

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls – Universität Heidelberg

vorgelegt von
Arne Christians, MSc.
aus: Herdecke

Tag der mündlichen Prüfung:.....

Funktionelle Charakterisierung des putativen Tumorsuppressors "Epithelial Membrane Protein 3".

Gutachter: Prof. Dr. Stefan Wiemann

Prof. Dr. Andreas von Deimling

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	7
Kurzdarstellung.....	9
Abstract.....	10
1 Einleitung.....	11
1.1 Gliome.....	11
1.1.1 Molekulare Veränderungen in Gliomen.....	13
1.2 Epithelial Membrane Protein 3.....	19
1.2.1 EMP3 als potentieller Tumorsuppressor.....	21
1.2.2 Biologische Funktion & Regulation von EMP3.....	23
1.3 Zielsetzung der Studie.....	24
2 Material & Methoden.....	26
2.1 Verwendete Materialien.....	26
2.1.1 Puffer und Stammlösungen.....	26
2.1.2 Primer.....	26
2.1.3 Medien.....	26
2.1.4 Vektoren.....	28
2.1.5 Bakterienstämme.....	28
2.1.6 Zelllinien.....	29
2.1.7 FFPE Gewebematerial für die IHC.....	29
2.2 Klonierung und Molekularbiologische Methoden.....	30
2.2.1 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	30
2.2.2 Gelelektrophorese.....	30
2.2.3 BP-Reaktion.....	30
2.2.4 LR-Reaktion.....	31
2.2.5 Transformation und Plasmid-DNA-Extraktion.....	31
2.2.6 Restriktionsverdau.....	32
2.2.7 Sequenzierung.....	32
2.2.8 Site-Directed-Mutagenesis / Erstellen der EMP3 Varianten.....	32
2.3 Methylierungsanalyse.....	33
2.3.1 DNA Extraktion & Bisulfitbehandlung.....	33
2.3.2 Pyrosequencing (PSQ).....	33
2.3.3 Methylierungsspezifische PCR (MSP) & Methylierungsspezifische	

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MS-MLPA).....	34
2.4 Zellkultur.....	34
2.4.1 Transfektion.....	35
2.4.2 Einbetten von Zellen in Paraffin.....	36
2.5 Erstellung eines monoklonalen Anti-EMP3 Antikörpers.....	37
2.6 Proteinanalyse.....	38
2.6.1 Lysate.....	38
2.6.2 BCA Proteinbestimmung.....	38
2.6.3 SDS-PAGE & Western Blotting.....	39
2.6.4 Verdau mit Peptide N-Glycosidase F (PNGase F).....	40
2.6.5 Immunhistochemie.....	40
2.6.6 Immunfluoreszenz.....	40
2.7 RNA-Interferenz (RNAi).....	41
2.7.1 Kristallviolett-Assay.....	42
2.7.2 Zelltod-Bestimmung.....	43
2.7.3 Migration.....	43
2.8 Interaktionsanalyse.....	44
2.8.1 Yeast-Two-Hybrid Split-Ubiquitin Assay (Y2H-SU).....	44
2.8.2 Co-Immunopräzipitation (Co-IP).....	46
2.8.3 Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Assay.....	48
2.8.4 Duolink® in situ Proximity Ligation Assay (PLA).....	49
2.9 Datenbanken & Softwares.....	51
2.10 Statistische Auswertung.....	51
3 Ergebnisse.....	52
3.1 REMBRANDT Datenbank Recherche.....	52
3.2 Promoter-Methylierungsanalyse.....	53
3.2.1 Methodenvergleich zwischen drei verschiedenen Verfahren zur Methylierungsanalyse von MGMT in Glioblastomen.....	53
3.2.2 Methylierungsanalyse von EMP3 in verschiedenen Tumorentitäten.....	54
3.3 Antikörperentwicklung.....	56
3.4 Immunhistochemische Detektion von EMP3 in Normalgeweben.....	56
3.5 Immunhistochemische Detektion von EMP3 in Tumorgeweben.....	64
3.5.1 Korrelation der EMP3 IHC Färbung mit Überlebensdaten.....	67
3.6 EMP3 Expression in Zelllinien.....	68

3.7	Posttranslationale Modifikation von EMP3.....	70
3.8	RNA-Interferenz Knockdown von EMP3.....	71
3.8.1	Einfluss des EMP3 Knockdowns auf die Zellproliferation.....	73
3.8.2	Einfluss des EMP3 Knockdowns auf die Migration.....	74
3.8.3	Einfluss des EMP3 Knockdowns auf den induzierten Zelltod	76
3.8.4	Einfluss des EMP3 Knockdowns auf Schlüsselproteine verschiedener Signalwege.....	79
3.9	Interaktionsanalyse.....	81
3.9.1	Split-Ubiquitin Screening (SU).....	81
3.9.2	Co-Immunoprecipitation (Co-IP).....	82
3.9.3	Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC).....	84
3.9.4	Proximity Ligation Assay (PLA)	90
4	Diskussion.....	97
4.1	Methylierungsanalyse.....	97
4.1.1	Vergleichende Analyse des MGMT Promotermethylierungsstatus mit drei verschiedenen diagnostischen Methoden.....	97
4.1.2	Analyse des EMP3 Promotermethylierungsstatus in Gliomen.....	98
4.2	Immunhistochemischer Nachweis von EMP3 in Geweben und Zelllinien.....	99
4.2.1	Antikörperentwicklung & methodische Aspekte.....	99
4.2.2	Nachweis von EMP3 in Normalgeweben.....	100
4.2.3	Nachweis von EMP3 in Zelllinien.....	104
4.2.4	Nachweis von EMP3 in Tumoren.....	104
4.3	Posttranslationale Modifikation von EMP3	106
4.4	RNA-Interferenz Knockdown von EMP.....	108
4.4.1	Methodische Aspekte der funktionellen RNAi Assays.....	108
4.4.2	Einfluss des EMP3 Knockdowns auf prominente Signalwege.....	110
4.5	Protein-Protein-Interaktionen von EMP3	115
4.5.1	Methodische Aspekte des Yeast-Two-Hybrid Split Ubiquitin Assays.....	116
4.5.2	Methodische Aspekte des Co-IP Assays.....	117
4.5.3	Methodische Aspekte des In situ Proximity Ligation Assays.....	118
4.5.4	Methodische Aspekte des BiFC Assays.....	119
4.5.5	Interaktoren.....	121
4.6	Funktionelle Charakterisierung von EMP3.....	134
4.7	Diagnostisches & Therapeutisches Potential von EMP3.....	139

4.8 Schlussfolgerung & Ausblick.....	141
5 Literaturverzeichnis.....	143
6 Eigene Veröffentlichungen.....	166
7 Anhang.....	168
7.1 Puffer und Stammlösungen.....	168
7.2 Primer.....	170
7.3 shRNA Sequenzen.....	172
7.4 Antikörper.....	172
8 Danksagung.....	175

Abkürzungsverzeichnis

5-FOA	5-Fluoroortic acid
AII	Astrozytom WHO Grad II
AIII	Astrozytom WHO Grad III
BCA	Bicinchoninic acid
BiFC	Bimolecular Fluorescence Complementation
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	Doppelt deionisiertes Wasser
DNA	Deoxyribonucleic acid
dsDNA	Double-stranded DNA
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular regulated kinase
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded
FKS	Fetales Kälberserum
GBM	Glioblastoma Multiforme
GFP	Green-fluorescent protein
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEK	Human embryonic kidney
IHC	Immunhistochemie
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LB	Lysogeny Broth
LOH	Loss of Heterozygosity
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MOPS	3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid
mRNA	Messenger RNA
MS-MLPA	Methylation-specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MSP	Methylation-specific PCR
NADPH/NADP ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
OAI	Oligoastrozytom WHO Grad II
OAI	Oligoastrozytom WHO Grad III
OD	Optische Dichte
OII	Oligodendrogliom WHO Grad II
OIII	Oligodendrogliom WHO Grad III

PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PLA	Proximity Ligation Assay
PSQ	Pyrosequencing
RET	Retention
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Rotations per Minute
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SD	Standard deviation
SDS	Sodium dodecyl sulfate
shRNA	Small-hairpin RNA
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
ssDNA	Single-stranded DNA
SU	Split-Ubiquitin
TBS	Tris Buffered Saline
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethane
WHO	World Health Organization
Y2H	Yeast-Two-Hybrid
YPAD	Yeast-Extract Peptone Dextrose plus Adenine
ZNS	Zentrales Nervensystem

Kurzdarstellung

EMP3 wurde aufgrund seines differentiellen Methylierungs- und Genexpressionsmusters als potentielles Tumorsuppressorgen in Neuroblastomen, Gliomen und anderen soliden Tumoren vorgeschlagen. In diesen Tumoren ist *EMP3* häufig durch Promoter-Hypermethylierung transkriptionell ausgeschaltet. Über die biologische Funktion von *EMP3* ist bisher wenig bekannt. Aufgrund seiner Homologien zu anderen Mitgliedern seiner Proteinfamilie, wurde für *EMP3* eine Rolle in der Regulation von Proliferation, Zell-Zell-Interaktionen und Apoptose postuliert. Das Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Funktion von *EMP3* und seiner Rolle in der Entstehung und Progression von Gliomen und anderen Tumoren. Dazu wurde die Promoter-Methylierung von *EMP3* in Tumoren untersucht und *EMP3* auf Proteinebene immunhistochemisch in Tumor- und Normalgeweben nachgewiesen. Zudem wurde der Einfluss von *EMP3* auf zelluläre Prozesse wie Apoptose, Proliferation und Migration *in vitro* über RNA-Interferenz Experimente bestimmt. Ferner wurden Interaktionsassays durchgeführt, um bisher unbekannte Protein-Protein-Interaktionspartner von *EMP3* zu identifizieren.

EMP3 ist in nahezu allen untersuchten nicht-neoplastischen Körpergeweben auf Proteinebene nachweisbar. Die stärkste Expression findet sich in Leukozyten, Neuronen und astrozytären Zellen. In Gliomen wird *EMP3* in über 80% der Glioblastome WHO Grad IV sehr stark exprimiert, während dies nur bei 20% der niedriggradigen Gliome der Fall ist. Eine erhöhte *EMP3* Expression korreliert dabei mit einem ungünstigeren klinischen Verlauf. Die Repression von *EMP3* über RNA-Interferenz reduziert signifikant die Proliferation und Migration von Tumorzellen *in vitro* und erhöht die Anfälligkeit gegen Zelltod-induzierende Stimuli. Dieser Effekt wird durch die reduzierte Aktivierung der EGFR, AKT und ERK Signalwege hervorgerufen. *EMP3* ist in ein komplexes Interaktionsnetzwerk eingebunden, aus dem 10 bisher unbekannte Interaktoren identifiziert werden konnten und reguliert darüber möglicherweise eine Reihe von wichtigen zellulären Transport- und Signaltransduktionsprozessen.

Die Daten stützen die These, dass *EMP3* eine Rolle in der Progression von Gliomen spielt, deuten aber nicht auf eine Funktion als Tumorsuppressor hin. Dennoch könnte *EMP3* einen validen prognostischen oder prädiktiven Marker und ein potentielles therapeutisches Target darstellen.

Abstract

EMP3 has been proposed as a potential tumor suppressor gene in neuroblastomas, gliomas and other solid tumors, due to its differential methylation and expression pattern. In these tumors *EMP3* is often transcriptionally silenced by promoter hypermethylation. The biological function of *EMP3* itself is largely unknown. Based on homologies to other members of the protein family, it was presumed that *EMP3* is involved in the regulation of proliferation, apoptosis and cell-cell-interactions.

The aim of this work is the functional characterization of *EMP3* and its role in glioma formation and progression. To this end we analyzed the methylation and expression pattern of *EMP3* in gliomas, non-neoplastic tissues and cell lines. In addition we studied the effects of RNA-interference-mediated knockdown of *EMP3* on proliferation, migration and apoptosis in an *in vitro* cancer cell line model. Furthermore we utilized different interaction assays to identify novel protein-protein interaction partners of *EMP3*.

EMP3 is expressed in almost all analyzed normal tissues, with the highest levels in leukocytes, neurons and astrocytic cells. In gliomas, the *EMP3* protein levels are highest in glioblastomas, of which over 80% show very strong *EMP3* expression, while in low-grade gliomas only 20% show elevated levels of *EMP3*. High levels of *EMP3* also correlate with shorter progression-free and overall patient survival. RNA-interference-mediated repression of *EMP3* significantly reduces the proliferation and migration of cancer cells *in vitro* and increased their susceptibility to induced cell death. This is in part caused by decreased phosphorylation and activation of the EGFR, AKT and ERK signaling kinases. *EMP3* is part of a complex interaction and signaling network, of which we could identify 10 novel interacting proteins. Through this network *EMP3* is possibly involved in the regulation of several important signaling and trafficking pathways. *EMP3* is therefore likely to be a mediator and regulator of intracellular trafficking and signal transduction.

The data support a role for *EMP3* in the progression of cancer, but, at least in glioma, not as a tumor suppressor. Nevertheless *EMP3* could be a valid prognostic and possibly even predictive biomarker in the diagnosis of glioma as well as a potential novel therapeutic target in different tumors and other diseases.

1 Einleitung

1.1 Gliome

Nicht-neoplastische Gliazellen erfüllen im Nervensystem eine Vielzahl von Funktionen. Sie dienen unter anderem als Stützgewebe und Gerüst für die Nervenzellen und nehmen eine wichtige Rolle bei der Reizweiterleitung der Nervenzellen, beim Stofftransport und der Aufrechterhaltung der Homöostase im Gehirn ein [1].

Der Oberbegriff „Gliome“ fasst eine Reihe von Neoplasien des Zentralnervensystems (ZNS) zusammen, die mutmaßlich aus glialen Vorläuferzellen hervorgehen. Etwa 30% aller Tumore des ZNS und 80% aller malignen Hirntumore werden als Gliome klassifiziert [2]. Gliome werden auf Basis ihrer Zellmorphologie in drei Untergruppen eingeteilt: Astrozytome, Oligodendrogliome und Ependymome [3]. Diese Subgruppen werden mittels bestimmter Kriterien, die von der World Health Organization (WHO) festgelegt wurden, weiter stratifiziert und in ein Graduierungssystem (WHO Grad I – IV) eingeordnet, anhand dessen das Verhalten und der klinische Verlauf des Tumors abgeschätzt werden können. Dabei gilt, je höher der Tumorgrad, desto schlechter der prognostizierte klinische Verlauf. Der Verlauf hängt zusätzlich von anderen klinische Faktoren ab, wie zum Beispiel dem Alter des Patienten und der Lokalisation des Tumors [3].

WHO Grad I Gliome sind sehr langsam wachsende, benigne Tumore mit guter Prognose. Da diese Tumore in der Regel nicht infiltrativ wachsen und sich gut vom umliegenden nicht-neoplastischen Gewebe abgrenzen lassen, ist eine Heilung durch eine chirurgische Resektion möglich [3].

WHO Grad II Tumore weisen ebenfalls eine relativ geringe proliferative Aktivität auf, wachsen jedoch im Gegensatz zu den Grad I Tumoren diffus infiltrierend in das umliegende Gewebe ein. Das hat zur Folge, dass nach chirurgischer Entfernung häufig Rezidive auftreten. Zudem können diese Tumore mit der Zeit eine Progression in malignere, höhergradige Tumorformen durchlaufen [3].

Anaplastische Gliome des WHO Grades III zeigen vermehrte Anzeichen einer erhöhten Malignität, wie einen abnehmenden Differenzierungsgrad, erhöhte mitotische Aktivität und Zelldichte, sowie atypische Kernmorphologie. Astrozytäre WHO Grad III Tumore können sich zudem ebenfalls zu höhergradigen Tumoren weiter entwickeln [3].

Dem höchsten WHO Grad IV werden extrem maligne Tumore zugeordnet, die Merkmale wie starke Entdifferenzierung, hohe mitotische Aktivität und Zelldichte, Gefäßproliferate und Nekrosen aufweisen. Diese Tumore haben auch bei maximaler Ausschöpfung aller Therapieoptionen eine sehr schlechte Prognose [3].

Die häufigste Subgruppe von Gliomen sind die astrozytären Tumore, welche etwa zwei Drittel aller Gliome ausmachen. Diese unterteilen sich in Pilozytische Astrozytome (WHO Grad I), diffuse Astrozytome (WHO Grad II), anaplastische Astrozytome (WHO Grad III) und Glioblastome (WHO Grad IV) [3].

Glioblastome machen dabei mehr als die Hälfte aller Gliome aus. Sie sind damit die häufigsten glialen Tumore und primären Hirntumore [4]. Ein kleiner Teil der Glioblastome geht aus der malignen Progression von diffusen und anaplastischen Astrozytomen hervor. Diese werden als sekundäre Glioblastome bezeichnet. Die überwiegende Mehrheit aller GBMs entsteht jedoch spontan und entwickeln sich nicht aus einer bekannten Vorläuferläsion, diese werden als primäre Glioblastome klassifiziert [3]. Glioblastome sind extrem maligne, diffus wachsende Tumore, die trotz intensiver Radio- und Chemotherapie nur eine sehr schlechte 5-Jahres Überlebensrate von unter 5% aufweisen [4].

Die oligodendroglialen Tumore werden ebenfalls weiter unterteilt. Hier werden jedoch im Gegensatz zu den astrozytären Tumoren nur zwei WHO Grade unterschieden, Oligodendrogliome (WHO Grad II) und anaplastische Oligodendrogliome (WHO Grad III) [3]. Oligodendrogliome machen rund 5 - 6% aller Gliome aus, wobei die Inzidenz in den letzten Jahren gestiegen ist. Dies könnte unter anderem auf unscharf definierte Abgrenzungskriterien zu anderen Tumorentitäten zurück zu führen sein [3].

Oligoastrozytome (WHO Grad II) und anaplastische Oligoastrozytome (WHO Grad III) ähneln in ihren Merkmalen den Oligodendrogliomen und anaplastischen Oligodendrogliomen, weisen jedoch ebenfalls Charakteristika eines astrozytären Tumors auf und werden daher auch als Mischgliome bezeichnet. Dabei handelt es sich jedoch um eine einzelne Tumorentität, deren Zellen die gleichen genetischen Veränderungen aufweisen. Diese Tumore gehen daher vermutlich aus einer Vorläuferzelle hervor, die das Potential besitzt sich sowohl in Astrozyten als auch Oligodendrozyten zu entwickeln [3, 5].

Ependymome lassen sich in die WHO Grade I und II, sowie anaplastische Ependymome (WHO Grad III) unterteilen. Diese Tumore treten häufig bei Kindern auf und machen etwa 6% aller Gliome aus [2, 3].

1.1.1 Molekulare Veränderungen in Gliomen

Gliome zeichnen sich, wie andere Tumore auch, durch eine Bandbreite von komplexen genetischen, epigenetischen und chromosomalen Veränderungen aus, die ursächlich für die maligne Transformation der Zellen sind [4]. Davon sind unter anderem verschiedene Tumorsuppressor- und Proto-Onkogene betroffen.

Tumorsuppressorgene codieren für Proteine, denen in der Regel eine wichtige Funktion in der Kontrolle und Regulation des Zellzyklus und/oder der Apoptose zukommt. Durch Mutationen, chromosomale Deletionen oder transkriptionelle Inaktivierung durch Promoter-Hypermethylierung werden diese in Krebszellen ausgeschaltet oder in ihrer Funktion eingeschränkt. Dies ermöglicht oder begünstigt eine unkontrollierte Vermehrung und die Akkumulation weiterer genetischer Veränderungen. Die Folge ist eine fortschreitende Malignisierung der Zellen [6].

Proto-Onkogene codieren für Proteine, die einen aktivierenden Einfluss auf den Zellzyklus haben oder anti-apoptotisch wirken und dadurch zur Vermehrung und zum Überleben der Zellen beitragen. Dies können zum Beispiel Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktor-Rezeptoren, Apoptose-Regulatoren, Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren sein. Durch Mutationen, Gen-Amplifikation oder Überexpression können diese in Onkogene umgewandelt werden, die durch verstärkte, unkontrollierte Aktivität die maligne Transformation der Zellen fördern oder auslösen [7].

Einige gut untersuchte Veränderungen, die in Gliomen eine Rolle spielen, werden im Folgenden kurz vorgestellt.

Chromosomale Veränderungen

In Gliomen treten verschiedene Formen von chromosomalen Verlusten oder Amplifikationen auf. Die Art und Häufigkeit der Veränderungen unterscheidet sich dabei je nach Gliom-Subgruppe. In oligodendroglialen Tumoren ist die bei weitem häufigste

chromosomale Aberration ein kombinierter kompletter Allelverlust auf den Chromosomenarmen 1p und 19q (loss-of-heterozygosity, LOH), vermittelt durch eine t(1;19) (q10;p10) Translokation [4, 8]. Von diesem Verlust sind bis zu 70 - 80% aller Oligodendrogliome und etwa 50% aller Oligoastrozytome betroffen [2, 4]. Der kombinierte 1p/19q Allelverlust ist damit ein Signaturmerkmal dieser Gliom-Subgruppe und grenzt diese von den astrozytären Tumoren ab, in denen diese Veränderung selten zu finden ist [4]. Der 1p/19q Verlust tritt fast immer in Verbindung mit IDH Mutationen und so gut wie nie in Verbindung mit *TP53* und *ATRX* Mutationen auf [9]. Die Häufigkeit dieser chromosomalen Veränderung spricht dafür, dass es sich dabei um ein frühes und entscheidendes Ereignis in der Tumorentwicklung handelt. Das führte zu der Hypothese, dass auf einem oder beiden der Chromosomenarme Tumorsuppressorgene lokalisiert sind, die durch den chromosomalen Verlust, in Verbindung mit weiteren Ereignissen im zweiten Allel, vollständig inaktiviert werden [10]. Inzwischen gibt es mit *CIC* und "Far Upstream Element Binding Protein 1" (*FUBP1*) vielversprechende Kandidaten für die gesuchten Tumorsuppressorgene [11].

In astrozytären Tumoren treten vor allem Allelverluste auf den Chromosomen 6, 9p, 10q, 11p, 19q und 22q, sowie der Verlust des gesamten Chromosoms 10 und Amplifikation von Chromosom 7 auf. Von diesen Veränderungen sind verschiedene Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene betroffen. Häufig treten zum Beispiel Amplifikationen des "Epidermal Growth Factor Receptor 1" (*ErbB1*, *EGFR*) Genlokus und Deletionen von "Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A" (*CDKN2A*) auf [2-4].

Genetische Veränderungen (Mutationen)

Wie auch in anderen Krebsarten, treten in Gliomen Mutationen auf, die bestimmte Tumorsuppressoren ausschalten oder Onkogene aktivieren.

Einer der bekanntesten und am besten charakterisierten Tumorsuppressoren, der in einer Vielzahl von Tumoren und ebenfalls in Gliomen häufig von Mutationen betroffen ist, ist p53. Das Protein wird codiert durch das *TP53* Gen auf 17p13.1 und reguliert zelluläre Reaktionen auf Schädigungen der DNA, wie zum Beispiel DNA Reparatur, Zellzyklus-Arrest und Apoptose [12, 13]. *TP53* ist in etwa 50 – 60% aller Tumore mutiert oder anderweitig inaktiviert [14], in Gliomen weisen besonders astrozytäre Tumore mit großer

Häufigkeit (>60%) Mutationen im *TP53* Gen auf [4].

Zu den weiteren Tumorsuppressoren, die in Gliomen von inaktivierenden Mutationen betroffen sind, zählen "Retinoblastoma Protein 1" (RB1), "Phosphatase and Tensin Homolog" (PTEN) und "Alpha-thalassemia/Mental-retardation Syndrome X-linked" (ATRX) [2]. RB1 ist in die Regulation des Zellzyklus involviert, PTEN ist ein negativer Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) Regulator, während es sich bei ATRX um einen Transkriptionsregulator handelt, dessen Inaktivierung mit Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster von Zellen assoziiert ist [15].

Als potentielle Tumorsuppressorgene wurden kürzlich *CIC* und *FUBP1* vorgestellt [11]. *CIC*, das humane Homolog zu *Capicua* in *Drosophila melanogaster*, ist auf Chromosom 19q13 lokalisiert und damit in der Region, die in oligodendroglialen Tumoren häufig von Deletionen betroffen ist. Bisher konnten *CIC* Mutationen in 50 – 80% aller untersuchten Oligodendrogliome und etwa 30% aller Oligoastrozytome nachgewiesen werden [11, 16, 17], wobei das Auftreten dieser Mutationen signifikant ($p < 0.001$) mit 1p/19q LOH und IDH1/2 Mutationen assoziiert ist [17]. Nahezu jedes Oligodendrogliom mit 19q Allelverlusten trägt eine Mutation im *CIC* Gen, während Mutationen in Tumoren ohne 1p/19q LOH selten auftreten. Mutationen in *FUBP1* kommen dagegen lediglich in 15 – 20% der Oligodendrogliome und 8% der Oligoastrozytome vor [11, 16]. Während Mutationen in den weiter oben genannten Tumorsuppressoren auch in anderen Krebsarten vorkommen, sind Mutationen in *CIC* fast ausschließlich in Oligodendrogliomen zu finden [17].

Eine der häufigsten genetischen Veränderungen in Gliomen sind somatische Mutationen in den Stoffwechsellenzymen "Isocitrat Dehydrogenase 1" und "2" (IDH1, IDH2) [18]. Diese Enzyme liegen als homodimere Komplexe im Zytoplasma (IDH1) beziehungsweise in den Mitochondrien (IDH2) vor und katalysieren die Umwandlung von Isocitrat in α -Ketoglutarat unter Produktion von NADPH aus NADP⁺ und Freisetzung von CO₂. Diese Reaktion ist Teil des Citratzyklus und damit ein zentrales und hoch konserviertes Element des zellulären Stoffwechsels [19].

Gliome weisen eine sehr hohe Mutationsfrequenz in diesen beiden Stoffwechsellenzymen auf, wobei Mutationen in *IDH1* häufiger auftreten als in *IDH2*. In Oligodendrogliomen, Oligoastrozytomen und Astrozytomen der WHO Grade II und III, sowie sekundären

Glioblastomen liegt die Häufigkeit der IDH Mutationen bei 50 – 80%. In primären Glioblastomen sind IDH Mutationen dagegen selten (<10%) [18, 20, 21].

Die meisten bisher identifizierten Mutationen im *IDH1* Gen führen zum Austausch einer einzelnen Aminosäure (Arginin) an Position 132 (R132) in der Primärstruktur des Proteins. In der großen Mehrheit der Fälle (~85%) findet dabei ein Austausch von Arginin zu Histidin statt (R132H). Bei IDH2 ist das korrespondierende Arginin an Position 172 (R172) betroffen [19]. Dieser Argininrest ist ein wichtiger Teil der katalytischen Tasche der IDH Enzyme. Der Austausch an dieser Position führt zu einer Änderung der katalytischen Funktion des Enzyms ("gain-of-function"). Anstelle der oben beschriebenen Reaktion, wird die Umwandlung von α -Ketoglutarat in 2-Hydroxyglutarat (2-HG) unter Verbrauch von NADPH katalysiert [22]. Eine gängige Hypothese ist, dass die Akkumulation von 2-HG in den Zellen zur Hemmung α -Ketoglutarat-abhängiger Dioxygenasen und zu einer epigenetischen Fehlsteuerung in der Zelle führt [23, 24]. Als Folge davon werden eine Reihe von Genen hypermethyliert und transkriptionell stillgelegt. Der dadurch entstehende Hypermethylierungsphänotyp wird als "Glioma CpG Island Methylator Phenotype" (G-CIMP) bezeichnet [25, 26].

Die hohe Mutationsfrequenz von IDH1/2 in Gliomen spricht dafür, dass es sich bei diesen genetischen Veränderungen um ein sehr frühes Ereignis im Prozess der Krebsentstehung handelt [27] und dass 2-HG als ein Onkometabolit wirkt, dessen Akkumulation die Transformation der Zellen begünstigt oder auslöst [28].

Epigenetische Veränderungen

Neben dem Hypermethylierungsphänotyp G-CIMP treten in Gliomen weitere epigenetische Veränderungen auf. Eine der Bekanntesten und meist Untersuchten, ist die Hypermethylierung des "O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase" (*MGMT*) Promoters [29, 30]. *MGMT* ist ein Reparatur-Protein, das Alkyl-Gruppen von Guanosin-Nukleotiden entfernen und auf sich selbst übertragen kann. Alkylierung der Guanosin-Nukleotide kann zu Basen-Fehlpaarung und Doppelstrangbrüchen führen, *MGMT* kommt daher eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität in der Zelle zu [31]. Dennoch ist die epigenetische Inaktivierung von *MGMT* durch Promoter-Hypermethylierung in Glioblastom-Patienten mit einer längeren Überlebens-

wahrscheinlichkeit assoziiert [29, 30, 32, 33].

MGMT wirkt in den Tumorzellen dem zytotoxischen Effekt von DNA-alkylierenden Zytostatika wie Temozolomid entgegen und vermittelt dadurch eine Resistenz gegen diese Art von Therapie. Tumorzellen in denen die Genexpression von *MGMT* durch Hypermethylierung des Promoters stillgelegt ist, sind daher mutmaßlich weniger resistent gegen Alkylantien [34]. Es wurde allerdings auch ein Überlebensvorteil für Patienten mit *MGMT* Methylierung festgestellt, die nur eine Radiotherapie erhalten hatten [35, 36]. Ebenso konnte kein Zusammenhang zwischen der immunhistochemisch bestimmten Proteinmenge von MGMT und dem Überleben nachgewiesen werden [37]. Diese Faktoren widersprechen der Hypothese, dass das MGMT Protein eine Chemoresistenz vermittelt. Unter diesem Gesichtspunkt wäre die *MGMT* Methylierung eher ein prognostischer Marker, der Tumore charakterisiert, die allgemein besser auf Therapien ansprechen und kein prädiktiver Marker für das Ansprechen auf bestimmte Chemotherapeutika [38]. In einer kürzlich erschienenen Arbeit von Wick *et al.* konnte dagegen gezeigt werden, dass der prognostische oder prädiktive Wert der *MGMT* Methylierung vom *IDH* Mutationsstatus abhängig ist. In Tumoren mit mutiertem *IDH1* ist die *MGMT* Methylierung demnach ein prognostischer Marker, während sie in *IDH*-wildtyp Tumoren spezifisch das Ansprechen auf Chemotherapie, aber nicht auf Radiotherapie vorhersagt [39]. Somit ist die *MGMT* Methylierung ein prädiktiver Marker in bestimmten, aber nicht allen Gliomen, der das Ansprechen auf bestimmte Therapieformen vorhersagen kann [39, 40]. Der *MGMT* Methylierungsstatus wird inzwischen sowohl in einer Vielzahl von klinischen Studien, als auch in der Routine-Diagnostik standardmäßig mit verschiedenen Methoden erhoben [41].

Zusammenfassung

Die Verteilung der oben beschriebenen molekularen Veränderungen unterscheidet sich deutlich zwischen den verschiedenen Gliom-Subgruppen, was Rückschlüsse auf deren Entstehung und Entwicklung zulässt. Der gängigen Hypothese zufolge, sind Mutationen in *IDH1/2* eines der frühesten Ereignisse in der Entstehung von Gliomen [27, 42]. Die weitere Entwicklung der Vorläuferzelle in die eine oder andere Tumor-Subgruppe, entscheidet sich anhand der Veränderungen, die diese in der Folge durchläuft. Mutationen in *TP53* und *ATRX* definieren Gliome mit astrozytärer Differenzierung, während 1p/19q LOH und

Mutationen in *CIC/FUBP1* und im *TERT* Promoter typisch für Tumore mit oligodendroglialer Differenzierung sind [43]. Primäre Glioblastome unterscheiden sich dabei in ihren molekularen Veränderungen und ihrer Entstehung sowohl von den Astrozytomen und sekundären Glioblastomen, als auch von den oligodendroglialen Tumoren [2, 42, 43].

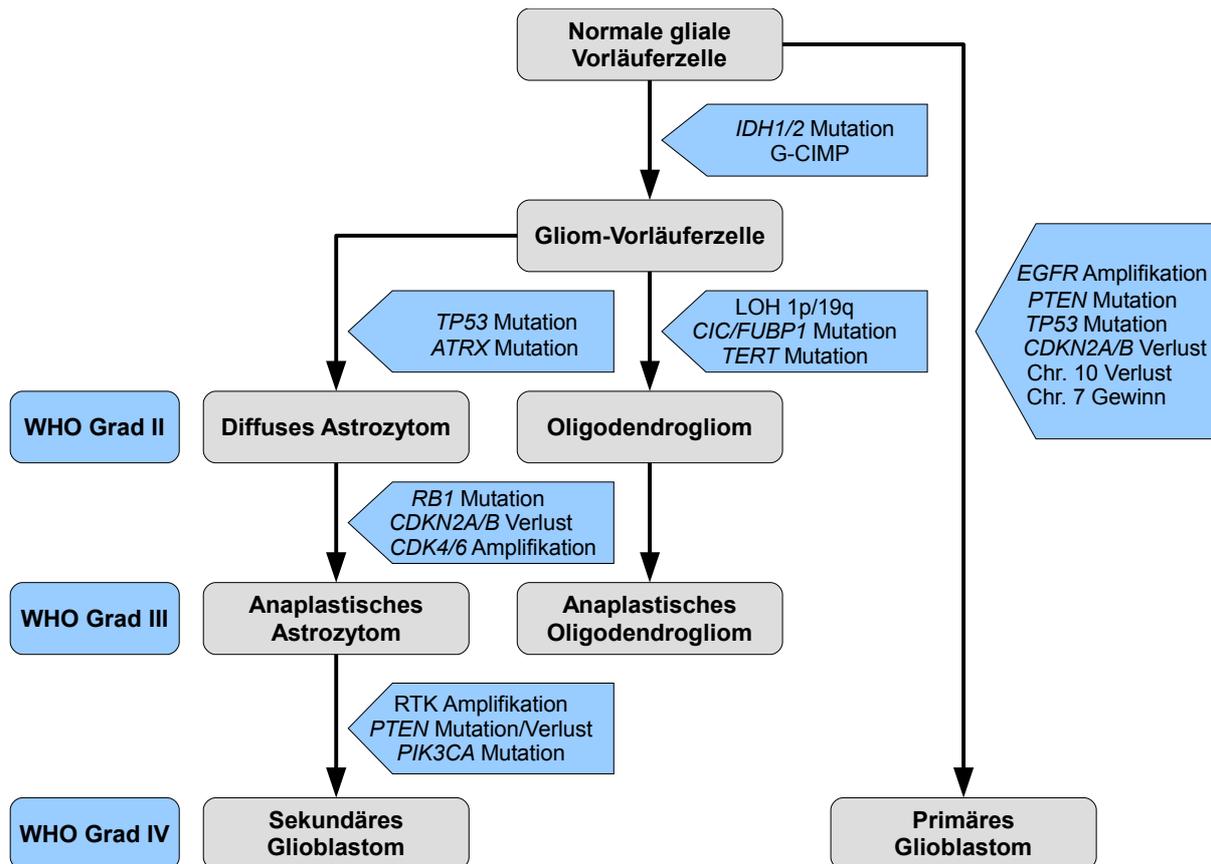


Abbildung 1: Hypothetisches Schema der Tumorentwicklung und Progression von Gliomen.

Die Klassifizierung der Gliome und deren Unterteilung in die verschiedenen Subgruppen erfolgte historisch aufgrund histologischer Merkmale, die diesen Tumoren gemeinsam sind. Mehr und mehr zeigt sich jedoch, dass sich Gliome klinisch oft besser anhand ihrer genetischen, epigenetischen und chromosomalen Veränderungen definieren lassen [42, 44]. Drei der wichtigsten Biomarker mit diagnostischer Relevanz in Gliomen sind der *IDH1/2* Mutationsstatus, der 1p/19q Status und die *MGMT* Promoter-Methylierung. Diesen Veränderungen ist gemeinsam, dass ihr Auftreten mit einer längeren

Überlebenswahrscheinlichkeit für den Patienten assoziiert ist. Der 1p/19q Status und der *MGMT* Methylierungsstatus sind dabei nach aktuellem Stand prädiktive Marker, die für die klinische Behandlungspraxis von bestimmten Gliomen von Bedeutung sind [9, 40]. Der *IDH* Mutationsstatus könnte als Biomarker in Zukunft an Relevanz gewinnen [9]. Der Wert von prädiktiven Biomarkern definiert sich maßgeblich über die Verfügbarkeit verschiedener Therapieoptionen. Dies ist bei Gliomen nach momentanem Stand der Medizin jedoch nicht gegeben [45]. Diffus infiltrierende Gliome sind mit den aktuell verfügbaren therapeutischen Methoden nicht heilbar. Selbst bei weiträumiger Resektion des Primärtumors verbleiben einzelne, oder kleine Gruppen von Tumorzellen über weite Teile des Gehirns verteilt, aus denen sich Rezidivtumore entwickeln können [46].

Neuartige Therapien, die auf spezifische molekulare Veränderungen abzielen, könnten dieses Problem umgehen und die über das Gehirn verteilten Tumorzellen zielgerichtet eliminieren [47]. Dies wird allerdings unter anderem durch die genomische Instabilität und die enorme Komplexität der molekularen Veränderungen besonders in hochgradigen, sehr malignen Gliomen erschwert. Oftmals unterscheiden sich die Zellen innerhalb dieser Tumore klonal in ihren genetischen und chromosomalen Veränderungen voneinander [48]. Selbst eine zielgerichtete Therapie kann somit unter Umständen nicht alle Tumorzellen erfassen. Die bisherigen Erfolge solcher Therapien sind bislang daher sehr begrenzt [44, 47, 48].

Zur Zeit befinden sich mehrere neuartige Therapeutika in der Entwicklung, die die molekularen Veränderungen in den Tumorzellen gezielt ausnutzen sollen [47]. Sofern diese Therapeutika ihren Nutzen in der Behandlung von Patienten mit Gliomen unter Beweis stellen können, würde das auch die Erfassung der zugehörigen Biomarker in der Diagnostik aufwerten.

1.2 Epithelial Membrane Protein 3

Bei Epithelial Membrane Protein 3 (EMP3) handelt es sich um ein aus 163 Aminosäuren (18,4 kDa) aufgebautes Membranprotein, welches durch das *EMP3* Gen auf Chromosom 19q13.3 codiert wird [49, 50]. EMP3 bildet zusammen mit "Peripheral Myelin Protein 22" (PMP22), sowie "Epithelial Membrane Protein 1" und 2 (EMP1, EMP2) und dem entfernter verwandten "Lens Intrinsic Membrane Protein 2" (LIM2; ursprünglich MP20 genannt) die

PMP22/EMP/MP20 Familie von Membranproteinen [51, 52]. Zu den anderen Mitgliedern der Proteinfamilie weist EMP3 eine Sequenzübereinstimmung von 41% (PMP22), 33% (EMP1), 38% (EMP2) und 23% (LIM2) auf [50].

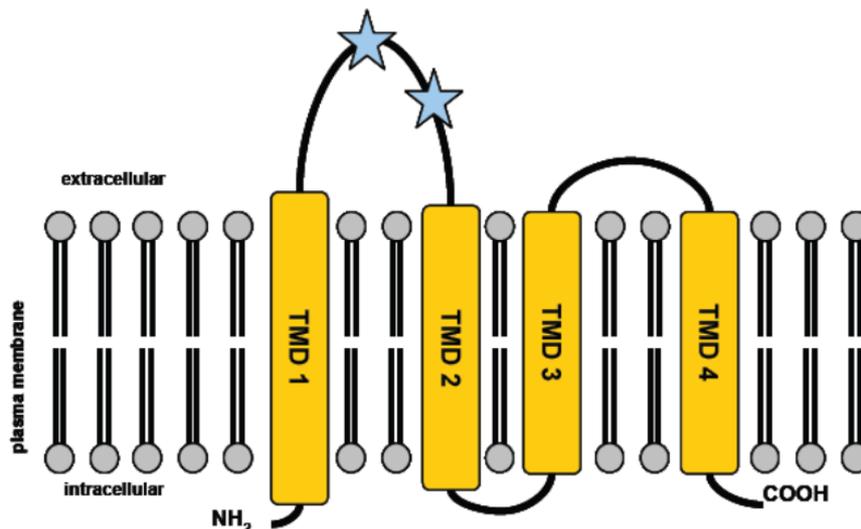


Abbildung 2: Schematische Darstellung von EMP3 in der Membran. Die gelben, mit TMD1 – 4 beschrifteten Bereiche stellen die Transmembrandomänen dar, die Sterne markieren die Position der Glykosylierungsmotive.

Auf Basis seiner Aminosäuresequenz lässt sich für EMP3 voraussagen, dass es aus 4 Transmembrandomänen aufgebaut ist, die durch zwei hydrophile extrazelluläre Loops (36 AS, 15 AS) und einen kurzen intrazellulären Loop (5 AS) verbunden sind [51]. Im ersten extrazellulären Loop verfügt EMP3 über zwei potentielle N-Glykosylierungsmotive (Abb. 2). Diese strukturellen Merkmale werden von allen Mitgliedern der PMP22/EMP/MP20 Familie geteilt, wobei vor allem der Aufbau der Transmembran-domänen zwischen den Familienmitgliedern hoch konserviert ist. Die Größe der extrazellulären Loops und die Anzahl der Glykosylierungsmotive kann dagegen leicht variieren [53]. Die funktionelle Bedeutung der Transmembrandomänen wird dadurch unterstrichen, dass Mutationen in *PMP22*, die zu verschiedenen Neuropathien führen, in diesen Bereichen gehäuft auftreten [53]. Die intrazellulären Bereiche der PMP22/EMP/MP20 Proteine spielen aufgrund ihrer geringen Größe vermutlich keine funktionelle Rolle, wohingegen die extrazellulären Loops eine ausreichende Größe aufweisen, um eine Interaktion mit anderen Proteinen und Molekülen zu ermöglichen [53]. EMP3 wird in den meisten adulten und fetalen Geweben

expremiert, wobei die höchste Expression in Leukozyten, Ovar, Milz, Lunge und Herzmuskelgewebe nachgewiesen wurde, während die schwächste Expression im Gehirn auftrat [50].

1.2.1 EMP3 als potentieller Tumorsuppressor

EMP3 wurde aufgrund seines differentiellen Genexpressions- und Promoter-Hypermethylierungsmusters, sowie seiner Lokalisation in der 19q Chromosomenregion als ein potentieller Tumorsuppressor in Gliomen, Neuroblastomen und anderen Tumoren vorgeschlagen [54].

Die erste Studie dazu wurde 2004 von Alaminos *et al.* publiziert, in der *EMP3* als ein Kandidatengenen auf 19q identifiziert wurde, dessen Expression in Neuroblastomen durch Promoter-Hypermethylierung herunterreguliert wurde [55]. Dieser Methylierungs-Phänotyp war dabei signifikant ($p = 0,004$) mit 19q LOH assoziiert. Bei Wiederherstellung der *EMP3* Expression in IMR-32 Neuroblastom-Zellen, zeigten diese ein signifikant vermindertes Koloniebildungspotential und verringertes Tumorwachstum *in vivo* in einem Maus Xenograft Modell. *EMP3* Promoter-Hypermethylierung fand sich in 24% der untersuchten Neuroblastome und war mit einer schlechteren Prognose bei Patienten nach 2-jährigem Follow-up assoziiert ($p = 0,03$). In Gliomen trat die *EMP3* Promoter-Hypermethylierung ebenfalls häufig auf (39%) [55]. Darauf folgten weitere Studien, in denen in verschiedenen Tumorentitäten aberrante *EMP3* Expressionslevel und/oder Hypermethylierungsfrequenzen gefunden wurden. Margetts *et al.* fanden ebenfalls ein gehäuftes Auftreten von *EMP3* Hypermethylierung in Neuroblastomen (68%) und in Phaeochromocytomen in denen *EMP3* Methylierung allerdings seltener zu finden war (6%) [56].

Reduzierte *EMP3* Expression wurde ebenfalls in zwei Arbeiten zu Speiseröhrenkarzinomen (Esophagus Squamous Cell Carcinoma, ESCC) und in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) gefunden. Sowohl bei Patienten mit ESCC, als auch NSCLC, war eine verringerte *EMP3* Expression mit einer kürzeren Überlebenswahrscheinlichkeit verbunden (ESCC: $p = 0,05$; NSCLC: $p = 0,01$) [57, 58].

