

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von: Diplom-Biologin Christin Seifert

geboren in: Erfurt

Tag der mündlichen Prüfung:

**Expressionskontrolle von ER Aminopeptidasen in Melanomzellen und deren Einfluss
auf die Generierung von CD8⁺ T-Zellepitopen**

Gutachter: Prof. Dr. Viktor Umansky
PD Dr. Annette Paschen

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle die Gelegenheit nutzen und mich bei all den hilfreichen Geistern bedanken, welche mich während der Erstellung dieser Dissertation begleitet haben und mir dabei halfen, den richtigen Pfad zu finden und auch den einen oder anderen Stein aus dem Weg zu räumen. Daher gilt dieser Dank zunächst meinen Eltern, die mir das Studium und damit auch die Doktorarbeit ermöglicht haben und meinem Mann, der mich liebevoll und mit viel Verständnis unterstützt hat.

Ein großer Dank geht auch an die Klinik für Dermatologie des Universitätsklinikum Essen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dirk Schadendorf, an der diese Arbeit angefertigt wurde. Ein besonderes Dankeschön gilt dabei meiner Betreuerin Frau PD Dr. Annette Paschen, welche mir diese anspruchsvolle sowie interessante Aufgabenstellung anvertraut hat und mir während der langen und freundschaftlichen Zusammenarbeit mit zahlreichen praktischen und wissenschaftlichen Hilfestellungen zur Seite stand.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Viktor Umansky, Prof. Dr. Rainer Zawatzky und Prof. Dr. Gernot Geginat dafür bedanken, dass sie sich immer für meine *Progress Reports* Zeit genommen haben und mir durch anregende Diskussionen neue Ideen und Blickwinkel eröffneten.

Ein liebes Dankeschön geht auch an Silke Lubojanski (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Thomas Wölfel, III. Med. Klinik, Universitätsmedizin Mainz) und Fang Zhao für die tatkräftige Unterstützung bei den T-Zell Versuchen. Zusätzlich danke ich Antje Sucker und Iris Moll für die Tipps und Tricks bei technischen Fragen sowie für die Ordnung im alltäglichen Labor-Chaos, die das Arbeiten erleichterte.

Ebenfalls möchte ich mich noch bei meinen Mit-Doktoranden Daria Vokhminova, Anja Heinemann und Jolanthe Baingo für die vielseitigen Diskussionen und praktischen Tipps bedanken sowie für die lustigen und abwechslungsreichen Treffen zum Doktoranden-Stammtisch. Mein Dank richtet sich auch an alle weiteren Kollegen im Labor für die freundliche Atmosphäre und Hilfsbereitschaft sowie für die zahlreichen *After work*-Ausflüge.

Danksagung

Abschließend möchte ich mich auch bei Frau Dr. Monika Seifert für die Unterstützung bei der statistischen Aufbereitung der Messergebnisse sowie bei allen Korrekturlesern bedanken.

Ohne Euch alle wäre diese Arbeit nicht zu leisten gewesen.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	1
1 Abkürzungsverzeichnis	5
2 Zusammenfassung	9
3 Theoretische Grundlagen.....	13
3.1 Das maligne Melanom.....	13
3.2 Epidemiologie und Entstehung des malignen Melanoms.....	13
3.3 Behandlungsstrategien des malignen Melanoms.....	15
3.3.1 Antigen-spezifische Immuntherapie des malignen Melanoms.....	16
3.4 MHC Klasse I Antigen präsentierender Weg	19
3.4.1 Das Proteasom	20
3.4.2 Zytoplasmatische Peptidasen.....	22
3.4.3 Peptidtransport in das Endoplasmatische Retikulum	24
3.4.4 Aminopeptidasen des Endoplasmatischen Retikulums	24
3.4.5 Peptidbeladung von MHC Klasse I Molekülen.....	27
4 Zielstellung.....	29
5 Material und Methoden	30
5.1 Material.....	30
5.1.1 Zellen	30
5.1.2 Oligonukleotide	31
5.1.3 Plasmide	33
5.1.4 Restriktionsenzyme	34
5.1.5 Ligase, Reverse Transkriptase und DNA-Polymerasen	34
5.1.6 Antikörper.....	35
5.1.7 Zytokine.....	37
5.1.8 Medien, Zusätze, Testsysteme.....	38
5.1.9 Chemikalien.....	39
5.1.10 Einweg- und Mehrweg-Verbrauchsmaterialien.....	41
5.1.11 Laborgeräte.....	42
5.1.12 Medien.....	44
5.1.13 Puffer und Lösungen für Gelelektrophorese	45
5.1.14 Puffer und Lösungen für die Zellkultur und Zellanalyse	45
5.1.15 Puffer und Lösungen für Proteinisolierung und Western Blot	46
5.1.16 Puffer und Lösungen für ELISA bzw. ELISPOT.....	48
5.2 Methoden.....	49
5.2.1 Kultivierung von Melanomzelllinien	49
5.2.2 Kultivierung von CD8 ⁺ T-Lymphozyten.....	50
5.2.3 RNA-Isolierung, Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion	52
5.2.4 Klonierung von DNA Fragmenten	56
5.2.5 Transiente und stabile Transfektion von Melanomzellen	60
5.2.6 Promotor-Luziferase Test.....	60
5.2.7 Proteinisolierung aus Zelllinien, Western Blot und Immundetektion	61
5.2.8 Nachweis von Zytokinen in Zellkulturüberständen.....	63
5.2.9 Durchflusszytometrie.....	64
5.2.10 Statistische Analysen.....	65
6 Ergebnisse.....	66

6.1	Der Einfluss von ERAP1 auf die Generierung und Präsentation von Epitopen aus Tumorantigenen des Melanoms.....	66
6.1.1	Etablierung eines Systems zur stabilen Herabregulation von ERAP1	68
6.1.2	Einfluss der ERAP1 Herabregulation auf die Erkennung von Ma-Mel-86a Zellen durch „bulk“ CTL.....	71
6.1.3	Der Einfluss von ERAP1 auf die Stimulierung autologer CTL Klone.....	72
6.2	Regulation der ERAP1 und ERAP2 Expression	78
6.2.1	Induktion der ERAP Expression in Melanomzellen durch IFN- γ	78
6.2.2	Der Einfluss von Chemotherapeutika auf die Expression von ERAP1 und ERAP2	80
6.3	Induktion von IL-6 in Doxorubicin behandelten Melanomzellen	89
6.4	ERAP1 und ERAP2 Expression in verschiedenen Melanomzelllinien.....	90
7	Diskussion	92
7.1	Mechanismen, welche die T-Zellerkennung von Tumoren beeinträchtigen	92
7.2	Die Rolle der ER Aminopeptidasen in der T-Zellerkennung von Tumoren	93
7.2.1	Reduktion der ERAP1 Expression verändert das HLA Klasse I Antigen-Epitoprepertoire in Melanomzellen	94
7.2.2	ERAP1 beeinflusst die Generierung Tumor-assoziiertes Epitope in Melanomzellen	95
7.3	Zelllinien etabliert aus verschiedenen Metastasen eines Patienten weisen unterschiedliche Expressionen der ER Aminopeptidasen auf	97
7.4	IFN- γ induziert in der Mehrzahl der getesteten Melanomzelllinien eine Hochregulation der ER Aminopeptidasen	98
7.5	p53 abhängige Induktion von ERAP1 nach Zytostatika Behandlung	99
7.6	Doxorubicin induziert die Expression verschiedener Komponenten des IFN-Signalwegs in p53-exprimierenden Zellen	102
7.7	Induktion von STAT3 in Doxorubicin behandelten Melanomzellen	104
7.8	IL-6 Freisetzung durch Doxorubicin behandelte Melanomzellen	105
7.9	ERAP1 und Immunogenität des Melanoms – eine abschließende Einschätzung .	108
8	Quellenverzeichnis	109
9	Anhang	124
9.1	ERAP1 Herabregulation durch verschiedene ERAP1 siRNAs	124
9.2	ERAP2 Expression in den Ma-Mel-86a und Ma-Mel-86c Klonen	124
9.3	Nachweis der Spezifität verschiedener CD8 ⁺ T-Zellklone.....	126
9.4	ERAP1 Promotor	126
9.5	ERAP2 Promotor	127
10	Eidesstattliche Erklärung	128

1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgemeinschaft
AK	Antikörper
APC	<i>Antigen presenting cell</i> , Antigen präsentierende Zellen
APM	Antigen Prozessierungsmaschinerie
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
b	Base
β_2 M	β_2 -Mikroglobulin
BH	Bleomycin Hydrolase
BiP	<i>Binding immunoglobulin protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDK4	<i>Cyclin-dependent kinase 4</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
COPII	<i>Coat protein complex II</i>
CSPG4	<i>Chondroitin sulfate proteoglycan 4</i>
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i> , zytotoxischen T Lymphozyten
CTLA4	<i>Cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i>
DC	<i>Dendritic cells</i> , Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's PBS
Dx	Doxorubicin
EBV-B	Epstein-Barr-Virus transformierte humane B-Lymphozyten
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

Abkürzungsverzeichnis

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ELISPOT	<i>Enzyme linked immuno spot technique</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER assoziierte Protein Degradation
ERAP	Endoplasmatische Retikulum Aminopeptidase
ERp57	Endoplasmatisches Retikulum Protein 57
FAM	<i>6-Carboxyfluorescein</i>
Fas	<i>FS7-associated cell surface antigen</i>
FasL	Fas Ligand
FCS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAS	<i>IFN-γ-activated site</i>
gDNA	genomische DNA
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
h	Stunde
HCMV	Humanes-Cytomegalievirus
HERPUD1	<i>Homocysteine-responsive endoplasmic reticulum-resident ubiquitin-like domain member 1</i>
HIF1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
HLA	humanes Leukozytenantigen
HSF	Hitzeschock Faktoren
IFN- α	Interferon-alpha
IFN- β	Interferon-beta
IFN- γ	Interferon-gamma
IFNGR1	IFN- γ Rezeptor 1
IL-6	Interleukin-6
IRF	Interferon regulatorische Faktoren
ISG15	<i>Interferon-stimulated gene 15</i>
ISGF3	<i>Interferon-stimulated gene factor 3</i>
ISRE	<i>Interferon stimulated response element</i>
JAK	Janus Kinase
kb	Kilobasen

Abkürzungsverzeichnis

kDa	Kilodalton
LAP	Leucin Aminopeptidase
LB	Lauria Bertani
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
Lsg.	Lösung
M	Molar
mAK	monoklonaler Antikörper
MART-1	<i>Melanoma Antigen Recognized by T-cells</i>
MCMV	Maus-Cytomegalievirus
MDSCs	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
Melan-A	<i>Melanocyte antigen</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MGB	<i>Minor groove binder</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
MITF	Microphthalmia Transkriptionsfaktor
mM	Millimolar
mRNA	messenger-RNA
NFκB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
OD	optische Dichte
p53	Tumorsuppressor p53
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> , mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphat buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	<i>Programmed cell death-1</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PLC	<i>Peptide loading complex</i>
PRAME	<i>Preferentially expressed antigen of melanoma</i>
PRDM1	<i>PR domain-containing 1, with ZNF domain</i> oder <i>B lymphocyte-induced maturation protein-1</i>
Pro	Prolin
P/S	Penicillin/Streptomycin
PSA	Puromycin-sensitive Aminopeptidase

Abkürzungsverzeichnis

PTEN	Phosphatase und Tensin homolog
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
RLU	<i>Relative light units</i> , Relative Lichteinheit
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SDS	Sodium-/Natrium-Dodecylsulfat
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> , Einzelnukleotid-Polymorphismus
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOCS3	<i>Suppressor of Cytokine Signaling 3</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TAP	<i>Transporter associated with antigen processing</i>
TCR	<i>T cell receptor</i> , T-Zellrezeptor
TEMED	<i>N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine Electrophoresis Reagent</i>
TIL	Tumor infiltrierte Lymphozyten
TLR3	<i>Toll-like receptor 3</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR1	TNF-Rezeptor 1
TOP	Thimet Oligoendopeptidase
TPPII	Tripeptidyl Peptidase II
Treg	regulatorische T-Zellen
Tris	Tris (hydroxymethyl-) aminomethan
TRP-1	<i>Tyrosinase related protein-1</i>
Tyk2	Tyrosin Kinase 2
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom System
UV	ultraviolett
z.B.	zum Beispiel

2 Zusammenfassung

Melanomzellen, welche hauptsächlich aus einer malignen Transformation Pigmentbildender Zellen der Haut hervorgehen, können durch autologe CD8⁺ T-Lymphozyten selektiv zerstört werden. Die Selektivität basiert hierbei auf der Interaktion des T-Zellrezeptors (TCR) mit spezifischen Oberflächenkomplexen der Tumorzellen, bestehend aus HLA Klasse I Molekülen und daran gebundenen Antigenpeptiden. Die Antigenpeptide gehen aus der Degradation von Tumorproteinen hervor, die initial durch den Proteasomkomplex übernommen wird. Das Proteasom generiert Peptide unterschiedlicher Länge und definiert dabei den korrekten C-Terminus der Antigenpeptide. Viele Proteasomprodukte sind aber zu lang für die Bindung an HLA Klasse I Moleküle und bedürfen daher der N-terminalen Prozessierung durch Aminopeptidasen. Bisher sind zwei humane ER-lokalisierte Aminopeptidasen bekannt, ERAP1 und ERAP2. ERAP1 ist nachweislich für eine effiziente Generierung viraler und parasitärer Antigenpeptide von Bedeutung. Die Rolle dieser Peptidase in der Prozessierung von Tumor-assoziierten Peptidepitopen ist jedoch bislang unklar. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Bedeutung von ERAP1 in der Antigenpräsentierung von Melanomzellen untersucht werden. Außerdem sollten Stimuli und Signalwege, welche die ERAP1 und ERAP2 Expression regulieren, bestimmt werden.

Um die Rolle von ERAP1 in der Antigenpräsentation von Melanomzellen zu klären, wurde das autologe Tumor-CD8⁺ T-Zell System des Melanopatienten Ma-Mel-86 verwendet. In den Zelllinien Ma-Mel-86a und Ma-Mel-86c, etabliert aus verschiedenen Metastasen dieses Patienten, wurde die ERAP1 Expression mittels shRNA stabil herabreguliert. Die Herabregulation von ERAP1 zeigte keinen Einfluss auf die Menge der HLA Klasse I Moleküle an der Zelloberfläche. Um den Einfluss der verminderten ERAP1 Expression auf die CD8⁺ T-Zellerkennung der Tumorzellen zu bestimmen, wurden aus dem peripheren Blut stammende autologe CD8⁺ T-Zellen zunächst mehrmals mit Ma-Mel-86a Zellen stimuliert. Anschließend wurde die Fähigkeit dieser "bulk" CD8⁺ T-Zellen, Ma-Mel-86a im Vergleich zu ERAP1 shRNA transfizierten Ma-Mel-86a Melanomzellen zu erkennen, analysiert. Interessanterweise beeinträchtigte die ERAP1 Herabregulation die Erkennung der Ma-Mel-86a Melanomzellen durch die autologen "bulk" CD8⁺ T-Lymphozyten, was darauf hindeutet, dass die Reduktion der ERAP1 Aktivität zu einer Veränderung im Antigen-Epitoprepertoire der HLA Klasse I Moleküle führte. Die verminderte ERAP1

Expression reduzierte auch die Erkennung der Tumorzellen durch einen autologen CD8⁺ T-Zellklon, der ein mutiertes Zielantigen erkannte. Vergleichbare Beobachtungen wurden ebenfalls für Ma-Mel-86c ERAP1 shRNA Transfektanten gemacht, die eine verringerte Stimulationskapazität gegenüber zwei von drei autologen CD8⁺ T-Zellklonen unterschiedlicher Spezifität zeigten.

Aufgrund der Bedeutung von ERAP1 in der Epitopräsentierung von Melanomzellen wurde nachfolgend das Expressionsprofil von ERAP1 und ERAP2 in verschiedenen Zelllinien sowie die Regulation der ERAP Expressionen analysiert. Zunächst konnten starke Unterschiede in der ERAP1 und ERAP2 Expression zwischen Zelllinien, etabliert aus verschiedenen Metastasen der Melanompatienten, festgestellt werden. Da derzeit die immunmodulierenden Eigenschaften von Chemotherapeutika intensiv untersucht werden, galt es, deren Einfluss auf die ERAP1 und ERAP2 Expression zu bestimmen. Interessanterweise führte die Behandlung verschiedener Zelllinien mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin zu einer erhöhten Promotoraktivität sowie zu einer verstärkten mRNA Expression beider Aminopeptidasen, wobei sich die Modulation der ERAP1 Expression abhängig vom p53 Status der Zellen zeigte. Diese Induktionen waren jedoch auf Proteinebene nur teilweise zu erkennen, was zusätzlich auf eine post-transkriptionelle Regulation der ERAP1 und ERAP2 Expression hindeutet.

Die Resultate dieser Arbeit belegen, dass ERAP1 eine wichtige Rolle im Prozess der Generierung von Tumor-assoziierten CD8⁺ T-Zell Epitopen in Melanomzellen übernimmt. Somit ist davon auszugehen, dass eine heterogene ERAP Expression in Metastasen von Tumorpatienten mit quantitativen und/oder qualitativen Veränderungen im antigenen HLA Klasse I Peptid-Repertoire verbunden ist. Dieser Effekt könnte die Effizienz Epitop-spezifischer Tumortherapien, wie den adoptiven Transfer TCR-transgener CD8⁺ T-Zellen, beeinflussen und sollte daher bei der Erstellung der Therapie berücksichtigt werden.

Summary

Melanoma cells that primarily arise from a malignant transformation of pigment-producing cells of the skin, can be selectively destroyed by autologous CD8⁺ T lymphocytes. The selectivity is provided by the interaction between the T cell receptor (TCR) and specific tumor cell surface complexes, consisting of antigenic peptides bound to HLA class I molecules. The antigenic peptides originate from the degradation of tumor proteins. In general, the multi-catalytic proteasome complex initiates the cleavage of tumor antigens into peptide fragments of different length, thereby defining the C-terminus for the majority of peptides presented by HLA class I molecules. While some of the proteasome products are of the correct size for direct HLA class I binding others are N-terminally elongated peptide precursors that require further trimming by aminopeptidases. Currently two human ER-localized aminopeptidases are known, ERAP1 and ERAP2. While ERAP1 is known to be of specific relevance for the efficient generation of viral and parasitic antigenic peptides, the importance of the peptidase in processing tumor-associated peptide epitopes has not been determined. Thus, the aim of this thesis was to determine the role of ERAP1 in antigen presentation by melanoma cells. Furthermore stimuli and signaling pathways that regulate ERAP1 and ERAP2 expression should be defined.

To analyze the impact of ERAP1 on antigen presentation of melanoma cells, the autologous tumor-CD8⁺ T cell system of melanoma patient Ma-Mel-86 was selected. In the cell line Ma-Mel-86a and Ma-Mel-86c, established from different metastasis of this patient, ERAP1 expression was stably downregulated by shRNA. Importantly, ERAP1 knockdown did not influence the overall of HLA class I surface expression level. To determine the effect of reduced ERAP1 expression in tumor cells on antigen presentation, autologous CD8⁺ T cells derived from peripheral blood were initially stimulated for several times with Ma-Mel-86a cells. Subsequently, the bulk CD8⁺ T cells were analyzed for their capability to recognize Ma-Mel-86a in comparison to ERAP1 shRNA transfected Ma-Mel-86a melanoma cells. Interestingly ERAP1 downregulation impaired the recognition of Ma-Mel-86a melanoma cells by autologous bulk CD8⁺ T lymphocytes, suggesting that reduced ERAP1 activity led to an alteration of the antigenic epitope repertoire presented by HLA class I molecules. Diminished ERAP1 expression also decreased the recognition of the tumor cells by an autologous CD8⁺ T cell clone recognizing a mutated target antigen. Comparable observations were made for Ma-Mel-86c ERAP1 shRNA transfectants, which

exhibited reduced stimulatory capacity towards two of three autologous CD8⁺ T cell clones of different specificity.

Due to the important role of ERAP1 in epitope presentation by melanoma cells the expression profile of ERAP1 and ERAP2 as well as their regulation in several cell lines was analyzed. Firstly, strong distinctions in ERAP1 and ERAP2 expression could be detected between cell lines established from different metastasis of melanoma patients. Since chemotherapeutic drugs, like Doxorubicin, are currently under intense investigation for their immune modulating properties its impact on ERAP1 and ERAP2 expression was determined. Interestingly, the treatment of several cell lines with Doxorubicin led to an increase in promoter activity as well as mRNA expression of both aminopeptidases, with ERAP1 expression being dependent of the p53 status of the cells. However the elevated expression was only partially detectable on the protein level, pointing towards additional post-transcriptional regulation of ERAP1 and ERAP2 expression.

The results of this thesis demonstrate that ERAP1 plays an important role in the generation of tumor-associated CD8⁺ T cell epitopes in melanoma cells. Thus a heterogeneous ERAP expression as it can be detected in metastasis of tumor patients might be associated with quantitative and qualitative alterations in the antigenic HLA class I peptide repertoire. This effect could influence the efficiency of epitope-specific tumor therapies such as the adoptive transfer of TCR-transgenic CD8⁺ T cells and should be taken into consideration for therapy design.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Das maligne Melanom

Die Haut ist flächenmäßig das größte Organ des menschlichen Organismus, welches eine Vielzahl von lebenswichtigen Aufgaben erfüllt. Bestehend aus der Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subcutis (Unterhaut) stellt sie eine mechanische, chemische sowie thermische Barriere zwischen dem Körperinneren und der Außenwelt dar. Sie reguliert die Temperatur und den Wasserhaushalt des Körpers und spielt als Sinnesorgan eine große Rolle. So werden über die Haut nicht nur Vibrationen und Berührungen, sondern auch thermische Reize und Schmerzen wahrgenommen. Eine weitere wichtige Funktion der Haut ist, den Organismus vor Krankheitserregern und Fremdstoffen zu schützen [1, 2]. Dennoch kann auch die Haut selbst von Krankheiten und Tumoren verschiedenster Art betroffen sein. Eine dieser Tumorformen ist das maligne Melanom („schwarzer Hautkrebs“), welches erstmals 1806 von dem französischen Mediziner Rene Theophile Hyacinthe Laënnec in einer Veröffentlichung als Melanose erwähnt wurde [3]. Dabei handelt es sich um eine bösartige Entartung des melanozytären Zellsystems, das sich vorwiegend als Manifestation der Haut zeigt. In den seltensten Fällen kann sich das maligne Melanom auch am Auge [4], an den Hirnhäuten [5] und an Schleimhäuten [6] zeigen. Aus klinischer Sicht gibt es verschiedene Formen des malignen Melanoms: das superfiziell spreitende-, das noduläre-, das Lentigo-maligna- und das Akrolentiginöse Melanom sowie einige seltene klinische Sonderformen [7]. Dabei neigt der primäre Tumor zur Bildung von Frühmetastasen, die über die Blut- und Lymphbahnen in andere Organe gestreut werden und somit eine ungünstige Prognose für den Patienten darstellen. So liegt die mittlere Überlebenszeit bei solchen Melanompatienten bei 4 bis 8 Monaten [8].

3.2 Epidemiologie und Entstehung des malignen Melanoms

Die Melanominzidenz nimmt weltweit zu [9, 10]. Derzeit liegt die Neuerkrankungsrate bei Männern in Europa bei 14,6/100.000, während die Rate bei den Frauen bei 16,2/100.000 liegt [11]. So sind insbesondere Bevölkerungsgruppen, die eine helle Haut-, Augen- und Haarfarbe haben und einer kumulierten UV Exposition ausgesetzt sind, prädestiniert für das Melanom. Aber auch Personen, die eine positive Eigen- und Familienanamnese

aufweisen sowie eine hohe Anzahl an melanozytären Nävi bzw. dysplastische melanozytäre oder große kongenitale melanozytäre Nävi besitzen, sind gefährdet [12].

Die schrittweise Transformation von Melanozyten bis hin zum Melanom ist bis jetzt relativ unbekannt. Als Hauptrisikofaktor für die Entstehung eines Melanoms gilt eine starke Belastung mit DNA-schädigender UV-Strahlung, welche Mutationen in verschiedenen Genen hervorrufen kann. Die Mehrheit der Melanome trägt somatische Mutationen, die zu einer konstitutiven Aktivierung des RAS-RAF-MEK-ERK- oder des Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)/-AKT Signalwegs führen, welche Wachstum und Proliferation vermitteln. Häufig auftretende Mutationen sind dabei in NRAS (NRAS^{Q61K}, NRAS^{Q61R}) und BRAF (BRAF^{V600E}) [13] zu finden, welche eine kontinuierliche Aktivierung beider Signalwege hervorrufen. Ebenfalls können verschiedene Mutationen in der protoonkogenen Tyrosinkinase c-Kit zu einer dauerhaften Aktivierung der RAS-RAF-MEK-ERK Kaskade führen. Aber auch der PI3K/AKT-, der JAK-STAT- und andere antiapoptotische Signalwege können durch c-Kit induziert werden [14]. Weitere Mutationen oder Amplifikationen können in Genen auftreten, die am PI3K/AKT- oder am Phosphatase und Tensin homolog (PTEN)-Signalweg beteiligt sind. So sind Mutationen im PTEN Tumorsuppressor für 10-30% der Melanome beschrieben [15]. PTEN ist normalerweise ein negativer Regulator der PI3K. Die Inaktivierung von PTEN durch Deletionen oder Mutationen führt jedoch zu einer konstitutiven Aktivierung des PI3K-Signalweges. Ein weiteres Molekül was bei der Entstehung und der Progression eines Melanoms beteiligt sein kann, ist der Microphthalmia Transkriptionsfaktor (MITF). Dieser spielt in der Melanozyten- und Melanom-Proliferation, im Überleben, der Differenzierung, der Apoptosis und während des Zellzyklusarrest eine wichtige Rolle [16]. Im Zusammenhang mit dem familiären Melanom konnten Keimbahnmutationen im Tumor-Suppressorgen *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* (CDKN2A) oder in der *Cyclin-dependent kinase 4* (CDK4) identifiziert werden [17], welche normalerweise in der Regulation des Zellzyklus involviert sind.

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Entstehung und die Entwicklung eines Tumors ist auch dessen Mikroumgebung. So weist die Haut einen Sauerstoff Partialdruck zwischen 0,1% und 10% auf [18]. Dabei sind Melanozyten, die im dermalen-epidermalen Übergang oder in den Haarfollikeln sitzen, einer hypoxischen Umgebung ausgesetzt, welche ein optimales Wachstum der Melanozyten begünstigt [19]. Dieser hypoxische Zustand aktiviert Transkriptionsfaktoren wie die Hypoxie-induzierten Faktoren 1 und 2 (HIF1 und 2). Diese beiden Transkriptionsfaktoren induzieren Gene, die das Überleben der Zelle

begünstigen und in der Wiederherstellung der Sauerstoffversorgung involviert sind. Jedoch können durch diese Transkriptionsfaktoren auch Gene aktiviert werden, die eine Transformation der Melanozyten begünstigen. So können Gene induziert werden, die an der Angiogenese, Invasion und Metastasenbildung oder an der Pluripotenz von Stammzellen beteiligt sind [20, 21].

3.3 Behandlungsstrategien des malignen Melanoms

Besteht bei einem Patienten der Verdacht eines malignen Melanoms, so wird die Läsion komplett durch einen chirurgischen Eingriff entfernt. Beträgt der vertikale Tumordurchmesser mehr als einen Millimeter, so wird der erst gelegene Lymphknoten im Lymphabfluss dieser Hautpartie, der Sentinel Lymphknoten, operativ entfernt und auf Metastasierung hin untersucht [22]. Ist dieser Lymphknoten bereits mit Metastasen befallen, so werden auch die umliegenden Lymphknoten entfernt. Circa 20% der Patienten, die ein kutanes Melanom haben, weisen einen Metastasen-Befall des Sentinel Lymphknoten auf, was eine schlechte Prognose für diese Patienten darstellt [23]. So liegt die 10 Jahres Überlebensrate bei diesen Patienten unter 10% [24].

Die Standardbehandlung der Patienten beruht auf einer Strahlentherapie und/oder Chemotherapie (Darcabazin, Temozolomid, Fotemustin, Vindesin, Carboplatin, Paclitaxel) [25], welche jedoch nur geringe therapeutische Erfolge versprechen. Zur Zeit kommen in klinischen Studien auch Inhibitoren gegen verschiedene Onkogene (BRAF, c-Kit) im Melanom zum Einsatz [26], die deutliche therapeutische Erfolge zeigen, wenngleich diese nur transient zu sein scheinen. Eine mögliche Alternative oder Ergänzung zur Behandlung mit Inhibitoren ist die Immuntherapie. Hierbei unterscheidet man zwischen unspezifischer und spezifischer Immuntherapie. Bei der unspezifischen Immuntherapie liegt das Ziel darin, das Immunsystem des Patienten durch eine Behandlung mit Zytokinen wie Interleukin 2 und Interferon- α -2b [25] gegen den Tumor zu aktivieren. Ebenso werden derzeit in klinischen Studien neue Therapieansätze, wie der Einsatz der Zytokine Interleukin-21 (IL-21) [27], *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF) [28] und Tumornekrosefaktor (TNF) [29] erprobt. Eine weitere Strategie beruht auf der Verwendung immunregulatorischer Antikörper wie der *anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4* (anti-CTLA4) Antikörper Ipilimumab und Tremelimumab [30] sowie Antikörper gegen *Programmed cell death-1* (PD-1) [31]. Ebenfalls werden Antikörper

verwendet, die durch ihre Bindung an ihre Liganden, z.B. CD137 [32] oder CD40 [33], kostimulatorische Signale auslösen.

3.3.1 Antigen-spezifische Immuntherapie des malignen Melanoms

Melanomzellen können durch T-Zellen des adaptiven Immunsystems spezifisch erkannt und eliminiert werden. Dabei werden Epitope aus antigenen Tumorproteinen über MHC Klasse I (*Major Histocompatibility Complex class I*, Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I) Moleküle an der Zelloberfläche präsentiert, welche durch spezifische T-Zellrezeptoren autologer zytotoxischer CD8⁺ T-Lymphozyten (CTL) erkannt werden können. Dies wiederum führt zur Aktivierung des T-Lymphozyten und nachfolgend zum Tod der Tumorzelle [34, 35]. Hierbei gibt es verschiedene Wege, wie CTLs die Apoptose der Zielzelle induzieren können, z.B. über den Granula abhängigen Exozytoseweg oder über die interzelluläre Interaktion zwischen dem *FS7-associated cell surface antigen* (Fas) und dem Fas Liganden (FasL) sowie durch die Tumor Nekrose Faktor (TNF) vermittelte Induktion des TNF-Rezeptor Type I Signalwegs [36]. Beim Granula abhängigen Exozytoseweg werden in den aktivierten CTLs Granula zur Zell-Zell-Kontaktstelle transportiert und deren Inhalt in die submikroskopische interzelluläre Spalte, die sogenannte Immunologische Synapse, freigesetzt [37]. Die häufigsten lytischen Moleküle, die dabei von den Granula abgesondert werden, sind Perforin, Granzyme und Granulysin. Perforin polymerisiert in der Membran der Zielzelle und bildet dabei Poren. Die Granzyme sowie Granulysin gelangen über einen Perforin-abhängigen Mechanismus in das Zytosol der Zielzelle und induzieren dort verschiedene apoptotische Signalwege [36]. Bei der interzellulären Fas-FasL Interaktion bindet der von den CTLs exprimierte FasL an das von der Zielzelle präsentierte Fas und induziert dadurch die Apoptose dieser Zelle [38], während bei der TNF-induzierten Apoptose das von der aktivierten CTL freigesetzte TNF- α [39, 40] an den TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) der Zielzelle bindet und so diverse Apoptosesignalwege aktiviert [41]. Neben TNF- α sezernieren aktivierte CTLs auch IFN- γ [42]. Dieses Zytokin spielt als endogener Regulator der angeborenen und erworbenen Immunität bei viralen oder intrazellulären bakteriellen Infektionen eine entscheidende Rolle [43] und ist zudem an der Tumor-Kontrolle beteiligt [44].

CTLs sind allerdings nur dann als zytotoxische Effektorzellen aktiv, wenn sie zuvor durch Dendritische Zellen (DC) aktiviert wurden [45]. DCs sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC) des Immunsystems, die Tumorantigene aufnehmen,

prozessieren und die resultierenden antigenen Peptide über MHC Klasse I Moleküle präsentieren können. Bindet der T-Zellrezeptor einer naiven T-Zelle an den Antigenpeptid-MHC Komplex einer stimulatorischen („reifen“) DC, so kommt es zur Aktivierung der CTL. Solche primär aktivierten CTLs können dann wiederum antigenen Peptide auf Tumorzellen (Melanomzellen), die über MHC Klasse I Moleküle präsentiert werden, spezifisch erkennen und eine Lyse der Tumorzellen induzieren. In der nachfolgenden Tabelle sind eine Reihe bekannter Melanom-Antigene aufgelistet (Tab. 1).

Tab. 1: Auflistung einiger gut definierter humaner Melanom-Antigene [46-49]

<p>Melanozyten abstammende Differenzierungsantigene, welche an der Melaninproduktion beteiligt sind</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tyrosinase • <i>Tyrosinase related protein-1</i> (TRP-1) • <i>Tyrosinase related protein-2</i> (TRP-2) • gp100 / Pmel17 • <i>Melanocyte antigen/Melanoma Antigen Recognized by T-cells</i> (Melan-A/MART-1)
<p>Onkofetale-/Hodenkrebs-Antigene, welche normalerweise im Hoden und in der Plazenta exprimiert werden</p> <ul style="list-style-type: none"> • Melanom Antigen (MAGE) Familie • B Melanom Antigen (BAGE) Familie • G Antigen (GAGE) Familie • NY-ESO
<p>Überexprimierte Antigene</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Preferentially expressed antigen of melanoma</i> (PRAME) • <i>Chondroitin sulfate proteoglycan 4</i> (CSPG4) • Survivin
<p>Tumorspezifische Antigene, die aus mutierten Genen hervorgehen</p> <ul style="list-style-type: none"> • β-Catenin • <i>Cyclin-dependent kinase 4</i> (CDK4) • <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i> (CDKN2A) • <i>Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i> (N-ras)

Die Kenntnis der Antigene wird im Rahmen spezifischer Immuntherapien genutzt, wie der Behandlung von Melanompatienten mit Vakzinen bestehend aus Antigen-beladenen DC. Bei der DC Vakzinierung können als Antigenquelle abgetötete Tumorzellen oder Tumorzelllysate, aber auch antigenen Proteine oder Peptide verwendet werden. Ebenfalls kann Antigen kodierende mRNA oder cDNA zur Transfektion der DC eingesetzt werden [50, 51]. Jedoch hatte die DC Vakzinierung bis jetzt nur einen limitierten klinischen Effekt.

Eine weitere spezifische Immuntherapie, mit deutlich verbessertem klinischem Ansprechen, basiert auf dem adoptiven Transfer Tumor-reaktiver T-Zellen. Zunächst werden Tumor infiltrierte Lymphozyten (TIL) *ex vivo* aus den Melanometastasen isoliert. Dazu wird Tumorgewebe entweder enzymatisch aufgeschlossen, in kleine Stücke geschnitten oder physikalisch disaggregiert. Diese Zellsuspensionen werden dann in Medium mit hoher Interleukin-2 (IL-2) Konzentration kultiviert. Anschließend werden die TILs selektioniert, die eine hohe Interferon- γ (IFN- γ) Freisetzung nach Kultivierung mit autologen oder allogenen MHC-angepassten Tumorzelllinien aufweisen. Die stark Tumorantigen-reaktiven T-Zellpopulationen werden dann mittels CD3-spezifischen Antikörpern, IL-2 und bestrahlten *Feeder*-Zellen rasch expandiert. Die Aktivität der TILs wird anschließend noch einmal validiert, bevor sie in den Patienten zurück transferiert werden. Vor dem adoptiven T-Zell Transfer erfolgt bei den Patienten eine nicht-myeloablative Lymphodepletion und/oder eine gesamte Körperbestrahlung, um immunsuppressive regulatorische T-Zellen (Treg) und Lymphozyten zu eliminieren, die gegen die transferierten T-Zellen arbeiten könnten. Mit dieser Methode konnte eine objektive Ansprechrare zwischen 50 und 70% in den Patienten erreicht werden [52-54]. Trotz der hervorragenden Ansprechrare besitzt diese Form der Therapie limitierende Faktoren. So lassen sich nicht die TILs aller Patienten kultivieren. Ebenfalls weisen die tumorspezifischen T-Lymphozyten für die adoptive Immuntherapie oftmals ein schlechtes Wachstum sowie eine geringe Affinität für die tumorspezifischen Antigene auf [55]. Um diesen Effekt zu umgehen, wurden Methoden zur Manipulierung der T-Zellspezifität entwickelt, wie der Transfer von stark affinen TCRs in autologe T-Zellen der Patienten. Morgan *et al.* z.B. transduzierten *ex vivo* autologe T-Zellen mit einem retroviralen Vektor, der die MART-1 TCR α und β Ketten exprimiert, und transferierten diese Zellen zurück in den Patienten. Allerdings fiel die objektive Ansprechrare mit 13% (2 von 15 Patienten) wesentlich geringer aus als bei der Infusion autologer TILs [56]. In einer klinischen Studie 2011 von Robbins *et al.* wurden Patienten, die NY-ESO-1 positive Tumore besaßen, mit autologen anti-NY-ESO-1 TCR-transgenen T-Zellen und IL-2 behandelt. Dabei zeigten 45% (5 von 11 Patienten) der Melanom Patienten eine objektive Reaktion auf die Therapie, wobei zwei Patienten sogar eine komplette Rückbildung der Tumore aufwiesen [57]. Diese TCR-basierende Gentherapie gerichtet gegen NY-ESO-1 präsentiert einen neuen und effektiven therapeutischen Ansatz für Melanompatienten.

3.4 MHC Klasse I Antigen präsentierender Weg

Antigene Peptidpitope, die durch MHC Klasse I Moleküle den CTLs präsentiert werden, bestehen für gewöhnlich aus 8-10 Aminosäuren [58]. Verschiedenste Proteasen und Peptidasen sind an der intrazellulären Generierung von MHC Klasse I Epitopen beteiligt, wie das Proteasom, zytosolische Peptidasen und im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisierte Aminopeptidasen (Abb. 1).

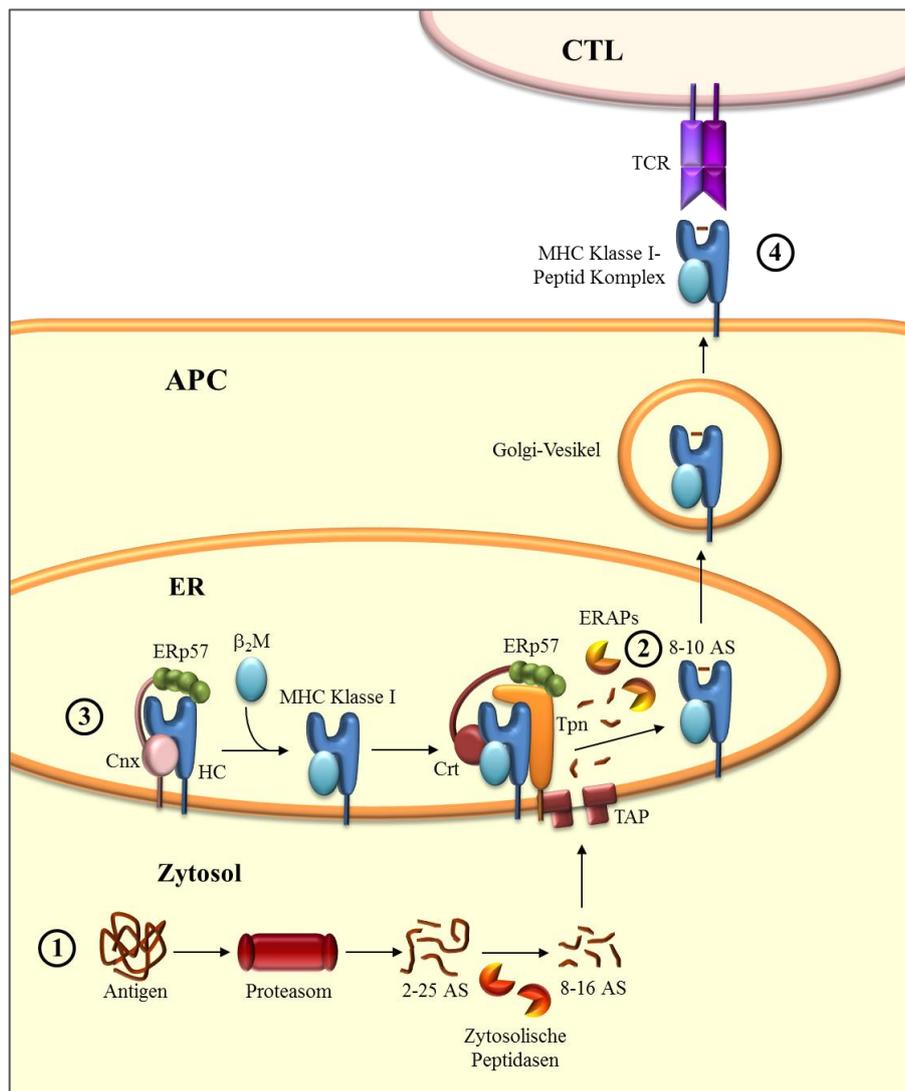


Abb. 1: Darstellung der MHC Klasse I Antigenprozessierung und -präsentation. Antigenprozessierung im Zytosol (1), Antigenprozessierung im ER (2) MHC Klasse I Assemblierung im ER (3), Peptid-MHC Klasse I Präsentation an der Zelloberfläche (4); Antigen präsentierende Zelle (APC), Aminosäure (AS), β_2 -Mikroglobulin (β_2M), Calnexin (Cnx), Calreticulin (Crt), Endoplasmatisches Retikulum (ER), ER Aminopeptidasen (ERAPs), *Major histocompatibility complex* Klasse I (MHC Klasse I), schwere Kette des MHC Klasse I Moleküls (HC), Tapasin (Tpn), *Transporter associated with antigen processing* (TAP), T-Zellrezeptor (TCR), Zytotoxischer T-Lymphozyt (CTL).

