

Aus dem Institut für Virologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

MYPOP als Biomarker und Target in der Tumorthherapie am Beispiel eines murinen
Melanom-Modells

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Nicola Maria Grebe
Aus Frankfurt am Main

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

Tag der Promotion: 21. März 2025

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
1 Einleitung / Ziel der Dissertation.....	1
1.1 Einleitung.....	1
1.2 Ziele der Dissertation.....	3
2 Literaturdiskussion.....	4
2.1 Der Myb-verwandte Transkriptionsfaktor (MYPOP, p42 ^{POP}).....	4
2.1.1 Die Rolle MYPOPs in der Abwehr von Viren und der Tumorsuppression.....	6
2.1.2 Interaktion zwischen MYPOP und nukleärem G-Aktin.....	6
2.1.3 Weitere Assoziationen zwischen MYPOP und anderen Krankheitsbildern.....	7
2.2 Transkriptionsfaktoren in der Krebstherapie.....	7
2.3 Tumormarker.....	9
2.4 Karzinogenese und Entzündung.....	10
2.4.1 Interleukin 24.....	11
2.4.2 Weitere Zytokine und Chemokine.....	12
3 Material.....	14
3.1 Tiere.....	14
3.2 Zellkultur und -materialien.....	14
3.3 Bakterienstämme.....	15
3.4 Plasmidkonstrukte.....	15
3.5 Geräte und Labormaterialien.....	16
3.6 Chemikalien, Kits und gebrauchsfertige Reagenzien.....	17
3.7 Antikörper.....	19
3.7.1 Primärantikörper.....	19
3.7.2 Sekundärantikörper.....	19
3.8 Größenstandard (Western Blot).....	19
4 Methoden.....	20
4.1 Präparation von Mausorganen.....	20
4.2 SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese).....	23
4.3 Western Blot.....	24
4.3.1 Quantifizierung.....	25
4.4 Arbeiten mit Bakterien.....	26
4.4.1 Plasmidpräparation.....	27
4.4.2 Midi-Präparation.....	27
4.5 Arbeiten mit adhärennten Zellen.....	28
4.5.1 Zellkultur.....	28
4.5.2 Neomycin-Konzentrations-Test.....	29
4.5.3 DNA-Transfektion.....	29

4.5.4	Kolonieformations-Assay.....	29
4.5.5	Zellfixierung und -färbung mit dem Hoechst-Farbstoff.....	30
4.5.6	Bestimmung der Transfektionseffizienz.....	31
4.5.7	Zellfixierung und -färbung mit Kristallviolett.....	31
4.6	Stimulation muriner Milzzellen zur Produktion bestimmter Zytokine.....	32
4.7	IL-24 ELISA.....	34
4.8	LEGENDplex™.....	35
5	Ergebnisse.....	37
5.1	MYPOP-Expressionsanalyse in verschiedenen Organen.....	37
5.2	Das Fehlen von MYPOP in murinen Melanomzellen B16-F10.....	40
5.2.1	Western Blot.....	40
5.3	MYPOP-Expression in der Tumorzelllinie B16-F10.....	41
5.4	MYPOP-Einfluss auf das Zellwachstum der Tumorzelllinie B16-F10 (Kolonieformations-Assay).....	43
5.5	Induktion spezifischer Zytokine durch MYPOP.....	46
5.5.1	IL-24 ELISA.....	46
5.5.2	IL-1α-, TNF-α-, IL-11-, GM-CSF-, CCL2-LEGENDplex™.....	47
6	Diskussion.....	51
6.1	Das murine MYPOP-Protein zeigt eine hohe Gewebespezifität.....	51
6.1.1	mRNA und Proteinexpression zeigen nur geringe Korrelation.....	53
6.2	Das Fehlen von MYPOP ist ein Hinweis auf Krebs.....	57
6.3	MYPOP, ein <i>Target</i> in der Tumorthherapie.....	58
6.4	Keine Induktion von IL-24, IL-11, CCL2, TNF-α und IL-1α und GM-CSF nach MYPOP-Reexpression.....	59
6.4.1	IL-24-ELISA.....	59
6.4.2	LEGENDplex™.....	61
7	Zusammenfassung.....	63
8	Literaturverzeichnis.....	65
9	Anhang.....	74
9.1	Messergebnisse IL-24 ELISA.....	74
9.2	Messergebnisse LEGENDplex™.....	77
9.2.1	Murine Milzzellen nach verschiedenen Stimulationsansätzen.....	77
9.2.2	B16-F10 nach verschiedenen Stimulationsansätzen.....	78
10	Danksagung.....	81
11	Lebenslauf.....	82

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
(μ /n) m	(Mikro-/ Nano-) Meter
(D)PBS	(Dulbecco's) Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
(m/ μ) l	(Milli-/ Mikro-) Liter
°C	Grad Celsius
AFP	alpha-Fetoprotein
AG	Arbeitsgruppe
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BFA	Brefeldin A
BME	Beta-Mercaptoethanol
BSA	Bovines Serumalbumin
CA-125	Kohlenhydrat-Antigen 125 (<i>carbohydrate antigen 125</i>)
CA-19-9	Kohlenhydrat-Antigen 19-9 (<i>carbohydrate antigen 19-9</i>)
CCL2	CC-Chemokin-Ligand-2
CD	Oberflächenmerkmal (<i>Cluster of Differentiation</i>)
CEA	karzinoembryogenes Antigen (<i>carcinoembryonic antigen</i>)
cm ²	Quadratcentimeter
C-Terminus	Carboxylterminus
DAMP	Gefahren-assoziierte molekulare Muster (<i>Danger-Associated Molecular Pattern</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
E. coli	Escherichia coli
ECL	verstärkte Chemilumineszenz (<i>Enhancer Chemiluminescence</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMT	epithelial-mesenchymale Transition (<i>epithelial-mesenchymal transition</i>)
<i>et al.</i>	und andere
FACS	Fluss-Sortierer (<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>)

FCS	Fetales Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
G	Gauge
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen/ Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor
h	Stunden
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
HPV	humane Papillomaviren
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>Horse Raddish Peroxidase</i>)
IL	Interleukin
IL-11	Interleukin-11
IL-1 α	Interleukin-1 α
IL-24	Interleukin-24
kDa	Kilodalton
KLD	Kinase-Ligase-Dpnl
L	Ligand
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LCR	Lange Kontrollregion (<i>Long Control Region</i>)
LDH	Laktatdehydrogenase
mA	Milliampere
MCP-1	Monozyten <i>chemoattractant</i> Protein-1
mda-7	<i>melanoma differentiation-associated gene 7</i>
mdm2	<i>Murine Double Minute 2-Protein</i>
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MYBPB1A	MYB-bindendes Protein 1A
MYPOP/ p42 ^{pop}	Myb-verwandter Transkriptionsfaktor p42 ^{pop}
Neo ^r	Neomycin-resistent
Neo ^s	Neomycin-sensibel
NES	nukleäres Exportsignal
NF- κ B	nukleärer Faktor kappa B
NKRF	NF-kappa-B-reprimierender Faktor
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
N-Terminus	Aminoterminus
NX	normalisierten Expression (<i>Normalized eXpression</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat

PSA	prostataspezifisches Antigen
R	Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic Acid</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-Seq	Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>Rounds per Minute</i>)
SA-PE	Streptavidin-Phycoerythrin
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
SOC-Medium	Super optimale Nährbouillon mit Katabolitrepression (<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>)
STAT	Signaltransduktor und Aktivator der Transkription (<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>)
TARC	<i>Translational Animal Research Center</i>
TBS	Trisgepufferte Salzlösung (<i>Tris-buffered Saline</i>)
TBST	Trisgepufferte Salzlösung mit Tween20 (<i>Tris-buffered Saline with Tween20</i>)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
w/ v	Gewichtsanteil pro Volumen
xg	Relative Zentrifugalkraft

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: MYPOP-spezifische Banden im Western Blot muriner Organe

Abbildung 2: Relative Bandenintensität der verschiedenen Organe im Vergleich zum Herzen

Abbildung 3: Aktin-spezifische Banden im Western Blot muriner Organe

Abbildung 4: Western Blot muriner Hautzellen

Abbildung 5: Fluoreszenzmikroskopische Bilder von B16-F10-Zellen nach Transfektion von GFP und GFP-MYPOP

Abbildung 6: Transfektionseffizienz

Abbildung 7: Kolonieformation-Assay

Abbildung 8: Konzentrationen von GM-CSF in murinen Milzzellen und B16-F10-Zellen nach Transfektion von MYPOP und Leervektoren

Abbildung 9: MYPOP-RNA-Expression in den verschiedenen menschlichen Organen

Abbildung 10: Vergleich der prozentualen mRNA- und Protein-Expression von MYPOP in unterschiedlichen Organen

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zellkulturreagenzien

Tabelle 2: Laborgeräte

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Kits und gebrauchsfertige Reagenzien

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete primäre Antikörper

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete sekundäre Antikörper

Tabelle 6: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele

Tabelle 7: Relative Bandenintensität der verschiedenen Organe im Vergleich zum Herzen

Tabelle 8: Vergleich prozentuale und mRNA- und Protein-Expression von MYPOP in unterschiedlichen Organen

Tabelle 9: Photometrisch gemessene Konzentrationen von IL-24 im ELISA

Tabelle 10: Konzentrationen der gemessenen Zytokine im LEGENDplex™ nach Stimulation muriner Milzzellen

Tabelle 11: Konzentrationen der gemessenen Zytokine im LEGENDplex™ nach Stimulation von B16-F0

1 Einleitung / Ziel der Dissertation

1.1 Einleitung

Der Myb-verwandte Transkriptionsfaktor MYPOP (synonym p42^{pop}) ist ein wenig erforschtes Protein, das vermutlich tumorsuppressiv wirkt. Es kommt in allen bisher getesteten gesunden Zellen vor, fehlt jedoch gänzlich oder ist stark reduziert in Tumorzellen diversen Ursprungs (Lungen-, Gebärmutterhals-, Darmkrebs, Leukämien). Durch das Einbringen von MYPOP in Krebszellen kann das Tumorzellwachstum verlangsamt werden und die Zellen sterben schließlich ab. Somit könnte MYPOP nicht nur als Biomarker zur Unterscheidung von gesundem und transformiertem Gewebe fungieren, sondern bietet auch einen Angriffspunkt in der Krebstherapie jeglicher Organsysteme (unveröffentlichte Daten der AG Florin und Patentanmeldung US 16/206,526).

Die Expression des Transkriptionsfaktors soll mit der Methode des Western Blots, bei dem Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert und quantifiziert werden können, analysiert werden. Hierbei kommen sowohl Zellen aus gesundem Gewebe als auch Tumorzellen zum Einsatz, um eine mögliche organspezifische Mehr- oder Mindereexpression detektieren zu können. Ein Vergleich zwischen den Protein- und *messenger*-Ribonukleinsäure (mRNA)-Leveln in verschiedenen Geweben soll zudem durchgeführt werden. Durch Transfektion von MYPOP-Desoxyribonukleinsäure (DNA) sollen Krebszellen dazu gebracht werden, das Genprodukt wieder herzustellen. Das Verteilungsmuster des Transkriptionsfaktors in der Zelle soll mittels Immunfluoreszenz begutachtet werden. Zusätzlich sollen die Auswirkungen auf das Überleben der Tumorzellen nach Reexpression des Transkriptionsfaktors beobachtet werden und im Vergleich zu einer Kontrollgruppe quantifiziert werden.

Um die Mechanismen und Signalwege des antitumoralen Proteins besser verstehen zu können, wird ein *Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) eingesetzt, wo das gesuchte Protein, in diesem Fall ein vermeintlich von MYPOP reguliertes Zytokin, zwischen zwei Antikörpern gebunden und mittels einer enzymatischen Reaktion nachgewiesen wird. Zudem kommt der Immunoassay LEGENDplex™ zum Einsatz, bei dem sowohl antikörpermarkierte, fluoreszierende *Beads* als auch biotinylierte Antikörper an den gesuchten Analyten binden, die dann im Folgenden nach einer Reaktion mit Streptavidin in der Durchflusszytometrie gleichzeitig detektiert und quantifiziert werden können. Hierbei sollen die Zytokine und Chemokine Interleukin-24 (IL-24), Interleukin-1 α (IL-1 α), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-11 (IL-11), Granulozyten-Makrophagen/Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) und CC-Chemokin-Ligand-2 (CCL2) untersucht werden und folglich Aufschluss über die antitumoralen Fähigkeiten MYPOPs durch Induktion von Zytokingenen liefern.

Mittels dieser Methoden sollen zum einen die in der Literatur beschriebenen onkogenen Eigenschaften des Transkriptionsfaktors erneut nachgewiesen und auf die murine Melanomzelllinie B16-F10 übertragen werden, zum anderen sollen die Mechanismen hinter diesen Eigenschaften erforscht werden. Diese Erkenntnisse könnten eine Grundlage für die Verwendung des Transkriptionsfaktor und seiner Interaktionspartner in der Diagnostik und Therapie von Krebsleiden bilden.

1.2 Ziele der Dissertation

Über die Proteinexpression von MYPOP in unterschiedlichen Geweben des Menschen gibt es bisher keine vergleichenden Daten, die Datenbank ProteinAtlas liefert derzeit nur mRNA Daten (ProteinAtlas). Ebenso wurde die tumorsuppressive Wirkung von MYPOP in murinen Tumorzellen nicht untersucht. Ziel dieser Arbeit ist es zum einen, die Intensität der MYPOP-Expression in der Maus organspezifisch zu quantifizieren, um Hinweise darauf zu erhalten, in welchen Geweben dieses Protein besonders wichtig sein könnte und ob das MYPOP-Expressionsniveau mit der proliferativen Aktivität der Zellen negativ korreliert. Zum anderen soll der MYPOP-Verlust im transformierten Gewebe am Beispiel von primären murinen Hautzellen versus murinen Melanomzellen (B16-F10) validiert und der Effekt der Transfektion von MYPOP in murine Tumorzellen untersucht werden. Hierbei sind das Verteilungsmuster des Transkriptionsfaktors in der Zelle sowie der Effekt auf das Zellwachstum von Interesse. Des Weiteren sollen die aus RNA-Sequenzierungen humaner Zellen identifizierten MYPOP-Zielgene mit Fokus auf Induktion spezifischer Zytokine auf mRNA- und Proteinebene untersucht werden um die genauen Mechanismen der antionkogenen Wirkung des Transkriptionsfaktors zu erforschen. Mit den gewonnenen Erkenntnissen soll der Einsatz des Transkriptionsfaktors als Therapeutikum, Biomarker und prognostischer Marker vorbereitet werden.

2 Literaturdiskussion

2.1 Der Myb-verwandte Transkriptionsfaktor (MYPOP, p42^{pop})

Transkriptionsfaktoren können je nach DNA-Bindungsdomäne in verschiedene Familien eingeteilt werden. Die sich in allen eukaryotischen Zellen befindliche MYB-Superfamilie ist eine der größten und umfasst 100-200 Mitglieder, vorwiegend pflanzlichen Ursprungs. Die Steuerung der Transkription durch MYB-Faktoren ist wichtig für die Regulation zellulärer Prozesse, des Stoffwechsels und der Zelldifferenzierung. Das typische MYB-Motiv ist in unterschiedlicher Anzahl vorhanden, kommt es nur einmalig vor, spricht man von Myb-verwandten Transkriptionsfaktoren. Diese unterscheiden sich in der transkriptionell regulierenden Domäne, welche entweder aktivierende oder repressive Auswirkungen auf die Transkription haben kann, zu der von MYB (Prouse und Campbell 2012).

Der murine Myb-verwandte Transkriptionsfaktor MYPOP, über den zum jetzigen Stand nur wenige Publikationen veröffentlicht wurden, wurde als Interaktionspartner von Profilin entdeckt. Es handelt sich um ein aus 393 Aminosäuren bestehendes Multidomänenprotein mit einem Molekulargewicht von 41,890 Kilodalton (kDa), welches aufgrund des Vorkommens von nur einer DNA-Bindungsdomäne und eines Tryptophan-Cluster-Motivs den Myb-verwandten Transkriptionsfaktoren zugeordnet wurde. Als Synonym kann die Bezeichnung p42^{pop} verwendet werden, die auf das errechnete Molekulargewicht von 42 kDa und die Partnerschaft zu Profilin hindeutet. Besonders hervorzuheben ist, dass das Tryptophan-Cluster nur einmalig vorhanden ist und das erste Tryptophan durch Phenylalanin ausgetauscht wurde. Trotzdem kann die DNA-Bindungsdomäne von MYPOP die Myb-Konsensussequenz eines artifiziiellen Thymidin-Kinase-Promotors aus dem Herpesvirusgenom binden.

Der Transkriptionsfaktor besitzt ein nukleäres Exportsignal (NES) sowie zwei nukleäre Lokalisationssignale (NLS), jeweils eines Amino (N)-terminal und eines Carboxyl (C)-terminal. Ein Leucin-Zipper-Motiv steht im Verdacht, für eine Dimerisierung des Transkriptionsfaktors verantwortlich zu sein, welche die DNA-Bindungskapazität und folglich die Transkriptionsregulation erhöht. Die Bindung an Profilin, einem Regulator der Aktivität und der Dynamik von Aktin im Zytoplasma und im Nukleus, wird durch ein Prolin-Cluster vermittelt und erfolgt ausschließlich mit dem MYPOP-Monomer. Nukleäres MYPOP scheint endogenes Profilin zu rekrutieren und mit ihm Komplexe bilden zu können.

Die mRNA des Transkriptionsfaktors wird als weit verbreitet in verschiedenen Geweben mit Dominanz im Gehirn und Hoden beschrieben und wird bereits in der frühen

Embryonalperiode exprimiert. Fluoreszenzanalysen zeigten ein Vorkommen im Zellkern, eine Deletion der NLS resultiert in einer Lokation im Zytoplasma.

Im Nukleus übt MYPOP eine regulierende Funktion auf die Transkription aus, im Zellplasma lokalisiertes MYPOP (ohne NLS) konnte keine Regulation der Genexpression nachgewiesen werden. Profilin kann diese Regulation deutlich reduzieren und somit die Aktivität als Transkriptionsfaktor modulieren (Lederer et al. 2005) .

Humanes MYPOP ist ortholog zu MYPOP murinen Ursprungs und stimmt in über 80 % der Aminosäuren überein, einschließlich der NES und NLS sowie des Leucin-Zippers, lediglich die DNA-Bindungsdomäne unterscheidet sich (Wüstenhagen et al. 2018) . Das Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 19 lokalisiert, das Genprodukt ist 399 Aminosäuren lang und weist ein errechnetes Molekulargewicht von 42,5 kDa auf, zeigt aber ein Laufverhalten im Gel, wie ein 60 kDa Protein (Wüstenhagen et al. 2018) . Es wird beschrieben, dass der Transkriptionsfaktor eine geringe Spezifität für einzelnen Zelltypen und Immunzellen aufweist und kein bestimmtes regionales Vorkommen im Gehirn zeigt, sondern in allen Arealen des menschlichen, murinen und porcinen Gehirns zu finden ist. Zusammenfassende Daten von RNA-Expressionsanalysen in verschiedenen Geweben zeigen eine Dominanz von MYPOP-RNA im Skelettmuskel, gefolgt vom cerebralen Cortex und weiteren Arealen des Gehirns. Es folgen unter anderem in absteigender Reihenfolge Milz, Dünndarm, Haut, Speicheldrüsen, Niere, Bauchspeicheldrüse, Herz, Fettgewebe, Colon, Endometrium, Leber, Eileiter, Lunge, Thymus und Knochenmark. Blutzellen und Zellen des Immunsystems scheinen am wenigsten MYPOP-RNA zu transkribieren.

In den Zelllinien HDLM-2 (Hodgkin Lymphom) und NB-4 (Akute Promyelozyten Leukämie) ist die RNA des Transkriptionsfaktors gehäuft zu finden (ProteinAtlas) . Für die Proteinexpression bestehen bislang kaum Daten, lediglich eine Überexpression in Thrombozyten ist beschrieben (ProteinAtlas; GeneCards) .

Die Lokalisation von MYPOP ist intrazellulär im Nukleoplasma, wo dieser Transkriptionsfaktor vermutlich die DNA-Sequenz 5'-YAAC[GT]G-3' erkennt und die Transkription der RNA-Polymerase II-spezifisch hemmt. MYPOP mRNA gilt als prognostisch ungünstiger Marker in Eierstock- und Leberkrebs und ist unspezifisch in allen Typen von Krebs auf RNA-Ebene nachzuweisen (ProteinAtlas) .

2.1.1 Die Rolle MYPOPs in der Abwehr von Viren und der Tumorsuppression

MYPOP ist jedoch nicht nur für die Regulation der Transkription bedeutsam, sondern auch für die Abwehr von viralen Angriffen. So interagiert das Protein mit dem späten Kapsidprotein L2 humaner Papillomaviren (HPV) Typ 16, welche als Onkoviren bekannt sind. Der Transkriptionsfaktor reprimiert die Transkription, die unter der Kontrolle der langen Kontrollregion (*long control region*, LCR) im viralen Genom von HPV16 steht, was durch L2 weiter verstärkt wird und des Weiteren ebenfalls für das Hochrisiko-Onkovirus HPV18 zu gelten scheint. Auch konnte gezeigt werden, dass MYPOP eine Infektion von Hautzellen durch HPV16 einschränken und antiviral auf DNA reagieren kann. Der Gesamtgehalt an MYPOP auf Proteinebene ist in HPV-transformierten Zelllinien sowie in Tumorzellen des Cervixkarzinoms stark reduziert, wodurch an eine post-translationale Degradierung als Folge der virusinduzierten Transformation zu denken ist. Diese wird vermutlich durch das Onkoprotein E7 des Virus vermittelt. Eine Überexpression des Transkriptionsfaktors hat einen Rücklauf an transformierten und entarteten Zellen, aber auch an nicht viral-transformierten Tumorzellen, zur Folge. Eine Erklärung für den antitumoralen Effekt des Proteins wäre eine Konkurrenz mit dem protoonkogenen Transkriptionsfaktor c-Myb, wodurch MYPOP eine grundlegende Rolle in der Genese von Tumoren zukommen würde (Wüstenhagen et al. 2018).

2.1.2 Interaktion zwischen MYPOP und nukleärem G-Aktin

Aktin ist im Allgemeinen deutlich besser in seiner zytoplasmatischen Form erforscht, jedoch erhält auch die nukleäre Form des Proteins immer mehr Aufmerksamkeit. So soll die filamentäre Form F-Aktin, welche aus zusammengesetztes globulären G-Aktin-Partikeln besteht, an die DNA-Doppelhelix binden und so zu Reparaturprozessen von Doppelstrangbrüchen beitragen und die Transkription beeinflussen. MYPOP scheint als Bindungspartner von nukleärem G-Aktin eine Rolle bei der epithelial-mesenchymalen Transition (*epithelial-mesenchymal transition*, EMT) zu spielen. Diese gilt unter anderem als wichtig bei der Zellentwicklung und Wundheilung, eine Dysregulation ist mit Erkrankungen wie Krebs und Fibrose assoziiert.

Zellen, die MYPOP exprimieren, zeigen eine verminderte Tendenz zur Migration und zum Überleben bei gleichbleibender Zellform, im Umkehrschluss konnte bei einer Suppression von MYPOP eine erhöhte Zellmigration und Überleben sowie eine Elongation der Zellen beobachtet werden. Aus verschiedenen Experimenten konnte gefolgert werden, dass nukleäres G-Aktin die EMT durch die Bindung und Erhöhung von MYPOP sowie den

anderen Aktin-bindenden Transkriptionsfaktoren MYB-bindendes Protein 1A (MYBBP1A) und NF-kappa-B-reprimierender Faktor (NKRF) unterdrückt.

Interessanterweise wird all diesen Faktoren auch eine tumorsuppressive Wirkung zugeschrieben. Zudem scheinen die Stabilität und Quantität nukleären G-Aktins und MYPOPs positiv miteinander zu korrelieren. Nukleäres F-Aktin hingegen fördert die EMT über eine Bindung und Erhöhung von β -Catenin, SMAD2 und SMAD3.

Eine Aktivierung dieser drei Faktoren unterdrückt E-Cadherin und fördert die Transkription von N-Cadherin und Vimentin, während die durch G-Aktin stabilisierten Transkriptionsfaktoren MYPOP, MYBBP1A und NKRF durch eine Erhöhung von E-Cadherin und eine Repression von N-Cadherin und Vimentin die gegenteilige Wirkung erzielen. Folglich scheint das dynamische Gleichgewicht zwischen der filamentären und der globulären Form eine essenzielle Rolle in der epithelial-mesenchymalen Transition zu spielen, an der unter anderem MYPOP beteiligt zu sein scheint (Du et al. 2023).

2.1.3 Weitere Assoziationen zwischen MYPOP und anderen Krankheitsbildern

Des Weiteren wurde in Zellen von an Gliomtumorpatienten, die im Rahmen dieser Erkrankung eine Epilepsie erleiden, eine Herunterregulation des hoch konservierten MYPOP-Gens gefunden. Der Transkriptionsfaktor steht im Verdacht, an der Regulation Gliom-assoziiertes Gene beteiligt zu sein. Die Identifikation von MYPOP und assoziierten Genen bietet das Potential einer frühen prognostischen Aussage über die Wahrscheinlichkeit des Auftretens epileptischer Anfälle. In Epilepsiepatienten scheint ein erhöhtes Vorkommen von Immunzellen wie aktivierten B-Zellen, Eosinophilen, Makrophagen, Mastzellen und verschiedenen T-Zellen vorzukommen. Andererseits wurden eine negative Korrelation zwischen den meisten Typen von Immunzellen und MYPOP, welches die Zellmigration beeinflussen soll, gefunden (Zhao et al. 2023).

2.2 Transkriptionsfaktoren in der Krebstherapie

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die an spezifische regulatorische DNA-Regionen binden und folglich Transkriptions-fördernde oder -supprimierende Funktionen ausüben können. Es kann in verschiedene Familien unterteilt werden, deren Mitglieder unterschiedliche molekulare Motive aufweisen. Beispielsweise seien Zinkfinger oder Homöobox genannt. Nicht nur in der Regulation der Produktion von Ribonukleinsäuren, sondern auch in der Entstehung und Aufrechterhaltung von diversen Pathologien wie

kardiovaskuläre und neurodegenerative Erkrankungen sowie Krebs scheinen Transkriptionsfaktoren eine tragende Rolle zu spielen.