In Gliomen wurde ein Zusammenhang zwischen dem Hypermethylierungs- und Expressionsstatus von *EMP3* und dem 1p/19q Status beobachtet.

In Oligodendrogliomen wurde von Li *et al.* eine Assoziation von erhöhter EMP3 Expression im Vergleich zu normalen Hirngewebe, mit Tumoren ohne 1p/19q Verlust festgestellt ($p = 0,004$), es konnte jedoch umgekehrt keine statistisch signifikante Korrelation zwischen verringerter EMP3 Expression und 1p/19q LOH hergestellt werden [59]. In einer Studie von Kunitz *et al.* konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen aberranter *EMP3* Promoter-Hypermethylierung, sowie reduzierter EMP3 Expression und Allelverlusten auf 19q in oligodendroglialen Tumoren gezeigt werden ($p = 0,01$), nicht jedoch in Astrozytomen [60]. Die Expressionslevel von EMP3 waren signifikant höher in primären Glioblastomen im Vergleich zu diffusen WHO Grad II und anaplastischen WHO Grad III Astrozytomen ($p = 0,005$, $p = 0,009$), sowie sekundären Glioblastomen ($p = 0,008$). Ebenso war *EMP3* Promoter-Methylierung bei weitem häufiger in WHO Grad II und III Oligodendrogliomen (73%, 78%) und Astrozytomen (83%, 84%), sowie sekundären Glioblastomen (89%), als in primären Glioblastomen (17%). Der Methylierungsstatus von *EMP3* korrelierte dabei mit dem Expressionslevel sowohl in Oligodendrogliomen ($p = 0,006$) als auch Astrozytomen ($p = 0,005$). Allerdings war die *EMP3* Hypermethylierung interessanterweise ein vorteilhafter prognostischer Marker in 46 Patienten mit oligodendroglialen Tumoren ($p = 0,03$) [60].

Diese Ergebnisse wurden später durch weitere Studien bestätigt und ergänzt [61-64]. *EMP3* Hypermethylierung ist, neben Allelverlusten auf 19q, außerdem mit dem IDH1/2 Mutationsstatus assoziiert. Hypermethylierung von *EMP3* ist Teil des G-CIMP Hypermethylierungsphänotyps, der durch die IDH Mutationen ausgelöst wird [65].

In Brustkrebszelllinien wurde eine erhöhte Expression von EMP3, EMP1 und PMP22 in Zelllinien mit einem invasiven Phänotyp beobachtet, während nicht-invasive Zelllinien nur eine sehr geringe Expression dieser Gene aufwiesen [66]. Dies wurde durch andere Studien untermauert, in denen erhöhte EMP3 Expression in Zellen mit "Human Epidermal Growth Factor Receptor 2" (ErbB2, HER2) Überexpression festgestellt wurde [67], beziehungsweise in denen berichtet wurde, dass EMP3 in primären Brustkrebs-Tumorgewebe signifikant höher expremiert wurde als in nicht-neoplastischem Brustgewebe ($p < 10^{-7}$) und mit aggressiveren Phänotypen wie histologischem Grad III, Lymphknoten-Metastasen und HER2 Expression assoziiert war. Auf Basis dieser Daten wurde EMP3 daher als ein Marker für die Brustkrebs-Aggressivität vorgeschlagen [68].

In Urothelkarzinomen wurde ebenfalls ein funktioneller Zusammenhang zwischen ErbB2 und EMP3 beschrieben. In diesen Tumoren korrelierte eine hohe EMP3 Expression signifikant ($p = 0,01$) mit verringertem progressionsfreiem Überleben [69].

Somatische Mutationen im *EMP3* Gen, wie sie in vielen anderen tumor-assoziierten Genen häufig auftreten, konnten bisher nicht gefunden werden [62]. Jedoch wurde in einer Studie ein bekannter Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP), der einen I125V Austausch in der Aminosäuresequenz des Proteins zur Folge hat, häufiger in Patienten mit Prostata-Karzinomen gefunden, als in der Kontrollgruppe (Allelfrequenz 0,045 gegenüber 0,013; $p = 0,0001$) [70].

1.2.2 Biologische Funktion & Regulation von EMP3

Die genaue biologische Funktion von EMP3 ist weitgehend unbekannt. Andere Mitglieder der Proteinfamilie sind dagegen besser charakterisiert [53]. Aufgrund seiner Homologien zu PMP22, wurde für EMP3 eine mögliche Funktion in der Regulation von Zellproliferation, Zell-Zell-Interaktionen und Apoptose postuliert [50, 51]. Des Weiteren ist EMP3 möglicherweise in Entwicklungs-, Differenzierungs- und Regenerationsprozesse des Nervensystems und anderer Gewebe involviert [71]. Auf welche Weise EMP3 diese Prozesse regulieren könnte, ist jedoch spekulativ. Bisher wurde lediglich ein einzelner Interaktionspartner von EMP3 identifiziert. In einer Studie von Wilson *et al.* wurde gezeigt, dass EMP3, EMP1, EMP2 und PMP22 mit dem C-terminalen Teil des purinergen P2X7 Rezeptors (P2X7) interagieren. Ektopische Überexpression eines dieser Proteine in HEK293 Zellen führte zur Ablösung der Zellmembran, Annexin-V-Bindung und schließlich zur Apoptose über einen Caspase-abhängigen Signalweg [72]. In anderen Studien resultierte die ektopische Überexpression von EMP3 in Zelllinien ebenfalls in verringerter Zellviabilität und/oder verringertem Tumorbildungspotential [55, 57].

Li *et al.* konnten dagegen feststellen, dass der Knockdown von EMP3 die Empfindlichkeit von HepG2 Zellen gegen den toxischen Effekt freier Fettsäuren in Verbindung mit "Tumor Necrosis Factor Alpha" (TNF α) erhöhte. Daraus leiteten die Autoren einen protektiven Effekt von EMP3 auf die Zellen ab [73].

Eine Studie zur Dom-Bildung bei Ratten Mammakarzinom-Zellen zeigte, dass das Ratten-Homolog von EMP3 diesen Prozess durch Herunterregulierung der Expression der β -

Untereinheit des Amilorid-sensitiven Na^+ -Kanals inhibiert. Repression des EMP3 Homologs durch Antisense-Oligonukleotide führte zur Dom-Bildung. Diese Zell-Dome sind lokale Flüssigkeitsansammlungen in der Zellschicht, verursacht durch den aktiven, gerichteten, transepithelialen Transport von Wasser und Ionen [74].

Die Genexpression von *EMP3* wird in einigen Neoplasien durch CpG-Insel-Hypermethylierung herunterreguliert [55, 57, 58, 60, 62]. Es wurden allerdings auch verringerte Transkript-Level beobachtet, ohne dass eine Hypermethylierung vorlag, was die Existenz eines weiteren Repressionsmechanismus nahelegt [54]. Das verwandte PMP22 unterliegt einer komplexen und strikten Kontrolle durch transkriptionelle, posttranskriptionelle und posttranslationale Mechanismen, die die PMP22 Proteinlevel in der Zelle regulieren. Veränderungen und Fehlsteuerungen von PMP22 durch Mutationen oder Genamplifikationen führen zu Neuropathien wie dem Charcot-Marie-Tooth Syndrom [75]. Veränderte Expressionslevel von EMP3 wurden neben verschiedenen Tumoren außerdem mit Keratokonus assoziiert, einer Erkrankung des Auges die zur Ausdünnung und Verformung der Kornea führt [76].

1.3 Zielsetzung der Studie

Obwohl mehrere Studien Indizien für eine potentielle Rolle von EMP3 als Tumorsuppressor aufzeigen konnten, sind die Daten bisher widersprüchlich. EMP3 wird in einigen Tumoren, wie Oligodendrogliomen und Neuroblastomen, herunterreguliert, was für eine Rolle als Tumorsuppressor spricht. In anderen Tumoren, wie zum Beispiel Glioblastomen und Mammakarzinomen, wird es dagegen hochreguliert und die Expression korreliert mit erhöhter Tumoraggressivität. Das differentielle Genexpressions- und Methylierungsmuster von EMP3 in verschiedenen Tumorentitäten, sowie die Assoziation mit relevanten genetischen, epigenetischen und chromosomalen Veränderungen und die klinischen Daten deuten darauf hin, dass EMP3 einen Einfluss auf die Entstehung und das Verhalten von Gliomen und anderen Neoplasien hat. In mehreren Publikationen wurde EMP3 als ein Tumorsuppressor vorgeschlagen, der in späteren Stadien der Tumorprogression und weniger bei der Entstehung von Krebs eine Rolle spielt [54].

Allerdings sind die biologische Funktion und die Signalwege, in die EMP3 involviert ist und über die eine Rolle in der Tumorentwicklung erklärt werden könnten, bislang noch

weitgehend unbekannt. Die wenigen funktionellen Untersuchungen die zu EMP3 bisher veröffentlicht wurden, liefern zum Teil widersprüchlich erscheinende Ergebnisse.

Die Ausgangshypothese ist, dass EMP3 ein potentieller Tumorsuppressor mit Relevanz in Gliomen und anderen Tumoren ist. Das Ziel dieser Arbeit ist die funktionelle Charakterisierung von EMP3, besonders im Hinblick auf seine mögliche Rolle als Tumorsuppressor in Gliomen. Um dies zu erreichen, werden verschiedene Strategien und experimentelle Ansätze verfolgt, die sich in drei Hauptbereiche gliedern lassen.

- 1.) Immunhistochemische Untersuchung von EMP3 an Geweben und Zellen:** Die Relevanz von EMP3 als Faktor in der Tumorentstehung und Progression wird bestimmt, indem EMP3 in einer Serie von Tumoren immunhistochemisch angefärbt wird. Um weitere Hinweise auf die Funktion, Verteilung und Lokalisation von EMP3 zu erhalten, wird EMP3 außerdem in verschiedenen Zelllinien und nicht-neoplastischen Geweben per Immunhistochemie untersucht.
- 2.) Funktionelle Untersuchungen an EMP3-Knockdown Zelllinien:** In einer Krebszelllinie wird über RNA-Interferenz ein stabiler Knockdown von EMP3 induziert. An diesem Zellkultur-Modell wird untersucht, wie sich die Repression von EMP3 auf die Viabilität und das Verhalten der Zellen im Hinblick auf Proliferation, Migration und Anfälligkeit gegen Apoptose auswirkt und über welche Signalwege eventuelle Veränderungen vermittelt werden könnten.
- 3.) Identifizierung der Interaktionspartner von EMP3:** Ziel ist die Aufklärung der Protein-Protein Interaktionen von EMP3, um auf diese Weise Rückschlüsse auf die Funktion und die Signalwege, in die das Protein involviert ist, zu erhalten. Dazu werden zunächst mit einem Screeningverfahren potentielle Interaktoren identifiziert, die dann in einem zweiten Schritt durch drei unabhängige Methoden validiert werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollten Rückschlüsse auf die biologische Funktion von EMP3 und seine Rolle in der Entstehung und Progression von Gliomen und anderen Neoplasien ermöglichen und die Validität von EMP3 als prognostischer/prädiktiver Biomarker oder sogar als mögliches therapeutisches Target klären.

2 Material & Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Puffer und Stammlösungen

Eine tabellarische Übersicht der verwendeten Puffer und Stammlösungen befindet sich im Anhang, Abschnitt 7.1 , Seite 168.

2.1.2 Primer

Eine tabellarische Übersicht der verwendeten Primer befindet sich im Anhang, Abschnitt 7.2 , Seite 170.

2.1.3 Medien

LB-Medium (1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 86 mM Natriumchlorid)

LB-Medium wurde angesetzt, indem 20g LB-Pulver (Sigma-Aldrich) in 1L ddH₂O gelöst wurden, die Lösung wurde 20 min bei 121°C autoklaviert und dann bei 4°C gelagert. Die entsprechenden Antibiotika wurden kurz vor Gebrauch aus einer 1000x Stammlösung zu einer Endkonzentration von 10 µg/ml hinzugefügt.

Für die LB-Platten wurden ebenfalls 20g LB-Pulver in 1L Wasser gelöst und 15g Agar-Agar hinzugefügt, die Lösung wurde autoklaviert und auf einem Magnetrührer langsam abgekühlt. Bei Erreichen von etwa 40°C wurden die entsprechenden Antibiotika aus der 1000x Stammlösung hinzugefügt (Endkonzentration 10 µg/ml). Der LB-Agar wurde anschließend in 10cm Schalen gegossen und bis zur vollständigen Aushärtung zum Abkühlen stehen gelassen.

Die fertigen Platten wurden bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

SOC-Medium (2% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM Natriumchlorid, 2,5 mM Kaliumchlorid, 10 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Magnesiumsulfat, 20 mM Glukose),

bezogen von Invitrogen.

Synthetic Drop-Out (SD) Medium

25ml 20x SD-Stammlösung

5ml 100x Aminosäure-Stammlösung

1ml 1% Adenin-Stammlösung

(5ml 100x Tryptophan-Stammlösung) [W]

(2ml 1% Uracil-Stammlösung) [U]

(0,5ml 1000x Kupfersulfat-Stammlösung) [Cu]

aufgefüllt mit ddH₂O auf 475 ml und autoklaviert. Danach wurden 25ml 40% Glucose-Lösung zugegeben. Für die SD-Platten wurden 10g Agar-Agar vor dem Autoklavieren hinzugefügt.

FOA-Medium

Zusammensetzung siehe SD-Medium

+25 ml 40% Glucose-Lösung

ddH₂O auf 250 ml

+0,5 g 5-FOA

vorsichtig auf 50°C erwärmt, mit geschmolzenem Agar-Agar (ebenfalls ~50°C) vermischt und in Platten gegossen.

YPAD-Medium (1% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Pepton, 2% w/v Glukose, 0,01% (w/v) Adenin Hemisulfat)

Die Komponenten des Mediums wurden als Pulver abgewogen, in 1L ddH₂O gelöst und autoklaviert. Für YPAD-Platten wurden 10g Agar-Agar vor dem Autoklavieren hinzugefügt.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), High Glucose, GlutaMAX, bezogen von Invitrogen.

Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM), bezogen von ATCC/LGC Standards.

2.1.4 Vektoren

- **pMet**; bait-Vektor für das Split-Ubiquitin System; Gateway® Expressions-Vektor; Resistenz: Ampicillin, (Chloramphenicol)
- **Nul**; prey-Vektor mit N-terminaler Ubiquitin Fusion für das Split-Ubiquitin System; Gateway® Expressions-Vektor; Resistenz: Ampicillin, (Chloramphenicol)
- **CKZ**; prey-Vektor mit C-terminaler Ubiquitin Fusion für das Split-Ubiquitin System; Gateway® Expressions-Vektor; Resistenz: Ampicillin, (Chloramphenicol)
- **pDONOR201** (Invitrogen); Gateway® Donor-Vektor; Resistenzen: Kanamycin, (Chloramphenicol)
- **pDEST26** (Invitrogen); Gateway® Expressions-Vektor; Resistenzen: Ampicillin, Geneticin, (Chloramphenicol)
- **pMYC-C**; modifizierter pDEST26 mit C-terminalem Myc-Tag; Gateway® Expressions-Vektor; Resistenzen: Ampicillin, Geneticin, (Chloramphenicol)
- **pFLAG-C**; modifizierter pDEST26 mit C-terminalem FLAG-Tag; Gateway® Expressions-Vektor; Resistenzen: Ampicillin, Puromycin, (Chloramphenicol)
- **pFLAG-N**; modifizierter pDEST26 mit N-terminalem FLAG-Tag; Gateway® Expressions-Vektor; Resistenzen: Ampicillin, Puromycin, (Chloramphenicol)
- **pGFP-V-RS** (OriGene); shRNA Expressions-Vektor mit GFP Reporter gen unter einem separaten Promoter; Resistenzen: Kanamycin, Puromycin
- **pSpRFP-KN151**; modifizierter Gateway-fähiger Vektor basierend auf pbJun-KN151 [77]; BiFC Gateway® Expressions-Vektor; Resistenzen: Ampicillin, Puromycin
- **pSpRFP-LC151**; modifizierter Gateway-fähiger Vektor basierend auf pbFos-LC151 [77]; BiFC Gateway® Expressions-Vektor; Resistenzen: Ampicillin, Geneticin

2.1.5 Bakterienstämme

***E.coli* TOP10**: *hsdR*, *mcrA*, *lacZΔM15*, *endA1*, *recA1*; Dieser *Escherichia coli* Stamm wurde standardmäßig für die Transformation mit dem Gateway-System neu erstellter Vektoren (BP-/LR-Reaktion) benutzt. Die Bakterien wurden ready-to-use, chemisch kompetent von der Firma Life Technologies bezogen (One-Shot®-TOP10).

***E.coli* DB3.1:** Dieser Stamm wurde für die Transformation von Gateway-Vektoren ohne Insert verwendet, da die Bakterien resistent gegen das Produkt des *ccdB*-Selbstmordoperons sind.

***E.coli* DH5 α :** Dieser Stamm wurde aufgrund geringerer Transformationseffizienz aber auch geringeren Kosten im Vergleich zu den TOP10 vor allem für Re-Transformationen bereits bestehender Vektoren verwendet.

2.1.6 Zelllinien

C32: humane Melanomzelllinie, adhärent, bezogen von ATCC.

HT-1080: humane Chondrosarkomzelllinie, adhärent, enthält eine IDH1 R132C Mutation und ein aktiviertes N-Ras Onkogen, bezogen von ATCC.

LN319: humane Glioblastomzelllinie, adhärent, enthält eine p53 Mutation, bezogen von ATCC.

HEK293: humane embryonale Nierenzelllinie, adhärent, bezogen von ATCC.

HEK293T: humane embryonale Nierenzelllinie, adhärent, bezogen von ATCC.

LN229: humane Glioblastomzelllinie, adhärent, bezogen von ATCC.

U87 MG: humane Glioblastomzelllinie, adhärent, bezogen von ATCC.

2.1.7 FFPE Gewebematerial für die IHC

5 Normalgewebe TMAs: bezogen von der Tumor- und Gewebebank des NCT Heidelberg.

1 Low-grade glioma TMA: Neuropathologie Heidelberg.

1 pGBM TMA: Neuropathologie Heidelberg.

34 pGBM: Material bezogen von Dr. M.Weiler (Universitätsklinikum Heidelberg und KKE Neuroonkologie, DKFZ Heidelberg). Das Material stammt aus der UKT05 Studie, für nähere Angaben siehe [33, 78].

4 OII: Neuropathologie Heidelberg.

3 sGMB: Neuropathologie Heidelberg.

3 Melanom-ZNS-Metastasen: Neuropathologie Heidelberg.

2.2 Klonierung und Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Sofern nicht anders angegeben, wurden die PCRs mit der KOD HotStart DNA Polymerase (Novagen/EMD Millipore) durchgeführt. Der PCR Ansatz enthielt dabei 5 µl 10x KOD-Polymerase-Puffer, 1,5 mM MgSO₄, je 0,2 mM von jedem dNTP, je 0,3 µM Sense- und Antisense-Primer, 50-100 ng Template-DNA, sowie 0,02 U/µl KOD Polymerase und wurde mit ddH₂O auf 50 µl Gesamtvolumen gebracht. Das PCR-Zyklus-Programm wurde in einem TProfessional Basic Thermocycler (Biometra) ausgeführt und bestand aus einem Aktivierungsschritt bei 95°C für 2 min, gefolgt von 25 Zyklen mit jeweils Denaturierung bei 95°C für 20s, Annealing bei T_M der Primer für 10s und Elongation bei 72°C für 10-20s/kb (abhängig von der Länge des Amplikons). Die PCR Produkte wurden anschließend per Gelelektrophorese überprüft.

2.2.2 Gelelektrophorese

Sämtliche PCR-Produkte und Restriktionsverdauungen wurden mittels Gelelektrophorese überprüft. Sofern nicht anders angegeben, geschah dies über ein 1,5%iges Agarose-Gel (Sigma-Aldrich) mit 1:10000 Gel-Red (Biotium). Dabei wurden 5 µl des jeweiligen Reaktionsansatzes mit 1 µl Orange Ladepuffer (6x) vermischt, aufgetragen und bei 180 V und 300 mA für 40 Minuten aufgetrennt und unter UV-Licht visuell überprüft. Als Größenmarker wurde zusätzlich eine FastRuler LowRange und Middle Range DNA-Leiter (Fermentas/Thermo Scientific) mit aufgetragen.

2.2.3 BP-Reaktion

Die gewünschten Inserts wurden mit den jeweiligen spezifischen Primern (siehe Anhang) mit dem oben angegebenen PCR-Protokoll amplifiziert. Als Template diente dabei cDNA aus humanen Zellen.

Mit den resultierenden PCR-Produkten als Template, wurde dann eine weitere PCR mit den P26 und P27 Primern durchgeführt. Bei positiver visueller Bestätigung der passenden

PCR-Produkte per Gelelektrophorese, wurden diese in eine BP-Reaktion eingesetzt. Dabei wurde ein Reaktionsansatz aus 3 µl PCR-Produkt, 1 µl BP-Clonase, 150 ng pDONOR201 und ddH₂O auf 10 µl zusammengestellt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde pro Ansatz 0,5 µl Proteinase K zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde dann in chemokompetente *E.coli* TOP10 (Life Technologies) transformiert und auf LB Kanamycin Platten ausgestrichen. Die aus der BP-Reaktion resultierenden DONOR-Vektoren wurden per Test-Restriktionsverdau und Sequenzierung auf die Korrektheit des jeweiligen Inserts überprüft. Auf diese Weise wurden EMP3, sowie jeder der potentiellen Interaktoren in 2 Varianten, einmal mit und einmal ohne Stop-Codon, in jeweils einen Donor-Vektor kloniert.

2.2.4 LR-Reaktion

Der Ansatz für die LR-Reaktion bestand aus 150 ng des jeweiligen Donor-Vektors, 200 ng des Destination-Vektors, 1 µl LR-Clonase II und ddH₂O auf 5 µl Gesamtvolumen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Daran anschließend wurden 0,5 µl Proteinase K zugegeben, für 30 min bei 37°C inkubiert und dann der gesamte Ansatz in *E.coli* TOP10 transformiert und auf LB Ampicillin Platten ausgestrichen.

2.2.5 Transformation und Plasmid-DNA-Extraktion

Die gewünschte Menge Vektoransatz wurde in 50 µl chemokompetente *E.coli* TOP10 gegeben und 1h auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 2 Minuten, gefolgt von einer kurzen Abkühlphase auf Eis. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurde der Ansatz für 1h bei 37°C inkubiert. Etwa 100 – 400 µl des Transformationsansatzes wurden dann auf LB Platten mit einem dem Vektor entsprechenden Selektionsmedium ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden pro Platte 2-3 Einzelkolonien gepickt, in 4 ml LB Medium + Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Aus der Bakteriensuspension wurde dann, mittels eines Plasmid Miniprep Extraction Kits (Macherey-Nagel), entsprechend der Herstellerangaben, die Plasmid-DNA extrahiert. Die Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA erfolgte an einem NanoDrop 1000 (PeqLab).

2.2.6 Restriktionsverdau

Der Ansatz für einen Restriktionsverdau bestand, sofern nicht anders angegeben, aus 200 ng DNA, 1 µl (10 U) Restriktionsenzym, 2 µl 10x Restriktions-Puffer Tango und 15 µl ddH₂O. Der Ansatz wurde 1h bei 37°C inkubiert und dann zur visuellen Überprüfung auf ein Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Überprüfung der Gateway-Klonierung wurde das Enzym Bsp1407I verwendet, für die Überprüfung der Hefe Kolonie-PCR HpaII. Alle Restriktionsendonukleasen wurden von Fermentas/Thermo Scientific bezogen.

2.2.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung nach Sanger wurde extern von der Firma GATC Biotech durchgeführt. Dabei wurden die GATC Standardprimer pDONOR-FP und pDONOR-RP für die Sequenzierung der pDONOR201 Vektoren und CMV-F und T7 für die pDEST26 Vektoren verwendet. Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse erfolgte mit der VectorNTI Software von Invitrogen/Life Technologies.

2.2.8 Site-Directed-Mutagenesis / Erstellen der EMP3 Varianten

Mittels Site-Directed-Mutagenesis (SDM) wurden, ausgehend von wildtyp EMP3, verschiedene EMP3 Varianten erstellt. Die SDM basiert dabei auf einer PCR-Amplifikation des EMP3-tragenden Donor-Vektors mit spezifischen Primern, welche entweder überlappen und in der Mitte ein Nukleotid enthalten, welches in der Template-Sequenz nicht vorhanden ist, oder so binden, dass sie einen Teil der Template-Sequenz aussparen, der dann nicht mit amplifiziert wird. Auf diese Weise wurden folgende EMP3-Konstrukte erstellt:

EMP3^{N47A}: Bei diesem Konstrukt wurde das Codon an der Position 139 - 141 von AAC zu GCC verändert, wodurch in der Aminosäuresequenz das Asparagin an Position 47 durch Alanin ausgetauscht wird. Durch diesen Austausch wurde das erste N-glykosidische Bindungsmotiv (-Asn-Asp-Thr-) funktionsunfähig gemacht.

EMP3^{N56A}: Bei diesem Konstrukt wurde das Codon an der Position 166 - 168 von AAT zu GCT verändert, wodurch in der Aminosäuresequenz das Asparagin an Position 56 durch Alanin ausgetauscht wird. Durch diesen Austausch wurde das zweite N-glykosidische Bindungsmotiv (-Asn-Val-Ser-) funktionsunfähig gemacht.

EMP3^{N47/56A}: Bei diesem Konstrukt sind beide N-Glykosylierungstellen verändert.

EMP3^{Δ91-163}: C-terminal trunkeerte Variante von EMP3, bei der die Aminosäuren 91 – 163 fehlen. Das verbleibende Segment des Proteins umfasst die vorderen beiden Transmembrandomänen und die erste extrazelluläre Loop.

EMP3^{Δ1-90}: N-terminal trunkeerte Variante von EMP3, bei der die Aminosäuren 1 – 90 fehlen. Das verbleibende Segment des Proteins umfasst die hinteren beiden Transmembrandomänen und die zweite extrazelluläre Loop.

2.3 Methylierungsanalyse

2.3.1 DNA Extraktion & Bisulfitbehandlung

Die FFPE Präparate wurden zunächst lichtmikroskopisch mit einer HE Färbung auf ihren Tumorzellgehalt hin untersucht. Für alle Proben wurde ein Tumorzellgehalt von mindestens 80% angestrebt. Wenn nötig wurden nur Teile des Präparates für die DNA Extraktion verwendet, um einen ausreichenden Tumorgehalt zu garantieren. Die Extraktion erfolgte mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) nach den Instruktionen des Herstellers, die DNA Konzentration wurde am NanoDrop 1000 (PeqLab) bestimmt.

Für die Bisulfitbehandlung wurden 500 ng der extrahierten DNA mit dem EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen) nach den Vorgaben des Herstellers behandelt.

2.3.2 Pyrosequencing (PSQ)

Die Pyrosequencing Arbeitsschritte für die Bestimmung des *MGMT* Promoter-Methylierungsstatus ist unter [78] detailliert beschrieben. Für die Bestimmung des *EMP3* Promoter-Methylierungsstatus wurde wie folgt vorgegangen:

Für die Methylierungsbestimmung von *EMP3* wurden zwei Sets von Primern verwendet,

die jeweils 3 CpGs umspannen und von denen jeweils einer der Primer über ein Biotin-Label verfügte. Der PCR Ansatz enthielt 20 µl HotStar Taq-Polymerase-Mix (Qiagen), je 1 µl (10 pmol) Sense- und Antisense-Primer, 10 µl bisulfitbehandelte Template-DNA, sowie 8 µl ddH₂O. Das PCR-Programm bestand aus einem Aktivierungsschritt bei 95°C für 15 min, gefolgt von 35 Zyklen mit jeweils Denaturierung bei 95°C für 30s, Annealing bei T_M der Primer für 30s und Elongation bei 72°C für 30s. Abschließend folgte ein finaler Elongationschritt bei 72°C für 10 min. Die PCR Produkte wurden per Gelelektrophorese überprüft und 30 µl des PCR Ansatzes anschließend für das Pyrosequencing-Verfahren vorbereitet. Dazu wurde die Biotin-gelabelte DNA mit Streptavidin-Sepharose Beads gemischt, die Stränge durch Erhitzen aufgetrennt und die Streptavidin-Beads mit den gebundenen Biotin-Strängen mit dem Vacuum-Prep Tool (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers gewaschen und in 40 µl 0,4 µM Sequenzierungsprimer-Lösung überführt. Anschließend folgte ein Annealing-Schritt mit 80°C für 60s und Abkühlen bei Raumtemperatur. Für die PSQ-Reaktion wurden die PyroMark Gold Reagenzien (Qiagen) verwendet. Die Ergebnisse wurden mit der PSQ PyroMark Software ausgewertet. Als Kontrollen wurden CpGenome Universal Methylated DNA (Positivkontrolle) und CpGenome Universal Unmethylated DNA (Negativkontrolle) verwendet. Alle Proben und Kontrollen wurden als Triplikate gemessen.

2.3.3 Methylierungsspezifische PCR (MSP) & Methylierungsspezifische Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MS-MLPA)

Diese beiden Methoden wurden parallel zum Pyrosequencing für die Methylierungsanalyse von *MGMT* eingesetzt. Die jeweiligen Arbeitsschritte sind unter [78] beschrieben.

2.4 Zellkultur

Die Zelllinien wurden in DMEM (HT-1080, HEK293, LN319, LN229, U87) oder EMEM (C32) mit 10% FKS, 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin in einem Inkubator bei 37°C unter 5% CO₂ Atmosphäre gehalten. Die Zellen wurden in T-75 Flaschen

ausgesät und in regelmäßigen Abständen mindestens einmal wöchentlich gesplittet, außerdem wurde einmal pro Woche zusätzlich ein Medienwechsel durchgeführt. Beim Splitten wurde zunächst das alte Medium abgenommen, anschließend 1x mit 5 ml DPBS gewaschen und 2,5 ml TrypLE Select (Life Technologies) zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation wurde die Reaktion mit 5 ml frischen Vollmedium abgestoppt, die Zellen durch auf- und abpipettieren gleichmäßig suspendiert und dann 1 ml der Zellsuspension in eine frische T-75 Flasche mit 9 ml frischem Vollmedium gegeben. Das Splitten von 6-well Platten erfolgte nach dem gleichen Schema, allerdings wurde nur 1/5 der oben angegebenen Mengen pro Well eingesetzt.

Zur Selektion der humanen Zellen wurden Puromycin und Geneticin eingesetzt. Puromycin wurde in einer Endkonzentration von 1 µg/ml dem Medium zugesetzt, während Geneticin in einer Endkonzentration von 2 mg/ml eingesetzt wurde.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen TrypLE Select für 5 min bei RT abgelöst, danach wurde die Reaktion mit Zugabe von frischem Vollmedium abgestoppt und 1 ml der Zellsuspension in ein separates Gefäß überführt. 100 µl der Zellsuspension wurden in 900 µl PBS aufgenommen, durchmischt und mit einem Scepter Cell-Counter (Millipore) die Zellzahl bestimmt.

2.4.1 Transfektion

Transfiziert wurden C32, U87, HEK293(T), LN319 und HT-1080 Zellen. Die Zellen wurden in 6-well Platten ausgesät, mit je 200.000 Zellen pro Well und 24h bei 37°C im Inkubator wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurden 2 µg des einzubringenden Vektors in 95 µl DMEM ohne FKS und Pen/Strep verdünnt, danach erfolgte die Zugabe von 3 µl FuGene HD Transfektionsreagenz (Promega). Der Reaktionsansatz wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann tropfenweise in das jeweilige Well der Platte zugegeben. Bei Doppeltransfektionen wurde der gleiche Ansatz verwendet, jedoch jeweils 1 µg von jedem Vektor eingesetzt (Gesamtmenge 2 µg). Nach Zugabe des Transfektionsansatzes zu den Zellen wurden diese für weitere 24 - 48h inkubiert und danach die Zellen entweder geerntet und lysiert oder unter Selektionsdruck gesetzt indem das Vollmedium durch Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum entsprechend der Resistenzkassette des Vektors ersetzt wurde. Während der Selektionsphase von 7 - 14

Tagen wurde das Selektionsmedium jeweils alle 2 - 3 Tage durch frisches Selektionsmedium ersetzt. Nach Stabilisierung der resistenten Zellpopulation wurden diese normal gesplittet und weiterhin unter Selektionsdruck gehalten.

Bei Transfektion mit dem Amaxa Nucleofection System mit dem Nucleofector II wurden die Zellen wie oben beschrieben abgelöst und in frisches Medium aufgenommen, mit dem Scepter Cell Counter ausgezählt und 2 Millionen Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 min bei 500 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 100 µl Nucleofector Solution T resuspendiert. Nach Zugabe von 2 µg DNA (bei Doppeltransfektionen wurde auch hier die Gesamtmenge an DNA konstant gehalten und auf die Vektoren aufgeteilt) wurde die Suspension in eine Küvette überführt und im Nucleofector System behandelt. Die Zellen wurden dann in einer 10 cm Schale mit vortemperiertem Medium (37°C) ausgebracht. Die Selektion der Zellen wurde durchgeführt wie oben beschrieben.

2.4.2 Einbetten von Zellen in Paraffin

C32 und HEK293T Zellen wurden in 10 cm Schalen bis zur Konfluenz angezogen. Das Medium wurde entfernt, die Zellen 1x mit PBS gewaschen und anschließend mit 10 ml 4% Formalin/PBS in der Schale für 20 Minuten unter leichtem Schütteln fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen vorsichtig abgeschabt, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und 10 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem Rest des Überstandes aufgelockert und auf Eis zwischengelagert.

Im nächsten Schritt wurde 2% Low Melting Agarose (Sigma-Aldrich) in PBS aufgeköcht und bei 37°C in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß langsam abgekühlt, so dass die Agarose sich nicht wieder verfestigte.

Anschließend wurden 100 – 200 µl der flüssigen Agarose auf das Zellpellet gegeben (je nach Größe des Pellets), vorsichtig gemischt und auf Eis gestellt.

Das verfestigte Agarose-Zell-Pellet wurde in eine Einbettkassette gegeben, erst 45 Minuten und dann nochmals für 2h mit 4% Formalin/PBS behandelt und durch eine aufsteigende Ethanolreihe geschleust (2x 45min, 4x 1h), mit Xylol behandelt (2x 30min, 1x 1h) und schließlich in Paraffin eingebettet.

Von den eingebetteten Zellpellets wurden Schnitte im Mikrotom angefertigt und jeweils ein

Schnitt von jedem der beiden Zellpeletts auf einen Objektträger aufgebracht und für die spätere Verwendung gelagert.

2.5 Erstellung eines monoklonalen Anti-EMP3 Antikörpers

Die Herstellung des Antikörpers erfolgte nach etablierten Protokollen [79, 80] in Kooperation mit der "Monoclonal Antibody Unit" des DKFZ Heidelberg.

Für die Immunisierung wurde ein 134 bp großes Fragment, das den Nukleotiden 61 – 195 der EMP3 Nukleotidsequenz entspricht, in den pQCH6 Vektor kloniert (pQe8, Qiagen). Dieser Abschnitt der Sequenz entspricht den Aminosäurepositionen 21 bis 65 (VATLDKSWWTLPKGESLNLWYDCTWNNDTKTWACSNVSENGWLKA) des EMP3 Proteins. Das His-Tag-Fusionspeptid wurde in *E.coli* M15 Bakterien expremiert, mit 8M Urea denaturiert und über Ni-NTA Säulen (Qiagen) aufgereinigt. Das aufgereinigte Peptid wurde weiblichen, 6 Wochen alten BALB/C Mäusen nach folgendem Schema gespritzt:

Tag 1: 20 µg Fusionspeptid + 50% Freund Adjuvant komplett

Tag 6: 20 µg Fusionspeptid + 50% Freund Adjuvant inkomplett

Tag 24: 20 µg Fusionspeptid

Tag 25: Serumtest im Westernblot (weiteres Vorgehen nur mit positiv getesteten Mäusen)

Tag 39: 20 µg Fusionspeptid

Tag 42: Fusion

Am Tag 25 wurde den Mäusen Blut abgenommen und das Serum im Westernblot gegen Lysat aus EMP3-Myc überexpremierenden LN319 Zellen und aus untransfizierten C32 Zellen getestet. Die positiv getesteten Mäuse wurden weiter gehalten. Am Tag 42 wurden die Mäuse getötet, B-Zellen extrahiert und mit Myelomzellen fusioniert. Die Hybridomzellen wurden angezogen und subkloniert. Anschließend wurden insgesamt 306 Klone im ELISA gegen das Fusionspeptid getestet. Positive Klone wurden zunächst im 96-well Format in der Immunfluoreszenz auf EMP3-Myc überexpremierenden Zellen getestet. Dort erfolgreich getestete Klone wurden im Anschluß im Westernblot an EMP3-Myc ÜE LN319 Zelllysaten überprüft und mit einem Anti-Myc-Antikörper abgeglichen. Der Klon mit der besten Sensitivität und Spezifität, Klon 158, wurde schließlich in anderen Anwendungen wie IHC und IP getestet.

2.6 Proteinanalyse

2.6.1 Lysate

Zelllysate für Western Blotting wurden hergestellt, indem die gewünschten Zellen in 10 cm Schalen oder 6-well Platten ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz inkubiert wurden. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen 1x mit eiskaltem PBS gewaschen. Danach wurde jeweils 1 ml gekühltes PBS auf die Zellen gegeben und diese entweder abgeschabt oder durch wiederholtes auf- und abpipettieren des PBS mit einer Pipette abgespült. Die Zellsuspension wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße auf Eis gegeben und bei 2.000 rpm für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das PBS abgenommen und das ~20fache Volumen des Zellpellets an Zelllysepuffer (mit Protease-Inhibitor) zugegeben und durch intensives Vortexen das Zellpellet aufgelöst und die Zellen lysiert. Danach wurden die Lysate für 10-15 min auf Eis inkubiert und dann bei 11.000 rpm für 3 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und gegebenenfalls für die weitere Verwendung bei -80 °C eingefroren.

2.6.2 BCA Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in den hergestellten Proteinlysaten wurde eine BCA Proteinbestimmung durchgeführt. Zunächst wurden die Lysate 1:50 – 1:20 in ddH₂O verdünnt und die BCA Lösung angesetzt aus 50 Teilen BCA Reagenz A und 1 Teil BCA Reagenz B (Pierce/Thermo Scientific). Für die Standardkurve wurden BSA-Lösungen mit folgenden Konzentrationen vorbereitet: 1,5 µg/µl, 1,0 µg/µl, 0,75 µg/µl, 0,5 µg/µl, 0,25 µg/µl, 0,1 µg/µl, 0,05 µg/µl, 0 µg/µl.

Je 25 µl der Proben, sowie der Standardkurven-Verdünnungen, wurden jeweils 3-fach in eine 96-Well-Platte pipettiert und mit 200 µl der BCA Lösung pro Well gemischt. Nach Inkubation bei 37 °C für 30 min im Wärmeschrank (lichtgeschützt), wurde die OD bei 562 nm im Photometer bestimmt und anhand der Standardkurve die Proteinkonzentrationen der Proben berechnet.

2.6.3 SDS-PAGE & Western Blotting

Die benötigte Menge an Proteinlysate, üblicherweise 10-20 µg Gesamtprotein pro Gel-Tasche, wurde mit Zellysepuffer auf 13 µl aufgefüllt und jeweils mit 2 µl Reducing Agent (10x) (Invitrogen/Life Technologies) und 5 µl NuPage Puffer (4x) (Invitrogen/Life Technologies) vermischt und bei 95°C für 5 Minuten aufgekocht, anschließend kurz auf Eis gestellt und dann in die Gel-Taschen geladen. Als Größenmarkierung wurde bei jedem Gel eine Tasche mit Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas/Thermo Scientific) Größenstandard geladen. Als Gele wurden vorgefertigte Novex® 4-12% Gradienten Bis-Tris Gele von Invitrogen/Life Technologies verwendet. Als Laufpuffer wurde MOPS-SDS-Puffer (Invitrogen/Life Technologies) verwendet. Die Laufzeit betrug 55 Minuten bei 200 V und 100 mA pro Gel.

Unmittelbar anschließend an die SDS-PAGE wurden die Gele auf eine 0,2 µm Nitrozellulosemembran, zwischen mit Transferpuffer getränkten Filterpapieren, platziert. Das Semi-Dry-Blotting erfolgte für 60 Minuten bei 30 V und 100 mA pro Gel. Die Membran wurde anschließend mit einer 5%igen Ponceau S Lösung (AppliChem) für 5 Minuten gefärbt, um die korrekte Auftrennung der Proteinbanden zu überprüfen. Nach der Entfärbung mit Wasser, wurde die Membran mit 5% Magermilchpulver in TBS-T für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler blockiert. Nach der Blockierung erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper (Verdünnung in 5% Milch/TBS-T) in einem 50 ml Falcon Reaktionsgefäß über Nacht bei 4 °C auf einem Rollmischer. Am nächsten Tag wurde die Membran 3x 10 Minuten in TBS-T gewaschen und dann mit dem Sekundärantikörper (Verdünnung 1:4000 für Anti-Maus und Anti-Kaninchen; 1:10000 für Anti-Ratte in 5% Milch/TBS-T) für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Rollmischer inkubiert. Nach 3 weiteren Waschschritten mit TBS-T für je 10 Minuten, wurde die Membran für 1 Minute mit LumiGlo Reagenz behandelt (KPL) und die Exposition mit einem Film (Fujifilm) durchgeführt, der anschließend sofort entwickelt wurde.

2.6.4 Verdau mit Peptide N-Glycosidase F (PNGase F)

Der Verdau wurde mit Lysat aus EMP3-überexprimierenden LN319 Zellen (transfiziert mit pMYC-C/EMP3) durchgeführt. Das Volumen an eingesetztem Lysat entsprach dabei ~50 µg Gesamtprotein. Zu dem Lysat wurden 1,5 µl 10x "Glycoprotein Denaturing Buffer" gegeben und der Ansatz mit ddH₂O auf 15 µl Gesamtvolumen gebracht. Nach dem Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 100 °C für 10 min und einer kurzen Abkühlphase, wurden 2 µl 10x "G7 Reaction Buffer", 2 µl 10% NP-40 und 1 µl (500 U) PNGase F zugegeben (alle Reagenzien von New England Biolabs). Abschließend wurde der Ansatz bei 37 °C für 1h inkubiert und danach im Westernblot überprüft (siehe SDS-Page & Westernblot).

2.6.5 Immunhistochemie

Von den zu untersuchenden FFPE Präparaten wurden am Mikrotom Schnitte von 1 – 4 µm Dicke angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die Immunfärbung erfolgte mit dem Anti-EMP3 K158 Antikörper an einem Ventana BenchMark XT Immunostainer (Ventana Medical Systems/Roche). Die automatisierte Färbeprozedur umfasste eine Vorbehandlung mit Cell Conditioner 1 (pH 8) für 60 min, gefolgt von der Inkubation mit unverdünntem Anti-EMP3 K158 Hybridomüberstand bei 37°C für 32 min. Auf die Antikörperbehandlung folgte die Signalamplifikation mit dem Ventana Amplifier Kit, Ultra-Wash und die Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 4 min und Bluing Reagent für 4 min. Die chromogene Reaktion wurde mit UltraView Universal DAB Detection Kit erzeugt. Alle aufgeführten Reagenzien für die IHC Prozedur wurden von Ventana bezogen.