Das multi-katalytische Proteasom spaltet das antigene Tumorprotein in Fragmente mit einer Länge von 2-25 Aminosäuren (AS). Dabei definiert das Proteasom den korrekten C-Terminus der meisten Epitopeptide [59, 60]. N-terminal verlängerte Peptidvorläufer können weiter durch zytosolische Peptidasen in kleinere Fragmente geschnitten werden. Peptide mit einer Länge von 8-16 Aminosäuren werden bevorzugt vom *Transporter associated with antigen processing* (TAP) in das Lumen des ER transportiert [61], wo die Beladung der MHC Klasse I Moleküle mit antigenen Epitopen stattfindet. Dabei binden Peptide mit einer Länge von 8 bis 10 Aminosäuren direkt in der Furche des MHC Klasse I Moleküls [62], während bei längeren Peptiden ein N-terminales Trimmen erforderlich wird. Dies kann durch ER lokalisierte Aminopeptidasen (ERAP) erfolgen. Die mit Peptid beladenen MHC Klasse I Moleküle werden dann an die Zelloberfläche transportiert, wo sie durch zytotoxische CD8⁺ T-Lymphozyten erkannt werden können [63].

3.4.1 Das Proteasom

Das Proteasom ist im Zytosol und im Nukleus aller eukaryotischer Zellen zu finden und ist eines der bedeutendsten proteolytischen Systeme, welches für den Abbau von Proteinen in den Zellen verantwortlich ist. Zusätzlich ist es an der Generierung der meisten Peptide beteiligt, die über MHC Klasse I präsentiert werden [64].

Das 26S Proteasom ist der zentrale proteolytische Enzymkomplex des Ubiquitin-Proteasom Systems (UPS) und ist für die Degradation von poly-ubiquitinierten Proteinen verantwortlich. Es besteht aus dem katalytisch aktiven 20S-Proteasom und aus zwei regulatorischen 19S-Untereinheiten, die für das Binden und Entfalten von ubiquitinierten Proteinen verantwortlich sind [65, 66]. Das 20S-Proteasom setzt sich aus 28 Untereinheiten zusammen, die vier übereinander angeordnete Ringe mit je 7 Untereinheiten bilden. Die zwei äußeren Ringe beherbergen jeweils die α -Untereinheiten ($\alpha 1$ - $\alpha 7$) während die zwei inneren Ringe aus den β -Untereinheiten ($\beta 1$ - $\beta 7$) bestehen und das katalytische Zentrum bilden. Für die katalytische Aktivität sind jedoch nur die $\beta 1$ -, $\beta 2$ - und $\beta 5$ -Einheiten verantwortlich [67]. Diese drei Untereinheiten weisen verschiedene proteolytische Aktivitäten auf. So schneidet $\beta 1$ am C-Terminus bevorzugt nach basischen AS, $\beta 2$ nach sauren AS und $\beta 5$ nach hydrophoben AS [68, 69]. Die zwei regulatorischen 19S-Untereinheiten werden jeweils in einen Basis (*base*)- und einen Deckel (*lid*)-Komplex gegliedert. Ein Basis-Komplex besteht aus sechs ATPasen und zwei nicht-ATPase Untereinheiten und interagiert direkt mit einem der äußeren α -Ringe des 20S-Proteasoms

[70]. Der Basiskomplex entfaltet die Proteine in einem ATP abhängigen Prozess. Zusätzlich öffnet er den Eingang zum 20S-Proteasom und transloziert die ungefalteten Proteine in das 20S-Proteasom [66]. Der Deckelkomplex besteht dagegen aus bis zu zehn nicht-ATPase Untereinheiten und beinhaltet sowohl die Bindungsstelle für ubiquitinierte Substrate, nicht ubiquitinierte Substrate als auch Enzyme für den Aufschluss und das Recycling von Ubiquitin Ketten (Abb. 2) [71].

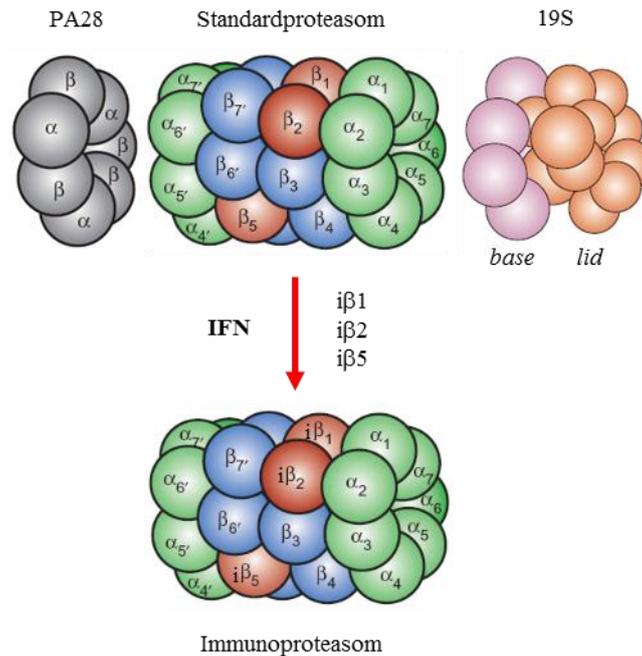


Abb. 2: Aufbau des Proteasoms und Immunproteasoms sowie der 19S und PA28 Regulatoren . Das 26S Proteasom setzt sich aus dem 20S Proteasom und dem 19S Regulator zusammen. Das 20S Proteasom ist aus vier Ringen zusammengesetzt. Die äußeren zwei Ringe bestehen aus α -Untereinheiten (α_1 - α_7) und die zwei inneren Ringe aus β -Untereinheiten (β_1 - β_7). Der 19S Regulator gliedert sich in den Basis-Komplex (*base*), bestehend aus sechs ATPasen und zwei nicht-ATPase Untereinheiten und den Deckel-Komplex (*lid*) mit bis zu zehn nicht-ATPase Untereinheiten. Interferone induzieren das Immunproteasom mit den Immun-Untereinheiten $i\beta_1$, $i\beta_2$ und $i\beta_5$. Ebenfalls kann der PA28 Regulator durch Interferone induziert werden. Bestehend aus drei PA28 α - und vier PA28 β -Untereinheiten bildet dieser einen heptameren Ring, der an einen der äußeren α -Ringe des 20S-Proteasoms bindet und zur Formation des so genannten Hybrid-Proteasoms (19S–20S–PA28) führt. Die Abbildung wurde von Sabrina Urban (Institut für Biochemie, Charité Berlin) zur Verfügung gestellt und beruhen auf den Reviews von P. M. Kloetzel 2001 und 2004 [70, 71].

Ein weiterer Komplex, der mit dem 20S-Proteasom assoziiert, ist PA28 [72]. Es kann durch das immunmodulatorische Zytokin Interferon- γ (IFN- γ) induziert werden [73] und besteht aus 3 PA28 α - und 4 PA28 β -Untereinheiten, die einen heptameren Ring bilden [74, 75]. PA28 bindet an einen der äußeren α -Ringe des 20S-Proteasoms, was zur Formation des so genannten Hybrid-Proteasoms (19S–20S–PA28) führt [76]. PA28 öffnet dabei den Eingang zum 20S-Proteasom und unterstützt so die Aufnahme des Proteinsubstrats. *In*

in vitro Experimente deuten darauf hin, dass PA28 den Spaltungsmechanismus des 20S-Proteasoms verändert und die Generierung von dominanten T-Zellepitopen optimiert [77]. Typ I, Typ II Interferone sowie TNF- α induzieren die Transkription und Translation von drei Immuno-Untereinheiten $i\beta 1$ (LMP2), $i\beta 2$ (MECL-1) und $i\beta 5$ (LMP7). Diese ersetzen ihre konstitutiven Gegenstücke $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ während der Proteasom-Neusynthese [78-80]. Der daraus resultierende Komplex wird Immunproteasom genannt und ist mit einer effizienteren MHC Klasse I Antigen Präsentation assoziiert [81-84]. In *in vitro* Experimenten zur Bestimmung der Schnittspezifität zeigte das Immunproteasom eine erhöhte katalytische Aktivität nach hydrophoben und basischen Aminosäuren sowie eine reduzierte Aktivität nach sauren Aminosäuren im Vergleich zum konstitutiven Proteasom [85]. Diese Aminosäuren werden sehr oft am C-terminalen Ende von Peptiden gefunden, die effizient an MHC Klasse I Moleküle binden [86]. Dies unterstützt die Ansicht, dass das Immunproteasom effektiver in der Antigen Prozessierung ist als das konventionelle Proteasom. Während dies für die meisten viralen Antigene zutrifft, gibt es aber auch Peptidepitope, die nur durch das konstitutive Proteasom effektiv produziert werden [87].

3.4.2 Zytoplasmatische Peptidasen

Das Proteasom ist zweifellos der Enzymkomplex, der beim größten Teil der MHC Klasse I Liganden das korrekte C-terminale Ende generiert [59, 60]. Die meisten dieser Peptide werden jedoch vom Proteasom als N-terminal verlängerte Vorläuferpeptide angefertigt und erfordern ein N-terminales Trimmen durch Aminopeptidasen, die im Zytosol oder im ER lokalisiert sind.

Eine dieser zytosolischen Aminopeptidasen ist die durch IFN- γ induzierbare Leucin Aminopeptidase (LAP). Diese kann zumindest im Zell-freien System reife Epitope von Peptidvorläufern generieren [88]. In LAP-defizienten Zelllinien jedoch konnte weder eine Veränderung in der Generierung von Peptiden noch in der Antigen Präsentation festgestellt werden. Eine zusätzliche Stimulierung mit IFN- γ zeigte gleiche Resultate. LAP-defiziente Mäuse, die viral infiziert wurden, generierten normale CTL Antworten für sieben Epitope, die von drei verschiedenen Viren stammten [89].

Zwei weitere Aminopeptidasen, die im Zytosol identifiziert wurden, sind die Bleomycin Hydrolase (BH) und die Puromycin-sensitive Aminopeptidase (PSA). Diese beiden Enzyme besitzen die Fähigkeit CTL Epitope vom Vesicular Stomatitis Virus aus N-terminal verlängerten Peptidvorläufern *in vitro* zu generieren [90]. BH-defiziente- sowie

PSA-defiziente Mäuse und Zelllinien zeigten hingegen eine normale Epitopräsentierung von N-terminal verlängerten Vorläuferpeptiden. Ebenfalls blieb die MHC Klasse I Expression und auch die CTL Antwort unverändert. Einzig BH/LAP-defiziente Mäuse zeigten eine signifikant erhöhte CTL Antwort für das gp276 Epitop vom lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV), was auf überlappende Funktionen der Aminopeptidasen hindeutet [91, 92]. Interessanterweise waren PSA-defiziente Mäuse kleiner und reproduzierten sich weniger als Wildtyp-Mäuse. Zusätzlich präsentierten DCs von PSA-defizienten Mäusen mehr MHC Klasse I Moleküle an der Zelloberfläche, was darauf hindeutet, dass PSA für gewöhnlich die Antigenpräsentierung in diesen APCs durch den Abbau bestimmter Peptide limitiert. Dieser Effekt konnte jedoch nicht in anderen PSA-defizienten Zellen nachgewiesen werden [92]. Es scheint, dass LAP, BH und auch PSA keine essentielle Rolle in der Generierung von Epitopen besitzen. Jedoch ist es möglich, dass sie bei der Prozessierung von noch unbekanntem Epitopen relevant sind.

Ein weiteres zytosolisches Enzym, das eine spezielle Rolle während des Trimmens von Peptiden spielen dürfte, ist die Tripeptidyl Peptidase II (TPPII). Diese besitzt sowohl die Aktivität einer Exopeptidase als auch einer Endopeptidase. Sie entfernt schrittweise Peptidgruppen bestehend aus drei Aminosäuren vom N-terminalen Ende des Peptidsubstrats (Tripeptidyl Exopeptidase Aktivität) [93]. Epitop Vorläuferpeptide, die länger als fünfzehn Aminosäuren lang sind, werden hauptsächlich von TPPII geschnitten. TPPII ist an der Generierung und Präsentation einiger Epitope beteiligt [94, 95] und scheint auch essentiell für die Proteasom-unabhängige Generierung des HIV-Nef₇₃₋₈₂ Epitops zu sein [96]. Hingegen degradiert TPPII potentielle CTL Epitope, wie das Survivin abgeleitete ELTLGEFLKL Epitop in Kolonkarzinomzellen [97], während die Prozessierung verschiedener LCMV Epitope nicht von TPPII beeinträchtigt wird [98].

Zytosolische Endopeptidasen wie Thimet Oligoendopeptidase (TOP) und Nardilysin können ebenso an der Generierung aber auch an der Degradierung von antigenen Epitopen beteiligt sein. So konnte für TOP gezeigt werden, dass es Peptide, die vom Proteasom freigesetzt werden, abbaut und so die MHC Klasse I Antigenpräsentierung reduziert. Eines dieser Peptide ist das Ovalbumin Epitop SIINFEKL [99, 100]. Andererseits beruht die Generierung eines CTL Epitops vom *Mycobacterium tuberculosis* Protein Hsp65 auf der Aktivität von TOP [101]. Nardilysin hingegen ist an der Prozessierung des Epstein-Barr Virus Epitopes EBNA3C₂₅₈₋₂₆₆ involviert [102].

3.4.3 Peptidtransport in das Endoplasmatische Retikulum

Damit die im Zytosol generierten Peptide an MHC Klasse I Moleküle binden können, müssen diese die Membran des ER durchqueren. Dies geschieht über TAP. Dieser Peptid-Transporter gehört zu der Familie der ABC-Transporter (*ATP-binding cassette*) und befördert zytosolische Peptide in einem ATP-abhängigen Prozess in das Innere des ER. TAP ist ein heterodimerer Komplex, der sich aus den Untereinheiten TAP1 und TAP2 zusammensetzt [103, 104]. Jede dieser Untereinheiten besitzt eine Transmembrandomäne, die den Transportweg für die Peptide bildet, sowie eine Nukleotid-Bindungsdomäne, welche ATP bindet und hydrolysiert [105]. Am N-terminalen Ende der Transmembrandomänen befinden sich vier Transmembran-Helices an die zusätzlich der *Peptid-loading complex* (PLC) über das Chaperon Tapasin binden kann [106]. TAP transportiert generell Peptide mit einer Länge von 8 bis 16 AS in das ER [61]. Dennoch können auch größere Peptide, wenn auch mit einer geringeren Effizienz, durch TAP befördert werden [107]. Der humane TAP-Komplex erkennt während der Peptidbindung hauptsächlich die letzte C-terminale AS sowie die drei ersten N-terminalen AS eines potentiellen Peptidsubstrats. Dabei bevorzugt er hydrophobe oder basische AS am C-terminalen Ende der Peptide, was mit der Bindungsspezifität für humane MHC Klasse I Moleküle korreliert [108]. Ein Prolin an Position 1 bis 3 am N-terminalen Ende hingegen wird von TAP nicht toleriert und führt zu einem ineffizienten Transport der Peptide [109, 110].

Es existieren aber ebenfalls TAP-unabhängige Wege, welche antigenen Peptiden den Eintritt in das ER ermöglichen. Einer dieser Wege führt z.B. über den SEC61 Komplex [111].

3.4.4 Aminopeptidasen des Endoplasmatischen Retikulums

Mitte der 90er Jahre wurde erstmals beschrieben, dass die Proteolyse von antigenen Peptiden nicht nur auf das Zytoplasma beschränkt ist, sondern dass MHC Klasse I Liganden auch im ER prozessiert werden können [112, 113]. In 2002 wurde die ER Aminopeptidase 1 (ERAP1, im murinen System *ER aminopeptidase associated with antigen processing* (ERAAP)) als die Protease identifiziert, die bei der Generierung von MHC Klasse I Peptiden im ER eine wichtige Rolle spielt [114, 115]. Drei Jahre später wurde eine weitere ER Aminopeptidase ERAP2 bestimmt, welche ebenfalls Peptide im ER

trimmen kann [116]. Beide ERAPs gehören zur Familie der M1 Zink Metallopeptidasen. Sie besitzen das für diese Familie typische GAMEN Motiv sowie das HEXXH(X)₁₈E Zink-Bindungsmotiv, was für die enzymatische Aktivität essentiell ist. Die Verwandtschaft dieser beiden Enzyme spiegelt sich auch in ihrer Aminosäuresequenz wieder. So stimmt die Sequenz von ERAP1 zu 50% mit der von ERAP2 überein [117]. Die Expression der ERAP Enzyme wird durch Typ I (IFN- α und IFN- β) [118] und auch Typ II Interferone (IFN- γ) induziert [114, 119]. Ebenfalls kann der Transkriptionsfaktor NF κ B die Expression der ER Aminopeptidasen regulieren [120]. Trotz der aufgeführten Gemeinsamkeiten werden diesen Enzymen jedoch verschiedenste Charakteristika zugeschrieben.

ERAP1

Peptide mit einer Länge von 9-16 AS sind das optimale Substrat für ERAP1 [121], eine Eigenschaft welche identisch zur bevorzugten Peptidlänge des humanen TAP ist [61]. Die meisten dieser Peptide werden von ERAP1 auf 8-9 AS lange Fragmente gekürzt [122] und stellen damit die ideale Größe für die MHC Klasse I Beladung dar [58, 62]. Die ERAP1 Substratspezifität wird durch die Interaktion mit den N- und C-Termini der Peptide bestimmt. Dabei bindet ERAP1 bevorzugt Peptide, die an ihrem C-terminalen Ende große hydrophobe AS tragen, während die Bindung von Peptiden mit einem geladenen C-Terminus weniger effizient ausfällt [121]. Beim N-terminalen Trimmen von Peptiden favorisiert ERAP1 hydrophobe AS wie Leucin [116]. Aber auch AS innerhalb des Peptidsubstrates beeinflussen das N-terminale Trimmen von ERAP1 [123]. So ist dieses Enzym z.B. nicht in der Lage Peptide mit X-Pro-X_n-Motiven zu hydrolysieren [115, 123]. Der Mechanismus jedoch, wie ERAP1 Vorläuferpeptide schneidet, um die optimale Länge für die MHC Klasse I Beladung zu erzielen, ist bis heute nicht entschlüsselt. Es existieren zwei verschiedene Theorien, wie dieser Mechanismus funktionieren könnte: Kanaseki *et al.* postulieren das ‚*Template*‘ Model, bei dem ERAP1 und die MHC Klasse I Moleküle gemeinsam das finale Peptid-Repertoire generieren [124]. Chang *et al.* vertreten dagegen die Ansicht, dass ERAP1 allein N-terminal verlängerte Peptide über einen ‚*Molecular ruler*‘ Mechanismus auf die optimale Länge zur MHC Klasse I Bindung trimmt [121].

Der beachtliche Einfluss von ERAP1 in der MHC Klasse I Antigen Prozessierung wurde erst in ERAP1-defizienten Maus Modellen ersichtlich. Diese Mäuse weisen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen eine 20-50% verringerte MHC Klasse I Expression auf. Die H-2L^d Expression ist sogar bis zu 70% reduziert [125-127]. Bei der Analyse von Antigen-

spezifischen CD8⁺ T-Zellantworten wurden einige virale Epitope gefunden, deren Generierung von ERAP1 abhängig ist, während andere Epitope durch ERAP1 zerstört oder gar nicht beeinflusst werden [128]. So ist die Peptidase z.B. an der Erzeugung verschiedenster Epitope des humanen Cytomegalie-Virus (HCMV) beteiligt [129]. ERAP1 ist nicht nur in die Prozessierung verschiedenster viraler Epitope involviert sondern spielt auch in der parasitären Epitopgenerierung eine wichtige Rolle. So zeigten Blanchard *et al.*, dass die HF10 Epitop Generierung des *Toxoplasma gondii* Antigens GRA6 und die immundominante protektive CD8⁺ T-Zellantwort gegen *T. gondii* die proteolytische Aktivität von ERAP1 erfordert [130]. Verschiedene ERAP1 Polymorphismen werden zudem mit der Entwicklung diverser Krankheiten in Verbindung gebracht, wie der Autoimmunkrankheit *Spondylitis ankylosans* [131], dem hämolytisch-urämischen Syndrom [132], der Hypertonie [133] und der Typ I Diabetes [134]. Eine weitere Bedeutung dieses multifunktionellen Enzyms liegt in der Regulierung des Blutdrucks [135] und der Supprimierung der Angiogenese in humanen Endometriumkarzinom Zellen über das Renin-Angiotensin System [136, 137]. Zudem wurde berichtet, dass ERAP1 an der Freisetzung der Zytokinrezeptoren IL-1-1RII [138], TNFR1 [139] und IL-6R α [140] beteiligt ist.

ERAP2

Die Bedeutung von ERAP2 für die MHC Klasse I Antigenpräsentierung ist bis jetzt nicht so umfassend erforscht wie für ERAP1, was auch daran liegt, dass bislang im murinen System kein ERAP2 Homolog gefunden werden konnte. ERAP2 bevorzugt im Vergleich zu ERAP1 basische Aminosäuren sowohl am C-terminalen als auch am N-terminalen Ende von Peptidsubstraten [116] und erhöht so die hydrolytische Kapazität des ERs. Tanioka *et al.* demonstrierten, dass rekombinantes ERAP2 *in vitro* das TPGPGVRY Epitop des HIV-1 Nef Antigens aus Vorläuferpeptiden generieren kann [117]. In Kopräzipitations-Experimenten konnte zusätzlich gezeigt werden, dass ERAP2 mit ERAP1 einen heterodimeren Komplex bilden kann. Durch diese physikalische Interaktion sind die ERAPs gemeinsam in der Lage, lange N-terminale Peptidenden, welche hydrophobe und basische AS enthalten, abzubauen. So generiert das ERAP1/2-Heterodimer *in vitro* aus dem K15I (KIRIQRGPGRAFVTI) Vorläuferpeptid, das vom HIV IIIB Hüllprotein (Env) stammt, den natürlichen MHC Klasse I Liganden G9I [116]. Eine Herabregulation von ERAP2 durch siRNA führt zu einer partiellen Suppression der MHC Klasse I Oberflächenexpression von ca. 10 % [116]. Zusätzlich zeigten Andrés *et al.*, dass ein

Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) (rs2248374-G) in ERAP2 eine atypische Spleißvariante der ERAP2 mRNA hervorruft, die ein verkürztes Protein kodiert. Diese ERAP2 mRNA wird über den *Nonsense-mediated mRNA decay* Mechanismus abgebaut, sodass keine ERAP2 Proteinexpression mehr nachweisbar ist. Das ERAP2 Defizit resultierte in einer leicht reduzierten MHC Klasse I Oberflächenpräsentation in B-Lymphozyten [141], was darauf hindeutet, dass ERAP2 eine Rolle in der MHC Klasse I Antigenpräsentierung spielt. Weitere SNPs im ERAP2 Gen sind mit verschiedenen Krankheiten, wie Präeklampsie [142], Morbus Crohn [143] und *Spondylitis ankylosans* assoziiert [144].

3.4.5 Peptidbeladung von MHC Klasse I Molekülen

Die Beladung der MHC Klasse I Moleküle mit antigenen Peptiden erfolgt im Lumen des ERs. Bevor jedoch MHC Klasse I Moleküle Peptide binden und an der Zelloberfläche zytotoxischen T-Zellen präsentieren, unterziehen sie sich zuvor einem stringenten Reifungsprozess. Dabei interagieren sie transient mit verschiedenen Komponenten der ER-Qualitätskontrollmaschinerie. Zu Beginn der MHC Klasse I Reifung bindet zunächst das Chaperone *Binding immunoglobulin protein* (BiP) gefolgt von Calnexin, das mit der Oxidoreduktase ERp57 assoziiert ist, an die neu synthetisierten schweren Ketten der MHC Klasse I Moleküle [145, 146]. Diese Moleküle verhindern die vorzeitige Degradation der unreifen Proteine und vermitteln die Faltung sowie die Heterodimerisierung der schweren MHC Klasse I Kette mit dem β_2 -Mikroglobulin (β_2 M) [146-148]. Die dabei entstehende Konformationsänderung führt zur Dissoziation des Calnexin und zur raschen Rekrutierung des MHC Klasse I Moleküls in den *Peptide loading complex* (PLC). Im PLC ist der Peptidtransporter mit dem Beladungskomplex der MHC Klasse I Moleküle ko-lokalisiert. Der PLC setzt sich aus dem Lectin-ähnlichen Chaperon Calreticulin, ERp57 sowie aus TAP und Tapasin zusammen [149] (Abb. 1). Nachdem sich Calnexin vom MHC Klasse I Molekül gelöst hat, bindet Calreticulin an die schwere Kette des MHC Klasse I Heterodimers. Unterstützt durch ERp57 fördert es die korrekte Faltung der Glykoproteine [150]. Weiterhin gibt es Hinweise, dass Calreticulin das MHC Klasse I Molekül zum PLC eskortiert [151]. Verschiedene Publikationen deuten zusätzlich darauf hin, dass sowohl die Calreticulin-ERp57 Konjugation als auch die Calreticulin-MHC Klasse I Interaktion eine wichtige Rolle bei der Calreticulin vermittelten Stabilisierung der schweren MHC Klasse I Kette sowie des Tapasin/ERp57 Heterodimers im PLC spielen [151, 152]. Das

Glykoprotein Tapasin stellt die Verbindung zwischen TAP und den übrigen PLC Komponenten dar. Mit der transmembranen Domäne bindet Tapasin effizient an TAP, während die ER lumenale Domäne mit dem MHC Klasse I Molekül und dem ERp57 interagiert [153, 154]. Während dieser Interaktionen vermittelt Tapasin auf der einen Seite die Stabilisierung von TAP und verstärkt somit den Peptid-Import in das ER [155]. Auf der anderen Seite unterstützt es die antigene Peptidbeladung der MHC Klasse I Moleküle und optimiert dabei das Peptidrepertoire [156]. Die Arbeiten von Wearsch and Cresswell deuten darauf hin, dass nur ERp57 konjugiertes Tapasin in der Lage ist, leere MHC Klasse I Moleküle zu stabilisieren und stabile Peptid-MHC Klasse I Komplexe zu generieren [157]. Nachdem MHC Klasse I Moleküle Peptide optimaler Länge gebunden haben, dissoziieren sie vom PLC und verlassen das ER [158]. Durch *Coat protein complex II* (COPII)-beschichtete Vesikels und das *cis*-Golgi Netzwerk gelangen die Peptid-MHC Klasse I Komplexe an die Zelloberfläche [159], wo die antigenen Peptide den CTLs präsentiert werden.

4 Zielstellung

ER Aminopeptidasen (ERAPs) sind an der finalen Prozessierung von viralen sowie parasitären Peptiden beteiligt, die über MHC Klasse I Moleküle an CTLs präsentiert werden. Über die Bedeutung dieser Peptidasen in der Prozessierung von Tumor-assoziierten Peptidepitopen ist jedoch bislang wenig bekannt.

Daher war ein Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von ERAP1 auf die Erkennung der Melanomzellen durch CTLs zu analysieren. Diese Untersuchungen sollten im autologen Tumor-CD8⁺ T-Zell System des Melanompatienten Ma-Mel-86 durchgeführt werden. In Zelllinien aus verschiedenen Metastasen dieses Patienten sollte zunächst eine stabile Herabregulation von ERAP1 etabliert werden, um in einem weiteren Schritt die Auswirkungen der ERAP1 Herabregulation in den Melanomzellen auf die autologe T-Zellerkennung untersuchen zu können.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Kenntnisse über die Regulation der Peptidasen ERAP1 und ERAP2 in Melanomzellen zu erhalten. Da derzeit die immunmodulierenden Eigenschaften von Chemotherapeutika intensiv untersucht werden, sollte der Einfluss von Doxorubicin auf die ERAP1 und ERAP2 Expression bestimmt werden. Dazu sollte sowohl die Promotoraktivität beider Aminopeptidasen als auch die mRNA- und Proteinexpression nach Doxorubicinbehandlung bestimmt werden. Des Weiteren sollten mögliche Signalwege charakterisiert werden, welche die ERAP1 und ERAP2 Expression nach Zytostatikabehandlung regulieren können.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Zellen

Zelllinie	Ursprung/Charakteristika	Quelle
HCT116	Humanes Kolon Karzinom/Zelllinie	Bert Vogelstein, John Hopkins Universität
HCT116 p53 ^{-/-}	Humanes Kolon Karzinom/Zelllinie	Bert Vogelstein, John Hopkins Universität
Ma-Mel-47	Humanes Melanom/Zelllinie	AG Paschen, Klinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Essen [160]
Ma-Mel-61a	Humanes Melanom/Zelllinie	AG Paschen, Klinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Essen
Ma-Mel-61b	Humanes Melanom/Zelllinie	AG Paschen, Klinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Essen
Ma-Mel-61f	Humanes Melanom/Zelllinie	AG Paschen, Klinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Essen
Ma-Mel-61g	Humanes Melanom/Zelllinie	AG Paschen, Klinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Essen
Ma-Mel-61h	Humanes Melanom/Zelllinie	AG Paschen, Klinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Essen
Ma-Mel-86a	Humanes Melanom/Zelllinie	AG Paschen, Klinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Essen [161]
Ma-Mel-86b	Humanes Melanom/Zelllinie	AG Paschen, Klinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Essen [161]
Ma-Mel-86c	Humanes Melanom/Zelllinie	AG Paschen,

Zelllinie	Ursprung/Charakteristika	Quelle
		Klinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Essen
Ma-Mel-86f	Humanes Melanom/Zelllinie	AG Paschen, Klinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Essen
UKRV-Mel-15a	Humanes Melanom/Zelllinie	[162]
1A/39	CD8 ⁺ T-Lymphozyten/T-Zell Klon	Silke Lubojanski AG, Dr. Thomas Wölfel, III Med. Klinik, Universitätsklinikum Mainz
2C/165	CD8 ⁺ T-Lymphozyten/T-Zell Klon	Silke Lubojanski AG, Dr. Thomas Wölfel, III Med. Klinik, Universitätsklinikum Mainz
2C/18	CD8 ⁺ T-Lymphozyten/T-Zell Klon	Silke Lubojanski AG, Dr. Thomas Wölfel, III Med. Klinik, Universitätsklinikum Mainz
2C/77	CD8 ⁺ T-Lymphozyten/T-Zell Klon	Silke Lubojanski AG, Dr. Thomas Wölfel, III Med. Klinik, Universitätsklinikum Mainz

Bakterien

One Shot TOPTEN (Invitrogen): chemisch kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*)

5.1.2 Oligonukleotide

Oligonukleotid-Primer für PCR

Primer	Primer-Sequenz 5' → 3'	Restriktions- schnittstelle	Fragment- größe	Annealing- Temp.
ERAP1promotor sense B	ata aga ggt acc acc gta gtt gag tct tgg aac	<i>KpnI</i>	1745 bp	61 °C
ERAP1_AS	ata aga aag ctt ctc acc ctt gcg ccg	<i>HindIII</i>		61 °C

Primer	Primer-Sequenz 5' → 3'	Restriktions- schnittstelle	Fragment- größe	Annealing- Temp.
ERAP2promotor sense A	ata aga ggt acc tgg gag gat cat ttg agc tc	<i>KpnI</i>	1081 bp	68 °C
ERAP2promotor antisense B	ata aga ctc gag cat gct gct gca gat ttg ac	<i>XhoI</i>		68 °C

Small interfering RNA (siRNA) Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' → 3'	Firma
ERAP1 sense 2	GCU AUU ACA UUG UGC AUU A dTdT	EUROGENTEC
ERAP1 antisense 2	UAA UGC ACA AUG UAA UAG C dTdT	EUROGENTEC
ERAP1 sense 3	GGG CAA GUC UCA UUA ACA A dTdT	EUROGENTEC
ERAP1 antisense 3	UUG UUA AUG AGA CUU GCC C dTdT	EUROGENTEC
ERAP1 sense 4	CAA GAU AAA UCA AGC AGA U dTdT	EUROGENTEC
ERAP1 antisense 4	AUC UGC UUG AUU UAU CUU G dTdT	EUROGENTEC
ERAP1 sense 5	GAU AGU AUG GCA AGU AUU U dTdT	EUROGENTEC
ERAP1 antisense 5	AAA UAC UUG CCA UAC UAU C dTdT	EUROGENTEC
Negativ KO siRNA sense	UUC UCC GAA CGU GUC ACG U dTdT	Qiagen
Negativ KO siRNA antisense	ACG UGA CAC GUU CGG AGA A dTdT	Qiagen

small hairpin RNA (shRNA) Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' → 3'	Hersteller
ERAP1_shRNA_sense	ACC TCG CTA TTA CAT TGT GCA TTA TCA AGA GTA ATG CAC AAT GTA ATA GCT T	euofins MWG GmbH
ERAP1_shRNA_antis	CAA AAA GCT ATT ACA TTG TGC ATT ACT CTT GAT AAT GCA CAA TGT AAT AGC G	euofins MWG GmbH

TaqMan Gene Expression Assay (20x) für real-time PCR von Applied Biosystems

Name	Applied Biosystems Ref.	Fluorophor/Quencher
ERAP1	Hs00429970_m1	FAM/MGB
ERAP2	Hs01073631_m1	FAM/MGB
GAPDH	4352934E	FAM/MGB
HERPUD1	Hs01124269_m1	FAM/MGB

5.1.3 Plasmide

Name	Quelle	Verwendungszweck
psiRNA-h7SK-GFPzeo	InvivoGen	Leerplasmid für shRNA Expression
psiRNA-h7SK-GFPzeo-scramble	InvivoGen	Kontroll shRNA Expression
psiRNA-h7SK-GFPzeo-ERAP1 shRNA	Christin Seifert	ERAP1 shRNA Expression
pGL4.10[luc2] Vektor	Promega	Leerplasmid, Promotoranalysen, Luziferase Firefly
pGL4.10+ERAP1 Promotor 308 bp	AG Sucker, Dermatologie Universitätsklinikum Essen	Promotoranalysen, Luziferase Firefly
pGL4.10+ERAP1 Promotor 1745 bp	Christin Seifert	Promotoranalysen, Luziferase Firefly
pGL4.10+ERAP2 Promotor	Christin Seifert	Promotoranalysen, Luziferase Firefly
pGL4.13 (CMV Promotor)	Promega	Promotoranalysen, Positivkontrolle, Luziferase Firefly
pGL4.74 (HSV-TK Promotor)	Promega	Promotoranalysen, Referenz für die Normalisierung, Renilla Firefly

5.1.4 Restriktionsenzyme

Name	Hersteller	Schnittstelle 5' → 3' 3' ← 5'	Aktivität [U/μl]
<i>Bbs</i> I mit 10x NEB Puffer 2	New England BioLabs	GAAGAC (N) ₂ CTTCTG (N) ₆	5
<i>Hind</i> III mit 10x Puffer R	Fermentas	A AGCTT TTCGA A	10
<i>Kpn</i> I mit 10x Tango Puffer	Fermentas	GGTAC C C CATGG	10
<i>Nco</i> I mit 10x Tango Puffer	Fermentas	C CATGG GGTAC C	10
<i>Spe</i> I mit 10x Puffer B	Promega	A CTAGT TGATC A	10
<i>Xho</i> I mit 10x Tango Puffer	Fermentas	C TCGAG GAGCT C	10

5.1.5 Ligase, Reverse Transkriptase und DNA-Polymerasen

Produkt	Hersteller	Verwendungszweck
DFS-Taq DNA Polymerase	BIORON	PCR
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits	Applied Biosystems	Reverse Transkription
T4 DNA Ligase (3U/μl)	Promega	Ligation
VELOCITY™ DNA Polymerase	BIOLINE	PCR, Sequenzierung

5.1.6 Antikörper

Antikörper und Kits für ELISA und ELISPOT

Antikörper	Hersteller	Verwendungszweck
mAK 1-D1K, 1 mg/ml	MABTECH AB	IFN- γ ELISA, ELISPOT
mAK 7-B6-1-Biotin	MABTECH AB	IFN- γ ELISA, ELISPOT
ELISA für Humanes Interleukin-6 (mAK 13A5, (1mg/ml), biotinylierter mAK 39C3 (1mg/ml), rekombinantes humanes IL-6 Standard)	MABTECH AB	IL-6 ELISA

Antikörper für Western Blot

Antikörper	Spezifität	Größe des detektierten Proteins (kDa)	Hersteller
Anti-human Aminopeptidase PILS/ARTS1 Antikörper	Ziege polyklonaler AK	110	R&D SYSTEMS
Anti-human ERAP2 (3F5)	Maus mAK	110	Hybridom 3F5
GAPDH (14C10)	Kaninchen mAK	37	Cell Signaling
IRF-1 (C-20)	Kaninchen polyklonaler AK	48	Santa Cruz Biotechnology
IRF-2 (TQ-5)	Maus mAK	50	Santa Cruz Biotechnology
IRF-3 (D83B9)	Kaninchen mAK	45/55	Cell Signaling
IRF-7 Antibody	Kaninchen polyklonaler AK	65	Cell Signaling
Purified Mouse Anti-Human ISGF3 γ (IRF9)	Maus mAK	48	BD Biosciences
ISG15 Antibody	Maus mAK	15	Hybridom
NF κ B p50 (H-119)	Kaninchen polyklonaler AK	50	Santa Cruz Biotechnology
NF κ B p65 (F-6)	Maus mAK	65	Santa Cruz Biotechnology
p21 (F-5)	Maus mAK	21	Santa Cruz

Antikörper	Spezifität	Größe des detektierten Proteins (kDa)	Hersteller
			Biotechnology
p53 (DO-1)	Maus mAK	53	Santa Cruz Biotechnology
Phospho-STAT1 (Tyr701) (58D6)	Kaninchen mAK	84/91	Cell Signaling
Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7)	Kaninchen mAK	79/86	Cell Signaling
Pme117 (K-18) (gp100)	Ziege polyklonaler AK	76/100	Santa Cruz Biotechnology
STAT1 (9H2)	Maus mAK	84/91	Cell Signaling
STAT3 Antikörper	Maus polyklonaler AK	79/86	Cell Signaling
Donkey anti-goat IgG-HRP	ECL, Esel polyklonaler AK anti-Ziege	-	Santa Cruz Biotechnology
ECL TM Anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from donkey)	ECL, Esel polyklonaler AK anti-Kaninchen	-	Amersham Biosciences
Goat Anti-Mouse IgG2a (γ_{2a} chain specific)-HRP, Human Adsorbed	ECL, Ziege polyklonaler AK anti-Maus	-	Southern Biotech
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	ECL, Ziege polyklonaler AK anti-Maus	-	Jackson ImmunoResearch Laboratories
Polyclonal Rabbit Anti-Goat Immunoglobulins/HRP	ECL, Kaninchen polyklonaler AK anti-Ziege	-	Dako

Antikörper für Durchflusszytometrie

1. Antikörper bzw. Isotyp-Kontrolle	Antigen	Isotyp	einzusetzende Menge des AK
Anti-Melanoma-PE, human (MCSP) (Miltenyi Biotec)	CSPG4	Maus IgG	3 µl
bulk monoclonal Antibody HLA-A1, A11, A26+ (10x) (ONE LAMBDA INC.)	HLA-A1, A11, A26	Maus IgM	1 µl
Hybridomüberstand W6/32	HLA Klasse I	Maus IgG	5 µl
Hybridomüberstand B1.232	HLA-B/C	Maus IgG	20 µl
IgG1 (Mouse)-PE (Beckmann Coulter)	Isotyp-Kontrolle	Maus IgG	3 µl

2. Antikörper	Antigen	Verdünnung (in A. dest.)	einzusetzende Menge des verdünnten AK
R-Phycoerythrin-conjugated AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (DIANOVA)	Maus IgG	1:2	1 µl
F(ab') ₂ -Fragment Esel anti- Maus IgM - Cy3 (DIANOVA).	Maus IgM	1:10	2 µl

5.1.7 Zytokine

Zytokine	Hersteller	Verwendungszweck
IL-2 (22 MIU/1,3 mg)	Chiron Corporation	CD8 ⁺ T -Zellstimulierung
rekombinantes humanes IFN-γ	PeptoTech	IFN-γ ELISA, Behandlung von Tumorzellen

5.1.8 Medien, Zusätze, Testsysteme

Produkt	Hersteller	Verwendungszweck
Ampicillin	SIGMA-ALDRICH	Klonierung
AIM V® Medium	Invitrogen	Zellkultur
BCIP®/NBT Liquid Substrate System	SIGMA-ALDRICH	IFN- γ ELISPOT
DNase I, RNase-free	Qiagen	RNA-Isolierung
Deoxynucleotide Mix	STRATAGENE	PCR
Dual-Glo Luciferase Assay System	Promega	Promotor Luciferase Test
Dulbecco's PBS 1x (DPBS)	PAA THE CELL CULTURE COMPANY	Zellkultur
Expand High Fidelity PCR System	Roche	PCR für Sequenzierung und Klonierung
ExtrAvidin-Alkaline Phosphatase	SIGMA-ALDRICH	IFN- γ ELISPOT
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA THE CELL CULTURE COMPANY	Zellkultur
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Fermentas	Plasmid-Minipräparation
O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas	Gelelektrophorese
HiSpeed Maxi Prep Kit	Qiagen	Plasmid-Maxipräparation
Lipofectamine 2000 Transfection Reagent	Invitrogen	Transfektion
Opti-MEM	GIBCO	siRNA-Transfektion
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas	Gelelektrophorese Proteine
Penicillin/Streptomycin (100x) (Penicillin 10000 U/ml, Streptomycin 10 mg/ml)	PAA THE CELL CULTURE COMPANY	Zellkultur
Alkaline Phosphatase Yellow (pNPP) Liquid Substrate System for ELISA	SIGMA-ALDRICH	ELISA

