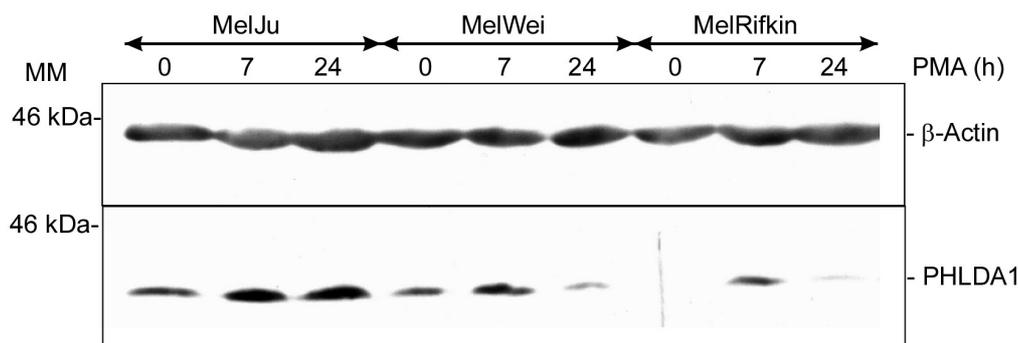


Abb. 2.15 PHLDA1-Induktion durch PMA. Die Zelllinien a) hämatopoetischen Ursprunges und b) Melanomzelllinien wurden für die angegebene Stunden (h) mit 10 ng/ml Phorbol ester (PMA) stimuliert. Anschließend wurden 500 μ g Gesamtzelllysat auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, die Proteine auf Nitrozellulose übertragen und mit dem Anti-PHLDA1-Serum L19 und $\text{K}\alpha\text{Z}$ -POD detektiert. Die Antikörper wurden eluiert und zur Auftragskontrolle mit Anti- β -Actin bzw. Anti-Actinin und $\text{K}\alpha\text{M}$ -POD detektiert. MM, Molekulargewichtsmarker.

In allen Zelllinien konnte PHLDA1 durch PMA induziert werden (siehe Abb. 2.15). Bei den Melanomzelllinien, die auch geringe Mengen basal exprimiertes PHLDA1 enthielten, war die Induktion nach 7 h am stärksten und nahm nach 24 h schon wieder ab. Die Zelllinien hämatopoetischen Ursprunges zeigten z.T. schon nach 4 h (K562) oder spätestens nach 24 h (HL60) eine sehr starke PHLDA1-Induktion. Somit besitzen auch Zelllinien hämatopoetischen Ursprunges ein funktionell-transkribierbares PHLDA1-Gen, dessen Expression sich durch PMA, wenn auch in unterschiedlicher Kinetik, stark induzieren lässt.

2.5 Lokalisation von PHLDA1 in Zellen

PHLDA1 hat ein potentielles Kernlokalisierungssignal (siehe Kap. 1.5 und Abb. 1.2), dessen Funktionalität allerdings noch nicht getestet wurde. Um die Lokalisation von PHLDA1 in den Zellen zu bestimmen, wurde eine zytoplasmatische Immunfluoreszenz mit der Zelllinie MelJuso und dem monoklonalen Anti-PHLDA1-AK RN6e2 durchgeführt und im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Das Chromatin im Zellkern wurde mit DAPI gefärbt und mit der Auswertungssoftware der Falschfarbe rot zugewiesen. Die Bindung des Anti-PHLDA1-AK RN6e2 wurde durch K α M-FITC-AK nachgewiesen, das im Fluoreszenzmikroskop grün erscheint.

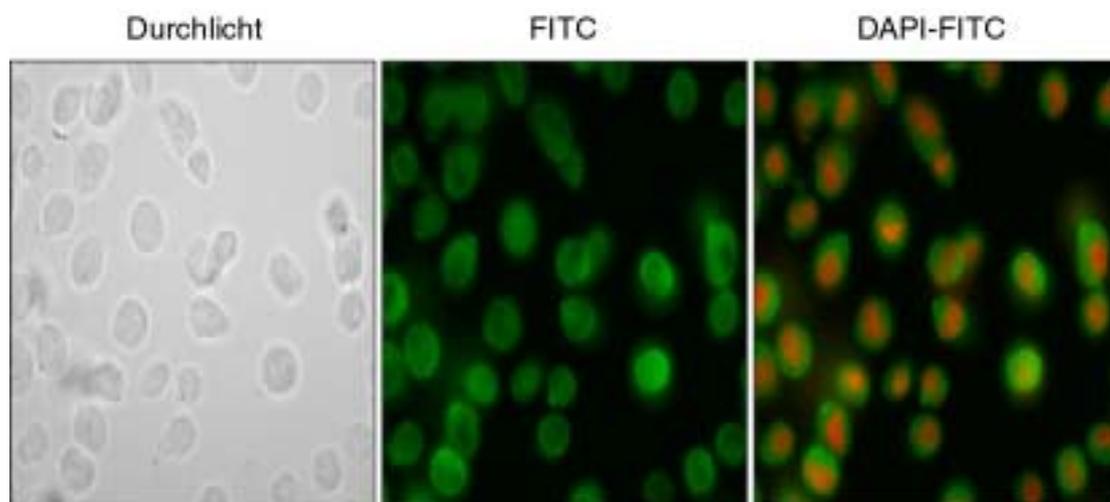


Abb. 2.16 Fluoreszenzmikroskopie zur Lokalisation von PHLDA1. Abgebildet ist dreimal der gleiche Ausschnitt von Fluoreszenzaufnahmen der Melanomzelllinie MelJuso mit dem Anti-PHLDA1-mAK RN6e2 und K α M-FITC. Links im Durchlicht, in der Mitte mit FITC-Filter und rechts eine Überlagerung aus DAPI-Färbung (rot) und FITC.

Wie man in Abb. 2.16 sehen kann, ist PHLDA1 im Zytoplasma lokalisiert, die Zellkerne sind weitgehend ausgespart. Wäre auch eine PHLDA1-Färbung des Kernes zu sehen, hätte er sich wegen der Überlagerung der Farben gelb gefärbt. Somit handelt es sich bei PHLDA1 trotz des potentiellen Kernlokalisierungssignales um ein zytoplasmatisches Protein. Nicht auszuschließen bleibt allerdings die Möglichkeit, dass PHLDA1 unter Stimulation oder in bestimmten Entwicklungsstadien von Zellen oder Geweben in den Kern transportiert wird.

2.6 Bestimmung des Translationsstartpunktes von PHLDA1

Das PHLDA1-Protein hat zwei potentielle Translationsstartpunkte. In der Regel wird bei eukaryontischen mRNAs das erste Startcodon verwendet (Kozak, 1984). Es gibt aber auch Beispiele für die Verwendung von ATGs weiter im 3'-Bereich, wenn diese eine Kozak-Translationsinitiationssequenz besitzen (Kozak, 1978; Kozak, 1986). In der PHLDA1-Sequenz besitzt das erste ATG keine, aber das zweite ATG eine Kozak-Konsensussequenz. Bei der Verwendung des ersten ATGs, würde ein Protein von 400 AA mit einem Molekulargewicht von 44,9 kDa entstehen (siehe Abb. 2.17 a), bei der Verwendung des zweiten ATGs ein Protein von 259 AA mit einem Molekulargewicht von 29,5 kDa (siehe Abb. 2.17 b). Wie schon in Abb. 2.1 gezeigt, läuft das PHLDA1-Protein in der SDS-PAGE bei einem Molekulargewicht von 40 kDa, also zwischen den beiden errechneten Molekulargewichten.

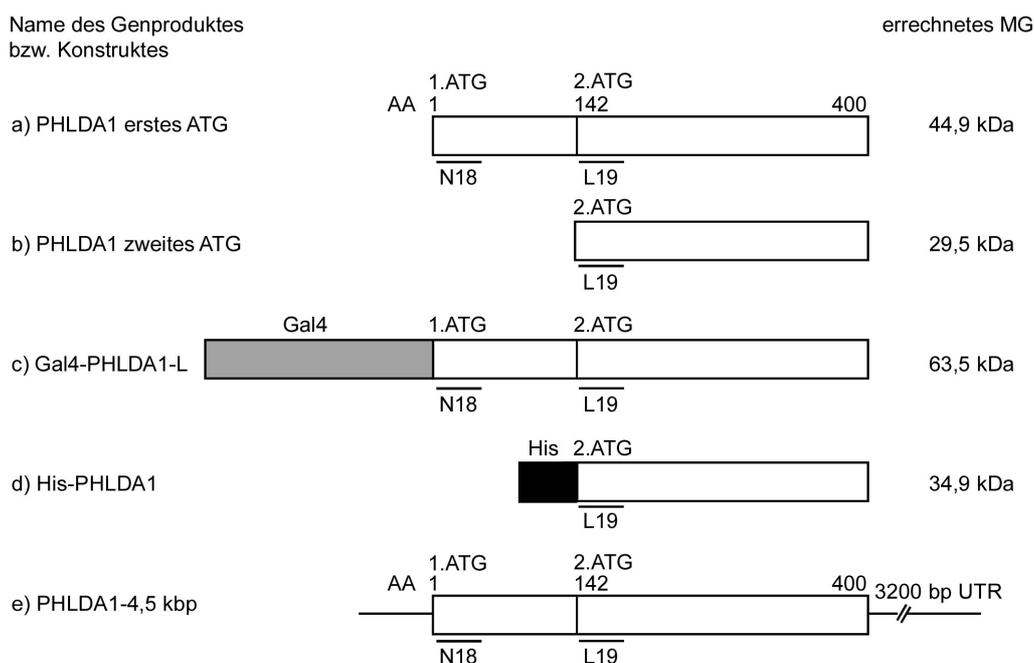


Abb. 2.17 Schematische Darstellung möglicher Genprodukte und Konstrukte von PHLDA1. Gezeigt sind die Genprodukte von PHLDA1 unter Verwendung a) des ersten ATGs bzw. b) des zweiten ATGs sowie die sich daraus ergebenden errechneten Molekulargewichte (MG) in kDa. Angegeben sind auch die Aminosäurepositionen (AA) bei denen sich die jeweiligen ATGs befinden sowie die Bindebereiche der polyklonalen Seren L19 und N18. In c) bis e) sind Konstrukte, die zur Bestimmung des Translationsstartpunktes verwendet wurden skizziert. UTR, 3'-untranslatierter Bereich.

Um den genauen Translationsstartpunkt zu bestimmen, wurden zwei verschiedene polyklonale Seren gegen PHLDA1 verwendet. Serum N18 ist gegen ein Peptid gemacht,

das den ersten 18 AA des humanen PHLDA1 ab dem ersten ATG entspricht und Serum L19 ist gegen ein Peptid gemacht, das den ersten 19 AA ab dem zweiten ATG entspricht (siehe Abb. 2.17 e). Mit diesen beiden Seren wurde die Größe von PHLDA1 in verschiedenen Zelllinien im Westernblot untersucht. Serum L19 sollte beide PHLDA1-Sequenzen erkennen, N18 dagegen nur das PHLDA1, das ab dem ersten ATG synthetisiert wurde.

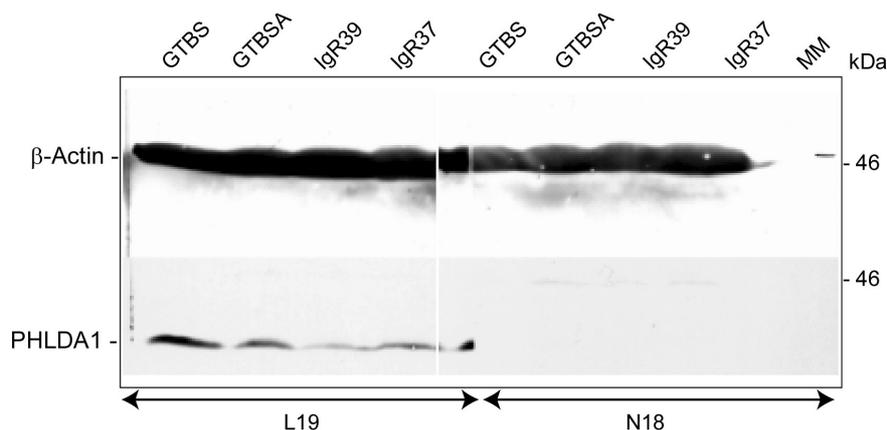


Abb. 2.18 Westernblot-Analyse mit verschiedenen Anti-PHLDA1 Seren. 250 μ g Gesamtzelllysat der angegebenen Zelllinien wurden auf einem 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt (jede Zelllinie zweimal). Das Gel wurde auf Nitrozellulosemembran übertragen und der linke Teil mit dem Serum L19 der rechte Teil mit Serum N18 inkubiert und anschließend mit $\text{K}\alpha\text{Z}$ -POD detektiert. Die Antikörperkonjugate wurden eluiert und der Blot mit Anti- β -Actin und $\text{K}\alpha\text{M}$ -POD detektiert. MM, Molekulargewichtsmarker.

Das polyklonale Serum L19 erkannte PHLDA1 bei ca. 40 kDa in vier verschiedenen Zelllinien, dagegen detektierte das Serum N18 kein Protein. Um die Reaktivität des Serums N18 zu zeigen, wurde PHLDA1 als rekombinantes Gal4-PHLDA1-L-Fusionsprotein (siehe auch Abb. 5.1) in Hefe exprimiert und im Westernblot getestet. Das Fusionsprotein enthält die 149 AA lange Gal4-DNA-Bindedomäne fusioniert an den gesamten offenen Leserahmen von PHLDA1 ab dem ersten ATG (siehe Abb. 2.17 c).

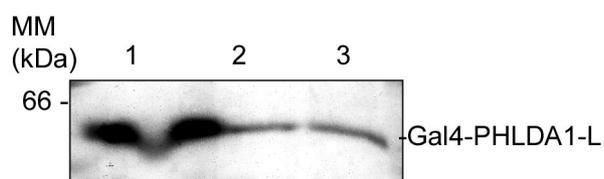


Abb. 2.19 Westernblot-Analyse von Gal4-PHLDA1-L mit Serum N18. Je 500 μ g Gesamtzelllysat von drei verschiedenen Hefepräparationen wurden auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran übertragen und mit Serum N18 und $\text{K}\alpha\text{Z}$ -POD detektiert.

Obwohl die Reaktivität des Serums N18 gegenüber rekombinantem Gal4-PHLDA1 gezeigt wurde (siehe Abb. 2.19), erkannte es kein PHLDA1 im Gesamtzelllysat von humanen Zellen, was für die Verwendung des zweiten ATGs spricht. Lediglich die Größe, bei der PHLDA1 im Gel migriert, suggeriert ein größeres Molekül als die errechneten 29,5 kDa. Allerdings kann das Protein posttranslational modifiziert sein oder aufgrund seiner positiven Gesamtladung langsamer laufen.

Um in einem weiteren, unabhängigen Experiment zu zeigen, dass PHLDA1 das zweite ATG verwendet und bei 40 kDa im Polyacrylamidgel läuft, wurden verschiedene Konstrukte des PHLDA1-Gens in die Zelllinie Colo320 und in die adenovirus-transformierte Nierenepithelzelllinie 293 transformiert, die beide nur wenig endogenes PHLDA1 exprimieren. Das Laufverhalten der verschiedenen Konstrukte wurde im Westernblot analysiert. Es wurde ein 4,5 kbp Vollängenklon verwendet, der den gesamten offenen Leserahmen und ca. 3200 bp der 3'-untranslatierten Sequenz enthält (PHLDA1-ORF, siehe Abb. 2.17 e). Ein weiteres Konstrukt (His-PHLDA1, siehe Abb. 2.17 d und Kap. 5.5.7.3) enthielt nur die PHLDA1-Sequenz ab dem zweiten ATG, fusioniert an ein N-terminales His-Tag, wodurch ein Protein von 34,9 kDa entstand. Wird von dem Vollängenkonstrukt ab dem ersten ATG translatiert, sollte es mit 44,9 kDa langsamer als das Konstrukt His-PHLDA1 laufen, wird dagegen das zweite ATG verwendet, sollte es mit 29,5 kDa schneller laufen.

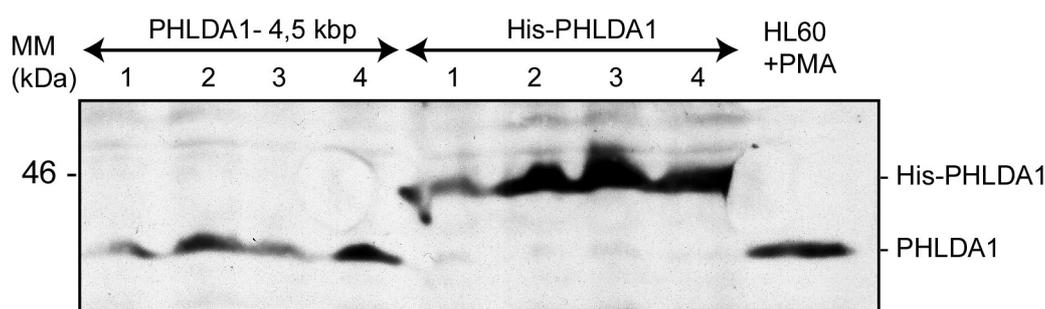


Abb. 2.20 Westernblot zur Bestimmung des Translationsstartpunktes. 250 μ g Gesamtzelllysat von vier unabhängigen PHLDA1-4,5kbp-Transfektanten, vier unabhängigen His-PHLDA1-Transfektanten und der PMA-stimulierten Zelllinie HL60 wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. Die Proteine wurden mit dem Serum L19 und K α Z-POD detektiert. MM, Molekulargewichtsmarker

Die PHLDA1-4,5 kbp-Transfektanten der Zelllinie Colo320 liefen wie das endogene, in HL60 induzierte PHLDA1 auf einer Höhe von 40 kDa und damit schneller als die His-

PHLDA1-Transfektanten, die ein errechnetes Molekulargewicht von 34,9 kDa haben und bei ca. 45 kDa liefen. Somit wird bei PHLDA1 das zweite Startcodon verwendet. Sowohl das endogene PHLDA1 als auch die PHLDA1-Transfektanten mit dem His-Tag laufen im denaturierenden Polyacrylamidgel langsamer als es ihrem theoretischen Molekulargewicht entspricht, was durch eine posttranslationale Modifikation und/oder durch die positive Ladung des Proteins zustande kommen kann.

2.7 Charakterisierung stabiler PHLDA1-Transfektanten

Bisher wurde das PHLDA1-Protein genauer charakterisiert und die PHLDA1-Expression *in vitro* und *in vivo* bestimmt. Dabei wurde eine starke Expression in den Nävi und die sukzessive Abnahme während der Tumorprogression festgestellt. Dieses Expressionsmuster unterscheidet sich grundsätzlich von den Zellen und Geweben, die die Tumore umgeben. Weder die Zellen der Haut noch die der Lymphknoten zeigten eine PHLDA1-spezifische Färbung, wodurch sich die Frage stellte, welche funktionellen Konsequenzen eine konstitutive PHLDA1-Expression für die Zellen hat.

Um Zellen mit einer konstitutiven PHLDA1-Expression zu erhalten, wurden stabile Transfektanten in solchen Zelllinien generiert, die wenig endogenes PHLDA1 exprimierten. Im Vergleich zu den Kontroll-Transfektanten, die nur mit dem Neomycinvektor transformiert wurden, wurden die Transfektanten dann in verschiedenen funktionellen Tests untersucht. Dabei wurde die Fähigkeit Kolonien zu bilden, die Klonierungseffizienz, Wachstumskinetiken, der Zellzyklus sowie das Verhalten der Zellen während der Apoptose, in Abhängigkeit der PHLDA1-Expression bestimmt.

2.7.1 PHLDA1-Expression stabiler Transfektanten

PHLDA1 wurde in die humane, Adenovirus-transformierte (mit E1a und E1b transformiert) Nierenepithelzelllinie 293 und in die Melanomzelllinie MelRifkin transformiert, da diese Zelllinien wenig endogenes PHLDA1 produzieren. Die Transfektanten wurden wie in Kap. 5.2.4.2 beschrieben, hergestellt mit der zytoplasmatischen Immunfluoreszenz auf PHLDA1-Expression überprüft (siehe Kap. 5.7.3.2). Da nur ca. 5-10% der Zellen einer Transfektantenlinie PHLDA1 exprimierte, wurden die Zellen über 96-Lochplatten kloniert und die Klone auf PHLDA1-Expression getestet. Auch die Kontroll-Transfektanten mit dem Neomycinvektor wurden kloniert. Von

den beiden Zelllinien konnten jeweils vier unabhängige, klonierte PHLDA1-Transfektanten und zwei unabhängige, klonierte Neomycinvektor-Transfektanten isoliert werden. Die PHLDA1-Expression der Transfektanten ist in Abb. 2.21 in der FACS-Analyse und im Westernblot gezeigt.

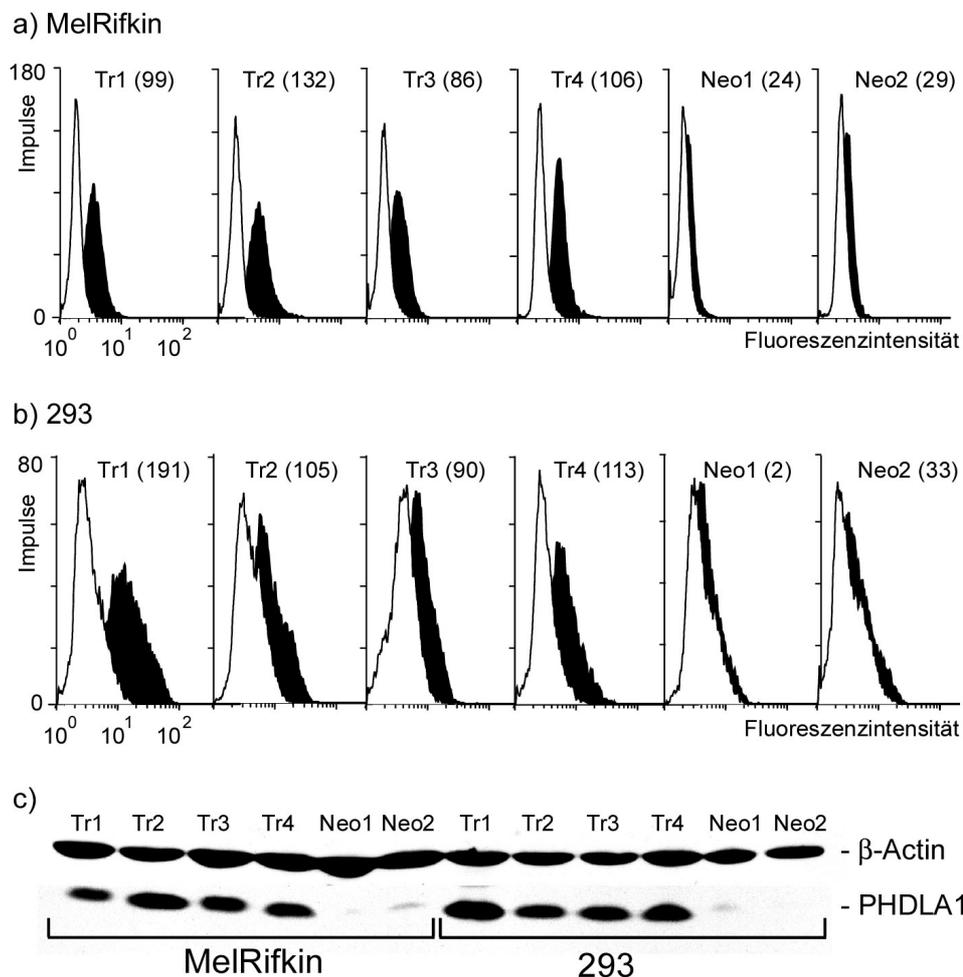


Abb. 2.21 Stabile PHLDA1-Transfektanten. FACS-Analyse der MelRifkin-Transfektanten a) und der 293-Transfektanten b). Tr1-Tr4, PHLDA1-Transfektanten; Neo1 und Neo2, Neomycinvektor-Transfektanten. Die Bindung des mAnti-PHLDA1-AK RN6e2 (schwarze, ausgefüllte Kurven) wurde durch K α M-FITC-AK in der zytoplasmatischen Immunfluoreszenz nachgewiesen. In den weißen Kurven sind die Isotypkontrollen mit dem mAK Upc10 und K α M-FITC-AK dargestellt. Die *delta mean channel* (siehe Kap. 5.7.3.4) sind in Klammern angegeben. In Abb. c) ist die PHLDA1-Expression im Westernblot gezeigt. Jeweils 100 μ g Gesamtzelllysat wurden auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran übertragen und mit mAK RN6e2 und K α M-POD detektiert. Die AK wurden eluiert und der Blot mit Anti- β -Actin und K α M-POD erneut detektiert.

Alle PHLDA1-Transfektanten exprimieren 3-10fach mehr PHLDA1 als die Neomycinvektor-Transfektanten (siehe *delta mean channel* in Abb. 2.21 a und b). Die

PHLDA1-Expression ist in den einzelnen Zellen der klonierten Transfektantenlinien sehr einheitlich, wie man durch die scharf abgegrenzten, eingipfeligen Kurven in der FACS-Analyse sehen kann. Die absolute PHLDA1-Menge der Transfektanten ist jedoch nicht höher als in anderen PHLDA1-positiven Zelllinien, vergleiche dazu die *delta mean channel* der FACS-Analysen von Abb. 2.21 a, b mit denen in Tab. 2.1 sowie die Westernblots in Abb. 2.21 c mit denen in Abb. 2.13, Abb. 2.14 und Abb. 2.4. So konnten PHLDA1-Transfektanten Zelllinien hergestellt werden, die PHLDA1 bis zu 10fach höher exprimierten als ihre parentalen Zellen. Die Gesamt-PHLDA1-Menge war allerdings mit der endogenen in einigen Zelllinien produzierten endogenen Menge vergleichbar.

2.7.2 Wachstumsmorphologie der PHLDA1-Transfektanten

Zunächst wurde untersucht, ob eine verstärkte PHLDA1-Expression eine Auswirkung auf die Zellmorphologie hat und sich im Verlaufe des Wachstums Unterschiede zwischen den PHLDA1-Transfektanten und den Kontroll-Transfektanten ergaben. Dazu wurden die Transfektanten in gleicher Anzahl in 96-Lochplatten ausplattiert und drei Tage wachsen gelassen. Täglich wurden die Morphologie der Transfektanten mit dem Mikroskop beobachtet und fotografiert. In Abb. 2.22 sind die 293-Transfektanten während ihres Wachstums über drei Tage abgebildet und in Abb. 2.23 ist die Morphologie von den MelRifkin-Transfektanten zu zwei Zeitpunkten gezeigt.

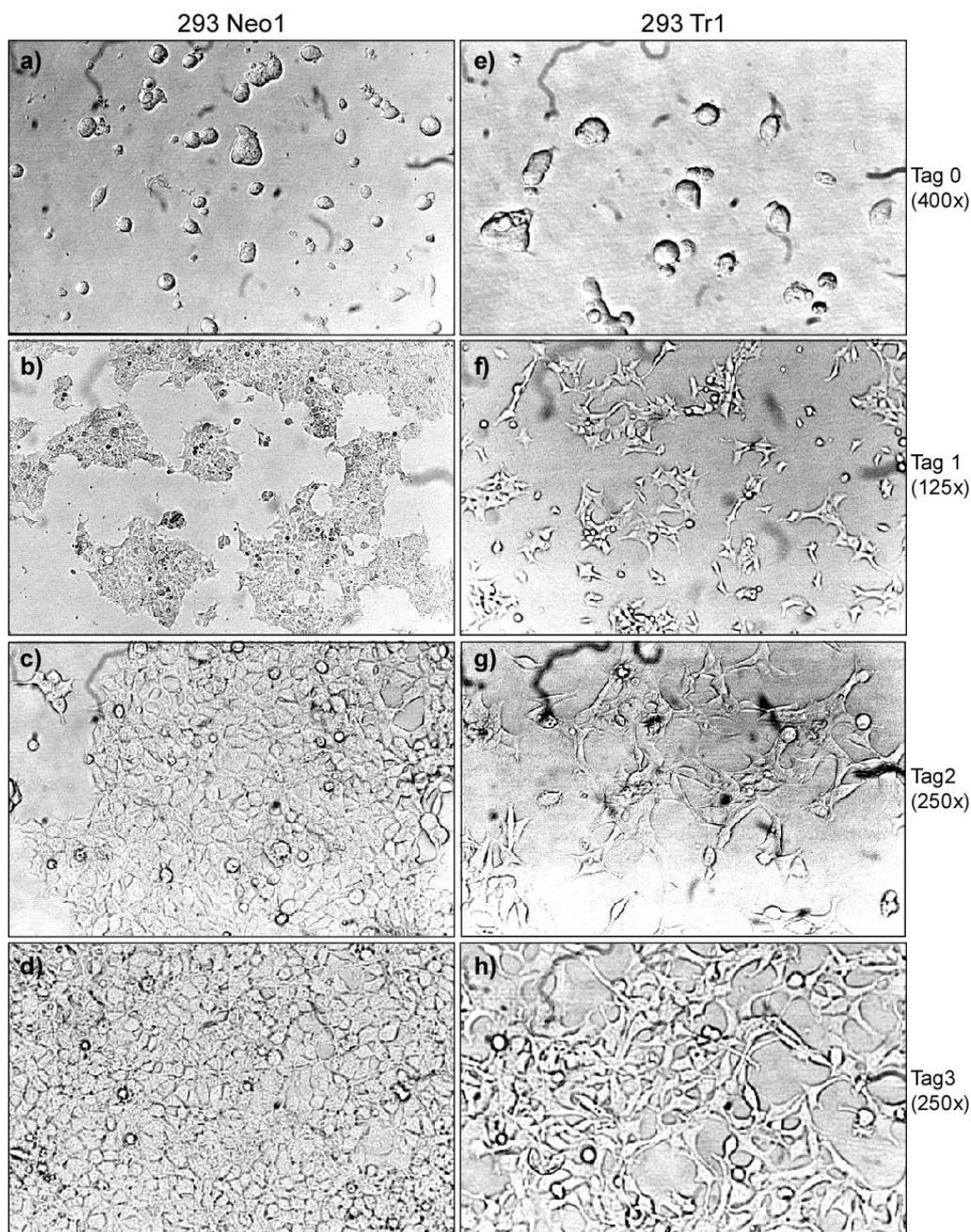


Abb. 2.22 Morphologie von 293-Transfektanten. Je 10^4 Zellen von der 293-Neomycin-Transfektante Neo1 (a-d) und der PHLDA1-Transfektante Tr1 (e-h) wurden in einem Loch einer 96-Lochplatte in RPMI-Medium ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen fotografiert. Die jeweilige Vergrößerung ist in Kammern angegeben.

Zum Zeitpunkt des Ausplattierens war kein Unterschied in der Morphologie zwischen den PHLDA1- und Neomycinvektor-Transfektanten zu beobachten (siehe Abb. 2.22 a und e). Ab dem ersten Tag wuchsen die Neomycinvektor-Transfektanten verstärkt in Zellgruppen (Abb. 2.22 b), während die PHLDA1-Transfektanten, gleichmäßig verteilt auf dem Boden der 96-Lochplatte wuchsen und längere Ausläufer der einzelnen Zellen bildeten (Abb. 2.22

f) als die Kontroll-Transfektanten. Ab dem zweiten Tag hatten sowohl die Neomycinvektor- als auch die PHLDA1-Transfektanten Zell-Zell Kontakt über den gesamten Boden der 96-Lochplatte. Dennoch ist zu beobachten, dass die Neomycinvektor-Transfektanten dichter wuchsen, als die PHLDA1-Transfektanten, bei denen auch noch am dritten Tag die Zellen, trotz des Zell-Zell Kontaktes, größere Abstände zwischen einzelnen Zellen auftraten (siehe Abb. 2.22 h). Dieser unterschiedliche Wachstumsverhalten konnte auch bei den MelRifkin-Transfektanten beobachtet werden (Abb. 2.23).

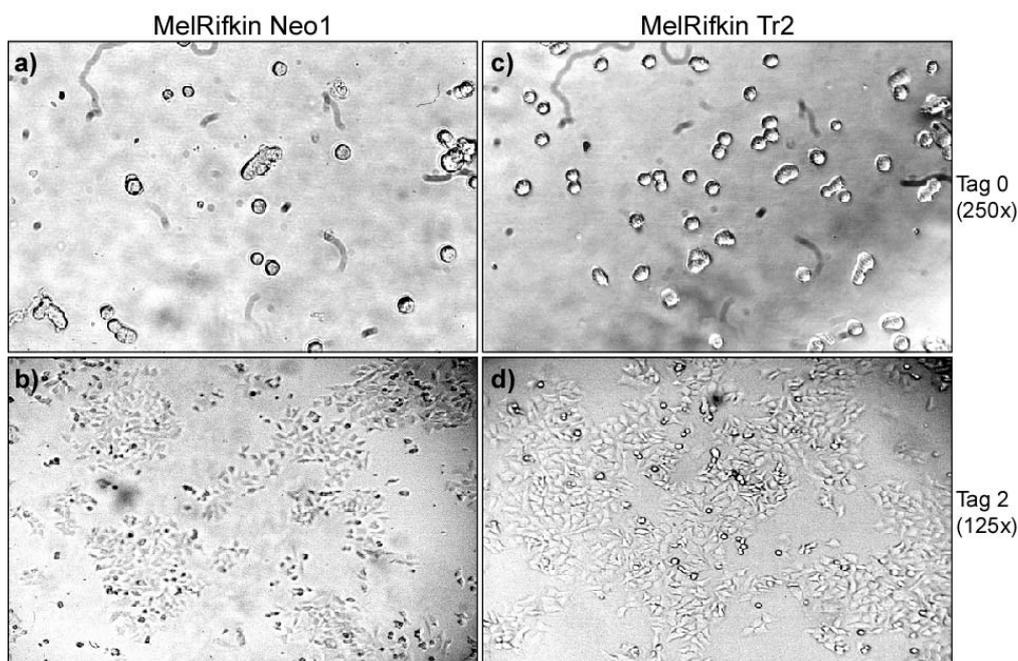


Abb. 2.23 Morphologie der MelRifkin-Transfektanten. Je 10^4 Zellen der MelRifkin-Neomycin-Transfektante Neo1 (a, b) und der PHLDA1-Transfektante Tr2 (c, d) wurden in einem Loch einer 96-Lochplatte in RPMI-Medium ausplattiert und bei 37°C inkubiert. An Tag 0 und Tag 2 wurden die Zellen fotografiert, die Vergrößerung ist in Klammern angegeben.

Auch bei den MelRifkin Transfektanten war zu dem Zeitpunkt des Ausplattierens kein Unterschied in der Morphologie zwischen Neomycinvektor- und PHLDA1-Transfektanten zu beobachten (Abb. 2.23 a und c). Aber auch hier wuchsen im weiteren Verlauf die Neomycinvektor-Transfektanten mehr in Zellgruppen siehe Abb. 2.23 b als die PHLDA1-Transfektanten, die gleichmäßiger verteilt über den Boden des Lochs der 96-Lochplatte waren (Abb. 2.23 d).

Demnach wurde durch die verstärkte PHLDA1-Expression in den Zelllinien deren Morphologie während des Wachstums verändert, indem sie gleichmäßiger verteilt einen Monolayer bildeten und weniger in Zellgruppen als die Neomycinvektor-Transfektanten

wuchsen. Die größeren Abstände zwischen den einzelnen Zellen der PHLDA1-Transfektanten deuten auf eine durch PHLDA1-vermittelte Kontaktinhibition des Wachstums hin.

2.8 Klonierungseffizienz

Nach Ablösung und Auswanderung vom Primärtumor ist es für die Tumorzellen von Vorteil wenn sie ohne Zell-Zell-Kontakt eine neue Kolonie bilden können. Je leichter es den Zellen fällt, ohne andere Tumorzellen eine neue Kolonie zu bilden, desto größer ist die Chance einer erfolgreichen Metastasenbildung. Die Fähigkeit der Zellen ohne Zell-Zell-Kontakt autonom zu wachsen, kann man *in vitro* über die Klonierungseffizienz bestimmen. Dabei wurden die Zellen der Transfektantenlinien so auf 96-Lochplatten ausplattiert, dass statistisch gesehen nur eine Zelle in ein Loch kommt. Nach ca. 10 Tagen ermittelte man mit dem Mikroskop die Anzahl der gewachsenen Klone (siehe auch Kap. 5.2.7).

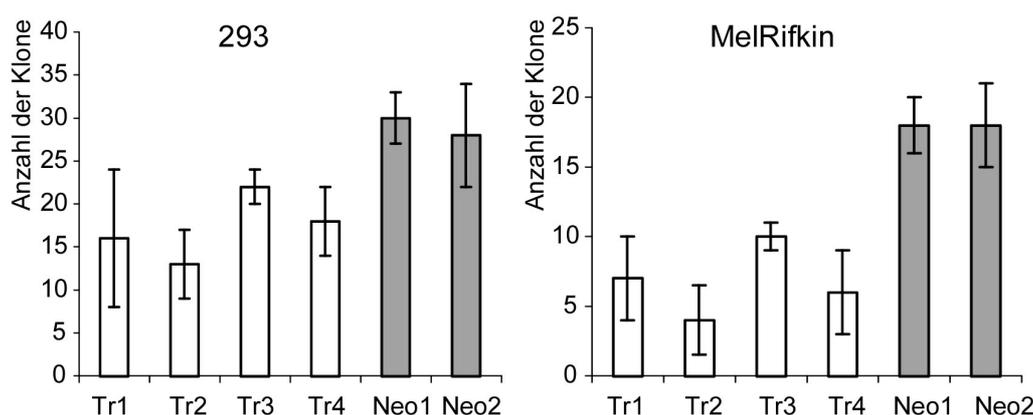


Abb. 2.24 Klonierungseffizienz. 100 Zellen jeder Transfektante wurden in 96-Lochplatten ausplattiert und nach 10 Tagen Inkubation die Anzahl der Klone gezählt und im Balkendiagramm dargestellt. Die vertikalen Balken sind die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Tr1-Tr4, PHLDA1-Transfektanten; Neo1 und Neo2, Neomycinvektor-Transfektanten.

Die Klonierungseffizienz war in den PHLDA1-Transfektanten sowohl für die Zelllinie 293 als auch für die Melanomzelllinie MelRifkin gegenüber den Neomycinvektor-Transfektanten reduziert. Dabei war der Unterschied bei den MelRifkin-PHLDA1-Transfektanten mit einer 60%-igen Reduktion größer als bei den 293-PHLDA1-Transfektanten, die ca. 40% weniger Klone bildeten als ihre Kontroll-Transfektanten. Insgesamt war die Anzahl der Klone bei den 293-Transfektanten im Durchschnitt doppelt so hoch wie bei den MelRifkin-Transfektanten. Somit reduziert eine verstärkte PHLDA1-

Expression die Fähigkeit, autonom aus einer einzelnen Zelle zu einem Klon heranzuwachsen.

2.9 Einfluss der konstitutiven PHLDA1-Expression auf das Wachstum

Um Aufschluss darüber zu bekommen, welche Auswirkungen eine verstärkte PHLDA1-Expression auf das Wachstumsverhalten von Zelllinien hat, wurden PHLDA1-Transfektanten im Vergleich zu den Kontroll-Transfektanten in verschiedenen Wachstumstests untersucht.

2.9.1 Einfluss von PHLDA1 auf die Fähigkeit Kolonien zu formen

Die Tumorigenese ist unter anderem davon abhängig, wie leicht es den Tumorzellen fällt, als neu gebildete Kolonie zu wachsen. Man kann dieses Verhalten *in vitro* durch den Kolonie-Formationsassay in flüssigem Medium bestimmen. Dabei wurde die gleiche Anzahl an Zellen der PHLDA1-Transfektanten wie der Neomycinvektor-Transfektanten in einem Loch der 6-Loch-Platten ausplattiert und ca. 16 Tage wachsen gelassen. Dann färbte man die Zellen und zählte die gebildeten Kolonien (siehe auch Kap. 5.2.6). In Abb. 2.25 sind die Anzahl der Kolonien grafisch dargestellt.

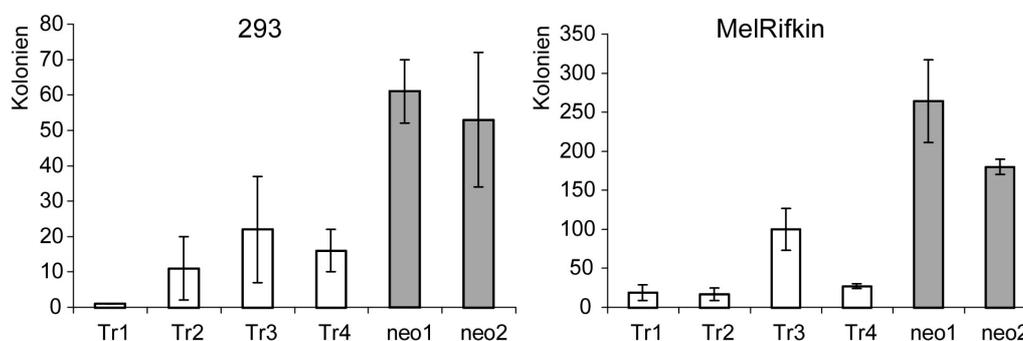


Abb. 2.25 Kolonie-Formationsassay. Angegeben sind die Anzahl der Kolonien der einzelnen Transfektantenlinien, die sich nach 16 Tagen Inkubation aus 300 ausplattierten Zellen gebildet haben. Die Standardabweichungen aus der Dreifachbestimmung sind als vertikale Balken eingezeichnet. Tr1-Tr4, PHLDA1-Transfektanten; Neo1 und Neo2, Neomycinvektor-Transfektanten.

Ein Beispiel für die Koloniebildung einiger repräsentativen Transfektanten ist in Abb. 2.26 gezeigt.