2.6.6 Immunfluoreszenz

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf einem, mit 4 Kammern versehenen, Objektträger (LabTek 4-well Chamber-Slides (Nunc/Sigma-Aldrich)) ausgesät (~20.000 Zellen pro Kammer) und 24h inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium aus den Kammern entfernt und die Zellen 2x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem Methanol 30 min bei -20 °C fixiert. Danach wurde das Methanol entfernt, 1x

kurz mit PBS gewaschen und pro Kammer 400 µl 4% Formalin/PBS hinzugefügt. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Formalin entfernt und die Kammern erneut mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte die Blockierung durch Zugabe von 400 µl 5% FKS/PBS in jede Kammer und Inkubation bei Raumtemperatur für 2h. Nach der Blockierung wurde das FKS/PBS entfernt und der/die Primärantikörper zugegeben, als 1:20 – 1:100 Verdünnung in 200 µl 5% FKS/PBS. Nach weiteren 2h Inkubation bei Raumtemperatur, wurde die Antikörper-Lösung entfernt und die Kammern 3x sorgfältig mit PBS gewaschen. Als Sekundärantikörper wurden AlexaFluor 488 und AlexaFluor 568 konjugierte Anti-Maus bzw. Anti-Kaninchen Antikörper in einer 1:300 Verdünnung in 5% FKS/PBS verwendet. 200 µl der Sekundärantikörper-Verdünnung wurden in jede Kammer gegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Flüssigkeit entfernt und die Kammern wiederum 3x sorgfältig mit PBS und 1x mit H₂O gewaschen. Anschließend wurden vorsichtig die Kunststoff-Kammern von den darunter liegenden Objektträgern entfernt und diese dann mit DAPI VectaShield Hard (Vector Labs) eingedeckelt.

Bei einer Immunfluoreszenz in 96-well Platten wurden entsprechend weniger Zellen (~5.000 pro Well) und geringere Volumina eingesetzt (~1/4 der oben angegebenen Volumina) und der Schritt zum Eindeckeln entfiel.

Alternativ dazu wurde die Immunfluoreszenz an Schnitten von Paraffin-eingebetteten Zellen durchgeführt. Die Schnitte wurden in diesem Fall zum Entparaffinieren durch eine Alkoholreihe geschleust, dann 10 min mit Cell Conditioner C1 gekocht und 3x mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Blockierung und Antikörper-Behandlung wie oben beschrieben.

2.7 RNA-Interferenz (RNAi)

Für die RNAi Versuche wurden insgesamt 8 verschiedene pGFP-V-RS Vektoren verwendet. Sechs der Vektoren enthielten dabei EMP3-spezifische shRNA Kassetten (shE1 - shE6), ein Vektor enthielt eine unspezifische scrambled shRNA Kasette (shScr) und ein Vektor war ein Leervektor ohne shRNA Kasette (shLV). Die Vektoren wurden

mittels Amaxa Nucleofection in HT-1080 Zellen transfiziert und mit Puromycin selektiert. Die Zellen wurden während der Selektion, über mehrere Passagen hinweg, täglich im Fluoreszenzmikroskop überprüft. Durch das im pGFP-V-RS Vektor enthaltene GFP-Reportergen konnten erfolgreich und stabil transfizierte Zellen anhand des grünen Fluoreszenzsignals identifiziert werden. Die Zellen wurden etwa 3-4 Wochen nach der Transfektion dünn ausgesät und über mehrere Tage inkubiert. Per Mikroskop wurden jeweils 6-8 fluoreszierende Kolonien pro Vektor markiert, mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und zusammen in ein neues Kulturgefäß überführt. Nach 2-3 weiteren Passagen wurden die Zelllinien, bei denen mindestens 95-100% der Zellen ein stabiles und gleichmäßiges Fluoreszenzsignal aufwiesen, per Westernblot auf ihre EMP3 Expression hin überprüft.

2.7.1 Kristallviolett-Assay

Die stabil transfizierten EMP3-Knockdown Zelllinien (HT-1080(shE1-6), HT-1080(shScr) und HT-1080(shLV)) wurden abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Die Zellsuspension wurde dann auf 100 Zellen/ μ l mit Medium verdünnt und 100 μ l (10.000 Zellen) pro Well in 12-well Platten ausgesät. Jede shRNA Zelllinie wurde dabei in jeweils 3 Wells pro Platte in 5 Platten ausgebracht. Die Platten wurden bei 37 °C inkubiert und zu den Zeitpunkten 3h, 24h, 48h, 72h und 96h wurde jeweils eine Platte aus dem Inkubator entfernt, das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und über Nacht mit -20 °C kaltem Methanol fixiert.

Das Methanol zur Fixierung wurde abgenommen, die fixierten Zellen mit PBS gewaschen und pro Well 500 μ l 0,4%ige Kristallviolettlösung zugegeben. Die Platten wurden 30 Minuten bei RT geschüttelt und anschließend gründlich mit Leitungswasser gewaschen. Pro Well wurden 400 μ l Sörensen-Puffer zugegeben und die Platten 30 Min bei Raumtemperatur geschüttelt. Jeweils 100 μ l der gefärbten Pufferlösung wurden dann in eine 96-well Platte überführt. Die gleichen Arbeitsschritte wurden zusätzlich mit einer Blank-Platte (frische 12-well Platte ohne Zellen) durchgeführt.

Die Messung der Absorption bei 550 nm erfolgte in einem Fluostar Omega von BMG Labtech, die Auswertung wurde mit der MARS Software (BMG Labtech) und in Excel durchgeführt.

2.7.2 Zelltod-Bestimmung

In 12-well Platten wurden pro Well 50.000 Zellen der EMP3-Knockdown-Zelllinien HT-1080(shE5) und HT-1080(shLV) ausgesät (jeweils 3 Platten pro Zelllinie) und 24h bei 37°C im Inkubator belassen. Am nächsten Tag wurde nach dem unten stehenden Schema jeweils eine Platte jeder Zelllinie mit 4 verschiedenen, absteigenden Konzentrationen einer Substanz versehen, wobei immer je 3 Wells die gleiche Konzentration beinhalteten: TRAIL 100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml, 0 ng/ml; Staurosporin 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2,5 ng/ml, 0 ng/ml; H₂O₂ 800 µM, 400 µM, 200 µM, 0 µM. Die 12-well Platten wurden 24h inkubiert, anschließend wurde das Medium entfernt, 2x mit PBS gewaschen, die Zellen mit Methanol fixiert und die Zelldichte mittels Kristallviolett-Assay bestimmt (siehe oben).

2.7.3 Migration

Zur Bestimmung der Migration wurde ein "Wound-Healing-Assay" mit „ibidi cell culture inserts“ (ibidi GmbH) durchgeführt. Die Inserts bestanden aus zwei, durch eine 500µm dicke Silikonwand getrennten Kammern, wobei jeweils ein Insert pro Well in einer 24-well-Platte platziert wurde. In jede der beiden Kammern wurden 10.000 Zellen in 70µl Vollmedium ausgesät und über Nacht zum Anwachsen inkubiert. Jede Zelllinie wurde dabei in 3 Wells ausgesät. Am nächsten Tag, nach Erreichen der Konfluenz, wurde das Medium aus den Kammern entfernt und durch frisches Vollmedium mit 10 µg/ml Mitomycin C (MMC) (Sigma-Aldrich) ersetzt um die Zellproliferation zu inhibieren. Nach ~ 2 Stunden im Inkubator wurden die Inserts entfernt, die Zellen 2x mit PBS gewaschen und frisches Medium ohne MMC in die Wells gegeben. Anschließend wurden mit einem Mikroskop Bilder an einer markierten Stelle, des von der inneren Kammer-Trennwand erzeugten freien Areal, in jedem Well aufgenommen. Nach 12 Stunden wurde eine weitere Serie von Bildern aufgenommen. Die Bilder wurden mit der WimScratch Software von ibidi ausgewertet und für jedes Bild jeweils die zellbedeckte Fläche bestimmt.

2.8 Interaktionsanalyse

2.8.1 Yeast-Two-Hybrid Split-Ubiquitin Assay (Y2H-SU)

Als Screeningmethode wurde der Yeast-Two-Hybrid Split Ubiquitin Assay gewählt. Bei diesem System werden zwei Expressionsvektoren eingesetzt um die zu untersuchenden Proteine jeweils mit einer Hälfte von Ubiquitin zu fusionieren und als Hybridproteine zu exprimieren. An die C-terminale Hälfte des Ubiquitins ist zusätzlich ein Reporter mit einem Abbausignal angehängt. Interagieren die Proteine, können sich die beiden Ubiquitinhälften durch ihre Affinität zueinander zusammenlagern und ein vollständiges Ubiquitin rekonstituieren. Dieses wird von der zelleigenen Ubiquitinprotease (UBP) erkannt, der Reporter abgespalten und abgebaut. Das heißt, beim SU-System ist der Reporter aktiv, wenn keine Interaktion stattfindet und wird ausgeschaltet, wenn eine Interaktion vorliegt.

Hefe-Transformation

Zunächst wurden kompetente Hefe-Zellen hergestellt indem 50 ml YPAD-Flüssigmedium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 30°C auf einem Schüttler inkubiert wurden. Am folgenden Tag wurden 30 ml der Übernachtskultur mit 300 ml frischem YPAD-Medium versetzt und bei 30°C unter Schütteln ca. 1,5h bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8 inkubiert. Die Zellsuspension wurde bei 4°C mit 4500rpm 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in ddH₂O resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet dann in 2ml frischem Lithium-Acetat-Puffer resuspendiert und in 100 µl Aliquots aufgeteilt. Die kompetenten Zellen wurden entweder sofort weiterverwendet oder bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurden zu den 100 µl Zellsuspension 10 µl Carrier-DNA (ssDNA) und anschließend 600 µl frisch angesetzter Hefe-Transformationspuffer, sowie 1 µg Vektor-DNA zugegeben und gründlich gemischt. Die Suspension wurde für 30 Minuten bei 30°C inkubiert, dann wurden 70 µl DMSO hinzugegeben und unter Schütteln (~800 rpm) für 15 Minuten bei 42°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben für 3 Minuten auf Eis gestellt und dann kurz (~10 Sekunden) bei 4500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet vorsichtig in 100 µl TE-Puffer resuspendiert und auf Selektionsplatten (SD oder SD/+W) ausgestrichen. Die Platten wurden bei 30°C inkubiert bis Koloniewachstum sichtbar wurde (~2 Tage).

Hefe Growth-Assay

Der Growth-Assay wurde auf folgenden 120x120 mm Platten durchgeführt:

Kontrollplatten	(SD/+U)
SD-Platten mit Kupfersulfat	(SD/+Cu)
SD-Platten ohne Kupfersulfat	(SD)
FOA-Platten mit Uracil & Kupfersulfat	(FOA/+U/+Cu)
FOA-Platten mit Uracil ohne Kupfersulfat	(FOA/+U)

Die Platten wurden dabei durch eine Markierung horizontal in zwei Hälften aufgeteilt und diese jeweils von oben nach unten mit aufsteigenden Zellkonzentrationen beschriftet (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 Zellen/ml).

Die Verdünnungen der zu testenden Hefen wurde erstellt, indem jeweils eine möglichst frische Hefekolonie mit einer Impföse aufgenommen und in 1 ml ddH₂O überführt wurde. Die Hefezellen wurden gründlich resuspendiert, die Suspension wiederum 1:5 verdünnt und die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) im Photometer bestimmt. Anhand der Messung wurde dann der Verdünnungsfaktor für eine Zellsuspension mit $OD_{600} = 1$ berechnet (entspricht etwa 10^5 Zellen/ml). Jeweils 220 μ l der 10^5 Zellen/ml Suspensionen wurden dann in die oberste Reihe einer 96-well Platte pipettiert, während in die darunter liegenden 3 Reihen jeweils 180 μ l ddH₂O gegeben wurde. Mit einer Mehrkanalpipette wurden dann von jedem Well der ersten Reihe je 20 μ l der Suspension in die zweite Reihe übertragen, gut gemischt und dann wiederum 20 μ l von der zweiten in die dritte Reihe übertragen und so weiter. Durch diese Prozedur enthielten die 4 Reihen nun folgende Konzentrationen an Hefezellen: 1. Reihe: 10^5 , 2. Reihe: 10^4 , 3. Reihe: 10^3 , 4. Reihe: 10^2 Zellen/ml.

Beginnend mit der Reihe mit der niedrigsten Konzentration (Reihe 4) wurden nun mit der Mehrkanalpipette jeweils 3,75 μ l der Suspension abgenommen und auf die Platten gegeben. Die Platten wurden für etwa 10 Minuten stehen gelassen bis die Tröpfchen eingezogen waren, dann mit Parafilm versiegelt und bei 30°C für etwa 2 Tage (die FOA Platten unter Umständen 1-2 Tage länger) inkubiert. Danach erfolgte die visuelle Auswertung des Koloniewachstums auf den verschiedenen Platten.

Split-Ubiquitin Screening der cDNA Bibliothek

Die Transformation wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen auf FOA/+U/+Cu ausgestrichen und bei 30°C 14 Tage inkubiert. Alle 3 Tage wurden die neu gewachsenen Kolonien in SD/+U Medium übertragen und 2 Tage bei 30°C inkubiert. Zwanzig µl der Kultur wurden danach mit 20 µl 50% Glycerin gemischt und bei -80°C eingefroren. Ein Aliquot jeder Kolonie wurde außerdem auf SD/+U/+Cu Platten ausgebracht und bei 30°C inkubiert. Zur Lyse der Zellen wurde dann jeweils ein Teil einer möglichst jungen Kolonie gepickt, in 20 mM NaOH übertragen und gut durchmischt. Das Lysat wurde kurz bei ~1000 rpm zentrifugiert und der Überstand in die PCR eingesetzt. Der PCR Ansatz bestand dabei aus folgenden Komponenten: 5 µl Lysat, 1 µl (10 pmol) von jeden Primer (P73 pCup Kol und P74 CYC Kol), 5 µl Taq-Polymerase-Puffer, 1 µl dNTPs (10 mM), 1 µl Taq-Polymerase und 36 µl ddH₂O. Das PCR Programm umfasste einen Aktivierungsschritt bei 95°C für 5 min, sowie 30 Zyklen mit jeweils Denaturierung bei 95°C für 30 s, Annealing bei 60°C für 45 s und Elongation bei 72°C für 2 min.

Die PCR Produkte wurden anschließend mit dem 4-Cutter Restriktionsenzym HpaII verdaut. Der Ansatz umfasste dabei 10 µl PCR Produkt, 2 µl Restriktionspuffer, 0,2 µl HpaII und 7,8 µl ddH₂O und wurde bei 37°C für 1h inkubiert. Danach wurde der Restriktionsansatz auf ein 2% Agarose-Gel aufgetragen und das Bandenmuster der Proben verglichen. PCR Produkte mit gleichem Bandenmuster wurden als identisch angesehen und nur jeweils eines in die Sequenzierung gegeben. Die Sequenzierung erfolgte über die Firma GATC mit dem Primer P75 pCup Seq. Die Auswertung und Zuordnung der Sequenzen erfolgte über den BLAST-Algorithmus (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.8.2 Co-Immunopräzipitation (Co-IP)

Die Co-Immunopräzipitation ist eine weit verbreitete Methode zur Validierung von potentiellen Interaktionen. Der Assay beruht auf der Bindung des Proteinkomplexes aus einer Lösung an eine Matrix, zum Beispiel über einen an Sepharosepartikel gebundenen Antikörper gegen eines der beteiligten Proteine. Die Matrix wird intensiv gewaschen um alle Kontaminanten zu entfernen. Danach werden die Proteine aus der Matrix eluiert, auf einem Gel aufgetrennt und über einen Westernblot oder andere Analysemethoden

nachgewiesen. Bei der hier gewählten Co-IP Variante werden die zu untersuchenden Proteine in Zellen als Fusionsproteine mit FLAG- beziehungsweise Myc-Tags überexpressiert. Die Immobilisierung und die Detektion erfolgt dabei über diese Tags. Dieses System hat Vor- und Nachteile. Die Überexpression der Fusionsproteine bietet den Vorteil eines besseren Signal-zu-Hintergrund Verhältnisses und eliminiert das Problem der Abhängigkeit von spezifischen Antikörpern gegen die beteiligten Proteine. Dies ist kosteneffizienter und erhöht die Reproduzierbarkeit und Sensitivität, da die Qualität und Eignung der verfügbaren Antikörper gegen spezifische Proteine stark variieren kann. Zudem können die zu untersuchenden Proteine relativ problemlos im Vektor modifiziert werden, zum Beispiel um die Auswirkungen von Punktmutationen oder Trunkierungen auf Protein-Protein Interaktionen zu testen.

LN319 Zellen wurden per Doppeltransfektion mit einem pMYC-C/EMP3 Vektor und einem pFLAG-C Vektor mit jeweils einem der Interaktoren als Insert transfiziert und mit Puromycin/Geneticin Selektionsmedium selektiert. Zwei Passagen nach Stabilisierung der Zellpopulation wurden die Zellen in 10 cm Schalen überführt und nach Erreichen der Konfluenz geerntet und lysiert. Zum Pre-Clearing wurden jeweils 100 µl "Control-Resin" Suspension (Pierce/Thermo Scientific) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 2000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und 1 ml Lysat zugegeben. Die Suspension wurde für 1h bei 4°C in einem Rotationsmischer inkubiert, dann wieder bei 2000 rpm zentrifugiert und der Überstand zur weiteren Verwendung vorsichtig abpipettiert. Das Resin-Pellet wurde verworfen.

80 µl FLAG-Agarose Suspension (Sigma-Aldrich) oder Myc-Agarose Suspension wurden in ein Zentrifugationssäulchen („SpinColumn“) (Pierce/Thermo Scientific) gegeben, bei 2000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Das Resin wurde anschließend 2x mit 500 µl Zelllysepuffer gewaschen, jeweils zentrifugiert (2000 rpm) und der Durchfluss verworfen. Nach Zugabe von jeweils 500 µl des Zelllysats wurden die Säulen verschlossen und über Nacht bei 4°C in einem Rotationsmischer inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Verschluss von den Säulen entfernt und das Lysat bei 2000 rpm abzentrifugiert und gelagert. Das Resin wurde 4x mit 500 µl Zelllysepuffer gewaschen und jeweils bei 2000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Auf das Resin wurden dann 50 µl Elutionspuffer (Thermo Scientific) gegeben, 1 min bei RT inkubiert und dann

bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde dann nochmals auf das Resin gegeben und die zentrifugiert.

2.8.3 Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Assay

Der BiFC Assay basiert ähnlich wie das SU-System auf der Fusion der zu untersuchenden Proteine mit zwei Hälften eines Reporterproteins, in diesem Fall Red Fluorescent Protein (RFP) und ist damit ebenfalls ein „Two-Hybrid“ System. Ähnlich wie bei Ubiquitin haben die beiden RFP-Hälften eine Affinität zueinander, die bei räumlicher Annäherung bei Interaktion der Fusionsproteine, eine Rekonstitution zu einem funktionellen Protein erlaubt, welches dann über Fluoreszenzanregung in der lebenden Zelle nachgewiesen werden kann. Die mikroskopische Analyse des Signals erlaubt dabei nicht nur eine Aussage über eine Interaktion zwischen zwei Proteinen, sondern auch, wo diese Interaktion in der Zelle stattfindet. Ebenso ist es möglich die Interaktionen über einen bestimmten Zeitraum hinweg zu analysieren und Veränderungen, zum Beispiel nach Zugabe bestimmter Faktoren zum Zellkulturmedium, in lebenden Zellen zu beobachten. Eine Quantifizierung des Signals ist theoretisch ebenfalls möglich, allerdings ist der Aussagewert bedingt durch die artifizielle, ektopische Überexpression begrenzt. Von Zelle zu Zelle kann die Signalstärke der gleichen Interaktion durch verschiedene Faktoren, wie zum Beispiel Variationen in der Transfektionseffizienz, abweichen.

Für dem BiFC Assay wurden EMP3 und alle potentiellen Interaktoren in die pSpRFP-LC151 und pSpRFP-KN151 Vektoren kloniert. Anschließend wurden die Vektor-Kombinationen pSpRFP-KN151/EMP3 + pSpRFP-LC151/(Interaktor) und pSpRFP-LC151/EMP3 + pSpRFP-KN151/(Interaktor) in HT-1080 Zellen co-transfiziert. Dazu wurden 10.000 Zellen pro Well in 4-well Chamber-Slides ausgesät, über Nacht wachsen gelassen und am nächsten Tag mit FuGene eine Doppeltransfektion angesetzt (siehe oben). Nach 24h im Inkubator wurde aus den Chamber-Slides das Medium entfernt, 1x vorsichtig mit PBS gewaschen und die Zellen dann für 1h bei -20°C mit Methanol fixiert. Nach der Fixierung wurde das Methanol entfernt, die Kammern abgenommen und die Objektträger 3x mit PBS und 1x mit H₂O gewaschen und mit DAPI VectaShield (Vector Labs) eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

2.8.4 Duolink® in situ Proximity Ligation Assay (PLA)

Der PLA basiert auf der Verwendung von zwei spezifischen Primärantikörpern, die Epitope an den zu untersuchenden Proteinen binden und verschiedenen Spezies entstammen (z.B. Maus und Kaninchen). An diese Primärantikörper werden in einem zweiten Schritt spezies-spezifische Sekundärantikörper gebunden, an die jeweils ein kurzes DNA-Oligonukleotid gebunden ist. Interagieren die Proteine und kommen sich die an die Antikörper gebundenen ssDNA-Stränge dadurch räumlich nahe genug ($< 40\text{nm}$), können die beiden Stränge mit zwei weiteren hinzugefügten „Connector“-Oligonukleotiden hybridisiert werden. Diese bilden nach einer Ligation einen zirkulären DNA-Strang der anschließend durch eine „rolling-circle“ Amplifikation (RCA) mit einer Polymerase mehrere hundertmal repliziert wird. Durch die Hybridisierung von fluoreszenten Detektionssonden an die amplifizierte DNA wird am Ort der Interaktion ein punktuell fluoreszenzsignal erzeugt (Abb.3). Ein einzelner Punkt repräsentiert dabei ein Interaktionsereignis [81].

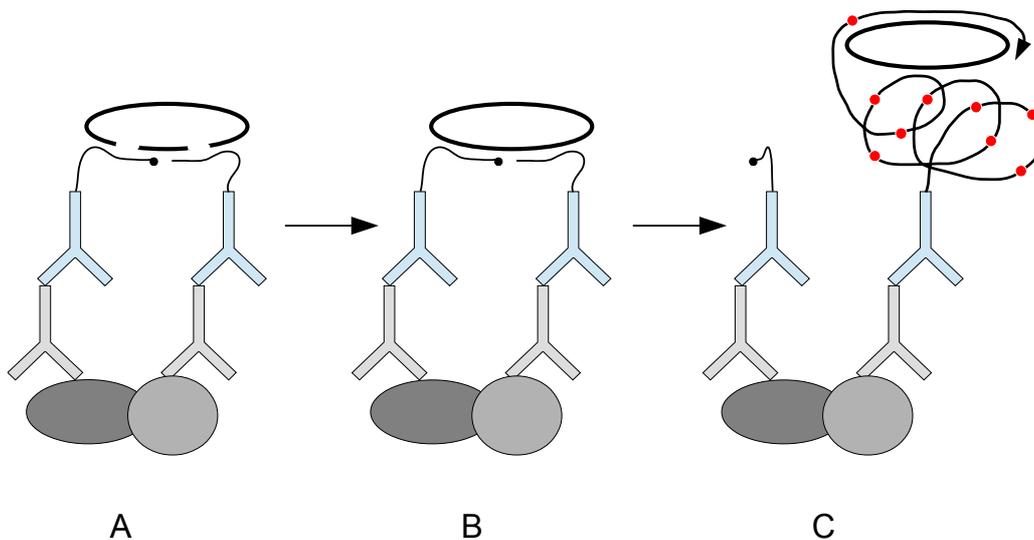


Abbildung 3: Funktionsprinzip des in situ Proximity Ligation Assays. A) Bindung der zirkularisierbaren DNA Oligos, B) Ligation, C) Rolling-Circle-Amplifikation und Detektion durch Bindung von fluoreszenten Sonden.

Der Proximity Ligation Assay zeichnet sich durch eine hohe potentielle Spezifität und Sensitivität aus. Da der Assay auf der Verwendung von Antikörpern beruht, benötigt er keine ektopische Überexpression der Interaktoren als Fusionsproteine und lässt sich im

Gegensatz zu den anderen bisher vorgestellten Methoden an FFPE Geweben und unmodifizierten Zellen anwenden. Dies spart die zeitlich aufwändige Vorbereitung der Vektoren und Zellen und umgeht die Probleme, die durch die Transfektion und die Überexpression auftreten können. Der Assay ist somit geeignet, direkt die endogenen Interaktionen der nativen Proteine in den Zellen nachzuweisen und ist dadurch weniger artifiziell als die anderen hier vorgestellten Systeme. Da jedes Signal ein Interaktionsereignis repräsentiert, kann der Assay potentiell genutzt werden, um die Anzahl der Signale zu quantifizieren und damit eine Aussage über die Häufigkeit und die Lokalisation der Interaktion zu treffen. Mit diesem Assay können auch schwache und instabile Interaktionen nachgewiesen werden.

Der Duolink in situ PLA wurde entsprechend den Vorgaben des Herstellers (OLink Bioscience) durchgeführt. Die FFPE-Zellschnitte von C32 und HEK293T Zellen wurden zur Entparaffinierung durch eine absteigende Alkoholreihe geschleust. Anschließend wurden die Schnitte 10 min in Cell Conditioner C1 gekocht und 3x in PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurde jeweils 1 Tropfen Blocking Solution auf jeden Schnitt gegeben und diese bei 37°C für 30 min inkubiert. Nach der Blockierung wurden die beiden primären Antikörper (EMP3 + je einer der potentiellen Interaktoren) zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die verwendeten Antikörper sind im Anhang, Seite 172, Abschnitt 7.4 aufgeführt. Am folgenden Tag wurden die Schnitte 3x mit PBS gewaschen und dann die PLA-Sonden hinzugefügt. Dazu wurden die PLA-Minus und PLA-Plus Sonden jeweils 1:5 in Ab-Diluent verdünnt, auf den Schnitt pipettiert und bei 37 °C für 1h inkubiert. Nach 3 weiteren Wasch-Schritten mit PBS wurde der Ligationsansatz auf die Schnitte pipettiert, bestehend aus 1:5 in ddH₂O verdünntem Ligationspuffer und 1:40 verdünnter Ligase. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C wurden die Schnitte 3x mit Wasch-Puffer A gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte die Amplifikation durch die Zugabe von 1:5 Amplifikations-Puffer Red und 1:80 Polymerase in ddH₂O und Inkubation bei 37°C für 2h. Im Anschluss wurden die Schnitte erneut 3x gewaschen mit Wasch-Puffer B und 1x mit H₂O und dann mit DAPI VectaShield eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte danach am Fluoreszenzmikroskop. Die Assays wurden dabei für jede Kombination von primären Antikörpern (EMP3 + Interaktor) jeweils einmal mit PLA-Plus (Maus)/PLA-Minus (Kaninchen) und PLA-Plus (Kaninchen)/PLA-Minus (Maus) durchgeführt.

2.9 Datenbanken & Softwares

Die Literaturrecherchen wurden mithilfe der NCBI PubMed Datenbank durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Als molekularbiologisches Softwaretool für die Planung von Klonierungen und als Vektordatenbank wurde die Software Vector NTI (Life Technologies) verwendet. Die Auswertung und Analyse von Sequenzdaten erfolgte mithilfe von Vector NTI und NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Die Proteindaten wurden aus der UniProt Datenbank (<http://www.uniprot.org>) und aus der Literatur entnommen. Expressions- und Überlebensdaten für Gliome wurden aus der "Repository for Molecular Brain Neoplasia Data" (REMBRANDT) Datenbank bezogen (caintegrator.nci.nih.gov/rembrandt). Einfache Berechnungen und Auswertungen wurden in Excel (Microsoft) vorgenommen, die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Sigma Plot (Systat Software).

2.10 Statistische Auswertung

Sofern nicht anders angegeben, wurde für die Berechnung der statistischen Aussagekraft ein ungepaarter, zweiendiger t-Test angewandt. In den Abbildungen sind signifikante Unterschiede durch Sternsymbole nach folgendem Schlüssel gekennzeichnet: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 REMBRANDT Datenbank Recherche

Eine Recherche in der REMBRANDT Datenbank ergab, dass eine erhöhte EMP3 Expression (≥ 2 -fach) mit einem schlechteren klinischen Verlauf korreliert. Verringerte EMP3 Expression (≥ 2 -fach) ist dagegen mit einer günstigeren Prognose verbunden (s. Abb.4).

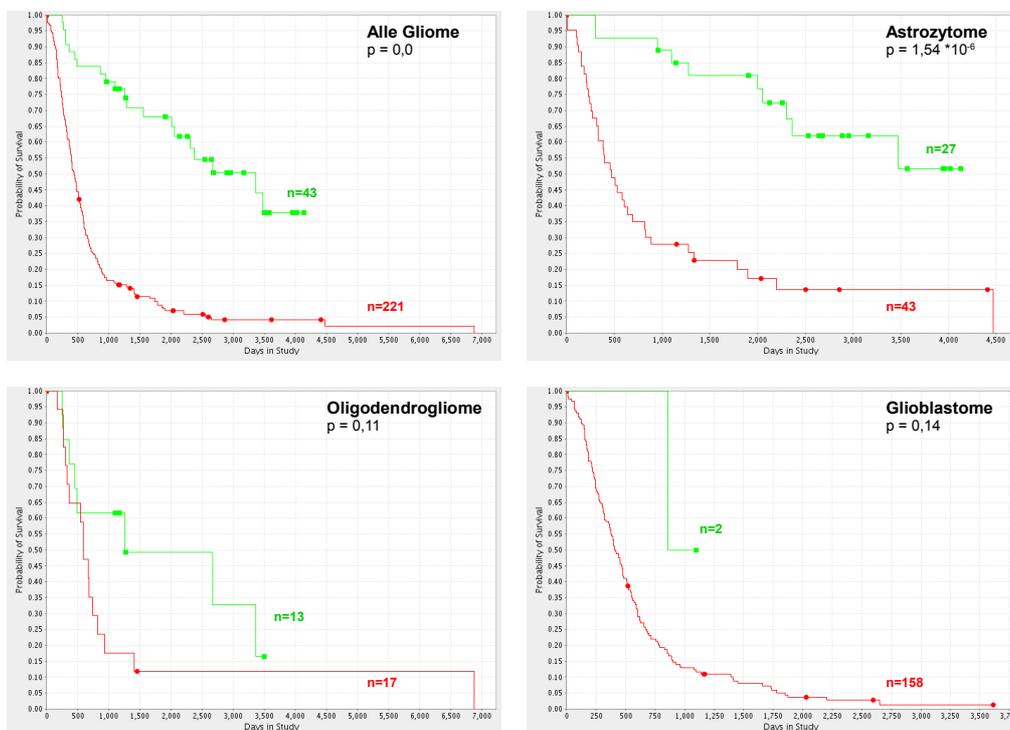


Abbildung 4: Kaplan-Meier Überlebenskurven für verschiedene Hirntumore in Abhängigkeit von der EMP3 Expression. Rote Kurven: erhöhte EMP3 Expression ($\geq 2x$), grüne Kurven: verringerte EMP3 Expression ($\geq 2x$).

Betrachtet man die Gesamtheit aller Gliome ist eine erhöhte EMP3 Expression gegenüber einer reduzierten Expression signifikant mit einem ungünstigeren klinischen Verlauf

beziehungsweise kürzerer Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert (Abb.4; $p=0,0$, Angabe aus der Datenbank). Trennt man den Datensatz in die einzelnen Subtypen von Gliomen auf, so ist die Assoziation von erhöhter EMP3 Expression mit einem ungünstigeren Verlauf nur bei den Astrozytomen signifikant ($p=1,54 \cdot 10^{-6}$, Angabe aus der Datenbank). Bei Oligodendrogliomen und Glioblastomen ist die Trennung des klinischen Verlaufs nach EMP3 Expression im verwendeten Datensatz nicht signifikant (Oligodendrogliome $p=0,11$; Glioblastome $p=0,14$), dennoch lässt sich auch hier ein ähnlicher Trend beobachten.

3.2 Promoter-Methylierungsanalyse

3.2.1 Methodenvergleich zwischen drei verschiedenen Verfahren zur Methylierungsanalyse von *MGMT* in Glioblastomen

Im Rahmen eines Nebenprojektes wurden an den klinisch dokumentierten UKT05 pGBM drei verschiedene diagnostische Methoden zur Analyse des *MGMT* Promotermethylierungs-Status verglichen. Verglichen wurden dabei MSP, MS-MLPA und PSQ. Das Ziel war zu bestimmen, welche der drei Methoden die präziseste Vorhersage des progressionsfreien Überlebens ermöglicht.

Der *MGMT* Methylierungsstatus konnte mit MSP in 33/35, mit PSQ in 34/35 und mit MS-MLPA in 35/35 Fällen erfolgreich bestimmt werden. Anhand des Datensatzes konnten für PSQ signifikante Cut-off Werte für die einzelnen CpGs zur Dichotomisierung der Methylierungsdaten berechnet werden. Diese lagen im Bereich von 11,5% – 44,9%.

MSP und PSQ verbesserten dabei, im Gegensatz zur MS-MLPA, signifikant die Vorhersage des progressionsfreien Überlebens im Vergleich zur Vorhersage allein anhand der klinischen Parameter wie Alter, Geschlecht, Karnofsky-Index und Ausmaß der Resektion ($p < 0,001$, Likelihood ratio Test). Für eine genaue Aufstellung der Ergebnisse, siehe [78].

3.2.2 Methylierungsanalyse von EMP3 in verschiedenen Tumorentitäten

Tumor	1p/19q Status	EMP3 Methylierung		
		Positiv	Negativ	
OII	LOH	15/22 (68%)	12/15 (80%)	3/15 (20%)
	RET	7/22 (32%)	3/7 (43%)	4/7 (57%)
OIII	LOH	21/31 (68%)	20/21 (95%)	1/21 (5%)
	RET	10/31 (32%)	4/10 (40%)	6/10 (60%)

Tabelle 1: EMP3 Promoter-Methylierung korreliert mit 1p/19q LOH.

Tumor	IDH1/2 Status	EMP3 Methylierung		
		Positiv	Negativ	
OII	mut	14/19 (74%)	12/14 (86%)	2/14 (14%)
	wt	5/19 (26%)	2/5 (40%)	3/5 (60%)
OIII	mut	23/30 (77%)	21/23 (91%)	2/23 (9%)
	wt	7/30 (23%)	3/7 (43%)	4/7 (57%)
AII	mut	19/20 (95%)	16/19 (84%)	3/19 (16%)
	wt	1/20 (5%)	0/1 (0%)	1/1 (100%)
AIII	mut	13/15 (87%)	13/13 (100%)	0/13 (0%)
	wt	2/15 (13%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)
pGBM	mut	0/11 (0%)	---	---
	wt	11/11 (100%)	1/11 (9%)	10/11 (91%)

Tabelle 2: EMP3 Promoter-Methylierung korreliert mit IDH1/2 Mutationen.

Der *EMP3* Promotermethylierungsstatus wurde mittels Pyrosequencing auf genomischer DNA von insgesamt 99 Tumoren bestimmt. Darunter waren 22 OII, 31 OIII, 20 AII, 15 AIII und 11 pGBM. Alle Tumor-DNAs stammten aus dem Tumor-DNA-Archiv der Neuropathologie Heidelberg, die Daten zum *IDH1/2* Mutations- und 1p/19q Status wurden der Tumordatenbank der Neuropathologie Heidelberg entnommen.

Da die Methylierungswerte für die einzelnen CpGs pro Probe vergleichbar waren, wurde jeweils der Durchschnittswert aller 6 abgefragten CpGs berechnet. Der Cut-off für die Unterscheidung zwischen methylierten und unmethylierten Proben wurde dabei auf 15% festgelegt. Die Ergebnisse der PSQ Analyse sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengefasst dargestellt, aufgeteilt nach dem *IDH* Mutations- und 1p/19q Status.

Insgesamt wiesen 15/22 (68%) der untersuchten OII, 24/31 (77%) der OIII, 16/20 (80%) der AII, 14/15 (93%) der AIII und 1/11 (9%) der pGBM eine *EMP3* Promoter-Hypermethylierung auf. Von den untersuchten Tumoren verfügten 69/99 über eine *IDH1/2* Mutation, 26 Fälle waren *IDH1/2* Wildtyp. Von 3 untersuchten OII und einem OIII lag der *IDH* Status nicht vor. Von den Tumoren mit *IDH1/2* Mutation verfügten 62/69 (90%) über einen methylierten *EMP3* Promoter, während bei den *IDH* wt Tumoren nur in 7/26 (27%) Fällen eine Methylierung nachweisbar war. Somit korrelierte die *EMP3* Methylierung signifikant mit dem *IDH1/2* Mutationsstatus ($p < 0,001$).

Für 53 oligodendrogliale Tumore der Grade II und III war außerdem der 1p/19q Status verfügbar. Von den 36 Tumoren mit 1p/19q LOH, wiesen 32 (89%) eine *EMP3* Promotermethylierung auf, während dies bei den Tumoren ohne LOH nur in 7/17 (41%) der Fall war. Die *EMP3* Promotermethylierung korrelierte damit auch signifikant mit 1p/19 LOH ($p < 0,001$).

3.3 Antikörperentwicklung

Für die geplanten Experimente und Methoden (Immunhistochemie, Immunfluoreszenz, Westernblot, Immunopräzipitation, PLA) wurde ein Anti-EMP3 Antikörper benötigt, der in allen Anwendungen gute und reproduzierbare Ergebnisse liefern konnte. Da die getesteten kommerziell erhältlichen Anti-EMP3 Antikörper (siehe Anhang) keine ausreichende Sensitivität, Spezifität und/oder Anwendungsbandbreite aufwiesen, wurde die Entwicklung eines neuen monoklonalen Antikörpers angesetzt. Nach der oben beschriebenen Methode konnte erfolgreich ein monoklonaler Antikörper gegen EMP3 erzeugt werden. Der aus dem Verfahren resultierende Antikörper mit der besten Spezifität und Sensitivität (Klon 158) gehört der Subklasse IgG2 an. Der Antikörper wurde in Form des rohen Hybridomzellkulturüberstandes verwendet und zeigte sich auch in dieser unaufgereinigten Form sensitiv genug um geringe endogene Proteinlevel von EMP3 im Westernblot, in der Immunfluoreszenz und in der Immunhistochemie zu detektieren. In der IHC war aufgereinigter Anti-EMP3 K158 Antikörper weniger sensitiv als der Hybridomüberstand (Daten nicht gezeigt). Die Detektion von EMP3 über Anti-EMP3 K158 und Anti-Myc-Tag stimmte in der Immunfluoreszenz und im Westernblot überein. Der Antikörper K158 erwies sich für alle getesteten Anwendungen, wie Westernblot, Immunfluoreszenz, Immunhistochemie und Immunopräzipitation als sehr gut geeignet und wurde für die Folgeexperimente verwendet.

3.4 Immunhistochemische Detektion von EMP3 in Normalgeweben

Um die Expression von EMP3 in verschiedenen Geweben zu bestimmen, wurden mit dem neu entwickelten Anti-EMP3 K158 Antikörper immunhistochemische Färbungen auf mehreren TMAs und einzelnen Schnitten von nicht-neoplastischen Geweben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 5- 13 dargestellt. Sofern nicht anders angegeben sind die Bilder in 200x Vergrößerung aufgenommen.

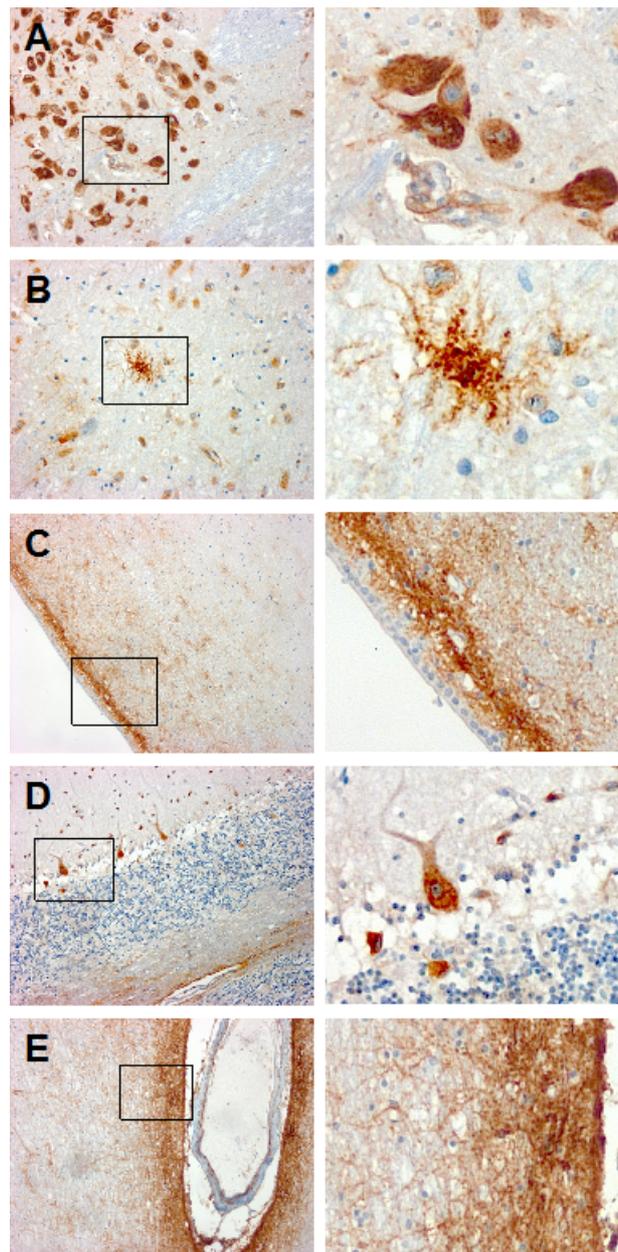


Abbildung 5: EMP3 Färbung auf Hirngewebe. Immunhistochemische Färbung mit Anti-EMP3 K158 Antikörper. Der links markierte Bildausschnitt ist in der rechten Spalte vergrößert dargestellt. A, B, C) Großhirn-Kortex. D, E) Cerebellum.

Im **Großhirn-Kortex** und **Cerebellum** zeigten vor allem Neurone und Zellen mit astrozytärer Morphologie eine starke EMP3 Färbung (Abb. 5A, B, D). Das umliegende

Gewebe war negativ oder schwach positiv. Außerdem zeigte sich perivaskulär und subventrikulär eine starke Färbung (Abb. 5E, C). Sowohl bei den Neuronen, als auch bei den astrozytären Zellen, lag die EMP3 Färbung vor allem im Zytoplasma vor.

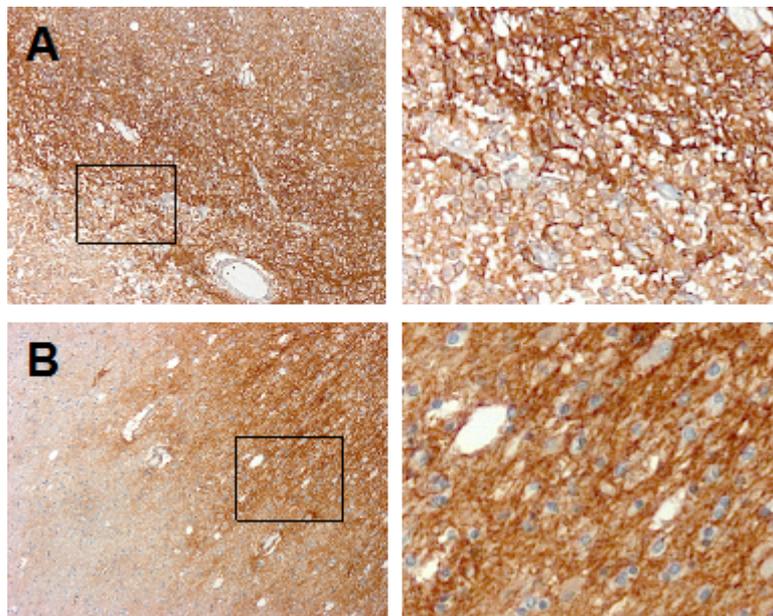


Abbildung 6: EMP3 Färbung auf Großhirn-Kortexgewebe im Bereich eines Infarkts. Immunhistochemische Färbung mit Anti-EMP3 K158 Antikörper. Der jeweils auf der linken Seite markierte Bildausschnitt ist in der rechten Spalte vergrößert dargestellt. A) Infarktzone links unten im Bildausschnitt. B) Infarktzone rechts oben außerhalb des Bildausschnitts.