Produkt	Hersteller	Verwendungszweck
5x Reporter Lysis buffer	Promega	Zellyse für Promotor Luciferase Test
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen	RNA-Isolierung
RPMI 1640	PAA THE CELL CULTURE COMPANY	Zellkultur
TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)	Applied Biosystems	Real time PCR
10 x Trypsin EDTA	PAA THE CELL CULTURE COMPANY	Zellkultur
X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent	Roche	siRNA Transfektion
Zeocin	Invivogen	Klonierung, stabile Transfektion

5.1.9 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamide:N-N'-methylene-bis-acrylamide Electrophoresis Purity Reagent 30 %	BIO-RAD
Agar-Agar (Select Agar)	Invitrogen
Agarose	SIGMA-ALDRICH
Ammonium persulfate, for electrophoresis 98 %	SIGMA-ALDRICH
Bovines Serum Albumin (2 mg/ml)	BIO-RAD
Bovines Serum Albumin Typ H1 (BSA)	GERBU
Bromphenolblau	SIGMA-ALDRICH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	MERCK
1,4-Dithiothreitol (DTT)	BOEHRINGER MANNHEIM GmbH
Doxorubicin	SIGMA-ALDRICH
Essigsäure 100 % (Eisessig)	MERCK

Bezeichnung	Hersteller
Ethanol	VWR, AnalaR NORMAPUR
Ethidiumbromid	SIGMA-ALDRICH
Formaldehydlösung 37 %, säurefrei	MERCK
Glycerin	ROTH
Glycin	ROTH
Hefeextrakt	GERBU
Luminol sodium salt	SIGMA-ALDRICH
Magnesiumchlorid-Hexyhydrat (MgCl ₂)	ROTH
β-Mercaptoethanol	MERCK
Methanol	Fluka, MERCK
Milchpulver, Blotting grade	ROTH
Natriumnitrat (NaN ₃)	Fluka
Natriumchlorid (NaCl)	Fluka
Natriumlaurylsulfat DAB10 (SDS)	GERBU
N-N'-methylene-bis-acrylamide Electrophoresis Purity Reagent 30 %	BIO-RAD
N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine Electrophoresis Reagent (TEMED)	SIGMA-ALDRICH
Para-Hydroxycoumarinsäure	SIGMA-ALDRICH
Ponceau solution	SIGMA-ALDRICH
Tris (Trizma Base)	AppliChem
Tris-HCl (Trizma Hydrochloride)	SIGMA-ALDRICH
Triton X	GERBU
Trypanblau 0,5 % (w/v)	BIOCHROM AG
Trypton/Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut	ROTH
Tween20	GERBU
Wasserstoffperoxid 30 % (H ₂ O ₂)	MERCK

5.1.10 Einweg- und Mehrweg-Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
3 MM Chromatographie-Papier, Whatman® 46x57 cm	GE Healthcare
6 Well Zellkulturtestplatte	TPP
24 Well TC-Plate, sterile, with lid	Greiner bio-one
96 Well Cell Culture Plate, sterile, U-bottom, with lid	Greiner bio-one
96 Well ELISA-Plate, MICROLON, F-bottom, high binding	Greiner bio-one
96 Well MICROTTEST™ Tissue Culture Plate, F-bottom, with lid	BECTON DICKINSON
96 Well Multi® Fast PCR Platte	SARSTEDT
96 Well MultiScreen® Filter Plates	Millipore
96 Well Microplates, half area, UV-STAR	Greiner bio-one
96 Well Microplates, PS, F-bottom	Greiner bio-one
96 Well white Assay Plate, F-bottom	Costar
Amersham™ Hybond™-ECL	GE Healthcare
Amersham Hyperfilm™ ECL 18x24 cm	GE Healthcare
CELLSTAR® Cell Culture Flasks, 25 cm ² , 50 ml, PS, red filter cap, sterile	Greiner bio-one
CELLSTAR® Cell Culture Flasks, 75 cm ² , 250 ml, PS, red filter cap, sterile	Greiner bio-one
Einfrierboxen natur, mit Einteilung	GLW
Einmalpipetten CELLSTAR 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner bio-one
Glas Messpipette 5 ml, 10 ml, 20 ml	Hirschmann® EM Techcolor
Kryo-Einfrier-Behälter	Nalgene
Kryo-Röhrchen 2 ml	Greiner bio-one
MACS MS Separationssäulen	Miltenyi Biotec
Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System	BIO-RAD
Neubauer-Zählkammer	BRAND

Bezeichnung	Hersteller
Optical Adhesive Cover	Applied Biosystems
Pasteurpipetten unsteril	Oehmen Laborbedarf
PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0,2 ml farblos	Biozym Scientific GmbH
Petrischalen TC 20 mm	Greiner bio-one
Pipettenspitzen 20 µl, 250 µl, 1 ml	RAININ
Pipettenstopfwatte	Oehmen Laborbedarf
PP CELLTAR® Tubes 15 ml	Greiner bio-one
PP CELLTAR® Tubes 50 ml	Greiner bio-one
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße 2 ml	Eppendorf
Zellschaber, 28 cm	Greiner bio-one

5.1.11 Laborgeräte

Geräte	Hersteller
Autoklav VX-95	Systemec
Biofuge pico	Heraeus Instruments
Brutschrank B 20	Heraeus Instruments
CO ₂ Brutschrank	BINDER
Dark Hood DH-40/50	biostep
Durchflusszytometer GALLIOS	Beckmann Coulter
Enduro Power Supplies	Labnet
Eismaschine AF100	Scotsman
infiniteM200	TECAN
Inverses Labormikroskop WILOVERT Standard	Hund Wetzlar
Gelelektrophorese Kammer SUB-CELL® GT	BIO-RAD

Geräte	Hersteller
Gekühlte Mikroliterzentrifuge Z 216 MK	Hermle Labortechnik
Gene Pulser X cell	BIO-RAD
Kühl-/Gefrierschrank 4°C / -20°C /-80°C	LIEBHERR, Heraeus
Mikroskop LEICA DMLS	Leica
Mikrowelle 700	SEVERIN
Mini Trans-Blot Cell, Western Blot System	BIO-RAD
Mini Zentrifuge MCF-2360	Laboratory & Medical Supplies
MIXER UZUSIO VTX-3000L	Laboratory & Medical Supplies
MULTIFUGE 3 S-R	Heraeus Instruments
Multifunktionaler Wärme-/Trockenschrank FED240	BINDER
pH 510 CyberScan	EUTECH INSTRUMENTS
Peltier Thermal Cycler	BIO-RAD
PIPETTE PLUGGER	BELLCO Biotechnology
Pipette LTS 0,5-10 µl	RAININ
Pipette LTS 10-100 µl	RAININ
Pipette LTS 100 µl-1 ml	RAININ
Pipette Mehrkanal LTS 20-200 µl	RAININ
Pipettierhilfe FASTPETTE V-2	Labnet
PowerPac™HC	BIO-RAD
Real-Time PCR System StepOnePlus	Applied Biosystems
Rollator TRM 50	IDL GmbH & Co, KG
Röntgenkassette 18x24 cm	Dr. Goos Suprema GmbH
Rühr-/Heizplatte IKA-COMBIMAG RCT	Janke & Kunkel KG
Schüttler MAXQ4000	Thermo SCIENTIFIC
Sterile Werkbank BIOWIZARD Xtra	KOJAIR
Sterile Werkbank HERA _{SAFE} KS	Thermo SCIENTIFIC

Geräte	Hersteller
Thermomixer compact	Eppendorf
TITRAMAX 100	Heidolph
Vollautomatischer Pipettenspüler PSD	Hölzel
VORTEMP 56	Labnet
Waage ALJ 220-5DNM	KERN & Sohn GmbH
Waage EW6000-1M	KERN & Sohn GmbH
Wasserbad GFL	Fischer & Rintelen GmbH
Zentrifuge ROTANTA 460R	Hettich

5.1.12 Medien

Medien für eukaryotische Zellkulturen

RPMI1640: (Roswell Park Memorial Institute) Dieses Medium enthält L-Glutamin und wurde für die Zellvermehrung eukaryotischer Zellen mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt.

AIM V® Medium: Dieses Medium enthält L-Glutamin, 50 µg/ml Streptomycinsulfat und 10 µg/ml Gentamycin. Es diente der Kultivierung von T-Lymphozyten. Es wurden 10% humanes Serum, 1% Penicillin/Streptomycin und 250 IU/ml IL-2 hinzugefügt.

Einfriermedium: 90% FCS
10% DMSO

Medium für Bakterienkulturen

LB-Medium: 10 g Trypton/Pepton aus Casein
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert

LB_{Zeocin}-Medium: LB-Medium mit Zusatz von 100 µg/ml Zeocin

LB_{Ampicillin}-Medium: LB-Medium mit Zusatz von 150 µg/ml Ampicillin

LB-Agar: 12-14 g Agar-Agar
10 g Trypton/Pepton aus Casein
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt, autoklaviert und in Petrischalen gegossen

5.1.13 Puffer und Lösungen für Gelelektrophorese

50x TAE: 242 g Tris-Base
57,1 ml Eisessig
100 ml 0,5 M EDTA pH8
mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt

1%iges Agarosegel: 1,2 g Agarose
120 ml 1x TAE-Puffer
3 µl Ethidiumbromid

DNA-Probenpuffer: 30% Glycerin (3 ml Glycerin + 7 ml Aqua dest.)
(6x) 0,25% Bromphenolblau (25 mg)

5.1.14 Puffer und Lösungen für die Zellkultur und Zellanalyse

2 x Trypsin/EDTA: wurde zum Ablösen adhärenter eukaryotischer Zellen vom Kulturgefäß verwendet, 10 x Trypsin/EDTA wurde in sterilem Aqua dest. auf 2 x verdünnt

Trypanblau: für Zellzahlbestimmung
3,6 ml Trypanblau
6,4 ml 1x DPBS

Mini MACS Puffer:	1x	DPBS
	2 mM	EDTA
	0,5%	BSA
FACS-Puffer:	500 ml	1x DPBS
	50 ml	FCS
3,7% Formaldehyd:	450 ml	1x DPBS
	50 ml	37%iges Formaldehyd

5.1.15 Puffer und Lösungen für Proteinisolierung und Western Blot

Triton X-Lysispuffer:	50 mM	Trizma-Base
	50 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂
	0,1%	Triton X
10% SDS:	50 g	SDS
	500 ml	Aqua dest.
10 % Ammoniumpersulfat:	1 g	Ammoniumpersulfat
	10 ml	Aqua dest.
1,5 M Tris (pH 8,8): (für Trenngel)	90,85 g	Trizma Base
	20 ml	10% SDS
	mit Aqua dest. auf 500 ml aufgefüllt	
1 M Tris (pH 6,8): (für Sammelgel)	15,15 g	Trizma Base
	10 ml	10% SDS
	mit Aqua dest. auf 250 ml aufgefüllt	

Material und Methoden

10%iges Trenngel:	1,9 ml	H ₂ O
	1,7 ml	30% Acrylamid Mix
	1,3 ml	1,5 M Tris (pH 8,8)
	0,05 ml	10% SDS
	0,05 ml	10% Ammoniumpersulfat
	0,002 ml	TEMED
Sammelgel:	0,68 ml	H ₂ O
	0,17 ml	30% Acrylamid Mix
	0,13 ml	1 M Tris (pH 6,8)
	0,01 ml	10% SDS
	0,01 ml	10% Ammoniumpersulfat
	0,001 ml	TEMED
4x Probenpuffer: (nach Laemmli)	0,25 M	Tris-HCL pH6,8
	8%	SDS
	40%	Glycerin
	20%	β-Mercaptoethanol
	Spatelspitze	Bromphenolblau
10x Laufpuffer:	60 g	Trizma Base
	20 g	SDS
	288 g	Glycin
	mit Aqua dest. auf 2 l aufgefüllt	
1x Laufpuffer:	100 ml	10x Laufpuffer mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt
10x Blotpuffer:	60 g	Trizma Base
	7,48 g	SDS
	290 g	Glycin
	mit Aqua dest. auf 2 l aufgefüllt	

Material und Methoden

1x Blotpuffer:	100 ml	10x Blotpuffer
	200 ml	Methanol 99%
	mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt	
0,1% Waschlösung:	2 ml	Tween20
	2 l	1x DPBS
5%ige Magermilch:	5 g	Magermilchpulver
	100 ml	0,1% Waschlösung
5%iges BSA:	5 g	Bovines Serum Albumin
	100 ml	0,1% Waschlösung
Lösung A:	im Kühlschrank lagern	
	200 ml	0,1 M Tris-HCl pH 8,6
	50 mg	Luminol
Lösung B:	bei Raumtemperatur dunkel lagern	
	11 mg	para-Hydroxycoumarinsäure
	10 ml	Dimethylsulfoxid
ECL-Detektionsreagenz:	4 ml	Lösung A
	1,2 µl	30% H ₂ O ₂
	400 µl	Lösung B

5.1.16 Puffer und Lösungen für ELISA bzw. ELISPOT

DPBS-Tween20:	200 ml	10x DPBS
	1 ml	Tween 20
	mit Aqua dest. auf 2 l aufgefüllt	
DPBS / 0,5% BSA:	50 ml	1x DPBS
	0,25g	BSA

Salines-Tween20:	0,9%	NaCl
	0,05%	Tween20

5.2 Methoden

5.2.1 Kultivierung von Melanomzelllinien

Auftauen von Zelllinien

Die Zellen wurden aus dem Stickstofflager entnommen und im 37°C Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurden diese in 10 ml kaltes RPMI1640-Medium mit 10% FCS und 1% P/S überführt und 7 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde danach in eine mittlere Kulturflasche (75 cm²) überführt und mit 10 ml Medium aufgefüllt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂.

Passagieren einer Zelllinie

Die adhärennten Zellen wurden in RPMI1640 Medium mit 10% FCS und 1% P/S bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Nährmedium enthielt Phenol-Rot als pH-Indikator, der bei Ansäuerung des Nährmediums durch Stoffwechselprodukte der Zellen von rot (pH>8,2) nach gelb (pH>6,8) umschlägt. Dadurch konnte der Nährstoffverbrauch erkannt und ein Passagieren der Zellen, in der Regel nach 4-5 Tagen, durchgeführt werden. Das verbrauchte Nährmedium wurde aus der Kulturflasche abgezogen und der Zellrasen mit 10 ml 1x DPBS gewaschen. Anschließend wurde der adhärennte Zellrasen mit 1,5-2 ml 2x Trypsin/EDTA bedeckt. Nach einigen Minuten Einwirkzeit konnten die Zellen durch leichtes Klopfen abgelöst werden. Diese wurden dann in 10 ml Medium aufgenommen und 7 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Zellpellet in 10 ml neuem Medium aufgenommen. Je nach Zelllinie wurden 0,5-3 ml der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche mit 20 ml Medium überführt und die Zellen anschließend bei 37°C und 5% CO₂ weiter kultiviert.

Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurde die Neubauer Zählkammer verwendet. Es wurden ca. 10 µl von einer in Trypanblau 1:10 verdünnten Zellsuspension unter das Deckglas gegeben und 4 Großquadrate ausgezählt. Die Zellzahl pro µl wurde nach folgender Formel errechnet.

$$\text{Zellzahl pro } \mu\text{l} = \frac{\text{ausgezählte Zellen}}{4 \text{ Großquadrate} \times 1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm Kammertiefe} \times 1:10 \text{ Verdünnung}}$$

Einfrieren von Zelllinien

Das Medium wurde aus der Kulturflasche entnommen und der Zellrasen mit 10 ml 1x DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1,5-2 ml Trypsin/EDTA inkubiert und abgelöst. Diese wurden danach in 10 ml RPMI1640 mit 10% FCS und 1% P/S aufgenommen und 7 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 1-1,5 ml Einfriermedium resuspendiert und in beschriftete Einfrier-Kryoröhrchen überführt. Diese wurden in Isopropanol gekühlte Einfrierboxen gegeben, welche ein schonendes Einfrieren der Zellen bis auf -80°C erlauben. Die Zellen wurden für 2-4 Tage bei -80°C aufbewahrt, bevor sie in die Flüssigstickstoff-Tanks überführt wurden.

Klonierung der shRNA exprimierenden Melanomzellen

Die Klonierung der stabil transfizierten Melanomzellen erfolgte in 96 Wellplatten mit Flachboden. In jedes Well wurden 0,33 Melanomzellen in 200 µl RPMI1640 mit 10% FCS, 1% P/S und 400 µg/ml Zeocin gegeben. Wöchentlich wurden 100 µl des alten Mediums verworfen und durch Neues ersetzt. Nachdem Einzelkolonien der Tumorzellen wuchsen, wurden diese zunächst in 6 Wellplatten und in einem weiteren Schritt in mittlere Kulturflaschen mit Selektionsmedium überführt.

5.2.2 Kultivierung von CD8⁺ T-Lymphozyten

Isolierung von CD8⁺ T-Lymphozyten aus PBMC

Es wurden kryokonservierte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (Peripheral Blood Mononuclear Cells – PBMC) eines Patienten aufgetaut, mit 10 ml RPMI1680 Medium und 10 ml Mini MACS Puffer gewaschen und 7 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Das

Zellpellet wurde dann in 10 ml Mini MACS Puffer resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Je 1×10^7 PBMCs wurden mit 15 μ l CD8 MicroBeads (Miltenyi Biotec) in 500 μ l Mini MACS Puffer für 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Mini MACS Puffer pro 1×10^7 Zellen gewaschen und 7 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Maximal 1×10^8 Zellen wurden in 500 μ l Mini MACS Puffer resuspendiert und in eine mit 500 μ l Mini MACS Puffer kalibrierte MS MACS Separation Column, die im OctoMACS Zellseparator Magnet eingebracht war, überführt. Die Säule wurde anschließend drei Mal mit 500 μ l Mini MACS Puffer gewaschen und danach aus dem Magnetfeld des OctoMACS Zellseparators genommen. Die Isolierung der CD8⁺ Zellen erfolgte, indem 1ml Mini MACS Puffer der Säule zugeführt und mit einem Stempel durch die Säule gedrückt wurde.

Primäre Stimulierung von CD8⁺ T-Lymphozyten

Es wurden $1-2 \times 10^6$ Zellen in 1ml AIM V® Medium mit 10% humanen AB Serum und 1% P/S (T-Zellmedium) resuspendiert und in ein Well einer 24 Well-Platte gesetzt. Pro Well kamen 1×10^5 mit 100 Gray bestrahlte Melanomzellen in 1 ml AIM V® Medium hinzu. Am Folgetag wurde je 1 ml Medium pro Well entfernt und 1 ml frisches T-Zellmedium mit 500 IU/ml rekombinantem humanen IL-2 hinzu gegeben.

Restimulierung von CD8⁺ T-Lymphozyten

Die erste Restimulierung der CD8⁺ T-Lymphozyten erfolgte 5 Tage nach der primären Stimulierung der Zellen und jede weitere Restimulierung alle 7 Tage. Je 1×10^6 CD8⁺ T-Lymphozyten wurden in 1 ml T-Zellmedium mit 250 IU/ml rekombinantem humanen IL-2 resuspendiert. Hinzu kamen je 1×10^5 Melanomzellen in 1 ml T-Zellmedium mit 250 IU/ml rekombinantem humanen IL-2.

Restimulierung von CD8⁺ T-Zellklonen

Die Restimulierung der CD8⁺ T-Zellklone erfolgte alle 7 Tage. Je $1,3 \times 10^6$ CD8⁺ T-Lymphozyten in 1 ml Medium mit 250 IU/ml rekombinantem humanen IL-2 wurden in ein Well einer 24-Wellplatte gesetzt. Hinzu kamen 2×10^5 mit 100 Gray bestrahlte EBV-B Zellen und 1×10^5 ebenfalls mit 100 Gray bestrahlte Melanomzellen in 1 ml T-Zellmedium mit 250 IU/ml rekombinantem humanen IL-2.

5.2.3 RNA-Isolierung, Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion

RNA-Isolierung aus Zelllinien

Das Medium der Zellkultur wurde verworfen und die adhärenen Zellen zunächst mit 10 ml 1x DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1,5 ml 2x Trypsin/EDTA abgelöst und in Medium aufgenommen. Nach 7 minütiger Zentrifugation bei 1200 U/min wurden die Zellen in 10 ml 1x DPBS resuspendiert und nochmals pelletiert. Mit dem gewonnenen Zellpellet wurde die RNA-Isolierung mittels RNeasy Plus Mini Kit und DNase I, RNase-free Set der Firma QIAGEN durchgeführt. Der DNase-Verdau erfolgte auf der RNeasy mini spin-Säule während der RNA Isolierung. Nachdem die RNA auf die Säule gebunden hatte, wurde diese mit 350 µl RW1 Puffer gewaschen und 15 s bei 13000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde die gebundene RNA für 15 min bei Raumtemperatur mit 80 µl RNase-freier DNase (10 µl RNase-freie DNase Stammlösung + 70 µl RDD-Puffer) inkubiert. Danach wurde die RNeasy mini spin-Säule mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen. Der weitere Ablauf der RNA-Isolierung erfolgte nach dem Protokoll des RNeasy Plus Mini Kits.

Konzentrationsbestimmung von RNA

Um die Konzentration der RNA berechnen zu können, wurde eine $OD_{260\text{ nm}}$ -Messung mit dem infinite M200 (TECAN) durchgeführt. Dafür wurden die Proben 1:50 verdünnt. Der Berechnung der RNA-Konzentration liegt das Lambert Beer Gesetz zu Grunde. Die Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$OD_{260\text{ nm}} \times 40\ \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnung} / 1000 = \text{RNA}\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Reverse Transkription (RT)

Durch das Enzym Reverse Transkriptase konnte aus RNA cDNA synthetisiert werden. Mittels Random Primern, eine Mischung aus einzelsträngigen Hexanukleotiden zufälliger Sequenz mit 3'-Hydroxylenden, die an die mRNA binden, konnten diese in cDNA umgeschrieben werden. Die Reverse Transkription wurde mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. Für die Synthese der cDNA wurde 1 µg mRNA eingesetzt. Für die Reverse Transkription wurde der Peltier Thermal Cycler (BIO-RAD) verwendet.

Ansatz für die Reverse Transkription

10x RT Puffer	2 µl
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10x RT Random Primer	2 µl
MS Reverse Transkriptase	1 µl
RNase Inhibitor	1 µl
Aqua dest.	3,2 µl
1 µg RNA + Aqua dest.	10 µl

Programm für Reverse Transkription

10 min	25°C
120 min	37°C
5 min	85°C
Kühlung	4°C

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR werden DNA-Fragmente durch eine thermostabile DNA-Polymerase repliziert. Mittels spezifischer komplementärer Primersequenzen werden ausgewählte Sequenzen definierter Länge amplifiziert. Der PCR-Ablauf selbst besteht aus drei Reaktionsschritten, der DNA-Denaturierung, dem Primer-Annealing und der Elongation, welche zyklisch wiederholt werden. Für die PCR wurde der Peltier Thermal Cycler (BIO-RAD) verwendet.

Amplifikation des ERAP1 Promotors (1745 bp) mit der VELOCITY™ DNA Polymerase

5x Hi-Fi Reaction Puffer	10 µl
10 mM dNTPs	5 µl
10 µM ERAP1promotor sense B	2 µl
10 µM ERAP1_AS	2 µl
VELOCITY DNA Polymerase	1 µl
DMSO	1,5 µl
Aqua dest. + gDNA (500ng)	28,5 µl

PCR Programm für die Amplifikation des ERAP1 Promotors (1745 bp)

Initialdenaturierung	2 min	98°C	
Denaturierung	30 s	98°C	} 35 Zyklen
Primer-Annealing	30 s	61°C	
Elongation	1 min	72°Cf	
Finale Elongation	10 min	72°C	
Kühlung		4°C	

Amplifikation des ERAP2 Promotors mit dem Expand High Fidelity PCR System

5x EHR Puffer	5 µl
10 mM dNTPs	1 µl
10 µM ERAP2promotor sense A	5 µl
10 µM ERAP2promotor antisense B	5 µl
Expand HiFi ^{Plus} Enzym	0,75 µl
gDNA	4 µl
Aqua dest.	29,25

Das PCR Programm für die Amplifikation des ERAP2 Promotors

Initialdenaturierung	2 min	94°C	
Denaturierung	30 s	94°C	} 35 Zyklen
Primer-Annealing	30 s	68°C	
Elongation	1,5 min	72°Cf	
Finale Elongation	7 min	72°C	
Kühlung		4°C	

Agarosegelelektrophorese von DNA

Da die DNA durch ihre Phosphatgruppen negativ geladen ist, wandern DNA-Fragmente im elektrischen Feld zum positiven Pol. Je nach Größe der DNA-Moleküle und der Porengröße des Agarosegels bewegen sich diese unterschiedlich schnell. Der Lauf der DNA im Gel erfolgte in 1x TAE-Puffer und bei einer Spannung von 100 V. Durch einen mitgeführten DNA-Marker, bestehend aus Fragmenten definierter Größen, konnte die

Größe des untersuchten DNA Fragments bestimmt werden. Zur Visualisierung der DNA wurde Ethidiumbromid in das erwärmte und gelöste Agarosegel gegeben. Dieser Farbstoff lagert sich in die Doppelhelix der DNA ein (Interkalation) und fluoresziert bei einer Anregung unter UV-Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 300 nm. Die Gelelektrophorese wurde zum einen für die Analyse von DNA-Fragmenten nach einer PCR und zum anderen zur Kontrolle eines Restriktionsverdaus verwendet.

Es wurden 4 µl Hyperladder (DNA-Marker) und je 3 µl DNA-Probenpuffer mit 12 µl der DNA-Probe auf das Gel aufgetragen.

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Um Rückschlüsse auf die Menge einer bestimmten mRNA ziehen zu können, wurde mit deren cDNA eine quantitative real-time PCR durchgeführt. Diese PCR basiert auf der Real-Time TaqMan™ PCR-Technologie und beruht auf dem Prinzip einer Standard-PCR, bei der es zur Aussendung von fluoreszierenden Lichtsignalen kommt. Dabei lagern sich spezifische Primer sowie eine spezifische Sonde, die am 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff und am 3'-Ende einen Quencher besitzt, an die DNA an. Kommt es zur Elongation der DNA, so wird der Reporterfarbstoff durch die DNA-Polymerase abgespalten. Ist der Reporterfarbstoff erst einmal von dem Quencher gelöst, so kann dieser seine charakteristische Fluoreszenz emittieren. Dabei korreliert die Menge der Lichtsignale mit der Menge der amplifizierten DNA. Die quantitative real-time PCR wurde mit dem StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt und die Auswertung erfolgte über die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode [163] mittels StepOne™ Software v2.2.

Real-time PCR Ansatz:

20x TaqMan Gene Expression Assay	0,5 µl
2x TaqMan Universal PCR Master Mix	5 µl
cDNA	1 µl
H ₂ O	3,5 µl

real-time PCR Program für TaqMan Gene Expression Assays:

Aktivierung des AmpliTaq Gold Enzyms	10 min	95°C	} 40 Zyklen
Denaturierung	15 sec	95°C	
Annealing und Elongation	1 min	60°C	

5.2.4 Klonierung von DNA Fragmenten

Isolierung von DNA aus Zelllinien

Die Isolierung der DNA aus adhärenenten und Suspensions-Zellen erfolgte mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit von Qiagen.

Aufreinigen von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten zum Beseitigen von störenden Faktoren wie Puffern, Proteinen und Primern, wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen durchgeführt.

Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten und Vektoren

Restriktionsenzyme sind die „molekularen Scheren“ der Biotechnologie. Sie können DNA spezifisch schneiden. Sie werden z.B. für die Präparation von DNA-Fragmenten bzw. für analytische Zwecke angewendet. Bei dem präparativen Verdau werden sowohl Plasmid als auch Insert mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten. Somit entstehen zueinander passende Schnittstellen und eine Ligation zwischen Insert und Vektor kann durchgeführt werden. Bei der analytischen Restriktion wird überprüft, ob ein Insert sich erfolgreich in einen Vektor integriert hat. Je nach Menge der eingesetzten DNA ergibt sich die Zusammensetzung der Restriktionsansätze.

15 µl Restriktionsansatz, präparativer Verdau des Plasmid psiRNA-h7SKGFPzeo:

10x NEB-Puffer	1,5 µl
<i>BbsI</i> (5 U/µl)	6 µl
Vektor	3 µg
auffüllen mit Aqua dest. auf	15 µl

15 µl Restriktionsansatz, analytischer Verdau von psiRNA-h7SKGFPzeo-ERAP1 shRNA:

10x Puffer B	1,5 µl
<i>SpeI</i> (10 U/µl)	2 µl
Vektor	0,5 µg
auffüllen mit Aqua dest. auf	15 µl

15 µl Restriktionsansatz, präparativer Verdau des Plasmid pGL4.10 für ERAP1 Promotor 1745 bp:

10x Tango Puffer	1,5 µl
<i>HindIII</i> (10 U/µl)	3 µl
<i>KpnI</i> (10 U/µl)	6 µl
pGL4.10	0,5 µg
auffüllen mit Aqua dest. auf	15 µl

15 µl Restriktionsansatz, präparativer Verdau der ERAP1 Promotor 1745 bp PCR:

10x Tango Puffer	1,5 µl
<i>HindIII</i> (10 U/µl)	3 µl
<i>KpnI</i> (10 U/µl)	6 µl
ERAP1promotor PCR Produkt	0,3 µg
auffüllen mit Aqua dest. auf	15 µl

15 µl Restriktionsansatz, analytischer Verdau von pGL4.10+ERAP1 Promotor 1745 bp:

10x Tango Puffer	1,5 µl
<i>HindIII</i> (10 U/µl)	3 µl
<i>KpnI</i> (10 U/µl)	6 µl
pGL4.10+ERAP1 Promotor 1745bp	0,5 µg
auffüllen mit Aqua dest. auf	15 µl

15 µl Restriktionsansatz, präparativer Verdau des Plasmid pGL4.10 für ERAP2 Promotor:

10x Tango Puffer	2 µl
<i>KpnI</i> (10 U/µl)	2 µl
<i>XhoI</i> (10 U/µl)	2 µl
pGL4.10	4 µg
auffüllen mit Aqua dest. auf	15 µl

15 µl Restriktionsansatz, präparativer Verdau der ERAP2 Promotor PCR:

10x Tango buffer	2,65 µl
<i>KpnI</i> (10 U/µl)	2 µl
<i>XhoI</i> (10 U/µl)	2 µl
ERAP2 Promotor PCR Produkt	10 µl
Aqua dest.	10 µl

15 µl Restriktionsansatz, analytischer Verdau von pGL4.10+ERAP2 Promotor:

10x Tango Puffer	1,5 µl
<i>KpnI</i> (10 U/µl)	2 µl
<i>XhoI</i> (10 U/µl)	2 µl
pGL4.10+ERAP2 Promotor	0,5 µg
auffüllen mit Aqua dest. auf	15 µl

Die Restriktionsansätze wurden 4 h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Restriktionsenzyme erfolgte für 20 min bei 65°C.

Ligation des Inserts in den Vektor

Bei der Ligation werden Vektor und Insert durch eine Ligase miteinander verbunden. Nach dem Verdau und der Aufreinigung des Inserts sowie dem Restriktionsverdau des Vektors erfolgte die Ligation, wobei der Vektor im Verhältnis zum Insert 1:3 nach folgender Berechnung eingesetzt wurde:

$$\frac{\text{ng vom Vektor} \times \text{kb Größe des Inserts}}{\text{kb Größe des Vektors}} \times \text{molares Verhältnis} \frac{\text{Insert (3)}}{\text{Vektor (1)}} = \text{ng vom Insert}$$

10 µl Ligationsansatz:

Verdauter Vektor	100 ng
Insert	x ng
T4 DNA Ligase (3U/µl)	0,5 µl
10x Ligationspuffer	1 µl
auffüllen mit Aqua dest. auf	10 µl

Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert und die Inaktivierung der T4 DNA Ligase erfolgte für 10 min bei 70°C.

Transformation des Ligationsansatzes in kompetente *E. coli*

Nach der Ligation erfolgte die Transformation der DNA in kompetente *E. coli* (TOPTEN). Dabei wurden 10 µl des Ligationsproduktes auf 100 µl TOPTEN-Zellen pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 30 s bei 42 °C. Nachdem die Zellen 2 min auf Eis abkühlten, wurden diese in 250 µl LB-Medium überführt und 1-2 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden von dieser Transformationsreaktion 100 µl auf eine LB_{Antibiotika}-Platte ausplattiert und für 24 h bei 37°C kultiviert.

Plasmid-Mini-Präparation

Es wurden zehn *E. coli* Kolonien von der LB_{Antibiotika}-Platte in je 3 ml LB_{Antibiotika}-Medium überführt und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler kultiviert. Die Plasmid-DNA Mini-Präparation wurde mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit von Fermentas durchgeführt.

Plasmid- Maxi-Präparation

Um eine höhere Konzentration an Plasmid-DNA gewinnen zu können, wurde der Mini-Ansatz in 250-500 ml LB_{Antibiotika}-Medium überführt und über Nacht bei 37° kultiviert. Die weitere Durchführung zur Gewinnung der Plasmid-DNA wurde mittels HiSpeed Plasmid Maxi Kit von Qiagen durchgeführt.

Berechnung der DNA-Konzentration

Zur Berechnung der DNA-Konzentration wurde eine OD_{260 nm}- Messung mit dem infinite M200 (TECAN) durchgeführt. Die Formel setzt sich, unter Berücksichtigung des Lambert Beer Gesetzes, wie folgt zusammen:

$$\text{OD}_{260 \text{ nm}} \times 50 \text{ } \mu\text{g/ml DNA} \times \text{Verdünnung} / 1000 = \text{DNA } \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

5.2.5 Transiente und stabile Transfektion von Melanomzellen

Transiente siRNA Transfektion

Zur Transfektion von siRNA in verschiedene Zelllinien wurde das X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent von Roche verwendet. Die Durchführung der siRNA Transfektionen erfolgte nach Herstelleranleitung.

Stabile Plasmid-Transfektion

Für Plasmid-Transfektionen zur Herstellung stabiler Transfektanten wurde je nach Empfindlichkeit der Zelllinie Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Invitrogen) verwendet oder eine Elektroporation mit dem Gene Pulser X cell (BIO-RAD) durchgeführt. Dabei wurden 3×10^6 Zellen pro 200 ml Opti-MEM und 20 μg vom Vektor in die Elektroporationsküvette gegeben und die Elektroporation 120 ms bei 140 V durchgeführt. Nach 5 min bei RT wurden die Zellen in 10 ml RPMI1640 mit 10% FCS und \emptyset P/S überführt und bei 37°C und 5% CO₂ weiter kultiviert.

5.2.6 Promotor-Luziferase Test

Bei dem Promotor –Luziferase Test werden Zellen mit einem Vektor transfiziert, in dem stromaufwärts eines Firefly-Luziferase Reportergens ein Zielpromotor kloniert wurde, welcher die Reporterexpression steuert. Zusätzlich werden diese Zellen mit einem weiteren Vektor, der eine Renilla-Luziferase unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors enthält, ko-transfiziert.

Zunächst wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen/ 2ml RPMI1640 mit 10% FCS und 1% P/S / Well in 6-Wellplatten ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Danach wurden die Zellen für die Negativkontrolle mit jeweils 1 μg pGL4.10[luc2], für die Positivkontrolle mit

pGL4.13[*luc2/SV40*] oder für die Analyse der ERAP1- bzw. ERAP2-Promotoraktivität mit pGL4.10+ERAP1 Promotor 1745 bp, pGL4.10+ERAP1 Promotor 308 bp oder pGL4.10+ERAP2 Promotor transfiziert. Zur Transfektion wurde das Lipofectamine 2000 Transfektionsreagenz verwendet. Zusätzlich wurden alle Zellen mit 0,2 µg pGL4.74[*hRluc/TK*] ko-transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für weitere 24 h entweder mit 500 U/ml IFN- γ oder mit 0,5 µM Doxorubicin behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 1x DPBS gewaschen und 500 µl vom 1x Reporter Lysis Puffer auf den Zellrasen gegeben. Nach 10 min bei -80°C wurden die lysierten Zellen bei 37°C aufgetaut und das Lysat in 1,5 ml Eppendorf-Tubes überführt. Es erfolgte nochmals ein Einfrieren in flüssigem Stickstoff. Nach dem Auftauen (bei 37°C) und Vortexen der Proben, wurden je 3 x 60 µl einer Probe (Dreifachbestimmung) in eine weiße 96 Wellplatte (Costar) pipettiert. Hinzu kamen dann 60 µl Dual-GloTM Luciferase Substrat, welches das Substrat für die Firefly-Luziferase beinhaltet. Nach 10 min lichtgeschützter Inkubation wurde die durch die Aktivität der Firefly-Luziferase erzeugte Lumineszenz gemessen. Die Lumineszenz wurde anschließend durch die Zugabe von 60 µl eines 1:100 verdünnten Dual Glo-Stop &Glo Reagent gestoppt. Dieses Reagenz beinhaltet nicht nur den Quencher, der die Lumineszenz der Firefly-Luziferase Reaktion abfängt, sondern auch das Substrat für die Renilla-Luziferase. Nach 15 min Inkubation wurde die Renilla-Luziferase vermittelte Lumineszenz gemessen.

5.2.7 Proteinisolierung aus Zelllinien, Western Blot und Immundetektion

Zur Isolierung von Proteinen wurde das Zellpellet in 50-100 µl Triton X-Lysispuffer resuspendiert und 3 Mal bei -80°C eingefroren und aufgetaut. Anschließend erfolgten 15 min Zentrifugation bei 13000 U/min und 4°C. Im Überstand befanden sich dann die gewonnenen Proteine. Um die Konzentration der Proteine über eine OD-Messung ermitteln zu können, musste eine Proteinstandardkurve mittels Serum Albumin (BSA von Biorad; 2 mg/ml) erstellt werden. Für die Verdünnungsreihe der Standardkurve wurden folgende BSA-Konzentrationen eingesetzt: 1,4; 1,2; 1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 µg/ml. Die Proteinbestimmung wurde in einer 96-Wellplatte durchgeführt. Es wurde die jeweilige BSA-Konzentration für die Standardkurve bzw. 1 µl der Proteinprobe mit zusätzlich 250 µl Bradford-Reagenz (Bio-Rad Protein Assay, Kat. Nr. 500-0006) eingesetzt. Der Ansatz wurde 5 min bei RT inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde bei OD_{595 nm} gemessen, die Standardkurve erstellt und die Konzentration der Proteinprobe ermittelt. Anschließend

wurden die Volumina errechnet, die 10 µg Protein enthielten, und nach folgendem Ansatz mit 1x Laufpuffer und Probenpuffer vereinigt:

20 µl Ansatz pro Geltasche:	5 µl	Probenpuffer
	15 µl	x µl Protein + x µl 1x Laufpuffer

Die Denaturierung der Proteine erfolgte anschließend 3 min bei 99°C. Die Proteinansätze wurden dann vollständig auf ein 10%iges Gel aufgetragen, welches aus einem Trenngel mit aufgesetztem Sammelgel bestand. Als Proteinmarker wurden 5 µl 1x Laufpuffer mit 7 µl PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) eingesetzt. Die Proteintrennung erfolgte mit dem Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System (BIO-RAD) bei 100 V für 1-2 h in 1x Laufpuffer.

Dem schloss sich der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose Transfer Membran (Amersham™ Hybond™-ECL, GE Healthcare) an. Hierzu wurde das Gel in einem ‚Sandwich‘ Verfahren auf die Nitrocellulose Transfer Membran gelegt (Schwamm, 3x Whatman-Papier, Gel, Membran, 3x Whatman-Papier, Schwamm). Das Blotting wurde mit dem Mini Trans-Blot Cell Western Blot System (BIO-RAD) in 1x Blotpuffer für 1-2 h bei 100 V durchgeführt. Anschließend wurde die Membran mit Wasser gewaschen und dann mittels Ponceau gefärbt. Es erschienen rote Banden auf der Membran, die den Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran bestätigten. Das Ponceau wurde durch mehrmaliges Waschen der Membran in Wasser entfernt. Anschließend wurde die Membran 1 h mit 10 ml 5%iger Magermilch inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Nach dem Entfernen der Magermilch wurde die Membran 5-10 min mit 15 ml 0,1%igem Waschpuffer gewaschen und die Immundetektion durchgeführt. Dazu wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem ersten Antikörper inkubiert. Zur Entfernung der ungebundenen Antikörper folgte 3x 10 min Waschen mit 25 ml 0,1%igem Waschpuffer. Danach wurde der sekundäre Antikörper für 1-2 h auf die Membran gegeben. Anschließend wurde die Membran 3x 10 min mit 25 ml 0,1%igem Waschpuffer und 1x 5 min mit 1x DPBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Entwicklung des Western Blots. Die Membran wurde 3 min in 4 ml ECL-Detektionsreagenz lichtgeschützt inkubiert. Danach wurde die Membran in Klarsichtfolie eingebettet und in der Entwicklungskammer fixiert. Anschließend wurde ein Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare) für 1 s - 5 min auf die Membran gelegt und entwickelt.

5.2.8 Nachweis von Zytokinen in Zellkulturüberständen

IFN- γ Enzyme Linked Immuno Spot Technique (IFN- γ ELISPOT)

Beim IFN- γ ELISPOT wird die Freisetzung von IFN- γ durch einzelne Immunzellen detektiert, wobei jede IFN- γ sezernierende Zelle durch einen roten „Punkt“ auf der Membran der 96-Wellplatte visualisiert wird.