So gelten unter anderem der nukleäre Faktor kappa B (NFκB), MYC, Hypoxie-induzierter Faktor 1 (HIF-1) und Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (*Signal Transducer and Activator of Transcription*, STATs) als Onkogene (Lambert et al. 2018). Eine verminderte Präsenz suppressierender Gene sowie eine erhöhte Präsenz fördernder Gene können mit der Entstehung und Progression von Krebs assoziiert sein. Auch können Transkriptionsfaktoren als Tumormarker dienen, deren Erhöhung mit einer Krankheitsprogression, schlechten Prognose, Invasivität und Metastasierung korrelieren können – auf der anderen Seite kann das Vorhandensein antionkogener Transkriptionsfaktoren auf gesunde Zellen schließen lassen (Huilgol et al. 2019).

Durch den Zusammenhang diverser Transkriptionsfaktoren mit der Entstehung und Aufrechterhaltung tumoröser Prozesse stellen diese auch einen möglichen Angriffspunkt in der Krebstherapie dar, welches lange Zeit als unmöglich angesehen wurde. Mittlerweile kommen durch ein genaueres Verständnis von Aufbau und Funktion der Regulatoren diverse Vorgehensweisen in Frage, die an unterschiedlichen Interaktionsstellen zwischen Protein und DNA ansetzen.

So kann bereits am Expressionslevel, welches wiederum unter anderem von weiteren Transkriptionsfaktoren oder epigenetischen Prozessen reguliert wird, angesetzt werden und die Menge an produzierten Transkriptionsfaktoren somit herauf- oder herabreguliert werden. Hierbei kann zum Beispiel durch die Beeinflussung verschiedener Histon-Deacetylasen, Demethylasen, Dephosphatasen und deubiquitierenden Enzymen die epigenetische Struktur verändert werden. Folge sind eine Aktivierung oder Repression der Transkription der Regulatorproteine der Transkription. Weitere Ansatzpunkte stellen die medikamentöse Förderung der Degradierung der Transkriptionsfaktoren durch Sumoylierung oder den Ubiquitin-Proteasom-Weg dar (Lambert et al. 2018).

Zudem kann die Protein-Protein-Interaktion beeinflusst werden. Als präzises Beispiel sei hier p53 genannt. p53 ist ein tumorsupprimierender Transkriptionsfaktor, der den Zellzyklus reguliert, indem je nach Stressoren die Apoptose oder Reparatur der DNA eingeleitet wird. Das Gen ist in über 50 Prozent der Tumoren mutiert und oder verbleibt durch eine Protein-Protein-Interaktion mit dem in Krebszellen überexprimierten *Murine Double Minute 2*-Proteins (mdm2) im Zytoplasma, sodass die Regulatorfunktion verloren geht. Diese Interaktion führt zu einer Ubiquitinierung und einem proteasomalen Abbau des Tumorsuppressors. Um dies zu verhindern, wurden spezifische Protein-Protein-Interaktions-

Inhibitoren entwickelt, sodass die Degradierung von p53 verhindert wird (Lambert et al. 2018).

Des Weiteren können Transkriptionsfaktoren über eine Liganden-basierte Bindung durch ein Molekül oder eine DNA-bindende Domäne im Sinne einer Aktivierung oder Hemmung beeinflusst werden. Auch dieser Ansatz wird zur Stabilisierung von Wildtyp-p53 mit konsekutiv erhöhter Präsenz im Zellkern oder mutiertem p53 zur Wiederherstellung der normalen Konfirmation und Aktivität erforscht (Parrales und Iwakuma 2015; Lambert et al. 2018).

Ein Angriff auf Ebene der Protein-DNA-Interaktion im Sinne einer Alkylierung, Interkalierung und Bindung an die große oder kleine Furche der DNA mit folgender Beeinflussung der Bindung von Transkriptionsfaktoren ist eine weitere Möglichkeit zur Krebstherapie (Lambert et al. 2018).

Ebenfalls bietet eine gentechnische Modulation mit dem CRISPR-dCas9-System die Möglichkeit einer Regulation von *downstream* Genen oder der direkten Veränderung mutierter Gene (Huilgol et al. 2019).

Vielversprechend gilt zudem der Ansatz der sogenannten Gentherapie, bei der unter anderem auch Transkriptionsfaktoren mit Hilfe viraler Vektoren in die Krebszelle eingebracht werden. Als führendes Beispiel sei hier Gendicine genannt, ein rekombinantes humanes p53 Typ 5 Adenovirus, welches durch intratumorale oder intravasale Injektion die Funktion des Wildtyp-p53 im Tumorgewebe wiederherstellen kann. Zusätzlich sorgt der virale Vektor für eine Verstärkung der humoralen und zellulären Immunantwort gegen die Krebszellen. Im Vergleich zu Chemo- oder Radiotherapie allein kann der Vektor die Tumorprogression in klinischen Studien signifikant reduzieren (Qi et al. 2024).

Trotz der vielversprechenden Überlegungen haben viele dieser therapeutischen Ansätze bisher noch keinen klinischen Einzug in die Therapie erhalten. Die Daten zeigen jedoch, dass Tumorsuppressoren diverse Ansatzpunkte in der Bekämpfung von Tumorzellen, auch im Sinne einer personalisierten Medizin, bieten können und somit auch eine medikamentöse Beeinflussung der Integrität MYPOPs bedeutsam werden könnte. Ebenso bleibt zu prüfen, inwiefern das Einbringen des MYPOP-Gens zur Tumorthherapie geeignet ist.

2.3 Tumormarker

Tumormarker sind meist glykosylierte Proteine, die bei Patienten mit einem Krebsleiden meist nicht-invasiv im Blut oder seltener in Urin, Stuhl oder anderen Körpersekreten quantitativ erhöht nachweisbar sind. Die meisten Tumormarker sind weder spezifisch für ein Krebsleiden an sich noch für eine bestimmte Art von Krebs, sodass sie immer im Gesamtkontext einer Erkrankung verstanden werden müssen.

So sollte immer die klinische Untersuchung, Bildgebung und die Krankheitsgeschichte betrachtet werden, um die Erhöhung eines Tumormarkers zu interpretieren. Auch besteht keine Korrelation zwischen quantitativer Erhöhung und Tumorgröße oder -stadium. Der Großteil der Tumormarker ist nicht als *Screening*-Methode anzusehen, eine Erhöhung kann zum Beispiel auch mit entzündlichen Prozessen oder benignem Tumorwachstum in Zusammenhang stehen.

Im klinischen Alltag häufig verwendete Marker sind zum Beispiel das karzinoembryogene Antigen (CEA) für das kolorektale Karzinom, alpha-Fetoprotein (AFP) für das hepatozelluläre Karzinom, prostataspezifische Antigen (PSA) für das Prostatakarzinom und die Kohlenhydrat-Antigene 19-9 für das Pankreas- und 125 für das Ovarialkarzinom (CA-19-9, CA-125). Diese werden vor allem für das Therapieansprechen, zur Verlaufskontrolle und zur Früherkennung von Rezidiven herangezogen. Begrenzt sind PSA beim Mann sowie AFP bei Patienten mit Leberzirrhose als Früherkennungsmaßnahme anwendbar. Allgemein kann die Dynamik dieser serologischen Parameter eine Unterstützung in der Therapieplanung sein, sollte jedoch nicht losgelöst von den klinisch-radiologischen Befunden betrachtet werden (Faria et al. 2019; Fiebigler und Wiltchke 2001; Virji et al. 1988).

Inwiefern ein Fehlen des MYPOP-Proteins oder die Erhöhung der MYPOP-RNA eine Biomarker-ähnliche Funktion ausüben kann, gilt es weiterführend zu untersuchen.

2.4 Karzinogenese und Entzündung

Die Entartung von Zellen und folglich die Entstehung von Krebs basieren auf dem Schutz vor Zelltod, der Aufrechterhaltung proliferationsfördernder Signale bei gleichzeitiger Suppression von Wachstumshemmung, der Initiation von Invasion und Metastasierung, dem Vermögen zur unendlichen Replikation sowie der Förderung der Angiogenese. Die Deregulation des Zellmetabolismus und die Umgehung der Zerstörung der Krebszellen durch das Immunsystem sind kennzeichnend für entartete Zellen. Beim Erlangen dieser Fähigkeiten kommen neben einer Genominstabilität und Mutationen auch Entzündungsprozessen in präkanzerösen und kanzerösen Geweben eine wichtige Bedeutung zu (Hanahan und

Weinberg 2011). Entzündung und eine proinflammatorische Umgebung fördern die Entstehung und Progression von Krebs und deren Tochtergeschwülsten. Hierzu tragen Zytokine und Chemokine und die ihrer Ausschüttung folgenden Kaskaden der Immunzellaktivierung und Freisetzung weiterer entzündungsfördernder Stoffe einen wichtigen Teil bei (Zlotnik 2006; Balkwill 2004). Einigen Zytokinen wird sowohl eine tumorfördernde als auch eine tumorsuppressive Wirkung nachgesagt, deren Regulation komplex und zum Teil noch unverstanden sind.

In dieser Arbeit wurden sechs verschiedene Zytokine und Chemokine mit immunologischen Methoden untersucht, die alle im Verdacht stehen, durch MYPOP reguliert zu werden. So wurde bei einer Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung (RNA-Seq) von HeLa-Zellen eine Heraufregulation der RNA-Expression dieser Botenstoffe bei MYPOP-transfizierten Zellen im Vergleich zu Zellen, die einen Leervektor erhalten haben, gefunden (Johannes Strunk, Arbeitsgruppe (AG) Florin, Publikation in Revision). Genauer gesagt wurde eine erhöhte Transkriptmenge von Interleukin 24, Tumornekrosefaktor α , Interleukin 1 α , Interleukin 11, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor und CC-Chemokin-Ligand-2 in MYPOP-exprimierenden HeLa Zellen gefunden.

Inwiefern sich diese Daten auf Proteinebene und auf eine andere, nicht humane Zelllinie übertragen lassen und wie die Ergebnisse bei krebsfördernder und krebshemmender Wirkung einiger Zytokine interpretieren lassen, soll im Verlauf dieser Arbeit genauer beleuchtet werden.

2.4.1 Interleukin 24

Das evolutionär hochkonservierte Interleukin 24 (IL-24), auch bekannt unter dem Namen *melanoma differentiation-associated gene 7* (mda-7) oder IL-10B, zählt zu den Mitgliedern der Interleukin 10-Familie (Wang und Liang 2005; Hofmann et al. 2012). Im Vergleich zu anderen Zytokinen gilt Interleukin-24 aufgrund eines Mangels an Disulfid-Brücken als instabiler (Lubkowski et al. 2018). Die Freisetzung erfolgt infolge bestimmter Stimuli, zu denen Zytokine, mikrobielle Faktoren sowie bestimmte kombinierte Antikörper-Rezeptor-Stimulation auf B-Zellen gehören (Wang et al. 2002). Zu den produzierenden Zelltypen zählen vorwiegend mononukleäre Zellen im peripheren Blut wie aktivierte Monozyten, Makrophagen, T_H2-Zellen und B-Zellen, jedoch auch Melanozyten, Keratinozyten und subepitheliale Myofibroblasten (Andoh et al. 2009).

Die Funktionen des Interleukins werden als vielfältig beschrieben, unter anderem wird mda-7 eine Rolle bei der Wundheilung (Soo et al. 1999), der Genese und Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen (Lee et al. 2012), antimikrobiellen Mechanismen bei

bakteriellen Infektionen (Jin et al. 2014) und bei diversen Autoimmunerkrankungen (Kragstrup et al. 2008; Kumari et al. 2013; Fonseca-Camarillo et al. 2014) zugeschrieben.

Der für diese Arbeit wahrscheinlich relevanteste Effekt besteht hingegen in der beschriebenen antikanzerogenen Wirkung: IL-24 soll das Tumorwachstum sowie Invasion, Metastasierung und Angiogenese hemmen, die entarteten Zellen für Chemotherapeutika und Bestrahlung sensibilisieren und Krebs-spezifische Apoptose induzieren. Auch wird dem Interleukin eine anti-Tumor-„bystander“ Aktivität nachgesagt (Su et al. 2005).

Ein Einsatz von IL-24 als Therapeutikum wurde bereits in Phase-I-Studien erprobt und scheint in verschiedenen Tumortypen eine krebsspezifische Apoptose zu induzieren und antitumorale Aktivität des Immunsystems zu fördern (Tong et al. 2005).

Es konnte gezeigt werden, dass Melanozyten im Rahmen einer malignen Transformation zum Melanom sinkende Level an IL-24 produzieren (Jiang et al. 1995). Eine vermehrte Transkription, Translation und Ausschüttung von Interleukin-24 könnte einen möglichen Wirkmechanismus der antionkogenen und tumorsuppressiven Aktivität MYPOPs darstellen.

2.4.2 Weitere Zytokine und Chemokine

Interleukin 1 α , synonym Hämatopoietin 1, ist der Interleukin 1-Familie zugehörig (Sims und Smith 2010). Zu den Effekten einer Stimulierung des IL-1-Rezeptors zählt vorwiegend eine Verstärkung der Entzündungsreaktion über die Produktion und Ausschüttung diverser proinflammatorischer Botenstoffe (Dinarello 1996; Kimura et al. 1998). Durch diese werden diverse Prozesse angeregt, die Zellproliferation, Tumordinvasion und Metastasierung in Tumorgewebe begünstigen (Murakami et al. 2013; Tjomsland et al. 2013; Löffek et al. 2005). Auf der anderen Seite kann das Interleukin auch tumorspezifische Immunität fördern (Voronov et al. 1999; Dvorkin et al. 2006). Vermutlich hängt die pro- oder antikanzerogene Wirkung des Interleukins von den Eigenschaften des Tumorgewebes und dessen Mikromilieu ab (Malik und Kanneganti 2018). Klinische Studien mit IL-1 α -Antagonisten zeigen vielversprechende Ergebnisse bezogen auf die Überlebensrate und krebssassoziierten Komplikationen bei Tumoren im Endstadium (Dinarello 2014; Hickish et al. 2017).

Tumornekrosefaktor α (TNF- α , auch: TNF) ist ein homotrimeres Protein, welches eine wichtige Rolle bei der Regulation des Immunsystems und des Zellzyklus' spielt (Locksley et al. 2001). Eine Aktivierung des Rezeptors mündet in einer Förderung von Entzündung, Zellproliferation und Zellüberleben (Balkwill 2006, 2009; Micheau und Tschopp 2003). Wie der Name vermuten lässt, kann TNF- α Krebszellen in eine hämorrhagische Nekrose mit der Zerstörung des Gefäßbettes des Tumors treiben (Carswell et al. 1975), wobei eher die

angestoßene Entzündungskaskade und nicht das Zytokin selbst eine zytotoxische Wirkung ausübt. Andererseits bewirkt der von malignen Zellen und Wirtszellen produzierte Tumornekrosefaktor ein krebsspezifisches proinflammatorisches Mikromilieu und scheint Wachstum, Ausbreitung und Angiogenese von Tumoren zu unterstützen sowie DNA zu schädigen (Balkwill 2009; Li et al. 2009; Hagemann et al. 2006). Welcher der tumorfördernden oder -supprimierenden Effekte zum Tragen kommt scheint am aktivierten Rezeptortyp zu liegen (Balkwill 2009). Somit bieten auch TNF-Antagonisten einen Ansatz in der Therapie gegen Krebs und werden klinisch erprobt (Madhusudan et al. 2004; Brown et al. 2008).

Interleukin 11 (IL-11) gehört zur IL-6 Familie (Kishimoto et al. 1995). Hinweise auf eine Überexpression des IL-11R α in verschiedenen Tumoren deuten auf eine wichtige Rolle des Zytokins bei der Karzinogenese hin (Huang et al. 2011). Auch wird ein proinflammatorisches Mikromilieu gefördert, welches die Entartung von Zellen sowie die Migration und Invasion von Tumorzellen begünstigt (Bollrath et al. 2009). Versuche, Antagonisten von IL-11 und seines Rezeptors als Arzneimittel in der Tumorthherapie einzusetzen, stellen einen vielversprechenden Ansatz dar (Putoczki et al. 2013), jedoch muss die Rolle von IL-11 in der Karzinogenese noch weiter untersucht werden.

Der Granulozyten-Makrophagen/ Monozyten-Kolonien-stimulierende Faktor (GM-CSF) gehört zur Familie der Kolonien-stimulierenden-Faktoren (CSF) (Griffin et al. 1990; Becher et al. 2016). GM-CSF ist neben der Stimulierung von Vorläuferzellen des Knochenmarks zur Differenzierung zu Granulozyten und Makrophagen (Burgess und Metcalf 1980) auch wichtig bei der Mediation von lokalen Entzündungsprozessen (Simon et al. 1997). In einigen präklinischen Tumormodellen konnte eine Anregung von entarteten Zellen zur Proliferation und Migration nachgewiesen werden (Gutschalk et al. 2012). GM-CSF exprimierende Tumoren sind mit einem verstärkten Tumorwachstum, früher Dissemination und Neovaskularisation verbunden (Aliper et al. 2014). In klinischen Versuchen zeigte GM-CSF als Tumorstoff vielversprechende Ergebnisse bezüglich Immunzellaktivierung und daraus resultierender Tumormunität sowie Nekrose von Tumorgewebe und Metastasen, jedoch konnte dies in Phase III Studien nicht bestätigt werden (Dranoff 2003).

Monozyten *chemoattractant* Protein-1 (MCP-1) oder auch CC-Chemokin-Ligand-2 (CCL2) wirkt chemotaktisch anziehend auf Monozyten (Yoshimura et al. 2015). In höheren Konzentrationen kann das Chemokin Makrophagen aktivieren, welche dann zu einer Entzündungsreaktion beitragen oder Tumorzellen abtöten (Matsushima et al. 1989). Der aus der Interaktion des Chemokins mit seinem Rezeptor resultierende Anlockung und Aktivierung von Makrophagen wird eine tragende Rolle in der Progression von Tumoren zugeschrieben (Zhu et al. 1994). Eine verstärkte Expression wird mit der Progression und

einer schlechten Prognose von Krebsleiden in Verbindung gebracht (Ueno et al. 2000; Lu et al. 2006). Therapeutisch erscheint die Blockade von CCL2, des Rezeptors oder der Einsatz als Kombinationspräparat in der Immuntherapie gegen Tumorleiden förderlich (Li et al. 2017).

Insgesamt soll in dieser Arbeit ein Expressionsprofil von MYPOP in gesunden murinen Geweben und Melanomzellen (B16-F10) bestimmt werden und die antionkogene Wirkung von MYPOP auf B16-F10 untersucht werden. Die Induktion der Zytokin-Expression soll in dieser Arbeit validiert werden.

3 Material

3.1 Tiere

Mäuse der Stämme BALB/c und C57BL/6J (B6) (*Mus musculus*) wurden von Janvier Labs gekauft und unter festgelegten pathogenfreien Bedingungen im *Translational Animal Research Center* (TARC) der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz gehalten (Kooperation mit der AG Holtappels, Institut für Virologie).

3.2 Zellkultur und -materialien

B16-F10: adhärente Melanomzellen aus C57BL/6-Mäusen (*Mus musculus*) (zur Verfügung gestellt von Professor Tobias Bopp, Institut für Immunologie)

Tabelle 1: Zellkulturreagenzien

Produkt	Hersteller	Verwendung
Gibco™ Dulbecco's <i>Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Thermo Fisher Scientific	Zellkulturmedium für B16-F10
Gibco™ RPMI-1640 Medium	Thermo Fisher Scientific	Zellkulturmedium für Immunzellen
Accutase™	Thermo Fisher Scientific	Ablösen adhärenter Zellen
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich	Zusatz zum Zellkulturmedium
Geneticin (G418)	Carl Roth	Selektion transfizierter Zellen (Resistenzgen Neomycin)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) -Puffer	Sigma-Aldrich	Pufferung des Zellkulturmediums
Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>) (DPBS)	Sigma-Aldrich	Waschschritte

Für die Zellkultur verwendete Zellkulturflaschen und Mikrotiterplatten sowie Plastikwaren wurden von den Herstellern Falcon, Greiner und Sarstedt bezogen.

3.3 Bakterienstämme

DH5 α chemisch kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*), New England Biolabs

3.4 Plasmidkonstrukte

pEGFP-MYPOP: GFP-getaggttes murines MYPOP, Kanamycinresistenz (Lederer et al. 2005)

pEGFP-N1: GFP-Leervektor (Kontrolle), Kanamycinresistenz, Clontech

pcDNAFlag-MYPOP: Flag-getaggttes murines MYPOP, Ampicillinresistenz (Lederer et al. 2005)

p3xFLAG-CMVTM-10: Flag-Leervektor (Kontrolle), Ampicillinresistenz, Sigma Aldrich

3.5 Geräte und Labormaterialien

Tabelle 2: Laborgeräte

Gerät	Bezeichnung/ Modell	Hersteller
Blotkammer	Trans Blot Cell	BioRad
Brutschrank (Bakterien)		WTC Binder
Brutschrank (Zellkultur)	Function Line BB16	Thermo Scientific
Einkanalpipetten		vwr
Elektrophoresekammer		LMS GmbH Labortechnik
FACS-Gerät	Cytomics FC 500	Beckman Coulter
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M	Zeiss
Heizblock	Blockthermostat BT 1303	HLC
Lichtmikroskop	LEITZ DM IL	Leica
Magnetrührer	IKAMAG REC-G	Janke&Kunkel
Mehrkanalpipetten		vwr
Mikrotiterplatten-Photometer	Multiskan™ FC	Thermo Scientific
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5417C	Eppendorf
NanoDrop	ND-1000	Thermo Scientific
Netzgeräte Blotkammer	Standard-Powerpack P25	Pharmacia
Netzgeräte DNA-Gele	Gene Power Supply GPS200/400	Pharmacia
Orbitalschüttler	DOS.10L	neoLab
Phasenkontrastmikroskop	SE	Nikon
Pipettierhelfer	PIPETBOY acu 2	Integra Biosciences
Schwenker	Rocky	Heraeus
Sterilbank	HERAsafe HS	Thermo Scientific
Ultraschall-Homogenisierer	Bioruptor Plus	diagenode
Ultrazentrifuge	LE-80R	Beckman Coulter
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad-Schüttler	OLS 200	Grant
Zentrifuge	Heraeus Multifuge 3 S-R	Thermo Scientific

Verwendete Plastikwaren stammten von den Herstellern Eppendorf, Falcon, Greiner und Sarstedt, Glaswaren von der Firma Schott.

3.6 Chemikalien, Kits und gebrauchsfertige Reagenzien

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Kits und gebrauchsfertige Reagenzien

Produkt	Verwendung	Hersteller
Acrylamid-Stammlösung (30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid)	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> , SDS-PAGE)	Carl Roth
Carestream® autoradiography Kodak® GBX Entwicklerlösung/ Fixierungslösung	Filmentwicklung (Western Blot)	Sigma-Aldrich
DNaseI	DNA-Verdau	Sigma-Aldrich
eBioscience™ <i>Cell Stimulation Cocktail</i>	Stimulation muriner Milzzellen zur Zytokinproduktion	Thermo Fisher Scientific
eBioscience™ <i>Protein Transport Inhibitor Cocktail</i>	Blockade des Proteintransports im Golgi-Apparats	Thermo Fisher Scientific
<i>Flourescence Mounting Medium</i>	Einbettung fixierter Zellen zur fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung	Dako Agilent
Geneticindisulfat (G418)	Aminoglykosid-Antibiotikum zur Zellselektion	Carl Roth
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm®	Gerinnungshemmung bei der Aufarbeitung von Mausorganen	ratiopharm
Hoechst 33342	DNA-Färbung	Sigma-Aldrich
Kollagenase A	Gewebe-Verdau	Roche
LEGENDplex™ <i>Custom Panel</i>	Detektion und Quantifizierung von Zytokinen/ Chemokinen	Biolegend
Lipofectamine™ <i>Transfection Reagent</i>	Transfektion von DNA	Thermo Fisher Scientific
Mouse IL-24 DuoSet ELISA-Kit	Detektion und Quantifizierung von IL-24	R&D Systems

Nitrocellulosemembranen	Western Blot	Schleicher & Schüll
NucleoBond® Xtra Midi	Isolation von DNA aus Bakterien	Macherey-Nagel
PBS (10x Dulbecco's) -Pulver	Phosphatgepufferte Salzlösung, mit Wasser angesetzt	PanReac AppliChem
<i>Red Blood Cell Lysing Buffer</i> Hybri-Max™	Erythrozytenlyse	Sigma-Aldrich
Super RX film	Western Blot Detektion Chemolumineszenz	Fujifilm
Türk's Lösung	Zellzählung	Sigma-Aldrich
Tween20	Detergens für Western Blot	Carl Roth
<i>Western Lightning™</i> Plus-ECL	Western Blot Antikörperdetektion	PerkinElmer Inc.

3.7 Antikörper

3.7.1 Primärantikörper

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Klon-Spezifisierung	Verdünnung	Hersteller
Anti-β-Aktin	Maus, monoklonal	AC-15	1:10.000	Sigma-Aldrich
ab94406 (Anti-MYPOP)	Kaninchen, polyklonal		1:1.000	Abcam
ab221487 (Anti-MYPOP)	Kaninchen, polyklonal		1:1.000	Abcam
Anti-KC-14 (Anti-MYPOP)	Kaninchen, polyklonal		1:1.000	ProteoGenix

3.7.2 Sekundärantikörper

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
Anti-Kaninchen	Ziege	Meerrettich-Peroxidase	1:10.000	Dianova
Anti-Maus	Ziege	Meerrettich-Peroxidase	1:10.000	Dianova

3.8 Größenstandard (Western Blot)

Page Ruler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas

4 Methoden

4.1 Präparation von Mausorganen

Die Präparation von Mausorganen diente der quantitativen Analyse der Expression von MYPOP in den jeweiligen Organen mittels des Western Blots. Im Tierstall wurden die Mäuse zunächst durch Kohlenstoffdioxid abgetötet und in 70-prozentigem (%) Ethanol gebadet, dann wurden die Organe entnommen. Um einzelne Zellen mechanisch zu isolieren, wurden die Organe durch Siebe mit absteigend kleinerer Porengröße gerieben. Im Falle eines makroskopisch hohen Anteils an Erythrozyten wurden diese mit dem *Red Blood Cell Lysing Buffer Hybri-Max™* der Firma Sigma-Aldrich lysiert. Bei einigen Organe wie Lunge und Haut war zudem ein zusätzlicher Kollagenase- und DNase-Verdau von Nöten. Im Folgenden werden die Isolations- und Präparationsschritte der verschiedenen Organe dargestellt.