Bei einem histologischen Präparat, das einen Infarkt im Großhirn-Kortex beinhaltete, war die EMP3 Färbung im umliegenden Gewebe massiv verstärkt, im Vergleich zu normalem Großhirn-Kortexgewebe. Mit steigender Entfernung von der Infarktzone nahm die Intensität der Färbung graduell ab (Abb. 6).

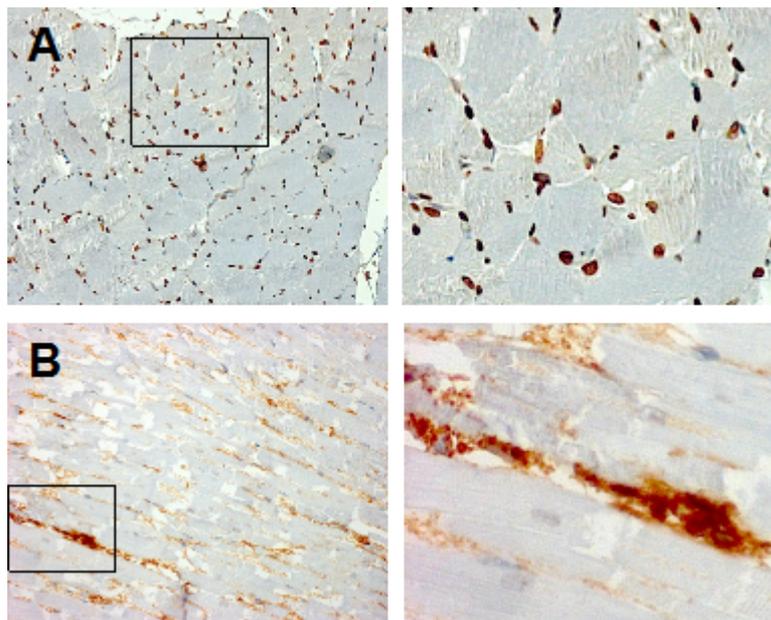


Abbildung 7: EMP3 Färbung auf Muskelgewebe. Immunhistochemische Färbung mit Anti-EMP3 K158 Antikörper. Der jeweils auf der linken Seite markierte Bildausschnitt ist in der rechten Spalte vergrößert dargestellt. A) Skelettmuskel. B) Herzmuskel.

Im **Skelettmuskelgewebe** trat die EMP3 Färbung sehr fokussiert in den Kernen der Muskelzellen auf, während alle anderen Kompartimente der Zellen vollständig negativ waren (Abb. 7A). Eine solche Kernlokalisation von EMP3 konnte in schwächerer Form auch in Tonsillengewebe (siehe Abb. 9C) beobachtet werden, sowie in einigen Tumoren (siehe 3.5, Abb. 14A, C). Im **Herzmuskelgewebe** (Abb. 7B) waren die Muskelzellen EMP3 negativ und wiesen im Gegensatz zu den Skelettmuskelzellen auch keine Kernfärbung auf. Eine diffuse EMP3 positive Färbung war in den Zwischenräumen zwischen den Muskelzellen sichtbar.

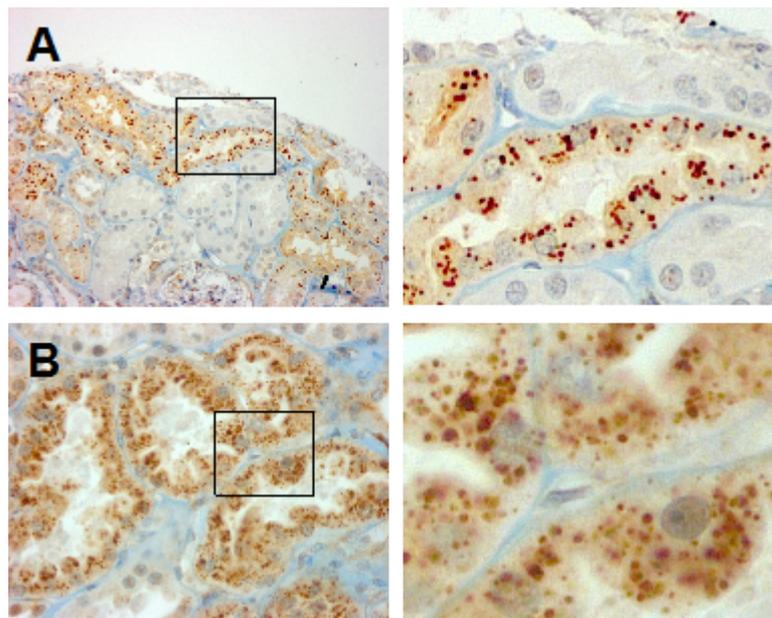


Abbildung 8: EMP3 Färbung auf Nierengewebe. Immunhistochemische Färbung mit Anti-EMP3 K158 Antikörper. Der jeweils auf der linken Seite markierte Bildausschnitt ist in der rechten Spalte vergrößert dargestellt. A) 200x Vergrößerung. B) 400x Vergrößerung.

Nierengewebe zeigte eine granuläre Färbung in den Epithelzellen der Tubuli, wobei jedoch nicht alle Tubuli eine gleich starke Positivität aufwiesen. Die Intensität der EMP3 Färbung in den Zellen unterschied sich zwischen den einzelnen Tubuli, jedoch nicht zwischen den Zellen innerhalb eines einzelnen Tubulus (Abb. 8). Die Lokalisation der EMP3 Färbung in diesen Zellen erschien punktuell fokussiert im Zytoplasma.

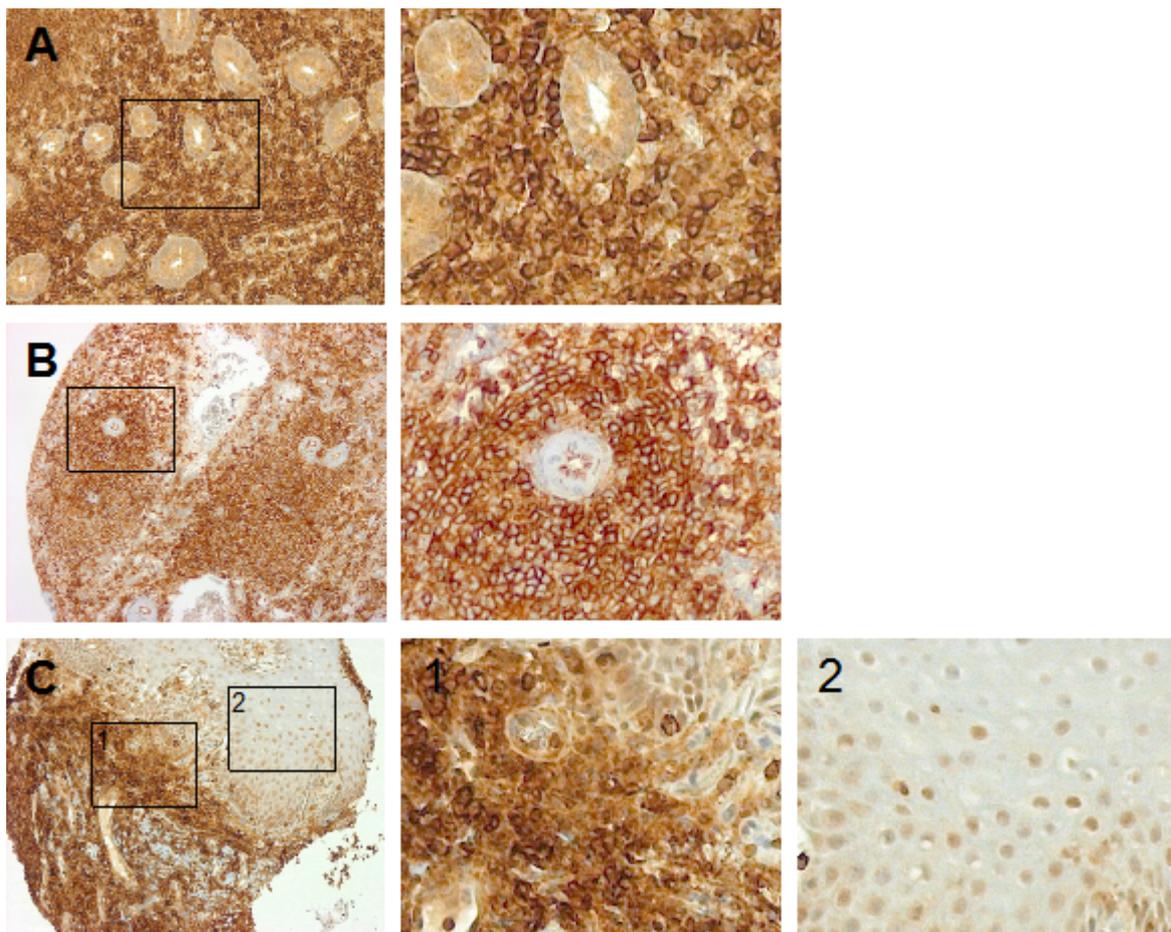


Abbildung 9: EMP3 Färbung auf verschiedenen lymphatischen Geweben. Immunhistochemische Färbung mit Anti-EMP3 K158 Antikörper. Der jeweils auf der linken Seite markierte Bildausschnitt ist in der rechten Spalte vergrößert dargestellt. A) Appendix. B) Milz. C) Tonsille.

Eine intensive EMP3 Färbung trat in lymphatischen Geweben auf, vor allem in **Appendix**, **Milz** und **Tonsille** (Abb. 9), wobei hier besonders die im Gewebe befindlichen Lymphozyten stark positiv waren. Das umliegende Gewebe wies eine schwächere EMP3 Färbung auf. Bei den Lymphozyten konzentrierte sich EMP3 vor allem an der Membran, im umliegenden Gewebe war die Lokalisation eher zytoplasmatisch. Im Tonsillengewebe zeigte sich außerdem in einigen Zellen eine Kernlokalisierung (Abb. 9C(2)).

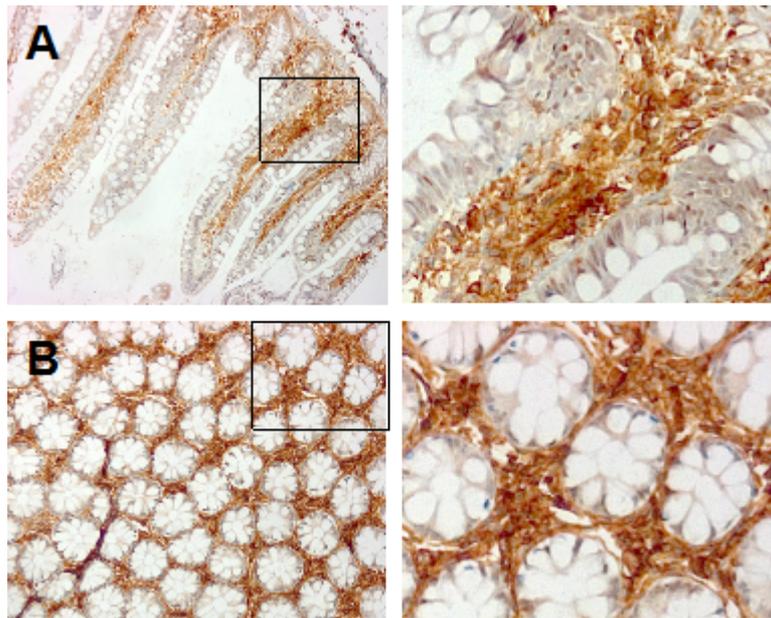


Abbildung 10: EMP3 Färbung auf Darmgewebe. Immunhistochemische Färbung mit Anti-EMP3 K158 Antikörper. Der jeweils auf der linken Seite markierte Bildausschnitt ist in der rechten Spalte vergrößert dargestellt. A) Dünndarm. B) Colon.

Ein ähnliches Bild zeigte sich in den Gewebeschnitten von **Dünndarm** und **Colon** (Abb. 10). Hier fanden sich stark EMP3 gefärbte Zellen innerhalb der Darmschleimhaut, im Inneren der Villi (Abb. 10A) und um die Krypten herum (Abb. 10B).

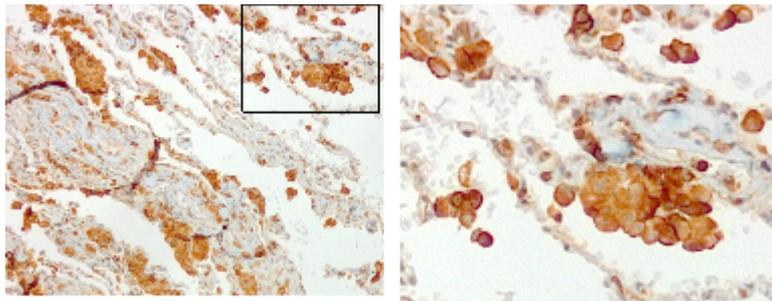


Abbildung 11: EMP3 Färbung auf Lungengewebe. Immunhistochemische Färbung mit Anti-EMP3 K158 Antikörper. Der jeweils auf der linken Seite markierte Bildausschnitt ist in der rechten Spalte vergrößert dargestellt.

Lungengewebe (Abb. 11) zeigte überwiegend eine schwache EMP3 Färbung, allerdings fanden sich fokale, knotenförmige Ansammlungen stark EMP3 positiver Zellen. EMP3 war in diesen Zellen membranös und zytoplasmatisch lokalisiert.

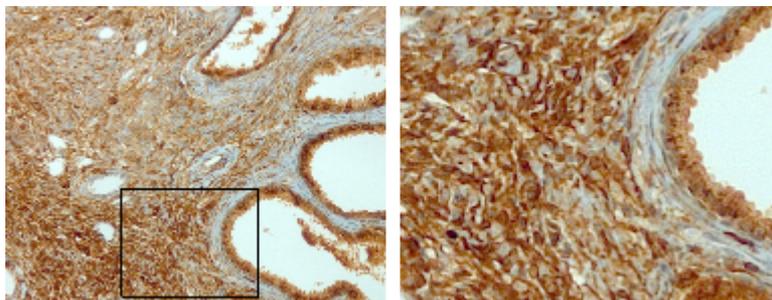


Abbildung 12: EMP3 Färbung auf Prostatagewebe. Immunhistochemische Färbung mit Anti-EMP3 K158 Antikörper. Der jeweils auf der linken Seite markierte Bildausschnitt ist in der rechten Spalte vergrößert dargestellt.

In den Gewebeschnitten der **Prostata** (Abb. 12) wiesen die Epithelzellen im Lumen eine granuläre, zytoplasmatische EMP3 Färbung auf, während die darunterliegenden Basalzellen EMP3 negativ waren. Die Stromazellen zeigten wiederum eine starke membranöse und zytoplasmatische EMP3 Färbung.

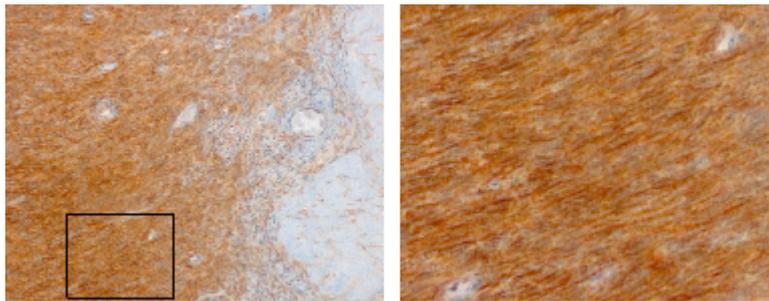


Abbildung 13: EMP3 Färbung auf Ovargewebe. Immunhistochemische Färbung mit Anti-EMP3 K158 Antikörper. Der jeweils auf der linken Seite markierte Bildausschnitt ist in der rechten Spalte vergrößert dargestellt.

Die Gewebeschnitte des **Ovar** (Abb. 13) zeigten eine starke EMP3 Färbung in den Stromazellen, im Zytoplasma und an der Zellmembran.

3.5 Immunhistochemische Detektion von EMP3 in Tumorgeweben

Neben der immunhistochemischen Färbung von Normalgeweben wurden auch eine Reihe von Tumoren mit dem Anti-EMP3 K158 Antikörper gefärbt. Dies umfasste insgesamt 144 Gliome, darunter 93 Grad IV und 51 Grad II Tumore. Außerdem wurden 3 ZNS-Melanommetastasen in die IHC eingeschlossen. Die Ergebnisse der Färbungen sind in Tabelle 3 zusammengefasst dargestellt.

Tumor	EMP3 IHC Färbung		Anmerkungen
OII	negativ	3/4 (75%)	---
	schwach	1/4 (25%)	
	stark	0/4 (0%)	
AII	negativ	8/44 (18%)	Low-grade Glioma TMA
	schwach	26/44 (59%)	
	stark	10/44 (23%)	
OAII	negativ	0/3 (0%)	Low-grade Glioma TMA
	schwach	3/3 (100%)	
	stark	0/3 (0%)	
pGBM	negativ	3/56 (5%)	GBM TMA
	schwach	6/56 (11%)	
	stark	47/56 (84%)	
pGBM	negativ	3/34 (9%)	UKT05
	schwach	3/34 (9%)	
	stark	28/34 (82%)	
sGBM	negativ	1/3 (33%)	---
	schwach	0/3 (0%)	
	stark	2/3 (67%)	
Melanom- Metastasen	negativ	0/3 (0%)	---
	schwach	0/3 (0%)	
	stark	3/3 (100%)	

Tabelle 3: Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von EMP3 auf verschiedenen Tumorgeweben.

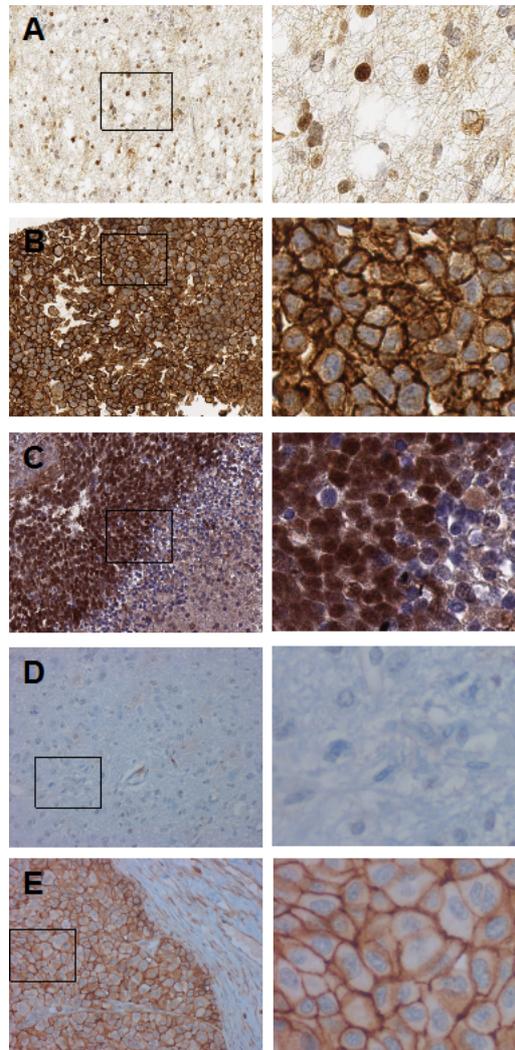


Abbildung 14: EMP3 Färbung auf verschiedenen Tumorgeweben. A) All, B) pGBM, C) sGBM, D) Olig, E) Melanom-Metastase. 200x Vergrößerung.

Von den Glioblastomen (WHO Grad IV) zeigten 77/93 (83%) eine starke bis sehr starke EMP3 Färbung, während 9/93 (10%) nur schwach positiv und 7/93 (7%) negativ waren. Die Färbung war dabei überwiegend membranständig oder zytoplasmatisch lokalisiert, in etwa 20% der Fälle war jedoch auch eine nukleäre Lokalisation zu beobachten. In den sGBMs zeigte sich in 2/2 positiven Fällen eine Kernlokalisierung. Die Kernlokalisierung von EMP3 konnte innerhalb der Zellen allgemein nie gleichzeitig zusammen mit einer Membranlokalisierung beobachtet werden.

Bei den niedriggradigen Gliomen zeigten 10/51 (20%) eine starke EMP3 Färbung, 30/51 (59%) wiesen eine schwache Färbung auf und 11/51 (21%) waren negativ. Die astrozytären Tumore wiesen insgesamt eine stärkere EMP3 Färbung auf, als die Oligodendrogliome. Dabei stellte sich die Intensität der Färbung insgesamt, auch in den stark gefärbten WHO Grad II Tumoren, wesentlich schwächer dar, als bei den stark positiven Glioblastomen WHO Grad IV. In den Astrozytomen konnte zudem häufiger eine zytoplasmatische und/oder nukleäre Lokalisation beobachtet werden als in den pGBMs.

Von den Melanommetastasen wiesen 4/4 eine starke EMP3 Färbung auf, die in allen Fällen membranständig lokalisiert war.

3.5.1 Korrelation der EMP3 IHC Färbung mit Überlebensdaten

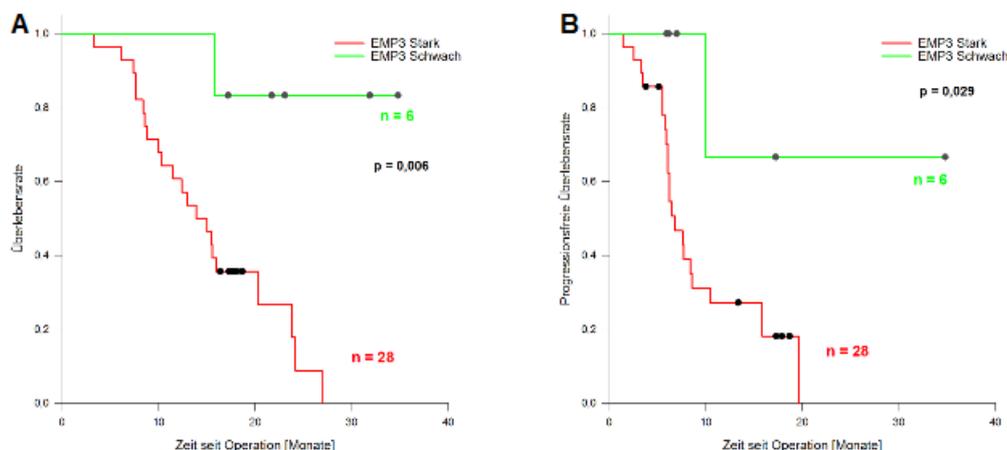


Abbildung 15: Kaplan-Meier Kurven der EMP3 IHC Färbung auf den UKT05 pGBM für (A) Gesamtüberleben und (B) progressionsfreies Überleben. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte über einen Log-Rank Test. In Grün sind die Fälle mit schwacher oder negativer EMP3 Färbung dargestellt, in Rot die Fälle mit starker EMP3 Färbung. Zensierte Ereignisse sind als schwarze Punkte dargestellt.

Bei den pGBMs des UKT05 Kollektivs wurde die EMP3 Färbung zusätzlich mit den Überlebensdaten abgeglichen. Zur Dichotomisierung der Ergebnisse der IHC wurden die Fälle mit schwacher und negativer EMP3 Färbung zusammengefasst ($n = 6$) und den Fällen mit starker Färbung ($n = 28$) gegenübergestellt. Die resultierenden Kaplan-Meier

Kurven für das progressionsfreie (PFS) und Gesamtüberleben (OS) sind in Abbildung 15 dargestellt. Eine starke EMP3 Färbung korrelierte dabei in beiden Fällen signifikant mit einem ungünstigeren klinischen Verlauf (OS: $p = 0,006$; PFS: $p = 0,029$; Log-Rank Test).

3.6 EMP3 Expression in Zelllinien

Die EMP3 Expression wurde ebenfalls in verschiedenen Zelllinien getestet, unter anderem auch im Hinblick auf die Verwendung in verschiedenen Folgeexperimenten.

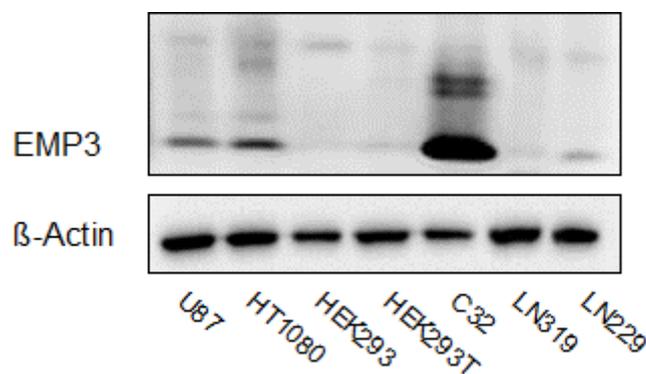


Abbildung 16: EMP3 Proteinlevel in Zelllinien.

Die endogene Expression von EMP3 unterschied sich erheblich zwischen den verschiedenen getesteten Zelllinien. Die C32 Zellen verfügten über die stärkste EMP3 Expression, gefolgt von den HT-1080 und U87 Zellen. HEK293, HEK293T, LN319 und LN229 zeigten dagegen im Westernblot (Abb.16) und in der Immunfluoreszenz nur geringe Mengen von detektierbarem EMP3. Die intrazelluläre Lokalisation von EMP3 unterschied sich ebenfalls zwischen den Zelllinien. In den C32 und HT-1080 Zellen trat die EMP3 Färbung überwiegend an der Zellmembran und in geringerem Maße um den Zellkern herum auf. Diese intrazelluläre Färbung deckte sich mit RCAS1, als Marker für den Golgi-Apparat, nicht aber mit Calnexin (ER) oder LAMP1 (Lysosomen) (Abb.17). In den U87 Zellen war die EMP3 Färbung zytoplasmatisch lokalisiert (Daten nicht gezeigt). Eine Kernfärbung, wie sie in einigen IHC gefärbten FFPE Präparaten von Normalgeweben und Gliomen beobachtet werden konnte, konnte in keiner der untersuchten Zelllinien beobachtet werden.

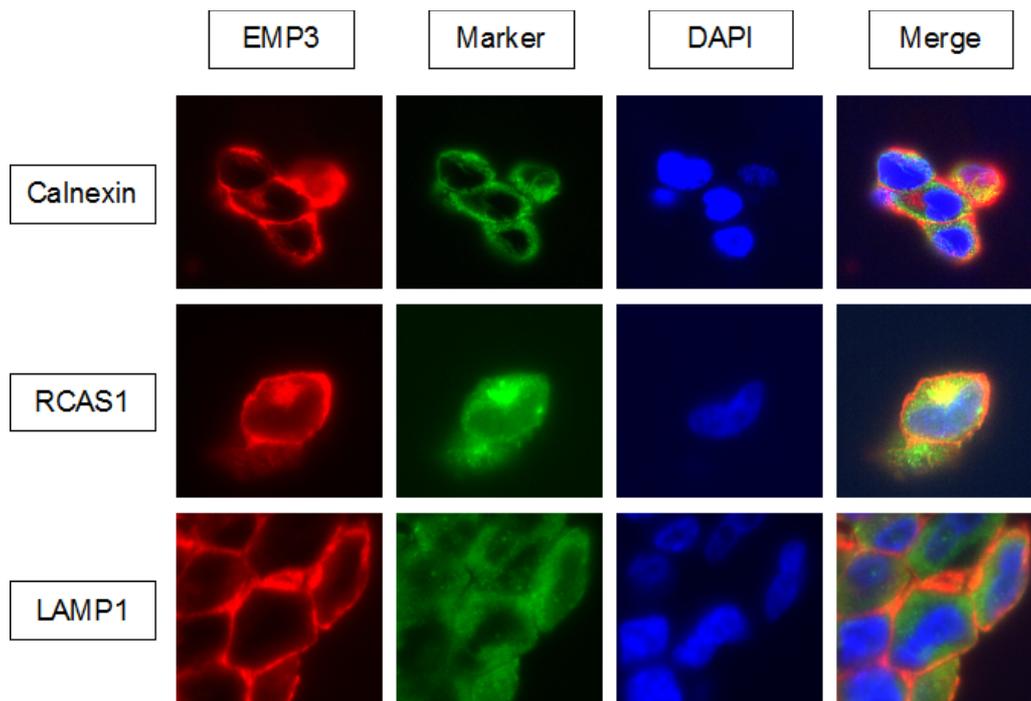


Abbildung 17: Parallele IF-Färbung von EMP3, RCAS1, Calnexin und LAMP1 an FFPE C32 Zellen. EMP3 ist in Rot dargestellt, RCAS1, Calnexin und LAMP1 in Grün. Die Zellkerne wurden mit DAPI markiert und sind in Blau dargestellt.

Die Überexpression von EMP3 führte in den LN229 und HEK293 Zelllinien zu einer Abnahme der Zellviabilität und Zellzahl, sowie Änderungen in der Zellmorphologie (Abb. 18). Die HT-1080 und LN319 Zellen reagierten dagegen nicht empfindlich auf die Überexpression von EMP3. Für die Überexpressionsexperimente (Co-IP, BiFC) wurden daher diese beiden Zelllinien verwendet.

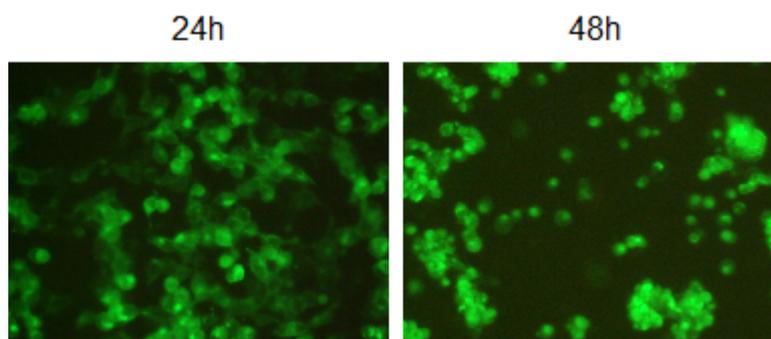


Abbildung 18: Verminderte Zellviabilität nach EMP3-GFP Transfektion in HEK293T Zellen. Nach 24-48h zeigten die Zellen morphologische Veränderungen, begannen sich von der Oberfläche abzulösen und starben ab.

3.7 Posttranslationale Modifikation von EMP3

Um zu überprüfen, ob die beiden annotierten N-Glykosylierungsmotive in der Aminosäuresequenz von EMP3 an Position 47 und 56 tatsächlich posttranslational glykosyliert werden, wurde Wildtyp-EMP3 sowie die Varianten EMP3^{N47A}, EMP3^{N56A} und EMP3^{N47/56A} in LN319 Zellen überexprimiert (jeweils mit Myc-Tag). Zusätzlich wurde das EMP3^{wt} Überexpressions-Lysat mit Peptid N-Glycosidase F (PNGase F) verdaut. Bei PNGase F handelt es sich um eine Amidase welche die Bindung zwischen Asparagin und N-Acetylglucosamin (GlcNAc) spaltet und damit N-glykosidisch gebundene Oligosaccharidketten von Glykoproteinen entfernt.

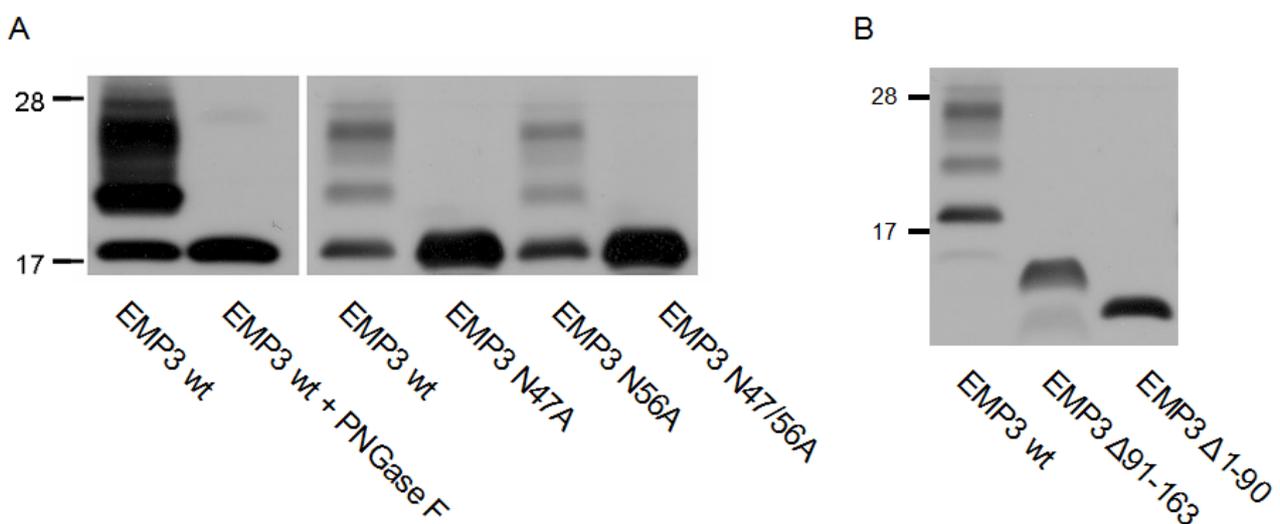


Abbildung 19: Glykosylierungsmuster von EMP3. A) Westernblots der EMP3-Konstrukte mit mutierten Glykosylierungsmotiven sowie Wildtyp-EMP3 und Wildtyp-EMP3 verdaut mit N-Glycosidase F. B) Westernblot mit Wildtyp-EMP3 sowie den verkürzten EMP3 Varianten EMP3^{Δ91-163} und EMP3^{Δ1-90}. Größenangaben auf der linken Seite in kDa. Detektion mit Anti-Myc-Tag Antikörper.

Abbildung 19a zeigt die Ergebnisse des Westernblots mit EMP3^{wt} und EMP3^{wt} nach einem Verdau mit PNGase F, sowie EMP3^{N47A}, EMP3^{N56A} und EMP3^{N47/56A}. Das unverdaute EMP3^{wt} zeigte ein deutliches Mehrfachbandenmuster, welches sich oberhalb der erwarteten EMP3 Proteinbande bei 18,4 kDa, bis fast 30 kDa erstreckte. Nach Verdau mit PNGase F verschwand das Mehrfachbandenmuster vollständig und es verblieb lediglich

eine einzelne Bande, deren Größe der von unmodifiziertem EMP3 entsprach. Ein ähnliches Bild ergab sich bei einem Vergleich der Überexpression von EMP3^{wt} und EMP3^{N47A}. Bei dem Konstrukt EMP3^{N47A} wurde das erste N-Glykosylierungsmotiv durch eine eingefügte Mutation neutralisiert, auch hier war kein Mehrfachbandenmuster vorhanden. Bei einer Überexpression des Konstrukts EMP3^{N56A}, bei dem das zweite N-Glykosylierungsmotiv inaktiviert wurde, war dieser Effekt nicht zu beobachten, hier zeigte sich wiederum das gleiche Mehrfachbandenmuster wie bei EMP3^{wt}. Bei gleichzeitiger Mutation beider Glykosylierungsmotive (EMP3^{N47/56A}) war das Mehrfachbandenmuster wiederum nicht erkennbar.

Bei einer Überexpression der Konstrukte EMP3^{Δ91-163} und EMP3^{Δ1-90}, zeigte sich im WesternBlot, dass auch hier jeweils nur eine einzelne Bande vorhanden war, die der erwarteten Größe des verkürzten EMP3-Proteins entsprach (Abb. 19b).

3.8 RNA-Interferenz Knockdown von EMP3

Um die Auswirkungen reduzierter EMP3 Expression auf verschiedene zelluläre Prozesse untersuchen zu können, wurden zunächst stabile Knockdown-Zelllinien mit verschiedenen shRNA-Konstrukten erstellt. Dazu wurden Zellen mit einem der 5 spezifisch gegen EMP3 gerichteten shRNA-Konstrukte shE1 – shE5, dem Leervektor (shLV) oder einem unspezifischen scrambled Konstrukt (shScr) als Kontrolle, transfiziert und selektioniert. Die stabil transfizierten Zellen wurden mittels Westernblot auf ihre EMP3 Expression hin überprüft. Dieses Verfahren wurde jeweils mit den Zelllinien C32, U87 und HT-1080 durchgeführt, wobei nur bei den HT-1080 Zellen ein stabiler Knockdown erreicht werden konnte (Abb. 20).

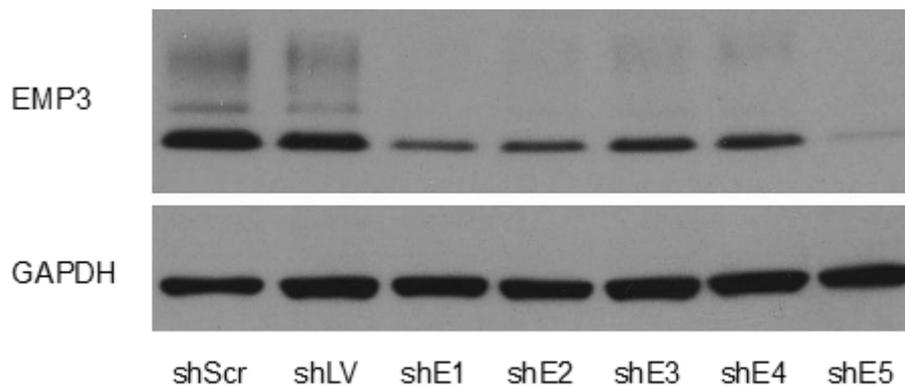


Abbildung 20: RNA-Interferenz Knockdown von EMP3. Dargestellt sind die EMP3 Proteinlevel in HT-1080 Zellen, transfiziert mit den unten stehenden Konstrukten, detektiert per Anti-EMP3 K158. GAPDH wurde als Kontrolle auf dem Blot dargestellt.

Die EMP3 Expression war am höchsten in den Zellen, die mit den Kontroll-Konstrukten shLV und shScr transfiziert wurden und entsprach der Expression in untransfizierten HT-1080 Zellen (100%). Bei den Zellen die mit shE1 und shE2 transfiziert wurden, war die Expression dagegen deutlich reduziert, auf etwa 30% im Vergleich zu den Kontrollen. Bei den Zellen mit shE3 und shE4 lag die Expression etwas höher, bei etwa 70%. Am geringsten war die EMP3 Expression bei den Zellen die mit shE5 transfiziert wurden, hier betrug sie weniger als 5% im Vergleich zu den Kontrollen. Somit konnte mit dem Konstrukt shE5 ein fast vollständiger und stabiler Knockdown von EMP3 in den HT-1080 Zellen erreicht werden.

3.8.1 Einfluss des EMP3 Knockdowns auf die Zellproliferation

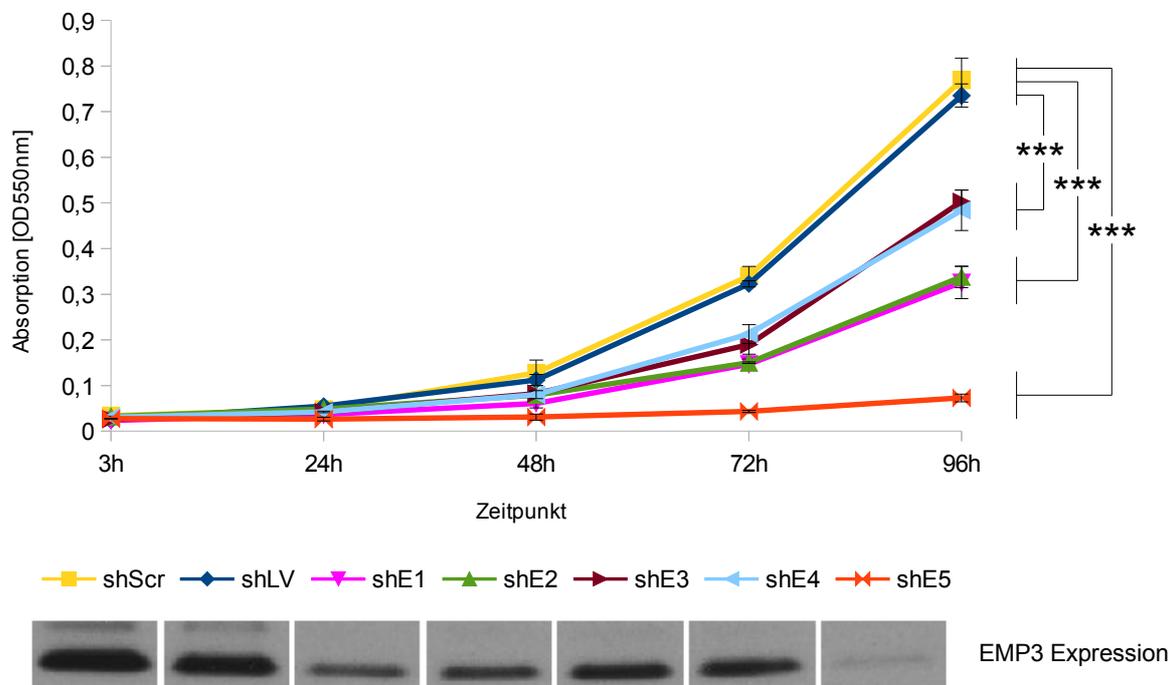


Abbildung 21: Einfluss des EMP3 Knockdowns auf die Zellproliferation. Darstellung der Ergebnisse des Kristallviolett-Assays zur Bestimmung der Zelldichte der EMP3-Knockdown HT-1080 Zellen in Form von Wachstumskurven über einen Zeitraum von 96h. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus drei Messwerten (Triplikate) \pm Standardabweichung (SD). Unterhalb der Legende ist zur Übersicht die EMP3 Expression der Zelllinien im Westernblot dargestellt (Auszug aus Abb. 20).

Um die Auswirkungen des stabilen EMP3-Knockdowns auf die Proliferation der Zellen zu untersuchen, wurde ausgehend von einer festen Zahl ausgesäter Zellen, die Entwicklung der Zellzahl in 24-Stunden-Intervallen über einen Gesamtzeitraum von 96 Stunden mittels Kristallviolettassay bestimmt. Die Wachstumskurven ließen dabei auf einen Zusammenhang zwischen der EMP3 Expression und der Proliferationsrate der Zellen schließen (Abb.21). Die Wachstumskurven gruppieren sich entsprechend der EMP3-Expression der Zelllinien, wobei die Reduktion der EMP3 Expression mit einer reduzierten Wachstumsrate korrelierte.

Während die Wachstumskurven der mit dem Leervektor shLV beziehungsweise dem „scrambled“ Konstrukt shScr transfizierten Zellen ohne EMP3-Knockdown die höchste Proliferationsrate zeigten, war die Zunahme der Zellzahl bei stärkerem EMP3-Knockdown

reduziert. Bei den Zellen die mit shE3 und shE4 transfiziert wurden (~30% EMP3 Knockdown) lag die Zellzahl nach 96 Stunden um 35% niedriger als bei den mit den Kontroll-Konstrukten transfizierten Zellen ($p < 0,001$). Noch deutlicher fiel die Differenz zwischen den Kontrollen und shE1 und shE2 (~70% Knockdown) aus. Hier war die Zellzahl nach 96 Stunden 58% niedriger als bei den Kontroll-Zellen ($p < 0,001$). Am geringsten war die Proliferationsrate bei den shE5 Zellen (>95% Knockdown), diese zeigten über den gesamten Zeitraum eine sehr geringe Zunahme und erreichten nur eine um 91% geringere Endzellzahl ($p < 0,001$).

3.8.2 Einfluss des EMP3 Knockdowns auf die Migration

Für die Bestimmung der Auswirkungen reduzierter EMP3 Expression auf die Migration wurde ein Wundheilungsassay mit den shLV und shE5 transfizierten HT-1080 Zellen durchgeführt und die Abnahme der durch die Doppelkammern erzeugten zellfreien Fläche über einen Zeitraum von 12 Stunden bestimmt. Um einen Einfluss der unterschiedlichen Proliferationsraten der transfizierten Zellen auf das Ergebnis auszuschließen, wurde die Mitoseaktivität der Zellen mittels Mitomycin C inhibiert. Das Ergebnis des Wundheilungsassays ist in Abbildung 22 dargestellt.