Auf eine 96 Well Multiscreen-Platte (Millipore) wurden zunächst 15 μ l 35%iges Ethanol/Well gegeben und anschließend 3x mit 150 μ l 1x DPBS gewaschen. Die ELISPOT Platte wurde für 24 h bei 4°C mit 0,5 μ g mAb1-D1K/ 50 μ l 1x DPBS/ Well beschichtet. Anschließend wurde die 96-Wellplatte 3x mit 1x DPBS gewaschen. Die Membran der Platte wurde dann mit 120 μ l RPMI1640 mit 10% FCS für 30 min bei 37°C blockiert. Nachdem das Medium verworfen wurde, wurden 5x 10⁴ Target-Zellen (Melanomzellen)/50 μ l RPMI1640 mit 10% FCS und 1x 10⁴ bis 1x 10³ Effektor-Zellen (CD8⁺ T-Zellen)/50 μ l RPMI1640 mit 10% FCS und 500 IU/ml IL-2 in jedes Well gegeben. Die ko-Kultivierung erfolgte dann 20 h bei 37°C und 5% CO₂. Nach 6x Waschen der ELISPOT-Platte mit DPBS-Tween20, wurde diese für 2 h bei 37°C mit 0,12 μ g Mab7-B6-1-Biotin/ 60 μ l DPBS/ 0,5% BSA/ Well inkubiert. Es folgte 6x Waschen mit DPBS-Tween20. Danach wurden 100 μ l von einer 1:1000 (in DPBS/ 0,5% BSA) verdünnten ExtrAvidin-Alkaline Phosphatase Lösung pro Well für 1 h bei RT aufgetragen. Anschließend wurde die ELISPOT Platte jeweils 3x 3 min mit DPBS-Tween20 und 3x 3 min mit 1x DPBS gewaschen. Für die Entwicklung des IFN- γ ELISPOTS wurden 100 μ l/Well BCIP/NBT liquid Substrat hinzu gegeben. Nachdem Punkte auf der Membran sichtbar wurden, wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser gestoppt.

IFN- γ Enzyme Linked Immunosorbent Assay (IFN- γ ELISA)

Der IFN- γ ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren von IFN- γ , welches auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Eine 96 Well ELISA-Platte (greiner bio-one,) wurde mit 0,2 μ g/ 100 μ l 1x DPBS/ Well mAB 1-D1K beschichtet. Nach 24 h wurde die Platte 2x mit 1x DPBS gewaschen und anschließend 1 h bei RT mit 200 μ l/ DPBS-Tween20/ Well blockiert. Nach der Inkubation folgte 2x Waschen mit Salinen-Tween20. Dann wurden je 100 μ l von der IFN- γ Standardverdünnungsreihe (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 U/ml) bzw. von den Proben auf die ELISA-Platte aufgetragen und 1 h bei RT inkubiert. Nach 3x Waschen mit Salinen-Tween20 wurde für 1 h 0,1 μ g/ 100 μ l DPBS-Tween20/ Well von mAb7-B6-1Biotin aufgetragen. Danach folgte nochmals 3x Waschen

mit Salinen-Tween20. Im Anschluss wurde die ELISA-Platte 1 h mit 0,1 µg/ 100 µl DPBS-Tween20/ Well Streptavidin-ALP inkubiert. Die enzymatische Farbreaktion wurde nach 5x Waschen mit Salinen-Tween20 durch Zugabe von 100 µl/ Well PNPP Substratlösung induziert. Nach 5 und 10 min wurde die spektrophotometrische Messung bei 405 nm im infinite M200 (TECAN) durchgeführt.

ELISA für Interleukin-6

Zum Nachweis von Interleukin-6 (IL-6) im Medium Doxorubicin behandelter Melanomzellen wurde das ELISA Detektionssystem für Humanes Interleukin-6 von Mabtech verwendet. Die Durchführung des ELISAs erfolgte nach Herstelleranleitung.

5.2.9 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie können Oberflächenmoleküle und intrazelluläre Proteine von Zellen quantitativ bestimmt werden. Hierzu werden Fluorochrom-gekoppelte Antikörper an das Zielmolekül angefügt. Zur Analyse werden die Zellen einzeln über eine schmale Kapillare durch einen Laserstrahl geführt. Dadurch werden die gekoppelten Fluorochrome angeregt und die freigesetzte Fluoreszenz kann über einen Detektor gemessen werden.

Adhärenz wachsende Zellen wurden, wie bereits beschrieben, abgelöst sowie abzentrifugiert und dann zu je $2,5 \times 10^5$ Zellen in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Suspension wurde 4 min bei 1500 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl FACS Puffer mit dem 1. Antikörper für 30 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und 4 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Es folgten 30 min lichtgeschützte Inkubation der Zellen mit dem sekundären Antikörper in 100 µl FACS Puffer bei 4°C. Die Zellen wurden dann nochmals mit 1 ml FACS Puffer gewaschen und 4 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl 1x DPBS/ 3,7% Formaldehyd resuspendiert und die FACS-Messung mit dem Gallios (Beckman Coulter) durchgeführt. Es wurde die GFP Expression, die HLA Klasse I sowie die HLA-A1 und HLA-B/C Oberflächenexpression der Melanomzellen über Durchflusszytometrie analysiert. Bei der Berechnung der relativen Fluoreszenzintensität wurde die unspezifische mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des sekundären Antiköpers bzw. der Isotyp-Kontrolle vom MFI-Wert der jeweiligen zu untersuchenden Probe dividiert.

5.2.10 Statistische Analysen

Für die Berechnung der statistischen Signifikanzen von Unterschieden innerhalb eines Zellsystems wurde der paarige, zweiseitige t -Test verwendet. Für statistische Analysen zwischen verschiedenen Zellsystemen wurde der unpaarige, zweiseitige t -Test herangezogen. Die Auswertungen erfolgten mit der GraphPad Prism Software Version 5.03.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$.

Die Streuung der Werte eines Merkmals um den Mittelwert wurde als Standardabweichung in den Abbildungen dargestellt.

6 Ergebnisse

6.1 Der Einfluss von ERAP1 auf die Generierung und Präsentation von Epitopen aus Tumorantigenen des Melanoms

Melanomzellen, die aus einer malignen Entartung des melanozytären Zellsystems hervorgehen, können durch autologe CD8⁺ T-Lymphozyten erkannt und spezifisch eliminiert werden. Die Interaktion wird hierbei über den T-Zellrezeptor der CTLs und den Antigen-beladenen HLA Klasse I Molekülen der Tumorzelle gewährleistet. Die antigenen Peptide, die an HLA Klasse I Moleküle binden, gehen aus der Degradation von Tumorproteinen hervor. An der intrazellulären Generierung dieser Peptide sind verschiedene proteolytische und peptidolytische Systeme, wie das Proteasom, zytosolische Peptidasen und ER-Aminopeptidasen beteiligt [164]. Das Proteasom generiert initial Peptide unterschiedlicher Länge und definiert dabei den korrekten C-Terminus der meisten Antigenpeptide [59]. Eine Vielzahl dieser Proteasomprodukte sind jedoch zu lang für die Bindung an HLA Klasse I Moleküle und erfordern deshalb das N-terminale Trimmen durch zytosolische- und ER-lokalisierte Aminopeptidasen [63]. Bislang sind zwei humane ER-Aminopeptidasen beschrieben, ERAP1 und ERAP2. ERAP1 ist nachweislich an der Prozessierung verschiedenster viraler [128, 129] und parasitärer Antigenpeptide [130] beteiligt. Jedoch ist nicht bekannt, welche Rolle diese Peptidase bei der Generierung Tumor-assoziiertes Peptidepitope spielt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher zunächst untersucht werden, ob eine Veränderung der ERAP1 Expression die HLA Klasse I restringierte Epitop-Präsentation durch Melanomzellen beeinflusst und somit Auswirkungen auf deren Antigen-spezifische T-Zellerkennung hat. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurde das autologe Tumor-CD8⁺ T-Zellsystem des Melanompatienten Ma-Mel-86 verwendet. Aus verschiedenen Metastasen dieses Patienten wurden die Zelllinien Ma-Mel-86a, -86b, -86c und -86f etabliert, die Unterschiede in der HLA Klasse I Expression aufweisen (Abb. 3).

Während Ma-Mel-86a und Ma-Mel-86c HLA Klasse I Moleküle auf der Zelloberfläche präsentieren, sind die Zelllinien Ma-Mel-86b und Ma-Mel-86f negativ für die gesamte HLA Klasse I Expression, was auf eine Defizienz in der β 2-Mikroglobulin Expression zurückzuführen ist [161] (für Ma-Mel-86f unpublizierte Daten).

Patientensystem Ma-Mel-86

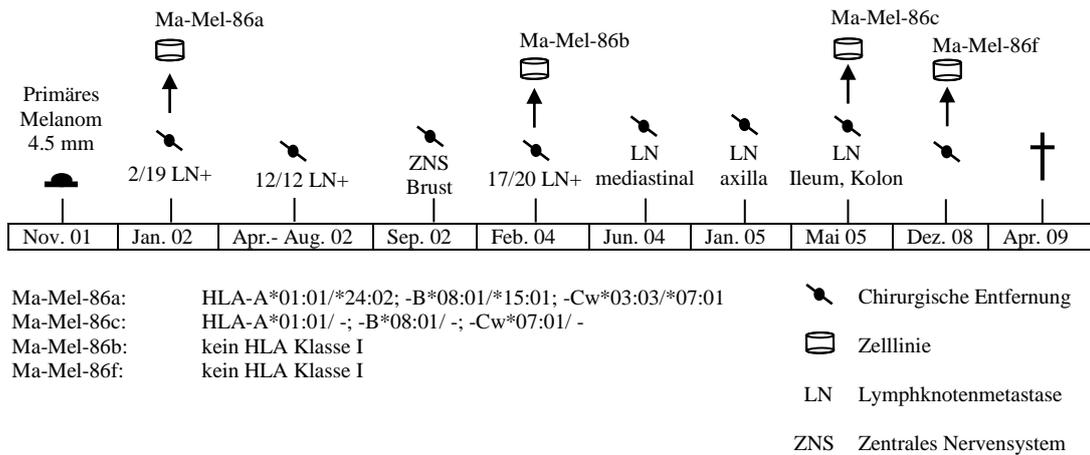


Abb. 3: Der Krankheitsverlauf des Patienten Ma-Mel-86. Aus verschiedenen Metastasen dieses Patienten wurden die Melanomzelllinien Ma-Mel-86a, Ma-Mel-86b, Ma-Mel-86c und Ma-Mel-86f etabliert. Die Zelllinien Ma-Mel-86a und Ma-Mel-86c sind im Vergleich zu Ma-Mel-86b und Ma-Mel-86f HLA-Klasse I positiv. Jedoch weist die Zelllinie Ma-Mel-86c den Verlust eines HLA Haplotyps auf.

Die Analyse mittels Durchflusszytometrie ergab, dass die Zelllinien Ma-Mel-86a und Ma-Mel-86c eine HLA Klasse I Expression zeigen, dass aber die Zelllinie Ma-Mel-86c weniger HLA Klasse I Moleküle an der Zelloberfläche präsentiert als Ma-Mel-86a (Abb. 4).

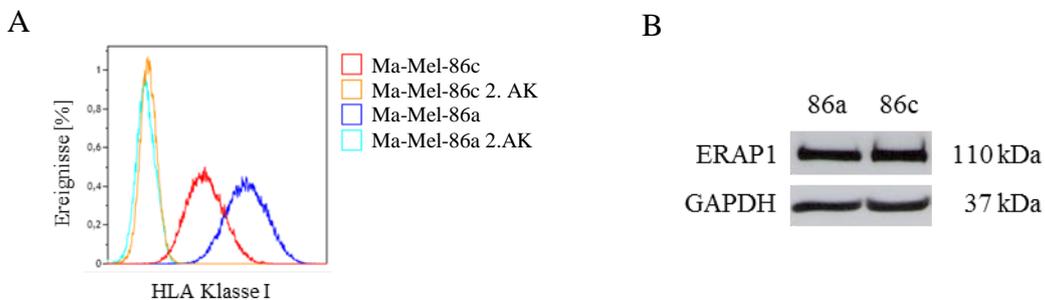


Abb. 4: HLA Klasse I Oberflächenpräsentation und ERAP1 Expression von Ma-Mel-86a und Ma-Mel-86c. Die HLA Klasse I Oberflächenexpression von Ma-Mel-86a und Ma-Mel-86c wurde unter Verwendung des mAK W6/32 mittels Durchflusszytometrie gemessen und im Histogramm abgebildet. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Versuchen (A). Die ERAP1 Expression in Ma-Mel-86a und Ma-Mel-86c wurde über Western Blot detektiert. Als endogene Kontrolle wurde der Nachweis von GAPDH mitgeführt. Es ist ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Versuchen aufgezeigt (B).

Eine mögliche Erklärung dafür könnte der Verlust eines HLA Klasse I Haplotyps in den Ma-Mel-86c Zellen sein (Abb. 3). Allerdings könnten auch andere molekulare Mechanismen, wie z.B. Unterschiede in der Expression von APM Komponenten, zum beobachteten Effekt beitragen. Da nur die Ma-Mel-86a und Ma-Mel-86c Zelllinien dieses Patienten HLA Klasse I positiv sind, wurden diese für die nachfolgenden Untersuchungen ausgewählt.

6.1.1 Etablierung eines Systems zur stabilen Herabregulation von ERAP1

Wie in Abb. 4B zu sehen, ist eine ERAP1 Expression sowohl in Ma-Mel-86a als auch in Ma-Mel-86c detektierbar. Um ERAP1 in diesen Zelllinien herabregulieren zu können, wurden in einem Vorversuch zunächst verschiedene ERAP1 siRNAs getestet (Abb. 28, im Anhang). Die ERAP1 siRNA 2 vermittelte dabei eine effektive Herabregulation von ERAP1 und wurde in den nachfolgenden Experimenten weiter verwendet. Ma-Mel-86a und Ma-Mel-86c Zellen wurden transient mit der ERAP1 spezifischen siRNA 2 transfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen geerntet und die ERAP1 Expression mittels Western Blot überprüft. Hierbei zeigte sich, dass die ERAP1 siRNA 2 eine wirkungsvolle Herabregulation von ERAP1 in beiden Zelllinien hervorrief (Abb. 5).

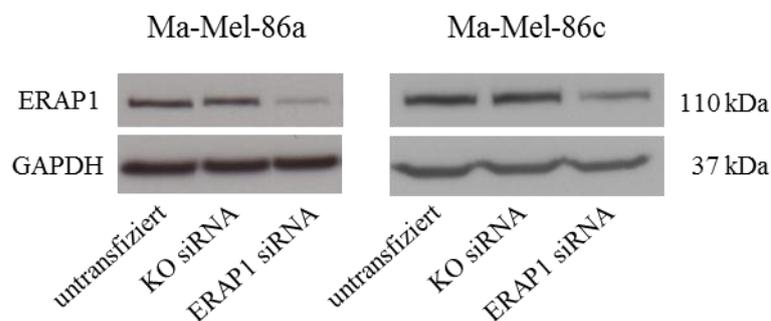


Abb. 5: ERAP1 siRNA Transfektion in Melanomzellen. Die Zelllinien Ma-Mel-86a (links) und Ma-Mel-86c (rechts) wurden transient mit einer ERAP1 spezifischen siRNA (siRNA 2) transfiziert. 72 h später wurden die Zellen lysiert und die Expression von ERAP1 mittels Western Blot bestimmt. Als Kontrolle wurden untransfizierte sowie Kontroll siRNA (KO siRNA) transfizierte Melanomzellen verwendet. GAPDH diente als endogene Kontrolle. In Bezug auf die Ma-Mel-86a Zellen ist ein repräsentatives Experiment von drei unterschiedlichen Versuchen dargestellt, während in den Ma-Mel-86c Zellen die Wirksamkeit der siRNA 2 nur einmalig bestätigt wurde.

Die Oligonukleotidsequenz der ERAP1 siRNA 2 wurde daraufhin für die Erstellung einer ERAP1 spezifischen shRNA verwendet, welche in den Vektor psiRNA-h7SK-GFPzeo integriert wurde (Abb. 6). Dieser ERAP1 shRNA-Vektor wurde zur stabilen Herabregulation von ERAP1 in Ma-Mel-86a und Ma-Mel-86c Zellen transfiziert, während die Kontrollzellen stabil mit dem entsprechenden Leervektor bzw. einer KO shRNA transfiziert wurden. Von allen Transfektanten wurden Klone isoliert und die stabile Integration des betreffenden Vektors in das Genom durch den Nachweis der GFP Expression mittels Durchflusszytometrie demonstriert (Abb. 7A). Dabei zeigten alle Tumorklone von Ma-Mel-86a und Ma-Mel-86c deutliche GFP Expressionen, wobei in beiden Fällen die Leervektor transfizierten Zellen GFP stärker exprimierten. Dies könnte

darauf zurückzuführen sein, dass die GFP Expression durch die Präsenz einer shRNA im Vektor verringert wird.

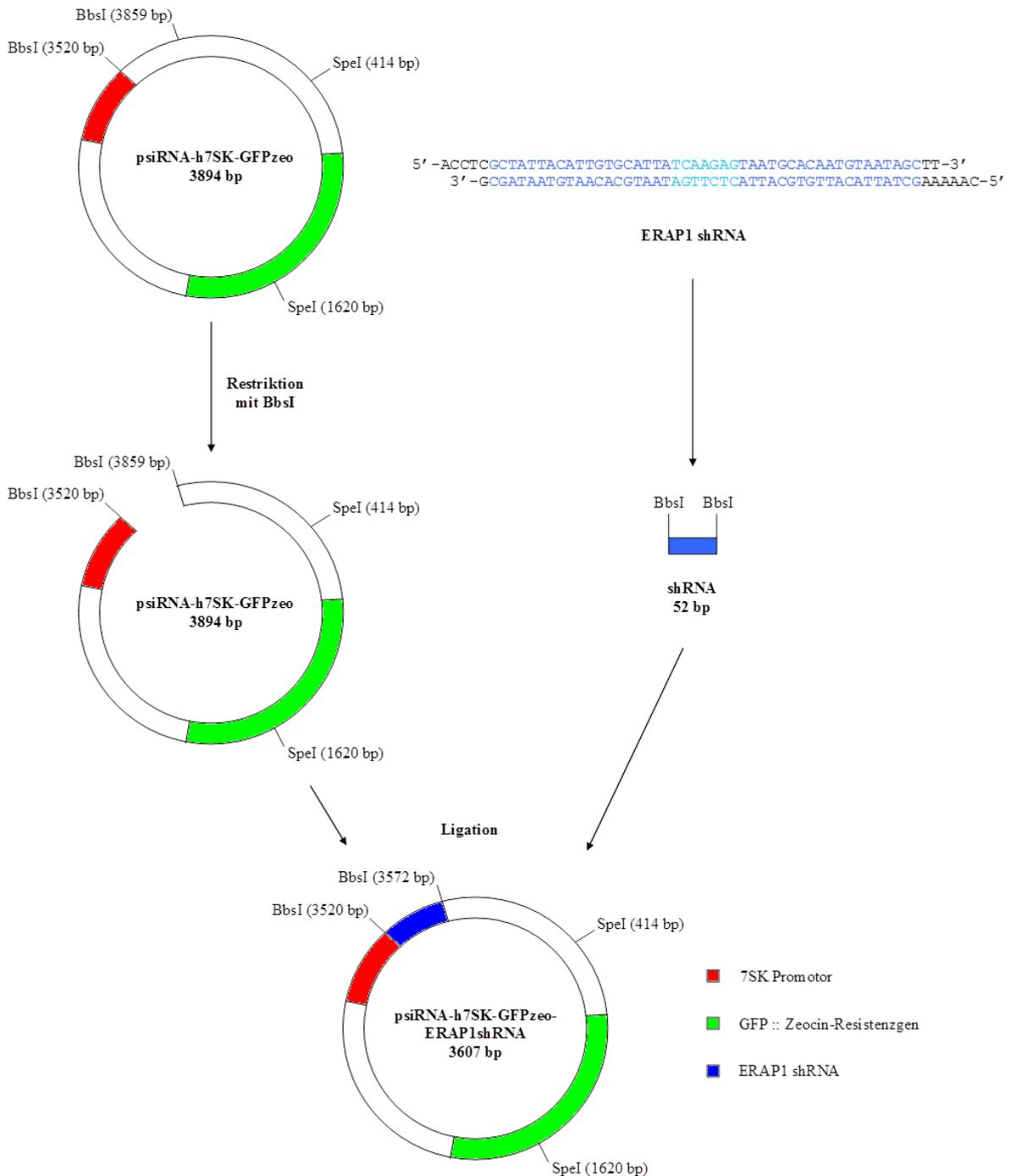


Abb. 6: Expressionsvektor für ERAP1 shRNA. Für die Klonierung der ERAP1 shRNA wurde der Vektor psiRNA-h7SK-GFPzeo verwendet. Dieser Vektor besitzt zwei BbsI Restriktionsschnittstellen, die direkt stromabwärts nach dem 7SK-Promotor lokalisiert sind und über welche die shRNA in den Vektor inseriert wurde. Ebenfalls trägt dieser Vektor ein Fusionsgen, das für GFP und eine Zeocinresistenz kodiert. Die Selektion Vektor-transgener Zellen erfolgte durch Zeocinbehandlung (400 µg/ml).

Die Expression von ERAP1 wurde mittels Western Blot bestimmt. Hierbei konnte eine deutliche Herabregulation von ERAP1 im Ma-Mel-86a ERAP1 shRNA- und auch im Ma-Mel-86c ERAP1 shRNA Klon nachgewiesen werden (Abb. 7B).

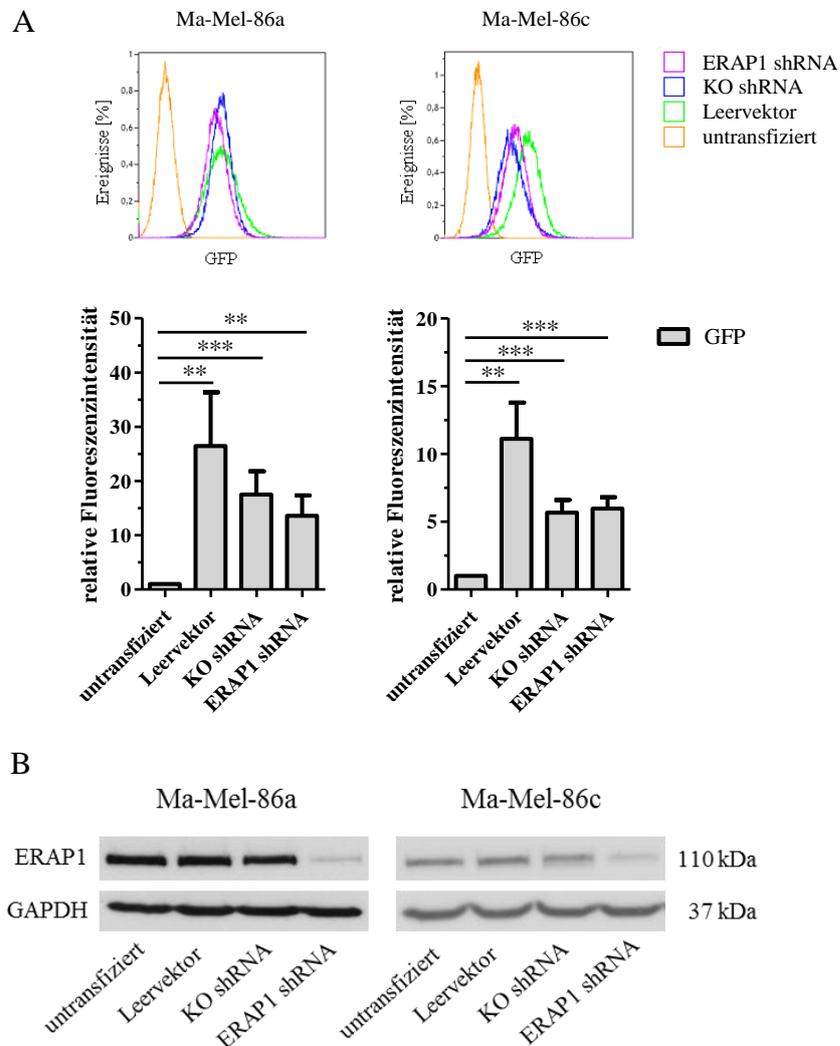


Abb. 7: GFP und ERAP1 Expression in Ma-Mel-86a und Ma-Mel-86c Klonen. Die GFP Expression in verschiedenen Ma-Mel-86a (links) und Ma-Mel-86c (rechts) Klonen (Leervektor, KO shRNA und ERAP1 shRNA) sowie in untransfizierten Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt und in Form repräsentativer Histogramme (oben) angegeben. Außerdem wurde der Mittelwert der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) aus jeweils fünf unabhängigen Experimenten gebildet und relativ zu untransfizierten Zellen dargestellt (= 1) (A). Immundetektion der ERAP1 Expression in Ma-Mel-86a und Ma-Mel-86c Klonen mittels Western Blot. Der Nachweis von GAPDH diene als endogene Kontrolle. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment von drei unterschiedlichen Versuchen (B).

In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass ERAP1 defiziente Mäuse eine Herabregulation von MHC Klasse I Molekülen an der Zelloberfläche aufweisen [115, 165, 166]. Daher wurde die HLA Klasse I Oberflächenexpression von Ma-Mel-86a und Ma-Mel-86c unter Verwendung des mAK W6/32 überprüft. Dieser Antikörper bindet Komplexe aus β 2M und HLA-A, HLA-B bzw. HLA-C (Abb. 8). Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der HLA Klasse I Expression zwischen untransfizierten Zellen

sowie Leervektor, KO shRNA und ERAP1 shRNA transfizierten Ma-Mel-86a und Ma-Mel-86c Klonen festgestellt werden.

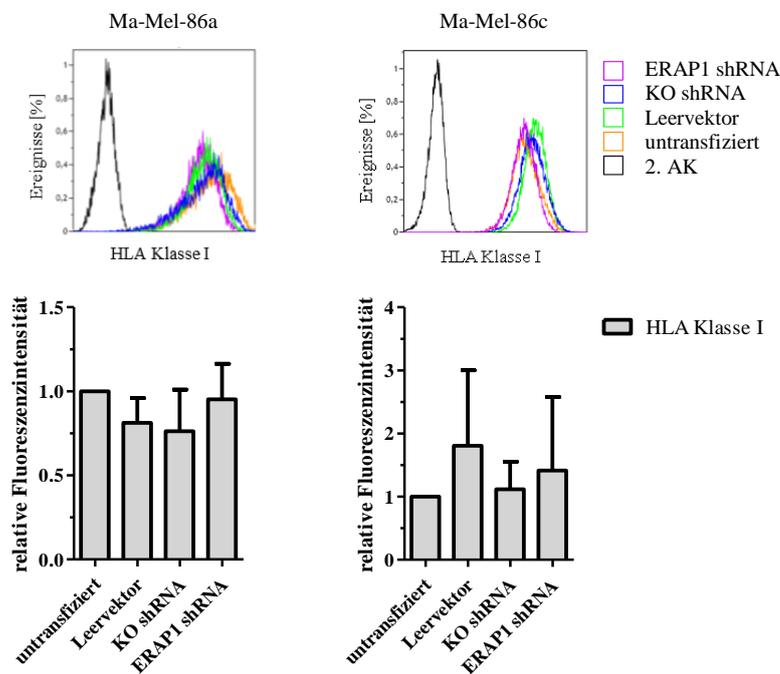


Abb. 8: HLA Klasse I Oberflächenexpression der Ma-Mel-86a und Ma-Mel-86c Klone. Die HLA Klasse I Oberflächenexpression der untransfizierten Zellen sowie der Leervektor, KO shRNA und der ERAP1 shRNA transfizierten Ma-Mel-86a (links) und Ma-Mel-86c (rechts) Klone wurde unter Verwendung des mAK W6/32 über Durchflusszytometrie gemessen. Je ein repräsentatives Experiment wurde in einem Histogramm (oben) dargestellt. Zusätzlich wurde der Mittelwert der MFI aus mindestens vier unabhängigen Experimenten gebildet und relativ zu untransfizierten Zellen dargestellt (= 1).

6.1.2 Einfluss der ERAP1 Herabregulation auf die Erkennung von Ma-Mel-86a Zellen durch „bulk“ CTL

Um den Einfluss der ERAP1 Herabregulation auf die CD8⁺ T-Zell Stimulierung untersuchen zu können, wurden autologe CD8⁺ T-Zellen aus kryokonservierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*, PBMC) des Patienten Ma-Mel-86 isoliert und zunächst mehrmals mit den untransfizierten Ma-Mel-86a stimuliert, um eine Population heterogener Tumor-reaktiver CTL anzureichern. Anschließend wurde die T-Zellantwort auf den Ma-Mel-86a ERAP1 shRNA Klon sowie auf die Kontrollzellen in einem Interferon- γ (IFN- γ) ELISPOT bzw. IFN- γ ELISA analysiert (Abb. 9). Hierbei zeigte sich, dass die ERAP1 Herabregulation in den Ma-Mel-86a Zellen die Erkennung durch die autologen CD8⁺ T-Lymphozyten im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich beeinträchtigte. Dies deutet darauf hin, dass die ERAP1 Herabregulation die Erkennung der Tumorzellen durch heterogene „bulk“ CTL

beeinträchtigt. Somit ist anzunehmen, dass die effiziente Präsentation verschiedenster Tumorantigen Epitope ERAP1 abhängig ist.

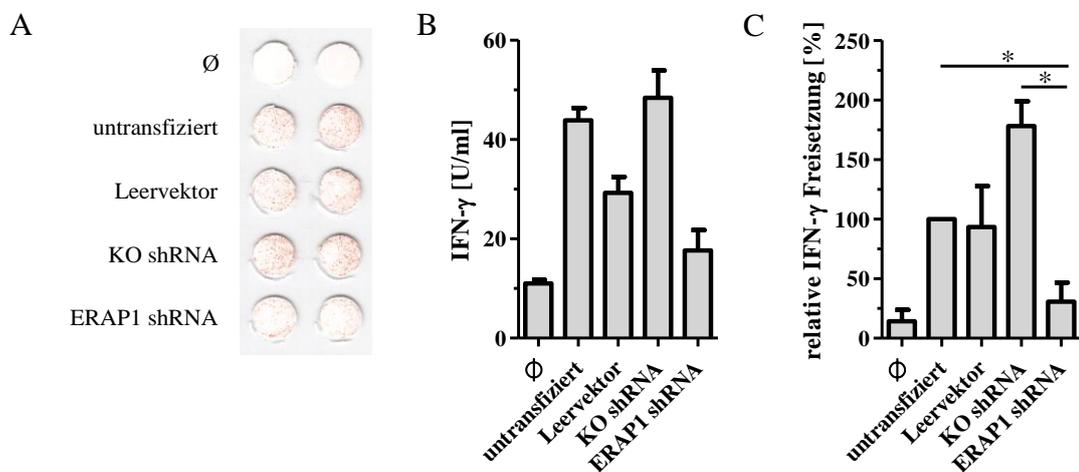


Abb. 9: Einfluss der ERAP1 Herabregulation in Ma-Mel-86a auf die Erkennung durch autologe CD8⁺ T-Zellen. Je 5×10^4 untransfizierte Ma-Mel-86a, Leervektor-, Ko shRNA- und ERAP1 shRNA transfizierte Ma-Mel-86a Klone wurden mit 1×10^4 CD8⁺ T-Zellen für 24 h in IL-2 haltigem Medium ko-kultiviert. Anschließend wurde ein IFN- γ ELISPOT (A) bzw. ein IFN- γ ELISA (B) durchgeführt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Versuchen (A, B). Zusätzlich wurden drei unabhängige IFN- γ ELISAs zusammengefasst und als relative IFN- γ Freisetzung in % dargestellt. Die IFN- γ Freisetzung der T-Zellen in Gegenwart von untransfizierten Zellen wurde gleich 100 % gesetzt (C).

6.1.3 Der Einfluss von ERAP1 auf die Stimulierung autologer CTL Klone

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, inwiefern die Herabregulation von ERAP1 in den Ma-Mel-86a Zellen deren Erkennung durch einen autologen CD8⁺ T-Zellklon (1A/39) beeinflusst. Dieser T-Zellklon, der durch Silke Lubojanski (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Thomas Wölfel, III. Med. Klinik, Universitätsmedizin Mainz) generiert wurde, erkennt ein mutiertes Epitop (GLGPGFSSY), welches vom *Homocysteine-responsive endoplasmic reticulum-resident ubiquitin-like domain member 1* (HERPUD1) Protein stammt. Dieses Epitop wird über HLA-B*15:01 bei den Ma-Mel-86a Zellen präsentiert. Die Spezifität des 1A/39 CTLs wurde in Transfektionsexperimenten mit 293T Zellen überprüft (Abb. 31, im Anhang). Die Ma-Mel-86c Zellen exprimieren ebenfalls das mutierte HERPUD1, können aber das Epitop nicht an der Zelloberfläche präsentieren, da sie durch einen HLA Klasse I Haplotyp Verlust HLA-B*15:01 negativ sind (Abb. 3). Zunächst wurde die HLA-B/C Oberflächenexpression der untransfizierten Ma-Mel-86a, der Leervektor-, Ko shRNA- und der ERAP1 shRNA Ma-Mel-86a Klone mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dabei

konnten keine signifikanten Unterschiede in den HLA-B/C Expressionen zwischen den Ma-Mel-86a Klonen und den untransfizierten Zellen festgestellt werden (Abb. 10).

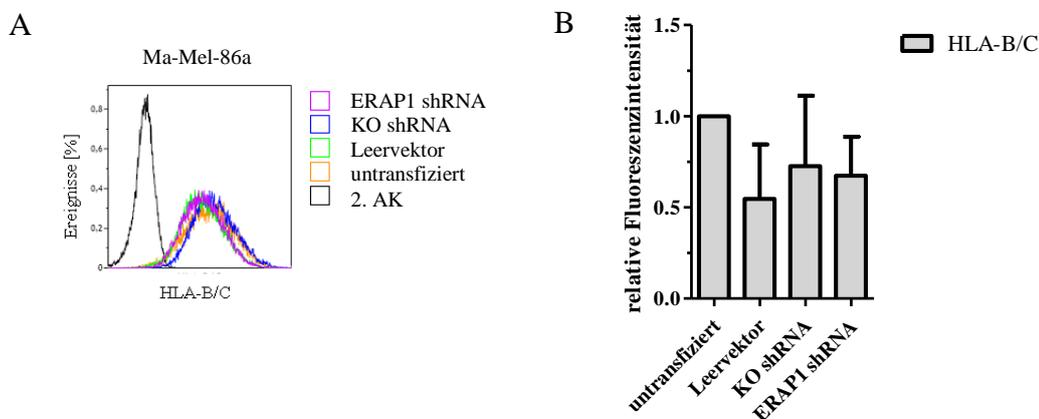


Abb. 10: HLA-B/C Oberflächenexpression der Ma-Mel-86a Klone. Die HLA-B/C Oberflächenexpression der Ma-Mel-86a Klone (Leervektor, KO shRNA und ERAP1 shRNA) sowie der untransfizierten Zellen wurde, unter Verwendung des mAK B1.232, mittels Durchflusszytometrie detektiert und in einem repräsentativen Histogramm (A) dargestellt. Im Balkendiagramm (B) wurde der Mittelwert der MFI aus drei unabhängigen Experimenten gebildet und relativ zu untransfizierten Zellen (= 1) dargestellt.

Des Weiteren wurde von diesen Zellen der HERPUD1 mRNA Gehalt bestimmt. Hierbei wurden ebenfalls keine signifikanten Abweichungen in der HERPUD1 Expression zwischen Kontrollzellen und dem ERAP1 shRNA transfizierten Ma-Mel-86a Klon (Abb. 11) detektiert.

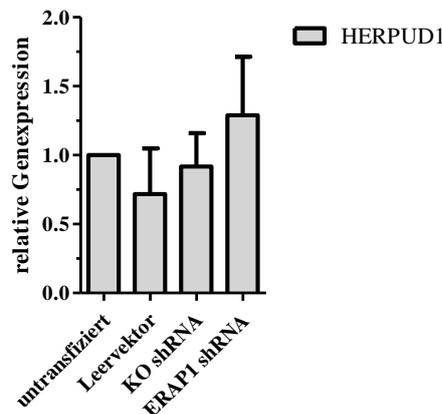


Abb. 11: HERPUD1 Expression in den Ma-Mel-86a Klonen. Aus den Ma-Mel-86a Klonen sowie aus den untransfizierten Zellen wurde die gesamte RNA isoliert und eine cDNA Synthese durchgeführt. Anschließend erfolgte eine TaqMan real-time PCR zur Quantifizierung der HERPUD1 mRNA. Die HERPUD1 Expression wurde auf die Expression der endogenen Kontrolle GAPDH normalisiert und die relative HERPUD1 Expression der untransfizierten Zellen gleich 1 gesetzt. Es wurden drei unabhängige Experimente zusammengefasst.

Somit konnte ausgeschlossen werden, dass eine unterschiedliche HLA-B*15:01 Expression bzw. eine veränderte Expression des Antigens die T-Zellerkennung beeinträchtigt. Anschließend wurde der Einfluss von ERAP1 auf die Generierung des

mutierten HERPUD1 Epitops analysiert. Hierzu wurden die Kontrollzellen und die ERAP1 shRNA transfizierten Ma-Mel-86a mit dem CD8⁺ T-Zellklon 1A/39 für 20 h ko-kultiviert. Die Aktivierung des T-Zellklons durch die Tumorzellen wurde über die Freisetzung von IFN- γ ins Zellmedium bestimmt. Die Quantifizierung von IFN- γ erfolgte mittels INF- γ ELISA. Wie in Abb. 12 dargestellt, wurde der Ma-Mel-86a ERAP1 shRNA Klon schlechter durch den 1A/39 T-Zellklon erkannt als die Kontrollzellen. Die IFN- γ Freisetzung des CTL Klons war dabei um ca. 60 % reduziert. Diese Ergebnisse zeigen, dass ERAP1 eine wichtige Rolle bei der effizienten Generierung des mutierten HERPUD1 Epitops in Ma-Mel-86a Zellen spielt.

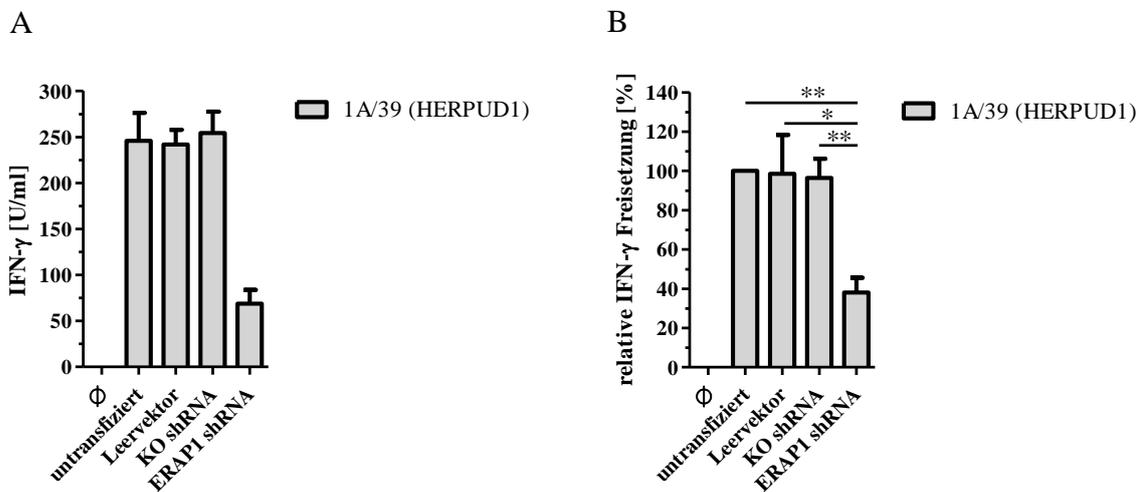


Abb. 12: Einfluss der ERAP1 Herabregulation in Ma-Mel-86a auf die Erkennung durch den autologen HERPUD1-spezifischen CD8⁺ T-Zellklon 1A/39. 5×10^4 Melanomzellen wurden mit 5×10^3 Zellen des autologen T-Zellklons 1A/39 für 20 h ko-kultiviert. Anschließend wurde die IFN- γ Konzentration im Überstand über einen IFN- γ ELISA gemessen. Darstellung eines repräsentativen Experiments von vier unabhängigen Versuchen (A). Zusätzlich wurden diese vier unabhängigen Versuche zusammengefasst und als relative IFN- γ Freisetzung in % angegeben. Die IFN- γ Freisetzung des T-Zellklons in Gegenwart von untransfizierten Ma-Mel-86a Zellen wurde gleich 100 % gesetzt (B).

Wie vorangehend erwähnt, können Ma-Mel-86c Zellen aufgrund des Verlusts der HLA-B*15:01 Expression das mutierte HERPUD1 Epitop nicht präsentieren. Es standen aber weitere autologe T-Zellklone zur Verfügung, welche Antigen-spezifische Reaktivität gegenüber den Ma-Mel-86c Zellen zeigten (Tab. 2). Die Spezifität dieser T-Zellklone wurde in Transfektionsexperimenten mit 293T Zellen überprüft (Abb. 31, im Anhang).

Tab. 2: Spezifität Ma-Mel-86c reaktiver autologer CD8⁺ T-Zellklone.

T-Zellklon [#]	Zielantigen	Epitop	HLA Restriktionselement
2C/165	CSPG4	bekannt*	HLA-Cw*07:01
2C/18	gp100	unbekannt	HLA-A*01:01
2C/77	gp100	VPLDCVLYRY	HLA-A*01:01

[#]CD8⁺ T Zellklone wurden von Silke Lubojanski zur Verfügung gestellt (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Thomas Wölfel, III. Med. Klinik, Universitätsmedizin Mainz)

*Information unterliegt aufgrund eines laufenden Patentverfahrens der Geheimhaltung

Der CTL Klon 2C/165 erkennt ein Epitop, das sich vom Melanom-assoziierten *Chondroitin sulfate proteoglycan 4* (CSPG4) Antigen ableitet und über HLA-Cw*07:01 an der Zelloberfläche präsentiert wird. Im Vergleich dazu erfasst der 2C/18 CTL Klon ein unbekanntes Epitop des Melanomdifferenzierungsantigens gp100, welches über HLA-A*01:01 präsentiert wird. Der CD8⁺ T-Zellklon 2C/77 erkennt ebenfalls ein gp100 Epitop (VPLDCVLYRY), was an HLA-A*01:01 Moleküle in den Ma-Mel-86c Zellen bindet. Interessanterweise konnte eine gp100 und CSPG4 Antigen Expression nur in Ma-Mel-86c Zellen aber nicht in Ma-Mel-86a Zellen nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten, AG Paschen).