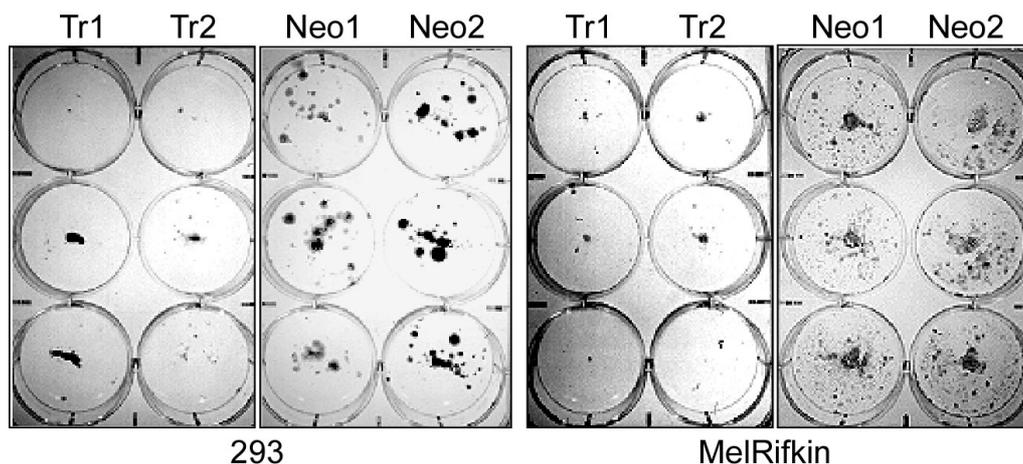


Abb. 2.26 Kolonie-Formationsassay. Jeweils 300 Zellen der angegebenen Transfektanten wurden in Dreifachbestimmung pro Loch einer 6-Lochplatte ausplattiert. Nach 16 Tagen Inkubation wurden die Zellen fixiert, mit Kristallviolett gefärbt und fotografiert. Tr1 und Tr2, PHLDA1-Transfektanten; Neo1 und Neo2, Neomycinvektor-Transfektanten.

Die Größe der Kolonien war bei den PHLDA1-Transfektanten in beiden Zelllinien deutlich gegenüber den Neomycinvektor-Transfektanten reduziert (siehe Abb. 2.26). Auch die Anzahl der Kolonien nach 16 Tagen Inkubation waren bei den PHLDA1-Transfektanten sowohl für die Zelllinie 293 als auch für die Melanomzelllinien im Mittel 5-fach geringer als bei den Neomycinvektor-Transfektanten (siehe Abb. 2.25 und Abb. 2.26). Somit vermindert die verstärkte PHLDA1-Expression die Fähigkeit Kolonien zu bilden (siehe Anzahl der Kolonien) sowie als solche heranzuwachsen (siehe Größe der Kolonien).

2.9.2 Wachstumskurven

In den Experimenten der Kolonie-Formation wurde festgestellt, dass die PHLDA1-Transfektanten langsamer wuchsen als die Neomycinvektor-Transfektanten. Dieses unterschiedliche Wachstumsverhalten wurde durch die Bestimmung der Wachstumskinetiken der PHLDA1-Transfektanten im Vergleich zu ihren Kontroll-Transfektanten nun weiter quantifiziert. Dazu wurde wie in Kap. 5.2.5 beschrieben für jeden Messtag in Vierfachbestimmung 10^4 Zellen jeder Transfektante pro Loch einer 96-Lochplatte ausplattiert und die Anzahl der lebenden Zellen in einem MTT-ELISA (siehe Kap. 5.2.5) in Abhängigkeit der inkubierten Tage ermittelt (siehe Abb. 2.27).

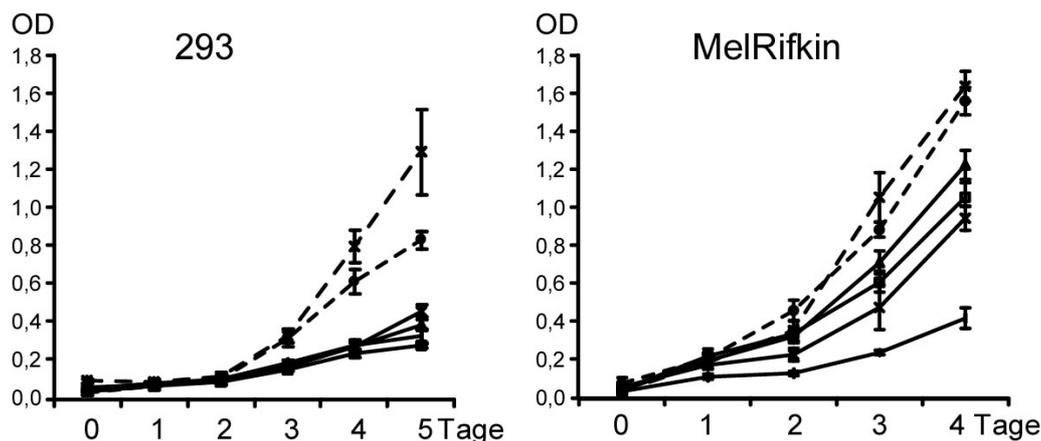


Abb. 2.27 Wachstumskurven für 293- und MelRifkin-Transfektanten. Angegeben ist OD_{570} (proportional zur Anzahl der lebenden Zellen) im Verlaufe der Tage des Wachstums. Für beide Transfektantenlinien sind die PHLDA1-Transfektanten als schwarze durchgezogene Linien und die jeweiligen Neomycinvektor-Transfektanten als unterbrochene Linien dargestellt. Die Standardabweichungen der Vierfachbestimmungen sind als vertikale Balken angegeben.

Die Zellzahlen zu Beginn des Experimentes waren zunächst bei allen Zelllinien gleich und nahmen dann jeweils exponentiell zu. Das Wachstumsverhalten der ersten beiden Tage war für alle Transfektantenlinien annähernd identisch. Ab dem zweiten Tag zeigten jedoch alle acht PHLDA1-Transfektanten eine deutlich geringere Wachstumsrate als die Neomycinvektor-Transfektanten. Ab diesem Tag kamen die Zellen in Zell-Zellkontakt (siehe auch Kap. 2.7.2). Der Unterschied der Wachstumsraten war bei den 293-PHLDA1-Transfektanten im Vergleich zu ihren Kontroll-Transfektanten größer als bei den entsprechenden MelRifkin-Transfektanten. Aber auch hier wuchsen alle MelRifkin-PHLDA1-Transfektanten deutlich langsamer als die Kontroll-Transfektanten. Die Standardabweichungen waren so gering, dass sich die einzelnen Kurven nie überlappten. Das Experiment wurde mindestens dreimal reproduzierbar wiederholt.

2.9.3 Zellzyklus

Eine konstitutive Expression von PHLDA1 in Zelllinien verlangsamte deren Wachstum im Vergleich zu den Neomycinvektor-Transfektanten. Das reduzierte Wachstum könnte durch eine verstärkte Apoptoserate oder durch einen veränderten Zellzyklus in den PHLDA1-Transfektanten zustande kommen. Eventuell hat PHLDA1 sowohl einen Einfluss auf die Apoptoserate als auch auf den Zellzyklus. Zunächst wurde ein möglicher Einfluss von PHLDA1 auf den Zellzyklus bestimmt. Dazu wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Prozentsatz an Zellen in den jeweiligen Zellzyklusstadien G_0G_1 , S und G_2M sowohl bei

den PHLDA1-, als auch bei den Neomycinvektor-Transfektanten bestimmt (siehe auch Kap. 5.7.7).

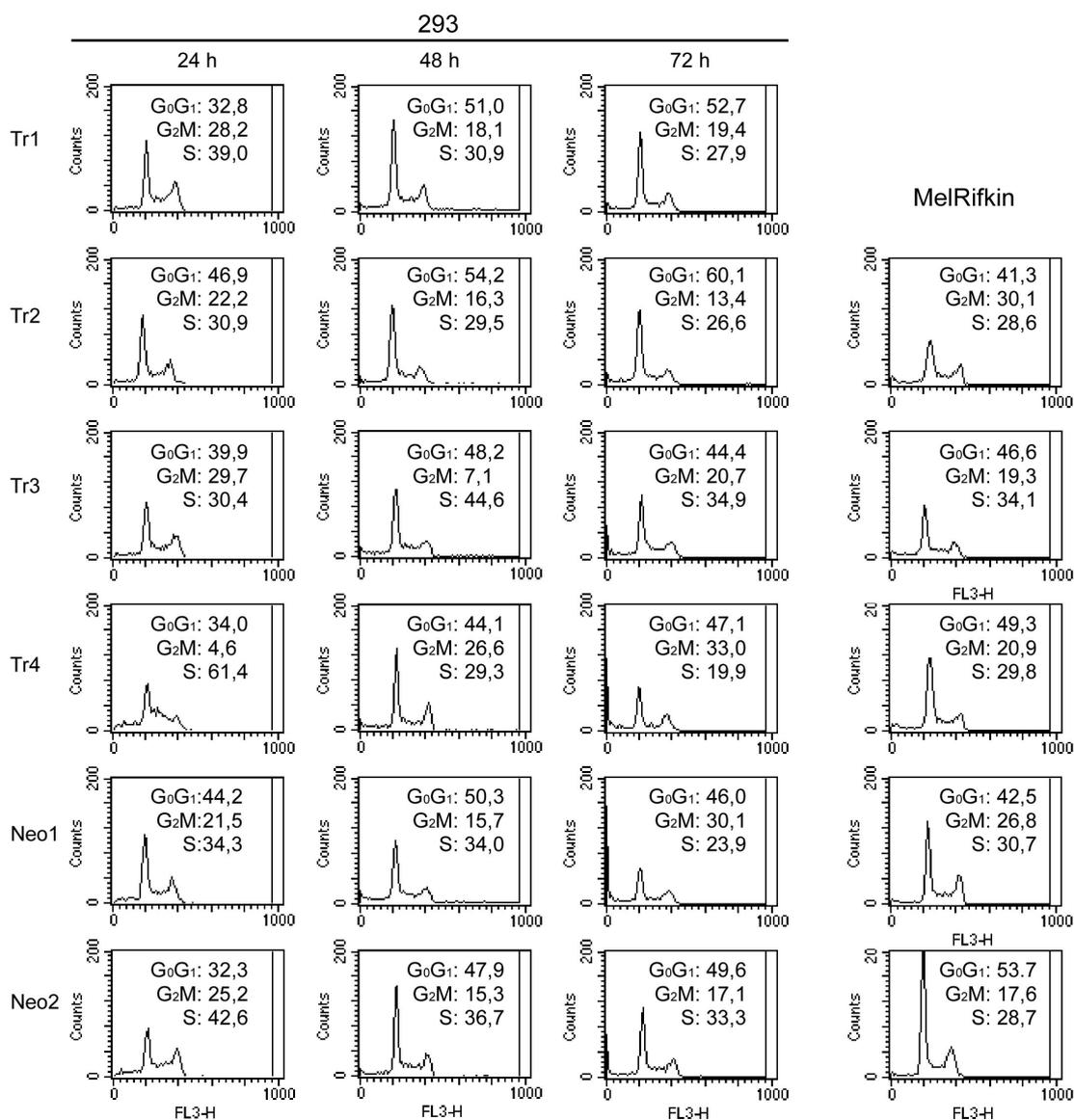


Abb. 2.28 Bestimmung des Zellzyklusses. FACS-Histogramm der Propidiumjodideinlagerung (FL3-H, auf der X-Achse) in Zellen, die auf Abwesenheit von Aggregaten (Zellduplexe, Triplikate etc.) gegatet wurden. Der erste Scheitelpunkt der Kurven stellt die Zellen mit doppeltem Chromosomensatz (G₀/G₁) dar, der zweite Scheitelpunkt, diejenigen Zellen mit vierfachem Chromosomensatz (G₂/M). Dazwischen befinden sich die Zellen in der Synthesephase (S). Angegeben sind die Prozentsätze der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusstadien, die sich nach der Auswertung mit der *ModFit*-Software ergaben. Für die Zelllinie 293 wurden die Zellzyklusbestimmungen 24 h, 48 h und 72 h nach dem Ausplattieren durchgeführt, für die Zelllinie MelRifkin nach 48 h. Tr1-Tr4, PHLDA1-Transfektanten; Neo1 und Neo2, Neomycinvektor-Transfektanten.

In Abb. 2.28 kann man sowohl anhand der Histogramme als auch an den Prozentzahlen entnehmen, dass die Expression von PHLDA1 nicht mit dem Verbleib der Zellen in einer bestimmten Phase des Zellzyklusses korreliert. So sind z.B. bei den 293-PHLDA1-Transfektanten 24 h nach dem Ausplattieren zwischen 32,8 und 46,9% der Zellen in G₀G₁ und bei den Neomycinvektor-Transfektanten zwischen 32,3 und 44,2%. Auch bei den anderen Phasen des Zellzyklusses sowie bei den verschiedenen Zeiten des Wachstums, treten weder bei den 293- noch bei den MelRifin-PHLDA1-Transfektanten signifikante Unterschiede einer Population von Zellen in einer bestimmten Zellzyklusphase im Vergleich zu den Neomycinvektor-Transfektanten auf. Demnach beeinflusst die konstitutive PHLDA1-Expression nicht den Zellzyklus.

2.10 Apoptose

Es konnte in drei unabhängigen Experimenten wie Wachstumsassay (siehe Kap. 2.9.2), Kolonie-Formationsassay (siehe Kap. 2.9.1) sowie der Klonierungseffizienz (siehe Kap. 2.8) gezeigt werden, dass eine verstärkte PHLDA1-Expression in Zelllinien das Wachstum hemmt. Die geringere Wachstumsrate kam nicht durch einen veränderten Zellzyklus (siehe Kap. 2.9.3) zustande. Außerdem wurde das murine PHLDA1-Homolog TDAG51 als Molekül gefunden, das im TCR-vermittelten Signalweg der Fas-Expression involviert ist. Somit hat TDAG51 in der Fas-vermittelten Apoptose eine essentielle Rolle. Deshalb wurden als nächstes die basalen, also nicht induzierten Apoptoseraten in Abhängigkeit der PHLDA1-Expression mit Hilfe der PHLDA1-Transfektanten und den Kontroll-Zelllinien bestimmt.

2.10.1 Annexin-V-Bindung

Eine Möglichkeit Zellen im frühen Apoptosestadium zu identifizieren, ist durch Annexin-V-Bindung. Das Prinzip beruht darauf, dass Zellen zu Beginn der Apoptose Phosphatidylserine von der zum Zytoplasma gewandten Seite der Zellmembran auf die extrazelluläre Seite der Zytoplasmamembran bringen. Dies kann durch FITC markiertes Annexin-V, das in Gegenwart von Ca²⁺-Ionen mit hoher Affinität an die Phosphatidylserine bindet, in der Immunfluoreszenz nachgewiesen und in der FACS-Analyse quantifiziert werden. Dabei wurden die Zellen zusätzlich mit Propidiumjodid angefärbt, das für die toten Zellen mit einer zerstörten Zytoplasmamembran durchlässig ist

und so in die DNA interkalieren kann. Es wurde auf die lebenden, also propidiumjodid-negativen Zellen gegatet (siehe Kap. 5.7.4) und nur diese in die Auswertung der Annexin-V-Bindung einbezogen.

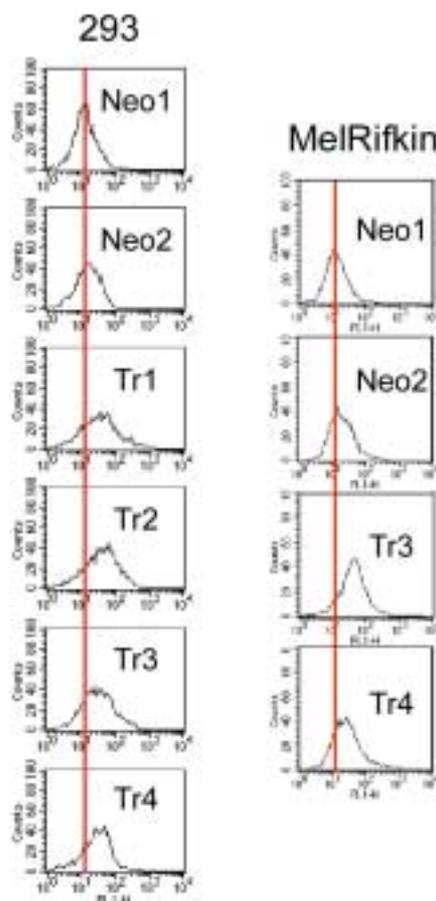


Abb. 2.29 Annexin-V-Bindung der Transfektanten. FACS-Analyse der Bindung von FITC-markiertem Annexin-V an lebende (Propidiumjodid negative) Zellen. Es ist die Zellzahl (counts) in Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität (FL1-H) angegeben. In der linken Hälfte sind die 293-Transfektanten (aus der Diplomarbeit von Elma Pröls übernommen) in der rechten Hälfte die MelRifkin-Transfektanten dargestellt. Die roten, vertikalen Balken geben die Mediane der Fluoreszenzintensität der Neomycinvektor-Transfektanten Neo1 und Neo2 an. Tr1-Tr4, PHDLA1-Transfektanten.

Die vier PHDLA1-Transfektanten in Zelllinie 293 sowie die beiden getesteten PHDLA1-Transfektanten in Zelllinie MelRifkin zeigen eine stärkere Annexin-V-Bindung als die Neomycinvektor-Transfektanten. Die Zellen befanden sich in unterschiedlichen Stadien der Apoptose, jedoch waren bei den PHDLA1-Transfektanten mehr Zellen apoptotisch, wie durch die nach rechts verschobenen Scheitelpunkte der Kurven in Abb. 2.29 zu sehen ist. Somit führt eine verstärkte PHDLA1-Expression in Transfektantenlinien zu einem höheren Prozentsatz an Zellen, die sich in einem frühen Apoptosestadium befinden.

2.10.2 TdT-abhängiger Einbau von FITC-dUTP (*TUNEL*-Assay)

Eine weitere Möglichkeit zur Identifikation von Zellen, die sich in der Apoptose befinden, bietet der *TUNEL*-Assay (TdT-mediated dUTP nick end labeling). Dieser beruht auf der Tatsache, dass am Ende der in der Apoptose involvierten Kaskade von Caspasen die *caspase-activated Dnase* (CAD) aktiviert wird und die nukleäre DNA fragmentiert. Die fragmentierte DNA kann man mit Hilfe des Enzymes Terminale Desoxyribonukleotidyl-Transferase (TdT) nachweisen, indem TdT an die 3'-OH Enden der genickten DNA fluoreszenzmarkierte Nukleotide anfügt. Der *TUNEL*-Assay wurde verwendet, um in der Transfektanten-Zelllinien 293 die apoptotischen Zellen nachzuweisen.

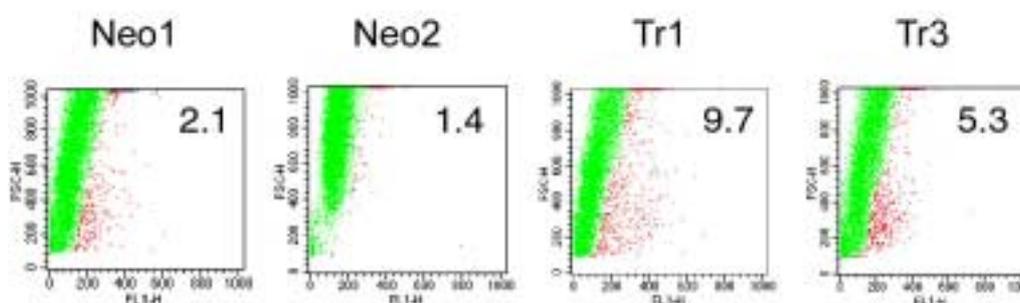


Abb. 2.30 *TUNEL*-Assay mit 293-Transfektanten. Gezeigt ist in der FACS-Analyse die Fluoreszenz (FL1-H), d.h. die eingebauten FITC-markierten Nukleotide aufgetragen gegen den Forward-Scatter (FSC-H) d.h. gegen die Zellgröße. Zellen ohne TdT-abhängigen FITC-dUTP-Einbau sind grün dargestellt und repräsentieren die Hintergrundfluoreszenz. Die apoptotischen Zellen (rot) mit einem TdT-abhängigen Einbau der FITC-markierten Nukleotide sind rot dargestellt. Die Zahlen der apoptotischen Zellen sind in Prozent angegeben. Neo1 und Neo2, Neomycinvektor-Transfektanten; Tr1 und Tr3, PHLDA1-Transfektanten.

Der Prozentsatz an apoptotischen Zellen, der in diesem Experiment erfasst wurde, war relativ gering (zwischen 1,4% und 9,7 %). Jedoch wurde keine Apoptose induziert, sondern nur die basale Absterberate ermittelt. Dennoch war die Apoptoserate bei den PHLDA1-Transfektanten zwischen 2,5- und 8fach höher als bei den Neomycinvektor-Transfektanten. Demnach gehen Transfektanten die vermehrt PHLDA1 exprimieren, verstärkt in die Apoptose, was die Ergebnisse des Annexin-V-Bindung (siehe Kap. 2.10.1) bestätigt.

2.10.3 Einfluss der PHLDA1-Expression auf den Effekt von Chemotherapeutika

Die Ergebnisse der Annexin-V Bindung sowie des *TUNEL*-Assays zeigten, dass eine konstitutive PHLDA1-Expression die basale Apoptoserate verstärkte. So stellte sich nun

die Frage, ob auch die Sensitivität gegenüber Apoptose-induzierenden Reagenzien erhöht wurde. Das Chemotherapeutika Doxorubicin (N-(5,5-diacetoxypentyl)doxorubicin) gehört zu der Klasse der Anthracycline und interkaliert in die DNA und löst Apoptose aus. Der genaue Wirkmechanismus ist noch nicht klar, ebensowenig, ob dazu eine Interaktion von DNA und Chemotherapeutika nötig ist.

Melanome zeichnen sich durch ihre Resistenz gegenüber Chemotherapeutika aus, die normalerweise in Tumoren Apoptose auszulösen vermögen. Um den Einfluss der PHLDA1-Expression auf diese Resistenz zu ermitteln, wurden Annexin-V Bindungsstudien nach Behandlung mit Doxorubicin mit den Transfektanten der Melanomzelllinie MelRifkin durchgeführt (siehe auch Kap. 5.7.5). Bei diesen Experimenten konnte keine Färbung mit Propidiumjodid durchgeführt werden, da sowohl Propidiumjodid als auch Doxorubicin in die DNA interkalieren und bei FL3-H absorbieren. Somit wurde die Gesamtpopulation von Annexin-V-bindenden Zellen bestimmt.

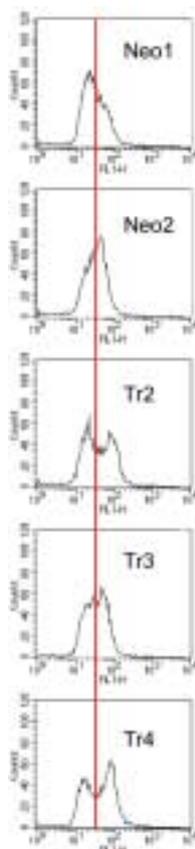


Abb. 2.31 Doxorubicin induzierte Apoptose in MelRifkin-Transfektanten. Dargestellt ist eine Annexin-V-FITC-Bindung (FL1-H) mit MelRifkin-Transfektanten, die 24 h mit 1 µg/ml Doxorubicin versetzt waren. Der rote vertikale Balken entspricht dem Median der Fluoreszenz der Neomycinvektor-Transfektanten Neo1 und Neo2. Tr2-Tr4, PHLDA1-MelRifkin-Transfektanten.

Durch die Behandlung mit Doxorubicin entstand in den PHLDA1-Transfektanten eine zweite, deutlich erkennbare Population von Zellen, die wesentlich mehr Annexin-V binden konnte als die Neomycinvektor-Transfektanten (siehe Abb. 2.31). Die konstitutive PHLDA1-Expression führte somit zu einer wesentlich erhöhten Sensitivität gegenüber dem Chemotherapeutikum Doxorubicin und somit zur erhöhten Apoptose.

2.11 Suche nach Interaktionspartnern von PHLDA1

Mit den bisher beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine konstitutive PHLDA1-Expression in Transfektanten das Wachstum reduziert (siehe Kap. 2.9.2) und die Klonierungseffizienz (siehe Kap. 2.8) sowie die Fähigkeit als Klon heranzuwachsen (siehe Kap. 2.9.1) einschränkt. Die Ursache des verminderten Wachstums ist vermutlich Apoptose, denn die basale Apoptoserate (siehe Kap. 2.10.1 und 2.10.2) sowie die Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika (siehe Kap. 2.10.3) war erhöht. Dagegen war der Zellzyklus nicht verändert (siehe 2.9.3). Um nun einen Aufschluss darüber zu bekommen auf welchem molekularen Weg PHLDA1 die Apoptose und das Wachstum beeinflusst, wurde nach zellulären Bindungspartnern von PHLDA1 gesucht.

2.11.1 Gst-Bindeexperimente (*Gst pull down*)

Zunächst wurde getestet ob rekombinantes PHLDA1 Proteine binden kann. Dazu wurde bakteriell exprimiertes Gst-PHLDA1 (siehe Kap. 5.6.10) mit biotinyliertem Gesamtzelllysate von Zelllinien inkubiert. Anschließend wurde mit Glutathionsepharosebeads (GS-beads) gegen PHLDA1 präzipitiert und das Präzipitat im Westernblot auf Mitpräzipitation von biotinylierten Proteinen getestet (siehe Kap. 5.6.11). Dies wurde mit Gst-PHLDA1 und Gst-cMuc18 als Kontrollprotein durchgeführt. Im Westernblot wurde überprüft, ob unterschiedliche Proteine mitpräzipitieren, die dann spezifisch für PHLDA1 bzw. cMuc18 sein sollten.

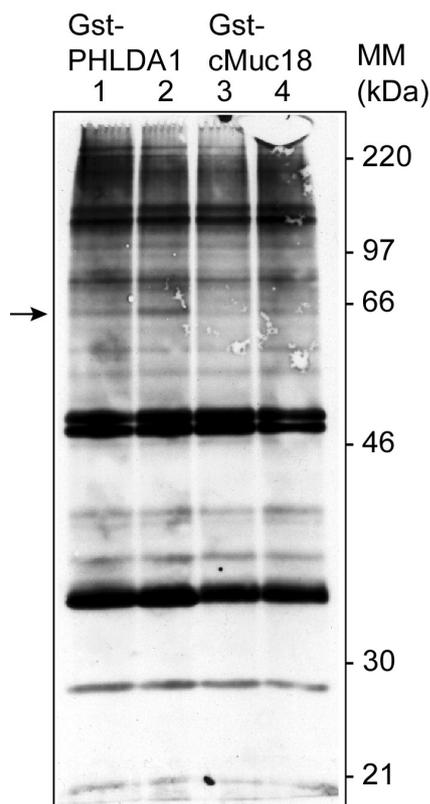


Abb. 2.32 Gst pull down. Biotinyliertes Gesamtzelllysat von 1×10^6 Zellen der Melanomzelllinie MelJuso wurde mit bakteriellem Gst-PHLDA1 (Spur 1, 2) oder Gst-cMuc18 (Spur 3, 4) 12 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Gst-Fusionsprotein mit Glutathionsepharose-beads isoliert und gereinigt (siehe Kap. 5.6.11). Die Eluate wurden auf einem denaturierenden 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran übertragen und mit Streptavidin-Peroxidase detektiert. MM, Molekulargewichtsmarker.

Es wurde jedoch kein unterschiedliches Bandenmuster zwischen den Inkubationen mit Gst-PHLDA1 und Gst-cMuc18 festgestellt. Bei der mit dem Pfeil markierten Bande in Spur 1 und 2 handelt es sich um das Fusionsprotein Gst-PHLDA1, das auf einer Höhe von 57,3 kDa läuft. Dies wurde durch Elution des Streptavidin-Peroxidase Komplexes und anschließender Detektion mit dem Anti-PHLDA1-mAK RN6e2 bestätigt. Das bakterielle Gst-Fusionsprotein wurde anscheinend durch eine Restaktivität des D-Biotinoyl- ϵ -aminocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester biotinyliert und dadurch auf dem Gel detektiert.

Da PHLDA1-bindende Proteine für eine Interaktion eventuell posttranslational modifiziert werden müssen (z.B. phosphoryliert), wurden die Zellen für 48 h mit PMA stimuliert bevor sie lysiert wurden. Auch dies lies keine PHLDA1 spezifischen Banden erkennen.

2.11.2 Suche nach PHLDA1-bindenden Proteinen mit Hilfe des *yeast two hybrid screen*

Für die *Gst pull down* Experimente wurde bakteriell exprimiertes PHLDA1-Protein verwendet, das in den Prokaryonten eventuell nicht richtig gefaltet wurde oder nicht (richtig) posttranslational modifiziert wurde. Außerdem könnte die Biotinylierung der Proteine des Gesamtzelllysates die PHLDA1-Bindestelle(n) blockieren. Um in einem eukaryontischen System nach Interaktionspartnern für PHLDA1 zu suchen, wurde ein *yeast two hybrid screen* durchgeführt. Dies ist eine genetische Methode mit der man mit einem definierten Gen eine Genbank (Library) nach Interaktionspartnern durchsucht und diese dann leicht klonieren kann (siehe dazu auch Kap. 5.3.3).

2.11.3 Expression der PHLDA1-baits in *S. cerevisiae*

Zunächst wurde getestet, ob die Gal4-PHLDA1-Fusionskonstrukte, also die *baits* mit denen Interaktionspartner gefunden werden sollte, auch in Hefe exprimiert werden. Als *baits* wurden verschiedene Konstrukte von Gal4-PHLDA1 verwendet. Dadurch kann man unter Umständen die Möglichkeit einer sterischen Blockierung bestimmter Bindedomänen des *baits* durch den Gal4-Fusionspartners verhindern und den Verlust möglicher Bindungspartner reduzieren. Deshalb wurden verschiedene Gal4-PHLDA1-Fusionskonstrukte wie unter 5.5.7.1 beschrieben hergestellt, die jeweils unterschiedliche Motive des PHLDA1-Proteins enthielten (siehe auch Abb. 5.1). Sie wurden in den Hefestamm Y190 transformiert (siehe Kap. 5.3.2), das Hefegesamtprotein aus jeweils gleicher Zellzahl (bestimmt über die OD) wie unter 5.6.2 beschrieben isoliert und im Westernblot auf PHLDA1-Expression untersucht (Abb. 2.33).

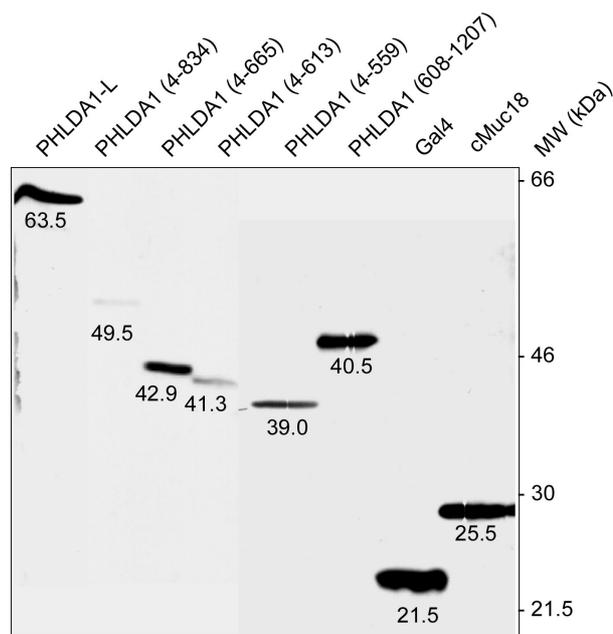


Abb. 2.33 Expression der PHLDA1-baits in Hefe. Jeweils 120 μ l der Gesamtzelllysat wurden auf einem 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. Der Blot wurde mit Anti-Gal4-AK und K α M-POD detektiert. Bei den verschiedenen Verkürzungen von Gal4-PHLDA1 sind die AA von PHLDA1 angegeben, die in den Gal4-PHLDA1-Fusionskonstrukten verwendet wurden (siehe auch Abb. 5.1). Gal4, *yeast two hybrid* Vektor pAS2-1; cMuc18, Gal4-cMuc18 als Kontrolle. Die errechneten Molekulargewichte sind unter den jeweiligen Banden angegeben.

Alle PHLDA1-baits wurden in dem Hefestamm Y190 exprimiert und liefen entsprechend ihrer Größe im Gel. Nur das N-terminal verkürzte Konstrukt lief etwas langsamer als es seinem errechneten Molekulargewicht entsprechen würde. Bei den C-terminal verkürzten Konstrukten wurden hauptsächlich die Motive mit den positiv geladenen Histidinen entfernt, die in dem N-terminal verkürzten Konstrukt überproportional vorhanden waren und eventuell für einen verlangsamten Lauf im Gel verantwortlich sein könnten.

2.11.3.1 Test auf autonome Aktivierung der Transkription durch die baits

Wie in 5.3.3.2 ausführlich beschrieben und in Abb. 5.2 illustriert, können Gal4-Fusionsproteine die Transkription alleine aktivieren, wenn sie ohne ein Genprodukt aus der *library* direkt mit der RNA-Polymerase-II oder anderen Proteinen interagieren, die in der Initiation der Transkription eine Rolle spielen. Um dies zu testen, wurde für den konventionellen *yeast two hybrid screen* das Gal4-PHLDA1-Volllängenkonstrukt alleine und mit einigen Kontrollproteinen (z.B. Gal4-AD) in den Hefestamm Y187 transformiert und auf verschiedenen Mangelmedien, die auf Transformation bzw. auf eine

Reportergenaktivierung selektionieren, ausplattiert. Für den Kreuzungsscreen wurden alle Gal4-PHLDA1-Konstrukte (siehe Abb. 5.1) in den Hefestamm PJ69-2A transformiert und auf verschiedenen Mangelmedien ausplattiert. Um auch für den Kreuzungsscreen zu testen, ob PHLDA1 mit der Gal4-AD interagiert, wurde das PHLDA1-Volllängenkonstrukt in dem Stamm PJ69-2A noch mit dem Hefestamm Y187 gekreuzt (5.3.3.4), der mit dem Gal4-AD Vektor bzw. Ga4-SV40 transformiert war. Alle Transformationsplatten wurden 12 Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde auf Wachstum getestet. Die Ergebnisse sind in Tab. 2.4 angegeben und ein Beispiel in Abb. 2.34 abgebildet.

Plasmide	Proteine	Mangelmedien (SD-Medien)					
		-W	-L,-W	-W,-H	-Ade, -H	-L, -W, -H	-Ade, -L, -W, -H
* PHLDA1-L	PHLDA1	+++	-	-	n.d.	n.d.	n.d.
* PHLDA1 + pGAD424	PHLDA1+ Gal4	+++	+++	-	n.d.	-	n.d.
* pVA3 + pTD1	p53+SV40	+++	+++	+++	n.d.	+++	n.d.
PHLDA1-L	PHLDA1	+++	n.d.	-	-	n.d.	-
PHLDA1-Eco-Pst	PHLDA1 (4-834)	+++	n.d.	-	-	n.d.	-
PHLDA1-Eco-Xho	PHLDA1 (4-665)	+++	n.d.	-	-	n.d.	-
PHLDA1-Eco-Sma	PHLDA1 (4-613)	+++	n.d.	-	-	n.d.	-
PHLDA1-Eco-Pvu	PHLDA1 (4-558)	+++	n.d.	-	-	n.d.	-
PHLDA1-N-trunc	PHLDA1 (608-1207)	+++	n.d.	-	-	n.d.	-
pVA3 + pTD1	p53 + SV40	+++	+++	+++	+++	n.d.	+++
PHLDA1-L + pTD1	PHLDA1 + SV40	+++	+++	-	-	n.d.	-

Tab. 2.4 Test auf autonome Transkriptionsaktivierung der PHLDA1-baits. Auswertung des Wachstumstests. 12 Tage nach Transformation bzw. Kreuzung wurden die Selektionsplatten nach Kolonien untersucht: starkes Wachstum ist mit +++ angegeben, keine Kolonien mit -. Es sind die Aminosäuren angegeben, die in den jeweiligen Mangelmedien fehlen. In den ersten drei Zeilen (mit einem * markiert) sind Transformationen in den Hefestamm Y187 angegeben, in den anderen Zeilen die Transformationen in den Hefestamm PJ69-2A, der für den Kreuzungsscreen verwendet wurde. In den letzten beiden Zeilen sind Kreuzungen aus PJ69-2A (mit bait-Plasmiden transformiert) und Y187 (mit Kontrollplasmiden transformiert) angegeben. n.d., nicht durchgeführt.

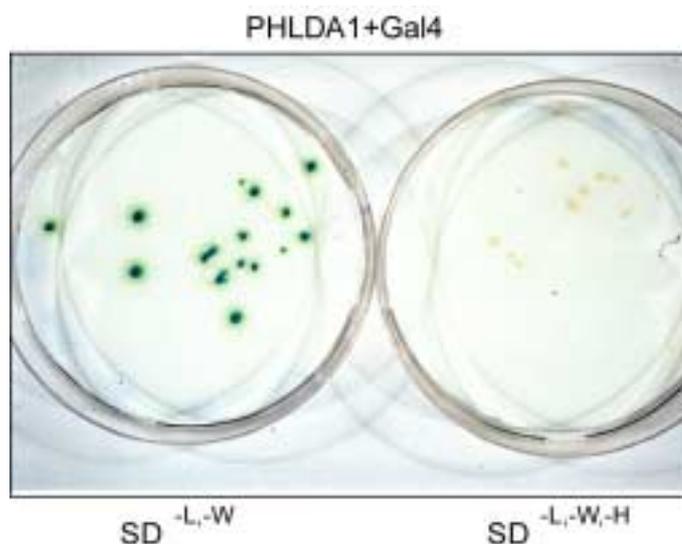


Abb. 2.34 Test auf autonome Aktivierung der Transkription. Abgebildet ist der LacZ-assay von der in Tab. 2.4 in Zeile zwei beschriebenen Transformation von PHLDA1 mit der Gal4-Aktivierungsdomäne (Gal4-AD) auf Selektionsmedium für die Plasmide ($SD^{-L,-W}$) und auf Selektionsmedium für eine Interaktion ($SD^{-L,-W,-H}$).

Das PHLDA1-L-Konstrukt in Stamm Y187 wuchs nicht auf den Mediumplatten, mit denen man auf eine Interaktion selektiert ($SD^{-W,-H}$) und auch die Kotransformation aus PHLDA1 und Gal4 konnte nicht auf den Selektionsmedien für eine Interaktion ($SD^{-L,-W,-H}$) wachsen (siehe Abb. 2.34, rechte Platte). Jedoch wuchsen die Transformationsansätze auf den Medien die nur auf die Plasmide selektierten, d.h. auf den SD^{-W} -Platten bzw. auf $SD^{-L,-W}$ -Platten bei der Kotransformation (siehe Abb. 2.34, linke Platte). Somit waren alle Transformationen erfolgreich. Dagegen konnten die Kontrolltransformation aus p53 und SV40 sowohl auf den Selektionsmedien für die Plasmide, als auch auf denen für eine Protein-Protein-Interaktion wachsen (siehe Tab. 2.4). Auch keines der PHLDA1-Volllängenkonstrukten oder Verkürzungen konnte auf den Selektionsmedien für eine Interaktion ($SD^{-W,-H}$) und ($SD^{-Ade,-W}$) im Hefestamm PJ69-2A, der für den Kreuzungsscreen verwendet wurde, wachsen (siehe Tab. 2.4). Ebenso hatte die Kreuzung aus PHLDA1 und Gal4, bzw. PHLDA1 und Gal4-SV40 kein Wachstum. Aber auch hier war die Kontrollkreuzung aus p53 in PJ69-2A und SV40 in Y187 in der Lage, auf allen Medien zu wachsen, die Kreuzungen waren also erfolgreich (siehe Tab. 2.4).

Demnach interagiert weder das PHLDA1-Volllängenkonstrukt noch eines seiner Verkürzungen mit Gal4, der RNA-Polymerase oder mit einem anderen, der an der Transkription beteiligten Proteine. Es können alle Gal4-PHLDA1-Konstrukte für den *yeast two hybrid screen* verwendet werden.

2.11.3.2 *Yeast two hybrid screen*

Die Suche nach Interaktionspartnern von PHLDA1 mit dem *yeast two hybrid screen* wurde wie in Kap. 5.3.3 beschrieben, durchgeführt. Zunächst wurde auf konventionelle Weise, d.h. durch Kotransformation von *bait* und der Genbankplasmide in denselben Hefestamm gescreent. Dabei wurden auch verschiedene Genbanken verwendet, die aus unterschiedlichen menschlichen Geweben wie Gehirn, Plazenta und der Zervixkarzinomzelllinie Hela gewonnen wurden (siehe Kap. 5.4.3). Alle diese Gewebe exprimierten PHLDA1 (Kuske, 1998). Da jedoch die Transformationsraten und somit die Anzahl an gescreenten Klonen sehr gering waren (siehe auch Tab. 2.8), wurde im weiteren mit dem Kreuzungsscreen (*mating screen*) eine Genbank gescreent, die aus Gehirngewebe generiert war. Beim Kreuzungsscreen muss nur das *bait* in einen Hefestamm transformiert werden, der dann leicht amplifiziert und mit der vortransformierten Genbank gekreuzt werden kann (siehe auch Kap. 5.3.3.4). Dadurch ist man bei der Anzahl an gescreenten Klonen nicht mehr von der Transformationseffizienz, sondern nur noch von der Kreuzungseffizienz abhängig, die in der Regel reproduzierbar ist.

Es wurde das Volllängenkonstrukt Gal4-PHLDA1-L sowie die C-terminale Verkürzung Gal4-PHLDA1-Eco-Xho (Nt 4-665), bei dem die PQ sowie PH-Wiederholungen deletiert waren (siehe Abb. 5.1) und das N-terminal verkürzte Konstrukt Gal4-PHLDA1 N-trunc (Nt 608-1207), das die C-terminalen PQ und PH-Wiederholungen besitzt, verwendet. Diese Konstrukte enthielten somit verschiedene Motive des PHLDA1-Proteins und waren in Hefe stark exprimiert (siehe Abb. 2.33).