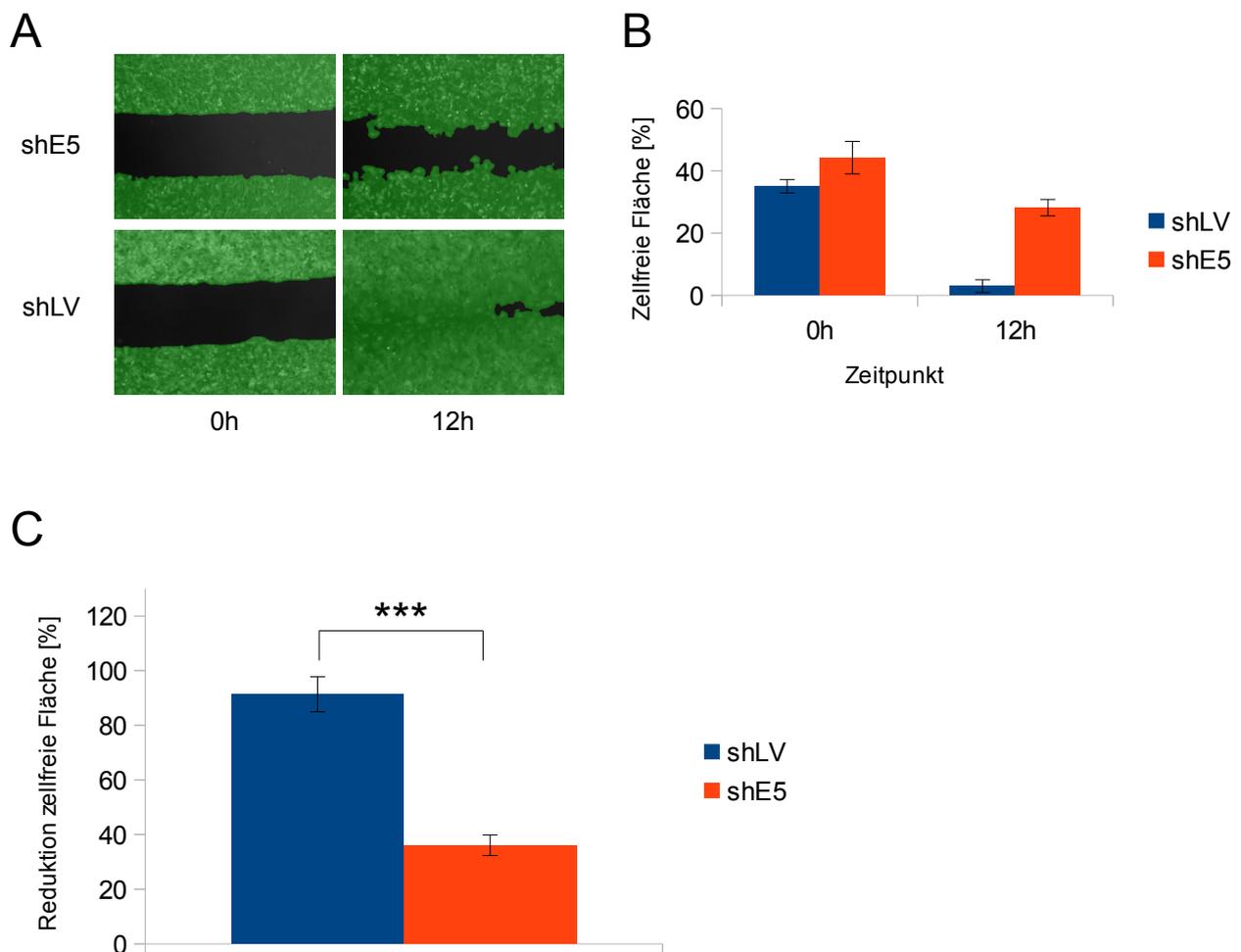


Abbildung 22: Einfluss des EMP3 Knockdowns auf die Migration. A) Darstellung des Wundheilungsassays für jeweils eine Kammer mit shE5 und shLV (Kontrolle) transfizierten HT-1080 Zellen zu den Zeitpunkten 0h und 12h, die zellbedeckte Fläche wurde vom Auswertungsalgorithmus grün markiert. B) Auswertung der zellfreien Fläche zu den Zeitpunkten 0h und 12h, Angabe in % des gesamten Bildausschnittes. C) Relative Reduktion der zellfreien Fläche nach 12h im Verhältnis zur Fläche zum Zeitpunkt 0h. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SD (Triplikate).

Die Migration der mit shE5 transfizierten Zellen mit EMP3 Knockdown in den zellfreien Korridor war im Vergleich zu den mit dem Leervektor transfizierten Zellen signifikant reduziert ($p < 0,001$). Nach 12 Stunden war die Lücke zwischen den zellbedeckten Flächen bei den Kontrollzellen fast vollständig geschlossen (Abnahme der zellfreien Fläche um 91%). Bei den shE5 Zellen hingegen wanderten die Zellen deutlich langsamer in den Spalt ein, die zellfreie Fläche war hier nach 12 Stunden nur um 36% reduziert.

3.8.3 Einfluss des EMP3 Knockdowns auf den induzierten Zelltod

Um den Einfluss des EMP3 Knockdowns in HT-1080 Zellen auf den induzierten Zelltod zu untersuchen, wurden shLV Kontrollzellen und shE5 Knockdown-Zellen ausgesät, 24 Stunden inkubiert und dann mit 3 verschiedenen Substanzen behandelt, um auf verschiedenen Wegen Apoptose zu induzieren: H_2O_2 (oxidativer Stress), Staurosporin (Kinase-Inhibitor) und TRAIL (Death-Rezeptor-Ligand). Nach 24 Stunden unter der jeweiligen Behandlung wurde die Zelldichte über einen Kristallviolettassay bestimmt.

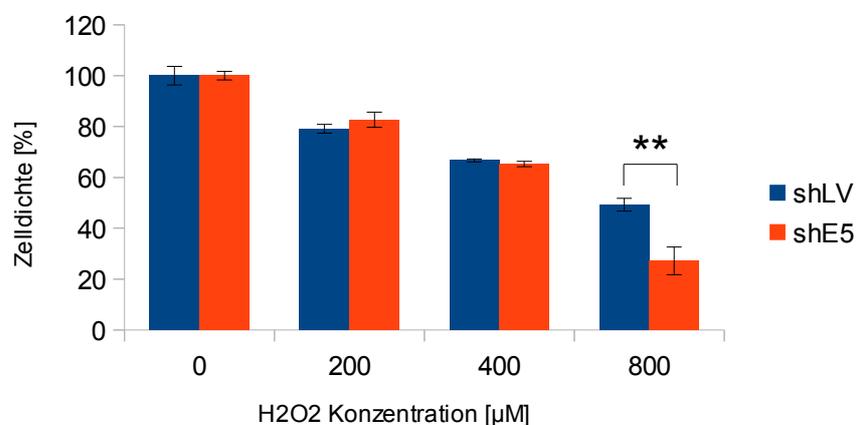


Abbildung 23: Einfluss des EMP3 Knockdowns auf den H_2O_2 -induzierten Zelltod. Angegeben ist die Zelldichte nach 24h unter Behandlung relativ zur unbehandelten Kontrolle, als Mittelwert \pm SD (Triplikate).

H_2O_2 (Abb. 23): Bei einer H_2O_2 Konzentration von 200 μ M und 400 μ M zeigte sich zunächst kein signifikanter Unterschied zwischen den shLV Kontrollzellen und den shE5 Knockdown-Zellen, beide Zellpopulationen nahmen gleich stark ab. Auf die höchste eingesetzte Konzentration von 800 μ M reagierten die shE5-Zellen jedoch signifikant empfindlicher als die shLV-Zellen ($p=0,003$), hier war die Zelldichte relativ zur unbehandelten Kontrolle um 79% reduziert, während bei den shLV-Zellen die Zelldichte nur um 51% abfiel.

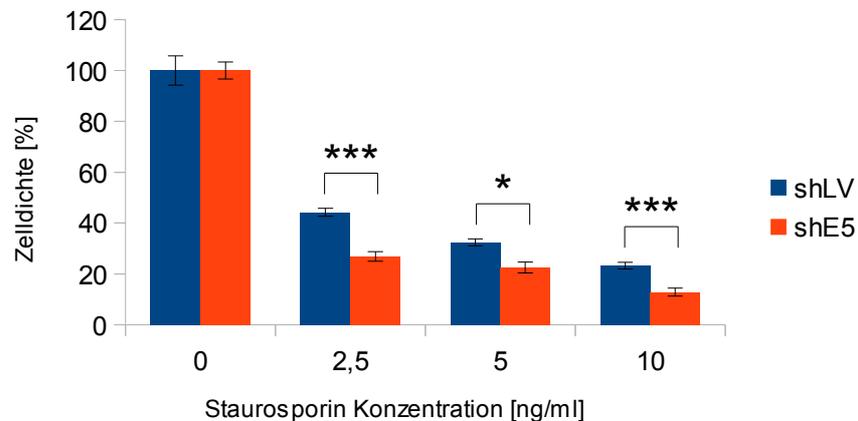


Abbildung 24: Einfluss des EMP3 Knockdowns auf den Staurosporin-induzierten Zelltod. Angegeben ist die Zelldichte nach 24h unter Behandlung relativ zur unbehandelten Kontrolle, als Mittelwert \pm SD (Triplikate).

Staurosporin (Abb. 24): Behandlung mit Staurosporin führte bei beiden getesteten Zelllinien zu einer insgesamt stärkeren Abnahme der Zellzahl als bei H_2O_2 Behandlung. Bei allen drei Konzentrationsstufen war die Zellzahl der Knockdown-Zellen dabei signifikant stärker reduziert als bei den Kontrollzellen. Bei einer Staurosporin Konzentration von 2,5 ng/ml nahm die Zellzahl der shLV-Zellen um 56% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ab, während bei den shE5-Zellen eine Abnahme um 74% beobachtet werden konnte ($p < 0,001$). Ein ähnliches Bild zeigte sich ebenfalls bei den beiden höheren Konzentrationsstufen 5 ng/ml (shLV: 68%, shE5: 78%; $p = 0,03$) und 10 ng/ml (shLV: 77%, shE5: 88%; $p < 0,001$).

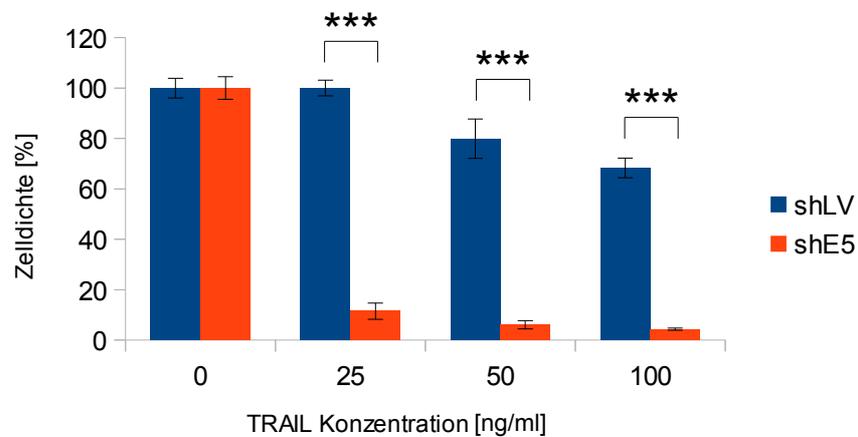


Abbildung 25: Einfluss des EMP3 Knockdowns auf den TRAIL-induzierten Zelltod. Angegeben ist die Zelldichte nach 24h unter Behandlung relativ zur unbehandelten Kontrolle, als Mittelwert \pm SD (Triplikate).

TRAIL (Abb. 25): Der stärkste differenzielle Effekt zeigte sich bei der Behandlung mit TRAIL. Während bei den shLV Kontrollzellen keine Reaktion auf die niedrigste TRAIL Konzentration (25 ng/ml) beobachtet werden konnte (0%), brach die Zellzahl der shE5-Zellen bei dieser Konzentration bereits signifikant ein (Reduktion um 89%) ($p < 0,001$). Bei erhöhter TRAIL Konzentration von 50 ng/ml reagierten auch die Kontrollzellen mit einer Abnahme der Zellzahl, allerdings war auch hier der Effekt auf die Knockdown-Zellen signifikant stärker (shLV: 20%, shE5: 94%; $p < 0,001$). Gleiches konnte bei einer Konzentration von 100 ng/ml beobachtet werden (shLV: 32%, shE5: 96%; $p < 0,001$).

3.8.4 Einfluss des EMP3 Knockdowns auf Schlüsselproteine verschiedener Signalwege

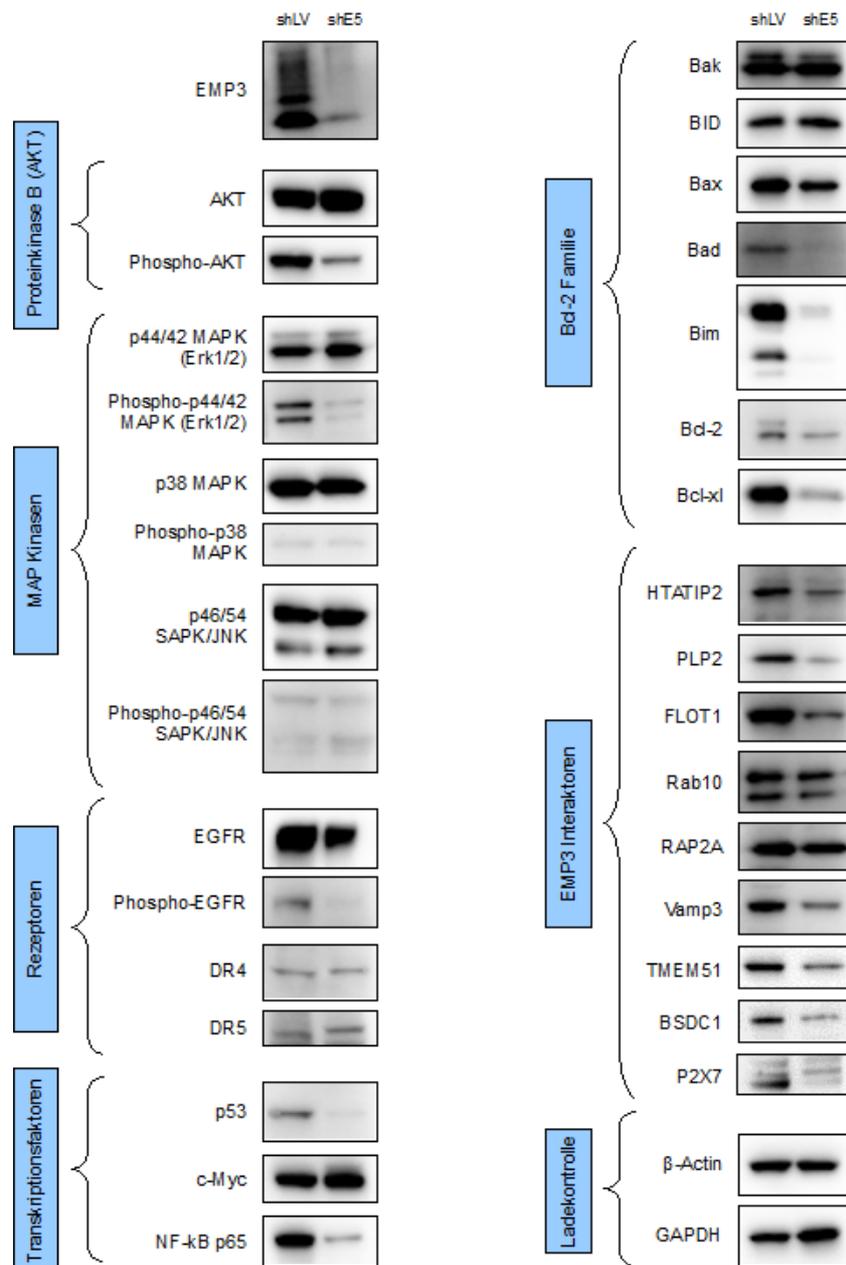


Abbildung 26: Knockdown von EMP3 vermindert die Expression und/oder Aktivierung verschiedener Schlüsselproteine. Dargestellt ist die Westernblot-Analyse von Proteinextrakten aus HT-1080 Zellen die mit dem Leervektor (linke Bande) oder dem shE5 Vektor (rechte Bande) transfiziert wurden.

Die Westernblot-Analyse der Proteinextrakte der Leervektor- und shE5-transfizierten Zellen zeigte, dass Schlüsselproteine mehrerer Signalwege verminderte Proteinlevel oder verminderte Phosphorylierungslevel aufwiesen. Bei Proteinkinase B (AKT) und den MAP Kinasen ERK1/2 war die Gesamtmenge der jeweiligen Proteine in den beiden Zelllinien gleich. Der Anteil an phosphoryliertem Protein war dagegen sowohl bei AKT, als auch bei ERK in den EMP3-Knockdown Zellen reduziert. Keine Unterschiede in den Protein- und Phosphorylierungsleveln zwischen den Zelllinien zeigten sich bei den MAP Kinasen p38 und JNK.

Ebenfalls reduziert waren EGFR und Phospho-EGFR, sowie die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und p53. Nicht verändert waren die TRAIL-Rezeptoren "Deathreceptor 4 & 5" (DR4, DR5) und der Transkriptionsfaktor c-Myc.

Bei den Apoptose-regulierenden Mitgliedern der Bcl-2 Familie waren Bad, Bim, Bcl-2 und Bcl-xl reduziert, während bei Bid, Bak und Bax keine Unterschiede zu beobachten waren. Die Mehrzahl der EMP3 Interaktoren (siehe Abschnitt 3.9) wiesen ebenfalls reduzierte Proteinlevel auf, darunter HTATIP2, PLP2, FLOT1, VAMP3, TMEM51, BSDC1 und P2X7. Keine oder nur geringfügige Veränderungen zeigte sich nur bei Rab10 und Rap2a. Die Interaktoren PLN und CMTM5 konnten im Westernblot nicht dargestellt werden.

3.9 Interaktionsanalyse

3.9.1 Split-Ubiquitin Screening (SU)

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Split-Ubiquitin Screens zusammengefasst dargestellt. Insgesamt konnten über den Screen 10 potentielle neue Interaktionspartner von EMP3 identifiziert werden. Der bekannte Interaktor P2RX7 wurde im Screen als Positivkontrolle eingesetzt.

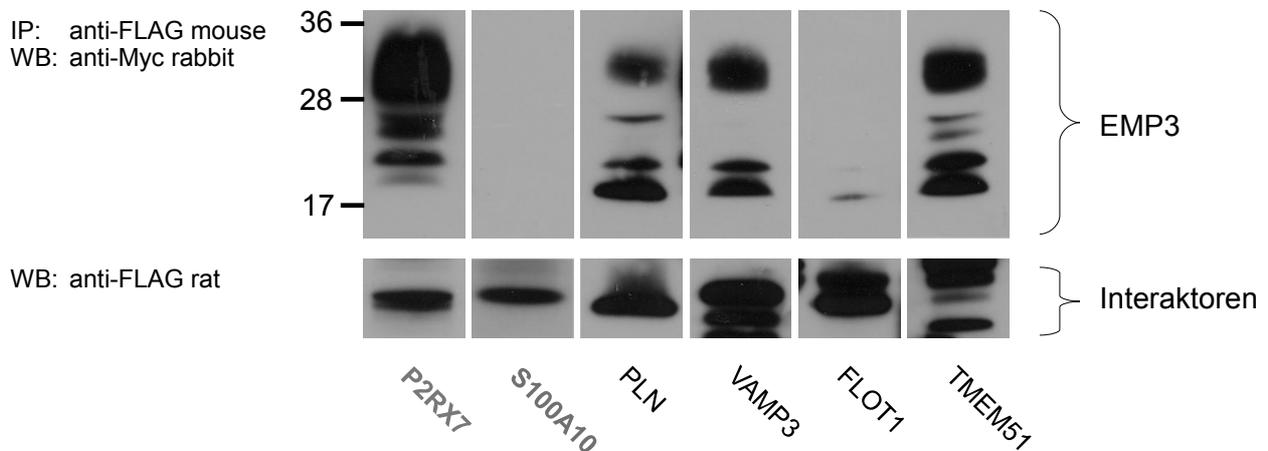
Bezeichnung	Kürzel	Größe	Lokalisation	Funktion/zellulärer Prozess
P2X purinoreceptor 7	P2X7, P2RX7	595 AS	ZM	Liganden-gesteuerter Ionenkanal, Cytokin-Ausschüttung, Apoptose
Cardiac Phospholamban	PLN, PLB	52 AS	M, ZM, ER/SR	SERCA2 Calcium-Kanal-Regulator, Überleben
HIV-1 Tat interactive protein 2	HTATIP2, TIP30	243 AS	KM, ZP	Kerntransport-Regulator, Tumor- Suppressor, Apoptose, Vesikelfusion
Proteolipid protein 2	PLP2, A4	152 AS	ZM, ER	Chemokin-Signaltransduktion, Ionenkanal-Aktivität, Chemotaxis, Proliferation, Überleben
CKLF-like MARVEL transmembrane domain- containing protein 5	CMTM5, CKLFSF5	223 AS	ZM	Cytokin Aktivität, Anti-Proliferative Aktivität, Apoptose
Ras-related protein Rap-2A	RAP2A	183 AS	ZM, Golgi, V	GTPase Aktivität, Signaltransduktion
Ras-related protein Rab-10	RAB10	200 AS	ER, Golgi, V	GTPase Aktivität, Vesikeltransport
Vesicle-associated membrane protein 3; Cellubrevin	VAMP3, SYB3	100 AS	ZM, V	v-SNARE, Vesikeltransport/-fusion
BSD domain-cotaining 1	BSDC1	430 AS	unbekannt	unbekannt
Flotillin-1	FLOT1	427 AS	ZM, V, N	Strukturprotein von Membran- Mikrodomänen, Signaltransduktion, Endozytose, Proliferation
Transmembrane protein 51	TMEM51	253 AS	(ZM)	unbekannt

Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse des Split-Ubiquitin Screenings. AS = Aminosäuren, ZM = Zellmembran, M = Mitochondrien, ER/SR = Endoplasmatisches/Sarkoplasmatisches Retikulum, ZP = Zytoplasma, V = Vesikel, N = Nukleus.

3.9.2 Co-Immunoprecipitation (Co-IP)

In der Co-IP konnten 9 der 10 neuen, bisher unbekanntem Interaktionspartner aus dem Split-Ubiquitin-Screen verifiziert werden. Dabei wurden die jeweiligen Interaktoren als FLAG-Tag Fusionsproteine mit EMP3-Myc zusammen in LN319 Zellen co-transfiziert und die Lysate in der IP eingesetzt. Die Immunopräzipitation erfolgte über an Sepharose-Beads gebundenen Anti-FLAG-Antikörper. Nach der Elution der Proteinkomplexe von der Matrix und Auftrennung über SDS-Page wurden die Interaktoren mittels Anti-FLAG- und das co-präzipitierte EMP3 mittels Anti-Myc-Antikörpern im Westernblot detektiert. Die Westernblot-Ergebnisse der Co-IP sind in Abbildung 27 dargestellt.

A



B

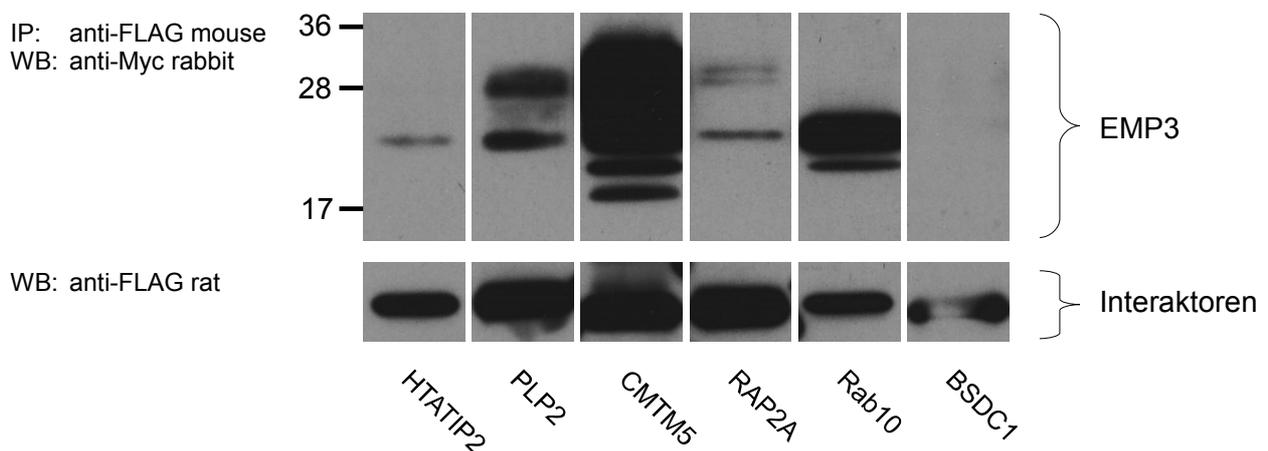


Abbildung 27: Validierung der potentiellen Interaktionspartner über Co-Immunopräzipitation. Gezeigt sind die Westernblots der Co-IP Eluate, die Detektion erfolgte mit Anti-Myc rabbit (Detektion von EMP3-Myc, obere Reihe) und mit Anti-FLAG rat (Detektion er FLAG-getagten Interaktoren, untere Reihe). A) Co-IP mit P2RX7 (Positivkontrolle), S100A10 (Negativkontrolle), PLN, VAMP3, FLOT1 und TMEM51. (Größenangaben links in kDa).

Um die Funktionalität des Assays zu überprüfen, diente der bereits bekannte EMP3 Interaktionspartner P2X7 als Positivkontrolle. Unspezifische Bindungseffekte an der Matrix und unzureichende Wasch-Effektivität als Quelle für falsch-positive Ergebnisse konnten durch Verwendung eines nicht mit EMP3 interagierenden Proteins (S100A10) als Negativkontrolle ausgeschlossen werden.

Wie Abbildung 27 zeigt, konnte in 9 von 10 Fällen im Westernblot neben den Interaktoren auch co-präzipitiertes EMP3-Myc nachgewiesen werden. Einzige Ausnahme war dabei BSDC1. Die Mengen von co-präzipitiertem EMP3-Myc unterschieden sich dabei zwischen den einzelnen Interaktoren. Überwiegend zeigte sich bei den Co-IPs das auf die Glykosylierung zurück zu führende Mehrfachbandenmuster (siehe 3.7), allerdings unterschieden sich die Verteilung beziehungsweise das Muster der Banden von nicht-co-präzipitiertem EMP3-Myc. Ebenso zeigten sich deutliche Unterschiede im Muster zwischen den EMP3-Myc-Banden die mit verschiedenen Interaktoren co-präzipitiert wurden. Eine Co-IP mit EMP3^{N47A}-Myc, EMP3^{Δ91-163}-Myc und EMP3^{Δ1-90}-Myc und den Interaktoren zeigte kein Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

3.9.3 Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)

Für den BiFC Assay wurden EMP3 und jeweils ein Interaktionspartner C-terminal an je eine Hälfte eines RFP fusioniert. Bei ausreichend naher Co-Lokalisation der beiden Proteine in der Zelle konnten sich die beiden Hälften des RFP spontan rekonstituieren und ein Fluoreszenzsignal erzeugen. Dazu wurden zwei verschiedenen Vektoren mit EMP3-SplitRFP und (Interaktor)-SplitRFP in HT-1080 Zellen transfiziert, nach 24h fixiert und unter dem Mikroskop analysiert. Auch bei diesem Assay wurde P2RX7 als Positivkontrolle eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten S100A10 und CKS1B. Die Ergebnisse des BiFC Assays sind in den Abbildungen 28, 29 und 30 dargestellt und in Tabelle 7 zusammengefasst aufgeführt.

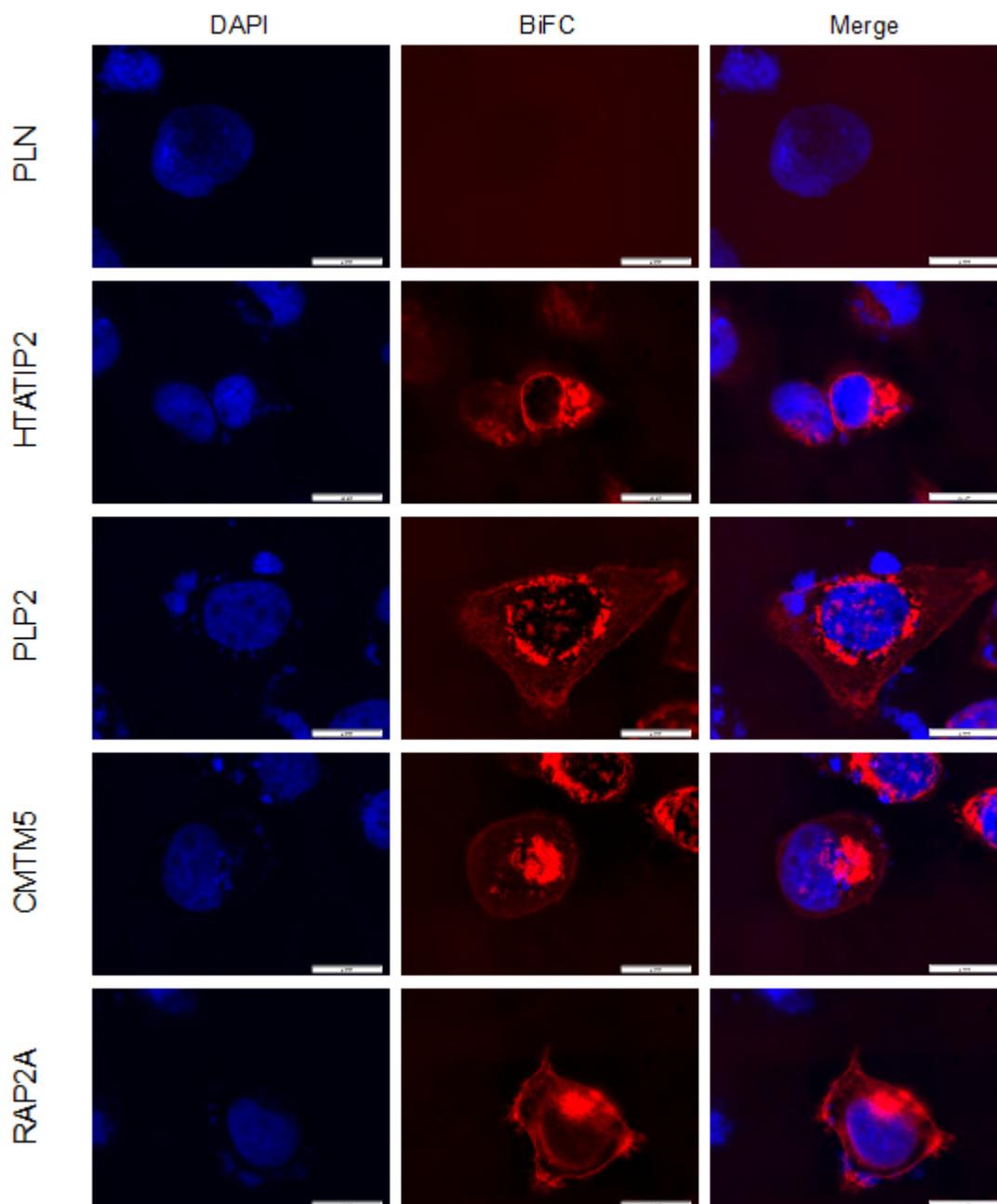


Abbildung 28: Fluoreszenzaufnahmen des BiFC Assays in HT-1080 Zellen mit den Interaktoren PLN, HTATIP2, PLP2, CMTM5 und RAP2A. Das BiFC Signal ist in Rot dargestellt, die Zellkerne sind blau eingefärbt (DAPI). Der weiße Balken repräsentiert 20 μm .

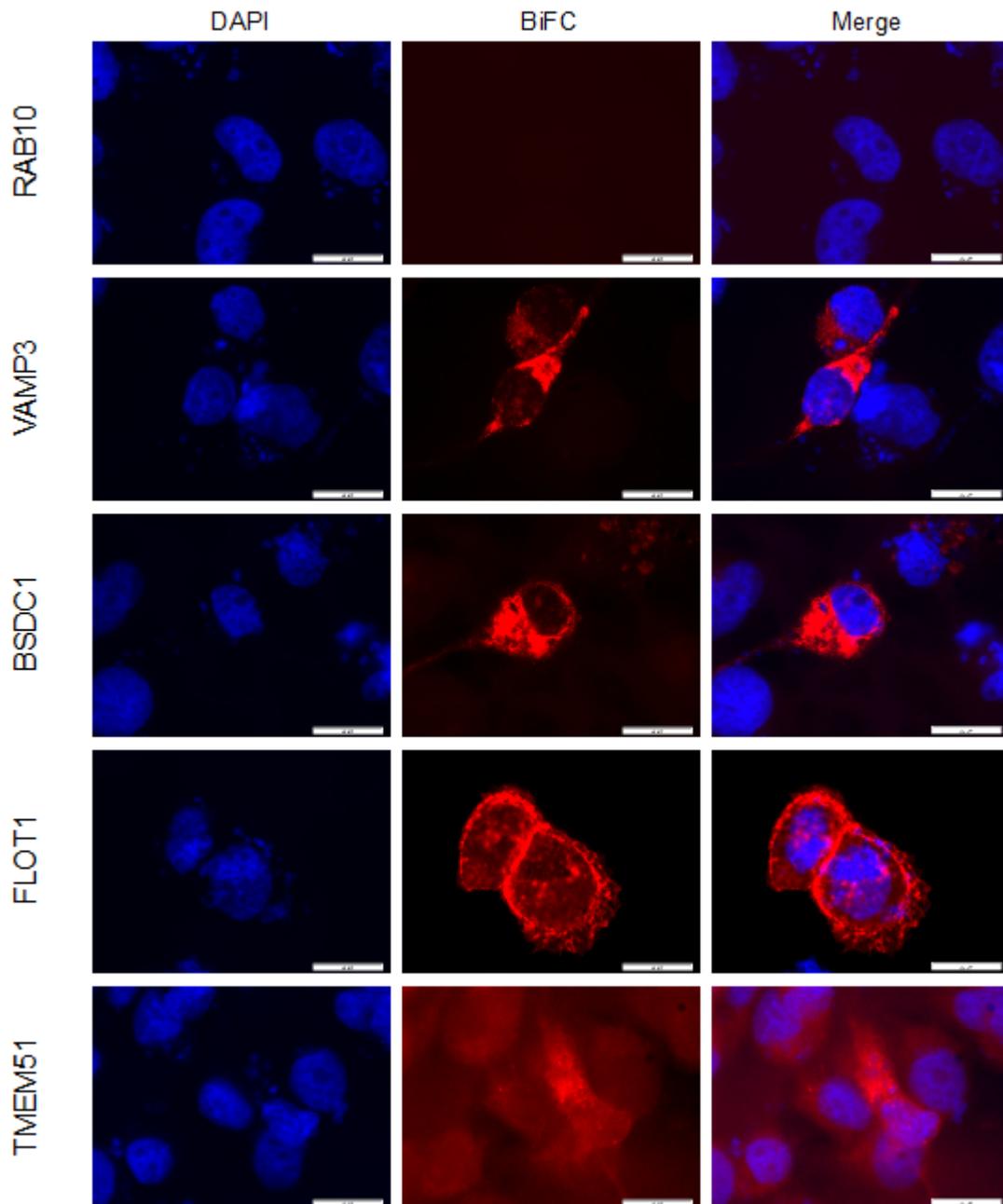


Abbildung 29: Fluoreszenzaufnahmen des BiFC Assays in HT-1080 Zellen mit den Interaktoren Rab10, VAMP3, BSDC1, FLOT1 und TMEM51. Das BiFC Signal ist in Rot dargestellt, die Zellkerne sind blau eingefärbt (DAPI). Der weiße Balken repräsentiert 20 μm .

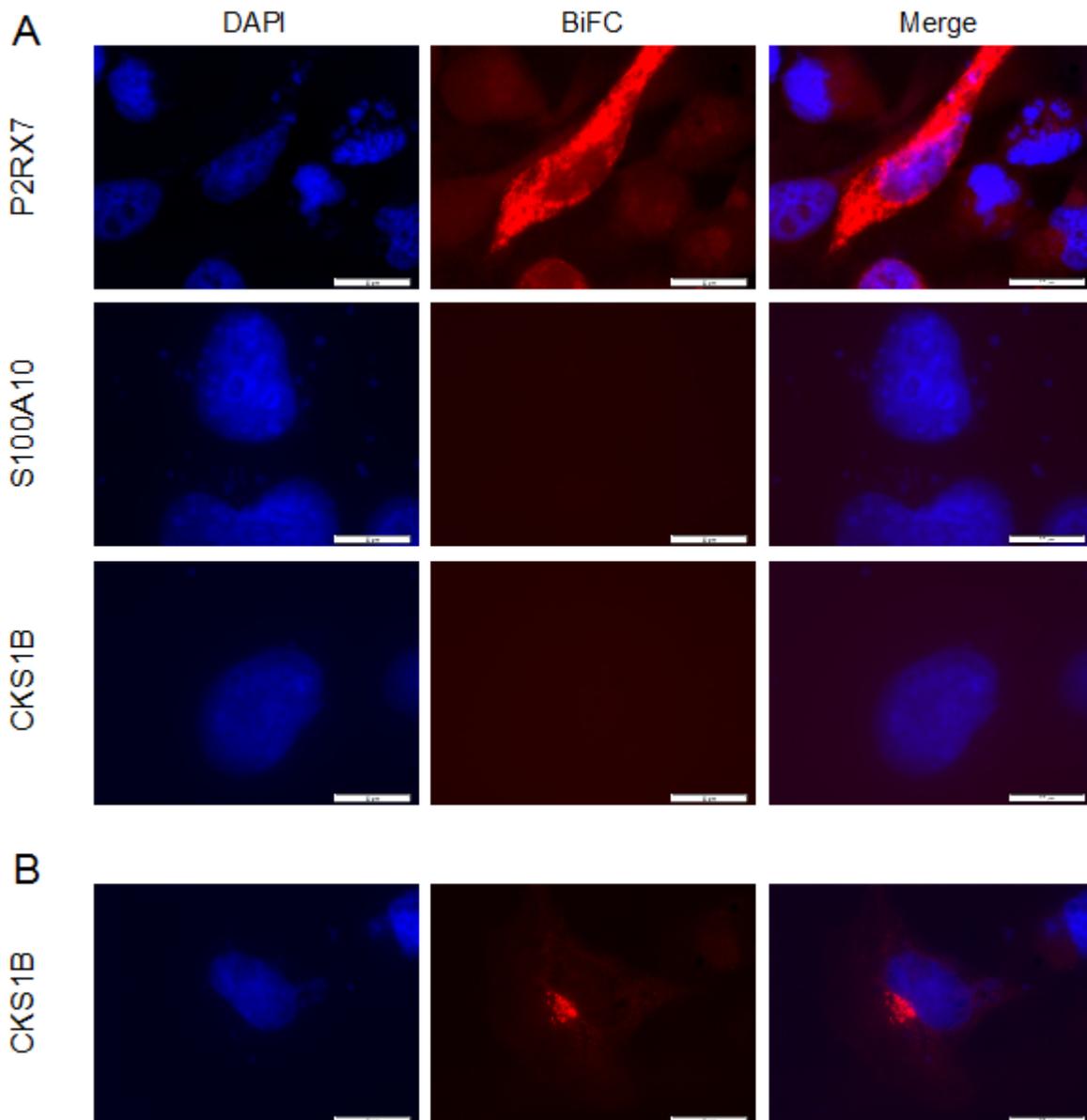


Abbildung 30: A) Fluoreszenzaufnahmen des BiFC Assays in HT-1080 Zellen mit dem Interaktor P2X7 (Positivkontrolle) sowie S100A10 und CKS1B (Negativkontrollen). B) Darstellung einer positiven Zelle in der Negativkontrolle mit CKS1B. Das BiFC Signal ist in Rot dargestellt, die Zellkerne sind blau eingefärbt (DAPI). Der weiße Balken repräsentiert 20 μm .

Mit dem BiFC Assay konnten 9 von 11 Interaktionen ebenfalls bestätigt werden. Die Ausnahme bildeten PLN und Rab10, bei denen sich auch nach mehrmaligen Wiederholungen kein Signal beobachten ließ, unabhängig von der Vektor-Kombination (Abb. 28, 29). Die BiFC Signale konnten dabei in etwa 40 - 60% der Zellen beobachtet werden. In den meisten Fällen entsprach die Lokalisation des BiFC Signals der erwarteten Lokalisation des jeweiligen Interaktors, mit Ausnahme von TMEM51 und P2X7 (siehe

Tabelle 5). Bei den Negativkontrollen trat in etwa 1 - 5% der Zellen ein schwaches granuläres Signal im Zytoplasma auf (Abb. 30b).

Sehr häufig auch Zellen beobachtet werden, die ein Signal zeigten, aber starke morphologische Veränderungen und Auflösungserscheinungen der Membran, des Zytoplasmas und der Kerne aufwiesen (Abb. 31).

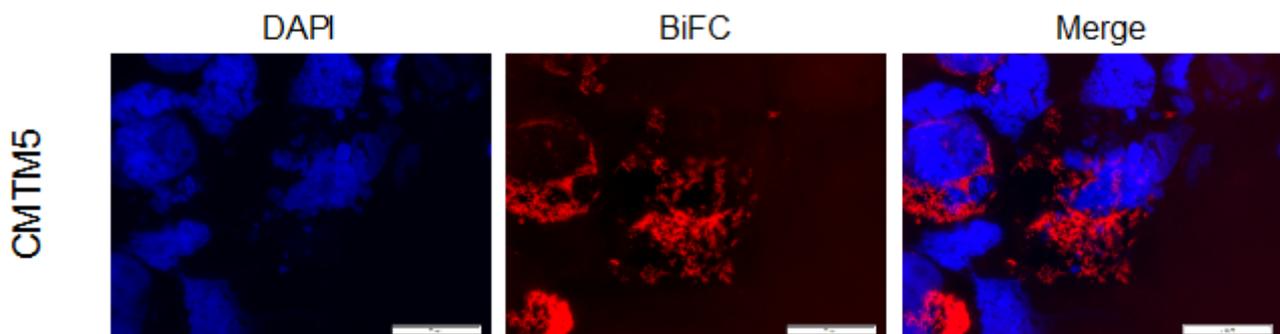


Abbildung 31: Fluoreszenzaufnahme des BiFC Assays in HT-1080 Zellen mit dem Interaktor CMTM5. Das BiFC Signal ist in Rot dargestellt, die Zellkerne sind blau eingefärbt (DAPI). Der weiße Balken repräsentiert 20 µm.

Interaktor	Lokalisation	Signalstärke	Anmerkungen
PLN	Kein Signal	---	---
HTATIP2	Zytoplasmatisch (fokal)	stark	---
	Perinukleär	stark	
PLP2	Perinukleär/Zytoplasmatisch	stark	---
	Zellmembran	schwach	
	Zytoplasmatisch	schwach	
CMTM5	Zytoplasmatisch (fokal)	stark	---
	Zellmembran	schwach	
RAP2A	Zytoplasmatisch (fokal)	stark	---
	Zellmembran	stark	
	Perinukleär	schwach	
Rab10	Kein Signal	---	---
VAMP3	Zytoplasmatisch	stark	---
BSDC1	Zytoplasmatisch	stark	---
FLOT1	Zytoplasmatisch	schwach	---
	Zellmembran	stark	
TMEM51	Zytoplasmatisch	sehr schwach	---
P2X7	Zytoplasmatisch	stark	Positivkontrolle
S100A10	Kein Signal	---	Negativkontrolle
CKS1B	Kein Signal	---	Negativkontrolle

Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse des BiFC Assays.

3.9.4 Proximity Ligation Assay (PLA)

Für den Proximity Ligation Assay wurden jeweils zwei primäre Antikörper aus verschiedenen Spezies (Maus und Kaninchen) verwendet, Anti-EMP3 K158 war dabei immer der Maus-Antikörper, während für die Interaktoren kommerziell erhältliche Antikörper aus Kaninchen verwendet wurden. Alle Antikörper wurden dabei zunächst in einer normalen Immunfluoreszenz an den Paraffin-Schnitten auf ihre Eignung getestet. Die PLAs wurden an FFPE-Schnitten von C32 und HEK293T Zellen durchgeführt. Auf jedem Schnitt waren beide Zelltypen vorhanden, wobei die HEK293T Zellen als interne Negativkontrolle dienten, da bei fehlender EMP3 Expression auch kein Signal erzeugt werden sollte. C32 Zellen wiesen eine relativ starke, HEK293T Zellen dagegen eine sehr geringe EMP3 Expression auf (siehe 3.6). Als weitere Kontrolle wurde der Assay zusätzlich mit einem Antikörper gegen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt, welches nicht mit EMP3 interagieren und daher ebenfalls kein Signal liefern sollte. Als Positivkontrolle diente P2X7.

