

„Immune escape“ durch Überexpression
von HER-2/neu:

Untersuchung der molekularen
Mechanismen anhand eines
in vitro-Systems

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades
"Doktor der
Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Felix Herrmann
geb. 14.08.1968 in Mannheim

Mainz, 28.06.2004

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das Immunsystem	1
1.2. Die Präsentation von Antigenen über MHC-Komplexe	3
1.2.1. Der MHC-Locus	3
1.2.2. Aufbau des MHC Klasse I-Komplexes	4
1.2.3. Die Prozessierung von MHC Klasse I-Antigenen	5
1.2.3.1. Die Generierung antigener Peptide durch das Proteasom	7
1.2.3.2. Extraproteasomale Modifikation antigener Peptide	9
1.2.3.3. Der TAP-Transporter	10
1.2.3.4. Calnexin, ER60 und Calretikulin	12
1.2.3.5. Tapasin	12
1.2.4. Modulation der MHC Klasse I-Antigenprozessierung	13
1.2.4.1. Der Einfluss von Zytokinen	13
1.2.4.2. Die transkriptionelle Regulation von MHC und TAP	15
1.2.4.3. Virale Effekte auf die Antigenprozessierung	17
1.2.4.4. „Immune escape“ Mechanismen von Tumoren	20
1.3. HER-2/neu	23
1.3.1. Die Struktur und Funktionsweise von HER-2/neu	23
1.3.1.1. HER-2/neu aktiviert zahlreiche Signalkaskaden	24
1.3.1.2. Die biologische Funktion von HER-2/neu	26
1.3.1.3. Die onkogene Wirkung von HER-2/neu	26
1.3.1.4. HER-2/neu Signalkaskaden im Tumor	28
1.3.2. HER-2/neu als Ziel therapeutischer Ansätze	29
1.3.3. HER-2/neu spezifische T-Zellen	31
1.4. Zielsetzung der Arbeit	33
2. Material	34
2.1. Geräte und Software	34
2.1.1. Geräte	34
2.1.2. Software	35
2.2. Verbrauchsmaterialien	35
2.3. Chemikalien	35
2.4. Komplettsysteme	36
2.5. Enzyme	37
2.6. Molekulargewichts- und Längenstandards	37
2.7. Inhibitoren	37
2.8. Peptide	37
2.9. Primer	38

2.9.1.	Primer zum Nachweis verschiedener Gene der MHC Klasse I	38
2.9.2.	Primer für Promotorstudien	39
2.9.3.	Oligonukleotide für Gelretardationsversuche	41
2.10.	Vektoren	42
2.11.	Internetseiten für Promotoranalysen	43
2.12.	Statistische Analysen	44
2.13.	Antikörper	44

3. Methoden 46

3.1.	Mikrobiologische Methoden	46
3.1.1.	Bakterienstämme	46
3.1.2.	Bakterienkulturmedien	46
3.1.3.	Herstellung kompetenter Bakterien	47
3.1.4.	Transformation von DNS in Bakterien	47
3.1.5.	Anzüchten der Bakterienkultur und DNS-Isolierung	48
3.2.	Molekularbiologische Methoden	49
3.2.1.	Enzymatische Reaktionen zur Spaltung oder Modifikation von DNS	49
3.2.2.	Elektrophoretische Auftrennung von DNS-Fragmenten in Agarose-Gelen	51
3.2.3.	Aufreinigung von DNS-Fragmenten aus Agarose-Gelen	51
3.2.4.	Ligation	51
3.2.5.	Sequenzierung	52
3.2.6.	Klonierung	52
3.3.	RNS Isolation und Modifikation	53
3.3.1.	RNS-Isolation	53
3.3.2.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	54
3.3.3.	Reverse Transkription	54
3.4.	PCR	55
3.4.1.	PCR mit DNS als Matrize	55
3.4.2.	Mutagenese-PCR	55
3.4.3.	PCR direkt aus Zelllysate	56
3.4.4.	Titan™ One Tube RT-PCR-System	56
3.4.5.	RACE-PCR	57
3.5.	Kultivierung eukaryotischer Zellen	58
3.5.1.	Medien und Lösungen	58
3.5.2.	Zelllinien	58
3.5.3.	Kultivierung	59
3.5.4.	Zellzählung	59
3.6.	Transfektion eukaryotischer Zellen	60

3.6.1.	Transiente Transfektion	60
3.6.2.	Stabile Transfektion und Selektion	60
3.7.	Proteinbiochemische Methoden	61
3.7.1.	Proteinpräparationen	61
3.7.1.1.	Gewinnung von Gesamtprotein aus eukaryotischen Zellen	61
3.7.1.2.	Gewinnung von Membranprotein aus eukaryotischen Zellen	62
3.7.1.3.	Gewinnung von Kernprotein aus eukaryotischen Zellen	62
3.7.2.	Proteinbestimmungen	63
3.7.3.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot	64
3.7.3.1.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	64
3.7.3.2.	Western Blot	65
3.7.4.	Gelretardationsversuch (Gelshiftversuch, EMSA)	65
3.7.4.1.	Biotin-Markierung der DNS	66
3.7.4.2.	Gelshift	66
3.8.	Zellbiologische Assays	68
3.8.1.	FACS (Durchflusszytometrie)	68
3.8.2.	Peptidtranslokationsversuch	68
3.8.3.	Infektion mit dem Tyrosinase-Vaccinia Virus Ankara und Chromium-Freisetzungsversuch	69
3.8.4.	Reporterassay (Luziferaseassay)	70
4.	Ergebnisse	72
4.1.	Das Zellmodell	72
4.2.	Defekte in der Antigenprozessierung in HER-2/neu ⁺ - Zellen	73
4.2.1.	Durchflusszytometrische Analyse der HER-2/neu- und MHC Klasse I-Oberflächenexpression	73
4.2.2.	Verminderte Transkriptmengen einiger wichtiger Komponenten der MHC Klasse I-Antigenprozessierung in HER-2/neu ⁺ -Zellen	76
4.2.3.	Verminderte RNS-Mengen führen zu verminderten Proteinmengen	79
4.2.4.	Geringe TAP-Expression führt zu vermindertem Peptidtransport	81
4.3.	Die Beeinträchtigung der APM-Komponenten führt zu dem Verlust der Immunogenität	81
4.3.1.	Herstellung von HLA-A2-Transfektanten und Überprüfung der Integration und Expression des Transgens	82
4.3.2.	Keine T-Zell-vermittelte Lyse der HER-2/neu ⁺ -Zellen	83
4.4.	Promotorstudien	85
4.4.1.	Klonierung des murinen TAP2-Promotors	85
4.4.2.	Analyse der Promotoraktivität von TAP2	87
4.4.3.	Klonierung des murinen Tapasin-Promotors	89
4.4.4.	Analyse der Promotoraktivität von Tapasin	92

4.4.5.	Bestimmung des Transkriptionsstartes im Tapasin-Promotor	92
4.4.6.	Klonierung des murinen TAP1/LMP2-Promotors	94
4.4.7.	Analyse der Promotoraktivität von TAP1/LMP2	95
4.5.	Untersuchung der Zielregionen von HER-2/neu	98
4.5.1.	Vergleich der Bindungsmotive in den klonierten Promotoren	98
4.5.2.	Herstellung und Analyse von Deletionsmutanten des TAP2-Promotors	99
4.5.3.	Herstellung und Analyse von Deletionsmutanten des Tapasin-Promotors	103
4.5.4.	Eliminierung von Bindungsmotiven für Transkriptionsfaktoren im Tapasin-Promotor	107
4.5.5.	Bedeutung des NF- κ B-Motivs an Position -482 für die basale Tapasin-Promotoraktivität	108
4.5.6.	Analyse der Suppression der Tapasin-K.o.-Promotormutanten durch HER-2/neu	111
4.5.7.	Detektion von Kernprotein-Bindung an Position -302, -229 und -195	112
4.5.8.	Elimination der Bindungsstellen für E2F und P300 im TAP2- und TAP1/LMP2-Promotor	114
4.6.	Untersuchung der HER-2/neu-vermittelten Herunterregulation der Promotoren mittels Ras-transformierten Zellen und Inhibitoren	117
4.6.1.	Untersuchung der Promotoraktivität von TAP2 und Tapasin in Ras ⁺ -Zellen	117
4.6.2.	Untersuchung der Hemmung der Promotoraktivitäten von TAP, LMP2 und Tapasin unter dem Einfluss von Inhibitoren	119
5.	Diskussion	122
5.1.	Der „Immune escape“- Phänotyp	122
5.1.1.	Die starke Überexpression von HER-2/neu führt zu einer verminderten MHC Klasse I-Oberflächenexpression	122
5.1.2.	HER-2/neu reduziert die RNS und Proteinmengen bestimmter Gene der MHC Klasse I-Antigenprozessierung	123
5.1.2.1.	Das Proteasom	124
5.1.2.2.	Der TAP-Transporter	127
5.1.2.3.	Tapasin und andere Chaperone	130
5.1.3.	Verringerte Antigenprozessierung durch HER-2/neu-Überexpression: Modell eines „Immune escape“-Phänotyp	132
5.1.4.	Der Einfluss von IFN- γ	134
5.1.5.	Die HER-2/neu Überexpression führt zu einem kompletten Verlust der Immunogenität	135

5.1.6.	Ist HER-2/neu ein attraktives Ziel für T-Zell-vermittelte Immuntherapien ?	137
5.2.	Molekularer Mechanismus der HER-2/neu-vermittelten Hemmung der Antigenprozessierung	141
5.2.1.	HER-2/neu hemmt die Promotoraktivität von TAP und Tapasin	141
5.2.2.	Die HER-2/neu-induzierte Hemmung des Tapasin-Promotors erfolgt über die Bindung eines E2F/E2F/P300-Komplexes	142
5.2.3.	Die HER-2/neu-initiierte Komplexbildung von E2F und P300: Verknüpfung von Zellzyklus und Antigenpräsentation ?	151
5.3.	Zukünftige experimentelle Strategien	153
6.	Zusammenfassung	155
7.	Literaturverzeichnis	157

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem

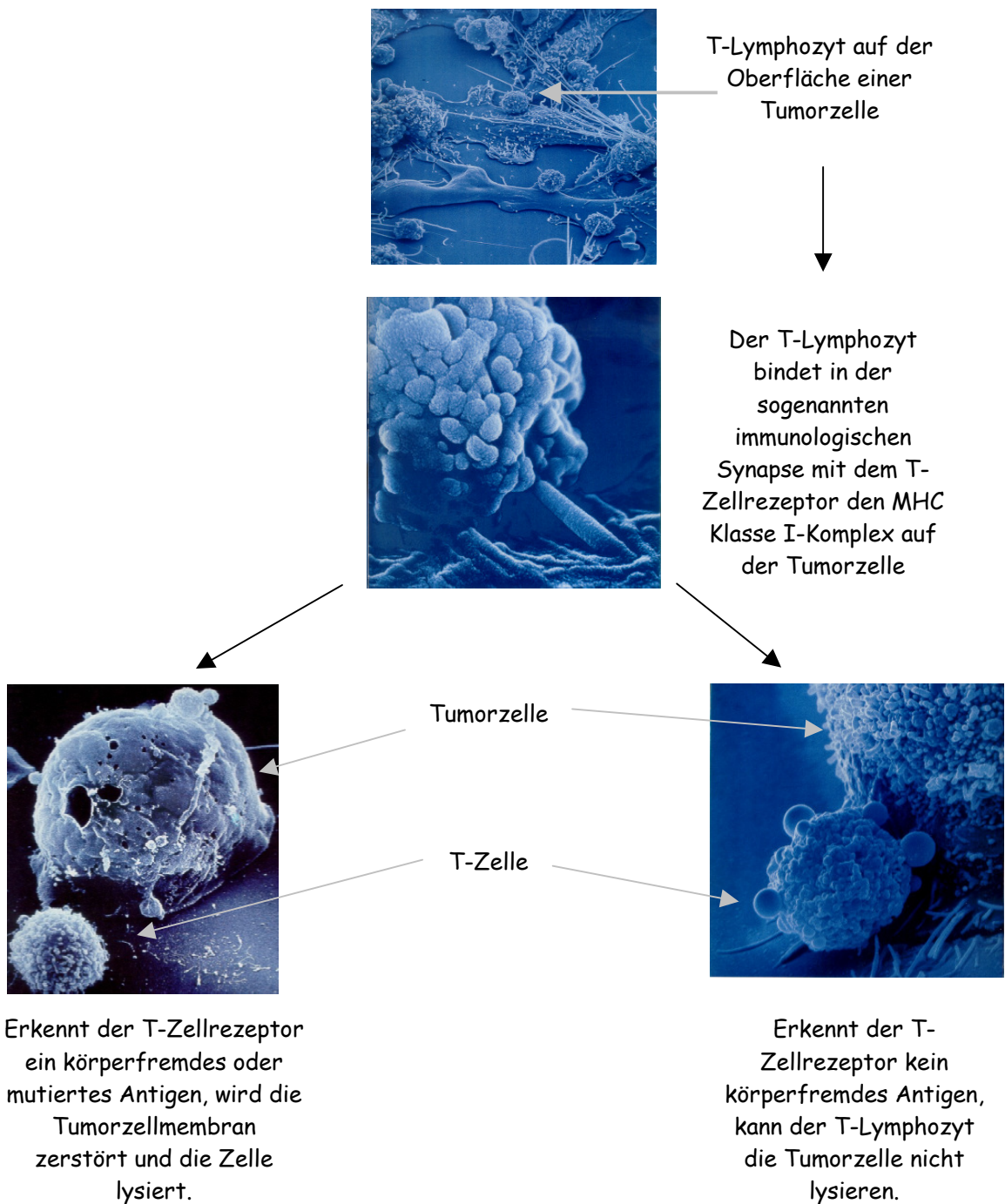
Das Immunsystem schützt den Organismus vor den Folgen des Eindringens körperfremder Substanzen, indem es eingedrungene Wurmparasiten, Pilze, Bakterien, Viren und deren Abbauprodukte eliminiert. Dabei kann zwischen einer unspezifischen und einer spezifischen Abwehrreaktion unterschieden werden. Bei der unspezifischen Abwehr werden die eingedrungenen Fremdkörper an charakteristischen Oberflächenmolekülen, wie z.B. an dem Lipopolysaccharid (LPS) von Bakterienzellwänden, erkannt. Sie kann daher eine Vielzahl verschiedenster Bakterienstämme gleichzeitig eliminieren. Im Gegensatz dazu ist die spezifische Immunantwort auf die Identifikation von Peptidsequenzen spezialisiert, die nur für ein bestimmtes Protein eines einzigen Organismus charakteristisch sind.

Je nach Aufenthaltsort des eingedrungenen Organismus treten bei dieser spezifischen Immunantwort zwei unterschiedliche Hauptkomponenten in Kraft. Die sogenannte humorale Immunantwort zerstört extrazelluläre Pathogene über die Detektion durch Antikörper, die von B-Lymphozyten produziert werden. Aufgrund der Bindung zahlreicher Antikörper (Komplexion) wird das Antigen in seiner Beweglichkeit eingeschränkt und für spezialisierte Fresszellen zugänglich gemacht. Ist der Fremdkörper dagegen in körpereigene Zellen eingedrungen (Infektion), tritt die zelluläre Immunantwort in Kraft, bei der zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL) die infizierten Zellen detektieren und lysieren.

In beiden Fällen erfolgt die Identifikation des Pathogens über das dem Körper fremde Proteinrepertoire. Aus den Proteinen werden Peptide generiert, die von speziellen Molekülen, den sogenannten Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC) gebunden und auf der Zelloberfläche den T-Zellen des Immunsystems präsentiert werden. Die MHC-Komplexe werden in zwei Gruppen unterteilt, die sich unter anderem durch die gebundenen Peptide unterscheiden. Die MHC Klasse I-Komplexe tragen Peptide, die aus dem Inneren einer Zelle stammen, während die MHC Klasse II-Komplexe mit extrazellulären Peptiden assoziiert sind. Die MHC Klasse I-Komplexe werden an CD8-Molekülen auf der Oberfläche von zytotoxischen T-Zellen gebunden, während die sogenannten T-Helferzellen über CD4-Moleküle an MHC Klasse II-Komplexe binden. Die eigentliche Erkennung des körperfremden Peptides (Antigens) durch die T-Zelle erfolgt dann über einen hochpolymorphen, auf das Peptid spezialisierten T-Zell-Rezeptor. Die Folge einer Antigenerkennung durch den Rezeptor führt im Falle von MHC Klasse II-Antigenen zu einer Aktivierung von T-Helferzellen, was die Produktion von Antikörpern durch B-Zellen induziert. Erkennen dagegen die ZTL's ein über MHC Klasse I-Moleküle präsentiertes, intrazelluläres Antigen, so resultiert aus der Aktivierung der CD8⁺-T-Zelle die Lyse der präsentierenden Zelle. Zytotoxische T-Zellen können auch Zellen töten, die infolge einer Mutation entartet

sind, sich unbegrenzt teilen und zu einem Tumor auswachsen können. Voraussetzung dafür ist jedoch, dass die Tumorzellen infolge genetischer Veränderungen ein anderes Peptid als eine nicht mutierte Körperzelle auf MHC Klasse I-Komplexen präsentieren (Abb. 1.1).

Abb. 1.1: T-Zellen attackieren Krebszellen (aus „T-lymphocytes fighting cancer cells 2“, Boehringer Ingelheim, 1985)



Die für einen Fremdorganismus fatalen Folgen haben einen Selektionsdruck auf pathogene Mikroorganismen hervorgerufen, sich der Präsentation über MHC-Moleküle durch Mutation zu entziehen. Als Gegenstrategie wiederum entwickelten

die höheren Säugetiere einen polymorphen und polygenen Genlocus, der die MHC-Moleküle kodiert, so dass eine Vielzahl an MHC-Molekülen existiert. Eine andere Möglichkeit, sich der Erkennung durch das Immunsystem zu entziehen, bietet sich in der Hemmung der Prozessierung von antigenen Peptiden. So sind zum Beispiel einige Viren in der Lage, die Prozessierung von intrazellulären Antigenen zu hemmen. Diese Mechanismen sind auch in Tumorzellen nachgewiesen worden.

In dieser Arbeit wird ein solcher „Immune escape“-Phänotyp genauer untersucht, um die molekularen Mechanismen zu erforschen, die diesem Vorgang zu Grunde liegen. Es wird im Folgenden die Kaskade der Antigenpräsentation durch MHC Klasse I-Komplexe beschrieben. Anschließend wird mit HER-2/neu ein Molekül vorgestellt, das in der Lage sein könnte, die Antigenpräsentation zu inhibieren und als Letztes die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit skizziert.

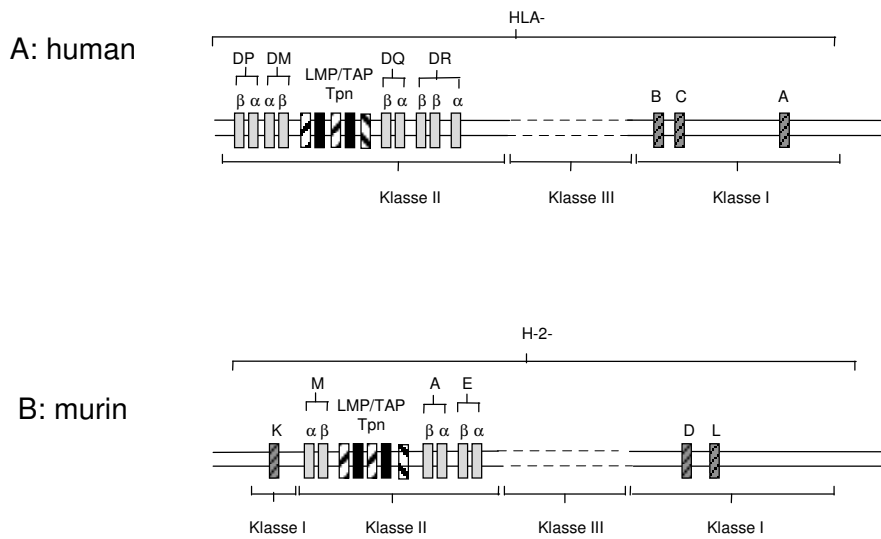
1.2. Die Präsentation von Antigenen über MHC-Komplexe

1.2.1. Der MHC-Locus

Die Bindung eines Peptids an den MHC-Komplex ist abhängig von der Aminosäuresequenz (Rammensee, et al., 1993; Engelhard, 1994). Durch Veränderung dieser Sequenz kann das Pathogen demnach die Präsentation des Peptides verhindern. Um dem entgegen zu wirken, entwickelten die höheren Säugetiere eine starke Vielfalt an MHC-Molekülen. Diese liegt im Genom begründet, da es ca. 100 Gene für die MHC-Moleküle gibt (Klein et al., 1993) und da für jedes Gen eine Vielzahl an Allelen vorliegt, die kodominant exprimiert werden. Die Gene sind in dem sogenannten MHC enthalten, der von Gorer 1936 bei Transplantationsversuchen entdeckt wurde. Er befindet sich auf dem Chromosom 6 (Mensch) bzw. 17 (Maus) und erstreckt sich über ungefähr 4×10^6 Basenpaare (Bp). Neben den Genen für die MHC-Moleküle der Klassen I und II enthält er weitere Gene, die für die Antigenprozessierung von Bedeutung sind, sowie einen sogenannten Klasse III-Locus, in dem Gene unterschiedlichster Immunfunktionen kodiert sind.

Die menschlichen MHC-Gene der Klasse I werden als HLA-A, B und C bezeichnet, die der Maus als H-2-K, D und L. Abbildung 1.2 gibt einen Überblick über die Struktur des humanen und murinen MHC-Lokus.

Abb. 1.2: Die genomische Struktur des humanen und murinen MHC-Lokus

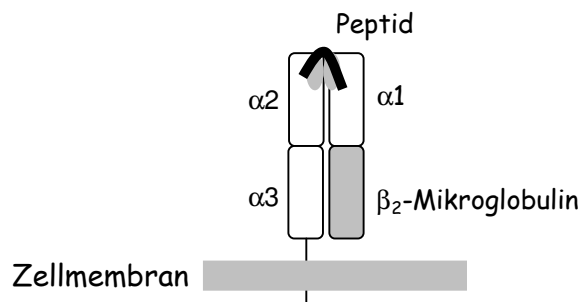


Die Gene für die schwere Kette des MHC-Moleküls (α und β) sind grau dargestellt. Diejenigen für den Peptidtransporter („Transporter associated with antigen processing“, TAP), die Proteasomuntereinheiten („Low molecular weight proteins“, LMP) und Tapasin (Tpn) als schwarze, bzw. schraffierte Balken (aus: Janeway und Travers, Immunobiology, 3. Auflage 1999, Current Biology Limited, New York).

1.2.2. Aufbau des MHC Klasse I-Komplexes

Während die Präsentation von Antigenen durch MHC Klasse II-Komplexe größtenteils auf bestimmte Zellen beschränkt ist, befinden sich die MHC Klasse I-Komplexe auf fast allen kernhaltigen Zellen (Silverman et al., 1988). Wie in Abb. 1.3 schematisch dargestellt, bestehen die Komplexe aus drei Komponenten: der schweren Kette, zusammengesetzt aus den $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ -Untereinheiten (UE), dem nicht kovalent gebundenen β_2 -Mikroglobulin, welches als einziges Molekül nicht auf dem MHC-Locus, sondern auf Chromosom 15 (Mensch) bzw. 2 (Maus) kodiert ist, und dem generierten Peptid. Die molekulare Struktur wurde erstmals von Bjorkman und Koautoren 1987 am Beispiel des humanen HLA-A2-Komplexes kristallographisch dargestellt, wobei das Peptid aber zunächst nur als elektronendichtes Material beschrieben wurde.

Abb. 1.3: Aufbau des MHC Komplexes



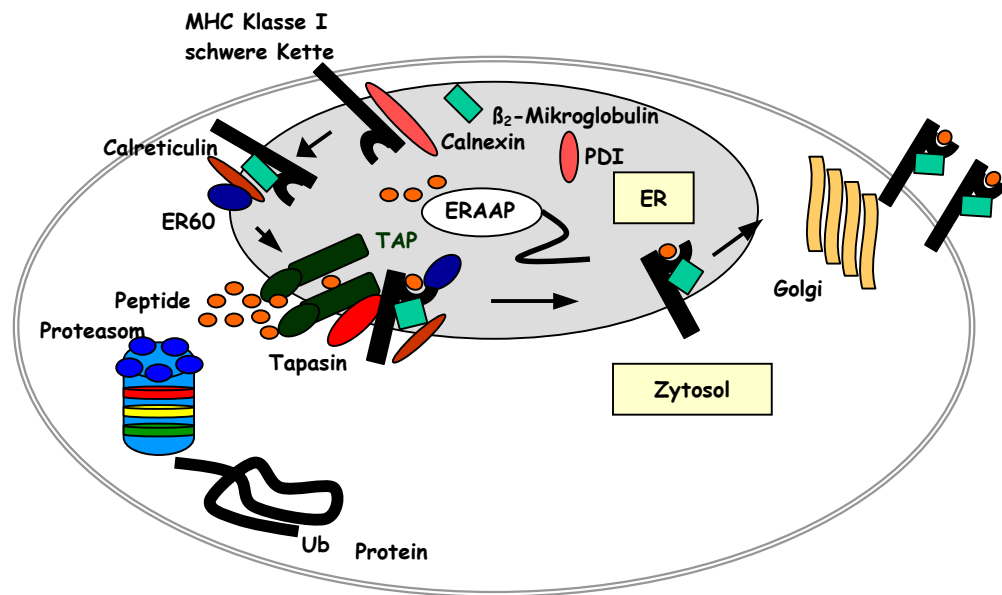
Zwischen den α 1- und α 2-UE befindet sich eine Grube, deren Boden durch β -Faltblatt-Strukturen gebildet wird und die durch die umgebenen α -Helices zu einem Spalt geformt ist. In diesem Spalt bindet das Peptid, wodurch es zu Konformationsänderungen der schweren Kette kommt, was wiederum die Stabilität der Assoziation von β ₂-Mikroglobulin und der schweren Kette erhöhen kann (Townsend et al., 1989). Die Stabilität der Peptidbindung ist einerseits von der Länge abhängig, die zwischen acht und neun Aminosäuren betragen sollte, sowie andererseits von der Sequenz und dem Auftreten spezieller Anker motive (Falk et al., 1990, 1991; Rammensee et al., 1993).

Beide Parameter sind für verschiedene MHC-Haplotypen unterschiedlich. So sind Peptide, die von H2-K^b-Komplexen präsentiert werden, neun Aminosäuren lang, während H2-K^d-gebundene Peptide um eine Aminosäure kürzer ausfallen. Eine Veränderung der Länge um nur eine Aminosäure reduziert bereits die Erkennung durch T-Zellen (Schild et al., 1991; Rammensee et al., 1991; Deres et al., 1992).

1.2.3. Die Prozessierung von MHC Klasse I-Antigenen

Obwohl es möglich ist, einen MHC-Komplex *in vitro* mit den gereinigten Einzelkomponenten ohne weitere Substanzen aufzubauen (Townsend et al., 1989), wird diese Bildung *in vivo* von einer Reihe von Chaperonen und anderen Komponenten entscheidend beeinflusst und kontrolliert. Dabei ist vor allem die Beladung des MHC-Moleküls mit dem geeigneten Peptid ein komplizierter Vorgang unter Beteiligung verschiedener Komponenten, deren Fehlen eine Auswirkung auf die Immunogenität einer Zelle besitzt. Die an der Bildung des MHC Klasse I-Komplexes beteiligten Moleküle sind in Abbildung 1.4 dargestellt.

Abb. 1.4: Die Prozessierung von MHC Klasse I-Antigenen



Im ER erfolgt die Bildung des Komplexes aus der schweren Kette des MHC und β_2 -Mikroglobulin unter Einfluss der Chaperone Calnexin, Calreticulin, „Glucose regulated protein“ ER60 und Proteindisulfid-isomerase PDI. Die Peptide werden im Zytosol durch das Proteasom, das ubiquitinierte Proteine spaltet, und im ER durch die „ER aminopeptidase associated with antigen processing“ ERAAP prozessiert. Die zytosolischen Peptide werden dann vom Peptidtransporter TAP in das ER transportiert. Im ER erfolgt die Beladung der Peptide unter Einfluss von Tapasin auf den MHC Komplex. Der trimere Komplex wird über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert und dort den T-Zellen präsentiert.

Die Bildung des MHC Klasse I-Komplexes aus schwerer Kette, β_2 -Mikroglobulin und Peptid erfolgt im endoplasmatischen Retikulum (ER). Dort wird die schwere Kette zunächst mit β_2 -Mikroglobulin assoziiert, bevor die Beladung mit dem Peptid erfolgt. Hierbei spielen verschiedene Chaperone, wie Calreticulin, Calnexin, „Glucose regulated protein“ (ER60) und Proteindisulfid-isomerase (PDI) eine wichtige Rolle. Die Peptide, die aus dem zytosolischen Abbau ubiquitiniertes Proteine durch das Proteasom stammen, werden mittels des ATP-abhängigen, heterodimeren Peptidtransporters TAP in das ER transportiert und direkt, oder nach einer N-terminalen Prozessierung durch ERAAP auf den Komplex geladen, der dann über den Golgi-Apparat die Zelloberfläche erreicht.

Neben diesem konventionellen Weg der Prozessierung von Klasse I-Antigenen gibt es auch die Möglichkeit, dass das Peptid aus dem extrazellulären Milieu stammt. Dabei werden zwei unterschiedliche Möglichkeiten diskutiert, wie das extrazelluläre Peptid den Weg der intrazellulären Antigenprozessierung kreuzt (Grommé et al., 2002):

In der Regel wird ein extrazelluläres Peptid nach der Phagozytose in speziellen Endosomen (MIIC-Endosomen) auf MHC Klasse II-Komplexe geladen. Diese Komplexe werden im ER von der invarianten Kette (Ii) gebunden. In den MIIC-Endosomen wird die invariante Kette abgebaut. Bei der Fusion des Phagosoms mit dem extrazellulärem Peptid und dem MIIC-Endosom wird der MHC Klasse II-

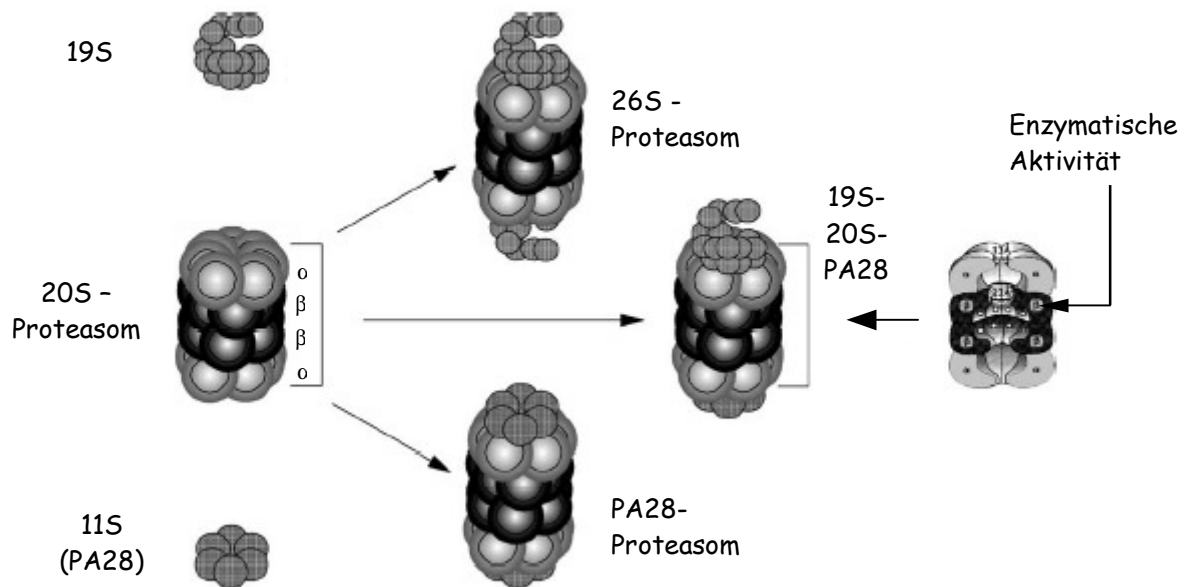
Komplex mit dem extrazellulären Peptid beladen. Es wurde jedoch gezeigt, dass diese Peptide aus dem Phagosom in das Zytosol gelangen, das Proteasom erreichen und damit auch über MHC Klasse I-Komplexe präsentiert werden können. Bei der anderen Möglichkeit erfolgt die Beladung des MHC-Komplexes unabhängig vom Proteasom und von TAP, wenn die MHC Klasse I-Moleküle in die MIIC-Endosomen gelangen. Das MHC Klasse I-Molekül kann diesen Weg kreuzen, wenn im ER die invariante Kette statt einem MHC II-Molekül ein MHC Klasse I-Molekül bindet (De Bruijn et al., 1995, Sugita et al., 1995, Vigna et al., 1996). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Re-Internalisierung bereits präsentierter MHC Klasse I-Komplexe in Endosomen, die dann mit den MIIC-Endosomen fusionieren (Grommé et al., 2002). Diese alternative Klasse I-Antigenprozessierung wurde zwar *in vivo* nachgewiesen, wird aber vermutlich nur von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen, wie Dendritischen Zellen oder Makrophagen, ausgeführt. Der größte Teil der endogenen Peptide wird von MHC Klasse I-Molekülen präsentiert.

Im Folgenden sollen die einzelnen Schritte der Bildung eines MHC Klasse I-Komplexes und die wichtigsten Komponenten genauer beschrieben werden.

1.2.3.1. Die Generierung antigener Peptide durch das Proteasom

Da die Stabilität einer Peptidbindung im MHC Klasse I-Komplex von der Länge des Peptids und bestimmten Aminosäuresequenzen (Ankermotive) abhängig ist, erfordert die Herstellung dieser Peptide die Aktivität spezieller Enzyme. Dies wird zu einem großen Teil von einem multikatalytischen Enzymkomplex gewährleistet, dem Proteasom. Dieser Komplex degradiert eine Vielzahl von Proteinen und stellt damit einen Teil des normalen Proteinstoffwechsels der Zelle dar. Die Bedeutung des Proteasoms für die Antigen-Prozessierung wurde in Studien deutlich, in denen eine Hemmung des Proteasoms mit einer Beeinträchtigung der MHC Klasse I-Antigenpräsentation einherging (Craiu et al., 1997; Rock et al., 1994), die mit Zugabe von antigenen Peptiden wiederhergestellt werden konnte (Rock et al., 1994). Die Struktur dieses Komplexes wurde anhand der kristallographischen Analyse des Proteasoms von Archaeobakterien und Hefen aufgeklärt (Lowe et al., 1995). Es setzt sich aus den regulatorischen Komplexen 11S (PA28) und/oder 19S und dem enzymatisch aktiven 20S-Komplex zusammen, so dass man zwischen dem 20S-Proteasom, dem 26S-Proteasom und dem PA28-Proteasom unterscheidet (Abb. 1.5).

Abb. 1.5: Schematischer Aufbau der unterschiedlichen Proteasomtypen (aus Cascio et al., 2002)



Das Proteasom setzt sich zusammen aus den regulatorischen Komplexen 19S und/oder 11S (Pa28), und dem enzymatisch aktiven 20S-Komplex, so dass man zwischen dem 20S-Proteasom, dem 26S-Proteasom, dem PA28-Proteasom und dem 19S-20S-PA28-Proteasom unterscheidet (Cascio et al., 2002; Rubin et al., 1995).

Das 20S-Proteasom:

Das etwa 700 kD schwere 20S-Proteasom stellt die eigentliche enzymatisch aktive Einheit aller drei Proteasomtypen dar. Es besteht aus zwei äußeren, heptameren α -UE und zwei inneren heptameren β -UE, die aufgrund ihrer Anordnung einen kurzen Kanal bilden. Die β -UE sind für den eigentlichen enzymatischen Prozess verantwortlich. Die kleinste Distanz zwischen den aktiven Seiten der β -UE beträgt 20 Angström, was ungefähr der Länge eines Peptidoktamers entspricht (Lowe et al., 1995). Von den sieben β -UE besitzen die konstitutiv exprimierten UE X, Y und Z enzymatische Aktivität (Lowe et al., 1995; Seemuller et al., 1995; Orłowski et al., 1993). Diese werden unter dem Einfluss von Interferon gamma (IFN- γ) durch die drei IFN- γ -induzierbaren UE LMP10, LMP2 und LMP7 ausgetauscht (Belich et al., 1994).

Das 26S-Proteasom:

Das 26S-Proteasom besteht aus der zentralen 20S-Einheit und zwei 19S-Einheiten, die auf beiden Seiten des Ringes des 20S-Komplexes sitzen. Die 19S-Einheiten erkennen polyubiquitinierte Strukturen, weshalb dieses Proteasom vor allem ubiquitinierte Proteine spaltet. Die 19S-Einheit führt Entfaltungen durch, was vermutlich den Eintritt der Polypeptide in den 20S-Komplex erleichtert (Kloetzel et al., 2001).

Das PA28-Proteasom (Immunoproteasom):

Eine Stimulation mit IFN- γ bewirkt den Einbau der 11S- (PA28) UE sowie von LMP2, LMP7 und LMP10 in das Proteasom. Da sich dadurch die Qualität und Quantität der Produktion antigener Peptide erhöht, wird dieses Proteasom auch als „Immunoproteasom“ bezeichnet.

Die Anlagerung der PA28-Einheit anstelle der 19S-Einheit erhöht die Kapazität der Peptidhydrolyse (Dubiel et al., 1992; Ma et al., 1992), die sich in einer simultanen doppelten Enzymaktivität äußert und die Bildung antigener Peptide verstärkt (Dick et al., 1996). Außerdem steigert PA28 die Substrataffinität des Proteasoms und die Freigabe des produzierten Peptidprodukts (Groettrup et al., 1996, Dick et al., 1996). Die regulatorischen Einheiten PA28 bestehen aus mehreren UE, von denen zwei, PA28 α und PA28 β durch IFN- γ induzierbar sind (Ahn et al., 1996b; Zhang et al., 1999).

Der Austausch der drei katalytischen, konstitutiv exprimierten β -Untereinheiten X, Y und Z durch LMP2, LMP7 und LMP10 verändert die Schneidespezifität dahingehend, dass vermehrt hinter hydrophoben, basischen und verzweigten Aminosäuren geschnitten (Aki et al., 1994; Driscoll et al., 1993; Gaczynska et al., 1993) und die Präsentation bestimmter antigener Peptide verstärkt wird (Cascio et al., 2001; Cerundolo et al., 1995; Sibille et al., 1995; Van Hall et al., 2000). Ob dabei die Präferenz des Peptidtransporters TAP für hydrophobe, anstelle von sauren Resten an Position eins, eine Rolle spielt, ist noch nicht zweifelsfrei bewiesen. Mutante Zelllinien, denen LMP2 und/oder LMP7 fehlt, zeigen allerdings keine starke Beeinträchtigung in ihrer MHC Klasse I-Antigenpräsentation (Arnold et al., 1993; Momburg et al., 1993). Jedoch ist die Präsentation von Antigenen des Influenzavirus wiederum von LMP7 abhängig (Cerundolo et al., 1995).

1.2.3.2. Extraproteasomale Modifikation antigener Peptide

Verschiedene extraproteasomale Peptidasen modifizieren den N-Terminus von antigenen Peptiden, was die Qualität der Bindung des Peptides im MHC Klasse I-Komplex positiv und negativ beeinflussen kann (Saveanu et al., 2002; Kessler et al., 2002; Kloetzel et al., 2004). Zum Beispiel ist die Expression der Oligopeptidase TOP, die antigene Peptide degradiert mit einer verminderten MHC Klasse I-Antigenpräsentation assoziiert (Saric et al., 2001; York et al., 2001). Die Peptidase TPPII dagegen kann die Präsentation bestimmter viraler Antigene verbessern (Seifert et al., 2003; Reits et al., 2004). Die Bedeutung für die Antigenpräsentation ist jedoch für diese zytosolischen Peptidasen nicht zweifelsfrei geklärt, da noch kein Zusammenhang zwischen Peptidasenaktivität und der Präsentation eines breiteren Peptidspektrums über MHC Klasse I-Komplexe nachgewiesen werden konnte (Wang et al., 2000).

Dagegen ist die „ER aminopeptidase associated with antigen processing“ (ERAAP) für das Immunsystem von entscheidender Bedeutung. Eine Inhibition dieses Enzyms führt zu einer Reduktion der MHC Klasse I-Antigenpräsentation (Serwold et al., 2002; York et al., 2004; Saric et al., 2004). Im Unterschied zu den oben genannten Peptidasen ist ERAAP im ER lokalisiert und durch IFN- γ stimulierbar. York und Koautoren (2004) identifizierten eine Substratspezifität dieses Enzyms für antigene Peptide, die um zehn oder mehr Aminosäuren lang sind. Dagegen werden Peptide mit acht Aminosäuren, was der optimalen Länge für eine MHC Klasse I-Bindung entspricht, nicht modifiziert. Die Autoren schließen, dass ERAAP N-terminale Veränderungen an proteasomal generierten Peptiden katalysiert, die deren Beladung auf den MHC-Komplex verbessern. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass unter IFN- γ -Einfluss das Immunoproteasom vermehrt N-terminal verlängerte Peptide produziert, die folglich für eine effektive MHC-Beladung durch ERAAP, dessen Expression ebenfalls durch IFN- γ erhöht wird, modifiziert werden müssten (Gaczynska et al., 1993; Driscoll et al., 1993).

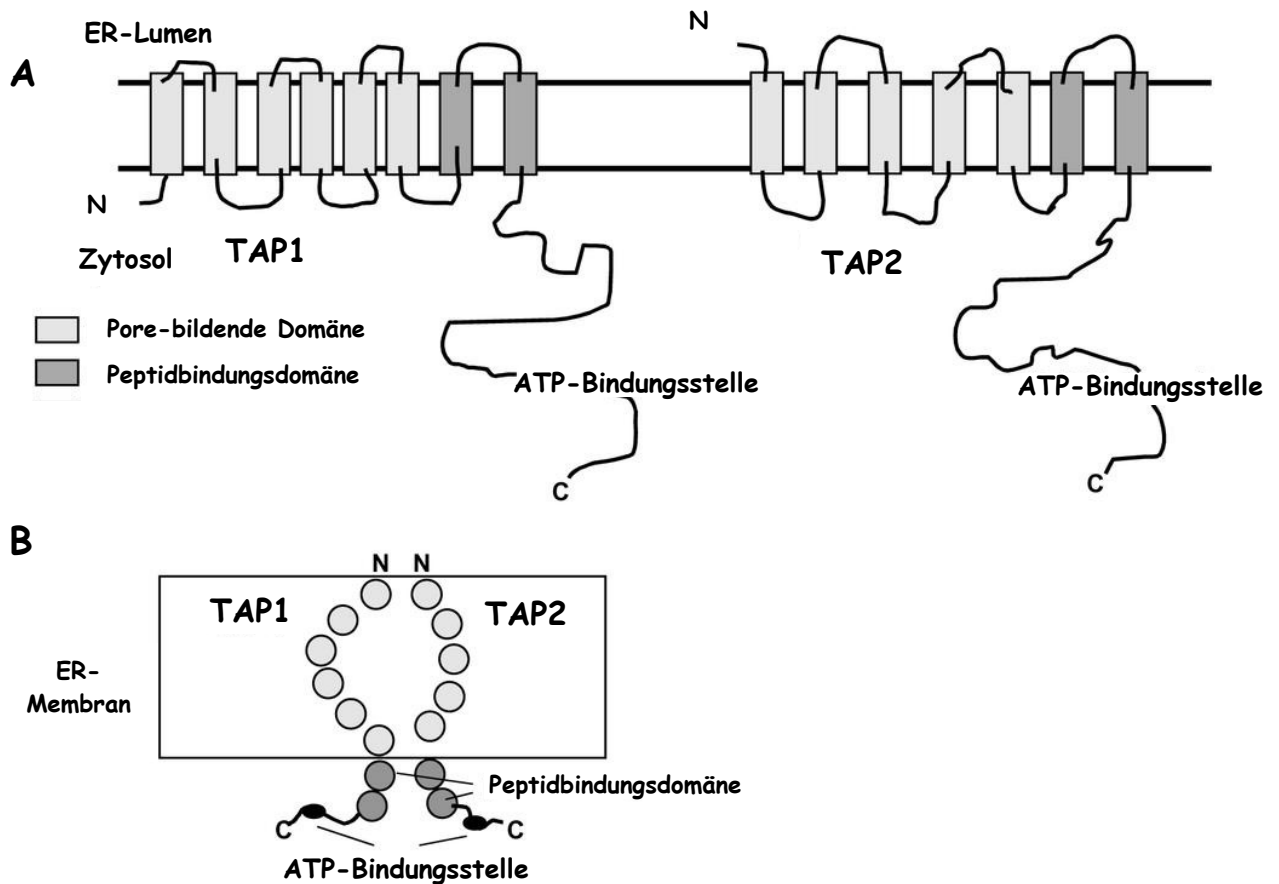
1.2.3.3. Der TAP-Transporter

Die durch das Proteasom im Zytosol generierten Peptide werden im ER auf die MHC Moleküle geladen und müssen deshalb in dieses Kompartiment transportiert werden. Dies wird durch den „Transporter associated with antigen processing“ (TAP) gewährleistet, dessen Proteinuntereinheiten im MHC Klasse II-Lokus kodiert sind. Der Transporter besteht aus zwei Untereinheiten, TAP1 und TAP2, wobei die Heterodimerisierung für den Peptidtransport essentiell ist. Jedoch liefern Experimente mit TAP2-negativen Zellen, die effizient von T-Zellen lysiert werden können, Hinweise auf den Peptidtransport von TAP1-Homodimeren (Gabathuler et al., 1994).

Die Bedeutung dieses Transporters für die MHC Klasse I-Antigenpräsentation wurde durch die Forschung an TAP-defizienten Zellen und TAP1^{-/-}-Mäusen deutlich. So zeigen die murinen RMA-S Zellen, denen die Untereinheit TAP2 fehlt, eine sehr schwache MHC Klasse I-Oberflächenexpression (Salter et al., 1986). Van Kaer und Koautoren (1992) konnten in TAP1^{-/-}-Mäusen nachweisen, dass die verminderte MHC-Oberflächenexpression auch zu einem verminderten Repertoire an CD8⁺-T-Zellen führt.

Der Transporter gehört aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften zur Superfamilie der ABC-Transporter. Beide Untereinheiten besitzen eine N-terminale hydrophobe Region, welche die ER-Membran mindestens sechsmal durchläuft, so dass ein Ringsystem entsteht, dessen Inneres eine Pore bildet. Zwei stark konservierte Domänen am C-Terminus besitzen sogenannte „Walker A“- und „Walker B“-Motive für die ATP-Bindung, dessen Spaltung die für den Transport nötige Energie liefert. Die Struktur des Transporters ist in Abbildung 1.6 dargestellt.

Abb. 1.6: Der TAP-Transporter



Dargestellt ist das Modell nach Voss et al. (1999) und die jeweilige unterschiedliche Lokalisation und Funktion der Domänen (aus Ritz et al., 2001).

Der Transport von Peptiden durch TAP lässt sich in mehrere Schritte unterteilen. Die Bindung des Peptides erfolgt unabhängig von ATP und verursacht eine Konformationsänderung durch Isomerisierung des Transporters. Das Peptid wird dann durch den Kanal geschleust, der unter ATP-Spaltung wieder die ursprüngliche Konformation einnimmt (Karttunen et al., 2001). Die Effektivität des Transportes ist von der Länge und bestimmter Sequenzeigenschaften des Peptides abhängig (Heemels et al., 1994; Momburg et al. 1994 und 1996; Neefjes et al., 1995). Die größte Effizienz wird bei einer Länge von 8-16 Aminosäuren in Peptidtranslokationsversuchen beobachtet, was mit den Längen von MHC-assoziierten Peptiden übereinstimmt (Momburg et al., 1994). Einen weiteren Einfluss auf die Effektivität des Transporters besitzt die Sequenz des Peptides. So konnten van Endert und Koautoren (1995) zeigen, dass der TAP-Transporter Peptide bevorzugt, die hydrophobe Reste an Position drei aufweisen. Dagegen verringert sich die Transporteffizienz durch einen aromatischen oder sauren Rest an Position eins oder zwei. Peptide, die mit einer geringeren Effizienz transportiert werden und entsprechend schlechter in die Grube des MHC-Moleküls passen, können durch den Seq21-Kanal in das Zytosol zurück

transportiert werden (Koopmann et al, 2000). Als Mitglied der ABC-Transporter-Familie wird auch TAP über Phosphorylierungen reguliert. Li und Koautoren (2000) konnten nachweisen, dass beide Untereinheiten, TAP1 und TAP2 phosphoryliert werden und dies zu einer Bildung von TAP, Tapasin und MHC Klasse I-Komplexen führt. In diesem Komplex kann TAP zwar noch Peptide binden, jedoch ist der Transport der Peptide in das ER blockiert.

1.2.3.4. Calnexin, ER60 und Calretikulin

Das durch den TAP-Transporter in das ER transportierte Peptid wird dort auf den β_2 -Mikroglobulin/MHC-Komplex geladen. Die Bildung dieses dimeren Komplexes und die Beladung desselben mit Peptid ist ein komplizierter Vorgang, der von verschiedenen Chaperonen abhängt und in drei Stufen unterteilt werden kann:

- i. die Faltung der schweren Kette
- ii. die Bindung von β_2 -Mikroglobulin
- iii. die Beladung des MHC-Komplexes mit Peptid

Die schwere Kette des MHC Moleküls besitzt ein Glykosilierungssignal, so dass der erste Schritt der Neusynthese des MHC-Komplexes in einer Glykosilierung im ER besteht (i). Dieser Vorgang ermöglicht die Bindung des Chaperons Calnexin, was seinerseits die Bindung von ER60 ermöglicht (Morrice et al., 1998; Lindquist et al., 1998; Hughes et al., 1998) und zur Faltung der schweren Kette führt. Anschließend assoziiert die schwere Kette mit β_2 -Mikroglobulin (ii), worauf Calnexin von dem Komplex abdissoziiert und Calretikulin den Komplex bindet (Sugita et al., 1994).

Die Assoziation von Calretikulin und die Beladung des Komplexes mit Peptid (iii) ist abhängig von der Anwesenheit von Tapasin, da sie in Tapasin-negativen Zellen fehlt (Williams et al., 2002). Im Falle von Calretikulin-negativen Zellen werden weniger K^b - und D^b -Moleküle beladen. Darüber hinaus ist in diesen Zellen die Bindung zwischen Peptid und MHC-Molekül weniger stabil und die Komplexe durchlaufen schneller das ER. Dies gibt Anlass zur Spekulation, dass Calretikulin den MHC-Komplex im ER zurückhält, bis die Beladung mit einem optimalen Peptid erfolgt ist (Williams et al., 2002). Die Kontrolle der Peptid-Bindungsqualität wird mit dem Chaperon Tapasin in Verbindung gebracht.

1.2.3.5. Tapasin

Dieses Chaperon wurde 1994 erstmals als Teil des temporären MHC- β_2 -Mikroglobulin-TAP-Komplexes im ER entdeckt (Ortmann et al., 1994). Die Funktion dieses Moleküls wurde durch Studien an Tapasin^{-/-}-Zellen genauer untersucht. So wurde in Tapasin-negativen B-lymphoblastoiden Zelllinien festgestellt, dass MHC Klasse I-Moleküle nicht mit TAP assoziieren können (Greenwood et al., 1994; Grandea et al., 1995). Sadasivan und Koautoren (1996) konnten nachweisen, dass die Assoziation

von MHC/ β_2 -Mikroglobulin mit TAP von Tapasin abhängig ist. Diese Abhängigkeit führt in den Tapasin-defizienten Zellen zu einer stark reduzierten Oberflächenexpression von MHC Klasse I-Komplexen (Grande et al., 1997; Suh et al., 1998). Diese verminderte MHC-Expression betrifft nur diejenigen HLA-Allele, die TAP-abhängig mit Peptid beladen werden, während TAP-unabhängig beladene HLA-A2-Moleküle auf der Oberfläche der Tapasin^{-/-}-Zellen normal exprimiert wurden (Grande et al., 1997).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass Tapasin die Auswahl an Peptiden bezüglich der Bindungsqualität im MHC-Molekül optimiert, was seinerseits die Stabilität des Komplexes erhöht und den Transport zur Zelloberfläche ermöglicht. Die Folge eines Tapasin-Mangels wurde auch *in vivo* in Tapasin^{-/-}-Mäusen genauer untersucht. Milzzellen und Zellen der Lymphknoten zeigten erwartungsgemäß eine um 85-90 %ige Reduktion der MHC-Oberflächenexpression, die Anzahl der T-Zellen im Thymus war reduziert und die Präsentation von Virusproteinen nach Influenza-Infektion stark beeinträchtigt (Garbi et al., 2000; Grande et al., 2000).

1.2.4. Modulation der MHC Klasse I-Antigenprozessierung

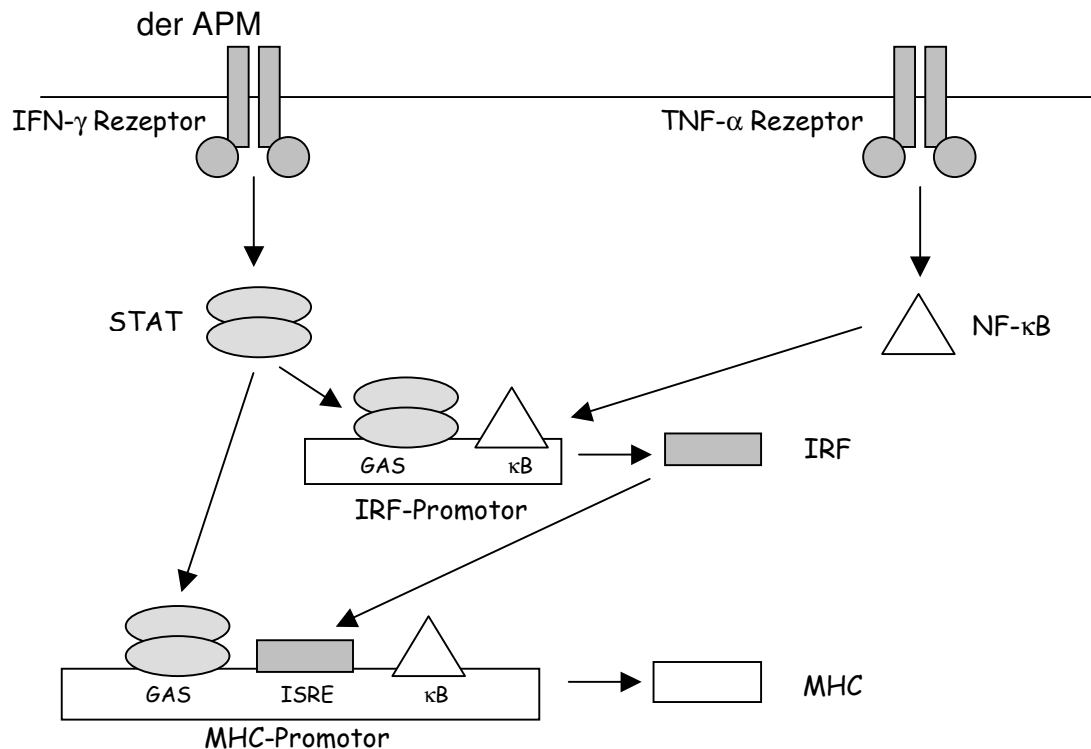
1.2.4.1. Der Einfluss von Zytokinen

Die Expression von MHC Klasse I-Komplexen an der Zelloberfläche kann durch eine Reihe von Zytokinen beeinflusst werden. Sie wirken zumeist auf transkriptioneller Ebene, indem sie die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die Promotoren der betroffenen Gene verursachen. Hierdurch kann die Transkription je nach Zytokin verstärkt oder gehemmt werden. So kommt es zum Beispiel unter der Wirkung von IFN- α , IFN- γ und TNF- α zu einer Erhöhung der Antigenpräsentation (Friedmann et al., 1985; Min et al., 1996; Boehm et al., 1997; Seliger et al., 2001a). Dagegen hat IL10 durch die Hemmung von TAP1 einen negativen Einfluss auf die Antigenprozessierung (Zeidler et al., 1997). Im Falle der MHC Klasse I-Antigenprozessierung werden die schwere Kette des MHC-Moleküls (Friedmann et al., 1985; Johnson, et al., 1990), β_2 -Mikroglobulin (Kimura et al., 1986), aber auch wichtige Komponenten der Antigenprozessierung wie TAP, Tapasin (Seliger et al. 2001b; Abarca-Heidemann et al. 2002) und Untereinheiten des Immunoproteasoms (Belich et al., 1994; Rechtsteiner et al., 2000) vermehrt transkribiert. Dabei erfolgt diese Induktion vor allem durch das von T-Zellen und NK-Zellen ausgeschüttete IFN- γ und das von NK-Zellen und Makrophagen sezernierte TNF- α , die zumeist synergistisch wirken (Boehm et al., 1997; Abb. 1.7).

Bei Bindung von IFN- γ an den Rezeptor kommt es zu einer Phosphorylierung der gekoppelten Januskinasen, die wiederum den „signal transducer of activated transcription“ (STAT) phosphorylieren und die Ausbildung eines STAT1 α Homodimeres bewirken (Taniguchi et al., 2001). Dieses Dimer kann nun an eine spezielle Basenabfolge in der Desoxyribonukleinsäure (DNS) von Promotoren, dem

GAS-Element binden und die Transkription stimulieren (Watling et al., 1993). Dabei wird auch die Transkription des „interferon regulatory factor“ IRF1 aktiviert (Boehm et al., 1997). IRF1 ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor, der seinerseits nun an spezielle „interferon sensitive response elements“ (ISRE) in der DNS bindet und die Transkription stimuliert (Coccia et al., 1995). Die Bindung von TNF an seinen Rezeptor bewirkt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der an die DNS bindet und die Transkription aktiviert (Baldwin et al., 1996).

Abb. 1.7: Mechanismus von IFN- γ und TNF- α auf die Transkription von Komponenten der APM



IFN- γ übt seine Wirkung über STAT und IRF aus, während TNF- α eine NF- κ B-Aktivierung verursacht. Beide Zytokine können die Transkription des Faktors IRF stimulieren, was zu einer synergistischen Wirkung beider Wege führt.

Die synergistische Aktivierung von TNF- α und IFN- γ entsteht durch vier Mechanismen (Boehm et al., 1997):

1. Viele induzierbare Promotoren besitzen sowohl eine Bindungsstelle für NF- κ B als auch für IRF1 oder STAT-1 α .
2. Der IRF-Promotor selbst hat eine Bindungsstelle für NF- κ B.
3. IFN- γ kann ebenfalls wie TNF- α eine NF- κ B-Aktivierung bewirken.
4. Der TNF- α Rezeptor kann auch durch die Bindung von IFN- γ aktiviert werden.

Da sich die Modulationen der Antigenprozessierung häufig auf der Promotorebene abspielen, werden im Folgenden die einzelnen Promotoren der Gene der Antigenprozessierung beschrieben.

1.2.4.2. Die transkriptionelle Regulation von MHC und TAP

Die genauen Mechanismen und Zielregionen in den Promotoren der stimulierbaren Gene der Antigenprozessierung sind nur teilweise aufgeklärt. Während die Regulation der Transkription der schweren Kette, β -2-Mikroglobulin, TAP1, Tapasin, TAP2 und LMP2 partiell bekannt ist, wurden die Promotoren von PA28 α , PA28 β , sowie von LMP7 und LMP10 noch nicht näher untersucht. Die bisher verfügbaren Daten über die transkriptionelle Regulation der Gene der MHC Klasse I-Antigenprozessierung sollen nun im Einzelnen erläutert werden.

Die schwere Kette des MHC-Moleküls

Neben den für die Bindung der RNS-Polymerase essentiellen „CAAT“- und „TATA“-Motiven und einem ISRE-Element finden sich in den Promotorsequenzen aller MHC-Gene verschiedene Konsensusmotive, die als Enhancer A, „site α “ und Enhancer B bezeichnet werden (Le Bouteiller et al., 1994).

Der Enhancer A bindet den Transkriptionsfaktor NF- κ B über zwei Konsensusmotive (κ B2 und κ B1), die nur durch wenige Nukleotide voneinander getrennt sind. Die Sequenzen der Motive weisen zwischen den Promotoren der einzelnen MHC-Gene Unterschiede auf, was zu einer unterschiedlichen Bindung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der in verschiedenen Dimerformen binden kann, führt (van den Elsen et al., 1998a). Das κ B2-Motiv im HLA-B Promotor bindet statt NF- κ B den Transkriptionsfaktor SP1 (Girdlestone et al., 1993; van den Elsen et al., 1998a), so dass es hier im Enhancer A zu SP1/NF- κ B-Wechselwirkungen kommen kann. Andere HLA-Gene, wie zum Beispiel HLA-G, binden in der Enhancer A-Region auch Transkriptionsfaktoren der Zinkfingerproteinfamilie, deren Bedeutung in diesem Zusammenhang aber noch nicht geklärt ist.

An das ISRE-Element können IRF1, IRF2 oder der „IFN stimulatory gene factor 3“ (ISGF3) binden, wodurch die Promotoraktivität unterschiedlich moduliert wird. Während IRF1 die Transkription stimuliert, wird sie durch die Bindung von IRF2 gehemmt (Hobart et al. 1997; Nelson et al., 1993). IFN- γ führt zu einer erhöhten Konzentration von IRF1 gegenüber IRF2 und zu einer verstärkten Transkription aufgrund der vermehrten Bindung von IRF1 an den Promotor.

Die „Site α “ hat große Ähnlichkeit zu dem „cAMP response element (CRE)“ und wird von verschiedenen Transkriptionsfaktoren der „Activating transcription factor“ (ATF)-Familie sowie von dem „regulatory factor X“ (RFX) gebunden. Sie hat sowohl für die konstitutive als auch die IFN- γ -induzierbare Promotoraktivität eine wichtige Bedeutung (Dey et al, 1992; van den Elsen, 1998a). So hat man festgestellt, dass eine Inaktivierung zu einem Verlust der Bindung von Transkriptionsfaktoren auch an anderen Elementen des MHC-Promotor führt (Kushida et al., 1997).

Auch der Enhancer B ist für die konstitutive Promotoraktivität essentiell, da eine Mutation der Konsensussequenz ATTGG zu ACCGG die Promotoraktivität um 50 %

herabsenkt (Schoneich et al., 1997). Diese Region weist auch die größte Übereinstimmung zwischen den Promotoren der einzelnen MHC-Gene auf (van den Elsen et al., 1998a) und bindet den Transkriptionsfaktor NF-Y (Gobin et al., 2001). Die Bindung der Transkriptionsfaktoren an die „Site α “ und an den Enhancer B ist abhängig von dem „MHC class II transactivator“ (CIITA), der eine Interaktion zwischen den einzelnen Faktoren steuert, die ihrerseits deren aktivierende Wirkung auf den Promotor ermöglicht. Gobin und Koautoren (2001) konnten desweiteren nachweisen, dass für die CIITA-Wirkung die Histonazetylase P300 unerlässlich ist, so dass man die Aggregation von P300, CIITA und den Transkriptionsfaktoren als „Enhancosom“ bezeichnet (van den Elsen et al., 1998b).

β_2 -Mikroglobulin

Die putative Promotorregion von β_2 -Mikroglobulin wurde erstmals von Kimura und Koautoren (1986) als eine Region mit Enhancer-Qualität nachgewiesen. Diese besitzt jedoch keine Ähnlichkeit zu Regionen im Promotor der schweren Kette. Der Promotor hat Bindungsstellen für NF- κ B und IRF und kann über TNF- α und IFN- γ stimuliert werden (Boehm et al. 1997). Die Elimination der Bindungsmotive für NF- κ B und IRF und eines „Inr“-Motivs, an dem vermutlich die Transkription beginnt, führt zu Aktivitätsverlusten des Promotors (Carrol et al., 1998). Übereinstimmend mit den Promotoren für die MHC Klasse I-Gene wurden auch Bindungsstellen für RFX/CREB und NF-Y nachgewiesen, an denen ein CIITA-enhaltenes Enhancosom bindet (Gobin et al., 2001).

TAP1 / LMP2

Unter den Promotoren der Gene der MHC Klasse I nimmt der Promotor für TAP1 und LMP2 eine Sonderstellung ein, da es sich um eine Region handelt, die zwischen den Genen für TAP1 und LMP2 liegt und für beide Richtungen als Promotor dient. Dieser bidirektionale Promotor wurde 1995 erstmals beschrieben und charakterisiert (Wright et al., 1995). Im Unterschied zu dem MHC Klasse I-Promotor konnte keine „TATA“-Box nachgewiesen werden. Die Transkription beginnt an verschiedenen Stellen, was typisch für Promotoren des MHC Klasse II-Lokus ist. Die Startpunkte für die TAP1-Transkription überlappen sich nicht mit denjenigen für LMP2. Yan und Koautoren (1997) konnten allerdings zeigen, dass die Mutation nur eines dieser Startpunkte in LMP2-Orientierung (TCATTC zu TCAATC) nicht nur zum Verlust dieses Startpunktes führt, sondern auch die Gesamtaktivität des bidirektionalen Promotors verringert. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass durch die Mutation nicht nur eine Erkennungsstelle für die RNS-Polymerase verloren ging, sondern auch ein neues Konsensusmotiv (CAAT) für die Bindung etwaiger nicht identifizierter Faktoren entstand, deren Wirkung nicht berücksichtigt wurde. Für die konstitutive Promotoraktivität ist die Bindung von SP1 an GC-Boxen von Bedeutung, während die Bindung

von NF- κ B für die Wirkung von TNF- α verantwortlich ist. Zusätzlich wurden Motive für die Bindung von IRF1 und STAT1 gefunden, die sowohl für die basale als auch für die IFN- γ induzierbare Aktivität des Promotors wichtig sind (Wright et al., 1995; Min et al., 1996; Chatterjee-Kishore et al., 1998 und 2000).

TAP2

Der TAP2-Promotor wurde 1998 als eine 1788 Basenpaare (Bp) lange, aus der 5' „untranslated region“ (UTR) des murinen TAP2-Gens stammende Region, die in Reporterassays Promotoraktivität aufwies, kloniert (Zheng et al., 1998). Arons und Koautoren (2001) ermittelten die Startpunkte für die Transkription, die analog zu dem TAP1/LMP2-Promotor und anderen Promotoren des MHC Klasse II-Lokus an verschiedenen Stellen beginnen und die im Falle von TAP2 in sogenannten MED-1-Motiven liegen. Die Autoren fokussierten ihre Analyse auf eine ca. 600 Bp lange Region und fanden eine Bindungsstelle für IRF1, die sowohl für die konstitutive, als auch für die induzierbare Aktivität des Promotors wichtig ist. Bei der Untersuchung der angrenzenden Regionen wurden später noch Bindungsstellen für SP1, sowie CRE-Motive gefunden (Gou et al., 2001), was darauf hinweist, dass innerhalb der 1788 Bp langen Region mehrere Sequenzabschnitte vorhanden sind, die für die Aktivität des Promotors von entscheidender Bedeutung sind. Weitere Untersuchungen, welche die Bindung von Transkriptionsfaktoren an den TAP2-Promotor nachweisen, wurden bisher nicht durchgeführt.

Tapasin

Der Tapasin-Promotor wurde bisher noch nicht detailliert charakterisiert, jedoch wurde die 5' UTR-Region auf potentielle Bindungsstellen im Zusammenhang mit der Induktion von Tapasin durch IFN- γ und TNF- α untersucht. Dabei wurden mit Hilfe des Computerprogrammes MatInspector (Quando et al., 1995) Motive für SP1, NF- κ B, STAT und IRF gefunden, diese jedoch nicht weiter auf ihre Funktionalität hin überprüft (Abarca-Heidemann et al., 2002).

Aus den oben angeführten Zusammenhängen lässt sich erkennen, dass die für die transkriptionelle Regulation wichtigen Promotoren der APM-Gene wenige Gemeinsamkeiten aufweisen. Diejenigen Promotoren, die im MHC Klasse II-Lokus liegen, besitzen mehrere Startpunkte (TAP1, TAP2, LMP2). Die Stimulation mit Zytokinen erfolgt offensichtlich über die Bindung von NF- κ B und IRF/STAT an die Promotoren.

1.2.4.3. Virale Effekte auf die Antigenprozessierung

Viele Viren haben Mechanismen entwickelt, die Peptidpräsentation über MHC Klasse I-Moleküle zu verhindern. Dabei erfolgt der Einfluss auf die Antigenprozessierung auf unterschiedlichen Ebenen (Miller et al., 1999; Lorenzo et al., 2001; Vossen et al.,

2002). So hemmen zum Beispiel Epstein-Barr-Viren die Proteolyse von zytosolischen Proteinen, Herpesviren, EBV und Adenoviren blockieren den Peptid-Transport oder die Interaktion mit Tapasin und viele Viren, wie CMV, verhindern die Translokation der MHC-Komplexe vom ER über den Golgiapparat an die Zelloberfläche. Die Mechanismen sollen nun etwas genauer angeführt werden (Abb. 1.8):

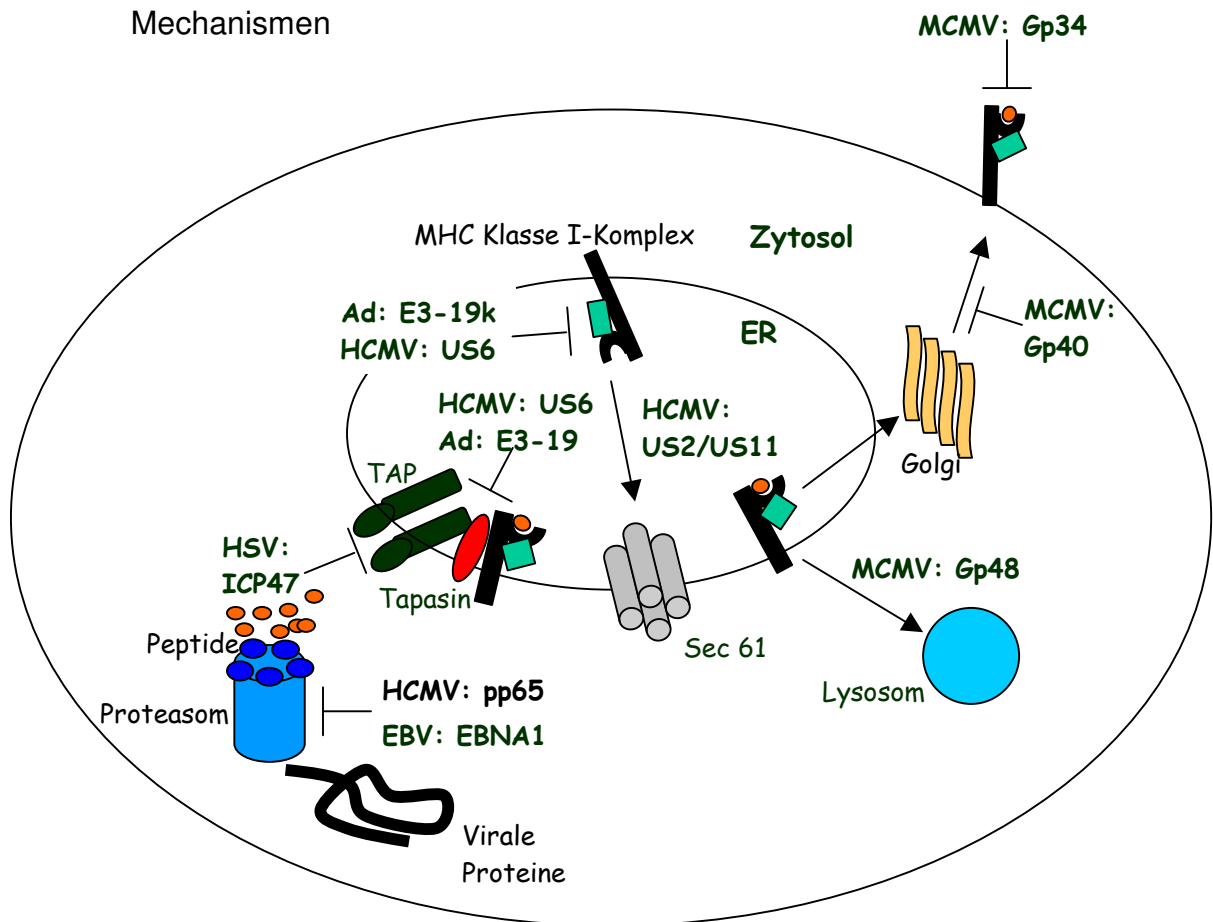
Hemmung der proteasomalen Degradation: Ein Matrixprotein des „human cytomegalie virus“ (HCMV) phosphoryliert viruseigene Proteine und verhindert so deren Degradation durch das Proteasom (Gilbert et al., 1993, 1996; Schmolke et al., 1995). Dagegen besteht die Strategie des Epstein-Barr Virus darin, über eine „Gly-Ala“-Repetition in dem Virusprotein EBNA-1 dessen Proteolyse zu hemmen. Aufgrund dieses Motivs entstehen β -Faltblattstrukturen im Protein, was den Eintritt in das Proteasom verhindert (Levitskaya et al., 1997; Sharipo et al., 2001).

Hemmung von TAP: Das Protein US6 des HCMV bindet nach seiner Synthese im ER Calnexin mit hoher Affinität und wird so im ER zurückgehalten. Dort kann es sich an TAP1 anlagern und dadurch verhindern, dass TAP1 ein ATP binden kann. Obwohl noch eine Peptidbindung an TAP möglich ist und TAP2 immer noch ATP binden kann, ist so der Transport von Peptiden unterbunden (Ahn et al., 1996a, 1997; Hengel et al., 1997; Hewitt et al., 2001). Bei der Wirkung von ICP47 („infected cell protein“) des HSV wird dagegen die Peptidbindungstelle im TAP Transporter kompetitiv blockiert und so die Assoziation des MHC Klasse I-Komplexes aufgrund fehlender antigener Peptide im ER unterbunden (Ahn et al., 1996c; Früh et al., 1995; Hill et al., 1995; Tomazin et al., 1999; Beinert et al., 1997). Außerdem führt die Bindung des ICP47 zu einer Destabilisierung des TAP-Heterodimers und beeinträchtigt so dessen Funktion (Lacaille et al., 1998). Das Adenovirale Protein E19 blockiert durch seine Bindung an TAP die Interaktion zwischen TAP und Tapasin und verhindert damit die Assoziation zwischen TAP und dem MHC Klasse I-Komplex (Bennett et al., 1999). Ein noch nicht identifiziertes „early protein“ des „Equine herpes virus“ (EHV-1) blockiert den Peptidtransport durch TAP bereits zwei Stunden nach der Infektion (Ambagala et al., 2004).

Blockade der Translokation des MHC-Komplexes: Das Protein US6 des HCMV bindet den MHC/ β_2 -Mikroglobulin-Komplex vor dessen Peptidbeladung. Diese kann zwar noch erfolgen, aber der Komplex wird im ER zurückgehalten (Ahn et al., 1996a; Jones et al., 1996). Der MCMV Virus kodiert zwei Proteine, die eine Translokation von MHC-Komplexen verhindern können: Gp40 hält die Komplexe im Golgi-Apparat zurück, während Gp48 den Rücktransport in Lysosomen und die Degradation der Komplexe bewirkt (Ziegler et al., 1997, 2000; Reusch et al., 1999; Krmpotic et al., 2002). Ein weiteres MCMV-Protein, Gp34, bindet die MHC-Komplexe an der Zell-

oberfläche und verhindert deren Interaktion mit dem T-Zell-Rezeptor (Kavanagh et al., 2001). Ein Produkt des Adenovirus, das Genprodukt E3-19k, bindet ebenfalls die MHC-Moleküle im ER und verhindert damit deren Glykosilierung. Allerdings kann dieser Effekt durch IFN- γ verringert werden (Vossen et al., 2002). Zusätzlich kann E3-19k auch MHC und TAP binden und so als kompetitiver Inhibitor von Tapasin wirken. Das HCMV degradiert MHC-Komplexe über die Proteine US2 und US11. Die MHC-Moleküle werden über den Sec61 Kanal wieder aus dem ER in das Zytosol geschleust und unterliegen dort einer schnellen Degradation (Wiertz et al., 1996; Furmann et al., 2002).

Abb. 1.8: Überblick über die verschiedenen, angeführten viralen „Immune escape“-Mechanismen



Dargestellt sind die im Text erwähnten viralen Proteine und ihr Angriffspunkt innerhalb der MHC Klasse I-Antigenpräsentation

In den oben angeführten Mechanismen handelt es sich meist um post-transkriptionelle Regulationen, jedoch sind auch Wirkungen auf die Promotoren von Antigenprozessierungsgenen bekannt. So sind die RNS-Mengen von TAP2, LMP2 und LMP7 um das 100 fache niedriger in Adenovirus Typ12-infizierten Zellen. Auch TAP1, die schwere Kette von MHC und β_2 -Mikroglobulin sind um das Zwei bis Zehnfache herunterreguliert. Dabei erfolgt die Hemmung der MHC-Transkription durch den Repressor COUP-TFII („Chicken ovalbumin upstream promotor trans-

cription factor II“), der in Assoziation mit der Histondeazetylase HDAC an den MHC Klasse I-Enhancer bindet (Hou, et al., 2002; Smirnov et al., 2001). Zhao und Koautoren (2003) konnten zeigen, dass dabei die enzymatische Aktivität der Histondeazetylase für die eigentliche Inhibition der Transkription verantwortlich ist. Dieser Mechanismus ist allerdings nicht für TAP und β_2 -Mikroglobulin nachgewiesen, denen auch die entsprechenden Erkennungssequenzen für COUP-TFII fehlen.