Im Vorfeld der Tumor-CTL Ko-Kultur wurde zunächst die HLA-A*1 und HLA-B/C Oberflächenexpression der untransfizierten Zellen sowie der Ma-Mel-86c Klone (Leervektor, KO shRNA und ERAP1 shRNA) mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 13). Es konnte kein signifikanter Unterschied in der HLA-A*1 und HLA-B/C Expression zwischen den Kontrollzellen und ERAP1 shRNA transfizierten Ma-Mel-86c Zellen festgestellt werden. Zusätzlich wurde die Antigenexpression in den Ma-Mel-86c Klonen überprüft. Da CSPG4 an der Oberfläche der Melanomzellen exprimiert wird [167], wurde die CSPG4 Expression über Durchflusszytometrie detektiert (Abb. 14), während die gp100 Expression mittels Western Blot bestimmt wurde (Abb. 15). Dabei zeigten die Ma-Mel-86c Klone untereinander eine ähnliche CSPG4 und gp100 Expression. Somit konnte eine veränderte T-Zellerkennung durch Unterschiede in der HLA-A*1 bzw. HLA-B/C und in der CSPG4 sowie gp100 Antigenexpression ausgeschlossen werden.

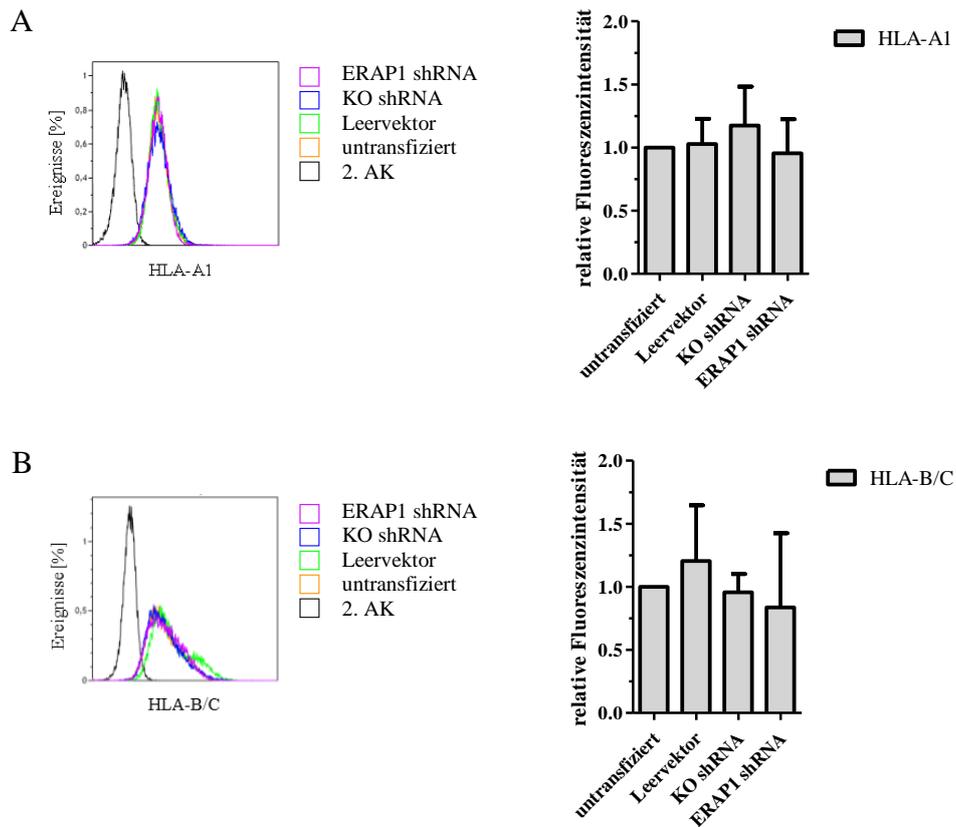


Abb. 13: HLA-A1 und HLA-B/C Oberflächenexpression der Ma-Mel-86c Klone. Die HLA-A*1 (A) sowie die HLA-B/C (B) Oberflächenexpression der untransfizierten Ma-Mel-86c Zellen sowie der Leervektor, KO shRNA und der ERAP1 shRNA transfizierten Ma-Mel-86c Klone wurde mittels Durchflusszytometrie detektiert und in einem repräsentativen Histogramm dargestellt (links). Es wurde der MFI-Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten berechnet und relativ zu untransfizierten Zellen (= 1) dargestellt (rechts).

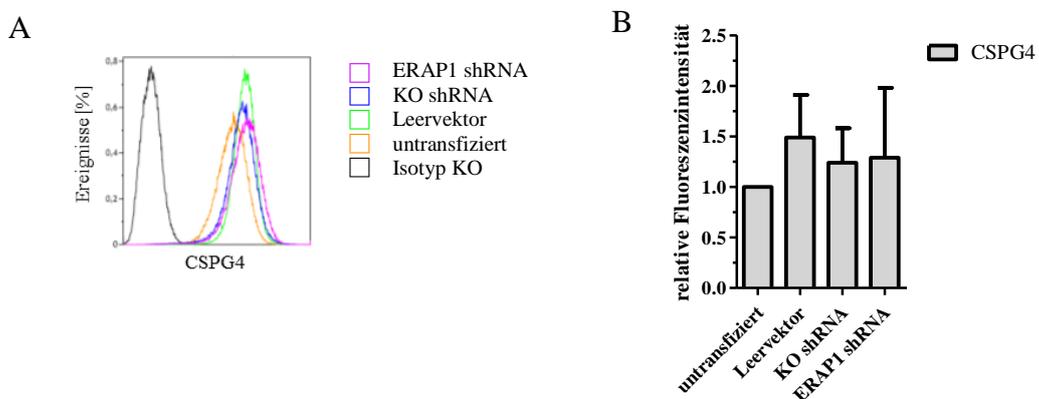


Abb. 14: CSPG4 Oberflächenexpression der Ma-Mel-86c Klone. Die CSPG4 Oberflächenexpression der Ma-Mel-86c Klone wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Histogramm (A) sowie die relative Fluoreszenzintensität berechnet aus den MFI-Mittelwerten von drei unabhängigen Versuchen. Die untransfizierten Zellen wurden gleich 1 gesetzt (B).

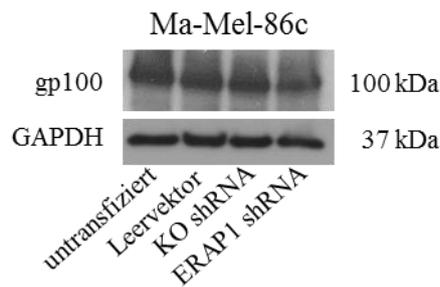


Abb. 15: gp100 Expression der Ma-Mel-86c Klone. Die Immundetektion der gp100 Expression in Ma-Mel-86c Klonen erfolgte mittels Western Blot (C). Der Nachweis von GAPDH diente als endogene Kontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Versuchen.

Anschließend wurde der Einfluss der ERAP1 Herabregulation in Ma-Mel-86c auf die Stimulation der CTL Klone 2C/165, 2C/18 und 2C/77 analysiert. Hierzu wurden die CTL Klone mit den Leervektor-, KO shRNA- und ERAP1 shRNA transfizierten Ma-Mel-86c Klonen sowie mit untransfizierten Ma-Mel-86c Zellen für 20 h ko-kultiviert. Danach wurde die T-Zellstimulierung über einen IFN- γ ELISPOT (Abb. 16A) bzw. IFN- γ ELISA analysiert (Abb. 16B).

Hierbei zeigte sich, dass eine Herabregulation von ERAP1 in Ma-Mel-86c Zellen keinen Einfluss auf die Generierung des CSPG4 T-Zellepitops hat, welches durch den CTL 2C/165 erkannt wird. Im Gegensatz dazu wurde eine verringerte Stimulation der CD8⁺ T-Zellklone CTL 2C/18 und 2C/77 in Gegenwart der Ma-Mel-86c ERAP1 shRNA Transfektanten festgestellt. Dies deutet darauf hin, dass ERAP1 die Prozessierung des unbekanntes gp100 T-Zellepitops, das durch den CTL Klon 2C/18 erkannt wird, als auch des VPLDCVLYRY gp100 Epitops, welches eine spezifische Stimulation des 2C/77 T-Zellklons hervorruft, beeinflusst. Der 2C/77 CTL Klon konnte nur einmalig in einem IFN- γ ELISPOT bzw. IFN- γ ELISA eingesetzt werden, da dieser T-Zellklon seine Proliferation kurz darauf einstellte und dadurch für weitere Versuche nicht mehr verwendet werden konnte.

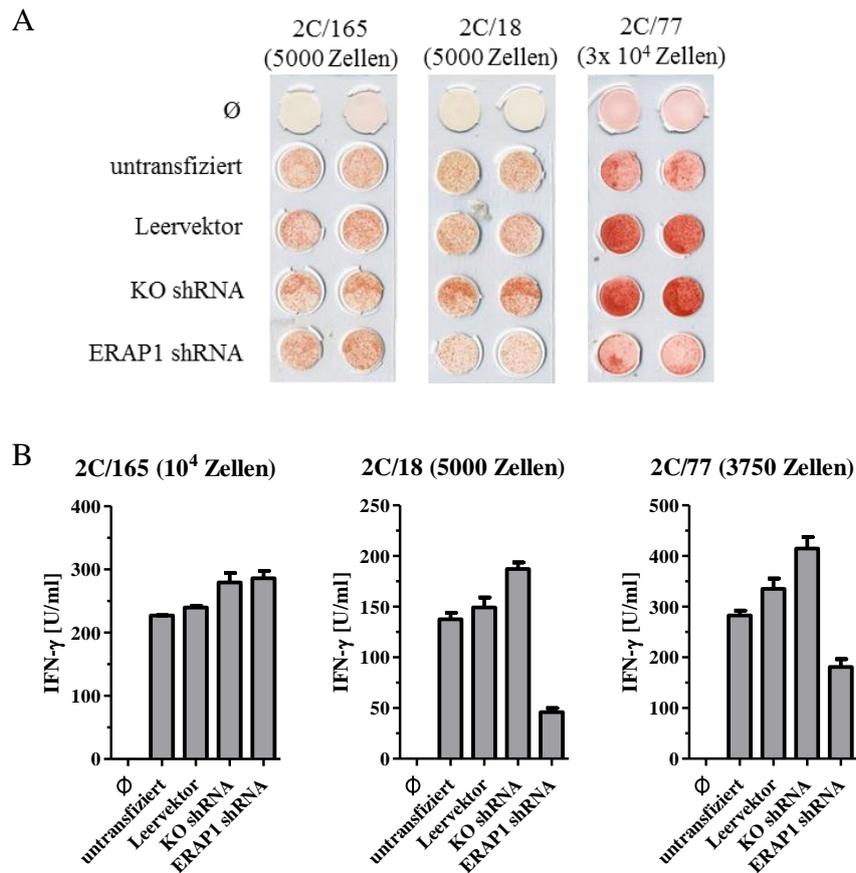


Abb. 16: Der Einfluss von ERAP1 auf die Stimulierung von autologen zytotoxischen CD8⁺ T-Zellklonen unterschiedlicher Spezifität. Jeweils 5 x 10⁴ Zellen der verschiedenen Ma-Mel-86c Klone (Leervektor, KO shRNA und ERAP1 shRNA) wurden mit den autologen Tumorreaktiven zytotoxischen T-Zellklonen 2C/165(CSPG4), 2C/18 (gp100) bzw. 2C/77 (gp100) ko-kultiviert. Nach 20 h wurde die T-Zellantwort durch einen IFN-γ ELISPOT (A) bzw. IFN-γ ELISA (B) analysiert. Jeweils ein repräsentativer Versuch von zwei unabhängigen Experimenten wurde für den 2C/165 bzw. 2C/18 CTL Klon dargestellt. Der IFN-γ ELISPOT bzw. IFN-γ ELISA für den 2C/77 CTL Klon konnte aufgrund der Limitierung der T-Zellen nur einmalig durchgeführt werden.

6.2 Regulation der ERAP1 und ERAP2 Expression

6.2.1 Induktion der ERAP Expression in Melanomzellen durch IFN-γ

Bisher ist bekannt, dass sowohl ERAP1 als auch ERAP2 über Typ I [118] und Typ II Interferone [114, 119] induziert werden können. Um zu überprüfen, ob dies auch für die ERAP Expressionen in den verschiedenen Zelllinien des Melanompatienten Ma-Mel-86 zutrifft, wurden diese für 48 h mit 500 U/ml IFN-γ behandelt und die ERAP1 und ERAP2 Proteinexpression analysiert. Zum Nachweis eines intakten IFN-γ Signalweges wurde die Aktivierung des *Signal Transducer and Activator of Transcription 1* (STAT1) anhand seiner Phosphorylierung (pY(701)-STAT1) sowie die Hochregulation verschiedener

Zielgene wie des Interferon regulatorischen Faktors 1 (IRF1) und IRF9 überprüft (Abb. 17). Schon in der basalen Expression von ERAP1 traten Unterschiede zwischen den Ma-Mel-86 Zelllinien auf. So exprimierten die Ma-Mel-86a und Ma-Mel-86f Zellen weniger ERAP1 als Ma-Mel-86b und Ma-Mel-86c. Die basale ERAP2 Expression hingegen ähnelte sich in allen Ma-Mel-86 Zellen. Nach IFN- γ Behandlung zeigte sich, dass der IFN- γ Signalweg in allen Zelllinien induziert wurde, dass aber die ERAP1 Expression nur in den Ma-Mel-86a und Ma-Mel-86f Zelllinien deutlich hochreguliert wurde. Indes vermittelte IFN- γ in den Ma-Mel-86b Zellen nur eine leichte Hochregulation der ERAP1 Expression. Im Vergleich dazu konnte eine eindeutige Induktion der ERAP2 Expression sowohl in den Ma-Mel-86a, Ma-Mel-86b als auch in den Ma-Mel-86f Zellen detektiert werden. Interessanterweise konnte in der Zelllinie Ma-Mel-86c keine deutliche IFN- γ -vermittelte Induktion beider Aminopeptidasen, trotz intaktem IFN- γ Signalweg, nachgewiesen werden.

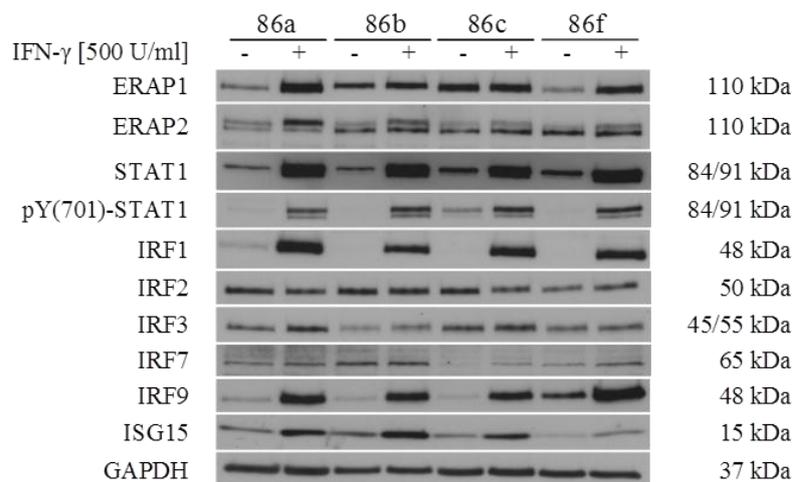


Abb. 17: ERAP1 und ERAP2 Expression in verschiedenen Zelllinien nach IFN- γ Behandlung. Die Zelllinien des Melanompatienten Ma-Mel-86 wurden für 48 h mit 500 U/ml IFN- γ behandelt. Anschließend wurde die ERAP1 und ERAP2 Proteinexpression sowie die Expression von STAT1, verschiedener IRFs und ISG15 mittels Western Blot bestimmt. Der Nachweis von GAPDH diente als endogene Kontrolle. Abgebildet ist ein repräsentatives Experiment von drei verschiedenen Versuchen.

Zusätzlich wurde die Expression von IRF2, IRF3 und IRF7 sowie ISG15 in den IFN- γ behandelten Melanomzellen analysiert. Hierbei konnte eine basale IRF3 Expression in allen getesteten Zelllinien nachgewiesen werden. Eine zusätzliche IFN- γ Behandlung führte jedoch nur zu einer leichten IRF3 Hochregulation in den Ma-Mel-86a Zellen. Die basale IRF2 Expression der Melanomzelllinien konnte durch IFN- γ Zugabe ebenfalls nicht induziert werden. IRF7 wurde hingegen nur sehr schwach in den Zelllinien exprimiert.

Eine eindeutige Induktion der IRF7 Expression durch IFN- γ konnte auch hier nicht detektiert werden. Einzig Ma-Mel-86c weist eine leichte Hochregulation von IRF7 durch IFN- γ Behandlung auf. Im Vergleich dazu ist eine Grundexpression von ISG15 in allen Zelllinien nachweisbar, welche durch eine IFN- γ Behandlung eindeutig hochreguliert wurde. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass der IFN- γ Signalweg in allen Ma-Mel-86 Zellen intakt ist und die Hochregulation der ERAP1 und ERAP2 Expression in drei von vier dieser Melanomzellen durch IFN- γ induziert werden kann.

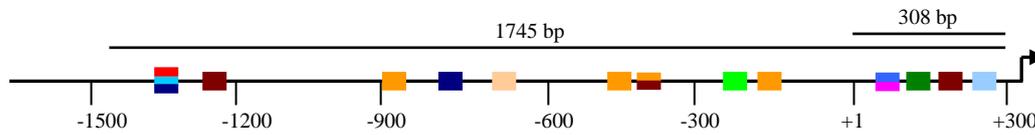
6.2.2 Der Einfluss von Chemotherapeutika auf die Expression von ERAP1 und ERAP2

Zytostatika wurden lange Zeit als ausschließlich immunsuppressiv betrachtet. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass sie, in Abhängigkeit von der Art des Chemotherapeutikums und der Konzentration, eine immunmodulierende oder gar immunstimulierende Wirkung haben können [168]. Bislang ist jedoch nichts darüber bekannt, ob eine Behandlung mit Zytostatika die ERAP1 und ERAP2 Expression beeinflussen kann und wenn ja welche Transkriptionsfaktoren dabei eine Rolle spielen könnten.

Um einen ersten Hinweis zu erhalten, wurden die Promotoren der beiden Aminopeptidasen mittels des Programms MatInspector von Genomatix (www.genomatix.de) analysiert. Diese Software kann potentielle Bindungsmotive verschiedenster Transkriptionsfaktoren in einer gegebenen DNA Sequenz vorhersagen. Wie vorangehend beschrieben, wird die ERAP1 und ERAP2 Expression über Typ I und Typ II Interferone induziert. Dabei spielen der Interferon regulatorische Faktor 1 (IRF1) und IRF2 eine Rolle [119, 169]. Ebenfalls kann die Expression beider Aminopeptidasen durch den Transkriptionsfaktor *Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF κ B) reguliert werden [120]. Dementsprechend wurden durch die MatInspector Software im ERAP1 Promotor (Abb. 18A) Bindungsstellen für IRFs und STATs sowie für NF κ B postuliert. Es wurden aber auch potentielle Bindungsstellen für Hitzeschock Faktoren (HSF) und den Tumorsuppressor p53 vorhergesagt. Im ERAP2 Promotor wurden Bindungsstellen für HSFs, IRFs und NF κ B postuliert (Abb. 18B). Besonders interessant erschienen die potentiellen Bindungsstellen für STAT1, STAT3 und p53 im ERAP1 Promotor, denn Behandlungen mit Chemotherapeutika wie Fludarabin, Doxorubicin oder Cisplatin führen zur Aktivierung von p53 [170]. p53 wiederum kann dann mit STAT1 interagieren [170, 171]. Ebenfalls

kann Doxorubicin STAT3 einen Transkriptionsfaktor mit onkogenem Potential induzieren [172].

A ERAP1 Promotor 5'→3'



B ERAP2 Promotor 5'→3'

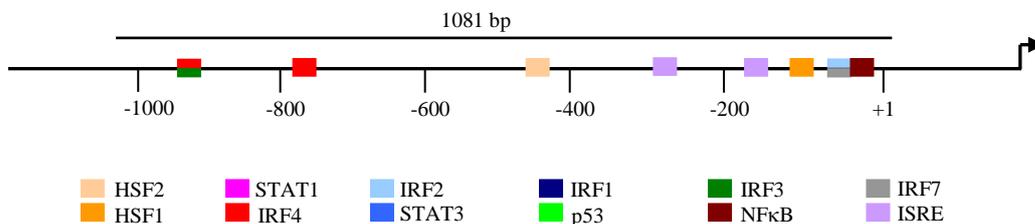


Abb. 18: Potentielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen im ERAP1 und ERAP2 Promotor. Dargestellt sind der ERAP1 Promotor (A) und der ERAP2 Promotor (B) mit den potentiellen Bindungsstellen für Hitzeschock Faktoren (HSF), Interferon regulatorische Faktoren (IRF), *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT), p53, *Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NFκB) und *Interferon Stimulated Response Element* (ISRE). Der Transkriptionsbeginn ist als +1 gekennzeichnet. Die Sequenz der Promotoren ist im Anhang der vorliegenden Arbeit zu finden.

Der Einfluss von Zytostatika auf die ERAP1 und ERAP2 Expression wurde deshalb sowohl in p53 Wildtyp Zellen (HCT116, Ma-Mel-47) als auch in einer p53 mutierten Zelllinie (Ma-Mel-86a) sowie in p53 negativen Zellen (HCT116 p53^{-/-}, UKRV-Mel-15a) analysiert. Die p53 positive Ma-Mel-86a Zelllinie trägt eine Mutation im TP53 Gen, die zu einem R248W Aminosäureaustausch führt (persönliche Mitteilung von Jolanthe Baingo, Labor Dermatologie, Universitätsklinikum Essen), welche in der DNA-Bindungsdomäne des p53 Proteins lokalisiert ist und einen Verlust der transkriptionellen Aktivität des p53 vermittelt [173, 174]. Nach 48 h Doxorubicinbehandlung konnte eine deutliche Hochregulation der p53 Proteinexpression in den p53 Wildtyp Zellen im Vergleich zu den p53 negativen Zellen nachgewiesen werden (Abb. 19). Die Ma-Mel-86a Zelllinie hingegen zeigte bereits ohne Doxorubicinbehandlung eine hohe p53 Expression. Eine Zugabe des Zytostatikas führte jedoch zu keiner eindeutigen Induktion der p53 Expression in diesen Zellen. Die Expression des p53 Zielgens p21 [175], welches aber auch durch STAT1 [176] bzw. NFκB/p65 induziert werden kann [177], ist in p53 exprimierenden Zellen nach Zytostatikabehandlung deutlich hochreguliert. Auch in den p53 negativen Zellen konnte nach Doxorubicinbehandlung eine leichte Induktion von p21 detektiert werden, die aber

bei weitem nicht so stark ausgeprägt war, wie in den p53 positiven Zellen. Eine Behandlung der Zellen mit IFN- γ rief hingegen keinen Effekt auf die p53 bzw. p21 Expression hervor.

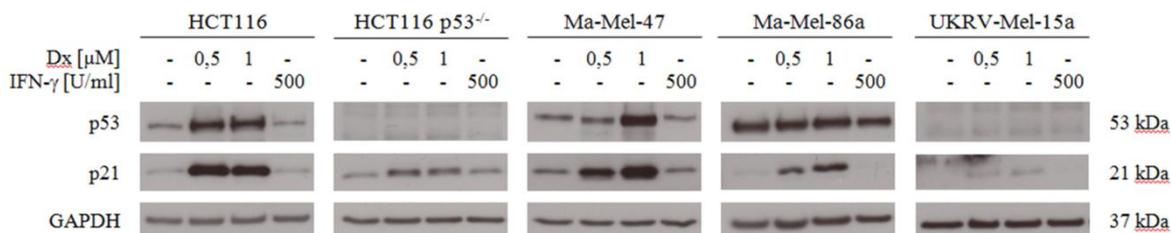


Abb. 19: p53 und p21 Expression in verschiedenen Tumorzelllinien nach Doxorubicinbehandlung. HCT116, HCT116 p53^{-/-}, Ma-Mel-47, Ma-Mel-86a und UKRV-Mel-15a wurden für 48 h mit 0,5 μ M bzw. mit 1 μ M Doxorubicin (Dx) oder 500 U/ml IFN- γ behandelt. Die p53 und p21 Proteinexpression in diesen Zelllinien wurde mittels Western Blot detektiert. Der Nachweis von GAPDH diente als endogene Kontrolle. Das repräsentative Ergebnis eines Versuchs von zwei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

Um einen Hinweis darauf zu bekommen, ob eine Behandlung mit Doxorubicin die Genexpression von ERAP1 und ERAP2 induzieren kann, wurde zunächst die Promotoraktivität beider Aminopeptidasen nach Zytostatikabehandlung analysiert. Dazu wurden sowohl ERAP1- als auch ERAP2-Promotorfragmente aus den Ma-Mel-86a Zellen in den Vektor pGL4.10 stromaufwärts eines Firefly-Luciferase Reportergens kloniert. Vom ERAP1 Promotor wurden dabei zwei Fragmente unterschiedlicher Länge in den Vektor integriert. Das eine Promotorfragment umfasst 1745 bp, in dem sich die potentiellen Bindungsstellen für HSF1 und 2, STAT1 und 3, IRF1 ,2 ,3 und 4 sowie p53 und NF κ B befinden, während das zweite ERAP1 Promotorfragment mit einer Größe von 308 bp nur die postulierten Bindungsstellen für STAT1 und 3, IRF2 und 3 und NF κ B besitzt (Abb. 18A). Das ERAP2 Promotorfragment, welches kloniert wurde, ist 1081 bp lang und trägt potentielle Bindungsstellen für HSF1 und 2, IRF2, 3, 4 und 7, NF κ B und das ISRE (Abb. 18B). Die Aktivität der Promotorkonstrukte wurde dann in einem Luciferase Test gemessen. Dazu wurden ERAP1- und ERAP2-Promotor-Reporterplasmide zunächst in die humanen Kolon Karzinom Zelllinien HCT116, HCT116 p53^{-/-} und in die Melanomzelllinien Ma-Mel-47, Ma-Mel-86a und UKRV-Mel-15a transfiziert. Anschließend wurden diese Zellen für 24 h mit 0,5 μ M Doxorubicin und als Positivkontrolle mit 500 U/ml IFN- γ behandelt. Danach wurden diese Zellen lysiert und die Aktivität der Firefly-Luciferase gemessen (Abb. 20). Dabei zeigte das 1745 bp große ERAP1 Promotorfragment in allen getesteten Zelllinien eine stärkere basale Aktivität als das 308 bp große ERAP1 Promotorfragment. Im Vergleich zu den ERAP1

Promotorfragmenten fiel die Grundaktivität des ERAP2 Promotorfragments nochmals wesentlich schwächer aus. Die basale Aktivität der ERAP1 Promotorfragmente in den HCT116 Zellen entsprach deren Aktivität in den HCT116 p53^{-/-} Zellen. Im Gegensatz dazu fiel die basale Aktivität des ERAP2 Promotorfragments in den HCT116 stärker aus als in der HCT116 p53^{-/-} Zellen. In den Melanomzelllinien dagegen war die Grundaktivität der ERAP1 Promotorfragmente und des ERAP2 Promotorkonstrukts sehr unterschiedlich.

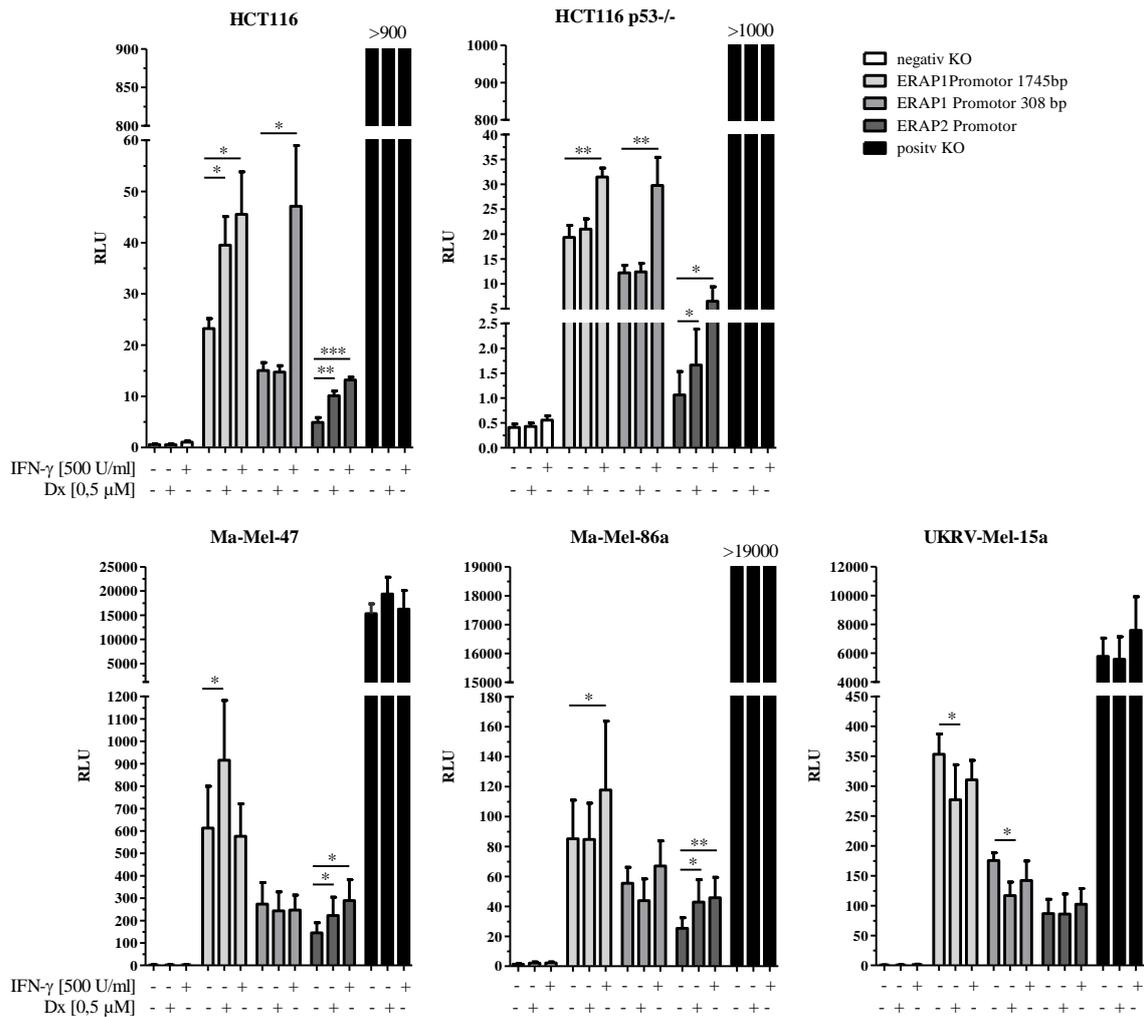


Abb. 20: Die Aktivität der ERAP1- und ERAP2 Promotorkonstrukte nach Doxorubicin und IFN-γ Behandlung. HCT116, HCT116 p53^{-/-}, Ma-Mel-47, Ma-Mel-86a und UKRV-Mel-15a wurden transient mit pGL4.10+ERAP1 Promotor 1745 bp, pGL4.10+ERAP1 Promotor 308 bp und mit pGL4.10+ERAP2 Promotor transfiziert. Für die negative Kontrolle wurden diese Zellen mit dem leeren pGL4.10 Vektor bzw. für die positive Kontrolle mit pGL4.13 transfiziert. Zusätzlich wurden alle Ansätze mit pGL4.74 (Renilla-Luciferase) ko-transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für weitere 24 h mit 0,5 μM Doxorubicin (Dx) bzw. mit 500 U/ml IFN-γ behandelt und schließlich die Promotoraktivitäten anhand der Luciferase Aktivität bestimmt. Dabei wurde die Aktivität der Firefly-Luciferase auf die entsprechende Renilla-Luciferaseaktivität normalisiert und als relative Lichteinheit (*Relative light units*, RLU) angegeben. Für HCT116, HCT116 p53^{-/-}, Ma-Mel-47 und Ma-Mel-86a wurden jeweils fünf und für UKRV-Mel-15a vier unabhängiger Versuche zusammengefasst.

In den HCT116 sowie in den HCT116 p53^{-/-} Zellen konnte nach INF- γ Behandlung eine Steigerung der Aktivität des 1745 bp und des 308 bp großen ERAP1 Promotorfragmentes sowie des ERAP2 Promotorfragmentes detektiert werden, was die Funktionalität der Promotorfragmente bestätigte. Der Vergleich beider Zelllinien ergab jedoch, dass INF- γ die Aktivität der ERAP1 Promotorfragmente in einem etwas stärkerem Maße in den HCT116 Zellen induzierte als in den HCT116 p53^{-/-} Zellen. Währenddessen konnte in den HCT116 p53^{-/-} Zellen eine höhere INF- γ -vermittelte Induktion des ERAP2 Promotorfragments nachgewiesen werden, als in den HCT116 Zellen. Die Behandlung der Zellen mit Doxorubicin steigerte die Aktivität des 1745 bp großen ERAP1 Promotorfragments in den HCT116, jedoch nicht in den HCT116 p53^{-/-} Zellen. Das 308 bp große ERAP1 Promotorfragment hingegen, welches im Gegensatz zum 1745 bp großen ERAP1 Promotorfragment keine potentielle p53 Bindungsstelle besitzt, wurde in keiner der Doxorubicin behandelten Zellen aktiviert. Im Kontrast dazu konnte eine Zytostatika vermittelte Induzierbarkeit des ERAP2 Promotorkonstrukts in HCT116 und HCT116 p53^{-/-} nachgewiesen werden, wobei in den HCT116 p53^{-/-} Zellen die Aktivität des ERAP2 Promotorfragments sichtlich geringer ausfiel als in den HCT116 Zellen.

In den Melanomzellen konnte nach einer INF- γ Behandlung nur eine schwache Induktion des 1745 bp großen ERAP1 Promotorfragments in den Ma-Mel-86a aber nicht in den Ma-Mel-47 und UKRV-Mel-15a Zellen festgestellt werden. Eine gesteigerte Aktivierung des 308 bp großen ERAP1 Promotorfragments durch INF- γ hingegen wurde in keiner der getesteten Melanomzellen ersichtlich. Im Vergleich dazu konnte eine Induzierbarkeit des ERAP2 Promotorfragments in den Ma-Mel-47 und Ma-Mel-86a Zellen, aber nicht in den UKRV-Mel-15a Zellen, nach INF- γ Behandlung verzeichnet werden. Die geringe INF- γ -vermittelte Induktion der ERAP Promotorkonstrukte in den Melanomzelllinien im Vergleich zu den Humanen Kolon Karzinomzellen war überraschend. Die molekularen Mechanismen, die für diesen Effekt verantwortlich sein könnten, wurden aber im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter charakterisiert. Eine Inkubation der Melanomzellen mit Doxorubicin erhöhte die Induzierbarkeit des 1745 bp großen ERAP1 Promotorfragments in den Ma-Mel-47 Zellen, während die Aktivität dieses Promotorkonstrukts in den Ma-Mel-86a Zellen unverändert blieb oder sich in den p53 negativen UKRV-Mel-15a Zellen sogar eher verringerte. Weiterhin konnte keine Induktion des 308 bp großen ERAP1 Promotorfragments in den Doxorubicin behandelten Melanomzellen nachgewiesen werden.

In einem weiteren Schritt wurde überprüft, ob sich die Aktivität der Promotorfragmente in der ERAP1 und ERAP2 mRNA Expression der IFN- γ und Doxorubicin behandelten Zellen widerspiegelt. Hierzu wurden die Zellen 24 h mit 500 U/ml IFN- γ bzw. mit 1 μ M Doxorubicin behandelt. Anschließend wurde die relative ERAP1 und ERAP2 mRNA Expression in diesen Zellen über qRT-PCR bestimmt (Abb. 21). Durch die IFN- γ Behandlung erhöhte sich der ERAP1 und ERAP2 mRNA Gehalt sowohl in den HCT116 Zellen als auch in den HCT116 p53^{-/-}. Dabei wiesen die HCT116 p53^{-/-} Zellen eine etwas stärkere Induktion der mRNA Expression von beiden ERAPs auf als die HCT116 Zellen, obwohl die HCT116 Zelllinie eine stärkere IFN- γ vermittelte Aktivität des ERAP1 Promotorfragments zeigte als die HCT116 p53^{-/-} Zellen (Abb. 20). Im Vergleich dazu spiegelte sich, nach IFN- γ Zugabe, die Induktion des ERAP2 Promotorfragments in der gesteigerten ERAP2 mRNA Expression sowohl in den HCT116 als auch in den HCT116 p53^{-/-} Zellen wieder.

Nach Doxorubicinbehandlung war die ERAP1 mRNA Expression in den HCT116 Zellen erhöht im Gegensatz zu der HCT116 p53^{-/-} Zelllinie, was mit den entsprechenden Aktivität ERAP1 Promotoraktivitäten korrelierte. Die ERAP2 mRNA Expression hingegen erhöhte sich gleichermaßen in beiden Zelllinien nach Doxorubicinzugabe. Die Aktivität des ERAP2 Promotorfragments zeigte im Vergleich dazu ein ähnliches Muster, wobei jedoch dessen Aktivität nach Doxorubicinzugabe stärker in den HCT116 Zellen ausgeprägt war als in der HCT116 p53^{-/-} Zelllinie.

In den Melanomzelllinien steigerte sich ebenfalls die ERAP1 mRNA Expression nach IFN- γ Behandlung (Abb. 21), obwohl nur die Ma-Mel-86a Zelllinie eine Aktivierung des 1745 bp großen ERAP1 Promotorfragments nach IFN- γ Zugabe aufwies (Abb. 20). Die Ma-Mel-86a Zelllinie zeigte dabei die stärkste Induktion der ERAP1 mRNA Expression im Vergleich zu Ma-Mel-47 und UKRV-Mel-15a. Indessen erhöhte IFN- γ die ERAP2 mRNA Expression in gleicher Weise in allen drei Melanomzelllinien, was sich auch in der Aktivität des ERAP2 Promotorfragments in den Ma-Mel-47 und Ma-Mel-86a Zellen widerspiegelte aber nicht in den UKRV-Mel-15a Zellen.

Nach Doxorubicinbehandlung erhöhte sich die ERAP1 mRNA Expression gleichermaßen sowohl in der p53 Wildtyp exprimierenden Ma-Mel-47 Zelllinie als auch in der Ma-Mel-86a Zelllinie, welche mutiertes p53 exprimiert. Interessanterweise konnte in den Ma-Mel-86a Zellen, nach Doxorubicinzugabe, keine gesteigerte Aktivität des ERAP1 Promotorfragments detektiert werden, obwohl eine erhöhte ERAP1 mRNA Menge vorzufinden war. Die UKRV-Mel-15a Zelllinie hingegen zeigte keine Induktion der

ERAP1 mRNA Expression nach Zytostatikazugabe, was mit der entsprechenden Aktivität des ERAP1 Promotorfragments korrelierte. Eine gesteigerte ERAP2 mRNA Expression durch Doxorubicin wurde in den Ma-Mel-47 und Ma-Mel-86a Zellen detektiert jedoch nicht in den UKRV-Mel-15a, was sich ebenfalls in der ERAP2 Promotoraktivität in diesen Zellen widerspiegelt. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass eine Doxorubinbehandlung die ERAP1 mRNA Expression in p53 exprimierenden Zellen erhöht, während dieser Effekt nicht in p53 negativen Zellen nachweisbar ist. Im Vergleich dazu zeigten alle p53 exprimierenden Zelllinien sowie die HCT116 p53^{-/-} Zelllinie eine Doxorubicin vermittelte Induktion der ERAP2 mRNA Expression, jedoch aber nicht die p53 negative Zelllinie UKRV-Mel-15a.

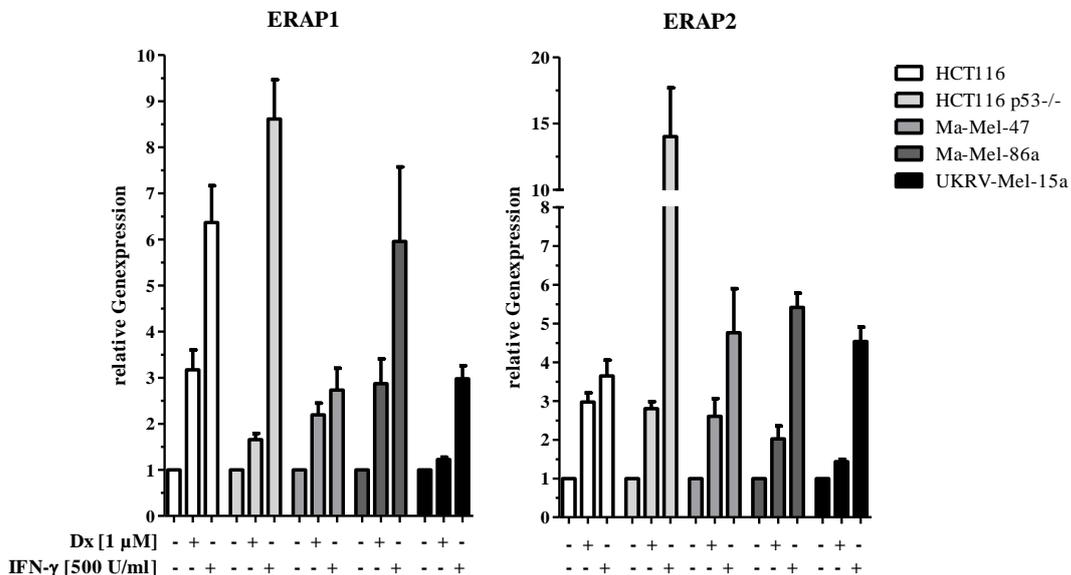


Abb. 21: ERAP1 und ERAP2 mRNA Expression in verschiedenen Zelllinien nach Doxorubicin und IFN-γ Behandlung. HCT116, HCT116 p53^{-/-}, Ma-Mel-47, Ma-Mel-86a und UKRV-Mel-15a wurden für 24 h mit 1 µM Doxorubicin (Dx) bzw. mit 500 U/ml IFN-γ behandelt. Nach RNA Isolierung und cDNA Synthese wurde eine TaqMan real-time PCR zur Bestimmung der ERAP1 und ERAP2 mRNA Menge durchgeführt. Dabei wurde auf die endogene Kontrolle GAPDH normalisiert. Es wurden mindestens drei unabhängige Versuche zusammengefasst.