Die Detektion erfolgte über die PLA Plus und Minus Sonden. Für die Etablierung des Assays wurden für jedes Primärantikörper-Paar beide möglichen Kombinationen ausgetestet (Maus Plus + Kaninchen Minus oder Maus Minus + Kaninchen Plus). Die Ergebnisse der Testung sind in Tabelle 6 aufgeführt. In 7 von 11 Fällen (ohne die Negativkontrolle) lieferte der Assay jeweils nur in einer der beiden Sonden-Kombinationen ein Signal, während in 4 Fällen beide Kombinationen funktionierten. In der Regel generierte die Kombination Maus PLUS + Kaninchen MINUS ein stärkeres oder ebenso starkes Signal wie die umgekehrte Kombination, lediglich im Falle von Rab10 lieferte Maus MINUS + Kaninchen PLUS ein besseres Ergebnis.

Antikörper Maus	Antikörper Kaninchen	Maus PLUS / Kaninchen MINUS	Maus MINUS / Kaninchen PLUS
Anti-EMP3 (K158)	Anti-PLN	(+)	-
Anti-EMP3 (K158)	Anti-HTATIP2	+	-
Anti-EMP3 (K158)	Anti-PLP2	+	-
Anti-EMP3 (K158)	Anti-CMTM5	+	-
Anti-EMP3 (K158)	Anti-RAP2A	+	-
Anti-EMP3 (K158)	Anti-Rab10	(+)	+
Anti-EMP3 (K158)	Anti-VAMP3	+	+
Anti-EMP3 (K158)	Anti-BSDC1	+	-
Anti-EMP3 (K158)	Anti-FLOT1	+	+
Anti-EMP3 (K158)	Anti-TMEM51	+	+
Anti-EMP3 (K158)	Anti-P2RX7	+	-
Anti-EMP3 (K158)	Anti-GAPDH	-	-

Tabelle 6: Ergebnisse der Sonden-Testung für den Duolink PLA. Ein auswertbares, starkes Signal ist für die jeweiligen Sonden-Kombinationen als „+“, ein schwaches Signal als „(+)" und kein Signal als „-“ aufgeführt.

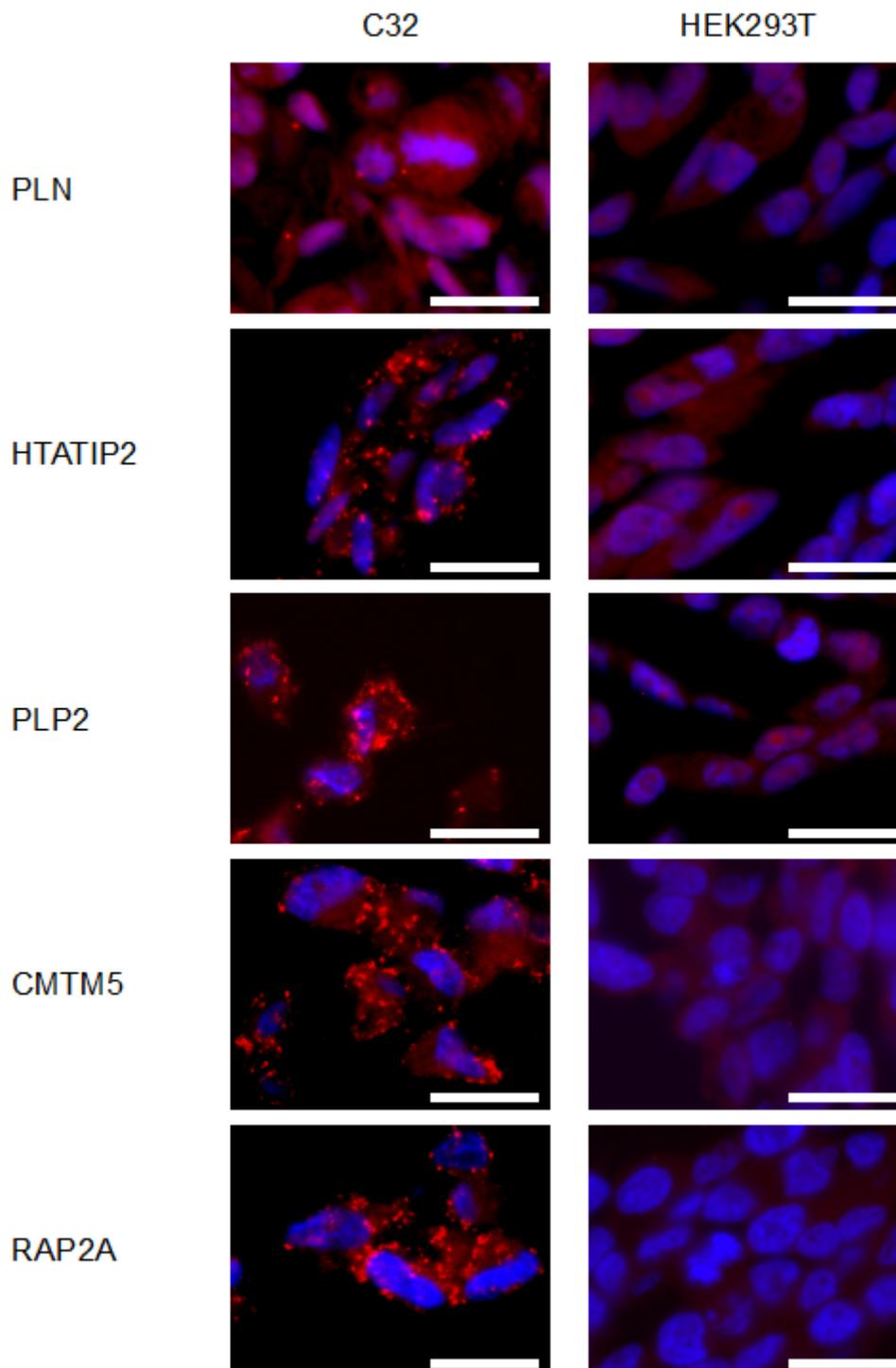


Abbildung 32: Fluoreszenzaufnahmen der Duolink PLAs mit den Interaktoren PLN, HTATIP2, PLP2, CMTM5 und RAP2A. In der linken Spalte sind jeweils die C32 Zellen und in der rechten Spalte die HEK293T Zellen dargestellt. Die roten punktförmigen Signale zeigen eine Interaktion an, die Kerne wurden mit DAPI blau eingefärbt. Der weiße Balken repräsentiert 20 μm .

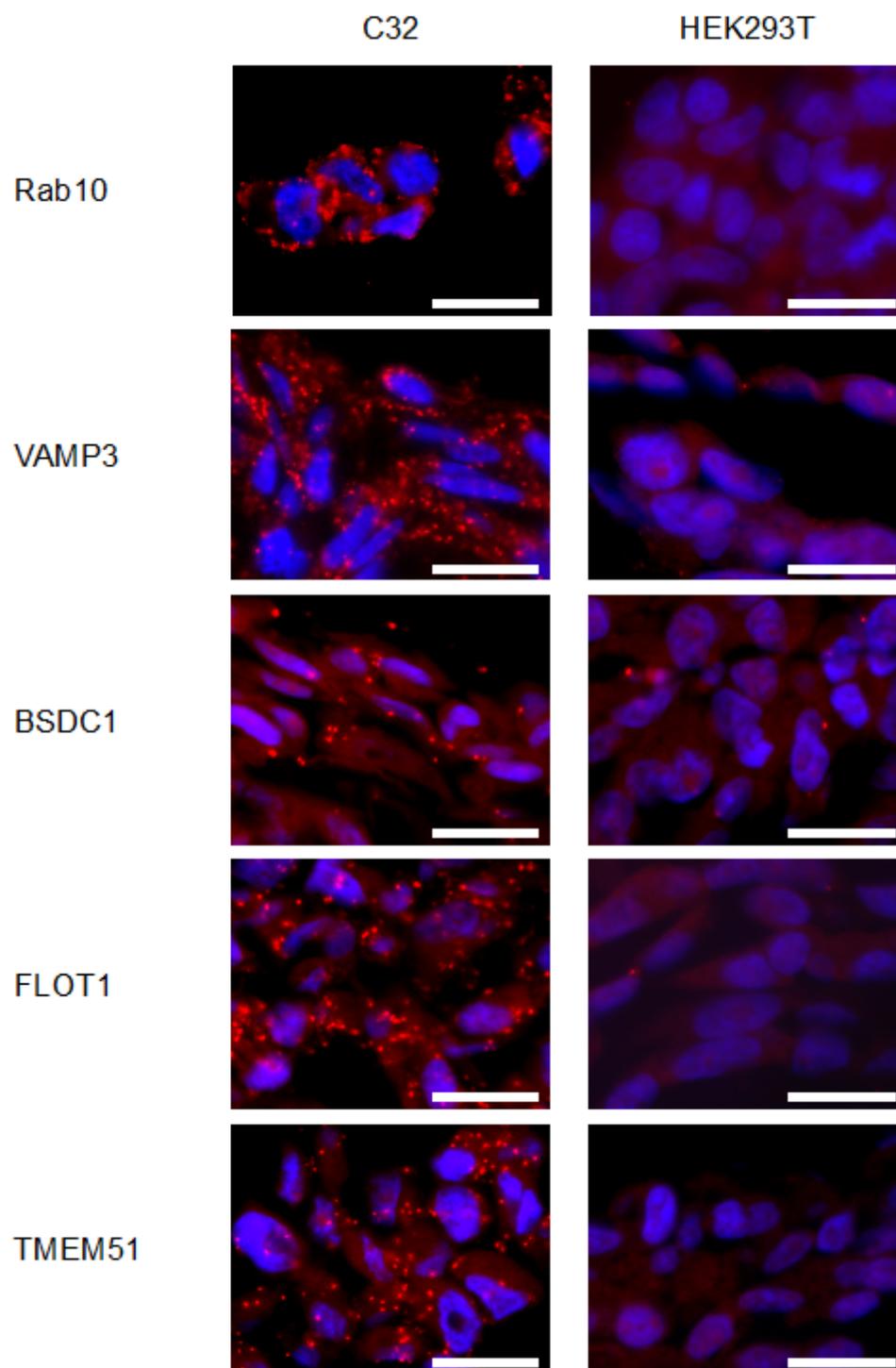


Abbildung 33: Fluoreszenzaufnahmen der Duolink PLAs mit den Interaktoren Rab10, VAMP3, BSDC1, FLOT1 und TMEM51. In der linken Spalte sind jeweils die C32 Zellen und in der rechten Spalte die HEK293T Zellen dargestellt. Die roten punktförmigen Signale zeigen eine Interaktion an, die Zellkerne wurden mit DAPI blau eingefärbt. Der weiße Balken repräsentiert 20 μm .

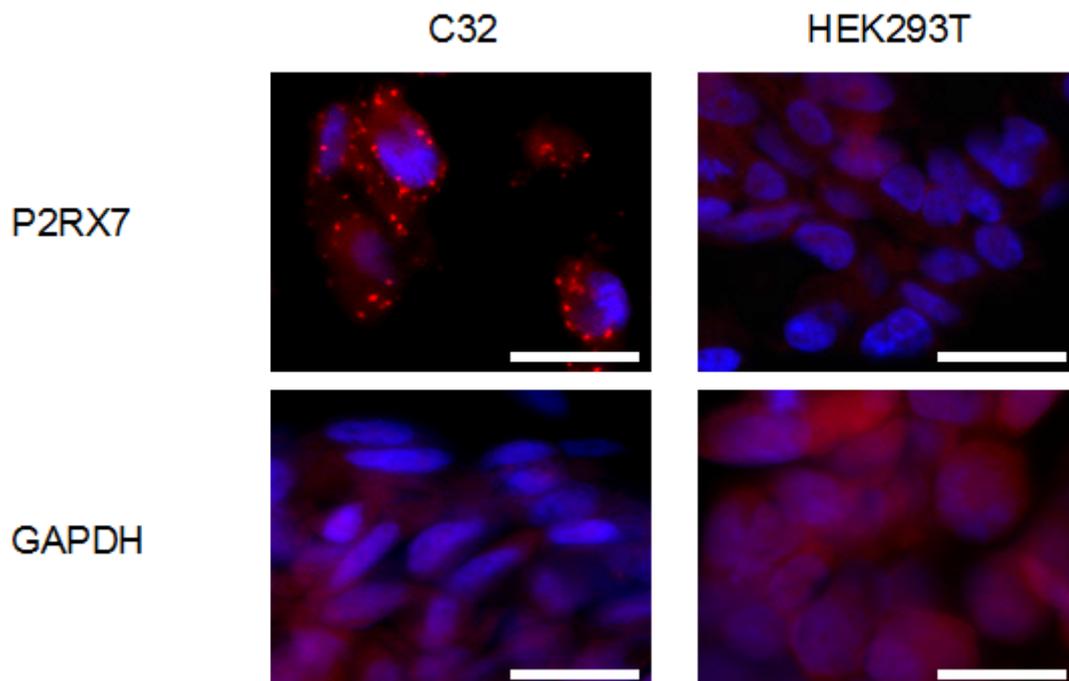


Abbildung 34: Fluoreszenzaufnahmen der Duolink PLAs mit dem Interaktor P2X7 (Positivkontrolle), sowie GAPDH (Negativkontrolle). In der linken Spalte sind jeweils die C32 Zellen und in der rechten Spalte die HEK293T Zellen dargestellt. Die roten punktförmigen Signale zeigen eine Interaktion an, die Zellkerne wurden mit DAPI blau eingefärbt. Der weiße Balken repräsentiert 20 μm .

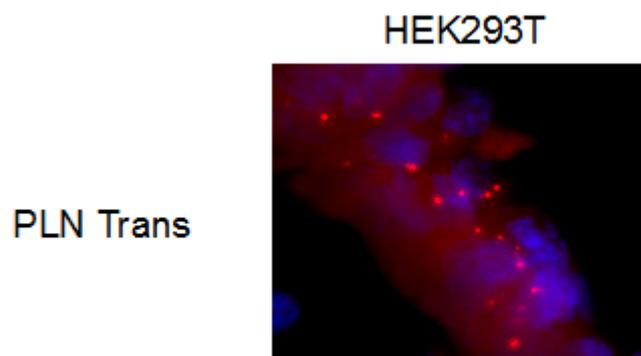


Abbildung 35: Fluoreszenzaufnahme des Duolink PLAs mit dem Interaktor PLN auf mit PLN und EMP3 co-transfizierten HEK293T Zellen. Die roten punktförmigen Signale zeigen eine Interaktion an, die Zellkerne wurden mit DAPI blau eingefärbt.

Die Ergebnisse des Proximity Ligation Assays sind in Abbildung 32, 33 und 34 dargestellt. In 10 von 11 Fällen war in den C32 Zellen ein deutliches Signal vorhanden. Die einzige Ausnahme war PLN, bei dem nur ein extrem schwaches Signal zu erkennen war. In einem zweiten Versuch wurden zusätzlich mit PLN und EMP3 co-transfizierte HEK293T Zellen in den PLA mit aufgenommen und bei diesen konnte ein stärkeres Fluoreszenzsignal beobachtet werden (Abb. 35). Die Fluoreszenzsignale unterschieden sich in ihrer Anzahl und Intensität zwischen den einzelnen Interaktoren, wobei sie bei PLP2, HTATIP2, TMEM51 und FLOT1 am stärksten ausgeprägt waren. Die Lokalisationen der Interaktionen sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die genaue Lokalisation der Interaktionen ließ sich jedoch nicht in jedem Fall zweifelsfrei feststellen, besonders im Inneren der Zelle war eine Zuordnung der punktuellen Signale zu bestimmten Organellen oder Strukturen in der Regel nicht möglich. Daher ist in Tabelle 6 für Signale die sich nicht im Kern oder an der Membran befinden lediglich „Zytoplasma“ als Lokalisation angegeben. Ein Versuch eine zusätzliche Abgrenzung durch eine Fluoreszenzanfärbung bestimmter Zellstrukturen auf einer anderen Anregungswellenlänge zu erreichen, war nicht erfolgreich.

Die Kontrollen lieferten überwiegend das erwartete Ergebnis, die HEK293T Zellen waren 9/12 Experimenten vollständig negativ, nur bei VAMP3, FLOT1 und BSDC1 zeigten sich dort vereinzelte Signale, welche allerdings sehr viel schwächer ausfielen als in den C32 Zellen (Abb. 33). Die Positivkontrolle mit Anti-P2X7 lieferte ein Signal während der Kontrollversuch mit Anti-GAPDH negativ ausfiel (Abb.34).

Interaktor	Lokalisation	Signalstärke C32	Signalstärke HEK
PLN	(Zellmembran)	Sehr schwach	Kein Signal
HTATIP2	Zytoplasma	Stark	Kein Signal
PLP2	Zellmembran Zytoplasma	Stark	Kein Signal
CMTM5	Zellmembran Zytoplasma	Stark	Kein Signal
RAP2A	Zellmembran Zytoplasma	Stark	Kein Signal
Rab10	Zellmembran Zytoplasma	Stark	Kein Signal
VAMP3	Zytoplasma	Stark	Vereinzelte Signale
BSDC1	(Zellmembran)	Schwach	Sehr schwach
FLOT1	Zellmembran Zytoplasma	Stark	Vereinzelte Signale
TMEM51	Zellmembran Zytoplasma	Stark	Kein Signal
P2RX7	Zellmembran	Stark	Kein Signal
GAPDH	Kein Signal	Kein Signal	Kein Signal

Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse der Duolink PLAs. Eingeklammerte Lokalisationen waren teilweise erkennbar aber nicht eindeutig zuzuordnen.

4 Diskussion

4.1 Methylierungsanalyse

4.1.1 Vergleichende Analyse des *MGMT* Promotermethylierungsstatus mit drei verschiedenen diagnostischen Methoden

Der *MGMT* Methylierungsstatus wird, als wichtiger prognostischer und prädiktiver Marker in Gliomen, mittlerweile in einer Vielzahl von Studien und auch in der Routinediagnostik standardmäßig erhoben. Allerdings besteht bisher kein allgemein akzeptierter Konsens, welche Methode in der Routine-Diagnostik und in größeren Studien-Kohorten zur Bestimmung des *MGMT* Methylierungsstatus am besten geeignet ist [82]. Teilweise können deutliche Abweichungen in den Methylierungsfrequenzen zwischen verschiedenen Methoden auftreten [83]. Vor diesem Hintergrund wurden an einer Serie klinisch dokumentierter Glioblastome, die mit Radio- und Chemotherapie behandelt wurden, drei Methoden zur Methylierungsanalyse verglichen. Die Tumore lagen in FFPE-konservierter Form vor, was der klinischen Routine am häufigsten entspricht. Das primäre Bewertungskriterium war dabei, welche Methode die genaueste Vorhersage des progressionsfreien Überlebens ermöglicht. Außerdem wurden als weitere Kriterien die Vorhersage des Gesamtüberlebens, sowie Kostenfaktoren und die praktische Handhabung und Umsetzbarkeit der jeweiligen Methoden herangezogen. Verglichen wurden drei gängige Methoden der Methylierungsanalyse. Dies umfasste eine qualitative Methode (MSP), eine semi-quantitative Methode (MS-MLPA) und eine quantitative Methode (PSQ). Von den untersuchten Methoden konnten allerdings nur MSP und PSQ die Vorhersage des progressionsfreien Überlebens signifikant gegenüber den klinischen Parametern, wie Alter und Karnofsky-Index, verbessern. PSQ ermöglichte dabei die genaueste Prognose des progressionsfreien Überlebens. Unter Berücksichtigung der sekundären Faktoren ist PSQ, aufgrund der relativ komplexen Handhabung und den hohen Kosten für spezielle Geräte und Reagenzien, technisch besser geeignet für Hochdurchsatzanalysen an größeren Fallserien. Für den klinisch-diagnostischen Routinebetrieb dagegen, stellt MSP aufgrund seiner einfachen Handhabung und geringen Kosten eine valide Alternative dar [78].

4.1.2 Analyse des *EMP3* Promotermethylierungsstatus in Gliomen

Der *EMP3* Methylierungsstatus wurde mittels Pyrosequencing an DNA aus insgesamt 99 Tumoren bestimmt. Dabei wurden zwei Primer-Paare eingesetzt, die insgesamt 6 CpGs der Promoterregion abdecken. Pyrosequencing liefert für jedes einzelne CpG im Lesebereich einen quantitativen Wert von 0% - 100%, der den Anteil des jeweiligen Nukleotids (entweder A/G oder T/C) an der betreffenden Stelle wiedergibt. Da durch die vorausgehende Bisulfitbehandlung unmethylierte Cytosin-Basen in Uracil und durch die folgende PCR in Thymin umgewandelt werden, kann anhand des prozentualen Wertes auf den Grad der Methylierung an dem jeweiligen CpG geschlossen werden [84, 85]. Dabei ist das Vorhandensein einer Methylierung an jedem einzelnen Cytosin eine reine Ja/Nein Information. Die kontinuierlichen Werte kommen dadurch zustande, dass in jedem Ansatz die DNA aus vielen verschiedenen Zellen mit potentiell unterschiedlichen Methylierungsmustern vorliegt. Für die Einteilung der Proben nach methyliert/unmethyliert müssen die kontinuierlichen, quantitativen Daten aus der PSQ Analyse zunächst wieder in eine Ja/Nein Information umgewandelt werden. Dazu wird ein Cut-off bestimmt, anhand dessen die Fälle als methyliert oder unmethyliert zugeordnet werden können. Mangels unabhängiger Parameter zur Validierung, konnte der Cut-off Wert für die quantitativen PSQ Methylierungsdaten im Fall der *EMP3* Methylierungsanalyse nicht statistisch berechnet werden, sondern musste abgeschätzt werden. Die Negativkontrollen generierten, im Durchschnitt aller abgefragten CpGs, Methylierungswerte von 5 – 10%. Anhand dessen und aufgrund der Erfahrungen aus der *MGMT* PSQ Methylierungsanalyse am UKT05 Tumorkollektiv [78], wurde der Cut-off Wert für die *EMP3* PSQ Methylierungsanalyse auf 15% festgelegt.

Die resultierenden Methylierungsfrequenzen der untersuchten Gliome sind dabei vergleichbar mit denen, die in anderen Studien dokumentiert wurden [60, 62]. Abweichungen, wie zum Beispiel die sehr hohe Methylierungsfrequenz von 93% in den AIII, sind vermutlich durch die relativ kleinen Fallzahlen zu erklären, durch die das Ergebnis verzerrt werden kann. Die signifikante Korrelation der *EMP3* Promotermethylierung mit dem 1p/19q Status und dem IDH Mutationsstatus deckt sich dabei ebenfalls mit den Ergebnissen der kürzlich veröffentlichten Studie von Mellai *et al.* [62], sowie im Bezug auf 19q Deletion mit den Ergebnissen der älteren Studie von Kunitz *et al.* [60].

4.2 Immunhistochemischer Nachweis von EMP3 in Geweben und Zelllinien

4.2.1 Antikörperentwicklung & methodische Aspekte

Der neu hergestellte Anti-EMP3 K158 monoklonale Mausantikörper der Subklasse IgG2 konnte erfolgreich für ein breites Anwendungsspektrum etabliert und eingesetzt werden. Um die Anwendungsbreite und die Spezifität zu maximieren, wurde zur Herstellung des Antikörpers ein Peptid verwendet, das der Aminosäuresequenz des ersten extrazellulären Loops des vollständigen EMP3 Proteins entspricht.

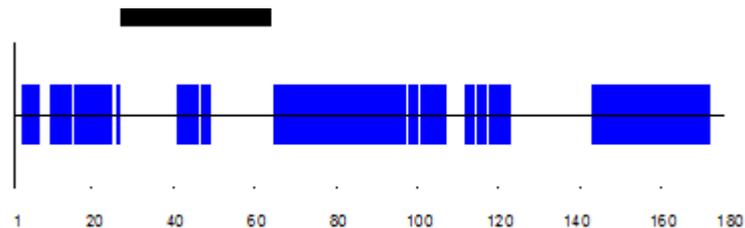


Abbildung 36: Homologie innerhalb der EMP/PMP22/MP20 Familie. Die blauen Bereiche repräsentieren Abschnitte in der Konsensus-Sequenz mit hoher Homologie zwischen den Proteinen der Familie. Der Schwarze Balken markiert den Abschnitt der zur Erstellung des Immunisierungs-Peptids herangezogen wurde. Darstellung wurde erstellt mit Vector NTI.

Dieser Abschnitt verfügt über eine relativ geringe Homologie zu den anderen Mitgliedern der Proteinfamilie, was die Wahrscheinlichkeit einer Kreuzreaktivität mit diesen Proteinen verringert (Abb. 36). Des weiteren ermöglicht der extrazelluläre Loop als Epitop die Bindung des Antikörpers an zellmembranständiges EMP3 ohne vorherige Permeabilisierung der Zellmembran. Dadurch sind Anwendungen an unpermeabilisierten Zellen, wie zum Beispiel FACS und Zellsortierung möglich, vorausgesetzt das Protein ist in vorausgesagter Weise in der Membran orientiert.

Die Reaktivität des Anti-EMP3 K158 Antikörpers gegen EMP3 aus anderen Spezies und gegen EMP1, EMP2, MP20 und PMP22 wurde nicht getestet. Kreuzreaktionen des Antikörpers mit anderen Mitgliedern der Proteinfamilie mit relativ hoher Homologie können daher nicht ausgeschlossen werden. Der unaufgereinigte K158 Überstand produziert im Vergleich zum aufgereinigten K158 Antikörper oder zum Anti-Myc-Tag-Antikörper im Westernblot ein stärkeres Hintergrundsignal und einige unspezifische Nebenbanden. Es handelt sich dabei vermutlich um unspezifische Bindungseffekte anderer Komponenten im Überstand. Solche Hintergrundeffekte durch den unaufgereinigten Überstand können theoretisch auch in der IF und IHC auftreten. Dennoch deuten die IHC und IF Färbungen auf eine deutlich bessere Sensitivität und Spezifität hin, als dies bei den kommerziell verfügbaren Anti-EMP3 Antikörpern der Fall ist (zum Vergleich siehe z.B. <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000142227/tissue>).

4.2.2 Nachweis von EMP3 in Normalgeweben

Bislang wurden in keiner Studie umfangreiche IHC basierte Daten zur Verteilung und Lokalisation von EMP3 in Normalgeweben gezeigt. EMP3 wurde als „in den meisten Körpergeweben expremiert“ beschrieben [50]. Eine differenzierte Aussage darüber, welche Zelltypen EMP3 wie stark expremieren, ließ sich aus den bisher verfügbaren Daten jedoch nicht ableiten, da diese auf der Messung von mRNA über qPCR-Verfahren basieren. Bei dieser Methode muss die mRNA zunächst aus einem Gewebestück extrahiert werden. Dies stellt eine potentielle Fehlerquelle dar und führt dazu, dass alle Informationen auf Einzelzell-Ebene verloren gehen. Der immunhistochemische Nachweis hingegen erlaubt Aussagen direkt auf Protein- und Zell-Ebene. In dieser Studie wurde erstmals eine Serie von verschiedenen Normalgeweben mittels immunhistochemischer Färbung hinsichtlich der EMP3 Proteinlevel untersucht.

Wie erwartet, konnte EMP3 in den meisten untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Dabei unterschieden sich die Quantität und die Lokalisation sowohl zwischen den Gewebetypen als auch den Zelltypen innerhalb eines Gewebes. Die stärkste EMP3 Färbung trat dabei in Leukozyten, Neuronen, astrozytären Zellen und Stromazellen auf. Insgesamt ist EMP3 in sehr verschiedenen Zelltypen und Kompartimenten innerhalb der Zellen lokalisiert, was darauf hindeutet, dass EMP3 unterschiedliche Funktionen in den

Zellen übernehmen kann. Andererseits tendieren gewisse Zelltypen dazu, in der IHC unspezifische Färbungen zu erzeugen, dazu gehören unter anderem auch Neurone und reaktive Astrozyten. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei der Anfärbung dieser Zellen um einen unspezifischen Effekt handelt.

Gehirn:

Im Gehirn exprimiert ein Großteil des Gewebes, abgesehen von einigen hervorstechenden Zelltypen, EMP3 nur sehr schwach. Die Lokalisation und die Morphologie der EMP3-positiven Zellen lässt darauf schließen, dass es sich dabei um Neuronen und astrozytäre Zellen handelt, möglicherweise auch um Mikroglia. Eine genauere Identifikation der EMP3 positiven Zellen würde eine parallele Immunfluoreszenzfärbung mit Anti-EMP3 K158, sowie Antikörpern gegen spezifische Marker für die entsprechenden Zellen, wie zum Beispiel „Glial Fibrillary Acidic Protein“ (GFAP) für Astrozyten oder CD11b für Mikroglia, erfordern. Intrazellulär liegt EMP3 in den oben genannten Zellen hauptsächlich zytoplasmatisch vor.

Besonders interessant war das Infarktpräparat, da hier eine sehr starke EMP3 Färbung, um die gesamte Infarktzone herum, beobachtet werden konnte. Dies ist sehr wahrscheinlich das Resultat einer reaktiven Gliose, bei der eine Einwanderung und Proliferation EMP3 positiver Zellen (Astrozyten, Mikroglia, Makrophagen) in der Infarktzone stattfindet. Dieser Prozess ist eine typische Reaktion auf Verletzungen, Infektionen oder Degeneration des Hirngewebes. Dabei werden zunächst Makrophagen und Mikroglia, später auch weitere gliale Zellen wie Oligodendrozyten und Astrozyten, beziehungsweise deren Vorläuferzellen zum Ort des Traumas rekrutiert. Die Zellen treten dabei in einen hypertrophen und proliferativen Zustand ein, während die Reste der beschädigten und abgestorbenen Zellen entfernt werden und die Traumazone durch proliferierende Astrozyten eingeschlossen und/oder aufgefüllt wird (gliale Narbe) [86, 87].

Die Ergebnisse der Knockout Experimente deuten darauf hin, dass EMP3 eine wichtige Rolle bei genau den zellulären Prozessen spielt, die bei einer Gliose aktiviert werden, dazu gehören Proliferation, Überleben und Migration [86]. Es ist daher denkbar, dass EMP3 eine direkte Rolle beim Prozess der Gliose spielt und die umliegenden und eingewanderten Zellen EMP3 gezielt hochregulieren. Dies würde sich mit der postulierten

Rolle von EMP3 bei Regenerationsprozessen des Nervensystems decken [71]. Die genauen Vorgänge bei einer Gliose sind nicht vollständig verstanden, es gilt jedoch als gesichert, dass an der Regulation des Prozesses diverse Cytokine beteiligt sind [86]. Interessanterweise sind einige Interaktionspartner von EMP3 in die Regulation der Cytokin-Signalübertragung involviert und spielen eine wichtige Rolle bei inflammatorischen Prozessen und zellulären Stressantworten. Dies gilt insbesondere für P2X7, dessen Rolle in diesen Prozessen gut dokumentiert ist [88-90]. Aber auch für die Interaktoren PLP2, Rap2a, VAMP3 und FLOT1 wurden Funktionen im Cytokin-Signaling und/oder in den JNK und p38 MAPK Signalwegen nachgewiesen [91-94].

Gliose ist ein notwendiger Prozess um das Gehirn vor weitergehenden Schäden zu schützen. Allerdings führt die Reaktion des Gewebes auch zu Problemen in Form einer heftigen Entzündungsreaktion durch die Freisetzung pro-inflammatorischer und zytotoxischer Cytokine und die excitotoxische Wirkung von freigesetztem Glutamat [86]. Als mögliche klinische Gegenmaßnahme wurde daher unter anderem die Inhibition von NF- κ B vorgeschlagen, das ein Schlüsselregulator von inflammatorischen Prozessen ist [95]. NF- κ B scheint direkt oder indirekt auch durch EMP3 reguliert zu werden, da der Knockdown von EMP3 die Proteinmenge von NF- κ B in den Zellen reduziert. Daher ist EMP3 möglicherweise nicht nur ein potentiell therapeutisches Target in Tumoren, sondern auch in anderen Prozessen, wie Gliose oder anderen entzündlichen Prozessen.

Eine reaktive Gliose kann in manchen Fällen in der histologischen Diagnostik mit einem diffusen Astrozytom verwechselt werden, besonders in kleineren Biopsie-Präparaten. Eine sichere Unterscheidung zwischen Gliose und Gliom ist jedoch von großer Bedeutung für die korrekte Therapie des Patienten [96]. Hier bietet sich unter Umständen eine Anwendungsmöglichkeit des EMP3 Antikörpers in der Routinediagnostik. In der IHC war ein Großteil der Astrozytome WHO Grad II nur schwach positiv oder negativ, während auf dem Infarktpräparat eine starke EMP3 Färbung zu beobachten war. Um das Potential der EMP3 IHC zur Unterscheidung von Gliosen und Gliomen abzuschätzen, sind jedoch weitere vergleichende Untersuchungen notwendig.

Lymphatische Gewebe:

Die stärkste EMP3 Expression liegt in lymphatischen Geweben wie Tonsille, Milz und

Appendix vor. Dies gilt auch für weitere, zum sekundären lymphatischen System zählende Gewebereiche im Colon, im Dünndarm und in der Lunge, die vermutlich dem Mucosa-Associated Lymphoid Tissue (MALT) zuzurechnen sind. Dabei handelt es sich um fokale Ansammlungen von Leukozyten an besonders gefährdeten, potentiellen Eintrittspforten für Krankheitserreger, wie den Schleimhäuten des Respirations- und Verdauungssystems [97]. Primäre lymphatische Gewebe, wie Knochenmark oder Thymus, standen nicht zur Verfügung, es ist aber davon auszugehen, dass diese ebenfalls eine starke EMP3 Expression aufweisen. Lymphozyten weisen von allen Zelltypen die stärkste EMP3 Expression auf, wobei EMP3 überwiegend an der Zellmembran lokalisiert ist. Im umliegenden Gewebe ist die Expression schwächer ausgeprägt und liegt eher zytoplasmatisch vor. Die starke EMP3 Expression in Leukozyten und lymphatischen Geweben deutet darauf hin, dass EMP3 eine Rolle bei Immunabwehr oder -modulation spielt. Dies deckt sich mit der Hypothese, dass EMP3 an Entzündungsprozessen beteiligt ist und die Level von NF- κ B beeinflussen kann. Welche Funktion EMP3 genau für die Immunabwehr spielt bleibt jedoch noch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Prostata, Niere, Ovar:

Ebenfalls stark EMP3 positiv sind glanduläre Zellen in der Prostata und der Niere, sowie Stromazellen in der Prostata und im Ovar. Die EMP3 Färbung liegt dabei in den glandulären Zellen punktuell oder granulär im Zytoplasma vor, was auf eine vesikuläre Lokalisation hinweist. In den Stromazellen dagegen ist sie membranständig und zytoplasmatisch lokalisiert. Welche Funktion EMP3 in diesen Zellen einnehmen könnte, ist unklar. Die Interaktion von EMP3 mit verschiedenen Proteinen die in den Vesikeltransport involviert sind, legt die Vermutung nahe, dass es in den sekretorischen Zellen an Transportprozessen beteiligt ist.

Muskel:

Bemerkenswert ist die Kernlokalisierung von EMP3, die überwiegend in den Skelettmuskelzellen beobachtet werden kann. Eine solche Kernlokalisierung wurde bisher weder für EMP3, noch ein anderes Mitglied der Proteinfamilie beschrieben und eröffnet Spekulationen über eine potentielle Funktion als Transkriptions-Co-Faktor oder im

Kerntransport als Teil eines Signalkomplexes. Dies ist eher ungewöhnlich für ein Membranprotein, besonders da EMP3 nicht über eine Kernlokalisationssequenz verfügt.

4.2.3 Nachweis von EMP3 in Zelllinien

Von den untersuchten Zelllinien zeigte die Melanomzelllinie C32 die stärkste EMP3 Expression, gefolgt von der Chondrosarkomzelllinie HT1080. Die Glioblastomzelllinie U87 wies eine ähnliche EMP3 Proteinmenge wie die HT1080 Zellen auf, während in den LN229 und LN319 Zellen nur geringe Mengen von EMP3 nachweisbar waren.

Interessanterweise tragen die HT1080 Zellen eine IDH1 R132C Mutation, was normalerweise durch die Akkumulation von 2-HG und den G-CIMP Hypermethylierungsphänotyp dazu führen sollte, dass *EMP3* hypermethyliert und ausgeschaltet wird. Der Methylierungsstatus von *EMP3* in den HT1080 Zellen wurde allerdings in dieser Studie nicht untersucht. Dennoch macht dies deutlich, dass kein zwingender Zusammenhang zwischen dem *IDH1/2* Mutationsstatus und der Expression von EMP3 besteht.

In den untersuchten Zelllinien liegt EMP3 überwiegend membranständig (C32, HT1080) oder zytoplasmatisch (U87) vor. Eine Kernlokalisierung, wie z.B. in Skelettmuskelzellen und astrozytären Tumoren, konnte in keiner der Zelllinien beobachtet werden. EMP3 colokalisiert in der parallelen Immunfluoreszenz in C32 Zellen nicht mit organell-spezifischen Markern für das ER (Calnexin) und Lysosomen (LAMP1), jedoch in einigen Zellen mit einem Golgi-assoziierten Marker (RCAS1). Es ist bekannt, dass Glykoproteine wie z.B. auch PMP22 durch das Golgi-Netzwerk transferiert und dort posttranslational modifiziert werden [53]. Möglicherweise ist EMP3 in den C32 Zellen an der Membran zu einem Großteil unmodifiziert, wird aber in einigen Zellen ins Golgi-Netzwerk transportiert und dort modifiziert.

4.2.4 Nachweis von EMP3 in Tumoren

Etwa 80% aller untersuchten Glioblastome zeigten in der IHC eine starke EMP3 Färbung, während dies bei den niedriggradigen Gliomen nur bei etwa 20% der Tumore zu beobachten war. Damit bestätigt sich ein inverser Zusammenhang zwischen dem Ausmaß

der Promotermethylierung und der EMP3 Expression in diesen Tumoren. Dabei ist allerdings zu beachten, dass die Methylierungsanalyse und der immunhistochemische Nachweis nicht am gleichen Tumorkollektiv durchgeführt wurden. Eine inverse Korrelation zwischen Methylierung und Expression von EMP3 in Gliomen wurde jedoch auch in anderen Studien gefunden [60, 62].

Die Intensität der IHC EMP3 Färbung korreliert signifikant ($p < 0,001$) mit dem Tumorgrad zwischen den untersuchten WHO Grad II und Grad IV Tumoren. Um diese Korrelation zwischen dem Tumorgrad und der Menge an EMP3 Protein in den Tumorzellen zu erklären, gibt es zwei mögliche Ansätze. Einerseits könnten die Tumorzellen, die im Verlauf der Progression EMP3 hoch regulieren, daraus einen Selektionsvorteil ziehen. In diesem Fall wäre EMP3 ein tumorigener Faktor, der aktiv die Progression der Tumore fördert. Andererseits könnte die erhöhte EMP3 Expression aber auch nur einen sekundären Effekt der Deregulierung verschiedener anderer Signalwege darstellen. Daraus ergibt sich demnach die Frage, ob es sich bei der erhöhten EMP3 Expression um eine "Driver"- oder "Passenger"-Veränderung handelt. Der immunhistochemische Nachweis von EMP3 differenziert dabei möglicherweise lediglich zwischen diffusen und anaplastischen Oligodendrogliomen und Astrozytomen, sowie sekundären Glioblastomen auf der einen und primären Glioblastomen auf der anderen Seite. Also Tumoren die eine *IDH1/2* Mutation tragen und solchen ohne *IDH1/2* Mutation. Die sehr geringen Fallzahlen von einigen Tumoren (OII, OAI, sGBM) lassen hier jedoch keine definitive Aussage zu. Um den Zusammenhang zwischen der EMP3 Expression und dem Tumorgrad, der Gliom-Subgruppe und anderen molekularen Veränderungen zu bestätigen, wäre es notwendig eine größere Serie von OII, OIII, AI, AIII, sGBM und pGBM immunhistochemisch zu untersuchen.

Die Daten aus den RNAi Experimenten deuten darauf hin, dass EMP3 selbst ein Element bei der Regulation der Signaltransduktion in den Zellen darstellt und eine wichtige Rolle bei der Proliferation, Migration und dem Überleben der Zellen spielt. Allerdings stammen die Daten nicht aus Gliomzellen sondern aus Sarkomzellen, die über einen anderen molekularen/genetischen Hintergrund verfügen. Daher sind die Daten vermutlich nur begrenzt übertragbar.

Astrozytome scheinen eine stärkere EMP3 Expression aufzuweisen als Oligodendro-

gliome. Dies lässt sich durch eine verstärkte Repression von EMP3 durch die Kombination der Promoter-Hypermethylierung aufgrund der *IDH1/2* Mutation und dem Allelverlust auf 19q erklären.

Die Stärke der EMP3 Expression korreliert in primären Glioblastomen invers mit der Überlebenszeit. Dies deutet darauf hin, dass EMP3 prognostische Relevanz in Gliomen besitzen könnte. Das hier untersuchte Tumorkollektiv ist allerdings sehr klein, was die Aussagekraft der Ergebnisse insgesamt einschränkt. Die Daten aus der REMBRANDT Datenbank bestätigen die Ergebnisse zwar zum Teil, sind aber ebenfalls mit Einschränkungen zu betrachten. Bei einigen Tumoren liefert die Datenbank kein signifikantes Ergebnis, sondern es ist lediglich ein Trend zu beobachten. Die starke Auftrennung der Kurven bei Einbeziehung des gesamten Gliomkollektivs ist nur bedingt aussagekräftig, da wie oben bereits beschrieben, EMP3 in den niedriggradigen Tumoren mit besserer Prognose häufig reprimiert wird, während es in den hochgradigen Glioblastomen mit schlechter Prognose hochreguliert ist. Insofern ist eine solche Auftrennung der Kurven nicht überraschend und repräsentiert die unterschiedliche Verteilung von EMP3 zwischen niedriggradigen und hochgradigen Tumoren. Andererseits wird der Zusammenhang zwischen erhöhter EMP3 Expression und schlechterem klinischen Verlauf auch von anderen Studien belegt [61, 98].

Die inverse Korrelation von EMP3 Expression und Überleben steht dabei im Widerspruch zu den Erkenntnissen aus anderen Tumorentitäten (Neuroblastomen, ESCC, NSCLC), in denen eine verringerte EMP3 Expression, beziehungsweise EMP3 Hypermethylierung mit einem ungünstigeren Verlauf assoziiert ist [55, 57, 58]. Ein Zusammenhang mit aggressiveren Tumorphänotypen mit geringerer Überlebenswahrscheinlichkeit entspricht zudem nicht dem erwarteten Bild eines Tumorsuppressors.

4.3 Posttranslationale Modifikation von EMP3

N-Glykosylierung ist eine der häufigsten posttranslationalen Modifikationen und hat Einfluss auf die Faltung, Sortierung und Sekretion von Proteinen. Glykoproteine sind in die Regulation und Kontrolle einer Vielzahl wichtiger zellulärer Prozesse wie Zell-Zell- und

Zell-Matrix Interaktionen, Proliferation, Überleben und Immunregulation involviert. Die molekularen Mechanismen, wie die Glykane die Signaltransduktion beeinflussen, sind allerdings bisher noch wenig verstanden [99].