Aus den primär gefundenen Hefeklonen wurde die Plasmid-DNA isoliert (siehe Kap. 5.5.2.4), in *E. coli* amplifiziert und zur Bestätigung einer *yeast two hybrid*-Interaktion in Hefe zurücktransformiert. Rücktransformiert wurde das neu isolierte Genbankplasmid mit dem PHLDA1-*bait* und zur Kontrolle mit Gal4 und anderen Gal4-Fusionsproteinen. In den folgenden Tabellen sind die im *yeast two hybrid screen* gefundenen Klone, ihr Wachstumsverhalten in der Rücktransformation sowie die Größe der Inserts und in einigen Fällen sind auch die Sequenz der Inserts dargestellt. In Tab. 2.5 sind die Klone aufgelistet, die im konventionellen *yeast two hybrid screen* mit dem bait Gal4-PHLDA1-L isoliert wurden.

Klon	Wachstum R-Trafo + PHLDA1	Wachstum R-Trafo + Gal4	Wachstum R-Trafo + Gal4-Lam	Insert (bp)	Gen
1.1	-	-	-	1400	Carbonic Anhydrase (CARP2 in falscher Orientierung, „ORF“ 238AA)
4.1	++	++	-	1600	n.s.
4.2	++	++	-	1600	n.s.
5.1	+++	-	-	1200	Humaner Translations-Initiations Faktor-3, eIF3p47, ORF 349AA
6.1	-	-	-	2100	Lysophosphatische Azetyltransferase 5'UTR
9.1	+	++	-	1600	n.s.
10.2	-	-	-	2100	Epithelin
11.1	+	+++	n.d.	1000	RNA-Pol-II hsRPB7, falscher Leserahmen
13.6	-	-	-		= 10.2 (Epithelin)
15.2	++	++	++	2000	n.s.
16.1	++	+++	++	2200	humane RNA-Pol-III (RPC39)

Tab. 2.5 Konventioneller Screen der humanen Gehirngenbank mit dem *bait* Gal4-PHLDA1-L. Angegeben ist das Wachstum der Rücktransformation (R-Trafo) mit Gal4-PHLDA1, Gal4 und Gal4-Laminin (Gal4-Lam) auf Selektionsmedium. +++, sehr starkes Wachstum; ++, starkes Wachstum; +, geringes Wachstum; -, kein Wachstum. Die Größe der Inserts in Basenpaaren (bp) und das entsprechende Gen ist angegeben, falls der Klon sequenziert wurde. Der *two hybrid* positive Klon ist mit fester Schrift markiert. n.s., nicht sequenziert; n.d., nicht durchgeführt; ORF, offener Leserahmen.

Mit dem Gal4-PHLDA1-L-*bait* wurden im konventionellen Screen 492000 Klone einer Gehirn-Genbank, 210000 Klone einer Plazenta-Genbank und 5000 Klone einer Hela-Genbank gescreent (siehe Kap. 5.3.3.5 zur Bestimmung der Anzahl der gescreenten Klone). Aus der Plazenta- und Hela-Genbank konnten keine Hefeklone isoliert werden, aus der Gehirn-Genbank 11 Klone und deren DNA (siehe Tab. 2.5).

Nach Rücktransformation mit dem *bait* wuchsen noch sieben Klone auf Selektionsmedium davon interagierten jedoch sechs Klone mit Gal4 oder Gal4-Laminin. Der Klon 5.1 interagierte nur mit Gal4-PHLDA1 nicht aber mit Gal4 oder Gal4-Lam und war damit der einzige richtig *two hybrid* positive Klon. Er enthielt das Gen der p47-Untereinheit des humanen Translations-Initiations-Faktors-3. In dem isolierten Klon fehlten die ersten neun Aminosäuren des Genproduktes der p47-Untereinheit.

In Tab. 2.6 sind die Klone dargestellt, die mit dem *mating screens* und dem Gal4-PHLDA1-L *bait* gefischt wurden. Aus allen Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und mit den entsprechenden Kontrollen in Hefe rücktransformiert

Klon	Wachstum R-Trafo + PHLDA1	Wachstum R-Trafo + Gal4	Wachstum R-Trafo + Gal4-Lam	Insert (bp)	Gen
b30.1	+	+	-	2000	keine Homologie zu bekannten Sequenzen, kein ORF
b31.1	+	+	-	1200	n.s.
b32.1	+	++	-	800	RNA-Pol-II
b33.7	++	-	-	1300	eIF3-p47
b34.5	++	-	-	1300	= b33.7 (eIF3-p47)
b35.4	++	-	-	1300	= b33.7 (eIF3-p47)
b36.3	+	+	+	1600	keine Homologie zu bekannten Sequenzen, kein ORF
b37.1	+	+	-	2000	= 30.1
b39.1	+	+	-	2000	= 37.1 und 30.1
b40.1	-	-	-	1500	n.s.
b41.1	+	+	+	1600	= 36.3
b42.1	-	-	-	800	humane Aldolase, falscher Leserahmen
b43.1	-	-	-	800	= b42.1
b43.3	-	-	-	1700	T-Zell akut lymphoblastic Leukemia assoziiertes Antigen 1 (TALLA1), falscher Leserahmen
b45.1	-	-	-	1700	b43.3 ähnlich
b46.4	-	-	-	900	n.s.
b47.1	-	-	-	1000	n.s.
b48.3	-	-	-	1000	n.s.
b50.4	-	-	-	1600	human signal transducing guanin nucleotid binding protein
b51.1	-	-	-	1600	keine Homologie zu bekannten Sequenzen, kein ORF
b52.1	-	-	-	1200	NADH-Oxidoreduktase, falscher Leserahmen
b54.2	-	-	-	400	n.s.
b55.1	-	-	-	1500	n.s.
b56.2	-	-	-	800	= b42.1 und b43.1

Tab. 2.6 Mating screen mit dem bait Gal4-PHLDA1-L. Angegeben ist das Wachstum der Rücktransformation (R-Trafo) mit Gal4-PHLDA1, Gal4 und Gal4-Laminin (Gal4-Lam) auf Selektionsmedium. +++, sehr starkes Wachstum; ++, starkes Wachstum; +, geringes Wachstum; -, kein Wachstum. Die Größe der Inserts ist in Basenpaaren (bp) angegeben und das Gen, falls der Klon sequenziert wurde. Die Klone der „richtig“ *two*

hybrid positiven Klone sind in fetter Schrift dargestellt. n.s. nicht sequenziert; ORF, offener Leserahmen.

Die Kreuzungseffizienz des *mating screens* mit dem Gal4-PHLDA1-Volllängenkonstrukt betrug 3,8%. Somit konnten $1,8 \times 10^6$ Klone der Gehirn-Genbank gescreent werden (siehe Kap. 5.3.3.6 zur Bestimmung der Kreuzungseffizienz und Anzahl der gescreenten Klone). Es konnten 24 Hefeklone und deren DNA isoliert werden. Nach Rücktransformation wuchsen noch zehn Klone davon interagierten sieben mit Gal4 oder Gal4-Lam. Die restlichen drei, „richtig“ *two hybrid positiven* Klone, enthielten alle das Gen der p47-Untereinheit des humanen Translations-Initiations-Faktors-3. Die Sequenzen der drei Klone waren identisch und enthielten bis auf die 7-N-terminalen Aminosäuren das komplette Gen der p47-Untereinheit und waren somit geringfügig anders als Klon 5.1 im konventionellen Screen, bei dem die ersten 9-Aminosäuren der p47-Untereinheit fehlten.

In Tab. 2.7 sind die im *mating screen* isolierten Klone mit den verkürzten PHLDA1-*baits* aufgelistet, von denen die DNA isoliert wurde und in Rücktransformationen getestet wurde. Ein Beispiel der Rücktransformation von Klon N15.1 ist in Abb. 2.35 dargestellt.

Klon	Wachstum R-Trafo + PHLDA1	Wachstum R-Trafo + Gal4	Wachstum R-Trafo + Gal4-cMuc18	Insert (bp)	Gen
C1.1	+++	+++	-	1600	n.s.
C2.2	+	++	n.d.	700	n.s.
C3.9	+	++	n.d.	1200	n.s.
				n.b.	n.s.
N1.1	+++	+++	-	1700	n.s.
N2.2	+++	+++	-	1500	keine Homologie zu bekannten Sequenzen, kein ORF
N3.1	+++	+++	-	1600	n.s.
N4.5	+++	+++	-	1900	n.s.
N5.1	+	+++	n.d.	1000	n.s.
N6.1	+	++	n.d.	1000	n.s.
N7.2	+++	+	-	1100	Prostaglandin D2-Synthase, im falschen Leserahmen
N8.1	+++	+	-	1200	Proteasome Untereinheit X, falscher Leserahmen
N9.1	+++	++	-	2000	n.s.
N10.2	+++	+	-	1200	Epoxid Hydrolase 3'UTR

N11.8	+++	+	-	1600	keine Homologie zu bekannten Sequenzen, kein ORF
N12.9	+	+++	n.d.		n.s.
N13.1	+++	+	-	1200	= 10.2
N13.3	+	+++	n.d.	600	n.s.
N14.2	+++	+	-	700	n.s.
N15.1	+++	-	-	800	mammary derived growth inhibitor related gene MRG
N16.2	+++	+++	-	1200	n.s.
N17.1	+++	++	-	1600	keine Homologie zu bekannten Sequenzen, kein ORF
N18.7	+++	+++	-	2300	n.s.
N19.9	++	+++	n.d.	2400	n.s.
N20.5	++	+++	n.d.	500	n.s.
N21.7	+	++	n.d.	800	n.s.
N22.1	+++	+++	-	1800	n.s.
N21.7	+	++	n.d.	800	n.s.
N24.1	+++	+++	-	700	n.s.
N25.1	+++	+++	-	1200	n.s.
N26.1	+	++	-	900	n.s.
N27.6	+++	+++	-	n.b.	n.s.
N29.8	++	++	n.d.	1400	n.s.
N30.1	+	++	n.d.	700	n.s.
N33.1	+	++	n.d.	700	n.s.
N35.7	+	++	n.d.	1600	n.s.
N36.7	++	++	++	2900	n.s.
N37.1	+++	+++	-	1000	n.s.
N38.1	++	++	++	1800	n.s.
N39.1	+++	+++	n.d.	700	n.s.
N40.2	+++	+++	n.d.	1400	n.s.

Tab. 2.7 Mating screen mit C- und N-terminal verkürzten Gal4-PHLDA1-baits. Die ersten drei Klone wurden mit dem C-terminal verkürzten PHLDA1-bait (Gal4-PHLDA1 Nt 4-665) isoliert (C1.1 bis C3.6). Alle anderen Klone (N1.1 bis N40.2) wurden mit dem N-terminal verkürzten bait (Gal4-PHLDA1 Nt608-1207) isoliert. Angegeben ist das Wachstum der Rücktransformation (R-Trafo) mit Gal4-PHLDA1, Gal4 und Gal4-cMuc18 auf Selektionsmedium. +++, sehr starkes Wachstum; ++, starkes Wachstum; +, geringes Wachstum; -, kein Wachstum. Die Größe der Inserts in Basenpaaren (bp) und das entsprechende Gen ist angegeben, falls der Klon sequenziert wurde. Der *two hybrid* positive Klon ist mit fetter Schrift markiert. n.s., nicht sequenziert; n.d., nicht durchgeführt; n.b., nicht bestimmbar; ORF, offener Leserahmen; UTR, untranslationierte Region.

Bei der Verwendung des C-terminal verkürzten *bait* Gal4-PHLDA1-Eco-Xho (Nt 4-665) betrug die Kreuzungseffizienz 4,8%. Somit wurden $1,5 \times 10^6$ Klone der Gehirn-Genbank im *mating screen* durchsucht und drei Klone isoliert, die aber alle auch mit Gal4 interagierten.

Im *mating screen* mit dem N-terminal verkürzte *bait* Gal4-N-trunc (Nt 608-1207) betrug die Kreuzungseffizienz 3,6%. Dadurch konnten $1,1 \times 10^6$ Klone der Gehirn-Genbank durchsucht und 37 Klone isoliert werden. 36 davon interagierten jedoch auch mit Gal4 oder mit Gal4-cMuc18. Nur der Klon 15.1 interagierte ausschließlich mit dem PHLDA1-*bait* (siehe auch Abb. 2.1). Er enthielt das Gen des *mammary derived growth inhibitor related gene* MRG.

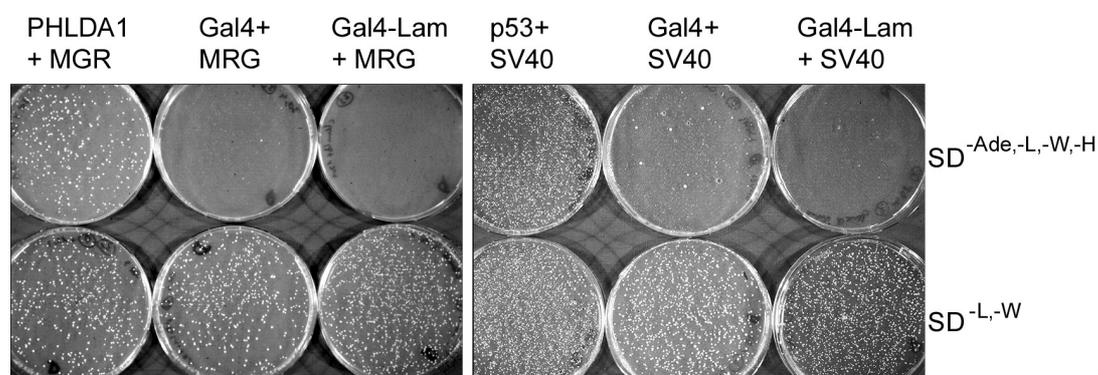


Abb. 2.35 Rücktransformation von Klon N15.1 (MRG) und der Positivkontrolle. In der linken Abbildung ist Klon N15.1 (MRG) mit PHLDA1 bzw. Gal4 oder Gal4-Lam in den Hefestamm PJ69-2A transformiert worden. In der rechten Abbildung ist die Positivkontrolle aus p53 und SV40 mit den gleichen Kontrollen abgebildet. In der ersten Reihe sind die Transformanten auf Selektionsmedium für eine Interaktion ($SD^{-Ade,-L,-W,-H}$) und in der zweiten Reihe auf Selektionsmedium für die Plasmide ($SD^{-L,-W}$) ausplattiert worden. Nach 10 Tagen Inkubation bei 30°C wurden die Platten fotografiert.

Wie in Abb. 2.35 zu sehen ist, wuchs PHLDA1 kotransformiert mit MRG vergleichbar stark wie p53 und SV40 nach Rücktransformation in Hefestamm PJ69-2A (erste Reihe, jeweils die linken Platten). Dagegen wuchsen weder PHLDA1 noch SV40 kotransformiert mit den Kontroll-*baits* Gal4 (erste Reihe, jeweils mittlere Platte) und Gal4-Lam (erste Reihe, jeweils rechte Platte). Alle Transformanten wuchsen in etwa vergleichbarer Kolonienzahl auf dem Selektionsmedium für die Plasmide (alle Platten der unteren Reihe), somit waren alle Transformationen erfolgreich und gleich effizient.

In Tab. 2.8 sind die Ergebnisse des *yeast two hybrid screens* noch einmal zusammengefasst.

Genbank, Screen	PHLDA1 -bait	gescreente Klone	isolierte Klone	Wachstum R-Trafo	Wachstum Kontrollen	two hybrid positive
Gehirn, konventionell	Voll- längen	$4,9 \times 10^5$	11	6	5	1
Plazenta, konventionell	Voll- längen	$2,1 \times 10^5$	0	0	0	0
Hela, konventionell	Voll- längen	5×10^3	0	0	0	0
Gehirn, mating	Voll- längen	$1,8 \times 10^6$	24	10	7	3
Gehirn, mating	C-trunc	$1,5 \times 10^6$	3	3	3	0
Gehirn, mating	N-trunc	$1,1 \times 10^6$	37	37	36	1
insgesamt		$5,1 \times 10^6$	75	56	51	5

Tab. 2.8 Zusammenfassung aller im *two hybrid screen* isolierter Klone. Für die einzelnen Genbanken ist die Art des Screens, die verwendeten *baits* und die Anzahl an gescreenten sowie isolierten Klone angegeben.

Es wurden im *yeast two hybrid screen* insgesamt $5,1 \times 10^6$ unabhängige Klone aus einer Gehirn-Genbank, einer Plazenta-Genbank und einer Genbank aus der Zervixkarzinomzelllinie Hela gescreent. Dabei konnten zunächst 75 Hefeklone und deren Plasmid-DNA isoliert werden. 56 von den Klonen wuchsen auch nach Rücktransformation in Hefe, jedoch interagierten von diesen Klonen 51 auch mit Gal4, Gal4-Laminin oder Gal4-cMuc18. Es konnten fünf Klone isoliert werden, die nur mit PHLDA1 reagierten. Vier der Klone enthielten das Gen für die p47-Untereinheit des humanen Translationsinitiationsfaktors-3 und ein Klon das Gen des *mammary derived growth inhibitor related gene* (MRG).

2.11.4 Koimmunpräzipitation

Um zu überprüfen, ob die in Hefe gefundenen Interaktionspartner auch in Mammaliazellen mit PHLDA1 interagieren, wurden Koimmunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Dazu wurden die beiden im *yeast two hybrid screen* gefundenen Gene eIF3-p47 und MRG in einen eukaryontischen Expressionsvektor mit Gst-Tag kloniert (siehe 5.5.7.4). PHLDA1 wurde in verschiedene Expressionsvektoren mit N-terminalen His-Tag und C-terminalen Myc-His-Tag kloniert (siehe 5.5.7.3). Für die Koimmunpräzipitationsexperimente wurden beide Vektoren in eine Zelllinie kotransformiert. Nach 48-72 h Inkubationszeit wurden die

Zellen unter verschiedenen Bedingungen lysiert und gegen eines der beiden Proteine präzipitiert. Das Präzipitat wurde dann im Westernblot analysiert. Wurde mit Glutathionsepharosebeads gegen eIF3-47 oder MRG präzipitiert, detektierte man auf dem Blot PHLDA1 mit den monoklonalen Anti-PHLDA1-AK, den polyklonalen Anti-PHLDA1-Seren oder mit den AK gegen Myc bzw. His-Tag. Wurde mit *Talon*-beadsTM gegen PHLDA1 präzipitiert, detektierte man den Blot mit monoklonalen Anti-Gst-AK, um das eventuell mitpräzipitierte Gst-MRG bzw. Gst-eIF3-p47 zu detektieren.

Die Transfektanten in den Zelllinien MelJuso, LTK⁻, Colo320 und 293 wurden nach 48 h oder 72 h lysiert, da nach dieser Zeit die Expression des transformierten Gens am höchsten war. Es wurde mit Mammalia-Lysepuffer (Kap. 4.3) mit pH-Werten zwischen 7.0 und 8.0 und mit einem der Detergenzien NP40, Tween-20, Digitonin, TritonX-100 und Brij-96 in den Konzentrationen von 0,1-1% lysiert. Lysiert wurde durch Ultraschall oder durch Scheren durch eine G20-Kanüle. Die Lysate wurden mit Glutathionsepharose-beads (GS-beads) oder mit *Talon*-beads, 4h bei 4°C inkubiert. Gewaschen wurden die beads mit Mammalia-Lysepuffer, versetzt mit unterschiedlichen Detergenzien und Konzentrationen (s.o.) oder mit Mammalia-Lysepuffer ohne Detergenz bzw. mit PBS pH7.2. Die Fusionsproteine wurden wie in Kap. 5.6.11 beschrieben von den *beads* eluiert.

Jeweils ein Aliquot von dem Gesamtzelllysat, dem Eluat, dem Überstand und Zellpellet wurde dann im Westernblot analysiert. Beide potentielle Bindungspartner waren im Gesamtzelllysat vorhanden. Auch derjenige Interaktionspartner gegen den präzipitiert wurde, war im Eluat vorhanden. Es konnte jedoch unter keinen der ausgetesteten Bedingungen eine spezifische Koimmunpräzipitation detektiert werden, unabhängig davon ob gegen die Gst-Fusionsproteine (eIF3-p47 und MRG) präzipitiert wurde und dann PHLDA1 im Blot detektiert werden sollte, oder ob gegen PHLDA1 mit *Talon*-beads präzipitiert wurde und gegen die Gst-Fusionsproteine detektiert wurde.

Da möglicherweise zur Bindung von PHLDA1 dessen Modifikation wie z.B. Phosphorylierung nötig ist, wurden 24 h nach der Kotransformation die Zellen mit PMA stimuliert. Aber auch nach Stimulation der Zellen war keine Koimmunpräzipitation zu beobachten. Wurden die GS-beads direkt nach der Lyse zu dem Gesamtzelllysat ohne vorherige Zentrifugation gegeben, konnte PHLDA1 im Eluat und im Zellpellet detektiert werden, allerdings auch bei der Kontrolltransformation des Gst-Vektors. Andere Proteine wie z.B. Mader oder Muc18 präzipitierten dabei nicht mit und waren auch nicht im Zellpellet detektierbar. Dies lässt vermuten, dass sich Gst und His-Tag gegenseitig

beeinflussen. Aus diesem Grund wurde versucht das in den Zellen endogen vorhandene PHLDA1 mit den Gst-Fusionsproteinen MGR und eIF3-p47 zu präzipitieren, was jedoch mit und ohne PMA-Stimulation nicht gelang.

Demnach interagiert PHLDA1 mit der p47-Untereinheit des Translationsinitiationsfaktor eIF3 und dem MRG in Hefe, nicht aber unter den ausgetesteten Bedingungen in humanen Zelllinien.

3 Diskussion

PHLDA1 wurde in unserem Labor auf der Suche nach Metastasierungs-assoziierten Molekülen des Melanoms mit Hilfe einer *mRNA differential display*-Analyse identifiziert (Kuske, 1998). Dabei war PHLDA1 in Zelllinien, die aus einer Melanommetastase generiert wurden, geringer exprimiert als in den Zelllinien des autologen Primärtumors. Somit könnte PHLDA1 eine Rolle im Metastasierungsprozess beim Melanom spielen. Die Aufklärung seiner Funktion kann dazu beitragen, die multifaktoriellen Prozesse der Metastasierung des Melanoms besser zu verstehen. In der vorliegenden Arbeit wurde PHLDA1 deshalb genauer charakterisiert und seine Expression sowie Funktion im humanen Melanom untersucht.

3.1 PHLDA1-Expression im humanen Melanom

Um Aufschluss darüber zu bekommen, ob das für PHLDA1 auf mRNA-Ebene gefundene Expressionsmuster auch auf Proteinebene gültig ist, wurden zunächst die PHLDA1-Proteinmengen in Melanomzelllinien mit Hilfe der Westernblot-Analyse untersucht. Dabei konnte in Zelllinien, die aus einer Melanommetastase generiert wurden, zwischen 42% und 86% weniger PHLDA1-Protein detektiert werden als in den Zelllinien des jeweiligen autologen Primärtumors (siehe Kap. 2.1). Auch bei 8 weiteren Zelllinien, die aus Melanommetastasen stammten ist die PHLDA1-Expression auf Proteinebene signifikant geringer ($p < 0,0046$) als bei 14 (nicht autologen) Zelllinien, die aus Primärtumoren stammten (siehe Kap. 2.4). Damit korreliert die PHLDA1-Proteinmenge gut mit dem Expressionsmuster auf mRNA-Ebene, über das PHLDA1 ursprünglich isoliert wurde. Die verminderte Expression von PHLDA1 ist somit eine typische Eigenschaft von Zelllinien, die aus Melanommetastasen isoliert wurden und unterstreicht die potentielle Bedeutung von PHLDA1 im Metastasierungsprozess des Melanoms.

In allen getesteten Zelllinien lies sich die PHLDA1-Expression durch Phorbolster stimulieren, auch in den Zelllinien hämatopoetischen Ursprunges, die basal keine PHLDA1-Expression zeigten (siehe Abb. 2.15).

Somit ist in allen bisher getesteten Zelllinien (siehe Tab. 2.2) ein PHLDA1-Gen vorhanden, dessen Expression sich mit der Kinetik eines *immediate early response gene*, Cycloheximid unabhängig induzieren lässt.

Der Vergleich der Expression der PHLDA1-mRNA und der Proteinmenge gibt auch Aufschluss über die Regulation der PHLDA1-Expression. Zum einen korreliert in den autologen Tumorzellpaaren die mRNA-Expression mit der Proteinmenge. Zum anderen wird bei Zelllinien nach Phorbolsterstimulation die PHLDA1-mRNA ca. nach 1-2 Stunden hochreguliert (Kuske, 1998) gefolgt von der Proteinexpression ab ca. 4 Stunden (siehe Abb. 2.15). Eine enge Korrelation der mRNA und Proteinkinetik spricht dafür, dass die Regulation der PHLDA1-Expression hauptsächlich auf Transkriptionsebene liegt.

Um die PHLDA1-Expression *in vivo* ermitteln zu können, wurde mit neu generierten Anti-PHLDA1-Antikörpern melanozytäre Läsionen immunhistochemisch untersucht (siehe Kap. 2.3). Obwohl eine geringe PHLDA1-mRNA-Menge in allen Geweben vorhanden war (Kuske, 1998), konnte kein PHLDA1-Protein in normalem Haut- und Lymphknotengewebe detektiert werden. Dies lässt vermuten, dass die Proteinmenge in diesen Geweben gering ist. Dagegen konnte in 55 untersuchten melanozytären Läsionen eine PHLDA1-spezifische Färbung nachgewiesen werden. 80% der benignen Nävi, dagegen nur 41% der Primärtumore und 22% der Metastasen zeigten eine starke und gleichmäßige PHLDA1-Expression (siehe Abb. 2.12). Da normale Zellen keine PHLDA1-Expression zeigen, ist seine Expression in melanozytären Läsionen kontinuierlich induziert oder ist durch eine veränderte Regulation konstitutiv exprimiert. Im Verlaufe der weiteren Tumorprogression wird die PHLDA1-Expression dann wieder schrittweise reduziert. Somit bestätigten die *in vivo* gemachten Untersuchungen die Resultate aus den Versuchen mit den Zelllinien *in vitro* und zeigen, dass die PHLDA1-Expression während der Tumorprogression des humanen Melanoms vom Primärtumor bis hin zur Metastase herunterreguliert wird.

3.2 Struktur und zelluläre Lokalisation von PHLDA1

Die PHLDA1 mRNA besitzt zwei potentielle Translationsstartpunkte, die im gleichen Leserahmen, 141 Aminosäuren voneinander entfernt liegen. Mit Hilfe von verschiedenen Antisera und rekombinanten PHLDA1-Konstrukten konnte gezeigt werden, dass nur der weiter 3'-liegende Translationsstartpunkt verwendet wird (siehe Kap. 2.6). Von Kozak wurde beschrieben, dass der „Scannmechanismus“ der Translationsinitiation bei einigen eukaryontische mRNAs das weiter 3'-liegende ATG verwendet, wenn es die „Kozak-Konsensussequenz“ besitzt (Kozak, 1999). Dies scheint auch für PHLDA1 zu gelten, denn

das zweite ATG enthält im Gegensatz zu dem weiter 5'-liegenden ATG die Konsensussequenz der Translationsinitiation (Kozak, 1981; Kozak, 1986).

Auch für das murine TDAG51/PHLDA1 und das Rattenhomolog wird die Verwendung des weiter 3'-liegenden ATG beschrieben. Park *et al.* vermuteten dies, da sie zu Komplementation ihrer TDAG51-mutanten T-Zell-Hybridomzelllinie, einen Klon verwendeten, der nur das weiter 3'-liegende ATG enthielt. Dieses Konstrukt stellte die Funktionalität der Hybridomzelllinie wieder her. Die komplementierte, mutante Zelllinie exprimierte Fas und war daraufhin wieder sensitiv gegenüber einer TCR-induzierten Apoptose (Park *et al.*, 1996). Gomes *et al.*, bestimmten die Verwendung des zweiten ATGs durch *in vitro* Translationsexperimente mit verschiedenen PHLDA1-Mutanten (Gomes *et al.*, 1999).

Nicht auszuschließen bleibt die Möglichkeit, dass der erste, also der weiter 5'-liegende Translationsstartpunkt eventuell in einigen Stadien der Entwicklung, bislang nicht untersuchten Geweben oder nach bestimmter Stimulation verwendet wird. Bisher spricht experimentell jedoch nichts für diese Vermutung, denn alle der 50 getesteten Zelllinien, die aus Melanometastasen aus verschiedenen Geweben stammten, verwendeten mit oder ohne PMA-Stimulation das weiter 3'-befindliche ATG.

Auch die Beobachtungen von Park *et al.*, und Gomes *et al.* über das langsamere Migrationsverhalten von TDGA51/PHLDA1 in der denaturierenden Gelelektrophorese stimmten mit den Untersuchungen in dieser Arbeit überein. PHLDA1 hat ein theoretisches Molekulargewicht von 29,5 kDa, migriert aber bei ca. 40 kDa. Möglicherweise ist PHLDA1 auch posttranslational modifiziert, wodurch das höhere Molekulargewicht zustande kommen könnte. Aber auch die vielen positiv geladenen Histidine könnten dazu beitragen, dass es langsamer im Gel wandert. Diese Vermutung wird auch durch das Laufverhalten von verschiedenen in Hefe hergestellten Deletionskonstrukten von PHLDA1 unterstützt. Wurden dabei die C-terminalen Histidin-reichen Regionen deletiert, wanderte rekombinantes PHLDA1 bei dem erwarteten Molekulargewicht im SDS-Polyacrylamidgel. Nach der Deletion eines N-terminalen Bereiches und dem Verbleib der Prolin- und Histidindomänen, migrierte dieses Konstrukt wesentlich langsamer, als es seinem Molekulargewicht entspricht (siehe Abb. 2.33).

PHLDA1 enthält eine *bipartite* ähnliche Struktur, die aus zwei Klustern basischer Aminosäuren bestehen und als Kernlokalisationssequenz bekannt ist (Robbins *et al.*,

1991). Es konnte jedoch mit Hilfe des monoklonalen Anti-PHLA1-AK RN6e2 gezeigt werden, dass PHLDA1 in Melanomzelllinien unter normalen Bedingungen zytoplasmatisch lokalisiert ist (siehe Abb. 2.16). Die Kerne waren von der PHLDA1-spezifische Färbung ausgeschlossen. Es ist aber möglich, dass PHLDA1 unter bestimmten Umständen oder nach Stimulation und unter Verwendung seines Kernlokalisierungssignales in den Kern transloziert wird. Das Kernlokalisierungssignal kann z.B. durch die Konformation von PHLDA1 selbst oder durch die Bindung von anderen Molekülen verdeckt sein und erst nach Aktivierung freigelegt werden. So liegt z.B. auch der Transkriptionsfaktor NF κ B durch den Inhibitor I κ B im Zytoplasma gebunden vor. Nach Aktivierung verschiedener Oberflächenrezeptoren wie z.B. des Toll-like Rezeptors, werden weitere Adaptermoleküle (MyD88, SIIK/IRAK und STAT6) aktiviert und die beiden Untereinheiten I κ α und I κ β der I κ K-Kinase dimerisieren. Diese phosphoryliert den Inhibitor I κ B wodurch er aus dem Komplex abdissoziiert sodass NF κ B in den Kern wandert. Dort bindet NF κ B an eine Reihe von Promotoren, die Gene zur Bekämpfung von Infektionen aktivieren (Janeway *et al.*, 2001).

So ist es auch durchaus denkbar, dass PHLDA1 nach einer Stimulation vom Zytoplasma in den Kern wandert. Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass PHLDA1 alleine die Funktion eines Transkriptionsfaktors ausübt, da Sequenzanalysen kein bekanntes DNA-Bindemotiv erkennen lassen. Außerdem hat PHLDA1, zumindest in Hefe, keine transaktivierende Eigenschaften (siehe Kap. 2.11.3.1), die für die „sauren“-Domänen bei Transkriptionsfaktoren beschrieben wurde (Ma und Ptashne, 1987). Vielmehr könnte PHLDA1 im Kern die Funktion eines Adaptermoleküls besitzen, ohne dabei direkten Kontakt zur DNA- oder zu der basalen Transkriptionsmaschinerie zu haben.

3.3 Funktion von PHLDA1 im humanen Melanom

Gene, die während der Tumorigenese oder des Metastasierungsprozesses in ihrer Expression herunterreguliert oder mutiert werden, sind möglicherweise Tumorsuppressorgene (Sager, 1989). Um die Funktion von PHLDA1 zu bestimmen, wurde eine Reihe stabiler Transfektanten in einer Melanomzelllinie und in der Adenovirus-transformierten Nierenepithelzelllinie 293 generiert. Die stabilen PHLDA1-Transfektanten zeigten unterschiedliche konstitutive PHLDA1-Expressionen, die im Vergleich zu den parental Zellen und den Neomycinvektor-Transfektanten verstärkt war (siehe Abb.

2.21). Die Proteinmenge in den PHLDA1-Transfektanten war jedoch mit der endogenen PHLDA1-Proteinmenge einiger anderen Melanomzelllinien, die aus Primärtumoren etabliert wurden, vergleichbar. Die Analysen der klonierten PHLDA1-Transfektanten ergab ein langsames Wachstum der PHLDA1-Transfektanten im Vergleich zu den Neomycinvektor-Transfektanten (siehe Kap. 2.9.2 und Abb. 2.27), zusätzlich eine reduzierte Klonierungseffizienz (siehe Kap. 2.8 und Abb. Abb. 2.24) sowie ein reduziertes Vermögen Kolonien zu bilden (siehe Kap. 2.9.1). Des Weiteren zeigten die PHLDA1-Transfektanten beim Wachstum eine verstärkte Kontaktinhibition (siehe Kap. 2.7.2).

Diese vier unabhängigen Experimente könnten eine Erklärung dafür geben, warum das Melanom während seiner Metastasierung die PHLDA1-Expression reduziert: Der Tumor kann mit weniger PHLDA1 schneller als neue Läsion heranwachsen. Zusätzlich ist er während des Wachstums unabhängiger von Zell-Zell-Kontakten, über die normalerweise antiapoptotische Signale vermittelt werden (Ishizaki *et al.*, 1995).

Um die Ursache für das verminderte Wachstum der PHLDA1-Transfektanten zu ermitteln, wurden Analysen der Zellpopulationen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklusses durchgeführt. Dabei ergaben sich keine Unterschiede zwischen PHLDA1- und Kontroll-Transfektanten, woraus zu schließen ist, dass PHLDA1 nicht durch eine Beeinflussung des Zellzyklus zu dem reduzierten Wachstum führt (siehe Kap. 2.9.3).

Es konnte aber mit zwei verschiedenen experimentellen Systemen, der Annexin-V-Färbung sowie mit dem TdT-abhängigen Einbau von FITC-markierten dUTP (*Tunel-assay*) gezeigt werden, dass die PHLDA1-Transfektanten eine 2,5 bis 8fach höhere basale Apoptoserate besaßen als ihre Kontroll-Transfektanten (siehe Kap. 2.10, Abb. 2.29 und Abb. 2.30). So ist vermutlich allein die Apoptosevermittlung von PHLDA1 für das geringere Wachstum der Transfektanten verantwortlich.

Im Verlauf der Tumorprogression des Melanoms wird wahrscheinlich die PHLDA1-Expression reduziert, um einen geringeren Anteil an apoptotischen Zellen zu haben. 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 und Weinberg, 2000). 55% der aller nicht melanozytären Tumoren haben Mutationen im p53-Gen und inaktivieren damit einen wichtigen Apoptoseweg (Greenblatt *et al.*, 1994). Aufgrund der

geringen Mutationsraten des p53-Gens bei Melanomen, scheinen melanozytäre Tumore andere Strategien zu verwenden, um der Apoptose zu entgehen.

So wurde für das Melanom eine verminderte Expression der als Apoptosensoren fungierenden Oberflächenmoleküle TRAIL (Zhang *et al.*, 1999) und Fas (Bachmann *et al.*, 2001) beschrieben.

Es wurde auch eine Überexpression von verschiedenen Inhibitoren der Apoptose (IAPs) bei Melanomen beobachtet. Für das IAP-Molekül *Survivin* ist ein möglicher Mechanismus seiner Apoptoseblockade bekannt: es bindet und inhibiert die aktive Form der Effektorcaspasen-3 und 7 (Tamm *et al.*, 1998). *Survivin* wird in den meisten adulten Geweben nicht exprimiert, dagegen aber sehr stark und einheitlich in Melanommetastasen (Grossman *et al.*, 1999). *Survivin* kann durch eine dominant negative Form blockiert werden, wodurch das Melanomwachstum *in vivo* inhibiert wird (Grossman *et al.*, 2001).

Ein anderer Inhibitor der Apoptose ist ML-IAP. Es blockiert die Apoptoseinduktion, die durch Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie und durch das Chemotherapeutikum 4-TBP (4-tertiary buthylphenol) verursacht wird. ML-IAP ist nicht in normalen Geweben und primären Melanozyten, dagegen aber moderat in einigen embryonalen Geweben und stark in den meisten Melanomzelllinien exprimiert (Vucic *et al.*, 2000). Der Mechanismus seiner Apoptoseblockade ist jedoch noch nicht bekannt.

Ähnliches konnte für das kürzlich identifizierte Molekül *Livin* gezeigt werden. Wie auch in den vorher beschriebenen Molekülen ist eine *Livin*-Expression nicht in normalen Geweben sondern nur in einigen embryonalen Geweben, Plazenta und in verschiedenen Tumorzelllinien zu beobachten, am stärksten jedoch in Melanomzelllinien. Eine Transfektion in *Livin*-negative Zelllinien reprimierte eine Reihe von Apoptoseinduktoren wie FADD, Bax, RIP, RIP3 und DR6, zusätzlich konnte *Livin* mit den Caspasen-3 und 7 *in vitro* sowie mit der Caspase-9 *in vivo* koimmunpräzipitiert werden. Rekombinantes *Livin* konnte die Aktivierung der Procaspase-9 durch Apaf1 und Cytochrom-C verhindern (Kasof und Gomes, 2001).

Der Inhibitor der Fas-induzierten Apoptose cFLIP (cellular FLICE-inhibitory protein), blockiert den Fas-Signalweg durch Bindung der Caspase-8 (FLICE) und des Adaptermoleküls FADD (Mort1) (Irmeler *et al.*, 1997). Dies konnte auch in einem Maus-Knockoutmodell gezeigt werden (Yeh *et al.*, 2000). cFLIP enthält wie FADD eine *death-effektor-domain* (DED), mit der es an FADD bindet und so die Aktivierung und Freisetzung der Caspase-8 aus dem *death inducing signalling complex* (*disc*) verhindert

(Krammer, 2000). Somit wird durch cFLIP höchstwahrscheinlich auch die Apoptoseinduktion durch andere TNF-Rezeptorfamilienmitglieder wie z.B. durch den TRAIL-Rezeptors blockiert (Griffith *et al.*, 1998; Kischkel *et al.*, 2000). cFLIP ist nicht in normalen Geweben, dagegen aber in frühen Stadien der T-Zellentwicklung sowie in Melanomzelllinien und Melanomgeweben exprimiert (Irmeler *et al.*, 1997). Des Weiteren war eine cFLIP-Expression in nur 3% der gutartigen melanozytären Läsionen, dagegen aber in 83% der untersuchten Melanome exprimiert (Bullani *et al.*, 2001). Es ist deshalb auch ein wichtiger Inhibitor der Fas-induzierten Apoptose im Melanom.

Mit PHLDA1 wächst die Liste der insgesamt erst kürzlich identifizierten Moleküle, die durch eine Deregulation ihrer normalen Expression daran beteiligt sind, Apoptoseresistenz beim Melanom zu vermitteln.

Der Mechanismus über den PHLDA1 Einfluss auf die Apoptose ausübt, ist noch nicht bekannt. Für das murine Homolog von PHLDA1, TDAG51 wurde als möglicher Apoptosemechanismus die Induktion der Fas-Expression diskutiert. In dem murinen Modellsystem mit einer T-Zell-Hybridomzelllinie konnte gezeigt werden, dass die TDAG51-Expression bei der TCR-vermittelten Apoptose für die Fas-Induktion nötig ist (Park *et al.*, 1996). 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 den in dieser Arbeit hergestellten PHLDA1-Transfektanten konnte keine Korrelation zwischen der PHLDA1- und der Fas-Expression festgestellt werden (Pröls, 2001). Selbst nach Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin war keine Veränderung der Fas-Expression zwischen PHLDA1- und Kontroll-Transfektanten zu beobachten. Des Weiteren war bei den untersuchten humanen Geweben die Fas-Expression nicht von der PHLDA1-Expression abhängig.

So scheinen die Mechanismen, über die PHLDA1 die Regulation der Apoptose in Melanomen und bei der neuronalen Entwicklung bei Ratten beeinflusst, nicht über eine Fas-Induktion zu wirken. Die in dieser Arbeit erzielten Resultate, sowie die von Gomes *et al.*, gemachten Beobachtungen, deuten darauf hin, dass PHLDA1 die Expression von Apoptoseeffektoren reguliert, die nicht im Fas-vermittelten Apoptosesignalweg liegen.

Als ersten Anhaltspunkt auf welchem molekularen Weg PHLDA1 die Apoptosevermittlung reguliert, konnte festgestellt werden, dass die PHLDA1-Transfektanten geringfügig mehr Apaf1 exprimierten, als die Kontroll-Transfektanten.

Dies ist insofern sehr interessant, da ebenfalls erst kürzlich gezeigt werden konnte, dass in 40% aller getesteten Melanome der Apoptoseeffektor Apaf1 nicht mehr exprimiert wurde. Das besondere war dabei, dass Apaf1 aufgrund eines epigenetischen *gene silencing* nicht mehr transkribiert wurde (Soengas *et al.*, 2001). Apaf1 verändert nach Cytochrom-C-Freisetzung aus den Mitochondrien seine Konformation und katalysiert anschließend die Aktivierung der Caspase-9 aus der Procaspase-9. Somit ist Apaf1 ein wichtiger Effektor im p53-vermittelten Apoptoseweg beim Melanom. In weiteren Experimenten soll bestätigt werden, auf welchem Weg PHLDA1 die Expression von Apaf1 beeinflusst.