Vollblut

Nach Durchtrennung der Aorta wurde das Blut mit einer Pipette aufgenommen, in ein 4 ml Röhrchen mit 50 Mikroliter (μl) 30 Millimolar (mM) PBS-Ethylendiamintetraacetat (EDTA) für 100 bis 200 μl Vollblut gegeben und mittels Auf- und Abpipettierens eine Koagulation verhindert. Nach Zentrifugation des EDTA-Vollbluts bei 360 xg für 10 Minuten und Entfernung des Überstands wurde eine Lyse der Erythrozyten durchgeführt, indem Lysepuffer zu dem Zellpellet gegeben wurde und 5 bis 10 Minuten unter Sichtkontrolle bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Beenden der Lyse wurde DPBS-FCS hinzugegeben, dann folgte eine weitere Zentrifugation bei 360 xg für 10 Minuten. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in DPBS aufgenommen und in der Neubauer Zählkammer gezählt.

Lunge

Eine Lungenperfusion zur Entfernung intravasaler Blutzellen mit in PBS gelöstem Heparin erfolgte von der rechten Herzkammer ausgehend, die Organentnahme erfolgte danach in DMEM. In einer Petrischale wurden die hilären Lymphknoten, Trachea und Bronchien mit einer Pinzette entfernt sowie die Lungenflügel mit einer Schere zerkleinert und in ein Gefäß mit 5 Milliliter (ml) DMEM/ 10 % FCS überführt. Für den Lungenverdau erfolgte die Zugabe von 100 μl DNase und 333 μl Kollagenase und der Transfer in ein Wasserbad bei 37 Grad Celsius ($^{\circ}\text{C}$) für eine Stunde unter Schütteln. Dann wurde die Suspension über ein 100 Mikrometer (μm) Zellsieb (*Cellstrainer*) gegeben und mit dem Stempel einer 2 ml Spritze zerrieben, wobei immer wieder mit DMEM/ 10 % FCS nachgespült wurde. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren bei 681 xg für 7 Minuten pelletiert und der Überstand in einem 50 ml Gefäß gesammelt. Nachdem das Zellpellet mit 20 ml DMEM/ 10 % FCS resuspendiert

wurde und beide Gefäße vereint wurden, erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 681 xg für 7 Minuten.

Durch die Zugabe von 1 ml Erythrozyten-Lysepuffer auf das Pellet und eine Inkubation für 2 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte eine Erythrozytenlyse, dann wurde der Lysepuffer durch Zugabe von 5 ml DMEM/ 10 % FCS inaktiviert. Die Zellsuspension wurde über das 100 µm Zellsieb gegeben, mit DMEM/ 10 % FCS nachgespült und die Zellen durch Zentrifugieren bei 360 xg für 7 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 2 ml DMEM/ 10 % FCS aufgenommen, ein Aliquot für die Zellzählung entnommen und in der Neubauer Zählkammer gezählt.

Knochenmark und Skelettmuskel

Die beiden Hinterbeine, aus denen später Knochenmarkszellen und Skelettmuskelzellen isoliert wurden, wurden in DPBS/ 1 % FCS gegeben. Die Skelettmuskeln wurden von den Knochen entfernt, mit einer Schere zerkleinert und mit den anderen Organen ohne Erythrozytenlyse verarbeitet. Nach Präparation von Femur und Tibia wurden die Epiphysen abgetrennt und die Markhöhlen der Knochen mit Hilfe einer 10 ml Spritze mit 27 Gauge (G) Kanüle mit DPBS/ 1 % FCS gespült, bis der Knochen weiß erschien. Die Knochenmarkszellen wurden in einem 50 ml Gefäß aufgefangen, bei 360 xg für 7 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Lysepuffer gelöst und nach 2 Minuten 5 ml DMEM/ 10 % FCS zugegeben. Es folgten ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 360 xg für 7 Minuten, die Lösung des Zellpellets in DPBS und die Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer Zählkammer mit Türks Lösung.

Organpräparation ohne Lyse der Erythrozyten: Fettgewebe, Gebärmutter und Teile der Eileiter, Bauchspeicheldrüse, Thymus, Skelettmuskel

Die Organe wurden entnommen, in DMEM gelagert und dann mit dem Stempel einer 2 ml Spritze durch ein Metallsieb gerieben, um eine Einzelzellsuspension herzustellen. Dabei wurde stetig mit DMEM/ 10 % FCS nachgespült. Diese Zellsuspension wurde über ein 100 µm Zellsieb gegeben und erneut mit Medium gespült und mit einer Pipettenspitze nachgerieben, dann erfolgte ein Pelletieren der Zellen durch Zentrifugation bei 360 xg für 7 Minuten. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml DPBS aufgenommen, ein Aliquot für die Zellzählung entnommen und in der Neubauer Zählkammer mit Türks Lösung gezählt.

Organpräparation mit Lyse der Erythrozyten: Herz, Speicheldrüsen, Leber, Milz, Nieren, Knochenmarkszellen

Nach Organentnahme und Transport in DMEM wurden die Organe unter Spülen mit Medium mit dem Stempel einer 2 ml Spritze durch ein Metallsieb und darauffolgend über einen 100 µm *Cellstrainer* gerieben. Dann wurden letzte Zellreste mit der Spitze einer Pipette und

Nachspülen mit DMEM durch das Zellsieb gedrückt, das Gefäß bei 360 xg für 7 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Zur Entfernung der Erythrozyten wurde das Pellet in 1 bis 2 ml Lysepuffer pro Organ aufgenommen und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden jeweils 5 ml DMEM/ 10 % FCS dazugegeben und die Suspension wurde über ein 40 µm Zellsieb gegeben. Die Zellen wurden erneut durch Zentrifugieren für 7 Minuten bei 360 xg pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in DPBS aufgenommen, um in der Neubauer Zählkammer mit Türks Lösung gezählt zu werden.

Schließlich wurden alle Zellen der oben genannten Organe (entsprechend die mit und ohne Erythrozytenlyse) erneut bei 360 xg für 7 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets durch Zugabe der entsprechenden Mengen 1x Laemmli-Puffer resuspendiert, sodass die Zielzellzahl von 1×10^6 Zellen/ 40 µl erreicht wurde. Die Proben wurden bei 95 °C für 10 Minuten aufgekocht, anschließend dreimalig für jeweils 20 Sekunden im Ultraschall-Homogenisierer beschallt und erneut bei 95 °C für 10 Minuten aufgekocht. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Haut

Die Ohren wurden abgeschnitten und in DPBS transportiert. Nach Entfernung der Haare und des Knorpels wurde die Haut mit einer Schere in der Petrischale zerkleinert und jeweils 10 Ohren in ein 50 ml Gefäß mit 5 ml DPBS überführt. Durch Zugabe von 700 µl DNase und 1350 µl Kollagenase pro Gefäß und Inkubation im Wasserbad bei 37 °C für eine Stunde unter Schütteln wurden die Hautzellen enzymatisch verdaut. Die Suspension wurde über einen 100 µm *Cellstrainer* gegeben, mit einer Pipettenspitze unter Spülung mit DPBS nachgerieben und die Zellen durch Zentrifugieren bei 360 xg für 7 Minuten pelletiert. Der Überstand beider Gefäße wurde in einem neuen vereint, erneut bei 360 xg für 7 Minuten zentrifugiert und der entstandene Überstand verworfen. Darauffolgend wurden alle Zellpellets in DPBS resuspendiert und über ein 40 µm Zellsieb gegeben. Nun wurde ein Aliquot für die Zellzählung entnommen und in der Neubauer Zählkammer mit Türk's Lösung gezählt. Durch die Zugabe von 1x Leammli wurde die Probe auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ 40 µl eingestellt und anschließend im Ultraschall-Homogenisierer drei Mal für jeweils 30 Sekunden beschallt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Peritonealmakrophagen

Zur Gewinnung von Peritonealmakrophagen erfolgte über eine Peritonealspülung, indem zunächst die Haut am Bauch vorsichtig eingeschnitten und abgezogen wurde, ohne die Peritonealfaszie zu verletzen. Mit einer kleinlumigen Kanüle einer DPBS enthaltenden 10 ml Spritze wurde vorsichtig knapp unterhalb des Zwerchfells durch die Faszie gestochen und die Flüssigkeit den Bauchraum gespritzt.

Die Maus wurde an den Füßen festgehalten und durch behutsames Schütteln die Flüssigkeit im Bauchraum verteilt, dann mit einer weiteren Spritze mit kleinlumiger Kanüle wieder aufgenommen, ohne Darm anzusaugen oder Organe zu perforieren, und in ein Gefäß überführt. Bei Bedarf wurde die Spülung mehrfach wiederholt. Das Gefäß wurde bei 360 xg für 7 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen, das Zellpellet dann in DPBS aufgenommen und über einen 100 µm *Cellstrainer* gegeben. Aus der gesiebten Zellsuspension wurde ein Aliquot für die Zellzählung entnommen und in der Neubauer Zählkammer mit Türk's Lösung gezählt. Nach Aufnahme der Zellen in 1x Laemmli, wobei eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ 40 µl angestrebt wurde, wurden diese dreimalig für jeweils 30 Sekunden im Ultraschall-Homogenisierer beschallt und bei -20 °C gelagert.

4.2 SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine nach ihrer Größe in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Natriumdodecylsulfat bindet als anionisches Detergens an kationische Aminosäurereste der Proteine, woraus eine negative Nettoladung resultiert. Nach Anlegen einer elektrischen Spannung wandern diese somit zur positiv geladenen Anode, wobei größere Proteine mit einem höheren Molekulargewicht weniger weit wandern als jene kleinerer Größe mit einem niedrigeren Molekulargewicht. Mit der Prozentigkeit des Polyacrylamidgels lässt sich die Größe der Poren des Gels einstellen. Um die Proteine zu denaturieren ist ein Erhitzen auf 95 °C notwendig, durch die Zugabe von β-Mercaptoethanol werden zusätzlich die Disulfid-Brücken zerstört. Damit später eine Aussage über das Molekulargewicht getroffen werden kann, wird neben den Proben ein Marker mit definierten Bandengrößen auf das Gel aufgetragen.

Am Tag vor der Durchführung der Elektrophorese wurde zunächst ein 10-prozentiges Trenngel gegossen, nachdem dieses polymerisiert war, folgte das 5-prozentige Sammelgel. Die Lagerung erfolgte über Nacht bei 4 °C. Zunächst wurden am nächsten Tag die in Laemmli eingefrorenen Proben aufgetaut, die entsprechende Menge β-Mercaptoethanol hinzugegeben, um eine Endkonzentration von 10 % einzustellen, und im Heizblock für 5 Minuten bei 95 °C aufgekocht. Währenddessen wurde das Gel in die Kammer eingespannt und der Laufpuffer angesetzt. Nachdem sichergestellt wurde, dass das Gel dicht in der Kammer sitzt und keine Luftblasen vorhanden sind, konnten Marker und Proben in die Geltaschen aufgetragen werden. Die Elektrophorese erfolgte für etwa 2 Stunden bei 200 Volt, bis sich der Farbmarker Bromphenolblau augenscheinlich am unteren Rand des Gels befand.

Tabelle 6: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele

Trenngel	10 %	Sammelgel	5 %
Aqua dest. [ml]	14,2	Aqua dest. [ml]	8,8
Acrylamid 30 % Stammlösung [ml]	11,7	Acrylamid 30 % Stammlösung [ml]	2,5
Lösung B [ml]	8,8	Lösung C [ml]	3,75
APS 10 % [µl]	350	APS 10 % [µl]	150
TEMED [µl]	17,5	TEMED [µl]	15
Gesamtvolumen [ml]	35	Gesamtvolumen [ml]	17,2

Lösung B:

1,5 M Tris-HCl; pH 8,8
0,4% (w/v) SDS

Lösung C:

0,5 M Tris-HCl; pH 6,8
0,4 % (w/v) SDS

TEMED: Tetramethylethylendiamin-
Stammlösung

APS: 10% Ammoniumperoxodisulfat

10x SDS-PAGE Laufpuffer:

0,25 M Tris; pH 6,8
2 M (w/v) Glycin
1% (w/v) SDS

5x Laemmli-Puffer:

0,5 M Tris-HCl; pH 6,8
0,4 % (w/v) SDS
0,2% (w/v) Bromphenolblau
30% (w/v) Glycerin

4.3 Western Blot

Der Western Blot dient der Übertragung von in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen auf eine Nitrocellulosemembran, wo sie dann mittels Antikörpern detektiert werden können. Hierzu wurde zwecks des Erhalts des Trennmusters des Gels eine elektrische Spannung von 400 Milliampere (mA) für 2 Stunden senkrecht zu der Membran angelegt, an der die Proteine über polare und ionische Wechselwirkungen binden. Nach dem Western Blot erfolgte zur Übertragungskontrolle eine Färbung mit Ponceau S, welches sich reversibel an positiv geladene Aminosäurenreste der Proteine anlagern kann. Anschließend wurde der Farbstoff mit 1x trisgepufferter Salzlösung (*Tris-buffered Saline*, TBS) wieder von der

Membran gewaschen und die freien Aminosäurenreste auf der Membran mit 5 % Magermilch in 1x TBS für 20 Minuten unter kontinuierlicher Bewegung bei Raumtemperatur blockiert.

Der Zugabe des gegen ein spezielles Epitop des zu detektierenden Proteins MYPOP gerichteten Primärantikörpers folgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C auf einem Schwenker. Verwendete Antikörper sowie zugehörige Konzentrationen können der Tabelle 4 entnommen werden. Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal mit 1x trisgepufferter Salzlösung mit Tween20 (*Tris-buffered Saline with Tween20*, TBST) für insgesamt 10 Minuten gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen, und mit dem Anti-Maus- oder Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper inkubiert.

Die sekundären Antikörper richteten sich gegen Epitope der primären Antikörper und waren mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, entsprechende Angaben sind in Tabelle 5 aufgelistet. Nun folgten dreimaliges Waschen mit TBST für insgesamt 20 Minuten, dann dreimaliges Waschen mit TBS für insgesamt 10 Minuten. Durch die Zugabe von Luminol als Substrat für die Peroxidase konnte dieses oxidiert werden, wobei Energie in Form von Licht freigesetzt wurde. Die Darstellung dieses Signals erfolgte in einer Dunkelkammer auf hochsensitiven Filmen. Hierfür wurden 2 Filme übereinander für 45 Minuten in einer Fotokassette belassen, dann wurden die Filme für 90 Sekunden in der Entwicklerlösung geschwenkt, mit Wasser gewaschen und für 5 Minuten in der Fixiererlösung fixiert. Nachdem die Filme getrocknet sind, wurde der Marker eingezeichnet und die Filme eingescannt. Die Membran wurde mit 1x TBS gewaschen, getrocknet und bei Raumtemperatur gelagert. Der Nachweis von Aktin erfolgte entsprechend der genannten Schritte, die Belichtung in der Fotokassette betrug jedoch nur 60 Sekunden bis 5 Minuten.

Western Blot Transferpuffer:

25 mM Tris
192 mM Glycin
20% (v/v) Methanol

Ponceau S-Lösung:

0,1% (w/v) Ponceau S
3% (v/v) Trichloressigsäure

Blockierungspuffer:

5% Magermilchpulver in 1x TBS

Waschpuffer:

1x TBS mit 0,1% Tween und 1x TBS

4.3.1 Quantifizierung

Die Quantifizierung der Intensität der MYPOP- und Aktin-Banden erfolgte mit ImageJ und Microsoft Excel. Hierbei wurde die relative MYPOP-Intensität der einzelnen Organe im

Bezug zu der des Herzens bestimmt, da beim Herzen ein starkes MYPOP-Signal zu detektieren war und dieses Organ auf jedem Gel als Referenz aufgetragen wurde.

Die ausgewerteten Intensitäten wurden mit dem organspezifischen mRNA-Expressionsmuster der kostenfreien *online* Datenbank *The Human Protein Atlas* verglichen. Hierbei handelt es sich um ein Projekt mit dem Ziel, mit verschiedensten Methoden alle menschlichen Proteine zu erfassen.

Die Gewebe-Kategorie beinhaltet sowohl die Proteinexpression in gesundem Gewebe und Organen, deren Daten antikörperbasiert mittels Immunhistochemie ermittelt wurden, als auch durch RNA-Sequenzierungen gewonnene mRNA-Expressions-Daten. Für MYPOP sind derzeit noch keine Proteindaten erfasst beziehungsweise veröffentlicht.

4.4 Arbeiten mit Bakterien

Um MYPOP-DNA in Form von Plasmiden in eukaryotische Zellen einzubringen, wurden zunächst die entsprechenden Plasmide in Bakterienzellen vermehrt und isoliert. Bei einer Transformation nehmen chemisch kompetente Bakterienzellen fremde DNA auf, was in dieser Arbeit dafür verwendet wurde, um die Plasmidkonstrukte zu vermehren. Hierzu wurden die kompetenten *E.coli* zunächst auf Eis aufgetaut, 1 µg der zu amplifizierenden DNA sowie 5 µl Kinase-Ligase-DpnI (KLD) Enzym-Mix zu den kompetenten Zellen gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert.

Dann erfolgten ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 Sekunden, eine erneute Inkubation auf Eis für fünf Minuten und die Zugabe von 950 µl super optimaler Nährbouillon mit Katabolitrepression (*Super Optimal broth with Catabolite repression*, SOC). Nachdem die Zellen für eine Stunde bei 37 °C und 250 Umdrehungen pro Minute (*Rounds per Minute*, rpm) geschüttelt wurden, konnten 100 µl auf eine Selektionsplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum gestrichen werden und über Nacht in einem 37 °C warmen Inkubator platziert werden.

Luria-Bertani (LB) Medium:

1% (w/v) Bacto-Tryptone

0.5% (w/v) Hefeextrakt

1% NaCl

100 µg/ml Ampicillin

50 µg/ml Kanamycin

Für LB Agar: 1.5% (w/v) Agar

4.4.1 Plasmidpräparation

Eine stecknadelkopfgroße Kolonie der Selektionsplatte wurde abgenommen, in ein Gefäß mit 3 ml LB-Medium, welches das zum Resistenzgen des Plasmids korrespondierende Antibiotikum enthielt, gegeben und für 8 Stunden unter ständigem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Dann wurde mit 100 µl dieser Starterkultur 100 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und über Nacht auf einem Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert.

4.4.2 Midi-Präparation

Die Midi-Präparation erfolgte mit dem *NucleoBond Xtra Midi Kit* von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben. Die kultivierten *E.coli* wurden bei 6000 xg und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Dann folgte die Elution der DNA durch Zugabe der Bakterien sowie der entsprechenden Puffer und Reagenzien über Säulen nach dem Prinzip der Anionenaustauschchromatographie. Zur Präzipitation der DNA erfolgte die Zugabe von Isopropanol. Nach einer Zentrifugation des Eluats bei 10.000 xg und 4 °C für 30 Minuten, Vortexen und der Zugabe von 70 % Ethanol wurde die DNA bei 10.000 xg für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 5 bis 10 Minuten getrocknet. Danach wurde es in deionisiertem sterilem Wasser resuspendiert, um zuletzt mit Hilfe des *NanoDrops* der Firma Thermo Scientific die DNA-Konzentration zu bestimmen. Hierbei wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt, was dem Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren entspricht. Die DNA wurde in deionisiertem, sterilen Wasser für eine Zielkonzentration von 1 µg DNA/ µl weiter verdünnt und bei -20 °C gelagert.

4.5 Arbeiten mit adhärenen Zellen

Um den Einfluss und das Fehlen MYPOPs auf Tumorzellen zu untersuchen, wurden Zellen in Zellkulturflaschen kultiviert.

4.5.1 Zellkultur

Bei den B16-F10 Zellen handelte es sich um adhärenent wachsende murine Melanomzellen von Black 6 Mäusen, die gemäß den Angaben der *American Type Culture Collection* kultiviert wurden. Die Zellen wurden in 75 Quadratcentimeter (cm²) Zellkulturflaschen für adhärenente Zellen mit Zellkulturmedium (DMEM), das mit 10 % FCS und 1% HEPES ergänzt wurde, bei 37° C kultiviert und maximal 30-Mal passagiert. Die Arbeit mit Zellen erfolgte stets unter sterilen Bedingungen.

Auftauen und Kultivierung der Zellen

Die Lagerung erfolgte in DMEM und Dimethylsulfoxid (DMSO) bei -70 °C. Unter permanenter Bewegung wurden die Zellen aufgetaut und unmittelbar nach Verflüssigung in 4 ml kaltes FCS gegeben. Nach Zugabe von 14 ml Medium erfolgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 300 xg. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit Medium resuspendiert und schließlich wurden die Zellen in 75 cm² Kulturflasche mit 20 ml Medium geben. Bevor Versuche mit den Zellen durchgeführt wurden, wurden diese mindestens für eine Woche kultiviert.

Subkultivierung

Zunächst wurde das Zellkulturmedium entfernt und der Zellrasen mit 10 ml DPBS gewaschen. Nach der Zugabe von 2 ml Accutase™ und Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde 8 ml DMEM in die Flasche gegeben, um eine Zellsuspension mit den abgelösten Zellen herzustellen, und diese im Verhältnis 1:10 in eine neue Zellkulturflasche mit 20 ml Medium geben. Eine erneute Passage erfolgte nach 2-3 Tagen bei einer Konfluenz von etwa 90 %.

Bestimmung der Zellzahl

Um bei den Versuchen vergleichbare Bedingungen zu schaffen und die gleiche Zahl an Zellen einzusetzen, wurden die Zellen in einer Neubauer Zählkammer gezählt und die Konzentration mit folgender Formel berechnet:

$$\begin{aligned} \Sigma \text{ Zellzahl aller gezählten Quadranten} / \text{Anzahl der gezählten Quadranten} \times \text{Verdünnung} \times 10^4 \\ = \text{Zellzahl} / \text{ml} \end{aligned}$$

4.5.2 Neomycin-Konzentrations-Test

Das Aminoglycosid-Antibiotikum Geneticindsulfat wird verwendet, um transfizierte Zellen anhand des Resistenzgens Neomycin (Neo^r) zu selektieren. Das verwendete MYPOP-Plasmid trägt jene Resistenz. Um eine Aussage über die benötigte Konzentration treffen zu können, die benötigt wird, um die B16-F10-Zellen ohne das Neomycin-Resistenzgen (Neo^s) zuverlässig in einem adäquaten Zeitraum abzutöten, wurde folgender Test durchgeführt: die Zellen wurden analog zu jeglichen Transfektionsversuchen so ausgesät, dass am nächsten Tag eine Konfluenz von 70 % erreicht wurde. Dann wurde das Medium abgenommen und mit Medium aufsteigender Neomycin-Konzentrationen von 0,25 bis 1,5 mg/ ml in 0,25-er Schritten ersetzt. Dies wurde alle zwei Tage wiederholt und jeden Tag erfolgte eine Beobachtung des Zellwachstums unter dem Mikroskop. Am achten Tag wurden die verbliebenen Zellen mit eiskaltem Methanol fixiert und mit Kristallviolett gegengefärbt.

4.5.3 DNA-Transfektion

Ziel einer Transfektion ist das Einbringen fremder DNA in eukaryontische Zellen, im Falle dieser Arbeit sollten MYPOP-DNA in Form von Plasmiden in die Tumorzellen eingebracht werden. Hierfür wurde mittels des kationischen Lipid-Transfektionsreagenz Lipofectamine™ plasmidische DNA nach dem Prinzip der Lipofektion in die Zelle eingebracht, indem die kationische Hülle mit der Zellmembran verschmilzt und folglich das Plasmid in das Zytoplasma entlässt.

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in einer 6-, 24- oder 48-*well*-Platte ausgesät, die Zielkonfluenz am Folgetag betrug 70 %. Dann wurde am nächsten Tag zunächst das Medium mit Opti-MEM™ ersetzt und die X-fache Menge 3,5 µL Lipofectamine™ sowie die X-fache Menge DNA in jeweils 50 µL Opti-MEM aufgelöst. Nach dem Mischen beider Ansätze im Verhältnis von eins zu eins folgte für 5 Minuten eine Inkubation bei Raumtemperatur. Die DNA-Lipid-Komplex wurden zu den Zellen gegeben und bei 37 °C inkubiert, nach 4 bis 6 Stunden erfolgte ein Wechsel des Mediums auf DMEM.

4.5.4 Kolonieformations-Assay

Kolonieformations-Assays basieren auf der Fähigkeit von einzelnen Zellen, sich durch Zellteilung zu einer Kolonie zu vermehren und testen das Potential zum unendlichen klonalen Wachstum (Franken et al. 2006) .

In dieser Arbeit sollten die Fähigkeit zur Koloniebildung sowie das Überleben nach einer Transfektion mit dem MYPOP-Plasmid und einem Leervektor verglichen werden. Beide Plasmide waren mit einem Resistenzgen gegen Neomycin (Neo^r) versetzt, sodass in den ersten Tagen zunächst eine Selektion der transfizierten und das Plasmid exprimierenden Zellen stattfand. Der Versuch wurde sowohl mit GFP-, als auch mit Flag-gekoppelten Plasmiden auf 24- und 48-*well*-Platten durchgeführt. Am ersten Tag wurden die Zellen ausgesät, sodass eine Konfluenz von 70 % am Folgetag erreicht wurde, zum Schutz vor Austrocknung wurden alle angrenzenden Vertiefungen der Platte mit DPBS gefüllt. Die Transfektion von jeweils 4 Näpfchen einer Platte mit einem MYPOP-Vektor und 4 Näpfchen mit einem Leervektor erfolgte nach Protokoll am zweiten Tag, 4 Näpfchen erhielten kein Plasmid. Darauffolgend wurde 24 Stunden nach der Transfektion das Standardmedium abgenommen und mit Neomycin-haltigem Medium mit einer Konzentration von 1,5 mg/ ml ersetzt. Alle zwei bis drei Tage wurde der Überstand abgenommen und frisches Medium mit Neomycin hinzugegeben. Das Wachstum der Zellen wurde täglich durch das Lichtmikroskop beobachtet und schließlich wurden die Zellen mit Methanol fixiert sowie mit Kristallviolett gefärbt. Von den mit dem GFP-Leervektor und GFP-MYPOP-Vektor transfizierten Zellen wurden vor der Fixierung zudem Bilder unter dem Fluoreszenzmikroskop angefertigt.