Der Mustervergleich zwischen den Westernblots mit Wildtyp EMP3, mutiertem EMP3 ohne Glykosylierungsmotive und Wildtyp EMP3, das mit PNGase F verdaut wurde (siehe 3.7, S. 69), legt den Schluss nahe, dass EMP3 zwar über zwei potentielle Glykosylierungsmotive verfügt, aber lediglich eines von beiden (N47) funktionell von Bedeutung ist und posttranslational modifiziert wird. Die C-terminal trunkeerte Variante von EMP3 wird nicht posttranslational modifiziert. Für die Modifikation scheint demnach das vollständige Protein benötigt zu werden. EMP3 verfügt am C-Terminus über eine putative ER-targeting Sequenz, welche durch die Trunkierung verloren geht. Dadurch wird möglicherweise das Trafficking von EMP3 gestört und die posttranslationale Modifikation verhindert.

Betrachtet man das Westernblot Bandenmuster von Wildtyp-EMP3, ist auffällig, dass anscheinend nur ein Teil des EMP3 Proteins glykosyliert wird, während ein großer Teil unmodifiziert vorliegt. Daraus lässt sich allerdings nicht ableiten, ob EMP3 innerhalb einer Zelle in verschiedenen Modifikationsformen vorliegt, oder ob die Modifikationen zwischen verschiedenen Zellen variieren. Für Letzteres würde sprechen, dass EMP3 nur in einigen Zellen im Golgi-Apparat lokalisiert ist.

Darüber hinaus scheint EMP3 mit Oligosaccharidketten unterschiedlicher Länge und/oder Komplexität modifiziert zu werden, da sich im Westernblot bei Wildtyp-EMP3 stets ein multiples Bandenmuster zeigt, das sich von etwa 20 kDa bis 28 kDa erstreckt. Dadurch ergibt sich die Frage aufgrund welcher zellulärer Prozesse und Signale EMP3 im Golgi-Apparat modifiziert wird und welche Funktion damit verbunden ist. Unterschiedlich lange oder komplexe Oligosaccharide könnten auf eine spezifische Signalfunktion der Glykosylierung hindeuten.

Von PMP22 ist bekannt, dass nur ein kleiner Teil des Proteins glykosyliert wird, während der größere Teil unmodifiziert vorliegt und abgebaut wird [53]. Der intrazelluläre PMP22 Haushalt ist strikt reguliert und erbliche Fehler in der Expression, Sortierung und Stabilität von PMP22 resultieren in Neuropathien [53]. Möglicherweise unterliegt das intrazelluläre Trafficking und die Regulation der EMP3 Mengen einem Kontrollmechanismus, der von der Glykosylierung des Proteins abhängt. Ob ein Zusammenhang zwischen unterschiedlichen Modifikationen des EMP3 Proteins und der Lokalisation innerhalb der

Zelle besteht, ist jedoch unklar. Über die Glyosylierung könnte auch eine Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktionsfunktion vermittelt werden. Das würde voraussetzen, dass die Oligosaccharidketten mit spezifischen Oberflächen- oder Matrixmolekülen interagieren. Eine solche Zell-übergreifende Interaktion kann allerdings mit den in dieser Studie verwendeten Interaktionsassays nicht nachgewiesen werden, da diese auf Interaktionen innerhalb einer Zelle abzielen. Einzig die Co-IP und möglicherweise der PLA könnten theoretisch eine solche Interaktion anzeigen. Diese Methoden sind jedoch nicht zum Screening geeignet, da sie Vorkenntnisse über die zu untersuchende Interaktion voraussetzen. Die Durchführung beider Methoden setzt entweder die ektopische Überexpression eines getaggtten Fusionsproteins, oder aber die Verwendung spezifischer Antikörper voraus. Daher kann eine neue, bisher unbekannte Interaktion damit nicht entdeckt werden. Eine Möglichkeit eine solche Interaktion nachzuweisen, wäre eine Kombination aus einem Pull-Down-System, einer Auftrennung des Eluats über ein Gel und anschließender massenspektrometrischer Untersuchung der einzelnen Banden. Dieses Verfahren wurde hier jedoch nicht angewandt. Daher ist eine Rolle von EMP3 in der Zell-Zell-Interaktion spekulativ und bisher nicht durch experimentelle Daten untermauert.

4.4 RNA-Interferenz Knockdown von EMP

4.4.1 Methodische Aspekte der funktionellen RNAi Assays

Der Knockdown von EMP3 führt zu morphologischen Veränderungen der Zellen, vermindert die Proliferations- und Migrationsfähigkeit und erhöht die Anfälligkeit gegen Stress und Apoptose.

Für EMP3 wurde aufgrund der Homologien zu anderen Mitgliedern der Proteinfamilie, insbesondere PMP22 und EMP1, eine Funktion in Zellproliferation, Zell-Zell-Interaktion und Apoptose postuliert. Mehrere Studien konnten bisher zeigen, dass die ektopische Überexpression von EMP3 in Zelllinien zu verminderter Proliferation, Koloniebildung, Tumorbildungspotential oder sogar zur Apoptose führt [55, 57, 72].

In verschiedenen Tumorentitäten wird EMP3 Expression durch Promoter Hypermethylierung herunterreguliert [54]. Um die Auswirkungen der EMP3 Repression auf

das Verhalten der Zellen zu simulieren, wurde ein künstlicher Knockdown mittels verschiedener shRNA Konstrukte an Zelllinien mit einem relativ hohen endogenen EMP3 Expressionslevel durchgeführt (U87, C32, HT1080). Allerdings ließ sich nur in den HT1080 Zellen ein stabiler Knockdown erreichen, bei den anderen Zelllinien brach die Proliferation der mit den effektiven shRNA Konstrukten transfizierten Zellen so stark ein, dass eine Kultivierung nicht möglich war.

Die shRNA Konstrukte, die stabil in die HT1080 Zellen transfiziert wurden, zeigten im Westernblot eine unterschiedliche Effektivität des Knockdowns von 50 bis über 90%, so dass für die weiteren Versuche Zelllinien mit unterschiedlich stark reduziertem EMP3 Proteinlevel zur Verfügung standen. Die Bestimmung der Zellzahl zu bestimmten Zeitpunkten, beziehungsweise nach Behandlung mit Apoptose-induzierenden Reagenzien, erfolgte über einen Kristallviolettassay. Dieser basiert auf der Einlagerung des gleichnamigen Farbstoffs in Zellen und erlaubt eine Aussage über die Zelldichte auf einer definierten Fläche (z.B. in einem Well) im Vergleich zu einer auf gleicher Fläche kultivierten Kontrollpopulation. Dies ermöglicht Rückschlüsse auf die Proliferationsrate oder die Sterberate der Zellen. Technisch bedingt kann der Assay bei sehr hohen Zelldichten, durch Überlagerung der Zellen und unvollständige Einlagerung oder Lösung des Farbstoffs aus den Zellen und bei sehr geringen Zelldichten ungenau werden. In dem hier etablierten Bereich war der Assay jedoch ausreichend präzise und es gab nur geringe Abweichungen in den Messwerten.

Die Bestimmung der Migrationsfähigkeit der transfizierten Zellen erfolgte über einen klassischen Wound-Healing-Assay, bei dem bestimmt wird, wie schnell eine definierte Freifläche zwischen zwei konfluenten Zellflächen durch einwandernde Zellen geschlossen wird. Die dabei verwendeten Kammern sollten eine definierte Wandstärke haben, so dass der Spalt zwischen den zwei Zellrasen idealerweise immer gleich breit ist.

Ein weiterer Einflussfaktor kann die Qualität und Dosierung des Mitomycin C (MMC) sein, welches im Assay verwendet wird um die Mitose der Zellen zu inhibieren und eine Verfälschung des Ergebnisses durch Proliferation zu vermeiden. Es wurde nicht überprüft, ob die Proliferation der Zellen effektiv gestoppt wurde, daher kann in diesem experimentellen Aufbau ein Fehler durch proliferierende Zellen nicht ausgeschlossen werden. Beobachtungen der behandelten Zellpopulation über die Versuchsdauer hinaus, lassen jedoch auf eine ausreichend effektive und dauerhafte Inhibition der Zellteilung

schließen.

Während zwischen den Wachstumskurven der Kontroll-Zellen (shLV, shScr) kein nennenswerter Unterschied besteht, ist die Zunahme der Zellzahl bei den Knockdown Zellen (shE1 – shE5) im gleichen Zeitraum signifikant geringer. Dies lässt auf eine reduzierte Proliferationsrate infolge des EMP3 Knockdowns schließen. Die Reduktion der Proliferation ist dabei proportional zur Effektivität des Knockdowns, was darauf hindeutet, dass in diesen Zellen ein direkter, "Dosis"-abhängiger Zusammenhang zwischen der EMP3 Proteinmenge und der Zellproliferation besteht. Ebenso führt die Repression von EMP3 zu einer signifikant verminderten Migrationsfähigkeit der Zellen. Während die Leervektor-transfizierten Zellen den Spalt nach 12h nahezu vollständig schließen, findet bei den Knockdown-Zellen nur eine geringe Einwanderung statt. Besonders interessant ist, dass der Knockdown von EMP3 außerdem die Anfälligkeit der Zellen gegen Apoptose induzierende Stimuli erhöht. Besonders deutlich ist diese Sensitivierung bei der Behandlung mit TRAIL. Bereits bei geringen Konzentrationen bricht die Zellzahl der Knockdown-Zellen signifikant stärker ein als bei den Kontroll-Zellen.

4.4.2 Einfluss des EMP3 Knockdowns auf prominente Signalwege

EMP3 hat Einfluss auf die Proteinlevel und Aktivierung einer Reihe von Schlüsselregulatoren wichtiger Signalwege. Dadurch bietet sich ein Erklärungsansatz für die reduzierte Viabilität und die erhöhte Apoptoseanfälligkeit der EMP3 Knockdown Zellen.

EGFR/AKT/ERK Signalwege

Die Wachstumssignalwege in den HT1080 Zellen sind aufgrund der Aktivierung durch die Wachstumsfaktoren im Zellkulturmedium, sowie ein aktiviertes N-Ras Onkogen, dauerhaft angeschaltet. Durch den Knockdown von EMP3 wird diese Aktivierung vermindert. Der Knockdown reduziert dabei unter anderem die Proteinmenge und Aktivierung von EGFR. In der Studie von Mellai *et al.* wurde ein inverser Zusammenhang der *EMP3* Methylierung mit der Amplifikation von *EGFR* festgestellt [62]. Möglicherweise betrifft dies auch andere Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. In einer Studie von Mackay *et al.* wurde beispielsweise eine Hochregulierung von EMP3 in Korrelation zur Überexpression von ErbB2/HER2 in

Mamma-Epithelzellen beobachtet [67]. Zhou *et al.* konnten ebenfalls eine signifikante Korrelation ($p = 3,3 * 10^{-6}$) zwischen der Expression von EMP3 und ErbB2/HER2 in primären Brustkrebs-Tumoren nachweisen [68]. Weiterhin konnte in einer kürzlich veröffentlichten Studie von Wang *et al.* gezeigt werden, dass der Knockdown von ErbB2 in Urothelkarzinomzellen zur Herunterregulierung von EMP3 führt und umgekehrt [69]. Dies untermauert die These, dass EMP3 einen Einfluss auf die Signalübermittlung durch verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinasen haben könnte.

In den EMP3 Knockdown-Zellen ist ebenfalls die Phosphorylierung der AKT und ERK Signalkinasen vermindert. Diese ubiquitären Kinasen nehmen eine zentrale Rolle bei der Regulierung eines breiten Spektrums zellulärer Prozesse ein, unter anderem bei Proliferation, Motilität, Stoffwechsel, Differenzierung, Apoptose und Überleben. Normalerweise werden diese Signalkaskaden durch mitogene Stimuli, Wachstumsfaktoren oder Cytokine aktiviert [100, 101], sind aber in Krebszellen häufig konstitutiv überaktiviert und tragen dadurch zur unkontrollierten Proliferation, Migration und zur Apoptose-Vermeidung der neoplastischen Zellen bei [100, 102]. Die reduzierte Aktivierung der AKT und ERK Signalwege erklärt daher die verminderte Zellviabilität, Migration und erhöhte Apoptoseanfälligkeit der Zellen. Die Daten ergänzen sich ebenfalls sehr gut mit den Ergebnissen der Studie von Wang *et al.* in der gezeigt wurde, dass die Überexpression von EMP3 zu einer stärkeren Aktivierung der ErbB2/PI3K/AKT-Signalkaskade und zu signifikant erhöhter Zellproliferation und Migration führte [69]. Die reduzierten Expressionslevel anderer untersuchter Proteine sind ein Hinweis darauf, dass mit der reduzierten Phosphorylierung auch die Downstream-Signalübertragung der Signalwege vermindert ist.

Die Verminderung der Rezeptoraktivität ist eine mögliche Erklärung für die reduzierte Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege. Der genaue Mechanismus über den EMP3 Einfluss auf die Signalübermittlung nimmt, ist jedoch bisher noch unklar und spekulativ. Da EMP3 selbst über keine Kinaseaktivität verfügt, könnten diese Effekte über die Interaktionspartner von EMP3 vermittelt werden. Es ist aber nicht auszuschließen, dass EMP3 diese Signalwege auch auf anderen Ebenen beeinflussen kann, zum Beispiel indem es als "Scaffolding"-Protein für die Signalkomplexe an der Membran dient.

Diese Ergebnisse sind unerwartet, da sie nicht der erwarteten Funktion eines

Tumorsuppressors, sondern eher eines Onkogens entsprechen [6, 7]. Durch den Knockdown eines typischen Tumorsuppressors wäre eher ein Anstieg der Proliferationsrate und/oder der Migration zu erwarten, oder zumindest kein Einbruch. Es erscheint daher zunächst widersprüchlich, dass EMP3 in bestimmten Tumoren ausgeschaltet wird, da dies diesen Daten zufolge die Proliferation der Tumorzellen inhibieren müsste. Der Einfluss von EMP3 auf die Zellproliferation bietet aber eine mögliche Erklärung dafür, dass EMP3 in manchen besonders aggressiven und proliferativen Tumoren wie Glioblastomen hochreguliert ist.

Andererseits ist der ERK Signalweg dafür bekannt, dass er eine komplexe und zwiespältige Rolle bei der Krebsentwicklung spielen kann. Abhängig von anderen Faktoren, wie Feedback-Signalen und Crosstalk mit anderen Signalwegen, kann der ERK Signalweg sowohl eine onkogene als auch eine tumor-suppressive Funktion einnehmen [102]. Dadurch könnte sich eine mögliche Erklärung dafür bieten, warum EMP3 in manchen Tumoren eher das Profil eines Tumorsuppressors und in anderen das eines Onkogens aufweist.

p53 Signalweg

Bemerkenswerterweise werden durch den EMP3 Knockdown auch der Tumorsuppressor p53, sowie zwei der untersuchten pro-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie (Bad, Bim) herunter reguliert. Dies ist möglicherweise ebenfalls eine Folge der reduzierten Aktivierung der AKT und ERK Signalwege. Es gibt bisher keine Daten dazu, ob die Überexpression von EMP3 umgekehrt die Proteinmenge von p53 in der Zelle erhöht. Falls das der Fall ist, würde es jedoch erklären, warum einige Tumorzelllinien empfindlich auf die Überexpression von EMP3 reagieren und verminderte Viabilität und Anzeichen von Apoptose zeigen. Dass die LN319 Zellen die EMP3 Überexpression gut verkraften, lässt sich demnach dadurch erklären, dass in diesen Zellen p53 mutiert ist [103]. Eine Erhöhung der Menge von mutiertem, inaktiven p53 Protein würde für die Zellen daher keinen Nachteil bedeuten. Die Verminderung der p53 Level in den Tumorzellen bietet eine potentielle Erklärung dafür, dass EMP3 in einigen Tumorentitäten scheinbar als Tumorsuppressor wirkt. Demnach könnte die Herunterregulierung von EMP3 in den Krebsvorläuferzellen dazu führen, dass sich durch die Verringerung der p53 Menge

weitere genetische und chromosomale Aberrationen akkumulieren können, ohne dass ein Zellzyklusarrest oder die Apoptose eingeleitet wird [12, 13]. Wie schon in Abschnitt 1.3 kurz dargelegt, ist die Inaktivierung von p53 ein häufiges Phänomen in Krebszellen [14].

In Gliomen ist die Mutation von *IDH1/2* eines der frühesten Ereignisse in der Tumorentstehung [27]. Dadurch wird auch EMP3 in einem sehr frühen Stadium der Tumorentwicklung epigenetisch herunter reguliert [25]. Falls die Repression von EMP3 auf die Gliomzellen einen ähnlichen Effekt hat wie auf die Sarkomzellen, würde das zu einer Reduktion der p53 Menge in den Zellen führen. Dies hätte eine erhöhte genomische Instabilität zu Folge und würde die weitere Tumorentwicklung begünstigen. Gleichzeitig würde die Repression von EMP3 die Aktivität der EGFR, AKT, ERK und NF- κ B Signalwege vermindern und die Proliferation der Tumorzellen einschränken. Daher bietet dieser potentielle Weg der Tumorentstehung eine mögliche Erklärung dafür, warum die *IDH1/2* mutierten Gliome, in denen EMP3 häufig herunter reguliert ist, in der Regel weniger aggressiv sind, weniger proliferieren und einen besseren Verlauf zeigen. Bei den primären Glioblastomen hingegen könnte die Überexpression von EMP3 in einem späteren Stadium der Tumorentwicklung auftreten. Durch eine erhöhte Expression von EMP3 und EGFR wird möglicherweise die Aktivierung der Wachstums-Signalwege synergistisch verstärkt. Da Glioblastome zu einem hohen Prozentsatz inaktivierende Mutationen im *TP53* Gen aufweisen, würde in diesen Tumoren eine gleichzeitige Erhöhung der p53 Menge keine negative Auswirkungen auf die Tumorzellen haben. Ähnliches gilt auch für Astrozytome, die ebenfalls hohe *TP53* Mutationsraten aufweisen und daher möglicherweise höhere EMP3 Mengen exprimieren können als Oligodendrogliome. Zwar konnte ein Zusammenhang von *TP53* Mutationen und dem Methylierungsstatus von EMP3 bisher nicht festgestellt werden [62]. Allerdings ist dabei zu beachten, dass der Methylierungsstatus höchst wahrscheinlich nicht der einzige regulierende Faktor der EMP3 Expression ist [54].

In anderen Tumorentitäten, in denen EMP3 als potentieller Tumorsuppressor beschrieben wurde, werden möglicherweise der AKT- und ERK-Signalweg anderweitig aktiviert oder die Zellen können die inhibierende Wirkung der EMP3 Repression ausgleichen indem andere Gene und Signalwege hoch reguliert werden, so dass die Tumorzellen durch die p53 Inaktivierung eine größere genomische Instabilität aufweisen, jedoch keine Wachstumsnachteile erleiden.

Death-Rezeptor Signalwege

Die stark erhöhte Anfälligkeit der Knockdown Zellen gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose lässt sich nicht über eine verstärkte Expression von Death-Rezeptor 4 (DR4) und Death-Rezeptor 5 (DR5) erklären, an die TRAIL bindet. Die Proteinlevel der beiden Rezeptoren sind in den EMP3 Knockdown-Zellen unverändert. Vielmehr lässt sich die erhöhte Apoptoseanfälligkeit ebenfalls plausibel mit der verminderten Aktivierung der AKT und ERK Signalwege erklären. Bei beiden Signalwegen wurde ein Zusammenhang mit der Resistenz gegen TRAIL in Krebszellen dokumentiert [104-106]. Inhibition des PI3K/AKT oder ERK Signalwegs sensitiviert Tumorzellen hingegen gegenüber TRAIL [106, 107]. Es ist daher naheliegend, dass der TRAIL-sensitivierende Effekt des EMP3 Knockdowns mit der verminderten Aktivierung der AKT und ERK Signalwege zusammenhängt. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass EMP3 den Death-Rezeptor-Signalweg auch noch auf anderem Wege beeinflussen kann. Um die genauen Mechanismen aufzuklären, sind jedoch weitere Studien notwendig.

NF-κB Signalweg

NF-κB ist ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor, der die Expression eines weiten Spektrums von Genen und damit zellulären Prozessen kontrolliert. Unter anderem gehören dazu die Produktion und Ausschüttung von Cytokinen, Migration, Proliferation und Überleben. NF-κB spielt eine wichtige Rolle in der adaptiven und angeborenen Immunabwehr, unter anderem auch bei Entzündungsprozessen [108]. Eine Fehlsteuerung von NF-κB wird mit verschiedenen Erkrankungen wie chronischen Entzündungen, Autoimmunerkrankungen und Krebs in Verbindung gebracht [109, 110]. NF-κB liegt im Zytoplasma in inaktiver Form, gebunden an den Inhibitor IκB, vor. Als Reaktion auf verschiedene Stimuli wie Cytokine, bakterielle oder virale Antigene oder andere Stressfaktoren, kann die Inhibition schnell aufgelöst und NF-κB dadurch aktiviert und in den Kern transportiert werden [108].

Die Proteinmenge von NF- κ B p65 ist in den EMP3 Knockdown-Zellen deutlich reduziert. Diese Reduktion der vorhandenen NF- κ B Proteinmenge bedeutet, dass die Zellen schlechter auf bestimmte Stressfaktoren und Stimuli reagieren können und dass diese Signalkaskade, die zum Überleben der Zellen beitragen kann, unter Umständen funktionell nicht mehr oder weniger aktiv ist. Dadurch bietet sich eine weitere Erklärung für die verminderte Viabilität und Apoptoseresistenz der Knockdown-Zellen. Es bleibt im Moment unklar, ob die Verminderung der NF- κ B Proteinmenge eine Folge der verminderten Aktivität anderer zellulärer Signalwege, wie AKT und ERK, ist. Oder ob EMP3 einen direkten Einfluss auf die Expression oder Proteinstabilität von NF- κ B hat. Ein Einfluss von EMP3 auf NF- κ B würde die Theorie einer Funktion von EMP3 in der Immunregulation und in Entzündungsprozessen untermauern.

4.5 Protein-Protein-Interaktionen von EMP3

Um die Funktion von EMP3 erklären zu können, ist es notwendig die Signalwege zu kennen, in die es involviert ist. Um dies zu erreichen, ist es wichtig zu wissen mit welchen anderen Proteinen es interagiert. Bisher wurde jedoch nur ein Interaktionspartner von EMP3 beschrieben, P2X7 [72]. Um zu klären, ob EMP3 neben diesem noch andere Interaktionspartner aufweist, wurde zunächst ein Screening nach neuen, bisher unbekanntem Interaktoren durchgeführt. Die daraus resultierenden Kandidaten wurden mit drei unabhängigen Methoden validiert, die sich von ihren Eigenschaften her gut ergänzen (Tabelle 8).

Methode	Ektopische Expression	Lokalisation	Quantifizierung	Antikörper	Screening
BiFC	Ja	Ja	Eingeschränkt	Nein	Nein
PLA	Nein	Ja	Ja	Ja	Nein
Co-IP	Ja	Nein	Eingeschränkt	Ja	Nein
SU	Ja	Nein	Eingeschränkt	Nein	Ja

Tabelle 8: Übersicht über die Eigenschaften der verwendeten Interaktionsassays.

Interaktor	SU-Y2H	Co-IP	BiFC	PLA	Gesamt
PLN	3	2	0	1	6
PLP2	1	2	3	3	9
BSDC1	2	0	3	1	8
CMTM5	1	3	3	2	9
Rap2a	1	1	3	3	8
Rab10	1	2	0	2	5
P2X7	1	3	3	2	9
FLOT1	1	1	3	3	8
HTATIP2	1	1	3	3	8
VAMP3	1	2	2	3	8
TMEM51	1	2	1	3	7

Tabelle 9: Quantitative Bewertung der Ergebnisse der Interaktionsassays für die Interaktoren. Die Skala reicht dabei von 0 bis 3: 0 = kein Signal, 1 = schwaches Signal, 2 = mittelstarkes Signal, 3 = starkes Signal. Im SU Assay repräsentiert die Zahl, wie oft der jeweilige Interaktor im Screen gefunden wurde.

Alle Interaktoren konnten nach dem Screening mit mindestens zwei anderen Methoden validiert werden. Eine quantitative Bewertung der Ergebnisse anhand der relativen Signalintensitäten in den jeweiligen Interaktionsassays ist in Tabelle 9 dargestellt.

4.5.1 Methodische Aspekte des Yeast-Two-Hybrid Split Ubiquitin Assays

Das klassische Y2H System basiert auf der Rekonstitution eines Transkriptionsfaktors und der transkriptionellen Aktivierung eines Reportergens, wenn eine Interaktion vorliegt. Dieses System eignet sich nur bedingt für Membranproteine, da es voraussetzt, dass die interagierenden Proteine in den Kern gelangen können. Das SU-System umgeht dieses Problem und ermöglicht ein Interaktionsscreening auch mit Membranproteinen wie EMP3, indem die Interaktion direkt an oder in der Membran stattfinden kann. Umgekehrt ist es aber für Interaktionsstudien an kernlokalisierten Proteinen weniger geeignet, da dort die zelleigene UBP weniger oder nicht aktiv ist. Das klassische Y2H-System diskriminiert also Membranproteine, das SU-System kernlokalisierte Proteine.

Wie der Name schon sagt, wird das Interaktionsscreening in Hefen durchgeführt. Diese lassen sich leicht handhaben und effizient transfizieren, was eine Voraussetzung für ein Screening in größerem Umfang ist. Allerdings ist zu beachten, dass die Proteine heterolog expremiert werden. Dadurch kann es zu Fehlern bei der Transkription, Translation, Faltung, Lokalisation, und/oder bei der posttranslationalen Modifikation der zu untersuchenden Proteine kommen. Dies kann Auswirkungen auf die Interaktionsfähigkeit der beteiligten Proteine haben. Es kann zum Beispiel zu falsch negativen Ergebnissen führen, weil ein Protein nicht korrekt gefaltet und in Einschlusskörpern abgelagert wird. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass durch die artifizielle Fusion der Proteine mit einer Ubiquitinhälfte die Interaktion sterisch inhibiert wird. Andererseits kann das System, durch die hohe Affinität der beiden Hälften des gespaltenen Ubiquitins zueinander, auch zu falsch positiven Ergebnissen führen, wenn diese sich in der Zelle spontan zusammenlagern. Zudem ist zu beachten, dass die verwendete cDNA Bibliothek nur etwa 11.000 cDNAs umfasste und daher nicht das gesamte Genom abgebildet wurde. Aufgrund dieser Einschränkungen kann das Screening nicht als vollständiges Abbild aller Interaktionen des Zielproteins betrachtet werden. Ebenso erfordert das System die Validierung der gefundenen Interaktionen um eventuelle falsch positive Ergebnisse zu eliminieren.

4.5.2 Methodische Aspekte des Co-IP Assays

Die Co-IP basiert ebenfalls auf der ektopischen Überexpression der zu untersuchenden Proteine. Wie oben bereits beschrieben, reagieren einige Zelllinien empfindlich auf die Überexpression von EMP3, das Gleiche trifft auf einige der Interaktoren zu. Ebenso kann die Methode zu falsch negativen Ergebnissen führen, wenn der Tag aufgrund einer posttranskriptionellen oder posttranslationalen Modifizierung des Proteins abgeschnitten wird. Dieses Problem konnte zum Beispiel bei der Überexpression von PLN-FLAG beobachtet werden. Das Fusionsprotein war kurze Zeit nach der Transfektion nicht mehr mit einem Anti-FLAG-Antikörper nachweisbar, wohl aber mit einem spezifischen Anti-PLN-Antikörper, was auf einen Verlust des Tags und nicht der Proteinexpression an sich hindeutet. Um die Probleme mit der Überexpression zu umgehen, wurden die Zellen nicht selektioniert, sondern nur transient transfiziert und spätestens nach 24 Stunden geerntet,

außerdem wurden die Tags sowohl N-terminal als auch C-terminal getestet.

Die Co-IP kann falsch negative Ergebnisse erzeugen, wenn die Proteinkomplexe bei der Lyse der Zellen durch zu harsche Bedingungen (z.B. zu hoher Detergenzanteil im Lysepuffer) instabil werden und eignet sich daher nur bedingt für instabile oder transiente Interaktionen. Ebenso können aber auch falsch positive Ergebnisse erzeugt werden; wenn die Wasch-Bedingungen nicht ausreichend sind oder unspezifische Bindungseffekte von Proteinen an der Matrix auftreten. Der Co-IP Assay erfordert daher sorgfältige Optimierung. Konkret stellten sich beispielsweise viele häufig benutzte Zellysepuffer und Aufschlussverfahren wie Ultraschall oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen als ungeeignet heraus, da die EMP3 Proteinkomplexe dadurch dissoziiert wurden. Die Wasch-Bedingungen wurden ebenfalls ausgetestet und optimiert um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden.

Es konnten alle potentiellen Interaktoren aus dem Y2H Screening in der Co-IP bestätigt werden, mit Ausnahme von BSDC1. Bei FLOT1 und HTATIP2 war das EMP3-Myc-Signal auf dem Westernblot allerdings sehr schwach. Interessanterweise zeigten sich im Westernblot unterschiedliche Mehrfachbandenmuster für EMP3. Das Mehrfachbandenmuster ist wie unter Abschnitt 4.3 dargestellt vermutlich auf die posttranslationale Modifikation von EMP3 mit unterschiedlich langen Oligosaccharidketten zurückzuführen. Das würde bedeuten, dass die Interaktoren jeweils bevorzugt mit spezifischen EMP3-Glykosylierungsvarianten interagieren. Dies wäre ein Hinweis auf die Funktion der Glykosylierung in der Modulation der Protein-Protein-Interaktionen von EMP3. Um diese Hypothese zu testen wurde der Co-IP Assay mit den EMP3 Konstrukten ohne funktionelle Glykosylierungsmotive durchgeführt. Mit dieser EMP3 Variante konnte keine der Interaktionen nachgewiesen werden. Das würde dafür sprechen, dass die Glykosylierung wichtig für die Vermittlung der Protein-Protein-Interaktionen von EMP3 ist.

4.5.3 Methodische Aspekte des *In situ* Proximity Ligation Assays

Die Sensitivität und Spezifität des PLA hängt maßgeblich von der Qualität der verwendeten Primärantikörper ab. Dies kann bei Proteinen, für die nur in begrenztem Umfang kommerzielle Antikörper mit gut definierter Sensitivität und Spezifität für

Anwendungen an FFPE Material verfügbar sind, ein Problem darstellen. Daher erfordert der PLA eine Etablierungsphase in der verschiedene Antikörper unter verschiedenen Bedingungen und Konzentrationen ausgetestet werden müssen. In dieser Studie wurden alle verwendeten Antikörper vorher in einer Standard-Immunfluoreszenzfärbung auf den FFPE Zellen getestet. Somit konnte sowohl die endogene Interaktor-Expression in den Zielzellen, als auch die Funktionalität der jeweiligen Antikörper sichergestellt werden. Da die Spezifität der verwendeten Antikörper nicht mit absoluter Sicherheit festgestellt werden kann und unspezifische Bindungseffekte der PLA-Sonden an die Zellen möglich sind, wurden HEK293T Zellen als interne Negativkontrolle einbezogen. Wie oben erwähnt, verfügen die HEK293T Zellen nur über eine äußerst geringe EMP3 Expression. Durch das Fehlen von EMP3 sollten somit auf den HEK Zellen im Gegensatz zu den C32 Zellen keine Signale entstehen. Als zweite Negativkontrolle wurde der Assay mit EMP3 und GAPDH durchgeführt, welches nach aktuellem Kenntnisstand nicht mit EMP3 interagieren sollte. Mit dem Proximity Ligation Assay konnten alle potentiellen Interaktionen validiert werden. Lediglich bei PLN war der Assay zunächst nicht erfolgreich. Dies ist darauf zurück zu führen, dass PLN in den C32 Zellen nicht endogen expremiert wird. Erst nach Co-Transfektion von HEK293T Zellen mit PLN und EMP3 Expressionsvektoren konnte die Interaktion ebenfalls nachgewiesen werden.

4.5.4 Methodische Aspekte des BiFC Assays

Die ektopische Überexpression der Interaktoren erlaubt im BiFC System, ähnlich wie bei der Co-IP, die Modifizierung der beteiligten Proteine, bringt aber auch ähnliche Probleme mit sich, wie die Zelltoxizität bestimmter Proteine, Verlust des Reporters oder die Störung der Interaktion durch den Split-RFP-Tag. Dies ist zum Beispiel bei PLN der Fall, mit dem im BiFC Assay kein Signal erzeugt werden konnte, vermutlich aufgrund des Verlustes des Tags.

Es konnten teilweise auch falsch positive Signale in den Negativkontrollen beobachtet werden. Dabei handelt es sich höchstwahrscheinlich um ein Artefakt der Überexpression. Die Affinität der beiden RFP-Hälften zueinander kann dazu führen, dass durch spontane Rekonstitution ein falsch positives Signal entsteht, obwohl die untersuchten Proteine nicht

interagieren. Die Signale der echten Interaktionen waren allerdings etwa um den Faktor 10 intensiver und häufiger als die falsch positiven Signale in den Negativkontrollen, so dass eine Unterscheidung problemlos möglich war.

Ein weiteres Problem zeigte sich dahingehend, dass die Zellen auf die Überexpression der Hybrid-Proteine sehr empfindlich reagierten. Dies äußerte sich darin, dass die positiven Zellen kurze Zeit nach der Transfektion begannen ihre Membranintegrität zu verlieren und schließlich abzusterben. Dies war unabhängig davon, welche Proteine überexprimiert wurden. Nach 48 – 72 Stunden war in der Regel kein Signal mehr zu beobachten, eine Selektion der positiven Zellen durch Zugabe zweier Antibiotika war ebenfalls nicht erfolgreich. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, dass die Fusionsproteine in der Zelle nicht vollständig korrekt lokalisiert und/oder gefaltet werden können und sich im ER oder anderen Kompartimenten anreichern und dort wichtige zelluläre Prozesse behindern, was schließlich zum Absterben der Zelle führt. Dazu würde passen, dass in fast allen Versuchen (wie oben beschrieben teilweise auch in den Negativkontrollen) Zellen mit einem perinukleären, granulären Signal vorhanden waren, die nach kurzer Zeit morphologische Veränderungen aufwiesen und schließlich abstarben.

Im BiFC Assay konnten alle Interaktionen gut dargestellt werden, mit Ausnahme von PLN und Rab10.

4.5.5 Interaktoren

PLP2

Proteolipid protein 2, codiert durch das *PLP2* Gen auf Xp11.23, ist ein im ER und in der Zellmembran lokalisiertes, aus 152 Aminosäuren aufgebautes Membranprotein, das strukturelle Ähnlichkeiten mit EMP3 aufweist. Wie EMP3, verfügt es über 4 Transmembrandomänen und zwei potentielle N-Glykosylierungsmotive. PLP2 wurde ursprünglich als ein differenzierungsabhängiges Membranprotein im Darmepithel beschrieben [111]. Es ist zudem vermutlich an embryonalen Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen beteiligt [112].

Die genaue Funktion von PLP2 ist unklar. Es spielt eine Rolle bei der CC-Chemokin-abhängigen Chemotaxis und Migration durch Interaktion mit „CC-Chemokine Receptor Type 1“ (CCR1) [93] und zeigt in multimerisierter Form Ionenkanal-Charakteristika [113]. PLP2 reguliert in Interaktion mit „B-cell Receptor-associated Protein 31“ (BCAP31) die Fas/CD95 vermittelte Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien [114]. Darüber hinaus ist PLP2 ein essentielles Element bei der viralen Immunabwehr-Vermeidung von Herpesviren, da es für den Export der viralen E3 Ubiquitin Ligasen K3 und K5 aus dem ER benötigt wird. Dies legt die Vermutung nahe, dass PLP2 auch in seiner normalen, endogenen Funktion in die Vermittlung von Transportprozessen involviert ist [115]. Eine solche Funktion wurde bereits für den PLP2 Interaktor BCAP31 beschrieben, der unter anderem auch den ER-Export von VAMP3 vermittelt [116].

Die Überexpression von PLP2 in Melanomzellen erhöhte deren Proliferation, Adhäsion und Invasivität, sowie die Metastasierung *in vivo* in einem Maus Xenograft-Modell. In der gleichen Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass PLP2 in der Lage ist PI3K zu binden und den AKT-Signalweg zu aktivieren [117]. Knockdown von PLP2 reduzierte umgekehrt die Proliferation, Adhäsion, Invasivität und Metastasierung von Melanomzellen *in vitro* und *in vivo* [118]. Vergleicht man diese Beobachtungen mit den Erkenntnissen aus dem EMP3 Knockdown, so wird deutlich, dass zwischen PLP2 und EMP3 offensichtlich nicht nur strukturelle, sondern auch funktionelle Parallelen bestehen. Möglicherweise wird die Inhibition des AKT Signalwegs in den EMP3 Knockdown-Zellen über PLP2 und eine daraus verringerte Aktivierung von PI3K vermittelt. Sowohl die reduzierte Aktivierung des AKT Signalwegs, als auch die Sensitivierung gegenüber Apoptose induzierenden Stimuli,

lassen sich potentiell über die Interaktion mit PLP2 erklären. EMP3 und PLP2 sind möglicherweise Teil eines membranassoziierten Proteinkomplexes, der die Signaltransduktion verschiedener Rezeptoren und nachgeschalteter Signalkaskaden modulieren kann. Denkbar wäre auch, dass PLP2 den Transport von EMP3 aus dem ER vermittelt und damit erst seine Funktion in anderen Kompartimenten ermöglicht.

BSDC1

BSD Domain-containing Protein 1 wird auf Chromosom 1p35.1 codiert. Es ist aus 430 Aminosäuren aufgebaut und verfügt über 2 Serin-Phosphorylierungsmotive und eine BSD Domäne, ein strukturelles Element das in Transkriptionsfaktoren und synaptischen Proteinen beschrieben wurde [119]. Funktionell ist nichts über BSDC1 bekannt, daher kann kein funktioneller Zusammenhang mit EMP3 hergestellt werden.

TMEM51

Transmembrane Protein 51 ist ein, aus 253 Aminosäuren bestehendes, Membranprotein, das durch das *TMEM51* Gen auf 1p36.21 codiert wird. TMEM51 verfügt über 2 potentielle Transmembrandomänen und ein Serin-Phosphorylierungsmotiv. Funktionell ist über dieses Protein ebenfalls nichts bekannt.

PLN

Phospholamban wird durch das *PLN* Gen auf 6q22.1 codiert und ist aus 53 Aminosäuren aufgebaut. Es verfügt über eine Transmembrandomäne, ein Serin-Phosphorylierungsmotiv (Ser16), sowie ein Threonin-Phosphorylierungsmotiv (Thr17). Phospholamban ist im Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) von Muskelzellen lokalisiert und reguliert dort die Aktivität der SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA2) und damit die Aufnahme von Ca^{2+} in das SR. PLN inhibiert dabei im dephosphorylierten Zustand die Aktivität von SERCA2. Wird PLN infolge der β -adrenergen Stimulation der Muskelzelle an Ser16 durch Proteinkinase A (PKA) und Thr17 durch Ca^{2+} /Calmodulin-dependent Protein Kinase (CaMKII) phosphoryliert, wird diese Inhibition aufgehoben und es kommt zu einer erhöhten Calcium-Aufnahme in das SR und zur Relaxation der Muskelzelle [120-122]. PLN ist somit ein

Schlüsselregulator der Calciumhomöostase und der Muskelfunktion. Keimbahnmutationen im PLN Gen führen bereits in jungem Alter zu ernsten Krankheitsphänotypen wie Kardiomyopathien und Herzversagen [120].

PLN interagiert darüber hinaus mit „HS1-associated Protein X-1“ (HAX-1), einem anti-apoptotischen Protein mit funktionellen Ähnlichkeiten zu Bcl-2 [123]. HAX-1 ist in der Lage mit SERCA2 zu interagieren und vermittelt seine zytoprotektive Funktion vermutlich unter anderem über die Regulation der intrazellulären Calciumlevel [124]. Die Kontrolle der Calciumlevel in verschiedenen Kompartimenten ist ein wichtiges Element in der Regulation von Apoptose und anderen zellulären Prozessen und es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von PLN mit HAX-1 dessen anti-apoptotische Wirkung unterstützt [125].

Welchen Einfluss EMP3 auf die Funktion von PLN hat, ob es diese unterstützt oder anderweitig regulieren kann, bleibt unklar. PLN zeigte in nahezu allen Interaktionsassays die schwächste Affinität zu EMP3, was jedoch auf Probleme bei der ektopischen oder endogenen Expression von PLN zurückzuführen sein könnte. EMP3 konnte in den Geweben in denen PLN hauptsächlich expremiert wird, den Herzmuskelzellen, gar nicht und in Skelettmuskelzellen nur im Kern, nicht im SR, nachgewiesen werden.

CMTM5

Bei CKLF-like MARVEL Transmembrane Domain-containing Protein 5 handelt es sich um ein aus 223 AS aufgebautes 4-Transmembran-Protein, welches durch das gleichnamige Gen auf 14q11.2 codiert wird. Es wird besonders stark im Gehirn, aber auch in anderen Körpergeweben expremiert [126, 127]. CMTM5 gehört zur Chemokine-like Factor Superfamilie (CKLFSF). Bislang konnten insgesamt 8 CKLFSF Mitglieder identifiziert werden, die ein Bindeglied zwischen klassischen Chemokinen und 4-Transmembran-Superfamilie Proteinen darstellen und denen verschiedene Rollen im Reproduktions- und Immunsystem sowie in der Tumorgenese zugeschrieben werden [126, 128-132]. Von dem mit CMTM5 nah verwandten CMTM8 ist bekannt, dass es in die EGFR Signalkaskade involviert ist und die EGFR Signaltransduktion reguliert. Überexpression von CMTM8 in Zellen führte zu einer verminderten EGF-induzierten Proliferation, während der Knockdown von CMTM8 umgekehrt die Proliferation erhöhte [133].

Von einigen Mitgliedern der Proteinfamilie, unter anderem auch von CMTM5, ist bekannt, dass sie über einen bisher wenig charakterisierten vesikulären Transportweg aus der Zelle ausgeschleust werden können, die genaue Funktion dieser sekretorischen Form ist jedoch bislang wenig untersucht [134].

CMTM5 wurde außerdem als ein potentielles Tumorsuppressorgen vorgeschlagen, da die Expression in verschiedenen Krebsarten inaktiviert wird [127, 128, 135].

Wiederherstellung der Expression in Krebszelllinien führte zur Inhibition der Proliferation und Migration, sowie zur Induktion der Apoptose über einen Caspase-abhängigen Signalweg [136, 137]. Die ektopische Überexpression von *CMTM5* hatte zudem synergistische Wirkung mit TNF α [136] und führte zu einer Herunterregulierung von „Human Epidermal Growth Factor Receptor 2“ (HER2) und Cyclin D1 [138].

In einigen Aspekten bestehen Parallelen zwischen *CMTM5* und Berichten zu EMP3, in denen eine ektopische Expression von EMP3 in Zelllinien ebenfalls mit verminderter Zellviabilität und Zelltod über einen Caspase-abhängigen Signalweg in Verbindung gebracht wurde [72]. *CMTM5* zeigte in allen Interaktionsassays eine robuste Affinität zu EMP3, wobei die beobachtete Lokalisation sich hauptsächlich in einem granulären Bereich nahe des Kerns konzentrierte, wobei es sich vermutlich um den Golgi-Apparat handelt, sowie an der Membran. Möglicherweise bietet die Interaktion von EMP3 mit *CMTM5* einen Erklärungsansatz für die Tumorsuppressor-ähnlichen Effekte von EMP3 in manchen, aber nicht allen untersuchten Zellen und Tumoren [54]. Es wäre denkbar, dass *CMTM5* und EMP3 regulatorische Gegenspieler in der Zelle darstellen, zum Beispiel indem EMP3 die Funktion von *CMTM5* unterdrückt und/oder umgekehrt. Der Knockdown von EMP3 würde in diesem Fall die Inhibition aufheben und damit die anti-proliferative und pro-apoptotische Wirkung von *CMTM5* verstärken. Denkbar wäre aber auch eine synergistische oder anderweitig modulierende Wirkung von *CMTM5* auf EMP3 oder umgekehrt, in Abhängigkeit von anderen zellulären Signalwegen.

HTATIP2

HIV-1 TAT-interacting Protein 2, oft auch TAT-interactive Protein 30kDa (TIP30) genannt, bezeichnet ein 243 Aminosäuren großes Protein, das auf Chromosom 11p15.1 codiert wird. Es liegt in zwei Splice-Varianten vor (CC3 und TC3), wobei die Isoform 1 (CC3) des

Proteins die prädominante Form ist, da TC3 instabil ist und schnell degradiert wird [139].