1.2.4.4. „Immune escape“ Mechanismen von Tumoren

Ähnlich wie bei einer Virusinfektion kann eine Zelle auch bei einer malignen Transformation die Fähigkeit verlieren, MHC Klasse I-Komplexe auf der Oberfläche zu präsentieren. Dies wurde erstmals anhand des Verlustes von MHC-Molekülen in einem Maus-Lymphom (Garrido et al., 1976), und wenig später im humanen Melanom nachgewiesen (Pellegrino et al., 1977). Diese Alterationen können in Tumorarten unterschiedlichster Histologie mit einer großen Häufigkeit auftreten (Garcia-Lora et al., 2003b, Tabelle 1.2, S.22) und erlauben dem Tumor einer Detektion durch das Immunsystem zu entkommen, was zu dem Begriff des „Immune escape“ geführt hat (Seliger et al., 2000). Da diese Tumoren oft eine starke Metastasierungsrate und eine schnelle Progression der Erkrankung zeigen (Kageshita et al., 1999; Garrido et al., 1997), wurde postuliert, dass der Verlust der Immunogenität von Tumoren essentiell für die Progression einer Krebserkrankung ist (Algarra et al., 2004; Garcia-Lora et al., 2003b; Khong et al., 2002). Tumore, bei denen derartige Verlustvarianten entdeckt wurden, sind zum Beispiel Hodgkin-Lymphom, Melanom, Blasen-, Brust-, Kolon-, Kopf- und Hals, Nieren- Haut- Kehlkopf- und Zervixkarzinom (Tab. 1.2, S.22). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind im Vergleich zu dem viralen „Immune escape“ nur wenig untersucht. Im Unterschied zu den meisten viralen Strategien wird jedoch nicht ein Protein gezielt produziert und dadurch die MHC-Antigenprozessierung vor allem auf der post-translationellen Ebene gehemmt. Vielmehr finden sich bei Tumoren meist komplette Gen-Verluste oder eine Hemmung der Transkription dieser Gene (Algarra et al., 2004; Garcia-Lora et al., 2003a, 2003b; Rivoltini et al., 2002, Tabelle 1.1, S.21).

Nach Algarra und Koautoren (2004) führt die erhöhte Proliferationsrate in einem frühen Tumorstadium zu einer Anhäufung an Mutationen, die auch den Verlust der MHC-Oberflächenexpression zur Folge haben können. Unter der Vermutung, dass Tumor-spezifische T-Lymphozyten oder NK-Zellen diejenigen Tumorzellen lysieren, die eine unveränderte Immunogenität aufweisen, sollten durch diesen Selektionsdruck die entstandenen „Immune-escape“-Varianten auswachsen können, so dass in späteren Tumorstadien in allen Zellen die Immunogenität verloren gegangen sein könnte (Algarra et al., 2004). So führte zum Beispiel die Impfung von Melanom-Patienten mit einem über HLA-A1 präsentierten Tumor-spezifischen Antigen zur klonalen Expansion von Tumorzellen, die β_2 -Mikroglobulin aufgrund genetischer

Alterationen verloren hatten (Benitez et al., 1998). Die folgende Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die verschiedenen „Immune escape“-Phänotypen und deren molekularen Ursachen:

Tab. 1.1: Die unterschiedlichen molekularen Ursachen einer verminderten MHC-Expression in humanen Tumoren (nach Garcia-Lora et al., 2003)

Phänotyp	Mechanismus	Tumortyp
Totaler Verlust aller MHC-Haplotypen	Mutation von β_2 -Mikroglobulin oder TAP	Burkitt's Lymphom, Colon-, Lungen-, Haut-, Nieren-, Prostatakarzinom
Verlust eines MHC Haplotyps	Deletionen im Chromosom 6 im Bereich 6p21, „Loss of heterozygosity“	Zervixkarzinom, Haut-, Pankreas-, Colonkarzinom
Verlust eines MHC-Genlokus	veränderte Gen-Regulation oder Methylierung, Mutation oder Gen-Verlust	Zervixkarzinom, Melanom
Verlust eines MHC-Allels	Mutation/Deletion des MHC-Gens	Haut-, Colonkarzinom, Zervixkarzinom
Verlust der IFN- γ -Induzierbarkeit	Defekte in der Signalkaskade von IFN- γ	Magen-, Nierenkarzinom
Verminderte MHC-Expression an der Zelloberfläche	Defekte in der Antigenprozessierung	Burkitt's Lymphom, Colon-, Lungen-, Haut-, Nieren-, Brustkarzinom u.v.a.

Eine genetische Ursache einer verminderten MHC-Expression kann durch einen entsprechenden Gen-Transfer ausgeglichen werden, wenn der Defekt auf einzelne Gene begrenzt ist (Hicklin et al., 1998). Einige der „Immune escape“-Phänotypen beruhen jedoch nicht auf einem Gen-Verlust, sondern auf einer veränderten Gen-Regulation, die reversibel ist (Garcia-Lora et al., 2003b; Algarra et al., 2004). Solche Alterationen wurden zum Beispiel für den TAP Peptidtransporter (Oudejans et al., 1996; Seliger et al., 1997; Murray et al., 1998; Vitale et al., 1998a), die Proteasom-Untereinheiten (Kageshita et al., 1999; Johnsen et al., 1998; Seliger et al., 1996, 2000) und Tapasin (Seliger et al., 2000, 2001a; Delp et al., 2000; Dissemond et al. 2003) festgestellt. Die folgende Tabelle 1.2 gibt einen Überblick über die Tumorarten, in denen derartige Defekte von LMP2, LMP7, TAP1, TAP2 und HLA detektiert wurden:

Tab. 1.2: Mittlere prozentuale Hemmung von TAP, LMP und HLA in Tumoren

Typ	N	TAP1	TAP2	LMP2	LMP7	HLA
Brustkrebs	168	13-44	21	42	42	61
Lungenkrebs	93	38	n.b.	100	100	100
Dickdarmkrebs	159	14	n.b.	n.b.	n.b.	87
Nierenkrebs	300	54	n.b.	70	45	19
Kopf-Halstumor	76	49	n.b.	0	0	29
Hautkrebs	70	38	32	50	57	n.b.
Hodgkin-Syndrom	8	100	88	100	0	100
Kehlkopfkarcinom	76	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	70
Zervixkarzinom	30	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	96
Myelom	13	13	13	n.b.	n.b.	13

Angegeben sind die mittleren prozentualen Hemmungen der Expression im Vergleich zu dem jeweiligen Normalgewebe. Die Mittelwerte wurden aus den Daten folgender Publikationen errechnet: Atkins et al., 2004; Garcia-Lora et al., 2003b; Kamarashev et al., 2001; Ritz et al., 2001; Seliger et al., 2000; 2003; Koopman et al., 2000; Cabrera et al., 1996, 1998, 2000). n.b.: nicht bestimmt.

Studien an Tumorzelllinien und an Onkogen-transformierten Zellen zeigten einerseits, dass häufig die Transkriptmengen von TAP und anderen Komponenten verringert sind und andererseits, dass eine Behandlung mit IFN- γ die Antigenprozessierung und -präsentation rekonstituieren (Epperson et al., 1993; Seliger et al., 1996; Garcia-Lora et al., 2003b). Hieraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass dieser „Immune escape“ durch eine veränderte Regulation der Transkription bestimmter Komponenten der MHC Klasse I-Antigenprozessierung entsteht (Algarra et al., 2004). In Onkogen-transformierten Zellen führt eine verminderte TAP1/LMP2-Promotoraktivität zu geringeren Transkriptmengen von TAP1 und LMP2 (Harders und Seliger, unveröffentlichte Daten).

Für die Immuntherapie von Tumoren haben diese Zusammenhänge eine große Bedeutung. In vielen dieser Ansätze wird versucht, T-Zellen zu etablieren, die „Tumor-assoziierte Antigene“ (TAA) erkennen und Tumorzellen eliminieren. Die Tumorzellen sollten sich durch die Präsentation dieser Antigene vom Normalgewebe eindeutig unterscheiden, um eine Autoimmunreaktion zu vermeiden. Eines dieser Antigene ist HER-2/neu, welches vor allem in Brust- und Ovarialtumoren sehr stark überexprimiert wird. In dieser Arbeit soll mit Hilfe eines *in vitro*-Zellmodells untersucht werden, ob HER-2/neu zu den Onkogenen gehört, die in Zellen einen „Immune escape“ auslösen können, um wichtige Hinweise für entsprechende Immuntherapien zu liefern. Im Folgenden soll dieses Molekül genauer vorgestellt werden.

1.3. HER-2/neu

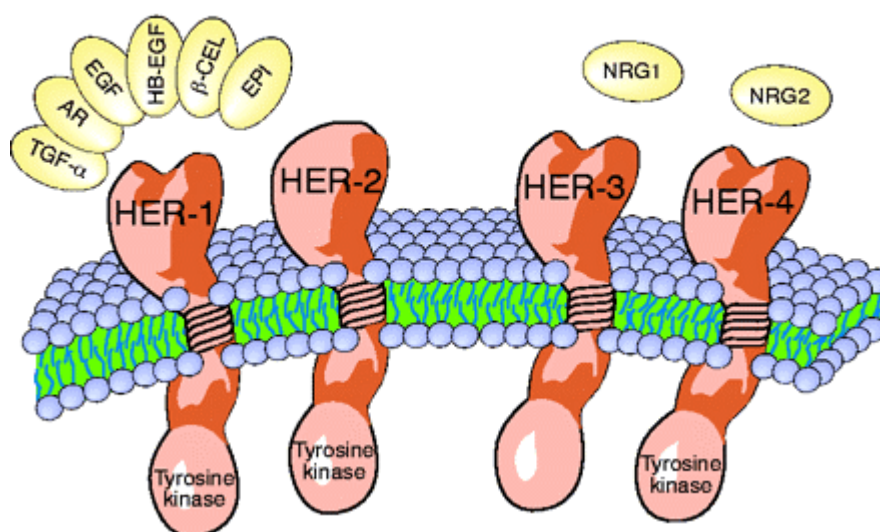
HER-2/neu ist eines von vier Mitgliedern der „human epidermal growth factor receptor“ (HER) Familie, die als HER-1 - HER-4 bezeichnet werden und Rezeptoren für Wachstumsfaktoren darstellen. HER-2/neu ist auf Chromosom 17q21 mit 27 Exons und 4477 Bp kodiert. Es stellt ein 185 kDa schweres Glykoprotein dar, das dem HER-1 homolog ist. Den Zusatz „neu“ erhielt HER-2 durch die Entdeckung des Ratten-Homologs in *Neuroblastomen* (Shih et al., 1981). Wenig später wurde auch das humane Gen isoliert (Coussens et al., 1985). Aufgrund der erstmaligen Beschreibung in Neuroblastomen und der Tatsache, dass es in zahlreichen Tumoren überexprimiert wird, wird es als Onkogen eingestuft (Nerve et al., 2001).

Allerdings wird HER-2/neu auch in vielen normalen Geweben epithelialen Ursprungs exprimiert (Press et al., 1990), was auf eine essentielle physiologische Bedeutung hinweist. Da die HER-2/neu-Expression in embryonalen Zellen stärker als in adulten Geweben ausgeprägt ist, wird vermutet, dass HER-2/neu für das Wachstum und die Differenzierung von Zellen eine wichtige Rolle spielt.

1.3.1. Die Struktur und Funktionsweise von HER-2/neu

Wie alle HER-Rezeptoren ist HER-2/neu ein Transmembranprotein mit einer cysteinreichen, extrazellulären Domäne, einer lipophilen membrandurchlaufenden Domäne und einer intrazellulären Domäne, die eine Tyrosinkinase-Aktivität besitzt (Abb. 1.9). Diese Rezeptoren werden deshalb auch als Rezeptortyrosinkinasen (RTK) bezeichnet.

Abb. 1.9: Struktur der HER-Rezeptoren



Dargestellt ist die Lokalisation der vier verschiedenen HER-Rezeptoren an der Zellmembran, sowie deren bisher gefundenen Liganden. HER-3 besitzt keine Tyrosinkinase, HER-2 keinen bekannten Liganden. TGF: „Transforming growth factor“, AR: Amphiregulin, EGF: „Epidermal growth factor“, HB-EGF: „Heparin binding EGF“, β-CEL: Betacellulin, EPI: Epiregulin, NRG: Neuregulin (aus Ross et al., 2004).

Die monomeren Rezeptoren bilden bei Bindung eines Liganden ein Mono- oder Heterodimer (Alroy et al., 1997). Abhängig von dem gebundenen Liganden entstehen dabei verschiedene Dimere, die wiederum unterschiedliche Signalkaskaden in der Zelle aktivieren. So kommt es bei der Bindung von EGF und seinen Derivaten zur Bildung von HER-1-Homodimeren oder zu HER-1/HER-2-Heterodimeren (Pinkas-Kramarski et al., 1996, 1997). Dagegen führen Neureguline (NRG) zur Bildung von HER-2/HER-3 oder HER-2/HER-4 (Vartanian et al., 1997; Tzahar et al., 1996). Bisher konnte allerdings kein Ligand gefunden werden, der die Bildung von HER-2-Homodimeren verursacht. Aus diesem Grunde wird vermutet, dass HER-2/neu als Dimerisierungspartner für die anderen Rezeptoren dient, was die Signalweiterleitung variieren kann.

Tzahar und Koautoren (1996) konnten nachweisen, dass HER-2/neu als Partner von anderen Rezeptoren bevorzugt wird und HER-2/neu-enthaltende Heterodimere eine stabilere Bindung des Liganden aufweisen. Dies bewirkt wiederum eine langsamere Internalisierung des Rezeptorkomplexes in die Zelle, so dass ein rascher Abbruch des Signals verhindert wird (Karunagaran et al., 1996; Pinkas-Kramarski et al., 1996; Baulida et al., 1994). Darüber hinaus können HER-2/neu-enthaltende Rezeptordimere nach der Internalisierung wieder recycelt werden, was statt zu einer lysosomalen Degradation zu einer erneuten Signalgebung an der Zelloberfläche führt (Waterman et al., 2001).

1.3.1.1. HER-2/neu aktiviert zahlreiche Signalkaskaden

Die Ausbildung eines Dimers führt bei den RTK's zu einer Autophosphorylierung der Tyrosinreste (Ullrich et al. 1990). Die phosphorylierten Aminosäuren dienen dann als Bindungsstelle für eine Reihe von Signalproteinen. Diese besitzen SH2- oder SH3-Domänen, die Phosphotyrosine mit hoher Affinität binden. Die zahlreichen Proteinwechselwirkungen, die von RTK's angeregt werden, können in drei Signalkaskaden eingeteilt werden (Abb. 1.10, S. 32): Die Ras/MAP-Kinase-Kaskade, der Phospholipase C- γ -Weg und der Signalweg über Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K).

Der Ras/MAP-Kinase-Weg

An den phosphorylierten Rezeptor binden die Adaptermoleküle Grb2 oder Shc mit ihrer SH2-Domäne. Beide haben auch eine SH3-Domäne, mit der der „guanine-exchange factor“ (Sos) interagiert, worauf der Komplex an die Plasmamembran der Zelle wandert. Dort katalysiert Sos die Dissoziation des GDP von Ras, so dass ein Ras-GTP-Komplex entstehen kann. Dies wiederum führt zur Aktivierung von Raf-1, einer Serin-Threonin-Kinase, die die Threonin-Tyrosin-Kinase MEK phosphoryliert, die ihrerseits die „mitogen activated protein-kinase“ MAP (ERK) aktiviert. Die Folge ist die Aktivierung einer Reihe von Transkriptionsfaktoren, wie AP1 und Myc, welche

die Transkription verschiedener Gene aktivieren und die Zelle zu Wachstum und Teilung anregen (Reese et al., 1997).

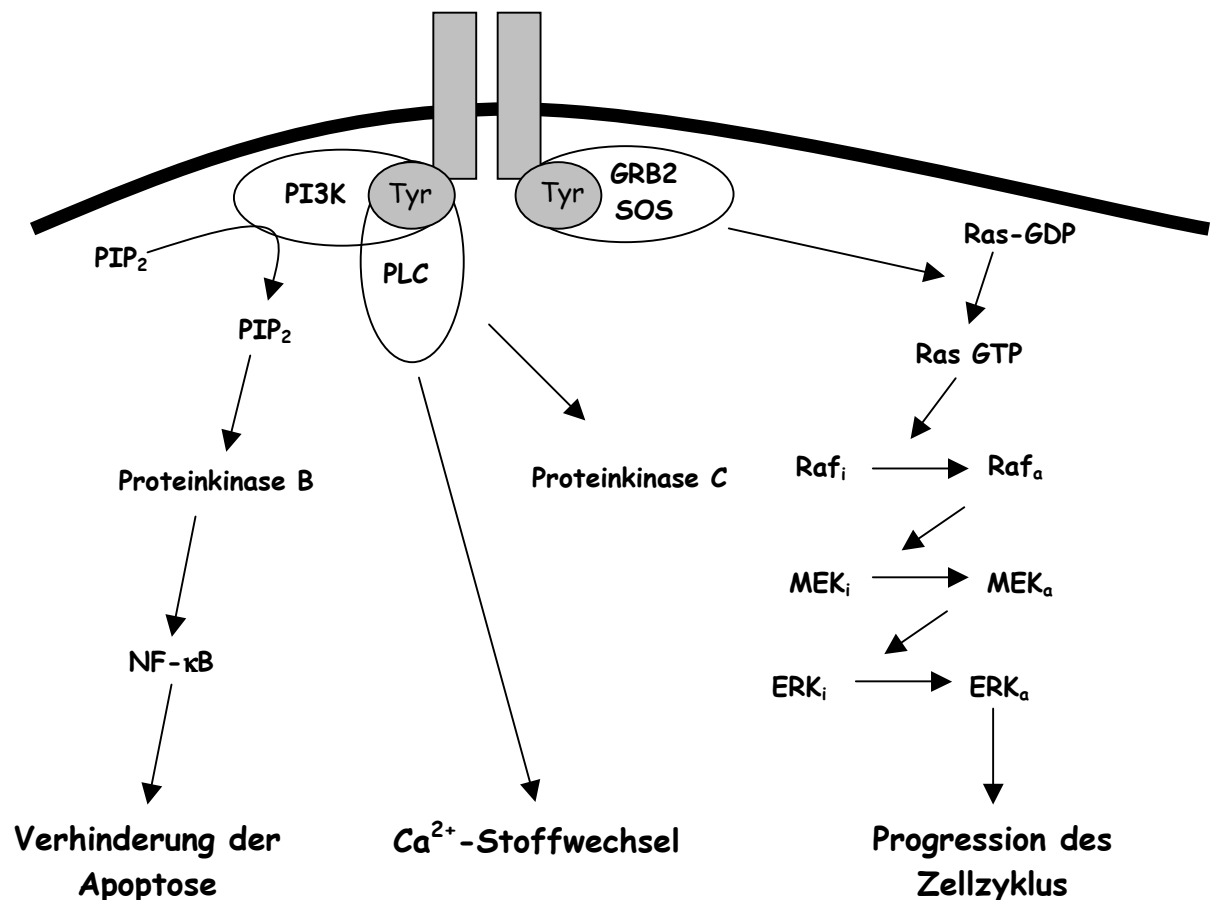
Der Phospholipase C-γ (PLCγ) Weg

Hier bindet die Phosphodiesterase PLCγ die aktivierten Tyrosinreste des Rezeptors, was zu ihrer Aktivierung führt. Die enzymatische Aktivität generiert die „second messenger“-Moleküle Inositol-1,4,5-Triphosphat und Diacylglycerol. Die Folge ist die Mobilisierung des intrazellulären Kalzium-Stoffwechsels und die Aktivierung der Protein-Kinase C (Alroy und Jarden, 1997; Dittmar et al., 2002).

Der Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) Weg

Die Bindung von PI3K über SH2 und SH3 Domänen an die RTK löst die enzymatische Aktivität von PI3K aus und induziert die Bildung weiterer „second messenger“. Von diesen ist die Protein-Kinase B/AKT verantwortlich für anti-apoptotische Signale, wie zum Beispiel die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB (Prenzel et al., 2001).

Abb.1.10: Signalkaskaden von HER-2/neu



Die von HER-2/neu aktivierten Signalwege führen zur Blockade der Apoptose und zur Progression des Zellzyklus.

1.3.1.2. Die biologische Funktion von HER-2/neu

Die ubiquitäre Expression von HER-2/neu in embryonalen und adulten epithelialen Geweben und die oben angeführten Signalwege lassen auf eine generelle Bedeutung des Rezeptors für das Wachstum und die Differenzierung von Zellen schließen. Den Beweis dafür lieferten HER-2/neu^{-/-}-Mäuse, die als Embryonen sterben. Diesen Mäusen fehlten zum Beispiel die Schwann'schen Zellen und das Nervensystem war unzureichend ausgebildet (Linn et al., 2000; Leu et al., 2003). Aber auch für die Entwicklung von Herz, Verdauungstrakt und anderen Organen sind die RTK's von essentieller Bedeutung (Stern, 2003). Darüber hinaus interagiert HER-2/neu auch mit anderen Rezeptoren, wie dem Androgenrezeptor (Yeh et al., 1999) oder dem Prolaktinrezeptor (Yamauchi et al., 2000), was auf die Bedeutung für die Proliferation von Zellen auch in adultem Gewebe hinweist. Ein Beispiel hierfür liefert die HER-2/neu-abhängige Entwicklung des Brustdrüsengewebes während hormonell ausgelöster Entwicklungsstadien, wie z.B. Pubertät und Schwangerschaft (Yang et al., 1995).

Einen weiteren Hinweis für die Bedeutung von RTK's im Brustgewebe liefern Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass EGF für die *ex vivo* Kultur von Zellen der Brustdrüse essentiell ist (Turkington 1969; Tonelli et al., 1980) und *in vivo* in diesen Zellen exprimiert wird (Kenney et al., 1995; Snedeker et al., 1991; Brown et al., 1989). Desweiteren kann Östradiol die Phosphorylierung der Tyrosinreste in HER-1 und HER-2/neu stimulieren (Sebsatian et al., 1998). Dabei wird vermutet, dass Östradiol die Bildung von EGF auslöst, das aus den Zellen ausgeschieden wird, an die RTK's in den Zellmembranen bindet und so die Proliferation in den Zellen über einen „autokrinen loop“ stimulieren kann (Stern et al., 2003).

Die Ausdifferenzierungen des weiblichen Brustgewebes finden erst durch die hormonellen Wirkungen während der Pubertät, der Schwangerschaft und der Lactation statt. Folglich ist HER-2/neu, wie die anderen HER Rezeptoren, vor allem in diesen Stadien stärker exprimiert (Schroeder et al., 1998). Aufgrund der zahlreichen Apoptose-hemmenden und Proliferation-auslösenden Signalkaskaden, die durch die RTK's aktiviert werden, ist die Kontrolle der Transkription der HER-Rezeptoren von entscheidender Bedeutung für eine kontrollierte Gewebeentwicklung. Dies gilt in erster Linie für HER-2/neu, da es der potenteste Signalauslöser ist. Eine deregulierte HER-2/neu-Expression kann zu unkontrolliertem Wachstum und zur Tumorbildung führen, weshalb HER-2/neu als Onkogen bezeichnet wird (Neve et al., 2001).

1.3.1.3. Die onkogene Wirkung von HER-2/neu

Die onkogene Wirkung von HER-2/neu wurde aufgrund der Entdeckung in Neuroblastomen von Ratten vermutet und kurz darauf experimentell bestätigt: Die

stabile Transfektion von murinen Fibroblasten NIH3T3 mit dem aufgrund einer Punktmutation aktivierten Rattengen c-neu verursachte einen transformierten Phänotyp in diesen Zellen, die nun in Softagar wachsen konnten. Dieser Effekt ließ sich durch einen blockierenden Antikörper gegen c-neu revertieren (Drebin et al., 1985). Transgene Mäuse, die dieses aktivierte c-neu in Drüsengeweben exprimieren, entwickeln metastasierende Tumore (Lollini et al., 1997). In vielen humanen Tumoren unterschiedlichster Histologie konnte eine Überexpression von HER-2/neu im Vergleich zum Normalgewebe nachgewiesen werden, was Anlass zu der Vermutung gibt, dass die transformierenden Eigenschaften von HER-2/neu in humanen Tumoren in der überdurchschnittlich großen HER-2/neu-Proteinmenge begründet ist (Menard et al., 2001).

Diese Hypothese wird durch Experimente mit transgenen Mäusen, die das nicht-mutierte c-neu in Drüsengeweben überexprimieren, bestätigt. Aus fünf von sechs Zelllinien entwickelten sich Tumore, die ein starkes Metastasierungspotential aufwiesen (Guy et al., 1992). Allerdings scheint die onkogene Wirkung von HER-2/neu entwicklungsabhängig zu sein: Shermann und Koautoren (1999) konnten eine Transformation in embryonalen Schwann'schen Zellen mit dem aktivierten c-neu nur erreichen, wenn die Zellen aus 16 Tage alten Embryos stammten, während Zellen von neonatalen Tieren sich nicht transformieren ließen.

Die Ursachen für die Überexpression von HER-2/neu in humanen Tumoren können Punktmutationen sein, am häufigsten wurden jedoch Gen-Amplifikationen nachgewiesen (Pauletti, et al., 1996, Press et al., 1997, Ross et al., 1999, Järvinen et al., 2003). Die Amplifikation betrifft nicht nur das HER-2/neu-Gen allein, sondern einen größeren Bereich des Chromosoms 17q. In diesem Bereich, 17q12-21, der auch als „HER-2-amplicon“ bezeichnet wird, befinden sich zum Beispiel die Gene für den Thyroidrezeptor, den Retinsäurerezeptor oder die Topoisomerase II α . Die Ursachen für die häufig auftretende erhöhte Kopienzahl des betreffenden Genlokus sind noch nicht bekannt (Järvinen et al., 2003). Da sie jedoch in den verschiedensten Gewebetypen nachweisbar ist, kann ein Zusammenhang zwischen Gen-Amplifikation und Gewebetyp ausgeschlossen werden.

HER-2/neu-überexprimierende Tumore fanden sich unter anderem in Brust, Ovar (Slamon et al., 1989), Blase (Sauter et al., 1993), Niere (Rotter et al., 1992) und Verdauungstrakt (Lemoin et al., 1991). Die teilweise bis zu 50fache Amplifikation des Gens erhöht die Anzahl HER-2/neu-enthaltener Dimere, was die Signalweiterleitung durch unterschiedliche Liganden stimuliert (Szöllösi et al., 1995; Järvinen et al., 2003). Nagy und Koautoren (1999) berichteten über Rezeptor-Aggregationen, die aus hunderten von Rezeptormolekülen bestehen und so die Signalweiterleitung durch gegenseitige Phosphorylierung der Tyrosinreste permanent aktivieren.

Der direkte Zusammenhang zwischen HER-2/neu-Proteinmenge und seinem onkogenen Potential wird als Ursache dafür angesehen, dass HER-2neu überex-

primierende Tumore als besonders aggressiv eingestuft werden (Slamon et al., 1987; Allred et al., 1992; Hynes et al., 1994; Salomon et al., 1995; Sjogren et al., 1998; Nicholson et al., 2001).

1.3.1.4. HER-2/neu Signalkaskaden im Tumor

Als Folge der dauerhaften Aktivierung von HER-2/neu sind die oben angeführten Signalkaskaden permanent aktiviert. Entsprechend wurden in Tumoren mit HER-2/neu Überexpression zahlreiche Mitglieder dieser Kaskaden in ihrer aktiven Form nachgewiesen. Darüber hinaus kommt es auch zur Überexpression von Mitgliedern anderer Signalkaskaden, wie zum Beispiel von Prolaktin und Prolaktinrezeptor, was wiederum die HER-2/neu-Phosphorylierung steigert (Yamauchi et al., 2000). Aus den komplizierten Vorgängen, die durch das permanent aktivierte Netzwerk von Signalkaskaden ausgelöst werden, lassen sich vier Ursachen für ein aggressives Tumorwachstum vermuten:

- i. vermehrte Proliferation,
- ii. keine Reaktion auf apoptotische Signale,
- iii. Stimulation der Bildung von Blutgefäßen (Angiogenese),
- iv. Auswanderung aus dem eigentlichen Gewebsverband (Migration) und Bildung von Metastasen.

Dabei spielen die folgenden Signalwege eine wichtige Rolle:

Aktivierung der Proliferation: Die Proliferation der Zellen äußert sich in einer verkürzten G1-Zellzyklusphase. Dabei greift HER-2/neu an drei Punkten in die Signalgebung ein: Erstens findet sich in HER-2/neu überexprimierenden Tumorzellen eine erhöhte CyclinD1-Expression über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Myc und E2F, die über den Ras-Signalweg stimuliert werden (Neve et al., 2000, 2002; Lee et al., 2000). Zweitens wird über die PI3K-Kaskade und PKB der Komplex P27/Kip phosphoryliert und ist folglich nicht im Kern, sondern im Zytoplasma lokalisiert. Dies hat die Freisetzung des CyclinE/CDK2-Komplexes von P27/Kip und die Aktivierung des Zellzyklus zur Folge (Shin et al., 2002; Viglietto et al., 2002; Liang et al., 2002). Die Verhinderung des Zellzyklusarrest wird drittens auch durch den erhöhten Level an CyclinD erreicht, der eine Interaktion zwischen P27/Kip und CyclinE/CDK2 blockiert (Lane et al., 2000; Yakes et al., 2002; Lenferink et al., 2001). Eine Hemmung von HER-2/neu mit spezifischen Antikörpern bzw. „small interfering RNA“ (siRNA) führt zu einem Zellzyklusarrest der behandelten Zellen in der G0/G1-Phase, die erniedrigte Mengen von PI3Kinase, CyklinD1 und phosphoryliertem Akt aufweisen (Choudhury et al., 2004; Yang et al., 2004; Le et al., 2000).

Blockade der Apoptose: Normalerweise führt ein unbegrenztes Wachstum von Zellen zu deren Apoptose, die einerseits durch die Expression sogenannter „Todesrezeptoren“, zum Beispiel des TNF-Rezeptors, von außen (extrinsische Apoptose), und andererseits von intrazellulären Signalmolekülen der Bcl-Familie (intrinsische Apoptose) stimuliert wird (Wajant, 2002; Gross et al., 1999). Beide Wege werden von HER-2/neu über PKB inaktiviert. Diese Kinase führt zu einer NF- κ B-Aktivierung, was zu einer Resistenz gegenüber der TNF-vermittelten Apoptose führt (Zhou et al., 2000). Zusätzlich inhibiert PKB die Caspase 9 und hält die Mitglieder der Bcl-Familie im Zytosol. Dies blockiert die Auslösung der intrinsischen Apoptose (Cardone et al., 1998). Der direkte Einfluss von HER-2/neu auf diese Mechanismen wurde in Studien gezeigt, in denen über eine Hemmung des Onkogens in HER-2/neu-überexprimierenden Zellen Apoptose ausgelöst wurde (Choudhury et al., 2004; Yang et al., 2004).

Angiogenese: Brust- und Lungenkrebszellen mit konstitutiv aktiviertem HER-2/neu zeigen erhöhte Level an „Vascular endothelium growth factor“ (VEGF) mRNA (Yen et al., 2000, 2002; Xiong et al., 2001), einem potenten pro-angiogenetischem Faktor. Hierbei scheinen der Ras-MAPKinase-Weg (Xiong et al., 2001) und PI3K (Laughner et al., 2001; Yang et al., 2004) eine Rolle zu spielen. Die resultierende Neubildung von Blutgefäßen ist für die Nährstoffversorgung des wachsenden Tumors essentiell.

Migration: Dieser Mechanismus ist bisher noch wenig verstanden. Eine wichtige Rolle bei der Migration werden der Aktivierung der MAPKinase und der PI3Kinase zugesprochen (Adelsmann et al., 1999; Spencer et al., 2000; Adam et al., 1998), die ihrerseits durch HER-2/neu aktiviert werden. Die Fähigkeit von Tumorzellen, durch die angrenzende Basalmembran hindurch zu gelangen (Invasion), wird mit der gesteigerten Expression der Matrix-Metalloproteinase MMP-9 und des Urokinase-Plasminogen-Aktivators in Verbindung gebracht, die in HER-2/neu⁺-Tumoren überexprimiert werden (Xu et al., 1997; Mazumdar et al., 2001). Spencer und Koautoren (2000) konnten mit HER-2/neu⁻- und HER-2/neu⁺-Zellen zeigen, dass die Invasion von Tumorzellen direkt von HER-2/neu abhängig ist.

1.3.2. HER-2/neu als Ziel therapeutischer Ansätze

Aufgrund der Assoziation einer HER-2/neu-Überexpression mit einem aggressiven Tumorwachstum ist HER-2/neu Ziel der verschiedensten Tumorthérapien. Dabei wurde einerseits versucht, dass Molekül, bzw. seine Signaltransduktion mit spezifischen „anti-sense“-Oligonukleotiden zu hemmen (Colomer et al., 1994; Casalini et al., 1997; Roh et al., 2000). Der Effekt ist jedoch auf einen lokalen Tumor begrenzt, eine noch nicht lokalisierbare Metastase wird nicht erreicht. Ein effektiverer Ansatz, der auch in der Klinik zum Teil erfolgreich angewendet wird, besteht in der

Injektion HER-2/neu-spezifischer Antikörper (Carter et al., 1992; Ohmishi et al., 1995; Kumar et al., 2000; Baxevanis et al., 2003). Allerdings führt dies aus bisher nicht geklärten Gründen nur in einigen Patienten zum Erfolg und die Therapie erfordert eine dauerhafte Behandlung mit dem teuren Medikament, da der Antikörper nicht vom Körper selbst gebildet werden kann. Darüber hinaus erhöht sich durch diese Therapie das Risiko von Herzerkrankungen (Horton, 2002). Die Studien an transgenen Mäusen, die c-neu in Drüsengeweben überexprimieren zeigen, dass die Behandlung mit dem Zytokin IL12 die Tumorentstehung reduzieren kann (Boggio et al., 1998; Quaglino et al., 2004) und sich dieser Effekt durch die Gabe des Östrogenrezeptor-Inhibitors Tamoxifen noch verbessern lässt (Nanni et al., 2003). Allerdings sind die Nebenwirkungen einer solchen Behandlung noch nicht kalkulierbar. Nach Forni und Koautoren (2003) hat der Zeitpunkt der Impfung einen entscheidenden Einfluss auf den Erfolg der Therapie. Die c-neu-transgenen Mäuse entwickeln sichtbare Metastasen ab einem Alter von ungefähr 15 Wochen. Erfolgt eine erste Behandlung vor diesem Zeitpunkt, lässt sich die Entstehung von derartigen Tumoren verhindern (DiCarlo et al., 1999; Forni et al., 2003). Dies wurde zum Beispiel mit der Impfung mit c-neu-DNS erreicht, die in den Wochen 6, 12, 18 und 24 erfolgte (Rovero et al., 2000). Auch bei dieser Methode verbessern sich die Erfolgsraten bei der Kombination mit Zytokinen wie IL1 und IL12 (Rovero et al., 2001; Nanni et al., 2001). In einer anderen Studie wurden den Mäusen nach der Impfung mit HER-2/neu-DNS zusätzlich genetisch modifizierte HER-2/neu⁺-Tumorzellen, die immunstimulatorische Zytokine, wie IFN- γ oder IL12 sekretieren injiziert. Auch in diesem Fall konnte das Tumorstadium blockiert werden, was mit hohen Titern an HER-2/neu-spezifischen Antikörpern assoziiert war (Quaglino et al., 2004; De Giovanni et al., 2004). Die IL12-Sekretion bewirkte unter den eingesetzten Zytokinen die effektivste Tumor-Prävention (De Giovanni et al., 2004). Eine Analyse der aufgrund der Impfung differentiell exprimierten Gene ergab, dass die meisten Veränderungen mit einer vermehrten Antikörper-Produktion zusammenhängen. Desweiteren konnte die Impfung in B-Zell^{-/-}-Mäusen das Tumorstadium nicht verhindern. Die Autoren postulieren daher eine wichtige Rolle der humoralen Immunantwort bei der Prävention von HER-2/neu-spezifischen Tumoren (Quaglino et al., 2004; De Giovanni et al., 2004).

Allerdings ist in der Regel die Erkrankung bei einem Patienten mit einem HER-2/neu überexprimierendem Tumor zum Zeitpunkt der ersten Therapie-Maßnahmen bereits weit fortgeschritten. Viele Ansätze zielen daher darauf ab, in dem Patienten eine immunologische Antwort gegen HER-2/neu zu erzeugen bzw. zu verstärken. Bei diesen Strategien sollen zytotoxische T-Zellen generiert werden, die HER-2/neu-überexprimierende Zellen eliminieren können. Diese sollen anschließend über einen T-Zell-Transfer den Patienten injiziert werden.

1.3.3. HER-2/neu spezifische T-Zellen

In den letzten Jahren wurden zahlreiche HER-2/neu-spezifische Peptide sequenziert, die über MHC Klasse I- und Klasse II-Komplexe präsentiert und von T-Zell-Klonen erkannt werden können (Correa et al., 2001; Kiessling et al., 2002; Baxevanis et al., 2003). Die HER-2/neu-spezifischen T-Zellen, die diese Peptide erkennen, wurden auf unterschiedlichste Weise hergestellt. Anderson et al. (2000) erzeugten diese T-Zellen durch die Ko-Kultur von Knochenmarkszellen mit HER-2/neu-Peptid-beladenen Dendritischen Zellen (DC). Die so gewonnenen T-Zellen konnten *in vitro* HER-2/neu⁺-Zellen erkennen, allerdings lagen die Lyseraten bei einem „Effektor zu Target Verhältnis“ (E:T, T-Zellzahl gegenüber Tumorzellzahl) von 25 : 1 nur bei etwa 18 %. Brossart und Koautoren (2000) impften Patienten mit solchen „Peptid-gepulsten“ DC's und konnten aus dem Blut Peptid-spezifische T-Zellen isolieren. Auch hier waren die Lyseraten bei einem E:T-Verhältnis von 10 : 1 mit 10 % gering. Ein anderer Ansatz zielt darauf ab, die DC's mit einem HER-2/neu kodierenden Virus zu infizieren. So können unterschiedliche HER-2/neu-Peptide über MHC Klasse I-, und MHC Klasse II-Moleküle präsentiert und neben CD8⁺- auch CD4⁺-T-Zell-Antworten ausgelöst werden (Specht et al., 1997; Meyer zum Büschenfelde et al., 2001). Jedoch erweisen sich auch in diesen Studien die entsprechend gewonnenen T-Zellen mit Lyseraten von unter 20 % bei einem E:T Verhältnis von 10 : 1 als wenig effektiv.

In vielen Experimenten fehlt die Kontrolle, dass derartige T-Zellen gesunde, epitheliale Zellen, die HER-2/neu schwach exprimieren, nicht angreifen. Somit kann für eine entsprechende Behandlung von Patienten das Risiko einer Autoimmunreaktion nur unzureichend kalkuliert werden. Ebenfalls konnte in keiner Studie der Nachweis erbracht werden, dass HER-2/neu-spezifische T-Zellen HER-2/neu-positive Tumorzellen unter einem physiologischen E:T-Verhältnis effektiv lysieren. Andererseits wurde bereits 1997 gezeigt, dass sich bei einem E:T-Verhältnis von 1 : 20 in der *in vitro*-Kultur „Escape-Varianten“ bilden, die trotz Anwesenheit der reaktiven T-Zellen expandieren und klonal auswachsen können (Kono et al., 1997). Da dieses E:T-Verhältnis vermutlich den normalen physiologischen Bedingungen in einem Patienten näher kommt, wird postuliert, dass HER-2/neu-überexprimierende Tumoren sich der Erkennung durch das Immunsystem entziehen können.

Die Entstehung von „Escape-Varianten“ lässt vermuten, dass diese Tumorzellen eine verringerte Präsentation von MHC Klasse I-Antigenen aufweisen. Diese Korrelation zwischen vermehrter HER-2/neu-Expression und verringerter Antigenpräsentation findet sich auch *in vivo* wieder. In Mäusen, die c-neu in Drüsengewebe überexprimieren, entstehen Tumore, die zum Teil stark reduzierte Mengen von MHC Klasse I-Molekülen auf der Zelloberfläche aufweisen (Lollini, et al 1997). Allerdings führt eine Zytokininduktion zu einer erhöhten Antigenprozessierung, ohne die c-neu Expression zu beeinträchtigen. Dies lässt vermuten, dass sich der Effekt von

HER-2/neu auf die Antigenpräsentation auf transkriptioneller Ebene abspielt. In dieser Arbeit soll dieser Effekt und seine Auswirkungen analysiert werden, um die Konsequenzen für eine HER-2/neu-spezifische Tumorthherapie einzuschätzen. Darüber hinaus soll der Mechanismus untersucht werden, der einer HER-2/neu-vermittelten Regulation der Antigenprozessierung zu Grunde liegt.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit soll der Einfluss von HER-2/neu auf die MHC Klasse-I Antigenpräsentation im konstitutiven und im induzierten System untersucht werden. Dabei sollen die molekularen Ursachen und deren funktionalen Folgen für die Immunität in den betreffenden Zellen aufgeklärt werden. Die Ergebnisse besitzen hinsichtlich einer T-Zell-vermittelten, HER-2/neu-spezifischen Immuntherapie von Tumoren klinische Relevanz. Dies soll zu einem verbesserten Verständnis beitragen, wie die Präsentation von MHC Klasse-I Antigenen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen moduliert wird.

Das in dieser Arbeit benutzte *in vitro* System besteht aus zwei murinen Zelllinien, die sich genetisch nur durch die Expression von HER-2/neu unterscheiden:

- i. Die HER-2/neu-negative murine Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3 und
- ii. die HER-2/neu-überexprimierende Zelllinie NIH3T3-HER-2/neu.

Die Zellen werden im Folgenden zur Vereinfachung als HER-2/neu⁻ und HER-2/neu⁺ bezeichnet. Zur Aufklärung der angeführten Zusammenhänge sollen die folgenden Aspekte in den HER-2/neu⁻- und HER-2/neu⁺-Zellen untersucht werden:

- Semiquantitative Analysen der wichtigsten Komponenten der MHC Klasse-I Antigenprozessierungsmaschinerie (APM) mittels Durchflusszytometrie, RT-PCR und Western Blot unter konstitutiven und IFN- γ -induzierten Bedingungen.
- Überprüfung der funktionalen Relevanz von Defizienzen der APM durch Überprüfung der Funktion des Peptidtransporters und der Immunität der Zellen mittels Zytotoxizitätsversuchen.
- Untersuchung der Promotoraktivität der APM-Komponenten TAP und Tapasin in HER-2/neu⁻- und HER-2/neu⁺-Zellen. Dies umfasst die Klonierung und Charakterisierung der entsprechenden Promotoren. Anschließend wird die konstitutive und induzierbare Promotoraktivität in den entsprechenden Zellen untersucht.
- Identifikation von Promotorregionen, die für die HER-2/neu-vermittelte Suppression der Promotoraktivität essentiell sind mittels Herstellung von Deletionsmutanten und Elimination von Transkriptionsfaktor-Bindungsmotiven. Die Aktivitäten der Promotormutanten werden anschließend in HER-2/neu⁻- und HER-2/neu⁺-Zellen untersucht.
- Überprüfung der Funktionalität von wichtigen Bindungsmotiven für Transkriptionsfaktoren, die auf die Promotoraktivität entscheidenden Einfluss haben, mittels Gelretardationsversuch.

2. Material

2.1. Geräte und Software

2.1.1. Geräte

Autoklav	Technorama Deutschland (Fernwald)
Bakterienschüttler	SM, Edmund Bühler (Bodelshausen)
Bakteriensterilbank	Twin 30, Gelaire Flow Laboratories (Sarstedt)
CO ₂ -Begasungsschränke	B5060EK/CO ₂ , Heraeus (Frankfurt)
Durchflusszytometer	Epics XL-MCL Coulter (Krefeld)
Gelapparaturen, horizontal	Horizon 11.14 und Horizon 58, Gibco BRL (Eggenstein)
Gelapparaturen, vertikal	Minigel-Twin, Biometra (Göttingen) Maxigel, Biometra (Göttingen)
Kühlwasserbad	F10, Julabo (Seelbach)
Mikroskop	Wilovert S, H. Hund GmbH (Wetzlar)
Milli-Q-Wasserdeionisierungsanlage	Milli Q Plus Ultra Pure Water System (Eschborn)
PCR-Geräte	UNO-Block mit Heizdeckel (Perkin Elmer, Weiterstadt; Biometra, Göttingen) und Trio-Block ohne Heizdeckel (Biometra)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Semi-Dry-Blot-Apparatur	Fastblot™, Biometra (Göttingen)
Spektralphotometer (UV/Vis)	Kontron Uvicon Spektralphotometer 930, Kontron Instruments (Neufarn)
Sofortbildkamerasystem	Polaroid MP4 Land Camera, Polaroid (Offenbach)
Sterilbänke	Nuaire, Zapf (Sarstedt, Nümbrecht)
Tank-Blot-Apparatur	Trans Blot Cell, Bio Rad (München)
Thermomixer	Thermomixer 5436, Eppendorf (Hamburg)
UV-Leuchtschirm	UV Kontaktlampe Chroma 41, 254 nm, Handlampe, 266nm, Vetter GmbH (Wiesloch)
Waagen	analytic, universal und BP 310S, Sartorius (Einbeck) analytic, universal und BP 310S, Sartorius (Einbeck)
Zentrifugen	Omnifuge 2. ORS, Megafuge 3.ORBiofuge 15, Heraeus (Frankfurt) Ultraentrifuge, Centrikon T-1065, Kontron Instruments (Neufarn)

2.1.2. Software

Align plus, Version 2.0	Scientific & Educational Software
Clone manager, Version 4.0	Scientific & Educational Software
Enhance, Version 2.0	Scientific & Educational Software
Microsoft Excel, Version 5.0	Microsoft Corporation
Microsoft Power Point, Version 5.0	Microsoft Corporation
Microsoft Word, Version 5.0	Microsoft Corporation
Photoshop	Adobe Advanced technology
Primer designer, Version 2.01	Scientific & Educational Software

2.2. Verbrauchsmaterialien

Einmalsterilfilter	0,2 und 0,45µm, Millipore (Eschborn)
Einmalpipetten	Greiner (Frickenhausen)
Elektroporationsküvetten	Gene Pulser Küvetten, 0,4 cm Elektrodenabstand, Biorad (München)
Nitrozellulose	Schleicher & Schüll (Dassel)
Nylonmembran Hybond	VWR (Darmstadt)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg)
Polaroidfilme	Polaroid Typ 667, Schwarzweiß-Sofort-Packfilm, Format 8,6 x 10,8 cm, Polaroid (Offenbach)
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Whatman-Papier	Schleicher & Schüll (Dassel)
Zellkulturgefäße	Nunc (Wiesbaden)

2.3. Chemikalien

Acrylamid	Amresco (Solon, Ohio, USA)
Agar	Gibco BRL (Eggenstein)
Agarose (Ultra Pure™)	Gibco BRL (Eggenstein)
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad (München)
Ampicillin (Amp)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Bacto-Trypton	Difco (Augsburg)
Bacto-Yeast-Extract	Difco (Augsburg)
Bis-Acrylamid	Amresco (Solon, Ohio, USA)
BSA, Fraktion V	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Cäsiumchlorid	Gibco BRL (Eggenstein)
Concanavalin A (Con A)	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Dithiothreitol (DTT)	Roche Diagnostics (Mannheim)
dNTP's	Perkin Elmer (Weiterstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)

Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt)
G418 Sulfat	PAA (Coelbe)
Guanidium Isothiocyanat (GITC)	Gibco BRL (Eggenstein)
L-Glutamin	Seromed (Berlin)
Interferon- γ , murin	Roche Diagnostics (Mannheim)
Leupeptin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Lipofectamin TM	Gibco BRL (Eggenstein)
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
NBT/BCIP-Stammlösung	Roche Diagnostics (Mannheim)
NP40	Roche Diagnostics (Mannheim)
Penicillin/Streptomycin	Seromed (Berlin)
Polyfect	Qiagen (Hilden)
Puromycin	Roche Diagnostis (Mannheim)
Pyronin G	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Roti-Quant	Biorad (München)
RNAse Inhibitor	Roche Diagnostics (Mannheim)
Saponin	Gibco BRL (Eggenstein)
Streptolysin O	Wellcome (Beckenham, G.B.)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Applichem (Darmstadt)
N,N,N,N-Tetramethylendiamin (TEMED)	Biorad (München)
Triton-X-100	Merck (Darmstadt)
Trypanblau	BDH Chemicals Ltd. (Poole, G.B.)
Trypsin/EDTA	Seromed (Berlin)

Alle weiteren nicht aufgeführten Chemikalien und Lösungen wurden von den Firmen Amersham Pharmacia (Freiburg), Roche Diagnostics (Mannheim), Fluka (Deisenhofen), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Promega (Mannheim), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

2.4. Komplettsysteme

Agarose Gel Extraction Kit QiaexII	Qiagen (Hilden)
Plasmid-Isolierungs-Kits	Qiagen (Hilden)
RNS-Isolierungs-Kit	Qiagen (Hilden)
Sequenzierungs-Kit	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Taq DNS Polymerase PCR Kit	Roche Diagnostics (Mannheim)
Titan TM One Tube RT-PCR System	Roche Diagnostics (Mannheim)
Gene Racer Kit	Invitrogen (Eggenstein)
LightShift TM Chemiluminescent EMSA Kit	Pierbio (Bonn)

2.5. Enzyme

DNase	Gibco BRL (Eggenstein)
Klenow Enzym	Roche Diagnostics (Mannheim)
<i>Pfu</i> DNS-Polymerase, native	Stratagene GmbH (Heidelberg)
Phosphatase, alkalische	Roche Diagnostics (Mannheim)
Proteinase K	Roche Diagnostics (Mannheim)
Restriktionsendonukleasen	Roche Diagnostics (Mannheim), Gibco BRL (Eggenstein)
T4 DNS Ligase (7U/μl)	Amersham Pharmacia (Freiburg)
TdT rekombinant	Gibco BRL (Eggenstein)

2.6. Molekulargewichts- und Längenstandards

DNS-Längenstandards

-100 Basenpaar-Leiter	Gibco BRL (Eggenstein)
-100 Basenpaar-Leiter	NEB (Frankfurt a.M)
-1kb Marker	NEB (Frankfurt a.M)

Proteinmolekulargewichtsstandard

RPN 800	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Fragmentgrößen (in kD): 250, 160, 105, 75, 50, 35, 25, 15, 10.	

2.7. Inhibitoren

In der folgenden Tabelle sind die Namen der verwendeten Inhibitoren, deren Substrat, bzw. Angriffspunkt und die eingesetzte Konzentration angegeben. Die Inhibitoren wurden von der Firma Calbiochem (Bad Soden) bezogen.

Tab. 2.1: Inhibitoren

Inhibitor	Angriffspunkt	Inkubationszeit	Konzentration
Staurosporin	PKC	24 h	10 nM
Tyrphostin AG99	MAPK	24 h	10 μM
Wortmanin	PI3K	24 h	10 μM
SN 50	NF-κB	36 h	18 μM

2.8. Peptide

Die verwendeten Peptide wurden mittels eines Festphasesyntheseverfahrens mit Fmoc als Schutzgruppe der N-terminalen Aminosäure hergestellt. Beide Peptide enthalten eine N-Glykosylierungsstelle, die durch Fettdruck hervorgehoben ist. Die Peptide wurden am DKFZ Heidelberg von Frank Momburg am Tyrosin (Y) mit ¹²⁵J radioaktiv markiert.

Peptid #63 RYNATRSI

Peptid #600

TNKTTRIDGQY

2.9. Primer

Die verwendeten Primer wurden mit Hilfe des Software Programms „Primer designer“ abgeleitet und von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen. Alle Primer wurden in destilliertem Wasser gelöst und bei -20°C gelagert.

2.9.1. Primer zum Nachweis verschiedener Gene der MHC Klasse I

In der folgenden Tabelle sind die Namen des amplifizierten Gens, die eingesetzte Primermenge, die Primersequenzen, die Größe des Amplifikats und die PCR-Bedingungen der TitanTMOne Tube RT-PCR angegeben.

Tab. 2.2: Primer zum Nachweis verschiedener Gene der MHC Klasse I

Gen	pmol/ Ansatz	Primersequenz	Produkt- größe (Bp)	Annealing- temperatur/ Zyklenzahl
β -Aktin	2	5' - gca cca cac ctt cta caa tga gct g - 3' 5' - atc cac aca gag tac ttg cgc tca - 3'	765	61 °C 10 + 19
β_2 -Mikro- globulin	10	5' - agccgaacatactgaactgctactg - 3' 5' - cgg cca tac tgt cat gct taa ctc - 3'	210	58 °C 10 + 10
Calnexin	2	5' - gaa ggc tgg cta gac gac gaa cc - 3' 5' - agc atc tgc agc act aca cct gg - 3'	461	60 °C 10 + 18
Calre- tikulin	4	5' - ggt ctt gga cgg aga tgc ctg - 3' 5' - aag cct ctg ctc ctc atc ctg - 3'	1024	60 °C 10 + 18
ER60	10	5' - gtc aga tgt cac cat cgc ag - 3' 5' - gta gtg tgt ggt ggc tca ga - 3'	327	58 °C 10 + 12
ERAAP	50	5' - cac aga agg ctg gga ttt tc - 3' 5' - ggg ttt ctg cca atg agt gt - 3'	460	57 °C 10 + 20
H2-L ^q	10	5' - cct gac ctg gca gtt gaa tg - 3' 5' - cca gaa cag caa cga tca cc - 3'	230	58 °C 10 + 18
HLA-A2	25	5'-aga ctc acc gag tgg aca tg-3' 5'-tat ctg cgg agc cac tcc ac-3'	298	57 °C 10 + 20

LMP2	78	5' - tcg tgg tgg gct ctg att cc - 3' 5 - cag agt gat ggc att tgt gg - 3'	449	61 °C 10 + 23
LMP7	15	5' - cca agg agt gca ggt tgt at - 3' 5' - caa ccg tct tcc ttc atg tg - 3'	373	60 °C 10 + 30
LMP10	8	5' - gaa ctg tca gag gaa tgc gt - 3' 5' - tca cac agg cat cca cat tg - 3'	606	61 °C 10 + 24
PA28 α	8	5' - gga gcc agc tct caa tga ag - 3' 5' - cag acg gat ctc ctg gta ct - 3'	508	55 °C 10 + 20
PA28 β	8	5' - ctg atg act tcc tct gca ct - 3' 5' - ctc tag gtt gct gct gat ga - 3'	593	55 °C 10 + 20
PDI	4	5' - agt acc tgc tgg tgg agt tct atg - 3' 5' - gct gtc tgt tca gtg aac tcg atg - 3'	610	58 °C 10 + 18
Tapasin	10	5' - gag cct gtc gtc atc acc at - 3' 5' - agc acc ttg agg agt ccg ag - 3'	848	63 °C 10 + 14
TAP1	15	5' - gac aag agc cgc tgc tat ttg g - 3' 5' - tga taa gaa gaa ccg tcc gag a - 3'	346	61 °C 10 + 22
TAP2	25	5' - tat cta gtc ata cgg agg gtg a - 3' 5' - cct ggg ata cga aaa gga gac g - 3'	311	59 °C 10 + 20
X	4	5' - atc gag tga ctg aca agc tga cc - 3' 5' - cag tga act gca gac att cgt cc - 3'	377	56 °C 10 + 19
Y	3	5' - gag cag aca cga gag caa ctg aag g-3' 5' - ctt ctt cct cct cca tat ctg gcc t - 3'	508	61 °C 10 + 18
Z	4	5' - ttg gag cag aca cga gag caa ct - 3' 5' - ttc tca cat ctg tac cgg cca ag - 3'	577	58 °C 10 + 18

2.9.2. Primer für Promotorstudien

In der folgenden Tabelle sind verschiedene Primer angegeben, die zur Untersuchung des Tapasin-Promotors oder zur Sequenzierung der Promotorkonstrukte benutzt wurden.

Tab. 2.3: Primer für Promotorstudien

Primername	Sequenz	Funktion
Tpn-Promotor fw	5'- gca tcc tag agt cac aga gc - 3'	Promotorklonierung
Tpn-Promotor rev	5'- ggt gct acg atc tct cct ac - 3'	Promotorklonierung
P36 pos 167	5'- tgc agt tgc tct cca gcg gt - 3'	Sequenzierung von Promotoren
P36 pos 5033	5'- agt gca ggt gcc aga aca tt - 3'	Sequenzierung von Promotoren
Tpn Exon 2	5'- tcc atg gcg cag tag cag tg -3'	5' RACE im Tapasinpromoter
Tpn Exon 3	5'- cag gct gga gag gct gaa ga - 3'	5' RACE im Tapasinpromoter

Mutagenese-Primer

Folgende Primer wurden für die Mutagenese-PCR hergestellt, um eine putative Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren zu eliminieren. Die veränderten Basen sind fett gedruckt, die eingebrachten oder eliminierten Restriktionsschnittstellen kursiv und unterstrichen. Es wurden Motive für *Eco31I* (GGGCTC), *BamHI* (ATCCGG), *BstXI* (CCAnnnnnnTGG) oder *NarI* (GGCGCC) eingebracht bzw. eliminiert. Die Position der mutierten Bindungsstelle bezieht sich auf die jeweils mittlere Base im Erkennungsmotiv, wobei das „A“ des Startcodons ATG als +1 gezählt wurde.

Bsp: LMP2-Promotor:

NF-κB (Motiv mit ungerader Anzahl an Bp):

AAGT**CCCGG**-ATG: NF-κB Motiv bei -5

SP1 (Motiv mit gerader Anzahl an Bp):

AG**CCCC**-ATG: SP1 Motiv bei -4

Tab. 2.4: Mutagenese-Primer

Transkriptionsfaktor/ Promotor	Position	Primersequenz
NF-κB/Tapasin	-468	5'- cccttgccatg agaa tcccaaattgagttgtcatgaaag - 3' 5'- ctttcatgacaactcaattg ggattc tcatggcaagggt - 3'
P300/Tapasin	-309	5'- ggtctggaacgcggg atcc gttttaagggaggtgg -3' 5'- ccacctccctaaaacc aggat cccgcttcccagacc - 3'
E2F/Tapasin	-239	5'- gggctcaaagttg atcc atccagtgagccaagggggtgg - 3' 5'- cccaccccctggctcactgg acggat cactttgagccc - 3'

SP1/Tapasin	-206	5'- ccagtgagccaagggg aaa aggtgcagggcgagg - 3' 5'- cctcgccctgcacc ttt cccct gg ctcactgg - 3'
p300/Tapasin	-191	5'- gggTgcagggcgagg atcc ctggagagctacag - 3' 5'- ctgtagctctcca gcgga tctcgccctgcacc - 3'
E2F/Tapasin	-146	5'- cggcaactctgttgg atcct gtggcgcggtt - 3' 5'- ggaacgcccca caggat ccaacagagttgccg - 3'
NF-κB/Tapasin	-82	5'- acctgaccagatc ggcgcc ttccagttctcaccaccagc - 3' 5'- gctggggtgaggaatcggaaa ggcgcc gatctggtcaggt - 3'
IRF/Tapasin	-42	5'- cccagccttagaagg atcc tgaagtgaaaggggaagaaaagac - 3' 5'- gcttttctccccttcactt caggat ccttctaaggctgggg - 3'
E2F/TAP1, LMP2	- 104	5'- cgttctaccagcatttgg atccc agagcaaacctgagcagg - 3' 5'- cctgctcaggttgc tcggg atccaaatgctgtagaacg - 3'
E2F/TAP1, LMP2	- 453	5' - cccgggact ccatgg cacgccctcgacc - 3' 5' - ggtccgagggcg tc ccatggagtcgccggg - 3'
P300/TAP2	- 1257	5' - ggagggacctga ggtctc ccctctccatttcc - 3' 5' - ggaaaatggaggagga gagacc caggtccctcc - 3'
P300/TAP2	- 649	5' - cccgagagttagcagg ggtctc gccattccaaacc - 3' 5' - ggttgggaatggc gagacc ccctgctaactctcggg - 3'
P300/TAP2	- 318	5' - ggtcttctgcccgtt ggtctc gccccgtgtcc - 3' 5' - ggacacggggca gagacc aagcggcagaagacc - 3'
E2F/TAP2	- 81	5' - ggctcagggtgatt ggatcc ggaggctcgtaccaggg 3' 5' - ccctggcatgagtccc ggat ccaatccaccctgagcc - 3'

2.9.3. Oligonukleotide für Gelretardationsversuche (Gelshiftassays)

Für die Gelshift-Experimente wurden folgende, einzelsträngige Oligonukleotide über die Firma Thermohybrid (Ulm, Deutschland) bezogen. Die Bindungsmotive sind kursiv, fett gedruckt und unterstrichen dargestellt.

Tab. 2.5: Oligonukleotide für Gelretardationsversuche (Gelshiftassays)

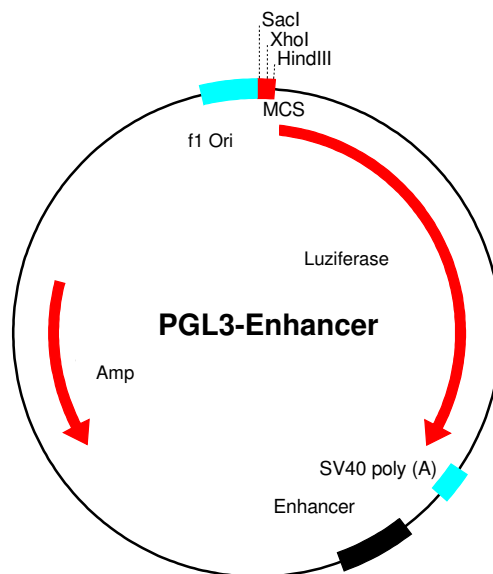
Transkriptionsfaktor	Position	Sequenz
NF-κB	-468	5' - ccat ggggatccca aattggg - 3' 5' - cccaatt ggggatccc catgg - 3'
p300	-309	5' - gaa cgcgggagtgtggtt - 3' 5' - aa aaccacactcccgcg ttc - 3'
E2F	-239	5' - ctcaa agttgqcgc agtcgg - 3' 5' - cggact gcqccaact ttgag - 3'
E2F	-146	5' - actctg tttgccc ctgtgg - 3' 5' - ccacag ggqccaac acagagt -3'

2.10. Vektoren

PGL3-Enhancer

Dieser Vektor wurde als Klonierungsvektor benutzt. Die einzubringenden Promotorsequenzen wurden in die „Multiple cloning site“ einkloniert.

Abb. 2.1: PGL3-Enhancer

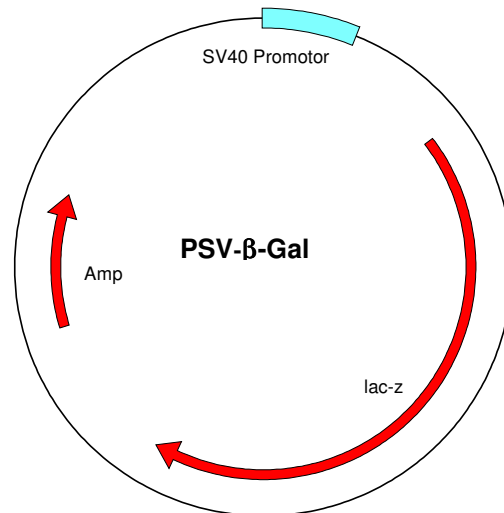


Schematische Darstellung des PGL3-Enhancer-Vektors der Firma Promega (Mannheim) Amp: Ampicillinresistenzgen (β -Lactamase), Enhancer: SV40 Enhancer, f1 Ori: Replikationsursprung, MCS: „Multiple cloning site“, Luziferase: Luziferasegen des Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*), SV40 poly (A): poly A-Signal für die Transkription des Luziferasegens.

PSV- β -Galaktosidase Kontrollvektor

Dieser Vektor wurde zur Kontrolle der Transfektionseffizienz im Reporterassay eingesetzt (3.8.3.) und von der Firma Promega (Mannheim) bezogen.

Abb. 2.2: PSV- β -Galaktosidase Kontrollvektor



Schematische Darstellung des pSV- β -Galaktosidase Kontrollvektors der Firma Promega (Mannheim)
Amp: Ampicillinresistenzgen (β -Lactamase), lac-z: β -Galaktosidase-Gen.

HLA-A2 Klonierungsvektor:

Mit Hilfe dieses Vektors wurde das HLA-A2 Gen stabil in die Zellen transfiziert. Der Vektor wurde von der AG Wölfel, III. Med. Klinik, Uniklinikum Mainz kloniert und zur Verfügung gestellt (Wölfel et al., 1994). Als Basisplasmid diente PcDNA2.1 der Firma Invitrogen (Eggenstein).

2.11. Internetseiten für Promotoranalysen

Zur Untersuchung von putativen Promotorsequenzen auf Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren wurden folgende frei zugängliche Webseiten benutzt:

<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>

<http://www.gsf.de/cgi-bin/matsearch.pl>

Die putative Sequenz wird bei beiden Adressen mit Datenbanken verglichen, auf der bekannte Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren (TF) abgelegt sind und die TF-Bindung an die Sequenz mit einer Wahrscheinlichkeit angegeben. Als putative TF-Bindungsstellen werden diejenigen Motive in Betracht gezogen, bei denen die Wahrscheinlichkeit einer Bindung mit > 85 % angegeben wurde.

2.12. Statistische Analysen

Die Daten des Peptidtranslokationsassays und des Chromfreisetzungsversuchs wurden im Rechenzentrum der Uniklinik Mainz von Herrn Schikedans mit Hilfe des „Wilcoxon Matched Pair Test“ für zweiseitige unabhängige Stichproben ausgewertet. Als Signifikanzgrenze wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ festgelegt.

2.13. Antikörper

Tab. 2.6: Isotyp-Kontrollen

Antikörper	Verwendung	eingesetzte Menge	Quelle
IgG2a	Durchflusszytometrie	3 μ l	Coulter/Beckmann (Krefeld)

Tab. 2.7: Antikörper gegen Proteine, die an der Zelloberfläche exprimiert werden

Antikörper	Verwendung	eingesetzte Menge	Quelle
w6/32 Hybridoma-ÜS	Durchflusszytometrie	200 μ l	Barnstable et al., 1978
α -H-2L ^{q/d}	Durchflusszytometrie	5 μ l	Cedarlane, Hornby, (Canada)
α -H-2K ^q	Durchflusszytometrie	5 μ l	Cedarlane, Hornby, (Canada)
α -H-2D ^q	Durchflusszytometrie	5 μ l	Cedarlane, Hornby, (Canada)
α -HER-2/neu (Ab5)	Durchflusszytometrie	10 μ l	MERCK Biosciences (Darmstadt)

ÜS: Überstand

Der Antikörper w6/32 erkennt den MHC-Komplex aus HLA-A, Peptid und β_2 -Mikroglobulin (Barnstable et al., 1978).

Tab. 2.8: Antikörper gegen Proteine der MHC Klasse I Antigenprozessierung

Antikörper	Verwendung	eingesetzte Menge	Quelle
α -TAP1	Western Blot	1 : 5000	Früh, K. (Howard Johnson, La Jolla, USA)
α -TAP2	Western Blot	1 : 200	Yang, Y., San Diego, C.A., USA
α -Tapasin	Western Blot	1 : 1000	Ortmann, B. (Köln)

α -LMP2	Western Blot	1 : 500	Früh, K. (Howard Johnson, La Jolla, USA)
α -LMP7	Western Blot	1 : 500	Früh, K. (Howard Johnson, La Jolla, USA)
α -LMP10	Western Blot	1 : 1250	Affinity (Exeter, GB)
α -PA28 α	Western Blot	1 : 1250	Affinity (Exeter, GB)
α -PA8 β	Western Blot	1 : 10000	Affinity (Exeter, GB)
α -Calretikulin	Western Blot	1 : 2000	Santa Cruz (Heidelberg)

Tab. 2.9: Konjugierte Antikörper

Antikörper	Verwendung	eingesetzte Menge	Quelle
Ziege- α -Maus Ig, FITC	Durchflusszytometrie	1 : 2500	DAKO (Hamburg)
Schwein- α -Kanninchen Ig-HRP	Western Blot	1 : 1250	DAKO (Hamburg)

FITC: Fluorescein-isothiocyanate , HRP: Horseradishperoxidase

3. Methoden

3.1. Mikrobiologische Methoden

3.1.1. Bakterienstämme

Tab. 3.1: Bakterienstämme

Name	Genotyp	Verwendung	Quelle
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , l ⁻ , hsdR17(rk ⁻ , mk ⁺), deoR, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, D(argF-lacZYA)169, F80d(lacZDM15)	Vermehrung von Plasmid-DNS	Hanahan, 1983,
„One shot TOP10“ <i>E. coli</i>	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Klonierung des Tapasinpromoters	Invitrogen (Eggenstein)

3.1.2. Bakterienkulturmedien

Luria Bertani-Medium (LB-Medium)

10 g Bacto Trypton
 5 g Bacto Yeast Extract
 5 g NaCl
 ad 1 l mit Aqua bidest., pH 7,5

Zur Herstellung von Agar-Platten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

YT⁺⁺-Medium

8 g Bacto Trypton
 5 g Bacto Yeast Extract
 5 g NaCl
 ad 980 ml Aqua bidest., pH 7,5.

Nach dem Autoklavieren wurden dem abgekühlten Medium folgende steril filtrierten Lösungen zugegeben:

10 ml 2 M MgSO₄
 10 ml 1 M KCl

SOC-Medium

2,0 % (w/v) Bacto Trypton
 0,5 % Hefeextrakt
 10 mM NaCl
 2,5 mM KCl

Nach dem Autoklavieren wurden dem abgekühlten Medium folgende steril filtrierte Lösungen zugegeben:

10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
20 mM Glukose

Zum Ansetzen der Medien wurde autoklaviertes Aqua bidest. verwendet.

Bei Bedarf wurde Ampicillin als Selektionsantibiotikum (100 mg/ml in Aqua bidest. und steril filtrierte) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml Medium zugegeben.

3.1.3. Herstellung kompetenter Bakterien

Um Plasmid-DNS in *E.coli* einbringen zu können (Transformation), müssen die Zellen zunächst mit Calciumchlorid behandelt werden, um die Zellwand zu permeabilisieren. Im Falle des Bakterienstammes DH5α wird eine Transfektionseffizienz von $5-8 \times 10^7$ „colony forming units“ (c.f.u.)/µg Plasmid-DNS erreicht.

Puffer TFB I:

30 mM Kaliumacetat
50 mM MnCl₂
100 mM RbCl
10 mM CaCl₂
15 % Glycerin

Puffer TFB II:

10 mM Na-MOPS, pH 7,0
75 mM CaCl₂
10 mM RbCl
15 % Glycerin

Beide Puffer wurden steril filtrierte und bei 4 °C gelagert.

Eine Einzelkolonie des *E.coli*-Stammes DH5α wurde in 2 ml YT⁺⁺-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden 50 µl dieser Bakterienkultur in 5 ml YT⁺⁺-Medium überführt und weitere 3,5 h bei 37 °C und 225 UpM inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz komplett in 100 ml vorgewärmtes YT⁺⁺-Medium überführt und weiter inkubiert, bis eine optische Dichte OD₆₀₀ von 0,45-0,55 erreicht wurde. Die Kultur wurde auf zwei sterile 50 ml Röhren verteilt und nach kurzer Abkühlung auf Eis 8 min bei 4 °C und 4000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die sedimentierten Bakterien in 10 ml TFB I-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (s. oben) wurden die sedimentierten Bakterien in 2 ml TFB II-Puffer resuspendiert und im Kühlraum in einem Ethanol/Trockeneisbad in vorgekühlten Reaktionsgefäßen zu je 200 µl Aliquots eingefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80 °C.

3.1.4. Transformation von DNS in Bakterien

Die zu transformierende DNS wurde mit Hilfe eines Hitzeschocks in kompetente *E.coli* eingebracht. Da jedes eingebrachte Plasmid eine Antibiotika-Resistenz

vermittelte, konnten mit Hilfe Antibiotika enthaltener Agarplatten diejenigen Bakterien selektioniert werden, die das Plasmid erfolgreich aufgenommen haben.

Die kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 100 µl der Bakteriensuspension mit der Fremd-DNS (die Hälfte eines Ligationsansatzes oder 10 ng aufgereinigte Plasmid-DNS) 30 min auf Eis inkubiert, damit sich die DNS an die Zellwände anlagern kann. Der Hitzeschock erfolgte bei 42 °C für 2 min. Danach wurde der Ansatz noch einmal 2 min auf Eis inkubiert, bevor 950 µl SOC-Medium zugegeben wurden. Der Ansatz wurde 60 min bei 37 °C und 225 UpM inkubiert und nach Sedimentation der Bakterien teilweise oder komplett auf einer Agar-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.5. Anzüchten der Bakterienkultur und DNS-Isolierung

Nach erfolgreicher Transformation sollte die eingebrachte Plasmid-DNS in größeren Mengen gewonnen werden. Hierzu wurde eine Einzelkolonie in Flüssigmedium angezüchtet und anschließend die Plasmid-DNS isoliert.

Das Prinzip der Isolierung der Plasmid-DNS aus *E.coli* beruht darauf, dass sich die Doppelstränge einer ringförmigen Plasmid-DNS durch eine Denaturierung mit NaOH nur unvollständig voneinander trennen, während sich die Einzelstränge der linearen chromosomalen DNS ganz voneinander lösen. Die Zugabe einer sauren Salzlösung neutralisiert die Natronlauge, wodurch die DNS wieder renaturiert wird. Dabei bildet die chromosomale DNS ein unlösliches Netzwerk und kann, einschließlich der präzipitierten Proteine, abzentrifugiert werden, während die Plasmid-DNS in Lösung bleibt. Diese kann wiederum mit Isopropanol gefällt werden. Isopropanol löst sich aufgrund seiner stärkeren Ähnlichkeit zu Wasser schneller als die DNS, die dabei ihrer Hydrathülle entzogen wird und ausfällt.

Bakterienkulturen können als Glycerin „stocks“ bei -80 °C gelagert werden, was eine erneute Transformation erspart. Dazu wurde ein Teil der Kultur 1 : 1 mit sterilem, wasserfreiem Glycerin gemischt und eingefroren. Um die Bakterien wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie auf einer Agar-Platte fraktioniert ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine einzelne Kolonie gepickt und in Medium angeimpft.

Mini-Plasmid-DNS-Präparation „Schnelle Lyse“

Diese Präparation dient der schnellen Isolierung kleiner DNS-Mengen aus Bakterien, um zu kontrollieren, ob die gewählten Bakterienkolonien die transformierte Fremd-DNS enthalten.

<u>Puffer P1</u>	<u>Puffer P2</u>	<u>Puffer P3</u>
50 mM Tris/HCL (pH 8,0)	0,2 M NaOH 3	M Kaliumacetat (pH 5,5)
10 mM Na ₂ EDTA	1 % SDS	50 mM MOPS (pH 7,0)
100 µg/ml RNase A		15 % Ethanol
		0,15 % TritonX 100

Von der 5 ml Bakterienkultur wurden 1,5 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen, und die Bakterien in 250 µl Puffer P1 auf dem Vortexer resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Puffer P2 wurden die Ansätze invertiert und 250µl Puffer P3 zugegeben. Die lysierten Bakterien wurden 5 min bei 13000 UpM zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der Plasmid-DNS wurden 600 µl Isopropanol zugegeben, der Ansatz gemischt und 5 min bei 13000 UpM zentrifugiert, um die Plasmid-DNS zu sedimentieren. Nach einem Waschschrift mit 70 %igem Ethanol wurde die Plasmid-DNS bei 65 °C 1 min getrocknet und in 100 µl Wasser resuspendiert. Die Lagerung der Plasmid-DNS erfolgte bei -20 °C.

Midi-Plasmid-DNS-Präparation (Qiagen, Hilden)

Mit dieser Methode können größere Mengen Plasmid-DNS mit einem höheren Reinheitsgrad im Vergleich zu der Mini-Plasmid-DNS-Präparation isoliert werden. Die Plasmid-DNS wird wie bei der „Mini-Präparation“ von der chromosomalen DNS und den Proteinen getrennt, vor dem Ausfällen mit Isopropanol jedoch über eine Säule aufgereinigt.

Das Prinzip dieser Aufreinigung besteht darin, dass die DNS bei niedrigen Salzkonzentrationen an eine Anionenaustauschsäule bindet. In dieser Situation kann sie mit Ethanolhaltigen Puffern, die eine mittlere Salzkonzentration aufweisen, gewaschen werden. Durch Zugabe hoher Salzkonzentrationen wird sie wieder von der Säule verdrängt und kann aus dem Eluat mit Isopropanol gefällt werden. Die Präparation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Bei Plasmiden, die anschließend in der Zellkultur eingesetzt werden sollten, wurden die Ansätze nach dem letzten Waschschrift in 70 %igen Ethanol unter der Sterilbank getrocknet und in 100-200 µl sterilem Wasser gelöst.