Wie zuvor beschrieben, kann Doxorubicin die ERAP1 und ERAP2 Promotoraktivität und den ERAP1 und ERAP2 mRNA Gehalt in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund der Zelle erhöhen. Wie jedoch verhält es sich mit der Proteinexpression dieser beiden Amino-peptidasen? Dazu wurden die Melanomzelllinien Ma-Mel-47, Ma-Mel-86a und UKRV-Mel-15a für 72 h mit unterschiedlichen Doxorubicinkonzentrationen behandelt (Abb. 22). Hierbei konnte eine schwache Hochregulation der ERAP1 und ERAP2 Proteinexpression nach 1 µM Doxorubicinzugabe in Ma-Mel-47 detektiert werden. In Ma-

Mel-86a und UKRV-Mel-15a hingegen konnte weder eine Induktion der ERAP1 noch der ERAP2 Proteinexpression infolge einer Doxorubicinbehandlung nachgewiesen werden.

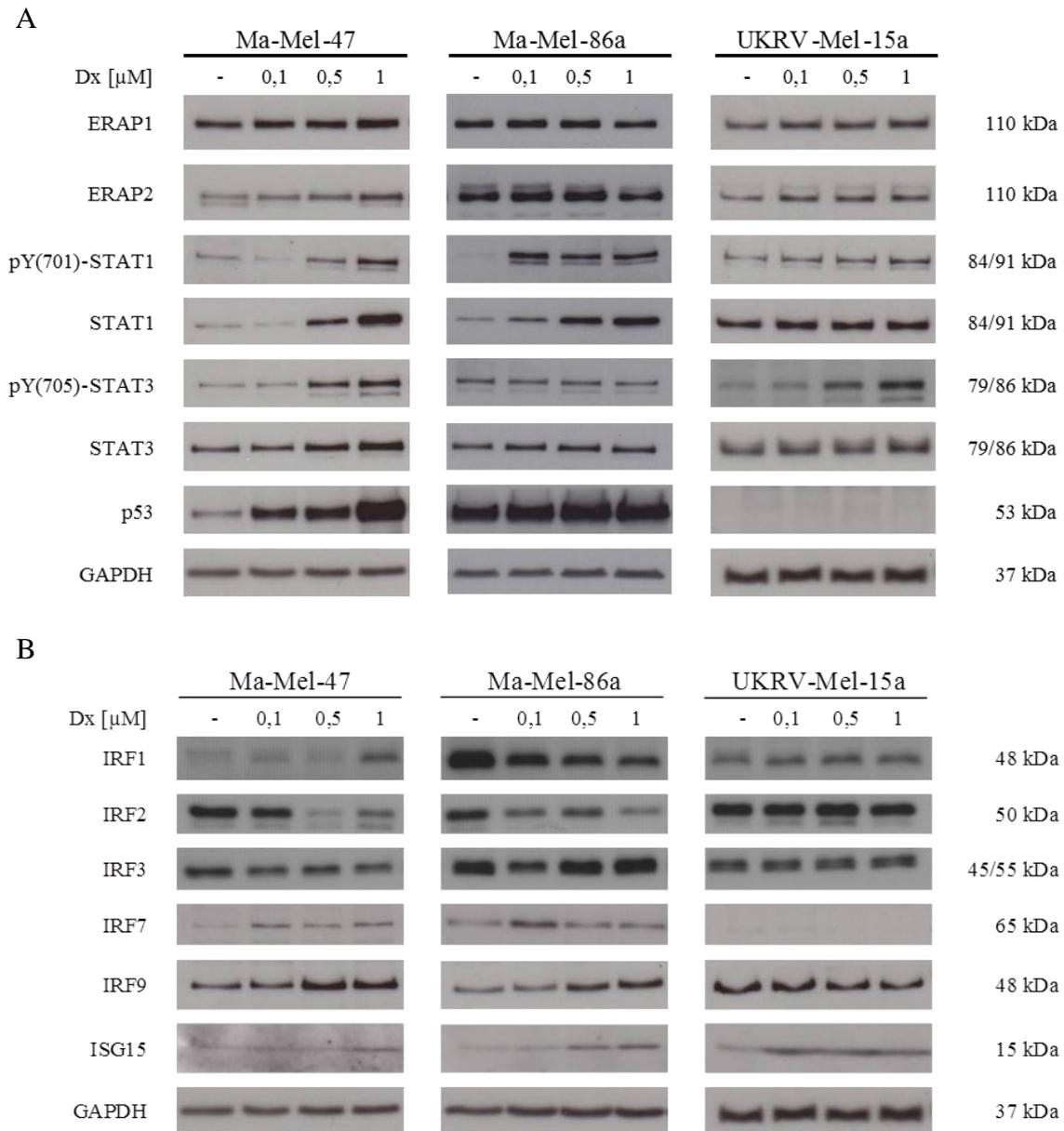


Abb. 22: Proteinexpression von ERAP1, ERAP2 und verschiedener Transkriptionsfaktoren in Melanomzellen nach Doxorubicin (Dx) Behandlung. Ma-Mel-47, Ma-Mel-86a und UKRV-Mel-15a wurden für 72 h mit 0,1 μ M, 0,5 μ M bzw. 1 μ M Dx behandelt. Anschließend wurde die Proteinexpression von ERAP1, ERAP2, STAT1, STAT3 und p53 (A) sowie von IRF1, IRF2, IRF3, IRF7, IRF9 und ISG15 (B) über Western Blot analysiert. Als endogene Kontrolle diente der Nachweis von GAPDH. Es ist jeweils ein Experiment von zwei unabhängigen Versuchen dargestellt. Der Nachweis der IRF2 Expression wurde einmalig durchgeführt.

Im Gegensatz zu Doxorubicin führte IFN- γ zu einer deutlichen Hochregulation der ERAP Expressionen in Ma-Mel-86a und UKRV-Mel-15a Zellen (Abb. 23). In den Ma-Mel-47 Zellen hingegen konnte nur eine schwache IFN- γ -vermittelte Induktion der ERAP1 und

ERAP2 Proteinexpression detektiert werden, welche der nach Doxorubicinbehandlung ähnelte.

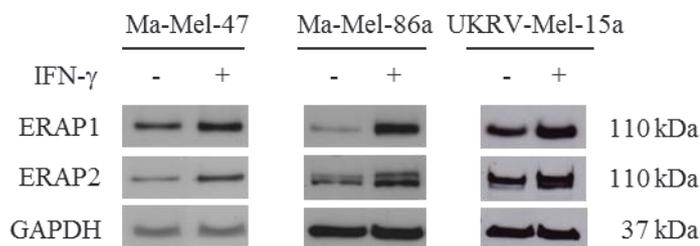


Abb. 23: Proteinexpression von ERAP1 und ERAP2 in Melanomzellen nach IFN- γ Behandlung. Ma-Mel-47, Ma-Mel-86a und UKRV-Mel-15a wurden für 48 h mit 500 U/ml IFN- γ behandelt. Über einen Western Blot wurde die ERAP1 und ERAP2 Proteinexpression detektiert. Als endogene Kontrolle diente der Nachweis von GAPDH. Es ist ein repräsentativer Versuch von zwei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Der ERAP1 und auch der ERAP2 Promotor weisen potentielle Bindungsstellen für verschiedenste Transkriptionsfaktoren auf (Abb. 18). Um einen Eindruck darüber zu bekommen, welche dieser Transkriptionsfaktoren eine mögliche Induktion der ERAP1 und ERAP2 Genexpression nach Doxorubicinbehandlung hervorrufen könnten, wurde die p53, STAT1, pY(701)-STAT1, STAT3 und pY(705)-STAT3 Proteinexpression sowie der IRF1, 2, 3, 7 und 9 Proteingehalt in Ma-Mel-47, Ma-Mel-86a und UKRV-Mel-15a untersucht. Zusätzlich wurde die ISG15 Expression in diesen Zellen analysiert (Abb. 22). In den p53 positiven Ma-Mel-47 und Ma-Mel-86a Zellen konnte eine deutliche Hochregulierung von STAT1, IRF9 und eine leichte Induktion von ISG15 verzeichnet werden, welche Komponenten oder im Fall von ISG15 ein Zielgen des JAK/STAT Signaltransduktionsweges sind. Zusätzlich wies die Zelllinie Ma-Mel-47 ein erhöhtes pY(701)-STAT1 Level sowie eine leichte IRF1 Hochregulation auf. Im Gegensatz dazu zeigten die Transkriptionsfaktoren IRF2, IRF3 sowie IRF7 entweder eine gleichbleibende oder eine verringerte Expression in den Ma-Mel-47 und Ma-Mel-86a Zellen nach Doxorubicinbehandlung. In der p53 negativen UKRV-Mel-15a Zelllinie wurde keiner dieser Transkriptionsfaktoren durch Doxorubicin induziert. Lediglich STAT3 und die phosphorylierte Form von STAT3 wurden durch Doxorubicin in UKRV-Mel-15a hochreguliert. Dieser Effekt konnte auch in den Ma-Mel-47 Zellen detektiert werden.

Basierend auf diesen Ergebnissen ist es durchaus möglich, dass die Doxorubicinvermittelte Induktion der ERAP1 Expression in den Ma-Mel-47 Zellen direkt durch den Transkriptionsfaktor p53 gewährleistet wird. Es wäre aber auch denkbar, dass verschiedene Komponenten des JAK/STAT-Signalweges, die nur in p53 positiven Zellen durch

Doxorubicin induziert werden können, zur verstärkten ERAP1 Expression in den Ma-Mel-47 Zellen beitragen.

6.3 Induktion von IL-6 in Doxorubicin behandelten Melanomzellen

Doxorubicin kann neben p53, STAT1 und STAT3 auch eine Menge anderer Transkriptionsfaktoren induzieren, wie z.B. AP1, AP-2, CREB, HIF1, STAT5 und ATF-2 [178]. All diese Transkriptionsfaktoren spielen eine wichtige Rolle in der Expression verschiedenster Gene, die Zytokine, Chemokine, Angiogenese- und Wachstumsfaktoren kodieren. Eines dieser Zytokine ist Interleukin-6 (IL-6). In diesem Zusammenhang wurde bereits beschrieben, dass Doxorubicin die Produktion von IL-6 in verschiedenen Tumorzelllinie induzieren kann [178]. Aus diesem Grund wurde eine IL-6 Freisetzung in den Doxorubicin behandelten Ma-Mel-47, Ma-Mel-86a und UKRV-Mel-15a überprüft. Hierfür wurden die Zellen für 72 h mit verschiedenen Doxorubicinkonzentrationen behandelt. Anschließend wurde das Medium dieser Zellen abgenommen und in einem IL-6 ELISA eingesetzt (Abb. 24).

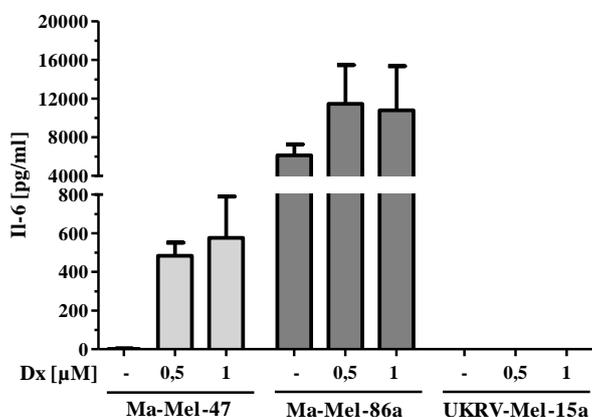


Abb. 24: IL-6 Freisetzung durch Melanomzellen nach Doxorubicin Behandlung. Ma-Mel-47, Ma-Mel-86a und UKRV-Mel-15a wurden für 72 h mit 0,5 µM bzw. 1 µM Doxorubicin behandelt. Das von den Zellen ins Medium freigesetzte IL-6 wurde durch einen IL-6 ELISA nachgewiesen. Es wurden zwei unabhängige Versuche zusammengefasst.

Dabei zeigte die Ma-Mel-86a Zelllinie bereits ohne Zytostatikazugabe eine hohe IL-6 Freisetzung. Eine Behandlung mit Doxorubicin führte zu einer Verdopplung der IL-6 Produktion (von ca. 6000 pg/ml auf ca. 12000 pg/ml) in dieser Zelllinie. In den Ma-Mel-47 Zellen konnte ebenfalls durch Doxorubicin die Freisetzung von IL-6 induziert werden, wobei die Produktion von IL-6 in diesen Zellen deutlich geringer ausfiel als bei den Ma-

Mel-86a Zellen. In der UKRV-Mel-15a Zelllinie hingegen konnte keine IL-6 Freisetzung nach Doxorubicinbehandlung detektiert werden.

6.4 ERAP1 und ERAP2 Expression in verschiedenen Melanomzelllinien

Da gezeigt werden konnte, dass ERAP1 einen Einfluss auf die antigene Epitopräsentierung in Melanomzellen hat und dass die Expression der ER Aminopeptidasen durch verschiedenste Faktoren und Mechanismen reguliert werden, stellte sich die Frage: Gibt es Unterschiede in der ERAP1- und der ERAP2 Expression in Zelllinien, welche aus verschiedenen Metastasen von Melanopatienten etabliert wurden. Hierzu wurde die Proteinexpression beider ER Aminopeptidasen in den Zelllinien des Patienten Ma-Me-61 (Ma-Mel-61a, b, f, g, h) (Abb. 25). und Ma-Mel-86 (Ma-Mel-86a, b, c, f) (Abb. 17) mittels Western Blot untersucht.

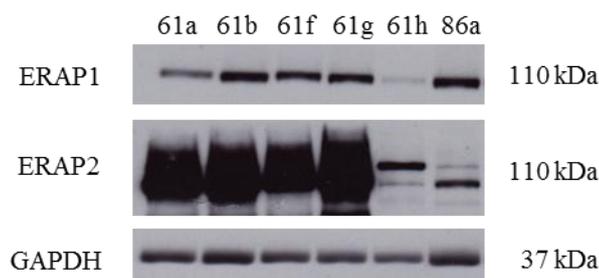


Abb. 25: ERAP1 und ERAP2 Proteinexpression in Zelllinien etabliert aus verschiedenen Metastasen zweier Melanopatienten. Der ERAP1 und ERAP2 Proteingehalt in den Melanomzelllinien des Patienten Ma-Mel-61 und in der Melanomzelllinie Ma-Mel-86a des Patienten Ma-Mel-86 wurde mittels Western Blot bestimmt (C). Als endogene Kontrolle wurde der Nachweis der GAPDH Expression mitgeführt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von vier unterschiedlichen Versuchen.

Dabei zeigten die Melanomzelllinien Ma-Mel-61a und Ma-Mel-61h eine deutlich verringerte ERAP1 Expression im Vergleich zu Ma-Mel-61b, Ma-Mel-61f und Ma-Mel-61g sowie zu Ma-Mel-86a (Abb. 25). Aber auch zwischen den Ma-Mel-86 Zelllinien konnten verschiedene ERAP1 Expressionen festgestellt werden (Abb. 17). So zeigten die Ma-Mel-86b und Ma-Mel-86c Zellen eine höhere ERAP1 Expression als Ma-Mel-86a und Ma-Mel-86f. ERAP2 hingegen wurde von den Zelllinien Ma-Mel-61a, -61b, -61f und -61g sehr stark exprimiert im Gegensatz zu Ma-Mel-61h und Ma-Mel-86a, wobei die Ma-Mel-61g Zelllinie den höchsten ERAP2 Proteingehalt aufwies. Die Ma-Mel-86 Zellen dagegen zeigten untereinander ähnliche ERAP2 Expressionen. Somit konnte demonstriert werden,

dass sowohl verschiedene ERAP1- als auch ERAP2 Expressionen in Zelllinien existieren, die aus verschiedenen Metastasen zweier Melanompatienten etabliert wurden.

7 Diskussion

Das maligne Melanom geht aus einer bösartigen Entartung pigmentbildender Melanozyten hervor und neigt zur frühzeitigen Bildung von Metastasen. Es kommt im Vergleich zu anderen dermatologischen Krebserkrankungen relativ selten vor, ist aber für 80% aller Hautkrebs-bedingten Todesfälle verantwortlich [179]. Zur Behandlung des malignen Melanoms existieren zahlreiche therapeutische Strategien, wie Chemotherapie oder Immuntherapie sowie eine Kombination aus Chemo-Immuntherapie. Die meisten dieser Behandlungsmethoden zeigen allerdings nur einen unzureichenden klinischen Effekt. Es existieren jedoch neue erfolgversprechende Therapieansätze, wie die adoptive Immuntherapie, die in klinischen Studien bei Patienten mit metastasierendem Melanom zum Einsatz kommen. So führte der adoptive Transfer von Melanom-reaktiven T-Zellen, die *in vitro* aus TILs isoliert wurden, in Lymphozyten-depletierten Patienten zu einer objektiven Tumorregression zwischen 50 und 70% [52-54]. Ein Manko dieser Strategie ist jedoch, dass Melanom-reaktive TILs nur aus 50% der herausgeschnittenen Tumorproben generiert werden können [180]. Daher werden seit kurzem gentechnisch veränderte autologe T-Zellen, die spezifisch gegen Tumorantigene gerichtete TCRs exprimieren, in klinischen Studien eingesetzt. Jüngste Resultate zeigen, dass die TCR-basierte Gentherapie, mit einer objektiven Ansprechrates von 45%, eine neue therapeutische Behandlungsmethode darstellt, die eine effiziente Tumorregression in Patienten mit metastasiertem Melanom vermittelt [57].

7.1 Mechanismen, welche die T-Zellerkennung von Tumoren beeinträchtigen

Verschiedene Faktoren, wie die Mikroumgebung des Tumors oder das Maß der durch die Tumorzellen präsentierten antigenen Peptide, beeinflussen den Ausgang einer adoptiven T-Zelltherapie. So können Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM), myeloide Suppressorzellen (*Myeloid-derived suppressive cells* (MDSC)), CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen und Th17-Zellen sowie deren assoziierten Zytokine sowohl die Reaktivität der Tumor-spezifischen Effektor T-Zellen beeinträchtigen als auch die Tumorentwicklung fördern [181]. Ebenfalls können Defekte oder Veränderungen in der Expression verschiedener Komponenten des MHC Klasse I Antigen prozessierenden und präsentierenden Wegs die Erkennung der Tumorzellen durch spezifische CD8⁺ T-

Lymphozyten beeinträchtigen oder gänzlich unterbinden. So führen Mutationen/Deletionen in den schweren Ketten der MHC Klasse I Moleküle und des β 2-Mikroglobulins zu einer veränderten bzw. zu einem Totalverlust der MHC Klasse I Expression [182]. Aber auch Mutationen in TAP1 können einen MHC Klasse I Verlust verursachen [183, 184]. Epigenetische Veränderungen hervorgerufen durch DNA Methylierungen, Histondeacetylierungen sowie transkriptionelle und post-transkriptionelle Modulationen können ebenfalls die Expression der MHC Klasse I Moleküle und verschiedener Antigen Prozessierungsmaschinerie (APM) Komponenten sowie potentieller Antigene hemmen [185-188]. Allerdings kann im Falle einer epigenetischen Abschaltung die Genexpression durch DNA Demethylierungsagenzien oder Histondeacetylase-Inhibitoren wiederhergestellt werden. Aber auch immunstimulatorische Zytokine, wie Interferone, können die Expression der MHC Klasse I Moleküle sowie einiger APM Komponenten in Tumorzellen regenerieren, wie den Proteasomaktivator PA28 [73], die Immunproteasom-Untereinheiten (β 1i, β 2i und β 5i) [78], TAP [189, 190], Tapasin [190, 191] sowie verschiedene an der Antigen-Prozessierung beteiligten Aminopeptidasen (ERAP1, ERAP2, LAP) [88, 118]. Jedoch existieren in Tumorzellen auch Resistenzen gegen eine IFN- γ vermittelte Induktion der MHC Klasse I Moleküle und APM Komponenten, die durch Defekte im JAK/STAT-Signalweg hervorgerufen werden [190, 192, 193].

7.2 Die Rolle der ER Aminopeptidasen in der T-Zellerkennung von Tumoren

Zwei IFN- γ induzierbare APM Komponenten sind die ER lokalisierten Aminopeptidasen ERAP1 und ERAP2. Diese beiden Peptidasen schneiden am N-terminalen Ende von Vorläuferpeptiden und spielen eine wichtige Rolle bei der finalen Generierung antigener Peptide, die an der Zelloberfläche über MHC Klasse I Moleküle den CD8⁺ T-Lymphozyten präsentiert werden [116, 128]. So konnte im murinen System gezeigt werden, dass ERAP1 an der Prozessierung viraler [128] und parasitärer [130] MHC Klasse I Epitope beteiligt ist. Interessanterweise zeigten Mehta *et al.*, dass sowohl ein partieller Verlust der ERAP1 Expression als auch Einzelnukleotid-Polymorphismen (*Single nucleotide polymorphism*, SNPs) im ERAP1 Gen signifikant mit einer verringerten Überlebensrate der Patienten mit Gebärmutterhalskrebs assoziiert sind [194, 195]. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass eine Herunterregulation von ERAP1 das antigene Peptid-Repertoire derart verändert, dass ein weniger immunogener Phänotyp des Tumors

entsteht, der mit Tumorwachstum und Progression einhergeht. Um den Einfluss einer veränderten ERAP1 Expression auf die HLA Klasse I restringierte Epitop-Präsentation durch Melanomzellen und die damit verbundene Antigen-spezifische T-Zellerkennung zu klären, wurde in der vorliegenden Arbeit das humane autologe Tumor-T-Zell System des Patienten Ma-Mel-86 verwendet (Abb. 3). In zwei HLA Klasse I positiven Zelllinien (Ma-Mel-86a und Ma-Mel-86c) dieses Patienten (Abb. 4) wurde ERAP1 stabil durch eine ERAP1 spezifische shRNA herabreguliert (Abb. 7) und anschließend der Einfluss von ERAP1 auf die Generierung und Präsentation von Tumorantigenen in Melanomzelllinien analysiert.

7.2.1 Reduktion der ERAP1 Expression verändert das HLA Klasse I Antigen-Epitoprepertoire in Melanomzellen

Zunächst wurde die Fähigkeit Tumor-spezifischer autologer CD8⁺ T-Zellen, Tumorzellen mit einer ERAP1 Herabregulation zu erkennen, analysiert. Dabei zeigte sich, dass eine verminderte ERAP1 Expression die Erkennung der Melanomzellen durch autologe "bulk" CD8⁺ T-Lymphozyten beeinträchtigte (Abb. 9), was auf eine Veränderung im Antigen-Epitoprepertoire der HLA Klasse I Moleküle hindeutet. In diesem Kontext demonstrierten Hammer *et al.*, dass ein Verlust der ERAP1 Expression in Mäusen die Generierung von natürlich prozessierten Peptiden im ER zum Erliegen bringt und die Stabilität der Peptid-MHC Klasse I Komplexe verringert sowie die CD8⁺ T-Zellantworten beeinträchtigt [126]. Zusätzlich konnte in ERAP1-defizienten Mäusen ein partieller Verlust in der MHC Klasse I Oberflächenexpression nachgewiesen werden [115, 165, 166, 196]. Eine signifikante Verringerung der HLA Klasse I Expression in humanen Melanomzellen mit herabgesetzter ERAP1 Expression konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht detektiert werden (Abb. 8, Abb. 10, Abb. 13). Daher konnte ausgeschlossen werden, dass eine veränderte HLA Klasse I Präsentation für die verminderte autologe T-Zellerkennung verantwortlich ist. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass humane Zellen im Gegensatz zu murinen Zellen über eine weitere ER-Aminopeptidase, ERAP2, verfügen. ERAP1 und ERAP2 bevorzugen unterschiedliche Peptidsubstrate [116]. Wenngleich zur Rolle von ERAP2 in der Generierung spezifischer T-Zellepitope bislang kaum Informationen vorliegen, so ist doch anzunehmen, dass ERAP2 die Herabregulation von ERAP1 durch die Bereitstellung eines veränderten Epitoprepertoires kompensieren kann. Daher muss es nicht zwangsläufig zu einer Reduktion der HLA Klasse I Oberflächenexpression kommen.

Interessanterweise zeigten Blanchard *et al.* im murinen System, dass in Abwesenheit von ERAP1 verlängerte Peptide an MHC Klasse I binden. Wenngleich diese Komplexe sehr instabil sind, so konnte doch gezeigt werden, dass sich die CD8⁺ T-Zellantwort in MCMV-infizierten ERAP1-defizienten Mäusen ändert und potente MCMV-spezifische CD8⁺ Zellen hervorgehen können, die N-terminal verlängerte Epitope erkennen [197].

7.2.2 ERAP1 beeinflusst die Generierung Tumor-assoziiertes Epitope in Melanomzellen

Zurzeit ist wenig darüber bekannt, welche Epitope aus Melanom-assoziierten Antigenen durch ER Aminopeptidasen generiert werden. Altrich-VanLith *et al.* zeigten, dass die Prozessierung des Tyr₃₆₉₋₃₇₇ Epitops aus dem Melanom-Differenzierungsantigen Tyrosinase ERAP1 abhängig ist [198]. Zusätzlich demonstrierten Tanioka *et al.*, dass rekombinantes ERAP2 *in vitro* das ITDQVPFSV Epitop aus einem Vorläuferpeptid des Melanom-assoziierten gp100 Antigens generiert [117]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Prozessierung des mutierten HERPUD1 Epitops GLGPGFSS \underline{Y} , welches von der Melanomzelllinie Ma-Mel-86a über das HLA-B*15:01 Molekül präsentiert wird, ERAP1 abhängig ist (Abb. 12). HERPUD1 ist ein ER residentes Protein, das durch die *Unfolded Protein Response* (UPR) oder nach zellulärem Stress infolge von Aminosäuremangel sowie oxidativem Stress, induziert wird [199]. Es ist an der ER assoziierten Protein Degradation (ERAD) beteiligt und interagiert direkt mit der Ubiquitin-Ligase Hrd1. Dabei reguliert HERPUD1 die Hrd1-vermittelte Ubiquitinierung von Proteinen [200]. Im primären Prostatakarzinom korreliert eine verringerte HERPUD1 Expression mit einer erhöhten Rate an Fernmetastasierungen, während eine Überexpression von HERPUD1 *in vitro* Apoptose induziert. Eine Deletionsmutante von HERPUD1, der die Transmembrandomäne fehlt, induzierte rascher Apoptose als Wildtyp HERPUD1, während HERPUD1 mit fehlender Ubiquitin-ähnlicher Domäne als Apoptoseinhibitor agiert [199]. Inwieweit jedoch die Mutation im Ma-Mel-86a HERPUD1 (liegt nicht in einer der Domänen der Deletionsmutanten) die Funktion des Proteins in Melanomzellen beeinflusst, ist völlig unklar.

Da die Melanomzelllinie Ma-Mel-86a im Vergleich zu Ma-Mel-86c keine Melanom-Differenzierungsantigene exprimiert, wurde der Einfluss von ERAP1 auf die Antigenprozessierung ergänzend in Ma-Mel-86c untersucht. Diese Zelllinie präsentiert über die HLA-A*01:01 Moleküle ein Epitop (VPLDCVLYRY) des Melanom-

Differenzierungsantigen gp100, welches erstmals von Benlalam *et al.* in 2003 beschrieben wurde und auch über HLA-B*35 präsentiert werden kann [201]. Zusätzlich präsentiert die Ma-Mel-86c Zelllinie ein weiteres gp100 Epitop mit unbekannter Sequenz über HLA-A*01:01. Eine verminderte ERAP1 Expression reduzierte die Erkennung der Melanomzelllinie durch gp100 spezifische autologe CD8⁺ T-Zellklone (Abb. 16), was auf einen Einfluss von ERAP1 in der Generierung dieser gp100 Epitope hindeutet. Das gp100 Epitop VPLDCVLYRY besitzt ein X-Pro-X_n-Motiv. Peptide mit solch einem Motiv werden nicht von TAP in das ER transportiert [109, 110]. Dennoch werden solche Peptide über MHC Klasse I Moleküle präsentiert [202]. Dies deutet darauf hin, dass Vorläuferpeptide mit einer X_n-Pro-X_n-Sequenz in das ER gelangen und durch eine ER lokalisierte Aminopeptidase zu Peptiden mit einem X-Pro-X_n-Motiv generiert werden [203]. ERAP1 ist nicht in der Lage Peptide mit X-Pro-X_n-Motiven zu hydrolysieren [115, 123]. Folglich liegt es nahe, dass ERAP1 die Aminopeptidase ist, die für die Generierung solcher Peptide im ER verantwortlich ist und diese für die MHC Klasse I Beladung zur Verfügung stellt. Die Ma-Mel-86c Zelllinie präsentiert weiterhin ein Epitop über HLA-Cw*07:01, welches vom Melanom-assoziierten Antigen CSPG4 stammt. Eine Herabregulation von ERAP1 in dieser Melanomzelllinie führte nicht zu einer verringerten Stimulation des Epitop-spezifischen autologen CD8⁺ T-Zellklons (Abb. 16). Dies weist darauf hin, dass ERAP1 nicht an der Entstehung des CSPG4 Epitops beteiligt ist.

Die Ergebnisse zeigen, dass ERAP1 eine wichtige Rolle im Prozess der MHC Klasse I Epitopgenerierung in Melanomzellen übernimmt. Parallel werden aber auch Tumor-assoziierte CD8⁺ T-Zell Epitope präsentiert, deren Generierung unabhängig von dieser Aminopeptidase stattfindet. Es existieren eine Anzahl weiterer Proteasen, die an der Entstehung von Melanom-assoziierten Epitopen mitwirken. So ist die IFN- γ induzierte Expression des PA28-Proteasoms in Melanomzellen Voraussetzung für eine effiziente Präsentation eines CTL Epitops, welches vom Melanom-Antigen TRP-2 (TRP-2₃₆₀₋₃₆₈) stammt [162]. Die Prozessierung des MAGE-3 Epitops (AELVHFLLL) [204] und des MAGE-C2₃₃₆₋₃₄₄ Peptids [205] hingegen erfordern die Präsenz des Immunproteasoms, während die Generierung des Melan-A₂₆₋₃₅ Epitops aus dem Melan-A/MART-1 Differenzierungsantigen in Anwesenheit des Immunproteasoms signifikant reduziert ist [87]. Auch das gp100₂₀₉₋₂₁₇ Epitop sowie das Tyrosinase₃₆₉₋₃₇₇ Peptid werden besser durch das Standard-Proteasom prozessiert, während das Immunproteasom diese Peptide eher zerstört [205]. Dies zeigt, dass auch die verschiedenen Zustandsformen des Proteasoms für die Präsentation von Epitopen aus Tumorantigenen über MHC Klasse I Moleküle eine

wichtige Rolle spielen. Es wurden auch zytosolische Peptidasen ausfindig gemacht, die an der Prozessierung einzelner Tumorepitope beteiligt sind. So beruht die Generierung des Melan-A₂₆₋₃₅ Epitops auf der katalytischen Aktivität von TOP [102]. TOP kann ebenfalls gemeinsam mit Nardilysin das CTL Epitop PRA₁₉₀₋₁₉₈ generieren, welches vom Tumor-assoziierten Protein PRAME stammt [102].

Aufgrund der Bedeutung von ERAP1 in der Epitopräsentierung von Melanomzellen ist davon auszugehen, dass eine heterogene Expression der ER Aminopeptidasen in Metastasen von Tumorpatienten mit qualitativen Veränderungen im antigenen HLA Klasse I Peptid-Repertoire verbunden ist. Daher wurde in einem weiteren Schritt das Expressionsprofil von ERAP1 und ERAP2 in verschiedenen Zelllinien sowie die Regulation der ERAP Expressionen analysiert.

7.3 Zelllinien etabliert aus verschiedenen Metastasen eines Patienten weisen unterschiedliche Expressionen der ER Aminopeptidasen auf

Aufgrund der Bedeutung von ERAP1 in der Epitopräsentierung von Melanomzellen ist davon auszugehen, dass eine heterogene Expression der ER Aminopeptidasen in Metastasen von Tumorpatienten mit qualitativen Veränderungen im antigenen HLA Klasse I Peptid-Repertoire verbunden ist. Daher wurde in einem weiteren Schritt das Expressionsprofil von ERAP1 und ERAP2 in verschiedenen Zelllinien sowie die Regulation der ERAP Expressionen analysiert.

Es ist bereits bekannt, dass die Expression von ERAP1 und ERAP2 in verschiedenen humanen Geweben sehr unterschiedlich ausfällt. So konnten über immunhistochemische Färbungen verschiedene ERAP1/ERAP2 Phänotypen erfasst werden [206]. Während die Expression beider Aminopeptidasen in Brust, Haut, Endometrium, Ovarium, Leber, Lunge und Pankreas nachweisbar ist, exprimieren die Niere und die Harnblase nur ERAP2. Im Vergleich dazu ist keine der beiden Peptidasen im Kolon, Magen, Testis, Gehirn, Thyreoidea und Melanozyten detektierbar. In diesem Zusammenhang zeigten Kamphausen *et al.*, dass Melanozyten zwar eine ERAP1- und ERAP2 mRNA Expression aufweisen jedoch keine Proteinexpression nachweisbar ist [207]. Im Gegensatz dazu konnte in verschiedenen Melanomzelllinien sowohl eine starke heterogene ERAP mRNA- als auch Proteinexpression nachgewiesen werden, wobei die mRNA Expression nicht immer mit dem Proteingehalt korrelierte [207]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Proteinexpression der ER Aminopeptidasen in mehreren Zelllinien, welche aus verschiedenen Metastasen

zweier Melanom-Patienten etabliert wurden, analysiert (Abb. 17, Abb. 25). Dabei zeigte sich eine heterogene Expression von ERAP1 zwischen den Zelllinien des Patienten Ma-Mel-61 bzw. Ma-Mel-86. Im Vergleich der ERAP2 Expression zwischen den Ma-Mel-61 Zellen ergaben sich ebenfalls Expressionsunterschiede, wobei überraschenderweise vier der fünf Zelllinien des Patienten Ma-Mel-61 eine starke Expression von ERAP2 aufwiesen. Die Ma-Mel-86 Zellen hingegen wiesen untereinander relativ ähnliche ERAP2 Expressionsmuster auf. Basierend auf dieser Beobachtung und den Ergebnissen zum Einfluss von ERAP1 auf die Epitop Präsentation von Tumorzellen ist anzunehmen, dass einzelne Metastasen eines Melanompatienten dadurch deutliche Unterschiede im HLA Klasse I Epitoprepertoire aufweisen können, was die Effizienz Epitop-spezifischer Tumorthérapien, wie den adoptiven Transfer TCR-transgener CD8⁺ T-Zellen, beeinflussen könnte.

7.4 IFN- γ induziert in der Mehrzahl der getesteten Melanomzelllinien eine Hochregulation der ER Aminopeptidasen

Die Expression der ER Aminopeptidasen kann durch Typ I (IFN- α und IFN- β) [118] und durch Typ II (IFN- γ) Interferone hochreguliert werden [114, 119]. Um einen Überblick zu bekommen, ob auch die in dieser Arbeit verwendeten Melanomzelllinien sensitiv für Interferone sind, wurden diese für 48 h mit IFN- γ behandelt. Die Mehrzahl der getesteten Zelllinien zeigte dabei eine Hochregulation der ERAP1 und ERAP2 Expression (Abb. 17, Abb. 23). Nur in der Ma-Mel-86c Zelllinie konnte, trotz intaktem IFN- γ Signalwegs, keine eindeutige IFN- γ -vermittelte Induktion beider Enzyme detektiert werden. Ma-Mel-86c weist bereits ohne IFN- γ Behandlung einen erhöhten pY(701)-STAT1 Gehalt auf, im Gegensatz zu den anderen Ma-Mel-86 Zellen. Daher wäre es durchaus denkbar, dass pY(701)-STAT1, unabhängig vom IRF1 Gehalt, die basale Expression der ER Aminopeptidasen in Ma-Mel-86c beeinflusst und eine zusätzliche Aktivierung von STAT1 durch IFN- γ keinen weiteren Einfluss auf die ERAP1 und ERAP2 Expression hat.

Es wäre aber auch denkbar, dass bislang unbekannte Defekte im IFN- γ Signalweg die Hochregulation der ERAP1 und ERAP2 Expressionen beeinträchtigen können. Die IFN- γ -vermittelte Induktion verschiedener Gene wird durch den JAK/STAT1-Signalweg gewährleistet. Dabei bindet IFN- γ an einen Typ II IFN Rezeptor, der an der Oberfläche der Zellen exprimiert wird. Dieser Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten, dem IFN- γ Rezeptor 1 (IFNGR1) und dem IFNGR2 [208, 209]. Die Bindung von IFN- γ führt zur

Oligomerisierung dieser beiden Rezeptoruntereinheiten und zur Aktivierung der IFNGR1 assoziierten Janus Kinase 1 (JAK1) sowie der IFNGR2 verknüpften Janus Kinase 2 (JAK2). Diese beiden aktivierten Kinasen induzieren die Phosphorylierung von STAT1, was zur Bildung von STAT1-STAT1 Homodimeren führt. Dieses Dimer bindet nach Translokation in den Zellkern an *IFN- γ -activated site* (GAS) Elemente und initiiert die Transkription bestimmter Zielgene (ISGs) (Abb. 26) [210]. Über molekulare Mechanismen, die eine IFN- γ Resistenz in Melanomzellen hervorrufen können, ist bis jetzt relativ wenig bekannt. Rodríguez *et al.* zeigten, dass eine beeinträchtigte STAT1 (Tyr701) Phosphorylierung im IFN- γ Signalweg zu einem Verlust der IFN- γ -vermittelten HLA Klasse I Hochregulation führte. Ebenfalls konnte in einer weiteren Melanomzelllinie eine IFN- γ Resistenz nachgewiesen werden, die durch eine epigenetische Blockade der IRF-1 Transaktivierung hervorgerufen wurde [192]. Respa *et al.* hingegen demonstrierten, dass ein Verlust der JAK2 Expression, hervorgerufen durch eine Deletion des JAK2 Gens, nicht nur die IFN- γ Induzierbarkeit der HLA Klasse I Moleküle sowie verschiedener APM Komponenten beeinträchtigte sondern auch deren basale Expression reduzierte [190]. Unabhängig vom JAK/STAT Signalweg könnten auch andere transkriptionelle und/oder posttranskriptionelle Mechanismen die IFN- γ -vermittelte Induktion der ERAPs unterbinden. Es wurden Mutationen in der Promotorregion der ERAPs beschrieben, die zu einer verringerten Promotoraktivität führen [207], so dass es auch denkbar wäre, dass über entsprechende Mutationen die IFN- γ Sensitivität der Promotoren beeinflusst wird. Es existieren aber auch Transkriptionsfaktoren wie das *B lymphocyte-induced maturation protein-1* (auch bekannt als *PR domain-containing 1, with ZNF domain* (PRDM1)), welche die basale- und die IFN- γ -induzierte ERAP1 Expression unterdrücken können [169]. Aber auch posttranskriptionelle Mechanismen, vermittelt durch virale miRNAs, können die Expression von ERAP1 beeinflussen [129]. In wieweit jedoch zelluläre miRNAs die Expression der ER Aminopeptidasen beeinträchtigen können, ist bislang unbekannt.

7.5 *p53* abhängige Induktion von ERAP1 nach Zytostatika Behandlung

Wie zuvor beschrieben kann die Expression der ER Aminopeptidasen durch Interferone hochreguliert werden [114, 118, 119]. In diesem Zusammenhang zeigten Tanioka *et al.*, dass für die basale Expression von ERAP2 der Transkriptionsfaktor IRF2 eine wichtige Rolle spielt, während die IFN- γ -vermittelte Hochregulation von ERAP2 primär durch IRF1 gewährleistet wird [119]. IRF1 und IRF2 können ebenfalls die Genexpression von ERAP1

regulieren [169]. Sowohl ERAP1 als auch ERAP2 besitzen in ihrem Promotorbereich IRF-Bindungs-elemente (IRF-E) an die diese IRFs binden können. Das IRF-E im Promotorbereich von ERAP1 überlappt mit der Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor PRDM1, welcher, wie bereits erwähnt, als potenter Repressor für die basale- sowie die IFN- γ -induzierte ERAP1 Expression agieren kann [169]. Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der direkt an die Promotorsequenz von ERAP1 und ERAP2 binden kann und dadurch die Expression der Aminopeptidasen reguliert, ist NF κ B [120].