3.4 Zelluläre Interaktionspartner von PHLDA1

Die verstärkte PHLDA1-Expression in den stabilen Transfektantenlinien, erhöhte deren basale Apoptoserate. Möglicherweise erhöht PHLDA1 die Proteinmenge des Apoptoseeffektors Apaf1, der genaue Mechanismus der Apoptosevermittlung ist jedoch nicht bekannt. Aufgrund seiner Struktur scheint PHLDA1 nicht direkt in einer der beschriebenen Apoptosekaskaden involviert zu sein. So fehlen PHLDA1 z.B. die *death domains* der klassischen Adaptermoleküle wie FADD/Mort1 und Apaf1 sowie eine *death effector domain* der Effektorcaspasen wie z.B. bei der Caspase8/FLICE (Krammer, 2000). Das PHLDA1-Protein besitzt auch keine der typischen Strukturen einer Pro-Caspase, noch hat es irgendwelche Motive eines Enzymes. Dagegen besitzt PHLDA1 die Struktur eines Adaptermoleküls mit Domänen, die für Protein-Protein-Interaktionen bekannt sind (siehe auch Kap. 1.5 und Abb. 1.2) und könnte dadurch an der Regulation der Expression von Apoptoseeffektoren beteiligt sein.

Zur Identifikation zellulärer Interaktionspartner, die dann auch Informationen über den Wirkmechanismus von PHLDA1 liefern könnten, wurde ein *yeast two hybrid screen* durchgeführt. Bei dem Screen von $5,1 \times 10^6$ unabhängigen cDNA-Klonen einer Gehirn- und einer Plazenta-Genbank sowie einer Genbank, die aus einer Zervixkarzinomzelllinie generiert wurde, konnten zwei verschiedene Gene isoliert werden, die in Hefe spezifisch mit PHLDA1 interagierten (siehe Kap. 2.11.3.2).

Bei dem einen Gen handelt es sich um die p47-Untereinheit des humanen Translationsinitiationsfaktor eIF3. Dieses Gen (eIF3-p47) wurde insgesamt in vier Hefeklonen aus zwei verschiedenen Gehirngenbanken isoliert. eIF3 ist ein multifaktorieller Komplex, der aus mindestens zehn Untereinheiten besteht und bei der Initiation der

Translation eine zentrale Rolle spielt (Methot *et al.*, 1997). Er bindet die 40-S ribosomale Untereinheit wodurch die 80-S Untereinheit des Ribosoms abdissoziiert. Zusätzlich stabilisiert eIF3 die Methionyl-tRNA und ist für die mRNA-Bindung nötig (Block *et al.*, 1998). Die genaue Funktion der p47-Untereinheit ist noch nicht bekannt. Sie besitzt N-terminal eine Sequenzhomologie zu dem murinen Mov-34, einer Untereinheit des 26S-Proteasoms (Asano *et al.*, 1997; Aravind und Ponting, 1998).

Bei dem anderen im *yeast two hybrid screen* gefundenen Gen handelt es sich um das MRG-Gen (mammary-derived growth inhibitor-related gene), das aus einem Hefeklon aus einer Gehirngenenbank isoliert wurde. Es besitzt eine Sequenzhomologie zu MDGI (mammary derived growth inhibitor gene), der als epithelialer Wachstumsinhibitor und Differenzierungsfaktor bekannt ist (Bielka *et al.*, 1986; Bohmer *et al.*, 1988). MDGI und MRG gehören zu einer Multigenfamilie von Fettsäure-bindenden Proteinen (FABP, fatty acid binding proteins) (Yang *et al.*, 1994).

Das MRG-Gen wurde auch in einem differentiellen cDNA-Sequenzieransatz bei der Suche nach potentiellen Tumorsuppressoren gefunden (Shi *et al.*, 1997). Dabei war die MRG-Expression in normalem Brustgewebe hoch, geringer in gutartigen Hyperplasien und kaum detektierbar in Brustkrebsgewebe. Zusätzlich zeigte eine Überexpression von MRG in einer humanen Brustkrebszelllinie eine deutliche Reduktion des Tumorwachstums in Nacktmäusen (*nude mice*). Die Autoren folgerten daraus dass MRG Tumor-reduzierende Eigenschaften besitzt und der Verlust seiner Expression an der Entwicklung von Brustkrebs beteiligt ist (Shi *et al.*, 1997). In einer neueren Studie konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass MRG seinen wachstumsinhibierenden Effekt durch die Bindung von Omega-3-ungesättigten-Fettsäuren (omega-3 PUFAs) ausübt und zusätzlich für die Differenzierung von epithelialen Brustzellen verantwortlich ist (Wang *et al.*, 2000).

Ob die Interaktion von PHLDA1 mit eIF3-p47 sowie MRG auch unter physiologischen Bedingungen in Mammaliazellen stattfindet, ist noch nicht eindeutig. In Hefe interagiert PHLDA1 spezifisch sowohl mit der p47-Untereinheit von eIF3 als auch mit MRG. Jedoch konnte keines der beiden Proteine im Zellextrakt von Mammalia-Zelllinien mit PHLDA1 koimmunpräzipitiert (siehe Kap. 2.11.4) werden, noch konnten sie mit *Gst pull down*-Experimenten (siehe 2.11.1) identifiziert werden.

Es besteht natürlich die Möglichkeit, dass die Interaktion nur in Hefe, nicht aber in Mammalia-Zellen stattfindet. Zwar handelt es sich bei dem *yeast two hybrid screen* um ein

eukaryontisches *in vivo*-System zur Identifikation von Protein-Protein Interaktionen, dennoch sind einige Bedingungen anders als unter physiologischen Umständen. So sind PHLDA1 und auch die potentiellen Interaktionspartner in Hefe stark überexprimiert. Sowohl PHLDA1 als auch die Proteine der Genbank liegen als Gal4-Fusionsproteine vor. Dadurch kann die natürliche dreidimensionale Struktur der Proteine verändert sein, wodurch sich neue Bindungsmöglichkeiten ergeben können oder andere verloren gehen. Zusätzlich können die Proteine durch ihre heterologe Expression in Hefe anders posttranslational modifiziert und gefaltet sein. Zwar gehören eIF3-p47 und MRG nicht zu der Gruppe von Genen die als „falsch positive“ für den *yeast two hybrid screen* bekannt sind (Bartel *et al.*, 1993), aber die soeben beschriebenen unphysiologischen Bedingungen könnten dazu beitragen, dass in Hefe zwei Proteine miteinander interagieren, die normalerweise in Mammalia-Zellen keine Bindung eingehen.

Genauso ist es möglich, dass in Hefe gefundene Interaktion echt ist und nur die Bedingungen für eine Koimmunpräzipitation *in vitro* noch nicht gefunden wurden. Die Interaktion in Zellen kann sehr schwach und auch zeitlich sehr kurz sein und durch die Methoden des Zellaufschlusses oder der Verwendung von Detergenzien zerstört werden.

Die gefundenen potentiellen Interaktionspartner geben Möglichkeiten darüber zu spekulieren, wie sie zusammen mit PHLDA1 das Tumorwachstum reduzieren. MRG übt wahrscheinlich durch die Bindung von Omega-3 ungesättigten Fettsäuren (omega-3 PUFAs) einen wachstumsinhibierenden Effekt auf Brustkrebszellen aus (Wang *et al.*, 2000). In diesem Zusammenhang sind neuere Ergebnisse sehr interessant, in denen erstmals gezeigt werden konnte, dass Omega-3 ungesättigten Fettsäuren das Wachstum von kultivierten, metastatischen Melanomzellen inhibieren konnte (Albino *et al.*, 2000). Dabei war nach Behandlung mit omega-3 PUFAs der Zellzyklus durch eine Hyphosphorylierung von Rb blockiert und ein größerer Prozentsatz an Zellen apoptotisch. Auch wenn der Mechanismus der Apoptosevermittlung noch nicht bekannt ist, vermuteten die Autoren durch die Hyphosphorylierung von Rb einen Zusammenhang zwischen dem Fettsäuremetabolismus und den Rb-Signalwegen. So könnte PHLDA1 in der omega-3 PUFAs/MRG Signalkette involviert sein und so die wachstumsinhibierenden und apoptoseauslösenden Wirkung an andere in der Apoptosekaskade befindliche Moleküle vermitteln.

eIF3 ist einer der zentralen Faktoren für die Translationsinitiation bei Eukaryonten. In einer Reihe von Studien konnte gezeigt werden, dass während der Apoptose die Translation inhibiert wird. So wurde beschrieben, dass der Translationsinitiationsfaktor 4G (eIF4G) nach Fas/CD95 induzierter Apoptose, proteolytisch gespalten und die dadurch die gesamte Proteinsynthese inhibiert wurde (Morley *et al.*, 1998). Die Arbeitsgruppe konnte auch zeigen, dass für die proteolytische Spaltung des eIF4G die Caspase-3 nötig ist (Bushell *et al.*, 1999). Die Caspase-3 kann *in vitro* auch eIF4B sowie die p35-Untereinheit von eIF3 spalten (Bushell *et al.*, 2000). In einer erst kürzlich erschienenen Arbeit wurde ein weiterer Mechanismus der Inhibition der Proteinbiosynthese während der Apoptose beschrieben. Die Autoren konnten zeigen, dass nach diversen Apoptosestimuli, die Proteinkinase PKR durch die Caspasen-3, 7 und 8 gespalten wird. Die dadurch freigesetzte Kinasedomäne phosphorylierte den Translationsinitiationsfaktor-2 (eIF2-a), der dadurch die Translation seiner eigenen mRNA inhibierte (Saelens *et al.*, 2001).

All diese Studien zeigen, dass während der Apoptose die Translation und damit die Proteinbiosynthese blockiert wurde. Auch für PHLDA1 wurde beschrieben, dass es die Proteinsynthese inhibiert (Hinz *et al.*, 2001). Die Autoren folgerten dies nach *in vitro* Translationsexperimenten und durch Kotransfektionen einer Luziferase-mRNA und PHLDA1 in die Mammalia 293T-Zelllinie. Dabei reduzierte die Expression von PHLDA1 jeweils die Translation des Luziferase-Reportergens. Zusätzlich isolierten sie in einem *yeast two hybrid screen* mit PHLDA1 als *bait* drei verschiedene Proteine, die mit der Regulation der Translation assoziiert sind. Dabei handelte es sich um das ribosomale Protein L14 und die mRNA-bindenden Proteine eIF3-p66 sowie iPABP (inducible poly(A) binding protein (Hinz *et al.*, 2001). Den Experimenten von Hinz *et al.*, ist jedoch nicht zu entnehmen, welche mRNAs durch PHLDA1 nicht mehr translatiert werden. Es ist eher unwahrscheinlich dass die Gesamtproteinbiosynthese durch PHLDA1 inhibiert wird. So war z.B. bei Hinz *et al.* das Haushaltsgen GAPDH nicht von der Translationshemmung beeinflusst. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte weder in den stabilen PHLDA1-Transfektanten noch in transienten PHLDA1-Transfektanten eine Reduktion der Gesamtproteinmenge festgestellt werden.

Der Mechanismus wie PHLDA1 die Inhibition der Proteinbiosynthese beeinflusst, bleibt aber weiterhin unklar. Es ist jedoch interessant dass sowohl in dieser Arbeit als auch bei den Studien von Hinz *et al.*, PHLDA1 als Interaktionspartner von in der Translation involvierten Proteinen im *yeast two hybrid system* gefunden wurde. Weitere Experimente

sind nötig, um zu zeigen dass PHLDA1 durch Bindung der verschiedenen Translationsinitiationsfaktoren die Translation spezifischer mRNAs inhibiert.

3.5 Die Rolle von PHLDA1 während der Tumorigenese des Melanoms

In Abb. 3.1 sind die Resultate der PHLDA1-Expression und die Ergebnisse der funktionellen Studien noch einmal schematisch zusammengefasst.

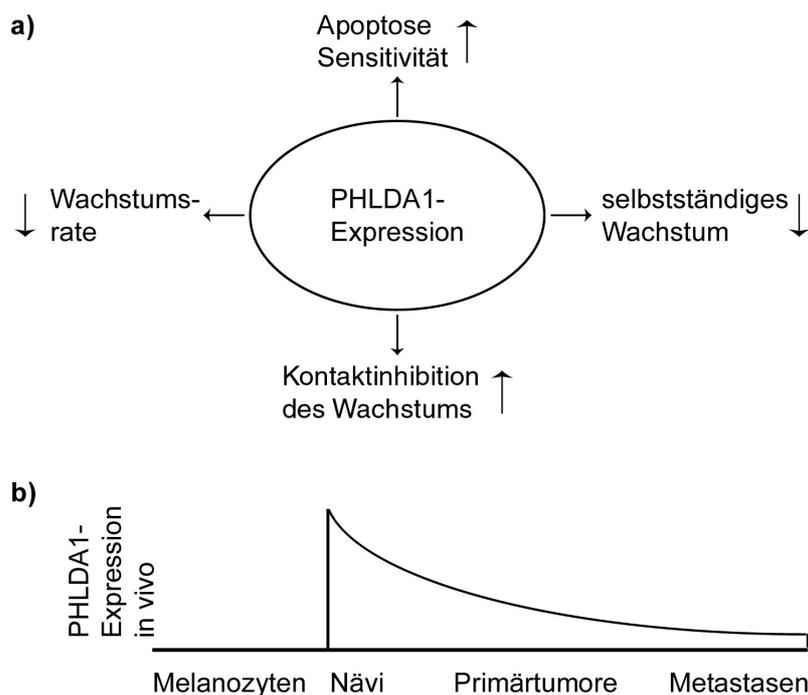


Abb. 3.1 a) Resultate der konstitutiven PHLDA1-Expression *in vitro* und b) das Expressionsmuster von PHLDA1 auf humanem Melanom.

Das PHLDA1-Protein ist in melanozytären Läsionen *in vivo* exprimiert. In benignen Nävi war die Expression am stärksten, während sie im Verlaufe der Tumorprogression vom Primärtumor bis hin zu Metastase herunterreguliert wurde (siehe Abb. 3.1 b). Die konstitutive PHLDA1-Expression in den Transfektanten-Zelllinien *in vitro* ist mit einer verminderten Wachstumsrate, einer verminderten Klonierungseffizienz und einem verminderten Vermögen Kolonien zu bilden, assoziiert. Auch die Kontaktinhibition des Wachstums nimmt bei den PHLDA1-Transfektanten im Vergleich zu den Kontroll-Transfektanten zu. Des Weiteren ist die konstitutive PHLDA1-Expression mit einer erhöhten basalen Apoptoserate assoziiert, die sich durch Chemotherapeutika stark induzierten lässt (siehe Abb. 3.1 a).

PHLDA1 wurde in einem Screen nach Metastasierungs-assoziierten Molekülen des Melanoms identifiziert. Aufgrund seiner Wachstumssupprimierenden Eigenschaften und seiner Apoptosevermittlung scheint eine Deregulation von PHLDA1 eher für die Tumorigenese eine Rolle zu spielen, als spezifisch den Metastasierungsprozess des Melanoms zu beeinflussen. Es ist jedoch nicht verwunderlich in einem Screen nach Metastasierungs-assoziierten Molekülen auch Gene zu finden, die für die Tumorigenese von Bedeutung sind, denn zur Manifestierung einer Metastase sind dieselben Veränderungen – *Hallmarks of cancer* – nötig, wie bei der Etablierung eines Primärtumors (Hanahan und Weinberg, 2000).

Die hohe PHLDA1-Proteinmenge in den Nävi sowie die Resultate der funktionellen Studien mit den PHLDA1-Transfektanten lassen vermuten, dass PHLDA1 für den benignen Charakter der Nävi mitverantwortlich ist. 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 Nävi als auch in Melanomen als Zellkluster auf, wodurch sie nicht mehr der Proliferationsregulation durch die Keratinozyten unterliegen. Dennoch sind Nävi 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 Apoptosevermittlung sowie die Wachstumsregulation der Keratinozyten übernehmen. Wenn dann im weiteren Verlauf der Tumorprogression die PHLDA1-Expression herunterreguliert wird, verliert der Nävi seinen gutartigen Eigenschaften und differenziert zum malignen Melanom.

3.6 Ausblick

Die Mechanismen über den PHLDA1 Apoptose vermittelt sind noch nicht eindeutig geklärt. Dennoch ist PHLDA1 durch seine ubiquitäre Expression und Induzierbarkeit ein interessantes Zielgen für die Entwicklung neuer Anti-Tumorthérapien beim Melanom. Bisherige Chemotherapien haben bei der Behandlung von Melanomen nur geringe Erfolge, da die verwendeten Chemotherapeutika in den Tumoren normalerweise Apoptose induzieren und gerade Melanome häufig Mutationen in den Apoptose-assoziierten Molekülen besitzen (Serrone und Hersey, 1999).

Andererseits kann durch eine gezielte Manipulation dieser in der Apoptose involvierten Moleküle versucht werden, die Resistenz der Melanome gegenüber den Chemotherapeutika zu reduzieren. So wählten z.B. Jansen und Mitarbeiter als Zielgen Bcl2 und reduzierten seine Expression in einem Mausmodell sowie während einer klinischen Studie bei Melanompatienten. Die Sensitivität eines in SCID-Mäusen wachsenden humanen Melanoms gegenüber dem Chemotherapeutikum *Dacarbazine* konnte durch die Verwendung von Bcl2-Antisense-Oligonukleotide drastisch erhöht werden (Jansen *et al.*, 1998). Bei der klinischen Studie mit 14 Patienten, die jeweils ein fortgeschrittenes malignes Melanom besaßen, konnte ebenfalls durch die Verwendung der Bcl-2-Antisense-Oligonukleotide die Sensitivität gegenüber dem Chemotherapeutikum *Dacarbazine* erhöht werden: Sechs der Patienten hatten eine wesentlich erhöhte Überlebensrate und entwickelten eine Anti-Tumorantwort. Dabei wurde der Tumor bei einem Patienten ganz, bei zwei Patienten teilweise und bei drei weiteren Patienten in geringem Maße zurückgebildet (Jansen *et al.*, 2000).

In diesem Zusammenhang sind die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen sehr interessant, in denen gezeigt werden konnte, dass eine verstärkte PHLDA1-Expression die Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika drastisch erhöht (siehe Abb. 2.31). Um für PHLDA1 eine anwendbare Therapie zu entwickeln, müssten diese Beobachtungen erst einmal *in vivo* überprüft werden. So könnte man die in dieser Arbeit beschriebenen PHLDA1-Transfektanten auf ihre Fähigkeit auf Wachstum und zur Metastasierung in Nacktmäusen untersuchen. Für einige der in unserem Labor verwendeten Melanomzelllinien, konnte dies schon erfolgreich durchgeführt werden (Xie *et al.*, 1997). Wenn auch mit den Transfektanten der Melanomzelllinie MelRifkin ein Tumor in den Mäusen induziert werden kann, könnte man die Sensitivität der Tumore gegenüber einer Chemotherapeutikabehandlung in Abhängigkeit der PHLDA1-Expression untersuchen.

Eine andere Möglichkeit bestünde in der Verwendung eines Maus-Melanom-Modells. Denkbar wäre hier z.B. die Verwendung der von Chin *et al.*, beschriebenen transgenen Mauslinie. Diese Mäuse entwickeln Melanome aufgrund einer Melanozyten-spezifischen Expression eines mutanten H-Ras-Gens in einem *INK4a^{-/-}* genetischen Background (Chin *et al.*, 1997). In solchen Mäusen könnte man durch retroviralen Gentransfer und der Verwendung eines melanozyten-spezifischen-Tyrosinase-Promotors, PHLDA1 bzw. Kontrollen in den Melanomen exprimieren. Anschließend könnte bestimmt werden, ob die

Empfindlichkeit der Tumore gegenüber Chemotherapeutika von der PHLDA1-Expression abhängt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte PHLDA1-Expression die Sensitivität der Melanomzelllinie gegenüber Chemotherapeutika drastisch erhöht. Sollten sich diese Ergebnisse mit den eben beschriebenen Experimenten *in vivo* bestätigen, könnte man damit beginnen auch eine Gentherapie für den Menschen zu entwickeln. Ziel müßte dabei sein, die Expression von PHLDA1 spezifisch in den Melanomen durch PHLDA1-Gentransfer hochzuregulieren oder seine Expression zu induzieren, um dadurch Sensitivität der Melanome gegenüber der Chemotherapiebehandlung zu erhöhen.

4 Material

4.1 Material und Bezugsquellen

4.1.1 Gewebe

Die Gewebeproben und klinische Diagnosen stammten von den Dermatologischen Abteilungen der Universität München, der Technischen Universität München und der Universität Hamburg. Das Gewebe wurde nach der operativen Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei -80°C gelagert.

Humane Nävi

Name	Gefriernummer	Diagnose
N1	946	kein Befund
N2	941	kein Befund
N3	936	kongenital
N4	758	kein Befund
N5	703	kein Befund
N6	696	compound
N7	Sb2 (94-1799)	kongenital
N8	Sb9 (TU 94-2197)	compound
N9	Sb10 (TU 94-2105)	papillomatös
N10	Sb11 (TU 94-2540)	compound
N11	665	compound
N12	Sb8 (TU 94-1890)	compound
N13	701	compound
N14	927	kein Befund
N15	667	compound

Tab. 4.1 In dieser Arbeit verwendeten humanen Nävi (N1-N15). Die klinische Diagnose ist, soweit bekannt, angegeben. Zur Klassifizierung der Nävi siehe auch Kap. 1.1. In der weiteren Arbeit sind die Nävi wie unter „Name“ bezeichnet, angegeben.

Humane Melanomprimärtumore

Name	Gefriernummer	Stadium (Lokalisation)
P1	957	CL IV, 3,8 mm
P2	939	SSM, (Oberarm)
P3	606	SSM, CL III, 0,5 mm (Rücken)
P4	543	keine Befund vorhanden
P5	Sb4 (TU 96-736)	NM, CL IV, 1,6 mm
P6	Sb12 (TU 94-3201)	Melanoma <i>in situ</i>
P7	Sb15 (TU 96-345)	NM, CL III, 1,0 mm
P8	Sb18 (TU 95-753)	SSM, CL II, 1,7 mm
P9	Sb19 (TU 96-1452)	LMM, CL III-IV, 1,5 mm
P10	923	SSM, "sehr groß"
P11	Sb16 (TU 95-2774)	NM, CL III-IV, 3,9 mm
P12	937	SSM, (Unterarm)
P13	898	kein Befund vorhanden
P14	625	kein Befund vorhanden
P15	626	SSM, CL III, 0,3 mm
P16	612	SSM, CL II, 0,14 mm
P17	Sb14 (TU 94-2561)	NM, CL IV, 2,1 mm
P18	940	SSM, (Rücken)
P19	902	SSM, (Nacken)
P20	Sb13 (TU 96-70)	NM, CL III, 0,7 mm
P21	866	kein Befund vorhanden
P22	895	SSM

Tab. 4.2 In dieser Arbeit verwendete humanen Melanomprimärtumore (P1-P22). Die Clark-level (CL), die vertikale Dicke der Tumore in mm (Breslow Index) sowie die Art des Tumors sind, sofern bekannt, angegeben. SSM, Superfiziell-Spreitendes-Melanom; NM, Noduläres-Melanom; LMM, Lentigo-Maligna-Melanom. Siehe auch Kap. 1.1 für die Klassifikation der Melanome. In der weiteren Arbeit sind die Primärtumore wie unter „Name“ bezeichnet, angegeben.

Humane Melanommetastasen

Name	Gefriernummer	Lokalisation der Metastase
M1	600	Lymphknoten
M2	Sb7 (TU 96-0000)	Lymphknoten
M3	874	Lunge
M4	969 (= 967)	Haut, (Ellenbogen)
M5	916	Haut, (Wadenbein)
M6	915	Haut, (Schulterblatt)
M7	195	Lymphknoten
M8	338	Haut
M9	638	Lymphknoten
M10	613	Lymphknoten
M11	610	Lymphknoten
M12	639	Lymphknoten
M13	602	Lymphknoten
M14	561	Lymphknoten
M15	921	Lymphknoten
M16	Sb20 (TU 95-2615)	Lymphknoten
M17	640	Lymphknoten
M18	865	Haut

Tab. 4.3 In dieser Arbeit verwendeten humanen Melanommetastasen (M1-M18). Es ist angegeben, ob es sich um Lymphknoten- oder Hautmetastasen handelt, und wenn bekannt, wo sich die Hautmetastase befand. In der weiteren Arbeit sind die Melanommetastasen wie unter „Name“ bezeichnet, angegeben.

4.1.2 Zelllinien

humanes Melanom:

1552, C32, GTBS^o, GUBSA^o, HT144, IgR3, IgR37[§], IgR39[§], Mel-888[&], MelBühler*, MelEi*, MelGerlach*, MelHo*, MelJu, MelJuso*, MelMusa, MelRifkin*, MelWei, SbCl2[&], SbCl3, SKMel2, SKMel25, SKMel28, SKMel31, , WM-115, WM 266-4, WM35,

humanes Adenokarzinom:	SKHep1
humanes Gliom:	A172, LN18
humanes Zervixkarzinom:	C4II, Catti, Hela,
humanes Kolonkarzinom:	Colo320, Colo829, DLD1, Lovo, LS174T, SW40,
humanes Lungenkarzinom:	A427
humane lymphoblastoide Zelllinie, EBV-infiziert:	LCL (Vater Lutz)
humanes Mammakarzinom:	207, MCF7, MDAM, Skbr3,
humane Monoblasten:	HL60,
humane Myeloblasten	K562
humanes Schilddrüsenkarzinom:	GRL173
humanes Plattenepithelkarzinom:	SCC9
humanes B-Zell-Lymphom:	Daudi, Ramos, Raji,
humanes T-Zell-Lymphom:	8402, Molt4 ⁺ , Peer, TSUPI
humane Adenovirus Typ-5 trans- formierte Nierenepithelzelllinie:	293
Affenierenzellen, SV40 transformiert:	Cos7
murine Fibroblasten-Zelllinie:	LTK ⁻

Herkunft der Zelllinien: ohne Markierung: ATCC, Manassas, VA, USA
 * Institut für Immunologie, München
 § S.Carrell, Epalinges, Schweiz
 ° M.Vetterlein, Wien, Österreich
 + L.Gürtler, Greifswald
 & M.BarEli, Houston, TX, USA
 ^ I. Funke, Klinikum Großhadern, München

4.1.3 Transfektanten

Name	Klon	transfiziertes Gen	Herkunft
MelRifkin Tr1	Tr1-1G6	4,5 kbp PHLDA1 in pcDNA3	vorliegende Arbeit
MelRifkin Tr2	Tr2-1D10	4,5 kbp PHLDA1 in pcDNA3	vorliegende Arbeit
MelRifkin Tr3	Tr3-2D9	4,5 kbp PHLDA1 in pcDNA3	vorliegende Arbeit
MelRifkin Tr4	Tr4-2A10	4,5 kbp PHLDA1 in pcDNA3	vorliegende Arbeit
MelRifkin Neo1	Tr1-H12	pcDNA3	vorliegende Arbeit
MelRifkin Neo2	Tr2-C9	pcDNA3	vorliegende Arbeit
293 Tr1	Tr1-D6-G10	4,5 kbp PHLDA1 in pcDNA3	vorliegende Arbeit
293 Tr2	Tr2-A5	4,5 kbp PHLDA1 in pcDNA3	vorliegende Arbeit
293 Tr3	Tr3-D11	4,5 kbp PHLDA1 in pcDNA3	vorliegende Arbeit

293 Tr4	Tr4-B3	4,5 kbp PHLDA1 in pcDNA3	vorliegende Arbeit
293 Neo1	Tr1-D7	pcDNA3	vorliegende Arbeit
293 Neo2	Tr2-E8	pcDNA3	vorliegende Arbeit

Tab. 4.4 In dieser Arbeit hergestellte, stabile Transfektantenlinien. Die genaue Klonbezeichnung ist unter „Klon“ angegeben. Im weiteren wurden die Transfektanten wie unter „Name“ angegeben, bezeichnet.

4.1.4 *S. cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
Y187	<i>MATα ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, mef, gal80Δ, URA3:: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i>	(Harper <i>et al.</i> , 1993)
Y190	<i>MATα, ura3-52, his3-200, lys2-801, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, cyh^r2, Lys2:: GAL1_{UAS}-GAL_{TATA}-HIS3, URA3:: GAL4_{17-mers(x3)}-CyCI_{TATA}-lacZ</i>	(Feilotter <i>et al.</i> , 1994)
CG1945	<i>MATα, ura3-52, his3-200, lys2-801, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, gal80Δ, cyh^r2, Lys2:: Gal1_{UAS}-HIS_{TATA}-HIS3, URA3:: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i>	(Harper <i>et al.</i> , 1993; Flick and Johnston, 1990)
PJ69-2A	<i>MATα, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, Lys2:: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2</i>	(James <i>et al.</i> , 1996)

Tab. 4.5 Verwendete Hefestämme

4.1.5 *E. coli*-Stämme

Name	Genotyp	Herkunft
DH5 α	<i>supE44 lacU169 (80lacZ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96thi-1relA1</i>	(Hanahan, 1983)
JM101	<i>supE_{thi} Δ(lac-proAB)F' (traD36proAB⁺lacI^qlacZ ΔM15)</i>	(Messing <i>et al.</i> , 1977)
JM109	<i>recA1 supE44endA1 hsdR17 gyrA96 rel A1 thi Δ(lac-proAB)</i>	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
BL21 (DE3)	<i>hsdS gal (λclts857 ind1 Sam7nin5 lacUV5-T7 gene1)</i>	(Shuman, 1989)

BL21-Codon-Plus TM -RP	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS (r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal endA Hte(argU proL Cam^r)</i>	(Carstens and Waesche, 2000)
-----------------------------------	--	------------------------------

Tab. 4.6 Verwendete *E. coli*-Stämme

4.1.6 Polyklonale Seren und Antikörperkonjugate

Name	eingesetzte Verdünnung	Herkunft
FITC-konjugiertes Kaninchen-Anti-Maus-Antiserum (K α M-FITC), Best. Nr. F0261	1:25 in 1% BSA-PBS	Dako, Hamburg
Peroxidase-konjugiertes Kaninchen-Anti-Maus-Antiserum (K α M-POD), Best. Nr. P0161	Westernblot: 1:5000 in 5% Magermilch-PBS, ELISA: 1:200 in Medium	Dako, Hamburg
Peroxidase-konjugiertes Kaninchen-Anti-Ziege-Antiserum (K α Z-POD), Best. Nr. P0449	1:2000 in 5% Magermilch-PBS	Dako, Hamburg
Peroxidase-konjugiertes affinitätsgereinigtes Kaninchen-Anti-Maus IgG+IgM Antiserum Best. Nr. 315-035-048	1:200 in 1% BSA-PBS	Jackson Laboratories, Dianova Hamburg
Ziege-Anti-TDAG51 L19 Best. Nr. SC-6143	1:200 in 1% BSA-PBS	Santa Cruz Inc., Santa Cruz, CA, USA
Ziege-Anti-TDAG51 M20 Best. Nr. SC-6142	1:200 in 1% BSA-PBS	Santa Cruz Inc., Santa Cruz, CA, USA
Ziege-Anti-TDAG51 N18 Best. Nr. SC6144	1:200 in 1% BSA-PBS	Santa Cruz Inc., Santa Cruz, CA, USA
Histostain TM -Plus Biotinylated Broad Spectrum Antibody Best. Nr. 50-441	1:1 in 1% BSA-PBS	Zymed, San Francisco, CA, USA
Humanes Immunglobulin Best. Nr. I4506	100 μ g/ml in 1% BSA-PBS	Sigma, Deisenhofen
Streptavidin-AP Konjugat Best. Nr. 1089153	1:500 in 1% BSA-PBS	Roche, Mannheim

Tab. 4.7 Verwendete polyklonale Seren und Antikörperkonjugate

4.1.7 Monoklonale Antikörper

Spezifität	Klon	Isotyp	Verdünnung bzw. eingesetzte Konzentration	Herkunft
murines H-2	11-4-1	IgG2a	Hybridomüberstand, unverdünnt	G. Hammerling, Heidelberg
humanes β -Actin	AC-15	IgG1	1:10000	Sigma, Deisenhofen
humanes Actinin	AT6/172	IgG1	1:200	Cymbus LTD, Hants, USA
humanes CD45	GAP8.3	IgG2a	Hybridomüberstrand, unverdünnt	ATCC, Manassas, VA, USA
humanes Fas (CD95/Apo1)	DX2	IgG1	20 μ g/ml	Pharmigen, San Diego, CA, USA
humaner Fas-Ligand	NOK1	IgG1	20 μ g/ml	Pharmigen, San Diego, CA, USA
NCA CD66c	FR4H12	IgG1	Hybridomüberstand, unverdünnt	Institut für Immunologie, München
Hefe Gal4-DNA-Binde-Domäne	keine Angabe	IgG1	5 μ g/ml	Clontech, Palo Alto, CA, USA
Hefe Gal4-DNA-Binde-Domäne	RK5C1	IgG2a	5 μ g/ml	Santa Cruz Inc., Santa Cruz, CA, USA
Gst (rekombinate Gutathione S-Transferase)	B14	IgG1	3 μ g/ml	Santa Cruz Inc., Santa Cruz, CA, USA
Histidin-Tag	keine Angabe	IgG2a	4 μ g/ml	Amersham, Pharmacia, Freiburg
humane Melanomzellen	HMB45	IgG1	Hybridomüberstand, unverdünnt	Immunotech, Marseille, France
Melanom Proteoglykan 220-440 kDa	G7A5	IgG1	1:100 2 μ g/ml	Immunotech, Marseille, France
Melanom Antigen (Chondroitin sulfat > 450kD)	NKI-M6	IgG1	1:50 2 μ g/ml	Dunn Labortechnik, Asbach

humanes c-Myc (Ab1)	Myc1-9E10.2	IgG1	Hybridomüberstand, 1:10	ATCC, Manassas, VA, USA
humanes c-Myc (Myc-Tag)	9E10	IgG1	3 µg/ml	Calbiochem, Cambridge, MA, USA
humanes p53	A431	IgG3	1 µg/ml	Transduction Lab., Lexington, USA
PHLDA1	RN1a6	IgG1	Hybridomüberstand, unverdünnt	vorliegende Arbeit
PHLDA1	RN6a3-b12	IgM	unverdünnt	vorliegende Arbeit
PHLDA1	RN5b10-a4	IgG2a	unverdünnt	vorliegende Arbeit
PHLDA1	RN6e2-b9-a4	IgG2a	unverdünnt	vorliegende Arbeit
PHLDA1	RN8e9-c6	IgG1	unverdünnt	vorliegende Arbeit
PHLDA1	RN8g2	IgG2	unverdünnt	vorliegende Arbeit
Xress-Tag von pCDNA3.1/His	keine Angabe	IgG1	1:5000	Invitrogen, Leek, Niederlande

Tab. 4.8 Verwendete monoklonale Antikörper. Alle monoklonalen Antikörper stammen aus Mäusen und wurden wie angegeben in RPMI-Medium/5%-FCS/0.1%-Azid verdünnt.

4.1.8 Enzyme

DNaseI	Roche (Boehringer), Mannheim
DNA-PolymeraseI (<i>E. coli</i>)	Roche (Boehringer), Mannheim
Klenow-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt
Kälberdarm-Phosphatase CIP	Roche (Boehringer), Mannheim
Lysozym (Hühnerrei)	Roche (Boehringer), Mannheim
Pfu-Polymerase	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt
	Roche (Boehringer), Mannheim
	Life Technologies, Karlsruhe
RNaseA (Rinderpankreas)	Roche (Boehringer), Mannheim
T4-Polynukleotidkinase	New England Biolabs, Frankfurt
T4-DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt
T4-DNA Polymerase	Roche (Boehringer), Mannheim
Taq-Polymerase	Life Technologies, Karlsruhe
	Quiagen, Hilden
Superscript TM II-Reverse-Transkriptase	Life Technologies, Karlsruhe

4.1.9 Nukleinsäuren

4.1.9.1 Plasmide

pACT2	Clontech, Palo Alto, CA, USA
pAS2-1	Clontech, Palo Alto, CA, USA
pBlueskript II SK+	Invitrogen, Leek, Niederlande
pcDNA3	Invitrogen, Leek, Niederlande
pcDNA3.1His-C	Invitrogen, Leek, Niederlande
pcDNA3.1Myc-His-C	Invitrogen, Leek, Niederlande
pCl-1	Clontech, Palo Alto, CA, USA
pEBG	B.J. Mayer Howard Hughes Medical Institute, Boston, MA, USA
pGAD	Clontech, Palo Alto, CA, USA
pGAD424	Clontech, Palo Alto, CA, USA
pGAD-GH	Clontech, Palo Alto, CA, USA
pGEX4T (1 und 2)	Amersham Pharmacia, Freiburg
pLAM5	Clontech, Palo Alto, CA, USA
pTD1	Clontech, Palo Alto, CA, USA
pVA3	Clontech, Palo Alto, CA, USA

4.1.9.2 Primer

Oligo dT-Primer und Primer RN1 bis RN14 stammen von GIBCO-BRL Life-Technologies, Karlsruhe; Primer RN15 bis RN29 von Metabion, Martinsried und Primer RN30 von MWG-Biotech AG, Ebersberg.