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. Enzymatische Reaktionen zur Spaltung oder Modifikation von DNS

Spaltung der DNS mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die spezifische Basensequenzen in einer doppelsträngigen DNS erkennen und an spezifischen Stellen schneiden. Die Schnittstellen weisen bei den meisten Endonukleasen eine zweifache Rotationssymmetrie auf (Palindrome). Je nach Enzym können bei der Spaltung der DNS dabei auch Überhänge entstehen. Die resultierenden DNS-Fragmente können daher verschiedene Enden besitzen: Erfolgt die Schneidung der DNS auf beiden

Strängen nach dem gleichen Basenpaar, entstehen glatte Enden (sogenannte „blunt ends“), erfolgt sie nach unterschiedlichen Basenpaaren, entstehen Enden mit einem 5'- oder 3'-Überhang (sogenannte „sticky ends“).

Da bei unterschiedlichen Sequenzen die Anzahl und Art der Schnittstellen variiert, kann man eine isolierte Plasmid-DNS mit bekannter Sequenz nach einer Spaltung mit Endonukleasen anhand der entstandenen Fragmentgrößen erkennen. Damit kann jede Plasmid-Aufreinigung mittels des spezifischen Restriktions-Verdau überprüft werden.

Die Restriktionsendonukleasen benötigen einen bestimmten Puffer, um ihre Aktivität optimal entfalten zu können. Dieser Puffer wird zusammen mit dem Enzym geliefert. Die Aktivität eines Enzyms wird in Units (U) angegeben. Eine Unit ist definiert als die Menge, die 1 µg λDNS in einer Stunde bei 37 °C spezifisch fragmentiert.

Für einen Restriktions-Verdau eines präparierten Plasmids wurde maximal 1 µg Plasmid-DNS in einem Volumen von 10 µl im mitgelieferten Puffer und 0,3 µl Enzym (in der Regel 10 U/µl) 90 -120 min bei der empfohlenen Temperatur verdaut. Jeder Verdau wurde mittels einer elektrophoretischen Auftrennung im Agarose-Gel überprüft.

Modifikation von DNS-Enden mit dem Klenow-Enzym

Das Klenow-Enzym ist ein Fragment der DNS-Polymerase I aus *E.coli*, welches überhängende 3'-Enden auffüllt, dem aber die 5'-3' Exonukleaseaktivität fehlt. Auf diese Weise können die nach einem Restriktionsverdau entstandenen „sticky ends“ zu „blunt ends“ umgewandelt werden, was eine Ligation zwischen vorher nicht kompatiblen DNS-Enden ermöglicht.

Im direkten Anschluss an einen Verdau in einem Gesamtvolumen von 10 µl wurden 0,2 µl 50 mM DTT, 0,25 µl dNTP's (Stammlösung: 2,5 mM je Nukleotid) und 0,5 µl Klenow-Enzym zugegeben. Der Ansatz wurde 15 min bei RT und anschließend 20 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurden dem Ansatz 0,3 µl 0,5 M EDTA zugefügt und eine Inkubation von 10 min bei 70 °C angeschlossen.

Dephosphorylierung von DNS mit der alkalischen Phosphatase

Zur Vermeidung der Eigenligation des linearisierten Vektors (z.B. bei „blunt end“-Ligationen) wurde mit Hilfe der alkalischen Phosphatase CIP (**c**alf **i**ntestine **a**lkaline **p**hosphatase) der Phosphatrest am 5'-Ende des Vektors abgespalten.

Die Dephosphorylierung erfolgte im Anschluss an den Restriktionsverdau. Zur Durchführung wurden dem Verdau (pro 10 µl Volumen) 1,3 µl CIP-Puffer (10 x CIP-Puffer: 1 mM ZnCl₂, 10 mM Spermidin) und 1 µl CIP (1 U/µl) zugegeben. Dieser Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Da die Phosphatase bei 37 °C nicht lange stabil ist, wurde nach 30 min 1 µl Enzym zusätzlich zugegeben und noch einmal 30 min inkubiert. Das Enzym wurde durch eine Inkubation für 10 min bei 70 °C inaktiviert.

3.2.2. Elektrophoretische Auftrennung von DNS-Fragmenten in Agarose-Gelen

In einem elektrischen Feld wandern unterschiedlich große DNS-Fragmente aufgrund ihrer negativen Ladung unterschiedlich schnell durch ein Agarose-Netz zur Anode. Dies wird zur Analyse von DNS-Fragmenten genutzt.

50 x TAE-Puffer:

2 M Tris
1 M Eisessig
50 mM EDTA

10 x DNS-Beladungspuffer:

5 g Ficoll
50 mg Bromphenolblau
50 mg Xylene Cyanol FF,
ad 20 ml mit Aqua bidest.

1 g Agarose wurde in 100 ml 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst, und 0,4 µg/ml (Endkonzentration) Ethidiumbromid zugegeben. Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren und fluoresziert im UV-Licht, wodurch die DNS unter UV-Licht sichtbar wird. Der DNS-Probe wurde 1/10 Volumen an DNS-Beladungspuffer zugesetzt, damit die DNS durch Adhärenz an das Ficoll in die Auftragstaschen des Agarose-Gels sinkt. Dieser Puffer enthält außerdem zwei Farbstoffe, die als Indikator der zurückgelegten Strecke der DNS im Agarose-Gel dienen. Die Größenbestimmung der DNS-Fragmente erfolgte durch gleichzeitiges Auftrennen eines geeigneten Längenstandards. Als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde 1 x TAE verwendet. Die Auftrennung erfolgte in horizontalen Gelapparaturen mit einer angelegten Spannung von 3-5 Volt/cm Gellänge. Die aufgetrennten DNS-Fragmente im Gel wurden unter UV-Anregung photographiert.

3.2.3. Aufreinigung von DNS-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die nach einem Verdau entstandenen DNS-Fragmente können nach einer elektrophoretischen Auftrennung einzeln aus dem Agarose-Gel eluiert werden. Hierzu wurden die entsprechenden Fragmente mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

Zunächst wird das Agarose-Netz durch einen Natriumiodat/Natriumchlorat-Puffer (Puffer QG von Qiagen) aufgelöst. Die DNS kann anschließend in diesem stark salzhaltigen Puffer an eine Silikatsäule gebunden werden. Die Elution von der Säule erfolgt durch Zugabe von Wasser. Die Aufreinigung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.4. Ligation

Unter Ligation versteht man die Verknüpfung zweier Nukleinsäure-Moleküle mit Hilfe einer Ligase. Diese Reaktion ermöglicht den Einbau von einem DNS-Fragment (Insert) in ein linearisiertes Plasmid (Vektor). Um die Wahrscheinlichkeit der Ver-

knüpfung von zwei Vektormolekülen zu verringern, wird in dem entsprechendem Reaktionsansatz die Anzahl der Insert-Moleküle höher eingestellt, als die der Vektormoleküle. Aus diesem Grund wurde bei einer „sticky end“-Ligation (Vektor und Insert mit kompatiblen überhängenden Enden) das Verhältnis 3 : 1 zugunsten des Inserts gewählt, bei einer „blunt end“-Ligation das Verhältnis 10 : 1. Es wurden höchstens 200 ng DNS/10 µl Reaktion eingesetzt.

10 x Ligationspuffer:

300 mM Tris HCl, (pH 7,7)

100 mM MgCl₂

100 mM DTT

4 mM ATP

10 mM Spermidin/HCl

Die Reaktion wurde von 0,5 U/10 µl Ansatz der T4-DNS-Ligase katalysiert. Die Ligation erfolgte über Nacht über einem Eisbad, das bei Raumtemperatur stand. Da je nach Reaktion die optimalen Temperaturbedingungen schwanken können, konnte sich so der Reaktionsansatz während des Abschmelzen des Eises seinem Optimum zwischen 12 °C und 16 °C annähern.

3.2.5. Sequenzierung

Die Integrität der neu klonierten Vektoren wurde über Sequenzierung, also über die Bestimmung der Basenabfolge überprüft. Die hierzu notwendigen Primer wurden so gewählt, dass von beiden Seiten vom Vektor ausgehend in das Insert „hineingelesen“ wurde. Die Sequenzierungen wurden von der Firma GENterprise (Mainz) mit dem „ThermoSequenase Kit“ (Amersham Pharmacia, Freiburg) durchgeführt.

Wenn nötig, wurden die zu sequenzierenden Plasmide vorher über Silicat-Säulen aufgereinigt („QIAquick^RSpin“ von Quiagen). Dies erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie bei der Gel-Elution (3.2.3.), mit dem Unterschied, dass statt der Behandlung mit Puffer QG eine fünffache Menge eines salzhaltigen Puffers (Puffer PB von Quiagen) zu der DNS-Lösung zugegeben wurde, bevor der Ansatz auf die Säule pipetiert wurde.

3.2.6. Klonierung

Mit Hilfe der oben beschriebenen Methoden wurden nach folgendem Protokoll Vektoren modifiziert. Die in den Vektor einzubringenden Inserts wurden über einen Verdau und eventueller Klenow-Behandlung (3.2.1.), anschließender Auftrennung im Agarose-Gel (3.2.2.) und Gelelution (3.2.3.) aufgereinigt. Parallel dazu wurde der entsprechende Vektor an der Stelle, in die das Fragment eingebracht werden sollte linearisiert, eventuell Klenow-behandelt und dephosphoryliert (3.2.1.). Die Aufreinigung erfolgte mit der „QIAquick^RSpin“-Behandlung (3.2.5.). Die Konzentration

von Insert und Vektor wurde in einem Agarose-Gel mit dem DNS-Marker als Standard abgeschätzt und die entsprechenden Mengen in einer Ligation (3.2.4.) eingesetzt. Die Hälfte des Ligationsansatzes wurde anschließend in kompetente *E.coli* transformiert (3.1.4.) und auf Antibiotika-haltigen Agarplatten selektioniert. Je nach „blunt end“- oder „sticky end“-Ligation wurden 24 bzw. 12 Klone gepickt und angezüchtet. Die aufgereinigten Plasmide wurden in einem Kontrollverdau verdaut, um die Existenz und die Orientierung des Inserts zu überprüfen. Entsprechend positive Klone wurden über „QIAquick^RSpin“ Behandlung aufgereinigt und sequenziert.

3.3. RNS Isolation und Modifikation

3.3.1. RNS-Isolation

RNS-Präparation über einen Cäsiumchlorid-Gradienten (Chrigwin, et al., 1979)

Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem chaotropen Guanidinisothiocyanat (GITC), das sehr effizient Proteine, einschließlich RNAsen denaturieren kann. Dies wird noch durch Zugabe von β -Mercaptoethanol und hohen Salzkonzentrationen unterstützt. Die anschließende Dichtegradientenzentrifugation trennt die RNS von anderen Makromolekülen der Zelle, z.B. DNS oder Proteinen.

GITC-Lösung:

4 M GITC
25 mM Natriumcitrat (pH 7,0)
115 mM β -Mercaptoethanol
Lösung steril filtrieren

Cäsiumchlorid-Lösung:

5,7 M Cäsiumchlorid
25 mM Natriumacetat (pH 5,0)
Lösung autoklavieren

Etwa 3×10^7 Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS in 6 ml kalter GITC-Lösung resuspendiert. Diese 6 ml wurden vorsichtig zu 4 ml CsCl-Lösung, die in UZ-Röhrchen vorgelegt worden waren, gegeben. Die Ultrazentrifugation erfolgte 17-20 h bei RT im Ausschwingrotor SW 40 (Heareus, Frankfurt). Der Überstand wurde abgenommen und die sedimentierte RNS nach Trocknung bei RT in 400 μ l TE-Puffer resuspendiert. Die Fällung der RNS erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, zweifachem Volumen 100 %igem Ethanol und anschließender Inkubation bei -80 °C für 30 min. Nach Zentrifugation bei 13000 UpM für 30 min und einem Waschschrift mit 70 %igem Ethanol wurde die RNS in 50 μ l TE-Puffer resuspendiert und ihre Konzentration photometrisch bestimmt.

RNS-Präparation mit dem RNeasy Mini Protocol (Qiagen, Heidelberg)

Die Durchführung diente der Gewinnung von Gesamt-RNS aus Zellen und erfolgte nach Herstellerangaben.

Maximal 1×10^7 Zellen wurden in einem GITC-haltigen Puffer lysiert und homogenisiert. Nach Zugabe von Ethanol für geeignete Bindungskonditionen wurde die Lösung auf eine „RNeasy Silica“-Membran gegeben, wo die RNS unter hohen

Salzbedingungen bindet. Nach mehreren Waschschrinen und einem DNS-Verdau in der Säule wurde die RNS mit Aqua bidest. eluiert.

Um die RNS auf eventuelle Verunreinigung zu überprüfen, wurde sie auf einem 1 %igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die dazu verwendeten Gelkämme und -träger wurden zur Zerstörung eventuell vorhandener RNasen 30 min in 3 %iger Wasserstoffperoxid-Lösung inkubiert.

3.3.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

TE-Puffer

10 mM Tris HCL (pH 8,0)

1 mM EDTA

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch. Die Nukleinsäuren wurden in TE-Puffer verdünnt und die Extinktion bei 260 und 280 nm gemessen. Aus der Absorption bei 260 nm wurde die Konzentration der Nukleinsäuren berechnet. Der Quotient aus A_{260}/A_{280} zeigt die Reinheit der Nukleinsäuren an und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Mit Hilfe der folgenden Formel lässt sich die Konzentration der Nukleinsäuren berechnen:

$$A_{260} \times V \times OD = \mu\text{g} / \text{ml Nukleinsäure}$$

A_{260} : Absorption bei 260 nm; V: Verdünnungsfaktor; OD: optische Dichte; diese beträgt bei einzelsträngiger Nukleinsäure 40, bei doppelsträngiger 50.

3.3.3. Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription werden einzelsträngige RNS-Moleküle in doppelsträngige DNS „umgeschrieben“. Diese Reaktion wird von einer RNS-abhängigen, retroviralen DNS-Polymerase durchgeführt. Sie benötigt eine RNS-Matrize, Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dNTP's), Mg^{2+} -oder Mn^{2+} -Ionen und einen Primer. Aus diesem Grund wurde den Ansätzen ein Hexanukleotid-Gemisch zugegeben, das zufällig an einer beliebigen Stelle mit der RNS hybridisieren und als Startpunkt für die Polymerisation dienen kann (Sarnagadharan et al., 1972).

In einem 20 μl Ansatz wurde 1 μg Gesamt-RNS mit 1 x Hexanukleotidgemisch, 10 mM DTT und 0,2 mM dNTP in dem mitgelieferten Puffer 10 min bei 95 °C denaturiert. Nach Abkühlung auf 4 °C wurde 1 μl (40 U) RNase-Inhibitor und 1 μl (10 U) Reverse Transkriptase zugefügt. Nach Hybridisierung der Primer bei RT (10 min), erfolgte die DNS-Polymerisation bei 42 °C für 40 min. Anschließend wurde das Enzym für 15 min bei 65 °C inaktiviert. Die Lagerung der cDNS erfolgte bei -20 °C.

3.4. PCR

3.4.1. PCR mit DNS als Matrize

Die Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation eines bestimmten DNS-Bereiches. Die eingesetzte *Taq*-Polymerase synthetisiert eine einzelsträngige DNS von einem Primer ausgehend in 5'-3'-Richtung, die komplementär zur Original-DNS ist. So wird eine zwischen zwei Primern gelegene Sequenz verdoppelt. Bei einem erneuten Zyklus dienen sowohl der Originalstrang als auch die Kopie als Matrize für eine weitere Verdopplung. Je nach Zyklenzahl lassen sich bestimmte Sequenzbereiche beliebig oft verdoppeln, so lange die benötigten Pufferbedingungen erhalten bleiben (Mullis et al., 1986). Ein Zyklus einer PCR Reaktion besteht immer aus drei Schritten:

- (i) Denaturieren des DNS Stranges bei 95 °C (30-60 sek.)
- (ii) Binden der Primer (Annealing) bei Primer-abhängiger Temperatur (T_a ; 30-60 sek.)
- (iii) Polymerisation des DNS Stranges bei 72 °C (mindestens 60 sek.).

Die Zyklenzahl variierte je nach Primer- und/oder Matrizenqualität zwischen 15 und 40 Zyklen. Die Template-Menge betrug 10 ng aufgereinigtes Plasmid. Die Primermenge wurde den jeweiligen PCR-Bedingungen angepasst.

Tab. 3.2: PCR-Mix

	Volumen	Konz. der Stammlösung	Endkonzentration
10 x Puffer (<i>Taq</i> -Polymerase)	5,0 µl	10fach konzentriert	1fach konzentriert
MgCl ₂	0,5 µl	25 mM	0,25 mM
dNTP's	4,0 µl	2,5 mM je dNTP	0,2 mM je dNTP
Aqua bidest.	39,0 µl	-	-
<i>Taq</i> -Polymerase	1,5 µl	1 U/µl	1,5 U/50 µl

3.4.2. Mutagenese-PCR

Für die Herstellung von Promotormutanten wurde die Mutagenese-PCR mit Hilfe des „site directed mutageneses Kit“ von Stratagene eingesetzt. Als Template diente der Vektor, der den zu mutierenden Promotor beinhaltet. Die Primer wurden so gewählt, dass eine putative Bindungsstelle für einen Transkriptionsfaktor durch Basenaustausch verändert und damit das Bindungsmotiv entfernt wurde. Da die Primer dennoch mit der Matrize über gleiche Basenabfolgen hybridisieren sollten, wurde die abweichende Basensequenz in die Mitte eines mit 35-40 Basenpaaren verhältnismäßig langen Primers gelegt. Anstatt der *Taq*-Polymerase wurde die *Pfu*-Polymerase (Stratagene) als Enzym gewählt, da dieses Enzym eine zusätzliche „Proof-reading“-Aktivität besitzt, mit der eventuelle Fehler durch falsch eingefügte Nukleotide wieder

korrigiert werden. Die PCR wurde nach oben angegebenem Protokoll durchgeführt mit dem Unterschied, dass der Ansatz zuvor 5 min auf 95 °C erhitzt wurde, um die GC-reichen Promotorsequenzen vollständig zu denaturieren. Außerdem wurde die Amplifikationsdauer je nach Plasmidgröße entsprechend den Herstellerangaben variiert.

Das amplifizierte Produkt wurde anschließend mit dem Enzym *DpnI* verdaut, welches den Originalstrang aufgrund seiner Methylierung selektiv entfernt. Anschließend wurden 10 µl des Ansatzes auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und unter UV-Licht die Menge des mutierten Plasmids abgeschätzt. Je nach Konzentration des Vektors wurden 1-10 µl des Ansatzes in *E.coli* transformiert und die erfolgreiche Mutation über Sequenzierung überprüft.

3.4.3. PCR direkt aus Zellysat

Einige PCR's können mit einem Zellysat durchgeführt werden, ohne vorher die DNS zu isolieren. Zu diesem Zweck wurden 20000 Zellen in ein 0,5 ml Eppendorf Gefäß überführt und sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 20 µl PCR-Wasser aufgenommen und die Zellen durch Erhitzen auf 95 °C für 10 min lysiert. Anschließend wurde die Lösung auf 55 °C gekühlt, mit 5 µl Proteinase K versetzt und für 60 min bei 55 °C inkubiert. Nach Inaktivierung der Proteinase K für 10 min bei 95 °C und Abkühlen auf 80 °C wurden 25 µl PCR-Mix hinzugefügt und die eigentliche PCR gestartet.

3.4.4. Titan™ One Tube RT-PCR-System

Mit diesem System ist es möglich, eine Reverse Transkription und eine PCR direkt in einem Ansatz und ohne Zusatz weiterer Reagenzien durchzuführen. In dem verwendeten Enzym-Mix ist die AMV (Aviärer Myoblasto Virus) Reverse Transkriptase für die cDNS-Erststrang-Synthese und ein „Expand High Fidelity“ Enzym-Mix aus *Taq*-DNS-Polymerase und *Pwo*-DNS-Polymerase für die anschließende PCR enthalten. Das Titan RT-PCR-System hat folgende Vorteile:

- Es reduziert die Fehlerrate in der PCR aufgrund der Korrekturlese-Eigenschaft der *Pwo*-DNS-Polymerase.
- Es minimiert Probleme durch Sekundärstrukturen der RNS.
- Es können Fragmente bis zu 6 Kb amplifiziert werden.
- Die hohe Effizienz der Enzyme verbessert die Sensitivität.
- Die einfache Handhabung beschleunigt den Nachweis von RNS-Transkripten.

Tab. 3.3: Mix 1

	Volumen	Konz. der Stammlösung	Endkonzentration
dNTP's	4,0 µl	2,5 mM je dNTP	0,2 mM je dNTP
DTT Lösung	2,5 µl	100 mM	5 mM
Aqua bidest.	ad 25 µl	-	-
RNS	4 µl	0,05 µg/µl	200 ng
5'- Primer	Vgl. 2.8.1.	100 pmol/µl	Vgl. 2.8.1.
3'- Primer	s.o.	s.o.	s.o.
RNase Inhibitor	0,5 µl	40 IU/µl	20 IU

Tab. 3.4: Mix 2:








	Volumen	Konz. der Stammlösung	Endkonzentration
5 x RT-PCR Puffer mit MgCl₂	5,0 µl	5-fach konzentriert	1-fach konzentriert 1,5 mM MgCl ₂
Aqua bidest.	ad 25 µl	-	-
Enzym Mix	0,75 µl	nicht bekannt	nicht bekannt

Die Reaktionen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.4.5. RACE-PCR

Zur Bestimmung des Transkriptionsstartes im murinen Tapasin-Promotor wurde die RACE-PCR (**r**apid **a**mplification of **c**DNA **e**nds) angewendet. Ziel der Methode ist die Sequenzbestimmung des 5'-Endes der mRNS. Dieses wird über eine PCR amplifiziert, damit es in ausreichender Menge für eine nachfolgende Sequenzierung verfügbar ist. Für diese Methode wurde der „GeneRacer“ Kit von Invitrogen eingesetzt. Um das 5'-Ende der RNS für eine PCR verfügbar zu machen, wird hierbei die CAP-Struktur der mRNS mit einem im Kit enthaltenen „CIP“-Enzym entfernt und ein RNS-Oligo an das frei gewordene Phosphatende ligiert. Damit besitzt das 5'-Ende eine bekannte Sequenz, an die ein eingesetzter Primer hybridisieren kann. Es wurden anschließend zwei PCR's mit jeweils zwei unterschiedlichen 3'-Primern, die innerhalb der transkribierten mRNS hybridisieren, durchgeführt. Als Ausgangsmaterial dienten 2 µg RNS von NIH3T3 Zellen, die außer mRNS auch andere RNS Moleküle enthält, weshalb zu Beginn alle freien Phosphatenden von RNS ohne Cap-Struktur dephosphorylliert wurden. Das PCR-Produkt wurde elektrophoretisch analysiert, eluiert und in den mitgelieferten PCR^R4-TOPO^R-Vektor kloniert. Das Produkt wurde in ebenfalls mitgelieferte Bakterien transformiert, vermehrt und schließlich sequenziert.

RACE-PCR-Verlaufsprotokoll:

95 °C	2 min		
95 °C	0,5 min		
72 °C	2 min	5 x	
95 °C	0,5 min		
70 °C	2 min	5 x	
94 °C	0,5 min		
64 – 68 °C	0,5 min		
72 °C	2 min	25 x	

3.5. Kultivierung eukaryotischer Zellen

3.5.1. Medien und Lösungen

Medien für die Kultivierung

„Minimum Essential Medium“, MEM (Seromed, Berlin)

DMEM (Seromed, Berlin)

RPMI 1640 (Seromed, Berlin)

Den Medien wurden folgende Lösungen (angegeben als Endkonzentration im Medium) zugesetzt:

10 % Fötale Kälberserum (FCS)

2 mM L-Glutamin

100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin

Für die Passage der adhärenenten Zellen wurden diese mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % (w/v) Trypsin, 0,02 % (w/v) EDTA) behandelt.

Selektionsantibiotika:

G418 Sulfat (Neomycin) Stocklösung: 20 mg/ml in Aqua bidest., gelöst unter Berücksichtigung der biologischen Aktivität.

Endkonzentration im Medium: 1,1 mg/ml

3.5.2. Zelllinien

Die adhärenente Zelllinie NIH3T3 ist eine murine, embryonale Fibroblastenzelllinie und exprimiert nicht den humanen HER-2/neu-Rezeptor. Die Zelllinie NIH3T3HER-2/neu wurde von Frau PD. Dr. Bernhard bereitgestellt, und wurde durch stabile Transfektion von NIH3T3 Zellen mit einem HER-2/neu-Expressionsvektor generiert. Die Zelllinie NIHEJrascl3 ist eine NIH3T3-Zelllinie, die durch stabilen Gentransfer des mutierten humanen c-Ha-ras hergestellt wurde (Seliger et al., 1991). Beide Zelllinien wurden in MEM-Medium kultiviert.

Die nicht adhärenen Zelllinien RMA und RMA-S (Ljunggren et al, 1985) leiten sich von dem T-Lymphom RBL-5 der C57BL/6 Mäuse ab. Bei den RMA-S Zellen handelt es sich um eine H-2-Verlustmutante. Aufgrund einer Mutation im TAP2-Gen, die ein verfrühtes Stopcodon zur Folge hat, wird kein funktionelles TAP2-Protein gebildet. Beide Zelllinien dienten als Positiv-, bzw. Negativkontrolle für Western Blot-Analysen und wurden in RPMI-Medium kultiviert.

Als Kontrolle zum Nachweis der HER-2/neu-Expression wurde die Ovarialkarzinom-Zelllinie SKOV-3, die HER-2/neu auf der Zelloberfläche exprimiert, verwendet. Die Zelllinie wurde in DMEM-Medium kultiviert.

Als Kontrolle und zum Nachweis der erfolgreichen Lyse Tyrosinase-spezifischer T-Zellen wurde die stabil mit Tyrosinase transfizierte humane Melanomzelllinie NA8-Tyrosinase benutzt, die in RPMI-Medium kultiviert wurde (AG Wölfel, III Med. Klinik, Uniklinikum Mainz).

3.5.3. Kultivierung

Die Zellen wurden im 37 °C-Brutschrank bei 5 % CO₂-Begasung in Zellkulturflaschen mit einer Kulturfläche von 25, 80, bzw. 175 cm² kultiviert. In Abhängigkeit ihrer Dichte wurden die Zellen im Abstand von drei Tagen bei ausreichender Konfluenz verdünnt. Adhärenente Zellen wurden durch Zugabe von Trypsin/EDTA und mechanisches Klopfen vom Flaschenboden gelöst. Die vom Boden gelösten Zellen bzw. nicht-adhärenente Zellen wurden in 15 oder 50 ml Röhrchen überführt, bei 1200 UpM sedimentiert; und in neue Flaschen mit Medium überführt. Nach spätestens 100 Passagen wurden die Zellen kryokonserviert (s.u.) und neue Chargen aufgetaut.

Bei der Kryokonservierung werden Zellen über längere Zeit bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Als Einfriermedium diente dabei FCS mit 10 % DMSO. Die Röhrchen mit den einzufrierenden Zellen wurden mindestens 24 h in Isopropanol bei -80 °C gelagert, um ein gleichmäßiges Abkühlen von 1 °C/min zu gewährleisten, bevor sie in den Stickstofftank überführt wurden.

Um die kryokonservierten Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie bei 37 °C aufgetaut und zum Waschen möglichst schnell in 10faches Volumen Medium überführt, bevor sie sedimentiert und in neuem Medium ausgesät wurden. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um abgestorbene Zellen zu entfernen.

3.5.4. Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen abzentrifugiert und in einem entsprechenden Mediumvolumen resuspendiert. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde in eine Neugebauer-Zählkammer überführt und vier Eckquadrate ausgezählt, aus denen der Mittelwert „n“ bestimmt wurde. Die Zellzahl kann mit Hilfe folgender Formel errechnet werden:

$$n \times 10.000 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellzahl} / \text{ml}$$

Der Anteil lebender Zellen kann durch Anfärbung der Zellen mit Trypanblau bestimmt werden. Nur tote Zellen, deren Zellmembran nicht mehr intakt ist, sind in der Lage, diesen Farbstoff aufzunehmen. Zur Durchführung wurden die Zellen 1 : 1 mit 0,4 %iger Trypanblau-Lösung gemischt. In einer Neugebauer-Zählkammer wurden die nicht angefärbten Zellen ausgezählt.

3.6. Transfektion eukaryotischer Zellen

Die Einführung von DNS in Säugerzellen bezeichnet man als Transfektion. Handelt es sich um ein lineares DNS-Molekül, so kann ein Einbau in das Genom der Zelle erfolgen, so dass das Transgen bei einer Zellteilung weitergegeben wird. Im Gegensatz dazu muss bei einer transienten Transfektion eines Plasmids die nachfolgende Analyse der Expression des Transgens 48-72 h nach Transfektion erfolgen.

Die transiente Transfektion wurde für Promotorstudien eingesetzt, während die stabile Transfektion der Einführung zellfremder Gene diene.

3.6.1. Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion wurde mittels Lipofektion durchgeführt. Die Lipofektion mit kationischen Lipiden beruht auf dem Prinzip, dass die Lipidreste mit der Zellmembran in Wechselwirkung treten, während die kationische Kopfgruppe des Lipids mit den negativ geladenen Phosphatresten der DNS assoziiert. Durch Internalisierung dieses Komplexes gelangt die DNS in die Zelle (Felgner et al., 1987). Einen Tag vor der Transfektion wurden 1×10^5 Zellen je Loch in einer 6-Loch-Platte ausgesät. Je Ansatz wurden 3 μ l Lipofectamin in 100 μ l warmen Medium (ohne Zusätze) für 30 min inkubiert. Gleichzeitig wurden entsprechende Mengen der Plasmid-DNS in 100 μ l Medium (ohne Zusätze) inkubiert. Die Ansätze wurden zur Transfektionslösung vereinigt und 1 h bei RT inkubiert, damit die Plasmide von einer Lipidhülle eingeschlossen werden konnten. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, bevor die Transfektionslösung und 800 μ l Medium ohne Zusätze zugegeben wurden. Nach einer Inkubation von drei Stunden bei 37 °C im Brutschrank wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in frischem Medium mit Zusätzen aufgenommen.

3.6.2. Stabile Transfektion und Selektion

Die stabile Transfektion wurde analog zur transienten Transfektion durchgeführt. Jedoch wurde das zu transfizierende Plasmid im Bereich des Ampicillin-Gens linearisiert, die DNS anschließend über eine „PCR-purification“ Säule aufgereinigt und in sterilem TE eluiert. Da das Plasmid ein Neomycin-Resistenzgen enthält, konnten die transfizierten Zellen von den nicht transfizierten Zellen durch eine Behandlung mit Neomycin (G418) selektioniert werden. Nach zwei Wochen

Behandlung wurde ein Teil der Kultur als „Batch“-Kultur eingefroren. Der Rest wurde großzügig ausgesät und nach Anheften der Zellen Einzelklone mit einer Impföse gepickt. Als Nachweis des Transgens in den Klonen wurde eine genomische PCR direkt aus dem Zelllysate durchgeführt.

3.7. Proteinbiochemische Methoden

3.7.1. Proteinpräparationen

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Proteinpräparationen durchgeführt. Die meisten Western Blot-Analysen wurden mit Gesamtprotein durchgeführt. Zum Nachweis der Tapasin-Expression wurde die Präparation von Membranproteinen angewendet. Für die Bandshift-Experimente wurden Kernextrakte, d.h. Kernproteine, aus den Zellen gewonnen.

3.7.1.1. Gewinnung von Gesamtprotein aus eukaryotischen Zellen

Bei dieser Methode werden die Zellen in einem SDS-haltigen Puffer lysiert. Das SDS oder Natriumdodecylsulfat zerstört alle nicht kovalenten Bindungen und damit die räumlichen Strukturen der Proteine. Um eine Degradation zu vermeiden, wurde den Zellen vor der Lyse ein Protease-Inhibitoren Gemisch zugegeben.

Protease-Inhibitoren-Mix (in PBS):

Die Protease-Inhibitoren wurden, wenn nicht anders angegeben, in Aqua bidest. gelöst und bei -20 °C gelagert.

Tab. 3.5: Protease-Inhibitoren

Protease-Inhibitor	Endkonzentration
Aprotinin	10 µg/ml
Trypsininhibitor	10 µg/ml
PMSF (in Isoprop.)	50 µg/ml
Jodacetamid	370 µg/ml
Pepstatin	17 µg/ml
Leupeptin	9,5 µg/ml

2 x SDS-Puffer:

1 g Saccharose
 4 ml SDS (25 %; w/v)
 1,2 ml 1 M Tris/HCl pH 6,8
 4,8 ml Aqua bidest.
 etwas Pyronin

Etwa 1×10^7 Zellen (eine große Petrischale) wurden mehrmals mit kaltem PBS gewaschen, mit 1 ml Protease-Inhibitoren-Mix versetzt und anschließend mit einem

Zellschaber von der Oberfläche vorsichtig abgeschabt. Es folgte eine Sedimentation bei 4 °C und 13000 UpM für 2 min. Das Pellet wurde in 200 µl 1 x SDS-Puffer resuspendiert und die Proteine weitere 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Lagerung der Proteine erfolgte bei -20 °C.

3.7.1.2. Gewinnung von Membranproteinen aus eukaryotischen Zellen

Da der Antikörper für die Detektion von Tapasin sehr viele unspezifische Bindungen im Western Blot aufweist, wurde für diese Detektion der zytosolische Anteil an zellulärem Protein von dem membrangebundenen getrennt. Dies erfolgte mit 1 % TRITON-X 114, ein lipophiles Detergenz. Dieses liegt bei 4 °C als homogene Lösung vor, wohingegen bei Erwärmung auf 30 °C eine Phasentrennung auftritt, da sich kleinere Micellen zu größeren zusammenschließen und absinken. Die Micellen können dabei membrangebundene Proteine aufnehmen, da diese einen lipophilen Anker besitzen und so durch Erwärmung von den hydrophilen zytosolischen Proteinen getrennt werden (Bordier, 1987). Die Proteine können anschließend über ein Ethanol-Hexan-Gemisch ausgefällt und in SDS-Puffer gelöst werden.

Das Zellpellet wurde nach dem Abzentrifugieren in eiskaltem PBS mit 1 % TRITON-X 114 aufgenommen und 30 min bei Raumtemperatur rotiert, damit sich die Micellen um die lipophilen Proteinanteile anlagern und diese aufnehmen konnten. Nach einem kurzen Abkühlen auf 4 °C wurden die hydrophilen Bestandteile in einer Kühlzentrifuge 15 min bei 13000 UpM abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, 5 min auf 30 °C erwärmt und die lipophilen Anteile bei RT 1 min bei 13000 UpM sedimentiert. Dieses Herauswaschen kleiner hydrophiler Moleküle wurde zweimal wiederholt.

Im direkten Anschluss erfolgte die Fällung der Membranproteine durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Ethanol-Hexan-Gemisch (4 : 1) und 40 µg/ml Glycogen und einer Inkubation über Nacht bei -20 °C. Nach einer Zentrifugation bei 4 °C und 13000 UpM für 30 min wurde das Pellet bei 37 °C getrocknet und anschließend in 50-100 µl SDS-Puffer aufgenommen.

3.7.1.2. Gewinnung von Kernprotein aus eukaryotischen Zellen

Für die Untersuchung von Transkriptionsfaktoren in einem Gelretardationsversuch (Gelshift-Experiment) benötigt man Kernproteine in einem nativen Zustand. Da der größte Anteil an den Proteinen einer Zelle aber aus zytosolischen Proteinen besteht, wurden für die Gelshift-Experimente die Kerne aus dem Zelllysate abzentrifugiert und aufgeschlossen. Die Lyse der Zellen erfolgt mit NP40 (Nonidet P 40), ein nicht-ionisches Detergenz, welches Proteine solubisiert und in der eingesetzten Menge die Kernmembran intakt hält.

Puffer A:

10 mM HEPES (pH 7,9)
 10 mM KCL
 0,1 mM EDTA
 0,1 mM EGTA

Puffer B:

20 mM HEPES (pH 7,9)
 0,4 M NaCL
 1 mM EDTA
 1 mM EGTA
 10 % Glycerin

vor Gebrauch Zugabe von :

0,5 mM PMSF

1 % (v/v) Aprotinin

1 mM DTT

1 mM PMSF

1 % (v/v) Aprotinin

1 mM DTT

Pro Ansatz wurden 1×10^7 Zellen nach Trypsinierung und zwei Waschschritten in eiskaltem PBS in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und bei 2000 UpM für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert. Nach Zugabe von 400 µl Puffer A und einer Inkubation für 10 min im Eisbad wurden die Zellen durch Zugabe von 24 µl 10 % NP40 und anschließendem Invertieren lysiert. Die Kerne wurden bei 2000 UpM für 5 Min bei 4 °C sedimentiert und für 30 min im Eis in 75 µl Puffer B inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 15000 UpM. Der Überstand wurde abgenommen und nach der Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Reagenz (3.7.2.) aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.7.2. Proteinbestimmungen

Protein-Konzentrationsbestimmung mit dem Protein Assay ESL

Diese Methode basiert auf der Komplexbildung von Cu^{2+} mit Proteinen. Anders als bei anderen Bestimmungsmethoden wird hier jedoch ein Cu^+ -Bathocuproin-Komplex gemessen, der aus dem überschüssigen, nicht von Protein gebundenen Cu^{2+} entsteht. Die Methode ist schnell und weniger sensitiv gegenüber Detergenzien wie SDS. Die Proteine wurden zunächst 5 min gekocht und anschließend 1 : 50 in Wasser verdünnt. Anschließend erfolgte die Bestimmung nach Herstellerangaben.

Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford (1976)

Das Bradford-Reagenz bildet mit Proteinen einen Farbkomplex, dessen Intensität zur Proteinkonzentration proportional ist (Bradford et al., 1976). Diese Bestimmung kann jedoch nicht in Anwesenheit von SDS durchgeführt werden und wurde deshalb nur zur Bestimmung von Kernextrakten angewendet.

Zur Durchführung wurden das gereinigte Proteins 1 : 5 in Aqua bidest. verdünnt und mit 0,1 M HCL versetzt. Anschließend wurde der Ansatz auf 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl filtriertem Bradford-Reagenz 5 min inkubiert. Parallel wurde eine Rinder-serumalbumin (BSA)-Eichgerade mit Konzentrationen von 2-14 µg mitgeführt. Die

Extinktion des Farbkomplexes wurde bei 595 nm gemessen und die Konzentration unter Berücksichtigung der Verdünnung mit Hilfe einer Eichgerade bestimmt.

3.7.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot

3.7.3.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE nach Lämmli, 1970)

Das stark negative SDS kann an Peptide binden und denaturieren, so dass die Proteine als negativ geladene, langgestreckte Polypeptidketten vorliegen, die deshalb in einem elektrischen Feld nur aufgrund ihrer Masse unterschiedlich schnell zur Anode wandern. Bei der SDS-PAGE werden die Proteine je nach Größe durch ein entsprechend engmaschiges Polyacrylamid-Netz unterschiedlich stark zurückgehalten und deshalb aufgetrennt.

Die Konzentration des Polyacrylamid-Gels ist variierbar und wird abhängig vom Molekulargewicht des zu detektierenden Proteins gewählt. Das Molekulargewicht der einzelnen aufgetrennten Proteine kann mit Hilfe eines Proteingrößenmarkers, der definierte Proteine enthält, bestimmt werden. Es wurden Minigele der Größe 10 x 10 cm verwendet. Das Gel wurde in Sammelgel und Trenngel unterteilt, damit die Proteine bei Umschlagen des pH-Wertes an der Grenze vom Sammelgel zum Trenngel fokussiert werden.

Tab. 3.6: Pipetierprotokoll SDS-Gel

Trenngel 10%		Sammelgel 5%	
40 % Acrylamid	1,5 ml	40 % Acrylamid	0,25 ml
2 % Bisacrylamid	0,8 ml	2 % Bisacrylamid	0,13 ml
1,88 M Tris/HCl pH 8,8	1,2 ml	0,625 M Tris/HCl pH 6,8	0,4 ml
0,5 % SDS	1,2 ml	0,5 % SDS	0,4 ml
Aqua bidest.	1,3 ml	Aqua bidest.	0,82 ml
TEMED	5 µl	TEMED	2 µl
10 % APS	30 µl	10 % APS	10 µl

Elektrophorese-Puffer:

50 mM Tris-Base

192 mM Glycin

0,1 % (w/v) SDS

Pro Gelspur wurden 30 µg Protein, welches zuvor 5 min gekocht wurde, aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte mit 10 mA pro Gel im Sammelgel und mit 20 mA im Trenngel. Als Molekulargewichtsmarker diente ein vorgefärbter Rainbowmarker (RPN 800, Amersham Pharmacia, Freiburg).

3.7.3.2. Western Blot

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine werden durch Transfer auf eine Nitrozellulosemembran für Detektionen zugänglich gemacht und können durch spezifische Antikörper immunologisch nachgewiesen werden.

Transferpuffer

300 ml 5 x Laufpuffer

600 ml Ethanol

ad 3 l mit Aqua bidest.

Der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde über Nacht in einer Tank-Blot-Kammer mit 100 mA bei RT durchgeführt. Der erfolgreiche Transfer wurde durch eine Färbung der Membran in PonceauS-Lösung überprüft. Die Färbung diente auch als Ladekontrolle für den Auftrag von gleichen Proteinmengen und wurde für die Abschätzung von Mengenunterschieden spezifischer Proteine eingescannt und entsprechend verglichen.

5 x TBS

20 mM Tris-Base

137 mM NaCl

pH 7,6

TBS-T

1 x TBS mit 0,4 % Tween20

Die Blockierung der freien Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran nach dem Proteintransfer erfolgte durch Inkubation für mindestens 2 h mit 10 % Pferdeserum und 2 % Trockenmilchpulver in TBS-T unter leichtem Schwenken. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T folgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (s. AK-Liste in 2.1.10) in TBS, 0,1 % Tween und 1 % Milchpulver bei 4 °C über Nacht unter leichtem Schwenken. Vor Zugabe des Zweitantikörpers (s. 2.1.10) wurde dreimal mit TBS-T gewaschen. Die Membran wurde im Anschluss an die Inkubation mit dem Zweitantikörper in einer Lösung bestehend aus einer 1 : 1-Mischung aus Detergenz 1 und Detergenz 2 (ECL-Kit, Amersham Pharmacia) 1 min inkubiert. Die dabei entstehende Lichtreaktion wurde mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert.

3.7.4. Gelretardationsversuch (Gelshiftversuch, EMSA)

Bei einem EMSA wird die Bindung von Protein an DNS nachgewiesen. So können zum Beispiel Promotorsequenzen überprüft werden, ob sie ein Erkennungsmotiv für einen Transkriptionsfaktor enthalten und an diese Sequenz ein Transkriptionsfaktor bindet. Die DNS wird zu diesem Zweck markiert, mit Protein inkubiert und anschließend in einem nativen Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Durch die Bindung des Proteins wandert die DNS in einem elektrischen Feld langsamer als ungebundene DNS, so dass die Bande im Vergleich zur ungebundenen DNS im Gel nach oben „shifted“. In dieser Arbeit wurde zur Detektion

der DNS der „LightShift™ Chemiluminescent EMSA Kit“ verwendet, in dem Biotin-markierte DNS auf Nylonmembranen mit Hilfe eines Streptavidin-Peroxidase Konjugates gebunden wird. Die Zugabe einer Substratlösung führt zu einer durch die Peroxidase katalysierten Reaktion, die mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert werden kann.

3.7.4.1. Biotin-Markierung der DNS

Für die Gelshift-Experimente wurden Oligonukleotide mit einer Länge von ca. 20-25 Bp als Einzelstränge über die Firma Thermohybrid (Ulm) bezogen. Diese wurden zunächst 1 : 1 (je 25 pmol) gemischt und für 10 min auf 95 °C erhitzt. Bei der anschließenden langsamen Abkühlung bilden sich komplementäre Doppelstränge aus, die nun über die Terminale Transferase TdT (Gibco BRL, Eggenstein) mit Biotin-UTP markiert werden können. Hierzu wurden die 50 pmol Oligonukleotidgemisch in TdT-Puffer, 5 µl 0,4 mM Biotin und 15 U TdT bei 37 °C für 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 0,5 µl 0,2 M EDTA gestoppt. Die Lagerung der Oligonukleotide erfolgte bei -20 °C.

3.7.4.2. Gelshift

Für die elektrophoretische Auftrennung wurden 20 x 20 cm große, native Polyacrylamid-Gele verwendet, die am Vortag gegossen wurden, um eine optimale Polymerisation zu gewährleisten.

TBE (10x)

890 mM Tris

890 mM Borsäure

20 mM EDTA (pH 8,0)

Tab. 3.7: Pipetierprotokoll natives Polyacrylamid-Gel

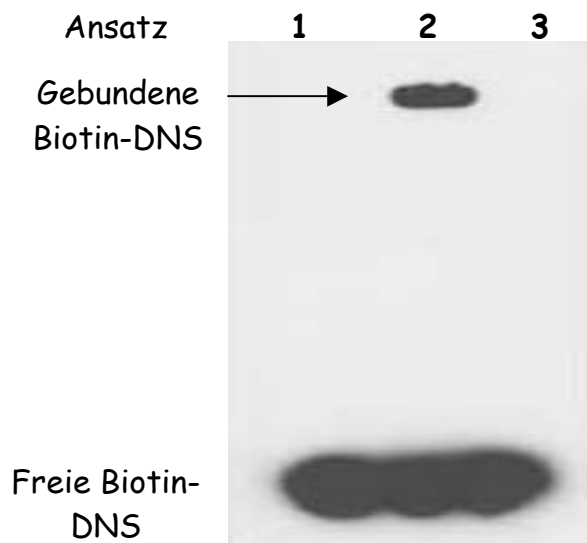
Trenngel 10%	
40 % Acrylamid / 2 % Bisacrylamid	6,13 ml
0,5 % TBE	33,87 ml
TEMED	33 µl
10 % APS	200 µl

Die eigentliche Kernbindungsreaktion erfolgt in jeweils drei Ansätzen:

Tab. 3.8: Ansätze im Gelretardationsversuch

Ansatz	Inhalt	Signal
1	Biotin-DNS	Kein Shift: Nur Signal durch die markierte DNS
2	Biotin-DNS + Kernprotein	Bindung von Protein an DNS führt zu einem zweitem Signal
3	Biotin-DNS + Kernprotein + 250facher Überschuss an nicht markierter DNS	Das Protein bindet vor allem nicht markierte DNS, deshalb kein zweites Signal

Abb. 3.1: Gelretardationsversuch



Die Ansätze wurden wie folgt auf Eis gemischt und für 15-30 min bei RT inkubiert.

Tab. 3.9: Pipetierprotokoll für den Gelretardationsversuch

Komponente	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
10 x Puffer	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl
1 µg/µl Poly (dl:dC)	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
Markierte DNS	30 pmol	30 fmol	30 fmol
Unmarkierte DNS	-	-	7,5 pmol
Kernprotein	-	5-10 µg	5-10 µg

Mit RNS-sterilem Aqua bidest. auf 20 µl auffüllen.

Nach der Bindungsreaktion wurden den Proben 5 µl Auftragspuffer zugesetzt, auf das Gel aufgetragen und elektrophoretisch 2-4 h in 0,5 % TBE bei 160 V unter Kühlung aufgetrennt. Um die Proben für die Detektion verfügbar zu machen, erfolgte eine Überführung auf eine Nylon-Membran (VWR, Darmstadt) in einer Semi-Dry-Blotting Aparatur (Biometra, Göttingen) für 1 h bei 500 mA unter Kühlung. Anschließend wurde die Membran zum „Cross-Linking“ für 15 min unter UV-Licht

gelegt. Durch die unter UV-Licht katalysierte Bildung von Thymidin-Dimeren wird die DNS an die Nylonmembran gebunden. Damit wird vermieden, dass die DNS in den anschließenden Wasch- und Inkubationsschritten wieder in Lösung geht und ausgewaschen wird. Die Detektion der Proben wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.8. Zellbiologische Assays

3.8.1. FACS (Durchflusszytometrie)

Die Durchflusszytometrie ist eine immunologische Methode zur Analyse von membranständigen und intrazellulären Proteinen von Zellen. Das Prinzip beruht auf der Identifizierung und Quantifizierung von Zellen oder Zellstrukturen durch Bindung markierter Antikörper an definierte Zielantigene.

Die markierten Zellen werden mit Hilfe eines Vakuums angesaugt und durch eine Trägerflüssigkeit so stark beschleunigt, dass vorhandene Aggregate aufgetrennt und die Zellen perlschnurartig aneinander gereiht werden. Die Fluoreszenz wird durch einen Argon-Ionen-Laser angeregt und in zwei Richtungen gemessen. Dabei ist das Vorwärtsstreulicht (FSC) das Maß für die Größe der Zelle, das Seitwärtsstreulicht (SSC) das Maß für die Granulierung der Zelle. Mit Hilfe der spezifischen Fluoreszenz des gewählten Farbstoffes kann die Expressionsstärke des markierten Proteins bestimmt werden; sie wird in Relation zu einem unspezifischen Isotyp-Antikörper gesetzt und logarithmisch gegen die Zellzahl aufgetragen.

5×10^5 Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und dem Restvolumen nach dem zweiten Waschen der Erst-Antikörper bzw. die Isotyp-Kontrolle zugefügt. Die Inkubation erfolgte auf Eis für 30 min. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde der zweite markierte Antikörper zupipetiert und 15 min im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Nach weiteren zwei Waschschritten wurden die Zellen in 500 µl PBS aufgenommen und gemessen.

3.8.2. Peptidtranslokationsversuch

Der ATP-abhängige Transport von Peptiden in das ER kann mit Hilfe des Peptidtranslokationsversuches (Neefjes et al., 1993) gemessen werden. Das Experiment beruht auf dem Prinzip, dass Peptide, die eine N-Glykosylierungsstelle enthalten, im ER glykosyliert werden. Die glykosylierten Peptide können an Concanavalin A-Sepharose gebunden und von den nicht glykosylierten Peptiden getrennt werden. In diesem Versuch wurden J^{125} -markierte Peptide, die ein Glykosylierungssignal enthalten, zu Streptolysin O-permeabilisierten Zellen gegeben. Die Menge der anschließend an Sepharose gebundenen Radioaktivität im Verhältnis zur eingesetzten Radioaktivität kann so als Maß für die Transportrate vom Zytosol in das ER gewertet werden.

Die Jodierung der Peptide wurde im Labor von Dr. F. Momburg in Heidelberg nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Die Peptide #63 (RYWANATRSI) und #600 (TNKTRIDGQY) wurden mit Hilfe der ChloraminT-Methode an Tyrosin jodiert. Dazu wurden die Peptide für 5 min bei RT mit 10 µl ChloraminT (1 mg/ml in PBS) und 4 µl NaI (0,4 mCi) inkubiert. Nach Zugabe von 20 µl Na₂S₂O₅ (1 mg/ml) und PBS ad 500 µl wurde nicht inkorporiertes Jod an eine DOWEX 1 x 8 Säule gebunden und sedimentiert. Der Überstand mit den jodierten Peptiden wurde abgenommen, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Translokationsassay

Translokationspuffer (TP)

130 mM KCl

10 mM NaCl

1 mM CaCl₂

2 mM EGTA

2 mM MgCl₂

5 mM HEPES, pH 7,3

Lysepuffer (LP)

50 mM Tris-HCL, pH 7,4

150 mM NaCl

5 mM MgCl₂

1 % (w/v) NP-40

2,5 x 10⁶ Zellen wurden zur Permeabilisierung für 15 min bei 37 °C mit 50 µl Streptolysin O (2,2 U/ml + 4 µl 1 M DTT/ml) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Translokationspuffer (TP) wurden die permeabilisierten Zellen in ein Reaktionsgefäß mit vorgelegtem Peptid (in 50 µl TP) gegeben. Nach Zugabe von 10 µl ATP (100 mM) erfolgte der Transport der Peptide für 20 min bei 37 °C. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 1 ml Lysepuffer (LP) und Inkubation für 30 min auf Eis. Durch anschließende Zentrifugation bei 13000 UpM für 10 min wurden die Kerne und Zellbruchstücke sedimentiert. Der Überstand wurde zu 20 µl ConA Sepharose pipetiert. Die Bindung der glykosylierten Peptide an die Sepharose erfolgte unter Schwenken bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurde nach mehrfachem Waschen mit LP die noch vorhandene Radioaktivität in einem γ-Counter gemessen und die Transportrate nach folgender Formel berechnet:

Transportrate in % = (CpM gebundene Peptide/CpM eingesetzte Peptide) x 100

3.8.3. Infektion mit dem Tyrosinase-Vaccinia Virus Ankara und Chromium-Freisetzungsversuch

Zum Nachweis der funktionellen Prozessierung und Präsentation zytosolischer Proteine über die MHC Klasse I-Moleküle wurden Zellen mit einem modifizierten Vaccinia-Virus Ankara, der das humane Tyrosinase-Gen exprimiert (Drexler et al., 1999) infiziert. Die infizierten Zellen sollten anschließend von Tyrosinase-spezifischen zytotoxischen T-Zellen erkannt und lysiert werden. Die infizierten Zellen wurden vorher mit ⁵¹Cr markiert, das in die Zellen eindringen kann. Eine erfolgreiche

Lyse führt zur Freisetzung der Radioaktivität und kann in einem Counter detektiert werden.

Ein Zellpellet mit 5×10^5 Zellen (Zielzellen) wurden mit 1×10^7 Units (Virus) resuspendiert und 3 h bei 37 °C inkubiert, wobei die Ansätze in der ersten Stunde mehrmals gemischt und für die folgenden beiden Stunden mit 500 µl Medium versetzt wurden. Anschließend wurde das Medium mittels Zentrifugation entfernt, die infizierten Zellen mit 20 µCi ^{51}Cr für 1,5 h bei 37 °C markiert, und anschließend das nicht inkorporierte ^{51}Cr durch dreimaliges Waschen mit MEM-Medium entfernt. Pro Well wurden 1000 Zielzellen in einer 96-Loch-Platte ausgesät und 12 h nach Infektion mit zytotoxischen T-Zellen in unterschiedlichen Verhältnissen (E:T-Ratio: 1 : 30, 1 : 10, 1 : 3, 1 : 0,3) in einem Gesamtvolumen von 200 µl für 4 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die vorhandene Radioaktivität in 30 µl Überstand in einem γ -Counter gemessen und die spezifische Lyse mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\left(\text{CpM in } 70 \mu\text{l Überstand} - \text{CpM Spontanlyse} \right) / \left(\text{CpM maximale Lyse} - \text{CpM Spontanlyse} \right) \times 100$$

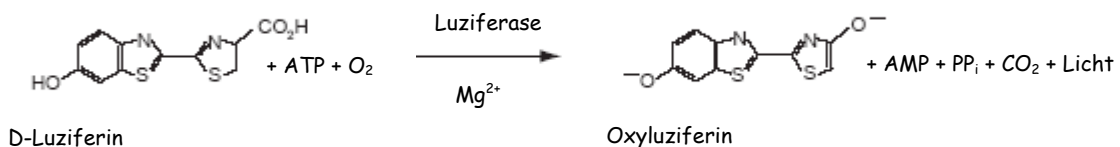
Die Spontanlyse wurde durch Inkubation der Zielzellen mit MEM-Medium bestimmt; die maximale Lyse durch Inkubation mit 2 % Triton-X-100.

Da die entsprechenden T-Zellen HLA-A2 restringiert waren, mussten für diese Experimente die murinen Zellen mit HLA-A2 stabil transfiziert werden.

3.8.4. Reporterassay (Luziferaseassay)

Um die Aktivität eines Promotors zu untersuchen, wurden die Promotorsequenzen vor ein Reporteragen, dem Luziferase-Gen des Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*) kloniert. Ein Promotor aktiviert dann die Expression des Luziferase-Enzyms, welches folgende Reaktion katalysiert (Abb.3.2):

Abb. 3.2: Luziferase-katalysierte Reaktion



Das bei dieser Reaktion frei werdende Licht kann mit Hilfe eines Luminometers gemessen werden. Die dabei ermittelten „relativen Licht-Einheiten“ („relative Light units“, RLU) sind ein Maß für die Konzentration der Luziferase und damit für die Aktivität des Promotors.

Der entsprechende Promotor wurde für diese Experimente vor das Luziferase-Gen des Vektors PGL3-Enhancer einkloniert. 1 µg des entstandenen Plasmids wurde mittels transienter Transfektion (3.6.1.) zusammen mit 0,03 µg PSV- β -Galaktosidase Kontrollvektor, welcher für die β -Galaktosidase codiert in 1×10^5 Zellen eingebracht,

die als Triplikate in Sechs-Loch-Platten am Vortag ausgesät worden waren. Die β -Galaktosidase fungierte bei dem Experiment als Kontrolle der Transfektionseffizienz. Nach 48 h wurden die Aktivitäten von Luziferase (LUC) und β -Galaktosidase (GAL) bestimmt und die Aktivität des Promotors wie folgt errechnet:

$$\frac{(\text{LUC PGL3-Enhancer} + \text{Promotor} / \text{GAL PGL3-Enhancer} + \text{Promotor}) - (\text{LUC PGL3-Enhancer ohne Promotor} / \text{GAL PGL3-Enhancer ohne Promotor})}{\dots}$$

Diese Rechnung wurde für jedes Loch einzeln durchgeführt und aus den Triplikaten Mittelwerte berechnet.

Zellernte:

Die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen und für 15 min in „Reporter Lysis Buffer“ (PROMEGA, Mannheim) inkubiert. Nach Abschaben mit einem Zellschaber wurden die Ansätze in 1,5 ml Gefäße überführt und für 2 min bei 13000 UpM zentrifugiert. 10-20 μ l des Überstandes wurden anschließend in dem Enzymassay eingesetzt:

Luziferaseassay:

10-20 μ l Zellextrakt wurden mit 100 μ l „Luciferase Assay Reagent“ (Promega, Mannheim) versetzt und sofort im Luminometer für 10 sek gemessen.

Galaktosidaseassay

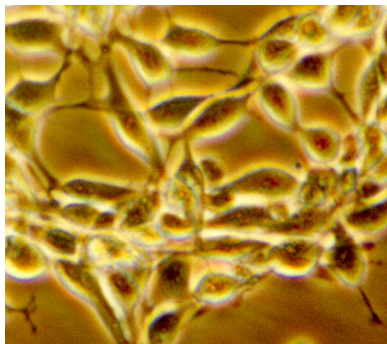
10-20 μ l Zellextrakt wurden mit 200 μ l 1 : 100 verdünntem Galakton Substrat (Applied Biosystems, Darmstadt) vermischt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden direkt 300 μ l „Light Emission Accelerator“ (Applied Biosystems, Darmstadt) dazu gegeben und das Gemisch im Luminometer für 5 sek gemessen.

4. Ergebnisse

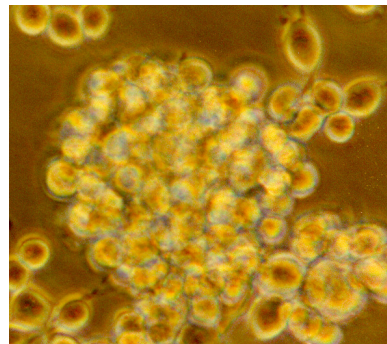
4.1. Das Zellmodell

Das in dieser Studie verwendete *in vitro*-System besteht aus zwei Zelllinien, die sich durch die Expression von HER-2/neu unterscheiden. Die Zelllinie NIH3T3 exprimiert als murine Zelllinie nicht den humanen HER-2/neu-Rezeptor. Aus dieser Zelllinie ist durch stabilen Gen-Transfer von HER-2/neu die Linie NIH3T3-HER-2/neu entstanden, die durch eine starke Expression dieses Rezeptors gekennzeichnet ist. Im Folgenden werden die Zellen als HER-2/neu⁻ und als HER-2/neu⁺ bezeichnet. Die Zellen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Morphologie (Abb. 4.1) und Wachstumseigenschaften (Tabelle 4.1.).

Abb. 4.1: Das Zellmodell



HER-2/neu⁻ (NIH3T3)



HER-2/neu⁺ (NIH3T3-HER-2/neu)

Mikroskopische Ansicht von HER-2/neu⁻- und HER-2/neu⁺-Zellen (200fach).

Tab. 4.1: Wachstumseigenschaften der HER-2/neu⁻- und HER-2/neu⁺-Zellen

Wachstumseigenschaften	HER-2/neu ⁻	HER-2/neu ⁺
Morphologie	flach, teilw. langgestreckt, nicht transformiert, keine Focibildung	rundlich, selten langgestreckt, häufig kugelige Aggregate, Focibildung
Lokalisation in der Kultur	ausschließlich adhärent	semi-adhärent
Wachstum in Weichagar	nein	ja
Bildung von Tumoren in syngenem Mäusen*	nein	ja
Zellzyklus (% Zellen)**	G ₀ /G ₁ : 61 % S: 29 % G ₂ /M: 10 %	G ₀ /G ₁ : 50 % S: 40 % G ₂ /M: 10 %
Verdopplungszeit**	37,5 h	24,5 h
Dauer der Zellzyklusphasen**	G ₀ /G ₁ : 19 h S: 14,5 h G ₂ /M: 4 h	G ₀ /G ₁ : 9 h S: 11 h G ₂ /M: 3 h
Kontaktinhibition	ja	nein

*: In Zusammenarbeit mit der Pathologie der Uniklinik Mainz, AG Prof. Lehr. **: Kurth, R. III Med. Klinik, Uniklinikum Mainz, unveröffentlichte Daten

Aufgrund der angeführten Eigenschaften besitzen HER-2/neu⁺-Zellen einen transformierten Phänotyp.

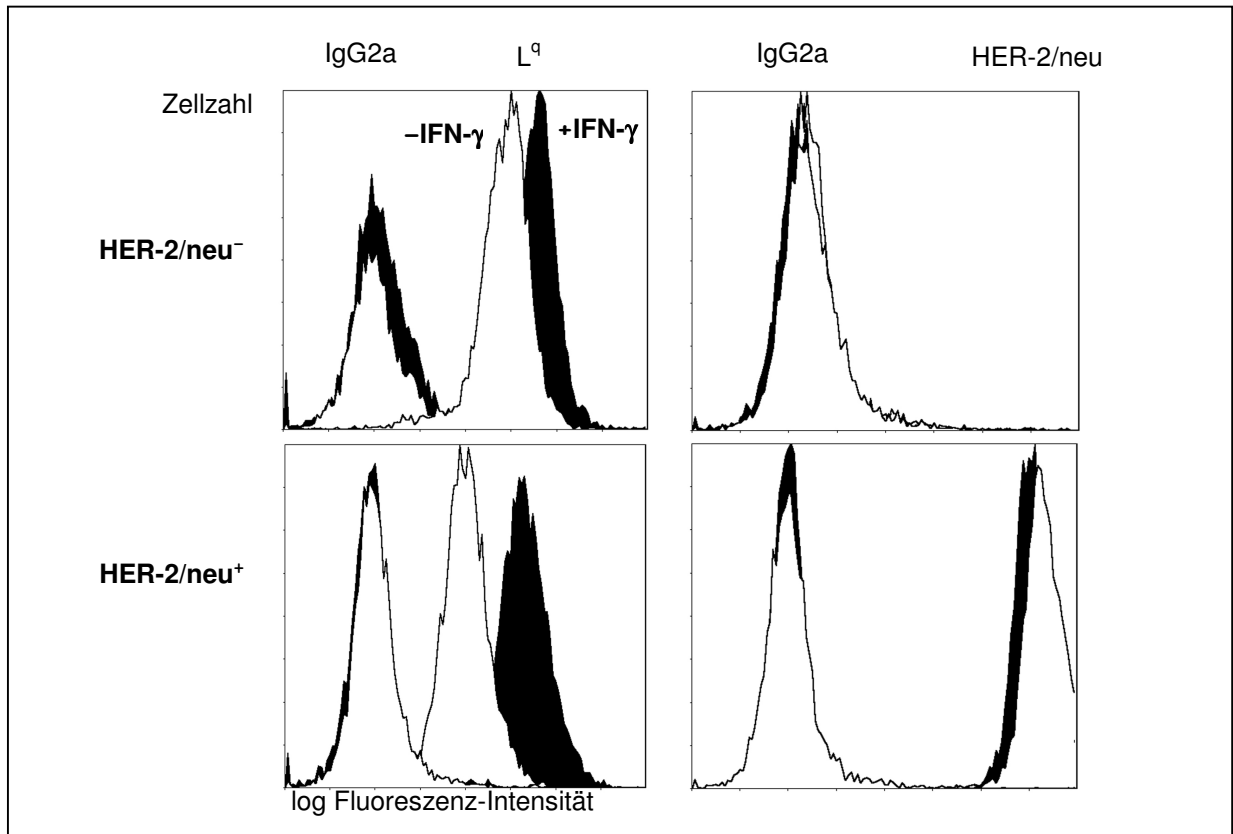
Es wird postuliert, dass transformierte Zellen häufig eine Beeinträchtigung der Präsentation von Antigenen über MHC Klasse I-Komplexe aufweisen. Jedoch ist die Bedeutung der HER-2/neu-Überexpression auf die Prozessierung von MHC Klasse I-Antigenen nicht bekannt. Deshalb soll das angeführte Zellmodell auf diese Fragestellung hin untersucht werden, wobei insbesondere die molekularen Mechanismen, die diesen Phänotyp entstehen lassen, aufgeklärt werden sollen.

4.2. Defekte in der Antigenprozessierung in HER-2/neu⁺- Zellen

4.2.1. Durchflusszytometrische Analyse der HER-2/neu- und MHC Klasse I-Oberflächenexpression

Um zu analysieren, ob HER-2/neu in dem verwendeten *in vitro*-System die Antigenprozessierung beeinträchtigt, wurde die Oberflächenexpression von MHC Klasse I-Komplexen durchflusszytometrisch bestimmt. Eine Behandlung der Zellen mit IFN- γ diente zum Nachweis der Stimulierbarkeit der Antigenpräsentation, um einen genetischen Effekt aufgrund des Gen-Transfers auszuschließen. Zum Nachweis der HER-2/neu-Expression wurde der HER-2/neu-spezifische Antikörper c-neu/ab5 (MERCK Biosciences, Darmstadt) eingesetzt. Die MHC Klasse I-Oberflächenexpression wurde mit dem Antikörper α -H-2L^{q/d} (Cedarlane, Hornby, Kanada), der die Haplotypen H2-L^q und H2-L^d erkennt, nachgewiesen.

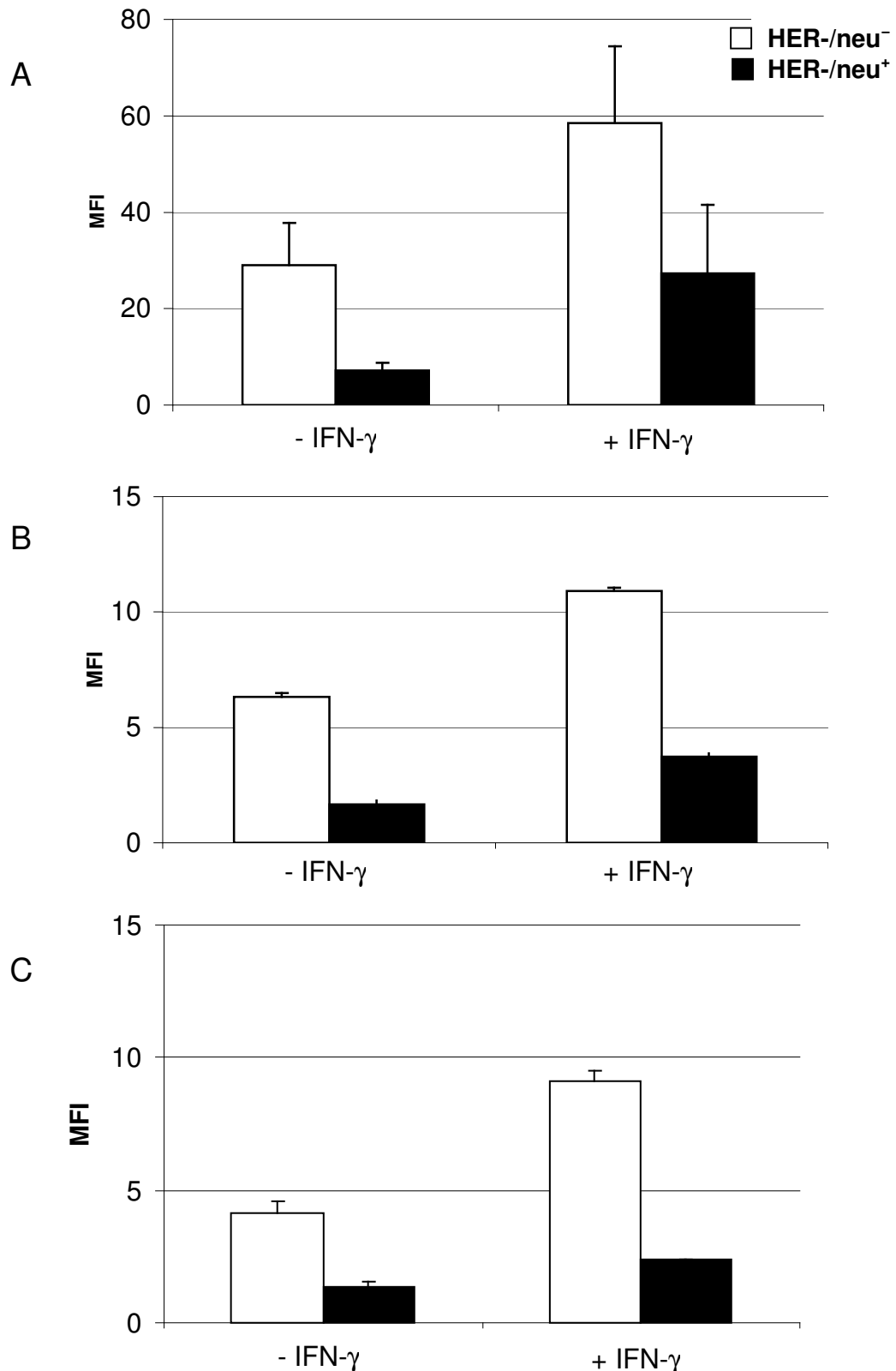
Abb. 4.2: HER-2/neu- und MHC Klasse I-Oberflächenexpression in HER-2/neu⁻- und HER-2/neu⁺-Zellen



5 x 10⁵ Zellen wurden mit den Antikörpern α -H-2L^{q/d} und α -c-neu/Ab5 auf die Oberflächenexpression von H2-L^q und HER-2/neu untersucht. Als Kontrolle diente IgG2a und als Zweitantikörper ein Ziegenanti-Maus-GAM-FITC-konjugierter Antikörper. Die Durchführung erfolgte wie in 3.8.1. beschrieben. Das Ergebnis zeigt eines der drei durchgeführten Experimente. Weiße Histogramme: unbehandelte Zellen, schwarze Histogramme: IFN- γ -stimulierte Zellen (100 U/ml, 24h).

Das Ergebnis in Abb. 4.2 zeigt eine verminderte MHC Klasse I-Oberflächenexpression in den HER-2/neu⁺-Zellen gegenüber den HER-2/neu⁻-Zellen, die durch IFN- γ in beiden Zelllinien induzierbar ist. Die IFN- γ -behandelten HER-2/neu⁺-Zellen zeigen eine geringere H2-L^q-Oberflächenexpression, als gleichermaßen behandelte HER-2/neu⁻-Zellen. Wie erwartet, ist die HER-2/neu-Expression in den HER-2/neu⁺-Zellen hoch und nicht durch IFN- γ -Behandlung beeinflussbar.

Um den Einfluss von HER-2/neu auf die MHC Klasse I-Oberflächenexpression genauer zu charakterisieren, wurden in weiteren FACS-Analysen die allelspezifischen Antikörper α -H-2L^{q/d}, α -H-2D^q und α -H-2K^q eingesetzt und die Ergebnisse quantifiziert (Abb. 4.3).

Abb. 4.3: Oberflächenexpression der MHC-Haplotypen H2-L^q, - D^q und K^q

5×10^5 unbehandelte und IFN- γ -stimulierte Zellen (24 h, 100 U/ml) wurden mit den spezifischen Antikörpern gegen H2-L^{q/d} (A), H2-D^q (B) und H2-K^q (C) untersucht. Als Kontrolle diente IgG2a und als Zweitantikörper ein Ziege-anti-Maus-GAM-FITC-konjugierter Antikörper. Die Durchführung erfolgte wie in 3.8.1. beschrieben dargestellt sind die Mediane und Standardabweichungen der mittleren spezifischen Fluoreszenzintensität (MFI) aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

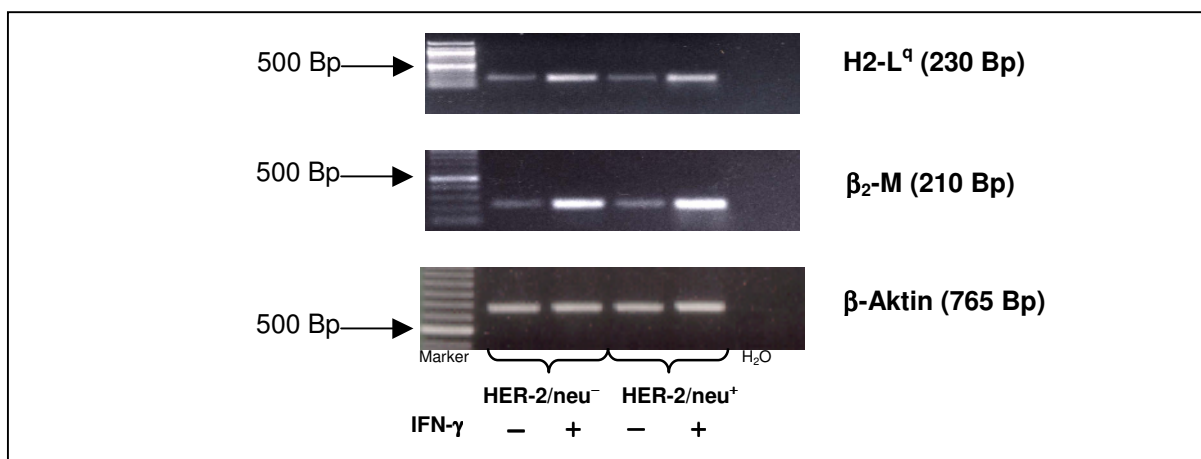
Für alle drei getesteten Haplotypen zeigt sich eine deutliche Reduktion der H2-Oberflächenexpression in den HER-2/neu⁺-Zellen gegenüber der parentalen Zelllinie (Abb. 4.3). Eine IFN- γ -Stimulation führte in allen Experimenten zu einer Rekonstitution der H2-Oberflächenexpression. Diese erreicht bei dem Haplotyp H2-L^q das Niveau der unstimulierten, parentalen Zelllinie. Bei den anderen Haplotypen, die nur marginal exprimiert werden, ist diese Rekonstitution nicht so stark ausgeprägt. Zusammengefasst ist die MHC Klasse I-Oberflächenexpression in den HER-2/neu⁺-Zellen im Vergleich zu den parentalen Zellen hinsichtlich der getesteten Haplotypen vermindert.

4.2.2. Verminderte Transkriptmengen einiger wichtiger Komponenten der MHC Klasse I-Antigenprozessierung in HER-2/neu⁺-Zellen

Aufgrund der beeinträchtigten MHC-Oberflächenexpression in den HER-2/neu⁺-Zellen wurden die Transkriptmengen der wichtigsten Komponenten der MHC Klasse I-Antigenprozessierung untersucht. Hierzu wurden RT-PCR-Analysen mit Gesamt-RNS unter den aufgeführten Bedingungen eingesetzt. Als interner Standard diente die Transkriptmenge von β -Aktin.

Es wurden zunächst die Transkriptmengen von β_2 -Mikroglobulin und H2-L^q untersucht.