4.5.5 Zellfixierung und -färbung mit dem Hoechst-Farbstoff

Um GFP-gekoppelte Plasmide unter dem Fluoreszenzmikroskop in Anzahl und Verteilung beurteilen zu können, ist eine zusätzliche Darstellung der Zellkerne hilfreich, da hierdurch auch die nicht-transfizierten Zellen sichtbar sind. Hierfür kann der Hoechst 33342 Farbstoff (2'-[4-Ethoxyphenyl]-5-[4-Methyl-1-Piperazinyl]-2,5'-bi-1H-Benzimidazol-Trihydrochlorid-Trihydrat) verwendet werden. Dieser bindet an adenin- und thyminreichen Sequenzen doppelsträngiger DNA und emittiert nach der Anregung von Licht der Wellenlänge 350 nm Licht im blauen Spektrum. Da der Farbstoff die Zellmembran passieren kann, sind unter dem Fluoreszenzmikroskop blau leuchtende Nukleoli zu erkennen.

Die Zellen wurden auf Deckgläsern in einer 24-*well*-Platte ausgesät und die Fixierung erfolgte 24 Stunden nach Transfektion mit GFP-MYPOP oder dem GFP-Leervektor. Die anschließende Prozedur erforderte kein steriles Vorgehen. Das Medium wurde abgenommen und jedes Näpfchen wurde mit 500 µl 1x PBS gewaschen. Nach der Zugabe von 300 µl 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS in jedes Näpfchen erfolgte eine Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur und ein dreimaliger Waschschriff mit PBS. Die Hoechst Stock Lösung (1:20) wurde kurz gevortext, 1:500 mit 1 % bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS zu einer Endkonzentration von 1:10.000 verdünnt und jeweils 100 µl Hoechst-Lösung in jedes Näpfchen gegeben, sodass das Deckglas bedeckt war.

Dann wurde die Platte für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und dreimalig erst mit PBS/ BSA, dann dreimalig mit PBS gewaschen. Zum Einbetten der Deckgläser wurde ein kleiner Tropfen *Flourescence Mounting Medium* auf einen Objektträger gegeben und das Deckglas mit der Zellseite nach unten auf den Tropfen gelegt. Der Objektträger wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur trocknen gelassen und bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

4.5.6 **Bestimmung der Transfektionseffizienz**

Da den Tumorzellen verschiedene Plasmide zugeführt wurden, sollte verglichen werden, ob das Verhältnis von ausgesäten zu erfolgreich transfizierten Zellen in etwa vergleichbar zwischen dem MYPOP- und Leervektor-Plasmid ist. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden jeweils 2 Nöpfchen einer 24-well-Platte mit dem GFP-MYPOP-Plasmid und 2 mit dem GFP-Leervektor transfiziert und am Folgetag fixiert sowie mit dem Hoechst 33342-Farbstoff gegengefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgte an 10 verschiedenen Stellen eine Bildgebung beider Ansätze unter Anregung der grünen Fluoreszenz des GFP sowie der blauen Fluoreszenz der Hoechst-gefärbten Zellkerne. Durch Auszählung der grün-fluoreszierenden Zellen im Verhältnis zu den Zellkernen, die der Gesamtzahl der Zellen entsprechen, konnte eine Aussage über die Effizienz der Transfektion der Plasmide im direkten Vergleich gemacht werden.

4.5.7 **Zellfixierung und -färbung mit Kristallviolett**

Kristallviolett färbt Nucleoli adhärenter Zellen nach deren Aussaat und Behandlung. Mit dieser Methode werden Unterschiede in Überleben und Proliferation bei verschiedener Behandlung von in Mikrotiterplatten ausgesäten Zelllinien sichtbar.

Das Medium wurde ohne Berühren des Bodens der Nöpfchen aufgenommen und die Platte wurde mit 1x PBS gewaschen. Unter dem Abzug wurde so viel Methanol in jedes Nöpfchen gegeben, dass der Boden bedeckt war, und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem das Methanol wieder aufgenommen wurde, folgte die Zugabe von Kristallviolett in jedes Nöpfchen und ein erneuter Inkubationsschritt für eine Stunde bei Raumtemperatur mit geschlossenem Deckel der Mikrotiterplatte. Nun wurde das Kristallviolett wieder aufgenommen und die Platte vorsichtig in eine Schale mit demineralisiertem Wasser getaucht, um die Kristallviolett-Reste wegzuwaschen. Die Platte wurde offen über Nacht im Abzug trocknen gelassen. Die Lagerung der Platte erfolgte bei Raumtemperatur unter Schutz vor direktem Lichteinfall.

Nach der Fixierung wurde die Platte eingescannt, um folglich quantitativ aufgearbeitet zu werden. Diese quantitative Auswertung der Scans erfolgte mit ImageJ und die statistische Auswertung mit R. Hierbei wurde zunächst die prozentuale Kolonieformation gemessen an bedeckter Fläche der Vertiefung sowie Intensität des Farbsignals ermittelt. Dann wurden die Mittelwerte der MYPOP- und Leervektor-transfizierten Zellen errechnet und auf eine signifikante Unterscheidung überprüft.

4.6 Stimulation muriner Milzzellen zur Produktion bestimmter Zytokine

Um für die Immunoassays eine Positivkontrolle zu etablieren, wurden Immunzellen aus murinen Milzen isoliert, kultiviert und zur Produktion von Zytokinen angeregt (Kooperation mit der AG Holtappels).

Um die Produktion von Zytokinen intra- oder extrazellulär nachzuweisen, bietet sich die Methode der Durchflusszytometrie an, wo basierend auf Antikörper-Antigen-Reaktionen Proteine detektiert werden können. Um eine höhere Ausbeute an Zytokinen zu erreichen, als bei der basalen Aktivität von Immunzellen der Milz zu erwarten ist, können die Zellen zusätzlich zur Produktion von Botenstoffen angeregt werden. Hierfür kann die Kombination aus Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Ionomycin verwendet werden. PMA aktiviert die Proteinkinase C, wohingegen Ionomycin als Calcium-Ionophor beschrieben wird. Zusammen wird eine T-Zell-Aktivierung mit konsekutiver Produktion diverser Zytokine angeregt (Ai et al. 2013; Foster et al. 2007). Brefeldin A und Monensin wirken als Inhibitoren des intrazellulären Proteintransports, sodass die Zytokine im Golgi-Apparat oder Endoplasmatischen Retikulum akkumulieren (Schuerwegh et al. 2001). Die Produktion von GM-CSF erfordert daneben weitere Stimulatoren, so imitiert die Anwesenheit von anti-Oberflächenmerkmal 3 (*cluster of differentiation*, CD) in Kombination mit löslichem CD28 die natürliche Stimulation von T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen (Trickett und Kwan 2003). Die auf diese Weise stimulierten Immunzellen schütten mit hoher Wahrscheinlichkeit die zu untersuchenden Zytokine und Chemokine IL-24, IL-1 α , TNF- α , IL-11, GM-CSF und CCL2 aus, sodass die Proben als Positivkontrolle für die durchgeführten Versuche dienen können.

In dieser Arbeit wurden murine Milzzellen stimuliert, die nach Extrazellulär ausgeschütteten Zytokine wurden im Überstand erfasst, die in den Zellen verbliebenen mittels Lyse per Ultraschall im Zelllysat. Für die Stimulation wurde ein *Cell Stimulation Cocktail*, welcher aus Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Ionomycin bestand, in Kombination mit einem Brefeldin A- und Monensin-haltigem *Protein Transport Inhibitor Cocktail* mit unterschiedlich langen Stimulationszeiten verwendet.

Um einen höheren Ertrag an Zytokinen im Überstand vorzufinden, wurde in einigen Ansätzen auf die Blockade des Golgi-Apparats verzichtet. Auch wurden zur Negativkontrolle nicht-stimulierte Zellen mitgeführt.

Zunächst wurden die Mäuse per Genickbruch getötet, die Milzen steril entnommen und in DMEM transportiert. Auch alle folgenden Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. In einer 6 cm Petrischale wurden die Organe mit dem Stempel einer 2 ml Spritze durch ein Metallsieb gerieben und eine Einzelzellsuspension hergestellt, mit DMEM nachgespült und über einen 100 µm *Cellstrainer* gegeben. Durch Zentrifugieren bei 360 xg für 7 Minuten wurden die Zellen pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 4 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert. Nach Inkubation für 2 Minuten bei Raumtemperatur wurden 5 ml DMEM dazugegeben und die Zellsuspension über ein 40 µm Zellsieb gegeben. Das Gefäß wurde mit Medium auf etwa 25 ml aufgefüllt und erneut bei 360 xg für 7 Minuten zentrifugiert. Dem Verwerfen des Überstands folgte die Aufnahme des Zellpellets in 1 ml RPMI-10 Medium und die Zellzählung in der Neubauer Zählkammer.

Mittels RPMI-10 wurde eine Zielkonzentration von 1×10^7 Zellen/ ml eingestellt und jeweils 100 µl der Suspension in ein Nöpfchen zweier 96-well-Platte gegeben (entsprechend 1×10^6 Zellen/ Nöpfchen). Nach Zugabe von 2 µl *Cell Stimulation Cocktail* und 2 µl *Protein Transport Inhibitor Cocktail* pro 1 ml RPMI-10-Medium und Herstellung der gleichen Lösung ohne Zugabe des *Protein Transport Inhibitor Cocktail* wurden jeweils 100 µl nach folgendem Schema in die Vertiefungen der Platten gegeben: in jeder Platte wurden jeweils vier Nöpfchen mit dem *Cell Stimulation Cocktail* und zwei dem *Protein Transport Inhibitor* (finale Konzentration jeweils 2 µl/ ml) stimuliert, vier ohne *Protein Transport Inhibitor* und vier entsprachen einer nicht-stimulierten Kontrolle, erhielten also keine der stimulierenden Substanzen.

Eine Platte wurde bei 37 °C und 5 % CO₂ für 5 Stunden inkubiert, die andere Platte für 18 Stunden. Danach wurden die Zellen mit einer Pipette eingesammelt und für 10 Minuten bei 420 xg bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20 °C asserviert und das Zellpellet in RPMI-10 resuspendiert. Zur Herstellung eines Zelllysats wurde die Suspension im Ultraschall-Homogenisierer dreimalig für 20 Sekunden beschallt, bei 420 xg für 7 Minuten zentrifugiert und der Überstand bei -20 °C gelagert.

Zur Stimulation von Milzzellen zur GM-CSF-Produktion wurde eine 10 µg/ ml anti-CD3ε-Lösung in sterilem DPBS hergestellt und jeweils 100 µl je Nöpfchen in eine 96-well-Platte pipettiert. Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C wurde die Antikörperlösung steril abgegossen und die Platte dreimalig mit DPBS gewaschen.

Zu der aus den Milzen isolierten Einzelzellsuspension mit einer Zellkonzentration von 1×10^7 Zellen/ ml wurde lösliches anti-CD28 in einer Konzentration von 2 µg/ ml zugegeben und jeweils 100 µl in die Vertiefungen pipettiert, die Platte wurde bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit für 2 Tage inkubiert. Dann erfolgte die Stimulation für 6,5 Stunden mit dem *Cell Stimulation Cocktail* und *Protein Transport Inhibitor* für vier Nöpfchen mit beiden Substanzen, vier ohne Inhibition des Proteintransports und drei ohne Stimulation sowie die Herstellung der Lysate nach oben beschriebenem Ablauf.

4.7 IL-24 ELISA

Da die zelluläre Produktion und Ausschüttung von IL-24 vermeintlich durch die Transfektion von MYPOP angeregt wird, wurde die Methode des ELISA zum Nachweis des Interleukins gewählt. Bei einem ELISA können lösliche Proteine einer Probe sowohl qualitativ als auch quantitativ nachgewiesen werden. Hierfür wird eine Mikrotiterplatte mit einem Antikörper beschichtet, der gegen ein Epitop des zu detektierenden Antigens gerichtet ist. Nach Zugabe der Probe binden die gesuchten Proteine, falls vorhanden, an diesen Antikörper. Ein weiterer Antikörper, der gegen ein anderes Epitop des Analyts gerichtet ist und mit einer Meerrettich-Peroxidase (*Horse Raddish Peroxidase*, HRP) gekoppelt ist, wird darauffolgend hinzugegeben und kann durch Zugabe einer Substratlösung eine enzymatische Reaktion gewährleisten. Bei dieser wird ein Farbumschlag sichtbar, der fotometrisch ausgelesen und anhand einer Standardkurve quantifiziert werden kann.

Der Versuch wurde mit dem *Mouse IL-24 DuoSet ELISA-Kit* der Firma R&D Systems durchgeführt, alle Schritte des Experiments erfolgten nach Protokoll des Herstellers. Die 96-well-Mikrotiterplatte Platte wurde über Nacht mit dem aus Ratten stammenden Anti-Maus IL-24 *Capture* Antikörper beschichtet. Am nächsten Tag wurde nach dreimaligem Waschen mit 300 µl Waschpuffer je Nöpfchen und vollständiger Entfernung der Flüssigkeit die Platte mit 1 % BSA-haltigem PBS geblockt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten eine Wiederholung der Waschschrte, das Pipettieren des Standards und des Zellkulturmediums als Leerwert auf die Platte sowie die Zugabe von jeweils 100 µl der Proben, die zuvor frisch aufgetaut und gevortext wurden. Nun wurde eine Inkubationszeit von 2 Stunden gewährt, die Platte drei Mal gewaschen, 100 µl des Detektionsantikörpers in jede Vertiefung pipettiert und für 2 Stunden inkubiert. Dann wurde erneut dreimalig gewaschen, 100 µl Streptavidin-HRP zugegeben und unter Abschirmung vor direktem Licht für 20 Minuten inkubiert. Anschließend an einen letzten dreimaligen Waschschrte der Platte wurden je 100 µl Substratlösung in jedes Nöpfchen pipettiert, die Platte 20 Minuten lang lichtgeschützt inkubiert und zuletzt 50 µl Stopplösung dazugegeben.

Ausgewertet wurde die optische Dichte jedes *well*s nach Durchmischung der Lösungen durch vorsichtiges Beklopfen der Platte in einem Fotometer bei 450 nm.

Bei den Proben, die als Duplikate aufgetragen wurden, handelte es sich zum einen um den Überstand und das Lysat der unterschiedlich stimulierten murinen Milzzellen, zum anderen um Überstände und Lysate der transfizierten B16-F10-Zellen in Form von biologischen Replikaten. Diese wurden jeweils parallel mit dem MYPOP-Flag oder GFP-MYPOP Konstrukt und vergleichend mit dem korrespondierenden Leervektor transfiziert, 24 und 48 Stunden danach wurde der Überstand eingesammelt sowie ein Lysat mit dem Ultraschall-Homogenisator hergestellt. Zusätzlich durchliefen einige transfizierte Zellen nach der Transfektion einen Selektionierungsprozess, indem zum Zellkulturmedium Neomycin in einer Konzentration von 1,5 mg/ml zugegeben wurde. Der Überstand wurde an den Tagen 3, 4, 5, 6, 10 und 13 entnommen und ebenfalls im ELISA getestet.

4.8 LEGENDplex™

Die Botenstoffe TNF- α , IL-1 α , IL-11, CCL-2 und GM-CSF, deren Produktion vermutlich durch das Einbringen von MYPOP-DNA in Tumorzellen angeregt wird, sollten im Zellkulturüberstand mittels LEGENDplex™ nachgewiesen werden. Dieser funktioniert nach dem Prinzip eines *Sandwich*-Immunoassays und kann mittels antikörpergekoppelten *Beads* lösliche Analyte in der Durchflusszytometrie nachweisen. Um eine klare Unterscheidung zwischen den *Beads* zu gewährleisten, werden zwei verschiedene Größen sowie verschiedene Level der Allophycocyanin (APC)-Fluoreszenz der Kügelchen angeboten. Diese sind jeweils mit einem spezifischen Antikörper gekoppelt, der an ein bestimmtes Epitop des gesuchten Proteins bindet. Nach dem Herauswaschen ungebundener *Beads* folgt die Zugabe eines zweiten, biotinylierten Antikörpers, der an eine andere Stelle des Analyts bindet und somit ein *Sandwich* aus antikörpergekoppeltem *Beads*, gesuchtem Protein und Zweitantikörper formiert. Durch die Zugabe von an die biotinylierten Antikörper bindenden Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) kann diese Bindung sichtbar gemacht werden. Das Protein Streptavidin, welches aus Bakterien isoliert wird, bindet an Biotin. Das aus roten Algen stammende Phycoerythrin besitzt ein Fluoreszenzemissionsmaximum von 578 nm, welches nach Anregung in einem Durchflusszytometer als Signal detektiert werden kann. Da die Intensität des Signals proportional zu der Menge an gebundenem Protein ist, kann die Konzentration des Analyts mit Hilfe einer Standardkurve in der vom Hersteller bereitgestellten Analysesoftware errechnet werden. Anhand der unterschiedlichen Kügelchen mit verschiedenen spezifischen Antikörpern können verschiedene Proteine in

einer Probe parallel in der Durchflusszytometrie (fluoreszenzaktivierte Zellanalyse, FACS) dargestellt und quantifiziert werden (Biolegend) .

Die Analyse von Zellen in der Durchflusszytometrie basiert auf der Reaktion zwischen fluorochromgekoppelten Antikörpern und Antigenen in Form von bestimmten Proteinen, die sich intrazellulär oder auf der Zelloberfläche befinden können. Indem die Zellen durch einen Laserstrahl einer definierten Wellenlänge angestrahlt werden, werden die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes auf ein höheres Energieniveau gehoben, beim Zurückfallen auf das Ausgangsniveau wird Energie in Form von Photonen emittiert. Diese Photonen können wiederum detektiert werden und sind proportional zu den pro Zelle gebundenen Antikörpern, was eine Quantifizierung ermöglicht (FACSlab Mainz) .

Das Experiment wurde mit einem personalisierten murinen LEGENDplex™ Kit für die Zytokine und Chemokine TNF- α , IL-1 α , IL-11, CCL-2 und GM-CSF der Firma Biolegend durchgeführt, alle Schritte orientierten sich am Protokoll des Herstellers. Die Zellkulturüberstände und Lysate wurden kurz vor der Verwendung aufgetaut und gevortext. Nach der Titration des Standards wurden dieser und die Proben in einem Volumen von 12,5 μ l in die 96-well-Platte pipettiert. Es folgten die Zugabe eines äquivalenten Volumens an *beads* und die Inkubation auf einem Orbitalschüttler bei 250 rpm bei 4 °C über Nacht. Am Folgetag wurden 200 μ l Waschpuffer in jedes Nöpfchen gegeben und die Platte bei 1000 xg für 5 Minuten abzentrifugiert, die Flüssigkeit entfernt, die pelletierten *beads* durch vorsichtiges Klopfen am Rand aufgelöst und dieser Schritte erneut wiederholt. Jedes Nöpfchen erhielt 12,5 μ l des Detektionsantikörpers, wonach die Platte für 1 Stunde auf einem Orbitalschüttler bei 250 rpm bei Raumtemperatur geschüttelt wurde. Dann wurden 12,5 μ l SA-PE in jede Vertiefung pipettiert und nach einer Inkubation für 30 Minuten auf dem Orbitalschüttler wurden die beschriebenen Schritte aus zweimaligem Waschen und Zentrifugieren wiederholt. Nun wurden 150 μ l Waschpuffer in jedes Nöpfchen gegeben und die *beads* wurden durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gelöst und in ein FACS-Röhrchen, in welches 100 μ l Waschpuffer vorgelegt wurde, gegeben. Bei der FACS-Messung wurde zunächst der Standard und dann die Proben gemessen, die Messzeit betrug 30 Sekunden.

Die verwendeten Proben und Kontrollen stimmten mit denen des IL-24 ELISA überein.

5 Ergebnisse

5.1 MYPOP-Expressionsanalyse in verschiedenen Organen

Um erste Informationen zur Proteinexpression des mutmaßlichen Tumorsuppressors MYPOP in verschiedenen Geweben zu erhalten und diese dann mit Tumorzellen der entsprechenden Ursprungsgewebe vergleichen zu können, wurde die relative Menge des MYPOP Proteins in Organen der Maus bestimmt.

Nach der Aufarbeitung verschiedener Organe gesunder Mäuse wurden die Proteine mit einer SDS-PAGE aufgetrennt, im Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und schließlich mit verschiedenen MYPOP-spezifischen Antikörpern inkubiert. Wichtig ist zu erwähnen, dass die Beladung der Geltaschen nach Zellzahl normiert wurden, dementsprechend jede Bande den MYPOP-Gehalt in 1×10^6 Zellen darstellt. Die Kombination aus allen 3 verfügbaren Antikörpern zeigte bei einer Belichtung von 45 Minuten die zuverlässigsten Ergebnisse. In allen Organen konnte eine MYPOP-spezifische Bande bei etwa 55 kDa detektiert werden, die Intensität unterschied sich jedoch (Abbildung 1).

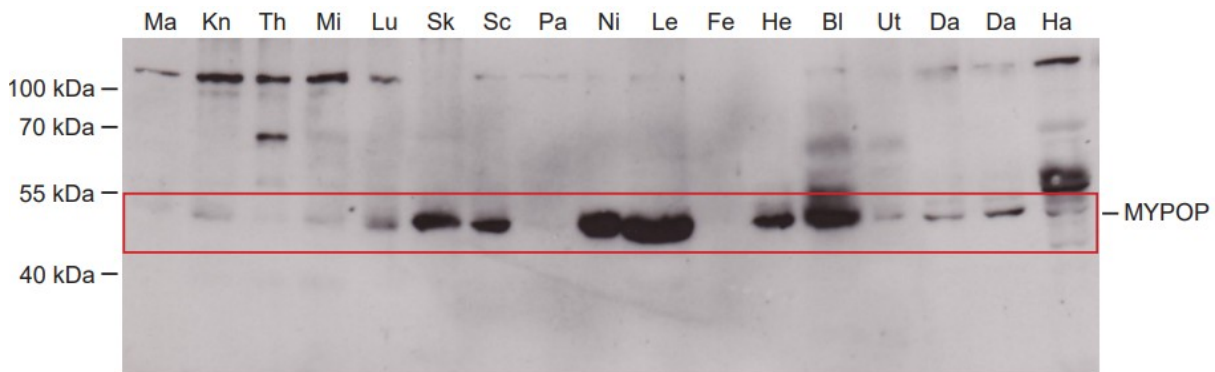


Abbildung 1: Western Blot muriner aufgereinigter Organe mit 1×10^6 Zellen pro Geltasche. Die Inkubation erfolgte mit den primären MYPOP-Antikörpern ab94406, ab221487 (Abcam) und Anti-KC-14 (ProteoGenix) in einer Konzentration von jeweils 1:1.000. Der rote Kasten hebt die MYPOP-spezifischen Banden hervor. Die weitere Quantifizierung der Bandenintensität mit ImageJ, für die jedes Organ mindestens in 3 verschiedenen Western Blots untersucht wurde, ergab eine Dominanz in Niere, Leber und Skelettmuskel. Reihenfolge der aufgetragenen Organe von links nach rechts: Peritonealmakrophagen (Ma), Knochenmark (Kn), Thymus (Th), Milz (Mi), Lunge (Lu), Skelettmuskel (Sk), Speicheldrüsen (Sc), Bauchspeicheldrüse (Pankreas, Pa), Niere (Ni), Leber (Le), Fettgewebe (Fe), Herz (He), Blut (BI), Gebärmutter und Eileiter (Uterus, Ut), Darm (Da), Darm (Da), Haut (Ha).

Da das Herz eine deutliche, klar abgrenzbare Bande formte und zudem ausreichend Probenmaterial vorhanden war, wurde bei der Auswertung die relative Intensität der Banden der verschiedenen Gewebe im Vergleich zu der des Herzens bestimmt.

Insgesamt wurden 5 Gele ausgewertet, jedes Organ wurde mindestens 3-mal aufgetragen. Zur Auswertung wurden jeweils die Mittelwerte der Bandenintensität der jeweiligen Organe ermittelt. Die höchsten Level der Expression des Transkriptionsfaktors MYPOP wiesen Niere, Skelettmuskel und Leber auf, welche alle die Menge an exprimierten Protein im Herz überstiegen. In absteigender Reihenfolge zeigten Zellen des Vollbluts nach Lyse der Erythrozyten, Speicheldrüsen, Lunge, Darm und Haut niedrigere MYPOP-Level als die Herzmuskulatur. In Makrophagen, Knochenmark, Gebärmutter mit Anteilen eines Eileiters, Thymus, Milz, Bauchspeicheldrüse und Fettgewebe konnte noch weniger MYPOP nachgewiesen werden. Die relativen Zahlen sind der Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: Relative Bandenintensität der verschiedenen Organe im Vergleich zum Herzen

Organ	Relative Bandenintensität im Vergleich zum Herzen [%]	(+/-) Standardabweichung
Fettgewebe	6,9	0,86
Bauchspeicheldrüse (Pankreas)	10,78	1,06
Milz	22,33	6,14
Thymus	23,29	17,11
Gebärmutter (Uterus)/ Eileiter (Tube)	25,66	1,46
Knochenmark	26,98	14,02
Makrophagen	27,30	27,53
Haut	38,74	12,29
Darm	51,01	13,3
Lunge	52,58	21,96
Speicheldrüsen	94,68	16,67
Blut	97,22	14,74
Herz	100	0
Skelettmuskel	107,22	9,91
Leber	109,69	15,61
Niere	115,33	17,97

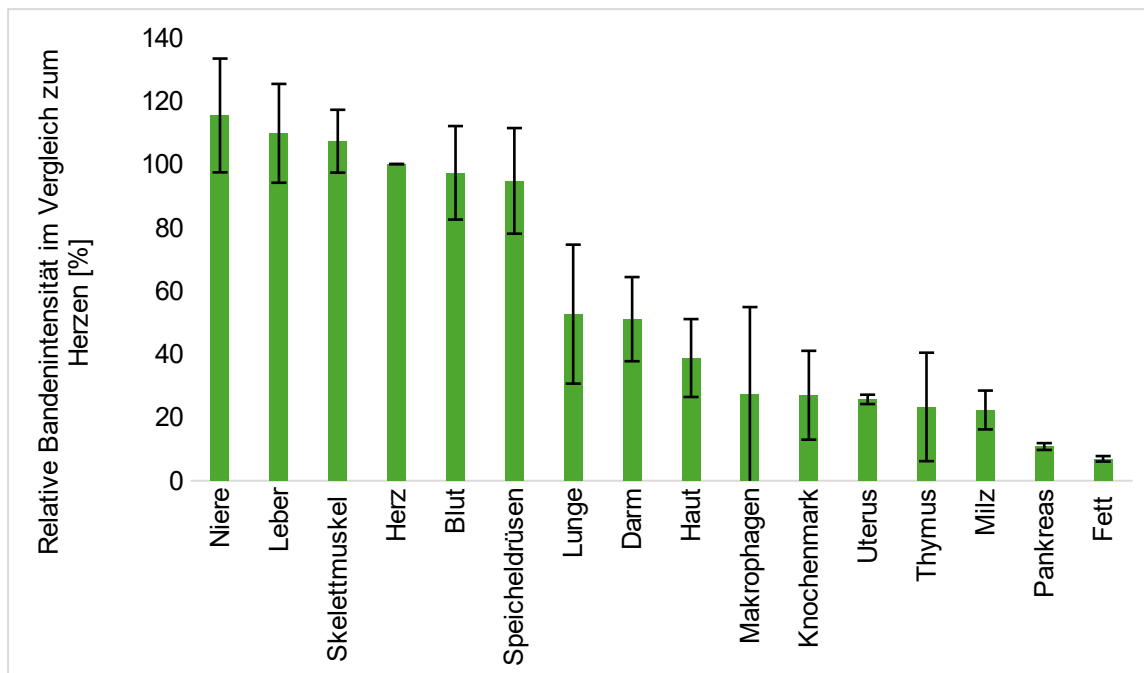


Abbildung 2: Relative Bandenintensität der verschiedenen Organe im Vergleich zum Herzen. Die Intensität des Herzes wurde auf 100 % normiert. Gezeigt sind Mittelwerte der Bandenintensität der jeweiligen Organe (n= mindestens 3) mit der dazugehörigen Standardabweichung.