Die Anwendung des Programms MatInspector von Genomatix (www.genomatix.de), welches potentielle Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren innerhalb einer gegebenen DNA Sequenz vorhersagt, deutet neben einer Präsenz von IRF-Bindungsstellen auch auf das Vorhandensein von HSF, STAT1 und STAT3 Bindungsmotiven im ERAP1 Promotor hin. (Abb. 18A). Von besonderem Interesse war jedoch der Hinweis auf die potentielle Bindungsstelle für p53 im ERAP1 Promotor. Der Tumorsupressor p53 wird durch Stresssignale aktiviert, die z.B. durch DNA Schädigung, Onkogenexpression, Hypoxie sowie durch Nährstoffmangel und Virusinfektionen hervorgerufen werden [174, 211, 212]. Er induziert die Expression verschiedenster Gene, die am Zellzyklus-Arrest, an der Apoptose und Seneszenz sowie an der DNA Reparatur beteiligt sind [213]. Aber auch Chemotherapeutika wie Fludarabin, Doxorubicin oder Cisplatin [170], die in der Krebsbehandlung Verwendung finden [214], rufen eine Aktivierung von p53 hervor. In verschiedenen Studien werden zurzeit die immunmodulierenden und immunstimulierenden Eigenschaften solcher Chemotherapeutika intensiv untersucht [168, 215]. Untersuchungen an Zelllinien haben ergeben, dass Doxorubicin oder Cisplatin behandelte Tumorzellen einen beachtlichen Anstieg in der Produktion verschiedenster Zytokine, Chemokine sowie Angiogenese- und Wachstumsfaktoren (IL-6, CXCL8, CCL2, CCL5, BFGF, G-CSF, und VEGF) zeigen [178]. Weiterhin konnte bereits demonstriert werden, dass geringe nicht-zytotoxische Konzentrationen an Doxorubicin, in einer humanen Kolon Karzinom Zelllinie, die Expression verschiedener APM Komponenten, wie LMP2, LMP7, TAP1, Tapasin und β -2M induzieren [216]. Doxorubicin interkaliert in die DNA [217]. Dabei stabilisiert es den Topoisomerase II-DNA Spaltungskomplex, was zu Doppelstrangbrüchen in der DNA führt [214, 218], so dass es zur Inhibierung der RNA- und DNA Synthese kommt [219]. Diese Doxorubicin-induzierten DNA Schäden rufen eine p53 Aktivierung hervor. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stellte sich daher die Frage, ob Doxorubicin auch die Expression der ERAPs beeinflussen kann. Um die Rolle von p53 in Doxorubicin-vermittelten Effekten zu klären, wurden die Untersuchungen sowohl an p53 Wildtyp

(HCT116, Ma-Mel-47) und p53 negative Tumorzellen (HCT116 p53^{-/-}, UKRV-Mel-15a) als auch an einer Zelllinie mit einer p53 Mutation (Ma-Mel-86a) durchgeführt. Die in den Ma-Mel-86a Zellen vorliegende Mutation im *TP53* Gen führt zu einem R248W Aminosäureaustausch, der direkt in der DNA-Bindungsdomäne des p53 Proteins lokalisiert und mit einem Verlust der transkriptionellen Aktivität verbunden ist [173, 174]. Sowohl die p53 Wildtyp Zellen (HCT116, Ma-Mel-47) als auch die p53 mutierte Zelllinie (Ma-Mel-86a) zeigten eine basale Expression von p53, jedoch konnte nur in den p53 Wildtyp Zellen eine eindeutige Induktion der p53 Expression durch Doxorubicin nachgewiesen werden (Abb. 19). Zusätzlich wurde auch in den p53 Wildtyp Zellen eine deutliche Hochregulation des p53 Zielgens p21 [175] detektiert. Aber auch die Zelllinie mit mutiertem p53 sowie die p53 negativen Zellen zeigten eine Doxorubicin vermittelte Induktion von p21, die aber insbesondere in den p53 negativen Zellen deutlich geringer ausfiel (Abb. 19). Neben der p53 vermittelten Induktion von p21 existieren noch weitere Signalwege, die eine p21 Expression nach Zytostatikabehandlung herbeiführen können. So demonstrierten Ma *et al.*, dass auch der Transkriptionsfaktor NFκB/p65 nach Doxorubicinbehandlung in p53 negativen Zellen p21 induzieren kann [177]. Interessanterweise wurde auch beschrieben, dass transkriptionell inaktives p53 unter Zytostatikaeinfluss STAT1 aktivieren kann (Abb. 26) [170] und aktiviertes STAT1 wiederum in der Lage ist, die Expression von p21 zu induzieren [176, 220].

Die p53 exprimierenden und p53 negativen Tumorzelllinien wurden mit einem ERAP1- bzw. ERAP2 Promotorgenkonstrukt transfiziert und anschließend mit Doxorubicin oder als Kontrolle mit IFN-γ behandelt (Abb. 20). Dabei konnte eine erhöhte Aktivität des ERAP1 Promotorfragments in p53 Wildtyp Tumorzellen registriert werden, während die p53 negativen Zellen sowie die Zelllinie mit mutiertem p53 keine Aktivierung des ERAP1 Promotorfragments aufwiesen. Eine Doxorubicin induzierte Aktivierung des ERAP2 Promotorfragments konnte sowohl in p53 Wildtyp Zellen als auch in der p53 mutierten Zelllinie detektiert werden, während in den p53 negativen Zellen nur eine leichte bis gar keine Aktivität des ERAP2 Promotorfragments nachweisbar war. Im Vergleich dazu konnte eine erhöhte ERAP1 mRNA Expression in allen p53 exprimierenden Zellen aber nicht in p53 negativen Zellen gemessen werden, während der ERAP2 mRNA Gehalt nach Zytostatikabehandlung sowohl in p53 exprimierenden als auch in einer p53 negativen Zelllinie anstieg. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Induktion der ERAP1 Expression nach Doxorubicinbehandlung p53 abhängig ist, während ERAP2 auch in p53 negativen Zellen induziert werden kann. Ob p53 direkt die Expression von ERAP1

reguliert oder eher indirekt über andere p53-vermittelte Signalwege, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt werden. Im Fall der p53 mutierten Zelllinie wäre es denkbar, dass transkriptionell inaktives p53 die Aktivierung von STAT1 vermittelte und so zur Expression von ERAP1 während der Zytostatikabehandlung führte [170]. Die Differenzen zwischen den Aktivitäten der ERAP Promotorfragmente und den entsprechenden mRNA Expressionen könnten dadurch erklärt werden, dass Doxorubicin Transkriptionsfaktoren induziert, die außerhalb des verwendeten Promotorfragments binden und dadurch zur Induktion der mRNA Expressionen beisteuerten. Aber auch posttranskriptionelle Regulationsmechanismen können für die Diskrepanz zwischen der Aktivität der Promotorfragmente und der mRNA Expression verantwortlich sein. So gibt es Hinweise, dass eine Doxorubicin vermittelte DNA-Schädigung Mechanismen induziert, die eine posttranskriptionale Stabilisierung spezifischer mRNAs hervorrufen können [221]. Ein weiterer Aspekt ist, dass Chemotherapeutika, unter anderem auch Doxorubicin, die Ribosom Biogenese beeinträchtigen können und dadurch die Translation von Proteinen verändern [222]. Dies könnte zu einer Akkumulation der mRNA führen und würde erklären, warum ein erhöhter mRNA Gehalt der ERAPs detektiert werden kann, dies sich aber auf Proteinebene nicht widerspiegelt (Abb. 22). Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Doxorubicin die Expression der ERAP mRNAs unabhängig von Wildtyp 53 regulieren kann, wenngleich p53 direkt bzw. indirekt an der Induktion der ERAP1 mRNA Expression beteiligt ist.

7.6 Doxorubicin induziert die Expression verschiedener Komponenten des IFN-Signalwegs in p53-exprimierenden Zellen

p53 wird nicht nur durch DNA-Schädigung aktiviert, sondern kann auch während einer viralen Infektion direkt durch den Typ I IFN Signalweg induziert werden [211]. Durch die Bindung von IFN α/β an den IFN- α Rezeptor wird die IFN- α Rezeptor 1 (IFNAR1) assoziierte Tyrosin Kinase 2 (TYK2) sowie die IFNAR2 gekoppelte JAK1 aktiviert. Diese beiden Kinasen wiederum rekrutieren und phosphorylieren STAT1 und STAT2, was zur STAT1/STAT2-Dimerisierung führt. Gemeinsam mit IRF9 bildet dieses STAT-Heterodimer den *Interferon-stimulated gene factor 3* (ISGF3) Komplex, der als Transkriptionsfaktor direkt an die *Interferon stimulated response element* (ISRE) Promotor Sequenzen verschiedenster Gene bindet (Abb. 26) [210].

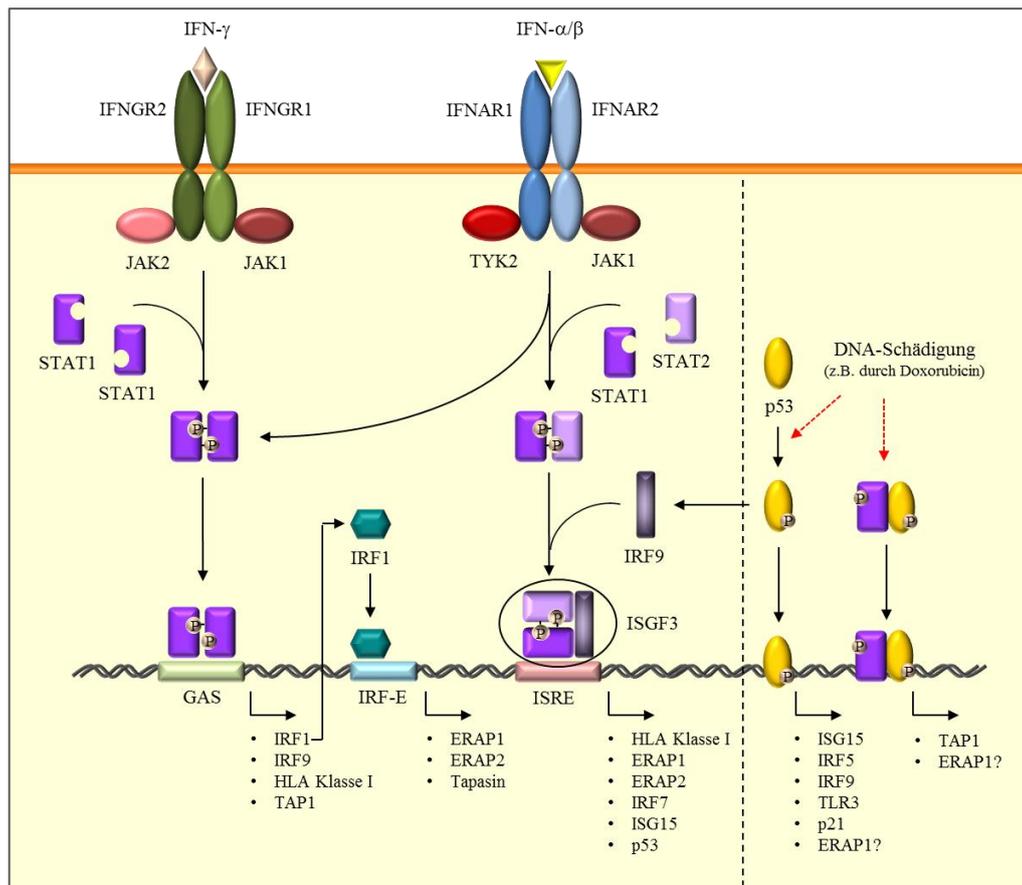


Abb. 26: IFN und p53 Signalwege. Dargestellt ist der Typ I IFN Signalweg (mitte), der Typ II IFN Signalweg (links) und der p53 Signalweg (rechts) sowie Überlappungen dieser Signalkaskaden. ER Aminopeptidase (ERAP), *IFN-γ-activated site* (GAS), *IFN-γ* Rezeptor 1 und 2 (IFNGR1 und 2), *IFN-α* Rezeptor 1 und 2 (IFNAR1 und 2), *Interferon regulatory factor* (IRF), IRF-Bindungsstelle (IRF-E), *Interferon-stimulated gene factor 3* (ISGF3), *interferon stimulated response element* (ISRE), Janus Kinase 1 und 2 (JAK1 und 2), *Signal Transducers and Activator of Transcription 1* und 2 (STAT1 und 2) Tyrosin Kinase 2 (TYK2), Phosphorylierung (P), *Toll-like receptor 3* (TLR3).

p53 besitzt ebenfalls in seinem Promotorbereich ISRE Sequenzen und kann daher direkt über den Typ I IFN Signalweg induziert werden [211]. Interessanterweise zeigen neuste Studien, dass IFN-induzierbare Gene wie IRF9 [223], IRF5 [224], ISG15 [225] und *Toll-like receptor 3* (TLR3) [226] auch direkt durch p53 transkriptionell induziert werden können, was auf eine Überschneidung zwischen dem p53 und IFN Signalweg sowohl bei der Tumorsuppression als auch bei der antiviralen Immunität hindeutet (Abb. 26). Basierend auf diesen Daten ist es möglich, dass Doxorubicin aktiviertes p53 ebenfalls Komponenten des IFN Signalweges induzieren kann. In diesem Kontext demonstrierten Youlyouz-Marfak *et al.*, dass auch durch eine Mutation transkriptionell inaktives p53 unter Zytostatikaeinfluss STAT1 aktivieren kann [170].

Da die Promotoren der ERAPs potentielle Bindungsstellen für verschiedene IRFs aufweisen (Abb. 18), liegt zusätzlich die Vermutung nahe, dass p53 induzierte IRFs die Induktion der ERAP Expressionen vermitteln können. Daher wurde die Expression

verschiedenster IRFs (IRF1, IRF2, IRF3, IRF7, IRF9), des STAT1 sowie des ISG15 in Doxorubicin behandelten Melanomzelllinien mit unterschiedlichen p53 Status analysiert (Abb. 22). Dabei zeigten die p53 Wildtyp- und die p53 mutierten Zelllinien eine Induktion von IRF9, ISG15 und STAT1, während die IRF2 Expression in beiden Zelllinien herabreguliert war. Für die IRF1- und IRF3- sowie IRF7 Expression in diesen beiden Zelllinien konnte hingegen keine eindeutige Beeinflussung durch Doxorubicin detektiert werden. Im Vergleich dazu, wurde in der p53 negativen Zelllinie keines der untersuchten Proteine durch Doxorubicin induziert. Diese Ergebnisse bezeugen, dass durch Doxorubicin aktiviertes p53 in der Lage ist, Komponenten des IFN Signalweges in Melanomzellen zu regulieren.

7.7 Induktion von STAT3 in Doxorubicin behandelten Melanomzellen

Doxorubicin kann ebenfalls den Transkriptionsfaktor STAT3 induzieren [172]. STAT3 wurde ursprünglich als DNA-bindender Faktor identifiziert, der durch IL-6 aktiviert werden kann (Abb. 27) und während einer akuten Entzündungsreaktion die Expression verschiedenster Gene reguliert [227]. Dieser Transkriptionsfaktor kann auch durch weitere Zytokine sowie Wachstumsfaktoren und onkogene Proteine aktiviert werden [228-230] und ist an einem breiten Spektrum biologischer Prozesse beteiligt. Es spielt bei der Regulierung der Proliferation, des Überlebens und der Apoptose sowie bei der Differenzierung von Zellen eine wichtige Rolle [231]. Aber auch während der Embryogenese ist STAT3 von zentraler Bedeutung, denn ein Verlust der STAT3 Expression führt zu einer frühzeitigen embryonalen Letalität [232]. Weiterhin können STAT3 pleiotrope Effekte in verschiedenen Organen und Zelltypen zugeschrieben werden [231]. Unter normalen Bedingungen ist STAT3 nur transient und unter strenger Überwachung transkriptionell aktiv. Jedoch ist es in einer Vielzahl humaner Krebsarten, wie bei Brustkrebs, Prostatakrebs und Melanom sowie beim Multiplen Myelom, Leukämien und Lymphomen, konstitutiv aktiv [229]. Dieses beständig aktivierte STAT3 wirkt dabei auf die Expression und Funktion verschiedenster Gene ein, die entscheidend für die Proliferation, das Überleben sowie für die Angiogenese, Invasion und Immunevasion der Tumorzellen sind [229, 233, 234]. Auch die in dieser Arbeit verwendeten Melanomzelllinien weisen eine basale Expression von STAT3 und phosphoryliertem STAT3 auf (Abb. 22). Eine Behandlung mit Doxorubicin erhöhte zusätzlich die Menge an pY(705)-STAT3 in zwei dieser Zelllinien, während sich in der

dritten Zelllinie der pY(705)-STAT3 Gehalt reduzierte. In diesem Zusammenhang demonstrierten Kim *et al.*, dass eine Doxorubicin induzierte Aktivierung von STAT3 durch den c-Jun N-terminale Kinase 1 (JNK1) Signalweg vermittelt wird. Dieses transkriptionell aktive STAT3 trägt jedoch dazu bei, dass die Doxorubicin induzierte Apoptose abgeschwächt wird und begünstigt dadurch eine Doxorubicin-Resistenz in den Tumorzellen [172]. Zudem zeigten Niu *et al.*, dass STAT3 die Expression von p53 unterdrücken kann, indem es direkt an dessen Promotor bindet und dadurch den p53 vermittelten Wachstumsarrest sowie Apoptose in Tumorzellen beeinträchtigt [235]. Im ERAP1 Promotor wurde die Präsenz einer STAT3 Bindungsstelle postuliert. Ob STAT3 tatsächlich die ERAP1 Expression beeinflussen kann, ist jedoch bis jetzt nicht bekannt.

7.8 IL-6 Freisetzung durch Doxorubicin behandelte Melanomzellen

Das multifunktionelle Zytokin Interleukin-6 (IL-6) wurde erstmals 1986 von Hirano *et al.* als B-Zell Differenzierungsfaktor identifiziert, der die finale Reifung von B-Zellen zu Immunglobulin-sekretierenden Zellen induziert [236]. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass IL-6 in verschiedenste biologische Prozesse involviert ist, wie z.B. in Immunantworten, in der Stoffwechsel- und Knochenhomöostase sowie bei der Hämatopoese und in Entzündungen [237, 238]. Es kann aber auch bei einer Autoimmunität, bei chronischen Entzündungen sowie bei der Onkogenese beteiligt sein [239-241]. IL-6 bindet an einen einzigartigen membrangebundenen Rezeptorkomplex, der aus einem IL-6 spezifischen Rezeptor (IL-6R) und aus dem Glykoprotein gp130 besteht [242]. Die Aktivierung des IL-6 Rezeptorkomplexes führt zur Induktion verschiedenster Signalwege wie des JAK/STAT-, Ras-ERK-MAPK- sowie des PI3K- Signaltransduktionsweges (Abb. 27) [243].

IL-6 wird von verschiedensten Zelltypen wie Endothelzellen, Keratinozyten, Fibroblasten, Monozyten, Lymphozyten sowie Granulozyten freigesetzt. Aber auch Melanomzellen sind in der Lage IL-6 zu produzieren und können dadurch einen parakrinen Effekt auf Zellen im umliegenden Stroma haben [244]. Arbeiten von Lu *et al.* deuten darauf hin, dass IL-6 während der malignen Tumorentwicklung von humanen Melanomzellen als bifunktionales Zytokin agiert. Es inhibiert das Wachstum von normalen Melanozyten und Melanomzellen eines frühen Stadiums über einen parakrinen Mechanismus. Indes weisen Melanomzellen eines fortgeschrittenen Stadiums eine ausgeprägte Tendenz auf, resistent gegenüber IL-6 induzierter Wachstumsinhibierung zu werden. In einigen Fällen produzieren diese Tumorzellen sogar konstitutiv endogenes IL-6, dass über einen autokrinen Mechanismus

deren Proliferation und Wachstum steigert [245]. Eine mögliche Erklärung für die IL-6 Resistenz könnte hierbei eine grundlegende Überexpression des *Suppressor of Cytokine Signaling 3* (SOCS3) Proteins sein, das als Suppressor des JAK/STAT3 Signalweges agiert [246]. Zudem konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine autokrine IL-6 Produktion eine Chemotherapeutika-Resistenz in Eierstockkrebszellen hervorrufen kann [247].

Daher wurde in dieser Arbeit die IL-6 Produktion in den drei verschiedenen Melanomzelllinien Ma-Mel-86a, Ma-Mel-47 und UKRV-Mel-15a, die mit Doxorubicin behandelt wurden, über einen IL-6 ELISA analysiert (Abb. 24). Hierbei zeigte die Zelllinie Ma-Mel-86a bereits ohne Zugabe von Doxorubicin eine hohe Freisetzung von IL-6 im Vergleich zu den anderen zwei getesteten Zelllinien Ma-Mel-47 und UKRV-Mel-15a. Durch eine Doxorubicinbehandlung konnte eine IL-6 Freisetzung durch die Ma-Mel-47 induziert werden. Aber auch die IL-6 Produktion in der Ma-Mel-86a Zelllinie erhöhte sich durch Doxorubicinzugabe, während für die UKRV-Mel-15a Zelllinie keine IL-6 Freisetzung ins Medium nachgewiesen werden konnte. Da IL-6 den JAK/STAT3-Signalweg über den IL-6 Rezeptorkomplex induzieren kann [243], wurde die IL-6 Freisetzung mit dem Phosphorylierungsstatus des STAT3 in den Doxorubicin behandelten Zelllinien verglichen. Dabei korrelierte bei den Ma-Mel-47 Zellen der pY(705)-STAT3 Gehalt mit dem freigesetzten IL-6, was auf eine autokrine Stimulation der IL-6 Produktion hindeuten könnte. Die Ma-Mel-86a Zelllinie hingegen produziert mit und ohne Doxorubicinbehandlung hohe IL-6 Mengen. Jedoch ist hierbei keine Induktion sondern eher eine Reduktion des pY(705)-STAT3 Gehalt durch die Zytostatikazugabe ersichtlich. Mögliche Erklärungen dafür wären, dass diese Zelllinie entweder keine IL-6 Rezeptorkomplexe besitzt oder dass der JAK/STAT3-Signalweg in diesen Zellen inhibiert wird. Im Vergleich dazu zeigt die UKRV-Mel-15a Zelllinie zwar keine detektierbare Freisetzung von IL-6 aber dafür eine Erhöhung des pY(705)-STAT3 Gehalts nach Doxorubicinbehandlung. Melanomzellen können eine Reihe weiterer Zytokine oder Wachstumsfaktoren freisetzen, die ebenfalls den JAK/STAT3-Signalweg aktivieren können [233, 244]. Daher wäre es möglich, dass in den UKRV-Mel-15a Zellen die Aktivierung von STAT3 über einen IL-6 unabhängigen Signalweg führt.

Interessanterweise ist IL-6 mit dem Krankheitsverlauf von Melanopatienten assoziiert. Eine Studie von Mouawad *et al.* zeigte, dass sowohl eine initial hohe IL-6 Konzentrationen als auch ein durch Chemotherapeutika hervorgerufener Anstieg an IL-6 im Serum von metastasierenden Melanopatienten mit einer zeitlich verkürzten Tumorprogression korreliert [248]. Aber auch in anderen Krebserkrankungen wie beim metastasenbildenden

Nierenzellkarzinom [249], dem fortgeschrittenen nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom [250] sowie dem ösophagealen Plattenepithelkarzinom [251], dem kolorektalem Krebs [252] und dem Prostatakrebs [253] ist eine erhöhte IL-6 Konzentration mit einer schlechten Prognose für den Patienten assoziiert.

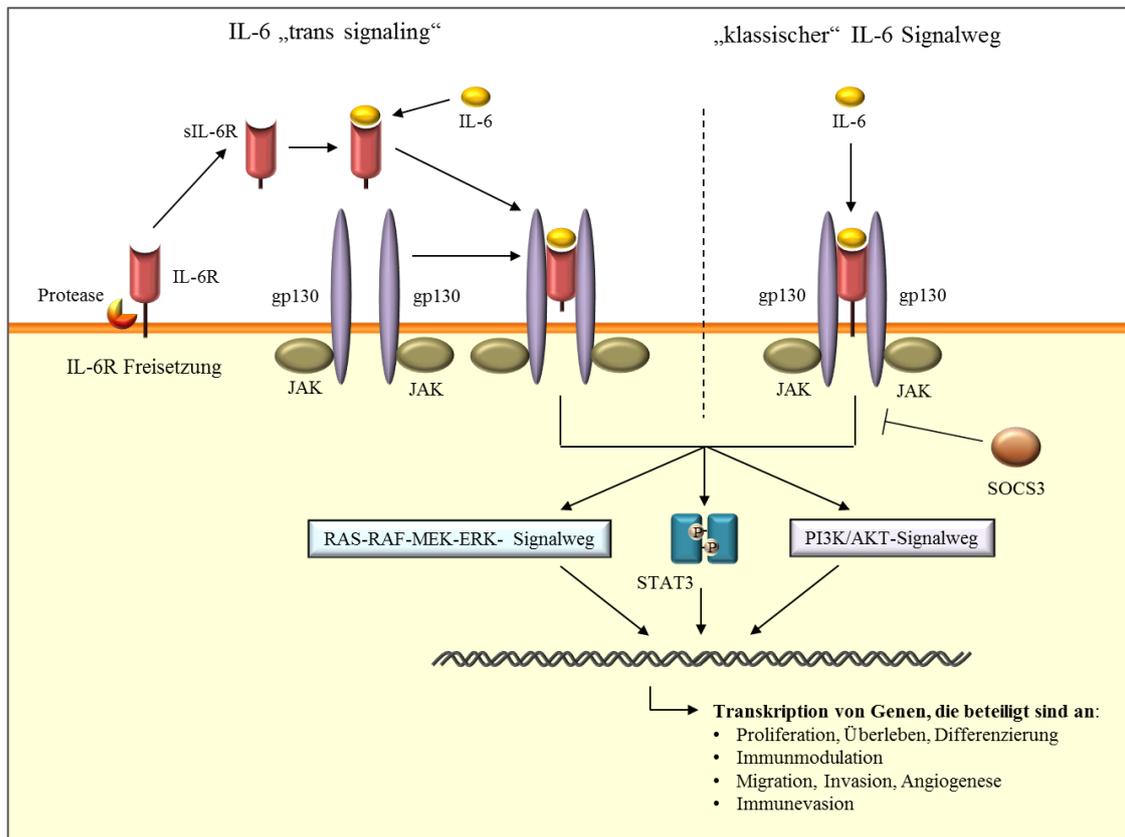


Abb. 27: Darstellung des klassischen IL-6 Signalweges sowie des IL-6 „trans signaling“. Beim klassischen IL-6 Signaltransduktionsweg bindet IL-6 an den membrangebundenen IL-6 Rezeptor (IL-6R)/gp130-Komplex und induziert die Aktivierung verschiedenster Signalwege wie den RAS-RAF-MEK-ERK-, PI3K/AKT- bzw. JAK/STAT3-Signalweg. Diese Signalwege können ebenfalls durch den IL-6 „trans signaling“ Weg induziert werden. Hierbei bindet IL-6 an einen löslichen IL-6R (sIL-6R), welcher nachfolgend mit membrangebundenen gp130 Molekülen assoziiert und dadurch die Signaltransduktion einleitet.

Eine zelluläre IL-6 Antwort kann, neben diesem „klassischen“ IL-6 Signalweg, d.h. über Bindung an einen Membran-ständigen Rezeptor, aber auch durch einen weiteren Mechanismus, dem so genannten IL-6 „trans signaling“, vermittelt werden (Abb. 27). Hierbei bindet freies IL-6 an einen löslichen IL-6R (sIL-6R). Dieser IL-6/sIL-6R-Komplex assoziiert daraufhin mit ubiquitär exprimierten gp130 Molekülen auf IL-6R negativen Zellen und ermöglicht die IL-6 vermittelte Stimulierung dieser Zellen [254]. Der sIL-6R entsteht hierbei entweder durch alternatives Spleißen [255] oder wird durch die Proteolyse der IL-6R Ektodomäne generiert. Letzteres wird durch die Metalloproteasen ADAM10 und

ADAM17 gewährleistet [254]. Ebenfalls gibt es Hinweise, dass auch ERAP1 an der Freisetzung des IL-6 Zytokinrezeptors beteiligt sein kann [140].

7.9 ERAP1 und Immunogenität des Melanoms – eine abschließende Einschätzung

Das zytotoxische Potential Tumorantigen-spezifischer CD8⁺ T-Lymphozyten gegenüber autologen Tumorzellen wird derzeit in verschiedenen Immuntherapie Studien zur Behandlung des malignen Melanoms genutzt. Die Wirksamkeit solcher T Zellen gegen den Tumor wird entscheidend durch die spezifische Epitopdichte auf den Tumorzellen beeinflusst. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ERAP1 für eine effiziente Generierung verschiedener Epitope aus Tumorantigenen eine wichtige Rolle spielt. Somit ist davon auszugehen, dass eine heterogene ERAP Expression in Metastasen von Tumorpatienten mit quantitativen und/oder qualitativen Veränderungen im antigenen HLA Klasse I Peptid-Repertoire verbunden ist. Dieser Effekt könnte die Effizienz Epitop-spezifischer Tumortherapien, wie den adoptiven Transfer TCR-transgener CD8⁺ T-Zellen, beeinflussen und sollte daher bei der Erstellung der Therapie berücksichtigt werden.

8 Quellenverzeichnis

1. Jung EG. *Dermatologie*. Stuttgart: Hippokrates Verlag GmbH; 1998.
2. M. Hagedorn CT, G. Gebert. *Haut*. Stuttgart: Schattauer Verlagsgesellschaft mbH; 1990.
3. Roguin A. Rene Theophile Hyacinthe Laennec (1781-1826): the man behind the stethoscope. *Clin Med Res* 2006,**4**:230-235.
4. Laver NV, McLaughlin ME, Duker JS. Ocular melanoma. *Arch Pathol Lab Med* 2010,**134**:1778-1784.
5. Liubinas SV, Maartens N, Drummond KJ. Primary melanocytic neoplasms of the central nervous system. *J Clin Neurosci* 2010,**17**:1227-1232.
6. Seetharamu N, Ott PA, Pavlick AC. Mucosal melanomas: a case-based review of the literature. *Oncologist* 2010,**15**:772-781.
7. Stadler R. *Bildatlas Malignes Melanom*. Wiesbaden: Deutscher Universitäts-Verlag; 2000.
8. Wood TF, DiFronzo LA, Rose DM, Haigh PI, Stern SL, Wanek L, *et al*. Does complete resection of melanoma metastatic to solid intra-abdominal organs improve survival? *Ann Surg Oncol* 2001,**8**:658-662.
9. Garbe C, Blum A. Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001,**14**:280-290.
10. de Vries E, Bray FI, Coebergh JW, Parkin DM. Changing epidemiology of malignant cutaneous melanoma in Europe 1953-1997: rising trends in incidence and mortality but recent stabilizations in western Europe and decreases in Scandinavia. *Int J Cancer* 2003,**107**:119-126.
11. Gabriele Husmann DPK, Prof. Dr. Alexander Katalinic, Dr. Joachim Bertz, Dr. Jörg Haberland, Dr. Klaus Kraywinkel MSc, Dr. Ute Wolf. *Krebs in Deutschland 2005/2006, Häufigkeiten und Trends*. Berlin: Robert Koch-Institut; 2010.
12. Psaty EL, Scope A, Halpern AC, Marghoob AA. Defining the patient at high risk for melanoma. *Int J Dermatol* 2010,**49**:362-376.
13. Ellerhorst JA, Greene VR, Ekmekcioglu S, Warneke CL, Johnson MM, Cooke CP, *et al*. Clinical correlates of NRAS and BRAF mutations in primary human melanoma. *Clin Cancer Res* 2011,**17**:229-235.
14. Jiang X, Zhou J, Yuen NK, Corless CL, Heinrich MC, Fletcher JA, *et al*. Imatinib targeting of KIT-mutant oncoprotein in melanoma. *Clin Cancer Res* 2008,**14**:7726-7732.
15. Wu H, Goel V, Haluska FG. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* 2003,**22**:3113-3122.
16. Yajima I, Kumasaka MY, Thang ND, Goto Y, Takeda K, Iida M, *et al*. Molecular Network Associated with MITF in Skin Melanoma Development and Progression. *J Skin Cancer* 2011,**2011**:730170.
17. Hansson J. Familial cutaneous melanoma. *Adv Exp Med Biol* 2010,**685**:134-145.
18. Evans SM, Schrlau AE, Chalian AA, Zhang P, Koch CJ. Oxygen levels in normal and previously irradiated human skin as assessed by EF5 binding. *J Invest Dermatol* 2006,**126**:2596-2606.
19. Horikoshi T, Balin AK, Carter DM. Effects of oxygen tension on the growth and pigmentation of normal human melanocytes. *J Invest Dermatol* 1991,**96**:841-844.
20. Kong Y, Kumar SM, Xu X. Molecular pathogenesis of sporadic melanoma and melanoma-initiating cells. *Arch Pathol Lab Med* 2010,**134**:1740-1749.

21. Bedogni B, Powell MB. Hypoxia, melanocytes and melanoma - survival and tumor development in the permissive microenvironment of the skin. *Pigment Cell Melanoma Res* 2009,**22**:166-174.
22. Gohl J, Hohenberger W, Merkel S. [Malignant melanoma]. *Chirurg* 2009,**80**:559-567.
23. Prieto VG. Sentinel lymph nodes in cutaneous melanoma: handling, examination, and clinical repercussion. *Arch Pathol Lab Med* 2010,**134**:1764-1769.
24. Bhatia S, Tykodi SS, Thompson JA. Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology (Williston Park)* 2009,**23**:488-496.
25. Garbe C, Terheyden P, Keilholz U, Kolbl O, Hauschild A. Treatment of melanoma. *Dtsch Arztebl Int* 2008,**105**:845-851.
26. Nikolaou VA, Stratigos AJ, Flaherty KT, Tsao H. Melanoma: New Insights and New Therapies. *J Invest Dermatol* 2012.
27. Davis ID, Brady B, Kefford RF, Millward M, Cebon J, Skrumsager BK, *et al.* Clinical and biological efficacy of recombinant human interleukin-21 in patients with stage IV malignant melanoma without prior treatment: a phase IIa trial. *Clin Cancer Res* 2009,**15**:2123-2129.
28. Kaufman HL, Kim DW, DeRaffele G, Mitcham J, Coffin RS, Kim-Schulze S. Local and distant immunity induced by intralesional vaccination with an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF in patients with stage IIIc and IV melanoma. *Ann Surg Oncol* 2010,**17**:718-730.
29. Rossi CR, Pasquali S, Mocellin S, Vecchiato A, Campana LG, Pilati P, *et al.* Long-term results of melphalan-based isolated limb perfusion with or without low-dose TNF for in-transit melanoma metastases. *Ann Surg Oncol* 2010,**17**:3000-3007.
30. Kaehler KC, Piel S, Livingstone E, Schilling B, Hauschild A, Schadendorf D. Update on immunologic therapy with anti-CTLA-4 antibodies in melanoma: identification of clinical and biological response patterns, immune-related adverse events, and their management. *Semin Oncol* 2010,**37**:485-498.
31. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J, Sharfman WH, *et al.* Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 2010,**28**:3167-3175.
32. Sznol M HFS, Margolin K, McDermott D F, Ernstoff M S, Kirkwood J M, Wojtaszek C, Feltquate D, Logan T. Phase I study of BMS-663513, a fully human anti-CD137 agonist monoclonal antibody, in patients (pts) with advanced cancer (CA). In: *J Clin Oncol*; 2008, 26(suppl):abstract 3007.
33. Khalil M, Vonderheide RH. Anti-CD40 agonist antibodies: preclinical and clinical experience. *Update Cancer Ther* 2007,**2**:61-65.
34. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, *et al.* A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991,**254**:1643-1647.
35. Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 2006,**24**:175-208.
36. Chavez-Galan L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chavez R, Lascurain R. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* 2009,**6**:15-25.
37. Jenkins MR, Griffiths GM. The synapse and cytolytic machinery of cytotoxic T cells. *Curr Opin Immunol* 2010,**22**:308-313.
38. Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 2009,**30**:180-192.

39. Brehm MA, Daniels KA, Welsh RM. Rapid production of TNF-alpha following TCR engagement of naive CD8 T cells. *J Immunol* 2005,**175**:5043-5049.
40. Corbin GA, Harty JT. T cells undergo rapid ON/OFF but not ON/OFF/ON cycling of cytokine production in response to antigen. *J Immunol* 2005,**174**:718-726.
41. Zhang X, Vallabhaneni R, Loughran PA, Shapiro R, Yin XM, Yuan Y, *et al.* Changes in FADD levels, distribution, and phosphorylation in TNFalpha-induced apoptosis in hepatocytes is caspase-3, caspase-8 and BID dependent. *Apoptosis* 2008,**13**:983-992.
42. Badovinac VP, Harty JT. Detection and analysis of antigen-specific CD8+ T cells. *Immunol Res* 2001,**24**:325-332.
43. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 2007,**96**:41-101.
44. Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002,**13**:95-109.
45. Zhang N, Bevan MJ. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* 2011,**35**:161-168.
46. Hodi FS. Well-defined melanoma antigens as progression markers for melanoma: insights into differential expression and host response based on stage. *Clin Cancer Res* 2006,**12**:673-678.
47. <http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm>. In; 2012.
48. Reker S, Becker JC, Svane IM, Ralfkiaer E, Straten PT, Andersen MH. HLA-B35-restricted immune responses against survivin in cancer patients. *Int J Cancer* 2004,**108**:937-941.
49. Erfurt C, Muller E, Emmerling S, Klotz C, Hertl M, Schuler G, *et al.* Melanoma-associated chondroitin sulphate proteoglycan as a new target antigen for CD4+ T cells in melanoma patients. *Int J Cancer* 2009,**124**:2341-2346.
50. Gilboa E. DC-based cancer vaccines. *J Clin Invest* 2007,**117**:1195-1203.
51. Nakai N, Hartmann G, Kishimoto S, Katoh N. Dendritic cell vaccination in human melanoma: relationships between clinical effects and vaccine parameters. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010,**23**:607-619.
52. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, *et al.* Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 2002,**298**:850-854.
53. Rosenberg SA, Dudley ME. Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004,**101 Suppl 2**:14639-14645.
54. Hershkovitz L, Schachter J, Treves AJ, Besser MJ. Focus on adoptive T cell transfer trials in melanoma. *Clin Dev Immunol* 2010,**2010**:260267.
55. Udyavar A, Geiger TL. Rebalancing immune specificity and function in cancer by T-cell receptor gene therapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2010,**58**:335-346.
56. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, *et al.* Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 2006,**314**:126-129.
57. Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, Sherry RM, Dudley ME, *et al.* Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol* 2011,**29**:917-924.
58. Singh-Jasuja H, Emmerich NP, Rammensee HG. The Tübingen approach: identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2004,**53**:187-195.

59. Strehl B, Seifert U, Kruger E, Heink S, Kuckelkorn U, Kloetzel PM. Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol Rev* 2005,**207**:19-30.
60. Goldberg AL, Cascio P, Saric T, Rock KL. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol* 2002,**39**:147-164.
61. van Endert PM, Tampe R, Meyer TH, Tisch R, Bach JF, McDevitt HO. A sequential model for peptide binding and transport by the transporters associated with antigen processing. *Immunity* 1994,**1**:491-500.
62. Jones EY. MHC class I and class II structures. *Curr Opin Immunol* 1997,**9**:75-79.
63. van Endert P. Post-proteasomal and proteasome-independent generation of MHC class I ligands. *Cell Mol Life Sci* 2011,**68**:1553-1567.
64. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, *et al.* Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 1994,**78**:761-771.
65. Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 1999,**68**:1015-1068.
66. Braun BC, Glickman M, Kraft R, Dahlmann B, Kloetzel PM, Finley D, *et al.* The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol* 1999,**1**:221-226.
67. Groll M, Ditzel L, Lowe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, *et al.* Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 1997,**386**:463-471.
68. Kisselev AF, Garcia-Calvo M, Overkleeft HS, Peterson E, Pennington MW, Ploegh HL, *et al.* The caspase-like sites of proteasomes, their substrate specificity, new inhibitors and substrates, and allosteric interactions with the trypsin-like sites. *J Biol Chem* 2003,**278**:35869-35877.
69. Murata S, Yashiroda H, Tanaka K. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009,**10**:104-115.
70. Kloetzel PM. Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001,**2**:179-187.
71. Kloetzel PM. The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim Biophys Acta* 2004,**1695**:225-233.
72. Ma CP, Slaughter CA, DeMartino GN. Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20 S proteasome (macropain). *J Biol Chem* 1992,**267**:10515-10523.
73. Realini C, Dubiel W, Pratt G, Ferrell K, Rechsteiner M. Molecular cloning and expression of a gamma-interferon-inducible activator of the multicatalytic protease. *J Biol Chem* 1994,**269**:20727-20732.
74. Zhang Z, Krutchinsky A, Endicott S, Realini C, Rechsteiner M, Standing KG. Proteasome activator 11S REG or PA28: recombinant REG alpha/REG beta heterooligomers are heptamers. *Biochemistry* 1999,**38**:5651-5658.
75. Knowlton JR, Johnston SC, Whitby FG, Realini C, Zhang Z, Rechsteiner M, *et al.* Structure of the proteasome activator REGalpha (PA28alpha). *Nature* 1997,**390**:639-643.
76. Tanahashi N, Murakami Y, Minami Y, Shimbara N, Hendil KB, Tanaka K. Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. *J Biol Chem* 2000,**275**:14336-14345.
77. Dick TP, Ruppert T, Groettrup M, Kloetzel PM, Kuehn L, Koszinowski UH, *et al.* Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell* 1996,**86**:253-262.