Abb. 4.4: RT-PCR-Analysen von H2-L^q und β_2 -Mikroglobulin



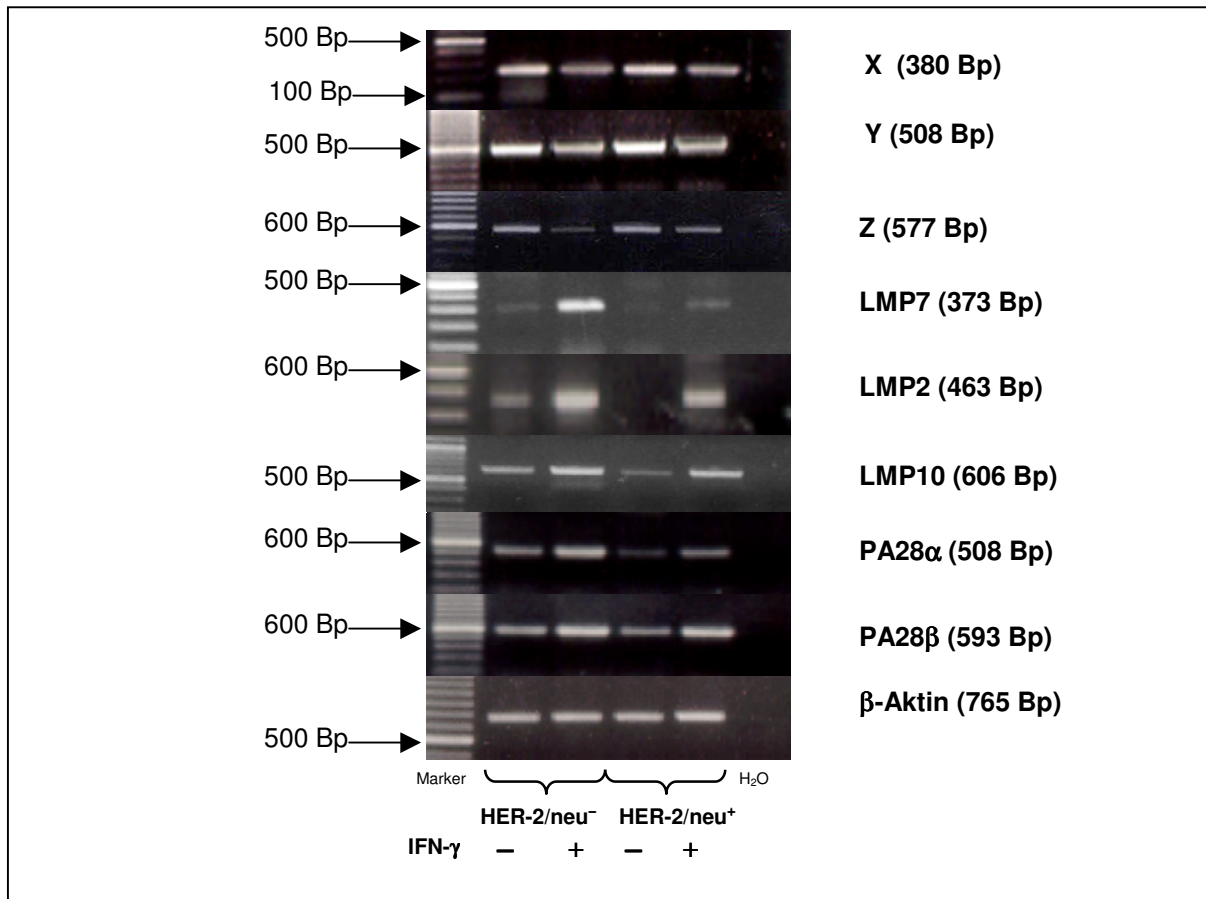
RT-PCR-Analysen der Gene H2-L^q und β_2 -Mikroglobulin (β_2 -M) im Vergleich zu β -Aktin in unbehandelten und mit 100 U/ml IFN- γ für 24 h stimulierten HER-2/neu⁻ und HER-2/neu⁺-Zellen. Die RT-PCR wurde mit je 200 ng Gesamt-RNS wie beschrieben durchgeführt und je 8 μ l auf einem 1 %igen Agarose-Gel mit Ethidiumbromid aufgetrennt. Die Abbildung zeigt jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Abb. 4.4 zeigt, dass die HER-2/neu⁻ und HER-2/neu⁺-Zellen vergleichbare konstitutive und IFN- γ -induzierbare Transkriptmengen von H2-L^q und β_2 -Mikroglobulin aufweisen.

Da die Verminderung der MHC-Oberflächenexpression in den HER-2/neu⁺-Zellen nicht mit geringeren Transkriptmengen von H2-L^q oder von β_2 -Mikroglobulin

assoziiert ist, wurden im Folgenden die wesentlichen Komponenten der Antigenprozessierung, wie Untereinheiten des Proteasoms und des TAP-Transporters sowie verschiedene Chaperone untersucht.

Abb. 4.5: RT-PCR-Analysen verschiedener Proteasomuntereinheiten



RT-PCR-Analysen der Gene der konstitutiv exprimierten Proteasom-Untereinheiten X, Y und Z, sowie der induzierbaren Untereinheiten LMP7, LMP2, LMP10, PA28 α und PA28 β in unbehandelten und mit 100 U/ml IFN- γ für 24 h stimulierten HER-2/neu $^{-}$ - und HER-2/neu $^{+}$ -Zellen. Die RT-PCR wurde mit je 200 ng Gesamt-RNS wie beschrieben durchgeführt und je 8 μ l auf einem 1 %igen Agarose-Gel mit Ethidiumbromid aufgetrennt. Die Abbildung zeigt jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

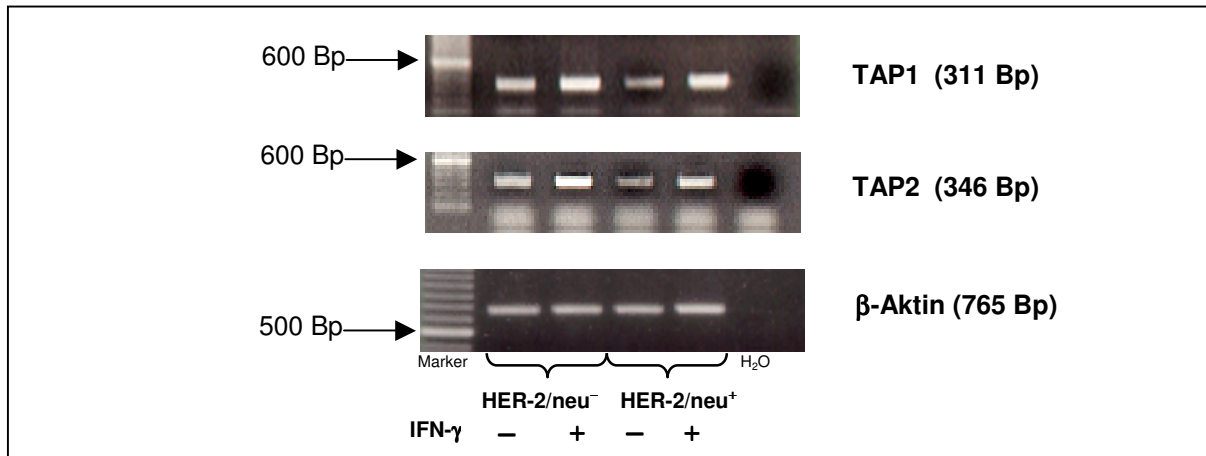
Abb. 4.5 zeigt, dass die konstitutiv exprimierten Proteasom-Untereinheiten X, Y und Z in beiden Zellen gleich stark exprimiert werden. Dagegen sind die IFN- γ -induzierbaren Untereinheiten LMP2, LMP10, PA28 α und PA28 β in den HER-2/neu $^{+}$ -Zellen zum Teil deutlich verringert. Eine Stimulation durch IFN- γ führt in beiden Zelllinien zu erhöhten Transkriptmengen dieser Komponenten, während die Untereinheiten X, Y und Z unter diesen Bedingungen vermindert exprimiert werden.

Im Bezug auf LMP7 ist ein Vergleich der konstitutiven Transkriptmengen zwischen den beiden Zelllinien in diesem Zellsystem schwierig, da die geringe Transkriptmenge erst nach 45 Zyklen erkennbar wird und damit in den Bereich einer Sättigung kommt. Es wurde deshalb beschlossen, die Expression dieser Untereinheit

zusätzlich im Western Blot zu bestimmen (siehe 4.2.3), um eine mögliche Hemmung von LMP7 in den HER-2/neu⁺-Zellen nachweisen zu können.

Zur Untersuchung des TAP-Transporters wurden die Transkriptmengen beider Untereinheiten TAP1 und TAP2 analysiert.

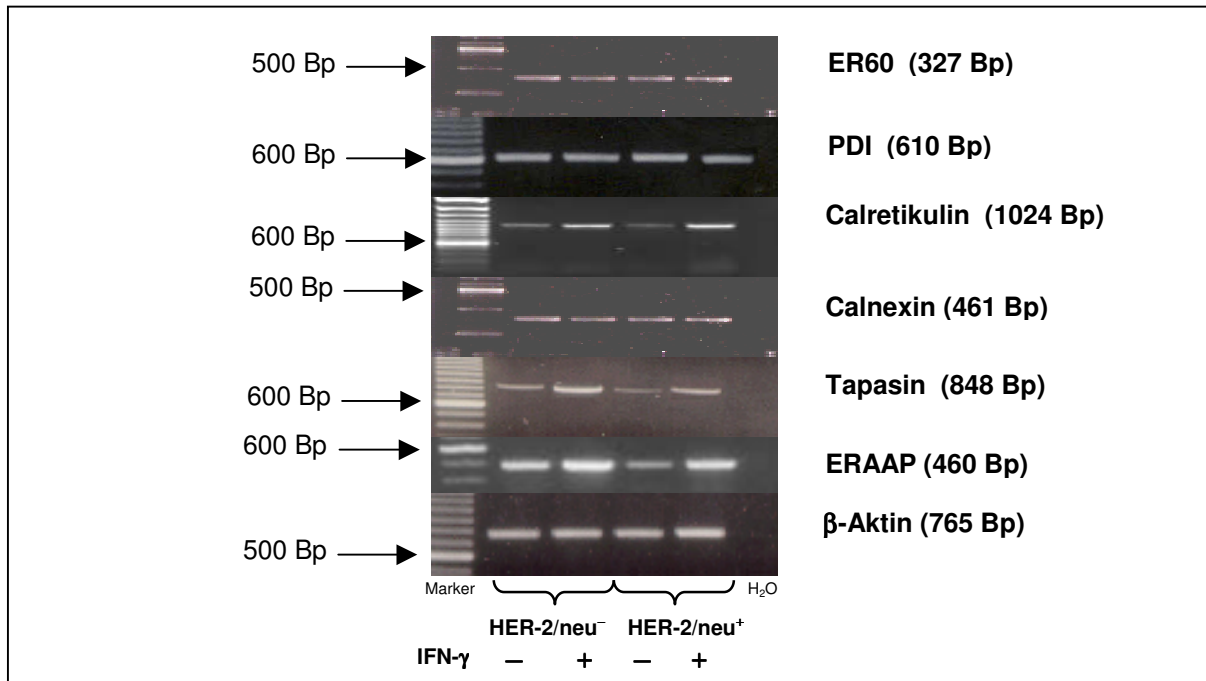
Abb. 4.6: RT-PCR-Analysen der TAP-Untereinheiten



RT-PCR-Analysen der Gene von TAP1 und TAP2 in unbehandelten und mit IFN- γ für 24 h stimulierten HER-2/neu⁻- und HER-2/neu⁺-Zellen. Die RT-PCR wurde mit je 200 ng Gesamt-RNS wie beschrieben durchgeführt und je 8 μ l auf einem 1 %igen Agarose-Gel mit Ethidiumbromid aufgetrennt. Die Abbildung zeigt jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Analog zu den induzierbaren Proteasomuntereinheiten sind TAP1 und TAP2 in ihren Transkriptmengen in den HER-2/neu⁺-Zellen gegenüber den parentalen Zellen deutlich verringert und durch IFN- γ stimulierbar (Abb. 4.6.).

Abb. 4.7: RT-PCR-Analysen verschiedener Chaperone und ERAAP



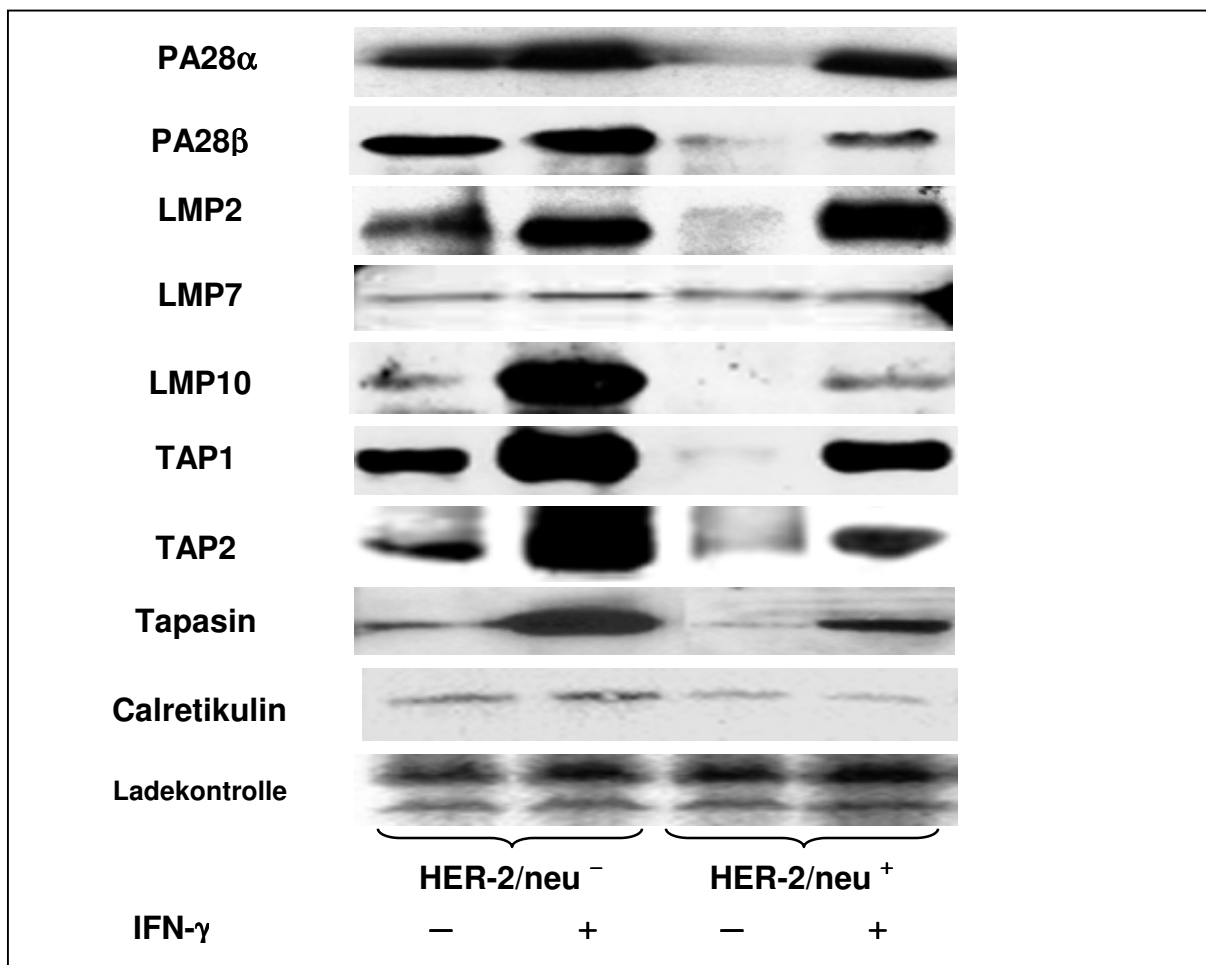
RT-PCR-Analysen der Gene verschiedener Chaperone und ERAAP in unbehandelten und mit IFN- γ für 24 h stimulierten HER-2/neu⁻- und HER-2/neu⁺-Zellen. Die RT-PCR wurde mit je 200 ng Gesamt-RNS wie beschrieben durchgeführt und je 8 μ l auf einem 1 %igen Agarose-Gel mit Ethidiumbromid aufgetrennt. Die Abbildung zeigt jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Die Ergebnisse in Abb. 4.7 zeigen, dass die Transkriptmengen der Chaperone Tapasin und Calretikulin, sowie der Peptidase ERAAP in den HER-2/neu⁺-Zellen gegenüber den parental Zellen verringert sind.

4.2.3. Verminderte RNS-Mengen führen zu verminderten Proteinmengen

Die Ergebnisse der RT-PCR-Analysen zeigen geringere Transkriptmengen von PA28, LMP2, LMP10, TAP1, TAP2, Tapasin, Calretikulin und ERAAP in den HER-2/neu⁺-Zellen im Vergleich mit den HER-2/neu⁻-Zellen. Um zu untersuchen, ob auch die Proteinmengen der betreffenden Gene vermindert sind, wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Eine Analyse der Proteinexpression von ERAAP konnte nicht durchgeführt werden, da bisher kein spezifischer Antikörper verfügbar ist.

Abb. 4.8: Western Blot-Analysen verschiedener Komponenten der Antigen-Prozessierung



30 µg Protein aus unbehandelten und für 24 h mit 100 U/ml IFN- γ -stimulierten Zellen wurden nach Protokoll mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und die Membran mit den entsprechenden Antikörpern (siehe 2.13.) inkubiert. Die Detektion erfolgte über einen HRP-gekoppelten Zweitantikörper, wie unter 3.7.3.2. beschrieben. Als Ladekontrolle diente jeweils die PonceauS-Färbung der Membran. Die Abbildung zeigt jeweils ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

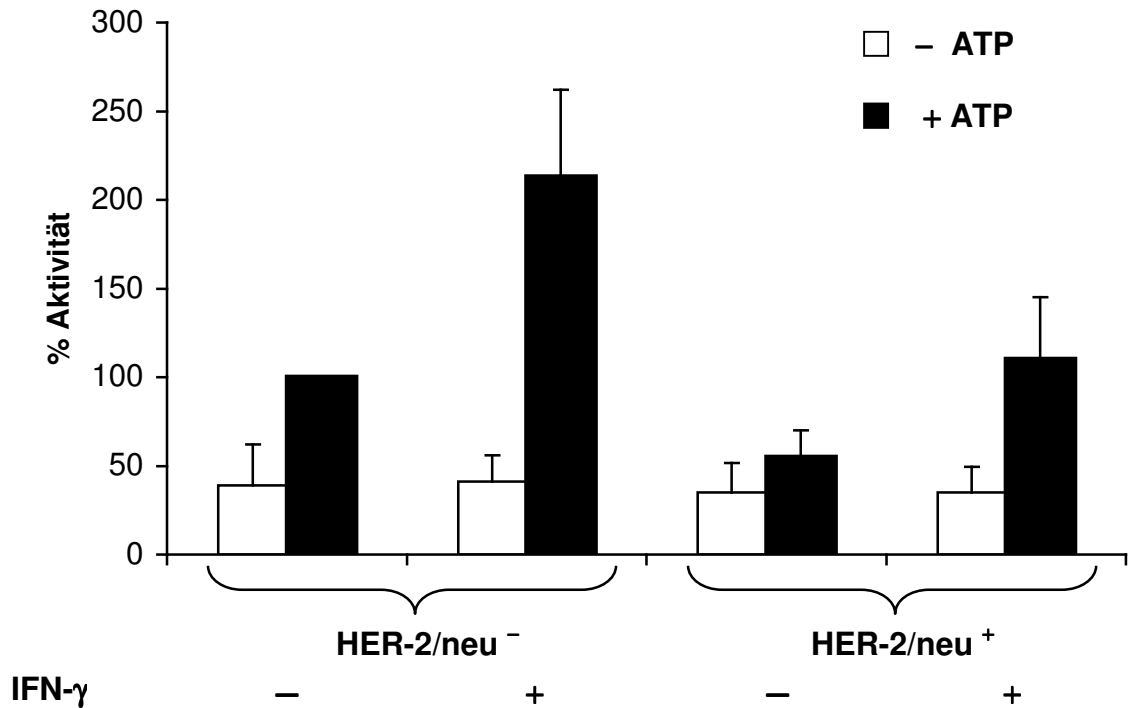
Mit Ausnahme von LMP7 zeigt jede der getesteten Komponenten eine Beeinträchtigung der Proteinexpression in den HER-2/neu⁺- im Vergleich zu den HER-2/neu⁻-Zellen, wobei der Mengenunterschied bei den TAP-Untereinheiten und den Proteasom-Aktivatoren PA28 α und PA28 β am stärksten ausgeprägt ist. Die Proteinexpression wird bei einer Stimulation der Zellen mit IFN- γ in beiden Zellen gesteigert (Abb. 4.8).

Zusammengefasst zeigen alle untersuchten Komponenten der MHC Klasse I-Antigenprozessierung, deren Transkriptmenge bei HER-2/neu-Überexpression vermindert ist, eine deutlich verringerte Proteinmenge. Die stark verringerten Proteinmengen könnten jedoch auch das Ergebnis einer posttranslationalen Modifikation sein.

4.2.4. Geringe TAP-Expression führt zu vermindertem Peptidtransport

Die verminderte TAP-Expression in den HER-2/neu⁺-Zellen sollte sich in einem verminderten Peptidtransport äußern. Aus diesem Grund wurde die Funktion des Peptidtransporters TAP mittels Peptidtranslokationsversuchen bestimmt.

Abb. 4.9: Peptidtranslokationsversuch



1 x 10⁷ unbehandelte und für 24 h mit 100 U/ml IFN-γ-behandelte Zellen wurden mit StreptolysinO permeabilisiert und der Transport radioaktiv markierter Peptide mit und ohne ATP wie beschrieben bestimmt (s.3.8.2.). Zur Quantifizierung wurde die Transportaktivität der HER-2/neu⁻-Zellen mit ATP als 100 % gesetzt. Die Abbildung zeigt die Mediane und Standardabweichungen der Transportaktivität aus mindestens drei Versuchen mit jeweils zwei unterschiedlichen Peptiden.

Das Ergebnis in Abb. 4.9 zeigt, dass der Transport von Peptiden vom Zytosol in das ER in den HER-2/neu⁺-Zellen signifikant vermindert ist (Wilcoxon, p < 0,05). Durch IFN-γ-Behandlung erreicht die Transportrate in den HER-2/neu⁺-Zellen wieder das Niveau der parentalen Zellen.

4.3. Die Beeinträchtigung der APM-Komponenten führt zu dem Verlust der Immunogenität

Aus der verminderten MHC Klasse I-Oberflächenexpression in den HER-2/neu⁺-Zellen resultiert die Vermutung, dass die Immunogenität der HER-2/neu⁺-Zellen beeinträchtigt ist. Deshalb wurde untersucht, ob die Zellen von spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt und lysiert werden können. Hierzu wurden die Zellen mit einem Vaccinia-Tyrosinase-Konstrukt infiziert und nach 12 h mit Tyrosinase-spezifischen T-Lymphozyten inkubiert. Da die zur Verfügung stehenden T-

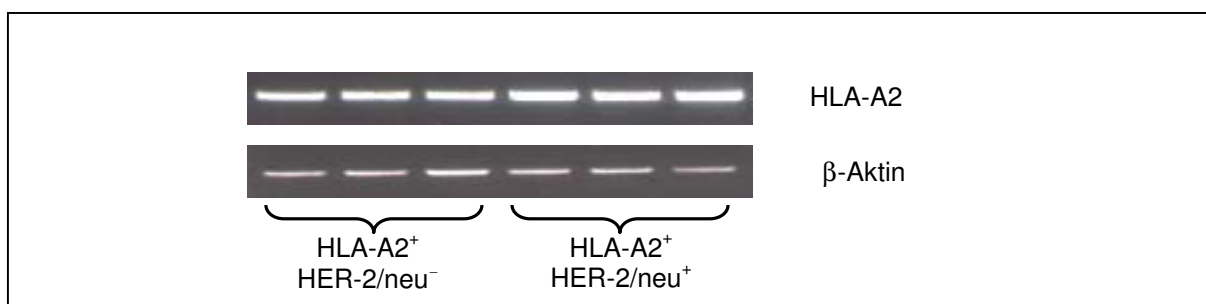
Zellen HLA-A2 restringiert sind, mussten die „Targetzellen“ zunächst stabil mit HLA-A2 transfiziert werden.

4.3.1. Herstellung von HLA-A2-Transfektanten und Überprüfung der Integration und Expression des Transgens

Die Transfektion erfolgte mit 0,5 µg, 1 µg und 1,5 µg eines HLA-A2-kodierenden Vektors über Lipofektion. Die Zellen wurden über 350 µg /ml Neomycin selektioniert und je 3 Klone expandiert.

Die Überprüfung des Transgens erfolgte mit einer RT-PCR. Dabei diente β-Aktin als interner Standard.

Abb. 4.10: HLA-A2-Transgen-Expression in HER-2/neu⁺- und HER-2/neu⁻-Zellen

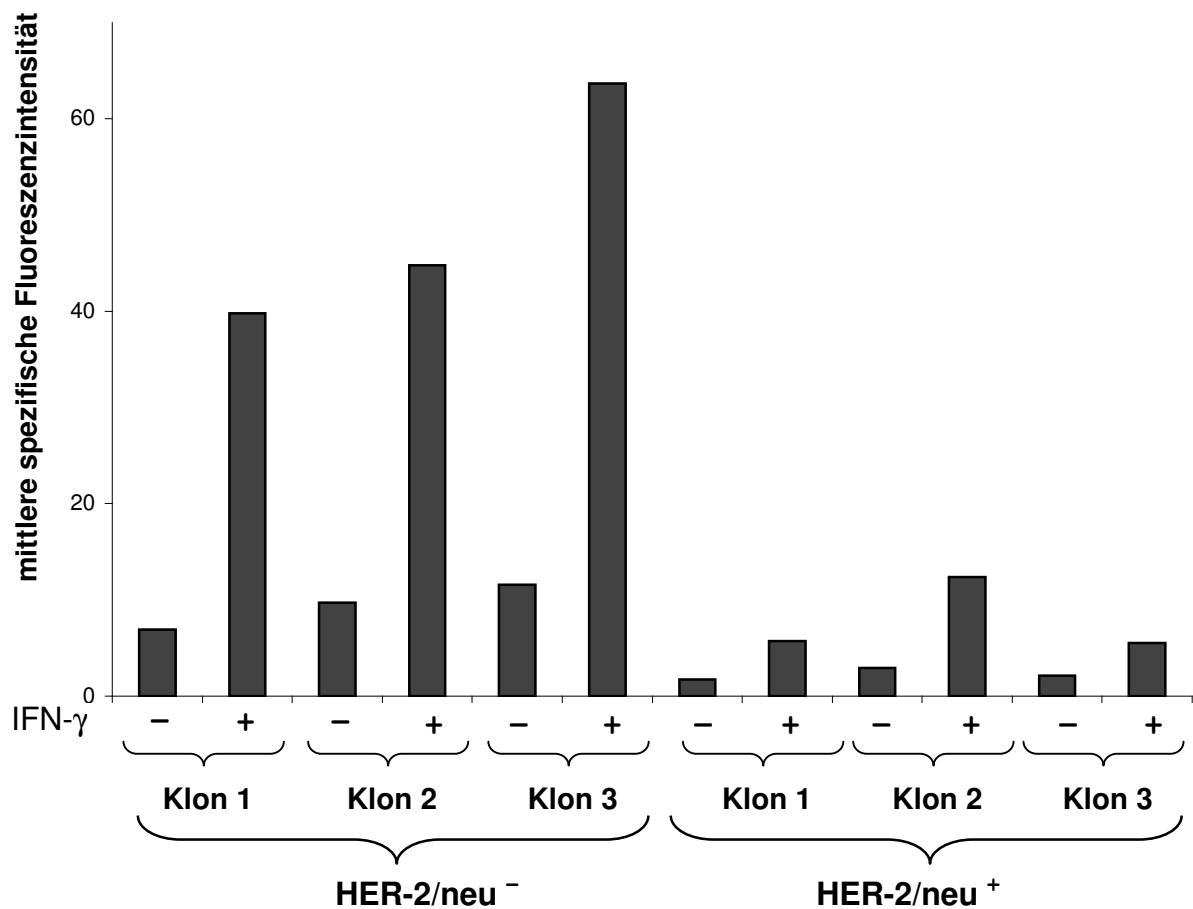


RT-PCR-Analysen des Transgens HLA-A2 im Vergleich zu β-Aktin. Je 200 ng totale zelluläre RNS wurden in die RT-PCR mit den entsprechenden Primern eingesetzt und anschließend je 8 µl auf einem 1 %igen Agarose-Gel mit Ethidiumbromid aufgetrennt.

Das Ergebnis zeigt, dass die HLA-A2-Transkriptmenge in den jeweils drei verschiedenen Klonen vergleichbar ist (Abb. 4.10). Dies bedeutet, dass eine unterschiedliche HLA-A2-Expression auf der Zelloberfläche von HER-2/neu⁺- und HER-2/neu⁻-Zellen nur mit einer unterschiedlichen Antigenprozessierung erklärbar wäre.

Da alle HLA-A2⁺-Klone die gleiche HLA-A2-Transkriptmenge exprimieren, wurden die Zellen auf ihre Fähigkeit, ein humanes MHC-Molekül zu prozessieren und an der Zelloberfläche zu präsentieren überprüft. Zu diesem Zweck wurden die HLA-A2⁺-Zellen durchflusszytometrisch auf ihre HLA-A2-Oberflächenexpression mit dem Antikörper W6/32, der den Komplex aus Peptid, β₂-Mikroglobulin und HLA-A,-B,-C erkennt (Barnstable et al., 1978) untersucht. Die Zellen wurden zusätzlich mit IFN-γ behandelt, um die Prozessierung von antigenen Peptiden zu erhöhen.

Abb. 4.11: Heterogene HLA-A2-Expression von HLA-A2⁺-HER-2/neu⁺- und HLA-A2⁺-HER-2/neu⁻-Zellen



5×10^5 unbehandelte und IFN- γ -stimulierte Zellen (24 h, 100 U/ml) wurden mit dem spezifischen Antikörper W6/32, der den Komplex aus Peptid, β_2 -Mikroglobulin und HLA-A,-B,-C erkennt, untersucht. Als Kontrolle diente IgG2a und als Zweitantikörper ein Ziege-anti-Maus-GAM-FITC-konjugierter Antikörper. Die Abbildung zeigt eines der zwei durchgeführten Kontrollexperimente.

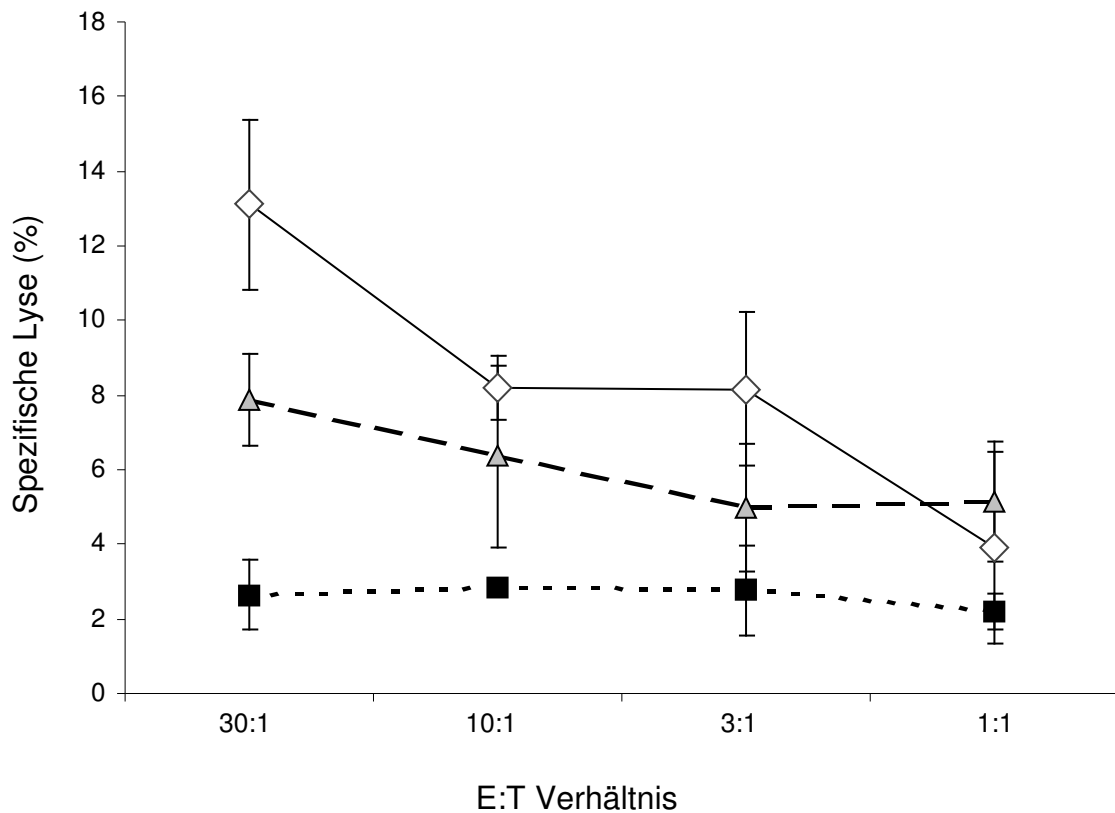
Alle HER-2/neu⁻-Klone zeigen eine HLA-A2-Oberflächenexpression, die durch IFN- γ -Behandlung um das fünf- bis achtfache erhöht werden kann (Abb. 4.11). Im Gegensatz dazu ist in den HER-2/neu⁺-Klonen die HLA-A2-Oberflächenexpression vermindert, aber durch IFN- γ induzierbar. Die Induktion ist mit zwei- bis vierfach nicht so stark, wie bei den HER-2/neu⁻-Klonen, jedoch entsprechen die Werte der IFN- γ -behandelten HER-2/neu⁺-Zellen ungefähr denen, der unbehandelten HER-2/neu⁻-Zellen.

4.3.2. Keine T-Zell-vermittelte Lyse der HER-2/neu⁺-Zellen

Nach Transfektion von HLA-A2 und dem Nachweis, dass dieses MHC-Molekül im murinen System mit Peptid beladen werden kann, wurde die Immunogenität der Zellen überprüft. Je drei getestete Klone wurden mit einem Vaccinia-Tyrosinase-Virus infiziert, und 12 h später als „Targets“ für Tyrosinase spezifische, HLA-A2-restringierte, zytotoxische T-Lymphozyten in einem Chrom-Freisetzungsversuch

eingesetzt. Neben den unbehandelten Zellen wurden zur Kontrolle auch IFN- γ -behandelte Zellen mitgeführt.

Abb. 4.12: HER-2/neu-vermittelter Verlust der T-Zell-Erkennung



1×10^6 Zellen wurden mit dem Tyrosinase-Virus infiziert, mit radioaktiv markiertem Chrom inkubiert und nach 12 h mit Virus-spezifischen T-Zellen 4 h kokultiviert. Dabei wurde die Zahl der Effektorzellen (ZTL) gegenüber der Targetzellzahl (E:T Verhältnis) wie angegeben variiert. Aus dem Überstand wurde die Radioaktivität bestimmt und die spezifische Lyse berechnet. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten und jeweils drei Klonen. Schwarze Quadrate: HER-2/neu⁺-Zellen, graue Dreiecke: HER-2/neu⁻-Zellen, Weiße Rauten: IFN- γ -stimulierte HER-2/neu⁺-Zellen (100 U/ml, 24 h).

Die Untersuchung ergab, dass die HLA-A2⁺-HER-2/neu⁻-Zellen von den HLA-A2-restringierten T-Zellen erkannt und lysiert werden. Allerdings sind die spezifischen Lyseraten aufgrund einer hohen spontanen Lyserate dieser Zelllinie niedrig. Die HLA-A2⁺-HER-2/neu⁺-Zellen werden unter keinem der gewählten E:T Verhältnisse (30 : 1 bis 1 : 1) lysiert. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p < 0,05$, Wilcoxon). Eine Stimulation mit IFN- γ führt zu einer verbesserten Lyserate der HLA-A2⁺-HER-2/neu⁺ Zellen.

Aus den Daten folgt, dass die HER-2/neu-Expression in den HER-2/neu⁺-Zellen zu einer Beeinträchtigung der Expression und Funktion bestimmter Komponenten der Antigenprozessierung und einer verringerten MHC Klasse I-Antigenpräsentation auf der Zelloberfläche führt, was mit einem Verlust der Immunogenität assoziiert ist.

4.4. Promotorstudien

Wie in Abschnitt 4.2.2. dargestellt, führt die starke Überexpression von HER-2/neu zu verminderten Transkriptmengen von TAP, Tapasin und anderen Komponenten der Antigenprozessierung, die sich durch IFN- γ wieder steigern lassen. Ein derartiger Effekt lässt vermuten, dass HER-2/neu die transkriptionelle und/oder posttranskriptionelle Regulation dieser Moleküle beeinflusst. Aufgrund der verringerten RNS-Mengen der betroffenen Komponenten ergibt sich die Hypothese, dass eine HER-2/neu-Überexpression mit einer verminderten Promotoraktivität der entsprechenden Gene assoziiert ist. Dies kann zwei Ursachen haben:

- i. HER-2/neu aktiviert Transkriptionsfaktoren, welche die Aktivität der Promotoren herabsenken.
- ii. HER-2/neu hemmt die Bindung aktivierender Transkriptionsfaktoren.

Voraussetzung für die Aufklärung dieser molekularen Zusammenhänge ist die Untersuchung der betreffenden Promotoren. Aus diesem Grund sollten die Promotoren von TAP1, TAP2, LMP2 und Tapasin kloniert und charakterisiert werden. Die Aktivität der Promotoren wurde anschließend in den Zellen getestet und mit Computerprogrammen auf potentielle Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren untersucht. Aufgrund dieser Bindungsstellen wurden Deletionsmutanten generiert, um über deren Aktivität Hinweise bezüglich der Funktionalität dieser Bindungsmotive zu finden. Ziel dieser Untersuchungen war die Identifikation von Sequenzbereichen in den Promotorregionen, die eine HER-2/neu-induzierte Hemmung der Promotoraktivität vermitteln.

4.4.1. Klonierung des murinen TAP2-Promotors

Der murine TAP2-Promotor wurde 1998 in Nature veröffentlicht (Zheng et al., 1998) und das entsprechende Plasmid zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um ein 1798 Bp langes Fragment aus der 5'-nicht-translatierten Region (UTR) von TAP2. Mit Hilfe der Computerprogramme TFSEARCH (Heinemeyer et al. 1998) und MatInspector (Quando et al., 1995) wurde das Konstrukt auf potentielle Bindungsstellen analysiert. Die Programme können eine beliebige Sequenz auf Bindungsmotive durchsuchen und eine Wahrscheinlichkeit der Bindung des entsprechenden Transkriptionsfaktors angeben. Es wurden nur diejenigen Motive berücksichtigt, deren Bindungswahrscheinlichkeit in beiden Programmen mit > 85,0 % angegeben wurde. Abb. 4.13 zeigt die Struktur mit den wichtigsten Bindungsmotiven des TAP2-Promotors.

Abb. 4.13: Putative Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren im TAP2-Promotor

GATA	NF-κB	SP1	GATA	AP1	CREBP	C/EBP	IRF1/2	P300	CREBP	P300	Myc	SP1	P300	NF-κB	E2F
88,6	85,4	87,7	89,3	87,6	86,7	85,4	87,4	86,1	86,2	86,1	85,5	87,7	85,1	86,5	86,2

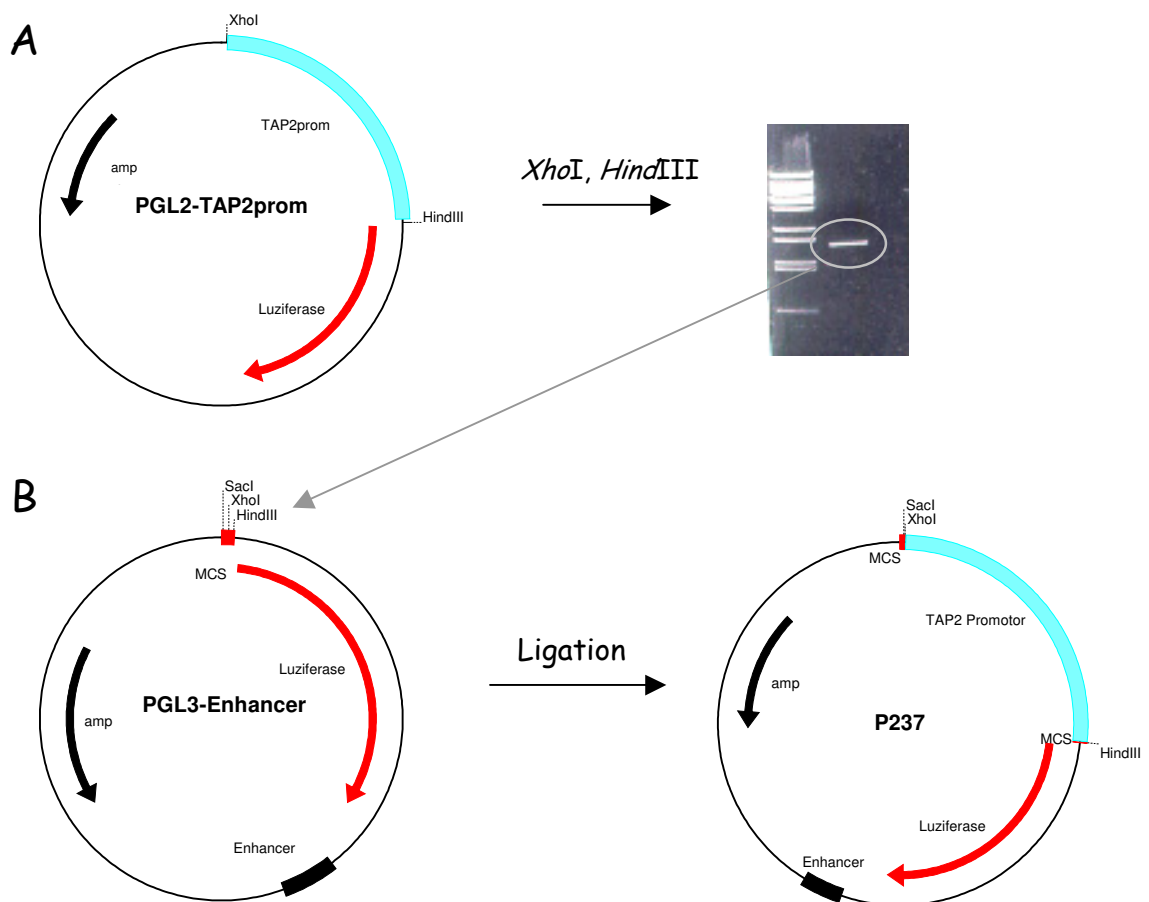
Dargestellt sind die wichtigsten Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen und die von TFSEARCH angegebene Wahrscheinlichkeit einer Bindung in Prozent.

Die Analyse ergab eine Vielzahl von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, darunter auch Faktoren, die durch HER-2/neu aktiviert werden können. So finden sich je zwei Motive für NF-κB und SP1, sowie je ein AP1- und ein Myc-Motiv. Die Induktion des Promotors durch IFN-γ ist von einem IRF1/2-Motiv abhängig, das in der Mitte des Promotors im Bereich mehrerer Transkriptions-Initiationsregionen liegt (Arons et al., 2000). Außerdem finden sich je zwei Bindungsmotive für GATA und „cAMP-Binding Protein“ (CREBP), ein Enhancer-Motiv (C/EBP), drei Bindungsstellen für die Histonazetyltransferase P300 und ein Motiv für einen Faktor der E2F-Familie, die vor allem im Zellzyklus eine wichtige Rolle spielen. Es finden sich keine Motive für NF-Y und CIITA, die die Expression der MHC-Gene kontrollieren.

Der TAP2-Promotor war in den Vektor „PGL2“ (Promega, Mannheim) einkloniert und befand sich 75 Bp vor dem ATG eines Luziferase-Gens. Dieses Konstrukt hatte aber in den NIH3T3 Zellen nur schwache Aktivität und wurde deshalb in den üblicherweise verwendeten PGL3-Enhancer Vektor umkloniert, der aufgrund des Enhancers die Promotoraktivität verstärkt. Dabei wurde zusätzlich der Abstand zwischen Promotor-ende und ATG verringert, um die Promotoraktivität weiter zu verbessern.

Der PGL2-TAP2prom wurde mit den Enzymen *XhoI* und *HINDIII* verdaut, auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und das 1795 Bp große Fragment eluiert. Mit den gleichen Schnittstellen wurde der PGL3-Enhancer-Vektor geschnitten und anschließend der Promotor über eine „sticky-end“-Ligation in den Vektor einkloniert. Das Produkt (P237) wurde bezüglich der Integrität des Promotors mittels Sequenzierung überprüft. Das Ergebnis zeigte, dass sich die Promotorregion 32 Bp vor dem ATG des Luziferasegens befand. Die Klonierung ist in Abb. 4.14. dargestellt.

Abb. 4.14: Herstellung des TAP2-Promotorplasmids (P237)

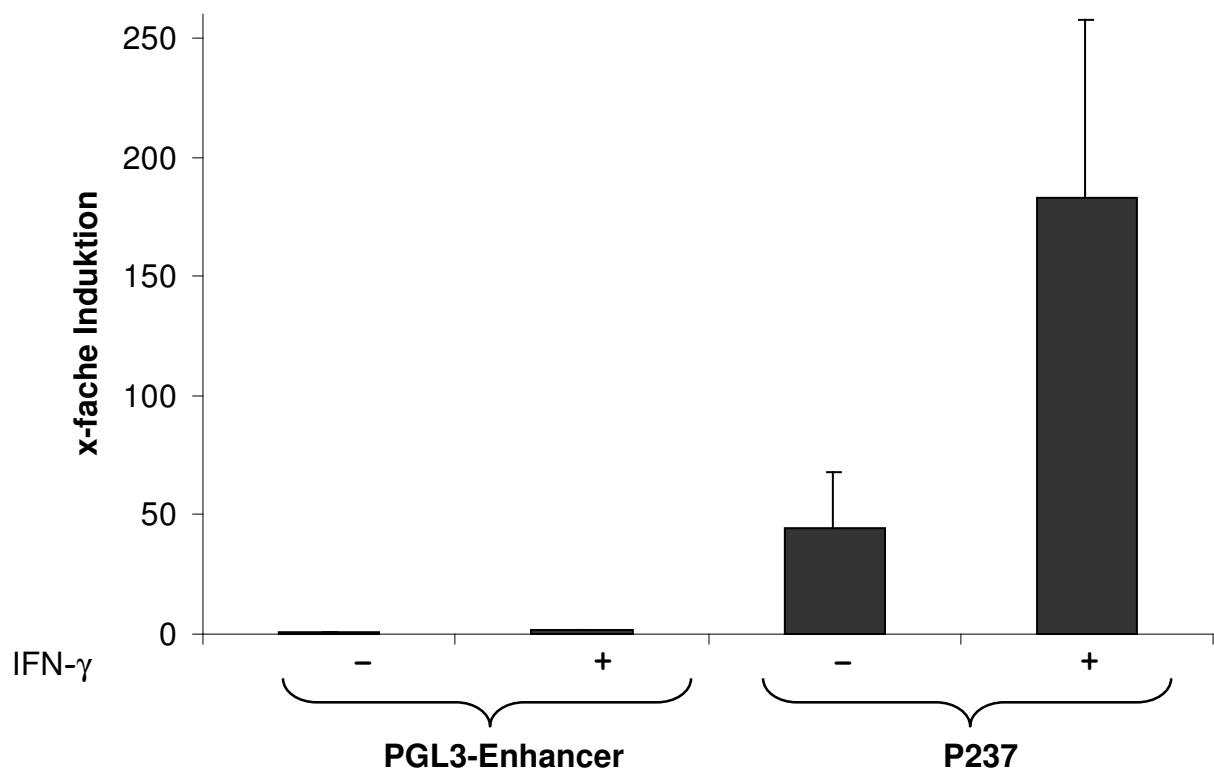


Mit Hilfe eines *XhoI/HindIII*-Verdau des PGL2-TAP2prom (A) wurde der TAP2-Promotor isoliert und dann über die *XhoI/HindIII*-Schnittstellen in den PGL3-Enhancer (B) eingebracht (P237).

4.4.2. Analyse der Promotoraktivität von TAP2

Die basale Aktivität des TAP2-Promotors wurde zunächst in den HER-2/neu⁻-Zellen untersucht. Es wurde erwartet, dass die basale TAP2-Promotoraktivität im Vergleich zu der des PGL3-Enhancer höher und durch IFN- γ induzierbar ist (Abb. 4.15).

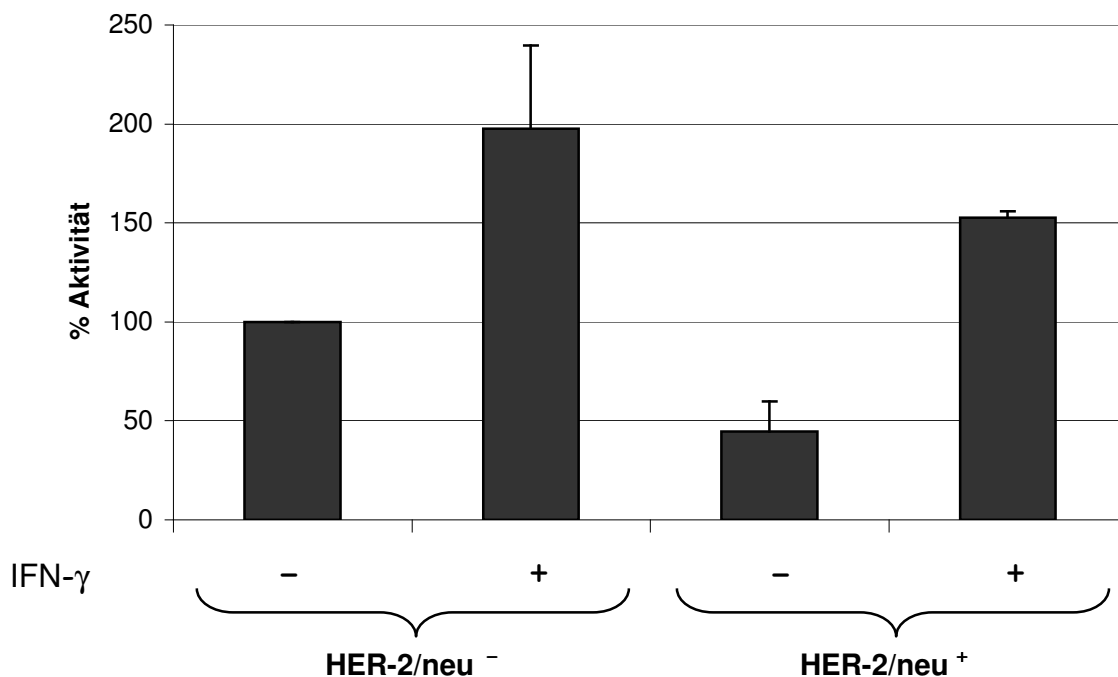
Abb. 4.15: Aktivität des TAP2-Promotors



Aktivität des TAP2-Promotors (P237) im Vergleich zur Aktivität des Enhancers (PGL3-Enhancer). Jeweils 5×10^5 HER-2/neu⁻-Zellen wurden mit je 1 μg des Luziferase-Plasmids und 0,03 μg des β -Galaktosidase-Plasmids mittels Lipofektion transient transfiziert und mit oder ohne 24 h Stimulation mit 100 U/ml IFN- γ nach 48 h Stunden die Promotoraktivität wie beschrieben ermittelt (s. 3.8.4.). Pro Versuch wurde jede Transfektion in Triplikaten angesetzt und die Mittelwerte der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Aus den Ergebnissen von fünf unabhängigen Experimenten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet, die hier als x-fache Aktivität des PGL3-Enhancer (=1) dargestellt sind.

Die basale Aktivität des TAP2-Promotors ist um das 50fache höher als die Aktivität des Enhancers. Eine IFN- γ -Induktion führt zu einer Steigerung auf eine 180fache Aktivität. Diese Daten belegen, dass die 1789 Bp lange 5'-UTR-Region des TAP2-Gens Promotoraktivität besitzt.

Im Weiteren wurde die TAP2-Promotoraktivität zwischen den HER-2/neu⁻- und HER-2/neu⁺-Zellen verglichen (Abb. 4.16).

Abb. 4.16: Aktivität des TAP2-Promotors in HER-2/neu⁻- und HER-2/neu⁺-Zellen

Jeweils 5×10^5 HER-2/neu⁻- und HER-2/neu⁺-Zellen wurden mit je 1 μg des Luziferase-Plasmids und 0,03 μg des β -Galaktosidase-Plasmids mittels Lipofektion transient transfiziert und mit oder ohne 24 h Stimulation mit 100 U/ml IFN- γ nach 48 h Stunden die Promotoraktivität wie beschrieben ermittelt (s. 3.8.4.). Pro Versuch wurde jede Transfektion in Triplikaten angesetzt und aus den Aktivitäten die mittlere relative Luziferaseaktivität bestimmt. Aus den relativen Luziferaseaktivitäten von fünf unabhängigen Versuchen wurde jeweils die prozentuale Aktivität errechnet, wobei die Aktivität des Promotors in den HER-2/neu⁻-Zellen auf 100 % gesetzt wurde. Aus diesen Prozenten wurden die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt.

Abb. 4.16 zeigt, dass die HER-2/neu-Expression die TAP2-Promotoraktivität um ungefähr 50 % verringert und diese durch eine IFN- γ -Behandlung auf 150 % rekonstituiert werden kann.

Es wird damit postuliert, dass die geringere Menge an TAP2-mRNS und -Protein in den HER-2/neu⁺-Zellen u.a. auf einer verminderten Promotoraktivität beruht.

4.4.3. Klonierung des murinen Tapasin-Promotors

Die Klonierung des Tapasin-Promotors erfolgte mit spezifischen Primern, die in der 5'-UTR des Tapasins binden. Mit Hilfe dieses Tapasin-UTR-spezifischen Primerpaares wurde eine 624 Bp lange Region isoliert und kloniert, in der potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren vermehrt zu finden waren (Abb. 4.17).

Abb. 4.17: Putative Bindungsmotive für verschiedene Transkriptionsfaktoren im Tapasin-Promotor

GATA	NF- κ B	P300	GATA	E2F	SP1	P300	E2F	NF- κ B	IRF1/2
85,5	87,7	85,1	94,0	86,2	86,3	89,1	86,2	100,0	87,4

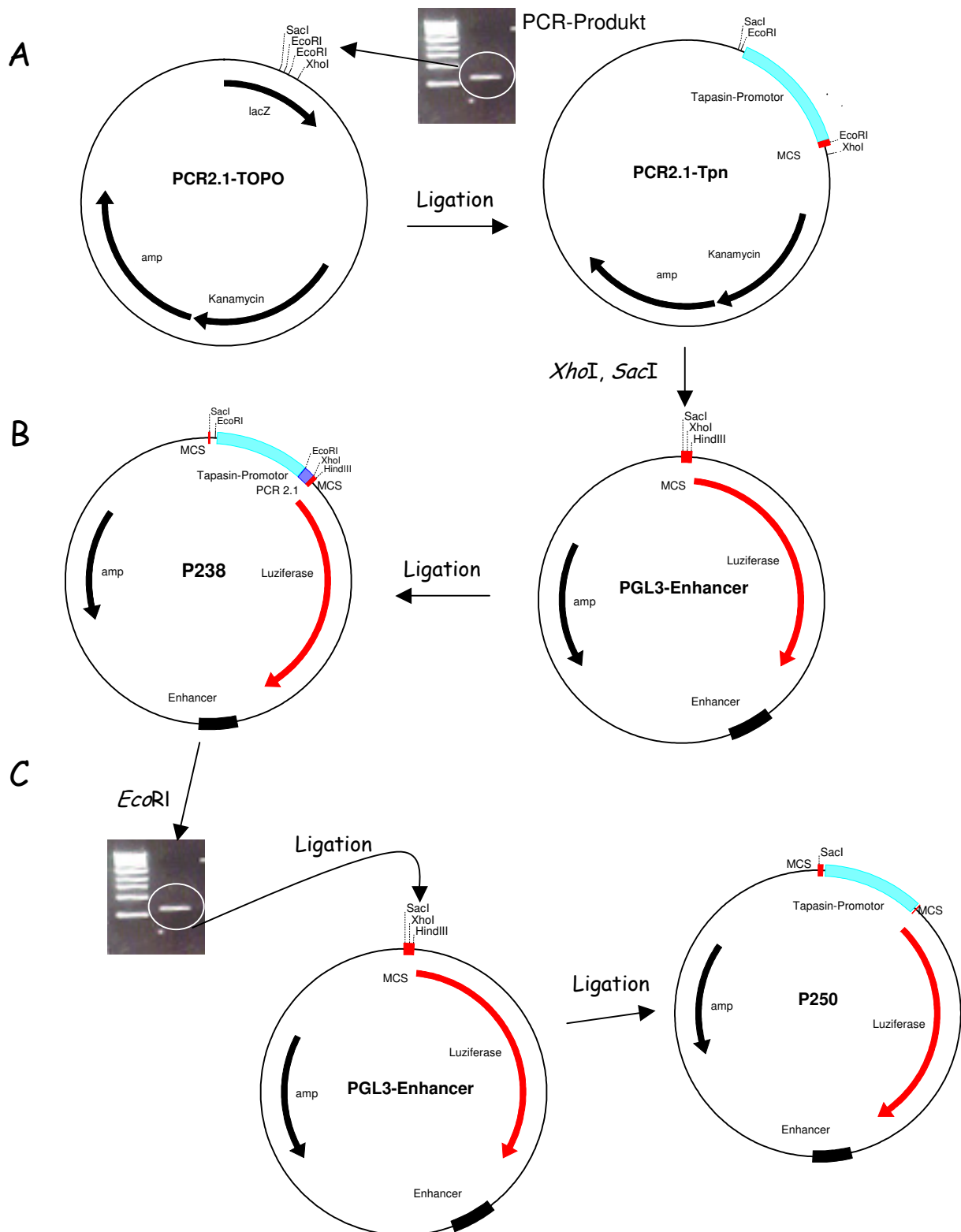
Dargestellt sind die wichtigsten Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen und die von TFSEARCH angegebene Wahrscheinlichkeit einer Bindung in Prozent.

Die Analyse ergab, dass mit NF- κ B und SP1 Motive nachgewiesen werden konnten, die durch HER-2/neu aktiviert werden können. Die Induktion des Promotors durch IFN- γ könnte von einem IRF1/2-Motiv abhängig sein, das am 3'-Ende des Promotors liegt. Außerdem finden sich je zwei Bindungsmotive für P300, GATA und E2F. Analog zu dem TAP2-Promotor weist auch der Tapasin-Promotor keine Motive für NF-Y und CIITA auf.

Zur Klonierung des Promotors wurde die PCR mit 0,5 μ g genomischer DNS von NIH3T3-Zellen und 50 pmol/Ansatz eines jeden Tapasin-UTR-spezifischen Primers bei einer Annealingtemperatur von 57 °C durchgeführt. Anschließend wurde der Ansatz direkt auf ein Agarose-Gel aufgetragen, die 624 Bp große Bande ausgeschnitten und aufgereinigt. Das Produkt wurde über die von der *Taq*-Polymerase gebildeten TA-Überhänge in den Vektor PCR2.1TOPO (Invitrogen, Eggenstein) an Position 294 einkloniert. Das entstandene Plasmid PCR2.1-Tpn wurde in Bakterien nach Herstellerangaben vermehrt und aufgereinigt. Um den Promotor in ein Luziferase-Konstrukt einzubringen, wurde das PCR2.1-Tpn-Plasmid mit *SacI* und *XhoI* verdaut, die Fragmente in einem Agarose-Gel aufgetrennt und der Promotor eluiert. Gleichzeitig wurde der PGL3-Enhancer mit *XhoI* und *HindIII* linearisiert und mit dem eluierten Promotor über eine blunt-end-Ligation ligiert (Abb. 4.18). Das Produkt (P238) wurde anschließend in Bakterien vermehrt und nach Aufreinigung mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft.

Da der Tapasin-Promotor (P238) nur geringe Aktivität im Luziferaseassay aufwies, wurde ein Teil der zwischen Promotor-3'-Ende und Luziferase gelegenen „multiple cloning site“ (MCS) entfernt. Zu diesem Zweck wurde das Plasmid noch einmal mit *EcoRI* verdaut, der Promotor aus dem anschließenden Agarose-Gel eluiert und über die *XhoI/HindIII*-Schnittstellen in den PGL3-Enhancer eingebracht (P250). Die Sequenzierung des neuen Reporterplasmids ergab, dass der Abstand zwischen Promotorende und ATG von 100 Bp auf 44 Bp reduziert werden konnte (Abb. 4.18).

Abb. 4.18: Herstellung eines Tapasin-Promotor-Plasmids

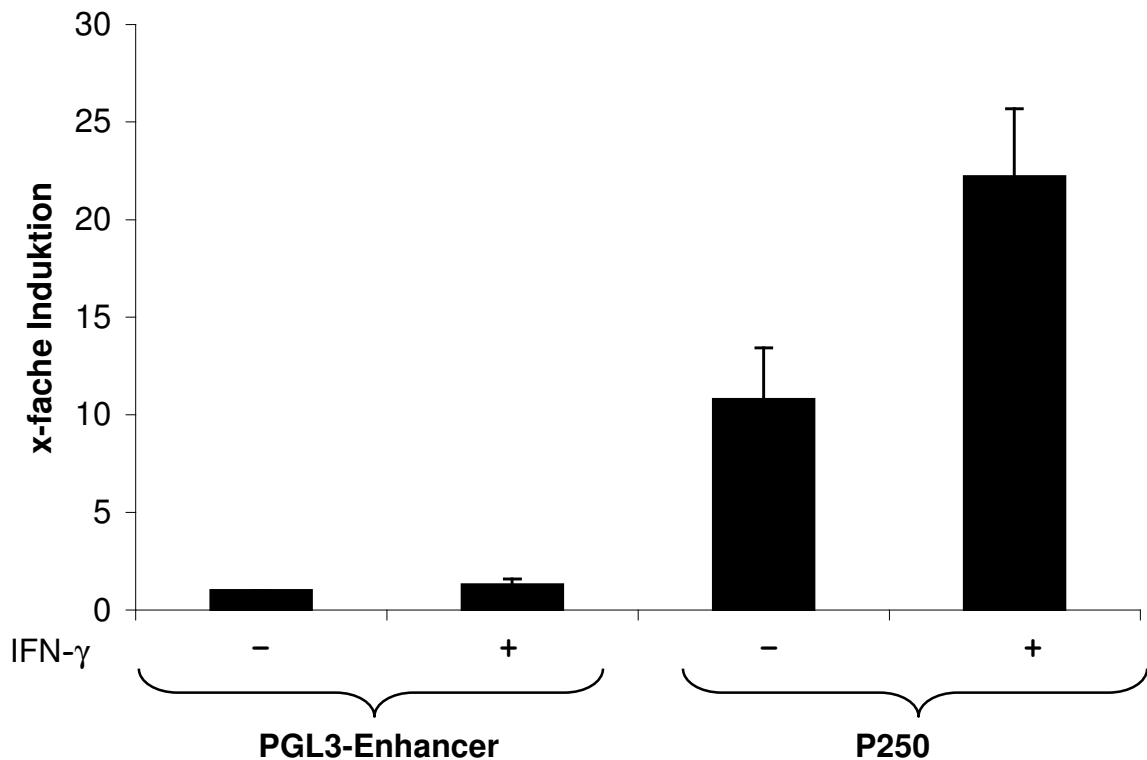


Das PCR-Produkt wurde über die TA-Überhänge in den PCR2.1-TOPO-Vektor einkloniert (A). Dann wurde der Promotor mit *XhoI* und *SacI* herausgeschnitten und in den PGL3-Enhancer eingebracht (P238, B). Um die Promotoraktivität zu erhöhen, wurde durch einen *EcoRI*-Verdau der Promotor aus dem Plasmid geschnitten und in die *XhoI/HindIII*-Schnittstellen in den PGL3-Enhancer einkloniert (P250, C).

4.4.4. Analyse der Promotoraktivität von Tapasin

Der klonierte Tapasin-Promotor wurde auf die basale und IFN- γ -induzierbare Aktivität in den HER-2/neu⁻-Zellen mittels Luziferaseversuch überprüft.

Abb. 4.19: Aktivität des Tapasin-Promotors (P250) im Vergleich zur Aktivität des Leervektors



Jeweils 5×10^5 HER-2/neu⁻-Zellen wurden mit je 1 μg des Luziferase-Plasmids und 0,03 μg des β -Galaktosidase-Plasmids mittels Lipofektion transient transfiziert und mit oder ohne 24 h Stimulation mit 100 U/ml IFN- γ nach 48 h Stunden die Promotoraktivität wie beschrieben ermittelt (s. 3.8.4.). Pro Versuch wurde jede Transfektion in Triplikaten angesetzt und die Mittelwerte der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Aus den Ergebnissen von vier unabhängigen Experimenten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet, die hier als x-fache Aktivität des PGL3-Enhancer (=1) dargestellt sind.

Wie Abb. 4.19 zeigt, besitzt das klonierte Konstrukt eine Promotoraktivität, die im Vergleich zum Leervektor um das 10fache erhöht ist und durch IFN- γ auf eine mehr als 20fache Aktivität verstärkt werden kann. Der Tapasin-Promotor hat also im Vergleich zu dem TAP2-Promotor eine geringere Aktivität, die jedoch signifikant und über IFN- γ stimulierbar ist.

4.4.5. Bestimmung des Transkriptionsstartes im Tapasin-Promotor

Da die Transkriptionsstartpunkte im Tapasin-Promotor im Unterschied zum TAP2-Promotor noch nicht bekannt waren, sie aber Einfluss auf die Promotoraktivität nehmen, sollte der Start der Transkription mittels 5'RACE bestimmt werden. Hierzu wurde der „Gene Racer Kit“ (Invitrogen, Eggenstein) eingesetzt. Als Template

wurden 2 µg RNS von NIH3T3-Zellen eingesetzt, an deren 5'-Enden zunächst die CAP-Struktur der mRNS durch ein bekanntes RNS-Oligo ersetzt wurde. Nach reverser Transkription diente die RNS als Matrize für eine PCR mit einem spezifischen 5'-Primer, der mit diesem Oligo hybridisieren kann, und zwei unterschiedlichen Primern, die in der mRNS von Tapasin binden. Die PCR mit diesen Primern wurde im TRIO-Heizblock (Biometra, Göttingen) bei einer Annealingtemperatur von 67 °C bzw. 69 °C durchgeführt. Die resultierenden Produkte wurden in den TOPO-Vektor inkloniert, in Bakterien transformiert und je 10 Kolonien vermehrt. Aus diesen wurden die TOPO-Vektoren isoliert und sequenziert. Die Sequenzierung liefert so den genauen Start der Transkription am 3'-Ende des revers transkribierten RNS-Oligos. Das Ergebnis ist in Abb. 4.20 dargestellt.

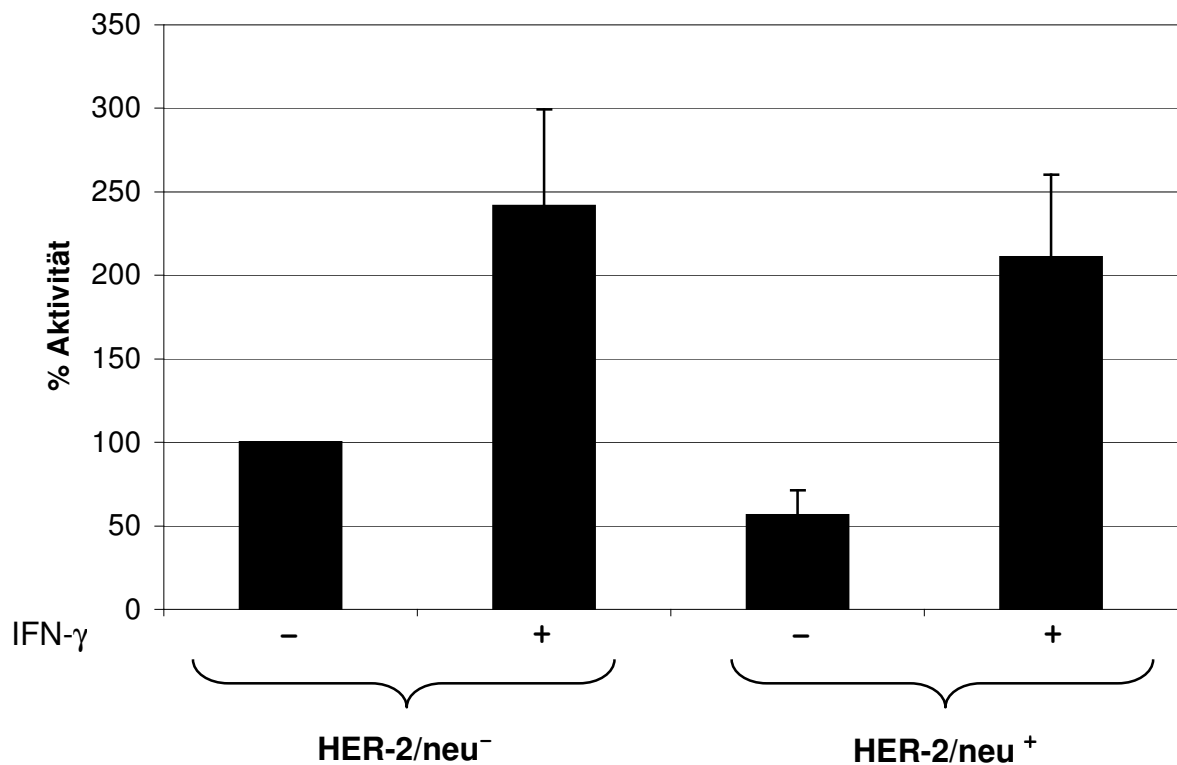
Abb. 4.20: Transkriptionsstartpunkte im Tapasin-Promotor



Die Abbildung zeigt einen 75 Bp langen Bereich aus der 5'-UTR des Tapasins vor dem ATG in der mRNS, die IRF1/2-Bindungsstelle und das gefundene INR-Element. Die Startpunkte der Transkription sind mit Pfeilen markiert.

Das Ergebnis in Abb. 4.20 zeigt, dass die Transkription von Tapasin an verschiedenen Stellen beginnt. Dieses Phänomen ist typisch für Promotoren ohne eine TATA-Box. Damit ähnelt der Tapasin-Promotor den beiden TAP-Promotoren, die ebenfalls keine TATA-Boxen besitzen und deren Transkription an unterschiedlichen Stellen beginnt (Wright et al., 1995; Arons et al., 2001). Im Tapasin-Promotor wurden insgesamt sieben Transkriptionsstartpunkte ermittelt, von denen vier in der Region eines INR-Elements und des IRF-Motivs liegen. Der Startpunkt an Position -58 wurde in den 10 Ansätzen dreimal gefunden.

Im Weiteren wurde die basale und IFN- γ -induzierte Tapasin-Promotoraktivität zwischen den HER-2/neu⁻- und HER-2/neu⁺-Zellen verglichen (Abb. 4.21).

Abb. 4.21: Aktivität des Tapasin-Promotors in HER-2/neu⁻- und HER-2/neu⁺-Zellen

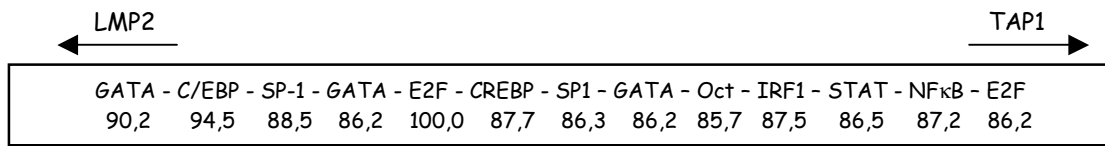
Jeweils 5×10^5 HER-2/neu⁻- und HER-2/neu⁺-Zellen wurden mit je 1 μ g des Luziferase-Plasmids und 0,03 μ g des β -Galaktosidase-Plasmids mittels Lipofektion transient transfiziert und mit oder ohne 24 h Stimulation mit 100 U/ml IFN- γ nach 48 h Stunden die Promotoraktivität wie beschrieben ermittelt (s. 3.8.4.). Pro Versuch wurde jede Transfektion in Triplikaten angesetzt und aus den Aktivitäten die mittlere relative Luziferaseaktivität bestimmt. Aus den relativen Luziferaseaktivitäten von vier unabhängigen Versuchen wurde jeweils die prozentuale Aktivität errechnet, wobei die Aktivität des Promotors in den HER-2/neu⁻-Zellen auf 100 % gesetzt wurde. Aus diesen Prozenten wurden die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt.

Das Ergebnis zeigt, dass die Aktivität des Tapasin-Promotors in den HER-2/neu⁺-Zellen vermindert ist und nur 60 % der Aktivität in den HER-2/neu⁻-Zellen erreicht. Analog zu TAP2 zeigt sich auch hier die erwartete Rekonstitution durch IFN- γ . Damit könnte analog zu dem TAP2-Promotor auch bei Tapasin die verminderte Menge an RNS und Protein u.a. durch eine Hemmung der Promotoraktivität in den HER-2/neu⁺-Zellen erklärbar sein.

4.4.6. Klonierung des murinen TAP1/LMP2-Promotors

Der murine TAP1/LMP2 Promotor wurde von Ursula Wollscheid in der AG Seliger kloniert. Aufgrund der Bidirektionalität können Transkriptionsfaktoren binden, die in LMP2- oder TAP1-Richtung den Promotor aktivieren. Eine Analyse der Sequenz mit dem Computerprogramm ergab die folgenden Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren (Abb. 4.22):

Abb. 4.22: Putative Bindungsmotive für verschiedene Transkriptionsfaktoren im TAP1/LMP2-Promotor



Dargestellt sind die wichtigsten Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen und die von TFSEARCH angegebene Wahrscheinlichkeit einer Bindung in Prozent.

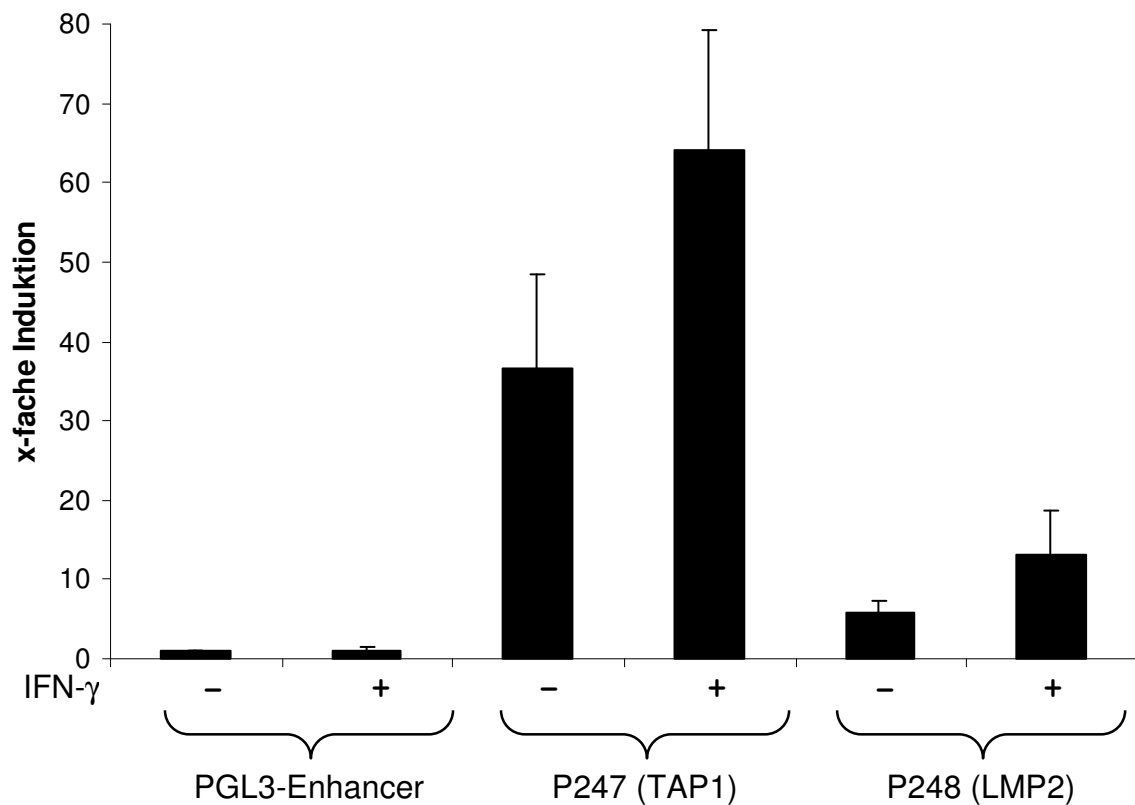
Analog zu dem TAP2- und Tapasin-Promotor finden sich im bidirektionalen TAP1/LMP2-Promotor Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren, die durch HER-2/neu aktiviert werden können. Zu diesen zählen je zwei Motive für SP1 und E2F, sowie ein NF-κB- und ein STAT-Motiv. Außerdem finden sich Erkennungssequenzen für GATA, C/EBP, CREBP und Oct1. Die IFN-γ-vermittelte Induktion der Transkription wird durch ein IRF1-Motiv vermittelt (White et al., 1996). Analog zu dem TAP2- und Tapasin-Promotor fehlen dem TAP1/LMP2-Promotor Erkennungssequenzen für CIITA und NF-Y.

Das über eine PCR amplifizierte Produkt wurde von Ursula Wollscheid in beide Richtungen in den PGL3-Enhancer-Vektor einkloniert, so dass der Promotor in TAP1- (P247) und LMP2-Orientierung (P248) untersucht werden konnte.

4.4.7. Analyse der Promotoraktivität von TAP1/LMP2

Der bidirektionale LMP2/TAP1-Promotor wurde auf seine basale und IFN-γ-induzierbare Aktivität in den HER-2/neu⁻-Zellen mittels Luziferaseassay überprüft (Abb. 4.23).