Name	Sequenz 5' → 3'	Verwendung
OligodT	dT ₁₂₋₁₈	Erststrangsynthese bei RT-PCR
RN1	CGGAATTCAAGCTGCCGTGC AGGCGC	5'-Mutageneseprimer für den zytoplasmatischen Schwanz von Muc18, Einfügen einer 5'-EcoRI-Schnittstelle
RN2	CGGGATCCTAATGCCTCAGA TCGATG	3'-Mutageneseprimer für den zytoplasmatischen Schwanz von Muc18, Einfügen einer 3'-BamHI-Schnittstelle
RN3	CGTTTTAAAACCTAAGAGTC	3'-Sequenzierprimer für Inserts in pAS2-1
RN4	TCATCGGAAGAGAGTAG	5'-Sequenzierprimer für Inserts in pAS2-1
RN5	GTGAACTTGCGGGGTTTTCA G	3'-Sequenzierprimer für pGAD10, pACT2, pGAD424 und pGAD-GH
RN6	GATGAAGATACCCACCAA CCC	5'-Sequenzierprimer für Inserts in pGAD10, pGAD424, pGAD-GH, pACT2

RN12	CGGAATTCAGGCGTGCGCCG GCTGCCGAG	5'-Mutageneseprimer für PHLDA1, Deletion des ersten ATGs durch EcoRI- Schnittstelle
RN13	GCGGATCCTTTCAGGCAGAG TTGGAGGTG	3'-Mutageneseprimer für PHLDA1, Einfügen 3'-BamHI-Schnittstelle
RN14	CCTCCAAAATCGGATCTG	5'-Sequenzierprimer für Inserts in pEBG, pGEX
RN18	CGGAATTCCTCCAAAGTTAAT GAGGCG	5'-Mutageneseprimer für PHLDA1, Einfügen einer 5'-EcoRI-Schnittstelle für Klonierung in pcDNA3.1 Myc-HisC
RN19	GCGGATCCAGGCAGAGTTGG AGGTG	3'-Mutageneseprimer für PHLDA1, Einfügen einer 3'-BamHI-Schnittstelle und Deletion des Stop Codons für Klonierung in pcDNA3.1 Myc-His C
RN20	CGGGATCCGAGATCTCTATG GCTTACC	5'-Mutageneseprimer für eIF3-p47, Einfügen einer 5'-BamHI-Schnittstelle für Klonierung in pEBG
RN21	GACTAGTAGACCAGCAAGTG TACTGC	3'-Mutageneseprimer für eIF3-p47, Einfügen einer 3'-SpeI-Schnittstelle für Klonierung in pEBG
RN22	GGGAGACCTGATACTCTC	3'-Sequenzierprimer für Inserts in pEBG
RN23	TAGAAGGCACAGTCGAGG	3'-Sequenzierprimer für Inserts in pcDNA3, pcDNA3.1His und pcDNA3.1Myc-His
RN24	GACTAGTCAGTATCTACGATT CATAG	3'-Mutageneseprimer zur Klonierung von Inserts aus pACT2 in pEBG, Einfügen einer 3'-SpeI-Schnittstelle
RN25	CGGGATCCATTCGCGGCCGC GTCGAC	5'-Mutageneseprimer zur Klonierung von Inserts aus pACT2 in pEBG und Einfügen einer 5'-BamHI-Schnittstelle, Primer bindet in EcoRI-Adapter
RN26	GAGAATTCGAGCCAAGCGGC G	5'-Mutageneseprimer für PHLDA1, Einfügen einer 5'-EcoRI-Schnittstelle zur Klonierung des zweiten ATGs in pcDNA3.1 Myc-HisC, HisC, pGEX4T (1)
RN27	GAGCTGGTCGACTCAGGCAG AG	3'-Mutageneseprimer für PHLDA1, Einfügen einer 3'-SalI-Schnittstelle für pcDNA3.1 HisC, pGEX4T(1)
RN28	CGCGCGAGGCAGATCGTC	3'-Sequenzierprimer für Inserts in pGEX

Doxorubicin	Sigma, Deisenhofen
Cycloheximide	Sigma, Deisenhofen
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
N, N'-Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
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
Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren	Difco, Detroit, MI, USA
HEPES	Sigma, Deisenhofen
8-Hydroxychinolin	Sigma, Deisenhofen
Interleukin-6 (Il-6)	Roche (Boehringer), Mannheim
IPTG (Isopropylthiogalactoside)	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumazetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Laurlulfat (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
MTT (3-(4,5,-dimethylthiazol-2-yl)-2,3-diphenyltetrazolium bromide)	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
Trypton	Difco, Detroit, MI; USA
Tween-20	Sigma, Deisenhofen
Wasserstoffperoxid, 30%ig	Merck, Darmstadt
X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-Galactosid)	Roth, Karlsruhe
Xylenocyanol	Sigma, Deisenhofen
Zitronensäure	Sigma, Deisenhofen

4.1.13 Kommerzielle Analysensysteme und vorgefertigte Lösungen

Apoptosis Detection Kit-Annexin V-FITC [®]	Pharmigen, San Diego, CA, USA
Chemolumineszenz-Reagenz <i>Renaissance</i> [®]	NEN [™] , Boston, MA, USA
Complete [™] Mini Protease-Inhibitor-Tabletten	Roche (Boehringer), Mannheim
DC-protein kit (Protein-Assay nach Lowry)	Biorad, München
DMEN-Medium	Life Technologies, Karlsruhe
ECL [™] Western-Blotting Substrat	Amersham Pharmacia, Freiburg
Fix & Perm [™] Cell Permeabilisation Kit	Caltag, Hamburg
FuGENE [™] 6 Transfections Reagenz	Roche (Boehringer), Mannheim
Gutathion Sepharose 4B	Amersham Pharmacia, Freiburg
Hämatoxylinlösung	Sigma, Deisenhofen
In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein [®]	Roche (Boehringer), Mannheim

JETstar™ Plasmid Purification System	Genomed, Bad Oeyenhausen
JETsorb™ DNA Isolierungskit	Genomed, Bad Oeyenhausen
JETquick™ <i>spin column</i> -Säulen	Genomed, Bad Oeyenhausen
Kaisers Glyzeringelatine	Merck, Darmstadt
mAb-Based Mouse Ig Isotyping Kit	Pharmigen, San Diego, CA, USA
Matchmaker Two-Hybrid System 2	Clontech, Palo Alto, CA, USA
Pretransformed Matchmaker yeast library	Clontech, Palo Alto, CA, USA
RNeasy™-Mini-Kit	Quiagen, Hilden
Roti-Blue® kolloidale Coomassie-Färbelösung	Roth, Karlsruhe
RPMI 1660-Medium	Biochrom-KG, Berlin
Talon™ Metal Affinity Resin	Clontech, Palo Alto, CA, USA
Tissue Freezing Medium	Leica, Bensheim

4.1.14 Verbrauchsmaterial

Dialyseschläuche	Roth, Karlsruhe
Eppendorf Reaktionsgefäße (1.5ml, 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Faltenfilter	GLW, Würzburg
Fettstift (DAKO-Pen)	Dako, Hamburg
Filterpapier	Schleicher & Schüll, Dassel
Glaskugeln 425-600 microns	Sigma, Deisenhofen
Kanülen	Braun, Melsungen
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Kulturflaschen 550 ml, 250ml	Greiner, Frickenhausen
25 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Kryoröhrchen 2 ml	Greiner, Frickenhausen
Lochplatten	
6-Loch	Costar, Cambridge, MA, USA
24-Loch	Greiner, Frickenhausen
96-Loch	Greiner, Frickenhausen
Nitrozellulosemembran BA85	Schleicher & Schüll, Dassel
Nitrozellulose-Dialysemembran (0,025 µm)	Millipore, Bedford, MA, USA
Objektträger und Deckgläser	Schleicher & Schüll, Dassel
Parafilm	Neeah, WI, USA
PCR-Reaktionsgefäße (0.2 ml)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, gestopft	Biozym, Hessisch Oldendorf
Plastikpetrischalen	Greiner, Frickenhausen
Röntgenfilm CEA X-Ray 90	Linhart, München
Spritzen	Becton&Dickenson, San Jose, CA, USA
Sterilfilter Minisat (0,2 µm)	Sartorius, Göttingen
Whatman 3mm Papier	GLW, Würzburg
Zahnstocher	Schlecker, München
Zentrifugenröhrchen	
50 ml (PP)	Greiner, Frickenhausen
14 ml (TC)	Greiner, Frickenhausen
15 ml (PP), 15 ml (PS)	Greiner, Frickenhausen

4.1.15 Geräte

Blotting-Apparatur (Western) <i>Trans-Blot™ Cell</i>	Biorad, München
Elektrophoresekammern	
Agarosegele	Amersham Pharmacia, Freiburg
Proteingele	Eigenbau Werkstatt Immunologie
ELISA-Reader (Victor 1420)	Wallach, Turku, Finnland
Filmentwicklergerät Airclean 200	Protec, Deutschland
Filmkassetten (Cevamatic)	Agfa-Gevaert, München
Fluorescence Activated Cell Scanner (FACS)	
FACscan und Facscalibur	Becton&Dickenson, San Jose, CA, USA
Geldokumentation	Intas, Göttingen
Gene-Pulser	BioRad, München
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschrank	Forma Scientific, Ohio, USA
Steri Cult 200	Heraeus, Hanau
B5060	Ehert, Emdingen
Trockeninkubator (30/37°C)	Heidolph, Kelheim
Magnetrührer	Leica, Bensheim
Microtom (Frigocut 2800)	Abimed, Düsseldorf
Mikropipetten (Gilson-Pipetman)	
Mikroskope	
Diavert	Leitz, München
Dialux 20	Leitz, München
Epifluoreszenzmiroskop DURAXA	Leica, Bensheim
Laborlux (Fluoreszenz)	Leitz, München
Mikrowelle	Siemens, München
Netzgeräte	
Electrophoresis Power Supply	Amersham Pharmacia, Freiburg
Labornetzgerät EA3003 Macrodrive 1	LKB, Uppsala, Schweden
Powersupply	Desaga, Heidelberg
Neubauer Zählkammer	Merck, Darmstadt
PCR-Gerät (Robocycler Gradient 96)	Stratagene, Heidelberg
pH-Elektrode	Ingold, Steinbach
pH-Meter PHM 62	Radiometer, Kopenhagen, DK
Fotoautomat für <i>Dialux 20</i> -Mikroskop	Wild, Heerbrugg, Schweiz
Fotometer	
Spektralfotometer U-3200	Hitachi, Tokio, Japan
Ultraspec 3000	Amersham Pharmacia, Freiburg
Rollmischer Mixer 5	Denley, GB
Schüttelinkubator	Infors AG, Bottmingen
CH-4103 (37°C)	Braun, Melsungen
Cetromat HK (30°C)	Büttner-Schilde-Haas AG, Bottmingen
Sterilwerkbank «Laminar Flow»	
Ultraschallgerät Branson Sonifier®	
Cell Disruptor B15	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
UV-Transilluminator	Bachofer, Reutlingen
UV-Stratalinker 2400	Stratagene, Heidelberg
Vortex-Genie	Scientific Instr., Hawthorne, NY, USA
Waagen	
Präzisionswaage HL32	Mettler, Gießen

Portable Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GLW, Würzburg
Zentrifugen	
Biofuge A	Heraeus Christ, Hanau
Minifuge 2	Heraeus Christ, Hanau
Rotixa RP	Hettich, Tuttlingen
Sorvall RC-5B	DuPont, Wilmington, DE, USA
Tischzentrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg
Zytospinzentrifuge (Shandon)	Astmoor, England

4.2 Medien

4.2.1 Zellkulturmedien für Mammalia-Zelllinien

Zellkulturmedium (Medium): RPMI 1640 supplementiert mit
 5% FCS (für einige Zelllinien 10%)
 1 mM Natriumpyruvat
 2 mM L-Glutamin
 100 U/ml Penicillin
 100 U/ml Streptomycin

PHLDA1-Transfektanten wurden in Zellkulturmedium mit 10% FCS und 1 mg/ml G418 gezüchtet.

Einfriermedium: RPMI 1640 supplementiert mit
 25% FCS
 20% DMSO
 1 mM Natriumpyruvat
 2 mM L-Glutamin
 100 U/ml Penicillin
 100 U/ml Streptomycin

HAT-Medium für Hybridome: RPMI 1640 supplementiert mit
 6×10^{-5} M Hypoxanthin
 $4,5 \times 10^{-7}$ M Aminopterin
 10^{-4} M Thymidin
 10% FCS
 300 U/ml rekombinantes Il6

PEG-6000: 1 g/ml in RPMI (serumfrei), 10 min im H₂O-Bad kochen

4.2.2 *S. cerevisiae*-Medien

YPD-Medium: 20 g/l Difco pepton
 10 g/l Hefeextrakt
 auf pH 5,8 einstellen, autoklavieren, nach Abkühlen
 auf ca. 60°C 50 ml 40%ige Glukoselösung zugeben

<u>YPD-Medium:</u>	YPD-Medium, 15 ml 0,2%ige Adenin-Hemisulfatlösung pro l zugeben	
<u>YPD-Platten:</u>	YPD-Medium und 20 g/l Agar, autoklavieren	
<u>YPD-Glyzerin:</u>	YPD-Medium mit 25% (m/v) Glyzerin, autoklavieren	
<u>SD-Medium:</u>	6,7 g/l Difco Hefe Nitrogen Base ohne Aminosäuren 20 g/l Agar (für Platten) mit H ₂ O auf 850 ml auffüllen, 100 ml der jeweiligen 10x Dropout AS-Lösung, pH auf 5,8 einstellen, autoklavieren, zufügen von 50 ml steriler 40%iger Glukoselösung	
<u>SD-Platten:</u>	SD-Medium und 20 g/l Agar, autoklavieren	
<u>10x-AS-Lösung für Selektionsmedium:</u>	L-Isoleucin	300 mg/l
	L-Valin	1500 mg/l
	L-Adenin Hemisulfat Salz	200 mg/l
	L-Arginin-HCl	200 mg/l
	L-Histidin HCl monohydrat	200 mg/l
	L-Leucin	1000 mg/l
	L-Lysin-HCl	300 mg/l
	L-Methionin	200 mg/l
	L-Phenylalanin	500 mg/l
	L-Treonin	2000 mg/l
	L-Tryptophan	200 mg/l
	L-Tyrosin	300 mg/l
	L-Uracil	200 mg/l
	mit H ₂ O auf 1l auffüllen und autoklavieren. Um z.B. SD ^{-L-W} herzustellen: 10x AS-Lösung (<i>dropout solution</i>) ohne die Aminosäuren Leucin und Tryptophan herstellen	

4.2.3 *E. coli*-Medien

<u>LB-Medium:</u>	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl autoklavieren
<u>LB-Agar-Platten:</u>	LB-Medium und 15 g/l Bacto Agar, autoklavieren
<u>LB-Glyzerin:</u>	LB-Medium und 30% (m/v) Glyzerin, autoklavieren

Antibiotikahaltige Medien wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 60°C mit den entsprechenden Antibiotika versetzt: Ampicillin wurde in einer Endkonzentration von 100 µg/ml und Chloramphenicol von 34 µg/ml eingesetzt.

4.3 Allgemeine Puffer und Lösungen

<u>Adenin-Hemisulfatlösung:</u>	2 g/l Adenin-Hemisulfat-Salz, autoklavieren
<u>aggregiertes humanes IgG:</u>	1 mg/ml in H ₂ O lösen 45 min bei 60°C erhitzen, aliquotieren und bei -20°C lagern
<u>Ampicillinlösung:</u>	100 mg/ml Ampicillin in H ₂ O, sterilfiltriert
<u>Antifade:</u>	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
<u>Auftragspuffer DNA:</u>	50% (m/v) Glycerin 0,4% (m/v) Bromphenolblau 0,4% (m/v) Xylencyanol in TE
<u>Auftragspuffer Protein (6x):</u>	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>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 ₃ 3 mM Na ₂ CO ₃ 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-Ethylcarbazol) 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 ₂ O auffüllen, 20µl H ₂ O ₂ , frisch herstellen
<u>Coomassie-Färbung: Fixierlösung:</u>	158 ml H ₂ O 2 ml Orthophosphorsäure 40 ml Methanol

<u>Färbelösung:</u>	120 ml H ₂ O 40 ml Methanol 40 ml <i>Roti-Blue</i> [®]
<u>Entfärbelösung:</u>	50 ml Methanol 150 ml H ₂ O
<u>Chloramphenicol</u> lösung:	34 mg/ml in EtOH, bei -20°C lagern
<u>EDTA-PBS:</u>	1 mM Na ₂ -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>Hefe-Lysepuffer für DNA:</u>	100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 1,0 mM EDTA 2% (m/v) Triton X-100 autoklavieren
<u>Hefe-Lysepuffer für Protein:</u>	8 M Harnstoff 5% (m/v) SDS 40 mM Tris-HCl pH 6,8 0,1 mM EDTA 0,4 mg/ml Bromphenolblau, autoklavieren
<u>Heringsperma-DNA:</u>	10 mg/ml Heringsperma-DNA TypIII-Natriumsalz in H ₂ O über Nacht bei RT lösen, DNA durch 20x aufziehen durch eine 18er-Kanüle scheren 10 min bei 100°C denaturieren, aliquotieren, bei -20°C aufbewahren, vor Gebrauch 5 min bei 95°C erhitzen
<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>Lysepuffer MTT-Elisa:</u>	15% (m/v) SDS 15 mM HCl
<u>Lysozymlösung:</u>	10 mg/ml Lysozym 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 in H ₂ O

<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> TM -Proteaseinhibitor- tablette/10ml Lysepuffer zugeben
<u>MTT-Medium:</u>	1 mg/ml MTT in Zellkulturmedium
<u>MTT-Stocklösung:</u>	5 mg/ml MTT in PBS, im Dunkeln bei 4°C lagern
<u>Na-Azetat pH 5,2:</u>	408,01 g NaCH ₃ OOx3H ₂ O, auf 800 ml mit H ₂ O auffüllen mit 100% CH ₃ OOH pH 5,2 einstellen, auf 1 l auffüllen, autoklavieren
<u>PBS pH 7,2:</u>	2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl 8 mM Na ₂ HPO ₄
<u>50% (m/v) PEG-4000:</u>	500 g/l, autoklavieren
<u>PEG-Lithium-Azetatlösung:</u>	8 ml 50% (m/v) PEG 1 ml 10xTE 1 ml 10xLiAz, frisch herstellen
<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), ca. 7 Tage bei 4°C aufbewahrbar
<u>Propidiumjodidfärbelösung:</u>	0,5 ml Propidiumjodidlösung (20x) RNaseA 1 mg/ml Endkonzentration (100 U/ml) 9,5 ml Glukose-PBS
<u>Propidiumjodidlösung (20x):</u>	Propidiumjodidstocklösung (1 mg/ml) 50 mg Propidiumjodid in 50 ml H ₂ O, sterilfiltrieren, in Aluminiumfolie einwickeln und bei 4°C aufbewahren
<u>RNase-A-Lösung:</u>	10 mg/ml RNase A in H ₂ 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 ₂ -EDTA

	5% (v/v) Triton X-100 in H ₂ 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 ₂ O ₂ , 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>TE-LiAz: (Hefe-Transformation)</u>	10 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM LiAz, pH 7,5 frisch herstellen
<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>X-Gal-Lösung:</u>	20 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β- galactopyranoside (X-Gal) in DMSO, im Dunkeln bei -20°C lagern
<u>Zitrat-Puffer (0,1M, pH 5,0)</u>	65 ml 1 M Natriumzitratlösung 35 ml 1 M Zitronensäure
<u>Z-Puffer:</u>	16,1 g/l Na ₂ HPO ₄ 5,5 g/l NH ₂ PO ₄ 0,75 g/l KCl 0,246 g/l MgSO ₄ pH auf 7,0 einstellen und autoklavieren
<u>Z-Puffer/X-Gal-Lösung:</u>	100 ml Z-Puffer 0,27 ml β-Mercaptoethanol 1,67 ml X-Gal Lösung

5 Methoden

5.1 Arbeiten mit menschlichem Gewebe

5.1.1 Herstellung von Gewebeschnitten

Die menschlichen Gewebeproben (siehe Kap. 4.1.1) wurden von der Lagerung bei -80°C in den Kryostaten bei -30°C überführt und mit *tissue freezing medium* eingebettet. Es wurden $5\ \mu\text{m}$ dicke, serielle Schnitte angefertigt, auf Objektträger gezogen und über Nacht bei RT getrocknet. Eine weitere Lagerung der Gefrierschnitte ist bei -80°C möglich.

5.2 Arbeiten mit Zelllinien

5.2.1 Zellkultur

Säugerzelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C , 6% CO_2 und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Zellkulturmedium (siehe Kap. 4.2.1) wurde soweit nicht anders vermerkt mit 5% FCS supplementiert. Das FCS wurde vor Anwendung 30 min bei 56°C erhitzt, um die Komplementproteine zu inaktivieren. Alle Arbeiten erfolgten unter einer Sterilbank. Die verwendeten Lösungen wurden autoklaviert oder durch $0,2\ \mu\text{m}$ Filter sterilfiltriert. Zum Ablösen adhären-wachsender Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für ca. 10 min bei 37°C im Inkubator mit soviel 1 mM EDTA-PBS-Lösung (siehe Kap. 4.3) überschichtet, dass der gesamte Boden der Kulturflasche leicht bedeckt war. Nach der Inkubation wurden die Zellen durch leichtes Klopfen abgelöst und anschließend 7 min bei 400 g und Raumtemperatur abzentrifugiert.

5.2.2 Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen

Zur Kryokonservierung wurden ca. 5×10^6 Zellen 7 min bei 400 g abzentrifugiert, in 0,75 ml Medium resuspendiert und mit 0,75 ml Einfriermedium (siehe Kap. 4.2.1) versetzt und in 2 ml Kryoröhrchen mit Schraubdeckel überführt. Der Einfriervorgang soll möglichst langsam erfolgen, um das Auskristallisieren von Zellflüssigkeit zu vermeiden. Deshalb wurden die Kryoröhrchen mit Papier umwickelt und bei -80°C für 1-2 Tage eingefroren und anschließend zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff bei -196°C überführt.

Das Auftauen soll dagegen schnell durchgeführt werden. Die Kryoröhrchen mit den Zellen wurden im 37°C Wasserbad aufgetaut bis nur noch ein kleiner Eisklumpen vorhanden war

und dann auf 5 ml vorgewärmtes (37°C) Medium getropft. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in frischem Medium aufgenommen und in Zellkulturflaschen überführt.

5.2.3 Stimulation der Zellen mit Phorbolster

PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Azetat) ist ein Phorbolster, 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.

5×10^6 Zellen wurden in 75 cm² Kulturflaschen ausgesät und nach 24 h mit PMA-Lösung (siehe Kap. 4.3) in einer Endkonzentration von 10 ng/ml versetzt. Die Effekte der Stimulation wurden nach 4-48 h bestimmt.

5.2.4 Transfektion von Säugerzellen in der Zellkultur

Sowohl transiente als auch stabile Transfektionen wurden mit dem nicht liposomalen Transfektionsreagenz *FuGENE*TM6 durchgeführt. Die transfizierten Plasmide waren, falls nicht anders erwähnt, pcDNA3 und Derivate. Sie tragen den menschlichen Zytomegalovirus *immediate early promotor* für eine starke, konstitutive Expression des klonierten Gens, das SV40-Polyadenylierungssignal für eine effiziente Transkriptionstermination und Polyadenylierung der mRNA und ein Neomycin-Resistenzgen (G418) zur Selektion in stabilen Transfektanten.

5.2.4.1 Transiente Transfektionen

In einer 75 cm² Kulturflasche wurden ca. 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen ausgesät, sodass die Zellen nach 24 h Inkubation im Brutschrank ca. 60-80% konfluent waren. Pro Ansatz wurde 20 µl *FuGENE*TM6 auf 970 µl Medium ohne FCS getropft und 5 min bei RT inkubiert. Die Mischung wurde auf 10 µg der zu transfizierenden DNA (1 mg/ml) getropft und 15 min bei RT inkubiert. Bei der Kotransfektion von zwei verschiedenen Plasmiden wurde von jedem Plasmid 10 µg DNA und 40 µl *FuGENE*TM6 verwendet. Der *FuGENE*TM6-DNA-Komplex wurde dann direkt zu den Zellen ins Medium gegeben. Die Expression des transfizierten Gens ist zeitlich begrenzt, da die Plasmide nicht in den eukaryontischen Zellen replizieren und wurde deshalb nach 4 h bis 48 h untersucht.

5.2.4.2 Stabile PHLDA1-Transfektanten

$2,5 \times 10^5$ der zu transfizierenden Zellen wurden in einer 25 cm^2 Kulturflasche ausplattiert, sodass die Zellen nach 24 h ca. 60-80% konfluent wuchsen. Pro Ansatz wurden $10 \mu\text{l}$ *FuGENE*TM6 auf $87 \mu\text{l}$ RPMI-Medium ohne FCS getropft und 5 min bei RT inkubiert. Die Mischung wurde auf $3 \mu\text{g}$ der zu transfizierende DNA getropft und 15 min bei RT inkubiert (siehe auch Kap. 4.1.3 für die für die verwendeten Plasmide bei den PHLDA1-Transfektanten). Der *FuGENE*TM6-DNA-Komplex wurde dann direkt zu den Zellen ins Medium gegeben. Die Zellen wurden in Zellkulturmedium mit 10% FCS inkubiert. Nach 48 h wurde dem Medium 1 mg/ml G418 zugesetzt.

Die Expression des Resistenzgenes bedeutet nicht zwangsläufig, dass auch das gewünschte Gen exprimiert wird. So kann das Gen oder sein Promotor möglicherweise durch die Rekombination ins Zellgenom deletiert oder inaktiviert werden kann. Deshalb wurde die Expression von PHLDA1 in den stabilen PHLDA1-Transfektanten mit Hilfe der Immunfluoreszenz überprüft. Je 200 Zellen jeder Transfektante wurden auf eine 96-Loch-Platte ausplattiert. Alle Löcher wurden regelmäßig mit dem Mikroskop auf Bildung von Klonen überprüft und Löcher mit mehr als einem Klon verworfen. Die Zellen von einzelnen Klonen wurden zunächst in 24-Lochplatten und anschließend in 6-Lochplatten überführt. Zellen aus diesen Platten wurden auf PHLDA1-Expression mit Hilfe der zytoplasmatischen Immunfluoreszenz (siehe Kap. 5.7.3.2) überprüft.

5.2.5 Wachstumskurven und MTT-Elisa

Um eine Wachstumskinetik der verschiedenen Transfektanten zu bestimmen, wurden die Zellen einen Tag vor Beginn des Experimentes gesplittet, sodass sie nach 24 h ca. 60-80% konfluent wuchsen. Die Zellen wurden mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Von jeder Transfektante wurden 1×10^4 Zellen in $200 \mu\text{l}$ Zellkulturmedium (siehe Kap. 4.2.1) pro Loch einer 96-Lochplatte ausplattiert. Für jede Transfektante wurde dies in Vierfachbestimmung durchgeführt und für jeden Messtag (in der Regel 5 Tage) wurde eine ELISA-Platte hergestellt. Nicht verwendete Löcher der 96-Lochplatte wurden mit je $200 \mu\text{l}$ Medium aufgefüllt.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte über einen MTT-ELISA (Mosmann, 1983). Das NADPH in den lebenden Zellen reduziert in diesem Assay das gelbe MTT-Substat zu unlöslichem violettem Formazan. Die Platten für Tag 0 wurden 5 min bei 75 g abzentrifugiert, da sich zu Beginn des Experimentes noch nicht alle Zellen abgesetzt

hatten. Bei allen Platten wurde das Medium abgesaugt, 100 µl MTT-Medium (siehe Kap. 4.3) pro Loch zugegeben und die Zellen für 4 h im Inkubator wachsen gelassen. Anschließend wurden 100 µl MTT-Lysispuffer (siehe Kap. 4.3) hinzugegeben um die Zellen über Nacht im Dunkeln bei RT zu lysieren. Die Auswertung erfolgte durch Bestimmung der OD im ELISA-Messgerät bei 570 nm. Von den Messwerten der Zellen wurde der Nullwert (Mittel der OD-Werte in den Löchern ohne Zellen) subtrahiert und aus der Vierfachbestimmung die Standardabweichung bestimmt.

5.2.6 Kolonie-Formations-Assay

Die Fähigkeit der Transfektanten Kolonien zu bilden, wurde im Kolonie-Formations-Assay bestimmt. Dazu wurden pro Transfektante 300 Zellen in 3 ml Zellkulturmedium in einem Loch einer 6-Lochplatte ausplattiert. Nach 16 Tagen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen 15 min in 70% Methanol fixiert und anschließend in 0,1% Kristallviolett-70% Methanol gefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde mit H₂O ausgewaschen. Die Platten wurden fotografiert und die Anzahl der Klone ausgezählt. Aus der Dreifachbestimmung wurde die Standardabweichung ermittelt.

5.2.7 Klonierungseffizienz

Zur Bestimmung der Klonierungseffizienz wurden in Dreifachansätzen je 100 Zellen der jeweiligen Transfektante in 10 ml Zellkulturmedium auf einer 96-Lochplatte verteilt und für 10 Tage im Inkubator wachsen gelassen. Die Löcher in denen je ein Klon gewachsen war, wurden gezählt und aus dem Dreifachansatz die Standardabweichung ermittelt.

5.2.8 Herstellung von Zytospinpräparaten

Mit einer Zytospinzentrifuge können Zellen aus einer Suspension auf einem Objektträger fixiert werden, um sie anschließend immunhistochemisch (siehe Kap. 5.7.2) zu untersuchen. Dazu werden die Zellen in PBS gewaschen, mit der Neubauer-Zählkammer gezählt und auf 5×10^4 Zellen/ml PBS eingestellt. Jeweils 100 µl dieser Suspension wurden mit der Zytospinzentrifuge 5 min mit 35 g auf Objektträger übertragen. Die Zytospins wurden über Nacht bei RT getrocknet und können dann für Immunhistochemie verwendet werden oder weiter bei -80°C gelagert werden.

5.3 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

5.3.1 Kultivierung von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae wurde auf Festmedium unter aeroben Bedingungen bei 30°C kultiviert. Animpfung von Übernachts-Flüssigkulturen erfolgte von der -80°C Glyzerinkultur oder von den Kulturplatten mit einer sterilen Glaspipette, inkubiert wurde auf dem Schüttelinkubator bei 220 Upm und 30°C unter aeroben Bedingungen. Für nicht transformierte Stämme wurde das Vollmedium YPD (siehe Kap. 4.2.2), für transformierte Stämme das jeweilige Selektionsmedium (SD-Medium, *synthetic dropout*, siehe Kap. 4.2.2) verwendet. Den SD-Medien, oder Mangelmedien fehlt jeweils eine bestimmte, für die Hefe essentielle Aminosäure, die durch das Genprodukt auf dem transformierten Plasmid synthetisiert werden kann. Auf Platten können die Hefestämme ca. 4 Wochen bei 4°C gelagert werden, dann müssen sie mit Hilfe einer sterilen Glaspipette auf frischen Platten ausgestrichen werden. Für eine Langzeitlagerung werden die Stämme in YPD mit 25% Glyzerin bei -80°C aufbewahrt.

5.3.2 Transformation von Plasmid-DNA in *S. cerevisiae*

Um Plasmide mit Auxotrophiemarkern in Hefe zu transformieren, wurden diese zuerst mit einer Lithium-Azetat-Methode (Ito *et al.*, 1983), modifiziert nach (Schiestl und Gietz, 1989) und (Gietz *et al.*, 1992) kompetent gemacht. Die Plasmid-DNA wird mit Hilfe von Transporter-DNA (*carrier-DNA*), Polyethylenglykol, DMSO und einem Hitzeschock von den Hefezellen aufgenommen. Die Selektion auf den bzw. die Auxotrophiemarker (essentielle Gene für die Biosynthese einer bestimmten AS) erfolgt in SD-Medium.

Folgendes Protokoll wurde verwendet, wenn ein oder zwei verschiedene Plasmide in Hefe transformiert werden sollten und einige Hundert Kolonien auf der Transformationsplatte ausreichend waren. Für die Genbank-Transformation (*library transformation*) im *yeast two hybrid screen* wurde das gleiche Protokoll mit anderen Mengen verwendet, die Mengen sind in Klammern und kursiv angegeben. Es wurden 2-3 frisch gewachsene Hefekolonien mit einem Durchmesser von jeweils 2-3 mm mit einem sterilen Zahnstocher von der Kulturplatte gekratzt, in 1 ml YPD-Medium resuspendiert und 2-3 min gevortext. Damit wurden 50 ml [*150 ml*] YPD-Medium angeimpft und 16-18 h bei 220 Upm und 30°C inkubiert. Die OD₆₀₀ sollte dann größer 1,5 sein. Mit ca. 20-30 ml [*500 ml*] dieser Zellsuspension wurden 300 ml [*1000 ml*] YPD angeimpft, sodass die OD₆₀₀ 0,2 bis 0,3

betrug. Nun wurde ca. 3-4 h bei 30°C und 200 Upm inkubiert, damit eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 erreicht wurde. Die Zellen wurden dann bei RT und 1000 g für 5 min abzentrifugiert und in 1,5 ml [8 ml] Lithiumazetatpuffer (siehe Kap. 4.3) resuspendiert. 100 ng jeder zu transformierenden Plasmid-DNA [1,0 mg DNA-BD Vektor und 500 µg AD-Vektor für die library transformation] wurde mit 100 µg [20 mg] Herings-Sperma-DNA gemischt, zu 100 µl [8 ml] der kompetenten Hefezellen gegeben und gut gemischt. Es wurden 600 µl [60 ml] der PEG-Lithiumazetatlösung (siehe Kap. 4.3) hinzugegeben, gevortext und 30 min bei 30°C und 200 Upm inkubiert. Anschließend wurde DMSO zu einer Endkonzentration von 10% (70-80 µl) [7-8 ml] zugesetzt und die Zellen zum Hitzeschock 15 min im Wasserbad bei 42°C inkubiert und gelegentlich geschwenkt. Der Hitzeschock wurde durch 1 bis 2 min Inkubation auf Eis beendet, die Zellen 5 min bei 500 g abzentrifugiert und in 500 µl [10 ml] TE pH 7,5 resuspendiert. Je 100 µl [250 µl] wurden pro 96 mm auf eine SD^{-L,-W}-Mediumplatte (siehe 4.2.2) [für die library transformation 150 mm SD^{-Ade,-L,-W,-H}-Mediumplatten] pipettiert, mit 5-10 [10-20] sterilen Glaskugeln (4 mm Durchmesser) versetzt und zur gleichmäßigen Ausplattierung einige Minuten geschwenkt.

5.3.3 *Yeast two hybrid screen*

Mit der *yeast two hybrid*-Methode können Protein-Protein-Interaktionen nachgewiesen werden (Fields und Song, 1989; Chien *et al.*, 1991; Bartel *et al.*, 1993). Die Methode beruht auf dem modulären Charakter von eukaryontischen Transkriptionsfaktoren, die aus einer funktionell unabhängigen DNA-Bindedomäne (DNA-BD) und einer funktionell unabhängigen Aktivierungsdomäne (AD) bestehen. Die AD interagiert direkt mit der basalen Transkriptionsmaschinerie und plaziert die RNA-Polymerase an die TATA-Box vor den Transkriptionsstartpunkt des jeweiligen Gens. Die *yeast two hybrid*-Methode kann zur Bestätigung der Interaktion zweier bekannter Proteine oder zur Identifikation eines bisher unbekanntes Partners im *yeast two hybrid screen* verwendet werden. In dieser Arbeit wurde nach bisher unbekanntes Interaktionspartnern von PHLDA1 im *yeast two hybrid screen* gesucht.

5.3.3.1 *Vorarbeiten für den yeast two hybrid screen*

Zuerst wurden verschiedene Konstrukte des offenen Leserahmens von PHLDA1 C-terminal im Leserahmen an die Gal4-DNA-BD kloniert (siehe Kap. 5.5.7.1 und Abb. 5.1), in den Hefestamm Y190 transformiert (siehe Kap. 5.3.2) und die Expression des

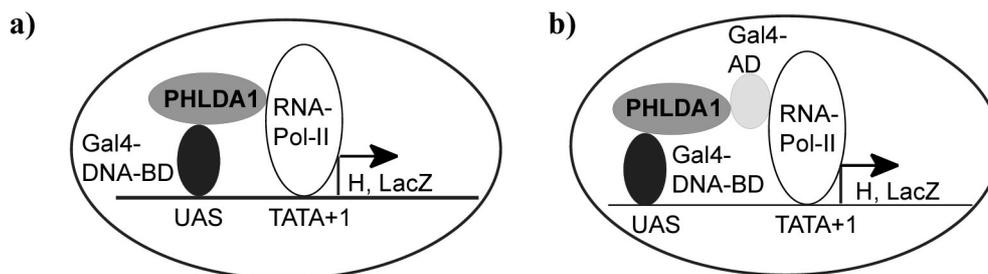


Abb. 5.2 Aktiviert Gal4-DNA-BD-PHLDA1 die Transkription ohne Interaktion mit einem anderen Protein? a) mögliche Interaktion von PHLDA1 mit der RNA-Polymerase-II (RNA-Pol-II) oder b) der Gal4-Aktivierungsdomäne (Gal4-AD). UAS, *upstream activation sequence*; BD, Bindedomäne; H, Reportergene für den Auxotrophiemarker Histidin; LacZ, Reportergene für β -Galactosidase

Zur Bestimmung der autonomen Aktivierung wurde das *bait* Gal4-PHLDA1 in den Hefestamm Y187 alleine sowie mit dem Vektor Gal4-BD transformiert und auf $SD^{-W,-H}$ - bzw. $SD^{-L,-W,-H}$ -Platten ausplattiert. Für den Kreuzungsscreen wurde Gal4-PHLDA1 sowie einige Verkürzungen in den Hefestamm PJ69-2A transformiert und auf $SD^{-W,-H}$ - und $SD^{-Ade,-W}$ -Platten ausplattiert. Außerdem wurden die *bait*s in PJ69-2A mit dem Hefestamm Y187 gekreuzt, der mit der Gal4-AD transformiert war und auf $SD^{-Ade,-L,-W,-H}$ ausplattiert. Alle Transfektanten bzw. Kreuzungen wurden zusätzlich auf Platten ausplattiert, die nur auf die transformierten Plasmide selektionieren. Die Platten wurde 3 bis 14 Tage bei 30°C inkubiert und regelmäßig auf Wachstum geprüft.

5.3.3.3 Ablauf des yeast two hybrid screens

Hier ist die Vorgehensweise des eigentlichen *yeast two hybrid screen* in einem Flußdiagramm dargestellt und auf die Protokolle der einzelnen Methoden verwiesen.

1. Transformation der Plasmide
 - a) Kotransformation des DNA-BD-Plasmids (Gal4-PHLDA1-L) (*bait*) und des Genbank-AD-Plasmid in Hefestamm Y190 (siehe Kap. 5.3.2 und Abb. 5.3)
 - b) einzelne Transformation des *bait*-Plasmids in Hefestamm PJ69-2A und Kreuzung mit dem Stamm, der die Plasmide der menschlichen Genbank (Y187) enthält (siehe Kap. 5.3.3.4 und Abb. 5.4)



2. Ausplattieren auf Selektionsmedium ($SD^{-L,-W,-H}$ bzw. $SD^{-Ade,-L,-W,-H}$ für den *mating screen*) insgesamt auf 60 Mediumplatten (150 mm Durchmesser), d.h. ca. $2,5 \times 10^4$ - 5×10^4 Kolonien/Platte

↓ 5 Tage bis 3 Wochen Inkubation bei 30°C

3. Berechnung der Transformations- bzw. Kreuzungseffizienz (siehe Kap. 5.3.3.6 bzw. Kap. 5.3.3.5)

↓

4. Vereinzeln der Klone auf neuem Selektionsmedium

↓ 5 Tage Inkubation bei 30°C

5. LacZ-Filterassay zur Bestätigung einer positiven Interaktion (siehe Kap. 5.3.3.7)

↓

6. Isolierung der Plasmid-DNA aus Hefe (siehe Kap. 5.5.2.4)

a) Identifizierung der Anzahl der Plasmide und der Größe der bzw. des Inserts mit der PCR (siehe Kap. 5.5.3)

b) Transformation in *E. coli* zur Amplifikation der Plasmid-DNA (siehe Kap. 5.4.2.2)

↓

7. Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* (siehe Kap. 5.5.2.4), Restriktionsverdau zur Analyse der Inserts

↓

8. Retransformation der Library-Plasmide in *S. cerevisiae*

a) Gal4-DNA-BD-PHLDA1 (bait) + Library-Plasmid

b) Gal4-DNA-BD + Library-Plasmid

c) Gal4-DNA-BD-unspezifisches Protein + Library-Plasmid

↓ 5 Tage bis 3 Wochen Inkubation bei 30°C

9. Die "richtig positiven" Klone sollten nur bei Retransformation 8. a) auf Selektionsmedium $SD^{-L,-W,-H}$ bzw. $SD^{-Ade,-L,-W,-H}$ für den Kreuzungsscreen wachsen.

↓

10. Sequenzierung der positiven Klone

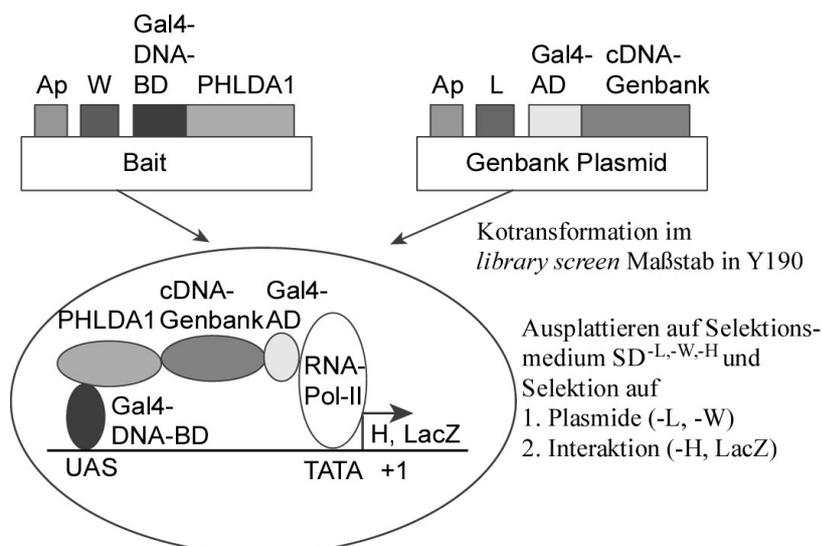


Abb. 5.3 Schema des yeast two hybrid screens Dargestellt sind *bait*- und *library*-Plasmide sowie die transformierte Hefezelle als Oval, nachdem sie die auf den Plasmiden codierten Gene exprimiert. Ap, Ampicillin Selektionsmarker für *E. coli*; W, Auxotrophiemarker für Tryptophan in Hefe; L, Auxotrophiemarker für Leucin in Hefe; H, Auxotrophiereporter gen für Histidin; LacZ, Reportergen für β -Galactosidase; BD, Bindedomäne; AD, Aktivierungsdomäne; UAS, *upstream activation sequence*; TATA, TATA-Box bzw. Bindestelle für die RNA-Pol-II

5.3.3.4 Kreuzung von *S. Cerevisiae* im yeast two hybrid screen

Eine andere, wesentlich weniger arbeitsintensive Möglichkeit verschiedene Plasmide in Hefe einzuschleusen, ist durch Kreuzung der Hefe. Dies wird vor allem zum Einbringen zweier verschiedener Plasmide in einen Hefestamm verwendet und eignet sich wegen der reproduzierbaren Kreuzungseffizienz besonders gut für den *yeast two hybrid screen*. Dazu muß jeweils das eine Plasmid in einem Stamm des Kreuzungstyps α (*mating type*) und das andere Plasmid im Stamm des Kreuzungstyps α vortransformiert werden, wozu der kleine Ansatz der Transformation (siehe Kap. 5.3.2) ausreicht. Unter geeigneten Bedingungen fusionieren die Hefestämme und beide Plasmide liegen dann in der diploiden Hefe vor (siehe Abb. 5.4).

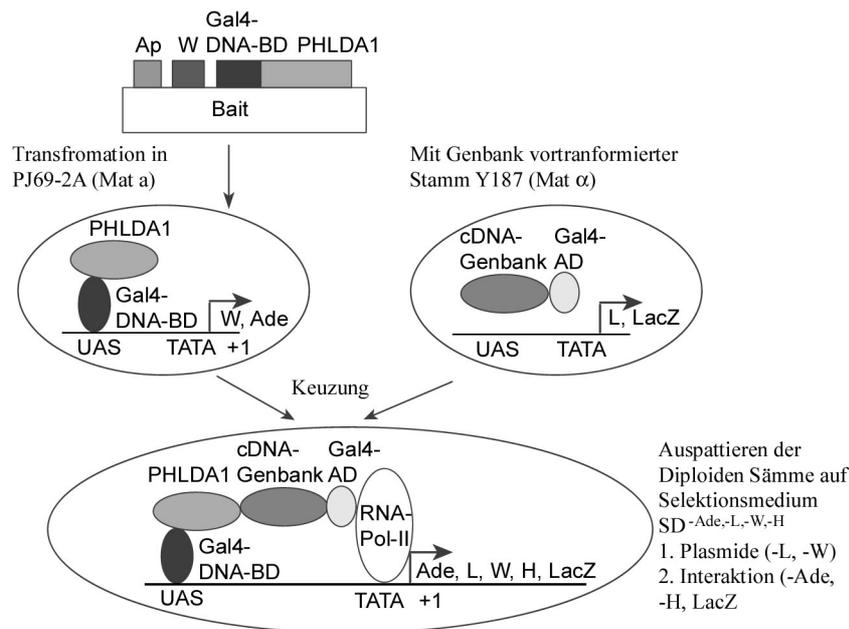


Abb. 5.4 Schema des yeast two hybrid mating screens. Dargestellt ist das *bait*-Plasmid sowie die transformierten Hefezellen als Ovale, nachdem sie die auf den Plasmiden codierten Gene exprimieren. Ap, Ampicillin Selektionsmarker für *E. coli*; Ade, Auxotrophiereportergen für Adenin; L, Auxotrophiemarker für Leucin in Hefe; W, Auxotrophiemarker für Tryptophan in Hefe; H, Auxotrophiereportergen für Histidin; LacZ, Reportergen für β -Galactosidase; BD, Bindedomäne; AD, Aktivierungsdomäne; UAS, *upstream activation sequence*; TATA, TATA-Box bzw. Bindestelle für die RNA-Pol-II.

Das DNA-BD-Plasmid (Gal4-PHLDA1, oder *bait*) wurde in den Hefestamm PJ69-2A (Kreuzungsloкус a) transformiert. Dieser Stamm enthält zwei Auxotrophiereportergene für Transkriptionsaktivierung, das Adenin- und das Histidingen, sodass die Wachstumsselektion auf eine Interaktion sehr stringent war. Als weiteres Reportergen für einen Transkriptionsaktivierung enthält es noch das LacZ-Gen.