Als Ladekontrolle wurde jeweils direkt nach dem Western Blot eine Ponceau S-Färbung durchgeführt, welche zeigte, dass die Proteine erfolgreich übertragen wurden. Entsprechend der Normierung der Beladung der Geltaschen auf die Zellzahl zeigte sich keine gleichmäßige Verteilung an Proteinen, sondern unterschiedliche Mengen an Protein pro Zellzahl entsprechend den verschiedenen Proteinleveln in den Geweben. Dies bestätigte sich zusätzlich im Aktin-Blot. So stellte sich die Aktin-Bande im stark proteinhaltigen Skelettmuskel wesentlich intensiver dar als in anderen Organen mit niedrigerer gesamten Proteinexpression wie dem Thymus (Abbildung 3).

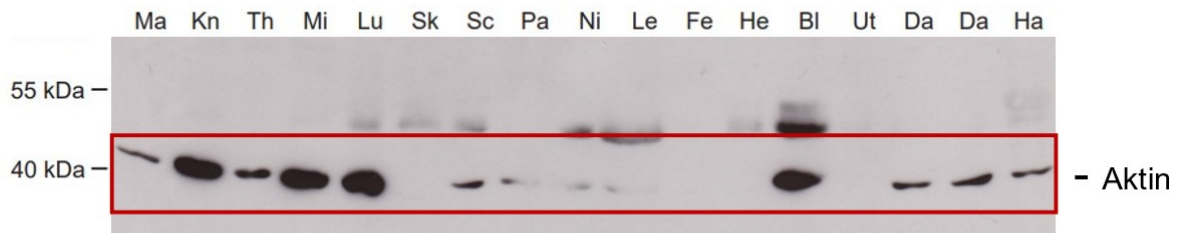


Abbildung 3: Western Blot muriner aufgereinigter Organe mit 1×10^6 Zellen pro Geltasche. Die Inkubation erfolgte mit dem primären monoklonalen Anti- β -Aktin-Antikörper AC-15 (Sigma-Aldrich) in einer Konzentration von 1:10.000. Der rote Kasten hebt die Aktin-spezifischen Banden bei 42 kDa hervor. Reihenfolge der aufgetragenen Organe von links nach rechts: Peritonealmakrophagen (Ma), Knochenmark (Kn), Thymus (Th), Milz (Mi), Lunge (Lu), Skelettmuskel (Sk), Speicheldrüsen (Sc), Bauchspeicheldrüse (Pankreas, Pa), Niere (Ni), Leber (Le), Fettgewebe (Fe), Herz (He), Blut (Bl), Gebärmutter und Eileiter (Uterus, Ut), Darm (Da), Darm (Da), Haut (Ha).

5.2 Das Fehlen von MYPOP in murinen Melanomzellen B16-F10

5.2.1 Western Blot

Um die Hypothese zu überprüfen, dass MYPOP in transformierten Zellen stark herunterreguliert ist oder gänzlich fehlt, wurde dies am Beispiel des Melanoms überprüft. Dazu wurde die relative MYPOP Menge in der Haut mit der in den Melanomzellen B16-F10 verglichen. Diese Ergebnisse sollten helfen, MYPOP als Biomarker zu etablieren. Hierbei wäre das Vorhandensein von MYPOP ein Marker für normales Gewebe, das Fehlen von MYPOP ein Tumormarker.

Im Western Blot zeigten die Zellen aus der Haut der Ohren von C57BL/6-Mäusen eine Bande auf Höhe des 55 kDa-Markers. Bei den Tumorzellen B16-F10 konnte weder bei der Kombination aus drei Anti-MYPOP-Antikörpern noch der Anti-KC-14 oder der ab221487 allein eine Bande detektiert werden. 24 Stunden nach der Transfektion eines MYPOP-Flag Expressionsvektors ist eine deutliche, intensive Bande bei der des 55 kDa-Markers zu erkennen. Die Zellen, denen der Leervektor transfiziert wurde, zeigen keine Bande bei 55 kDa. Allerdings sind in den Tumorzellen tiefer oder höher laufenden Banden zu detektieren. Es ist derzeit nicht klar, ob diese Banden dem MYPOP Protein zugeordnet werden können oder es sich um unspezifische Banden handelt. Dies lässt darauf schließen, dass die Zellen der Melanomzellelinie B16-F10 wie vermutet kein MYPOP exprimieren.

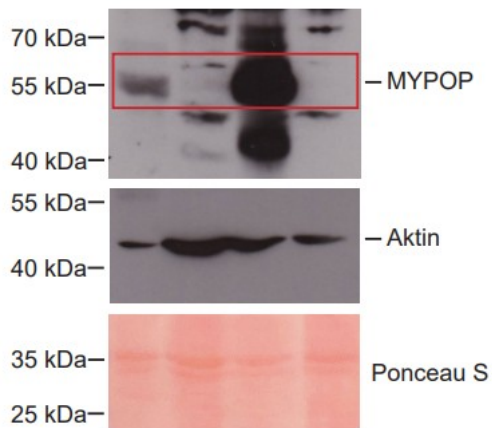


Abbildung 4: Western Blot muriner Hautzellen mit 1×10^6 Zellen pro Geltasche unter Verwendung der primären MYPOP-Antikörpern ab94406, ab221487 (Abcam) und Anti-KC-14 (ProteoGenix) in einer Konzentration von jeweils 1:1.000. Rechts wurden aufgereinigte Hautzellen der Ohren von gesunden Mäusen aufgetragen, daneben Melanomzellen der Zelllinie B16-F10, gefolgt von B16-F10 nach der Transfektion von MYPOP sowie B16-F10 nach Transfektion eines Leervektors. Zu erkennen ist die MYPOP-spezifische bei den tumorfreen Zellen sowie eine deutliche Bande nach Transfektion. Die Tumorzellen hingegen zeigen keine 55 kDa Bande, genau wie die Leervektor-transfizierten Zellen. Nach dem Western Blot erfolgte eine Ladekontrolle mit der Ponceau S-Färbung sowie eine erneute Antikörperinkubation mit Anti- β -Aktin (AC-15; Sigma-Aldrich) in einer Konzentration von 1:10.000.

5.3 MYPOP-Expression in der Tumorzelllinie B16-F10

Nachdem festgestellt wurde, dass Tumorzellen kein MYPOP exprimieren, stellt sich die Frage, inwiefern eine Re-Expression das Tumorstadium hemmen kann und MYPOP somit eine Rolle in der Therapie von Tumoren spielen könnte. Zunächst wurde die fehlende MYPOP Expression in den Melanomzellen überprüft, die Haut diente hierbei als Positivkontrolle (siehe Abbildung 4). Durch eine Transfektion konnte MYPOP jedoch erfolgreich in die Zellen eingebracht werden. Das Expressionsniveau erreichte ein höheres Expressionsniveau als das endogene.

In der Fluoreszenzmikroskopie ließen sich der Transfektionserfolg der B16-F10-Zellen nach Lipofectamine™ -Transfektion und das mikroskopische Bild des exprimierten Proteins beurteilen. Hierzu wurden Plasmide genutzt, die das grün fluoreszierende Protein (GFP) beziehungsweise das Fusionsprotein GFP-MYPOP kodierten. Die GFP-exprimierenden Zellen zeigten hier eine grüne Fluoreszenz der ganzen Zelle, die GFP-MYPOP-exprimierenden Zellen hingegen eine zellkernbetonte Färbung mit intensiv fluoreszierenden vesikelähnlichen Verdichtungen im Zytoplasma verteilt. Der ganze Zellkörper wirkte zudem hell grünlich gefärbt.

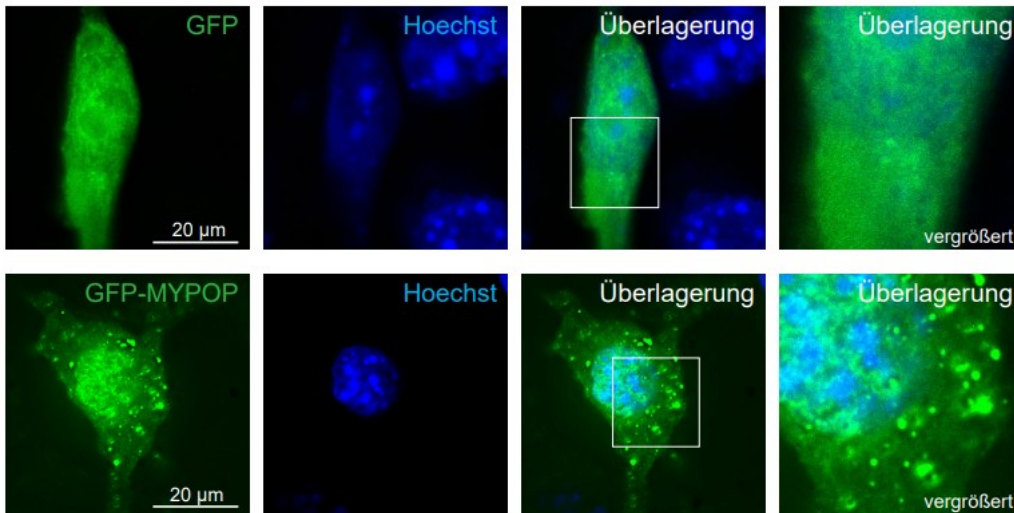


Abbildung 5: Fluoreszenzmikroskopische Bilder von B16-F10-Zellen nach Transfektion von GFP und GFP-MYPOP in einer 100-fachen Vergrößerung. Die GFP-transfizierten Zellen zeigen eine gleichmäßige Verteilung des grün fluoreszierenden Proteins im gesamten Zytoplasma und Zellkern. GFP-MYPOP zeichnet sich vor allem durch eine intensive Fluoreszenz im Zellkern aus, daneben sind Vakuolen-ähnliche Gebilde im Zytoplasma erkennbar.

Nach der Anfertigung von jeweils 10 Übersichtsaufnahmen in der 200-fachen Vergrößerung von GFP- MYPOP und Leervektor-transfizierten sowie Hoechst 33342-gefärbten Zellen und Auszählung der blau fluoreszierenden Zellkerne sowie der grün fluoreszierenden Zellen konnte die Transfektionseffizienz berechnet werden.

Von den insgesamt 740 gezählten Zellen haben 160 das GFP-Plasmid aufgenommen und exprimieren das Genprodukt, was einer Effizienz von 21,62 % entspricht. Die Transfektion der GFP-MYPOP-DNA war bei 125 von insgesamt 622 Zellen erfolgreich, dies entspricht 20,1 %. Folglich konnte bei beiden Plasmiden eine ähnliche Effizienz der Transfektion beobachtet werden, etwa 20 % der B16-F0-Zellen haben die fremde DNA aufgenommen und das Genprodukt exprimiert, ein ähnliche Transfektionseffizienz ist für Flag-Vektoren zu erwarten.

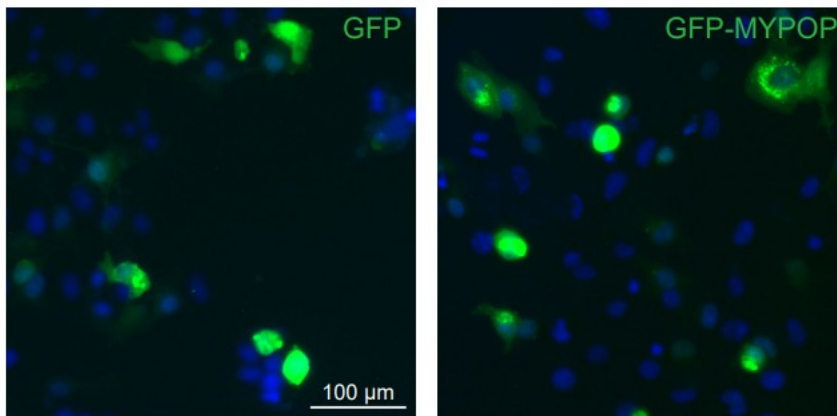


Abbildung 6: Übersichtsaufnahme GFP- und GFP-MYPOP exprimierender Zellen in der 200-fachen Vergrößerung bei Überlagerung des blauen und grünen Kanals. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden die blauen Zellkerne ausgezählt und mit den grün leuchtenden Zellen ins Verhältnis gesetzt. Im Mittel ergibt sich bei beiden Transfektionsansätzen eine Effizienz von etwa 20 %.

5.4 MYPOP-Einfluss auf das Zellwachstum der Tumorzelllinie B16-F10 (Kolonieformations-Assay)

Zunächst wurde die benötigte Antibiotikakonzentration ermittelt, um Zellen ohne Resistenzgen zuverlässig abzutöten. Am vierten Tag wurde ein gehemmtes Wachstum ab einer Konzentration von 1 mg/ ml ersichtlich, am siebten Tag stellten sich die Näpfcchen mit niedrigeren Konzentrationen als so stark proliferierend heraus, dass sich die Zellen bereits durch Überwachsung von der Platte ablösten. Dies allerdings nur bei den nicht-transfizierten Zellen. Die transfizierten Zellen erreichten nach etwa 8 Tagen die Konfluenz. Daher wurde dieser Zeitraum 1,5 mg/ ml Neomycin für Folgeversuche gewählt. Die Zellen wurden fortlaufend mikroskopisch beobachtet und am achten Tag eiskaltem Methanol fixiert und mit Kristallviolett gefärbt (Abbildung 7).

Mittels der Fluoreszenz der GFP-transfizierten Zellen konnte gezeigt werden, dass sowohl die GFP-MYPOP- als auch die GFP-Leervektor-transfizierten Zellen als Kontrollgruppe die Plasmide aufgenommen haben und das Protein exprimiert wird, die Transfektion war demnach erfolgreich. Die unbehandelten Zellen (Kontrollgruppe) hingegen haben kein Plasmid erhalten und zeigen keine Fluoreszenz (Abbildung 7A).

Bereits am Tag nach der Transfektion wurde der zytotoxische Effekt des Antibiotikums bei den Zellen der Kontrollgruppe sichtbar, die kein Plasmid und somit keine Resistenz erhalten haben und ein gehemmtes Wachstumsverhalten zeigten, bis schließlich alle Zellen nach etwa 5 Tagen in den Zelltod übergingen. Die Zellen, die erfolgreich transfiziert wurden und das Plasmid exprimierten, wuchsen weiter, jedoch deutlich langsamer als gewöhnlich in der Reinkultur ohne Transfektion und Antibiotika-Behandlung. Auch überlebten nicht alle Zellen den Stress des Transfektionsprozesses und nicht alle nahmen das Plasmid auf und konnten somit nicht weiter proliferieren, da sie kein Neomycinresistenzgen exprimieren konnten. Die Plasmid-tragenden Zellen wurden selektioniert, vermehrten sich weiterhin langsam und bildeten Kolonien.

Zudem konnte beobachtet werden, dass nach etwa 5 Tagen die MYPOP-transfizierten Zellen trotz Neomycin-Resistenz apoptotisch wurden und begannen, sich von der Mikrotiterplatte abzulösen. Diese deformierten Zellen konnten auch unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden (Abbildung 7A). Die Zellen, denen nur das die Neomycin-Resistenz enthaltende GFP-Plasmid geboten wurde, teilten sich hingegen weiter und boten auch fluoreszenzmikroskopisch ein deutlich vitaleres Bild, Zellen ohne Transfektion der Antibiotikaresistenz waren kaum noch sichtbar.

Die Fixierung und Färbung mit Kristallviolett machten diesen Effekt noch deutlicher sichtbar, wie in Abbildung 7B zu sehen ist, welche zu den Fluoreszenzbildern in den Abbildungen korrespondiert. MYPOP-reexprimierende Tumorzellen bildeten keinen dichten Zellrasen mehr und sammelten sich nur noch vereinzelt am Rand der Vertiefungen der Mikrotiterplatte. Diejenigen Zellen, die mit dem Leervektor lediglich die Resistenz erhalten haben, konnten mit ihrem Wachstum weiterhin die *wells* ausfüllen, die nicht transfizierte Kontrollgruppe ist nahezu gänzlich abgestorben.

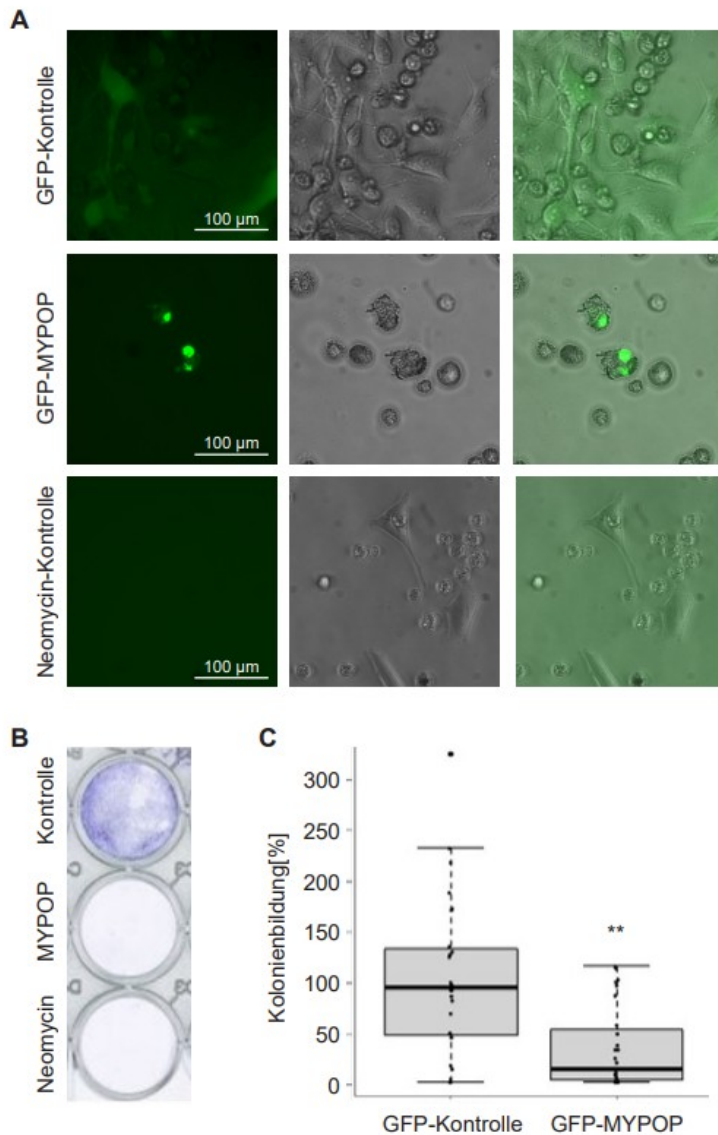


Abbildung 7: Kolonieformation-Assay von B16-F10 Melanomzellen. **A**: Fluoreszenzmikroskopische Bilder in der 200-fachen Vergrößerung (8 Tage nach Transfektion). Die GFP-transfizierten Zellen zeigen ein vitales Bild und weiteres Wachstum. Zellen, die GFP-MYPOP erhalten haben, lösen sich aus dem Zellverband, runden sich ab und gehen vermutlich in den Zelltod über. Nicht-transfizierte Zellen ohne Resistenzgen gehen unter der Behandlung mit Neomycin ebenfalls zugrunde, sie schrumpfen und verlieren ihre ursprüngliche Form. **B**: Bild der fixierten und gefärbten Mikrotiterplatte entsprechend der mikroskopischen Bilder in A. Während die GFP-transfizierten Zellen weiter proliferieren, sterben die MYPOP-transfizierten und nicht-transfizierten Zellen ab. **C**: Boxplots der ermittelten Kolonienbildung der GFP- und GFP-MYPOP-transfizierten Zellen. Die Zellen nach Transfektion von GFP-MYPOP zeigen eine signifikant niedrigere Kolonienbildung als jene nach Transfektion von GFP ($p = 0,001106$).

Der makro- und mikroskopische Eindruck ließ sich in der statistischen Auswertung bestätigen. Nach der Quantifizierung der bewachsenen Fläche unter Beachtung der Zelldichte in Form der Intensität des Signals wurden die Werte in R statistisch aufgearbeitet. Die Boxplots in Abbildung 7C stellen den prozentualen Anteil der Kolonienbildung der MYPOP- und Leervektor-transfizierten Zellen dar. Es ist ersichtlich, dass der Mittelwert der bewachsenen Fläche bei den B16-F10-Zellen nach MYPOP-Transfektion deutlich unter dem der Leervektor-transfizierten Melanomzellen liegt. Diese Beobachtung ist mit $p = 0,01365$ statistisch signifikant.

Unter Beachtung der Histogramme sowie der Dichtestandardfunktionen der verschiedenen Transfektionsansätze stellen sich die Zellen, die den Leervektor erhalten haben, als normalverteilt dar, diejenigen, die MYPOP reexprimierten, als nicht-normalverteilt. Entsprechend dieser Konstellation wurde der Mann-Whitney-U-Test (Wilcoxon-Rangsummentest) durchgeführt, welcher sich mit $p = 0,001106$ als statistisch signifikant herausstellte. Ähnliche Boxplots mit entsprechend signifikanten statistischen Tests konnten sowohl bei der Einzelbetrachtung des Flag-Konstrukts als auch des GFP-Konstrukts erzielt werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Melanomzellen B16-F10 viel weniger endogenes MYPOP im Vergleich zu normalen Hautzellen besitzen und dass eine MYPOP Expression in diesen Zellen zur starken Reduktion der Zellzahl führt.

5.5 Induktion spezifischer Zytokine durch MYPOP

5.5.1 IL-24 ELISA

Eine MYPOP-Reexpression führte in HeLa Zellen zur Expression des Zytokins IL-24 (Johannes Strunk, AG Florin, Publikation in Revision). Dieses Interleukin ist aufgrund seiner Entdeckung als tumorsupprimierendes Protein in Melanomzellen auch als Melanomdifferenzierungs-assoziiertes Protein 7 (mda-7) bekannt (Wang und Liang 2005). Daher sollte untersucht werden, ob MYPOP auch in Melanomzellen B16-F10 dieses Zytokin induzieren kann.

Die Eichkurve mit dem im Kit enthaltenen IL-24 hat valide Ergebnisse gezeigt, aber weder die Messungen aus Lysaten oder Überständen der stimulierten Milzzellen noch diejenigen der transfizierten B16-F10 lieferten auswertbare Daten beziehungsweise lagen unter der Detektionsgrenze. Die genauen Werte der photometrischen Messung sind der Tabelle im Anhang zu entnehmen (siehe Anhang, Seite 53-54).

Zunächst wurde die IL-24 Induktion in murinen Milzzellen kontrolliert. In einigen Proben der murinen Milzzellen konnte im ELISA IL-24 detektiert werden, hier auch in beiden aufgetragenen Duplikaten. Die höchste Konzentration des Zytokins von 109,3 pg/ ml zeigte sich im Überstand der mit anti-CD-3 und löslichem CD-28 inkubierten sowie mit PMA und Ionomycin stimulierten Zellen ohne Blockade des Proteintransports, gefolgt von der Negativkontrolle dieses Versuchsansatzes ohne zusätzliche Stimulation neben anti-CD-3 und CD-28 mit 87,55 pg/ ml. Die Zellen, die zu den Stimulantien des erstgenannten Ansatzes zusätzlich eine Blockade des Proteintransports erhalten haben, ergaben eine IL-24 Konzentration von 37,95 pg/ ml. Auch in den Lysaten der Assays mit den beiden höchsten IL-24-Konzentrationen konnte das Zytokin nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigten weitere Behandlungsansätze und Negativkontrollen positive Signale für IL-24, zum Teil auch im Lysat.

Im Großteil der transfizierten B16-F10-Zellen lag das Signal für IL-24 unter der minimal nachweislichen Konzentration. Von allen getesteten Proben, die jeweils in Duplikaten gemessen wurden, konnte lediglich in 4 Ansätzen IL-24 detektiert werden. Trotz des Auftragens von Duplikaten auf die Platten war nur bei einem Ansatz in beiden getesteten Duplikaten ein sehr schwaches Signal zu detektieren, die anderen positiven Ausschläge waren jeweils nur in einem der aufgetragenen Proben nachweisbar. Da keine klare Induktion von IL-24 in meinem Testlauf feststellbar war, wurde von weiteren Experimenten abgesehen.

Alles in allem kann zusammengefasst werden, dass die Positivkontrollen valide Ergebnisse zeigten, sodass der Versuchsaufbau funktioniert hat. Dennoch konnte in den B16-F10-Zellen keine signifikante Erhöhung für IL-24 nachgewiesen werden, sodass davon ausgegangen werden muss, dass die Transfektion von MYPOP-DNA nicht zu einer Erhöhung des gesuchten Zytokins führt.