Abb. 4.23: Aktivität des TAP1/LMP2-Promotors im Vergleich zur Aktivität des Leervektors

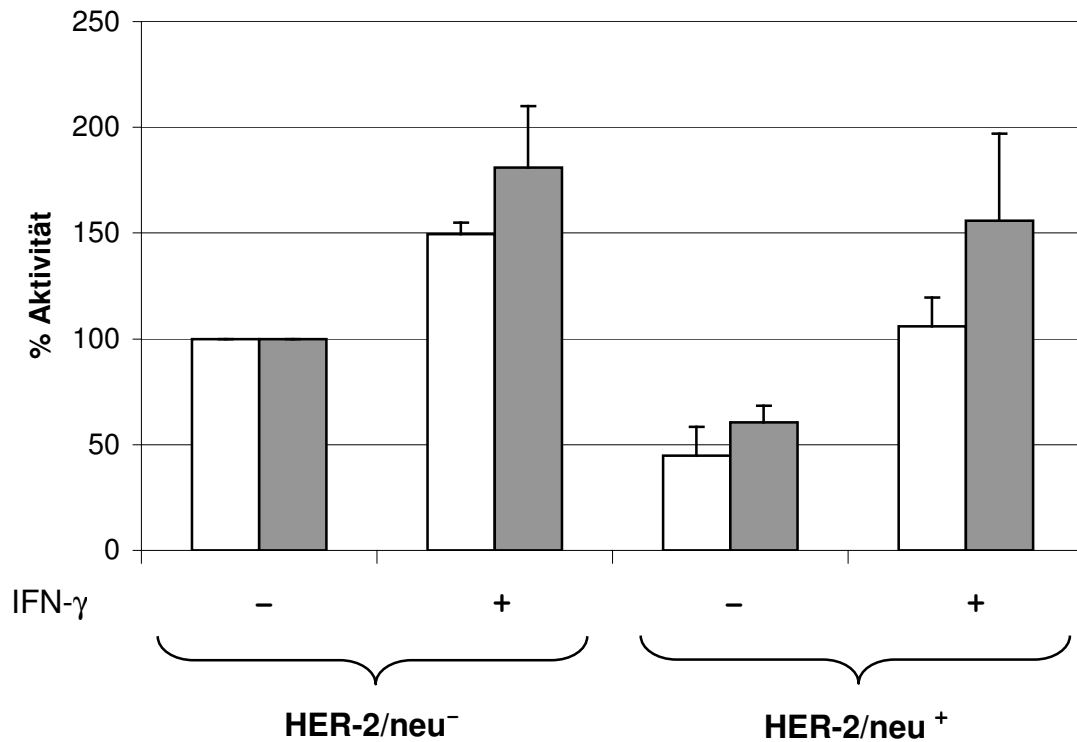


Jeweils 5×10^5 HER-2/neu⁻-Zellen wurden mit je 1 µg des Luziferase-Plasmids und 0,03 µg des β-Galaktosidase-Plasmids mittels Lipofektion transient transfiziert und mit oder ohne 24 h IFN-γ-Stimulation nach 48 h Stunden die Promotoraktivität wie beschrieben ermittelt (s. 3.8.4.). Pro Versuch wurde jede Transfektion in Triplikaten angesetzt und die Mittelwerte der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Aus den Ergebnissen von drei unabhängigen Experimenten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet, die hier als x-fache Aktivität des PGL3-Enhancer (=1) dargestellt sind.

Beide klonierte Promotoren weisen eine signifikante Aktivität auf, wobei der TAP1-Promotor eine 35fache, der LMP2-Promotor eine 10fache Aktivität im Vergleich zu der des PGL3-Enhancer-Plasmids besitzt. Beide Promotoren sind durch IFN-γ induzierbar.

Im Weiteren wurde die TAP1/LMP2-Promotoraktivität zwischen den HER-2/neu⁻- und HER-2/neu⁺-Zellen verglichen (Abb. 4.24).

Abb. 4.24: Aktivität des TAP1/LMP2-Promotors in HER-2/neu⁻- und HER-2/neu⁺-Zellen



Jeweils 5×10^5 HER-2/neu⁻ und HER-2/neu⁺ Zellen wurden mit je $1 \mu\text{g}$ der Luziferase-Plasmide P247 (TAP1-Promotor, weiße Balken) und P248 (LMP2-Promotor, graue Balken) und $0,03 \mu\text{g}$ des β -Galaktosidase-Plasmids mittels Lipofektion transient transfiziert und mit oder ohne 24 h Stimulation mit 100 U/ml IFN- γ nach 48 h Stunden die Promotoraktivität wie beschrieben ermittelt (s. 3.8.4.). Pro Versuch wurde jede Transfektion in Triplikaten angesetzt und aus den Aktivitäten die mittlere relative Luziferaseaktivität bestimmt. Aus den relativen Luziferaseaktivitäten von drei unabhängigen Versuchen wurde jeweils die prozentuale Aktivität errechnet, wobei die Aktivität des Promotors in den HER-2/neu⁻-Zellen auf 100 % gesetzt wurde. Aus diesen Prozenten wurden die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt.

Wie in Abb. 4.24 dargestellt, ist die Aktivität des Promotors in beide Richtungen durch HER-2/neu vermindert. Dabei zeigt der TAP1-Promotor eine 50 %ige, der LMP2-Promotor eine 60 %ige Herabsenkung der Aktivität, die in beiden Fällen durch IFN- γ -Behandlung wieder rekonstituiert werden kann.

Zusammenfassend zeigen die vier klonierten Promotoren von TAP1, TAP2, LMP2 und Tapasin eine geringere Aktivität in den HER-2/neu⁺-Zellen im Vergleich zu den HER-2/neu⁻-Zellen. Alle Promotoren sind in beiden Zelllinien durch IFN- γ induzierbar. Es sollte nun der Frage nachgegangen werden, welche Regionen der Promotoren für diesen Effekt hauptsächlich verantwortlich sind, um Hinweise auf den oder die möglichen Transkriptionsfaktoren zu finden, die durch HER-2/neu in ihrer Aktivität beeinflusst werden.

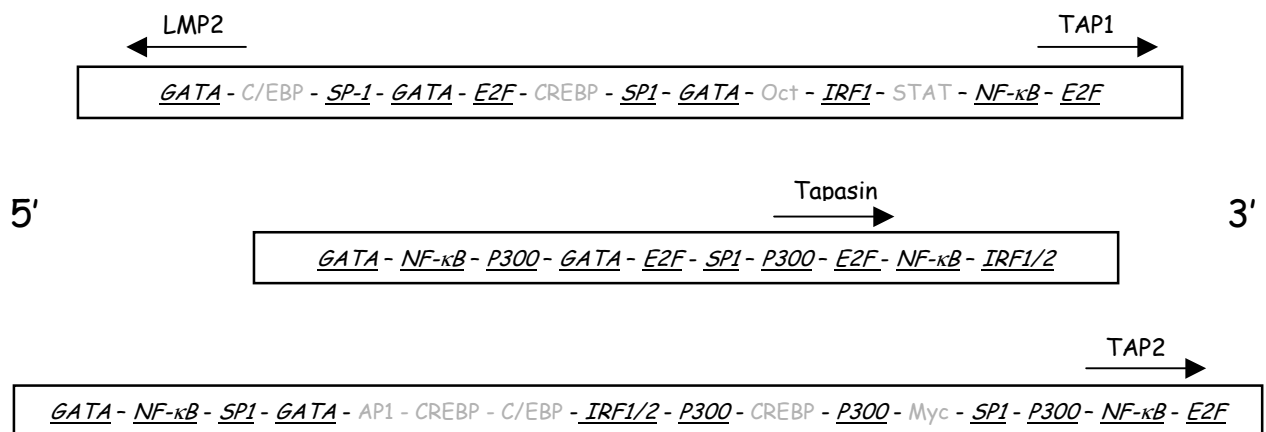
4.5. Untersuchung der Zielregionen von HER-2/neu

Aus den oben angeführten Ergebnissen resultiert die Vermutung, dass HER-2/neu die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die Promotoren von TAP1, TAP2, LMP2 und Tapasin moduliert. Aufgrund der relativ großen Anzahl an Bindungsmotiven für Transkriptionsfaktoren in den klonierten Promotoren wurden die Promotoren zunächst über Restriktionsanalysen in kleinere Bereiche unterteilt und hinsichtlich ihrer Aktivität in HER-2/neu⁻- und HER-2/neu⁺-Zellen untersucht.

4.5.1. Vergleich der Bindungsmotive in den klonierten Promotoren

Da HER-2/neu die Aktivität der vier klonierten Promotoren reduziert, ist ein gemeinsames Muster von Bindungsmotiven für Transkriptionsfaktoren in diesen Promotoren zu vermuten.

Abb. 4. 25: Gemeinsame Bindungsmotive in den Promotoren für TAP und Tapasin



Dargestellt sind in 5'-3' Richtung die Bindungsmotive in den klonierten TAP1/LMP2-, TAP2- und Tapasin-Promotoren, die in beiden verfügbaren Computerprogrammen TFSEARCH und MatInspector mit einer Bindungs-Wahrscheinlichkeit von >85 % angegeben wurden. Gemeinsame Bindungsstellen sind schwarz, unterstrichen und kursiv, unterschiedliche Bindungsstellen grau dargestellt.

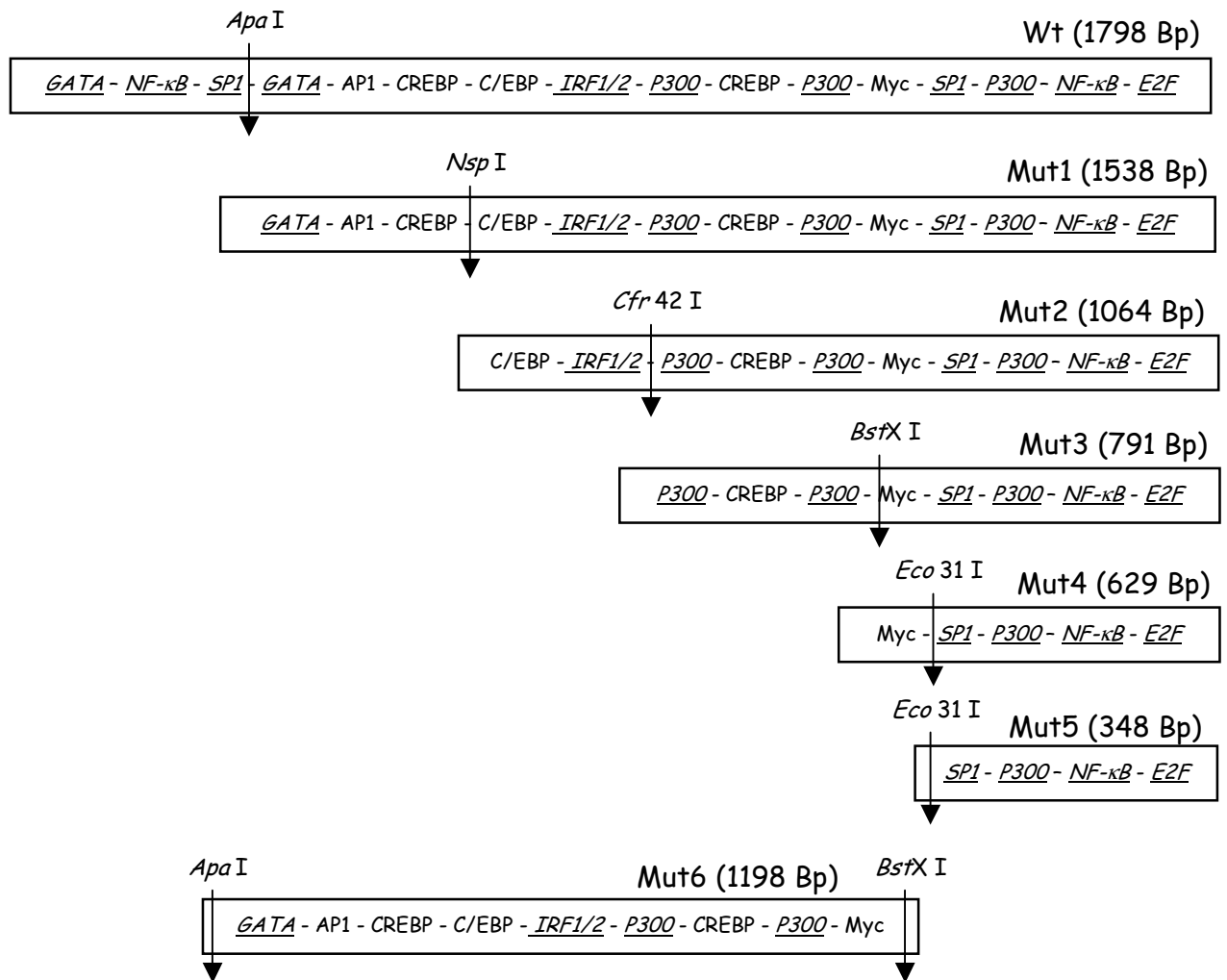
In der Tat zeigt der Vergleich der Bindungsmotive in den verschiedenen Promotoren mehr Gemeinsamkeiten, als Unterschiede (Abb. 4.25). In allen Promotoren treten Motive für GATA, SP1, NF-κB, E2F und IRF auf. Diese sind in jedem Promotor mit Ausnahme von IRF und NF-κB zwei- oder mehrmals vorhanden. Dem Tapasin-Promotor fehlt eine CREBP-Bindungsstelle, dem TAP2-Promotor ein STAT- und dem TAP1/LMP2-Promotor ein P300-Motiv. Eine mögliche Interaktion von HER-2/neu könnte also über GATA, SP1, NF-κB oder IRF alleine, oder in Kombinationen erfolgen. Alternativ könnten die HER-2/neu-vermittelten Regulationen der Promotoren über unterschiedliche Transkriptionsfaktoren erfolgen. Falls keiner dieser Faktoren von HER-2/neu beeinflusst wird, muss die Existenz eines Transkriptionsfaktors, dessen Bindungsmotiv durch die Computeranalyse nicht detektiert wurde, angenommen werden.

Auf der Basis der Computer-gestützten Sequenzanalyse wurden Bindungsmotive eliminiert, durch die HER-2/neu die Aktivität der Promotoren modulieren könnte. Hierzu wurden mittels Restriktionsendonukleasen Deletionsmutanten hergestellt, sowie über die Einführung von Punktmutationen bestimmte Motive für Transkriptionsfaktoren inaktiviert.

4.5.2. Herstellung und Analyse von Deletionsmutanten des TAP2-Promotors

Für die Herstellung der Deletionsmutanten des TAP2-Promotors wurde der Promotor mit *Xho*I und *Hind*III aus dem Plasmid P237 herausgeschnitten und die entsprechende Bande aus dem Agarose-Gel aufgereinigt. Anschließend wurde der Promotor mit spezifischen Restriktionsendonukleasen verdaut, Überhänge mit dem Klenow-Enzym aufgefüllt und die entsprechenden Banden aus dem Agarose-Gel eluiert. Die Promotorfragmente wurden dann über „blunt-end-Ligation“ in die *Hind*III-Schnittstelle des PGL3-Enhancer-Vektors inkloniert und durch Sequenzierung überprüft. Abb. 4.26 zeigt die angefertigten Promotormutanten und die eingesetzten Restriktionsendonukleasen:

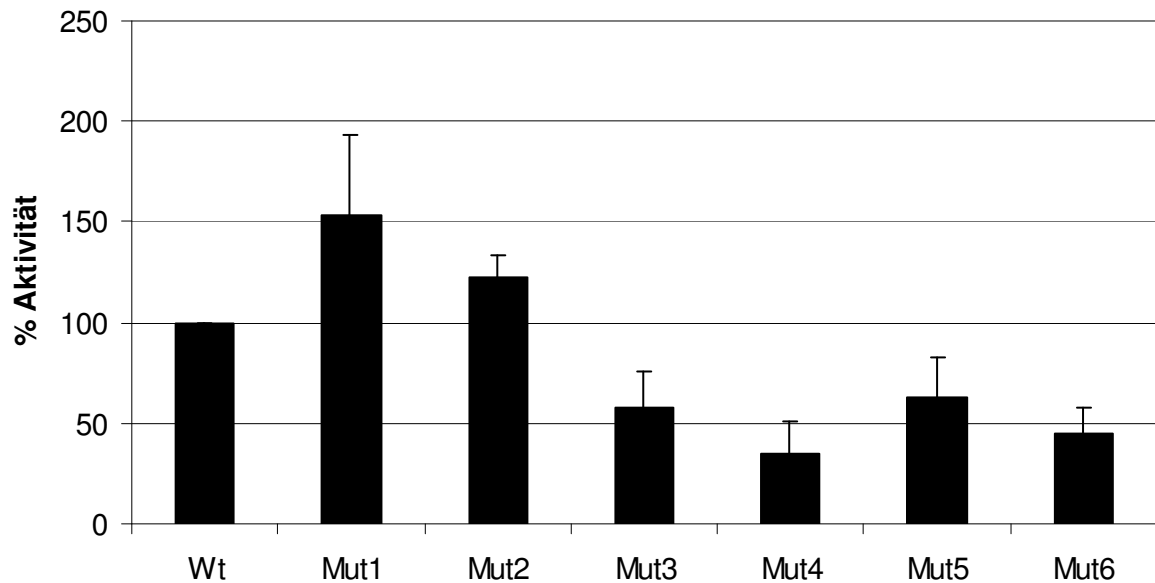
Abb. 4.26: Verschiedene über Restriktionsendonukleasen generierte TAP2-Promotormutanten



Dargestellt sind die Promotorfragmente (Mut1-6), ihre Bindungsmotive im Vergleich zum Wildtyp (Wt), ihre Größe und das jeweilige Restriktionsenzym, mit dem das Fragment aus dem Wt-Promotor ausgeschnitten wurde. Bindungsmotive, die auch im TAP1/LMP2-, oder Tapasin-Promotor detektiert wurden, sind kursiv und unterstrichen dargestellt.

Nachdem die Promotor-Deletionsmutanten konstruiert und sequenziert waren, wurde ihre basale Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Promotor in HER-2/neu⁻-Zellen getestet. Dies sollte Aufschluss über die Bedeutung der deletierten Bereiche für die Gesamtaktivität des TAP2-Promotors geben. Die Testung der Promotoraktivität erfolgte nach transients Transfektion der einzelnen Plasmide im Luziferaseassay.

Abb. 4.27: Aktivität der TAP2- Promotormutanten



Jeweils 5×10^5 HER-2/neu⁻-Zellen wurden mit je 1 μ g der spezifischen Luziferase-Plasmide P237(Wt), bzw. Mut 1-6 und 0,03 μ g des β -Galaktosidase-Plasmids mittels Lipofektion transient transfiziert und nach 48 h Stunden die Promotoraktivität wie beschrieben ermittelt (s. 3.8.4.). Pro Versuch wurde jede Transfektion in Triplikaten angesetzt und die Mittelwerte der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Aus den Ergebnissen von mindestens 10 unabhängigen Experimenten wurde jeweils die prozentuale Aktivität errechnet, wobei die Aktivität des Wt-Promotors auf 100 % gesetzt wurde. Aus diesen Prozenten wurden die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt.

Die Ergebnisse in Abb. 4.27 zeigen eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte Aktivität der Mutanten 1 und 2. Die 5'-Deletionen dieser Mutanten verursachen demnach eine Steigerung der TAP2-Promotoraktivität, was auf eine repressive Wirkung dieser Bereiche auf die Wildtyp-Promotoraktivität schließen lässt. Dagegen sind die Mutanten 3, 4 und 5 weniger aktiv als der Wildtyp. Somit hat der in diesen Mutanten deletierte mittlere Bereich des Promotors aktivierende Eigenschaften. Hier liegen die Motive für den Enhancer C/EBP und für IRF, die von Arons und Koautoren (2000) als entscheidend für die Promotoraktivität von TAP2 deklariert wurden. Die Aktivität von Mutante 6, mit einer weiteren 3'-Deletion zeigt allerdings, dass die Region um IRF nicht für die komplette Wildtyp-Promotoraktivität ausreicht. Die Ergebnisse führen zu der Hypothese, dass sich der TAP2-Promotor aus zwei aktivierenden Regionen zusammensetzt: der Bereich mit C/EBP und IRF und ein 3'-gelegener Bereich mit Bindungsstellen für SP1, P300, E2F und NF- κ B (Abb. 4.28).

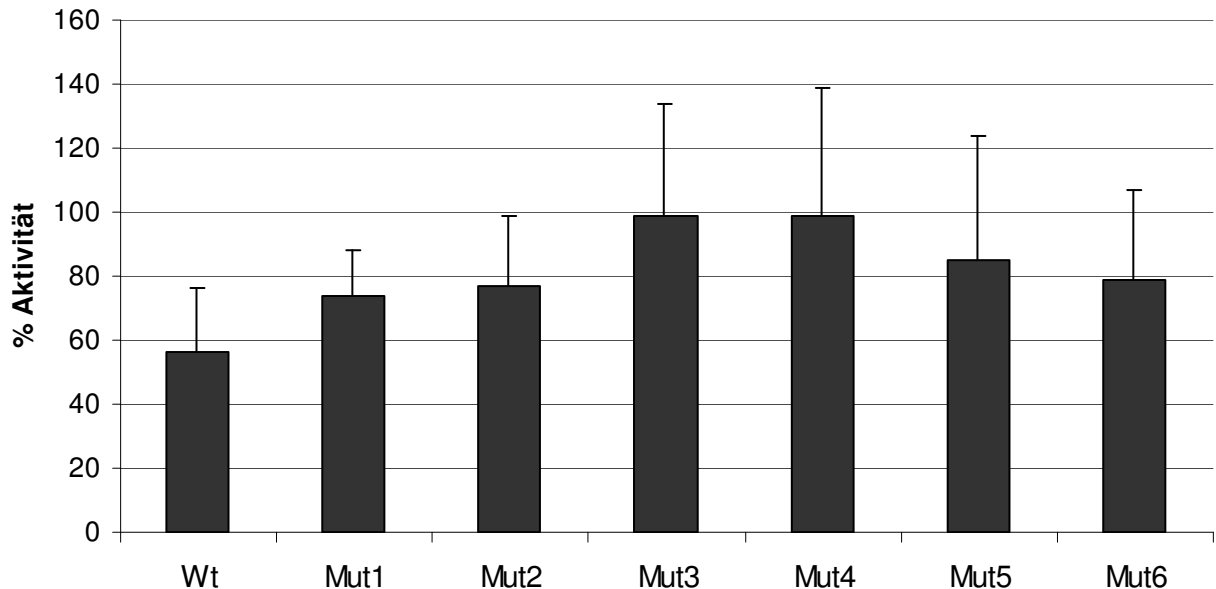
Abb. 4.28: Aktivierende Stellen im TAP2-Promotor

GATA - NF- κ B - SP1 - GATA - AP1 - CREBP - C/EBP - IRF1/2 - P300 - CREBP - P300 - Myc - SP1 - P300 - NF- κ B - E2F

Dargestellt sind die wichtigsten Bindungsmotive, von denen die aktivierenden Motive fett, kursiv und unterstrichen hervorgehoben sind.

Nach der Überprüfung des Einflusses der einzelnen Regionen des TAP2-Promotors auf die konstitutive Aktivität wurden die einzelnen Mutanten in den HER-2/neu⁺-Zellen im Vergleich zu den HER-2/neu⁻-Zellen hinsichtlich ihrer Aktivität untersucht.

Abb. 4.29: Hemmung der Aktivität der TAP2-Promotor-Deletionsmutanten in HER-2/neu⁺-Zellen



Jeweils 5×10^5 HER-2/neu⁻- und HER-2/neu⁺-Zellen wurden mit je 1 µg der spezifischen Luziferase-Plasmide P237 (Wt), bzw. Mut1-6 und 0,03 µg des β-Galaktosidase-Plasmids mittels Lipofektion transient transfiziert und nach 48 h Stunden die Promotoraktivität wie beschrieben ermittelt (s. 3.8.4.). Pro Versuch wurde jede Transfektion in Triplikaten angesetzt und die Mittelwerte der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Aus den Ergebnissen von mindestens 10 unabhängigen Experimenten wurden jeweils die prozentualen Aktivitäten errechnet, wobei die Aktivität des Wt-Promotors in den HER-2/neu⁻-Zellen auf 100 % gesetzt wurde. Aus diesen Prozenten wurden die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt.

Wie in Abb. 4.29. dargestellt, sind alle getesteten Mutanten im Vergleich zum Wt-Promotor weniger stark herunterreguliert. Allerdings zeigen sich starke Standardabweichungen, die eindeutige Aussagen erschweren. Die Mutanten mit der geringsten Aktivität (Mutanten 3 und 4) sind auch am wenigsten durch HER-2/neu herunterreguliert. Eine signifikante Hemmung des Promotors durch HER-2/neu-Expression lässt sich nur für den Wildtyp und Mutante 1 nachweisen. Daraus ergeben sich folgende Zielregionen für HER-2/neu:

Abb. 4.30: Zielregionen für HER-2/neu im TAP2-Promotor

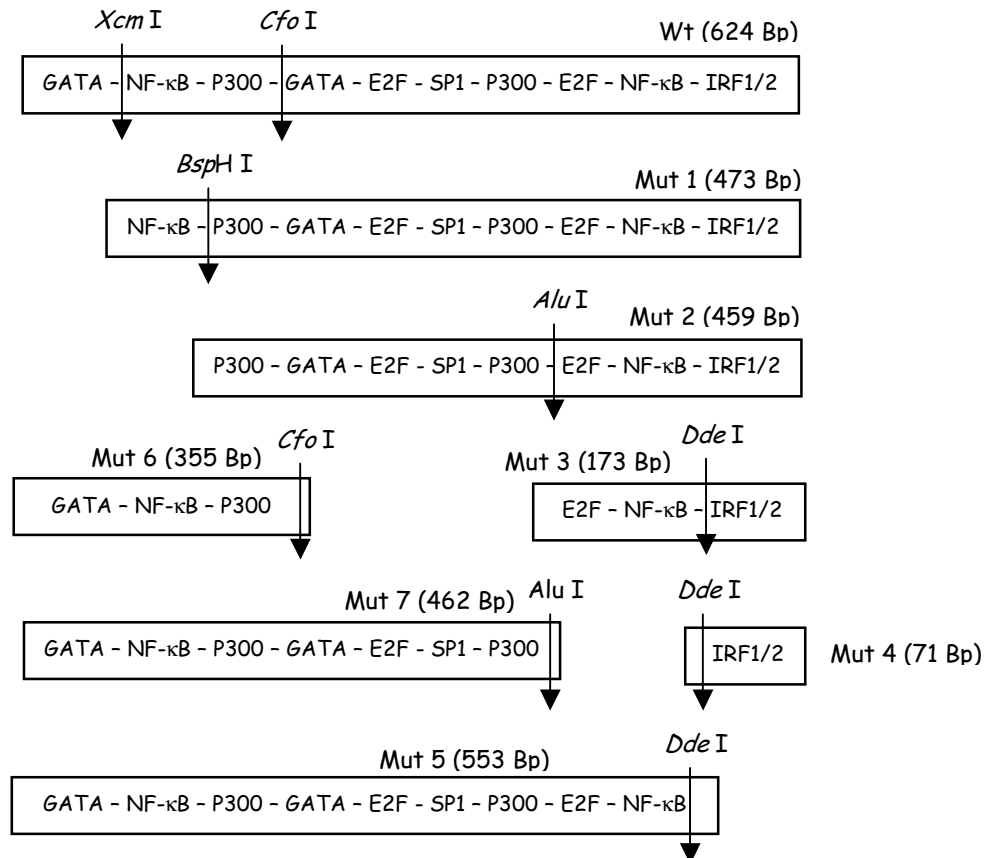
GATA - NF-κB - SP1 - GATA - AP1 - CREBP - C/EBP - IRF1/2 - P300 - CREBP - P300 - Myc - SP1 - P300 - NF-κB -

Dargestellt sind die wichtigsten Bindungsmotive im TAP2-Promotor. Die Region des Promotors, die durch HER-2/neu signifikant inhibiert wird, ist fett, kursiv und unterstrichen hervorgehoben.

4.5.3. Herstellung und Analyse von Deletionsmutanten des Tapasin-Promotors

Die Generierung der Deletionsmutanten des Tapasin-Promotors erfolgte analog zu den TAP2-Deletionsmutanten mit Restriktionsendonukleasen. Die einzelnen Mutanten sind in Abb. 4.31 dargestellt.

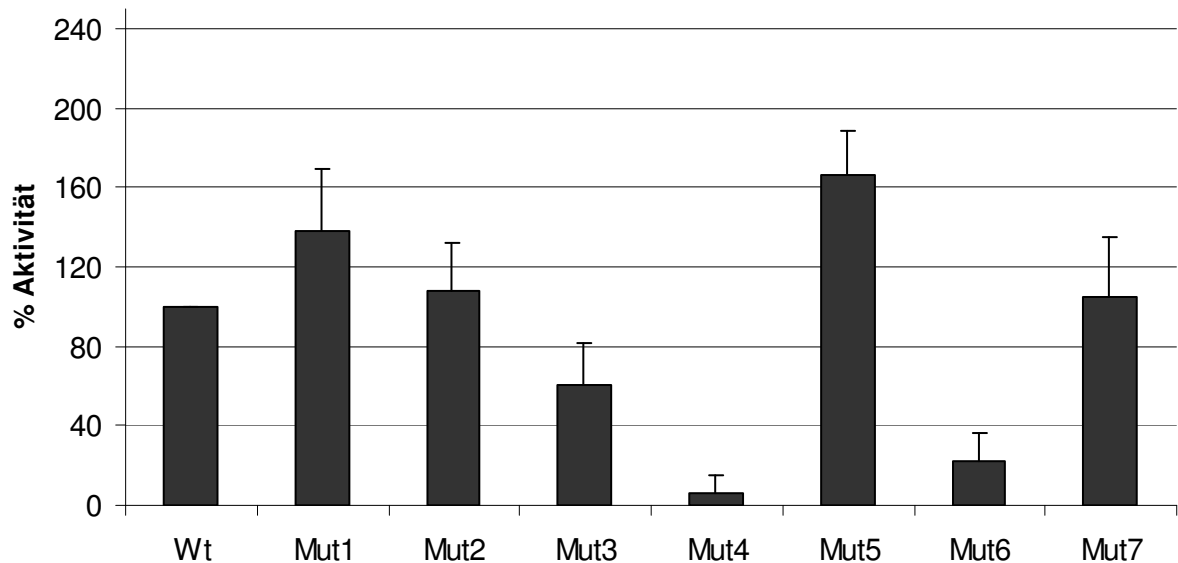
Abb. 4.31: Tapasin-Promotor-Deletionsmutanten



Dargestellt sind die Promotorfragmente (Mut 1-7) und ihre Bindungsmotive im Vergleich zum Wt, ihre Größe und das jeweilige Restriktionsenzym, mit dem die Region aus dem Wt-Promotor ausgeschnitten wurde.

Analog zu den Deletionsmutanten des TAP2-Promotors wurden die Tapasin-Promotor-Deletionsmutanten hinsichtlich ihrer basalen Aktivität im Vergleich zur Aktivität des Promotor-Wildtyps in HER-2/neu⁻-Zellen bestimmt. Die Testung der Promotoraktivität erfolgte nach transienter Transfektion der Plasmide im Luziferase-assay.

Abb. 4.32: Aktivität der Tapasin-Promotor-Deletionsmutanten



Jeweils 5×10^5 HER-2/neu⁻ Zellen wurden mit je 1 µg der spezifischen Luziferase-Plasmide P250 (Wt), bzw. Mut 1-7 und je 0,03 µg des β-Galaktosidase-Plasmids mittels Lipofektion transient transfiziert und nach 48 h Stunden die Promotoraktivität wie beschrieben ermittelt (s. 3.8.4.). Pro Versuch wurde jede Transfektion in Triplikaten angesetzt und die Mittelwerte der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Aus den Ergebnissen von acht unabhängigen Experimenten wurde jeweils die prozentuale Aktivität errechnet, wobei die Aktivität des Wt-Promotors auf 100 % gesetzt wurde. Aus diesen Prozenten wurden die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt.

Wie Abb. 4.32 zeigt, besitzen die verschiedenen Mutanten eine heterogene Promotoraktivität. Die Mutanten 1, 2, 5 und 7 haben im Vergleich zum Wt eine erhöhte Aktivität, d.h. die in diesen Mutanten deletierten Bereiche haben keinen aktivierenden Einfluss auf die Wt-Promotoraktivität. Im Gegensatz dazu ist die Promotoraktivität der Mutanten 3, 4 und 6 zum Teil stark reduziert, was auf eine wichtige Rolle der hier deletierten Bereiche für die Tapasin-Promotoraktivität schließen lässt.

Die im Vergleich zum Wt-Promotor erhöhte Aktivität der Mutante 1 lässt vermuten, dass die deletierte GATA-Bindungsstelle eine repressive Wirkung auf den Promotor hat. Die weitere Deletion eines NF-κB-Motivs in Mutante 2 resultiert in einer gegenüber Mutante 1 verminderten Aktivität. Deshalb kann eine Bedeutung der NF-κB Stelle auf die Aktivität des Wt-Promotors vermutet werden. Weitere zusätzliche 5'-Deletionen reduzieren die Promotoraktivität (mut 3, 4). Hieraus resultiert die Annahme, dass die IRF1/2-Bindungsstelle in Mutante 4 keinen aktivierenden Einfluss auf die Tapasin-Promotoraktivität hat. Dies wird durch die Mutante 5 bestätigt, in der das IRF1/2-Motiv deletiert ist, was die basale Aktivität im Vergleich zu der des Wildtyps stark steigert.

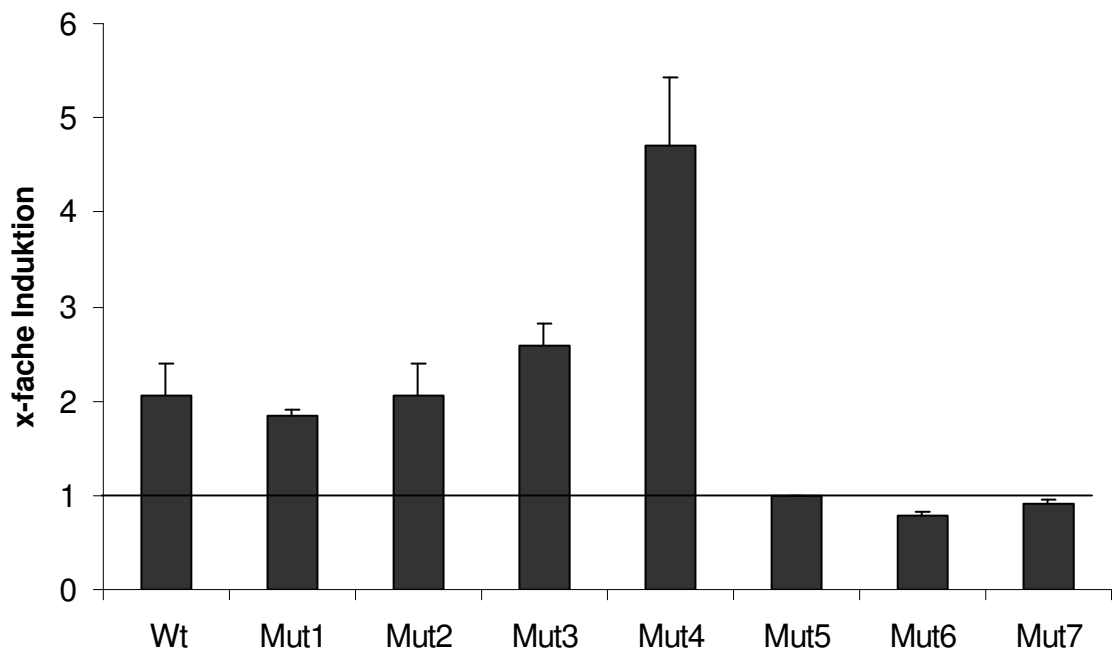
Aus diesen komplizierten Zusammenhängen ergibt sich für den Tapasin-Promotor, dass von den 10 putativen Transkriptionsfaktor-Motiven lediglich zwei Bindungsstellen auf die Aktivierung der Transkription keinen Einfluss haben (Abb. 4.33).

Abb. 4.33: Aktivierende Bereiche im Tapasin-Promotor

GATA - NF- κ B - P300 - GATA - E2F - SP1 - P300 - E2F - NF- κ B - IRF1/2

Dargestellt sind die wichtigsten Bindungsmotive, von denen die aktivierenden Motive fett, kursiv und unterstrichen hervorgehoben sind.

Da die Deletion der IRF1/2-Bindungsstelle die Tapasin-Promotoraktivität in den Experimenten erhöht, wurde im Folgenden untersucht, ob dieser Bereich für die IFN- γ -Stimulation des Promotors in Frage kommt. Aus diesem Grund wurden alle Mutanten auch hinsichtlich der IFN- γ -Stimulierbarkeit getestet.

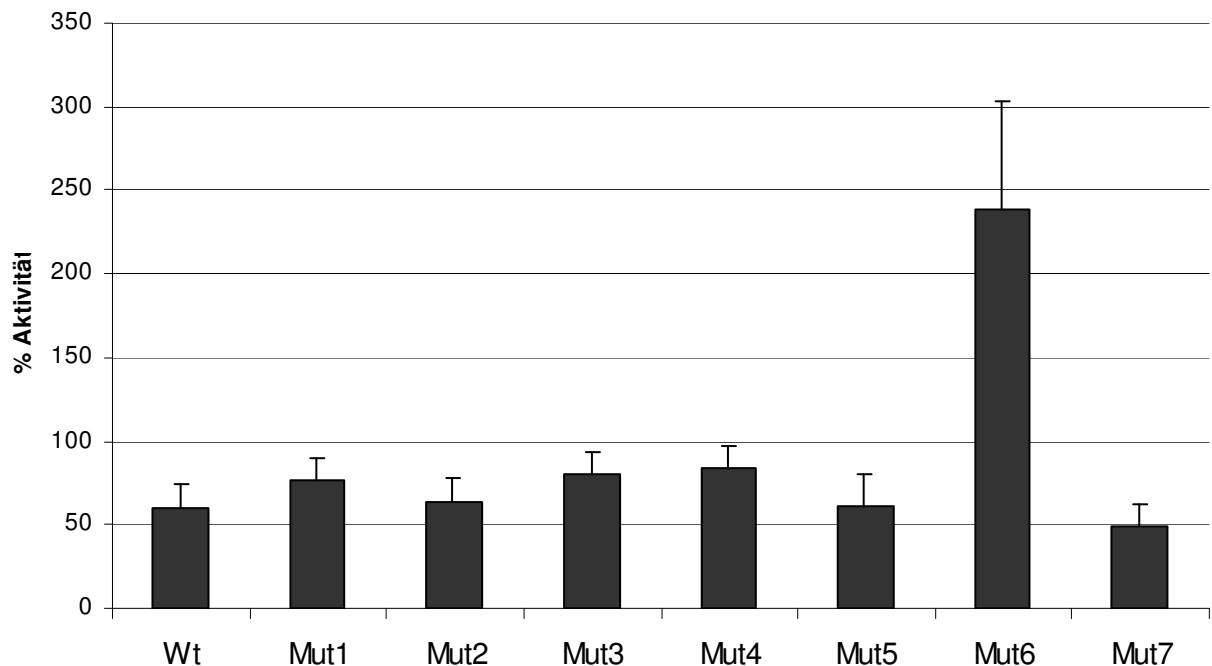
Abb. 4.34. IFN- γ -Induzierbarkeit der Tapasin-Promotor-Deletionsmutanten

Jeweils 5×10^5 HER-2/neu⁻-Zellen wurden mit je 1 μ g der spezifischen Luziferase-Plasmide P250 (Wt), bzw. Mut 1-7 und je 0,03 μ g des β -Galaktosidase-Plasmids mittels Lipofektion transient transfiziert und mit oder ohne 24 h Stimulation mit 100 U/ml IFN- γ nach 48 h Stunden die Promotoraktivität wie beschrieben ermittelt (s. 3.8.4.). Pro Versuch wurde jede Transfektion in Triplikaten angesetzt und die Mittelwerte der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Aus den relativen Luziferaseaktivitäten wurde jeweils die x-fache Induktion der konstitutiven Aktivität des Wt-Promotors errechnet und die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen aus den Ergebnissen von acht unabhängigen Versuchen ermittelt.

Die Ergebnisse in Abb. 4.34 verdeutlichen, dass das IRF-Motiv für die IFN- γ -Induzierbarkeit des Promotors essentiell ist, da alle Mutanten, denen dieser Bereich fehlt (Mutanten 5, 6 und 7), keine Induzierbarkeit mehr zeigen.

Analog zu den Studien des TAP2-Promotors wurden im Folgenden die Tapasin-Promotor-Deletionsmutanten hinsichtlich einer Hemmung in den HER-2/neu⁺-Zellen analysiert (Abb. 4.35).

Abb. 4.35: Aktivität der Tapasin-Promotor-Deletionsmutanten in den HER-2/neu⁺-Zellen



Jeweils 5×10^5 HER-2/neu⁺-Zellen wurden mit je 1 μg der spezifischen Luziferase-Plasmide P250 (Wt), bzw. Mut 1-7 und je 0,03 μg des β -Galaktosidase-Plasmids mittels Lipofektion transient transfiziert und nach 48 h Stunden die Promotoraktivität wie beschrieben ermittelt (s. 3.8.4.). Pro Versuch wurde jede Transfektion in Triplikaten angesetzt und die Mittelwerte der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Aus den Ergebnissen von acht unabhängigen Experimenten wurde jeweils die prozentuale Aktivität errechnet, wobei die Aktivität des Wt-Promotors in den HER-2/neu⁻-Zellen auf 100 % gesetzt wurde. Aus diesen Prozentsätzen wurden die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt.

Das Ergebnis zeigt, dass alle Mutanten mit Ausnahme von Mutante 6 in den HER-2/neu⁺-Zellen herunterreguliert sind (Abb. 4.35). Daraus folgt, dass alle Regionen, die einen Einfluss auf die Aktivität des Tapasin-Promotors haben, durch HER-2/neu reprimiert werden können. Daraus ergeben sich die folgenden potentiellen Zielsequenzen für HER-2/neu:

Abb. 4.36: Zielregionen für HER-2/neu im Tapasin-Promotor

GATA - NF- κ B - P300 - ***GATA - E2F - SP1 - P300 - E2F - NF- κ B*** - IRF1/2

Dargestellt sind die wichtigsten Bindungsmotive im Tapasin-Promotor. Die Region des Promotors, die durch HER-2/neu signifikant reprimiert wird, ist fett, kursiv und unterstrichen hervorgehoben.

Aus den Ergebnissen der Studien mit den Promotor-Deletionsmutanten von TAP2 und Tapasin konnte nicht auf ein bestimmtes Bindungsmotiv geschlossen werden, das die HER-2/neu-vermittelte Hemmung der Promotoraktivität verursacht. Die noch herunterregulierten Bereiche beider Promotoren sind relativ lang und enthalten eine Vielzahl von Motiven.

Aus diesem Grund wurden am Beispiel des Tapasin-Promotors verschiedene Bindungsmotive über Mutagenese-PCR gezielt eliminiert. Diese Promotormutanten

wurden anschließend hinsichtlich ihrer Aktivität in den HER-2/neu⁻-Zellen analysiert, um die Funktionalität der mutierten Motive zu verifizieren. Anschließend wurde untersucht, ob die Elimination der Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle einen Einfluss auf die Verringerung der Promotoraktivität bei einer HER-2/neu-Überexpression nimmt.

4.5.4. Eliminierung von Bindungsmotiven für Transkriptionsfaktoren im Tapasin-Promotor

Mittels Mutagenese-PCR wurden verschiedene Bindungsmotive durch Mutation inaktiviert (Tab. 4.2).

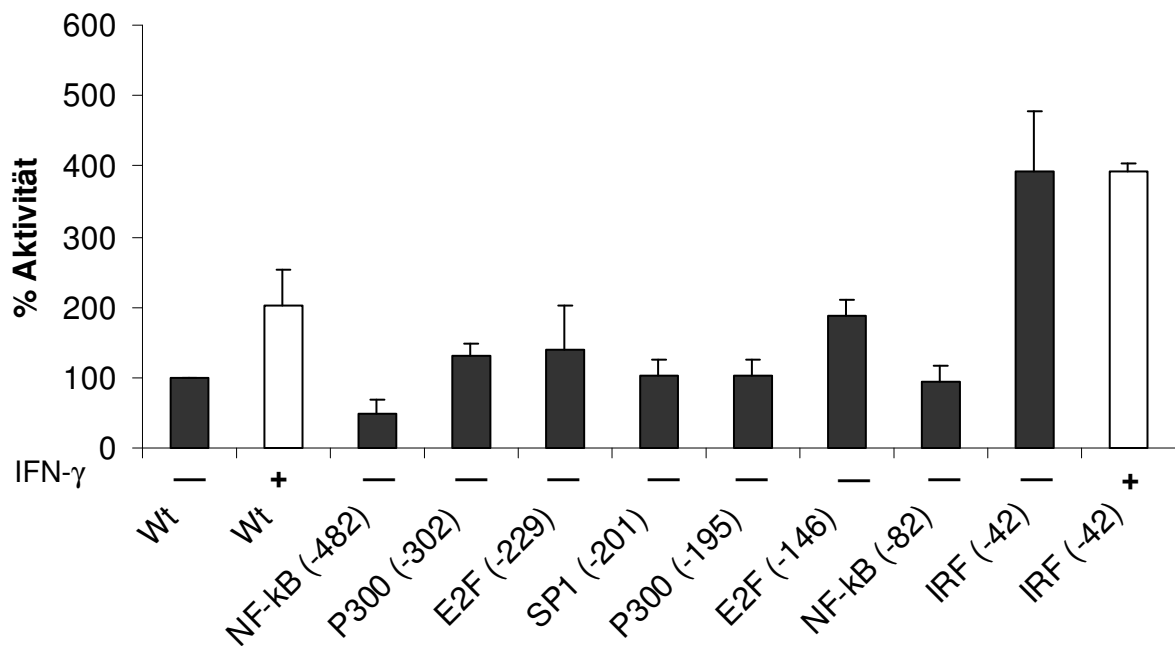
Tab. 4.2: Mutierte Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren im Tapasin-Promotor

Transkriptionsfaktor - Motiv	Position	Wt Motiv	Mutiertes Motiv
NF-κB	-468	gggatcca	<u>g</u> g <u>a</u> atcca
P300	-309	cgcgggagtgtgt	cgcgggga <u>tcct</u> gtt
E2F	-239	gttgccgc	gttg <u>gatc</u>
SP1	-206	gggggtgggt	gggg <u>aaa</u> ggt
P300	-191	gcgaggagtggctg	gcgagga <u>tc</u> ggctg
E2F	-146	ttggccc	ttg <u>gatc</u>
NF-κB	-82	gggaatttcc	<u>gcgcct</u> ttcc
IRF-1/2	-42	aggaaaatgaaagt	agga <u>tcct</u> gaaagt

Um sicher zu stellen, dass durch den entsprechenden Basenaustausch die Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle eliminiert wurde und keine neue Bindungsstelle entstanden ist, wurden alle Mutationen mittels TRANSFAC auf neue Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren überprüft. Außerdem wurden die klonierten Konstrukte durch Sequenzierung überprüft.

Die so gewonnenen Transkriptionsfaktor-K.o.-Mutanten wurden hinsichtlich ihrer Aktivität mittels Luziferaseassay im Vergleich zu dem Wildtyp untersucht (Abb. 4.37).

Abb. 4.37: Aktivität der Transkriptionsfaktor-K.o.-Mutanten des Tapasin-Promotors in den HER-2/neu⁻-Zellen.



Jeweils 5×10^5 HER-2/neu⁻-Zellen wurden mit je 1 μ g der Luziferase-Plasmide und 0,03 μ g des β -Galaktosidase-Plasmids mittels Lipofektion transient transfiziert und mit oder ohne 24 h Stimulation mit 100 U/ml IFN- γ nach 48 h Stunden die Promotoraktivität wie beschrieben ermittelt (s. 3.8.4.). Pro Versuch wurde jede Transfektion in Triplikaten angesetzt und die Mittelwerte der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Aus den Ergebnissen von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurde jeweils die prozentuale Aktivität errechnet, wobei die Aktivität des Wt-Promotors in den HER-2/neu⁻-Zellen auf 100 % gesetzt wurde. Aus diesen Prozentsätzen wurden die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt.

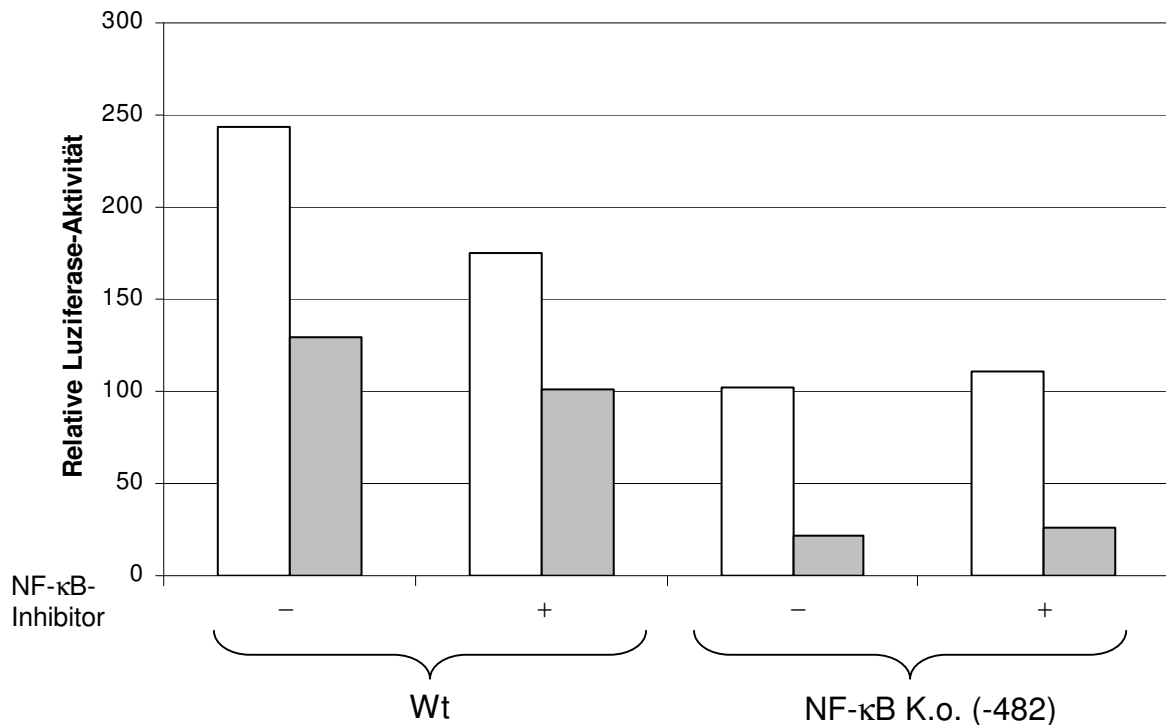
Abb. 4.37 zeigt, dass nur eine Transkriptionsfaktor-K.o.-Mutante eine im Vergleich zu dem Wt verminderte Aktivität aufweist (NF- κ B, -482). Daraus folgt, dass von den eliminierten Bindungsmotiven nur das NF- κ B-Motiv an Position -482 die Aktivität des Tapasin-Promotors aktiviert. Außerdem wird die Aktivität bei Inaktivierung des IRF-Motivs stark erhöht, was auf einen repressiven Einfluss dieses Motivs hinweist. Allerdings ist diese Bindungsstelle für die Induzierbarkeit des Promotors durch IFN- γ verantwortlich. Auch die Elimination der Motive für E2F (-229, -146) und P300 (-302) führt zu einer Steigerung der Promotoraktivität. Für diese Motive lässt sich demnach ebenfalls eine repressive Wirkung auf die Promotoraktivität vermuten.

4.5.5. Bedeutung des NF- κ B-Motivs an Position -482 für die basale Tapasin-Promotoraktivität

Wie in Abb. 4.37 dargestellt, führt die Elimination des NF- κ B-Motivs an Position -482 zu einer signifikanten Reduktion der Aktivität des Tapasin-Promotors. Dies wurde mit einem NF- κ B-Inhibitorpeptid und mittels Gelretardationsversuchen genauer untersucht.

Zu diesem Zweck wurden HER-2/neu⁻- und HER-2/neu⁺-Zellen mit dem Wt-Promotor oder der NF- κ B-K.o.-Mutante (-482) transfiziert und vor der Analyse im Luziferase-assay für 36 h mit dem NF- κ B-Inhibitor-Peptid inkubiert.

Abb. 4.38: Einfluss des NF- κ B-Inhibitors auf die Tapasin-Promotoraktivität



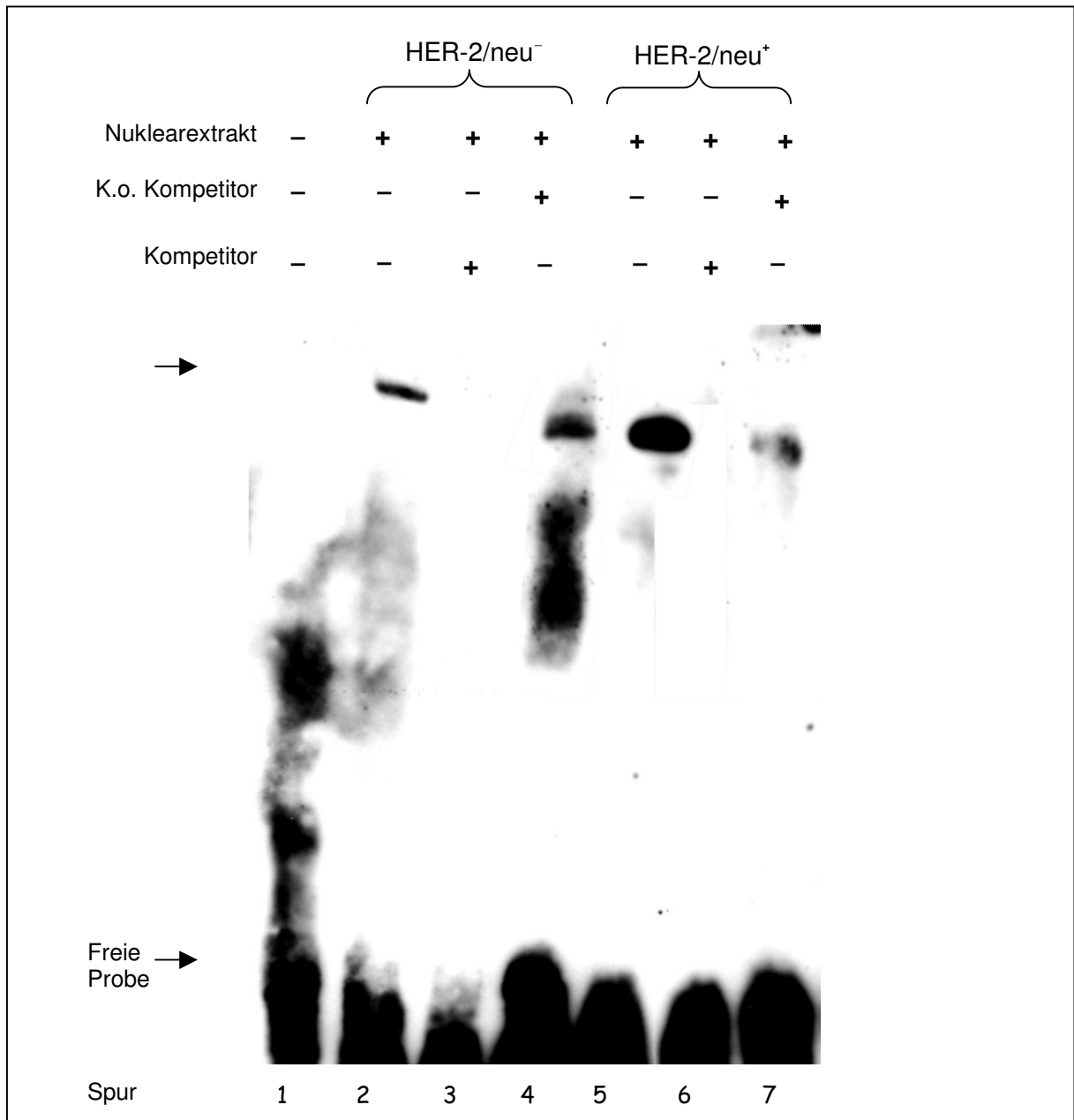
Jeweils 5×10^5 HER-2/neu⁻- (weiße Balken) und HER-2/neu⁺-Zellen (graue Balken) wurden mit je 1 μ g der Luziferase-Plasmide und je 0,03 μ g des β -Galaktosidase-Plasmids mittels Lipofektion transient transfiziert und mit oder ohne 36 h Stimulation mit 18 μ M/ml NF- κ B-Inhibitor nach 48 h Stunden die Promotoraktivität wie beschrieben ermittelt (s. 3.8.4.). Pro Versuch wurde jede Transfektion in Triplikaten angesetzt und die Mittelwerte der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Die Abbildung zeigt eines der zwei durchgeführten Experimente.

Wie in Abb. 4.38 dargestellt, führt die Inhibition von NF- κ B zur Reduktion der Tapasin-Promotoraktivität in beiden Zelllinien, während die NF- κ B-K.o.-Mutante des Promotors unbeeinflusst ist. Hieraus resultiert die Hypothese, dass die Tapasin-transkription durch die Bindung von NF- κ B an Position -482 im Tapasin-Promotor erhöht wird.

Um dies zu untersuchen, wurden Gelretardationsversuche durchgeführt. Hierzu wurden 25 Bp lange Oligonukleotide, deren Sequenz der Bindungsstelle für NF- κ B an Position -482 im Tapasin-Promotor entsprechen, eingesetzt. Als Spezifitätskontrolle diente ein Parallelansatz mit einem 200fachen Überschuss („Kompetitor“) an unmarkiertem Oligonukleotid der gleichen Sequenz oder einer mutierten Sequenz, in der das NF- κ B-Motiv eliminiert worden war. Es wurde erwartet, dass ein spezifisches Signal durch einen Überschuss an Oligonukleotid der gleichen Sequenz

verdrängt werden kann, während es in Gegenwart des Überschusses an mutiertem Oligonukleotid erhalten bleibt (Abb. 4.39).

Abb. 4.39: NF- κ B-Gelshiftassay



10 μ g Kernprotein von HER-2/neu⁻- und HER-2/neu⁺-Zellen wurden mit 30 fmol Biotin-markierten Oligonukleotiden inkubiert, die dem Motiv für NF- κ B an Position -482 im Tapasin-Promotor entsprechen. Anschließend wurden die Proben über ein 6 %iges natives Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, geblottet und der Detektion mit dem „Lightshift Chemilumineszent EMSA Kit“ (Pierbio, Bonn) nach Herstellerangaben ausgesetzt. Als Kompetitor wurde ein 200facher Überschuss an unmarkierten Oligonukleotid bzw. unmarkierten mutierten Oligonukleotid, bei dem das Bindungsmotiv durch die Mutation inaktiviert war, verwendet.

Das Ergebnis zeigt ein spezifisches Signal in den Spuren 2 und 5, was vermuten lässt, dass an das NF- κ B-Motiv an Position -489 des Tapasin-Promotors

Kernproteine binden können. Diese Bindung ist spezifisch, da sie sich durch einen Überschuss an unmarkierten Oligonukleotid (Spur 3, 6) aber nicht durch einen Überschuss an mutiertem Oligonukleotid (Spur 4, 7) verdrängen lässt. Das Signal fällt in den HER-2/neu⁺-Zellen stärker als in den HER-2/neu⁻-Zellen aus. Aus diesem Grund wird vermutet, dass in den HER-2/neu-überexprimierenden Zellen eine stärkere NF-κB-Aktivierung im Vergleich zu den HER-2/neu⁻-Zellen vorliegt.

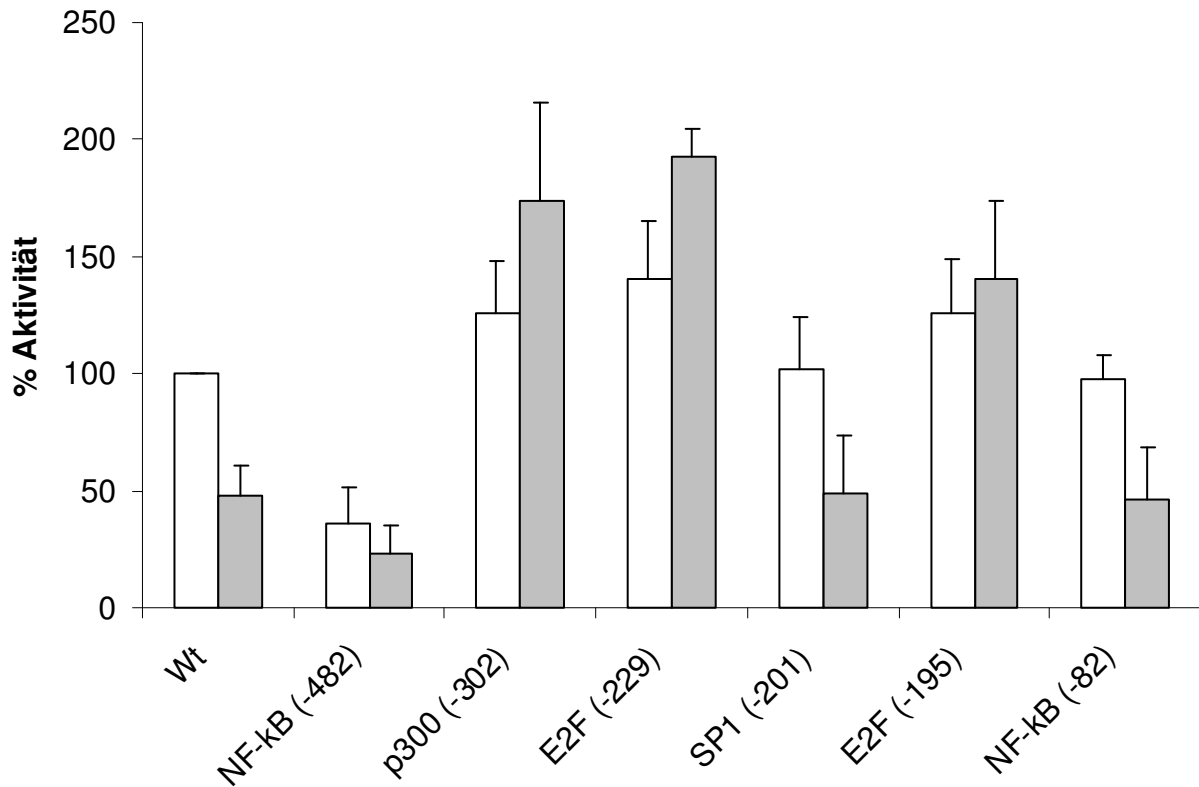
Zusammenfassend wurden im Tapasin-Promotor folgende Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren als funktionelle Motive identifiziert, die die Tapasin-Transkription beeinflussen:

- i. Das NF-κB-Motiv (-489) besitzt eine aktivierende Wirkung auf den Tapasin-Promotor.
- ii. Die Motive für E2F (-229 und -195) und P300 (-302) haben repressive Wirkung auf die Tapasin-Promotoraktivität.
- iii. Das Motiv für IRF1/2 (-42) hemmt die basale Tapasin-Promotoraktivität, ist aber essentiell für die IFN-γ-Stimulation.

4.5.7. Analyse der Suppression der Tapasin-K.o.-Promotormutanten durch HER-2/neu

Nach der Analyse der Funktionalität der mutierten Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren wurde untersucht, ob die Promotormutanten in den HER-2/neu⁺-Zellen gegenüber den HER-2/neu⁻-Zellen herunterreguliert sind. Das Ergebnis zeigt Abb. 4.40.

Abb. 4.40: Aktivität der Tapasin-Promotor-K.o.-Mutanten in den HER-2/neu⁻- und HER-2/neu⁺-Zellen.



Jeweils 5×10^5 HER-2/neu⁻ (weiße Balken) und HER-2/neu⁺-Zellen (graue Balken) wurden mit je 1 μg der Luziferase-Plasmide und je 0,03 μg des β -Galaktosidase-Plasmids mittels Lipofektion transient transfiziert und nach 48 h Stunden die Promotoraktivität wie beschrieben ermittelt (s. 3.8.4.). Pro Versuch wurde jede Transfektion in Triplikaten angesetzt und die Mittelwerte der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Aus den Ergebnissen von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurde jeweils die prozentuale Aktivität errechnet, wobei die Aktivität des Wt-Promotors in den HER-2/neu⁻-Zellen auf 100 % gesetzt wurde. Aus diesen Prozenten wurden die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt.

Die Analyse der Promotormutanten ergab, dass drei Bindungsstellen für die Hemmung der Promotoraktivität durch HER-2/neu essentiell sind: Die Promotormutanten, bei denen die Motive für P300 an Position -302, oder für E2F an den Positionen -229, oder -195 inaktiviert wurden, sind nicht durch die HER-2/neu-Überexpression herunterreguliert.

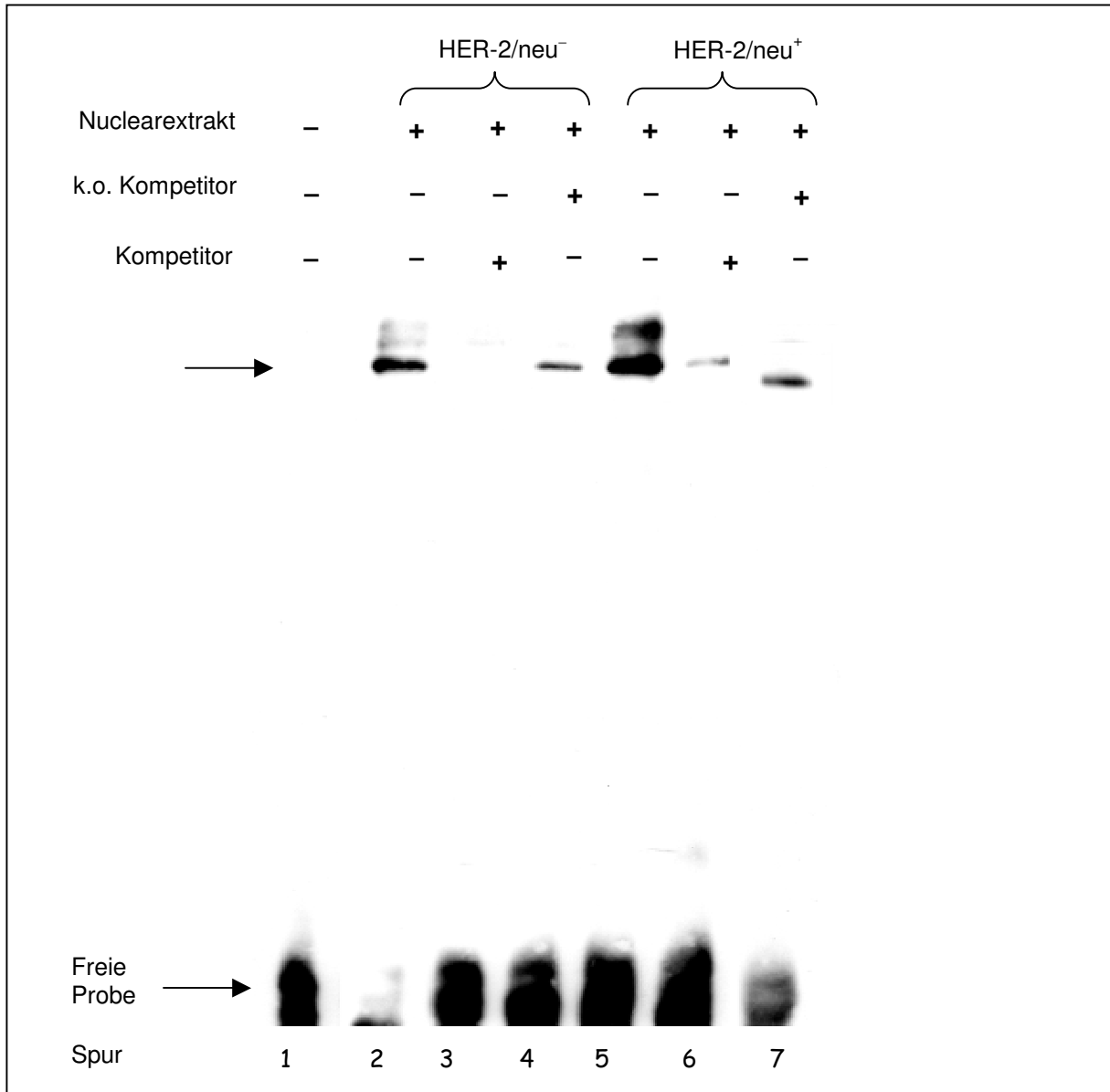
Aufgrund der Ergebnisse wird postuliert, dass an diesen Motiven Transkriptionsfaktoren binden, die die Tapasin-Promotoraktivität inhibieren. Um dies zu überprüfen wurden Gelretardationsversuche durchgeführt.

4.5.8. Detektion von Kernprotein-Bindung an Position -302, -229 und -195

Die Durchführung des EMSA-Experimentes erfolgte analog zu den NF- κ B-Experimenten (4.4.6.1) mit je 10 μg Kernprotein und Biotin-markierten Oligonukleotiden, die den Bindungsmotiven für E2F (-229, -195) und P300 (-302) aus dem Tapasin-Promotor entsprechen. Da in den Experimenten keine spezifische Bindung

von Kernproteinen an eines der drei eingesetzten Oligonukleotide festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurde der Versuch nicht mit einem, sondern mit allen drei Oligonukleotiden in einem Ansatz durchgeführt (Abb. 4.41).

Abb. 4.41: E2F/P300-Gelshiftassay



10 µg Kernprotein von HER-2/neu⁻- und HER-2/neu⁺-Zellen wurden mit 30 fmol Biotin-markierten Oligonukleotiden inkubiert, die den Motiven für E2F (-239 und -146) und P300 (-191) entsprechen. Anschließend wurden die Proben über ein 6%iges natives Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, geblottet und der Detektion mit dem „Lightshift Chemilumineszent EMSA Kit“ (Pierbio, Bonn) nach Herstellerangaben ausgesetzt. Als Kompetitor wurde ein 200facher Überschuss an unmarkiertem Oligonukleotid bzw. unmarkiertem mutierten Oligonukleotid, bei dem das Bindungsmotiv durch die Mutation inaktiviert war, verwendet.

Das Experiment zeigt eine Bindung von Kernproteinen an den Motiven für E2F (-239 und -146) und P300 (-309), welche nur in Anwesenheit von allen drei Motiven erfolgt. Sie fällt in den HER-2/neu⁺-Zellen (Spur 5) stärker aus als in den HER-2/neu⁻-Zellen (Spur 2) und kann durch einen 200fachen Überschuss an unmarkiertem Oligo-

nukleotiden verdrängt werden (Spur 3, 6), während das Signal bei Inkubation mit einem Überschuss an mutierten Oligonukleotiden erhalten bleibt (Spur 4, 7).

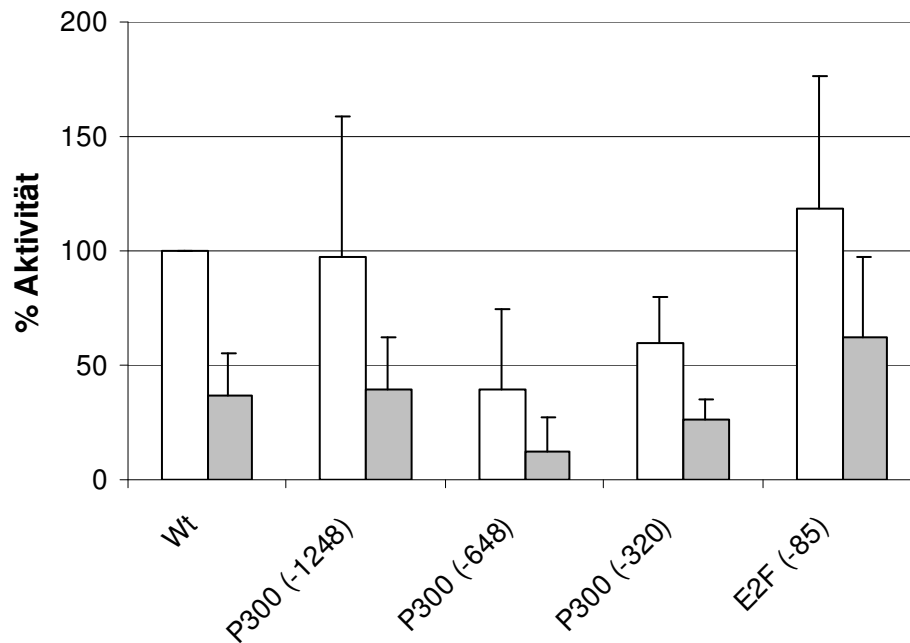
Aus den Ergebnissen lässt sich zusammenfassen, dass die transkriptionelle Hemmung der Tapasinexpression durch HER-2/neu auf einer verstärkten simultanen Bindung eines Transkriptionsfaktor-Komplexes an den Promotor beruht. Dieser Komplex bindet gleichzeitig zwei Bindungsstellen für E2F an Position (-239 und -146) und eine für P300 an Position -191.

3.5.9. Elimination der Bindungsstellen für E2F und P300 im TAP2- und TAP1/LMP2-Promotor

Da die Promotoraktivität von Tapasin durch HER-2/neu über eine komplexe Bindung von E2F und P300 gehemmt werden kann, sollte untersucht werden, ob die Inaktivierung der E2F- und P300-Motive in den TAP1/LMP2- und TAP2-Promotoren ähnliche Effekte erzielt.

Im TAP2-Promotor konnten drei P300-, und ein E2F-Motiv identifiziert werden. Der TAP1/LMP2-Promotor wies zwei E2F-Motive auf. Diese Bindungsstellen wurden durch Mutation inaktiviert und die Aktivität der resultierenden Promotormutanten nach Überprüfung durch Sequenzierung mittels Luziferaseassay analysiert.

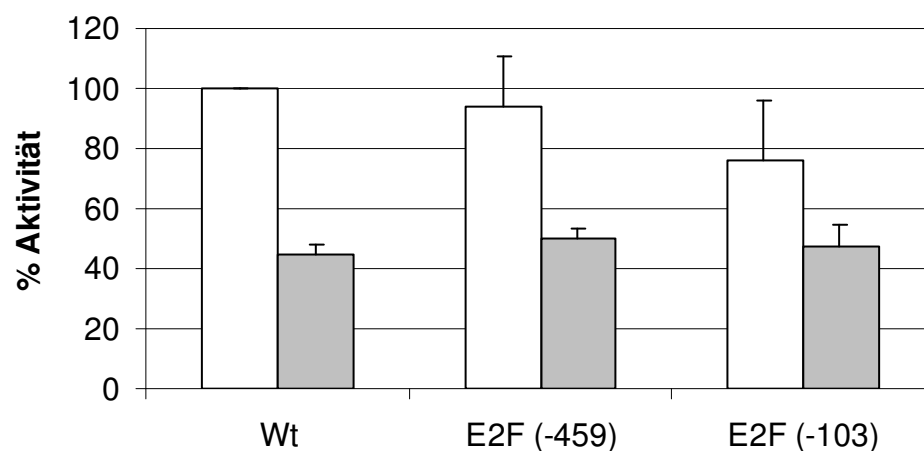
Abb. 4.42: Aktivität der TAP2-E2F/P300-K.o.-Mutanten in den HER-2/neu⁻- und HER-2/neu⁺-Zellen



Jeweils 5×10^5 HER-2/neu⁻- (weiße Balken) und HER-2/neu⁺-Zellen (graue Balken) wurden mit je $1 \mu\text{g}$ der Luziferase-Plasmide und je $0,03 \mu\text{g}$ des β -Galaktosidase-Plasmids mittels Lipofektion transient transfiziert und nach 48 h Stunden die Promotoraktivität wie beschrieben ermittelt (s. 3.8.4). Pro Versuch wurde jede Transfektion in Triplikaten angesetzt und die Mittelwerte der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Aus den Ergebnissen von drei unabhängigen Experimenten wurde jeweils die prozentuale Aktivität errechnet, wobei die Aktivität des Wt-Promotors in den HER-2/neu⁻-Zellen auf 100 % gesetzt wurde. Aus diesen Prozentsätzen wurden die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt.

Die Promotoraktivität aller P300/E2F-K.o.-Mutanten ist den HER-2/neu⁺-Zellen im Vergleich zu den HER-2/neu⁻-Zellen verringert. Die Elimination der P300 Motive an Position -648 und -320 führt in beiden Zelllinien zu einer verminderten Promotoraktivität (Abb. 4.42). Dies lässt vermuten, dass diese Motive die Wt-Promotoraktivität positiv regulieren. Umgekehrt führt die Mutation des E2F-Motivs in beiden Zelllinien zu einer leichten Aktivierung des Promotors. Aus den Daten kann vermutet werden, dass die HER-2/neu induzierte Hemmung des TAP2-Promotors im Unterschied zu Tapasin nicht über P300 und/oder E2F erfolgt.

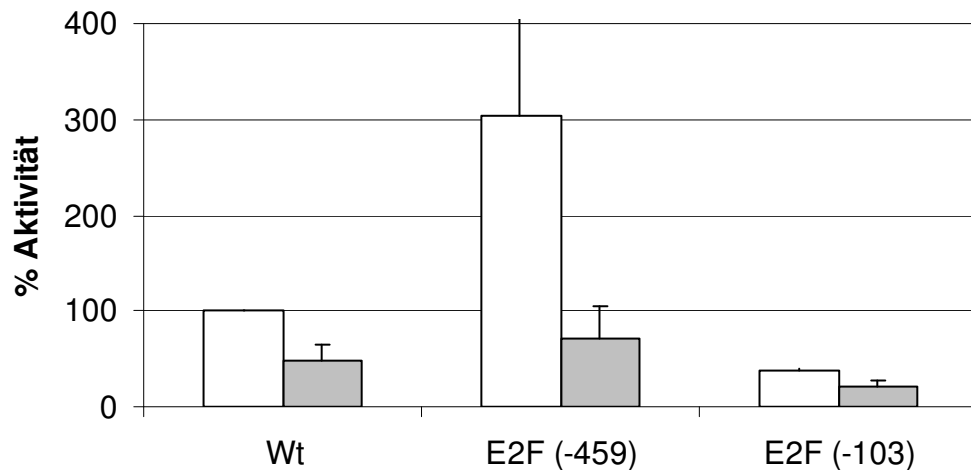
Abb. 4.43: Aktivität der TAP1-E2F/P300-K.o.-Mutanten in den HER-2/neu⁻- und HER-2/neu⁺-Zellen



Jeweils 5×10^5 HER-2/neu⁻- (weiße Balken) und HER-2/neu⁺-Zellen (graue Balken) wurden mit je 1 μg der Luziferase-Plasmide und je 0,03 μg des β -Galaktosidase-Plasmids mittels Lipofektion transient transfiziert und nach 48 h Stunden die Promotoraktivität wie beschrieben ermittelt (s. 3.8.4). Pro Versuch wurde jede Transfektion in Triplikaten angesetzt und die Mittelwerte der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Aus den Ergebnissen von drei unabhängigen Experimenten wurde jeweils die prozentuale Aktivität errechnet, wobei die Aktivität des Wt-Promotors in den HER-2/neu⁻-Zellen auf 100 % gesetzt wurde. Aus diesen Prozentsätzen wurden die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt.