50 ml SD^{-W} -Medium wurde mit 2-3 Kolonien dieses transfizierten Stammes angeimpft und über Nacht bei 30°C im Schüttler bei 220 Upm inkubiert, sodass die OD_{600} 0,8 bis 1,0 betrug. Die Zellen wurden 5 min bei RT und 1000 g abzentrifugiert und in 2 ml SD^{-W} -Medium resuspendiert. Ein 1 ml Aliquot der vortransformierten Genbank (menschliche cDNA-Library aus Gehirngewebe) in Hefestamm Y187 (Kreuzungsloкус α) wurde auf Eis aufgetaut. Davon wurden 10 μ l zur Bestimmung des Genbank-Titers entnommen und auf Eis gelagert. Die restlichen Zellen der Genbank wurden mit den Zellen der Übernachtskultur (*bait*) in 50 ml YPDA (Kanamycin 10 mg/ml) 20-24 h bei 30°C und leichtem Schwenken (40 Upm) inkubiert. Das Fusionieren der Hefezellen konnte im Phasenkontrastmikroskop mit 400-facher Vergrößerung beobachtet werden, die gerade

fusionierten diploiden Zellen hatten eine Y-ähnliche Struktur. Die Zellen wurden 5 min bei 1000 g und RT abzentrifugiert, zweimal mit YPDA-Medium gewaschen und in 10 ml YPDA-Medium aufgenommen. Das Gesamtvolumen wurde bestimmt, 100 µl zur Bestimmung der Kreuzungseffizienz entnommen und die restlichen Zellen in jeweils 250 µl auf SD^{-Ade,-L,-W,-H}-Platten ausplattiert.

5.3.3.5 Bestimmung der Kreuzungseffizienz und der Anzahl der gescreenten Klone

Von der Suspension der gekreuzten Stämme wurden jeweils 100 µl einer 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 Verdünnung auf SD^{-W}; SD^{-L} und SD^{-L,-W}-Platten ausplattiert, einige Tage bei 30°C inkubiert und die Anzahl der Klone (cfu) gezählt. Dann wurde für jedes Plasmid auf der jeweiligen Selektionsplatte die „Vivability“ bestimmt, d.h. die Anzahl an lebenden Zellen/ml. Sie errechnet sich aus:

$$\frac{\text{cfu} \times 1000 \text{ } \mu\text{l/ml}}{\text{ausplattiertes Volumen (}\mu\text{l)} \times \text{Verdünnungsfaktor}}$$

Dabei ist die „Vivability“ für den Y187-Stamm (Genbank-Plasmid) die cfu/ml auf SD^{-L}-Platte, für den Stamm PJ69-2A (PHLDA1-Plasmid) die cfu/ml auf der SD^{-W}-Platte und die „Vivability“ der Diploiden die cfu/ml auf der SD^{-L,-W}-Platte. Von den beiden Kreuzungspartnern ist derjenige mit der geringeren cfu der limitierende Partner. Die Kreuzungseffizienz in % diploider Zellen errechnet sich dann aus:

$$\frac{\text{cfu/ml diploide Zellen} \times 100}{\text{cfu/ml des limitierenden Partners}}$$

Daraus ergibt sich: Anzahl der gescreenten Klone = cfu/ml Diploide x resuspendiertem Volumen.

5.3.3.6 Bestimmung der Transformationseffizienz und Anzahl der gescreenten Klone

Um bei der Genbank-Transformation die Anzahl der gescreenten Klone zu ermitteln muß man die Transformationseffizienz pro µg DNA ermitteln. Dazu plattiert man 100 µl der transformierten Zellsuspension in jeweils 1:10, 1:100 und 1:1000 Verdünnung auf SD^{-L,-W}-Platten aus, um auf kotransformierte Zellen (die das DNA-BD-Plasmid und das AD-Plasmid erhalten haben) zu selektionieren. Nach einigen Tagen Inkubation bei 30°C zählt man die Anzahl der Klone (cfu). Die Klonierungseffizienz in cfu/µg DNA ergibt sich daraus:

$$\frac{\text{cfu} \times \text{Zellsuspensionsvolumen } (\mu\text{l})}{\text{plattiertes Volumen } (\mu\text{l}) \times \text{Verdünnung} \times \text{DNA-Menge des limitierten Plasmides } (\mu\text{g})}$$

Die Anzahl der gescreenten Klone errechnet sich aus: cfu/ μg DNA x Menge AD-Plasmid (μg).

5.3.3.7 LacZ-Filterassay für den *yeast two hybrid screen*

Um Protein-Protein-Interaktion im *yeast two hybrid screen* zu bestätigen, kann neben der Verwendung von Auxotrophiemarkern als Reportergene auch die β -Galactosidase verwendet werden, die bei einer Interaktion der beiden *yeast two hybrid* Partner exprimiert wird. Die β -Galactosidase wird dann im nächsten Schritt aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität nachgewiesen, indem sie das Substrat X-Gal umsetzt und dabei die Zellen blau färbt.

Dazu wurden die auf den Selektionsmedien gewachsenen Kolonien auf frisches Selektionsmedium ausgestrichen und ca. 3-5 Tage bei 30°C inkubiert. Die Hefekolonien wurden dann auf eine Nitrozellulosemembran gezogen und diese für einige Minuten auf einer Wanne aus Aluminiumpapier in flüssigem Stickstoff schwimmen gelassen, um die Hefezellen aufzubrechen. Die Nitrozellulosemembran wurde auf ein Filterpapier gelegt (Hefekolonien nach oben), das mit Z-Puffer/X-Gal-Lösung (siehe Kap. 4.3) getränkt wurde. Membran und Filterpapier wurden in eine Petrischale gegeben, diese mit Parafilm verschlossen und ca. 30 min bis 8 h bei 30°C inkubiert und in regelmäßigen Abständen nach blauen Kolonien geschaut. Bei Inkubationen länger als 8 h beginnen sich auch negative Klone blau zu färben.

5.4 Arbeiten mit *Escherichia Coli*

5.4.1 Kultivierung von *E. coli*

E. coli wurde auf Festmedium, d.h. auf LB-Platten (siehe Kap. 4.2.3), bei 37°C oder als Übernachtskultur bei 200 Upm, 37°C in LB-Medium (siehe Kap. 4.2.3) auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Auf Platten sind die *E. coli*-Kolonien bei 4°C einige Wochen haltbar. Zur Langzeitlagerung wurden 0,75 ml Übernachtskultur mit 0,75 ml 30% Glycerin-LB-Medium gemischt und bei -80°C gelagert. *E. coli* aus Glycerinkulturen wurden mit einer sterilen Glaspipette auf Mediumplatten ausgestrichen oder direkt zum Animpfen der Übernachtskultur verwendet.

5.4.2 Transformation von *E. coli*

5.4.2.1 Transformation von CaCl₂ behandelten *E. coli*

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 200 ml LB-Medium 1:200 mit einer frischen *E. coli*-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden 15 min mit 1500 g und 4°C pelletiert und in 100 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und das Pellet in 10 ml eiskalter 50 mM CaCl₂, die 15% (m/v) Glycerin enthielt, resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu je 200 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl mit 5-10 ng Plasmidlösung (max. 10 µl) versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 90 s im Wasserbad bei 42°C wurde der Transformationsansatz zur Expression der durch das transformierte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz mit 1 ml Medium versetzt und 30 min bei 37° inkubiert. 100 µl dieses Transformationsansatzes wurden auf LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin (bzw. mit demjenigen Antibiotikum gegen das das Plasmid Resistenz verleiht) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einer Standard DNA (pBlueskript) in den Konzentrationen 10 ng/ml und 50 ng/ml wurde die Transformationseffizienz (cfu/µg DNA) bestimmt. Auf diese Weise können Transformationsraten von 10⁷ Transformanten/µg DNA erreicht werden.

5.4.2.2 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Um höhere Transformationsraten (bis 10⁹ cfu/ug DNA) zu erreichen, die z.T. zur Transformation von Ligationsansätzen oder zur Transformation von Plasmid-DNA aus Hefelysaten in *E. coli* nötig sind, wurde eine Elektroporation angewandt.

Eine frische Übernachtskultur von *E. coli* wurde 1:100 in 500 ml LB-Medium verdünnt und bei 37°C und 200 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 1,0 inkubiert. Die Zellen wurden dann 15-30 min auf Eis heruntergekühlt und anschließend mit 1500 g bei 4°C für 15 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 ml kaltem H₂O resuspendiert, abzentrifugiert, erneut in 250 ml kaltem H₂O resuspendiert und wieder pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml kaltem 10%igen Glycerin resuspendiert, abzentrifugiert und schließlich in 1 ml kaltem 10%igen Glycerin aufgenommen. Die transformationskompetenten Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Zur Transformation wurden die elektrokompenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut. 40 μl der Zellen wurden mit bis zu 5 μl eines Ligationsansatzes oder der Hefepiasmid-DNA, die 20 min auf einer 0,025 μm Nitrozellulosemembran gegen 10% Glycerin dialysiert wurden, versetzt und auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde dann in eine auf Eis vorgekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvette überführt und dann mit dem *Gene Pulser* ein Strompuls ausgelöst (2,5 kV, 25 μF , 400 Ω). Die Zellen wurden sofort mit 1 ml LB-Medium aus der Küvette gespült, 30 min bei 37°C zur Expression der Antibiotikaresistenz inkubiert und dann auf den LB-Platten mit der entsprechenden Resistenz ausplattiert.

5.4.3 Amplifikation einer cDNA Genbank in *E. coli*

Die von Clontech erhaltene cDNA-Genbank aus menschlichem Gehirngewebe, lag schon in dem *yeast two hybrid vektor* pACT2 und in *E. coli* transformiert vor. Sie bestand aus 5×10^6 unabhängigen Klonen, die Inserts hatten eine durchschnittliche Länge von 1,5 kbp. Um genügend DNA für Hefe-Transformationen zu erhalten, wurde die Genbank in *E. coli* amplifiziert. Zunächst wurde der Genbank-Titer (*library titer*) bestimmt. Dazu wurde 1 μl der Genbank-Zellen $1:2,5 \times 10^5$ in LB_{amp} verdünnt, auf LB_{amp} -Platten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Klone gezählt und anhand der Verdünnung der Genbank-Titer (cfu/ml) bestimmt.

Die eigentliche Amplifikation erfolgte auf LB_{amp} -Platten, da in Flüssigkultur evt. schneller wachsende Klone die anderen überwachsen könnten und dann in der Genbank überrepräsentiert wären. Auf einer Platte haben alle transformierten *E. coli* die gleiche Chance bei einer Übernacht-Inkubation einen Klon zu bilden. Anhand des Genbank-Titers wurde die Genbank so verdünnt, dass in 100 μl *E. coli*-Lösung ca. 5×10^6 Klone vorhanden waren und anschließend auf eine 150 mm LB_{amp} -Platte ausplattiert (30 Platten insgesamt) wurden. Die Platten wurden ca. 20 h bei 37°C inkubiert, sodass noch einzelne Klone vorhanden waren. Die Klone wurden von den Platten mit je 3 ml LB_{amp} -Medium pro Platte und einer sterilen Glaspipette abgekratzt und vereinigt. Anschließend wurden die Zellen in drei 2 l Erlenmeyerkolben verteilt und in je 400 ml LB_{amp} für 1,5 h bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Pro 400 ml Zellkultur wurden 4 DNA-Maxipräparationen (siehe 5.5.2.3) mit Genomed-Säulen durchgeführt (12 insgesamt) und die so gewonnene Library Plasmid-DNA separat aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

5.5 Molekularbiologische Methoden

5.5.1 Handhabung von Nukleinsäuren nach Sambrook *et al.*, 1989

5.5.1.1 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA

Proteine und andere Verunreinigungen wurden aus wässriger DNA-Lösung durch Extraktion mit Phenol (siehe Kap. 4.3) entfernt. Die Probe wurde mit einem gleichen Volumen an Phenol gemischt und kurz gevortext. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei 13000 Upm und RT in einer Tischzentrifuge und Überführung der oberen, wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß. In einem zweiten Schritt wurde die Probe mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform ausgeschüttelt und die Phasen wie beschrieben getrennt. Die so gereinigte Nukleinsäure wurde anschließend mit Ethanol präzipitiert.

5.5.1.2 Fällung von DNA/RNA

Die Reinigung und Konzentration von Nukleinsäure aus wässrigen Lösungen erfolgte durch Fällung. Hierfür wurde zur Probe 1/10 Volumen 3M Na-Azetat pH 5,2 (siehe Kap. 4.3) und das 2,5fache 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. Der Niederschlag wurde mit 70% Ethanol gewaschen um Salze zu entfernen, erneut zentrifugiert, das Pellet 10 min bei RT getrocknet und in einem kleinen Volumen Tris-Puffer (pH 8,0) gelöst.

5.5.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren 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.

5.5.2 Isolierung von Nukleinsäuren

5.5.2.1 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung erfolgte durch eine *Boilinglysate*-Methode nach Sambrook *et al.*, 1989. 1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden 3 min unter RT bei 6000 Upm in einer Tischzentrifuge pelletiert. Das Zellpellet wurde in 350 µl STET-Puffer (siehe Kap. 4.3) resuspendiert, nach Zugabe von 25 µl Lysozymlösung (siehe Kap. 4.3) und 3,5 µl RNase-A-Lösung (10 mg/ml) (siehe Kap. 4.3) kräftig geschüttelt und anschließend 40 s auf bei 95°C im *Eppendorf*-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 10 min bei 13000 Upm abzentrifugiert und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Reinigung erfolgte durch Fällung mit 40 µl 3 M Na-Azetat Lösung pH 5,2 (siehe Kap. 4.3) und 400 µl Isopropanol für 5 min bei RT und anschließender Zentrifugation bei 13000 Upm und 4°C. Das Pellet wurde einmal mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknung mit 50-100 µl Tris-Puffer pH 8,0 resuspendiert.

5.5.2.2 Präparation von Plasmid DNA aus *E. coli* mit *spin column*-Säulen

Um kleine Mengen an sehr reiner Plasmid DNA für z.B. Sequenzierungen zu erhalten, wurden JET™quick *spin column*-Säulen verwendet. Sie beruhen auf einer alkalischen SDS-Lyse und anschließender säulenchromatographischer Reinigung, wodurch auch Nukleotide effizient abgetrennt werden.

1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden mit einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (3 min, RT und 6000 Upm) und in 210 µl der mitgelieferten Lösung G1 (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNaseA) resuspendiert. Es wurden 210 µl G2 (200 mM NaOH, 1% SDS) zugegeben, gemixt und die Zellen 5 min bei RT lysiert. Anschließend wurde mit 280 µl G3-Lösung (Azetat und Guanidine Hydrochlorid) durch Invertieren neutralisiert und 10 min bei 13000 Upm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt auf eine *spin column*-Säule gegeben und 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Die Säule wurde einmal mit Lösung G4 (Ethanol, NaCl, EDTA und Tris-HCl) gewaschen, einmal leer zentrifugiert und die DNA mit 75 µl H₂O durch zweiminütiges Zentrifugieren (*spin column* in neues *Eppendorf*-gefäß) eluiert.

5.5.2.3 Maxipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Um größere und reine Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* zu isolieren, wurde der *Maxi-Säulenpräparationskit* verwendet, der auf dem gleichen Prinzip wie dem der *spin column*-Säulen basiert.

300 ml Übernachtskultur von *E. coli* mit dem zu präparierenden Plasmid wurden 10 min bei 1500 g und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml der mitgelieferten E1-Lösung (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNaseA) resuspendiert und mit 10 ml E2-Lösung (200 mM NaOH, 1% SDS) versetzt. Die Zellen wurden 5 min bei RT durch Invertieren lysiert und dann mit 10 ml E3-Lösung (3,2 M Kaliumazetat/Essigsäure pH 5,0) neutralisiert. Das Lysat wurde 10 min bei 15000 g und RT abzentrifugiert und der klare Überstand auf die mit 30 ml E4-Lösung (600 mM Natriumchlorid, 100 mM Natriumazetat) äquilibrierte Säule aufgetragen. Dann wurde mit 60 ml E5-Lösung (800 mM NaCl, 100 mM Na-Azetat) gewaschen und die DNA mit 15 ml E6-Lösung (1250 mM NaCl, 100 mM Tris pH 8,5) eluiert. Um die Plasmid-DNA auszufällen, wurde das Eluat mit 10,5 ml Isopropanol versetzt. Die präzipitierte DNA wurde 30 min bei 4°C und 15000 g abzentrifugiert, das Pellet in 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknung in ca. 500 µl H₂O resuspendiert.

5.5.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Die in Hefe transformierten Plasmide liegen nur in geringer Kopienzahl vor, können aber mit dieser Methode isoliert werden. Die Konzentration der erhaltenen Plasmid-DNA ist recht gering, reicht aber für PCR-Amplifikationen sowie für die Transformation von *E. coli* mit der Elektroporation aus, wo die Plasmid-DNA dann für weitere Analysen leicht amplifiziert werden kann.

10 ml einer Übernachtskultur wurden 5 min bei 1000 g abzentrifugiert und dann mit 200 µl Hefe-Lysepuffer (siehe Kap. 4.3) in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Alternativ dazu können auch zwei bis drei ca. 3 mm dicke Hefekolonien direkt von der Platte in ein Eppendorfgefäß gekratzt und mit 200 µl Lysepuffer resuspendiert werden. Dann versetzte man mit 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 300 µg Glaskugeln (425-600 µm) und vortexte für 2 min auf höchster Stufe. Anschließend wurde 5 min bei 13000 Upm und RT in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Weiter wurde wie unter Kap. 5.5.1.2 beschrieben die DNA gefällt und in 20 µl 10 mM Tris-Puffer pH 8,0 resuspendiert.

5.5.2.5 Isolation von mRNA aus Säugerzelllinien

Um eine cDNA-Synthese durchführen zu können, wurde aus den Säugerzellen 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 und Handschuhe getragen.

Zur Isolation der RNA wurde das *RNeasyTM-Mini-Kit* verwendet. 5×10^6 Zellen wurden abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und das Pellet mit 350 μ l des mitgelieferten RLT-Puffer-1%- β -Mercaptoethanol versetzt. Die Zellen wurden mit einer G20-Kanüle homogenisiert und nach Zugabe von 350 μ l 70% Ethanol auf eine *spin column* Säule gegeben. Es wurde einmal für 15 s bei 8000 Upm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, einmal mit 700 μ l RW1-Puffer und zweimal mit je 500 μ l RPE-Puffer gewaschen (15 s Zentrifugation bei 8000 Upm). Die RNA wurde mit 30-50 μ l nukleasefreiem H₂O von der Säule eluiert.

5.5.3 Amplifikation von DNA mit der 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 μ l DNA (10 ng/ μ l)
- 2 μ l 10fach-konzentrierter Reaktionspuffer (ohne MgCl₂)
- 1 μ l 5'-Primer (10 pmol/ μ l)
- 1 μ l 3'-Primer (10 pmol/ μ l)
- 0,2 μ l dNTPs (je 10 mM/Nukleotid)
- 0,6 μ l MgCl₂ (50 mM)
- 0,2 μ l *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/ μ l)
- mit H₂O auf 20 μ l 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 PCR-Ablauf wie folgt aus: 5 min 94°C zur anfänglichen, kompletten Strangtrennung der DNA und dann 25 bis 30 Zyklen bestehend aus 35 s 94°C (Strangtrennung), 45 s 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 in einer Gelelektrophorese überprüft (siehe Kap. 5.5.6).

Die PCR wurde auch zur Überprüfung von Klonierungen in Bakterien eingesetzt. Dazu wurde die Bakterienkolonie direkt von der Transformationsplatte mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers gepickt und mit dem PCR-Ansatz in ein 0,2 µl Reaktionsgefäß gegeben. Durch die Inkubation bei 95°C wurde das Bakterium zerstört und genügend Plasmid-DNA freigesetzt.

5.5.4 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 die 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.

Vor der eigentlichen cDNA-Synthese verdaute man pro µg RNA (siehe Kap. 5.5.2.5) für 2 h mit 6 U RNase-freier DNaseI bei 37°C in 200 µl DNase-Puffer. Zur Reinigung der RNA wurde der DNase-Verdau mit 200 µl Phenol-Chloroform (3:1) versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Dann zentrifugierte man 10 min bei 13000 Upm und RT in der Tischzentrifuge, trennte die wässrige Phase ab und fällte die RNA aus (siehe Kap. 5.5.1.2). Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 100 µl DEPC-H₂O aufgenommen.

Für die cDNA-Synthese wurden 9 µl (2 µg) Gesamt-RNA mit 2 µl Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer (200 ng) für 10 min auf 70°C erhitzt und dann auf Eis abgeschreckt. Nach Zugabe von 4 µl Erststrang-Puffer, 1 µl 10 mM dNTP-Mix und 1µl RNase-Inhibitor, inkubierte man für 10

min bei 25°C. Dann wurde 1 µl der *Reversen-Transkriptase SuperScriptTMII* (RNase H⁻) zugegeben und für 50 min bei 42°C inkubiert. Das Enzym wurde durch 15 min Inkubation bei 70°C inaktiviert. Die so gewonnene einzelsträngige cDNA wurde dann mit der PCR amplifiziert (siehe Kap. 5.5.3). Dabei wurden 2 µl des cDNA-Ansatzes in der PCR-Reaktion als Matrize (*template*) eingesetzt.

5.5.5 *in vitro*-Modifikation von DNA nach Sambrook *et al.*, 1989

5.5.5.1 Restriktion von DNA

Zur Spaltung von doppelsträngiger, zirkulärer DNA wurden TypII-Restriktionsendonukleasen eingesetzt. Es wurde mit 1 U Enzym pro µg DNA, 100 µg/ml BSA und unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen bei der für das Enzym optimalen Temperatur für 1 h inkubiert.

5.5.5.2 Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente

Um eine Religation linearisierter DNA mit kompatiblen Enden zu verhindern, wurden 5'-terminale Phosphatgruppen mit Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm abgespalten. 1 µg DNA wurden mit 1 U CIP (*calv intestine phoshatase*) für 30 min bei 30°C und anschließend für 15 min bei 55°C inkubiert. Das Enzym wurde durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe Kap. 5.5.1.1) inaktiviert und die DNA gefällt (siehe Kap. 5.5.1.2).

5.5.5.3 Phosphorylierung linearer DNA-Fragmente

5'-terminale Phosphatgruppen können mit der T4-Polynukleotidkinase (PNK) an einzel- oder doppelsträngige DNA angefügt werden, um sie so für Klonierungen ligieren zu können. Es wurden 1 µg DNA mit 2 µl 10fach-konzentriertem PNK-Puffer und 2 U T4-PNK versetzt, mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt und 45 min bei 37°C inkubiert.

5.5.5.4 Entfernung von 3'-überhängenden DNA-Fragment-Enden

Die T4-DNA-Polymerase ist in der Lage vom 3'-Ende linearer DNA-Fragmente Nukleotide abzuspalten. Diese Aktivität steht im Gleichgewicht mit einer 5'→3'-Polymeraseaktivität. Um sicherzustellen, dass nur die 3'-überhängenden Nukleotide

abgespalten werden, muß die Reaktion in Anwesenheit eines großen Überschusses an Desoxyribonukleotiden und bei niedriger Temperatur durchgeführt werden. Die Reaktion kann in allen herkömmlichen Restriktionspuffern durchgeführt werden. Im idealen Fall sind die Reaktionsprodukte DNA-Fragmente mit glatten Enden. Es wurde 1 µg DNA mit 2 µl 10fach-konzentriertem Restriktionsenzym-puffer, 0,1 mM dNTPs und 1 U T4-DNA-Polymerase versetzt, auf 20 µl mit H₂O aufgefüllt und 15 min bei 16°C inkubiert. Das Enzym wurde 15 min bei 75°C inaktiviert.

5.5.5.5 Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Fragment-Enden

Das Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase-I ist in der Lage, 5'-überhängende DNA-Fragment-Enden in Anwesenheit von Desoxyribonukleotiden und Magnesiumionen aufzufüllen und so glatte DNA-Enden zu erzeugen. Die Reaktion kann in allen herkömmlichen Restriktionspuffern durchgeführt werden. Es wurden 1 µg DNA mit 2 µl 10fach-konzentriertem Restriktionspuffer, 50 µM dNTPs und 1 U Klenow-Fragment versetzt, mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt und 15 min bei RT inkubiert. Das Enzym wurde 15 min bei 75°C inaktiviert und die so behandelten DNA-Fragmente direkt zur Ligation eingesetzt.

5.5.5.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Doppelsträngige DNA-Fragmente mit glatten oder kompatiblen, überhängenden Enden wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase kovalent verknüpft. Es wurden 100 ng linearisierter Vektor mit dem 5fach molaren Überschuß an zu klonierendem DNA-Fragment mit 1 U T4-DNA-Ligase, 1 µl 10fachem Ligase-Puffer gemischt und mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 2 h bei RT oder über Nacht bei 16°C inkubiert und dann 20 min auf einer Nitrozellulose-Dialysemembran mit 13 mm Durchmesser und einer Porenweite von 0,025µm gegen 10% Glycerin dialysiert und anschließend in die Bakterien transformiert (siehe Kap. 5.4.2).

5.5.6 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 TypII-Agarose mit TBE-Puffer (siehe Kap. 4.3) in der Mikrowelle aufgeköcht, auf ca. 50°C abgekühlt und in einen Gelträger gegossen und vor Erstarren der Agarose zum Formen von Auftragstaschen ein Kamm eingesetzt. Als Laufpuffer diente TBE mit 0,03 µg/ml Ethidiumbromid. Die Proben wurden 6:1 mit 6fach-konzentriertem Auftragspuffer (siehe Kap. 4.3) gemischt und in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung (5-10 V/cm), was bei den verwendeten Gelkammern einer Spannung von ca. 100-120 V entsprach. Die DNA konnte im UV-Durchlicht bei 254 nm sichtbar gemacht werden und einer CCD-Kamera fotografiert werden.

5.5.6.1 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente nach ihrer gelelektrophoretischen Trennung aus dem Agarosegel zu isolieren, wurden sie unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Zur Extraktion der DNA wurde das *Jetsorb-Kit* verwendet. Das Prinzip besteht darin die DNA nach Schmelzen der Agarose unter Hochsalzbedingungen an eine Silikamatrix (Glasmilch) zu binden, die Verunreinigungen abzuwaschen und dann unter Niedrigsalzbedingungen wieder zu eluieren. Pro 100 µg Gel wurden 300 µl des mitgelieferten Puffers A1 und 10 µl der Glasmilch zugegeben und mindestens 15 min bei 50°C inkubiert, um die Agarose zu schmelzen und die DNA an die Glasmilch zu binden. Dann wurde 30 s bei 13000 Upm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, einmal mit 300 µl Puffer A1 und zweimal mit 300 µl Puffer A2 (Ethanol, NaCl, Tris-HCl, EDTA) gewaschen. Nach dem Pelletieren wurde die Glasmilch ca. 5 min bei RT getrocknet und die DNA in 30 µl 10 mM Tris pH 8.0 durch 5 min Inkubation bei 50°C eluiert. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde die DNA im Überstand gewonnen und konnte direkt für Ligationen oder Restriktionen eingesetzt werden.

5.5.7 Klonierungen

Alle PCR-Reaktionen wurden falls nicht anders angegeben wie unter Kap. 5.5.3 beschrieben durchgeführt, die Sequenzen der Primer sind in Kap. 4.1.9.2 aufgelistet. Die PCR-Produkte wurden mit Phenol-Chloroform extrahiert (siehe Kap. 5.5.1.1), gefällt (siehe Kap. 5.5.1.2) und gegebenenfalls mit Restriktionsenzymen geschnitten (siehe Kap. 5.5.5.1). Die geschnittenen PCR-Produkte und Vektoren wurden dann über eine Gelelektrophorese gereinigt (siehe Kap. 5.5.6), aus dem Gel extrahiert (siehe Kap. 5.5.6.1), ligiert (siehe Kap. 5.5.5.6) und dann in *E. coli* transformiert (siehe Kap. 5.4.2). In *E. coli* wurde die Plasmid-

DNA amplifiziert, wieder extrahiert (siehe Kap. 5.5.2.1) und mittels Restriktionsanalyse (siehe Kap. 5.5.5.1) und Sequenzierung (Sequenzen der Sequenzierprimer sind in Kap. 4.1.9.2 angegeben) auf Richtigkeit der Klonierung geprüft.

Bei allen PCR-Amplifikationen und Klonierungen wurde ein 2,3 kbp langer cDNA-Klon als *Template* verwendet, der den gesamten offenen Leserahmen von PHLDA1 und noch ca. 1000 bp des 3'-untranslatierten Bereichs enthält. Die Sequenz dieses Klons ist in der Doktorarbeit von Martina Kuske beschrieben (Kuske, 1998). Der Klon beginnt mit bp 71517 des Chromosom 12, der *working draft sequence* NT_0115310.2 am NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/HsBlast.html>) (siehe auch Kap. 5.8.1). Das A des ersten ATGs in der Sequenz wurde mit +1 numeriert und entspricht dem bp 71682 des Chromosom 12.

Die Namen der generierten Konstrukte sind jeweils in fetter Schrift angegeben und unter dieser Bezeichnung in der weiteren Arbeit verwendet.

5.5.7.1 PHLDA1 in pAS2-1

Um die PHLDA1-Sequenz ab dem ersten ATG in den *yeast two hybrid*-Vektor pAS2-1 in die Schnittstellen EcoRI und BamHI zu klonieren, wurden 5'-Primer RN12 (Nt 4-24) und 3'-Primer RN13 (Nt 1185-1207) verwendet. Dabei wurde das ATG-Codon durch eine EcoRI-Schnittstelle ersetzt und nach dem Stop-Codons eine BamHI-Schnittstelle eingeführt. Die PCR wurde mit der *Taq-Polymerase* und der *Q-Solution* von Qiagen durchgeführt, als Matrizenstrang diente der 2,3 kbp PHLDA1-Klon. Folgende Zyklen der PCR wurden 30mal wiederholt: 35 s bei 95°, 35 s bei 56°C und 90 s 72°C. Dann wurde wie unter Kap. 5.5.7 beschrieben, verfahren. Es entstand das Konstrukt **Gal4-PHLDA1-L** (L für lang).

Es wurden noch eine Reihe von Verkürzungen des PHLDA1-ORFs in pAS2-1 mittels Restriktion aus dem Konstrukt Gal4-PHLDA1-L hergestellt.

Restriktionsenzyme	generiertes Fragment	in Schnittstelle von Vektor pAS2-1 kloniert
EcoRI und PvuII	Nt 4-559	EcoRI und SmaI
EcoRI und SmaI	Nt 4-613	EcoRI und SmaI

EcoRI und XhoI	Nt 4-665	EcoRI und SalI
EcoRI und PstI	Nt 4-834	EcoRI und PstI
NcoI und SmaI	Nt 608-1207	NcoI-SmaI Fragment ausgeschnitten, Vektor NcoI 5'-Überhang aufgefüllt (siehe 5.5.5.5) und ligiert

Tab. 5.1 C- und N-terminale Verkürzungen von Gal4-PHLDA1

5.5.7.2 PHLDA1 in pcDNA3

Dieses Konstrukt wurde von Martina Kuske übernommen und für die Herstellung der stabilen Transfektanten verwendet. Es wurde ein 4,5 kbp PHLDA1 cDNA Konstrukt EcoRI/NotI in pcDNA3 kloniert (Kuske, 1998). Der Klon beginnt mit bp 71517 des Chromosom 12, der *working draft sequence* NT_0115310.2 am NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/HsBlast.html>). Das Konstrukt wurde als **PHLDA1-4,5 kbp** bezeichnet.

5.5.7.3 PHLDA1 in pcDNA3.1

PHLDA1 erstes ATG in pcDNA3.1His-C: (His-PHLDA1-L)

Um PHLDA1 in eukaryontischen Zellen mit einem N-terminalen His-Tag exprimieren zu können, wurde PHLDA1 aus dem Konstrukt Gal4-PHLDA1-L mit EcoRI-SalI ausgeschnitten und in die EcoRI-XhoI-Schnittstelle von pcDNA3.1His-C kloniert.

PHLDA1 erstes ATG in pcDNA3.1Myc-His-C: (PHLDA1-Myc-His-L)

Um PHLDA1 mit einem C-terminalen Myc-His-Tag zu exprimieren, wurde PHLDA1 mit dem 5'-Primer RN18 und dem 3'-Primer RN19 amplifiziert und in pcDNA3.1Myc-His-C EcoRI-BamHI kloniert. RN18 generierte eine EcoRI-Schnittstelle bei Nt 15 und RN19 eine BamHI Schnittstelle bei Nt 1203 wodurch das Stop-Codon deletiert wurde. Es wurden die *Taq-Polymerase* und die *Q-Solution* von Qiagen verwendet und als Matrize der 2,3 kb-PHLDA1 Klon. Folgende Zyklen wurden 30mal wiederholt: 35 s bei 94°C, 45 s bei 60°C und 60 s bei 72°C. Dann wurde wie unter Kap. 5.5.7 beschrieben, verfahren.

PHLDA1 zweites ATG in pcDNA3.1Myc-His-C: (PHLDA1-Myc-His)

Um PHLDA1 ab dem zweiten ATG mit einem C-terminalen Myc-His-Tag in Eukaryonten exprimieren zu können, wurde PHLDA1 mit den Primern RN26 und RN19 amplifiziert und EcoRI-BamHI in pcDNA3.1Myc-His-C kloniert. RN26 generierte eine EcoRI-

Schnittstelle bei Nt 386 und RN19 eine BamHI-Schnittstelle bei Nt 1203 wodurch das Stop-Codon deletiert wurde. Es wurden die *Taq-Polymerase* und die *Q-Solution* von Quiagen verwendet und als Matrize der 2,3 kbp PHLDA1-Klon. Folgende Zyklen wurden 30x wiederholt: 35 s bei 94°C, 55 s bei 60°C und 90 s bei 72°C. Dann wurde wie unter Kap. 5.5.7 beschrieben, verfahren.

PHLDA1 zweites ATG in pcDNA3.1His-C: (His-PHLDA1)

Um PHLDA1 ab dem zweiten ATG mit einem N-terminalen His-Tag in Eukaryonten exprimieren zu können, wurde PHLDA1 mit den Primern RN26 und RN27 amplifiziert. RN26 generierte eine EcoRI-Schnittstelle bei Nt 386 und RN27 fügte eine Sall-Schnittstelle bei Nt 1205 ein. Es wurden die *Taq-Polymerase* und die *Q-Solution* von Quiagen verwendet und als Matrize der 2,3 kbp PHLDA1-Klon. Folgende Zyklen wurden 30mal wiederholt: 35 s bei 94°C, 55 s bei 60°C und 90 s bei 72°C. Dann wurde wie unter Kap. 5.5.7 beschrieben, verfahren.

5.5.7.4 PHLDA1 in pGEX4T

PHLDA1 erstes ATG in pGEX4T(1): (Gst-PHLDA1-L)

Um PHLDA1 in *E. coli* als bakterielles Gst-Fusionsprotein zu exprimieren, wurde PHLDA1 mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Sall aus dem Konstrukt Gal4-PHLDA1-L ausgeschnitten und EcoRI-Sall in pGEX4T(1) kloniert.

PHLDA1 zweites ATG in pGEX4T: (Gst-PHLDA1)

Um PHLDA1 ab dem zweiten ATG als Gst-Fusionsprotein zu exprimieren, wurde es EcoRI und Sall aus dem Konstrukt His-PHLDA1 ausgeschnitten und EcoRI-Sall in pGEX4T(1) kloniert.

cMuc18 in pGEX4T: (Gst-cMuc18)

Als Kontrollprotein für Experimente mit Gst-Fusionsproteinen, benötigte man ein zu PHLDA1 nicht homologes Gen, das in die gleichen Schnittstellen des Gst-Expressionsvektors kloniert wurde. Dazu wurde der zytoplasmatische Schwanz von Muc18 (MCAM/CD146) mit den Primern RN1 und RN2 amplifiziert. RN1 generierte bei NT 1761 eine 5'-EcoRI-Schnittstelle und RN2 3' des Stop-Codons eine BamHI-Schnittstelle. Folgenden Zyklen wurden 30mal wiederholt: 45 s bei 94°C, 45 s bei 55°C und 45 s bei

72°C. Das PCR-Fragment wurde wie unter Kap. 5.5.7 beschrieben in die EcoRI-BamHI-Schnittstelle von pGEX4T(1) kloniert.

5.5.7.5 Gst-Fusionskonstrukte zur Expression in Mammalia-Zellen

eIF3-p47 in pEBG: (Gst-eIF3-p47)

Für Koimmunpräzipitationsexperimente benötigte man Gst-Fusionsproteine, die in Mammalia-Zellen exprimiert werden. Dazu wurde die p47-Untereinheit des humanen Translations-Initiationsfaktors3 in Vektor pEBG kloniert. Klon 5.1 (eIF3-p47) des *yeast two hybrid screens* wurde mit den Primern RN20 und RN21 amplifiziert. RN21 generierte eine 5'-BamHI-Schnittstelle und RN21 eine 3'-SpeI-Schnittstelle. Folgende Zyklen wurden 30mal wiederholt: 35 s bei 94°C, 45s bei 60°C und 60 s bei 72°C. Das PCR-Fragment wurde wie unter Kap. 5.5.7 beschrieben in die BamHI und SpeI-Schnittstellen von pEBG kloniert.

MRG in pEBG: (Gst-MGR)

Das *mammary derived growth inhibitor related gene* (MRG) wurde zur Expression in Mammaliazellen als Gst-Fusionsprotein in den Vektor pEBG kloniert. Der im *yeast two hybrid screen* isolierte Klon N15.1 (MRG) wurde mit den Primern RN24 und RN25 amplifiziert. Beide Primer binden im *yeast two hybrid* Vektor pACT2. RN24 generiert eine 5'-BamHI-Schnittstelle und RN25 eine 3'-SpeI-Schnittstelle. Folgende Zyklen der PCR wurden 30mal wiederholt: 35s bei 95°C, 45 s bei 54°C und 90 s bei 72°C. Das PCR-Fragment wurde wie unter Kap. 5.5.7 beschrieben in die Schnittstellen BamHI und SpeI von pEBG kloniert.

5.6 Proteinbiochemische Methoden

5.6.1 Zellaufschluß von Mammalia-Zelllinien

Ca. 5×10^6 Zellen wurden pelletiert, einmal mit PBS gewaschen und mit 500 µl Mammalia-Lysepuffer, der eine Mischung aus Proteaseinhibitoren enthielt (siehe Kap. 4.3), versetzt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden 15 s mit dem *Branson Sonifier* mit der Mikroultraschallspitze auf Intensitätsstufe 4 und 40%igem Zyklus lysiert, wodurch auch die DNA geschert wurde. Es wurde 30 min auf Eis inkubiert, dann

10 min die unlöslichen Bestandteile bei 1500 g und 4°C abzentrifugiert und der klare Überstand abgenommen.

5.6.2 Zellaufschluß von *S. cerevisiae*

Für jeden im Westernblot zu analysierenden Hefeklon wurden 5 ml Hefeübernachtkultur angesetzt (siehe Kap. 5.3.1). Am nächsten Morgen wurde die Hefekultur 1 min gevortext, dann mit 50 ml frischem Medium 1:10 verdünnt und bei 30°C, 220 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 wachsen gelassen. Die Zellen wurden dann bei 4°C und 1000 g für 5 min pelletiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Pro 7,5 absoluter OD-Einheiten (OD₆₀₀ x ml Kulturvolumen) wurden 100 µl auf 60°C vorgewärmter Hefe-Lysepuffer (siehe Kap. 4.3) und 80 µl Glaskugeln (425-600 microns) zugesetzt. Die Zellen wurden 10 min bei 70°C erhitzt und anschließend 1 min auf höchster Stufe gevortext und dann auf Eis abgekühlt. Es wurde 10 min mit 1500 g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dem Pellet wurde noch einmal 1/10 der anfangs eingesetzten Menge an Hefe-Lysepuffer zugesetzt, 5 min bei 95°C erhitzt, 1 min auf höchster Stufe gevortext und wieder 10 min bei 1500 g und 4°C abzentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt.

5.6.3 Zellaufschluß von *E. coli*

600 ml *E. coli*-Kultur wurden 10 min bei 4°C und 1500 g abzentrifugiert und in 15 ml 0,5% Triton-PBS (mit 2 *Complete*-Proteaseinhibitortabletten) resuspendiert. Die Zellen wurden insgesamt 3 min im *Branson Sonifier* auf Eis lysiert. Es wurde die Standardmikrospitze verwendet und auf Intensitätsstufe 4 und 90%igem Zyklus jeweils 10 s sonifiziert und dann 10 s zur Abkühlung stehen gelassen. Das Lysat wurde durch 10 min Zentrifugation bei 4°C und 12000 g von den Zellrückständen getrennt.

5.6.3.1 Direkte Lyse von *E. coli* für die SDS-PAGE

Um z.B. für ein SDS-PAGE gleichviel *E. coli* Gesamtprotein auf das Gel aufzutragen wurde von der Kultur die OD₆₀₀ bestimmt. Es wurde soviel µl an Kultur genommen, wie 0,3 OD Einheiten entspricht. Betrug z.B. die OD₆₀₀ 0,9, wurden 300 µl *E. coli*-Kultur verwendet, abzentrifugiert, in 30 µl einfach-konzentriertem Protein-Auftragspuffer (siehe 4.3) resuspendiert und 5 min bei 95°C erhitzt.

5.6.4 Messung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration beruht auf der Methode von Lowry *et al.*, 1951. Im alkalischen Milieu bildet sich hierbei ein Komplex aus Cu^{2+} und den freien Elektronenpaaren der Stickstoffatome in den Peptidbindungen der Proteine. Dadurch wird das Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert, das wiederum die Heteropolysäure $\text{H}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ im Folin-Reagenz zu tiefblauem kolloidalem Molybdän reduziert. Die Absorption dieser Lösung ist bei 750 nm proportional zur Proteinmenge.