5.5.2 IL-1 α -, TNF- α -, IL-11-, GM-CSF-, CCL2-LEGENDplex™

Eine MYPOP-Reexpression führte in HeLa Zellen neben IL-24 auch zur Induktion der IL-1 α -, TNF- α -, IL-11-, GM-CSF-, CCL2 Gene. IL-1 α und IL-11 konnten auf Proteinebene validiert werden ((Johannes Strunk, AG Florin, Publikation in Revision). Daher sollte mit Hilfe eines LEGENDplex™-Assays untersucht werden, ob MYPOP auch in den Melanomzellen B16-F10 diese Zytokine induziert.

Durch die Kontrollen mit den stimulierten murinen Milzzellen konnte sichergestellt werden, dass der Versuchsablauf korrekt durchgeführt wurde und der Assay an sich funktioniert hat. Hier zeigte sich ein gemischtes Bild, wobei meist kein spezielles Muster erkennbar war.

Somit war es nicht möglich, eine bestimmte Konzentration, Inkubationszeit oder Stimulationskombination für eine zuverlässige Positivkontrolle festzulegen, die universell für alle getesteten Zytokine anwendbar ist.

IL-1 α :

Das Zytokin konnte in der höchsten Konzentration im Lysat der für 18 Stunden mit PMA und Ionomycin stimulierten Milzzellen ohne Blockade des Golgiapparats nachgewiesen werden. Alle weiteren Ansätze zeigten eher geringe Konzentrationen an IL-1 α .

In keinem Ansatz der transfizierten murinen Melanomzellen B16-F10 hingegen konnte das Zytokin detektiert werden, die Konzentrationen lagen unter der Nachweisgrenze von 1,36 pg/ ml (siehe Anhang, Seite 55-57).

TNF- α :

Die höchste Konzentration an Tumornekrosefaktor konnte im Überstand der für 5 Stunden mit dem PMA-haltigen *Cell Stimulation Cocktail* ohne Blockade des Proteintransports stimulierten murinen Milzzellen nachgewiesen werden. Zudem zeigten die CD3-stimulierten Zellen mit und ohne weitere Stimulantien sowie das Zelllysate der für 5 Stunden mit dem *Cell Stimulation Cocktail* und dem *Protein Transport Inhibitor Cocktail* behandelten Zellen eine vergleichsweise höhere Konzentration des Zytokins auf als die anderen Versuchsansätze.

Im LEGENDplex™ befand sich die Konzentration des Chemokins bei allen Versuchsansätzen der B16-F10-Zelllinie unter der Nachweisgrenze von 4,02 pg/ ml (siehe Anhang Seite 55-57).

IL-11:

Die murinen Milzzellen, die für 5 Stunden mit dem *Cell Stimulation Cocktail* sowie dem *Protein Transport Inhibitor Cocktail* behandelt wurden, zeigten die höchsten Konzentrationen an IL-11. Alle weiteren Ansätze zeigten entweder nur geringfügige Erhöhungen oder das Zytokin war gar nicht nachweisbar.

Die verschiedenen Transfektionsansätze sowie Aufbereitungsmethoden der murinen Melanomzellen zeigten uneinheitliche Ergebnisse, welche nicht reproduzierbar waren. Eine herausstechend hohe Konzentration des Zytokins von 1048,85 pg/ ml konnte im 6 Tage alten Überstand der Zellen nachgewiesen werden, die das GFP-MYPOP Plasmid erhalten haben. Alle weiteren Proben, in denen IL-11 zu detektieren war, schienen keiner Systematik zu folgen, so konnte das Zytokin sowohl bei einigen GFP-MYPOP und MYPOP-Flag transfizierten Zellen als auch bei jenen, die den Leervektor erhalten haben, nachgewiesen werden, jedoch befanden sich bei der Mehrheit der Versuchsansätze die Konzentrationen unter der Nachweisgrenze von 32,05 pg/ ml (siehe Anhang, Seite 55-57).

GM-CSF:

Die Inkubation der murinen Milzzellen mit gebundenem anti-CD-3 sowie löslichem CD-28 führte in allen drei Szenarien zu einer deutlichen Erhöhung von GM-CSF in Vergleich zu den anderen, nicht anti-CD-3- und CD-28-behandelten Versuchsansätzen. Hier zeigte sich die höchste Konzentration im Überstand der mit dem *Cell Stimulation Cocktail* behandelten Zellen ohne Einsatz des *Protein Transport Inhibitor Cocktail*, die Konzentration des Ansatzes mit Blockade des Proteintransports und des Ansatzes ohne zusätzliche Stimulantien waren etwa gleich hoch. In den Lysaten der genannten Ansätze hingegen waren deutlich niedrigere Konzentrationen nachzuweisen. Zusätzlich konnte das Zytokin in diversen weiteren Ansätzen nachgewiesen werden.

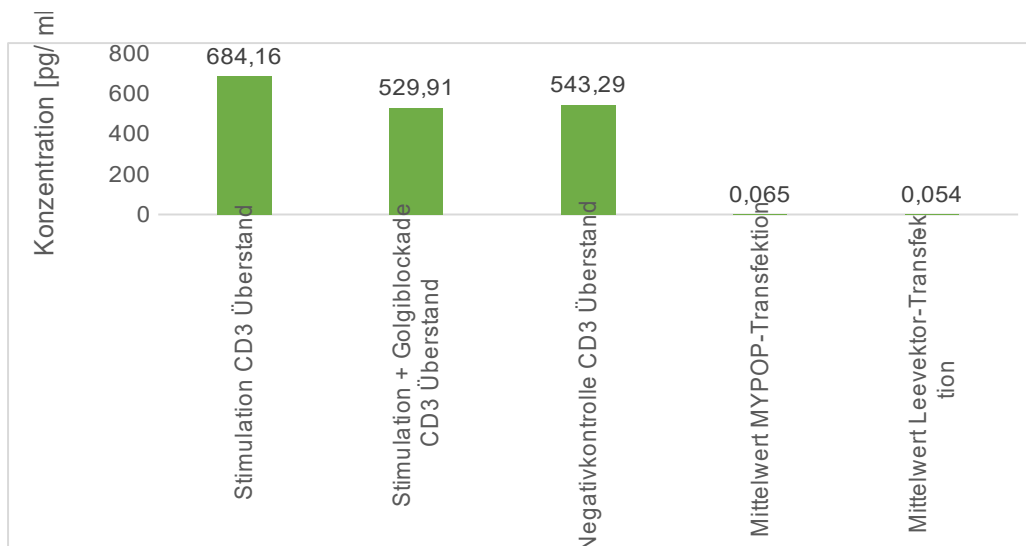


Abbildung 8: Konzentrationen von GM-CSF in murinen Milzzellen und B16-F10-Zellen nach Transfektion von MYPOP und Leervektoren in pg/ ml. Die Stimulation der Milzzellen wurde mit PMA und Ionomycin durchgeführt, eine Blockade des Golgiapparats mittels Brefeldin A und Monensin induziert, die Negativkontrollen erhielten keine stimulierenden Substanzen. Die höchsten Konzentrationen des Zytokins konnten bei zusätzlicher Beschichtung der Mikrotiterplatten mit anti-CD3 und zusätzlicher Zugabe von CD-28 bei einer Inkubation über 6,5 Stunden detektiert werden. Da bei 30 getesteten MYOPOP Proben (GFP- und Flag-getaggt, verschiedene Inkubations- und Selektionsansätze) mit korrespondierender Leervektor-Transfektion lediglich jeweils eine MYPOP- und eine Leervektor-transfizierte Probe ein positives Signal zeigte, sind hier die Mittelwerte des Versuchs aufgetragen. Der LEGENDplex™ wurde einmalig durchgeführt.

Das Interleukin GM-CSF konnte in 2 der insgesamt 60 Proben nachgewiesen werden, in allen anderen Proben befand sich die Konzentration unter der Nachweisgrenze von 1,47 pg/ ml (siehe Anhang, Seite 55-57).

CCL-2:

Neben dem Überstand der für 5 Stunden mit PMA und Ionomycin stimulierten Milzzellen ohne Blockade des Proteintransports zeigte zudem das Lysat der 5 Stunden mit beiden *Cocktails* inkubierten Zellen nachweisbare Konzentrationen an CCL2. Auch im Überstand der anti-CD3- und CD28-behandelten Zellen konnte das Zytokin nachgewiesen werden, sowohl ohne zusätzliche Stimulation als auch nach 6,5-stündiger Stimulation mit dem *Cell Stimulation Cocktail* mit und ohne Proteintransportblockade. Des Weiteren führte eine Inkubation für 18 Stunden ausschließlich mit PMA und Ionomycin zu einem CCL2-Nachweis über der Grenze von 3,46 pg/ ml.

CCL2 konnte lediglich in 3 nicht-reproduzierbaren Proben der transfizierten B16-F10-Zellen detektiert werden, in allen weiteren Ansätzen war das Zytokin nicht nachweisbar (siehe Anhang, Seite 55-57).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Kontrollen in Form der murinen Milzzellen jedes untersuchte Zytokin nachweisen konnten, die B16-F10-Melanomzellen jedoch sehr schwankende Ergebnisse zeigten, die sich statistisch nicht als signifikant oder auswertbar herausstellten. Somit ist am ehesten davon auszugehen, dass MYPOP die Präsenz der untersuchten Zytokine bei murinen Melanomzellen nicht positiv beeinflusst, wie es die Untersuchungen von HeLa-Zellen nahelegen.

6 Diskussion

6.1 Das murine MYPOP-Protein zeigt eine hohe Gewebespezifität

Anders als *housekeeping* Proteine wie Laktatdehydrogenase (LDH), die in allen Zellen in ähnlicher Menge vorkommen, scheint das Protein MYPOP gewebespezifisch exprimiert zu werden. Somit scheint es nicht generell für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion notwendig zu sein, jedoch je nach Organtyp in unterschiedlichem Maße benötigt zu werden. Dies spiegelt sich nicht nur in bereits bestehenden Daten der RNA-Expression wieder (Abbildung 9) (ProteinAtlas), sondern auch in den eigens durchgeführten Western Blots. Da das Flag-Konstrukt etwa auf Höhe endogenen MYPOPs zuverlässig durch die Antikörper detektierbar war, können die Ergebnisse dieser Western Blots als durchaus aussagekräftig bewertet werden (Abbildung 1).

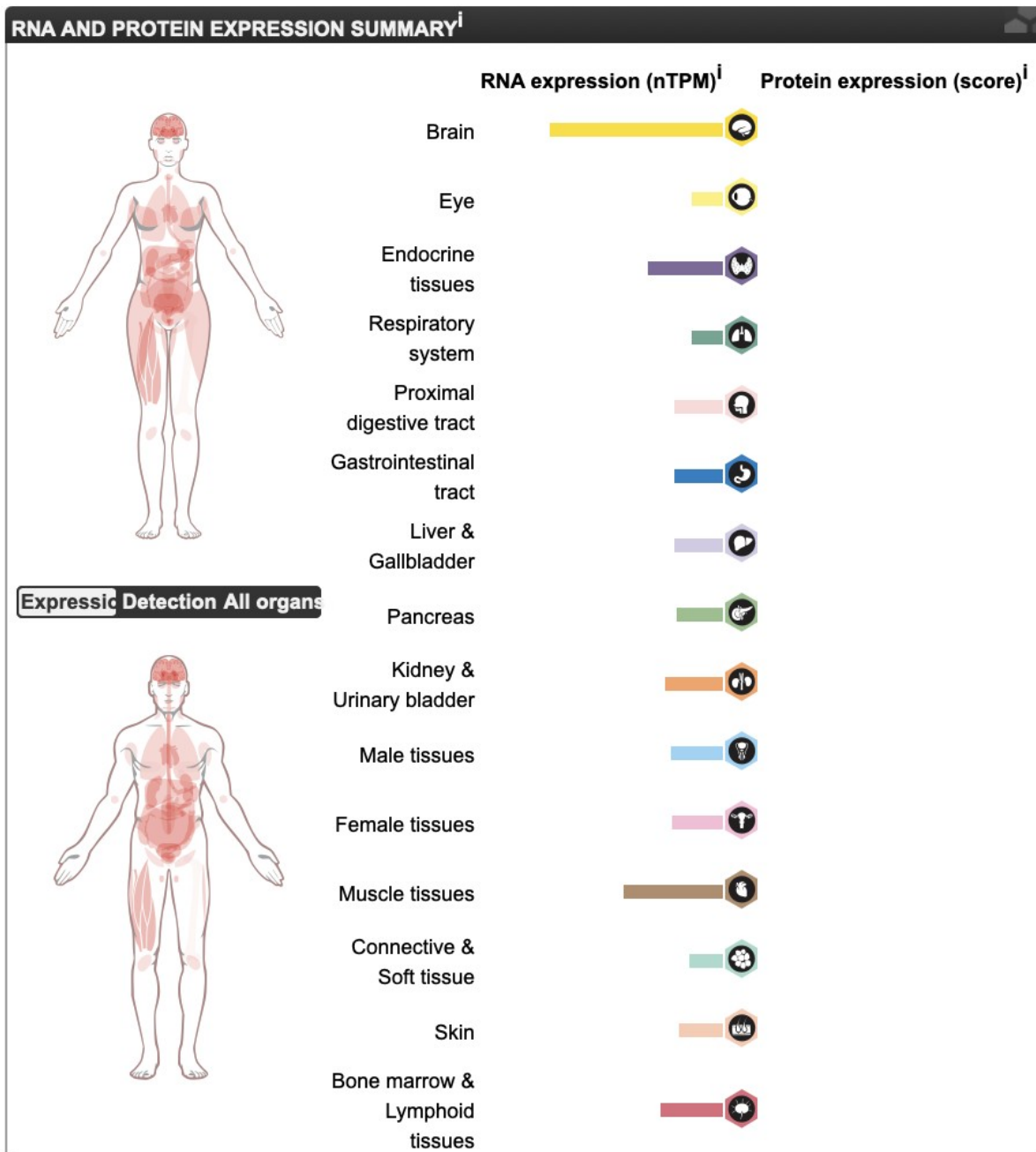


Abbildung 9: MYPOP-RNA-Expression in den verschiedenen menschlichen Organen und Geweben. Dargestellt ist die RNA-Expression von oben nach unten in folgenden Geweben: Gehirn (*brain*), Auge (*eye*), endokrines Gewebe (*endocrine tissue*), Atemwege (*respiratory system*), proximaler Verdauungstrakt (*proximal digestive tract*), Gastrointestinaltrakt (*gastrointestinal tract*), Leber und Gallenblase (*liver and gallbladder*), Pankreas (*pancreas*), Niere und Harnblase (*kidney and urinary bladder*), männliche Sexualorgane (*male tissues*), weibliche Sexualorgane (*female tissues*), Bindegewebe (*connective and soft tissue*), Haut (*skin*), Knochenmark und lymphatisches Gewebe (*bonemarrow and lymphoid tissue*). Eine klare Dominanz der RNA ist im Gehirn zu sehen, gefolgt vom Skelettmuskel und endokrinen Organen. Für die Proteinexpression existieren zurzeit noch keine Daten (ProteinAtlas).

6.1.1 mRNA und Proteinexpression zeigen nur geringe Korrelation

Zum Vergleich mit der Protein- und mRNA-Expression wurde zunächst die Intensität des im Western Blot analysierten Herzens auf 100% gesetzt und die relative Intensität aller weiteren Organe auf diese Angabe bezogen. Als Vergleichsdaten dienten die Sequenzierungen des *consensus dataset* der Datenbank ProteinAtlas, wo ebenfalls die Werte der normalisierten Expression (*Normalized eXpression*, NX) auf die angegebenen Werte für den Herzmuskel als 100 % festgelegt und die weiteren Organe entsprechend angepasst wurden. Anzumerken ist jedoch, dass es sich bei den ProteinAtlas-Daten um humane RNA-Sequenzierungen handelt, die Proteinexpressionsanalyse in dieser Arbeit jedoch an murinen Organen durchgeführt wurde.

Laut ProteinAtlas zeigt die MYPOP-mRNA nur eine geringe Gewebespezifität. Dementsprechend zeigt sich hier eine Abweichung von der in dieser Arbeit untersuchten Proteinexpression. Die prozentualen Werte für die Niere mit 118,75 % (mRNA) und 115,33 % (Protein) liegen in ähnlichen Bereichen. Im Skelettmuskel wurden laut ProteinAtlas die höchsten Level an mRNA beschrieben, auch in der Proteinanalyse der Organe ließen sich hohe Mengen an Protein nachweisen. Jedoch ist die mRNA-Expression im Bezug zu der des Herzens fast 4-fach höher als die Proteinexpression im Skelettmuskel. Im Bezug zum Herzen beträgt diese 455 % auf mRNA-Ebene, jedoch nur 107,22 % auf Proteinebene. Die Proteinexpression der Bauchspeicheldrüse (10,78 %) weicht ebenfalls stark von der mRNA-Expression (106,25 %) ab, auch ergeben sich deutliche Diskrepanzen in Fettgewebe mit 95 % mRNA- und 6,9 % Proteinexpression. Alle weiteren Organe, deren anteilige Expressionen von MYPOP im Bezug zu der des Herzens in Tabelle 8 und Abbildung 10 dargestellt sind, weichen auf beiden Ebenen moderat bis stark voneinander ab (ProteinAtlas). Hier wurde willkürlich die mRNA Expression des Herzens als Bezugspunkt gewählt, aber auch andere Bezugspunkte liefern keine deutliche Korrelation zwischen mRNA und Proteingehalt.

Tabelle 8: Vergleich prozentuale und mRNA- und Protein-Expression von MYPOP in unterschiedlichen Organen

	mRNA- Expression [%]	Protein- Expression [%]
Fett	95	6,9
Bauchspeicheldrüse	106,25	10,78
Milz	153,75	22,33
Thymus	66,25	23,29
Gebärmutter/ Eileiter	90	25,66
Knochenmark	52,5	26,98
Makrophagen	17,5	27,30
Darm	126,25	51,01
Lunge	73,75	52,58
Speicheldrüsen	118,75	94,68
Blut	33,75	97,22
Herz	100	100
Skelettmuskel	455	107,22
Leber	76,25	109,69
Niere	118,75	115,33

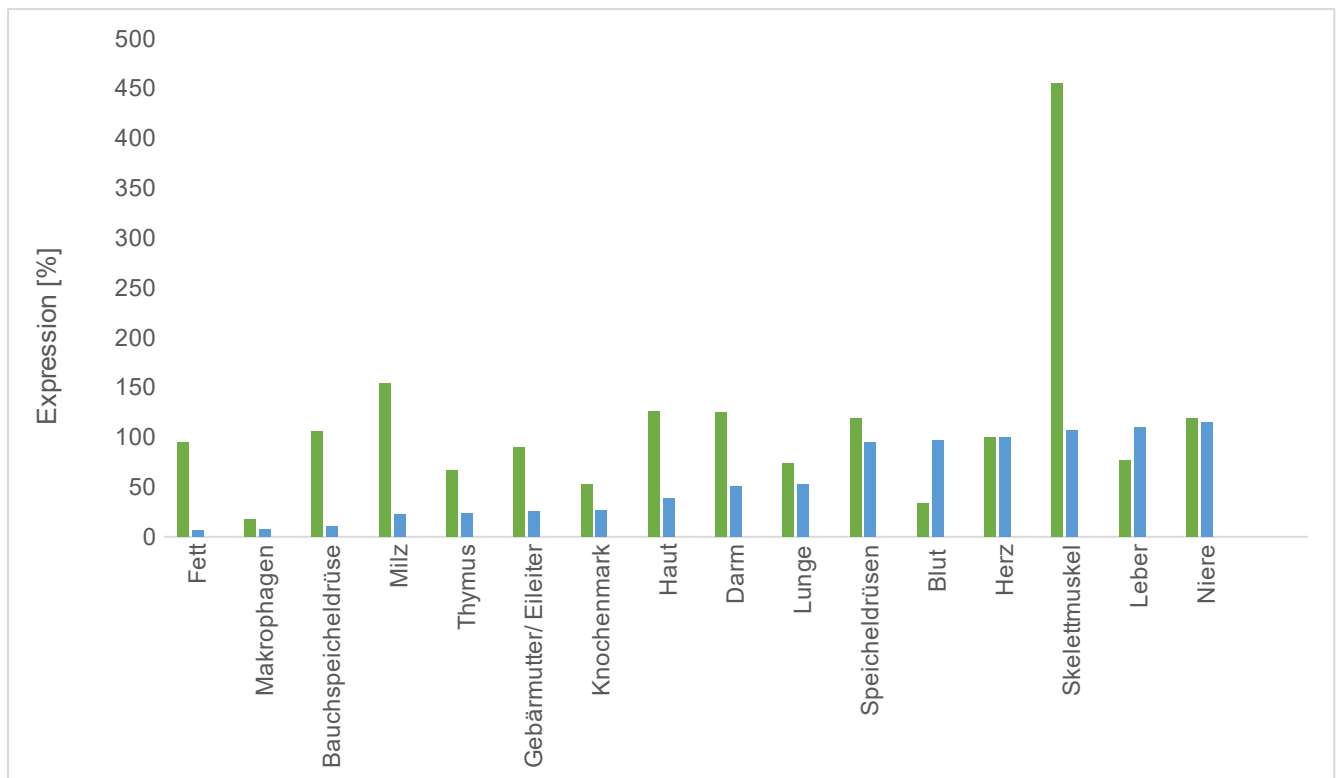


Abbildung 10: Vergleich der prozentualen mRNA- (grün) und Protein-Expression (blau) von MYPOP in unterschiedlichen Organen. Hierfür wurden die Zahlenwerte beider Expressionen für das Herz auf 100 % gesetzt und die relative Expression der anderen Organe vergleichend zu der des Herzens dargestellt. Die mRNA-Analysedaten stammen von ProteinAtlas, die Proteindaten aus eigener Forschung (siehe Abbildung 2, Tabelle 7).

Der Western Blot (Abbildung 1) zeigt, dass alle getesteten gesunden Gewebe MYPOP exprimieren, wenngleich auch in unterschiedlichem Ausmaß. Die Quantifizierung der Expression an MYPOP der verschiedenen Organe zeigt eine Dominanz der Organe Leber, Skelettmuskel, Niere und Herzmuskel. Dies ist nur teilweise konsistent mit den mRNA-Leveln, die in ProteinAtlas angegeben sind (ProteinAtlas).

Zunächst sollte hier beachtet werden, dass es sich um zwei verschiedene Ebenen der Proteinexpression handelt. In den untersuchten Geweben wurde das fertig translatierte, gefaltete und modifizierte Protein betrachtet, welches von den spezifischen Antikörpern erkannt wurde. Die transkribierte mRNA hingegen muss nicht zwangsläufig in Aminosäuren übersetzt werden, sondern die Translation kann durch diverse Prozesse wie RNA-Lokalisation, RNA-Interferenz und weitere Regulationsmechanismen unterbunden werden, sodass der Gehalt an mRNA nicht mit dem des Proteins korrelieren muss. Diese Regulation der Translation ist von Organ zu Organ unterschiedlich, da jedes Organ unterschiedliche Proteine in verschiedener Quantität benötigt, was einen möglichen Ansatz zur Erklärung der Abweichungen zwischen den Daten darstellt (Sioud 2021; Mitschka und Mayr 2022).

Eine Interaktion mit anderen Proteinen und infolgedessen eine Herauf- oder Herabregulation, Degradierung oder weitere Beeinflussung des Transkriptionsfaktors erscheinen ebenfalls denkbar. So agiert MYPOP zum Beispiel mit Profilin, welches wiederum die Aktivität des Aktins in der Zelle beeinflusst (Lederer et al. 2005). Auch ist noch ungeklärt, inwiefern das MYPOP-Genprodukt in verschiedenen Formen und Modifikationen vorkommt (Zhong et al. 2023), welche nicht von den Antikörpern erkannt werden. Es bleibt außerdem fraglich, ob MYPOP seine Funktion nur als Protein ausüben kann oder ob die mRNA beziehungsweise deren andere Transkripte regulatorische Fähigkeiten besitzt (Karapetyan et al. 2013; Morris und Mattick 2014).

Auch weichen die Menge an Gesamtprotein sowie die Expression spezifischer Eiweiße zwischen verschiedenen Geweben allgemein ab. So ist im Skelettmuskel ein hoher Gehalt an Aktin zu erwarten, im Fettgewebe hingegen findet sich andere Proteine des Bindegewebes, die sich in einem deutlich geringeren Proteingehalt insgesamt widerspiegeln (ProteinAtlas). Folglich besteht die Möglichkeit, dass MYPOP in Geweben mit allgemein hohen Proteinleveln eine höhere Konzentration aufweist. Die Quantifizierung der Western Blots legen dennoch eine organspezifische Regulation nahe, da hier der MYPOP-Gehalt auf die Zellzahl und nicht die Aktin- oder Tubulinmenge, stellvertretend für den Gesamtproteingehalt, normiert wurde. Im Datensatz der ProteinAtlas RNA-Analyse wurde hingegen auf diese sogenannten *housekeeping genes* normiert (ProteinAtlas).

Da sich die mRNA-Daten auf eine Expressionsanalyse humanen MYPOPs beziehen und die Quantifizierung im Western Blot mit murinen Organen durchgeführt wurde, können diverse Abweichungen zwischen Mensch und Maus nicht ausgeschlossen werden. Auch abweichende Aviditäten der Antikörper, die laut Hersteller zwar für murine Gewebe geeignet, aber an menschlichen Geweben validiert sind, und andere Interaktionen in den Versuchen können aufgrund des murinen Ursprungs der Proben nicht aufgeschlossen werden. Somit können die erhobenen Daten keineswegs eins zu eins auf den Menschen übertragen werden. Trotzdem zeigt die Analyse zum MYPOP-Proteingehalt eine deutlich stärkere Organspezifität als die mRNA-Analyse und deutet auf eine starke post-transkriptionelle Regulation von MYPOP hin. In jedem Fall liefern die hier dargestellten Daten die ersten vergleichenden Proteinexpressionsdaten in einem Säugerorganismus.