Analog zu dem TAP2-Promotor sind auch im TAP1-Promotor alle E2F-K.o.-Mutanten in den HER-2/neu⁺-Zellen im Vergleich zu den HER-2/neu⁻-Zellen verringert (Abb. 4.43). Da die Elimination des E2F Motivs an Position -459 keine Auswirkung auf die Aktivität des Promotors hat, scheint dieses Motiv nicht funktionell zu sein. Dagegen führt die Inaktivierung der E2F-Bindungsstelle an Position -103 zu einer leichten Reduktion der Promotoraktivität in den HER-2/neu⁻-Zellen. Analog zu TAP2 erfolgt die HER-2/neu-induzierte Hemmung des TAP1-Promotors im Unterschied zu Tapasin vermutlich nicht über P300 und/oder E2F.

Abb. 4.44: Aktivität der LMP2-E2F/P300-K.o.-Mutanten in den HER-2/neu⁻- und HER-2/neu⁺-Zellen



Jeweils 5×10^5 HER-2/neu⁻- (weiße Balken) und HER-2/neu⁺-Zellen (graue Balken) wurden mit je 1 μg der Luziferase-Plasmide und je 0,03 μg des β -Galaktosidase-Plasmids mittels Lipofektion transient transfiziert und nach 48 h Stunden die Promotoraktivität wie beschrieben ermittelt (s. 3.8.4.). Pro Versuch wurde jede Transfektion in Triplikaten angesetzt und die Mittelwerte der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Aus den Ergebnissen von drei unabhängigen Experimenten wurde jeweils die prozentuale Aktivität errechnet, wobei die Aktivität des Wt-Promotors in den HER-2/neu⁻-Zellen auf 100 % gesetzt wurde. Aus diesen Prozentsätzen wurden die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt.

Entsprechend den Ergebnissen bei TAP1 und TAP2 sind alle E2F-K.o.-Mutanten des LMP2-Promotors in den HER-2/neu⁺-Zellen im Vergleich zu den HER-2/neu⁻-Zellen verringert. Die Elimination des E2F-Motiv an Position -459 führt zu einer Steigerung der Promotoraktivität, die in den HER-2/neu⁻ Zellen deutlich stärker ausfällt, als in den HER-2/neu⁺-Zellen. Dagegen führt die Zerstörung des E2F-Motivs an Position -103 zu einer Reduktion der Promotoraktivität in beiden Zelllinien. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass das E2F-Motiv (-459) den LMP2-Promotor negativ reguliert, während das E2F-Motiv (-103) aktivierenden Einfluss hat. Analog zu den Daten der K.o.-Promotormutanten von TAP1 und TAP2 wird die HER-2/neu-induzierte Hemmung des TAP2-Promotors im Unterschied zu Tapasin vermutlich nicht über P300 und/oder E2F vermittelt.

Die Ergebnisse zeigen, dass im Gegensatz zu dem Tapasin-Promotor in keinem der drei untersuchten Promotoren die Inaktivierung von E2F- und P300-Bindungsstellen die HER-2/neu-vermittelte Hemmung der Promotoraktivität aufhebt.

4.6. Untersuchung der HER-2/neu-vermittelten Herunterregulation der Promotoren mittels Ras-transformierten Zellen und Inhibitoren

Aus den oben angeführten Ergebnissen kann vermutet werden, dass in den HER-2/neu⁺-Zellen unterschiedliche Signalwege zu einer Hemmung des Tapasin-Promotors bzw. der Promotoren von TAP1, TAP2 und LMP2 führen. Wie in der Einleitung beschrieben, aktiviert HER-2/neu u.a. drei Signalkaskaden:

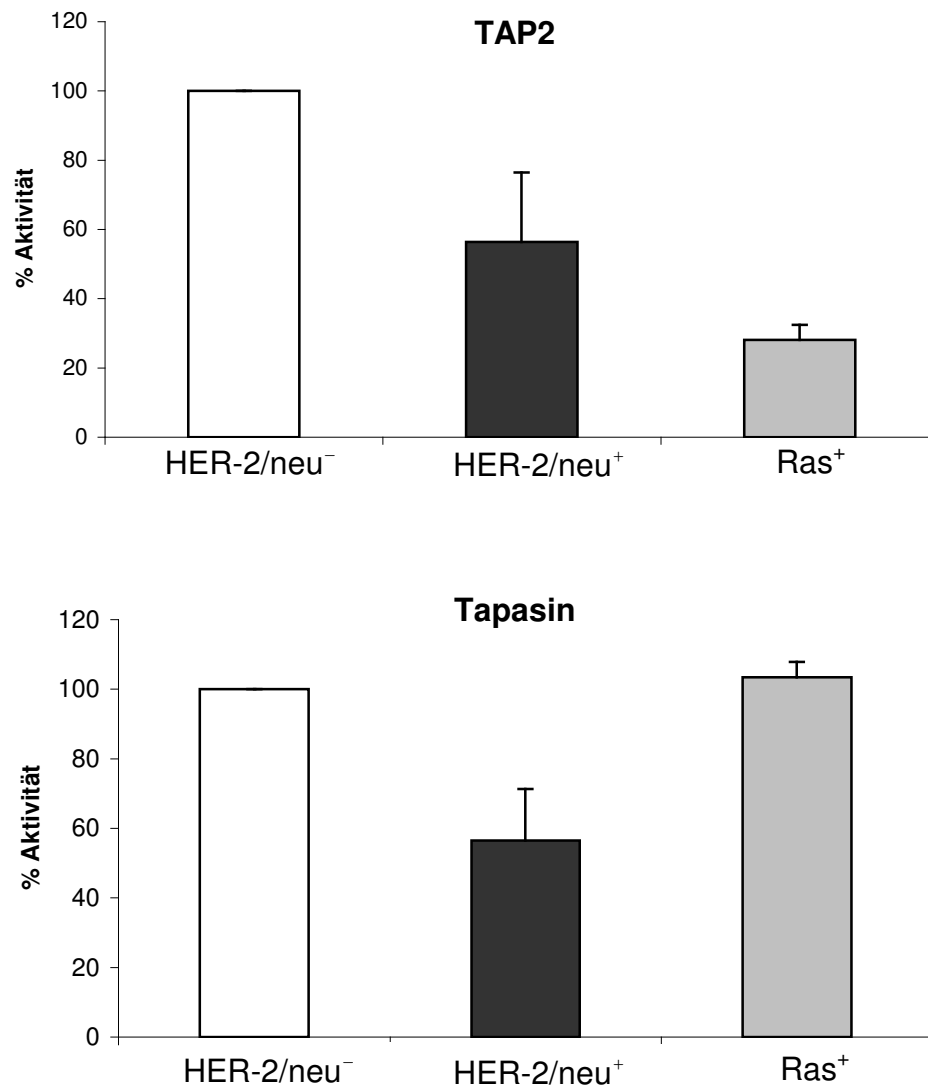
- i. Phospholipase C γ - Protein-KinaseB/C
- ii. PI3-Kinase
- iii. Ras-MAP-Kinase (ERKK)

Es stellt sich die Frage, über welche Signalkaskade die oben angeführten Promotoren reguliert werden könnten. Um diese Frage zu untersuchen, wurden drei Inhibitoren eingesetzt, die jeweils eine der angeführten Kaskaden blockieren. Zusätzlich wurden die HER-2/neu⁺-Zellen mit Ras-transformierten NIH3T3-Zellen verglichen, in denen eine starke Aktivierung der Ras-Kaskade vorliegt (NIHEJrascl3, vgl. 3.5.2.). Im Folgenden werden diese Zellen als Ras⁺-Zellen bezeichnet. In diesen Zellen liegt analog zu den HER-2/neu⁺-Zellen eine im Vergleich zu den parentalen Zellen verminderte MHC Klasse I-Oberflächenexpression aufgrund einer reduzierten TAP1/LMP2 Transkription vor (Lohmann, et al., 1996; Seliger et. al., 1998). Mitarbeiter der AG Seliger konnten zeigen, dass in diesen Zellen die Promotoraktivität des TAP1/LMP2-Promotors in beide Richtungen supprimiert ist (Harders, unveröffentlichte Daten). Es wurde im Folgenden untersucht, ob die Promotoren von TAP2 und Tapasin in den Ras⁺-Zellen ebenfalls in ihrer Aktivität beeinträchtigt sind.

4.6.1. Untersuchung der Promotoraktivität von TAP2 und Tapasin in Ras⁺-Zellen

Die Aktivität der TAP2- und Tapasin-Promotoren wurde in den HER-2/neu⁺-Zellen und in den Ras⁺-Zellen im Vergleich zu den HER-2/neu⁻-Zellen (NIH3T3) mittels Luziferaseassay ermittelt (Abb. 4.45).

Abb. 4.45: Vergleich der Promotoraktivitäten von TAP2 und Tapasin in HER-2/neu⁺- und Ras⁺-Zellen im Vergleich zu HER-2/neu⁻-Zellen



Jeweils 5×10^5 HER-2/neu⁻-, HER-2/neu⁺- und Ras⁺-Zellen wurden mit je 1 μg der Luziferase-Plasmide und je 0,03 μg des β -Galaktosidase-Plasmids mittels Lipofektion transient transfiziert und nach 48 h Stunden die Promotoraktivität wie beschrieben ermittelt (s. 3.8.4.). Pro Versuch wurde jede Transfektion in Triplikaten angesetzt und die Mittelwerte der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Aus den Ergebnissen von mindestens vier unabhängigen Experimenten wurde jeweils die prozentuale Aktivität errechnet, wobei die Aktivität des Wt-Promotors in den HER-2/neu⁻-Zellen auf 100 % gesetzt wurde. Aus diesen Prozentsätzen wurden die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt.

Im Vergleich zu den parental Zellen ist die Promotoraktivität von TAP2 in den Ras⁺-Zellen herunterreguliert (Abb. 4.45), während die Aktivität des Tapasin-Promotors in diesen Zellen nicht moduliert ist. Die Hemmung des TAP2-Promotors ist in den Ras-transformierten Zellen im Vergleich zu den HER-2/neu⁺-Zellen stärker ausgeprägt.

Damit resultiert eine Ras-Hyperaktivierung in einer Inhibition der Promotoraktivitäten von TAP1, LMP2 und TAP2. Eine HER-2/neu-Überexpression führt wie angeführt zusätzlich zu einer Hemmung des Tapasinpromotors. Diese Daten führen zu der

Hypothese, dass die Regulation der TAP1/LMP2- und TAP2-Promotoraktivität in den HER-2/neu⁺-Zellen über die Ras-Kaskade erfolgt, wohingegen die Tapasin-Promotoraktivität über einen Ras-unabhängigen Signalweg inhibiert wird. Um dies zu untersuchen, wurden spezifische Inhibitoren der verschiedenen Signalkaskaden eingesetzt.

4.6.2. Untersuchung der Hemmung der Promotoraktivitäten von TAP1/LMP2, TAP2 und Tapasin unter dem Einfluss von Inhibitoren

Zur Blockade der verschiedenen Signalkaskaden wurden die folgenden Inhibitoren verwendet:

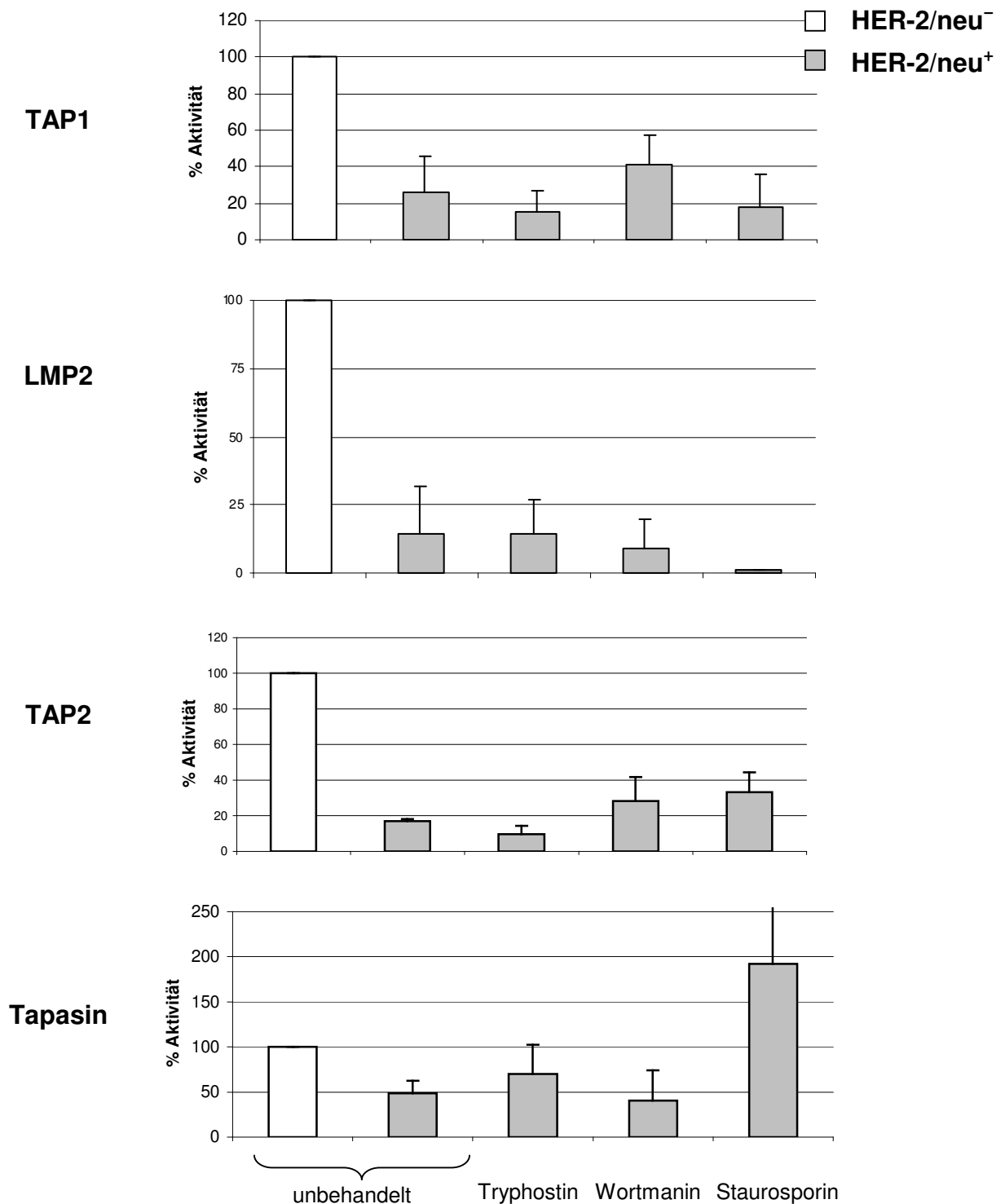
Tab. 4.3: Inhibitoren

Inhibitor	Konz. / Dauer	Angriffspunkt	Gehemmte Signalkaskade
Tyrphostin AG99	10 μ M / 24 h	ERKK	Ras-MAPK
Wortmanin	10 μ M / 24 h	PI3K	PI3K-MAPK
Staurosporin	10 μ M / 24 h	PKC	PLC- γ -PKC

Die Inhibitoren wurden in der AG Seliger in Zytotoxizitätsversuchen auf die spezifischen lethalen Dosis-Wirkungen in NIH3T3-Zellen getestet (Mendler, Recktenwald, Kronfeld, unveröffentlichte Daten). Aus diesen Ergebnissen wurden die höchsten nicht toxischen Konzentrationen gewählt und im Luziferaseassay eingesetzt. Die Inkubation erfolgte nach der transienten Transfektion der Zellen mit den Reporterplasmiden 24 h vor der Zellernte.

Bei der Auswertung der Daten wurde geprüft, ob die Inhibitoren die HER-2/neu-vermittelte Suppression der Promotoraktivitäten aufheben können (Abb. 4.46).

Abb. 4.46: Einfluss von Inhibitoren auf die HER-2/neu-vermittelte Hemmung der Promotoraktivitäten von TAP1/LMP2, TAP2 und Tapasin



Jeweils 5×10^5 HER-2/neu⁻ (weiße Balken) und HER-2/neu⁺-Zellen (graue Balken) wurden mit je 1 μ g der Luziferase-Plasmide und je 0,03 μ g des β -Galaktosidase-Plasmids mittels Lipofektion transient transfiziert, und unbehandelt oder mit 24 h Behandlung mit 10 μ M/ml des entsprechenden Inhibitors nach 48 h Stunden die Promotoraktivität wie beschrieben ermittelt (s. 3.8.4.). Pro Versuch wurde jede Transfektion in Triplikaten angesetzt und die Mittelwerte der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Aus den Ergebnissen von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurde jeweils die prozentuale Aktivität errechnet, wobei die Aktivität des Wt-Promotors in den HER-2/neu⁻-Zellen auf 100 % gesetzt wurde. Aus diesen Prozentsätzen wurden die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt.

Die Ergebnisse zeigen, dass Tryphostin und Wortmanin auf die Hemmung der Promotoraktivitäten keinen Einfluss besitzen. Die Inkubation der Zellen mit Staurosporin führt dagegen zu einer deutlichen Rekonstitution der Tapasin-Promotoraktivität. Dieser Effekt lässt sich nicht bei den Promotoren von TAP1, LMP2 und TAP2 nachweisen. Die LMP2-Promotoraktivität wird durch diesen Inhibitor dagegen stark inhibiert.

Diese Daten lassen vermuten, dass die Inhibition der Proteinkinase C durch Staurosporin die HER-2/neu-vermittelte Hemmung der Aktivität des Tapasin-Promotors blockiert.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein „Immune escape“-Phänotyp anhand eines *in vitro*-Systems untersucht. Als Auslöser dieses Phänotyps wurde das Onkogen HER-2/neu gewählt, das in vielen Tumoren stark überexprimiert wird. Mit Hilfe der gewonnenen Daten sollten wichtige biologische Zusammenhänge aufgeklärt werden, die für T-Zell-vermittelte Therapien von HER-2/neu⁺-Tumoren relevant sein können. Außerdem sollte das Zellmodell dazu herangezogen werden, die molekularen Mechanismen dieses „Immune escape“-Phänotyps aufzuklären.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass HER-2/neu die MHC Klasse I-Oberflächenexpression beeinträchtigt. Dies ist begründet in einer verminderten Expression von TAP, Tapasin und Untereinheiten des Proteasoms und führt zu verringertem Peptidtransport und dem Verlust der Immunogenität. Die zugrunde liegenden molekularen Ursachen konnten im Fall von TAP, Tapasin und LMP2 zum Teil aufgeklärt werden, da HER-2/neu die Promotoraktivität dieser Gene beeinträchtigt. Es wurde weiter gezeigt, dass die Suppression der Tapasin-Promotoraktivität von Bindungsmotiven für E2F und P300 abhängig ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen nun im Einzelnen diskutiert werden.

5.1. Der „Immune escape“- Phänotyp

5.1.1. Die starke Überexpression von HER-2/neu führt zu einer verminderten MHC Klasse I-Oberflächenexpression

Verschiedene Studien zeigen, dass eine HER-2/neu-Überexpression zu einer verminderten MHC Klasse I-Präsentation führen kann (Lollini et al., 1998; Kono et al., 1997). Umgekehrt ist eine Hemmung von HER-2/neu mit einer gesteigerten MHC Klasse I-Antigenpräsentation assoziiert (Castilleja et al. 2001; Choudhury et al. 2004). Dieser Zusammenhang konnte in der vorliegenden Arbeit anhand von FACS-Analysen bestätigt werden. Die HER-2/neu⁺-Zellen zeigen eine deutliche Reduktion der MHC Klasse I-Oberflächenexpression von allen getesteten Haplotypen (H2-L^q, H2-D^q und H2-K^q), die sich durch die Stimulation mit IFN- γ rekonstituieren lässt. Die Reduktion erfolgt um mehr als 50 % gegenüber der parentalen Zelllinie und ist damit vergleichbar mit der Wirkung einer konstitutiven Ras-Aktivierung in einem ähnlichen Zellmodell: NIH3T3-Zellen, die das mutierte und deshalb konstitutiv aktive Ras exprimieren, zeigen eine Reduktion der MHC Klasse I-Oberflächenexpression um etwa 40-50 % (Lohmann et al., 1996). Auch in diesem Fall kann der Effekt durch IFN- γ -Behandlung revertiert werden (Seliger et al., 1998).

Möglicherweise beeinflusst die Menge an HER-2/neu das Ausmaß der Reduktion der MHC-Oberflächenexpression. Der Vergleich muriner Fibroblasten mit unterschiedlich starker HER-2/neu-Überexpression zeigt, dass eine hohe HER-2/neu-Expression die MHC Klasse I-Expression an der Zelloberfläche um 50 % reduziert, während bei einer niedrigeren HER-2/neu-Expression eine etwa 30 %ige Reduktion auftritt (Herrmann et al., 2004). Aufgrund der vergleichsweise hohen Expression von HER-2/neu in den HER-2/neu⁺-Zellen war es in dieser Arbeit nicht möglich, die MHC Klasse I-Oberflächenexpression durch eine Behandlung mit HER-2/neu-Inhibitoren signifikant zu erhöhen. Unabhängig von dem Inhibitor-Typ war die Menge, die eingesetzt werden musste, um einen messbaren Effekt auf HER-2/neu zu erzeugen, relativ hoch, so dass vermutlich toxische Nebenwirkungen durch die Hemmung anderer Tyrosinkinase auftraten (Hartmann et al., 1997). Möglicherweise spielt auch der Zusammenhang zwischen einer Hemmung von HER-2/neu und der Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest, die ihrerseits die Antigenpräsentation beeinflussen könnten, eine Rolle: Die Studien von Choudhury und Koautoren (2004) zeigten, dass eine Hemmung von HER-2/neu neben einer erhöhten MHC Klasse I-Antigenpräsentation auch Apoptose induzieren kann und zum Arrest des Zellzyklus führt. Dieser antiproliferative Effekt wird durch zahlreiche Arbeiten belegt, in denen HER-2/neu durch Antikörper, Inhibitoren, Antisense-Oligonukleotide oder in Mausmodellen mit HER-2/neu-transgenen Mäusen supprimiert wurde (Hudziak et al., 1989; Roh et al., 2000; Moasser et al., 2001; Schiffer et al., 2003).

5.1.2. HER-2/neu reduziert die RNS und Proteinmengen bestimmter Gene der MHC Klasse I-Antigenprozessierung

Um die Ursachen für die Reduktion der MHC Klasse I-Oberflächenexpression an der Zelloberfläche zu untersuchen, wurden RT-PCR- und Western Blot-Analysen von Komponenten der Antigenprozessierung durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die schwere Kette und β_2 -Mikroglobulin in beiden Zellen vergleichbar exprimiert werden. Dagegen ist die Transkription von TAP1, TAP2, Tapasin, ERAAP, LMP2, LMP10, PA28 α und PA28 β in den HER-2/neu⁺-Zellen verringert. Damit sind die Produktion der Peptide durch das Proteasom und ERAAP, der Peptidtransport und die Beladung des MHC-Komplexes mit Peptid möglicherweise beeinträchtigt. Diese Zusammenhänge sollen nun im Einzelnen diskutiert werden.

5.1.2.1. Das Proteasom

Die Untersuchung der Expression der Komponenten des Proteasoms ergab, dass die nicht induzierbaren Untereinheiten X, Y und Z sowie die induzierbare Untereinheit LMP7 unverändert exprimiert werden. Dagegen sind LMP2, LMP10 und die Untereinheiten des Proteasomaktivators PA28 in den HER-2/neu⁺-Zellen herunterreguliert. Allerdings erhöht eine Stimulation durch IFN- γ die RNS- und Proteinmengen dieser Gene sehr stark, so dass die Ausbildung des Immunproteasoms, das vor allem unter dem Einfluss von IFN- γ erfolgt, durch HER-2/neu nicht beeinträchtigt sein sollte.

Analog zu diesen Daten finden sich in der Literatur keine Hinweise auf eine verminderte Expression der konstitutiv exprimierten Untereinheiten X, Y und Z. Studien an Proteasom-Mutanten in Hefen konnten zeigen, dass eine defekte Expression dieser Komponenten die enzymatische Funktion des Proteasoms beeinträchtigt und zu Störungen des vitalen Zellstoffwechsel führt. So ist eine Deletion der Untereinheit X für die Zelle letal (Chen et al., 1995), die Inaktivierung von Y führt zur Akkumulation ubiquitinerter Proteine (Gueckel et al., 1998) und die Elimination von Z führt zum Zellzyklusarrest (Jager et al., 1999). Eine Inhibition der enzymatischen Tätigkeit des Proteasoms verhindert die für die Zelle essentielle Eliminierung von falsch gefalteten Proteinen, Transkriptionsfaktoren und Zellzyklus-Regulatoren (Etlinger et al., 1977, Palombella et al., 1994, Glotzer et al., 1991, Rock et al., 1994, Hilt et al., 1995, 1996). Demnach wäre eine Suppression der für diese Funktion wichtigen Komponenten in den vitalen und stark proliferierenden HER-2/neu⁺-Zellen nicht zu erwarten.

Eine verminderte Expression von LMP2 wurde dagegen in verschiedenen Tumoren, wie z.B. im Lungenkarzinom, Nierenkarzinom, Kolonkarzinom und Melanom nachgewiesen (Seliger et al., 2000; Miyagi et al., 2003). Allerdings ist auch LMP7 häufig betroffen (Seliger et al., 2001b), das in dieser Arbeit durch die HER-2/neu-Expression nicht beeinflusst wird. Eine verminderte Menge von LMP2 konnte auch in Ras-transformierten Zellen und in humanen und murinen Tumorzelllinien unterschiedlicher Histologie festgestellt werden (Seliger et al., 1998; Johnson et al., 1999). Dieser Effekt ist auch bei einer HER-2/neu-Überexpression zu erwarten, da HER-2/neu die Ras-Kaskade aktiviert. In den Ras-transformierten Zellen war LMP7 normal exprimiert, allerdings auch LMP10, PA28 α und PA28 β (Seliger et al., 1998). Auch in diesem Zellsystem war es möglich, die LMP2-Expression durch Zugabe von IFN- γ zu steigern, was auf einen ähnlichen Mechanismus der LMP2-Hemmung in Ras- und in HER-2/neu-transformierten Zellen hinweist. Dagegen scheinen andere Mechanismen unabhängig von Ras zu einer Inhibition von LMP10 und PA28 zu führen.

Im Gegensatz zu LMP2 gibt es bisher nur wenige Daten über eine Beeinträchtigung von LMP10 oder PA28 in transformierten Zellen oder Tumoren. In Zervixkarzinomzellen

konnte eine Verminderung der Transkripte verschiedener Komponenten der Antigenprozessierung, unter anderem auch von PA28 α , PA28 β und LMP10 nachgewiesen werden (Ritz et al., 2001). Tatsumi und Koautoren (2003) stellten eine verringerte, aber IFN- γ -induzierbare Transkription von LMP2, LMP10 und PA28 in Kolonkarzinomzellen fest. Da sich ähnliche Defizienzen in Tumorzelllinien aus unterschiedlichen Gewebetypen nachweisen lassen (Johnson et al., 1999; Seliger et al., 2000), die aufgrund einer IFN- γ -Induzierbarkeit wahrscheinlich durch eine Modulation der Transkription oder Translation entstehen, wird vermutet, dass diese Defizienzen auf regulativen Mechanismen beruhen könnten (Seliger et al., 2000). Auch die durch Adenoviren auslösbare Transformation kann mit entsprechenden Merkmalen assoziiert sein: In adenoviral infizierten Zellen konnte man eine verminderte Expression von LMP2, LMP7, LMP10, PA28 α und PA28 β , aber auch von TAP2 und Tapasin feststellen (Rotem-Yehudar et al., 1996; Vertegeaal et al., 2003).

Die Arbeiten von Garcia-Lora und Koautoren (2003a, 2003b) lassen vermuten, dass verminderte Transkriptmengen u.a. von Untereinheiten des Proteasoms Folge einer Selektion von T-Zellen sein können: In diesen Studien wurden Tumorzellen in immunkompetente und -defiziente Mäuse injiziert und die Antigenprozessierung der entstandenen Metastasen untersucht. Die Tumore in den immunkompetenten Mäusen wiesen verminderte Mengen an LMP2, LMP7 und LMP10 auf, während Tumore aus den immundefizienten Mäusen diese Gene unverändert exprimierten. Die Expression von PA28 war allerdings nicht beeinträchtigt. Auch in diesen Fällen konnte die Expression der betroffenen Gene über Stimulation mit IFN- γ wieder gesteigert werden. Dies lässt den Schluss zu, dass in den immunkompetenten Mäusen ein durch T-Zellen verursachter Selektionsdruck auf Tumorzellen einen „Immune escape“-Mechanismus erzeugt, in dem u.a. Komponenten des Proteasoms reversibel supprimiert werden, was auf eine Bedeutung dieser Komponenten für eine Immunantwort auch im konstitutiven System hinweist.

Die Tatsache, dass die konstitutiv exprimierten Untereinheiten des Proteasoms nicht durch HER-2/neu supprimiert werden, lässt schlussfolgern, dass die Bildung des 20S-Proteasoms nicht beeinträchtigt ist. Dagegen ist der Einbau des Proteasom-Aktivators durch die stark unterdrückte PA28-Expression in den HER-2/neu⁺-Zellen ohne Zytokinbehandlung auszuschließen. Wie in der Einleitung beschrieben, fördert PA28 die Generierung antigener Peptide (Dick et al., 1996; Sijts et al., 2002). Die Frage, inwieweit dies auch ohne den Einfluss von IFN- γ eine Rolle spielt, ist noch nicht geklärt. Bekannt ist, dass PA28, wie auch LMP2 und LMP10 konstitutiv in vielen Zellen, vor allem in „professionell Antigen präsentierenden Zellen“ stark exprimiert wird (Sijts et al. 2002). Im Gegensatz dazu finden sich im Gehirn nur sehr geringe PA28-Proteinmengen (Ma et al.,

1993), wo wiederum die Expression von HER-2/neu am höchsten ist (Press et al., 1990). Dies könnte auf eine generelle negative Korrelation der Expression von HER-2/neu und PA28 hinweisen.

Studien an PA28^{-/-}-Mäusen lassen vermuten, dass PA28 nicht an einem fundamentalen, für den Vitalstoffwechsel unentbehrlichen, zellulären Prozess beteiligt ist. In diesen Mäusen wurden, bis auf eine veränderte Proteasomaktivität hinsichtlich spezieller Proteine und antigener Peptide, keine Abnormalitäten festgestellt (Murata et al., 2001). Auch die MHC Klasse I-Antigenpräsentation ist in diesen Mäusen nur bedingt beeinträchtigt. So wird zwar das Melanoma-Antigen TRP2 nicht mehr auf der Zelloberfläche präsentiert. Dagegen werden aber antigene Peptide aus Influenzaviren effektiv über MHC Klasse I-Komplexe präsentiert. Demnach kann eine MHC Klasse I-Antigenpräsentation je nach Qualität oder Spezifität des Peptides auch unabhängig von PA28 erfolgen (Sijts et al., 2002).

Aus der selektiven Regulation einzelner Komponenten des Proteasoms ergibt sich eine interessante Strategie für einen „Immune escape“-Mechanismus. Eine komplette Unterdrückung des gesamten Proteasoms würde, wie erwähnt, möglicherweise auch die für die Zelle essentielle Eliminierung von falsch gefalteten Proteinen, Transkriptionsfaktoren und Zellzyklus-Regulatoren verhindern und damit den Vitalstoffwechsel der Zelle beeinträchtigen (Etlinger et al., 1977, Palombella et al., 1994, Glotzer et al., 1991, Rock et al., 1994, Hilt et al., 1995). Glas und Koautoren (1998) konnten zeigen, dass eine komplette Inaktivierung des Proteasoms innerhalb von 24 h zum Absterben einer Zelle führen kann. Ein effektiver „Immune escape“-Mechanismus sollte demnach die Herstellung antigener Peptide reduzieren, ohne die Funktion des Proteasoms für den vitalen Zellstoffwechsel zu beeinträchtigen. Dies deutet sich in den hier vorliegenden Ergebnissen an, da die Expressionen von PA28, LMP2 und LMP10, nicht aber die der anderen Komponenten des Proteasoms verringert sind.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach der Bedeutung weiterer Enzyme, die auf die Prozessierung antigener Peptide Einfluss nehmen können. Die Bedeutung der in der Einleitung erwähnten zytosolischen Peptidasen für die MHC Klasse I-Antigenpräsentation ist allerdings bisher nicht erwiesen, weshalb in der vorliegenden Arbeit die Expression dieser Enzyme nicht untersucht wurde. Die Analyse der Expression der ER-residenten Peptidase ERAAP zeigte allerdings, dass die Transkription dieses Enzyms in den HER-2/neu⁺-Zellen beeinträchtigt und durch IFN- γ induzierbar ist. Allerdings lagen keine Antikörper vor, um auch die Proteinmengen analysieren zu können. Eine Inhibitor der ER-residenten Peptidase ERAAP führt zu einer Reduktion der MHC Klasse I-Antigenpräsentation (Serwold et al., 2002; York et al., 2004; Saric et al., 2004).

Studien über die Expression dieses Enzyms in Tumoren oder transformierten Zellen wurden bisher nicht durchgeführt. Einen Hinweis auf eine potentielle Inhibition der extraproteasomalen Peptidproduktion lieferten Matsui und Koautoren (2001), die eine LMP2/LMP7-Defizienz durch stabilen Gentransfer revertierten. Da die Zellen ein HIV-Peptid trotz dieser Rekonstitution nicht prozessieren, kann vermutet werden, dass in diesen Tumorzellen auch die Prozessierung durch extraproteasomale Peptidasen inhibiert ist. Die Autoren postulieren aufgrund ihrer Daten, dass Tumorzellen neben der proteasomalen Peptidproduktion auch die Aktivität anderer Peptidasen blockieren können. Die vorliegende Arbeit liefert einen weiteren Hinweis auf diese Vermutung, da sowohl Komponenten des Proteasoms als auch ERAAP in ihrer Expression beeinträchtigt sind. Zu dieser Annahme passt die Hypothese, dass ERAAP vor allem bei der N-terminalen Modulation von Peptiden, die von dem Immunoproteasom generiert werden eine wichtige Rolle spielt. Allerdings ist noch nicht bekannt, inwieweit dies auch ohne den Einfluss von IFN- γ von Bedeutung ist. Die simultane Hemmung der für diese Funktion wichtigen Komponenten PA28, LMP2, LMP10 und ERAAP lassen vermuten, dass diese Enzymfunktionen auch im konstitutiven System eine essentielle Rolle spielen könnten. Es wird demnach postuliert, dass eine Onkogen-vermittelte Blockade der Expression von zytosolischen und ER-residenten Enzymen einen Mechanismus darstellt, der zu einer Hemmung der Antigenprozessierung in Tumoren führt.

5.1.2.2. Der TAP-Transporter

Eine HER-2/neu Überexpression führt in dem untersuchten Zellmodell zu verminderten RNS- und Proteinmengen von TAP1 und TAP2. Unter Einfluss von IFN- γ erhöht sich die Expression beider Untereinheiten bis zu dem Niveau der unbehandelten parental Zellen. Jedoch sind die Proteinmengen in den IFN- γ -behandelten HER-2/neu⁺-Zellen geringer als in den behandelten HER-2/neu⁻-Zellen. Die reduzierten Proteinmengen haben zur Folge, dass der Transport von antigenen Peptiden in den HER-2/neu⁺-Zellen vermindert ist (s. 4.2.4., S.81).

Die Inhibition des Peptid-Transporters TAP ist ein häufig beobachtetes Phänomen in Tumoren (Seliger et al., 2000; Ritz et al., 2001). Allerdings ist in den meisten Fällen nur die Expression von TAP1 beschrieben, da TAP2-spezifische Antikörper bisher nur sehr eingeschränkt verfügbar sind. Andererseits ist bereits mit einer verminderten TAP1-Expression die TAP-Funktion stark eingeschränkt (Van Kaer et al., 1992). Wie in der Einleitung dargestellt, wurden in den verschiedensten Tumortypen TAP-Defizienzen festgestellt (vgl. Tab. 1.2, S. 22), wie zum Beispiel im Brust-, Lungen-, Dickdarm-, Nieren-, Kopf-Hals-, Prostata- und Hautkrebs (Atkins et al., 2004; Kamarashev et al., 2001; Ritz et al., 2001; Seliger et al., 2000, 2003; Saunders et al., 1995). Neben den

Tumorfäzionen wurden auch zahlreiche transformierte Zelllinien untersucht, in denen eine reduzierte MHC Klasse I-Oberflächenexpression mit einer Hemmung der TAP-Expression korreliert (Seliger et al., 2000; Ritz et al., 2001). In den meisten Fällen konnte die fehlende oder verminderte Expression durch Stimulation mit IFN- γ wieder verstärkt werden, was darauf schließen lässt, dass es sich nicht um genetische Defekte handelt. Vielmehr mehren sich die Hinweise, dass die TAP-Expression in transformierten Zellen auf transkriptioneller Ebene gehemmt wird. Singal und Koautoren (1996) konnten verringerte, aber IFN- γ -induzierbare Expressionen von TAP1 und LMP2 in Zelllinien aus dem kleinzelligen Lungenkarzinom nachweisen. Die Autoren fanden eine veränderte Bindung von nicht weiter identifizierten Transkriptionsfaktoren an den bidirektionalen TAP1/LMP2-Promotor im Bereich des „Interferon Responsive Elements“, die durch IFN- γ -Behandlung wieder normalisiert werden konnte. Allerdings fehlt in den gezeigten Gelshift-Experimenten der Nachweis, dass diese Bindung spezifisch ist, da keine „Kompetitor-Oligonukleotide“ eingesetzt wurden. Harders (unpublizierte Daten) wies eine Hemmung der Promotoraktivität des TAP1/LMP2 Promotors in Ras-transformierten Zellen nach. Analog zu diesen Daten zeigen die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine gehemmte TAP1/LMP2-Promotoraktivität. Zusätzlich sind die Aktivitäten des TAP2- und Tapasin-Promoters vermindert. So kann vermutet werden, dass eine onkogene Transformation unter bestimmten Bedingungen einen negativen Einfluss auf die Promotoraktivitäten von TAP haben kann (siehe unten). Allerdings muss in diesem Zusammenhang berücksichtigt werden, dass auch eine Hemmung der TAP-Funktion auf der translationellen Ebene oder über eine veränderte Phosphorylierung erfolgen könnte. So supprimieren zum Beispiel HCMV-Viren die Funktion des Peptidtransporters über eine Phosphorylierung der TAP-Untereinheiten, was einen verminderten Peptidtransport zur Folge hat (Li et al., 2000).

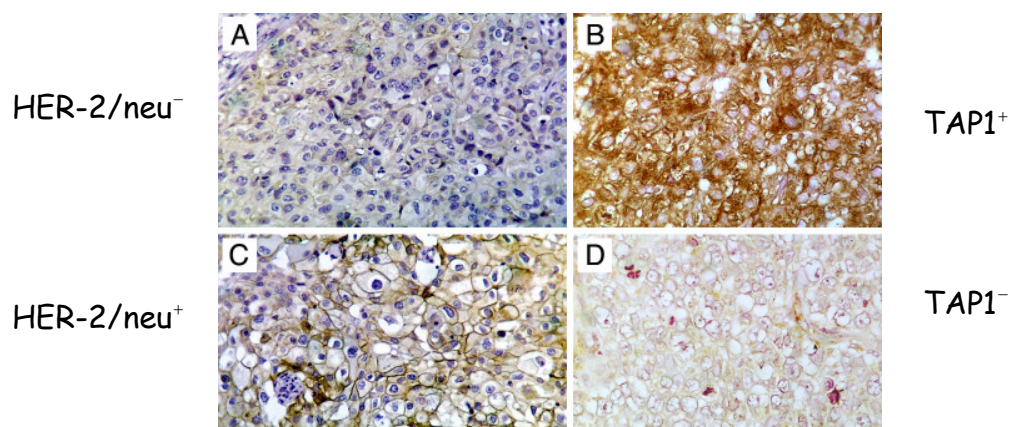
Die meisten Arbeiten, die eine verminderte TAP-Expression in Tumoren und Tumorzelllinien beschreiben, wurden im Hinblick auf die Bedeutung für die zelluläre Immunogenität durchgeführt. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist TAP für die Entwicklung einer CD8⁺-vermittelten Immunantwort entscheidend (van Kaer et al., 1992). Da sich eine TAP-Defizienz in vielen Tumortypen unterschiedlichster Histologie findet, führt dies zu der Frage, ob es sich bei diesen Effekten um einen generellen, regulativen „Immune escape“-Mechanismus handelt (Seliger et al., 1997). In verschiedenen Studien zeigte sich, dass transplantierte Tumorzellen in Mäusen schneller zu Tumoren auswachsen können, wenn sie TAP-defizient sind (Johnson, et al., 1999; Qin, et al., 2002). Die Abstoßung kann dagegen verbessert werden, wenn das Immunsystem der Mäuse zuvor durch eine Impfung sensibilisiert wird. Eine Injektion bestrahlter Tumorzellen, die nicht mehr proliferieren können und eine anschließende Impfung

mit vitalen TAP⁻-Tumorzellen führt zu einer Abstoßung der TAP⁻-Tumorzellen. Dies ist abhängig von einer CD8⁺ T-Zell-Antwort und einer ausreichenden IFN- γ -Produktion, die in den zuvor geimpften Mäusen, nicht aber in naiven Mäusen nachweisbar war (Qin et al., 2002). Da die Antigenpräsentation auch in den TAP⁻-Zellen durch IFN- γ induzierbar ist (Seliger et al., 1998), ist die Abstoßung der Tumore in den zuvor geimpften Mäusen mit einer durch die Impfung verursachten IFN- γ -Ausschüttung erklärbar und demnach von einer IFN- γ -induzierten TAP-Expression abhängig (Qin et al., 2002). Weitere Arbeiten dieser Autoren konnten zeigen, dass IFN- γ neben einer vermehrten Antigenpräsentation in den Tumorzellen auch antiangiogenetische Effekte auslöst, die vor der eigentlichen Tumor-Abstoßung beobachtet werden können. Hierbei spielt neben der CD8⁺- auch die CD4⁺-T-Zell-Antwort eine wichtige Rolle (Qin et al., 2000, 2003).

Ohne eine entsprechende Impfung ist die Modulation der TAP-Expression entscheidend für das Persistieren eines eingebrachten Tumors. Garcia-Lora und Koautoren (2003a, 2003b) konnten zeigen, dass die Anwesenheit zytotoxischer T-Zellen eine Inhibition der TAP-Expression induziert, da solche „Immune escape“-Varianten nur in immunkompetenten Mäusen, nicht aber in immundefizienten Nacktmäusen entstehen. Andere Studien wiesen im humanen Mammakarzinom eine negative Korrelation von TAP-Expression und Grad des Tumors nach, da die TAP-Transkripte in Metastasen gegenüber dem Primärtumor verringert sind (Kaklamanis et al., 1995; Vitale et al., 1998). Dies wurde auch im Nierenzellkarzinom gefunden (Seliger et al., 1997; Atkins et al., 2004).

Die Arbeiten an TAP-defizienten Zellen aus dem Mammakarzinom passt zu den hier angeführten Ergebnissen, dass die Expression von TAP-Untereinheiten durch HER-2/neu gehemmt werden kann, da HER-2/neu in vielen Zellen des Mammakarzinoms überdurchschnittlich stark exprimiert wird (Press et al., 1997; Slamon et al., 1989; Järvinen et al., 2003). Die inverse Korrelation zwischen HER-2/neu- und TAP-Expression findet sich in Metastasen oder späteren Tumorstadien (Kaklamanis et al., 1995, Vitale et al., 1998). Eine in dieser Klinik von Herrn Prof. Lehr durchgeführte Untersuchung an 38 Brustkrebsgeweben konnte diesen Zusammenhang bestätigen. In 19 HER-2/neu-überexprimierenden Geweben war die TAP1-Expression im Vergleich zu 19 HER-2/neu-negativen Geweben signifikant geringer (Abb. 5.1).

Abb. 5.1: HER-2/neu und TAP1-Expression im Mammakarzinom



Histologische Analyse aus 2 unterschiedlichen Brustkrebsgeweben mit hoher TAP1-Expression (B) bei niedriger HER-2/neu-Expression (A), bzw. den umgekehrten Zusammenhang (C und D). Aus Herrmann et al., 2003.

Auch aus den Studien mit Onkogen-transformierten Zellen kann eine negative Korrelation einer HER-2/neu- mit der TAP-Expression vermutet werden. So führt eine durch aktiviertes Ras ausgelöste Transformation in Fibroblasten zu verminderter TAP1-Expression (Seliger et al., 1998), was folglich auch in HER-2/neu-überexprimierenden Zellen zu erwarten ist.

5.1.2.3. Tapasin und andere Chaperone

Von den in dieser Arbeit untersuchten Chaperonen der Antigenprozessierung sind die Expressionen von Calretikulin schwach und von Tapasin stark in den HER-2/neu⁺-Zellen beeinträchtigt.

Die Hemmung von Tapasin ist im Hinblick auf einen möglichen „Immune escape“-Mechanismus interessant, da seine Funktion im Gegensatz zu den anderen erwähnten Chaperonen nur auf die Antigenprozessierung beschränkt ist. Tapasin ist häufig in Tumorzellen in seiner Expression beeinträchtigt. Betroffen sind zum Beispiel das Kleinzellige Lungenkarzinom, Pankreaskarzinom, Kolonkarzinom, Nierenkarzinom, Retinoblastom, orbitales Melanozytom und Melanom (Seliger et al., 2001a, 2001b; Atkins et al., 2004; Dissemond et al., 2003; Krishnakumar et al., 2004, 2003). In den meisten Fällen ist die Expression von Tapasin in diesen Zellen durch Zytokine, wie IFN- γ oder TNF- α , stimulierbar. Auch bei der adenoviralen Transformation ist die Tapasin-Expression gehemmt und über Zytokine stimulierbar (Bennett et al., 1999). Analog zu diesen Daten kann auch in dieser Arbeit die verminderte Tapasin-Expression durch IFN- γ gesteigert werden.

Aufgrund dieser durch Zytokininduktion reversiblen Inhibition der Tapasinexpression werden als Ursache für die Inhibition in transformierten Zellen regulative Mechanismen postuliert. Dies wird unterstützt durch die bereits erwähnten Studien von Garcia-Lora und Koautoren (2003a, 2003b), da in den „Immune escape“-Varianten der Tumore die Tapasin-Expression durch den Selektionsdruck des Immunsystems blockiert und durch IFN- γ induzierbar ist. Dies spricht gegen eine klonale Expansion von Zellen mit genetischen Alterationen als Ursache für einen Tapasin-Verlust in den Tumorzellen. Die Daten der Promotoranalysen dieser Arbeit unterstützen diese Vermutung, da die verminderten Transkriptmengen mit einer verringerten Aktivität des Tapasin-Promotors korrelieren und damit einen ersten Hinweis über die entsprechenden molekularen Ursachen der Regulation von Tapasin in transformierten Zellen liefern.

Die funktionale Bedeutung einer reduzierten Tapasin-Expression für die Immunogenität der Zellen ist ähnlich, wie bei einer TAP-Defizienz, da die Inhibition von Tapasin in verringerten oder instabilen MHC Klasse I-Komplexen auf der Zelloberfläche resultiert (Grande et al., 1997, 2000; Suh et al., 1999; Garbi et al., 2000). In Tapasin^{-/-}-Mäusen finden sich zwar MHC Klasse I-Komplexe an der Zelloberfläche, die jedoch aufgrund ineffizienter Peptidbeladung instabil und durch eine untypische Peptidspezifität charakterisiert sind. Aus diesen Daten wurde eine Rolle für Tapasin in der Auswahl des Peptidrepertoires im MHC Klasse I-Komplex postuliert (Paulsson et al., 2004). Als Folge der veränderten und verringerten PeptidAuswahl ist die CD8⁺-T-Zell-Antwort in Tapasin^{-/-}-Mäusen vermindert (Garbi et al., 2000). Zusammengefasst erscheint die simultane Inhibition von Tapasin und von TAP eine sehr effektive Form des „Immune escape“ darzustellen, da sowohl der Transport zytosolischer Peptide in das ER, als auch die Auswahl an antigenen Peptiden, die unabhängig von TAP im ER auf MHC Klasse-I-Komplexe geladen werden, beeinträchtigt sein könnten.

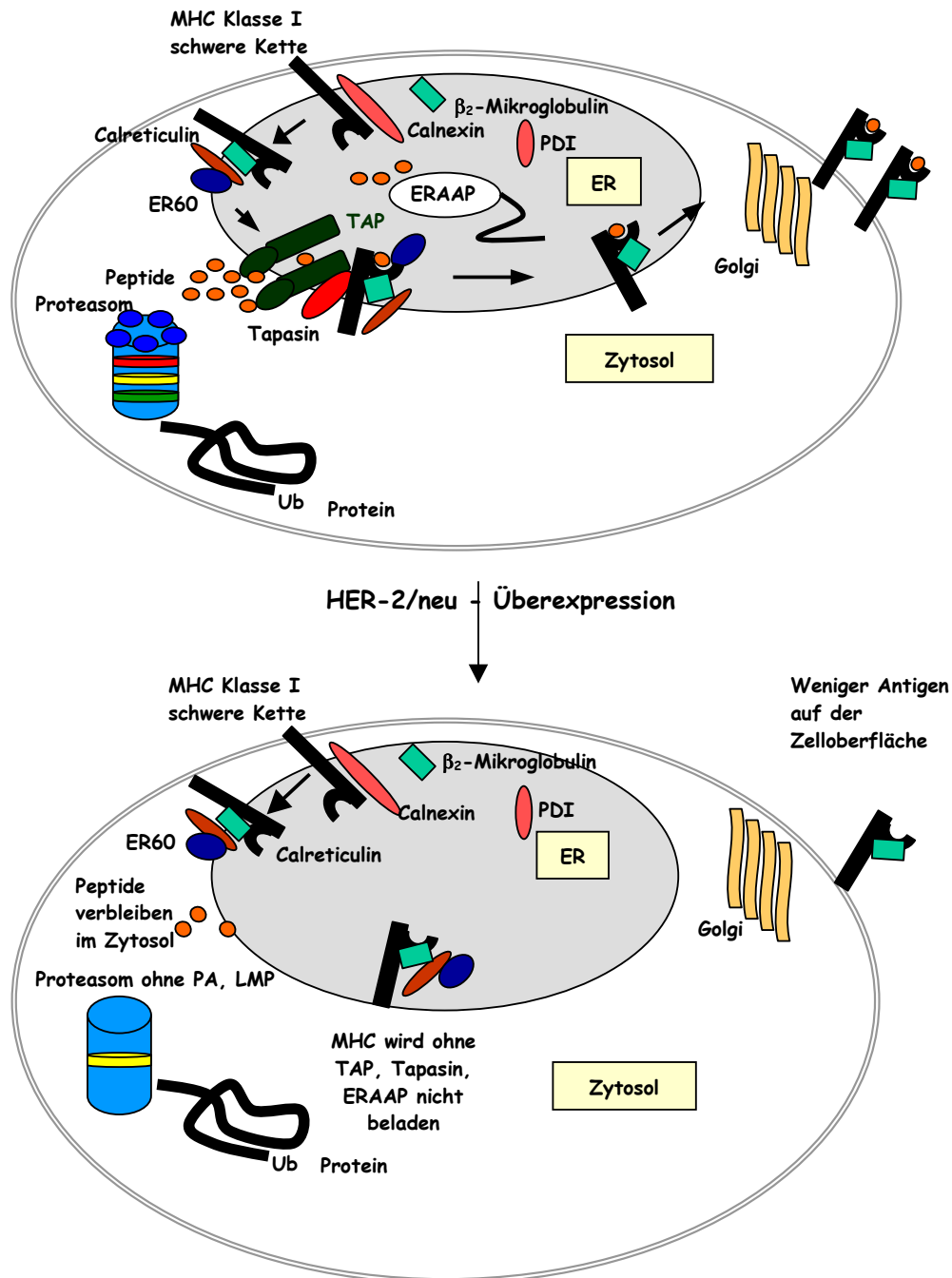
Eine verringerte Proteinmenge von Calretikulin wurde bisher selten in Tumoren und transformierten Zellen beschrieben. Dazu kommt, dass dieses Chaperon, ebenso wie Calnexin, ER60 und PDI nicht nur an der Antigenprozessierung beteiligt ist, sondern grundsätzlich die korrekte Faltung ER-residenter Proteine gewährleistet (Bouvier, 2003). Eine Hemmung dieser essentiellen Chaperone lässt vermuten, dass bei einem „Immune escape“-Mechanismus, ähnlich wie bei den Proteasom-Untereinheiten, nur diejenigen Moleküle supprimiert werden, die für den vitalen Zellstoffwechsel entbehrlich sind. Ritz und Koautoren (2001) konnten im Zervixkarzinom eine verminderte Expression von Calretikulin und Calnexin nachweisen, was auf die Funktion von alternativen Chaperonen schließen lässt. Die Hemmung von Calretikulin durch HER-2/neu-Überexpression fällt jedoch gesamt gering aus. Der Vergleich der Western Blot-Analysen

zeigt, dass PA28, LMP2, LMP10, TAP1 und Tapasin fast komplett fehlen, während die Calretikulin-Proteinmenge nur marginal vermindert ist.

5.1.3. Verringerte Antigenprozessierung durch HER-2/neu-Überexpression: Modell eines „Immune escape“-Phänotyp

Aus den oben angeführten Ergebnissen ergibt sich, dass HER-2/neu die MHC Klasse I-Antigenprozessierung auf mehreren Ebenen inhibiert. Allerdings wurden in dieser Arbeit andere Parameter, die die Immunogenität beeinflussen, wie zum Beispiel Kostimulation oder die Expression nicht klassischer MHC-Antigene nicht berücksichtigt. Die folgende Abbildung 5.2. soll die unterschiedlichen Komponenten, die durch HER-2/neu gehemmt werden, verdeutlichen:

Abb. 5.2: „Immune escape“-Phänotyp in HER-2/neu⁺ Zellen



Der „Immune escape“ beeinträchtigt die Generierung antigener Peptide im Zytosol und im ER, die TAP-Funktion und die Peptidbeladung, da die Komponenten PA28, LMP2, LMP10, TAP1, TAP2, Tapasin und ERAAP fehlen. Als Resultat finden sich deutlich weniger MHC Klasse I-Komplexe auf der Zelloberfläche.

5.1.4. Der Einfluss von IFN- γ

Eine Reihe von Publikationen belegen, dass eine HER-2/neu Überexpression *in vivo* zu Gen-Verlusten führen kann (Gallion et al., 1995; Verma et al., 1999; Brandau et al., 2001; Montagna et al., 2002; Schiffer et al., 2003). Schiffer und Koautoren (2003) induzierten in Mäusen HER-2/neu⁺-Tumore mit der Injektion von HER-2/neu⁺-Zellen, in denen die HER-2/neu-Expression durch Stimulation mit Anhydrotetrazyklin blockiert werden kann. Durch eine entsprechende Behandlung der Mäuse konnten die Tumore eliminiert werden, allerdings entstanden nach 20 Tagen HER-2/neu⁻-Tumor-Varianten in den Tieren. Ein erhöhter Selektionsdruck könnte demnach in HER-2/neu⁺-Zellen zu genetischen Defekten führen. Auch die Arbeiten an humanen Tumoren mit HER-2/neu-Überexpression zeigen, dass diese Tumore häufig genetische Defekte aufweisen (Järvinen et al., 2003). Die in dieser Arbeit untersuchten, durch HER-2/neu ausgelösten Defekte könnten deshalb auch auf genetischen Alterationen in den transformierten Zellen beruhen. Um dies auszuschließen, wurde gezeigt, dass eine Stimulation mit IFN- γ die Defekte regulieren kann, ohne dabei die Expression von HER-2/neu zu beeinflussen. Dies konnte in allen entsprechenden Experimenten bestätigt werden. Eine genetische Alteration kann damit als Ursache für die beobachteten Effekte ausgeschlossen werden.

Obwohl sich die Wirkung von IFN- γ in den semiquantitativen RNS- und Western Blot-Analysen nicht genau quantifizieren lässt, erscheint die Reversion durch das Zytokin nur unvollständig zu sein. Die HER-2/neu⁻-Zellen zeigen unter dem Einfluss von IFN- γ eine bessere TAP-Funktion und Antigenpräsentation als die HER-2/neu⁺-Zellen unter den gleichen Bedingungen. Dies entspricht einer Ras-induzierten Hemmung der Antigenprozessierung. In diesen Zellen ist die MHC Klasse I-Oberflächenexpression um etwa 50 % vermindert und erreicht unter IFN- γ -Einfluss das Niveau der unbehandelten parental Zellen (Seliger et al., 1998).

Weitere Studien zeigen, dass ein HER-2/neu-induzierter Effekt auf die Immunogenität der Zellen durch IFN- γ wieder rückgängig gemacht werden kann, ohne die HER-2/neu-Expression zu beeinflussen, so dass ein genetischer Defekt als Ursache für die verringerte MHC-Komplexzahl ausgeschlossen werden kann (Kono et al., 1997; Lollini et al., 1998). Dies deckt sich mit den zahlreichen Publikationen, die eine verminderte aber durch IFN- γ -stimulierbare Expression verschiedener APM-Komponenten in Tumoren, Tumorzelllinien und Onkogen- oder adenoviral-transformierten Zellen beschreiben (siehe oben). Die bereits postulierten regulativen Mechanismen, die in den transformierten Zellen zu verminderter Immunogenität führen, könnten sich dabei unter anderem auf Promotorebene abspielen, ohne die ISRE-Elemente und damit die IFN- γ -Induzierbarkeit zu beeinflussen. Diese Überlegung wird durch die dargestellten

Ergebnisse einer Ras-, und HER-2/neu-vermittelten Blockade von APM-Promotoren unterstützt.

Es stellt sich jedoch in diesen Zusammenhängen die Frage nach der Effektivität des „Immune escape“-Mechanismus, der durch inflammatorische Zytokine, wie IFN- γ , reversibel ist. Wie bereits erwähnt, ist die Induktion durch IFN- γ in dieser Arbeit in den HER-2/neu⁺-Zellen jedoch unvollständig und erreicht „nur“ das Niveau der parentalen, unstimulierten Zellen. Die in den Studien von Garcia-Lora und Koautoren (2003a, 2003b) beschriebene, durch T-Zellen ausgelöste Hemmung der Expression einzelner Gene der MHC Klasse I-Antigenpräsentation ist entsprechend den Ergebnissen dieser Arbeit durch IFN- γ induzierbar. Dies lässt vermuten, dass es sich in diesem Fall um effektive „Immune escape“-Mechanismen handelt, obwohl die Zytokininduktion die Immunogenität der Tumorzellen verbessern kann. Inwieweit es sich bei dem hier untersuchten Modell einer HER-2/neu-induzierten Hemmung der Antigenpräsentation ebenfalls um einen „effektiven“ Mechanismus handelt, bleibt offen. Zur Klärung dieser Frage könnten zum Beispiel Mausmodelle herangezogen werden, in die die hier untersuchten Zellen injiziert und die entstehenden Tumore hinsichtlich einer Abstoßung und der MHC Klasse I-Antigenpräsentation untersucht werden.

5.1.5. Die HER-2/neu Überexpression führt zu einem kompletten Verlust der Immunogenität

Die verminderte Expression des Immuno-Proteasoms, des Peptidtransporters TAP und dessen beeinträchtigte Funktion führt zu stark reduzierter MHC Klasse I-Oberflächenexpression in den HER-2/neu⁺-Zellen. Damit stellte sich die Frage, ob diese Zellen von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden können. Die Herstellung der für diese T-Zell-Analysen benötigten HLA-A2-Transfektanten bestätigte indirekt die oben angeführten negativen Effekte von HER-2/neu auf die intrazelluläre Antigenprozessierung, da die HLA-A2⁺-HER-2/neu⁺ Zellen weniger HLA-A2-Komplexe an der Zelloberfläche exprimieren als die HLA-A2⁺-HER-2/neu⁻-Zellen. Die HLA-A2-Oberflächenexpression kann aber durch eine Induktion mit murinem IFN- γ erhöht werden. Da dieses Zytokin in diesem Fall nur die Expression der murinen Gene der Antigenprozessierung, nicht aber die des humanen HLA-A2 steigert, ist die in den HER-2/neu⁺-Zellen geringe HLA-A2-Expression an der Zelloberfläche nur auf die verminderte Menge an antigenen Peptiden zurückzuführen. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass HER-2/neu die Herstellung antigener Peptide hemmt.

Die Ergebnisse der Chromfreisetzungs-Versuche bestätigten die Vermutung, dass die HER-2/neu⁺-Zellen aufgrund der verminderten Antigenpräsentation nicht erkannt werden können und damit die Immunantwort beeinträchtigt ist. Allerdings sind die

relativen Lyseraten sehr niedrig, da die spontane Lyse der Zellen in diesen Experimenten unverhältnismäßig hoch ist. Deshalb wurden die Experimente statistisch ausgewertet und der Unterschied zwischen den HER-2/neu⁺- und HER-2/neu⁻-Zellen als signifikant bestimmt ($p < 0,05$, Wilcoxon-test). Auch in diesen Experimenten zeigt sich der Einfluss einer Stimulation mit IFN- γ , da die stimulierten Zellen stärker lysiert werden als die unbehandelten Zellen. Die Antigenpräsentation ist demnach nicht „defekt“, sondern effektiv reduziert.

Einen Verlust der Immunogenität bei einer HER-2/neu-Überexpression deutete sich indirekt auch in der Studie von Castilleja und Koautoren (2001) an, in der die Degradation von HER-2/neu in Tumorzellen durch Geldanamycin induziert wurde, mit dem Ziel, die Menge an präsentierten HER-2/neu-Peptiden zu erhöhen. Dabei wird über eine gleichzeitige Zunahme von MHC Klasse I-Komplexen an der Zelloberfläche berichtet, die zu einer besseren Immunogenität der Zellen führt. Auch aus anderen Studien, in denen HER-2/neu über Inhibitoren oder Antikörper gehemmt wurde, lassen sich Hinweise auf eine inverse Korrelation von Immunogenität und HER-2/neu-Überexpression finden. Allerdings werden die präsentierten Daten meist auf den anti-proliferativen und/oder pro-apoptotischen Effekt fokussiert (Monden et al., 1999; Mann et al., 2001; Baselga, 2001; Moulder et al., 2001; Schiffer et al., 2003; Choudhury et al., 2004). Dabei wird teilweise auch eine inverse Korrelation von HER-2/neu- und MHC-Oberflächenexpression beschrieben (Choudhury et al., 2004; Castilleja et al., 2001).

Weitere Hinweise auf diese Zusammenhänge liefern Studien, in denen die Hemmung von HER-2/neu *in vivo* eine Tumorregression ermöglichen kann. Zum Beispiel berichten Norgaard und Koautoren (1999) über eine erfolgreiche Therapie von HER-2/neu⁺-Tumoren in HER-2/neu-transgenen Mäusen durch die Impfung mit einem Farnesyl-Transferase-Inhibitor, der die Ras-Aktivierung blockiert. Unter der Annahme, dass die HER-2/neu-Ras-Kaskade die Suppression der Antigenpräsentation induziert, sollte die Blockade dieses Signalwegs die Immunogenität der Zellen verbessern. Eine durch diesen Inhibitor verursachte Modulation der MHC Klasse I-Expression wurde allerdings nicht untersucht. Wolpoe und Koautoren (2003) konnten mit Hilfe von HER-2/neu-spezifischen Antikörpern eine CD8⁺-T-Zell-Antwort in HER-2/neu-transgenen Mäusen verbessern. Auch in klinischen Studien wurden durch den Einsatz des HER-2/neu-spezifischen Antikörpers „Herceptin“ in Kombination mit einer Chemotherapie die Heilungsraten verbessert (Baselga, 2001, Slamon et al. 2001, Vogel et al., 2002). Dieser Antikörper konnte in anderen Studien die zytotoxische Aktivität HER-2/neu-spezifischer T-Zellen gegen HER-2/neu-überexprimierende Tumorzellen *in vitro* erhöhen (Meyer zum Büschenfelde et al., 2002; Kono et al., 2004).

Möglicherweise wird durch die Blockade von HER-2/neu dessen Einfluss auf die Immunogenität der Tumorzellen ausgeschaltet. Allerdings berichten Kono und Koautoren (2004), dass die Expression von TAP1 und LMP2, sowie die MHC Klasse I-Oberflächenexpression bei einer über spezifische Antikörper induzierten HER-2/neu-Degradation unverändert bleibt. Sie führen die verbesserten Lyseraten vor allem auf die Zunahme von antigenen HER-2/neu-Peptiden zurück, da sich dieser Effekt über die Hemmung des Proteasoms inhibieren lässt. Dies würde gegen die in dieser Arbeit gefundenen inversen Korrelationen von HER-2/neu-Expression und Antigenpräsentation sprechen. Allerdings werden in der erwähnten Studie Zellen eingesetzt, deren HER-2/neu-Expression um ungefähr 50 % niedriger ist, als die in dieser Arbeit untersuchten HER-2/neu⁺-Zellen. Wie bereits erwähnt, könnte die Menge an HER-2/neu-Protein entscheidend sein, um einen signifikanten Effekt auf die Immunogenität nachzuweisen (Herrmann et al., 2004).

Somit ergibt sich aus den angeführten Daten die Frage, ob die verminderte Immunogenität bei einer HER-2/neu-Überexpression Einfluss auf die Therapie humaner Tumore mit zytotoxischen T-Zellen nehmen kann.

5.1.6. Ist HER-2/neu ein attraktives Ziel für T-Zell-vermittelte Immuntherapien ?

Die häufige Überexpression von HER-2/neu in Tumoren lässt vermuten, dass Peptide dieses Proteins in großer Anzahl über MHC Klasse I-Komplexe auf Tumorzellen präsentiert werden. Aufgrund dieser Annahme wurde in einer Vielzahl an Studien versucht, zytotoxische T-Zellen zu erzeugen, die auf Tumorzellen präsentierte HER-2/neu-Peptide erkennen können. Unterstützt wird dieser Ansatz dadurch, dass aus Patienten mit HER-2/neu⁺-Tumoren neben HER-2/neu-spezifischen Antikörpern auch entsprechend spezifische T-Zellen isoliert wurden, die HER-2/neu-Peptide auf Tumorzellen aus unterschiedlichen Geweben erkennen (Disis et al., 1994; Pupa et al., 1993; Peoples et al., 1995; Sotiropoulou et al., 2003). In verschiedenen Studien wurden insgesamt mehr als 30 Peptide sequenziert, die über MHC Klasse I- und Klasse II-Komplexe präsentiert werden (Correa et al., 2001; Kiessling et al., 2002) und die sich in der Qualität der Bindung an den MHC-Komplex, der Häufigkeit der *in vivo*-Präsentation, der Allel-Restriktion und in der Immunogenität unterscheiden (Rongcun et al., 1999; Kuhns et al., 1999; Seliger et al., 2000; Scardino et al., 2001; Correa et al., 2001; Kiessling et al., 2001). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde versucht, in HER-2/neu⁺-Tumor-Patienten eine tumorspezifische T-Zell-Antwort zu erzeugen. Dabei wurde zum Beispiel das HER-2/neu-Peptid „369-377“, das an MHC Klasse I-Komplexe binden kann, in Patienten mit Ovar- und Kolonkarzinom injiziert und nach zwei weiteren Restimula-

tionen aus den Probanden Peptid-spezifische T-Zellen gewonnen. Allerdings wurden HER-2/neu⁺-Tumorzellen *in vitro* von den T-Zellen nicht erkannt (Zaks et al., 1998). In anderen Studien konnte die T-Zell-Reaktivität durch Peptide, die sowohl über MHC Klasse I-, als auch Klasse II-Komplexe präsentiert werden können, gesteigert werden, was den Einfluss einer CD4⁺-Antwort in diesem Zusammenhang verdeutlicht (Disis et al., 1999; Knutson et al., 2001). Zur Optimierung der Antigenpräsentation in dem Patienten wurden auch Dendritische Zellen, die zuvor mit HER-2/neu-Peptiden stimuliert wurden, als Impfstoff eingesetzt und HER-2/neu-spezifische T-Zellen aus den Probanden isoliert (Brossart et al., 1998, 2000; Rongcun et al., 1999). In anderen Ansätzen wurden Dendritische Zellen verwendet, die mit einem HER-2/neu-kodierenden Virus infiziert waren, um zu gewährleisten, dass nur natürlich prozessierte Peptide auf MHC Klasse I- und Klasse II-Komplexen präsentiert werden (Specht et al., 1997, Meyer zum Büschenfelde et al., 2000, 2001).

Die meisten der angeführten Studien führen *in vitro*-T-Zell-Analysen als Beweis für den möglichen Erfolg klinischer Therapien an, in denen eine HER-2/neu-spezifische T-Zellantwort in den Patienten induziert werden soll. Aus den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen ergibt sich jedoch, dass der Einfluss von HER-2/neu auf die Antigenpräsentation eine derartige Strategie in Frage stellen könnte. Dies könnte einer der Gründe dafür sein, dass die bisher vorliegenden Heilungsraten bei den Impfstrategien zur Induktion HER-2/neu-spezifischer T-Zellen eher gering sind (Correa et al., 2001), während Therapien mit „Herceptin“, das zur Degradation von HER-2/neu führt, erfolgreicher angewendet werden (Vogel et al., 2002).

Betrachtet man die Effektivität der aus den Patienten generierten T-Zellen aus den oben angeführten Arbeiten anhand der angegebenen Lyseraten, so zeigt sich, dass HER-2/neu-spezifische T-Zellen unabhängig von der Herstellung oder dem präsentierten Peptid relativ geringe Lyseraten gegenüber HER-2/neu-überexprimierenden Tumorzellen zeigen. Sie liegen zum Beispiel bei einem E:T-Verhältnis von 10 : 1 bei etwa 5 % (Knutson et al., 2001) oder 12 % (Brossart et al., 2000). Dabei werden auch häufig die E:T-Verhältnisse mit 50-100 : 1 unverhältnismäßig hoch angesetzt (Brossart et al., 2000; Sotiropoulou et al., 2003), was den zu erwartenden *in vivo*-Bedingungen vermutlich nicht entspricht. Auf der anderen Seite zeigen die Daten von Kono und Koautoren (1997), dass bei dem eher physiologischen Effektor zu Target-Verhältnis von 1 : 20 Varianten entstehen können, die verminderte MHC Klasse I-Komplexe auf der Zelloberfläche tragen. Hieraus resultiert die Vermutung, dass eine Induktion einer HER-2/neu-spezifischen T-Zellantwort in einem Tumorpatienten die Ausbildung von „Immune escape“-Varianten positiv selektionieren kann. Dass diese „Escape“-Varianten nicht ausschließlich aufgrund eines Gen-Verlustes einer einzelnen Zelle entstehen, sondern

unter anderem das Ergebnis einer veränderten Regulation der transkriptionellen Kontrolle von Genen sein können, zeigen die Daten dieser Arbeit. Dies wiederum lässt den Schluss zu, dass sich HER-2/neu-überexprimierende Tumore relativ schnell und in vielen Zellen gleichzeitig einer Erkennung durch T-Zellen entziehen können.

Einige Studien bestätigten *in vivo* die Induktion dieses Mechanismus durch den über zytotoxische T-Zellen ausgelösten Selektionsdruck. Shanakaran und Koautoren (2001) verglichen RAG^{-/-}-Mäuse, die keine T-Zellen entwickeln, mit syngenen, immunkompetenten Mäusen hinsichtlich der Tumorprogression. Die Injektion von Tumorzellen aus syngenen Mäusen führte in beiden Mausotypen zu einem schnellen Tumorwachstum. Dagegen unterliefen Tumore aus RAG^{-/-} Mäusen in den immunkompetenten Mäusen zu 40 % einer Regression. Das bedeutet, dass diese Tumore, die nicht unter dem Selektionsdruck des Immunsystems entstanden waren, effektiver von dem Immunsystem erkannt werden. Verschiedene Autoren postulieren daher die Selektion von „Immune escape“-Varianten in Tumoren aufgrund des Selektionsdrucks durch das Immunsystem als einen generellen Mechanismus (Algarra et al., 2004; Garcia-Lora et al., 2003a, 2003b). In einer anderen Studie wurden die molekularen Ursachen, die durch den Selektionsdruck durch T-Zellen verursacht werden, in Ansätzen aufgeklärt. Tumorzellen, die keine Antigene auf der Zelloberfläche exprimierten wurden in immundefiziente Mäuse injiziert. Die entstandenen Tumorzellen wiesen ohne eine vorhandene T-Zellantwort wieder eine normale Antigenpräsentation auf. Dies wurde nicht festgestellt, wenn die Tumorzellen in immunkompetente Mäuse injiziert wurden (Garcia-Lora et al., 2001). RT-PCR-Analysen zeigten, dass in den Tumorzellen aus immunkompetenten Mäusen die Transkription von TAP1, TAP2, LMP2, LMP7, LMP10, Tapasin und Calnexin inhibiert wurde. Eine Stimulation mit IFN- γ führte dagegen wieder zu vermehrten Transkriptmengen (Garcia-Lora et al., 2003b). Die Tumorzellen modulierten demnach die Antigenpräsentation, je nach vorhandenem Selektionsdruck, durch eine veränderte transkriptionelle Regulation verschiedener Gene der MHC Klasse I-Antigenprozessierung. Diese Daten unterstützen die angeführte Hypothese, dass eine induzierte T-Zellantwort zu dem Entstehen von „Escape“-Varianten führen kann, die nicht auf genetischen Defekten beruhen, sondern das Ergebnis einer modulierten Antigenpräsentation ist. Diese Regulation erfolgt möglicherweise über einen generellen Mechanismus, da in unterschiedlichen Tumorarten jeweils die gleichen und über mehrere Genlozi verteilte Gene betroffen sind. So ist zum Beispiel LMP10 im Unterschied zu TAP nicht im MHC-Lokus codiert (Larsen et al., 1993; Beck et al., 1992). Zusammengefasst sind demnach Impfungen mit HER-2/neu spezifischen T-Zellen kritisch zu sehen, obwohl HER-2/neu aufgrund seiner Überexpression und der zahlreichen, natürlich präsentierten Peptide als „attraktives“ Ziel für diese Therapien gilt.

Jedoch kann HER-2/neu einen „Immune escape“ in Tumoren induzieren und dies kann wiederum durch einen über T-Zellen ausgeübten verstärkten Selektionsdruck favorisiert werden.

Alternativ zu diesen Ansätzen erscheint die Impfung mit HER-2/neu-spezifischen Antikörpern erfolgversprechender zu sein, wie verschiedene Studien mit „Herceptin“, das die extrazelluläre Domäne von HER-2/neu erkennt, zeigen konnten (Esteva, 2004). Der Erfolg einer entsprechenden Therapie wird in den klinischen Studien anhand einer verlängerten Lebenserwartung und dem geringeren Fortschreiten der Erkrankung im Vergleich zu Kontrollgruppen angeführt (Vogel et al., 2002). Jedoch ist die Erfolgsrate relativ gering. Cobleigh und Koautoren (1999) impften 222 Patienten und konnten in nur acht Patienten einen kompletten, und in 26 einen partiellen Rückgang des Tumors beobachten, obwohl in allen Patienten HER-2/neu-überexprimierende Tumore diagnostiziert wurden. Es wird daher vermutet, dass HER-2/neu⁺-Tumore eine Resistenz gegenüber der Antikörper-Therapie entwickeln können. Dies wurde bereits mit HER-2/neu⁺-Zelllinien, die in „Herceptin“-enthaltenen Medien proliferieren können, nachgewiesen (Kute et al., 2004; Nahta et al., 2004). Ob es sich dabei um genetische Alterationen, oder um regulative Mechanismen handelt, ist noch nicht geklärt. Möglicherweise spielt die genetische Instabilität in den meist fortgeschrittenen Tumorstadien eine wichtige Rolle, da die erhöhte Mutationsrate eine positive Selektion Therapie-resistenter Tumorzellen ermöglichen könnte.

Im Allgemeinen wird die Antikörper-vermittelte Therapie durch eine zusätzliche Behandlung mit Chemotherapeutika ergänzt, was die Heilungsrate verbessern kann (Slamon et al., 2001, Baselga et al., 2001). Allerdings wurde festgestellt, dass die Therapie mit „Herceptin“ in Kombination mit Chemotherapeutika zu Herzerkrankungen führen kann (Perez et al., 2004). So berichten Slamon und Koautoren (2001), dass 27 % der behandelten Patienten eine abnormale Herzfunktion als Folge der Therapie aufwiesen. Möglicherweise lässt sich dieses Risiko durch die Verwendung spezieller Chemotherapeutika reduzieren (Eidtmann et al., 2004; Perez et al., 2004; Schimmel et al., 2004). Neue Daten lassen vermuten, dass die toxischen Nebenwirkungen einer „Herceptin“-Behandlung unter anderem mit der Bedeutung von HER-2/neu für die Herzfunktion zusammenhängen. Studien mit transgenen Mäusen, die eine ventrikular-restringierte Defizienz von HER-2/neu aufweisen, entwickeln Kardiomyopathien und zeigen eine verminderte Kontraktionsfähigkeit des Herzmuskels (Cron et al., 2002; Negro et al., 2004).