Die Lowry-Proteinbestimmung wurde mit dem *DC-Protein Assay Kit* durchgeführt. Es wurden 50 μl Zelllysat mit 250 μl der mitgelieferten Lösung-A (alkalische Kupfersulfatlösung) und 5 μl 1% SDS-Lösung versetzt. Nach Zugabe von 2 ml Lösung-B (Folin-Reagenz) inkubierte man für 15 min bei RT und maß anschließend die Absorption bei 750 nm im Fotometer. Als Standard diente Rinderserumalbumin mit bekannter Konzentration (1 mg/ml).

5.6.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von denaturierten Proteinen erfolgte durch vertikale, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach 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 Trenngele 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. 1 h) 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 100 μg Protein aufgetragen (max. 150 μl), das zuvor mit Proteinautragspuffer (siehe Kap. 4.3) für 5 min bei 95°C erhitzt wurde. Für die Minigele verwendete man ca. 10 μg Protein in max. 30 μl Volumen. Die Elektrophorese erfolgte für große Gele bei 80 V, 16 h und RT, für die Minigele bei 120 V

für 2,5 h im Kühlraum mit dem Laufpuffer für SDS-PAGE (siehe Kap. 4.3). Anschließend wurden die Proteine durch Coomassie-Färbung (siehe Kap. 5.6.6) direkt im Gel sichtbar gemacht, oder im Westernblot (siehe Kap. 5.6.7) auf Nitrozellulosemembranen übertragen.

5.6.6 Coomassie-Färbung

Um Proteine direkt im Gel sichtbar zu machen, wurde eine kolloidale Coomassie-Färbung durchgeführt. Hierbei wird das Gel in einer sauren Methanollösung eingelegt, wodurch die Proteine durch Denaturierung im Gel fixiert werden. Nach Zugabe des Farbstoffes bildet sich ein tiefblauer Komplex. Überschüssiger Farbstoff im Gel muß durch Waschen mit einer verdünnten Methanollösung entfernt werden. Die Empfindlichkeit dieses Nachweises liegt bei etwa 30 ng Protein.

Die Coomassie-Färbung wurde mit *Roti-Blue*[®] durchgeführt. Dazu wurde das Gel eine Stunde in 200 ml Coomassie-Fixierlösung (siehe Kap. 4.3) eingelegt und anschließend mindestens 2 h oder über Nacht in 200 ml Coomassie-Färbelösung (siehe Kap. 4.3) gefärbt. Um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen, wurde ca. 1 h in der Coomassie-Entfärbelösung geschüttelt (siehe Kap. 4.3).

5.6.7 Western Blot

Um Proteine nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung immunologisch durch Antikörper nachweisen zu können, wurden sie auf Nitrozellulosemembranen transferiert (Towbin *et al.*, 1979). Dazu wurde die *Trans-Blot*TM Cell Nassblot-Apparatur verwendet. Schwämme, Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran BA85 wurden 10 min in Blottingpuffer (siehe Kap. 4.3) getränkt. Im „Sandwich-Verfahren“ wurde zwischen die Halterung ein Schwamm, ein Filterpapier, das Acrylamidgel, die Nitrozellulosemembran, ein weiteres Filterpapier und ein zweiter Schwamm gelegt. Das „Sandwich“ wurde so in die Blotapparatur eingeklemmt, dass sich die Nitrozellulosemembran auf der zur Anode gewandten Seite des Acrylamidgels befand. Die Blotapparatur wurde mit Blottingpuffer aufgefüllt, der Transfer fand für 1,5 h bei 50 V, 1,5 A und unter Wasserkühlung statt. Anschließend wurde die Rückseite der Nitrozellulosemembran markiert und in PBS gewaschen.

5.6.8 Immundetektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Die Proteine sollten nach ihrem Transfer auf Nitrozellulosemembranen durch Antikörper detektiert werden. Zunächst wurden die unspezifischen Bindestellen auf der Membran durch eine einstündige Inkubation in 5% Magermilch-PBS abgeblockt. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h mit dem ersten AK bei RT inkubiert. Dazu wurde der AK (für die Verdünnungen der AK siehe Kap. 4.1.7) dünn auf eine in einer feuchten Färbekammer, horizontal liegende Glasplatte aufgetragen. Die Membran wurde luftblasenfrei mit der Antigenseite nach unten darauf plaziert. Es wurde dreimal für je 10 min mit 0,1% Tween-PBS auf dem Schüttler gewaschen. Die Inkubation des zweiten, Peroxidase-gekoppelten Antikörpers (siehe Kap. 4.1.6) erfolgte wie bei dem 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 Mischen von 8 ml Lösung-1 (Luminol) mit 8 ml Lösung-2 (Wasserstoffperoxidlösung) hergestellt, die Membran darin 1 min geschwenkt und anschließend kurz auf einem Papiertuch abgetrocknet. Die Chemolumineszenzreaktion wird durch die an den zweiten AK gekoppelte Meerrettichperoxidase ausgelöst. Dabei wird das Luminol oxidiert und geht 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 30 s und 15 min.

5.6.8.1 Entfernung von Immunkomplexen von Nitrozellulosemembranen

Um denselben Blot mit anderen Antikörpern inkubieren zu können, mußten die ersten Immunkomplexe wieder entfernt werden (*stripping*). Dies wurde z.B. durchgeführt, wenn der Blot zur Kontrolle eines gleichmäßigen Proteinauftrages mit Anti- β -Actin detektiert werden sollte. Dazu wurde die Membran nach der Chemolumineszenzdetektion zweimal kurz in 0,1% Tween-PBS gewaschen und dann zweimal für je 20 min mit *Stripping*-Puffer (siehe Kap. 4.3) auf dem Schüttler inkubiert. Es wurde dreimal mit PBS gewaschen und mit der Nitrozellulosemembran für die Inkubation mit einem anderen Antikörper wie unter Kap. 5.6.8 beschrieben verfahren.

5.6.9 Etablierung der Expression von Gst-PHLDA1 in *E. coli*

Sowohl für die Immunisierung von Mäusen als auch bei dem anschließenden Test der Hybridome auf Reaktivität gegenüber PHLDA1 im ELISA, benötigte man größere Mengen an PHLDA1-Protein. Deshalb wurde ein Gst-PHLDA1-Fusionskonstrukt zur Expression in *E. coli* hergestellt, das Mithilfe des Gst-Tags leicht über Glutathionsepharose-beads (GS-beads) gereinigt werden kann.

Zunächst wurde der gesamte offene Leserahmen (ORF) von PHLDA1 ab dem ersten ATG als Gst-PHLDA1-L Fusionsprotein kloniert (siehe Kap. 5.5.7.4), in *E. coli*-Stamm BL21-(DE3) transformiert (siehe Kap. 5.4.2.2) und die Expression im Westernblot überprüft (siehe Abb. 5.5).

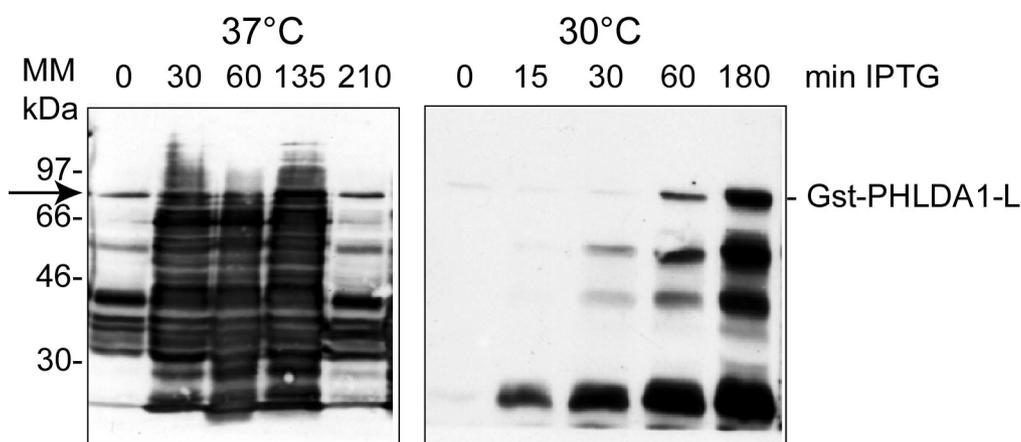


Abb. 5.5 Westernblot von Gst-PHLDA1-L. Auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel wurden jeweils 0,3 OD₆₀₀-Einheiten (siehe Kap. 5.6.3.1) von *E. coli*-Stamm *BL21-DE3*, bei dem mit 1 mM IPTG für die angegebenen Minuten (min) die Gst-PHLDA1-L Expression induziert wurde, aufgetragen. Es wurde auf Nitrozellulosemembran geblottet, mit Anti-Gst und K α M-POD detektiert. Der linke Blot zeigt die Expression bei 37°C, der rechte Blot bei 30°C. Mit dem Pfeil ist das 71,4 kDa Gst-PHLDA1-L Fusionsprotein markiert. MM, Molekulargewichtsmarker

Bei der Kultivierung bei 37°C war die Induktion des Gst-Fusionsproteins nicht so eindeutig zu beobachten, ebenso traten wesentlich mehr von kürzeren Fragmenten auf wie bei der 30°C Kultivierung. Auch die Menge des synthetisierten Gst-PHLDA1 Volllängenproduktes war bei 37°C geringer (vergleiche Abb. 5.5 den linken und rechten Blot). Dies lässt vermuten, daß weniger ein proteolytischer Abbau für die kurzen Fragmente verantwortlich war, als vielmehr eine nicht vollständige Synthese. Es ist bekannt daß *E. coli* durch ein anderes Repertoire an T-RNAs andere Codons zur Synthese von Proteinen verwendet, als Eukaryontenzellen. Dieser sogenannte *Codon-bias* ist besonders stark für

die Codons für Arginin und die Codons für Prolin. Da nun PHLDA1 ein sehr prolinreiches Molekül ist, könnten die in *E. coli* in zu geringer Anzahl vorhandenen t-RNAs für den Abbruch der Synthese verantwortlich sein. Bei niedrigerer Temperatur wachsen die *E. colis* langsamer, können mehr t-RNAs wiederverwenden und die Ausbeute an Vollängen Gst-PHLDA1 ist höher. Um noch mehr Vollängen Gst-PHLDA1 zu erhalten, wurde der neu entwickelte *E. coli*-Stamm *BL21-Codon-PlusTM-RP* verwendet, der Plasmide enthält, die für zusätzliche Prolin-t-RNAs codieren. Mittlerweile war auch bekannt das PHLDA1 das zweite ATG als Translationsstartcodon verwendet, deshalb wurde PHLDA1 ab zweiten ATG als Gst-Fusionsprotein in pGEX4T kloniert (Gst-PHLDA1, siehe Kap. 5.5.7.4) und in *E. coli*-Stamm *BL21-Codon-PlusTM-RP* exprimiert.

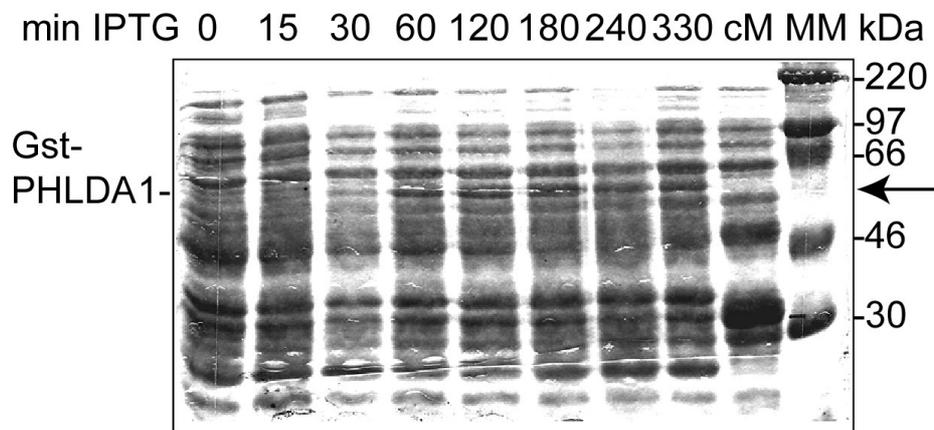


Abb. 5.6 SDS-PAGE von Gst-PHLDA1. Es wurden 0,3 OD-Einheiten des *E. coli*-Stammes *BL21-Codon-PlusTM-RP* (transformiert mit PHLDA1-pGEX4T) auf ein 10%iges Polyacrylamidgel aufgetragen, bei dem durch 1 mM IPTG Gst-PHLDA1 für die angegebenen Minuten (min) induziert wurde. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt und getrocknet. Mit dem Pfeil ist das 57,3 kDa Gst-PHLDA1-Fusionsprotein markiert. cM, Gst-cMuc18 in *E. coli*-Stamm *DH5 α* 180 min IPTG induziert, MM Molekulargewichtsmarker.

Der *E. coli*-Stamm *BL21-Codon-PlusTM-RP* produzierte ab 30 min Induktion mit 1 mM IPTG soviel Gst-PHLDA1, dass es direkt im Coomassiegel sichtbar wurde (siehe Pfeil Abb. 5.6), nicht aber ein Kontrollfusionsprotein Gst-cMuc18 in *E. coli*-Stamm *DH5 α* (cM). Somit konnte das Konstrukt Gst-PHLDA1 in *E. coli*-Stamm *BL21-Codon-PlusTM-RP* für einen präparativen Ansatz zur Herstellung von größerer Menge an Gst-PHLDA1 verwendet werden (siehe Kap. 5.6.10).

5.6.10 Reinigung von heterolog exprimierten Gst-Fusionsproteinen

Um PHLDA1 als Gst-Fusionsprotein anzureichern und zu reinigen wurde PHLDA1 in den bakteriellen Expressionsvektor pGEX4T kloniert (siehe Kap. 5.5.7.4) und in *E. coli* Stamm *BL21-Codon-PlusTM-RP* transformiert. Es wurden 100 ml Übernachtskultur in LB (100 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol) angesetzt und bei 30°C, 200 Upm geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde die Kultur mit ca. 500 ml LB_{amp/Can} auf eine OD₆₀₀ von 0,4 verdünnt und 90 min bei 30°C und 200 Upm geschüttelt. Es wurde mit 1 mM IPTG induziert und für 2 h bei 30°C und 200 Upm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie in Kap. 5.6.3 beschrieben, lysiert.

Gst-Fusionsproteine können in einem Einschnitt-Verfahren mit *Gluthathion-SepharoseTM 4B beads* (GS-beads) aufgereinigt werden. 665 µl der GS-beads wurden zweimal mit je 8 ml kaltem PBS gewaschen, 3 min bei 500 g und 4°C abzentrifugiert und anschließend mit 500 µl PBS versetzt. Dadurch erhält man 1 ml einer 50%igen GS-bead-Lösung, die für die Bindung von ca. 2,5 mg Gst-Fusionsprotein ausreicht, wobei etwa 2,5 µg Fusionsprotein/ml Medium in pGEX4T produziert wird. Die GS-bead-Lösung wurde mit dem *E. coli*-Zelllysate für 3 h bei 4°C auf einem Rollmischer inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit je 10 ml kaltem PBS gewaschen. Das Gst-Fusionsprotein wurde durch die Zugabe von 500 µl Elutionspuffer (10 mM reduziertes Glutathion, 50 mM Tris-HCl pH 8,0), 10 min Inkubation auf dem Rollmischer bei 4°C und 3 min Zentrifugation eluiert. Die Elution wurde zweimal wiederholt und die 3 Eluate vereinigt. Das gebildete Gst-Fusionsprotein kann direkt durch Coomassie Färbung (siehe Kap. 5.6.6) nach der SDS-PAGE (siehe Kap. 5.6.5) sichtbar gemacht werden (siehe auch Abb. 5.6).

5.6.11 Gst-Binde-Experimente (*Gst pull down*)

Um mit einem bestimmten Protein einen bisher unbekannt Interaktionspartner zu finden, kann man *Gst pull down*-Experimente durchführen. Dazu wurde das Gst-Fusionsprotein (Gst-PHLDA1) in *E. coli* exprimiert und gereinigt (siehe Kap. 5.6.10) und anschließend mit biotinyliertem Mammalia-Zelllysate inkubiert. Bindende Proteine können dann mit einem Anti-Biotin-AK oder Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin nachgewiesen werden, aus dem Gel ausgeschnitten werden und durch Proteinmikrosequenzierung identifiziert werden.

Ca. 1×10^6 Mammalia-Zellen wurden geerntet und lysiert (siehe Kap. 5.6.1) und zur Biotinylierung mit 30 μ l D-Biotinoyl- ϵ -aminocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester versetzt und für 1 h bei 4°C auf dem Rollmischer inkubiert. Die Reaktion wurde durch 15 min Inkubation bei 4°C mit 30 μ l Stoppuffer (25 mM Tris, 200 mM Glycin) beendet. Dann wurde das Lysat mit 80 μ l 50%iger Pferdeserum-Sepharose vorinkubiert, um unspezifisch an Sepharose bindende Proteine zu absorbieren und für 1 h bei 4°C auf dem Rollmischer inkubiert. Die Sepharose wurde abzentrifugiert und der Vorgang noch zweimal mit Pferdeserum-Sepharose wiederholt. Anschließend wurde 10 μ g Gst-Fusionsprotein zugegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Rollmischer inkubiert. Es wurden 200 μ l einer 50%igen, in PBS äquilibrierten GS-bead-Lösung zugegeben und wie in Kap. 5.6.10 beschrieben das Gst-Fusionsprotein gereinigt. Das so gereinigte Gst-Fusionsprotein mit potentiellm Interaktionspartner wurde einer SDS-PAGE unterzogen (siehe Kap. 5.6.5), auf Nitrozellulosemembran geblottet (siehe Kap. 5.6.7) und mitpräzipitierte Proteine mit Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin detektiert.

5.6.12 Koimmunpräzipitation

Um die Protein-Protein-Interaktionen von zwei bekannten Proteinen in Mammalia-Zellen nachzuweisen, wurden Koimmunpräzipitations-Experimente durchgeführt. Dazu wurden die Expressionsplasmide der beiden potentiellen Interaktionspartner in dieselbe Zelllinie kotransformiert (siehe Kap. 5.2.4.1) und die Zellen nach 48 oder 72 h lysiert (siehe Kap. 5.6.1). Dann wurde ein Proteininteraktionspartner präzipitiert, gewaschen und eine SDS-PAGE (siehe Kap. 5.6.5) durchgeführt und im anschließenden Westernblot (siehe Kap. 5.6.7) mittels Immundetektion (siehe Kap. 5.6.8) auf Mitpräzipitation des potentiellen Interaktionspartners geprüft. Dies erfolgte über monoklonale Antikörper gegen die Proteine oder gegen den *Tag* der Proteine. Die Präzipitation erfolgte über die *Tags* der Proteine. Bei Gst-Fusionsproteinen wurde wie unter der in Kap. 5.6.10 beschriebener Reinigung verfahren, jedoch wurden 80 μ l 50%ige GS-bead-Lösung verwendet und dreimal mit je 50 μ l GS-Elutionspuffer eluiert. Die Präzipitation von His-*Tag*-Proteinen erfolgte über *TalonTM Metal Affinity Resin*. Dazu wurden 80 μ l 50%ige *Talon-bead*-Lösung mit je 8 ml Mammalia-Lysepuffer (siehe Kap. 4.3) äquilibriert und zu 1×10^6 lysierten Mammalia-Zellen gegeben und für 2 h bei 4°C auf dem Rollmischer inkubiert. Anschließend wurde dreimal für je 10 min bei 4°C mit 5 ml Mammalia-Lysepuffer gewaschen. Das His-Fusionsprotein wurde durch Zugabe von 50 μ l Elutionspuffer (50 mM

Imidazol in 10 mM Tris pH 8,0) durch 10 min Inkubation auf dem Rollmischer bei 4°C und anschließender Zentrifugation für 3 min bei 1800 Upm und 4°C eluiert. Die Elution wurde zweimal wiederholt und die drei Eluate vereinigt.

5.7 Immunologische Methoden

5.7.1 Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen PHLDA1

5.7.1.1 Immunisierung

Um monoklonale Anti-PHLDA1-Antikörper zu erhalten, wurde eine männliche CB6F1 Maus mit 100 µg rekombinantem Gal4-PHLDA1 aus *S. cerevisiae* immunisiert. 8 Wochen später und daraufhin noch einmal 6 Wochen später wurde mit jeweils 100 µg rekombinantem Gst-PHLDA1 aus *E. coli* immunisiert.

5.7.1.2 Fusion von Milz- und Maus-Myelomzellen

Drei Tage nach der letzten Immunisierung wurde der Maus die Milz entfernt und daraus mit Hilfe eines Teflon-Pistels eine Einzelzellsuspension hergestellt. Ein Drittel der Milzzellen wurden mit der Maus-Myelomzelllinie X63Ag8.653 fusioniert, die restlichen Zellen wurden weggefroren. Die Maus-Myelomzelllinie sezerniert keine leichten und schweren Ketten und ist HGPRT defizient. Die Zellen wurden in einem 50 ml Röhrchen 1:1 gemischt und zweimal mit serumfreiem Medium gewaschen. Anschließend wurden 0,7 ml einer 37°C warmen PEG-6000-Lösung (siehe Kap. 4.2.1) mit einer Plastikpipette innerhalb einer Minute tropfenweise zugegeben und das Zellpellet vorsichtig aufgerührt. Es wurde 1 min bei RT und 350 g zentrifugiert und anschließend 10 ml DMEM-Medium (siehe Kap. 4.1.13) tropfenweise unter Drehen des Röhrchen innerhalb von 5 min zugegeben. Nach Zugabe von weiteren 10 ml DMEM-Medium wurde das Röhrchen leicht geschüttelt bis die PEG-Lösung ganz mit dem Medium vermischt war. Es wurde 10 min mit 350 g zentrifugiert, das Zellpellet in 4 ml HAT-Medium (siehe Kap. 4.2.1) aufgenommen und auf 4 bis 5 96-Lochplatten verteilt. Das Wachstum von Hybridomklonen wurde regelmäßig mit dem Mikroskop in allen Löchern überprüft. Das Medium wurde regelmäßig gewechselt und die Hybridomüberstände im ELISA auf das Vorhandensein von Anti-PHLDA1-AK getestet (siehe Kap. 5.7.1.3).

5.7.1.3 Test der Hybridomüberstände im ELISA

Um die AK in den Hybridomüberständen auf eine Reaktivität gegenüber PHLDA1 zu testen, wurde ein ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) durchgeführt. Eine PVC 96-Lochplatte wurde mit je 50 µl rekombinantem Gst-PHLDA1-Protein/Loch (20 µg/ml in PBS) beschichtet und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde je 200 µl 0,1% Gelatine-PBS zugegeben und für eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Die Platte wurde fünfmal mit 0,05% Tween-PBS gewaschen, anschließend 50 µl des Hybridomüberstandes zugegeben und wieder 1 h bei RT inkubiert. Es wurde fünfmal mit 0,05% Tween-PBS gewaschen und 50 µl des Streptavidin-Peroxidase gekoppelten zweiten AK (Kaninchen-Anti-Maus-POD, 1:200 verdünnt, siehe Kap. 4.1.6) und wiederum 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde zehnmal mit 0,05% Tween-PBS gewaschen und 50 µl frisch hergestellte Substratlösung (siehe Kap. 4.3) zugegeben. Nach etwa 10 min waren positive AK-Reaktionen durch eine tief orange Färbung zu sehen. Positive Hybridomüberstände wurden darauf getestet nicht gegen ein anderes Gst-Fusionsprotein (Gst-cMuc18) zu reagieren und kloniert.

5.7.1.4 Isotypbestimmung der monoklonalen Antikörper

Die Isotypbestimmung wurde mit dem *Mab-based mouse Ig isotyping-kit* durchgeführt. Dabei wurden jeweils 50 µl Isotyp-spezifischer Ratten-Anti-Maus-AK zum Beschichten von ELISA-Platten verwendet. Nach 1 h Inkubation wurde die ELISA-Platte fünfmal mit 0,05% Tween-PBS gewaschen und dann für 20 min mit 1% BSA-PBS geblockt. Es wurden je 50 µl der Hybridomüberstände zugegeben, für 1 h inkubiert und anschließend fünfmal mit 0,05% Tween-PBS gewaschen. Es wurden je 50 µl polyklonales Ratten-Anti-Maus-Serum zugegeben, das mit alkalischer Phosphatase konjugiert war, für 1 h inkubiert und anschließend wieder 5x mit 0,05% Tween-PBS gewaschen. Es wurden je 50 µl der mitgelieferten Substratlösung zugegeben und für ca. 30 min bei 37°C inkubiert. Positive Reaktionen entwickelten eine gelbe Farbe, negative blieben farblos.

5.7.2 Immunhistochemie

Gewebeschnitte oder Zytospinpräparate wurden nach Lagerung bei -80°C zuerst 1 h bei RT getrocknet und dann 5 min in 100% Azeton fixiert. Das Gewebe bzw. die Zellen wurden mit einem Fettstift umrandet, damit die AK nicht verlaufen. Alle weiteren Arbeiten

wurden in einer feuchten Färbekammer durchgeführt. Es wurde 15 min mit aggregiertem humanen IgG (100 µg/ml in PBS, siehe Kap. 4.3) geblockt um eine unspezifische AK-Bindung an die Fc-Rezeptoren zu blockieren. Der Überschuß an Blockierlösung wurde abgeklopft. Der erste Antikörper (siehe Kap. 4.1.7 für die Verdünnungen) wurde mit 100 µg/ml aggregiertem IgG versetzt und 1h auf den Schnitten inkubiert. Es wurde dreimal mit PBS in einer Färbeküvette gewaschen. Der zweite, biotinylierte AK (*HISTOSTAINTM-Plus Biotinylated Broad Spectrum Antibody*) wurde 1:1 in 1% BSA-PBS verdünnt und 20 min inkubiert und anschließend erneut dreimal mit PBS gewaschen. Streptavidin Peroxidase (500 U/ml) wurde 1:500 in 1%-BSA-PBS verdünnt und 15 min auf den Schnitten inkubiert und wieder dreimal mit PBS gewaschen. Die Färbung erfolgte 5 min mit Carbazol-Lösung (siehe Kap. 4.3) in einer Färbeküvette bei 25°C im Wasserbad. Anschließend wurde dreimal mit H₂O gewaschen und 1 min mit Hämatoxylin-Lösung gegengefärbt. Die Schnitte wurden getrocknet und mit *Kaisers*-Glyzeringelatine eingedeckelt. Die gefärbten Schnitte/Zellen wurden im Dunkeln aufbewahrt. Die Gewebeschnitte wurden mit dem Lichtmikroskop ausgewertet und fotografisch dokumentiert.

Da von den Geweben serielle Schnitte angefertigt wurden, konnten die Serien mit verschiedenen ersten Antikörpern inkubiert werden, um die einzelnen Zellpopulationen zu lokalisieren. So wurden alle melanozytären Läsionen mit einem Anti-Proteoglykan-AK inkubiert, der sowohl Nävi als auch Melanome, nicht aber epidermale Melanozyten anfärbte. Dieses Färbemuster wurde mit dem des Anti-PHLDA1-AK RN6e2 und der Färbung von Lymphozyten mit dem Anti CD45-AK Hb12 verglichen. Zusätzlich wurden Isotypkontrollen verwendet, die eine andere Spezifität (nicht auf dem Gewebe vorhanden), aber den gleichen Isotyp wie die monoklonalen AK besaßen. Mit der Isotypkontrolle kann man die unspezifische Bindung unter anderem an Fc-Rezeptoren nachweisen und dann gegebenenfalls abblocken.

5.7.3 Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz können Oberflächen- und zytoplasmatische Antigene durch Bindung eines spezifischen Antikörpers und dessen Detektion mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten zweiten Antikörpers nachgewiesen werden (indirekte Immunfluoreszenz). Die direkte Immunfluoreszenz, bei der der erste AK direkt mit dem fluoreszenzmarkierten Substrat gekoppelt ist, wurde hier nicht verwendet. Wichtig ist bei

der Oberflächenimmunfluoreszenz von lebenden Zellen die Verwendung von 0,1% NaN_3 in den Lösungen, um eine Polarisation der Antigene (*Capping*) zu vermeiden.

5.7.3.1 Immunfluoreszenz von Oberflächenantigenen

Ca. 10^5 Zellen wurden einmal in PBS gewaschen. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten im Eppendorfgefäß, 3 min bei 500 g und 4°C. Dann wurde mit 100 μl des ersten AK für 45 min inkubiert (siehe Kap. 4.1.7 für die Verdünnungen der AK). Es wurde dreimal mit je 1 ml kaltem 0,1% NaN_3 -PBS gewaschen. Mit 50 μl des zweiten Antikörpers (Kaninchen-Anti-Maus FITC-konjugiert (siehe Kap. 4.1.6) wurde 25 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Es wurde wieder dreimal mit 0,1% NaN_3 -PBS gewaschen, das Zellpellet in 150 μl 1%iger Paraformaldehydlösung aufgenommen und im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt. Die Auswertung erfolgt im Fluoreszenzmikroskop oder im FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) (siehe Kap. 5.7.3.4).

5.7.3.2 Zytoplasmatische Immunfluoreszenz

Um Antigene im Zytoplasma nachweisen zu können, müssen die Zellen permeabilisiert werden, damit die Antikörper aufgenommen werden können. Dazu wurde das *Fix & Perm Kit* verwendet. 10^5 Zellen wurden einmal in PBS gewaschen und dann 15 min mit 100 μl der mitgelieferten Fixierlösung (Medium-A) bei RT inkubiert. Die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen. 50 μl des ersten AK's wurden mit 50 μl Permeabilisierungslösung (Medium-B) gemischt und 20 min mit den Zellen bei RT inkubiert. Es wurde dreimal mit kaltem 0,1% NaN_3 -PBS gewaschen. Die Inkubation des zweiten AK und die weitere Behandlung der Zellen erfolgte wie bei der Oberflächenimmunfluoreszenz (Kap. 5.7.3.1).

5.7.3.3 Auswertung im Fluoreszenzmikroskop

10 μl der gefärbten Zellen (siehe Kap. 5.7.3.1 und Kap. 5.7.3.2) wurden auf einen Objektträger getropft, mit einem Deckglas abgedeckt und unter einem Fluoreszenzmikroskop bei 495 nm betrachtet. Verglichen wurde die Färbeintensität von spezifischen Antikörper mit der von der Isotypkontrolle.

Aufnahmen zur Lokalisation von PHLDA1 in den Zellen wurden mit dem Epifluoreszenzmikroskop *DURAXA* gemacht. Dazu wurden die Objektträger für 10 min mit 200 μl Poly-L-Lysin (1 mg/ml) beschichtet. Anschließend wurden 100 μl der gefärbten

Zellen (siehe Kap. 5.7.3.2) zugegeben und 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Es wurde zweimal mit PBS gewaschen und 3 min mit DAPI (1 µg/ml in PBS) gegengefärbt, anschließend wurde noch zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit *Antifade* (siehe Kap. 4.3) eingedeckelt. Die Aufnahmen im Fluoreszenzmikroskop wurden mit FITC- und DAPI-Filter gemacht. Zur Auswertung wurde die *QFluoro*-Software Version 1.0-A von Leica verwendet.

5.7.3.4 Auswertung im FACScan

Zur Quantifizierung der Immunfluoreszenz wurden jeweils 10000 Einzelzellen, die mit den Protokollen der Oberflächen- (siehe Kap. 5.7.3.1) und zytoplasmatischen Immunfluoreszenz (siehe Kap. 5.7.3.2) gefärbt wurden, im *FACScan* gemessen und mit der *CellQuestTM*-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 spezifischem Antikörper und dem *mean channel* der Isotypkontrolle.

5.7.4 Annexin-V-Bindung

Zellen im frühen Apoptosestadium können durch einen Annexin-V-Bindungsassay nachgewiesen werden. Zu Beginn der Apoptose wird Phosphatidylserin von der inneren zur äußeren Seite der Zytoplasmamembran gebracht. Dies kann man durch FITC-markiertes Annexin-V nachweisen, das unter Ca^{2+} -Ionen mit hoher Affinität an Phosphatidylserin bindet und somit die apoptotischen Zellen für die FACS-Analyse zugänglich macht (Kowaltowski *et al.*, 2001). Um die apoptotischen Zellen von nekrotischen Zellen unterscheiden zu können, wurden die Zellen zusätzlich mit Propidiumjodid gefärbt. Bei nekrotischen Zellen ist die Zytoplasmamembran zerstört, dadurch nehmen die Zellen den Farbstoff auf, der dann die DNA anfärbt. Sie sind somit Annexin-V-FITC und Propidiumjodid positiv, dagegen sind apoptotische Zellen Annexin-V-FITC positiv und Propidiumjodid negativ.

Die Annexin-V-Färbung wurde mit dem *Apoptosis Detection Kit-Annexin V-FITC* durchgeführt. Es wurden ca. 1×10^6 Zellen 7 min bei 400 g abzentrifugiert, einmal in PBS gewaschen und das Pellet in 100 µl des mitgelieferten Bindepuffers resuspendiert. Es wurden 5 µl der Annexin-V-Lösung und 2 µl Propidiumjodidlösung (50 µg/ml) zugegeben und 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Als Kontrollen versetzte man die Zellen

entweder nur mit Bindepuffer, Propidiumjodid oder Annexin-V-FITC. Anschließend wurden 150 µl Bindepuffer zugegeben und innerhalb einer Stunde im FACS gemessen.

In der FACS-Auswertung muss man den Anteil an Propidiumjodid negativen und Annexin-V-FITC positiven Zellen erfassen. Von den Zellen nimmt man FITC-Färbung (FL1-H) auf und trägt sie im Dot-Blot gegen die Propidiumjodid-Färbung (FL3-H) auf. Anschließend setzt man Quadranten (*gates*), mit denen man 1) die Autofluoreszenz (unbehandelte Zellen) 2) die toten Zellen (nur FL3-H, also Propidiumjodid positiv) und 3) die Annexin-V positiven Zellen (FL1-H) erfasst. Die so erstellten Quadranten überträgt man auf den Dot-Blot der Doppelfärbung und ermittelt den Prozentsatz an apoptotischen Zellen, die Annexin-V positiv und Propidiumjodid negativ sind.

5.7.5 Apoptoseinduktion mit Doxorubicin

Doxorubicin ist ein Chemotherapeutikum, das in die DNA der zu behandelten Zellen interkaliert und Apoptose auslöst. Um die Wirkung von Doxorubicin auf PHLDA1 und Kontroll-Transfektanten zu bestimmen, plattierte man die Transfektanten am Vortag der Analyse aus, sodass sie am nächsten Tag zu ca. 60-80% konfluent wuchsen und versetzte sie mit 1 µg/ml Doxorubicin. Nach 24 h Inkubation führte man die Annexin-V Färbung durch (siehe Kap. 5.7.4). Dabei konnte keine Propidiumjodid-Färbung durchgeführt werden, da sowohl Propidiumjodid als auch Doxorubicin in die DNA interkaliert und bei FL3-H fluoresziert. Somit ist es nicht möglich auf lebende Zellen zu *gaten*. Es ist nur eine Untersuchung der Gesamtpopulation der Transfektanten möglich. Dennoch sollte ein Unterschied zwischen den Neomycinvektor-Kontrolltransfektanten und den PHLDA1-Transfektanten zu beobachten sein, wenn PHLDA1 eine Rolle auf die Apoptosesensitivität gegenüber Chemotherapeutika hat.

5.7.6 TUNEL-Assay

Mit dem TUNEL-Assay (TdT-mediated dUTP nick end labeling) lassen sich ebenfalls apoptotische Zellen identifizieren. Die DNA wird während der Apoptose durch die DNase CAD (*caspase-activated DNase*) fragmentiert, die mit dem TUNEL-Assay nachgewiesen werden können. Dabei hängt das Enzym Terminale Deoxynukleotidyl-Transferase (TdT) fluoreszenzmarkierte Nukleotide (dUTP-FITC) an die 3'-OH-Fragmentenden der DNA an,

wodurch die so markierten apoptotischen Zellen im FACS gemessen und quantifiziert werden können.

Der *TUNEL*-Assay wurde mit dem *In Situ Cell-Death Detection-Kit, Fluorescein*[®] durchgeführt. Es wurden 1×10^7 Zellen bei 400 g für 7 min abzentrifugiert und zweimal in 1% BSA-PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden die Zellen in 100 µl frisch angesetzter 4%iger Paraformaldehyd-PBS-Lösung resuspendiert und 1 h bei RT inkubiert. Dabei wurden die Zellen einige Male resuspendiert. Es wurde einmal in 1% BSA-PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl 0,1% Triton-X-100, 0,1% Natriumzitat, 1% BSA-PBS für 5 min auf Eis permeabilisiert. Es wurde zweimal mit 1% BSA-PBS und einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen zur Markierung mit 45 µl der mitgelieferten Fluorescein-dUTP-Lösung und 5 µl der TdT-Lösung versetzt (bei der Negativkontrolle wurde nur mit 50 µl Fluorescein-dUTP-Lösung versetzt) und 1 h im Zellkultur-Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 1% BSA-PBS und einmal mit PBS gewaschen und in 150-200 µl 1% BSA-PBS aufgenommen.

5.7.7 Zellzyklusanalysen

Zur Bestimmung des Zellzyklusses wurden die Zellen mit Propidiumjodid gefärbt, das als Fluoreszenzfarbstoff in die DNA interkaliert. Dadurch werden die Zellen für eine Messung und Auswertung mit dem FACS zugänglich und es lässt sich die Menge der DNA pro Zellen quantifizieren, wodurch man bestimmen kann ob sich die Zellen in G_0G_1 -, in der S- oder G_2 -Phase des Zellzyklusses befinden.

Die Zellen wurden einen Tag vor Beginn des Experimentes gesplittet, sodass sie zu Beginn ca. 60-80% konfluent wuchsen. Die Zellen wurden gezählt und anschließend für jeden Messtag 3×10^5 Zellen pro Loch einer 6-Lochplatte ausplattiert. Nach jeweils 24 h, 48h und 72 h wurden die Zellen geerntet, zweimal in Glukose-PBS (siehe Kap. 4.3) gewaschen, gezählt und auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden sie in ein 15 ml Röhrchen (*red-cup*) gegeben, 7 min bei 400 g abzentrifugiert, das Pellet 10 s gevortext und tropfenweise in 1 ml eiskaltem 70%igen Ethanol aufgenommen. Die Zellen wurden mindestens für 24 h bei 4°C in Ethanol gelassen und anschließend gefärbt. Dazu wurden die Zellen kurz gevortext, 0,5 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und 5 min bei 3000 Upm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Nach kurzem vortexen wurde 0,5 ml der Propidiumjodidfärbelösung (siehe Kap. 4.3) zugegeben und im Dunkeln für 30 min inkubiert. Innerhalb der nächsten Stunden wurden die Zellen im *FACScalibur* mit der

Software *CellQuest* und dem *doublet discrimination module* aufgenommen. Dabei wurden zusätzlich zur FL-3^H (PJ) auch FL-3^W und FL-3^A gemessen. Beim Analysieren wurden Aggregate ausgegated, indem man einen Dot-Blot von FL-3^W (X-Achse) gegen FL-3^A (Y-Achse) aufnahm und nur die Zellen entlang der Y-Achse in ein Gate und somit in die Auswertung einbezog. Die Zellzyklusparameter wurden mit Hilfe der Software *ModFit* Version 2.0 (Verity Software) ermittelt.

5.8 Computeranalysen

5.8.1 Sequenzalignement mit Genbank DNA-Sequenzen

Zur Analyse von Sequenzhomologien der im *yeast two hybrid screen* gefundenen cDNA-Klone wurde eine *BLAST*[®]-Suche (Basic Local Alignment Search Tool) (*blastn*) am *NCBI*, in Bethesda, USA durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul *et al.*, 1990).

Um für PHLDA1 die exakte chromosomale Lokalisation zu bestimmen, wurde PHLDA1 gegen das humane Genom mit dem *blastn* Algorithmus am *NCBI*, Bethesda, USA, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/HsBlast.html>) alignet.

Um zwei Sequenzen zu vergleichen, wurden die Programme *ALIGN* und *LALIGN* von dem *Institut de Génétique Humaine*, Montpellier, Frankreich (<http://xylian.igh.cnrs.fr/>) verwendet. *ALIGN* eignet sich gut für das Alignment von Sequenzen mit großer Homologie, während *LALIGN* auch kurze Sequenzhomologien auffindet, aber nur den homologen Bereich anzeigt.

5.8.2 Sequenzalignement von Proteinen

Um Proteinsequenzen miteinander zu vergleichen und nach Proteinsequenzhomologien zu suchen, wurde das *Fasta3* Programm vom *EMBL* (<http://www2.ebi.ac.uk/fasta3/>) verwendet.

6 Zusammenfassung

Das Melanom ist aufgrund seiner frühzeitigen und häufigen Metastasierung sowie seiner Resistenz gegenüber Chemotherapeutika einer der bösartigsten Tumoren des Menschen. Trotz dieser großen medizinischen Bedeutung, ist über die molekularen Mechanismen der Tumorigenese und Metastasierung bisher wenig bekannt. Deswegen ist die Identifizierung und Charakterisierung von Genen, die in diesem Prozess eine Rolle spielen, von größter Wichtigkeit.

PHLDA1 (pleckstrin homology-like domain family A member 1) wurde in unserem Labor in einer *mRNA differential display*-Analyse auf der Suche nach Metastasierungs-assoziierten Molekülen im Melanom isoliert. Es ist das humane Homolog zu dem murinen TDAG51, das im Aktivierungs-induzierten Zelltod bei T-Zellen involviert ist. In der vorliegenden Arbeit wurde PHLDA1 charakterisiert und seine Funktion im humanen Melanom beschrieben.

Es wurden sechs monoklonale Antikörper gegen PHLDA1 generiert, charakterisiert und die PHLDA1-Expression in der Westernblot-Analyse, in der Immunfluoreszenzfärbung auf lebenden Zellen, sowie immunhistochemisch auf Gewebebefrierschnitten untersucht. Dabei konnten folgende Resultate erzielt werden:

In 11 untersuchten Zelllinien aus Melanommetastasen war die PHLDA1-Proteinmenge signifikant geringer ($p < 0,0046$) als in 17 Zelllinien aus Melanomprimärtumoren. Die verminderte Expression von PHLDA1 ist somit eine typische Eigenschaft von Zelllinien, die aus Melanommetastasen etabliert wurden.