6.2 Das Fehlen von MYPOP ist ein Hinweis auf Krebs

Ob der Gehalt an MYPOP-mRNA oder translatierten Proteins mit dem Risiko einer malignen Entartung korreliert, ist zudem noch ungeklärt. Zwar gilt MYPOP mRNA als ungünstiger prognostischer Marker in Eierstock- und Leberkrebs (ProteinAtlas), genaue Mechanismen dahinter sind jedoch nicht bekannt. Mutmaßlich könnte dies einen kompensatorischen oder autoregulatorischen Mechanismus darstellen, bei dem mehr mRNA hergestellt wird, wenn weniger Protein vorhanden ist, so wie dies für den Tumorsuppressor p53 gezeigt wurde (Derech-Haim et al. 2020). Ergebnisse im Kolonienformations-Assay sowie das Fehlen von MYPOP in Tumorzellen im Vergleich zu gesundem Gewebe deuten auf eine wichtige Rolle in der Onkogenese an. Um die erhöhte Expression in den Organen und die potenzielle Rolle bei der Karzinogenese weiter interpretieren zu können, wäre ein direkter Vergleich zwischen gesundem Gewebe und dazugehörigem Tumorgewebe desselben Organs von Nöten. Dies wurde bereits für normales und entartetes Gewebe der Lunge gezeigt (Florin 2020).

Der vergleichende Western Blot von gesunden Hautzellen aus dem Mausohr im Vergleich zu murinen Melanomzellen der Zelllinie B16-F10 zeigt, dass MYPOP in den Tumorzellen fehlt, zumindest in der für die verwendeten Antikörper detektierbaren Form. Dies spricht für MYPOP als tumorsuppressiven Transkriptionsfaktor.

Dennoch kann nicht ausgeschlossen sein, dass MYPOP zwar vorhanden, aber schlicht nicht zu detektieren ist. Eine mögliche Begründung dafür wäre eine Modifikation im Sinne einer Phosphorylierung oder Sumoylierung im Bereich der Antikörperbindestelle, die das Protein im Western Blot für die Antikörper nicht mehr erkenntlich macht. Des Weiteren kann eine postranslationale Modifikation die Stabilität des Proteins beeinflussen, folglich könnte sich die tatsächlich translatierte Menge an MYPOP von der im Western Blot detektierten Menge unterscheiden (Zhong et al. 2023).

Insgesamt konnte mit den hier dargestellten Western Blot Analysen die Hypothese bekräftigt werden, dass MYPOP in Tumorzellen, in diesem Fall in Melanomzellen, stark vermindert vorliegt oder sogar fehlt. Weitere Untersuchungen sind jedoch zusätzlich von Nöten, beispielsweise würde sich eine Massenspektrometrie als nächster Schritt anbieten.

6.3 MYPOP, ein *Target* in der Tumorthherapie

Durch Transfektion mit Lipofectamine™ kann MYPOP-DNA sowohl mit dem GFP- als auch mit dem Flag-Tag wieder in die Tumorzellen eingebracht werden, was sich im Western Blot und in der Immunfluoreszenz bestätigte. Das Flag-Konstrukt läuft etwa auf Höhe des endogenen MYPOPs und wird durch die verwendeten Antikörper sehr zuverlässig detektiert, was für die Aussagekräftigkeit der in dieser Arbeit getätigten Analysen spricht.

Der signifikante Unterschied zwischen MYPOP- und Leervektor-transfizierten Zellen in der Kolonienbildung bekräftigt die Theorie, dass das Wiedereinbringen von MYPOP das Zellwachstum der Tumorzellen stoppt und sie schließlich in den Zelltod treibt. Die genauen Mechanismen des Sterbens der Zellen bleiben unbekannt, da das mikroskopische Bild abgestorbener Zellen weitere Vorgänge neben Apoptose wie Nekrose und weitere Formen des Zelltods nicht ausschließen können. Das beobachtete Schrumpfen der Zellen lässt allerdings auf Apoptose schließen (Böhm und Schild 2003). Um den Weg des Zelltods genau zu bestimmen sind weitere Versuche nötig, in denen spezifische Zelltodmarker untersucht werden. Dies kann beispielsweise mit der Methode der Durchflusszytometrie realisiert werden.

Bei den Versuchen ist die Abpassung des richtigen Zeitpunkts zur Fixierung und Färbung der Zellen sehr wichtig, jedoch ist dieser aufgrund von organisatorischen Gegebenheiten nicht immer perfekt anzutreffen. Folglich könnten größere Unterschiede zwischen den Gruppen (MYPOP versus Kontrolle) erzielt werden, wenn die Zellkulturplatten noch genauer überwacht werden. Zudem muss vermieden werden, dass die Leervektor-transfizierten Zellen die Vertiefung überwachsen und sich somit von der Platte ablösen, was durch eine niedrige Kolonienbildungsrate die Statistik negativ beeinflusst. Auch die MYPOP-transfizierten Zellen sollten zum Zeitpunkt der Fixierung noch nicht vollkommen abgestorben sein, um einen aussagekräftigen Vergleich zwischen MYPOP-, Leervektor- und nicht transfizierten Zellen herstellen zu können und valide Ergebnisse errechnen zu können.

Bei der Auswertung mittels ImageJ bleibt anzumerken, dass es sich um ein Bildbearbeitungsprogramm handelt und dessen Fehlerfreiheit bei automatisierten Messungen nicht garantiert werden kann. Eine Möglichkeit zur Gegenkontrolle bietet die Auszählung der Zellen unter dem Mikroskop, in einem *Counter* oder *Xcelligence*, wobei auch diese Methoden fehlerbehaftet sein können.

Inwiefern es möglich ist, dass einige Zellen lediglich die Resistenz behalten und die MYPOP-Sequenz nicht exprimieren, ist zudem ungewiss. Dies würde den Unterschied zwischen MYPOP- und Leervektorgruppe verkleinern, da der antionkogene Effekt des Transkriptionsfaktors nicht mehr zur Geltung kommen kann. Um dieses mögliche Phänomen zu untersuchen, kann wiederum eine antikörperbasierte Methode wie der Western Blot mit spezifisch an MYPOP oder das Resistenzprotein bindenden Antikörpern weitere Informationen liefern.

Des Weiteren müssen noch weitere Ziellinien untersucht werden, um Aussagen über andere Krebsarten neben dem schwarzen Hautkrebs treffen zu können. Es zudem muss geklärt werden, inwiefern der MYPOP-vermittelte Tumorzelltod auf *in vivo* Versuche übertragbar und reproduzierbar ist. Bei positiven Ergebnissen stellt sich die Frage, wie man MYPOP-DNA als Therapeutikum gezielt in Tumorzellen einbringen kann. Hierzu käme zum Beispiel ein viraler Vektor in Frage (Tong et al. 2005).

Insgesamt kann festgehalten werden, dass die Hypothese, dass MYPOP zu einer Reduktion der Zellzahl von Melanomzellen führt, durch die Durchführung der Experimente bestätigt werden.

6.4 Keine Induktion von IL-24, IL-11, CCL2, TNF- α und IL-1 α und GM-CSF nach MYPOP-Reexpression

6.4.1 IL-24-ELISA

Da die Mehrzahl der getesteten Proben kein Signal für IL-24 aufweisen, kann am ehesten angenommen werden, dass die Tumorzellen das Zytokin nicht produzieren. Entgegen einer leichten Tendenz zu etwas höheren Konzentrationen an IL-24 nach längerem Abwarten nach Transfektion lieferten die Duplikate zum Großteil keine verlässlich reproduzierbaren Ergebnisse. Beim IL-24 ELISA wurden alle Proben als Duplikate aufgetragen, dann ein Mittelwert aus beiden Messungen errechnet. Wie man der Tabelle 9 (siehe Anhang, Seite 53-54) entnehmen kann, war nur bei einem einzigen Ansatz das Ergebnis überhaupt reproduzierbar. Somit scheint diese Vermutung nicht valide und muss durch weitere Untersuchungen begutachtet werden.

In der Literatur wird IL-24 aufgrund eines Mangels an Disulfid-Brücken als instabil beschrieben (Lubkowski et al. 2018) . Folglich könnte das Zytokin zum Zeitpunkt des Assays bereits zerfallen sein oder den Gefrier- und Auftauprozess nicht unbeschadet überstanden haben. Dies steht jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen, die bei den mitgeführten Positivkontrollen muriner Milzzellen herauskamen, demnach ist ein Fehler in der Durchführung des Assays unwahrscheinlich. Bei den Positivkontrollen ließ sich IL-24 vorwiegend in Lysaten nachweisen, obwohl der ELISA nach Herstellerangaben und zusätzlicher Rücksprache nur für Zellkulturüberstand validiert wurde. Zudem zeigten auch nicht-stimulierte Zellen eine Ausschüttung des Botenstoffes. Da sowohl Überstände als auch Lysate der B16-F10 Zellen untersucht wurden, ist es unwahrscheinlich, dass das Interleukin schlicht nicht sezerniert wurde, was auch den Messungen an HeLa Zellen und der Literatur widerspräche (Johannes Strunk, AG Florin, Publikation in Revision).

Auch ist unklar, ob der Prozess der Transfektion im Allgemeinen die Produktion und Ausschüttung von Zytokinen, speziell bei der Zelllinie B16-F10 beeinflusst. Möglicherweise ist die Effizienz der Transfektion nicht groß genug, um einen signifikanten Effekt in der Zytokinproduktion detektieren zu können. Um dies zu umgehen, müssten effizientere Methoden zum Einbringen des MYPOP-Gens zum Beispiel durch mRNA-Transfektion oder den Einsatz von viralen Vektoren verwendet werden oder andere Maßnahmen wie eine Optimierung des Transfektionsprotokolls getätigt werden, um den Prozentsatz an MYPOP exprimierenden Zellen zu verbessern (Chong et al. 2021) .

Die den Untersuchungen zugrundeliegenden Daten stammen zudem aus der RNA-Sequenzierung von HeLa-Zellen, die nicht nur humanen Ursprungs sind, sondern auch aus dem Gebärmutterhals stammen und sich somit stark von Hautzellen unterscheiden. Solch eine Diskrepanz legen auch die gewonnenen Erkenntnisse aus der Expressionsanalyse verschiedener Organe nahe.

Zusammenfassend bleibt es fraglich, ob die murinen Melanomzellen das Zytokin IL-24 produzieren und sezernieren und inwiefern dies von der Transfektion von MYPOP beeinflusst wird. So kann der antionkogene Effekt des Zytokins nicht als möglicher Mechanismus der tumorabtötenden Wirkung von MYPOP bestätigt werden und muss weiter untersucht werden. Mittlerweile wurde in Transkriptomanalysen unterschiedlicher Tumorzellen der AG Florin gezeigt, dass MYPOP vor allem Gene herunterreguliert, die den Zellzyklus aktivieren. Damit scheint der Wirkmechanismus von MYPOP in der Blockade des Zellzyklus zu liegen (Johannes Strunk, AG Florin, Publikation in Revision).

6.4.2 LEGENDplex™

Beim LEGENDplex™ konnte keines der gesuchten Zytokine oder Chemokine in einer signifikanten Erhöhung detektiert werden, der Nachweis blieb eher eine Ausnahme und ließ kein spezifisches Muster erkennen. So konnten sowohl in MYPOP- als auch in mit dem entsprechenden Leervektor-transfizierten Zellen mit dem Flag- sowie dem GFP-Konstrukt in einzelnen Proben IL-11, CCL2 und GM-CSF nachgewiesen werden, TNF- α und IL-1 α blieben in allen Tests unter der Nachweisgrenze. Auch konnte keine Veränderung durch Herstellung von Lysaten, Selektionierung mittels einer Antibiotikumgabe zum Zellkulturmedium und verschiedenen Zeitpunkten des Einsammelns des Überstands erzielt werden. Somit stellt sich die Frage, ob die B16-F10 Zellen die gesuchten Botenstoffe überhaupt produzieren und sezernieren und ob die Transfektion des MYPOP-Plasmids einen Einfluss darauf ausübt.

Zum einen könnte die Effizienz der Transfektion zu gering sein. Demnach müssten Maßnahmen getroffen werden, um diese zu verbessern oder gegebenenfalls eine andere Methode verwendet werden. Zum anderen stammen die Daten, auf denen sich der Versuchsaufbau bezieht, aus Analysen aus HeLa-Zellen. Möglicherweise kann MYPOP bei diesen Zellen die Gene für die gesuchten Zytokine anschalten, aber nicht in B16-F10. Folglich wäre eine RNA-Seq der murinen Melanomzellen der nächste nötige Schritt, um diese Theorie zu bestätigen und um andere Botenstoffe ausfindig zu machen, die durch MYPOP heraufreguliert werden.

Dass das Einbringen von MYPOP-DNA zum Absterben der Tumorzellen führt, hat sich im Kolonieformations-Assay bestätigt, jedoch bleiben die kausalen Zusammenhänge und Mechanismen noch unklar. Inwiefern die untersuchten Mediatoren für die Krebs-hemmende Aktivität des Transkriptionsfaktors in B16-F10-Zellen verantwortlich sind, ist fraglich. Für alle untersuchten Botenstoffe sind sowohl tumorfördernde als auch -hemmende Eigenschaften beschrieben, die meist auf einem komplexen Zusammenspiel zwischen Immunsystem, Tumorzellen, tumoralem Mikromilieu und diversen weiteren Mediatoren beruhen (Su et al. 2005; Carswell et al. 1975; Balkwill 2009; Bollrath et al. 2009; Gutschalk et al. 2012; Lim et al. 2016; Takahashi et al. 2009). Eine Aussage über den Effekt, der bei einem Nachweis eines Zytokins dominierend wäre, wäre kaum möglich zu treffen. Möglich wäre auch ein Ausbleiben oder Fehlen von Co-Stimulatoren, die zur Produktion der Zytokine benötigt werden. In einer Umgebung mit weiteren Immun- und Stromazellen und einem Tumormikromilieu, welches vergleichbar mit *in vivo* Bedingungen ist, ist wahrscheinlich ein anderes Zytokinmuster im Gegensatz zur Reinkultur zu erwarten (Anderson und Simon 2020).

Da die dem Versuch zugrundeliegenden Daten zu einer signifikanten Erhöhung der getesteten Zytokine aus RNA-Sequenzierungen humaner, MYPOP-transfizierter HeLa-Zellen stammen (Johannes Strunk, AG Florin, Publikation in Revision), kann diskutiert werden, ob es Unterschiede zwischen verschiedenen Geweben und Krebsformen sowie zwischen den verschiedenen Spezies Mensch und Maus gibt.

Zudem können die RNA-Daten nicht mit dem Nachweis von Proteinen gleichgesetzt werden, da auch die Translation einer Regulation unterliegt (Zhong et al. 2023). Somit würde eine RNA-Sequenzierung der B16-F10-Tumorzelllinie nach Transfektion des MYPOP-Plasmids im Vergleich mit einem Leervektor einen weiteren Ansatz bilden, um hinter die genauen Mechanismen der Anti-Tumor-Aktivität zu blicken. Hieraus gewonnene Daten könnten dann in nächsten Schritten mittels einer quantitativen Polymerase-Kettenreaktion bestätigt und auf Proteinebene mit weiteren LEGENDplex™-Versuchen oder ELISAs untersucht werden.

Zusätzlich könnte, wie aktuelle Untersuchungen zeigen, der Prozess der Herabregulation von Onkogenen durch den Transkriptionsfaktor eine wichtigere Rolle spielen als die Heraufregulation von Tumorsuppressoren (Johannes Strunk, AG Florin, Publikation in Revision). Hier gilt es, diverse Onkogene und weitere Tumorsuppressorgene zu erforschen und einen Vergleich zwischen Krebszellen und MYPOP-transfizierten Zellen herzustellen.

Trotzdem bestätigen die mitgeführten Kontrollen in Form von stimulierten murinen Milzzellen, dass der Assay funktioniert hat und im Versuchsablauf keine Fehler unterlaufen sind. Die zusätzliche Stimulierung der Milzzellen mit anti-CD3 und löslichem CD28 hat zu der erwarteten Erhöhung des Zytokins GM-CSF geführt.

Folglich bedarf es weiteren Untersuchungen, um auszuschließen oder zu bestätigen, dass das Wiedereinbringen von MYPOP zu einer erhöhten Produktion der gesuchten Botenstoffe führt. Zudem gilt zu klären, ob die Signalwege der Zytokine überhaupt bei der tumorsuppressiven Wirkung des Transkriptionsfaktors eine Rolle spielen, welche anderen Kaskaden angestoßen werden und inwiefern die mRNA von MYPOP selbst an den antionkogenen Mechanismen beteiligt ist.

7 Zusammenfassung

Die Rolle des Transkriptionsfaktors MYPOP in der Entstehung von Krebs, der Einfluss der Expression auf die Prognose sowie der Einsatz als Therapeutikum bleiben weiterhin ein Rätsel mit enormem Potenzial in der Tumorforschung.

Um eine organspezifische MYPOP-Expression quantitativ zu untersuchen, wurden die Organe von gesunden Mäusen entnommen, isoliert und aufgereinigt und folglich im Western Blot mit MYPOP-spezifischen Antikörpern detektiert. Hier stellte sich heraus, dass der Transkriptionsfaktor eine Dominanz in den Geweben der Leber und der Niere sowie in quer gestreifter Muskulatur des Skelettmuskels und des Herzens aufweist. Verglichen mit der in der Literatur angegebenen RNA-Expression im menschlichen Körper scheint lediglich im Skelettmuskel vermehrt MYPOP translatiert zu werden. Inwiefern eine höhere Expression von MYPOP von Bedeutung für den Zellzyklus, die Proliferation und eine potenziell maligne Transformation hat, bleibt unklar.

In dieser Arbeit bestätigte sich das Fehlen von MYPOP in murinen Tumorzellen im Western Blot verglichen mit Zellen aus gesunden Mausorganen. Dies wurde am Beispiel von Melanomzellen (B16-F10) im Vergleich zu gesunden Hautzellen gezeigt. Der Transkriptionsfaktor kann durch eine Transfektion mit einem MYPOP-Plasmid erneut exprimiert werden und bewirkt eine signifikante Reduktion der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle. Diese tumorsuppressive Wirkung auf murine B16-F10 Zellen konnte in Kolonieformations-Assays veranschaulicht werden, ursächliche Mechanismen und Signalkaskaden sind aber weiterhin unbekannt.

In quantitativen RNA-Sequenzierungen von humanen HeLa-Zellen wurde zwar herausgefunden, dass nach dem Einbringen von MYPOP-DNA diverse potenziell immunmodulatorische Zytokine in der Zelle heraufreguliert werden, eine vermehrte Expression dieser MYPOP-regulierten Gene auf Proteinebene ließ sich jedoch nicht bestätigen. Weder der Vergleich des Zytokinmusters der Tumorzellen mit und ohne MYPOP-Transfektion im Immunoassay LEGENDplex™ noch im Sandwich-ELISA war eine signifikante Erhöhung von IL-1 α , TNF- α , IL-11, IL-24, GM-CSF oder CCL2 in der Gruppe der transfizierten Zellen detektierbar.

Zusammenfassend ist es möglich, Tumorzellen in Zellkultur durch das Einbringen von MYPOP am Wachstum zu hemmen und abzutöten, was den Einsatz als antitumorale Substanz nahelegt. Perspektivisch soll zukünftig MYPOP-DNA mittels Transduktion *in vivo* in ein Mausmodell eingebracht werden, um in folgenden Schritten eine Gentherapie für den menschlichen Organismus entwickeln zu können.

Durch eine Optimierung spezifischer Antikörper könnte der Transkriptionsfaktor zudem als Marker für gesundes, nicht entartetes Gewebe in der histologischen Beurteilung und weiteren diagnostischen Verfahren zur Anwendung kommen. Auch der Einsatz als prognostischer Marker neben den bereits bestehenden beiden Entitäten Eierstock- und Leberkrebs nach der Erhebung von Sequenzierungsdaten diverser Neoplasien gilt als vielversprechend.

8 Literaturverzeichnis

Ai, Wenchao; Li, Haishan; Song, Naining; Li, Lei; Chen, Huiming (2013): Optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment. In: *International journal of environmental research and public health* 10 (9), S. 3834–3842. DOI: 10.3390/ijerph10093834.

Aliper, Alexander M.; Frieden-Korovkina, Victoria P.; Buzdin, Anton; Roumiantsev, Sergey A.; Zhavoronkov, Alex (2014): A role for G-CSF and GM-CSF in nonmyeloid cancers. In: *Cancer Medicine* 3 (4), S. 737–746. DOI: 10.1002/cam4.239.

Anderson, Nicole M.; Simon, M. Celeste (2020): The tumor microenvironment. In: *Current biology : CB* 30 (16), R921-R925. DOI: 10.1016/j.cub.2020.06.081.

Andoh, Akira; Shioya, Makoto; Nishida, Atsushi; Bamba, Shigeki; Tsujikawa, Tomoyuki; Kim-Mitsuyama, Shokei; Fujiyama, Yoshihide (2009): Expression of IL-24, an activator of the JAK1/STAT3/SOCS3 cascade, is enhanced in inflammatory bowel disease. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183 (1), S. 687–695. DOI: 10.4049/jimmunol.0804169.

Balkwill, Fran (2004): Cancer and the chemokine network. In: *Nature reviews. Cancer* 4 (7), S. 540–550. DOI: 10.1038/nrc1388.

Balkwill, Frances (2006): TNF-alpha in promotion and progression of cancer. In: *Cancer metastasis reviews* 25 (3), S. 409–416. DOI: 10.1007/s10555-006-9005-3.

Balkwill, Frances (2009): Tumour necrosis factor and cancer. In: *Nature reviews. Cancer* 9 (5), S. 361–371. DOI: 10.1038/nrc2628.

Becher, Burkhard; Tugues, Sonia; Greter, Melanie (2016): GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. In: *Immunity* 45 (5), S. 963–973. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.10.026.

Biologend: LEGENDplex™.

Böhm, Ingrid; Schild, Hans (2003): Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. In: *Molecular imaging and biology* 5 (1), S. 2–14. DOI: 10.1016/s1536-1632(03)00024-6.

Bollrath, Julia; Phesse, Toby J.; Burstin, Vivian A. von; Putoczki, Tracy; Bennecke, Moritz; Bateman, Trudie et al. (2009): gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. In: *Cancer cell* 15 (2), S. 91–102. DOI: 10.1016/j.ccr.2009.01.002.

Brown, E. R.; Charles, K. A.; Hoare, S. A.; Rye, R. L.; Jodrell, D. I.; Aird, R. E. et al. (2008): A clinical study assessing the tolerability and biological effects of infliximab, a TNF-alpha

inhibitor, in patients with advanced cancer. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 19 (7), S. 1340–1346. DOI: 10.1093/annonc/mdn054.

Burgess, A. W.; Metcalf, D. (1980): The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. In: *Blood* 56 (6), S. 947–958.

Carswell, E. A.; Old, L. J.; Kassel, R. L.; Green, S.; Fiore, N.; Williamson, B. (1975): An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (9), S. 3666–3670.

Chong, Zhi Xiong; Yeap, Swee Keong; Ho, Wan Yong (2021): Transfection types, methods and strategies: a technical review. In: *PeerJ* 9, e11165. DOI: 10.7717/peerj.11165.

Derech-Haim, Sanaz; Friedman, Yael; Hizi, Amnon; Bakhanashvili, Mary (2020): p53 regulates its own expression by an intrinsic exoribonuclease activity through AU-rich elements. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 98 (3), S. 437–449. DOI: 10.1007/s00109-020-01884-0.

Dinareello, C. A. (1996): Biologic basis for interleukin-1 in disease. In: *Blood* 87 (6), S. 2095–2147.

Dinareello, Charles Anthony (2014): Interleukin-1 α neutralisation in patients with cancer. In: *The Lancet. Oncology* 15 (6), S. 552–553. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70164-0.

Dranoff, Glenn (2003): GM-CSF-secreting melanoma vaccines. In: *Oncogene* 22 (20), S. 3188–3192. DOI: 10.1038/sj.onc.1206459.

Du, William W.; Qadir, Javeria; Du, Kevin Y.; Chen, Yu; Wu, Nan; Yang, Burton B. (2023): Nuclear Actin Polymerization Regulates Cell Epithelial-Mesenchymal Transition. In: *Advanced science (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany)* 10 (28), e2300425. DOI: 10.1002/advs.202300425.

Dvorkin, Tatyana; Song, Xiaoping; Argov, Shmuel; White, Rosalyn M.; Zoller, Margot; Segal, Shraga et al. (2006): Immune phenomena involved in the in vivo regression of fibrosarcoma cells expressing cell-associated IL-1 α . In: *Journal of leukocyte biology* 80 (1), S. 96–106. DOI: 10.1189/jlb.0905509.

FACSlab Mainz: Prinzip der Durchflußzytometrie. Hg. v. FACS and Array Core Facility Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Faria, S. C.; Sagebiel, T.; Patnana, M.; Cox, V.; Viswanathan, C.; Lall, C. et al. (2019): Tumor markers: myths and facts unfolded. In: *Abdominal radiology (New York)* 44 (4), S. 1575–1600. DOI: 10.1007/s00261-018-1845-0.

Fiebigler, W.; Wiltshcke, C. (2001): Tumormarker. In: *Acta medica Austriaca* 28 (2), S. 33–37. DOI: 10.1046/j.1563-2571.2001.01008.x.

Florin, Luise (2020): Myb-related Transcription Factor (mypop) As Diagnostic Marker And Therapeutic Target For Tumor Therapy. Hg. v. Luise Florin, Marc Schneider und Elena Wustenhagen.

Fonseca-Camarillo, G.; Furuzawa-Carballeda, J.; Granados, J.; Yamamoto-Furusho, J. K. (2014): Expression of interleukin (IL)-19 and IL-24 in inflammatory bowel disease patients: a cross-sectional study. In: *Clinical and experimental immunology* 177 (1), S. 64–75. DOI: 10.1111/cei.12285.

Foster, Barbara; Prussin, Calman; Liu, Fei; Whitmire, Jason K.; Whitton, J. Lindsay (2007): Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. In: *Current protocols in immunology* Chapter 6, Unit 6.24. DOI: 10.1002/0471142735.im0624s78.

Franken, Nicolaas A. P.; Rodermond, Hans M.; Stap, Jan; Haveman, Jaap; van Bree, Chris (2006): Clonogenic assay of cells in vitro. In: *Nature protocols* 1 (5), S. 2315–2319. DOI: 10.1038/nprot.2006.339.

GeneCards (Hg.): MYPOP Gene. Online verfügbar unter <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MYPOP>.

Griffin, J. D.; Cannistra, S. A.; Sullivan, R.; Demetri, G. D.; Ernst, T. J.; Kanakura, Y. (1990): The biology of GM-CSF: regulation of production and interaction with its receptor. In: *International journal of cell cloning* 8 Suppl 1, 35-44; discussion 44-5. DOI: 10.1002/stem.5530080705.