5.2. Molekularer Mechanismus der HER-2/neu-vermittelten Hemmung der Antigenprozessierung

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Aufklärung der molekularen Ursachen der HER-2/neu-induzierten Hemmung der MHC Klasse I-Antigenprozessierung. Die Analyse der Expressionsmuster der entsprechenden Gene ergab, dass es sich hierbei um ein komplexes Phänomen handelt, da eine Mehrzahl an Genen involviert ist, die sich sowohl hinsichtlich des Genlokus, als auch der Funktion des Proteinproduktes unterscheiden. Dies lässt darauf schließen, dass verschiedene Regulationen auf unterschiedlichen Signalwegen parallel erfolgen.

Es wurde deshalb entschieden, den Schwerpunkt auf die Regulation von TAP und Tapasin zu setzen, da es sich bei diesen Molekülen um wichtige Komponenten der Antigenprozessierung handelt. Dagegen ist die Bedeutung für die Immunantwort von LMP und PA28 ohne Zytokineinfluss noch nicht bewiesen. Aufgrund der verringerten RNS-Mengen von TAP und Tapasin wurde vermutet, dass diese Gene unter anderem transkriptionell reguliert werden. Deshalb wurden die Promotoren dieser Gene kloniert und hinsichtlich ihrer Aktivität untersucht. Ziel dabei war es, Sequenzbereiche zu detektieren, die für die HER-2/neu-vermittelte Hemmung der Transkription essentiell sind.

5.2.1. HER-2/neu hemmt die Promotoraktivität von TAP und Tapasin

Es zeigte sich, dass die Promotoren von TAP1/LMP2, TAP2, und Tapasin in ihrer Aktivität in den HER-2/neu⁺-Zellen vermindert und durch IFN- γ induzierbar sind. Dies war aufgrund der RT-PCR Analysen erwartet worden.

In der Literatur finden sich zahlreiche Daten, die einen Einfluss von HER-2/neu auf die Promotoraktivität verschiedener Gene nachweisen (Hynes et al., 2001; Sistonen et al., 1989; Ye et al., 1996; Reese et al., 1997; Prenzel et al., 2001; Galang et al., 1996; Yarden et al., 2001). Allerdings beschreiben die meisten Arbeiten eine Induktion der Transkription, während in dieser Arbeit eine Inhibition der Promotoraktivität vorliegt. Ein repressiver Einfluss von HER-2/neu auf einen Promotor wurde zum Beispiel anhand des Membranproteins MUC-1 gezeigt, dessen Promotoraktivität in HER-2/neu⁺-Tumoren herunterreguliert ist (Adriance et al., 2004). In einigen Studien konnten auch die Signalkaskaden aufgeklärt werden, die für die HER-2/neu-vermittelte Inhibition von Promotoren bestimmter Gene verantwortlich sind. Dabei fällt auf, dass die Regulation häufig unter Einfluss der Ras- oder PI3K-Kaskade erfolgt. Ye und Koautoren (1996) konnten zum Beispiel nachweisen, dass die Transkription von α_2 -Integrin durch die Signalkaskade HER-2/neu-Ras gehemmt wird, welche die Bindung von SP1 an den Integrin-Promotor blockiert. Die gleiche Signalkaskade führt über bisher noch nicht

bekannte Transkriptionsfaktoren zu einer Hemmung des Promotors des Tumorsuppressors Rho-B (Jiang et al., 2004). Oh und Koautoren (2001) konnten die verminderte Transkription des Östrogen-Rezeptors auf eine HER-2/neu-induzierte Ras-MAPK-Aktivierung zurückführen. Dagegen ist die Reprimierung des Promotors von MUC-1 sowohl von aktiviertem Ras, als auch der PI3-Kinase (PI3K) in HER-2/neu überexprimierenden Zellen abhängig (Scibetta et al., 2001). Auch in den meisten Studien, die eine Aktivierung von Promotoren durch HER-2/neu genauer charakterisierten, konnten als verantwortliche Signalmoleküle Ras oder PI3K identifiziert werden, wie zum Beispiel bei der Regulation der Promotoren von CyklinD1 (Lee et al., 2000), Prolyl-isomerase PIN1 (Ryo et al., 2002), „Fatty acid Synthase“ FAS (Kumar-Sinha et al., 2003) und „Vascular endothelium growth factor receptor“ VEGFR (Maity et al., 2000).

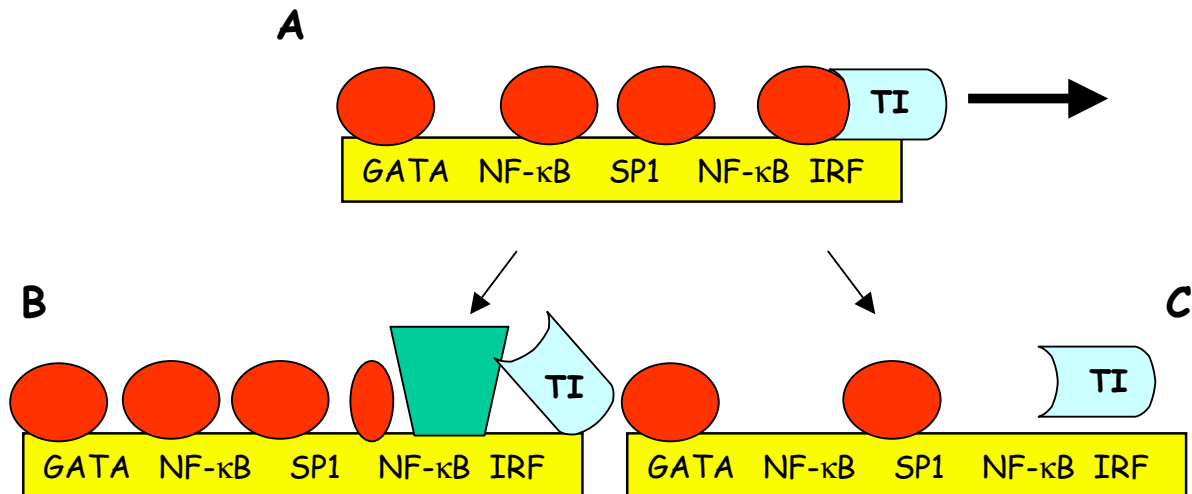
Analog zu diesen Daten zeigt sich in den Ergebnissen dieser Arbeit eine mögliche Beteiligung der Ras-Kaskade bei der Hemmung des TAP2-Promotors, da dieser sowohl in HER-2/neu⁻, als auch in Ras⁺-Zellen geringere Aktivität im Vergleich zu den parentalen Zellen aufweist. Frühere Studien in der Arbeitsgruppe konnten den gleichen Effekt von Ras auf den TAP1/LMP2 Promotor belegen (Harders, nicht publizierte Daten), der auch in den HER-2/neu⁺-Zellen herunterreguliert ist. Dagegen wird der Tapasin-Promotor nur in den HER-2/neu⁺, nicht aber in den Ras⁺-Zellen inhibiert. Dies gibt Anlass zur Spekulation, dass HER-2/neu über die Ras-Signalkaskade die Promotoren von TAP1, TAP2 und LMP2 reguliert und ein Ras-unabhängiger Signalweg zur Hemmung der Tapasin-Transkription führen könnte. Der Einsatz von Inhibitoren konnte diese Vermutung zum Teil bestätigen, da die Behandlung mit dem Proteinkinase C-Inhibitor Staurosporin die HER-2/neu-vermittelte Hemmung des Tapasin-Promotors revertieren konnte. Dieser Effekt wurde durch den Einsatz von Inhibitoren gegen die durch Ras aktivierbare MAP-Kinase oder gegen PI3-Kinase nicht erreicht. Allerdings konnte ebenfalls kein Einfluss dieser Inhibitoren auf die Hemmung der TAP1/LMP2- und TAP2-Promotoraktivität nachgewiesen werden, obwohl diese Promotoren in Ras⁺-Zellen inhibiert sind. Dies könnte jedoch auch mit einer unzureichenden Blockade dieser Signalmoleküle durch die entsprechende Inhibitor-Menge zusammenhängen. Eine genauere Aufklärung dieser Zusammenhänge erfordert die Analyse der Phosphorylierung von Komponenten der unterschiedlichen Signalkaskaden in zukünftigen Experimenten.

5.2.2. Die HER-2/neu-induzierte Hemmung des Tapasin-Promotors erfolgt über die Bindung eines E2F/E2F/P300-Komplexes

Aus den Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass durch HER-2/neu Transkriptionsfaktoren auf eine andere Art an die Promotoren von TAP und Tapasin binden

als in den parentalen Zellen. Dies hat auf die Transkription einen hemmenden Einfluss, wofür sich unterschiedliche Erklärungsmöglichkeiten anbieten (Abb. 5.3).

Abb. 5.3: Modell einer HER-2/neu-verursachten Hemmung der Promotoraktivität:



In der Ausgangssituation (A) binden verschiedene Transkriptionsfaktoren an den Promotor. Damit verbessern sie die Bindung des Initiationskomplexes (TI) an den Promotor und aktivieren so die Transkription. Eine Hemmung der Promotoraktivität könnte entstehen, wenn zusätzlich ein Repressor an den Promotor bindet, der die Bindung der anderen Transkriptionsfaktoren beeinflusst (B), oder wenn bestimmte Transkriptionsfaktoren nicht mehr an den Promotor binden (C).

Aufgrund der unterschiedlichen Signalkaskaden, die durch HER-2/neu aktiviert werden, finden sich zahlreiche Transkriptionsfaktoren, die unter Einfluss von HER-2/neu reguliert werden können. Zu diesen Faktoren zählen zum Beispiel Myc (Hynes et al., 2001), AP1 (Sistonen et al., 1989; van Dame et al., 2001; Rogatsky et al., 2001), AP2 (Hollywood et al., 1993; Galang et al., 1996; Vernimmen et al., 2003), SP1 (Ye et al., 1996), NF-κB (Galang et al., 1996; Reese et al., 1997; Zhou et al., 2000; Pianetti et al., 2001, Prenzel et al., 2001) oder Faktoren der Ets-Familie (Yordy et al., 2000; Bosc et al., 2001). Wie bereits erwähnt kann HER-2/neu durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren die Promotoraktivität eines Gens inhibieren (Adriance et al., 2004; Jiang et al., 2004; Ye et al., 1996). Es stellte sich deshalb die Frage, welche Transkriptionsfaktoren bei der Hemmung von TAP und Tapasin eine Rolle spielen.

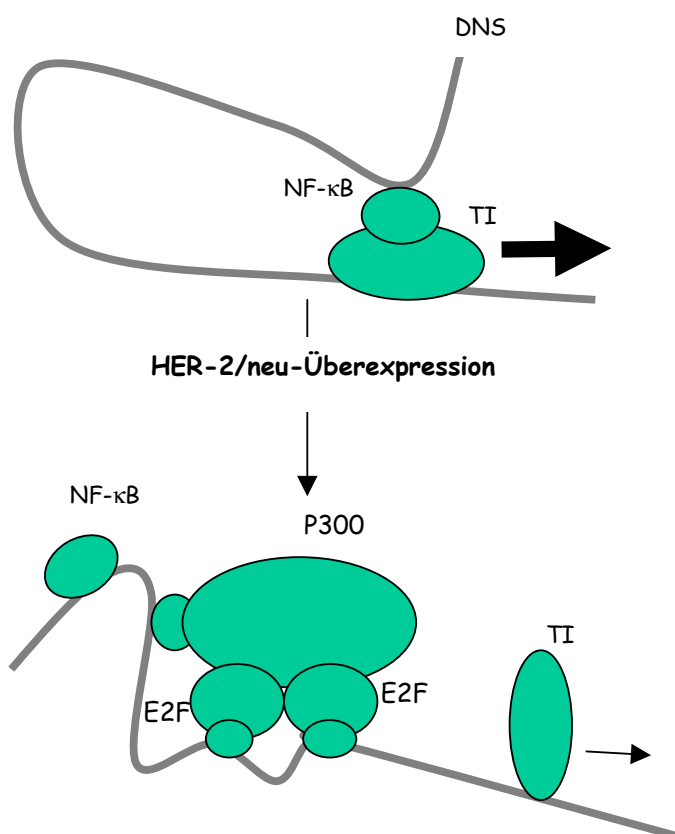
Die vergleichende Analyse der Promotorsequenzen auf gemeinsame Muster von Bindungsmotiven ergab mehrfach auftretende Bindungsmotive für SP1, GATA, NF-κB, E2F und IRF, so dass sich für eine HER-2/neu-induzierte Suppression der Promotoraktivitäten viele verschiedene Zielregionen voraussagen ließen. Auch die Analysen der Deletionsmutanten der Promotoren von TAP2 und Tapasin ergaben keine eindeutigen Hinweise, bis auf die Tatsache, dass die Wt-Promotoren am stärksten durch HER-2/neu

inhibiert werden können. Dies führt zu der Vermutung, dass die Hemmung der Aktivität durch die simultane Bindung von mehreren Faktoren an unterschiedlichen Stellen der Promotoren vermittelt wird. Deshalb wurden am Beispiel des Tapasin-Promotors die Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren durch Mutation eliminiert, um deren Einfluss auf die HER-2/neu-induzierte Hemmung des Promotors zu untersuchen.

Es zeigte sich, dass die Inaktivierung von drei Motiven für E2F bzw. P300 in allen drei Fällen die Promotoraktivität in beiden Zellen steigert. Beim Vergleich der Aktivitäten dieser Promotormutanten zwischen den HER-2/neu⁺- und HER-2/neu⁻-Zellen wurde deutlich, dass diese Motive essentiell für die HER-2/neu-induzierte Hemmung der Promotoraktivität sind. In den Gelshift-Experimenten konnte die Bindung von nukleären Proteinen an diese Promotorregionen nachgewiesen werden. Dabei ist die Bindung nur möglich, wenn alle drei Motive simultan angeboten werden (vgl. Abb. 5.4.). Dies erklärt, warum die Mutation nur eines dieser Motive die HER-2/neu-induzierte Hemmung des Promotors aufheben kann.

Aus diesen Daten kann gefolgert werden, dass HER-2/neu die Bindung eines Komplexes aus zwei E2F- und einem P300-Faktor an den Tapasin-Promotor induziert, was zu einer Suppression der Transkription führt (Abb. 5.4.).

Abb. 5.4: Modell einer HER-2/neu-vermittelten Hemmung der Tapasin-Promotoraktivität

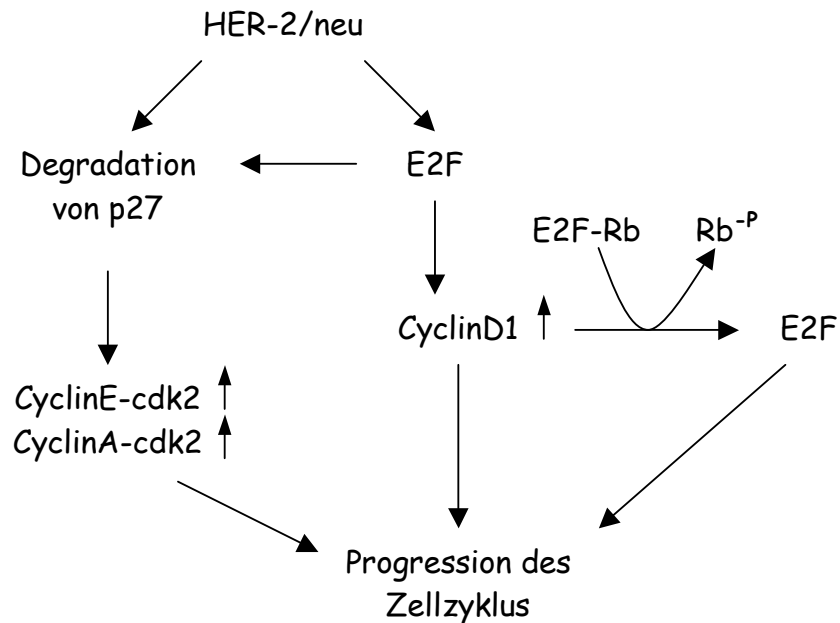


Unter normalen Bedingungen kann der Transkriptions-Initiations-Komplex (TI) durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel NF-κB, die DNS stabil binden und die rNS effektiv synthetisieren

Bei HER-2/neu-Überexpression kommt es zur Bindung eines Komplexes aus zwei E2F und einem p300 Molekül, der nur als trimerer Komplex an drei Regionen den Promotor bindet und so die Interaktion zwischen NF-κB und TI verhindert. Die Folge könnte sein, dass die Bindung des TI weniger stabil ist und weniger rNS synthetisiert wird.

Diese Ergebnisse sind insofern von besonderem Interesse, da der über HER-2/neu aktivierbare Faktor NF- κ B, der in der transkriptionellen Regulation der MHC-Gene (van den Elsen et al., 1998a), von TAP1/LMP2 (Wright et al., 1995, Chatterjee-Kishore et al., 1998) und, wie gezeigt, auch von Tapasin eine wichtige Rolle spielt, nicht für die Hemmung der Promotoraktivität von Tapasin verantwortlich ist. Dagegen konnte E2F bisher nicht in Verbindung mit immunologisch relevanten Gen-Regulationen gebracht werden. Vielmehr ist dieser Faktor vor allem für die Modulation des Zellzyklus essentiell (Stevaux et al., 2002; Cam et al., 2003). In diesem Zusammenhang wurde auch eine Interaktion zwischen HER-2/neu und E2F identifiziert. Zum Beispiel reguliert HER-2/neu über die Aktivierung der MAP-Kinase die Bindung von E2F an den CyclinD1-Promotor, was die Freisetzung weiterer E2F-Faktoren zur Folge hat (Lee et al., 2000; Morris et al., 2000). Beide Komponenten, E2F und HER-2/neu, bewirken auch die Destabilisierung des Inhibitors p27, was wiederum die Aktivierung von CyclinE-cdk2 und CyclinA-cdk2 und den Eintritt der Zelle in die G1-Phase bewirkt. Folglich haben beide Komponenten denselben stimulierenden Effekt auf die Zellteilung (Abb. 5.5). Auch die Expression der Prolylisoimerase PIN1 wird durch die HER-2/neu-Ras-induzierte Bindung von E2F an den entsprechenden Promotor ermöglicht, was die Proliferation von Epithelzellen stimuliert (Ryo et al., 2002). In lymphoiden Zellen wird E2F durch die PI3-Kinase und Akt aktiviert (Brennan et al., 1997), so dass eine HER-2/neu-induzierte E2F-Bindung an Promotoren auch über PI3K erfolgen könnte.

Abb. 5.5: HER-2/neu und E2F im Zellzyklus



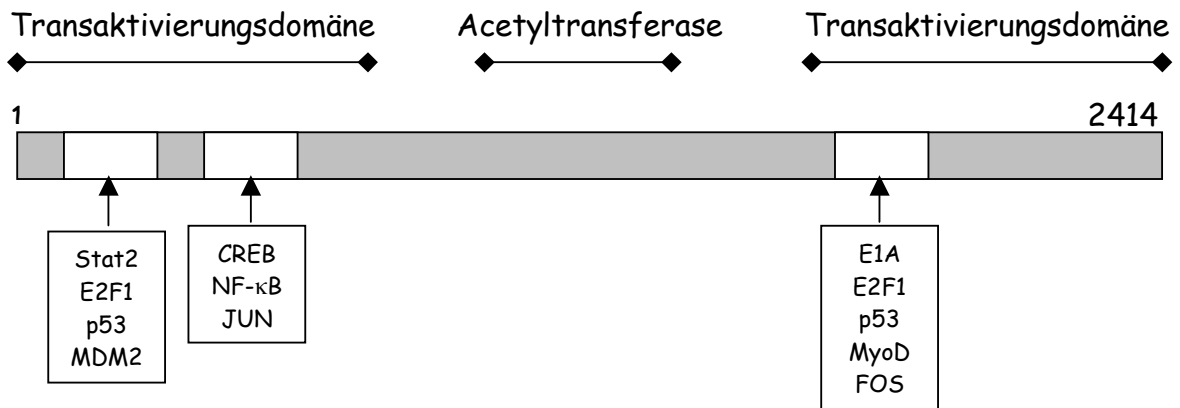
HER-2/neu und E2F bewirken ein Fortschreiten des Zellzyklus. Dabei kann HER-2/neu seine Wirkung über E2F und die Expression von CyclinD1 sowie über die Aktivierung von CyclinE und Cyclin A ausüben.

Der Einfluss von E2F auf den Zellzyklus kann je nach den bindenden Faktoren sowohl repressiv als auch aktivierend sein. Die Faktoren E2F1, E2F2 und E2F3 gelten als Aktivatoren, wohingegen E2F4, 5, 6, 7 meist repressiv auf die Promotoren wirken (Stevaux et al., 2002; Cam et al., 2003; Bruin et al., 2003). Die Hemmung des Promotors der Telomerase Reversen Transkriptase TERT durch E2F1 zeigt allerdings, dass diese Einteilung nicht absolut ist (Crowe et al., 2001). Aus den bisherigen Publikationen, die eine Hemmung von Promotoraktivitäten durch E2F beschreiben, lassen sich die repressiven Wirkungen vor allem in ruhenden Zellen nachweisen, während die aktivierenden Eigenschaften von E2F1, 2, 3 den Zellzyklus in der späten G1- und der S-Phase antreiben (Stevaux et al., 2002; Cam et al., 2003). Wie im Ergebnisteil angeführt, befinden sich die HER-2/neu⁺-Zellen häufiger in der S-Phase als die HER-2/neu⁻-Zellen und zeigen höhere Proliferationsraten (Tab. 4.1., S.72). Der repressive Einfluss von E2F auf die Tapasin-Transkription steht demnach im Gegensatz zu den bisherigen Daten, da sich hier der hemmende Einfluss durch E2F in proliferierenden (HER-2/neu⁺) statt in ruhenden (HER-2/neu⁻) Zellen vermuten lässt. Analog zu den hier gefundenen Ergebnissen, die eine DNS-Bindung eines E2F-enthaltenen Repressor-Komplexes vermuten lassen, bindet E2F an die DNS häufig im Komplex, zum Beispiel als Dimer zusammen mit dem E2F-Dimerisations Partner (DP), wobei die Spezifität der Bindung von dem E2F-Faktor abhängig ist (Dyson, 1998). Die Regulation des Cyclin-Kinase-Inhibitors p18^{INKac} erfolgt über die simultane Bindung von

E2F1, E2F4 und SP1 in einem Multiproteinkomplex an den Promotor (Blais et al., 2002). Auch für die repressive Wirkung auf Promotoren durch E2F ist eine Komplexbildung essentiell, da gezeigt werden konnte, dass die entsprechenden Promotoren von Repressorkomplexen aus E2F4, P130 und der Histon-Deazetylase HDAC gebunden sind. Dieser Komplex wird bei Fortschreiten des Zellzyklus durch die Aktivatoren E2F1, 2, 3 verdrängt (Rayman et al., 2002; Ren et al., 2002; Takahashi et al., 2000). Folglich ist die Komplexbildung von E2F-Faktoren mit Histon-modifizierenden Enzymen, zu denen auch P300 zählt und die vermutlich bei der Hemmung des Tapasin-Promotors auftritt, bereits bekannt. In den erwähnten Studien wurde die Bedeutung der Histon-Deazetylasen allerdings im Zusammenhang mit ihrer enzymatischen Funktion gesehen, da die Detektion des Repressor-Komplexes mittels Chromatin-Immunopräzipitation erfolgte. Gelshiftassays mit isolierten und entsprechend nicht über Histone geschützten Oligonukleotiden wurden nicht durchgeführt. Möglicherweise bindet dieses Enzym in den genannten Studien nicht direkt ein Erkennungsmotiv im Promotor, sondern indirekt an die DNS über die Komplexbildung mit dem DNS-bindenden E2F-Faktor. Im Gegensatz dazu ist in dieser Arbeit die Bindung der Histon-Azetyltransferase P300 an ein Motiv in dem Tapasin-Promotor essentiell für die Hemmung der Aktivität, da dessen Mutation die Bindung aufheben kann.

Die meisten Daten, die einen Einfluss auf die Promotoraktivität durch P300 beschreiben, beziehen diese Wirkung vor allem auf die Bindung von P300 an Transkriptionsfaktoren, was vermutlich aufgrund der enzymatischen Eigenschaft von P300 den Zugang zur DNS erleichtert (Chan et al., 2001). Unter den Transkriptionsfaktoren, die P300 binden und die über HER-2/neu reguliert werden, finden sich zum Beispiel STAT1, AP1 (c-jun, c-fos), Ets-1, CREB und E2F (Goodmann, et al., 2000, Abb. 5.6).

Abb. 5.6: Organisation des P300-Proteins



Sowohl am N-, als auch am C-Terminus befinden sich Transaktivierungsdomänen und in der Mitte ist die enzymatische Aktivität der Acetyltransferase lokalisiert. Mehrere Bereiche innerhalb der Transaktivierungsdomänen können Transkriptionsfaktoren binden, von denen einige hier dargestellt sind. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass zwei Bindungsstellen für E2F1 vorliegen (verändert nach Chan et al., 2001)

Neben der Eigenschaft als Komplexbildner von Transkriptionsfaktoren kann P300 auch selbst an eine spezielle DNS-Konsensussequenz, die dem Erkennungsmotiv für NF-κB ähnelt, binden (Rikitake et al., 1992). Da die Bindung von P300 an Promotoren meist im Zusammenhang mit anderen Transkriptionsfaktoren erfolgt, wird vermutet, dass diese Bindung die Bildung und DNS-Bindung spezieller Transkriptionsfaktor-Komplexe erleichtert (Chan et al., 2001). Zum Beispiel hemmt das adenovirale Protein E1A die Aktivität des HER-2/neu-Promotors über die DNS-Bindung von P300 (Chen et al., 1997). Der gleiche Promotor wird durch die Wirkung von P300 und des Transkriptionsfaktors ER81 aktiviert. Dabei handelt es sich um einen positiven „Feedback-Loop“ in dem HER-2/neu über die Aktivierung der MAP-Kinase den Komplex P300-ER81 stimuliert, der seinerseits die HER-2/neu-Transkription aktiviert (Bosc et al., 2002). Die Aktivierung von P300 durch HER-2/neu kann auch über den Akt-Signalweg erfolgen. So wird über diese Signalkaskade das p53-bindende MDM2 phosphoryliert, welches in seiner phosphorylierten Form mit P300 assoziieren kann und die Degradation von p53, sowie antiapoptotische Signale auslöst (Zhou et al., 2001). P300 ist somit direkt an der veränderten Regulation von Zellzyklus und Apoptose in HER-2/neu-überexprimierenden Zellen beteiligt. Ein Zusammenhang zwischen P300 und der transkriptionellen Regulation von TAP und Tapasin ist bisher nicht beschrieben worden. Allerdings spielt P300 bei der Aktivierung und Stabilisierung des „Enhancosoms“ der Transkription der MHC Klasse I-Allele eine wichtige Rolle. Dieser Einfluss spiegelt sich jedoch nicht in einer direkten Bindung an den Promotor, sondern über die Bindung von P300 an die

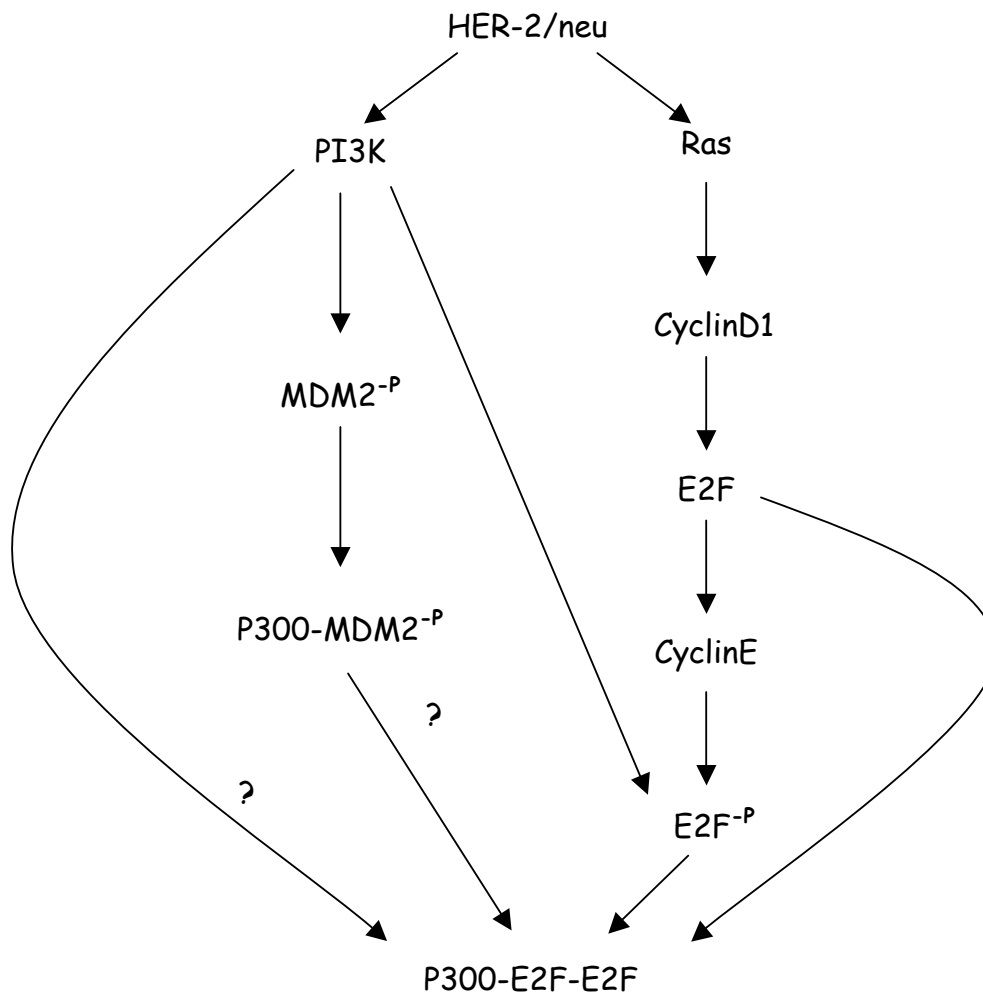
beteiligten Transkriptionsfaktoren wider (van den Elsen et al., 1998b; Gobin et al., 2001).

Zusammenfassend wird die Vermutung, dass P300 zusammen mit E2F bei HER-2/neu-Überexpression den Tapasin-Promotor hemmt, dadurch unterstützt, dass P300 und E2F durch HER-2/neu-induzierte Signalkaskaden aktiviert werden können und P300 sowohl DNS als auch E2F binden kann.

Nachdem die Hemmung der Promotoraktivität von Tapasin auf die Wirkung eines Repressor-Komplexes, der an E2F und P300 Motive im Promotor bindet, zurückzuführen war, wurde untersucht, ob diese Motive auch für die Regulation von LMP2, TAP1 und TAP2 von Bedeutung sind. Die Inaktivierung dieser Motive ergab jedoch, dass diese Regionen in den Promotoren keinen Einfluss auf die HER-2/neu-induzierte Hemmung der Promotoraktivität haben. Allerdings ist auch denkbar, dass die rein theoretisch durchgeführte Analyse auf Bindungsmotive etwaige Bindungsstellen in der DNS nicht findet, obwohl in der Zelle dennoch E2F und P300 an diese Promotoren binden können.

Aus den Daten der Literatur lassen sich zwei Signalkaskaden vermuten, die die Bildung eines E2F/E2F/P300-Komplexes induzieren könnten (Abb. 5.7):

Abb. 5.7: Potentielle Signalwege von HER-2/neu zur Komplexbildung von E2F und P300



Hypothetischer Signalweg von HER-2/neu zu einer Komplexbildung von E2F und P300. Die Kaskade wäre über PI3K und/oder Ras denkbar. Die Fragezeichen stehen für einen hypothetischen Weg, die anderen Pfeile sind bereits bekannt (siehe Text).

Allerdings lassen folgende Daten aus der vorliegenden Arbeit vermuten, dass der Tapasin-Promotor unabhängig von Ras reguliert wird:

- i. Der Tapasin-Promotor wird in HER-2/neu⁻, nicht aber in Ras⁺-Zellen inhibiert.
- ii. Die Hemmung der MAPKinase und PI3Kinase hat vermutlich keinen Einfluss auf diesen Effekt.
- iii. Die Hemmung der PKC kann den HER-2/neu-induzierten Effekt aufheben.
- iv. Die Promotoren von TAP1/LMP2 und TAP2 werden vermutlich nicht durch E2F/P300-Bindungsmotive inhibiert.

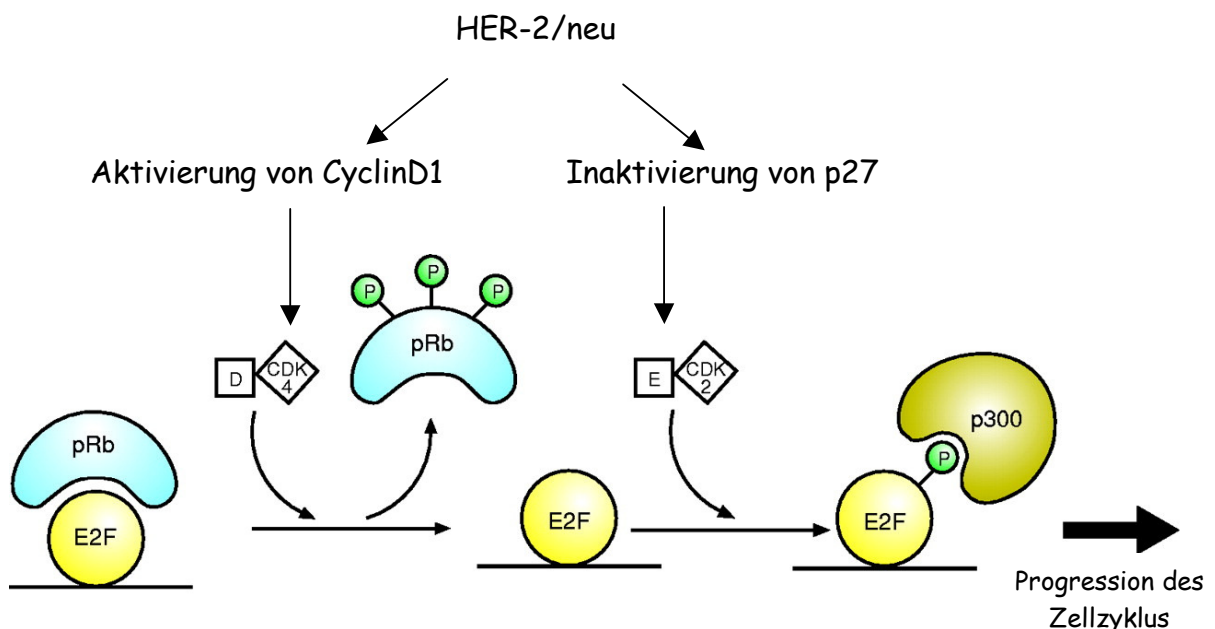
Somit wäre statt der in Abb. 5.7 gezeigten Signalwege eine Verbindung von HER-2/neu – PLC- γ – PKC – E2F/E2F/P300 denkbar, die in der Literatur bisher nicht beschrieben

wurde. Diese Hypothese wird durch eine Analyse der Phosphorylierungsmuster der verschiedenen Signalkaskaden noch zu prüfen sein.

5.2.3. Die HER-2/neu-initiierte Komplexbildung von E2F und P300: Verknüpfung von Zellzyklus und Antigenpräsentation ?

Ebenso wie HER-2/neu spielen E2F und P300 an der Entwicklung von Herz und Nervengewebe eine wichtige Rolle, wie Studien an HER-2/neu^{-/-}, E2F^{-/-} und P300^{-/-}-Mäusen zeigen konnten (Dagnino et al., 1997; Lin et al., 2000; Yao et al., 1998; Stevaux et al., 2002). Alle drei Faktoren üben einen Einfluss auf den Zellzyklus aus, der in einer Progression münden kann. In diesem Zusammenhang findet sich auch der Nachweis einer Komplexbildung analog zu dem in dieser Arbeit postulierten Repressorkomplex aus E2F und P300. Morris und Koautoren (2000) konnten zeigen, dass die Phosphorylierung von E2F5 zu einer Bindung von P300 führt, was die Bindung von E2F an die DNS ermöglicht und letztlich den Eintritt in die S-Phase induziert. So ergibt sich folgendes Modell für die Komplexbildung von E2F und P300 im Zellzyklus (nach Chan et al., 2001), in das auch HER-2/neu über die Aktivierung von CyclinD1 und die Inaktivierung von p27 Einfluss nehmen könnte:

Abb. 5.8: HER-2/neu als Initiator der E2F/P300-Komplexbildung



Die Aktivierung von CyclinD1 fördert die mehrfache Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (Rb) durch CyclinD/cdk4 und damit die Freisetzung von E2F. Dies kann nun seinerseits von CyclinE/cdk2 im Bereich der Transaktivierungsdomäne phosphoryliert werden und daraufhin mit P300 einen Komplex bilden, der zu einer Zunahme der Transkription von E2F-kontrollierten Genen führt (verändert nach Chan et al., 2001).

Wie bereits angeführt, besitzt P300 zwei E2F-Bindungsstellen, so dass auch ein Komplex aus zwei E2F-Molekülen und einem P300-Molekül denkbar wäre, wie es bei der Regulation der Aktivität des Tapasin-Promotors wahrscheinlich erfolgt.

Bei der Betrachtung dieser Daten und den Ergebnissen dieser Arbeit fallen u.a. folgende Zusammenhänge auf:

- i. Der Komplex aus E2F/P300 spielt im Zellzyklus eine entscheidende Rolle.
- ii. Dieser Komplex kann durch HER-2/neu induziert werden.
- iii. HER-2/neu aktiviert in Zellen die Progression des Zellzyklus.
- iv. HER-2/neu hemmt die MHC Klasse I-Antigenprozessierung.
- v. Dies erfolgt im Falle von Tapasin vermutlich über einen Komplex aus E2F/E2F/P300.

Aus diesen Zusammenhängen wäre denkbar, dass Zellzyklus und MHC Klasse I-Antigenpräsentation negativ miteinander korrelieren. Dabei könnte sogar vermutet werden, dass die gleichen Faktoren aktivierend oder repressiv wirken, so dass zum Beispiel E2F/P300 die Promotoren Zellzyklus-relevanter Gene stimuliert und diejenigen von immunologisch relevanten Genen inhibiert.

Der biologische Nutzen für diese negative Korrelation könnte in der effektiven Verteilung der für beide Prozesse benötigten Energie liegen. Unterstützt wird diese Hypothese durch die häufig auftretenden Defekte in der MHC Klasse I-Antigenpräsentation in transformierten, und durch eine verstärkte Proliferation gekennzeichneten Zellen. Umgekehrt führt eine Steigerung der Antigenpräsentation häufig zum Zellzyklusarrest. Kröger und Koautoren (2003) konnten zeigen, dass durch eine Induktion der Expression von IRF-1, welches die Expression immunologisch relevanter Gene aktiviert, der transformierte Phänotyp von Ras⁺-, Myc⁺- und HER-2/neu⁺-NIH3T3 Zellen revertiert werden konnte. Somit unterstützt der Effekt einer gesteigerten Antigenpräsentation bei gleichzeitigem Zellzyklus-Arrest durch immunstimulatorische Moleküle, wie IFN- γ , die oben angeführte Hypothese (Saunders et al., 1994; Kirchhoff et al., 1993, Vivo et al., 2001; Kröger et al., 2003).

5.3. Zukünftige experimentelle Strategien

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben sich vor allem zwei unterschiedliche experimentelle Strategien für weitere Forschungen:

- i. Untersuchung der *in vivo*-Bedeutung eines durch HER-2/neu-Überexpression ausgelösten „Immune-escape“.
- ii. Aufklärung der komplexen molekularen Ursachen einer Onkogen-vermittelten Suppression verschiedener Promotoren der MHC Klasse I-Antigenpräsentation.

Zur Überprüfung der Relevanz eines HER-2/neu-induzierten „Immune-escape“-Phänotyps könnten Mausmodelle herangezogen werden. Durch die Injektion von HER-2/neu-überexprimierenden Zellen in immunkompetente und immundefiziente Mäuse könnte man die Expressionsmuster der entstandenen Tumore hinsichtlich verschiedener, immunologisch relevanter Gene untersuchen. Dabei sollte auch, wenn möglich, zwischen dem Primärtumor und Metastasen unterschieden werden. Aus den Tumoren könnten Zelllinien etabliert werden und diese wieder in syngene Mäuse injiziert werden. So könnte man das Wachstum und die Abstoßung der entstehenden Tumore in Abhängigkeit ihrer Herkunft aus immundefizienten und immunkompetenten Mäusen untersuchen. Die Ergebnisse dieser Arbeiten könnten die Bedeutung eines durch das Immunsystem ausgelösten Selektionsdrucks auf das Wachstum und den „Immune-escape“-Phänotyp HER-2/neu-überexprimierender Tumore aufklären. Weiterhin wäre es in diesem Zusammenhang möglich, durch eine Auswahl an Zellen, die HER-2/neu unterschiedlich stark überexprimieren die relative HER-2/neu-Proteinmenge, die für einen „Immune escape“-Phänotyp im Primärtumor erforderlich ist, abschätzen zu können. Diese Daten hätten für die klinische Diagnostik wichtige Bedeutung.

Zur Aufklärung der molekularen Ursachen einer Inhibition von Promotoren der MHC Klasse I-Antigenpräsentation sollte zunächst versucht werden, den Transkriptionsfaktor-Komplex, der die Tapasin-Transkription über die E2F/P300-Motive hemmt, zu isolieren und zu identifizieren. Dies bietet die Möglichkeit, die Komponenten des Komplexes gezielt zu hemmen, um die Tapasin-Promotor-Aktivität zu steigern. Im Folgenden könnten dann Plasmide kloniert werden, welche die entsprechenden Transkriptionsfaktoren überexprimieren. Durch eine Ko-Transfektion mit anderen Promotor-Plasmiden könnte man so in Reporterassays den Einfluss der Faktoren auch auf andere Promotoren, wie zum Beispiel die TAP1/LMP2- und TAP2-Promotoren untersuchen. Hierzu sollten außerdem diejenigen Promotoren, die möglicherweise durch HER-2/neu inhibiert werden, wie LMP10, PA28 α , PA28 β und ERAAP kloniert werden. Dabei sollten auch die humanen Promotoren mit einbezogen werden. Eine Aufklärung der beteiligten Signalwege, die den Repressorkomplex aktivieren, könnte über die Analyse der

Expressions- und Phosphorylierungsmuster der Komponenten der Signalkaskaden mit Phospho-spezifischen Antikörpern erfolgen. Von besonderem Interesse wäre dabei auch zu untersuchen, ob die Expression der identifizierten Transkriptionsfaktoren die Regulation Zellzyklus-relevanter Gene beeinflusst. Auf der Grundlage der erwähnten Hypothese einer negativen Korrelation von Zellzyklus und MHC Klasse I-Antigenpräsentation wäre zu erwarten, dass eine Überexpression des Repressors der Tapasin-Expression zu einer vermehrten Expression Zellzyklus-relevanter Gene, wie verschiedener Cycine führt. Schließlich bietet sich die Möglichkeit, die Expression der identifizierten Transkriptionsfaktoren in anderen Onkogen-transformierten Zelllinien im Vergleich zu untransformierten Zelllinien zu bestimmen. Dies könnte auch anhand von histologischen Schnitten humaner Tumore aus unterschiedlichen Geweben erfolgen, um Hinweise auf die klinische Bedeutung dieser Transkriptionsfaktoren zu erhalten.

6. Zusammenfassung

In Tumoren und Onkogen-transformierten Zellen finden sich häufig Defizienzen in der Expression von Komponenten der MHC Klasse I-Antigenprozessierung, die mit einer verminderten MHC Klasse I-Oberflächenexpression und einer reduzierten Sensitivität der Zellen gegenüber einer ZTL-vermittelten Lyse gekoppelt sein können. Da in den meisten Fällen die reduzierten Expressionsmuster über Zytokine revertiert werden können, werden verschiedene Regulationsmechanismen als Ursache für die Defizienzen postuliert. Auch in Zellen, die den „human epidermal growth factor receptor 2“ (HER-2/neu) überexprimieren, wurden derartige „Immune escape“-Mechanismen identifiziert. Aufgrund der Amplifikation und/oder Überexpression dieses Onkogens in Tumoren, die mit einer schnellen Progression der Erkrankung und einer schlechten Heilungsprognose assoziiert ist, wurden zahlreiche Therapien entwickelt, die auf einer Mobilisierung des Immunsystems gegenüber HER-2/neu oder dessen Blockade durch spezifische Antikörper abzielen. Die bisher jedoch nur unzureichenden Erfolge dieser Therapien könnten ihre Ursache in einer verminderten Immunogenität der HER-2/neu⁺-Zellen aufgrund von Defizienzen in der MHC Klasse I-Antigenprozessierung haben, weshalb die Untersuchung der molekularen Ursachen dieser Suppression für die Therapie von HER-2/neu⁺-Tumoren von besonderer Bedeutung ist.

In dieser Arbeit wurde anhand eines *in vitro*-Systems ein HER-2/neu-vermittelter „Immune escape“-Phänotyp charakterisiert und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen untersucht. Hierzu wurden murine, HER-2/neu⁻-NIH3T3-Zellen mit HER-2/neu-transfizierten NIH3T3-Zellen verglichen. Die Untersuchung zeigte, dass die Oberflächenexpression von MHC Klasse I-Antigenen bei einer HER-2/neu-Überexpression vermindert ist. Dies ist assoziiert mit reduzierten Expressionen von LMP2, LMP10, PA28 α , PA28 β , ERAAP, TAP1, TAP2, und Tapasin, einem blockiertem TAP-Transport und einer fehlenden Sensitivität gegenüber einer ZTL-vermittelten Lyse. Da die analysierten Defekte durch eine Stimulation mit IFN- γ wieder revertiert werden können, wird eine transkriptionelle oder translationelle Regulation der betroffenen Gene durch HER-2/neu postuliert. Aufgrund dieser Ergebnisse ist eine T-Zell-vermittelte Therapie von HER-2/neu⁺-Tumoren als kritisch anzusehen.

Die Untersuchung der Promotoren von TAP1/LMP2, TAP2 und Tapasin ergab geringere und durch IFN- γ -induzierbare Promotoraktivitäten in den HER-2/neu⁺-Zellen im Vergleich zu den HER-2/neu⁻-Zellen. Mittels Mutagenese-PCR und Gelretardationsanalysen konnte die Bindung eines Komplexes an zwei E2F- und einer P300-Bindungsstelle im Tapasin-Promotor identifiziert werden, die für die HER-2/neu-vermittelte Hemmung der Tapasin-Promotoraktivität essentiell ist. Eine Inaktivierung der E2F- und P300-Motive in den TAP1/LMP2- und TAP2-Promotoren hatte dagegen keinen Einfluss auf die HER-2/neu-vermittelte Blockade der Promotoraktivität. Ein Vergleich der Promotoraktivitäten der HER-2/neu⁺- mit Ras-transformierten Zellen ergab, dass die TAP1/LMP2- und TAP2-Promotoren in beiden Zellen supprimiert werden, während der Tapasin-Promotor bei Ras-Transformation nicht beeinträchtigt ist. Der Einsatz von Inhibitoren zeigte, dass die Suppression des Tapasin-Promotors

vermutlich über die PLC- γ -PKC-Kaskade erfolgt. Dagegen konnte mit Inhibitoren gegen MAPK und PI3Kinase kein vergleichbarer Effekt erzielt werden. Aufgrund dieser Daten wird postuliert, dass HER-2/neu über die Signalkaskade PLC- γ -PKC-E2F/P300 die Tapasin-Promotoraktivität supprimiert, wohingegen noch bisher unbekannt Signalkaskaden von HER-2/neu und Ras zu einer Hemmung der TAP1/LMP2- und TAP2-Promotoraktivität führen. Da die Komplexbildung von E2F und P300 auch im Zellzyklus eine Rolle spielt, wird eine negative Korrelation zwischen Zell-Proliferation und MHC Klasse I-Antigenpräsentation postuliert, die Gegenstand künftiger Studien sein wird.

7. Literaturverzeichnis

Abarca-Heidemann, K., Friedrichs, S., Klamp, T., Boehm, U., Guethlein, L., Ortman, B. (2002) Regulation of the expression of mouse TAP-associated glycoprotein (tapasin) by cytokines. *Immunol. Letters* 83 (3), 197-207.

Adam, L., Vadlamudi, R., Kondapaka, S.B., Chernoff, J., Mendelsohn, J., Kumar, R. (1998) Heregulin regulates cytoskeletal reorganization and cell migration through the p21-activated kinase-1 via phosphatidylinositol-3 kinase. *J. Biol. Chem.* 273 (43), 28238-28246.

Adelsman, M.A., McCarthy, J.B., Shimizu, Y. (1999) Stimulation of beta1-integrin function by epidermal growth factor and heregulin-beta has distinct requirements for erbB2 but a similar dependence on phosphoinositide 3-OH kinase. *Mol. Biol. Cell.* 10 (9), 2861-2878.

Adriance, M.C., Gendler, S.J. (2004) Downregulation of Muc1 in MMTV-c-Neu tumors. *Oncogene* 23 (3), 697-705.

Ahn, K., Angulo, A., Ghazal, P., Peterson, P. A., Yang, Y., Früh, K. (1996a). Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10990-10995.

Ahn, K., Erlander, M., Leturcq, D., Peterson, P.A., Früh, K., Yang, Y. (1996b) In vivo characterization of the proteasome regulator PA28. *J. Biol. Chem.* 271 (31), 18237-18242.

Ahn, K., Gruhler, A., Galocha, B., Jones T.R., Wiertz, E.J., Ploegh, H.L., Peterson, P.A., Yang, Y., Früh, K. (1997). ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. *Immunity* 6, 613-621.

Ahn, K., Meyer, T.H., Uebel, S., Sempé, P., Djaballah, H., Yang, Y., Peterson P.A., Früh, K., Tampé, R. (1996c). Molecular mechanism and species specificity of TAP inhibition by herpes simplex virus ICP47. *EMBO J.* 15, 3247-3255.

Aki, M., Shimbara, N., Takashina, M., Akiyama, K., Kagawa, S., Tamura, T., Tanahashi, N., Yoshimura, T., Tanaka, K., Ichihara, A., (1994) Interferon- γ induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J. Biochem.* 115 (2), 257-269

Algarra, I., Garcia-Lora, A., Cabrera, T., Ruiz-Cabello, F., Garrido, F. (2004) The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol. Immunother.* Apr. 7 [Epub ahead of print]

Allred, D.C., Clark, G.M., Molina, R., Tandon, A.K., Schnitt, S.J., Gilchrist, K.W., Osborne, C.K., Tormey, D.C., McGuire, W.L. (1992) Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer. *Hum. Pathol.* 23, 974-979.

Alroy, I., Yarden, Y. (1997) The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Letters* Vol. 410 (1), 83-86.

Ambagala, A.P., Gopinath, R.S., Srikumaran, S. (2004) Peptide transport activity of the transporter associated with antigen processing (TAP) is inhibited by an early protein of equine herpesvirus-1. *J. Gen. Virol.* 85 (Pt 2), 349-53.

- Anderson, B.W., Peoples, G.E., Murray, J.L., Gillogly, M.A., Gershenson, D.M., Ioannides, C.G. (2000) Peptide priming of cytolytic activity to HER-2 epitope 369-377 in healthy individuals. *Clin. Cancer Res.* 6 (11), 4192-200.
- Arnold, D., Driscoll, J., Androlewicz, M., Hughes, E., Cresswell, P., Spies, T., (1993). Proteasome subunits encoded in the MHC are not generally required for the processing of peptides bound by MHC class I molecules. *Nature* 360, 171-174.
- Arons, E., Kunin, V., Schechter, C., Ehrlich, R. (2001) Organization and functional analyses of the mouse transporter associated with antigen processing 2 promoter. *J. Immunol.* 166, 3942-3951.
- Atkins, D., Ferrone, S., Schmahl, G.E., Storkel, S., Seliger, B. (2004) Down-regulation of HLA class I antigen processing molecules: an immune escape mechanism of renal cell carcinoma? *J. Urol.* 171, 885-889.
- Baldwin, A.S. (1996) The NF κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 649-683.
- Barnstable, C.J., Bodmer, W.F., Brown, G., Galfre, G., Milstein, C., Williams, A.F., Ziegler, A. (1978) Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell* 14 (1), 9-20.
- Baselga, J. (2001) Herceptin alone or in combination with chemotherapy in the treatment of HER2-positive metastatic breast cancer: pivotal trials. *Oncology* 61, 14.
- Baselga, J., Albanell, J. (2001) Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies. *Ann. Oncol.* 12 (suppl 1), 35-41.
- Baulida, J., Kraus, M. H., Alimandi, M., Di Fiore, P.P., Carpenter, G. (1996) All ErbB Receptors Other Than the Epidermal Growth Factor Receptor Are Endocytosis Impaired. *J. Biol. Chem.* 271 (9), 5251-5257.
- Baxevanis, C.N., Sotiropoulou, P.A., Sotiriadou, N.N., Papamichail, M. (2004) Immunobiology of HER-2/ neu oncoprotein and its potential application in cancer. immunotherapy *Cancer Immunol. Immunother.* 53, 166-75.
- Beck, S., Kelly, A., Radley, E., Khurshid, F., Alderton, R.P., Trowsdale, J. (1992) DNA sequence analysis of 66 kb of the human MHC class II region encoding a cluster of genes for antigen processing. *J. Mol. Biol.* 228 (2), 433-41.
- Beinert, D., Neumann, L., Uebel, S., Tampe, R. (1997) Structure of the viral TAP-inhibitor ICP47 induced by membrane association. *Biochemistry* 36 (15), 4694-700.
- Belich, M.P., Glynn, R.J., Senger, G., Sheer, D., Trowsdale, J. (1994) Proteasome components with reciprocal expression to that of the MHC-encoded LMP proteins. *Curr. Biol.* 4, 769-776
- Benitez, R., Godelaine, D., López-Nevot, M.A., Bresseur, F., Marchand, M., Cabrera, T., Van Baren, N., Andry, G., Jimenez, P., Andry, C., Ruiz-Cabello, F., Boon, T., Garrido, F. (1998) Mutations of the β_2 -microglobulin gene result in a lack of HLA class I molecules on melanoma cells of two patients immunized with MAGE peptides. *Tissue Antigens* 52, 520-524.
- Bennett, E.M., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., Brodsky, F.M. (1999) Cutting edge: adenovirus E19 has two mechanisms for affecting class I MHC expression. *J. Immunol.* 162, 5049-5052

- Bernhard, H., Salazar, L., Schiffman, K., Smorlesi, A., Schmidt, B., Knutson, K.L., Disis, M.L. (2002) Vaccination against the HER-2/neu oncogenic protein. *Endocrin-rel. Cancer* 9, 33-44.
- Björkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., Wiley, D.C. (1987) Structure of the human class I MHC antigen, HLA-A2. *Nature* 329, 506-512.
- Blais, A., Monte, D., Pouliot, F., Labrie, C. (2002) Regulation of the human cyclin-dependent kinase inhibitor p18INK4c by the transcription factors E2F1 and Sp1. *J. Biol. Chem.* 277 (35), 31679-93.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J.C. (1997) Cellular responses to interferon- γ . *Ann. Rev. Immunol.* 15, 749-795.
- Boggio, K., Nicoletti, G., Di Carlo, E., Cavallo, F., Landuzzi, L., Melani, C., Giovarelli, M., Rossi, I., Nanni, P., De Giovanni, C., Bouchard, P., Wolf, S., Modesti, A., Musiani, P., Lollini, P.L., Colombo, M.P., Forni, G. (1998) Interleukin-12 mediated prevention of spontaneous mammary adenocarcinomas in two lines of Her-2/*neu* transgenic mice. *J. Exp. Med.* 188, 589-596.
- Bordier, C. (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol Chem.* 256 (4), 1604-1607.
- Bosc, D.G., Goueli, B.S., Janknecht, R. (2001) HER2/Neu-mediated activation of the ETS transcription factor ER81 and its target gene MMP-1. *Oncogene* 20 (43), 6215-24.
- Bosc, D.G., Janknecht, R. (2002) Regulation of Her2/neu promoter activity by the ETS transcription factor, ER81. *J. Cell. Biochem.* 86 (1), 174-183.
- Bosher, J.M., Totty, N.F., Hsuan, J.J., Williams, T., Hurst, H.C. (1996) A family of AP-2 proteins regulates c-erbB-2 expression in mammary carcinoma. *Oncogene* 13 (8), 1701-1707.
- Bosher, J.,M., Williams, T., Hurst, H.C. (1995) The developmentally regulated transcription factor AP-2 is involved in c-erbB-2 overexpression in human mammary carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 744-747.
- Bouvier, M. (2003) Accessory proteins and the assembly of human class I MHC molecules: a molecular and structural perspective. *Mol. Immunol.* 39 (12), 697-706.
- Brandau, S., Bohle, A. (2001) Bladder cancer. I. Molecular and genetic basis of carcinogenesis. *Eur Urol.* 39 (5), 491-7.
- Brennan, P., Babbage, J.W., Burgering, B.M., Groner, B., Reif, K., Cantrell, D.A. (1997) Phosphatidylinositol 3-kinase couples the interleukin-2 receptor to the cell cycle regulator E2F. *Immunity* 7, 679-89.
- Brossart, P., Stuhler, G., Flad, T., Stevanovic, S., Rammensee, H.G., Kanz, L., Brugger, W. (1998) Her-2/neu-derived peptides are tumor-associated antigens expressed by human renal cell and colon carcinoma lines and are recognized by in vitro induced specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res.* 58 (4), 732-736.
- Brossart, P., Wirths, S., Stuhler, G., Reichardt, V.L., Kanz, L., Brugger, W. (2000). Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* 96, 3102-3108.

- Brown, C.F., Teng, C.T., Pentecost, B.T., DiAugustine, R.P. (1989) Epidermal growth factor precursor in mouse lactating mammary glands. *Mol. Endocrinol.* 3, 1077-1083
- Busse, D., Doughty, S., Artega, C.L. (2000) HER-2/neu (erB-2) and the cell cycle. *Sem. Oncol.* 27 (6) Suppl. 11, 3-8.
- Cam, H., Dynlacht, B.D. (2003) Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication. *Cancer Cell.* 3 (4), 311-6.
- Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., Reed, J.C. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation, *Science* 282, 1318-1321.
- Carroll, I.R., Wang, J., Howcroft, T.K., Singer, D.S. (1998) HIV Tat represses transcription of the β 2-microglobulin promoter. *Mol. Immunol.* 35, 1171-1178.
- Carter, P., Presta, L., Gorman, C.M., Ridgway, J.B., Henner, D., Wong, W.L., Rowland, A.M., Kotts C., Carver, M.E., Shepard HM (1992) Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4285-4289.
- Casalini, P., Ménard, M., Malandrini, S.M.I., Rigo, C.M., Colnaghi, M.I., Cultraro, C.M., Segal, S. (1997). Inhibition of tumorigenicity in lung adenocarcinoma cells by c-erbB-2 antisense expression. *Int. J. Cancer* 72, 631-636.
- Cascio, P., Hilton, C., Kisselev, A.F., Rock, K.L., Goldberg, A.L., (2001) 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J.* 20, 2357-2366
- Castilleja, A., Ward, N.E., O'Brian, C.A., Swearingen II, B., Swan, E., Gillogly, M.A., Murray, J.L., Kudelka, A.P., Gershenson, D.M., and Ionannides, C.G. (2001) Accelerated HER-2 degradation enhances ovarian tumor recognition by CTL: Implications for tumor immunogenicity. *Mol. Cell. Biochem.* 217, 21-33.
- Cerundolo, V., Kelly, A., Elliott, T., Trowsdale, J., Townsend, A. (1995) Genes encoded in the major histocompatibility complex affecting the generation of peptides for TAP transport. *Eur. J. Immunol.* 25, 554-562.
- Chan, H. M., La Thangue, N. B. (2001) P300/CBP protein : HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J. Cell. Science* 114, 2363-2373.
- Chatterjee-Kishore, M., Kishore, R., Hicklin, D.J., Marincola, F.M., Ferrone, S. (1998) Different requirement for signal transducer and activator of transcription 1 α and interferon regulatory factor 1 in the regulation of low molecular mass polypeptide 2 and TAP1 gene expression. *J. Biol. Chem.* 273 (26), 16177-16183.
- Chatterjee-Kishore, M., Wright, K.L., Ting, P-Y., Stark, G.R. (2000) How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *EMBO J.* 19, 4111-4122
- Chen, P., Hochstrasser, M. (1995) Biogenesis, structure and function of the yeast 20S proteasome. *EMBO J.* 14, 2620-2630.
- Chen, H., Hung, M.C. (1997) Involvement of Co-activator p300 in the transcriptional regulation of the HER-2/neu gene. *J. Biol. Chem.*, 272 (10), 6101-6104.
- Chrigwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., Rutter, W.J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294-5299.

- Choudhury, A., Charo, J., Parapuram, S.K., Hunt, R.C., Hunt, D.M., Seliger, B., Kiessling, R. (2004) Small interfering RNA (siRNA) inhibits the expression of the Her2/neu gene, upregulates HLA class I and induces apoptosis of Her2/neu positive tumor cell lines. *Int. J. Cancer* 108, 71-77.
- Cobleigh, M.A., Vogel, C.L., Tripathy, D., Robert, N.J., Scholl, S., Fehrenbacher, L., Wolter, J.M., Paton, V., Shak, S., Lieberman, G., Slamon, D.J. (1999) Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER-2 overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J. Clin. Oncol.* 17, 2639-2648.
- Coccia, E.M., Marzialli, G., Stellacci, E., Perrotti, R., Ilari, R., Orsetti, R., Battistini, A. (1995) Cells resistant to IFN- β respond to IFN- γ via the STAT-IRF1 pathway. *Virology* 211, 113-122.
- Colomer, R., Lupu, R., Bacus, S.S., Gelmann, E.P. (1994) erbB-2 antisense oligonucleotides inhibit the proliferation of breast carcinoma cells with erbB-2 oncogene amplification. *Br. J. Cancer.* 70 (5), 819-25.
- Correa, I., Plunkett, T. (2001) Update on HER-2 as a target for cancer therapy: HER-2/neu peptides as tumor vaccines for T cell recognition. *Breast cancer res.* 3, 399-403.
- Coulie, P.G., Ikeda, H., Baurain, J.F., Chiari, R. (1999) Antitumor immunity at work in a melanoma patient. *Adv. Cancer Res.* 76, 213-242.
- Coussens, L., Yang-Feng, T.L., Liao, Y.C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P.H., Libermann, T.A., Schlessinger, J., Francke, U., Levinson, A., and Ulrich, A. (1985) Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*, 230, 1132-1139.
- Craiu, A., Gaczynska, M., Akopian, T., Gramm, C., Fenteany, G., Goldberg, A.L., Rock, K.L. (1997) Lactacystin and clasto-lactacystin β -lactone modify multiple proteasome α -subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *J. Biol. Chem.* 272 (20), 13437-13445.
- Crone, S.A., Zhao, Y.Y., Fan, L., Gu, Y., Minamisawa, S., Liu, Y., Peterson, K.L., Chen, J., Kahn, R., Condorelli, G., Ross, J. Jr, Chien, K.R., Lee, K.F. (2002) ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy. *Nat. Med.* 8, 459-65.
- Crowe, D.L., Nguyen, D.C. (2001) Rb and E2F-1 regulate telomerase activity in human cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1518, 1-6.
- Curcio, C., Di Carlo, E., Clynes, R., Smyth, M.J., Boggio, K., Quaglino, E., Spadaro, M., Colombo, M.P., Amici, A., Lollini, P.L., Musiani, P., Forni, G. (2003) Nonredundant roles of antibody, cytokines, and perforin in the eradication of established Her-2/neu carcinomas. *J. Clin. Invest.* 111 (8), 1161-70.
- Dagnino, L., Fry, C.J., Bartley, S.M., Farnham, P., Gallie, B.L., Phillips, R.A. (1997) Expression patterns of the E2F family of transcription factors during mouse nervous system development. *Mech. Dev.* 66 (1-2), 13-25.
- De Bruijn, M.L., Jackson, M.R., Peterson, P.A. (1995) Phagocyte-induced antigen-specific activation of unprimed CD8⁺ T cells in vitro. *Eur. J. Immunol.* 25, 1274-1285.

- De Bruin, A., Maiti, B., Jakoi, L., Timmers, C., Buerki, R., Leone, G. (2003) Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J. Biol. Chem.* 278 (43), 42041-42049.
- De Giovanni, C., Nicoletti, G., Landuzzi, L., Astolfi, A., Croci, S., Comes, A., Ferrini, S., Meazza, R., Iezzi, M., Di Carlo, E., Musiani, P., Cavallo, F., Nanni, P., Lollini, P.L. (2004) Immunoprevention of HER-2/neu transgenic mammary carcinoma through an interleukin 12-engineered allogeneic cell vaccine. *Cancer Res.* 64, 4001-4009.
- Delp, K., Momburg, F., Hilmes, C., Huber, C., Seliger, B. (2000) Functional deficiencies of components of the MHC class I antigen pathway in human tumors of epithelial origin. *Bone Marrow Transplant.* 25 Suppl 2, 88-95.
- Deres, K., Schuhmacher, T., Wiesmüller, K.H., Stevanovic, S., Greiner, G., Jung, G., Ploegh, H.L. (1992) Preferred size of peptides that bind to H-2K^b is sequence dependent. *Eur. J. Immunol.* 22, 1603-1608.
- Dey, A., Thornton, A.M., Lonergan, M., Weissman, S.M., Chamberlain, J.W., Ozato, K. (1992) Occupancy of upstream regulatory sites in vivo coincides with major histocompatibility complex class I gene expression in mouse tissues. *Mol. Cell Biol.* 12, 3590-3599.
- Di Carlo, E., Diodoro, M.G., Boggio, K., Modesti, A., Modesti, M., Nanni, P., Forni, G., Musiani, P. (1999) Analysis of mammary carcinoma onset and progression in HER-2/neu oncogene transgenic mice reveals a lobular origin. *Lab. Invest.* 79 (10), 1261-1269.
- Dick, T. P., Ruppert, T., Groettrup, M., Kloetzel, P. M., Kuehn, L., Koszinowski, U., Stevanovi, S., Schild, H., Rammensee, H. G. (1996) Coordinated Dual Cleavages Induced by the Proteasome Regulator PA28 Lead to Dominant MHC Ligands. *Cell* 86 (2), 253-262.
- Disis, M.L., Calenoff, E., McLaughlin, G., Murphy, A.E., Chen, W., Groner, B., Jeschke, M., Lydon, N., McGlynn E. and Livingston, R.B. (1994) Existent T-cell and antibody immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer. *Cancer Res.* 54, 16-20.
- Disis, M., Cheever, M. (1997) HER-2/neu protein: a target for antigen-specific immunotherapy of human cancer. *Adv. Cancer Res.* 71, 343-371.
- Dissemond, J., Kothen, T., Mörs, J., Weimann, T.K., Lindeke, A., Goos, M., Wagner, S.N. (2003) Downregulation of tapasin expression in progressive human malignant melanoma. *Arch. Dermatol. Res.* 295 (2), 43-9.
- Dittmar, T., Husemann, A., Schewe, Y., Nofer, J.R., Niggemann, B., Zanker, K.S., Brandt, B.H. (2002) Induction of cancer cell migration by epidermal growth factor is initiated by specific phosphorylation of tyrosine 1248 of c-erbB-2 receptor via EGFR. *FASEB J.* 16 (13), 1823-5.
- Dranoff, G. (2002) GM-CSF-based cancer vaccines. *Immunol. Rev.* 188, 147-154.
- Drebin, J.A., Link, V.C., Stern, D.F., Weinberg, R.A., Greene, M.I. (1985) Down-modulation of an oncogene protein product and reversion of the transformed phenotype by monoclonal antibodies. *Cell* 41 (3), 697-706.
- Drexler, I., Antunes, E., Schmitz, M., Wolfel, T., Huber, C., Erfle, V., Rieber, P., Theobald, M., Sutter, G. (1999) Modified vaccinia virus Ankara for delivery of human tyrosinase as melanoma-associated antigen: induction of tyrosinase- and melanoma-specific human leukocyte antigen A*0201-restricted cytotoxic T cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 59, 4955-4963.

- Driscoll, J., Brown, M., Finley, D., Monaco, J. (1993) MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome. *Nature* 365, 262-264.
- Dubiel, W., Pratt, G., Ferrell, K., Rechsteiner, M. (1992) Purification of an 11S regulator of the multicatalytic protease. *J. Biol. Chem.* 267 (31), 22369-22377.
- Dyson, N. (1998) The regulation of E2F by pRB-family proteins *Genes Dev.* 12 (15), 2245-62.
- Engelhard, V.H. (1994) Structure of peptides associated with MHC class I molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 6, 13-23.
- Epperson, D.E., Arnold, D., Spies, T., Cresswell, P., Pober, J.S., Johnson, D.R. (1993) Cytokines increase transporter in antigen processing-1 expression more rapidly than HLA class I expression in endothelial cells. *J. Immunol.* 149, 3297-3301.
- Esteva, F.J. (2004) Monoclonal antibodies, small molecules, and vaccines in the treatment of breast cancer. *Oncologist* 9 Suppl 3, 4-9.
- Etlinger, J.D., Goldberg, A.L. (1977) A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 54-58.
- Falk, K., Rötzschke, O., Deres, K., Metzger, J., Jung, G., Rammensee, H.G. (1991) Identification of naturally processed viral nonapeptide allows their quantification in infected cells and suggests an allele-specific T-cell epitope forecast. *J. Ex. Med.* 174, 425-434.
- Falk, K., Rötzschke, O., Rammensee, HG. (1990) Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 348, 248-251.
- Falk, K., Rötzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G., Rammensee, HG. (1991) Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351, 290-296.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., Danielsen, M. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84 (21), 7413-7417.
- Fisk, B., Blevins, T.L., Wharton, J.T., Ioannides, C.G. (1995) Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J. Exp. Med.* 181, 2109 - 2117.
- Forni, G., Curcio, C., Spadaro, M., Iliffe, J., Quaglino, E., Di Carlo, E., Musiani, P., Lollini, P.L. (2003) Immunization in tumor prevention. *Int. Immunopharmacol.* 3 (8), 1151-8.
- Friedmann, R., Stark, G. (1985) α -Interferon-induced transcription of HLA and metallothionein genes containing homologous upstream sequences. *Nature* 314, 637-641.
- Fromm, S.V., Duady-Ben, Y., Schechter, C., Ehrlich, R. (2002) Assembly and cell surface expression of TAP-independent, chloroquine-sensitive and interferon-gamma-inducible class I MHC complexes in transformed fibroblast cell lines are regulated by tapasin. *Cell. Immunol.* 215 (2), 207-218.

- Früh, K., Ahn, K., Djaballah, H., Sempé, P., van Endert, P.M., Tampé, R., Peterson, P.A., Yang, Y. (1995) A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature* 375, 415-418.
- Furmann, M.H., Ploegh, H.L., Tortorella, D. (2002) Membrane-specific, host derived factors are required for US2- and US11-mediated degradation of major histocompatibility complex class I molecules. *J. Biol. Chem.* 277 (5), 3258-3267.
- Gaczynska, M., Rock, K.L., Goldberg, A.L. (1993) Interferon- γ and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature* 365, 264-267.
- Gabathuler, R., Reid G, Kolaitis G, Driscoll J, Jefferies WA. (1994) Comparison of cell lines deficient in antigen presentation reveals a functional role for TAP-1 alone in antigen processing. *J. Exp. Med.* 180, 1414-1425.
- Galang, C.K., Garcia-Ramirez, J., Solski, P.A., Westwick, J.K., Der, C.J., Neznanov, N.N., Oshima, R.G., Hauser, C.A. (1996) Oncogenic Neu/ErbB-2 increases ets, AP-1, and NF-kappaB-dependent gene expression, and inhibiting ets activation blocks Neu-mediated cellular transformation. *J. Biol. Chem.* 271 (14), 7992-7998.
- Gallion, H.H., Pieretti, M., DePriest, P.D., van Nagell, J.R. Jr. (1995) The molecular basis of ovarian cancer. *Cancer* 76 (10 Suppl), 1992-7.
- Garbi, N., Tan, P., Diehl, A.D., Chambers, B.J., Ljunggren, H.G., Momburg, F., Hämmerling, G.J. (2000) Impaired immune responses and altered peptide repertoire in tapasin-deficient mice. *Nat. Immunol.* 1, 234-238.
- Garcia-Lora, A., Algarra, I., Collado, A., Garrido, F. (2003b) Tumour immunology, vaccination and escape strategies. *Eur. J. Immunogenet.* 30 (3), 177-83.
- Garcia-Lora, A., Algarra, I., Gaforio, J.J., Ruiz-Cabello, F., Garrido, F. (2001) Immunoselection by T lymphocytes generates repeated MHC class I deficient metastatic tumor variants. *Int. J. Cancer* 91, 109-119.
- Garcia-Lora, A., Martinez, M., Algara, I., Gaforio, J.J., Garrido, F. (2003a) MHC class I-deficient metastatic tumor variants immunoselected by T lymphocytes originate from the coordinated downregulation of APM components. *Int. J. Cancer* 106, 521-527.
- Garrido, F., Algarra, I. (2001) MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv Cancer Res.* 83, 117-158.
- Garrido, F., Festenstein, H., Schirmacher, V. (1976) Further evidence for derepression of H-2 and Ia like specificities of foreign haplotypes in mouse tumor cell lines. *Nature* 261, 228-230.
- Garrido, F., Ruiz-Cabello, F., Cabrera, T., Perez-Villar, J.J., Lopez-Botet, M., Duggan-Keen, M. (1997) Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol. Today* 18, 89-95.
- Gilbert, M.J., Riddell, S.R., Li, C.R., Greenberg, P.D. (1993) Selective interference with class I major histocompatibility complex presentation of the major immediate-early protein following infection with human cytomegalovirus. *J. Virol.* 67, 3461-3469.

- Gilbert, M.J., Riddell, S.R., Plachter, B., Greenberg, P.D. (1996) Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature* 383, 720-722.
- Girdlestone, J., Isamat, M., Gewert, D., Milstein, C. (1993) Transcriptional regulation of HLA-A and -B: differential binding of members of the Rel and IRF families of transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11568-11572.
- Glas, R., Bogyo, M., McMasters, J.S., Gaczynska, M., Ploegh, H.L. (1998) A proteolytic system that compensates for loss of proteasome function. *Nature* 392, 618-622.
- Glotzer, M., Murray, A.W., Kirschner, M.W. (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132-138.
- Gobin, S.J.P., van Zutphen, M., Westerheide, S.D., Boss, J.M., van den Elsen, P.J. (2001) The MHC-specific enhancosome and its role in MHC class I and β 2-microglobulin gene transactivation. *J. Immunol.* 167, 5175-5148.
- Goldberg, Alfred L., Cascio, Paolo, Saric, Tomo, Rock, Kenneth, L. (2002) The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol. Immunol.* 39, 147-164.
- Goodmann, R.H., Smolik, S. (2000) CBP/p300 in cell growth, transformation and development. *Genes Dev.* 14, 1553-1577.
- Gorer, P.A. (1936) Novel allele-specific, post-translational reduction in HLA class I surface expression in a mutant human B cell line. *Brit. J. Exp. Path.* 17: 42-50.
- Gori, S., Colozza, M., Mosconi, A.M., Franceschi, E., Basurto, C., Cherubini, R., Sidoni, A., Rulli, A., Bisacci, C., De Angelis, V., Crino, L., Tonato, M. (2004) Phase II study of weekly paclitaxel and trastuzumab in anthracycline- and taxane-pretreated patients with HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Br. J. Cancer.* 90 (1), 36-40.
- Goueli, B.S., Janknecht, R. (2004) Upregulation of the Catalytic Telomerase Subunit by the Transcription Factor ER81 and Oncogenic HER2/Neu, Ras, or Raf. *Mol. Cell. Biol.* 24 (1), 25-35.
- Grande, A.G., Androlewicz, M.J., Athwal, R.S., Geraghty, D.E., Spies, T. (1995) Dependence of peptide binding by MHC class I molecules on their interaction with TAP. *Science* 270, 105-108.
- Grande, A.G., Golovina, T.N., Hamilton, S.E., Sriram, V., Spies, T., Brutkiewicz, R.R., Harty, J.T., Eisenlohr, L.C., Van Kaer, L. (2000) Impaired assembly yet normal trafficking of MHC class I molecules in tapasin mutant mice. *Immunity* 13, 213-222.
- Grande, A.G., Lehner, P.J., Cresswell, P., Spies, T. (1997) Regulation of MHC class I heterodimer stability and interaction with TAP by tapasin. *Immunogenetics* 46 (6), 477 – 483.
- Greenwood, R., Shimizu, Y., Sekhon, G.S., DeMars, R. (1994) Novel allele-specific, post-translational reduction in HLA class I surface expression in a mutant human B cell line. *J. Immunol.* 153, 5525-5536.
- Groettrup, M., Soza, A., Eggers, M., Kuehn, L., Dick, T.P., Schild, H., Rammensee, H.G., Koszinowski, U.H., Kloetzel, P.M. (1996) A role for the proteasome regulator PA28 α in antigen presentation. *Nature* 381, 166-168.