In normalem Haut- und Lymphknotengewebe war das PHLDA1-Protein nicht zu detektieren. Dagegen konnte in 55 untersuchten melanozytären Läsionen eine PHLDA1-spezifische Färbung nachgewiesen werden. 80% der benignen Nävi, dagegen nur 41% der Primärtumore und 22% der Metastasen zeigten eine starke und gleichmäßige PHLDA1-Expression. Damit bestätigten die *in vivo* gemachten Untersuchungen die Resultate aus den Versuchen mit den Zelllinien und zeigen, dass die PHLDA1-Expression während der Tumorprogression des humanen Melanoms vom Primärtumor bis hin zur Metastase herunterreguliert wird.

Mit den monoklonalen Anti-PHLDA1-Antikörpern konnte PHLDA1 als zytoplasmatisches Protein lokalisiert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der zweite Translationsstartpunkt des offenen Leserahmens von PHLDA1 verwendet wird.

Zur Aufklärung der Funktion von PHLDA1, wurden jeweils vier stabile PHLDA1-Transfektanten und zwei Neomycinvektor-Transfektanten in einer Melanomzelllinie und in einer immortalisierten Epithelzelllinie generiert. Die Analyse der klonierten Transfektanten ergab ein langsames Wachstum der PHLDA1-Transfektanten, eine reduzierte Klonierungseffizienz sowie ein reduziertes Vermögen Kolonien zu bilden. Außerdem zeigten die PHLDA1-Transfektanten während des Wachstums eine stärkere Kontaktinhibition.

Die konstitutive PHLDA1-Expression in den stabilen Transfektanten beeinflusste nicht den Zellzyklus. Dagegen konnte sowohl mit Hilfe der Annexin-V-Bindung sowie mit dem TdT-abhängigen Einbau von FITC-markiertem dUTP (*tunel-assay*) gezeigt werden, dass die basale Apoptoserate in den PHLDA1-Transfektanten erhöht war. Auch die Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin erhöhte die Apoptoserate der PHLDA1-Transfektanten signifikant gegenüber der Neomycinvektor-Transfektanten.

Um Aufschluss darüber zu bekommen auf welchem molekularen Weg PHLDA1 die Apoptose beeinflusst, wurde nach zytoplasmatischen Interaktionspartnern von PHLDA1 im *yeast two hybrid screen* gesucht. Dabei konnten aus $5,6 \times 10^6$ gescreenten Hefeklonen einer Gehirn-, einer Plazenta- und einer Hela-Genbank, zwei Gene isoliert werden, die in Hefe spezifisch mit PHLDA1 interagierten. Bei einem Gen handelte es sich um die p47-Untereinheit des humanen Translationsinitiationsfaktor eIF3, bei dem anderen Gen um das MRG-Gen (mammary-derived growth inhibitor-related gene). Translationsinitiationsfaktoren werden mit der Blockade der Proteinbiosynthese während der Apoptose in Verbindung gebracht und MRG ist als Gen identifiziert worden, dass eine wachstumsreduzierende Wirkung auf Mammakarzinome ausübt. Ob die beiden Proteine auch die physiologischen Bindungspartner von PHLDA1 sind, ist noch nicht eindeutig geklärt.

Das Expressionsmuster von PHLDA1, zusammen mit den funktionellen Ergebnissen, läßt vermuten, dass die starke PHLDA1-Expression in den Nävi für deren gutartigen Charakter mitverantwortlich ist. Im Melanom wird im Verlauf der Tumorprogression die PHLDA1-Expression schrittweise reduziert und korreliert dann mit der zunehmenden Deregulation des Wachstums und der Ausbildung der Apoptoseresistenz. Die Assoziation zwischen der PHLDA1-Expression und Apoptosesensitivität machen PHLDA1 zu einem interessanten Zielgen für die Entwicklung einer effizienteren Chemotherapie beim Melanom.

7 Literaturverzeichnis

- Adams, J.M. and Cory, S.(1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322-1326.
- Akslen, L.A., Monstad, S.E., Larsen, B., Straume, O., and Ogreid, D.(1998). Frequent mutations of the p53 gene in cutaneous melanoma of the nodular type. *Int. J. Cancer* **79**, 91-95.
- Albino, A.P., Juan, G., Traganos, F., Reinhart, L., Connolly, J., Rose, D.P., and Darzynkiewicz, Z.(2000). Cell cycle arrest and apoptosis of melanoma cells by docosahexaenoic acid: association with decreased pRb phosphorylation. *Cancer Res.* **60**, 4139-4145.
- Albino, A.P., Vidal, M.J., McNutt, N.S., Shea, C.R., Prieto, V.G., Nanus, D.M., Palmer, J.M., and Hayward, N.K.(1994). Mutation and expression of the p53 gene in human malignant melanoma. *Melanoma Res.* **4**, 35-45.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J.(1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Anfosso, F., Bardin, N., Frances, V., Vivier, E., Camoin-Jau, L., Sampol, J., and Dignat-George, F.(1998). Activation of human endothelial cells via S-endo-1 antigen (CD146) stimulates the tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase p125(FAK). *J. Biol. Chem.* **273**, 26852-26856.
- 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.
- Aplin, A.E., Howe, A., Alahari, S.K., and Juliano, R.L.(1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol. Rev.* **50**, 197-263.
- Aravind, L. and Ponting, C.P.(1998). Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translation. *Protein Sci.* **7**, 1250-1254.
- Asano, K., Vornlocher, H.P., Richter-Cook, N.J., Merrick, W.C., Hinnebusch, A.G., and Hershey, J.W.(1997). Structure of cDNAs encoding human eukaryotic initiation factor 3 subunits. Possible roles in RNA binding and macromolecular assembly. *J. Biol. Chem.* **272**, 27042-27052.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V.M.(1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-1308.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V.M.(1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **11**, 255-260.
- Bachmann, F., Buechner, S.A., 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, C.M., Houghton, A.N., Sober, A.J., and Soong, S.J.(1998). *Cutaneous Melanoma*, Quality Medical publishing Inc., St. Louis.
- Bardeesy, N., Bastian, B.C., Hezel, A., Pinkel, D., DePinho, R.A., and Chin, L.(2001). Dual inactivation of RB and p53 pathways in RAS-induced melanomas. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 2144-2153.

- Barsky, S.H., Siegal, G.P., Jannotta, F., and Liotta, L.A.(1983). Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab. Invest.* **49**, 140-147.
- Bartel, P., Chien, C.T., Sternglanz, R., and Fields, S.(1993). Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* **14**, 920-924.
- Batzler, W.U., Baumgardt-Elms, C., Eisinger, B., Lehnert, M., Schön, D., Schüz, J., and Stegmaier, C.(1999). *Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends*, Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, Saarbrücken.
- Baylin, S.B. and Herman, J.G.(2000). DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet.* **16**, 168-174.
- Bergers, G. and Coussens, L.M.(2000). Extrinsic regulators of epithelial tumor progression: metalloproteinases. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 120-127.
- Bielka, H., Grosse, R., Bohmer, F., Junghahn, I., and Binas, B.(1986). Inhibition of proliferation of Ehrlich ascites carcinoma cells is functionally correlated with reduced activity of the cytosol to stimulate protein synthesis. *Biomed. Biochim. Acta.* **45**, 441-445.
- Birnbaum, M.J., Clem, R.J., and Miller, L.K.(1994). An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J. Virol.* **68**, 2521-2528.
- Bishop, J.M.(1981). Enemies within: the genesis of retrovirus oncogenes. *Cell* **23**, 5-6.
- Bishop, J.M.(1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell* **64**, 235-248.
- Bishop, J.M.(1996). The discovery of proto-oncogenes. *FASEB J.* **10**, 362-364.
- Block, K.L., Vornlocher, H.P., and Hershey, J.W.(1998). Characterization of cDNAs encoding the p44 and p35 subunits of human translation initiation factor eIF3. *J. Biol. Chem.* **273**, 31901-31908.
- Blomberg, N., Baraldi, E., Nilges, M., and Saraste, M.(1999). The PH superfold: a structural scaffold for multiple functions. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 441-445.
- Blume-Jensen, P. and Hunter, T.(2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**, 355-365.
- Bohmann, D., Bos, T.J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P.K., and Tjian, R.(1987). Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science* **238**, 1386-1392.
- Bohmer, F.D., Mieth, M., Reichmann, G., Taube, C., Grosse, R., and Hollenberg, M.D.(1988). A polypeptide growth inhibitor isolated from lactating bovine mammary gland (MDGI) is a lipid-carrying protein. *J. Cell. Biochem.* **38**, 199-204.
- Breslow, A.(1970). Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann. Surg.* **172**, 902-908.
- Buck, C.(1995). *The molecular basis of cancer* (Mendelsohn, J., Howley, P., Israel, M., and Liotta, L., Eds.) W.B.Saunders, 172-205.
- Bullani, R.R., Huard, B., Viard-Leveugle, I., Byers, H.R., Irmeler, M., Saurat, J.H., Tschopp, J., and French, L.E.(2001). Selective expression of flip in malignant melanocytic skin lesions. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 360-364.

- Bushell, M., McKendrick, L., Janicke, R.U., Clemens, M.J., and Morley, S.J.(1999). Caspase-3 is necessary and sufficient for cleavage of protein synthesis eukaryotic initiation factor 4G during apoptosis. *FEBS Lett.* **451**, 332-336.
- Bushell, M., Wood, W., Clemens, M.J., and Morley, S.J.(2000). Changes in integrity and association of eukaryotic protein synthesis initiation factors during apoptosis. *Eur. J. Biochem.* **267**, 1083-1091.
- Cantley, L.C. and Neel, B.G.(1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**, 4240-4245.
- Carmichael, D.F., Sommer, A., Thompson, R.C., Anderson, D.C., Smith, C.G., Welgus, H.G., and Stricklin, G.P.(1986). Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **83**, 2407-2411.
- Carstens, C. and Waesche, A.(2000). Codon Bias-Adjusted BL21 Derivatives for Protein Expression. *Strategies* **12**, 49-51.
- Castresana, J.S., Rubio, M.P., Vazquez, J.J., Idoate, M., Sober, A.J., Seizinger, B.R., and Barnhill, R.L.(1993). Lack of allelic deletion and point mutation as mechanisms of p53 activation in human malignant melanoma. *Int. J. Cancer* **55**, 562-565.
- Cavenee, W.K., Dryja, T.P., Phillips, R.A., Benedict, W.F., Godbout, R., Gallie, B.L., Murphree, A.L., Strong, L.C., and White, R.L.(1983). Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* **305**, 779-784.
- Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R., and Fields, S.(1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **88**, 9578-9582.
- Chin, L., Pomerantz, J., and DePinho, R.A.(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, J.W., and DePinho, R.A.(1997). Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility in vivo. *Genes Dev.* **11**, 2822-2834.
- Christofori, G. and Semb, H.(1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 73-76.
- Clark, E.A., Golub, T.R., Lander, E.S., and Hynes, R.O.(2000). Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* **406**, 532-535.
- Clark, W.H.J., Elder, D.E., Guerry, D., Epstein, M.N., Greene, M.H., and Van Horn, M.(1984). A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum. Pathol.* **15**, 1147-1165.
- Comings, D.E.(1973). A general theory of carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **70**, 3324-3328.
- Coussens, L.M. and Werb, Z.(1996). Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem. Biol.* **3**, 895-904.
- Danen, E.H., van Kraats, A.A., Cornelissen, I.M., Ruiter, D.J., 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.
- DePinho, R.A.(1998). Transcriptional repression. The cancer-chromatin connection. *Nature* **391**, 533-536.

- Di Cunto, F., Topley, G., Calautti, E., Hsiao, J., Ong, L., Seth, P.K., and Dotto, G.P.(1998). Inhibitory function of p21Cip1/WAF1 in differentiation of primary mouse keratinocytes independent of cell cycle control. *Science* **280**, 1069-1072.
- Downward, J.(1998). Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 262-267.
- Duesberg, P.H. and Vogt, P.K.(1970). Differences between the ribonucleic acids of transforming and nontransforming avian tumor viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **67**, 1673-1680.
- Elder, D.E., Greene, M.H., and Bondi E.E.(1981). *Pathology of malignant melanoma*, Masson Publications, New York.
- Essner, R., Kuo, C.T., Wang, H., Wen, D.R., Turner, R.R., Nguyen, T., and Hoon, D.S.(1998). Prognostic implications of p53 overexpression in cutaneous melanoma from sun-exposed and nonexposed sites. *Cancer* **82**, 309-316.
- Evan, G. and Littlewood, T.(1998). A matter of life and cell death. *Science* **281**, 1317-1322.
- Evan, G.I. and Vousden, K.H.(2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* **411** , 342-348.
- Exton, J.H.(1998). Small GTPases minireview series. *J. Biol. Chem.* **273**, 19923
- Fedi, P., Tronick, S., and Aaronson, S.(1997). *Growth factors in cancer medicine*,
- Feilotter, H.E., Hannon, G.J., Ruddell, C.J., and Beach, D.(1994). Construction of an improved host strain for two hybrid screening. *Nucleic Acids Res.* **22**, 1502-1503.
- Fidler, I.J. and Hart, I.R.(1982). Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science* **217**, 998-1003.
- Fields, S. and Song, O.(1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Finlay, C.A., Hinds, P.W., and Levine, A.J.(1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* **57**, 1083-1093.
- Flick, J.S. and Johnston, M.(1990). Two systems of glucose repression of the GAL1 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 4757-4769.
- Foulds, L.(1954). *The Experimental Study of Tumor Progression*, Academic Press, London.
- Frank, D., Mendelsohn, C.L., 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, J.M., Blay, P., MacDonald, N.J., Manrow, R.E., and Steeg, P.S.(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, J.M., MacDonald, N.J., and Steeg, P.S.(1998). Nm23 and tumour metastasis: basic and translational advances. *Biochem. Soc. Symp.* **63**, 261-271.
- Friedman, R.J., Heilman, E.R., Rigel, D.S., and Kopf, A.W.(1985). The dysplastic nevus. Clinical and pathologic features. *Dermatol. Clin.* **3**, 239-249.
- Frisch, S.M. and Francis, H.(1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell. Biol.* **124**, 619-626.

- Gehring, W.J., Affolter, M., and Burglin, T.(1994). Homeodomain proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 487-526.
- Giancotti, F.G. and Ruoslahti, E.(1990). Elevated levels of the alpha 5 beta 1 fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells. *Cell* **60**, 849-859.
- Giancotti, F.G. and Ruoslahti, E.(1999). Integrin signaling. *Science* **285**, 1028-1032.
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R.A., and Schiestl, R.H.(1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic. Acids. Res.* **20**, 1425
- Gomes, I., Xiong, W., Miki, T., and Rosner, M.R.(1999). A proline- and glutamine-rich protein promotes apoptosis in neuronal cells. *J. Neurochem.* **73**, 612-622.
- Grant, S.W., Kyshtoobayeva, A.S., Kurosaki, T., Jakowatz, J., and Fruehauf, J.P.(1998). Mutant p53 correlates with reduced expression of thrombospondin-1, increased angiogenesis, and metastatic progression in melanoma. *Cancer. Detect. Prev.* **22**, 185-194.
- Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M., and Harris, C.C.(1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer. Res.* **54**, 4855-4878.
- Greene, M.H.(1999). The genetics of hereditary melanoma and nevi. 1998 update. *Cancer* **86**, 2464-2477.
- Greene, M.H., Clark, W.H.J., Tucker, M.A., Kraemer, K.H., Elder, D.E., and Fraser, M.C.(1985). High risk of malignant melanoma in melanoma-prone families with dysplastic nevi. *Ann. Intern. Med.* **102**, 458-465.
- Griffith, T.S., Chin, W.A., Jackson, G.C., Lynch, D.H., and Kubin, M.Z.(1998). Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J. Immunol.* **161**, 2833-2840.
- Grossman, D., Kim, P.J., Schechner, J.S., and Altieri, D.C.(2001). Inhibition of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**, 635-640.
- Grossman, D., McNiff, J.M., Li, F., and Altieri, D.C.(1999). Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **113**, 1076-1081.
- Hall, M. and Peters, G.(1996). Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv. Cancer. Res.* **68**, 67-108.
- Hanahan, D.(1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A.(2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J.(1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-816.
- Hengartner, M.O.(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.
- Hinds, P.W., Mitnacht, S., Dulic, V., Arnold, A., Reed, S.I., and Weinberg, R.A.(1992). Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* **70**, 993-1006.

- 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, R.O., Gill, G., Chen, J.L., Dynlacht, B.D., and Tjian, R.(1993). Molecular cloning and functional analysis of Drosophila TAF110 reveal properties expected of coactivators. *Cell* **72**, 247-260.
- Howe, H.L., Wingo, P.A., Thun, M.J., Ries, L.A., Rosenberg, H.M., Feigal, E.G., and Edwards, B.K.(2001). Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. *J. Natl. Cancer. Inst.* **93**, 824-842.
- Hunter, T.(2000). Signaling--2000 and beyond. *Cell* **100**, 113-127.
- Hussussian, C.J., Struewing, J.P., Goldstein, A.M., Higgins, P.A., Ally, D.S., Sheahan, M.D., Clark, W.H.J., Tucker, M.A., and Dracopoli, N.C.(1994). Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat. Genet.* **8**, 15-21.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E., and Tschopp, J.(1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**, 190-195.
- Ishizaki, Y., Cheng, L., Mudge, A.W., and Raff, M.C.(1995). Programmed cell death by default in embryonic cells, fibroblasts, and cancer cells. *Mol. Biol. Cell* **6**, 1443-1458.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A.(1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163-168.
- James, P., Halladay, J., and Craig, E.A.(1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-1436.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.(2001). *Immunobiology*, 5 edition. Garland Publishing, New York.
- Jansen, B., Schlagbauer-Wadl, H., Brown, B.D., Bryan, R.N., van Elsas, A., Muller, M., Wolff, K., Eichler, H.G., and Pehamberger, H.(1998). bcl-2 antisense therapy chemosensitizes human melanoma in SCID mice. *Nat. Med.* **4**, 232-234.
- Jansen, B., Wacheck, V., Heere-Ress, E., Schlagbauer-Wadl, H., Hoeller, C., Lucas, T., Hoermann, M., Hollenstein, U., Wolff, K., and Pehamberger, H.(2000). Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL2 antisense therapy. *Lancet* **356**, 1728-1733.
- Jimbow, K., Roth, S.I., Fitzpatrick, T.B., and Szabo, G.(1975). Mitotic activity in non-neoplastic melanocytes in vivo as determined by histochemical, autoradiographic, and electron microscope studies. *J. Cell. Biol.* **66**, 663-670.
- Johnson, D.G., Schwarz, J.K., Cress, W.D., and Nevins, J.R.(1993). Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* **365**, 349-352.
- Johnson, J.P.(1999). Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* **18**, 345-357.
- Jones, P.A.(2001). Cancer. Death and methylation. *Nature* **409**, 141, 143-141, 144.

- Kamijo, T., Weber, J.D., Zambetti, G., Zindy, F., Roussel, M.F., and Sherr, C.J.(1998). Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**, 8292-8297.
- Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M.F., Quelle, D.E., Downing, J.R., Ashmun, R.A., Grosveld, G., and Sherr, C.J.(1997). Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* **91**, 649-659.
- Kasof, G.M. and Gomes, B.C.(2001). Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J. Biol. Chem.* **276**, 3238-3246.
- Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K.J., and Ashkenazi, A.(2000). Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* **12**, 611-620.
- Knudson, A.G.(1993). Antioncogenes and human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **90**, 10914-10921.
- Ko, L.J. and Prives, C.(1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* **10**, 1054-1072.
- Kolanus, W., Nagel, W., Schiller, B., Zeitlmann, L., Godar, S., Stockinger, H., and Seed, B.(1996). Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell* **86**, 233-242.
- Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., and Vercesi, A.E.(2001). Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett.* **495**, 12-15.
- Kozak, M.(1978). How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell* **15**, 1109-1123.
- Kozak, M.(1981). Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res.* **9**, 5233-5262.
- Kozak, M.(1984). Selection of initiation sites by eucaryotic ribosomes: effect of inserting AUG triplets upstream from the coding sequence for preproinsulin. *Nucleic Acids Res.* **12**, 3873-3893.
- Kozak, M.(1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**, 283-292.
- Kozak, M.(1999). Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* **234**, 187-208.
- Krammer, P.H.(2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**, 789-795.
- Kuske, M. D. Identifizierung und Charakterisierung von Phrip, einem differentiell exprimierten Gen in autologen Primärtumor- und Metastasezelllinien. (1998). Doktorarbeit an der Fakultät für Biologie der LMU-München.
- Kuske, M.D. and Johnson, J.P.(2000). Assignment of the human PHLDA1 gene to chromosome 12q15 by radiation hybrid mapping. *Cytogenet. Cell Genet.* **89**, 1
- LaCasse, E.C., Baird, S., Korneluk, R.G., and MacKenzie, A.E.(1998). The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* **17**, 3247-3259.
- Laemmli, U.K.(1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lane, D.P.(1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15-16.
- Lau, L.F. 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.

- Lee, C.H., Li, W., Nishimura, R., Zhou, M., Batzer, A.G., Myers, M.G.J., White, M.F., Schlessinger, J., and Skolnik, E.Y.(1993). Nck associates with the SH2 domain-docking protein IRS-1 in insulin-stimulated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **90**, 11713-11717.
- Lee, J.H., Miele, M.E., Hicks, D.J., Phillips, K.K., Trent, J.M., Weissman, B.E., and Welch, D.R.(1996). KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J. Natl. Cancer Inst.* **88**, 1731-1737.
- Lee, J.H. and Welch, D.R.(1997). Identification of highly expressed genes in metastasis-suppressed chromosome 6/human malignant melanoma hybrid cells using subtractive hybridization and differential display. *Int. J. Cancer* **71**, 1035-1044.
- Lee, J.H. and Welch, D.R.(1997). Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer Res.* **57**, 2384-2387.
- Lehmann, J.M., Holzmann, B., Breitbart, E.W., Schmiegelow, P., Riethmuller, G., and Johnson, J.P.(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, J.M., Riethmuller, G., and Johnson, J.P.(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, C.R., Sandeen, M.A., Margulies, I.M., Liotta, L.A., and Steeg, P.S.(1991). Reduced tumor incidence, metastatic potential, and cytokine responsiveness of nm23-transfected melanoma cells. *Cell* **65**, 25-35.
- Lewin, B.(1991). Oncogenic conversion by regulatory changes in transcription factors. *Cell* **64**, 303-312.
- Lewin, B.(1998). The mystique of epigenetics. *Cell* **93**, 301-303.
- Liotta, L.A. and Kohn, E.C.(2001). The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* **411**, 375-379.
- Liotta, L.A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, C.M., and Shafie, S.(1980). Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* **284**, 67-68.
- Livingstone, L.R., White, A., Sprouse, J., Livanos, E., Jacks, T., and Tlsty, T.D.(1992). Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* **70**, 923-935.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.(1951). Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J.Biol.Chem.* **193**, 265-275.
- Lu, C. and Kerbel, R.S.(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.
- Lubbe, J., Reichel, M., Burg, G., and Kleihues, P.(1994). Absence of p53 gene mutations in cutaneous melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **102**, 819-821.
- Lukashev, M.E. and Werb, Z.(1998). ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol.* **8**, 437-441.

- Ma, J. and Ptashne, M.(1987). A new class of yeast transcriptional activators. *Cell* **51**, 113-119.
- MacDonald, H.R. and Lees, R.K.(1990). Programmed death of autoreactive thymocytes. *Nature* **343**, 642-644.
- Mancianti, M.L., Gyorfi, T., Shih, I.M., Valyi-Nagy, I., Levensgood, G., Menssen, H.D., Halpern, A.C., Elder, D.E., and Herlyn, M.(1993). Growth regulation of cultured human nevus cells. *J. Invest. Dermatol.* **100**, 281S-287S.
- Maru, Y. and Witte, O.N.(1991). The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell* **67**, 459-468.
- Mayer, B.J. and Hanafusa, H.(1990). Association of the v-crk oncogene product with phosphotyrosine-containing proteins and protein kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**, 2638-2642.
- McGovern, V.J., Cochran, A.J., Van der Esch, E.P., Little, J.H., and MacLennan, R.(1986). The classification of malignant melanoma, its histological reporting and registration: a revision of the 1972 Sydney classification. *Pathology* **18**, 12-21.
- McNabb, D.S. and Courtney, R.J.(1992). Analysis of the UL36 open reading frame encoding the large tegument protein (ICP1/2) of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **66**, 7581-7584.
- Meijerink, J.P., Mensink, E.J., Wang, K., Sedlak, T.W., Sloetjes, A.W., de Witte, T., Waksman, G., and Korsmeyer, S.J.(1998). Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood* **91**, 2991-2997.
- Messing, J., Gronenborn, B., Muller-Hill, B., and Hans, H.P.(1977). Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: insertion of a HindII fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **74**, 3642-3646.
- Methot, N., Rom, E., Olsen, H., and Sonenberg, N.(1997). The human homologue of the yeast Prt1 protein is an integral part of the eukaryotic initiation factor 3 complex and interacts with p170. *J. Biol. Chem.* **272**, 1110-1116.
- Mitelman, F., Mertens, F., and Johansson, B.(1997). A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat. Genet.* **15 Spec No**, 417-474.
- Morley, S.J., McKendrick, L., and Bushell, M.(1998). Cleavage of translation initiation factor 4G (eIF4G) during anti-Fas IgM-induced apoptosis does not require signalling through the p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase. *FEBS Lett.* **438**, 41-48.
- Mosmann, T.(1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
- Murphy, K.M., Heimberger, A.B., and Loh, D.Y.(1990). Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCRlo thymocytes in vivo. *Science* **250**, 1720-1723.
- Nagel, W., Schilcher, P., Zeitlmann, L., and Kolanus, W.(1998). The PH domain and the polybasic c domain of cytohesin-1 cooperate specifically in plasma membrane association and cellular function. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1981-1994.
- Nobori, T., Miura, K., Wu, D.J., Lois, A., Takabayashi, K., and Carson, D.A.(1994). Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* **368**, 753-756.

- Nowell, P.C.(1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**, 23-28.
- 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.
- Oliner, J.D., Kinzler, K.W., Meltzer, P.S., George, D.L., and Vogelstein, B.(1992). Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* **358**, 80-83.
- Orr, H.T.(2001). Beyond the Qs in the polyglutamine diseases. *Genes Dev.* **15**, 925-932.
- 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.
- Parada, L.F., Tabin, C.J., Shih, C., and Weinberg, R.A.(1982). Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* **297**, 474-478.
- Park, C.G., Lee, S.Y., 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.
- Park, M.(1998). *The Genetic Basis of Human Cancer*, McGraw Hill, New York.
- Pawson, T.(1995). Protein modules and signalling networks. *Nature* **373**, 573-580.
- Pawson, T. and Scott, J.D.(1997). Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* **278**, 2075-2080.
- Pitti, R.M., Marsters, S.A., Lawrence, D.A., Roy, M., Kischkel, F.C., Dowd, P., Huang, A., Donahue, C.J., Sherwood, S.W., Baldwin, D.T., Godowski, P.J., Wood, W.I., Gurney, A.L., Hillan, K.J., Cohen, R.L., Goddard, A.D., Botstein, D., and Ashkenazi, A.(1998). Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* **396**, 699-703.
- Pollock, P.M. and Trent, J.M.(2000). The genetics of cutaneous melanoma. *Clin. Lab. Med.* **20**, 667-690.
- Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N.J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H.W., Cordon-Cardo, C., and DePinho, R.A.(1998). The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* **92**, 713-723.
- Ponder, B.A.(2001). Cancer genetics. *Nature* **411**, 336-341.
- Prives, C.(1998). Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell* **95**, 5-8.
- Pröls, E. Untersuchung der Funktion des Apoptose assoziierten Moleküls PHLDA1 und dessen Überexpression in Melanom Zelllinien. (2001). Diplomarbeit an Fakultät für Biologie der LMU-München.
- Qian, N., Frank, D., O'Keefe, D., Dao, D., Zhao, L., Yuan, L., Wang, Q., Keating, M., Walsh, C., and Tycko, B.(1997). The IPL gene on chromosome 11p15.5 is imprinted in humans and mice and is similar to TDAG51, implicated in Fas expression and apoptosis. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 2021-2029.

- Quelle, D.E., Zindy, F., Ashmun, R.A., and Sherr, C.J.(1995). Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* **83**, 993-1000.
- Rabbitts, T.H.(1994). Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* **372**, 143-149.
- Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J.C., and Perucho, M.(1997). Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* **275**, 967-969.
- Raveh, T., Droguett, G., Horwitz, M.S., DePinho, R.A., and Kimchi, A.(2001). DAP kinase activates a p19ARF/p53-mediated apoptotic checkpoint to suppress oncogenic transformation. *Nat. Cell Biol.* **3**, 1-7.
- Reed, J.C.(1998). Bcl-2 family proteins. *Oncogene* **17**, 3225-3236.
- Rhim, K.J., Hong, S.I., Hong, W.S., Lee, S.Y., Lee, D.S., and Jang, J.J.(1994). Aberrant expression of p53 gene product in malignant melanoma. *J. Korean Med. Sci.* **9**, 376-381.
- Riede, U.S. and Schaefer, H.E.(1993). *Allgemeine und spezielle Pathologie*, 3 edition. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Rigel, D.S. and Carucci, J.A.(2000). Malignant melanoma: prevention, early detection and treatment in the 21st century. *CA Cancer J. Clin.* **50**, 215-236.
- Robbins, J., Dilworth, S.M., Laskey, R.A., and Dingwall, C.(1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* **64**, 615-623.
- Rocco, J.W. and Sidransky, D.(2001). p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp. Cell Res.* **264**, 42-55.
- Rodeck, U.(1993). Growth factor independence and growth regulatory pathways in human melanoma development. *Cancer Metastasis Rev.* **12**, 219-226.
- Rosenberg, S.A.(2001). Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* **411**, 380-384.
- Saelens, X., Kalai, M., and Vandenabeele, P.(2001). Translation inhibition in apoptosis: Caspase-dependent PKR activation and eIF2- α phosphorylation. *J. Biol. Chem.*
- 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, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A.(1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., 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, E.F., and Maniatis, T.(1989). *Molecular Cloning*, second edition edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Schadendorf, D., Heidel, J., Gawlik, C., Suter, L., and Czarnetzki, B.M.(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.

- Schiestl, R.H. and Gietz, R.D.(1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* **16**, 339-346.
- Schlagbauer-Wadl, H., Jansen, B., Muller, M., Polterauer, P., Wolff, K., Eichler, H.G., Pehamberger, H., Konak, E., and Johnson, J.P.(1999). Influence of MUC18/MCAM/CD146 expression on human melanoma growth and metastasis in SCID mice. *Int. J. Cancer* **81**, 951-955.
- Schneuwly, S., Kuroiwa, A., Baumgartner, P., and Gehring, W.J.(1986). Structural organization and sequence of the homeotic gene Antennapedia of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* **5**, 733-739.
- Schuchter, L.M.(2001). Review of the 2001 ajcc staging system for cutaneous malignant melanoma. *Curr. Oncol. Rep.* **3**, 332-337.
- Serrano, M., Gomez-Lahoz, E., DePinho, R.A., Beach, D., and Bar-Sagi, D.(1995). Inhibition of ras-induced proliferation and cellular transformation by p16INK4. *Science* **267**, 249-252.
- Serrano, M., Lee, H., Chin, L., Cordon-Cardo, C., Beach, D., and DePinho, R.A.(1996). Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* **85**, 27-37.
- Serrone, L. and Hersey, P.(1999). The chemoresistance of human malignant melanoma: an update. *Melanoma Res.* **9**, 51-58.
- Seykora, J. and Elder, D.(1996). Dysplastic nevi and other risk markers for melanoma. *Semin. Oncol.* **23**, 682-687.
- Shaw, G.(1996). The pleckstrin homology domain: an intriguing multifunctional protein module. *Bioessays* **18**, 35-46.
- Sherr, C.J.(1996). Cancer cell cycles. *Science* **274**, 1672-1677.
- Shi, Y.E., Ni, J., Xiao, G., Liu, Y.E., Fuchs, A., Yu, G., Su, J., Cosgrove, J.M., Xing, L., Zhang, M., Li, J., Aggarwal, B.B., 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.
- Shuman, S.(1989). Vaccinia DNA topoisomerase I promotes illegitimate recombination in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **86**, 3489-3493.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., and McGuire, W.L.(1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235**, 177-182.
- Soengas, M.S., Capodici, P., Polsky, D., Mora, J., Esteller, M., Opitz-Araya, X., McCombie, R., Herman, J.G., Gerald, W.L., Lazebnik, Y.A., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W.(2001). Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* **409**, 207-211.
- Sparkes, R.S., Murphree, A.L., Lingua, R.W., Sparkes, M.C., Field, L.L., Funderburk, S.J., and Benedict, W.F.(1983). Gene for hereditary retinoblastoma assigned to human chromosome 13 by linkage to esterase D. *Science* **219**, 971-973.
- Spector, D.H., Varmus, H.E., and Bishop, J.M.(1978). Nucleotide sequences related to the transforming gene of avian sarcoma virus are present in DNA of uninfected vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **75**, 4102-4106.
- 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.

- Stehelin, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M., and Vogt, P.K.(1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* **260**, 170-173.
- Steiner, P., Philipp, A., Lukas, J., Godden-Kent, D., Pagano, M., Mittnacht, S., Bartek, J., and Eilers, M.(1995). Identification of a Myc-dependent step during the formation of active G1 cyclin-cdk complexes. *EMBO J.* **14**, 4814-4826.
- Stetler-Stevenson, W.G.(1999). Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J. Clin. Invest.* **103**, 1237-1241.
- Stott, F.J., Bates, S., James, M.C., McConnell, B.B., Starborg, M., Brookes, S., Palmero, I., Ryan, K., Hara, E., Vousden, K.H., 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.
- Symonds, H., Krall, L., Remington, L., Saenz-Robles, M., Lowe, S., Jacks, T., and Van Dyke, T.(1994). p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell* **78**, 703-711.
- Taipale, J. and Beachy, P.A.(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.
- Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D.A., Vigna, N., Oltersdorf, T., and Reed, J.C.(1998). IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.* **58**, 5315-5320.
- Tan, X. and Wang, J.Y.(1998). The caspase-RB connection in cell death. *Trends Cell Biol.* **8**, 116-120.
- 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.
- Varner, J.A., Emerson, D.A., and Juliano, R.L.(1995). Integrin alpha 5 beta 1 expression negatively regulates cell growth: reversal by attachment to fibronectin. *Mol Biol Cell* **6**, 725-740.
- Vucic, D., Stennicke, H.R., Pisabarro, M.T., Salvesen, G.S., and Dixit, V.M.(2000). ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Curr. Biol.* **10**, 1359-1366.
- Wagener, C.(1999). *Entstehung und Progression maligner Tumoren*, 2 edition. Georg Thieme, Stuttgart.
- Wagner, FF and Flegel, WAA cDNA which predicts a protein with PQ-rich repeats, isolated from a phage library of human fetal liver tissue. *unveröffentlicht* (1995).
- Wang, M., Liu, Y.E., Ni, J., Aygun, B., Goldberg, I.D., and Shi, Y.E.(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.
- Webb, S., Morris, C., and Sprent, J.(1990). Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity. *Cell* **63**, 1249-1256.
- Weinberg, R.A.(1991). Tumor suppressor genes. *Science* **254**, 1138-1146.

- Weinberg, R.A.(1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-330.
- Werb, Z.(1997). ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* **91**, 439-442.
- Wharton, K.A., Yedvobnick, B., Finnerty, V.G., 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.
- Xie, S., Luca, M., Huang, S., Gutman, M., Reich, R., Johnson, J.P., 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, Y., Spitzer, E., Kenney, N., Zschiesche, W., Li, M., Kromminga, A., Muller, T., Spener, F., Lezius, A., and Veerkamp, J.H.(1994). Members of the fatty acid binding protein family are differentiation factors for the mammary gland. *J. Cell. Biol.* **127**, 1097-1109.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J.(1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Yarden, Y. and Ullrich, A.(1988). Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 443-478.
- Yeh, W.C., Itie, A., Elia, A.J., Ng, M., Shu, H.B., Wakeham, A., Mirtsos, C., Suzuki, N., Bonnard, M., Goeddel, D.V., and Mak, T.W.(2000). Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity* **12**, 633-642.
- Yin, Y., Tainsky, M.A., Bischoff, F.Z., Strong, L.C., and Wahl, G.M.(1992). Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell* **70**, 937-948.
- Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., and Oren, M.(1991). Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* **352**, 345-347.
- Zerp, S.F., van Elsas, A., Peltenburg, L.T., and Schrier, P.I.(1999). p53 mutations in human cutaneous melanoma correlate with sun exposure but are not always involved in melanomagenesis. *Br. J. Cancer* **79**, 921-926.
- Zhang, X.D., Franco, A., Myers, K., Gray, C., Nguyen, T., and Hersey, P.(1999). Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma. *Cancer Res.* **59**, 2747-2753.
- Zhang, Y., Xiong, Y., and Yarbrough, W.G.(1998). ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* **92**, 725-734.

Veröffentlichungen

- Horwitz, S.B., Shen, H.J., He, L., Dittmar, P., Neef, R., Chen, J., and Schubart, U.K. (1997). The microtubule-destabilizing activity of metablastin (p19) is controlled by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **272**, 8129-8132.
- Neef, R., Kuske, M.D., and Johnson, J.P. (1999). Das Apoptose assoziierte Molekül Phrip ist in Melanomprimärtumoren und Melanommetastasen differentiell exprimiert. Posterpräsentation auf der *Biolog99* in München
- Neef, R., Kuske, M.D., Pröls, E., and Johnson, J.P. (2001). The Apoptosis Associated Gene PHLDA1 is Downregulated During Human Melanoma Progression. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* **42**, 789
- Pröls, E., Neef, R., Gerlinger, M., and Johnson, J.P. (2001). Regulation of cell growth and sensitivity to apoptosis by the T cell death associated gene PHLDA1/TDAG51. *Immunobiology* **201**, 266-267.
- Neef, R., Kuske, M.D., Pröls, E., and Johnson, J.P. Identification of the human PHLDA1/TDAG51 gene: downregulation in metastatic melanoma contributes to apoptosis resistance and growth deregulation. *FASEB J.*, akzeptiert für den Reviewprozess
- Neef, R., Kuske, M.D., Pröls, E., and Johnson, J.P. (2001). Isolation of the human apoptosis associated gene PHLDA1 and its role in melanoma tumor progression. Posterpräsentation auf dem *1st International Meeting on Molecular Staging of Cancer* 6-8 Dez. 2001 in Munich.

Danksagung

Einen ganz besonderen Dank an Frau Prof. Dr. Judith Johnson, unter deren Anleitung die vorliegende Arbeit durchgeführt wurde. Ihr ständiges Interesse am Fortgang der Arbeit, ihre Diskussionsbereitschaft und wertvollen Anregungen haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ihre freundschaftliche Art sorgte für ein angenehmes Arbeitsklima und Ihr Optimismus veranlasste mich auch in schwierigen Phasen der Doktorarbeit nicht an der Wissenschaft zu zweifeln.

Herrn Prof. Dr. G. Riethmüller danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Immunologie.

Herrn Prof. Dr. T. Cremer danke ich ganz herzlich für die Vertretung dieser Arbeit an der Fakultät für Biologie.

Herrn Dr. Hartmut Engelmann und Frau Dr. Barbara Fellerhofer danke ich für viele Tips und Lösungsvorschläge beim Umgang mit diversen Computerprogrammen.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Johnson, auch bei den ehemaligen Mitarbeitern, Bettina Reichelt, Martina Kuske und Susan Mintz-Weber bedanke ich mich für die Verbreitung einer freundschaftlichen und lockeren Atmosphäre. Frau Ina Contag danke ich für die Einführungen in das Arbeiten mit der Zellkultur und für ihr stetes Bemühen Ordnung ins Labor zu bringen. Besonders danke ich auch Marco Gerlinger und Angelika Holler für das Korrekturlesens von Teilen dieser Arbeit. Diesbezüglich möchte ich mich auch ganz besonders bei Frau Dr. Barbara Hoffmann und meiner Frau Miriam bedanken.

Lebenslauf

Rüdiger Ansgar Neef

geb. 17.05.1968 in St.Georgen/Schwarzwald

Familienstand: verheiratet, zwei Kinder

Ainmillerstr. 50, 80801 München

ruediger.neef@ifi.med.uni-muenchen.de

Ausbildung

- 06/1987 Abitur an der Lornsenschule in Schleswig
- 08/1987 - 07/1989 Ausbildung zum Chemisch-Technischen Assistenten am Chemischen Institut Dr. Flad in Stuttgart. Abschluss mit dem Staatsexamen
- 09/1989 - 10/1990 Anstellung als Chemisch-Technischer Assistent bei Prof. Dr. Dr. A. Bacher, Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie an der TU-München
- 11/1990 - 04/1996 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München mit den Schwerpunkten Genetik (Hauptfach), Mikrobiologie, Biochemie und Immunologie
- 07/1995 - 04/1996 Diplomarbeit bei Frau Prof. Dr. R. Kahmann am Lehrstuhl für Genetik mit dem Thema: Charakterisierung des *Ustilago maydis* α1-Pheromons durch Mutationsanalyse
- 06/1996 - 12/1996 Forschungsaufenthalt als *research assistant* bei Prof. Dr. U.K. Schubart am Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York, USA
- 01/1997 - 12/2001 wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Frau Prof. Dr. J.P. Johnson am Institut für Immunologie der LMU-München
- 01/1997 - 02/1998 Arbeiten zur Identifikation zytoplasmatischer Interaktionspartner von Muc18/MCAM im Labor von Frau Prof. Dr. J.P. Johnson
- 03/1998 Beginn der vorliegenden Doktorarbeit im Labor von Frau Prof. Dr. J.P. Johnson mit dem Thema: Expression und Funktion des Apoptose-assoziierten Moleküls PHLDA1 im humanen Melanom