Gutschalk, Claudia M.; Yanamandra, Archana K.; Linde, Nina; Meides, Alice; Depner, Sofia; Mueller, Margareta M. (2012): GM-CSF enhances tumor invasion by elevated MMP-2, -9, and -26 expression. In: *Cancer Medicine* 2 (2), S. 117–129. DOI: 10.1002/cam4.20.

Hagemann, Thorsten; Wilson, Julia; Burke, Frances; Kulbe, Hagen; Li, Ninfeng Fiona; Plüddemann, Annette et al. (2006): Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 176 (8), S. 5023–5032. DOI: 10.4049/jimmunol.176.8.5023.

Hanahan, Douglas; Weinberg, Robert A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. In: *Cell* 144 (5), S. 646–674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hickish, Tamas; Andre, Thierry; Wyrwicz, Lucjan; Saunders, Mark; Sarosiek, Tomasz; Kocsis, Judit et al. (2017): MABp1 as a novel antibody treatment for advanced colorectal cancer: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. In: *The Lancet. Oncology* 18 (2), S. 192–201. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30006-2.

-
- Hofmann, S. R.; Rösen-Wolff, A.; Tsokos, G. C.; Hedrich, C. M. (2012): Biological properties and regulation of IL-10 related cytokines and their contribution to autoimmune disease and tissue injury. In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 143 (2), S. 116–127. DOI: 10.1016/j.clim.2012.02.005.
- Huang, Gangxiong; Yu, Ling; Cooper, Laurence J. N.; Hollomon, Mario; Huls, Helen; Kleinerman, Eugenie S. (2011): Genetically Modified T Cells Targeting Interleukin-11 Receptor α -Chain Kill Human Osteosarcoma Cells and Induce the Regression of Established Osteosarcoma Lung Metastases. In: *Cancer research* 72 (1). DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2778.
- Huilgol, Dhananjay; Venkataramani, Prabhadevi; Nandi, Saikat; Bhattacharjee, Sonali (2019): Transcription Factors That Govern Development and Disease: An Achilles Heel in Cancer. In: *Genes* 10 (10). DOI: 10.3390/genes10100794.
- Jin, Sun Hee; Choi, Dalwoong; Chun, Young-Jin; Noh, Minsoo (2014): Keratinocyte-derived IL-24 plays a role in the positive feedback regulation of epidermal inflammation in response to environmental and endogenous toxic stressors. In: *Toxicology and applied pharmacology* 280 (2), S. 199–206. DOI: 10.1016/j.taap.2014.08.019.
- Karapetyan, Armen R.; Buiting, Coen; Kuiper, Renske A.; Coolen, Marcel W. (2013): Regulatory Roles for Long ncRNA and mRNA. In: *Cancers* 5 (2), S. 462–490. DOI: 10.3390/cancers5020462.
- Kimura, H.; Inukai, Y.; Takii, T.; Furutani, Y.; Shibata, Y.; Hayashi, H. et al. (1998): Molecular analysis of constitutive IL-1 α gene expression in human melanoma cells: autocrine stimulation through NF- κ B activation by endogenous IL-1 α . In: *Cytokine* 10 (11), S. 872–879. DOI: 10.1006/cyto.1998.0369.
- Kishimoto, T.; Akira, S.; Narazaki, M.; Taga, T. (1995): Interleukin-6 family of cytokines and gp130. In: *Blood* 86 (4), S. 1243–1254.
- Kragstrup, Tue Wenzel; Otkjaer, Kristian; Holm, Christian; Jørgensen, Annette; Hokland, Marianne; Iversen, Lars; Deleuran, Bent (2008): The expression of IL-20 and IL-24 and their shared receptors are increased in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. In: *Cytokine* 41 (1), S. 16–23. DOI: 10.1016/j.cyto.2007.10.004.
- Kumari, Snehlata; Bonnet, Marion C.; Ulvmar, Maria H.; Wolk, Kerstin; Karagianni, Niki; Witte, Ellen et al. (2013): Tumor necrosis factor receptor signaling in keratinocytes triggers interleukin-24-dependent psoriasis-like skin inflammation in mice. In: *Immunity* 39 (5), S. 899–911. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.10.009.

Lambert, Mélanie; Jambon, Samy; Depauw, Sabine; David-Cordonnier, Marie-Hélène (2018): Targeting Transcription Factors for Cancer Treatment. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 23 (6). DOI: 10.3390/molecules23061479.

Lederer, Marcell; Jockusch, Brigitte M.; Rothkegel, Martin (2005): Profilin regulates the activity of p42POP, a novel Myb-related transcription factor. In: *Journal of cell science* 118 (Pt 2), S. 331–341. DOI: 10.1242/jcs.01618.

Lee, Ki-Mo; Kang, Haeng-A; Park, Min; Lee, Hwa-Youn; Choi, Ha-Rim; Yun, Chul-Ho et al. (2012): Interleukin-24 attenuates β -glycerophosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells by inhibiting apoptosis, the expression of calcification and osteoblastic markers, and the Wnt/ β -catenin pathway. In: *Biochemical and biophysical research communications* 428 (1), S. 50–55. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.09.145.

Li, Bin; Vincent, Alicia; Cates, Justin; Brantley-Sieders, Dana M.; Polk, D. Brent; Young, Pampee P. (2009): Low Levels of Tumor Necrosis Factor α Increase Tumor Growth by Inducing an Endothelial Phenotype of Monocytes Recruited to the Tumor Site. In: *Cancer research* 69 (1), S. 338–348. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1565.

Li, Xiaoguang; Yao, Wenbo; Yuan, Ya; Chen, Peizhan; Li, Bin; Li, Jingquan et al. (2017): Targeting of tumour-infiltrating macrophages via CCL2/CCR2 signalling as a therapeutic strategy against hepatocellular carcinoma. In: *Gut* 66 (1), S. 157–167. DOI: 10.1136/gutjnl-2015-310514.

Lim, Su Yin; Yuzhalin, Arseniy E.; Gordon-Weeks, Alex N.; Muschel, Ruth J. (2016): Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis. In: *Oncotarget* 7 (19), S. 28697–28710. DOI: 10.18632/oncotarget.7376.

Locksley, Richard M.; Killeen, Nigel; Lenardo, Michael J. (2001): The TNF and TNF Receptor Superfamilies. In: *Cell* 104 (4), S. 487–501. DOI: 10.1016/s0092-8674(01)00237-9.

Löffek, Stefanie; Zigrino, Paola; Angel, Peter; Anwald, Birgit; Krieg, Thomas; Mauch, Cornelia (2005): High invasive melanoma cells induce matrix metalloproteinase-1 synthesis in fibroblasts by interleukin-1 α and basic fibroblast growth factor-mediated mechanisms. In: *The Journal of investigative dermatology* 124 (3), S. 638–643. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2005.23629.x.

Lu, Yi; Cai, Zhong; Galson, Deborah L.; Xiao, Guozhi; Liu, Yulin; George, Diane E. et al. (2006): Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) acts as a paracrine and autocrine factor for prostate cancer growth and invasion. In: *The Prostate* 66 (12), S. 1311–1318. DOI: 10.1002/pros.20464.

Lubkowski, Jacek; Sonmez, Cem; Smirnov, Sergey V.; Anishkin, Andriy; Kotenko, Sergei V.; Wlodawer, Alexander (2018): Crystal structure of the labile complex of interleukin 24 (IL-24) with the extracellular domains of IL-22R1 and IL-20R2. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 201 (7), S. 2082–2093. DOI: 10.4049/jimmunol.1800726.

Madhusudan, Srinivasan; Foster, Martin; Muthuramalingam, Sethupathi R.; Braybrooke, Jeremy P.; Wilner, Susan; Kaur, Kulwinder et al. (2004): A phase II study of etanercept (Enbrel), a tumor necrosis factor alpha inhibitor in patients with metastatic breast cancer. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10 (19), S. 6528–6534. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0730.

Malik, Ankit; Kanneganti, Thirumala-Devi (2018): Function and regulation of IL-1 α in inflammatory diseases and cancer. In: *Immunological reviews* 281 (1), S. 124–137. DOI: 10.1111/imr.12615.

Matsushima, K.; Larsen, C. G.; DuBois, G. C.; Oppenheim, J. J. (1989): Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. In: *The Journal of Experimental Medicine* 169 (4), S. 1485–1490. DOI: 10.1084/jem.169.4.1485.

Micheau, Olivier; Tschopp, Jürg (2003): Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes. In: *Cell* 114 (2), S. 181–190. DOI: 10.1016/s0092-8674(03)00521-x.

Mitschka, Sibylle; Mayr, Christine (2022): Context-specific regulation and function of mRNA alternative polyadenylation. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 23 (12), S. 779–796. DOI: 10.1038/s41580-022-00507-5.

Morris, Kevin V.; Mattick, John S. (2014): The rise of regulatory RNA. In: *Nature reviews. Genetics* 15 (6), S. 423–437. DOI: 10.1038/nrg3722.

Murakami, Yuichi; Watari, Kosuke; Shibata, Tomohiro; Uba, Manami; Ureshino, Hiroki; Kawahara, Akihiko et al. (2013): N-myc Downstream-regulated Gene 1 Promotes Tumor Inflammatory Angiogenesis through JNK Activation and Autocrine Loop of Interleukin-1 α by Human Gastric Cancer Cells*. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (35), S. 25025–25037. DOI: 10.1074/jbc.M113.472068.

Parrales, Alejandro; Iwakuma, Tomoo (2015): Targeting Oncogenic Mutant p53 for Cancer Therapy. In: *Frontiers in Oncology* 5. DOI: 10.3389/fonc.2015.00288.

ProteinAtlas: MYPOP. Hg. v. proteinatlas.org.

ProteinAtlas: The tissue section - Tissue-based map of the human proteome.

Prouse, Michael B.; Campbell, Malcolm M. (2012): The interaction between MYB proteins and their target DNA binding sites. In: *Biochimica et biophysica acta* 1819 (1), S. 67–77. DOI: 10.1016/j.bbagr.2011.10.010.

Putoczki, Tracy L.; Thiem, Stefan; Loving, Andrea; Busuttill, Rita A.; Wilson, Nicholas J.; Ziegler, Paul K. et al. (2013): Interleukin-11 is the dominant IL-6 family cytokine during gastrointestinal tumorigenesis and can be targeted therapeutically. In: *Cancer cell* 24 (2), S. 257–271. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.06.017.

Qi, Li; Li, Guiqing; Li, Peipei; Wang, Hongwei; Fang, Xiaolong; He, Tongchuan; Li, Jingjing (2024): Twenty years of Gendicine® rAd-p53 cancer gene therapy: The first-in-class human cancer gene therapy in the era of personalized oncology. In: *Genes & diseases* 11 (4), S. 101155. DOI: 10.1016/j.gendis.2023.101155.

Schuerwegh, A. J.; Stevens, W. J.; Bridts, C. H.; Clerck, L. S. de (2001): Evaluation of monensin and brefeldin A for flow cytometric determination of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in monocytes. In: *Cytometry* 46 (3), S. 172–176. DOI: 10.1002/cyto.1102.

Simon, H. U.; Yousefi, S.; Dibbert, B.; Levi-Schaffer, F.; Blaser, K. (1997): Anti-apoptotic signals of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor are transduced via Jak2 tyrosine kinase in eosinophils. In: *European journal of immunology* 27 (12), S. 3536–3539. DOI: 10.1002/eji.1830271256.

Sims, John E.; Smith, Dirk E. (2010): The IL-1 family: regulators of immunity. In: *Nature reviews. Immunology* 10 (2), S. 89–102. DOI: 10.1038/nri2691.

Sioud, Mouldy (2021): RNA Interference: Story and Mechanisms. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2282, S. 1–15. DOI: 10.1007/978-1-0716-1298-9_1.

Soo, C.; Shaw, W. W.; Freymiller, E.; Longaker, M. T.; Bertolami, C. N.; Chiu, R. et al. (1999): Cutaneous rat wounds express c49a, a novel gene with homology to the human melanoma differentiation associated gene, mda-7. In: *Journal of cellular biochemistry* 74 (1), S. 1–10.

Su, Zhaozhong; Emdad, Luni; Sauane, Moira; Lebedeva, Irina V.; Sarkar, Devanand; Gupta, Pankaj et al. (2005): Unique aspects of mda-7/IL-24 antitumor bystander activity: establishing a role for secretion of MDA-7/IL-24 protein by normal cells. In: *Oncogene* 24 (51), S. 7552–7566. DOI: 10.1038/sj.onc.1208911.

Takahashi, Munehisa; Miyazaki, Hiroshi; Furihata, Mutsuo; Sakai, Hirofumi; Konakahara, Takeo; Watanabe, Morihiro; Okada, Tomoko (2009): Chemokine CCL2/MCP-1 negatively

regulates metastasis in a highly bone marrow-metastatic mouse breast cancer model. In: *Clinical & experimental metastasis* 26 (7), S. 817–828. DOI: 10.1007/s10585-009-9281-8.

Tjomsland, Vegard; Bojmar, Linda; Sandström, Per; Bratthäll, Charlotte; Messmer, Davorka; Spångeus, Anna; Larsson, Marie (2013): IL-1 α Expression in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Affects the Tumor Cell Migration and Is Regulated by the p38MAPK Signaling Pathway. In: *PLoS ONE* 8 (8). DOI: 10.1371/journal.pone.0070874.

Tong, Alex W.; Nemunaitis, John; Su, Dan; Zhang, Yuan; Cunningham, Casey; Senzer, Neil et al. (2005): Intratumoral injection of INGN 241, a nonreplicating adenovector expressing the melanoma-differentiation associated gene-7 (mda-7/IL24): biologic outcome in advanced cancer patients. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 11 (1), S. 160–172. DOI: 10.1016/j.ymthe.2004.09.021.

Trickett, Annette; Kwan, Yiu Lam (2003): T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. In: *Journal of Immunological Methods* 275 (1-2), S. 251–255. DOI: 10.1016/s0022-1759(03)00010-3.

Ueno, T.; Toi, M.; Saji, H.; Muta, M.; Bando, H.; Kuroi, K. et al. (2000): Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 6 (8), S. 3282–3289.

Virji, M. A.; Mercer, D. W.; Herberman, R. B. (1988): Tumor markers in cancer diagnosis and prognosis. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 38 (2), S. 104–126. DOI: 10.3322/canjclin.38.2.104.

Voronov, E.; Weinstein, Y.; Benharroch, D.; Cagnano, E.; Ofir, R.; Dobkin, M. et al. (1999): Antitumor and immunotherapeutic effects of activated invasive T lymphoma cells that display short-term interleukin 1 α expression. In: *Cancer research* 59 (5), S. 1029–1035.

Wang, Mai; Liang, Peng (2005): Interleukin-24 and its receptors. In: *Immunology* 114 (2), S. 166–170. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2005.02094.x.

Wang, Mai; Tan, Zhongjia; Zhang, Rong; Kotenko, Sergei V.; Liang, Peng (2002): Interleukin 24 (MDA-7/MOB-5) signals through two heterodimeric receptors, IL-22R1/IL-20R2 and IL-20R1/IL-20R2. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (9), S. 7341–7347. DOI: 10.1074/jbc.M106043200.

Wüstenhagen, Elena; Boukhallouk, Fatima; Negwer, Inka; Rajalingam, Krishnaraj; Stubenrauch, Frank; Florin, Luise (2018): The Myb-related protein MYPOP is a novel intrinsic host restriction factor of oncogenic human papillomaviruses. In: *Oncogene* 37 (48), S. 6275–6284. DOI: 10.1038/s41388-018-0398-6.

Yoshimura, Teizo; Liu, Mingyong; Chen, Xin; Li, Liangzhu; Wang, Ji Ming (2015): Crosstalk between Tumor Cells and Macrophages in Stroma Renders Tumor Cells as the Primary Source of MCP-1/CCL2 in Lewis Lung Carcinoma. In: *Frontiers in Immunology* 6, S. 332. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00332.

Zhao, Kai; Bai, Xuexue; Wang, Xiao; Cao, Yiyao; Zhang, Liu; Li, Wei; Wang, Shiyong (2023): Insight on the hub gene associated signatures and potential therapeutic agents in epilepsy and glioma. In: *Brain research bulletin* 199, S. 110666. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2023.110666.

Zhong, Qian; Xiao, Xina; Qiu, Yijie; Xu, Zhiqiang; Chen, Chunyu; Chong, Baochen et al. (2023): Protein posttranslational modifications in health and diseases: Functions, regulatory mechanisms, and therapeutic implications. In: *MedComm* 4 (3), e261. DOI: 10.1002/mco2.261.

Zhu, J. F.; Valente, A. J.; Lorenzo, J. A.; Carnes, D.; Graves, D. T. (1994): Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human osteoblastic cells stimulated by proinflammatory mediators. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 9 (7), S. 1123–1130. DOI: 10.1002/jbmr.5650090721.

Zlotnik, Albert (2006): Chemokines and cancer. In: *International journal of cancer* 119 (9), S. 2026–2029. DOI: 10.1002/ijc.22024.

9 Anhang

9.1 Messergebnisse IL-24 ELISA

Tabelle 9: Photometrisch gemessene Konzentrationen von IL-24 im ELISA

Probe	Konzentration [pg/ ml]		
	Duplikat 1	Duplikat 2	Mittelwert
Standard 500 pg/ml	500	500	500
Standard 250 pg/ml	250	250	250
Standard 125 pg/ml	125	125	125
Standard 62,5 pg/ml	62,5	62,5	62,5
Standard 31,3 pg/ml	31,3	31,3	31,3
Standard 15,6 pg/ml	15,6	15,6	15,6
Standard 7,81 pg/ml	7,81	7,81	7,81
Medium	<Min	<Min	0
Negativkontrolle 18h Lysat	21,8	16,4	19,1
Stimulation 18h Lysat	13	<Min	6,5
Stimulation + Golgiblockade 18h Lysat	<Min	<Min	0
Negativkontrolle 18h Überstand	<Min	<Min	0
Stimulation 18h Überstand	<Min	<Min	0
Stimulation + Golgiblockade 18h Überstand	<Min	<Min	0
Negativkontrolle 5h Lysat	8,96	9,53	9,25
Stimulation 5h Lysat	<Min	<Min	0
Stimulation + Golgiblockade 5h Lysat	21,3	50,6	35,95
Negativkontrolle 5h Überstand	<Min	<Min	0
Stimulation 5h Überstand	<Min	<Min	0

Stimulation + Golgiblockade 5h Überstand	<Min	<Min	0
Negativkontrolle CD3 Lysat	27,5	31,1	29,3
Stimulation CD3 Lysat	26,5	27,5	27
Stimulation + Golgiblockade CD3 Lysat	<Min	<Min	0
Negativkontrolle CD3 Überstand	93,5	81,6	87,55
Stimulation CD3 Überstand	144	74,6	109,3
Stimulation + Golgiblockade CD3 Überstand	37,7	38,2	37,95
MYPOP-Flag Lysat 1 Tag	<Min	<Min	0
Leer-Flag Lysat 1 Tag	<Min	<Min	0
GFP-MYPOP Lysat 1 Tag	<Min	<Min	0
GFP-Leer Lysat 1 Tag	<Min	<Min	0
GFP-MYPOP Überstand 3 Tage selektioniert	<Min	<Min	0
GFP-Leer Überstand 3 Tage selektioniert	<Min	<Min	0
GFP-MYPOP Überstand 4 Tage selektioniert	15,4	7,97	11,685
GFP-Leer Überstand 4 Tage selektioniert	<Min	<Min	0
GFP-MYPOP Überstand 5 Tage selektioniert	<Min	<Min	0
GFP-Leer Überstand 5 Tage selektioniert	<Min	<Min	0

GFP-MYPOP Überstand 6 Tage selektioniert	<Min	22,1	11,05
GFP-Leer Überstand 6 Tage selektioniert	<Min	8,22	8,22
GFP-MYPOP Überstand 10 Tage selektioniert	<Min	<Min	0
GFP-Leer Überstand 10 Tage selektioniert	<Min	<Min	0
GFP-MYPOP Überstand 13 Tage selektioniert	29,3	<Min	29,3
GFP-Leer Überstand 13 Tage selektioniert	<Min	<Min	0

9.2 Messergebnisse LEGENDplex™

9.2.1 Murine Milzzellen nach verschiedenen Stimulationsansätzen

Tabelle 10: Konzentrationen der gemessenen Zytokine im LEGENDplex™ nach Stimulation muriner Milzzellen

Probe	Konzentration [pg/ ml]				
	IL-1 α	TNF- α	CCL2	IL-11	GM-CSF
Negativkontrolle Lysat 5h	4,41	7,3	4,93	65,45	2,33
Negativkontrolle Überstand 5h	2,04	8,62	4,23	45,92	3,53
Negativkontrolle Lysat 18h	<1,35	<3,99	<3,40	<29,28	<1,61
Negativkontrolle Überstand 18h	3,22	13,41	5,86	74,68	3,03
Negativkontrolle CD3 Lysat	4,99	75,36	<3,40	<29,28	38,24
Negativkontrolle CD3 Überstand	21,05	576,76	13,8	50,1	543,29
Stimulation Lysat 5h	43,77	269,78	6,32	<29,28	61,3
Stimulation Überstand 5h	5,97	2073,54	30,97	<29,28	225,32
Stimulation Lysat 18h	228,91	426,04	12,37	<29,28	157,98
Stimulation Überstand 18h	<1,35	<3,99	<3,40	<29,28	<1,61
Stimulation CD3 Lysat	9,18	187,25	4,35	<29,28	73,75
Stimulation CD3 Überstand	32,43	752,31	10,8	<29,28	684,16
Stimulation + Golgiblockade Lysat 5h	24,49	839,06	27,48	442,4	330,36
Stimulation + Golgiblockade Überstand 5h	3,22	295,22	<3,40	32,16	4,59
Stimulation + Golgiblockade Lysat 18h	6,21	206,18	4,35	<29,28	192,06
Stimulation + Golgiblockade Überstand 18h	7,49	372,41	3,88	<29,28	15,6
Stimulation + Golgiblockade CD3 Lysat	8,66	117,06	5,51	37,89	209,81
Stimulation + Golgiblockade CD3 Überstand	29,31	629,39	14,67	34,04	529,91

9.2.2 B16-F10 nach verschiedenen Stimulationsansätzen

Tabelle 11: Konzentrationen der gemessenen Zytokine im LEGENDplex™ nach Stimulation von B16-F10

Probe	Konzentration [pg/ ml]				
	IL-1 α	TNF- α	CCL2	IL-11	GM-CSF
MYPOP-Flag 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
Leer-Flag 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
MYPOP-Flag 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
Leer-Flag 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
MYPOP-Flag 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
Leer-Flag 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
MYPOP-Flag 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
Leer-Flag 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
MYPOP-Flag 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
Leer-Flag 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
MYPOP-Flag 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
Leer-Flag 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
MYPOP-Flag zentrifugiert 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
Leer-Flag zentrifugiert 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	51,45	1,61
MYPOP-Flag Lysat 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
Leer-Flag Lysat 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
GFP-MYPOP 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
Leer-GFP 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
GFP-MYPOP 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
Leer-GFP 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
GFP-MYPOP 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
Leer-GFP 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
GFP-MYPOP 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
Leer-GFP 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
GFP-MYPOP 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
Leer-GFP 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
GFP-MYPOP 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
Leer-GFP 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
GFP-MYPOP Lysat 1 Tag	<1,36	<4,02	4,89	68,98	<1,47
Leer-GFP Lysat 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
GFP-MYPOP zentrifugiert 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
Leer-GFP zentrifugiert 1 Tag	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
MYPOP-Flag 2 Tage	<1,36	<4,02	3,75	43,23	<1,47

Leer-Flag 2 Tage	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
MYPOP-Flag 2 Tage	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
Leer-Flag 2 Tage	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
MYPOP-Flag 2 Tage	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
Leer-Flag 2 Tage	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
GFP-MYPOP 2 Tage	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
Leer-GFP 2 Tage	<1,36	<4,02	<3,46	80,58	1,96
GFP-MYPOP 3 Tage selektioniert	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
Leer-GFP 3 Tage selektioniert	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
MYPOP-Flag 4 Tage selektioniert	<1,36	<4,02	<3,46	53,57	<1,47
Leer-Flag 4 Tage selektioniert	<1,36	<4,02	3,52	64,47	<1,47
GFP-MYPOP 4 Tage selektioniert	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
Leer-GFP 4 Tage selektioniert	<1,36	<4,02	<3,46	180,01	<1,47
MYPOP-Flag 5 Tage selektioniert	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
Leer-Flag 5 Tage selektioniert	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
GFP-MYPOP 5 Tage selektioniert	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
Leer-GFP 5 Tage selektioniert	<1,36	<4,02	<3,46	35,43	<1,47
MYPOP-Flag 6 Tage selektioniert	<1,36	<4,02	<3,46	49,36	<1,47
Leer-Flag 6 Tage selektioniert	<1,36	<4,02	<3,46	166,05	<1,47
GFP-MYPOP 6 Tage selektioniert	<1,36	<4,02	<3,46	1048,85	<1,47
Leer-GFP 6 Tage selektioniert	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47
MYPOP-Flag 10 Tage selektioniert	<1,36	<4,02	<3,46	73,56	<1,47
Leer-Flag 10 Tage selektioniert	<1,36	<4,02	<3,46	163,28	<1,47
GFP-MYPOP 10 Tage	<1,36	<4,02	<3,46	157,78	<1,47

selektioniert							
Leer-GFP selektioniert	10 Tage	<1,36	<4,02	<3,46	37,34	<1,47	
GFP-MYPOP selektioniert	13 Tage	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47	
Leer-GFP selektioniert	13 Tage	<1,36	<4,02	<3,46	<32,05	<1,47	

10 Danksagung

Das erste große Dankeschön geht an meine Doktormutter, die mich in der Coronazeit trotz Lockdown mit gebrochenem Fuß aufgenommen hat und mir für ein knappes Jahr einen Grund gegeben hat, aufzustehen und an die Uni zu gehen – danke für die kreativen Ideen, schlaunen Gedanken und Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit. Generell hat mich die gesamte Arbeitsgruppe herzlich aufgenommen und bei allen Fragen und Anliegen unterstützt. Auch beim Institut für Virologie möchte ich mich bedanken, wo man sich immer auf Augenhöhe und fast schon familiär begegnet und speziell an alle Mitarbeitenden der Diagnostik, wo ich die eine oder andere Inkubationszeit mit Covid-PCRs verbracht habe.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern, Geschwistern und Freunden für die bedingungslose Unterstützung über das gesamte Studium bedanken, was wirklich nicht selbstverständlich ist!