- Gromme, M., Neefjes, J. (2002) Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. *Mol. Immunol.* 39, 181-202.
- Gross, A., McDonnell, J.M., Korsmeyer, S.J., (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13, 1899-1911
- Gueckel, R., Enenkel, C., Wolf, D.H., Hilt, W. (1998) Mutations in the yeast proteasome beta-type subunit Pre3 uncover position-dependent effects on proteasomal peptidase activity and in vivo function. *J Biol Chem.* 273 (31), 19443-52.
- Guo, Y., Yang, T., Liu, X., Shengli, L., Wen, J., Durbin, J.E., Liu, Y., Zheng, P. (2001) Cis elements for transporter associated with antigen-processing-2 transcription: two new promoters and an essential role of the IFN response factor binding element in IFN- γ mediated activation of the transcription initiator. *Int. Immunol.* 14, 189-200.
- Guy, P. M, Platko, J.V., Cantley, L.C., Cerione, R.A., Carraway K.L. (1994) Insect Cell-Expressed p180^{erbB3} Possesses an Impaired Tyrosine Kinase Activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8132-8136.
- Guy, C.T., Webster, M.A., Schaller, M., Parsons, T.J., Cardiff, R.D., Muller, W.J. (1992) Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89 (22),10578-82.
- Hartmann, F., Horak, E.M., Cho, C., Lupu, R., Bolen, J.B., Stetler-Stevenson, M.A., Pfreundschuh, M., Waldmann, T.A., Horak, I.D. (1997) Effects of the tyrosine-kinase inhibitor geldanamycin on ligand-induced Her-2/neu activation, receptor expression and proliferation of Her-2-positive malignant cell lines. *Int. J. Cancer* 70, 221-229.
- Heemels, M. T., Ploegh, H. L. (1994) Substrate specificity of allelic variants of the TAP peptide transporter. *Immunity* 1, 775-779.
- Heinemeyer, T., Wingender, E., Reuter, I., Hermjakob, H., Kel, A.E., Kel, O.V., Ignatieva, E.V., Ananko, E.A., Podkolodnaya, O.A., Kolpakov, F.A. (1998) Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res.* 26 (1), 362-367.
- Hendil, K.B., Khan, S., Tanaka, K., (1998) Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20S proteasomes. *Biochem. J.*, 332 (Pt 3), 749-754
- Hengel, H., Koopmann, J.O., Flohr, T., Muranyi, W., Goulmy, E., Hämmerling, G.J. (1997a) A viral ER-glycoprotein inactivates the MHC-encoded peptide transporter. *Immunity* 6, 623-632.
- Herberg, J.A., Sgouros, J., Jones, T., Copeman, J., Humphray, S.J., Sheer, D., Cresswell, P., Beck, S., Trowsdale, J. (1998) Genomic analysis of the tapasin gene, located close to the TAP loci in the MHC. *Eur. J. Immunol.*, 28, 459-467.
- Herrmann, F., Lehr, H.A., Drexler, I., Sutter, G., Hengstler, J., Wollscheid, U., Seliger, B. HER-2/neu-mediated regulation of components of the MHC class I antigen-processing pathway. *Cancer Res.* 64, 215-220.
- Hewitt, E.W., Gupta, S.S., Lehner, P.J. (2001) The human cytomegalovirus gene product US6 inhibits ATP binding by TAP. *EMBO J.* 20, 387-396.
- Hilt, W., Heinemeyer, W., Wolf, D.H. (1996) The proteasome and protein degradation in yeast. *Adv. Exp. Med. Biol.* 389, 197-202.

- Hill, A., Jugovic, P., York, I., Russ, G., Benninck, J., Yewdell, J. (1995) Herpes simplex virus turns off TAP to evade host immunity. *Nature* 375, 411-415.
- Hilt, W., Wolf, D.H. (1995) Proteasomes of the yeast *S. cerevisiae*: genes, structure and functions. *Mol. Biol. Rep.* 21 (1), 3-10.
- Hisamatsu, H., Shimbara, N., Saito, Y., Kristensen, P., Hendil, K.B., Fujiwara, T., Takahashi, E., Tanahashi, N., Tamura, T., Ichihara, A., Tanaka, K. (1996) Newly identified pair of proteasomal subunits regulated reciprocally by interferon gamma. *J. Exp. Med.* 183 (4), 1807-16.
- Hobart, M., Ramassar, V., Goes, N., Urmson, J., Halloran, P.F. (1997) IFN regulatory factor 1 plays a central role in the regulation of the expression of class I and class II MHC genes in vivo. *J. Immunol.* 158, 4260-4269.
- Holbro, T., Civenni, G., Hynes, N.E. (2003) The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp. Cell. Res.* 284 (1), 99-110.
- Hollywood, D.P., Hurst, H.C. (1993) A novel transcription factor, OB2-1, is required for overexpression of the proto-oncogene *c-erbB-2* in mammary tumour lines. *EMBO. J.* 12, 2369-2375.
- Horton, J. (2002) Trastuzumab use in breast cancer: clinical issues. *Cancer Control* 9 (6), 499-507.
- Hou, S., Guan, H., Ricciardi, R.P. (2002) In adenovirus type 12 tumorigenic cells, major histocompatibility complex class I transcription shutoff is overcome by induction of NF- κ B and relief of COUP-TFII repression. *J. Virol.* 76, 3212-3220.
- Hudziak, R.M., Lewis, G.D., Winget, M., Fendly, B.M., Shepard, H.M., Ullrich, A. (1989) p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol. Cell. Biol.* 9 (3), 1165-72.
- Hughes, E.A., Cresswell, P. (1998) The thiol oxidoreductase ERp57 is a component of the MHC class I peptide-loading complex. *Curr. Biol.* 8, 709-12.
- Hwang, L.Y., Lieu, P.T., Peterson, P.A., Yang, Y. (2001) Functional regulation of immunoproteasomes and transporter associated with antigen processing. *Immunol. Res.* 24 (3), 245-72.
- Hynes, N.E., Lane, H.A. (2001) Myc and mammary cancer: Myc is a downstream effector of the ErbB2 receptor tyrosine kinase. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 6 (1), 141-50.
- Hynes, N.E., Stern, D.F. (1994) The biology of *erbB-2/neu/HER-2* and its role in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1198, 165-184.
- Jager, S., Groll, M., Huber, R., Wolf, D.H., Heinemeyer, W. (1999) Proteasome beta-type subunits: unequal roles of propeptides in core particle maturation and a hierarchy of active site function. *J. Mol. Biol.* 291 (4), 997-1013.
- Jainchill, J.L., Aaronson, S.A., Todaro, G.J. (1969) Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J. Virol.* 4, 549-553.

- Janda, E., Litos, G., Grunert, S., Downward, J., Beug, H. (2002) Oncogenic Ras/Her-2 mediate hyperproliferation of polarized epithelial cells in 3D cultures and rapid tumor growth via the PI3K pathway. *Oncogene* 21 (33), 5148-5159.
- Järvinen, T.A., Liu, E.T. (2003) HER-2/neu and topoisomerase II α in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 78 (3), 299-311.
- Jiang, K., Delarue, F.L., Sebt, S.M. (2004) EGFR, ErbB2 and Ras but not Src suppress RhoB expression while ectopic expression of RhoB antagonizes oncogene-mediated transformation. *Oncogene* 23 (5), 1136-1145.
- Johnson, D.G., Cress, W.D., Jakoi, L., Nevins, J.R. (1994) Oncogenic capacity of the E2F1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (26), 12823-12827.
- Johnson, D., Pober, J. (1990) Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically increase transcription of HLA class I heavy- and light chain genes in vascular endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 183- 192.
- Johnson, A.K., Templeton, D.J., Sy, M.S., Harding, C.V. (1999) Deficiency of transporter for antigen presentation (TAP) in tumor cells allows evasion of immune surveillance and increases tumorigenesis. *J. Immunol.* 163, 4224-4231.
- Jones, TR., Wiertz, E.J., Sun, L., Fish, KN., Nelson, JA., Ploegh, HL. (1996) Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11327-11333.
- Kageshita, T., Hirai, S., Ono, T., Hicklin, D.J., Ferrone, S. (1999) Down-regulation of HLA class I antigen-processing molecules in malignant melanoma: association with disease progression. *Am. J. Pathol.* 154, 745-754.
- Kaklamanis, L., Leek, R., Koukourakis, M., Gatter, K.C., Harris, A. (1995) Loss of transporter in Antigen Processing 1 transporter protein and major histocompatibility complex class I molecules in metastatic versus primary breast cancer. *Cancer res.* 55, 5191-5194.
- Kamarashev, J., Ferrone, S., Seifert, B., Boni, R., Nestle, F.O., Burg, G., Dummer, R. (2001) TAP1 down-regulation in primary melanoma lesions: an independent marker of poor prognosis. *Int. J. Cancer* 95, 23-28.
- Karunakaran, D., Tzahar, E., Beerli, R.R., Chen, X., Graus-Porta, D., Ratzkin, B.J., Seger, R., Hynes, N.E., Yarden, Y. (1996) ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J.* 15, 254-264.
- Karttunen, J.T., Lehner, P.J., Gupta, S.S., Hewitt, E.W., Cresswell, P. (2001) Distinct functions and cooperative interaction of the subunits of the transporter associated with antigen processing (TAP). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 7431-7436.
- Kavanagh, D.M., Gold, M.C., Wagner, M., Koszinowski, U.H., Hill, A.B. (2001) The multiple immune-evasion genes of murine cytomegalovirus are not redundant: m4 and m152 inhibit antigen presentation in a complementary and cooperative fashion. *J. Ex. Med.* 194, 967-978.
- Kenney, N.J., Huang, R.P., Johnson, G.R., Wu, J.-X., Okamura, D., Matheny, W., Kordon, E., Gullick, W.J., Plowman, G., Smith, G.H., Salomon, D.S., Adamson, E.D., Detection and location of amphiregulin and cripto-1 expression in the developing postnatal mouse mammary gland. *Mol. Reproduct. Dev.* 41, 277-286.

- Kessler, B.M., Glas, R., Ploegh, H.L. (2002) MHC class I antigen processing regulated by cytosolic proteolysis-short cuts that alter peptide generation. *Mol Immunol.* 39 (3-4),171-9.
- Khong, H.T, Restifo, N.P. (2002) Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol.* 3 (11), 999-1005.
- Kirchhoff, S., Schaper, F., Hauser, H. (1993) Interferon regulatory factor 1 (IRF-1) mediates cell growth inhibition by transactivation of downstream target genes. *Nucleic Acids Res.* 21 (12), 2881-2889.
- Kiessling, R., Wei, WZ., Herrmann, F., Lindencrona, JA., Choudhury, A., Kono, K., Seliger, B. (2002) Cellular immunity to the HER-2/neu proto-oncogene. *Adv. Cancer Res.* 85, 101-144.
- Kimura, A., Israel, A., Le Bail, O., Kourilsky, P. (1986) Detailed analyses of the mouse H-2Kb promoter: enhancer-like sequences and their role in the regulation of class I gene expression. *Cell* 44 (2), 261-272.
- Klein, J., Takahata, N., Ayala, F.J. (1993) MHC polymorphism and human origins. *Sci. Am.* 269: 78-83.
- Kono, K., Halapi, E., Hising, C., Peterson, M., Gerdin, E., Vanky, F., Kiessling, R. (1997) Mechanisms of escape from CD8+ T-cell clones specific for the HER-2/neu proto-oncogene expressed in ovarian carcinomas: related and unrelated to decreased MHC class I expression. *Int. J. Cancer* 70, 112-119.
- Kono, K., Sato, E., Naganuma, H., Takahashi, A., Mimura, K., Nukui, H., Fujii, H. (2004) Trastuzumab (Herceptin) enhances class I-restricted antigen presentation recognized by HER-2/neu-specific T cytotoxic lymphocytes. *Clin. Cancer Res.* 10 (7), 2538-25344.
- Koopman, L.A., Corver, W.E., van der Slik, A.R., Giphart, M.J., Fleuren, G.J. (2000) Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer. *J. Exp. Med.* 191 (6), 961-76
- Koopmann, J.O., Albring, J., Hüter, E., Bulbuc, N., Spee, P., Neefjes, J., Hämmerling, G.J., Momburg, F. (2000) Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel. *Immunity* 13, 1-20.
- Kopp, F., Dahlmann, B., Kuehn, L. (2001) Reconstitution of hybrid proteasomes from purified PA700-20 S complexes and PA28 $\alpha\beta$ activator: ultrastructure and peptidase activities. *J. Mol. Biol.* 313 (3), 465-471.
- Kloetzel, P.M. (2001) Antigen processing by the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 179-187.
- Kloetzel, P.M., Ossendorp, F. (2004) Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 16 (1), 76-81.
- Knutson, K.L., Schiffman, K., Cheever, M.A., Disis, M.L. (2002) Immunization of cancer patients with a HER-2/neu, HLA-A2 peptide, p369-377, results in short-lived peptide-specific immunity. *Clin. Cancer Res.* 8 (5), 1014-1018.
- Krishnakumar, S., Lakshmi, S., Abhyankar, D., Biswas, J. (2003) Loss of antigen-processing molecules in primary orbital melanoma. *Orbit.* 22 (4), 265-70.

- Krishnakumar, S., Sundaram, A., Abhyankar, D., Krishnamurthy, V., Shanmugam, M.P., Gopal, L., Sharma, T., Biswas, J. (2004) Major histocompatibility antigens and antigen-processing molecules in retinoblastoma. *Cancer* 100 (5), 1059-69.
- Krmpotic, A., Busch, D.H., Bubic, I., Gebhardt, F., Hengel, H., Hasan, M., Scalzo, A.A., Koszinowski, U.H., Jonjic, S. (2002) MCMV glycoprotein gp40 confers virus resistance to CD8⁺ T cells and NK cells in vivo. *Nat. Immunol.* 3, 529-535.
- Kröger, A., Dallugge, A., Kirchhoff, S., Hauser, H. (2003) IRF-1 reverts the transformed phenotype of oncogenically transformed cells in vitro and in vivo. *Oncogene* 22 (7), 1045-1056.
- Kuhns, J.J., Batalia, M.A., Yan, S., Collins, E.J. (1999) Poor binding of a HER-2/neu epitope (GP2) to HLA-A2.1 is due to a lack of interactions with the center of the peptide. *J. Biol. Chem.* 274 (51), 36422-7.
- Kute, T., Lack, C.M., Willingham, M., Bishwokama, B., Williams, H., Barrett, K., Mitchell, T., Vaughn, J.P. (2004) Development of Herceptin resistance in breast cancer cells. *Cytometry.* 57A (2), 86-93.
- Kumar, R., Mandal, M., Vadlamudi, R. (2000) New insights into anti-HER-2 receptor monoclonal antibody research. *Semin Oncol.* 27 (6 Suppl 11), 84-91, discussion 92-100.
- Kumar-Sinha, C., Ignatoski, K.W., Lippman, M.E., Ethier, S.P., Chinnaiyan, A.M. (2003) Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. *Cancer Res.* 63, 132-139.
- Kushida, M.M., Dey, A., Zhang, X-L., Campbell, J., Jheeney, M., Carlyle, J., Ganguly, S., Ozato, K., Vasavada, H., Chamberlain, J.W. (1997) A 150-base pair 5' region of the MHC class I HLA-B7 gene is sufficient to direct tissue-specific expression and locus control region activity. *J. Immunol.* 159, 4913-4929.
- Lacaille, V.G., Androlewicz, M.J. (1998) Herpes simplex virus inhibitor ICP47 destabilizes the transporter associated with antigen processing (TAP) heterodimer. *J. Biol. Chem.* 273 (28), 17386-90.
- Lane, H.A., Beuvink, I., Motoyama, A.B., Daly, J.M., Neve, R.M., Hynes, N.E., (2000) ErbB2 potentiates breast tumor proliferation through modulation of p27(Kip1)-Cdk2 complex formation - receptor overexpression does not determine growth dependency", *Mol. Cell. Biol.*, 20, 3210-3223.
- Larsen, F., Solheim, J., Kristensen, T., Kolsto, A.B., Prydz, H. (1993) A tight cluster of five unrelated human genes on chromosome 16q22.1. *Hum Mol Genet.* 2 (10), 1589-95.
- Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P.C., Semenza, G.L., (2001) HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) synthesis - novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression., *Mol. Cell. Biol.* 21, 3995-4004.
- Le Bouteiller, P. (1994) HLA class I chromosomal region, genes and products: facts and questions. *Crit. Rev. Immunol.* 14, 89-129.
- Lee, R.J., Albanese, C., Fu, M., D'Amico, M., Lin, B., Watanabe, G., Haines, G.K. III, Siegel, P.M., Hung, M.C., Yarden, Y., Horowitz, J.M., Muller, W.J., Pestell, R.G. (2000) Cyclin D1 is required for transformation by activated Neu and is induced through an E2F-dependent signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 20, 672-683.

- Lemoine, N.R., Jain, S., Silvestre, F., Lopes, C., Hughes, C.M., McLelland, E., Gullick, W.J., Filipe, M.I., (1991) Amplification and overexpression of the EGF receptor and c-erbB-2 proto-oncogenes in human stomach cancer. *Br. J. Cancer* 64 (1), 79-83.
- Lenferink, A.E., Busse, D., Flanagan, W.M., Yakes, F.M., Arteaga, C.L., (2001) ErbB2/neu kinase modulates cellular p27(Kip1) and cyclin D1 through multiple signaling pathways. *Cancer Res.* 61, 6583-6591.
- Leu, M., Bellmunt, E., Schwander, M., Farinas, I., Brenner, H.R., Muller, U. (2003) Erbb2 regulates neuromuscular synapse formation and is essential for muscle spindle development. *Development* 130 (11), 2291 – 2301.
- Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P.M., Klein, G. (1995) Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* 375, 685-688.
- Li, S., Paulsson K.M., Sjögren H.O., Wang P. (1999) Peptide-bound major histocompatibility complex class I molecules associate with tapasin before dissociation from transporter associated with antigen processing. *J. Biol. Chem.* 274 (13), 8649-8654.
- Li, Y., Salter-Cid, L., Vitiello, A., Preckel, T., Lee, J.D., Angulo, A., Cai, Z., Peterson, P.A., Yang, Y. (2000) Regulation of transporter associated with antigen processing by phosphorylation. *J Biol Chem.* 275 (31), 24130-5.
- Liang, J., Zubovitz, J., Petrocelli, T., Kotchetkov, R., Connor, M.K., Han, K., Lee, J.H., Ciarallo, S., Catzavelos, C., Beniston, R., Franssen, E., Slingerland, J.M., (2002) PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat. Med.* 8, 1153-1160.
- Ljunggren, H.G., Karre, K. (1985) Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *Exp Med.* 162 (6), 1745-59
- Lin, W., Sanchez, H.B., Deerinck, T. Morris, J.K., Ellisman, M., Lee, K.F. (2000) Aberrant development of motor axons and neuromuscular synapses in erbB2-deficient mice *Proc Natl. Acad. Sci. U S A.* 97, (3), 1299-304.
- Lindquist, J.A., Jensen, O.N., Mann, M., Hammerling, G.J. (1998) ER-60, a chaperone with thiol-dependent reductase activity involved in MHC class I assembly. *Embo J.* 17, 2186-95.
- Lohmann, S., Wollscheid, U., Huber, C., Seliger, B. (1996) Multiple levels of MHC class I down-regulation by ras oncogenes. *Scand. J. Immunol.* 43 (5), 537-44.
- Lollini, P.L., Forni, G. (2003) Cancer immunoprevention: tracking down persistent tumor antigens. *Trends Immunol.* 24 (2), 62-66.
- Lollini, P.L., Nicoletti, G., Landuzzi, L., De Giovanni, C., Rossi, I., Di Carlo, E., Musini, P., Muller, W.J., Nanni, P. (1998) Downregulation of major histocompatibility complex class I expression in mammary carcinoma of HER-2/neu transgenic mice. *Int. J. Cancer* 77, 937-941.
- Lorenzo, M.E., Ploegh, H.L., Tirabassi, R.S. (2001) Viral immune evasion strategies and the underlying cell biology. *Sem. Immunol.* 13, 1-9

- Lowe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W., Huber, R. (1995) Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science*. 268, 533-539.
- Ludewig, B., Ochsenbein, A.F., Odermatt, B., Paulin, D., Hengartner, H., Zinckernagel, R.M. (2000) Immunotherapy with dendritic cells directed against tumor antigens shared with normal host cells results in severe autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 191 (5), 795-803.
- Ma, C.P., Willy, P.J., Slaughter, C.A., Demartino, G.N. (1993) PA28, an activator of the 20 S proteasome, is inactivated by proteolytic modification at its carboxyl terminus. *J. Biol. Chem.*, 268 (30), 22514- 22519.
- Ma, C.P., Slaughter, C.A., DeMartino, G.N. (1992) Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20S proteasome (macropain) *J. Biol. Chem.* 267 (15), 10515-10523.
- Maity, A., Pore, N., Lee, J., Solomon, D., O'Rourke, D.M. (2000) Epidermal growth factor receptor transcriptionally up-regulates vascular endothelial growth factor expression in human glioblastoma cells via a pathway involving phosphatidylinositol 3'-kinase and distinct from that induced by hypoxia. *Cancer Res.* 60, 5879-5886.
- Mann, M., Sheng, H., Shao, J., Williams, C.S., Pisacane, P.I., Sliwkowski, M.X., DuBois, R.N. (2001) Targeting cyclooxygenase 2 and HER-2/neu pathways inhibits colorectal carcinoma growth. *Gastroenterology* 120 (7), 1713-9.
- Matsui, M., Machida, S., Tomiyama, H., Takiguchi, M., Akatsuka, T. (2001) Introduction of tapasin gene restores surface expression of HLA class I molecules, but not antigen presentation of an HIV envelope peptide in a hepatoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285 (2), 508-17.
- Mayer, W.E., Klein, J. (2001) Is tapasin a modified Mhc class I molecule? *Immunogenetics.* 53 (9), 719-723.
- Mazumdar, A., Adam, L., Boyd, D., Kumar, R. (2001) Heregulin regulation of urokinase plasminogen activator and its receptor: human breast epithelial cell invasion. *Cancer Res.* 61, 400-405.
- Menard, S., Fortis, S., Castiglioni, F., Agresti, R., Balsari, A., (2001) HER2 as a prognostic factor in breast cancer. *Oncology* 61 Suppl. 2, 67-72.
- Meyer zum Büschenfelde, C., Metzger, J., Hermann, C., Nicklisch, N., Peschel, C., Bernhard, H. (2001) The Generation of Both T Killer and Th Cell Clones Specific for the Tumor-Associated Antigen HER2 Using Retrovirally Transduced Dendritic Cells. *J. Immunol.* 167, 1712-1719.
- Meyer zum Büschenfelde, C., Nicklisch, N., Rose-John, S., Peschel, C., Bernhard, H. (2000) Generation of tumor-reactive CTL against the tumor-associated antigen HER2 using retrovirally transduced dendritic cells derived from CD34+ hemopoietic progenitor cells. *J. Immunol.* 165, 4133-4140.
- Miller, D.M., Zhang, Y., Rahill, B.M., Waldman, W.J., Sedmak, D.D. 1999 Human cytomegalovirus inhibits IFN-alpha-stimulated antiviral and immunoregulatory responses by blocking multiple levels of IFN-alpha signal transduction. *J. Immunol.* 162, 6107-6113.
- Min, W., Pober, J.S., Johnson, D.R. (1996) Kinetically coordinated induction of TAP1 and HLA class I by IFN-gamma. *J. Immunol.* 156, 3174-3183.

- Miyagi, T., Tatsumi, T., Takehara, T., Kanto, T., Kuzushita, N., Sugimoto, Y., Jinushi, M., Kasahara, A., Sasaki, Y., Hori, M., Hayashi, N. (2003) Impaired expression of proteasome subunits and human leukocyte antigens class I in human colon cancer cells. *J Gastroenterol Hepatol.* 18 (1), 32-40.
- Moasser, M.M., Basso, A., Averbuch, S.D., Rosen, N. (2001) The tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ("Iressa") inhibits HER2-driven signaling and suppresses the growth of HER2-overexpressing tumor cells. *Cancer Res.* 61, 7184-7188.
- Momburg, F., Armandola, E., Post, M., Hämmerling, G. J. (1996) Residues in TAP2 peptide transporters controlling substrate specificity. *J. Immunol.* 156, 1756-1759.
- Momburg, F., Ortiz-Navarrete, V., Neefjes, J., Goulmy, E., van-de-Wal, Y., Spits, H., Powis, S.J., Butcher, G.W., Howard, J.C., Walden, P., Haemmerling, G. (1992) Proteasome subunits encoded by the major histocompatibility complex are not essential for antigen presentation. *Nature* 360,174-177.
- Momburg, F., Roelse, J., Hämmerling, G., and Neefjes, J. (1994) Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transporter. *J. Exp. Med.* 179: 1613-1618.
- Monden, Y., Hamano Takaku, F., Shindo Okada, N., Nishimura, S. (1999) Azatyrosine. Mechanism of action for conversion of transformed phenotype to normal. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 886, 109-21.
- Montagna, C., Andrechek, E.R., Padilla-Nash, H., Muller, W.J., Ried, T. (2002) Centrosome abnormalities, recurring deletions of chromosome 4, and genomic amplification of HER2/neu define mouse mammary gland adenocarcinomas induced by mutant HER2/neu. *Oncogene.* 21 (6), 890-898.
- Morrice, N.A., Powis, S.J. (1998) A role for the thiol-dependent reductase ERp57 in the assembly of MHC class I molecules. *Curr. Biol.* 8, 713-716.
- Moulder, S.L., Yakes, F.M., Muthuswamy, S.K., Bianco, R., Simpson, J.F., Arteaga, C.L. (2001) Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 61, 8887-8895.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Ehrlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51, 263-273.
- Murata, S., Udono, H., Tanahashi, N., Hamada, N., Watanabe, K., Adfachi, K., Yamano, T., Yui, K., Kobayashi, N., Kasahara, M., Tanaka, K., Chiba, T. (2001) Immunoproteasome assembly and antigen presentation in mice lacking both PA28 α and PA28 β . *EMBO J.* 20, 5898-5907.
- Murray, P.G., Constandinou, C.M., Crocker, J., Young, L.S., Ambinder, R.F. (1998) Analysis of major histocompatibility complex class I, TAP expression, and LMP2 epitope sequence in Epstein-Barr virus-positive Hodgkin's disease. *Blood* 92, 2477-2483.
- Nagy, P., Jenei, A., Damjanovich, S., Jovin, T.M., Szolosi, J. (1999) Complexity of signal transduction mediated by ErbB2: clues to the potential of receptor-targeted cancer therapy. *Pathol. Oncol. Res.* 5 (4), 255-71.

- Nahta, R., Takahashi, T., Ueno, N.T., Hung, M.C., Esteva, F.J. (2004) P27(kip1) down-regulation is associated with trastuzumab resistance in breast cancer cells. *Cancer Res.* 64, 3981-3986.
- Nanni, P., Nicoletti, G., De Giovanni, C., Landuzzi, L., Di Carlo, E., Cavallo, F., Pupa, S.M., Rossi, I., Colombo, M.P., Ricci, C., Astolfi, A., Musiani, P., Forni, G., Lollini, P.L. (2001) Combined allogeneic tumor cell vaccination and systemic interleukin 12 prevents mammary carcinogenesis in HER-2/neu transgenic mice. *J. Exp. Med.* 194 (9), 1195-205.
- Nanni, P., Nicoletti, G., De Giovanni, C., Landuzzi, L., Di Carlo, E., Iezzi, M., Ricci, C., Astolfi, A., Croci, S., Marangoni, F., Musiani, P., Forni, G., Lollini, P.L. (2003) Prevention of HER-2/neu transgenic mammary carcinoma by tamoxifen plus interleukin 12. *Int. J. Cancer* 105, 384-389.
- Neefjes, J., Gottfried, E., Roelse, J., Grommé, M., Obst, R., Hämmerling, G.J., Momburg, F. (1995) Analysis of fine specificity of rat, mouse and human TAP peptide transporters, *Eur. J. Immunol.* 25, 1133-1136.
- Negro, A., Brar, B.K., Lee, K.F. (2004) Essential roles of Her2/erbB2 in cardiac development and function. *Recent Prog. Horm. Res.* 59:1-12.
- Nelson, N., Marks, M.S., Driggers, P.H., Ozato, K. (1993) Interferon consensus sequence-binding protein, a member of the interferon regulatory factor family, suppresses interferon-induced gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 13, 588-599.
- Neve, R.M., Holbro, T., Hynes, N.E. (2002) Distinct roles for phosphoinositide 3-kinase, mitogen-activated protein kinase and p38 MAPK in mediating cell cycle progression of breast cancer cells. *Oncogene*, 21 (29), 4567-4576.
- Neve, R.M., Lane, H.A., Hynes, N.E. (2001) The role of overexpressed HER2 in transformation *Annals of oncology.* 12, suppl.1, 9-13.
- Neve, R.M., Sutterluty, H., Pullen, N., Lane, H.A., Daly, J.M., Krek, W., Hynes, N.E. (2000) Effects of oncogenic ErbB2 on G1 cell cycle regulators in breast tumor cells. *Oncogene*, 19 (13), 1647-1656.
- Nicholson, R.I., Gee, J.M., Harper, M.E. (2001) EGFR and cancer prognosis. *Eur. J. Cancer* 37, Suppl. 4, 9-15.
- Nijenhuis, M., Hämmerling, G. J. (1996) Multiple regions of the transporter associated with antigen processing (TAP) contribute to its peptide binding site. *J. Immunol.* 157, 5467-5472.
- Norgaard, P., Law, B., Joseph, H., Page, D.L., Shyr, Y., Mays, D., Pietenpol, J.A., Kohl, N.E., Oliff, A., Coffey, R.J. Jr., Poulsen, H.S., Moses, H.L. (1999) Treatment with farnesyl-protein transferase inhibitor induces regression of mammary tumors in transforming growth factor (TGF) alpha and TGF alpha/neu transgenic mice by inhibition of mitogenic activity and induction of apoptosis. *Clin. Cancer Res.* 5 (1), 35-42.
- O'Hagan, R.C., Hassell, J.A. (1998) The PEA3 Ets transcription factor is a downstream target of the HER2/Neu receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 16 (3), 301-310.

- Oh, A.S., Lorant, L.A., Holloway, J.N., Miller, D.L., Kern, F.G., El-Ashry, D. Hyperactivation of MAPK induces loss of ER α expression in breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 15, 1344-1359.
- Ohnishi, Y., Nakamura, H., Yoshimura, M., Tokuda, Y., Iwasawa, M., Ueyama, Y., Tamaoki, N., Shimamura, K. (1995) Prolonged survival of mice with human gastric cancer treated with an anti-c-ErbB-2 monoclonal antibody. *Br. J. Cancer* 71 (5), 969-973.
- Orlowski, M., Cardozo, C., Michaud, C. (1993) Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. *Biochemistry* 32 (6), 1563-1572.
- Orlowski, M., Wilk, S. (1981) A multicatalytic protease complex from pituitary that forms enkephalin and enkephalin containing peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101 (3), 814-822.
- Ortmann, B., Androlewicz M.J., Cresswell P. (1994) MHC class I/ β_2 -microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding. *Nature* 368, 864-867.
- Ortmann, B., Copeman J., Lehner P.J., Sadasivan B., Herberg J.A., Grandea A.G., Riddell S.R., Tampé R., Spies T., Trowsdale J., Cresswell P. (1997) A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science* 277, 1306-1309.
- Oudejans, J.J., Jiwa, N.M., Kummer, J.A., Horstman, A., Vos, W., Baak, J.P., Kluin, P.M., van der Valk, P., Walboomers, J.M., Meijer, C.J. (1996) Analysis of major histocompatibility complex class I expression on Reed-Sternberg cells in relation to the cytotoxic T-cell response in Epstein-Barr virus-positive and -negative Hodgkin's disease. *Blood* 87, 3844-51.
- Palombella, V. J., Rando, O. J., Goldberg, A. L., Maniatis, T. (1994) The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell* 78 (5), 773-785.
- Pauletti, G., Godolphin, W., Press, M.F., Slamon, D.J. (1996) Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene* 13 (1), 63-72.
- Paulsson, K.M., Wang, P. (2004) Quality control of MHC class I maturation. *FASEB J.* 18 (1), 31-8.
- Pellegrino, M.A., Ferrone, S., Reisfeld, M.A., Irie, R.F., Golub, S.H. (1977). Expression of histocompatibility (HLA) antigens on tumor cells and normal cells from patients with melanoma. *Cancer* 40, 36-41.
- Peoples, G.E., Goedegebuure, P.S., Smith, R., Linehan, D.C., Yoshino, I., Eberlein, T.J. (1995) Breast and Ovarian Cancer-Specific Cytotoxic T Lymphocytes Recognize the Same HER2/Neu-Derived Peptide *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 432-436.
- Perez, E. A., Rodeheffer, R. (2004) Clinical Cardiac Tolerability of Trastuzumab. *J. Clin. Oncol.* 22, 322-329 .
- Pianetti, S., Arsura, M., Romieu-Mourez, R., Coffey, R.J., Sonenshein, G.E. (2001) Her-2/neu overexpression induces NF- κ B via a PI3-kinase/Akt pathway involving calpain-mediated degradation of I κ B- α that can be inhibited by the tumor suppressor PTEN. *Oncogene* 20 (11), 1287-1299.

- Pinkas-Kramarski, R., Eilam, R., Alroy, I., Levkowitz, G., Lonai, P., Yarden, Y. (1997) Differential expression of NDF/neuregulin receptors ErbB-3 and ErbB-4 and involvement in inhibition of neuronal differentiation. *Oncogene* 15 (23), 2803 – 2815.
- Pinkas-Kramarski, R., Soussan, L., Waterman, H., Levkowitz, G., Alroy, I., Klapper, L., Lavi, S., Seger, R., Ratzkin, B.J., Sela, M., Yarden, Y. (1996) Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J.* 15, 2452-2467.
- Polanowska, J., Le Cam, L., Orsetti, B., Vallés, H., Fabbbrizio, E., Fjas, L., Taviaux, S., Theillet, C., Sardet, C. (2000) Human E2F5 gene is oncogenic in primary rodent cells and is amplified in human breast tumors. *Genes. Chromosomes and cancer* 28, 126-130.
- Prenzel, N., Fischer, O.M., Streit, S., Hart, S., Ullrich, A. (2001) The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification *Endocrine rel. cancer* 8 (1): 11-31
- Polanowska, J., Le Cam, L., Orsetti, B., Valles, H., Fabbbrizio, E., Fajas, L., Taviaux, S., Theillet, C., Sardet, C. (2000) Human E2F5 gene is oncogenic in primary rodent cells and is amplified in human breast tumors. *Genes Chromosomes Cancer.* 28 (1), 126-30.
- Press MF, Bernstein L, Thomas PA, Meisner LF, Zhou JY, Ma Y, Hung G, Robinson Harris, R.A., El-Naggar, C., Slamon, A. Phillips, Dj., Ross, R.N., Wolman, J.S., Flom, S.R. (1997) HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J. Clin. Oncol.* 15 (8), 2894-2904.
- Press, M.F., Cordon-Cardo, C., Slamon, D.J. (1990) Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 5 (7), 953-962.
- Pupa, S.M., Menard, S., Andreola, S., Colnaghi, M.I. (1993) Antibody response against the c-erbB-2 oncoprotein in breast carcinoma patients. *Cancer Res.* 53, 5864-5866.
- Quaglino, E., Rolla, S., Iezzi, M., Spadaro, M., Musiani, P., De Giovanni, C., Lollini, P.L., Lanzardo, S., Forni, G., Sanges, R., Crispi, S., De Luca, P., Calogero, R., Cavallo, F. (2004) Concordant morphologic and gene expression data show that a vaccine halts HER-2/neu preneoplastic lesions. *J. Clin. Invest.* 113 (5), 709-17.
- Quando, K., Frech, H., Karas, E., Wingender, E., Werner, T. (1995) MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* 23 (23), 4878-4884.
- Qin, Z., Blankenstein, T. (2000) CD4+ T cell-mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity* 12, 677-686.
- Qin, Z., Harders, C., Cao, X., Huber, C., Blankenstein, T., Seliger, B. (2002) Increased tumorigenicity, but unchanged immunogenicity of transporter for antigen presentation 1 – deficient tumors. *Cancer res.* 62, 2856-2860.
- Qin, Z., Schwartzkopff, J., Pradera, F., Kammertoens, T., Seliger, B., Pircher, H., Blankenstein, T. (2003) A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells. *Cancer Res.* 63, 4095-4100.
- Raghuraman, G., Lapinski, P.E., Raghavan, M. (2002) Tapasin Interacts with the Membrane-spanning Domains of Both TAP Subunits and Enhances the Structural Stability of TAP1·TAP2 Complexes. *J. Biol. Chem.* 277 (44), 41786 - 41794.

- Rammensee, H.G., Falk, K., Rötzschke, O. (1993) MHC molecules as peptide receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 5: 35-44.
- Rayman, J.B., Takahashi, Y., Indjeian, V.B., Dannenberg, J.H., Catchpole, S., Watson, R.J., te Riele, H., Dynlacht, B.D. (2002) E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes Dev.* 16 (8), 933-47.
- Rechsteiner, M., Realini, C., Ustrell, V. (2000) The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation. *Biochem. J.* 345, 1-15.
- Reese, D.M., Slamon, D.J. (1997) HER-2/neu Signal Transduction in Human Breast and Ovarian Cancer. *Stem Cells* 15, 1-8.
- Reits, E., Neijssen, J., Herberts, C., Benckhuijsen, W., Janssen, L., Drijfhout, J.W., Neefjes, J. (2004) A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity* 20, 495-506.
- Reits, E.A., Vos, J.C., Gromme, M., Neefjes, J. (2000) The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature* 404, 774-778.
- Ren, B., Cam, H., Takahashi, Y., Volkert, T., Terragni, J., Young, R.A., Dynlacht, B.D. (2002) E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev.* 16 (2), 245-56.
- Reusch, U., Muranyi, W., Lucin, P., Burgert, H.G., Hengel, H., Koszinowski, U.H. (1999) A cytomegalovirus glycoprotein reroutes MHC class I complexes to lysosomes for degradation. *EMBO J.* 18, 1081-1091.
- Rikitake, Y., Moran, E. (1992) DNA-Binding properties of the E1A-associated 300-kilodalton protein. *Mol. Cell Biol.* 12 (6), 2826-2836.
- Ritz, U., Seliger, B. (2001) The transporter associated with antigen processing (TAP): Structural integrity, expression, function and its clinical relevance. *Mol. Med.* 7(3), 149-158.
- Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., Goldberg, A.L. (1994) Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78 (5), 761-771.
- Roh, H., Pippin, J.A., Green, D.W., Boswell, C.B., Hirose, C.T., Mokadam, N., Drebin, J.A. (2000) HER2/neu antisense targeting of human breast carcinoma. *Oncogene* 19 (53), 6138-43.
- Rongcun, Y., Salazar-Onfray, F., Charo, J., Evrin, K., Maes, H., Kono, K., Hisling, C., Gerdin, E., Lan, L., Apella, E., Sette, A., Celis, E., Kiesling, R. (1999) Identification of new HER2/neu derived peptide epitopes which can elicit CTL cytotoxic for autologous and allogenic carcinomas and melanomas. *J. Immunol.* 163, 1037-1044.
- Ross, J.S., Fletcher JA. (1999) HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol.* 112 (1 Suppl 1), 53-67.
- Ross, J.S., Fletcher, J.A., Bloom, K.J., Linette, G.P., Stec, J., Symmans, W.F., Puztai, L., Hortobagyi GN. (2004) Targeted therapy in breast cancer: The HER-2/neu gene and protein. *Mol. Cell Proteomics.* 3 (4), 379-98.

- Rotem-Yehudar, R., Groettrup, M., Soza, A., Kloetzel, P.M., Ehrlich, R. (1996) LMP-associated proteolytic activities and TAP-dependent peptide transport for class I MHC molecules are suppressed in cell lines transformed by the highly oncogenic adenovirus 12. *J. Exp. Med.* 183, 499-514.
- Rotter, M., Block, T., Busch, R., Thanner, S., Hofler, H. (1992) Expression of HER-2/neu in renal-cell carcinoma. Correlation with histologic subtypes and differentiation. *Int. J. Cancer* 52, 213-217.
- Rovero, S., Amici, A., Carlo, E.D., Bei, R., Nanni, P., Quaglino, E., Porcedda, P., Boggio, K., Smorlesi, A., Lollini, P.L., Landuzzi, L., Colombo, M.P., Giovarelli, M., Musiani, P., Forni, G. (2000) DNA vaccination against rat her-2/Neu p185 more effectively inhibits carcinogenesis than transplantable carcinomas in transgenic BALB/c mice. *J. Immunol.* 165, 5133-5142.
- Rovero, S., Boggio, K., Carlo, E.D., Amici, A., Quaglino, E., Porcedda, P., Musini, P., Forni, G. (2001) Insertion of the DNA for the 163-171 peptide of IL1beta enables a DNA vaccine encoding p185(neu) to inhibit mammary carcinogenesis in Her-2/neu transgenic BALB/c mice. *Gene Ther.* 8 (6), 447-52.
- Ritz, U., Momburg, F., Pilch, H., Huber, C., Maeurer, M.J., Seliger, B. (2001) Deficient expression of components of the MHC class I antigen processing machinery in human cervical carcinoma. *Int. J. Oncol.* 19, 1211-1220.
- Rivoltini, L., Carrabba, M., Huber, V., Castelli, C., Novellino, L., Dalerba, P., Mortarini, R., Arancia, G., Anichini, A., Fais, S., Parmiani, G. (2002) Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction *Immunological Rev.* 188 (1), 97.
- Rubin, D.M., Finley D. (1995) Proteolysis. The proteasome: a protein-degrading organelle? *Curr. Biol.* 5, 854-858.
- Ryo, A., Liou, Y.C., Wulf, G., Nakamura, M., Lee, S.W., Lu, K.P. (2002) PIN1 is an E2F target gene essential for Neu/Ras-induced transformation of mammary epithelial cells. *Mol. Cell Biol.* 22 (15), 5281-95.
- Sadasivan, B., Lehner, P., Ortmann, B., Spies, T., Cresswell, P. (1996) Roles for Calreticulin and a Novel Glycoprotein, Tapasin, in the Interaction of MHC Class I Molecules with TAP. *Immunity* 5, 103-114.
- Saveanu, L., Fruci, D., van Endert, P. (2002) Beyond the proteasome: trimming, degradation and generation of MHC class I ligands by auxiliary proteases. *Mol Immunol.* 39 (3-4), 203-15.
- Saunders, N.A., Smith, R.J., Jetten, A.M. (1994) Differential responsiveness of human bronchial epithelial cells, lung carcinoma cells, and bronchial fibroblasts to interferon-gamma in vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 11(2), 147-52.
- Salomon, D.S., Brandt, R., Ciardiello, F., Normanno, N. (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 19, 183-232.
- Salter, R.D., Cresswell, P. (1986) Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in mutant TxB cell hybrid. *EMBO J.* 5, 943-949.
- Saric, T., Beninga, J., Graef, C.I., Akopian, T.N., Rock, K.L., Goldberg, A.L. (2001) Major histocompatibility complex class I-presented antigenic peptides are degraded in cytosolic extracts primarily by thimet oligopeptidase. *J. Biol. Chem.* 276 (39), 36474-36481.

- Saric, T., Chang, S.C., Hattori, A., York, I.A., Markant, S., Rock, K.L., Tsujimoto, M., Goldberg, A.L. (2002) An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat. Immunol* 3 (12), 1169-76.
- Sarnagadharan, M.G., Sarin, P.S., Reitz, M.S., Gallo, R.C. (1972) Reverse transcriptase activity of human acute leukaemic cells: purification of the enzyme, response to AMV 70S RNA and characterization of the DANN product. *Nat. New Biol.* 240: 67-72.
- Sauter, G., Moch, H., Moore, D., Carroll, P., Kerschmann, R., Chew, K., Mihatsch, M.J., Gudat, F., Waldman, F. (1993) Heterogeneity of erbB-2 gene amplification in bladder cancer. *Cancer Res.* 53, 2199-2203.
- Sauter, G., Simon, R., Bubendorf, L., Mihatsch, M. (1990) Molecular genetics of urinary bladder cancer progression Amplification and expression of the c-erb B-2/neu proto-oncogene in human bladder cancer. *Mol Carcinog.* 3 (5), 254-257.
- Scardino, A., Alves, P., Gross, D.A., Tourdot, S., Graff-Dubois, S., Angevin, E., Firat, H., Chouaib, S., Lemonnier, F., Nadler, L.M., Cardoso, A.A., Kosmatopoulos, K. (2001) Identification of HER-2/neu immunogenic epitopes presented by renal cell carcinoma and other human epithelial tumors. *Eur. J. Immunol.* 31, 3261-3270.
- Schiffer, I.B., Gebhard, S., Heimerdinger, C.K., Heling, A., Hast, J., Wollscheid, U., Seliger, B., Tanner, B., Gilbert, S., Beckers, T., Baasner, S., Brenner, W., Spangenberg, C., Prawitt, D., Trost, T., Schreiber, W.G., Zabel, B., Thelen, M., Lehr, H.A., Oesch, F., Hengstler, J.G. (2003) Switching off HER-2/neu in a tetracycline-controlled mouse tumor model leads to apoptosis and tumor-size-dependent remission. *Cancer Res.* 63, 7221-7231.
- Schild, H., Norda, M., Deres, K., Falk, K., Röttschke, O., Wiesmüller, K.H., Jung, G., Rammensee, H.G. (1991) Fine specificity of cytotoxic T lymphocytes primed in vivo either with virus or synthetic lipopeptide vaccine or primed in vitro with peptide. *J. Ex. Med.* 174, 1665-1668.
- Schimmel, K.J., Richel, D.J., van den Brink, R.B., Guchelaar, H.J. (2004) Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treat. Rev.* 30 (2), 181-91.
- Schmolke, S., Kern, H.F., Drescher, P., Jahn, G., Plachter, B. (1995) The dominant phosphoprotein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus is dispensable for growth in cell culture. *J. Virol.* 69, 5959-5968.
- Schoneich, J., Lee, J.L., Mansky, P., Sheffery, M., Yang, S.Y. (1997) The pentanucleotide ATTGG, the "inverted CCAAT", is an essential element for HLA class I genetranscription. *J. Immunol* 158, 4788-4796.
- Schroeder, J.A., Lee, D.C. (1998) Dynamic expression and activation of ERBB receptors in the developing mouse mammary gland. *Cell Growth. Differ.* 9, 451-464.
- Scibetta, A.G., Albanese, I., Morris, J., Cooper, L., Downward, J., Rowe, P.P., Taylor-Papadimitriou, J. (2001) Regulation of MUC1 expression in human mammary cell lines by the c-ErbB2 and ras signaling pathways. *DNA Cell. Biol.* 20 (5), 265-74.
- Sebastian, J., Richards, R.G., Walker, M.P., Wiesen, J.F., Werb, Z., Derynck, R., Hom, Y.K., Cunha, G.R., DiAugustine, R.P., (1998) Activation and function of the epidermal growth factor receptor and erbB-2 during mammary gland morphogenesis. *Cell Growth. Differ.* 9, 777-785

- Seemuller, E., Lupas, A., Stock, D., Lowe, J., Huber, R., Baumeister, W., (1995) Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science* 271, 579-582.
- Seifert, U., Maranon, C., Shmueli, A., Desoutter, J.F., Wesoloski, L., Janek, K., Henklein, P., Diescher, S., Andrieu, M., de la Salle, H. (2003) An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nat. Immunol.* 4, 375-379.
- Seliger, B., Atkins, D., Bock, M., Ritz, U., Ferrone, S., Huber, C., Storkel, S. (2003) Characterization of human lymphocyte antigen class I antigen-processing machinery defects in renal cell carcinoma lesions with special emphasis on transporter-associated with antigen-processing down-regulation. *Clin. Cancer Res.* 9 (5), 1721-1727.
- Seliger, B., Harders, C., Lohmann, S., Momburg, F., Urlinger, S., Tampè, R., Huber, C. (1998) Down-regulation of the MHC class I antigen processing machinery after oncogenic transformation of murine fibroblasts. *Eur. J. Immunol.* 28, 122-133.
- Seliger, B., Höhne, A., Jung, D., Kallfelz, M., Knuth, A., Jaeger, E., Bernhardt, H., Momburg, F., Tampé, R., Huber, C. (1997) Expression and function of the peptide transporter in escape variants of human renal cell carcinomas, *Exp. Haemat.* 25, 608-614.
- Seliger, B., Höhne, A., Knuth, A., Bernhardt, H., Ehring, B., Tampé, R., Huber, C. (1996) Reduced membrane MHC class I density and stability in a subset of human renal cell carcinomas with low TAP and LMP expression. *Clin. Cancer Res.* 2 (8), 1427-1433
- Seliger, B., Maeurer, M.J., Ferrone, S. (2000) Antigen processing machinery break-down and tumor growth. *Immunol. Today* 21 (9), 455-464.
- Seliger, B., Maeurer, M. J., Ferrone, S. (1997) TAP off — tumors on. *Immunol. Today* 18 (6), 292-299.
- Seliger, B., Pfizenmaier, K., Schafer, R. (1991) Short-term treatment with gamma interferon induces stable reversion of ras-transformed mouse fibroblasts. *J. Virol.* 65, 6307-6311.
- Seliger, B., Schreiber, K., Delp, K., Meissner, M., Hammers, S., Reichert, T., Pawlischko, K., Tampé, R., Huber, C. (2001a) Downregulation of the constitutive tapasin expression in human tumor cells of distinct origin and its upregulation by cytokines. *Tissue antigens* 57, 39-45.
- Seliger, B., Wollscheid, U., Momburg, F., Blankenstein, T., Huber, C. (2001b) Characterization of the major histocompatibility complex class I deficiencies in B 16 melanoma cells. *Cancer Res.* 61, 1095-1099.
- Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R., Shastri, N. (2002) ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 419, 480-483.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., Schreiber, R.D. (2001) IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107-1111.
- Sharipo, A. Imreh, M., Leonchiks, A., Bränden, C.I., Masucci, M.G. (2001) cis-Inhibition of proteasomal degradation by viral repeats: impact of length and amino acid composition. *FEBS Lett.* 499 (1-2), 137-142.

- Sherman, L., Sleeman, J.P., Hennigan, R.F., Herrlich, P., Ratner, N. (1999) Overexpression of activated neu/erbB2 initiates immortalization and malignant transformation of immature Schwann cells in vitro. *Oncogene* 18 (48), 6692-6699.
- Shih, C., Padhy, L.C., Murray, M., Weinberg, R.A. (1981) Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 19, 261-264.
- Shin, I., Yakes, F.M., Rojo, F., Shin, N.Y., Bakin, A.V., Baselga, J., Arteaga, C.L. (2002) PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat. Med.* 8, 1145-1152.
- Sibille, C., Gould, K.G., Willard-Gallo, K., Thomson, S., Rivett, A.J., Powis, S., Butcher, G.W., De Baetselier, P. (1995) LMP2⁺ proteasomes are required for the presentation of specific antigens to cytotoxic T lymphocytes. *Curr. Biol.* 5, 923-930.
- Sijts, A., Sun, Y., Janek, K., Kral, S., Paschen, A., Schadendorf, D., Kloetzel, P.M. (2002) The role of the proteasome activator PA28 in MHC class I antigen processing. *Mol. Immunol.* 39, 165-169.
- Sijts, A., Zaiss, D., Kloetzel, P.-M. (2001) The Role of the Ubiquitin-proteasome Pathway in MHC Class I Antigen Processing: Implications for Vaccine Design *Curr. Molec. Med.* 1 (6), 665-676
- Singh, P., Wong, S.H., Hong, W. (1994) Overexpression of E2F-1 in rat embryo fibroblasts leads to neoplastic transformation. *EMBO J.* 13, 3329-3338.
- Singal, D.P., Ye, M., Qiu, X. (1996) Molecular basis for lack of expression of HLA class I antigens in human small-cell lung carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer* 68, 629-636.
- Silverman, T., Rein, A., Orrison, B., Langloss, B., Bratthauer, G., Miyazaki, J., Ozato, K. (1988) Establishment of cell lines from somite stage mouse embryos and expression of MHC class I and II genes in these cells. *J. Immunol.* 140, 4378-4387.
- Sjogren, S., Inganas, M., Lindgren, A., Holmberg, L., Bergh, J. (1998) Prognostic and predictive value of c-erbB-2 overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers. *J. Clin. Oncol.* 16, 462-469.
- Sistonen, L., Holtta, E., Lehvaslaiho, H., Lehtola, L., Alitalo, K. (1989) Activation of the neu tyrosine kinase induces the fos/jun transcription factor complex, the glucose transporter and ornithine decarboxylase. *J Cell Biol.* 109 (5), 1911-9.
- Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J., Norton, L. (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* 344 (11), 783-92.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich A., McGuire, W.L. (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235, 177-182.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, H.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A., Press, M.F. (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707-712.

Smirnov, D.A., Hou, S., Liu, X., Claudio, E., Siebenlist, U.K., Ricciardi, R.P. (2001) COUP-TFII is upregulated in Adenovirus type 12 tumorigenic cells and is a repressor of MHC class I transcription. *Virology* 284, 13-19.

Snedeker, S.M., Brown, C.F., DiAugustine, R.P. (1991) Expression and functional properties of transforming growth factor α and epidermal growth factor during mouse mammary gland ductal morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 276-280.

Sotiropoulou, P.A., Perez, S.A., Voelter, W., Echner, H., Missitzis, I., Tsavaris, N.B., Papamichail, M., Baxevanis, C.N. (2003) Natural CD8⁺ T-cell responses against MHC class I epitopes of the HER-2/neu oncoprotein in patient with epithelial tumors. *Cancer Immunol. Immunother.* 52, 771-779.

Specht, J.M., Wang, G., Do, M.T., Lam, J.S., Royal, R.E., Reeves, M.E., Rosenberg, S.A., Hwu, P. (1997) Dendritic Cells Retrovirally Transduced with a Model Antigen Gene Are Therapeutically Effective against Established Pulmonary Metastases. *J. Exp. Med.* 186, 1213 - 1221.

Spencer, K.S., Graus-Porta, D., Leng, J., Hynes, N.E., Klemke, R.L. (2000) ErbB2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by ErbB family receptor tyrosine kinases. *J. Cell Biol.* 148, 385-397.

Stern, D.F. (2003) ErbBs in mammary development. *Exp. Cell res.* 284 (1), 89-98.

Stevaux, O., Dyson, N.J. (2002) A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 14, 684-691.

Sugita, M., Brenner, M.B. (1994) An unstable beta 2-microglobulin: major histocompatibility complex class I heavy chain intermediate dissociates from calnexin and then is stabilized by binding peptide. *J. Exp. Med.* 180, 2163-2171.

Sugita, M., Brenner, M.B. (1995) Association of the invariant chain with major histocompatibility complex class I molecules directs trafficking to endocytic compartments. *J. Biol. Chem.* 270 (3), 1443-1448.

Suh, W.K., Derby, M.A., Cohen-Doyle, M.F., Schoenhals, G.J., Fruh, K., Berzofsky, J.A., Williams, D.B. (1999) Interaction of murine MHC class I molecules with tapasin and TAP enhances peptide loading and involves the heavy chain alpha3 domain. *J Immunol.* 162 (3), 1530-40.

Szöllösi, J., Balázs, M., Feuerstein, B.G., Benz, C.C., Waldmann, F. (1995) ERBB-2 (HER-2/neu) Gene copy number, p185 overexpression and intratumor heterogeneity in human breast cancer. *Cancer res.* 55, 5400-5407.

Takahashi, Y., Rayman, J.B., Dynlacht, B.D. (2000) Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev.* 14 (7), 804-16.

Tan, M., Yao, J., Yu, D. (1997) Overexpression of the c-erbB2 gene enhanced intrinsic metastasis potential in human breast cancer cells without increasing their transformation abilities. *Cancer res.* 57, 1199-1205.

Tanahashi, N., Murakami, Y., Minami, Y., Shimbara, N., Hendil, K.B., Tanaka, K., (2000) Hybrid proteasomes: induction by interferon- γ and contribution to ATP-dependent proteolysis. *J. Biol. Chem.* 275 (19), 14336-14345.

- Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, N. (2001) IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 623-655.
- Teng, M.S., Stephens, R., Du Pasquier, L., Freeman, T., Lindquist, J.A., Trowsdale, J., 2002. A human TAPBP (tapasin)-related, TAPBP-R. *Eur. J. Immunol.* 32, 1059–1068.
- Toikkanen, S., Helin, H., Isola, J., Joensuu, H. (1992) Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: a 30-year follow-up. *J. Clin. Oncol.* 10 (7), 1044-8.
- Tomazin, R., Boname, J., Hegde, N.R., Lewinsohn, D.M., Altschuler, Y., Jones, T.R., Cresswell, P., Nelson, J.A., Riddell, S.R., Johnson, D.C. 1999 Cytomegalovirus US2 destroys two components of the MHC class II pathway, preventing recognition by CD4⁺ T cells. *Nat. Med.* 5, 1039-1043.
- Tonelli, Q.J., Sorof, S. (1980) Epidermal growth factor requirement for development of cultured mammary gland. *Nature* 285, 250-252.
- Townsend, A., Ohlen, C., Bastin, J., Ljunggren, H.G., Foster, L., Karre, K. (1989) Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* 340, 443-448.
- Turkington, R.W. (1969) Homogeneous differentiation of mammary alveolar cells. *Exp. Cell Res.* 58 (2), 296-302.
- Tzahar, E., Waterman, H., Chen, X., Levkowitz, G., Karunakaran, D., Lavi, S., Ratzkin, B.J. Yarden, Y. (1996) A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol. Cell Biol.* 16, 5276-5287.
- Ullrich, A., Schlessinger, J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61 (2), 203-12.
- Untch, M., Eidtmann, H., du Bois, A., Meerpohl, H.G., Thomssen, Ch., Ebert, A., Harbeck, N., Jackisch, C., Heilman, V., Emons, G., Wallwiener, D., Wiese, W., Blohmer, J.U., Hoffken, K., Kuhn, W., Reichardt, P., Muscholl, M., Pauschinger, M., Langer, B., Luck, H.J. (2004) Cardiac safety of trastuzumab in combination with epirubicin and cyclophosphamide in women with metastatic breast cancer: results of a phase I trial. *Eur. J. Cancer.* 40 (7), 988-97.
- Van den Elsen, P.J., Gobin, S.J., van Eggermond, A.J., Peijnenburg, A. (1998a) Regulation of MHC class I and II gene transcription: differences and similarities. *Immunogenetics* 48 (3), 208-221.
- Van den Elsen, P.J., Peijnenburg, A., van Eggermond, A.J., Gobin, S.J. (1998b) Shared regulatory elements in the promoters of MHC class I and II genes. *Immunol Today* 19, 308-312.
- Van Endert, P.M., Riganelli, D., Greco, G., Fleischhauer, K., Sette, A., Bach, J.F. (1995) The peptide-binding motif of the human transporter associated with antigen processing. *J. Exp. Med.* 182, 1883-1895.
- Van Hall, T., Sijts, A., Camps, M., Offringa, R., Melief, C., Kloetzel, P.M., Ossendorp, F. (2000) Differential influence on cytotoxic T lymphocyte epitope presentation by controlled expression of either proteasome immunosubunits or PA28. *J. Exp. Med.* 483-494.

- van Kaer, L., Ashton-Rickardt, P. G., Ploegh, H. L., Tonegawa, S. (1992) TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8⁺ T cells. *Cell* 71 (7), 1205-1209.
- Vartanian, T., Goodearl, A., Viehover, A., Fischbach, G. (1997) Axonal neuregulin signals cells of the oligodendrocyte lineage through activation of HER4 and Schwann cells through HER2 and HER3. *J Cell Biol.* 137 (1), 211-20.
- Verma, R.S., Manikal, M., Conte, R.A., Godec, C.J. (1999) Chromosomal basis of adenocarcinoma of the prostate. *Cancer Invest.* 17 (6), 441-7.
- Vernimmen, D., Gueders, M., Pisvin, S., Delvenne, P., Winkler, R. (2003) Different mechanisms are implicated in ERBB2 gene overexpression in breast and in other cancers. *Br. J. Cancer* 89 (5), 899-906.
- Vertegaal, A.C., Kuiperij, H.B., Houweling, A., Verlaan, M., van der Eb, A.J., Zantema, A. (2003) Differential expression of Tapasin and immunoproteasome subunits in Adenovirus type 5- versus type 12-transformed cells. *J. Bio. Chem.* 278, 139-146.
- Viglietto, G., Motti, M.L., Bruni, P., Melillo, R.M., D'Alessio, A., Califano, D., Vinci, F., Chiappetta, G., Tsihchlis, P., Bellicosa, A., Fusco, A., Santoro, M. (2002) Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat. Med.* 8, 1136-1144.
- Vigna, J.L., Smith, K.D., Lutz, C.T. (1996) Invariant chain association with MHC class I: preference for HLA class I/beta 2-microglobulin heterodimers, specificity, and influence of the MHC peptide-binding groove. *J. Immunol.* 157, 4503-4510.
- Vitale, M., Mezzani, R., Rodella, L., Zauli, G., Piergiovanni, G., Cadei, M., Hicklin, J.D., Ferrone, S. (1998) HLA class I antigen and transporter associated with antigen processing (TAP1 and TAP2) downregulation in high-grade primari brest carcinoma lesions. *Cancer res.*, 56, 737-742.
- Vivo, C., Levy, F., Pilatte, Y., Fleury-Feith, J., Chretien, P., Monnet, I., Kheuang, L., Jaurand, M.C. (2001) Control of cell cycle progression in human mesothelioma cells treated with gamma interferon. *Oncogene* 20 (9), 1085-1093.
- Vogel, C.L., Cobleigh, A., Tripathy, D., Gutheil, J.C., Harris, L.N., Fehrenbacher L., Slamon, D.J., Murphy, M., Novotny, W.F., Burchmore, M., Shak, S., Stewart, S.J., Press M. (2002) Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 20 (3), 719-26.
- Vos, J. C., Spee, P., Momburg, F., Neefjes, J. (1999) Membrane topology and dimerization of the two subunits of the transporter associated with antigen processing reveal a three domain structure. *J. Immunol.* 163, 6679-6683.
- Vos, J. C., Reits, E. A., Wojcik-Jacobs, E., Neefjes, J. (2000). Subunit interactions visualized by post-translational translocation and ER-mobility indicate a head-head/tail-tail orintation for the pore of the ABC transporter TAP. *Curr. Biol.* 13, 1-7.
- Vossen, M.T.M., Westerhout, E.M., Söderberg-Naucler, C.Wiertz, E.J.H.J. (2002) Viral immune evasion: a masterpiece of evolution. *Immunogenetics* 54 (8), 527-542.
- Wajant H. (2002) The Fas signaling pathway - more than a paradigm. *Science* 296, 1635-1636.

- Wang, E.W., Kessler, B.M., Borodovsky, A., Cravatt, B.F., Bogoy, M., Ploegh, H.L., Glas, R. (2000) Integration of the ubiquitin-proteasome pathway with a cytosolic oligopeptidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 9990-9995.
- Waltzer, L., Bienz, M. (1998) *Drosophila* CBP represses the transcription factor TCF to antagonize Wingless signalling. *Nature* 395, 521-525.
- Waterman, H., Yarden, Y. (2001) Molecular mechanisms underlying endocytosis and sorting of ErbB receptor tyrosine kinases. *FEBS Lett.* 490 (3), 142-152.
- Watling, D., Guschin, D., Müller, M., Silvenninen, O., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Roger, N.C., Schindler, C., Stark, G.R., Ihle, J.N., Kerr, I.M. (1993) Complementation by the protein tyrosine kinase JAK2 of a mutant cell line defective in the interferon- γ signal transduction pathway. *Nature* 366, 166-170.
- White, L.C., Wright, K.L., Felix, N.J., Ruffner, H., Reis, L.F., Pine, R., Ting, J.P. (1996) Regulation of LMP2 and TAP1 genes by IRF-1 explains the paucity of CD8⁺ T cells in IRF-1^{-/-} mice. *Immunity* 5, 365-76.
- Wiertz, E.J., Tortorella, D., Bogoy, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T.R., Rapaport, T.A., Ploegh, H.L. (1996) Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* 384, 432-438.
- Williams, A., Peh, C.A., Elliott, T. (2002) The cell biology of MHC class I antigen presentation. *Tissue Antigens* 59, 3-17.
- Wölfel, T., Schneider, J., Meyer Zum Buschenfelde, K.H., Rammensee, H.G., Rotzschke, O., and Falk, K. (1994) Isolation of naturally processed peptides recognized by cytolytic T lymphocytes (CTL) on human melanoma cells in association with HLA-A2.1. *Int. J. Cancer* 57, 413-418.
- Wölfel, T., Van Pel, A., Brichard, V., Schneider, J., Seliger, B., Meyer zum Buschenfelde, K.H., Boon, T. (1994) Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 24, 759-764.
- Wolpoe, M.E., Lutz, E.R., Ercolini, A.M., Murata, S., Ivie, S.E., Garrett, E.S., Emens, L.A., Jaffee, E.M., Reilly, R.T. (2003) HER-2/neu-specific monoclonal antibodies collaborate with HER-2/neu-targeted granulocyte macrophage colony-stimulating factor secreting whole cell vaccination to augment CD8⁺ T cell effector function and tumor-free survival in Her-2/neu-transgenic mice. *J. Immunol.* 171, 2161-2169.
- Wright, K.L., White, L.C., Kelly, A., Beck, S., Trowsdale, J., Ting, J.P. (1995) Coordinate regulation of the human TAP1 and LMP2 genes from a shared bidirectional promoter. *J. Exp. Med.* 181, 1459-1471.
- Xiong, S., Grijalva, R., Zhang, L., Nguyen, N.T., Pisters, P.W., Pollock, R.E., Yu, D. (2001) Up-regulation of vascular endothelial growth factor in breast cancer cells by the heregulin-beta1-activated p38 signaling pathway enhances endothelial cell migration. *Cancer Res.* 61, 1727-1732.
- Xu, G., Livingston, D.M., Krek, W. (1995) Multiple members of the E2F transcription factor family are the products of oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1357-1361.
- Xu, F.J., Stack, S., Boyer, C., O'Briant, K., Whitaker, R., Mills, G.B., Yu, Y.H., Bast, R.C. Jr. (1997) Heregulin and agonistic anti-p185(c-erbB2) antibodies inhibit proliferation but

increase invasiveness of breast cancer cells that overexpress p185(c-erbB2): increased invasiveness may contribute to poor prognosis. *Clin Cancer Res.* 3 (9), 1629-34.

Yabe, T., Kawamura, S., Sato, M., Kashiwase, K., Tanaka, H., Ishikawa, Y., Asao, Y., Oyama, J., Tsuruta, K., Tokunaga, K., Tadokoro, K., Juji, T. (2002) A subject with a novel type I bare lymphocyte syndrome has tapasin deficiency due to deletion of 4 exons by Alu-mediated recombination. *Blood* 100, 1496-1498.

Yakes, F.M., Chinratanalab, W., Ritter, C.A., King, W., Seelig, S., Arteaga, C.L. (2002) Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt 1s required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res.* 62, 4132-4141.

Yamauchi, T., Yamauchi, N., Ueki, K., Sugiyama, T., Waki, H., Miki, H., Tobe, K., Matsuda, S., Tsushima, T., Yamamoto, T., Fujita, T., Taketani, Y., Fukayama, M., Kimura, S. Yazaki, Y. Nagai, R., Kadowaki, T. (2000) Constitutive Tyrosine Phosphorylation of ErbB-2 via Jak2 by Autocrine Secretion of Prolactin in Human Breast Cancer. *J. Biol. Chem.* 275 (43), 33937-33944.

Yan, G., Yineng, Fu., Faustmann, D. (1997) Reduced expression of TAP1 and LMP2 antigen-processing genes in the nonobese diabetic (NOD) mouse due to a mutation in their shared bidirectional promoter. *J. Immunol.*, 159, 3068-3080.

Yang, Y (2003) Generation of major histocompatibility complex class I antigens. *Microbes Infect.* 5 (1), 39-47.

Yang, G., Cai, K.Q., Thompson-Lanza, J.A., Bast, R.C. Jr, Liu, j. (2004) Inhibition of breast and ovarian tumor growth through multiple signaling pathways by using retrovirus-mediated small interfering RNA against Her-2/neu gene expression. *J. Biol. Chem.* 279 (6), 4339-45.

Yang, T., Spitzer, E., Meyer, D., Sachs, M., Niemann, C., Hartmann, G., Weidner, K.M., Birchmeier, C., Birchmeier, W. (1995) Sequential requirement of the hepatocyte growth factor and neuregulin in the morphogenesis and differentiation of the mammary gland. *J. Cell Biol.* 131, 215-226.

Yao, T., Oh, S.P., Fuchs, M., Zhou, N., Ch'ng, L., Newsome, D., Bronson, R.T., Li, E., Livingston, D.M., Eckner, R. (1998) Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell* 93 (3), 361-372.

Yarden, Y., Sliwkowski, M.X. (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Feb;2(2):127-37.

Ye, J., Xu, R.H., Taylor-Papadimitriou, J., Pitha, P.M. (1996) Sp1 binding plays a critical role in Erb-B2- and v-ras-mediated downregulation of alpha2-integrin expression in human mammary epithelial cells. *Mol. Cell Biol.* 16 (11), 6178-89.

Yeh, S., Lin, H.K., Kang, H.Y., Thin, H.T., Lin, M.F., Chang, C. (1999) From HER2/Neu signal cascade to androgen receptor and its coactivators: A novel pathway by induction of androgen target genes through MAP kinase in prostate cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5458-5463.

Yen, L., Benlimame, N., Nie, Z.R., Xiao, D., Wang, T., Moustafa, A.E., Esumi, H., Milanini, J., Hynes, N.E., Pages, G., Alaoui-Jamali, M.A. (2002) Differential regulation of tumor angiogenesis by distinct ErbB homo- and heterodimers. *Mol. Biol. Cell* 13 (11), 4029-4044.

- Yen, L., You, X.L., Al Moustafa, A.E., Batist, G., Hynes, N.E., Mader, S., Meloche, S., Alaoui-Jamali, M.A. (2000) Heregulin selectively upregulates vascular endothelial growth factor secretion in cancer cells and stimulates angiogenesis. *Oncogene* 19 (31), 3460-3469.
- Yordy, J.S., Muise-Helmericks, R.C. (2000) Signal transduction and the Ets family of transcription factors. *Oncogene* 19 (55), 6503-6513.
- York, I.A., Goldberg, A.L., Mo, X.Y., Rock, K.L. (1999) Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation. *Immunol. Rev.* 172, 49-66.
- York, I.A., Chang, S.C., Saric, T., Keys, J.A., Favreau, J.M., Goldberg, A.L., Rock, K.L. (2002) The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat. Immunol.* 3 (12), 1177-84.
- Zaks, T.Z., Rosenberg, S.A. (1998) Immunization with a peptide epitope (p369-377) from HER-2/neu leads to peptide-specific cytotoxic T lymphocytes that fail to recognize HER-2/neu+ tumors. *Cancer Res.* 58, 4902-4908.
- Zeidler, R., Eissner, G., Meissner, P., Uebel, S., Tampe, R., Lazis, S., Hammerschmidt, W. Downregulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin-10. *Blood* 90, 2390-2397.
- Zhang, Z., Krutchinsky, A., Endicott, S., Realini, C., Rechsteiner, M., Standing, K.G. (1999) Proteasome activator 11S REG or PA28: recombinant REG α /REG β hetero-oligomers are heptamers. *Biochemistry* 38 (17), 5651-5658.
- Zhang, Y., Woodford, N., Xia, X., Hamburger, A.W. (2003) Repression of E2F1-mediated transcription by the ErbB3 binding protein Ebp1 involves histone deacetylases. *Nucleic Acids Res.* 31 (8), 2168-2177.
- Zhao, B., Hou, S., Ricciardi, R.P. (2003) Chromatin repression by COUP-TFII and HDAC dominates activation by NF-kappaB in regulating major histocompatibility complex class I transcription in adenovirus tumorigenic cells. *Virology* 306, 68-76.
- Zheng, P., Gou, Y., Quingtan, N., Levy, D.E., Dyck, J., Lu, S., Sheimann, L.A., Liu, Y. (1998) Proto-oncogene PML controls genes devoted to MHC class I antigen presentation. *Nature* 396, 373-376.
- Zhou, B.P., Hu, M.C., Miller, S.A., Yu, Z., Xia, W., Lin, S.Y., Hung, M.C. (2000) HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-kappaB pathway. *J. Biol. Chem.* 275 (11), 8027-8031.
- Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Zou, Y., Spohn, B., Hung, M.C. (2001) HER-2/neu induces p53 ubiquitination via akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* 3, 973 – 982.
- Ziegler, H., Muranyi, W., Burgert, H.G., Kremmer, E., Koszinowski, U.H. (2000) The luminal part of the murine cytomegalovirus glycoprotein gp40 catalyzes the retention of MHC class I molecules. *EMBO J.* 19, 870-881.
- Ziegler, H., Thale, R., Lucin, P., Muranyi, W., Flohr, T., Hengel, H., Farrell, H., Rawlinson, W., Koszinowski, U.H. (1997) A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/cis-Golgi compartments. *Immunity* 6, 57-66.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ABC	"ATP-binding cassette"
Ac	Acetat
AG	Arbeitsgruppe
amp	Ampicillin
AMV	Aviärer Myoblasto Virus
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	"Activating protein 1"
APM	Antigenprozessierungsmaschinerie
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Amphiregulin
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
bidest	bidestilliert
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
°C	°Celsius
CD	"Cluster of differentiation"
cdk	"Cyclin dependent kinase"
cDNS	codierende DNS
C/EBP	"CCAAT/enhancer binding protein"
cfu	"Colony forming unit"
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
ConA	Concanavalin A
cpm	Impulse pro Minute
CREBP	"cyclic AMP-Response-Element-binding protein"
CIITA	"MHC class II transactivator"
Da	Dalton
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphatgemisch aus dATP/dCTP/dGTP/dTTP
DP	Dimerisierungspartner
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein Barr-Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBNA	"Epstein-Barr virus nuclear antigen"
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-tetraessigsäure
EMSA	"Electromobility shift assay"
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAAP	"ER aminopeptidase associated with antigen processing"
ERK	"extracellular signal-regulated kinase"
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FAS	"Fatty acid synthase"
fmol	Femtomol
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fw	"foreward"
g	Gramm

G	Guanin
GAM	"goat anti mouse"
GATA	"GATA-binding factor 1"
gp	Glykoprotein
GRB	"Growth factor receptor-bound protein"
GTP	Guanidintriphosphat
h	Stunden
H2-	"Class II histocompatibility antigen"
HBV	Hepatitis-B Virus
HCV	Hepatitis-C Virus
HDAC	Histondeazetylase
HER	"Human epidermal growth factor receptor"
HLA	"human leucocyte antigen"
HPV	Humaner Papillomavirus
HRP	"Horseradish peroxidase"
HSP	Hitzeschockprotein
HSV	<i>Herpes simplex</i> -Virus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
ISRE	"Interferon stimulated response element"
IRF	"Interferon regulatory factor"
kB	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
k.o.	"Knockout"
l	Liter
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LCMV	Lymphozytärer Choriomeningitis Virus
LMP	"low molecular weight proteins"
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	"major histocompatibility complex"
mM	Millimolar
mA	Milliampère
μ F	Mikrofarad
mAb	monoklonaler Antikörper
MAPK	"Mitogen-activated protein kinase"
MCS	"multiple cloning site"
mdr	"multidrug resistance"
min	Minute
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mM	millimolar
μ M	mikromolar
mmol	Millimol
μ mol	Mikromol
MOPS	3-[N-Morpholin]-propansulfonsäure-N'-[2-ethansulfonsäure]
mRNS	Messenger-Ribonukleinsäure
Mut	Mutante
MFI	mittlere spezifische Fluoreszenzintensität
NRG	Neuregulin
NBT	4-Nitro Blue-Tetrazoliumchlorid
neo	Neomycin
NF	"Nuclear factor"
ng	Nanogramm

NK-Zelle	Natürliche Killer Zelle
nm	Nanometer
NP 40	Nonidet P40
Oct	Oktamersequenz
OD	Optische Dichte
p(A)-	Polyadenylierungssequenz
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAk	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PIN	Prolylisomerase
PIP2	Phosphatidylinositol-2-Phosphat
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
pmol	picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RACE	"Rapid amplification of cDNA-ends"
rev	"reverse"
Rb	Retinoblastomprotein
RNS	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
sek	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	Simian Virus 40
T	Thymin
TA	Annealingtemperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAP	"Transporter associated with antigen processing"
Taq	Thermophilus aquaticus
TB-Medium	"terrific broth"-Medium
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit 0,1% Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TGF	"Transforming growth factor"
TI	Transkriptions-Initiationskomplex
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TOP	Thimet oligopeptidase
TPPII	Tripeptidyl peptidase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TZR	T Zell Rezeptor
ü/N	über Nacht
U	"Units"
Ub	Ubiquitin
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTR	"untranslated region"
UV	ultraviolettes Licht
Val	Valin
Wt	Wildtyp
V	Volt
VEGF	"Vaskular endothelial growth factor"
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

ZTL Zytotoxische T-Zelle