78. Shin EC, Seifert U, Kato T, Rice CM, Feinstone SM, Kloetzel PM, *et al.* Virus-induced type I IFN stimulates generation of immunoproteasomes at the site of infection. *J Clin Invest* 2006,**116**:3006-3014.
79. Fruh K, Yang Y. Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma. *Curr Opin Immunol* 1999,**11**:76-81.
80. Hallermalm K, Seki K, Wei C, Castelli C, Rivoltini L, Kiessling R, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha induces coordinated changes in major histocompatibility class I presentation pathway, resulting in increased stability of class I complexes at the cell surface. *Blood* 2001,**98**:1108-1115.
81. Sijts AJ, Standera S, Toes RE, Ruppert T, Beekman NJ, van Veelen PA, *et al.* MHC class I antigen processing of an adenovirus CTL epitope is linked to the levels of immunoproteasomes in infected cells. *J Immunol* 2000,**164**:4500-4506.
82. Sijts AJ, Ruppert T, Reherrmann B, Schmidt M, Koszinowski U, Kloetzel PM. Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. *J Exp Med* 2000,**191**:503-514.
83. van Hall T, Sijts A, Camps M, Offringa R, Melief C, Kloetzel PM, *et al.* Differential influence on cytotoxic T lymphocyte epitope presentation by controlled expression of either proteasome immunosubunits or PA28. *J Exp Med* 2000,**192**:483-494.
84. Schwarz K, van Den Broek M, Kostka S, Kraft R, Soza A, Schmidtke G, *et al.* Overexpression of the proteasome subunits LMP2, LMP7, and MECL-1, but not PA28 alpha/beta, enhances the presentation of an immunodominant lymphocytic choriomeningitis virus T cell epitope. *J Immunol* 2000,**165**:768-778.
85. Gaczynska M, Rock KL, Spies T, Goldberg AL. Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994,**91**:9213-9217.
86. Rock KL, Goldberg AL. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* 1999,**17**:739-779.
87. Morel S, Levy F, Burlet-Schiltz O, Brasseur F, Probst-Kepper M, Peitrequin AL, *et al.* Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity* 2000,**12**:107-117.
88. Beninga J, Rock KL, Goldberg AL. Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J Biol Chem* 1998,**273**:18734-18742.
89. Towne CF, York IA, Neijssen J, Karow ML, Murphy AJ, Valenzuela DM, *et al.* Leucine aminopeptidase is not essential for trimming peptides in the cytosol or generating epitopes for MHC class I antigen presentation. *J Immunol* 2005,**175**:6605-6614.
90. Stoltze L, Schirle M, Schwarz G, Schroter C, Thompson MW, Hersh LB, *et al.* Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat Immunol* 2000,**1**:413-418.
91. Towne CF, York IA, Watkin LB, Lazo JS, Rock KL. Analysis of the role of bleomycin hydrolase in antigen presentation and the generation of CD8 T cell responses. *J Immunol* 2007,**178**:6923-6930.
92. Towne CF, York IA, Neijssen J, Karow ML, Murphy AJ, Valenzuela DM, *et al.* Puromycin-sensitive aminopeptidase limits MHC class I presentation in dendritic cells but does not affect CD8 T cell responses during viral infections. *J Immunol* 2008,**180**:1704-1712.

93. Geier E, Pfeifer G, Wilm M, Lucchiari-Hartz M, Baumeister W, Eichmann K, *et al.* A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science* 1999,**283**:978-981.
94. Reits E, Neijssen J, Herberts C, Benckhuijsen W, Janssen L, Drijfhout JW, *et al.* A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity* 2004,**20**:495-506.
95. Levy F, Burri L, Morel S, Peitrequin AL, Levy N, Bachi A, *et al.* The final N-terminal trimming of a subaminoterminal proline-containing HLA class I-restricted antigenic peptide in the cytosol is mediated by two peptidases. *J Immunol* 2002,**169**:4161-4171.
96. Seifert U, Maranon C, Shmueli A, Desoutter JF, Wesoloski L, Janek K, *et al.* An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nat Immunol* 2003,**4**:375-379.
97. Preta G, Marescotti D, Fortini C, Carcoforo P, Castelli C, Masucci M, *et al.* Inhibition of serine-peptidase activity enhances the generation of a survivin-derived HLA-A2-presented CTL epitope in colon-carcinoma cells. *Scand J Immunol* 2008,**68**:579-588.
98. Basler M, Groettrup M. No essential role for tripeptidyl peptidase II for the processing of LCMV-derived T cell epitopes. *Eur J Immunol* 2007,**37**:896-904.
99. York IA, Mo AX, Lemerise K, Zeng W, Shen Y, Abraham CR, *et al.* The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation. *Immunity* 2003,**18**:429-440.
100. Saric T, Graef CI, Goldberg AL. Pathway for degradation of peptides generated by proteasomes: a key role for thimet oligopeptidase and other metallopeptidases. *J Biol Chem* 2004,**279**:46723-46732.
101. Silva CL, Portaro FC, Bonato VL, de Camargo AC, Ferro ES. Thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15), a novel protein on the route of MHC class I antigen presentation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999,**255**:591-595.
102. Kessler JH, Khan S, Seifert U, Le Gall S, Chow KM, Paschen A, *et al.* Antigen processing by nardilysin and thimet oligopeptidase generates cytotoxic T cell epitopes. *Nat Immunol* 2011,**12**:45-53.
103. Kleijmeer MJ, Kelly A, Geuze HJ, Slot JW, Townsend A, Trowsdale J. Location of MHC-encoded transporters in the endoplasmic reticulum and cis-Golgi. *Nature* 1992,**357**:342-344.
104. Androlewicz MJ, Anderson KS, Cresswell P. Evidence that transporters associated with antigen processing translocate a major histocompatibility complex class I-binding peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993,**90**:9130-9134.
105. Biemans-Oldehinkel E, Doeven MK, Poolman B. ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett* 2006,**580**:1023-1035.
106. Ortmann B, Copeman J, Lehner PJ, Sadasivan B, Herberg JA, Grandea AG, *et al.* A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science* 1997,**277**:1306-1309.
107. Herget M, Baldauf C, Scholz C, Parcej D, Wiesmuller KH, Tampe R, *et al.* Conformation of peptides bound to the transporter associated with antigen processing (TAP). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011,**108**:1349-1354.
108. Schmitt L, Tampe R. Affinity, specificity, diversity: a challenge for the ABC transporter TAP in cellular immunity. *Chembiochem* 2000,**1**:16-35.
109. Neisig A, Roelse J, Sijts AJ, Ossendorp F, Feltkamp MC, Kast WM, *et al.* Major differences in transporter associated with antigen presentation (TAP)-dependent

- translocation of MHC class I-presentable peptides and the effect of flanking sequences. *J Immunol* 1995,**154**:1273-1279.
110. van Endert PM, Riganelli D, Greco G, Fleischhauer K, Sidney J, Sette A, *et al.* The peptide-binding motif for the human transporter associated with antigen processing. *J Exp Med* 1995,**182**:1883-1895.
 111. Zimmermann R, Eyrisch S, Ahmad M, Helms V. Protein translocation across the ER membrane. *Biochim Biophys Acta* 2011,**1808**:912-924.
 112. Elliott T, Willis A, Cerundolo V, Townsend A. Processing of major histocompatibility class I-restricted antigens in the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 1995,**181**:1481-1491.
 113. Snyder HL, Yewdell JW, Bennink JR. Trimming of antigenic peptides in an early secretory compartment. *J Exp Med* 1994,**180**:2389-2394.
 114. Saric T, Chang SC, Hattori A, York IA, Markant S, Rock KL, *et al.* An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat Immunol* 2002,**3**:1169-1176.
 115. Serwold T, Gonzalez F, Kim J, Jacob R, Shastri N. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 2002,**419**:480-483.
 116. Saveanu L, Carroll O, Lindo V, Del Val M, Lopez D, Lepelletier Y, *et al.* Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat Immunol* 2005,**6**:689-697.
 117. Tanioka T, Hattori A, Masuda S, Nomura Y, Nakayama H, Mizutani S, *et al.* Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase. The third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases. *J Biol Chem* 2003,**278**:32275-32283.
 118. Shin EC, Seifert U, Urban S, Truong KT, Feinstone SM, Rice CM, *et al.* Proteasome activator and antigen-processing aminopeptidases are regulated by virus-induced type I interferon in the hepatitis C virus-infected liver. *J Interferon Cytokine Res* 2007,**27**:985-990.
 119. Tanioka T, Hattori A, Mizutani S, Tsujimoto M. Regulation of the human leukocyte-derived arginine aminopeptidase/endoplasmic reticulum-aminopeptidase 2 gene by interferon-gamma. *FEBS J* 2005,**272**:916-928.
 120. Forloni M, Albin S, Limongi MZ, Cifaldi L, Boldrini R, Nicotra MR, *et al.* NF-kappaB, and not MYCN, regulates MHC class I and endoplasmic reticulum aminopeptidases in human neuroblastoma cells. *Cancer Res* 2010,**70**:916-924.
 121. Chang SC, Momburg F, Bhutani N, Goldberg AL. The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a "molecular ruler" mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005,**102**:17107-17112.
 122. York IA, Chang SC, Saric T, Keys JA, Favreau JM, Goldberg AL, *et al.* The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat Immunol* 2002,**3**:1177-1184.
 123. Evnouchidou I, Momburg F, Papakyriakou A, Chroni A, Leondiadis L, Chang SC, *et al.* The internal sequence of the peptide-substrate determines its N-terminus trimming by ERAP1. *PLoS One* 2008,**3**:e3658.
 124. Kanaseki T, Blanchard N, Hammer GE, Gonzalez F, Shastri N. ERAAP synergizes with MHC class I molecules to make the final cut in the antigenic peptide precursors in the endoplasmic reticulum. *Immunity* 2006,**25**:795-806.
 125. Firat E, Saveanu L, Aichele P, Staeheli P, Huai J, Gaedicke S, *et al.* The role of endoplasmic reticulum-associated aminopeptidase 1 in immunity to infection and in cross-presentation. *J Immunol* 2007,**178**:2241-2248.
 126. Hammer GE, Gonzalez F, Champsaur M, Cado D, Shastri N. The aminopeptidase ERAAP shapes the peptide repertoire displayed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nat Immunol* 2006,**7**:103-112.

127. Yan J, Parekh VV, Mendez-Fernandez Y, Olivares-Villagomez D, Dragovic S, Hill T, *et al.* In vivo role of ER-associated peptidase activity in tailoring peptides for presentation by MHC class Ia and class Ib molecules. *J Exp Med* 2006,**203**:647-659.
128. Blanchard N, Shastri N. Coping with loss of perfection in the MHC class I peptide repertoire. *Curr Opin Immunol* 2008,**20**:82-88.
129. Kim S, Lee S, Shin J, Kim Y, Evnouchidou I, Kim D, *et al.* Human cytomegalovirus microRNA miR-US4-1 inhibits CD8(+) T cell responses by targeting the aminopeptidase ERAP1. *Nat Immunol* 2011,**12**:984-991.
130. Blanchard N, Gonzalez F, Schaeffer M, Joncker NT, Cheng T, Shastri AJ, *et al.* Immunodominant, protective response to the parasite *Toxoplasma gondii* requires antigen processing in the endoplasmic reticulum. *Nat Immunol* 2008,**9**:937-944.
131. Lee YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Associations between ERAP1 polymorphisms and ankylosing spondylitis susceptibility: a meta-analysis. *Inflamm Res* 2011,**60**:999-1003.
132. Taranta A, Gianviti A, Palma A, De Luca V, Mannucci L, Procaccino MA, *et al.* Genetic risk factors in typical haemolytic uraemic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2009,**24**:1851-1857.
133. Yamamoto N, Nakayama J, Yamakawa-Kobayashi K, Hamaguchi H, Miyazaki R, Arinami T. Identification of 33 polymorphisms in the adipocyte-derived leucine aminopeptidase (ALAP) gene and possible association with hypertension. *Hum Mutat* 2002,**19**:251-257.
134. Fung EY, Smyth DJ, Howson JM, Cooper JD, Walker NM, Stevens H, *et al.* Analysis of 17 autoimmune disease-associated variants in type 1 diabetes identifies 6q23/TNFAIP3 as a susceptibility locus. *Genes Immun* 2009,**10**:188-191.
135. Hattori A, Kitatani K, Matsumoto H, Miyazawa S, Rogi T, Tsuruoka N, *et al.* Characterization of recombinant human adipocyte-derived leucine aminopeptidase expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biochem* 2000,**128**:755-762.
136. Watanabe Y, Shibata K, Kikkawa F, Kajiyama H, Ino K, Hattori A, *et al.* Adipocyte-derived leucine aminopeptidase suppresses angiogenesis in human endometrial carcinoma via renin-angiotensin system. *Clin Cancer Res* 2003,**9**:6497-6503.
137. Shibata K, Kikkawa F, Mizokami Y, Kajiyama H, Ino K, Nomura S, *et al.* Possible involvement of adipocyte-derived leucine aminopeptidase via angiotensin II in endometrial carcinoma. *Tumour Biol* 2005,**26**:9-16.
138. Cui X, Rouhani FN, Hawari F, Levine SJ. Shedding of the type II IL-1 decoy receptor requires a multifunctional aminopeptidase, aminopeptidase regulator of TNF receptor type 1 shedding. *J Immunol* 2003,**171**:6814-6819.
139. Cui X, Hawari F, Alsaaty S, Lawrence M, Combs CA, Geng W, *et al.* Identification of ARTS-1 as a novel TNFR1-binding protein that promotes TNFR1 ectodomain shedding. *J Clin Invest* 2002,**110**:515-526.
140. Cui X, Rouhani FN, Hawari F, Levine SJ. An aminopeptidase, ARTS-1, is required for interleukin-6 receptor shedding. *J Biol Chem* 2003,**278**:28677-28685.
141. Andres AM, Dennis MY, Kretzschmar WW, Cannons JL, Lee-Lin SQ, Hurle B, *et al.* Balancing selection maintains a form of ERAP2 that undergoes nonsense-mediated decay and affects antigen presentation. *PLoS Genet* 2010,**6**:e1001157.
142. Johnson MP, Roten LT, Dyer TD, East CE, Forsmo S, Blangero J, *et al.* The ERAP2 gene is associated with preeclampsia in Australian and Norwegian populations. *Hum Genet* 2009,**126**:655-666.

143. Franke A, McGovern DP, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, *et al.* Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet* 2010,**42**:1118-1125.
144. Tsui FW, Haroon N, Reveille JD, Rahman P, Chiu B, Tsui HW, *et al.* Association of an ERAP1 ERAP2 haplotype with familial ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2010,**69**:733-736.
145. Nossner E, Parham P. Species-specific differences in chaperone interaction of human and mouse major histocompatibility complex class I molecules. *J Exp Med* 1995,**181**:327-337.
146. Zhang Y, Baig E, Williams DB. Functions of ERp57 in the folding and assembly of major histocompatibility complex class I molecules. *J Biol Chem* 2006,**281**:14622-14631.
147. Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell. *Nature* 1992,**355**:33-45.
148. Vassilakos A, Cohen-Doyle MF, Peterson PA, Jackson MR, Williams DB. The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class I histocompatibility molecules. *EMBO J* 1996,**15**:1495-1506.
149. Wearsch PA, Cresswell P. The quality control of MHC class I peptide loading. *Curr Opin Cell Biol* 2008,**20**:624-631.
150. Helenius A, Aebi M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 2004,**73**:1019-1049.
151. Wearsch PA, Peaper DR, Cresswell P. Essential glycan-dependent interactions optimize MHC class I peptide loading. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011,**108**:4950-4955.
152. Del Cid N, Jeffery E, Rizvi SM, Stamper E, Peters LR, Brown WC, *et al.* Modes of calreticulin recruitment to the major histocompatibility complex class I assembly pathway. *J Biol Chem* 2010,**285**:4520-4535.
153. Dick TP, Bangia N, Peaper DR, Cresswell P. Disulfide bond isomerization and the assembly of MHC class I-peptide complexes. *Immunity* 2002,**16**:87-98.
154. Lehner PJ, Surman MJ, Cresswell P. Soluble tapasin restores MHC class I expression and function in the tapasin-negative cell line .220. *Immunity* 1998,**8**:221-231.
155. Garbi N, Tiwari N, Momburg F, Hammerling GJ. A major role for tapasin as a stabilizer of the TAP peptide transporter and consequences for MHC class I expression. *Eur J Immunol* 2003,**33**:264-273.
156. Chen M, Bouvier M. Analysis of interactions in a tapasin/class I complex provides a mechanism for peptide selection. *EMBO J* 2007,**26**:1681-1690.
157. Wearsch PA, Cresswell P. Selective loading of high-affinity peptides onto major histocompatibility complex class I molecules by the tapasin-ERp57 heterodimer. *Nat Immunol* 2007,**8**:873-881.
158. Spiliotis ET, Manley H, Osorio M, Zuniga MC, Edidin M. Selective export of MHC class I molecules from the ER after their dissociation from TAP. *Immunity* 2000,**13**:841-851.
159. Cho S, Ryoo J, Jun Y, Ahn K. Receptor-mediated ER export of human MHC class I molecules is regulated by the C-terminal single amino acid. *Traffic* 2011,**12**:42-55.
160. Heinemann A, Zhao F, Pechlivanis S, Eberle J, Steinle A, Diederichs S, *et al.* Tumor suppressive microRNAs miR-34a/c control cancer cell expression of ULBP2, a stress induced ligand of the natural killer cell receptor NKG2D. *Cancer Res* 2011.
161. Schwinn N, Vokhminova D, Sucker A, Textor S, Striegel S, Moll I, *et al.* Interferon-gamma down-regulates NKG2D ligand expression and impairs the

- NKG2D-mediated cytotoxicity of MHC class I-deficient melanoma by natural killer cells. *Int J Cancer* 2009,**124**:1594-1604.
162. Sun Y, Sijts AJ, Song M, Janek K, Nussbaum AK, Kral S, *et al.* Expression of the proteasome activator PA28 rescues the presentation of a cytotoxic T lymphocyte epitope on melanoma cells. *Cancer Res* 2002,**62**:2875-2882.
163. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001,**25**:402-408.
164. Saunders PM, van Endert P. Running the gauntlet: from peptide generation to antigen presentation by MHC class I. *Tissue Antigens* 2011,**78**:161-170.
165. Hammer GE, Gonzalez F, James E, Nolla H, Shastri N. In the absence of aminopeptidase ERAAP, MHC class I molecules present many unstable and highly immunogenic peptides. *Nat Immunol* 2007,**8**:101-108.
166. York IA, Brehm MA, Zendzian S, Towne CF, Rock KL. Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1) trims MHC class I-presented peptides in vivo and plays an important role in immunodominance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006,**103**:9202-9207.
167. Campoli M, Ferrone S, Wang X. Functional and clinical relevance of chondroitin sulfate proteoglycan 4. *Adv Cancer Res* 2010,**109**:73-121.
168. Galluzzi L, Senovilla L, Zitvogel L, Kroemer G. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2012,**11**:215-233.
169. Doody GM, Stephenson S, McManamy C, Tooze RM. PRDM1/BLIMP-1 modulates IFN-gamma-dependent control of the MHC class I antigen-processing and peptide-loading pathway. *J Immunol* 2007,**179**:7614-7623.
170. Youlyouyz-Marfak I, Gachard N, Le Clorennec C, Najjar I, Baran-Marszak F, Reminieras L, *et al.* Identification of a novel p53-dependent activation pathway of STAT1 by antitumour genotoxic agents. *Cell Death Differ* 2008,**15**:376-385.
171. Townsend PA, Scarabelli TM, Davidson SM, Knight RA, Latchman DS, Stephanou A. STAT-1 interacts with p53 to enhance DNA damage-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2004,**279**:5811-5820.
172. Kim JH, Lee SC, Ro J, Kang HS, Kim HS, Yoon S. Jnk signaling pathway-mediated regulation of Stat3 activation is linked to the development of doxorubicin resistance in cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 2010,**79**:373-380.
173. Park DJ, Nakamura H, Chumakov AM, Said JW, Miller CW, Chen DL, *et al.* Transactivational and DNA binding abilities of endogenous p53 in p53 mutant cell lines. *Oncogene* 1994,**9**:1899-1906.
174. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002,**2**:594-604.
175. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, *et al.* WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993,**75**:817-825.
176. Agrawal S, Agarwal ML, Chatterjee-Kishore M, Stark GR, Chisolm GM. Stat1-dependent, p53-independent expression of p21(waf1) modulates oxysterol-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2002,**22**:1981-1992.
177. Ma S, Tang J, Feng J, Xu Y, Yu X, Deng Q, *et al.* Induction of p21 by p65 in p53 null cells treated with Doxorubicin. *Biochim Biophys Acta* 2008,**1783**:935-940.
178. Levina V, Su Y, Nolen B, Liu X, Gordin Y, Lee M, *et al.* Chemotherapeutic drugs and human tumor cells cytokine network. *Int J Cancer* 2008,**123**:2031-2040.
179. Miller AJ, Mihm MC, Jr. Melanoma. *N Engl J Med* 2006,**355**:51-65.
180. Tran KQ, Zhou J, Durflinger KH, Langan MM, Shelton TE, Wunderlich JR, *et al.* Minimally cultured tumor-infiltrating lymphocytes display optimal characteristics for adoptive cell therapy. *J Immunother* 2008,**31**:742-751.

181. Zamarron BF, Chen W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *Int J Biol Sci* 2011,**7**:651-658.
182. Garrido F, Cabrera T, Aptsiauri N. "Hard" and "soft" lesions underlying the HLA class I alterations in cancer cells: implications for immunotherapy. *Int J Cancer* 2010,**127**:249-256.
183. Seliger B, Ritz U, Abele R, Bock M, Tampe R, Sutter G, *et al.* Immune escape of melanoma: first evidence of structural alterations in two distinct components of the MHC class I antigen processing pathway. *Cancer Res* 2001,**61**:8647-8650.
184. Chen HL, Gabrilovich D, Tampe R, Girgis KR, Nadaf S, Carbone DP. A functionally defective allele of TAP1 results in loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer. *Nat Genet* 1996,**13**:210-213.
185. Nie Y, Yang G, Song Y, Zhao X, So C, Liao J, *et al.* DNA hypermethylation is a mechanism for loss of expression of the HLA class I genes in human esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis* 2001,**22**:1615-1623.
186. Serrano A, Tanzarella S, Lionello I, Mendez R, Traversari C, Ruiz-Cabello F, *et al.* Rexpression of HLA class I antigens and restoration of antigen-specific CTL response in melanoma cells following 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *Int J Cancer* 2001,**94**:243-251.
187. Khan AN, Gregorie CJ, Tomasi TB. Histone deacetylase inhibitors induce TAP, LMP, Tapasin genes and MHC class I antigen presentation by melanoma cells. *Cancer Immunol Immunother* 2008,**57**:647-654.
188. Manning J, Indrova M, Lubyova B, Pribylova H, Bieblova J, Hejnar J, *et al.* Induction of MHC class I molecule cell surface expression and epigenetic activation of antigen-processing machinery components in a murine model for human papilloma virus 16-associated tumours. *Immunology* 2008,**123**:218-227.
189. Rouyez MC, Lestingi M, Charon M, Fichelson S, Buzyn A, Dusanter-Fourt I. IFN regulatory factor-2 cooperates with STAT1 to regulate transporter associated with antigen processing-1 promoter activity. *J Immunol* 2005,**174**:3948-3958.
190. Respa A, Bukur J, Ferrone S, Pawelec G, Zhao Y, Wang E, *et al.* Association of IFN-gamma signal transduction defects with impaired HLA class I antigen processing in melanoma cell lines. *Clin Cancer Res* 2011,**17**:2668-2678.
191. Abarca-Heidemann K, Friederichs S, Klamp T, Boehm U, Guethlein LA, Ortmann B. Regulation of the expression of mouse TAP-associated glycoprotein (tapasin) by cytokines. *Immunol Lett* 2002,**83**:197-207.
192. Rodriguez T, Mendez R, Del Campo A, Jimenez P, Aptsiauri N, Garrido F, *et al.* Distinct mechanisms of loss of IFN-gamma mediated HLA class I inducibility in two melanoma cell lines. *BMC Cancer* 2007,**7**:34.
193. Abril E, Mendez RE, Garcia A, Serrano A, Cabrera T, Garrido F, *et al.* Characterization of a gastric tumor cell line defective in MHC class I inducibility by both alpha- and gamma-interferon. *Tissue Antigens* 1996,**47**:391-398.
194. Mehta AM, Jordanova ES, Kenter GG, Ferrone S, Fleuren GJ. Association of antigen processing machinery and HLA class I defects with clinicopathological outcome in cervical carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2008,**57**:197-206.
195. Mehta AM, Jordanova ES, Corver WE, van Wezel T, Uh HW, Kenter GG, *et al.* Single nucleotide polymorphisms in antigen processing machinery component ERAP1 significantly associate with clinical outcome in cervical carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2009,**48**:410-418.
196. Cifaldi L, Lo Monaco E, Forloni M, Giorda E, Lorenzi S, Petrini S, *et al.* Natural killer cells efficiently reject lymphoma silenced for the endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing. *Cancer Res* 2011,**71**:1597-1606.

197. Blanchard N, Kanaseki T, Escobar H, Delebecque F, Nagarajan NA, Reyes-Vargas E, *et al.* Endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing defines the composition and structure of MHC class I peptide repertoire in normal and virus-infected cells. *J Immunol* 2010,**184**:3033-3042.
198. Altrich-VanLith ML, Ostankovitch M, Polefrone JM, Mosse CA, Shabanowitz J, Hunt DF, *et al.* Processing of a class I-restricted epitope from tyrosinase requires peptide N-glycanase and the cooperative action of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 and cytosolic proteases. *J Immunol* 2006,**177**:5440-5450.
199. Hendriksen PJ, Dits NF, Kokame K, Veldhoven A, van Weerden WM, Bangma CH, *et al.* Evolution of the androgen receptor pathway during progression of prostate cancer. *Cancer Res* 2006,**66**:5012-5020.
200. Kny M, Standera S, Hartmann-Petersen R, Kloetzel PM, Seeger M. Herp regulates Hrd1-mediated ubiquitylation in a ubiquitin-like domain-dependent manner. *J Biol Chem* 2011,**286**:5151-5156.
201. Benlalam H, Linard B, Guilloux Y, Moreau-Aubry A, Derre L, Diez E, *et al.* Identification of five new HLA-B*3501-restricted epitopes derived from common melanoma-associated antigens, spontaneously recognized by tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol* 2003,**171**:6283-6289.
202. Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 1999,**50**:213-219.
203. Serwold T, Gaw S, Shastri N. ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for MHC class I molecules. *Nat Immunol* 2001,**2**:644-651.
204. Schultz ES, Chapiro J, Lurquin C, Claverol S, Burlet-Schiltz O, Warnier G, *et al.* The production of a new MAGE-3 peptide presented to cytolytic T lymphocytes by HLA-B40 requires the immunoproteasome. *J Exp Med* 2002,**195**:391-399.
205. Chapiro J, Claverol S, Piette F, Ma W, Stroobant V, Guillaume B, *et al.* Destructive cleavage of antigenic peptides either by the immunoproteasome or by the standard proteasome results in differential antigen presentation. *J Immunol* 2006,**176**:1053-1061.
206. Fruci D, Giacomini P, Nicotra MR, Forloni M, Fraioli R, Saveanu L, *et al.* Altered expression of endoplasmic reticulum aminopeptidases ERAP1 and ERAP2 in transformed non-lymphoid human tissues. *J Cell Physiol* 2008,**216**:742-749.
207. Kamphausen E, Kellert C, Abbas T, Akkad N, Tenzer S, Pawelec G, *et al.* Distinct molecular mechanisms leading to deficient expression of ER-resident aminopeptidases in melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 2010,**59**:1273-1284.
208. Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 1997,**15**:563-591.
209. Pestka S, Kotenko SV, Muthukumaran G, Izotova LS, Cook JR, Garotta G. The interferon gamma (IFN-gamma) receptor: a paradigm for the multichain cytokine receptor. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997,**8**:189-206.
210. Plataniias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 2005,**5**:375-386.
211. Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H, Stoiber D, Negishi H, Kikuchi H, *et al.* Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature* 2003,**424**:516-523.
212. Graeber TG, Peterson JF, Tsai M, Monica K, Fornace AJ, Jr., Giaccia AJ. Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Mol Cell Biol* 1994,**14**:6264-6277.

213. Gomez-Lazaro M, Fernandez-Gomez FJ, Jordan J. p53: twenty five years understanding the mechanism of genome protection. *J Physiol Biochem* 2004,**60**:287-307.
214. Hurley LH. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2002,**2**:188-200.
215. Kepp O, Galluzzi L, Martins I, Schlemmer F, Adjemian S, Michaud M, *et al.* Molecular determinants of immunogenic cell death elicited by anticancer chemotherapy. *Cancer Metastasis Rev* 2011,**30**:61-69.
216. Kaneno R, Shurin GV, Kaneno FM, Naiditch H, Luo J, Shurin MR. Chemotherapeutic agents in low noncytotoxic concentrations increase immunogenicity of human colon cancer cells. *Cell Oncol (Dordr)* 2011,**34**:97-106.
217. Frederick CA, Williams LD, Ughetto G, van der Marel GA, van Boom JH, Rich A, *et al.* Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin. *Biochemistry* 1990,**29**:2538-2549.
218. Tewey KM, Rowe TC, Yang L, Halligan BD, Liu LF. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science* 1984,**226**:466-468.
219. Momparler RL, Karon M, Siegel SE, Avila F. Effect of adriamycin on DNA, RNA, and protein synthesis in cell-free systems and intact cells. *Cancer Res* 1976,**36**:2891-2895.
220. Chin YE, Kitagawa M, Su WC, You ZH, Iwamoto Y, Fu XY. Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science* 1996,**272**:719-722.
221. Reinhardt HC, Hasskamp P, Schmedding I, Morandell S, van Vugt MA, Wang X, *et al.* DNA damage activates a spatially distinct late cytoplasmic cell-cycle checkpoint network controlled by MK2-mediated RNA stabilization. *Mol Cell* 2010,**40**:34-49.
222. Burger K, Muhl B, Harasim T, Rohrmoser M, Malamoussi A, Orban M, *et al.* Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels. *J Biol Chem* 2010,**285**:12416-12425.
223. Munoz-Fontela C, Macip S, Martinez-Sobrido L, Brown L, Ashour J, Garcia-Sastre A, *et al.* Transcriptional role of p53 in interferon-mediated antiviral immunity. *J Exp Med* 2008,**205**:1929-1938.
224. Mori T, Anazawa Y, Iizumi M, Fukuda S, Nakamura Y, Arakawa H. Identification of the interferon regulatory factor 5 gene (IRF-5) as a direct target for p53. *Oncogene* 2002,**21**:2914-2918.
225. Hummer BT, Li XL, Hassel BA. Role for p53 in gene induction by double-stranded RNA. *J Virol* 2001,**75**:7774-7777.
226. Taura M, Eguma A, Suico MA, Shuto T, Koga T, Komatsu K, *et al.* p53 regulates Toll-like receptor 3 expression and function in human epithelial cell lines. *Mol Cell Biol* 2008,**28**:6557-6567.
227. Wegenka UM, Buschmann J, Lutticken C, Heinrich PC, Horn F. Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Mol Cell Biol* 1993,**13**:276-288.
228. Levy DE, Darnell JE, Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002,**3**:651-662.
229. Yu H, Jove R. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 2004,**4**:97-105.
230. Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest* 2002,**109**:1139-1142.
231. Levy DE, Lee CK. What does Stat3 do? *J Clin Invest* 2002,**109**:1143-1148.

232. Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, *et al.* Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997,**94**:3801-3804.
233. Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 2007,**7**:41-51.
234. Kortylewski M, Jove R, Yu H. Targeting STAT3 affects melanoma on multiple fronts. *Cancer Metastasis Rev* 2005,**24**:315-327.
235. Niu G, Wright KL, Ma Y, Wright GM, Huang M, Irby R, *et al.* Role of Stat3 in regulating p53 expression and function. *Mol Cell Biol* 2005,**25**:7432-7440.
236. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, *et al.* Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 1986,**324**:73-76.
237. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* 2011,**1813**:878-888.
238. Peters M, Muller AM, Rose-John S. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood* 1998,**92**:3495-3504.
239. Neurath MF, Finotto S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011,**22**:83-89.
240. Ara T, Declerck YA. Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *Eur J Cancer* 2010,**46**:1223-1231.
241. Hong DS, Angelo LS, Kurzrock R. Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for translational therapeutics. *Cancer* 2007,**110**:1911-1928.
242. Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, *et al.* Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 1989,**58**:573-581.
243. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003,**374**:1-20.
244. Lazar-Molnar E, Hegyesi H, Toth S, Falus A. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* 2000,**12**:547-554.
245. Lu C, Kerbel RS. Interleukin-6 undergoes transition from paracrine growth inhibitor to autocrine stimulator during human melanoma progression. *J Cell Biol* 1993,**120**:1281-1288.
246. Komyod W, Bohm M, Metze D, Heinrich PC, Behrmann I. Constitutive suppressor of cytokine signaling 3 expression confers a growth advantage to a human melanoma cell line. *Mol Cancer Res* 2007,**5**:271-281.
247. Wang Y, Niu XL, Qu Y, Wu J, Zhu YQ, Sun WJ, *et al.* Autocrine production of interleukin-6 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Lett* 2010,**295**:110-123.
248. Mouawad R, Rixe O, Meric JB, Khayat D, Soubrane C. Serum interleukin-6 concentrations as predictive factor of time to progression in metastatic malignant melanoma patients treated by biochemotherapy: a retrospective study. *Cytokines Cell Mol Ther* 2002,**7**:151-156.
249. Blay JY, Negrier S, Combaret V, Attali S, Goillot E, Merrouche Y, *et al.* Serum level of interleukin 6 as a prognosis factor in metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1992,**52**:3317-3322.
250. De Vita F, Orditura M, Auriemma A, Infusino S, Roscigno A, Catalano G. Serum levels of interleukin-6 as a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 1998,**5**:649-652.

251. Oka M, Yamamoto K, Takahashi M, Hakozaiki M, Abe T, Iizuka N, *et al.* Relationship between serum levels of interleukin 6, various disease parameters and malnutrition in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996,**56**:2776-2780.
252. Belluco C, Nitti D, Frantz M, Toppan P, Basso D, Plebani M, *et al.* Interleukin-6 blood level is associated with circulating carcinoembryonic antigen and prognosis in patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2000,**7**:133-138.
253. Nakashima J, Tachibana M, Horiguchi Y, Oya M, Ohigashi T, Asakura H, *et al.* Serum interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2000,**6**:2702-2706.
254. Chalaris A, Garbers C, Rabe B, Rose-John S, Scheller J. The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer. *Eur J Cell Biol* 2011,**90**:484-494.
255. Lust JA, Donovan KA, Kline MP, Greipp PR, Kyle RA, Maihle NJ. Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine* 1992,**4**:96-100.

9 Anhang

9.1 ERAP1 Herabregulation durch verschiedene ERAP1 siRNAs

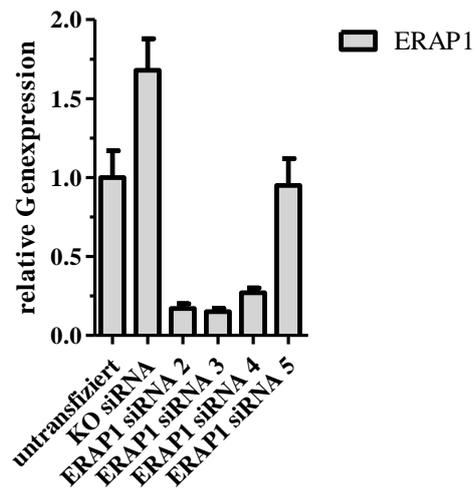


Abb. 28: ERAP1 siRNA Transfektion von UKRV-Mel-15a Zellen. UKRV-Mel-15a Zellen wurden für 72 h mit verschiedenen ERAP1 siRNAs transfiziert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die gesamte mRNA isoliert. Nach einer cDNA-Synthese wurde die ERAP1 mRNA Expression mittels TaqMan real-time PCR quantifiziert und auf die endogene Kontrolle GAPDH normalisiert. Die relative ERAP1 Expression der untransfizierten Zellen wurde auf 1 gesetzt. Dieses Experiment wurde einmalig durchgeführt.

9.2 ERAP2 Expression in den Ma-Mel-86a und Ma-Mel-86c Klonen

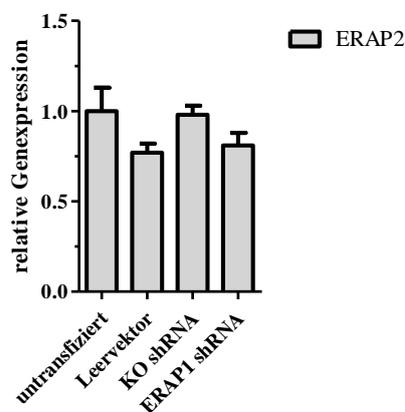


Abb. 29: ERAP2 mRNA Expression in den Ma-Mel-86a Klonen. Aus den Ma-Mel-86a Klonen sowie aus den untransfizierten Zellen wurde die gesamte RNA isoliert und eine cDNA Synthese durchgeführt. Anschließend erfolgte eine TaqMan real-time PCR zur Quantifizierung der ERAP2 mRNA. Die ERAP2 Expression wurde auf die Expression der endogenen Kontrolle GAPDH normalisiert und die relative ERAP2 Expression der untransfizierten Zellen gleich 1 gesetzt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Versuchen.

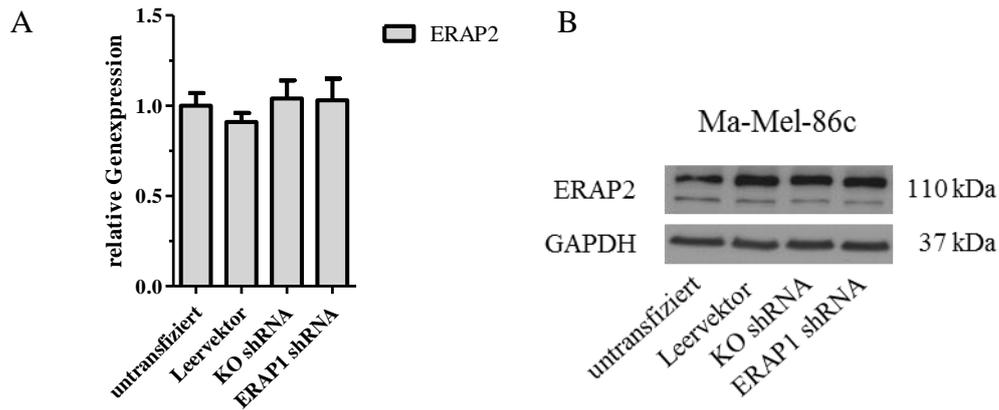


Abb. 30: ERAP2 mRNA und Protein Expression in Ma-Mel-86c Klonen. Aus den Ma-Mel-86c Klonen sowie aus untransfizierten Zellen wurde die gesamte RNA isoliert und eine cDNA Synthese durchgeführt. Anschließend erfolgte eine TaqMan real-time PCR zur Quantifizierung der ERAP2 mRNA. Die ERAP2 Expression wurde auf die Expression der endogenen Kontrolle GAPDH normalisiert und die relative ERAP2 Expression der untransfizierten Zellen gleich 1 gesetzt. Dieses Experiment wurde einmalig durchgeführt (A). Die Immundetektion der ERAP2 Expression in den Ma-Mel-86c Klonen erfolgte über Western Blot. Der Nachweis von GAPDH diente als endogene Kontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von drei unterschiedlichen Versuchen (B).

9.3 Nachweis der Spezifität verschiedener CD8⁺ T-Zellklone

293T	transfizierte cDNA	1A.2/39
+	HLA-B*15:01	
+	HLA-B*15:01 HERPUD1 ^{mut}	

293T	transfizierte cDNA	2C/165
+	HLA-C*07:01	
+	HLA-C*07:01 CSPG4	

293T	transfizierte cDNA	2C/18
+	HLA-A*01:01	
+	HLA-A*01:01 gp100	

293T	transfizierte cDNA	2C/77
+	HLA-A*01:01	
+	HLA-A*01:01 gp100	

Abb. 31: Nachweis der Spezifität verschiedener CD8⁺ T-Zellklone. Die Generierung und der Nachweis der Spezifität der T-Zellklone erfolgte durch Silke Lubojanski (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Thomas Wölfel, III. Med. Klinik, Universitätsmedizin Mainz). Dazu wurden 293T Zellen mit Vektoren transfiziert, die zum einen das spezifische HLA Klasse I Molekül und zum anderen das angegebene Antigen exprimieren. Die Transfektanten wurden anschließend mit dem jeweiligen spezifischen T-Zellklon ko-kultiviert und die Aktivierung der T-Zellen über einen IFN- γ ELISPOT analysiert.

9.4 ERAP1 Promotor

atccccaccgtagttgagtccttggaacagggtgttaatcctttatattataaaaatgctccttgactagagataata
| -1400
 ggcagtatgaaacattatatttttaaaaaggaaacataatattgaaaaaaaaagagaaatactggtgcagtgga
| -1350 IRF1 IRF2 IRF4 | -1300
 cttggaatccccagttctcaaaggggaagaaggccaataaagaagtgggagaagaagtctgagaaccgcatga
NFkB | -1250
 aaagggctcctgttcccactaggaccatggtccactcaccaaattatcagagacgtttgaaccagagcaactcc
| -1200 -1150|
 atcttgaataggagctgggtaaaaataaggctgagacactactgggctacactcccaggagggttagacattctaa
| -1100
 gtcacagaatgagatagaaggtaggcacaagacacaggtcataaagaccttgctgataaaacaggttgcagta
| -1050
 aggaagctggccaaaaccacaaaaccaggatggcaatgagagtgtcctctggctcgtcactgctacggctctc
| -1000 | -950
 accagctccatgacagtttacaaatgccactgcaacgctcgggaagctaccctatatggtctaaaaggggagg
| -900 HSF1
 catgaataatttcccccgcttagcatataatcaagaataaccctaaaaatggacaaccaacagcccttgggg
| -850 | -800
 gtgctctgcctatgagtagccattcttttattcctttagtttcttaattacttgctttcactttactccatgg
| -750 IRF1
 actcccctcaaattctttcttgcgcaaaaatccaagaaccctctcttggggctctggatcgggacccattttcgg
| -700 HSF2 | -650
 taataaactttagcatttgggtgttttaatggttgtgttttcttgacttgttacctcatttagcctcaactgt

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften anderer entnommen sind, wurden als solche kenntlich gemacht. Zusätzlich habe ich ausschließlich die in dieser Arbeit aufgeführten Apparaturen und Hilfsmittel verwendet.

Essen, 12. März 2012

Christin Seifert