HTATIP2/CC3 ist ein ubiquitär exprimierter Tumorsuppressor mit pro-apoptotischer, anti-angiogener und anti-tumorigener Wirkung. Die Expression von HTATIP2 ist in verschiedenen Tumorentitäten herunterreguliert oder ausgeschaltet und korreliert invers mit der Tumoraggressivität [140-144]. Versuche mit HTATIP2-defizienten Mäusen zeigten eine stark erhöhte Anfälligkeit für Tumorbildung in verschiedenen Organen [140]. Wiederherstellung der HTATIP2 Expression in Krebszelllinien führte zu Wachstumsinhibition, verringertem metastatischem und angiogenem Potential und erhöhter Apoptose-Anfälligkeit [141, 145-147]. Für die Isoform 2 (TC3) von HTATIP2 wurde hingegen eine anti-apoptotische Wirkung beschrieben [139].

HTATIP2 ist ein Inhibitor der Kerntransport-Mediatoren der Importin- β Familie und kann über diese Interaktion den Transport von Proteinen in den Nukleus blockieren [148]. Importine sind Trägerproteine die an Proteine mit einer Kernlokalisationssequenz binden und deren Einschleusung in den Nukleus über den Kernporenkomplex ermöglichen. Über die Regulierung des Kerntransports hat HTATIP2 Einfluss auf die Expression verschiedener Tumor-relevanter Gene. Es reprimiert unter anderem die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-xl und von Osteopontin, einem Extrazelluläre-Matrix-Protein, das in Tumormetastasierung involviert ist und induziert die Expression der Apoptose-Regulatoren Bad, Siva und Bax [147, 149-151]. Zusätzlich reguliert HTATIP2 die Expression und mRNA-Stabilität des Tumorsuppressors p53 und damit die p53 Menge in der Zelle [145]. HTATIP2 kann darüber hinaus p53 Protein direkt binden und dessen Lokalisation und Funktion modulieren [152]. Es reguliert außerdem im Zusammenspiel mit "Coactivator Independent of AF-2" (CIA) die "Estrogen Receptor alpha" (ER α) induzierte Expression von c-Myc [153]. Weiterhin hat HTATIP2 regulatorischen Einfluss auf die EGFR Signalkaskade. In einer Studie von 2011 wurde gezeigt, dass HTATIP2, im Komplex mit Rab5a, ACSL4 und EndoB1, die Endozytose und Degradation von EGFR reguliert. Knockdown von HTATIP2 führte dabei zu einem verzögerten Abbau des Rezeptor-Komplexes und länger anhaltender EGFR Signaltransduktion nach EGF Stimulation [154]. HTATIP2 verfügt über eine Nukleotid-Bindungsdomäne an der NADPH gebunden werden kann, das als Co-Faktor für die Funktion des Proteins benötigt wird [155]. HTATIP2 hat eine potentielle Reduktase-Funktion, es verfügt über eine entsprechende Short-chain

Dehydrogenase/Reductase (SDR) Domäne. Allerdings deutet die Kristallstrukturanalyse darauf hin, dass diese vermutlich für sich genommen inaktiv ist. Es wird allerdings spekuliert, dass es sich dabei um ein potentielles regulatorisches Motiv handeln könnte. Dabei könnte die Bindung eines Interaktionspartners die katalytische Funktion aktivieren, wodurch gebundenes NADPH in NADP umgewandelt und die Bindung zu bestimmten Interaktor-Proteinen aufgelöst wird [155]. Dies wäre ein möglicher Regulationsmechanismus für die Funktion von HTATIP2, ähnlich zur Funktion von G-Proteinen bei denen die Aktivierung und Inaktivierung über die Bindung von GTP und GDP gesteuert wird. Bisher sind jedoch keine Faktoren bekannt über die eine solche Regulation vermittelt werden könnte. Inaktivierung des NADPH Bindungsmotivs durch Mutation verhindert die Interaktion mit Importin- β und führt zum Verlust der Kerntransport-Inhibition und der pro-apoptischen Funktion von HTATIP2 [153, 155].

Die Lokalisation der Interaktion von HTATIP2 und EMP3 fokussierte sich im BiFC Assay in einem sehr schmalen perinukleären Bereich, wobei es sich um die Kernhülle handeln könnte. Dies deckt sich mit der beschriebenen Co-Lokalisation von HTATIP2 mit dem Kernporenkomplex [148] und wäre ein Hinweis darauf, dass EMP3 HTATIP2 in seiner Funktion als Kernimport-Inhibitor reguliert. In den EMP3 Knockout-Zellen sind die Proteinlevel von HTATIP2 reduziert, was eine mögliche Erklärung für die ebenfalls reduzierten p53 Level bietet. Möglicherweise inhibiert EMP3 die Funktion von HTATIP2, so dass ein Knockout von EMP3 zu einer verstärkten Kernimport-Blockierung durch HTATIP2 und damit zu einer Änderung im Expressionsmuster einer ganzen Reihe von Genen und zu verringerter Zellviabilität führt. Denkbar wäre auch, dass HTATIP2 durch die Bindung an EMP3 dessen Translokation in den Zellkern verhindert. EMP3 verfügt zwar nicht über ein Kernlokalisierungssignal und wird daher nicht von Importin gebunden, als sehr kleines Protein kann es jedoch theoretisch auch selbstständig, oder durch andere Faktoren vermittelt, durch die Kernporen in den Nukleus gelangen. In Zellen, in denen HTATIP2 herunter reguliert ist, könnte EMP3 dann in den Zellkern gelangen. Möglicherweise trifft auch eine Kombination der beiden Theorien zu und beide Proteine regulieren sich durch die Interaktion gegenseitig. Interessant ist auch die Rolle von HTATIP2 im endosomalen Trafficking von EGFR [154]. In den EMP3 Knockdown-Zellen sind die Proteinlevel von EGFR reduziert. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass EMP3 die Funktion von HTATIP2 inhibiert und dass der Wegfall dieser Inhibition zu einer beschleunigten

Degradation von EGFR durch den HTATIP2-Proteinkomplex führt, trotz ebenfalls verminderter Proteinlevel von HTATIP2. In welcher Form EMP3 und HTATIP2 funktionell interagieren bleibt jedoch im Moment noch spekulativ. Gleiches gilt für die Frage, ob die Interaktion mit EMP3 dabei ebenfalls durch die Bindung von NADPH oder andere Faktoren beeinflusst wird.

RAB10

Das Ras-related Protein Rab-10 wird durch das Rab10 Gen auf 2p23.2 codiert. Rab Proteine gehören zur Superfamilie der monomeren oder „kleinen“ GTPasen und sind hochkonservierte Schlüsselregulatoren des intrazellulären Vesikeltransports und der Vesikelsortierung. Rab GTPasen können zwischen einem inaktiven GDP-gebundenen Zustand und einem aktiven GTP gebundenen Zustand wechseln und werden daher manchmal auch als „molekulare Schalter“ bezeichnet. Die Aktivierung erfolgt dabei durch den Austausch von GDP durch GTP durch einen „Guanine Nucleotide Exchange Factor“ (GEF), während die Inaktivierung über die Hydrolyse von GTP mithilfe eines "GTPase-activating Protein" (GAP) erfolgt [156].

Rab10 ist in Vesikeltransportprozesse vom Golgi-Apparat zur Zellmembran und in die strukturelle Organisation der ER Morphologie involviert [157, 158]. Es steuert unter anderem den Insulin-stimulierten Transport von Glukose Transporter Typ 4 (GLUT4)-Vesikeln zur Zellmembran, sowie in Neuronen den asymmetrischen Transport von Vesikeln zur axonalen Membran während der Axonbildung [159-161]. Darüber hinaus spielt es eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort auf bakterielle Infektionen, indem es den Transport von „Toll-like Receptor 4“ (TLR4) zur Zellmembran von Makrophagen reguliert [162]. TLR4 aktiviert nach Stimulation durch Lipopolysaccharide (LPS) verschiedene zelluläre Signalwege, unter anderem über NF- κ B und MAPK und induziert die Produktion und Ausschüttung von pro-inflammatorischen Cytokinen wie TNF α , IL-6 und Interferon-Beta (IFN- β) [163].

Rab10 ist ein Mediator von intrazellulären Transportprozessen und seine Assoziation mit EMP3 spricht dafür, dass EMP3 ebenfalls direkt oder indirekt in diese Prozesse involviert ist, oder aber, dass Rab10 weitere bisher noch unbekannt Funktionen hat.

RAP2A

Rap2a gehört ebenso wie Rab10 zur Familie der kleinen GTPasen. Es existieren 2 Unterfamilien von Rap Proteinen, Rap1 (a , b) und Rap2 (a, b, c), die eine hohe Homologie zueinander aufweisen und eine wichtige Rolle in diversen intrazellulären Signalkaskaden einnehmen. Die Rap2 Proteine regulieren unter anderem Zellproliferation, Adhäsion, sowie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen über Integrin-abhängige Signalkaskaden und die ERK und JNK Signalwege. Ebenso wie andere Mitglieder der Familie der kleinen GTPasen, können Rap Proteine zwischen einem aktiven und inaktiven Zustand wechseln (siehe oben, Rab10) [156].

Einer der Effektoren mit denen Rap2a interagiert, ist die „Traf2- and Nck-interacting Kinase“ (TNIK), welche ihrerseits den JNK Signalweg aktivieren kann und in die Organisation des Actin-Zytoskeletts und in die Regulation der Wnt-Signalkaskade involviert ist [164-166]. Eine weitere Verbindung von Rap2a mit dem JNK Pathway besteht über die Interaktion mit der „Mitogen-activated kinase kinase kinase kinase 4“ (MAP4K4), welche ebenfalls den JNK Signalweg aktiviert [94]. Über den JNK Signalweg werden in der Zelle Stressantworten auf externe Stimuli, wie UV-Strahlung oder Cytokine, ausgelöst und gesteuert.

Rap2a zeigte in allen Assays eine stabile Interaktion mit EMP3, wurde allerdings durch den Knockdown nur geringfügig in seiner Expression beeinflusst, ebenso wurde keine Veränderung im Rap2a nachrangigen JNK Signalweg festgestellt. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Rap2a EMP3 im Signalweg übergeordnet ist und die Aktivierung oder Inhibition der EMP3 Funktionen steuert. Interessanterweise wurde die Überexpression einer dominant-aktiven Form von Rap2a kürzlich mit einer verminderten Migrationsfähigkeit und Invasivität über eine reduzierte Aktivierung des AKT Signalweges in Gliomzellen in Verbindung gebracht. Eine Verminderung der Rap2a Expression führte umgekehrt zu einer erhöhten Migration, Invasivität und stärkeren AKT-Phosphorylierung [167]. Diese Beobachtungen sind genau gegenteilig zu EMP3 und würden daher dafür sprechen, dass Rap2a einen inhibierenden Effekt auf EMP3 hat. In diesem Zusammenhang wäre interessant ob EMP3 mit Rap2a im aktiven, GTP gebundenen oder inaktiven, GDP gebundenen Zustand interagiert und inwiefern dies die Funktion von EMP3 beeinflusst.

P2X7

Das *P2RX7* Gen auf 12q24.31 codiert für den aus 595 Aminosäuren aufgebauten P2X Purinoceptor 7, der zur purinergen P2X Rezeptor-Familie von Kationen-Kanälen gehört. Das Protein verfügt über 2 Transmembrandomänen und einem extrazellulären Loop, der über insgesamt 5 N-Glykosylierungsmotive verfügt, die für die Rezeptorfunktion von Bedeutung sind. Außerdem verfügt P2X7 über eine, im Vergleich zu anderen P2X Rezeptoren, ungewöhnlich lange intrazelluläre, C-terminale Sequenz. P2X7 wird hauptsächlich in Leukozyten expremiert, aber auch in Mikroglia, Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen [90, 168].

Der P2X7 Rezeptor liegt als Homotrimer in der Membran vor und fungiert als Ligandengesteuerter Ionenkanal, der durch extrazelluläres ATP aktiviert wird. Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der P2X Familie benötigt P2X7 hohe Level von ATP ($>100 \mu\text{M}$) zur Aktivierung. In Abhängigkeit von der Intensität und Dauer der Aktivierung kann sich dabei die Permeabilität des Kanals ändern und unterschiedliche Effekte vermitteln. Kurze Aktivierung von P2X7 führt zu einem Influx kleiner Kationen, vor allem Na^{2+} und Ca^{2+} , und einem Efflux von K^+ [90, 168, 169]. Die daraus resultierende Depolarisation der Membran und der Anstieg der intrazellulären Calcium-Level, induzieren verschiedene Signalkaskaden die unter anderem zur Prozessierung und Ausschüttung von Transmittern und pro-inflammatorischen Cytokinen, wie IL-1 β und IL-18, führen [90, 168]. Länger anhaltende Aktivierung des Rezeptors durch hohe ATP-Level, führt zu einem Einstrom größerer Moleküle bis zu einer Größe von 900 - 1000 Da, was in der Folge zur Ablösung der Membran führt und die Apoptose induziert [168]. Es existieren zwei Modelle, wie dieser Effekt vermittelt werden könnte. Entweder direkt über eine Konformationsänderung und Erweiterung des P2X7 Ionenkanals zu einer größeren Pore, oder indirekt über Aktivierung des p38 MAPK Signalwegs und sekundäre porenbildende Proteine [168].

P2X7 ist in einen Multi-Proteinkomplex eingebunden aus dem bislang 11 Proteine identifiziert wurden, darunter Strukturproteine des Zytoskeletts (β -Actin), Chaperone (Heat Shock Proteine HSP70 und HSP90), Membranproteine (Integrin $\beta 2$) und Signalproteine (Protein Tyrosin Phosphatase β , RPTP β und Phosphatidylinositol-4-Kinase, PI4K) [170]. P2X7 aktiviert eine Reihe von Signalkaskaden, darunter den p38 MAPK Signalweg [171]

und den NF- κ B Signalweg über NF- κ B p65 [172].

P2X7 reguliert verschiedene zelluläre Prozesse, insbesondere im Immun- und Nervensystem. Es steuert unter anderem wichtige Aspekte der angeborenen Immunantwort, wie die Reaktion auf Infektionen und Entzündungsprozesse [90]. Interessanterweise wurde für P2X7 eine starke Hochregulation als Folge einer Ischämie des Hirngewebes berichtet, wie sie auch bei EMP3 zu beobachten war [173]. Dies könnte ein Hinweis auf ein synergistisches Zusammenspiel von P2X7 und EMP3 in der Regulation der Signalübertragung während der Entzündungs- und Regenerationsprozesse sein. In diesem Zusammenhang wäre interessant, inwieweit sich die zelluläre Antwort auf die Stimulation des P2X7 Rezeptors in Anwesenheit oder Abwesenheit von EMP3 ändert. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, ob und in welcher Weise EMP3 die Funktion des P2X7 Rezeptors modulieren kann.

P2X7 diente in den Interaktionsassays als Positivkontrolle, da die Interaktion von EMP3 und P2X7 bereits beschrieben wurde [72]. Die Interaktion von P2X7 und EMP3 bestätigte sich in allen angewandten Assays.

Während das Interaktionssignal im PLA vorwiegend an der Zellmembran lokalisiert war, zeigte sich im BiFC Assay die Interaktion als starkes zytoplasmatisches Signal. Dafür sind mehrere Erklärungen denkbar. Einerseits könnte es sich dabei um einen Artefakt der Überexpression handeln. Andererseits ist auch denkbar, dass eine Interaktion zwischen EMP3 und P2X7 auch an Membranen intrazellulärer Kompartimente, wie dem Golgi-Apparat und dem ER vorliegt.

VAMP3

Vesicle-associated Membrane Protein 3 (VAMP3) wird auf Chromosom 1p36.23 codiert und gehört zur Synaptobrevin/VAMP Proteinfamilie, einer Klasse evolutionär konservierter, Vesikel-assoziierter SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive Factor Attachment Protein Receptor) Membranproteine. SNARE-Proteine sind von entscheidender Bedeutung für den Transport und die Fusion von Vesikeln mit der Zielmembran und werden nach ihrer Lokalisation in zwei Kategorien eingeteilt: Vesikel-assozierte v-SNAREs und Zielmembran-(target-)assozierte t-SNAREs. Auf bestimmte Signale hin (z.B. Ca^{2+} Konzentration) wird über die Interaktion von v- und t-SNAREs die Verschmelzung der

Vesikelmembran mit der Zielmembran initiiert [174, 175]. Auf diese Weise vermitteln VAMPs unter anderem die Ausschüttung von Neurotransmittern oder Cytokinen aus sekretorischen Vesikeln. Insgesamt sind 8 VAMPs bekannt, die jeweils bestimmten Vesikel-transportwegen zugeordnet sind, die für verschiedenste übergeordnete Prozesse benötigt werden. Störung der Synaptobrevin/VAMP Funktion, z.B. durch die Einwirkung von Tetanus-Toxin oder Botulinus-Toxin, hat daher schwerwiegende Folgen für den Organismus [176, 177].

VAMP3 wird in den meisten Körpergeweben expremiert und ist in mehrere Transportwege von endosomalen Vesikeln involviert [174]. Unter anderem spielt es eine Rolle beim Membrantransport und Rücktransport von Integrinen und hat dadurch Einfluss auf Prozesse wie die Adhäsion, Motilität und chemotaktische Migration von Makrophagen und anderen Zellen [178]. Weiterhin vermittelt es die Exozytose von IL-6 und TNF α [92], sowie GLUT4 [179]. Die VAMP3 Proteinlevel sind vermindert, wenn EMP3 ausgeschaltet ist. In mehreren Studien wurde bereits gezeigt, dass die Inaktivierung von VAMP3 mit reduzierter Migrationsfähigkeit assoziiert ist [180-183].

VAMP3 ist ein weiterer Interaktor von EMP3, der in Transportprozesse in der Zelle involviert ist. Die Interaktion von EMP3 und VAMP3 spielt sich dabei überwiegend im Inneren der Zelle ab. Denkbar wäre, dass VAMP3 den Membrantransport von EMP3 vermittelt, allerdings wäre dafür nicht zwangsläufig eine direkte Interaktion notwendig, da VAMP3 nur die Fusion der EMP3-haltigen Vesikel mit der Zellmembran vermitteln könnte. Daher wäre auch die Möglichkeit denkbar, dass EMP3 im Komplex mit VAMP3 dessen Funktion reguliert und beispielsweise in Abhängigkeit von zellulären Signalen das Targeting der VAMP3 Vesikel unterstützt, indem es dessen Affinität zu den t-SNAREs der Zielmembran moduliert. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass EMP3 ganz grundsätzlich die Sortierung und Rekrutierung von VAMP3 steuert.

FLOT1

Die Flotillin Proteinfamilie besteht aus zwei Mitgliedern, Flotillin-1 und Flotillin-2, die untereinander ein hohes Maß an Homologie aufweisen. Die Flotilline sind evolutionär hochkonserviert, unter Wirbeltieren beträgt die Homologie etwa 90%, zwischen

Wirbeltieren und wirbellosen Tieren 64%. Das FLOT1 Gen ist auf Chromosom 6p21.3 lokalisiert und codiert für ein 427 AS großes Protein, das vor allem im Gehirn, Herzmuskel, Lunge, Plazenta und hematopoetischen Zellen expremiert wird. Intrazellulär sind die Flotilline überwiegend an der Zellmembran lokalisiert, wo sie als hetero-oligomere Komplexe in Membran-Mikrodomänen, sogenannten „lipid rafts“, organisiert sind. Es sind allerdings auch andere Lokalisationen für die Flotilline bekannt, unter anderem in endosomalen Kompartimenten, Phagosomen, Exosomen, im Golgi-Apparat und im Zellkern [184].

Die Flotilline sind zwar mit der Zellmembran assoziiert, durchspannen diese jedoch nicht, sondern interagieren dort mutmaßlich mit Membranproteinen über die ein Komplex mit den Effektor-Proteinen der Flotilline vermittelt wird [184]. Unter anderem spielen die Flotilline eine Rolle bei der Rezeptor-Tyrosin-Kinase-regulierten Endozytose. Stimulation durch EGF führt zur Phosphorylierung der hetero-oligomeren Flotillin-Komplexe durch die Src Kinase Fyn und zur endozytischen Internalisierung der Flotillin-Mikrodomänen [185]. FLOT1-reiche Mikrodomänen sind zudem an der Proteinkinase C (PKC) vermittelten Endozytose von Neurotransmitter-Transportern, wie dem Dopamin-Transporter (DAT) und dem glialen Glutamat-Transporter "Excitatory Amino Acid Transporter 2" (EAAT2) beteiligt [186].

Neben der Endozytose, sind die Flotilline in eine Vielzahl weiterer Prozesse involviert. Sie spielen eine Rolle bei neuronalen Regenerations- und Differenzierungsprozessen, der Aktivierung von T-Zellen, sowie bei der Reorganisation des Zytoskeletts und der Migration. Flotilline regulieren die Rekrutierung und Organisation verschiedener Membran- und Signalproteinkomplexe an speziellen Zellmembran-Domänen, darunter EGFR-, Cadherin-, Integrin- und T-Zell-Rezeptor-Komplexe [184].

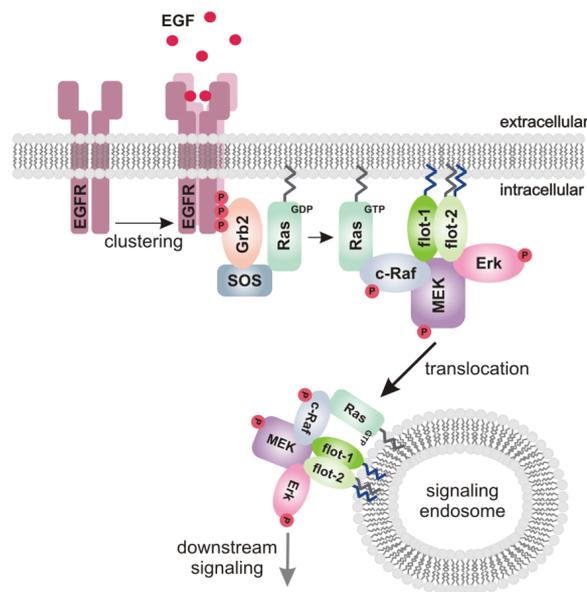


Abbildung 37: Hypothetisches Modell der Flotillin-Funktion in der EGFR/ERK Signaltransduktion. Entnommen aus Kurrle *et al.*, 2012.

FLOT1/2 agieren dabei als Plattform und Regulator für die Rezeptor/Signalprotein-Komplexe an der Membran. Die Flotilline sind über diesen Weg zum Beispiel an der EGFR Signaltransduktion über ERK1/2 beteiligt [187] (Abb. 37, Kurrle *et al.*, 2012, [188]). Darüber hinaus sind die Flotilline auch in der Lage andere Signalkaskaden wie den p38 MAP-Kinase Signalweg zu modulieren [91]. FLOT1 ist zudem in den Insulin Signalweg und die Insulin-stimulierte Translokation von GLUT4 Vesikeln zur Zellmembran involviert [189]. Die Interaktion mit dem Mitogen-Protein „Prostate Tumor-overexpressed Gene 1 Protein“ (PTOV1) kann außerdem die Translokation von FLOT1 in den Nukleus während der S-Phase des Zellzyklus induzieren [190]. Dort aktiviert und stabilisiert FLOT1 den Mitose-Regulator Aurora B und hat somit Einfluss auf die Zellproliferation [191].

Die genaue Funktion der Flotilline wird kontrovers diskutiert, sie scheinen jedoch an der Regulation einer Vielzahl wichtiger zellulärer Signaltransduktionsprozesse beteiligt zu sein [184]. Im Interaktionsscreening wurde eine Interaktion von EMP3 mit FLOT1, nicht jedoch FLOT2, festgestellt. Interessanterweise zeigten sich im BiFC und PL-Assay Interaktionssignale im Bereich des Zellkerns. Dabei könnte es sich zwar um Artefakte handeln, falls nicht wäre es ein Hinweis darauf, dass EMP3 in einem Komplex mit FLOT1 in den Kern gelangen kann und dort möglicherweise an der Regulation der Genexpression

beteiligt ist. Die weitaus stärkeren Interaktionssignale waren jedoch im Bereich der Membran lokalisiert, besonders in Bereichen in denen die Zellen Kontakt zu anderen Zellen hatten. Dies würde für einen funktionellen Zusammenhang der Interaktion von EMP3 und FLOT1 mit Zell-Zell-Interaktionen und den dadurch ausgelösten Signalwegen sprechen. Sehr wahrscheinlich reguliert FLOT1 im Zusammenspiel mit EMP3 die Rekrutierung, Assemblierung und Aktivität verschiedener Membran-assoziiierter Proteinkomplexe. Der Knockdown von EMP3 reduziert die Proteinmenge und die Aktivität von FLOT1, was vermutlich zu einer Reduktion der Signaltransduktionsaktivität verschiedener Rezeptorkomplexe führt. Es wurde bereits in einer anderen Studie gezeigt, dass ein Knockdown von FLOT1 die EGFR Signalübertragung reduziert und zu einer verminderten AKT und ERK Phosphorylierung führt [187]. Dadurch würde sich ein Erklärungsansatz für die reduzierte AKT und ERK Aktivierung und verminderte Proliferation und Migration der Knockdown-Zellen ergeben. Dies wird durch zwei Studien untermauert, in denen gezeigt wurde, dass eine Repression von FLOT1 zu einer Reduktion der Zellproliferation führt [190, 191].

4.6 Funktionelle Charakterisierung von EMP3

Die Interaktoren von EMP3 sind überwiegend Membran-assoziierte Proteine, die in die Regulation von Transport- und Signaltransduktionsprozessen involviert sind. Das legt die Vermutung nahe, dass EMP3 selbst ebenfalls eine wichtige Rolle bei diesen Prozessen spielt.

EMP3 ähnelt strukturell den 4-Transmembran-Proteinen der Tetraspanin- und MARVEL-Domänen-Proteinfamilie, zu der auch die Interaktoren CMTM5 und PLP2 gehören. Von Tetraspanin-Proteinen ist bekannt, dass sie an der Membran zusammen mit anderen Membranproteinen "Tetraspanin-enriched Microdomains" (TEM) bilden und darüber Funktionen in der Organisation von membranassoziierten Signalproteinkomplexen erfüllen [192]. Solche Funktionen sind bereits für die nahe mit EMP3 verwandten Proteine EMP2 und PMP22 beschrieben worden [193]. Von EMP2 ist bekannt, dass es die Expressionslevel und Distribution von Integrinen und anderen Oberflächenproteinen wie Caveolin-1 modulieren kann [194-196]. Es interagiert darüber hinaus auch direkt mit β 1-

Integrinen und "Focal Adhesion Kinase" (FAK) und fungiert als eine Art Adapter zwischen Integrin und FAK [197, 198]. Erhöhte Expression von EMP2 führt zu einer verstärkten Aktivierung der Kinasen FAK und Src, während PMP22 die Signaltransduktion über den AKT-Signalweg moduliert [193, 199]. Für EMP3 wurde bereits ein ähnlicher Zusammenhang der EMP3 Expression mit der Expression von ErbB2 und Integrinen und der Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs gezeigt [69]. Diese Daten, zusammen mit den hier präsentierten Ergebnissen, lassen daher den Schluss zu, dass PMP22, EMP2 und EMP3 ähnliche Funktionen im Transport, sowie der Distribution, Organisation und Regulation von membranassoziierten Signalprotein-Komplexen erfüllen. Dafür spricht auch, dass in den untersuchten Geweben besonders solche Zellen stark EMP3-positiv waren, die eine starke Transport- und Signaltransduktions-Aktivität aufweisen, beispielsweise Neuronen und Immunzellen, und passt auch zur Hochregulierung von EMP3 als Reaktion auf Gewebeschädigung und Entzündungsprozesse.

Diese Hypothese wird zusätzlich dadurch untermauert, dass mehrere der hier vorgestellten Interaktoren von EMP3 in die Regulation der Signaltransduktion über EGFR und/oder AKT/ERK involviert sind. Dies betrifft vor allem PLP2, FLOT1, HTATIP2 und CMTM5. Während PLP2 und FLOT1 die Signaltransduktion positiv zu regulieren scheinen, erfüllen HTATIP2 und CMTM5 die Funktion einer negativen oder inhibierenden Regulation der Signalwege. Möglicherweise interagiert EMP3 auch direkt mit anderen membranassoziierten Rezeptoren, außer P2X7. Wie unter 4.5.1 bereits erwähnt, ist es durchaus denkbar, dass im Screening nicht alle tatsächlichen Interaktionspartner von EMP3 erfasst wurden. Die hier vorgestellten Interaktoren bilden nicht notwendigerweise das vollständige Interaktionsnetzwerk von EMP3 ab. Es besteht also die Möglichkeit, dass EMP3 auch direkt mit Rezeptoren und Signalproteinen wie Integrinen, RTKs, Cytokin-Rezeptoren oder Signalkinasen wie AKT oder ERK1/2 interagiert.

Zudem scheint EMP3 bei der Organisation der Proteinkomplexe eine Rolle zu spielen, die die Fusion von Vesikeln und Membranen vermitteln. Es interagiert sowohl mit einer Rab-GTPase (Rab10) als auch einem v-SNARE (VAMP3). Beides sind entscheidende Elemente bei der Fusion von Vesikeln mit den Zielmembranen [156, 200]. Auch für den Interaktor HTATIP2 wurde kürzlich eine Rolle bei der Vesikelfusion postuliert [201]. EMP3 ist somit ein Bindeglied zwischen verschiedenen wichtigen Elementen, die für den Fusionsmechanismus benötigt werden. In Abbildung 38 ist ein hypothetisches Modell der

Interaktion von EMP3, Rab10, VAMP3 und HTATIP2 im Prozess der Membranfusion dargestellt (basierend auf Daten und Modellen aus [154, 156, 200, 201]).

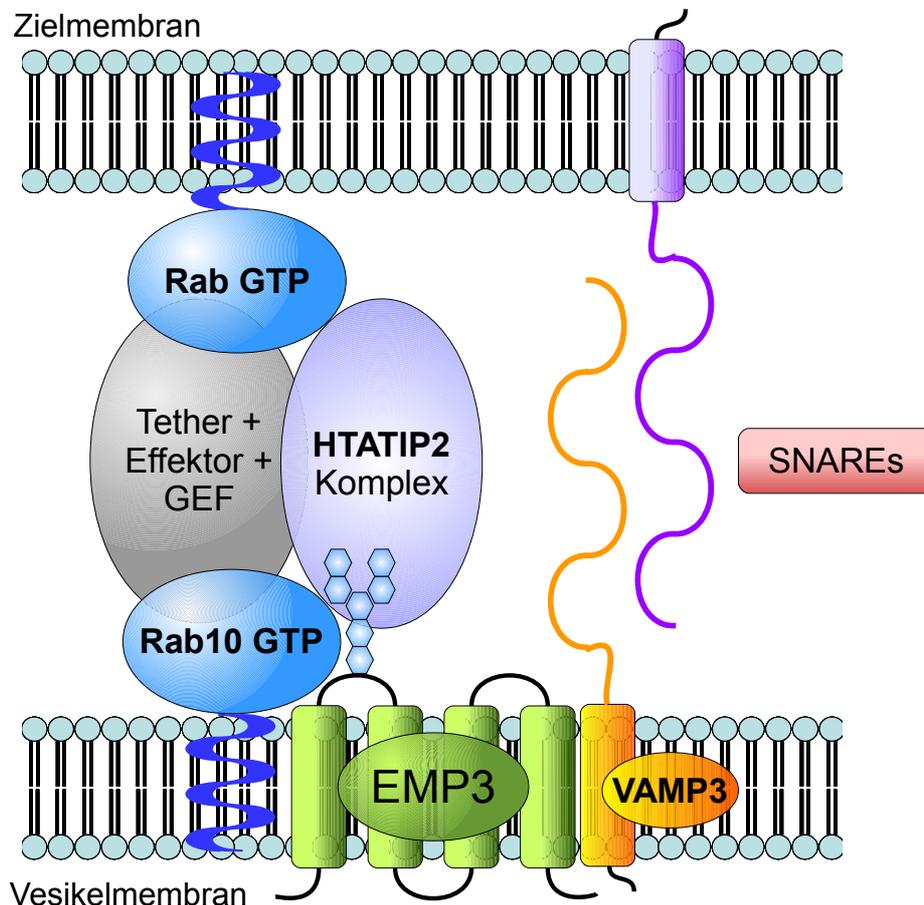


Abbildung 38: Hypothetisches Modell der EMP3 Funktion im Membranfusionsmechanismus.

EMP3 scheint jedoch keine unersetzliche Funktion in der Zelle einzunehmen, da es Zellen gibt, die nur eine sehr geringe endogene Expression von EMP3 aufweisen. In diesen Zellen verläuft die Signaltransduktion möglicherweise über alternative Mechanismen. Denkbar ist auch, dass EMP3 zwar nicht essentiell für die Signaltransduktion ist, aber durch gezieltes Trafficking, Assemblierung und Organisation der Signalkomplexe an der Membran, deren funktionelle Effizienz erhöht. Möglicherweise dient die Glykosylierung von EMP3 dabei als eine Art Lokalisierungssignal um EMP3 und seine Interaktionspartner zu

den entsprechenden zellulären Kompartimenten und Membran-Domänen zu dirigieren. Alternativ könnte die Oligosaccharidkette eventuell als eine Art Anker oder Gerüst für die Signalkomplexe dienen.

Die Tatsache, dass der Knockdown von EMP3 die nachweisbaren Proteinlevel einer ganzen Reihe von Interaktoren und Signalproteinen reduziert, könnte außerdem darauf hindeuten, dass EMP3 entweder die Expression oder die Proteinstabilität dieser Proteine beeinflussen kann. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass dies eine Folge der abgeschwächten AKT, ERK und NF- κ B Signaltransduktion ist. Der Knockdown von EMP3 verhindert möglicherweise die korrekte Assemblierung der Signalkomplexe an der Membran. Dadurch wird die Effizienz der Signaltransduktion stark vermindert und in der Folge die Expression einer Reihe von Genen nicht mehr stimuliert.

Es ist zudem nicht auszuschließen, dass EMP3 selbst als ein membranständiger Rezeptor oder Ligand fungiert. Die Signaltransduktion könnte in diesem Modell z.B. über das G-Protein Rap2a, sowie PLP2 und FLOT1 vermittelt werden, während CMTM5 und HTATIP2 als Negativ-Regulatoren fungieren.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass für EMP3, aufgrund seines Interaktionsnetzwerkes und seiner Homologien, eine Funktion in zellulären Membrantransport- und Organisationsprozessen, sowie in der Signaltransduktion sehr wahrscheinlich ist. Eine Übersicht über die Signalwege in die EMP3 und seine Interaktoren involviert sind, ist in Abbildung 39 dargestellt.

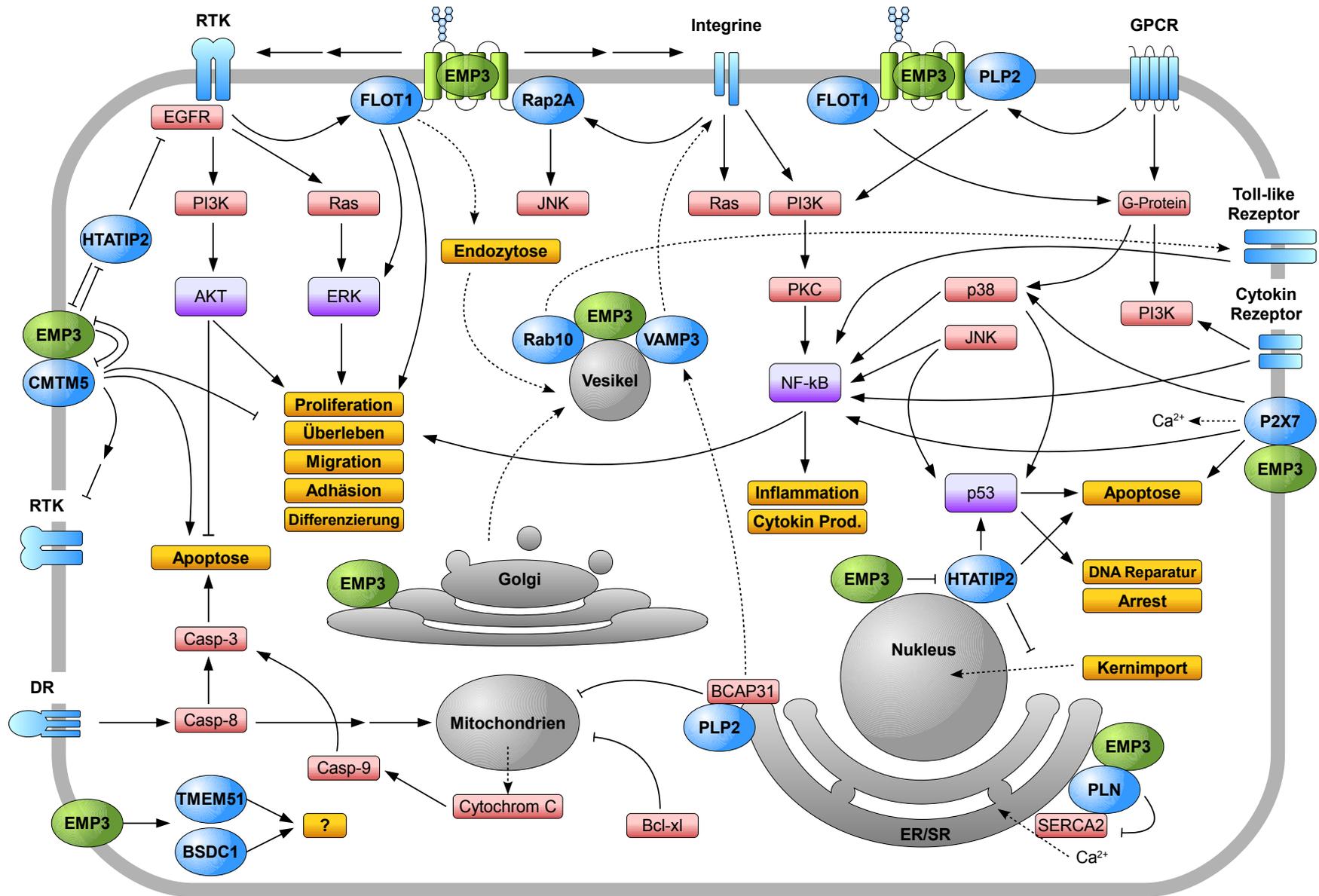


Abbildung 39: Übersicht über das funktionelle Netzwerk von EMP3. Durchgängige Linien repräsentieren eine direkte Interaktion oder einen regulatorischen Einfluss. Gestrichelte Linien repräsentieren Transportprozesse. GPCR = "G-Protein-coupled Receptor", PKC = "Protein Kinase C"

4.7 Diagnostisches & Therapeutisches Potential von EMP3

EMP3 wurde ursprünglich als potentieller Tumorsuppressor in Gliomen mit 1p/19q Co-Deletion vorgeschlagen [55], diese Rolle wird jedoch durch die funktionellen und klinischen Daten bisher nur begrenzt unterstützt. Zudem gibt es mit *CIC* und *FUBP1* inzwischen wesentlich vielversprechendere Kandidaten für die gesuchten Tumorsuppressorgene auf 1p und 19q [11, 17]. Dennoch deuten die klinischen Daten und das Expressionsmuster von EMP3 in verschiedenen Tumorentitäten auf eine Rolle von EMP3 in der Entstehung und/oder Progression von Neoplasien hin [54]. Dabei zeigt sich jedoch in verschiedenen Tumoren ein differentielles, bisweilen sogar gegensätzliches Bild. In einigen Neoplasien, wie Gliomen, Mammakarzinomen und Urothelkarzinomen korreliert erhöhte EMP3 Expression mit höherer Malignität und kürzerer Überlebenswahrscheinlichkeit [61, 68, 69]. In anderen Tumoren, wie Neuroblastomen, Speiseröhrenkarzinomen und Bronchialkarzinomen, korreliert die EMP3 Expression hingegen invers mit diesen Parametern [55, 57, 58]. Warum das der Fall ist, lässt sich aus den bisher verfügbaren Daten nicht zweifelsfrei erschließen. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass dieses Phänomen mit dem unterschiedlichen genetischen und epigenetischen Hintergrund der verschiedenen Neoplasien zusammenhängt. Eine plausible Erklärung wäre, dass EMP3 nicht nur Signalwege moduliert, die zum Wachstum und Überleben der Zellen beitragen, sondern dass von einem EMP3 Verlust auch solche Signalkaskaden betroffen sind, die das Zellwachstum begrenzen oder die Apoptose regulieren, zum Beispiel über p53. Darüber hinaus können die komplexen Signalwege, in die EMP3 möglicherweise integriert ist, in verschiedenen Neoplasien unterschiedlichen Regulationen unterliegen und unterschiedliche zelluläre Funktionen hemmen oder stimulieren .

Die bisher verfügbaren Daten aus dieser und anderen Studien deuten darauf hin, dass EMP3 ein valides therapeutisches Ziel sein könnte [54]. Ähnliche Ansätze gibt es bereits für das nah verwandte EMP2. Versuche mit rekombinanten Anti-EMP2 Antikörpern zeigen, dass diese die EMP2-vermittelte Signaltransduktion über FAK und Src blockieren können. Diese Antikörper haben eine anti-proliferative, anti-invasive und Apoptose-induzierende Wirkung auf Krebszelllinien und können das Tumorwachstum im Xenograft-Modell inhibieren [202-205]. Die strukturellen und funktionellen Parallelen zwischen EMP2 und

EMP3 lassen darauf schließen, dass ein ähnlicher Effekt auch von einem EMP3 Inhibitor zu erwarten wäre.

Die differentielle Expression von EMP3 in verschiedenen Tumoren bedeutet, dass ein eventueller Inhibitor gegen die Funktion von EMP3 möglicherweise nur sinnvoll gegen solche Tumorguppen eingesetzt werden könnte, die eine erhöhte EMP3 Expression aufweisen. Zudem bleibt die Frage nach den Nebenwirkungen einer Inhibition von EMP3. Da das Protein in vielen wichtigen Körperzellen wie Leukozyten und Neuronen stark exprimiert wird, wären negative Auswirkungen auf diese Zellen ebenfalls denkbar. Zudem könnte durch die Inhibition die Tumorentstehung in anderen Geweben hervorgerufen oder begünstigt werden. Dagegen spricht allerdings, dass eine EMP3 Knockout-Maus existiert, die voll lebensfähig ist und keinen auffälligen Phänotyp aufweist (unpublizierte Daten, Referenz: Dr. Zouhair Aherrahrou, Medizinische Klinik II, Universität zu Lübeck).

Von besonderem Interesse ist der mögliche regulatorische Einfluss von EMP3 auf verschiedene Signalkaskaden in die EGFR, AKT, ERK und NF- κ B involviert sind und die in vielen Tumorentitäten überaktiviert werden. Die funktionellen Daten deuten darauf hin, dass der Knockdown von EMP3 die verstärkte Aktivierung dieser Signalkaskaden deutlich vermindert. Diese Signalwege werden bereits seit einiger Zeit als vielversprechende Angriffspunkte für zielgerichtete Krebstherapien diskutiert und Inhibitoren gegen verschiedene Rezeptoren sind bereits seit längerem in der Erprobung [47, 100]. Ein Inhibitor gegen EMP3 könnte zum Beispiel in Kombination mit solchen Inhibitoren eingesetzt werden, um den Effekt zu maximieren.

EMP3 könnte darüber hinaus auch einen prädiktiver Marker für andere Therapieformen darstellen. Besonders interessant ist dabei die Möglichkeit, EMP3 als prädiktiven Marker für Therapien mit TRAIL oder ähnlichen Apoptose-induzierenden Agenzien einzusetzen. Diese Therapien haben das Problem, dass die Tumorzellen oftmals Resistenzen aufweisen und daher eine antitumorogene Wirkung ausbleibt. Teilweise sind die entsprechenden Signalwege in den Tumorzellen dahingehend verändert, dass diese Todes-Liganden sogar im Gegenteil die Tumorzell-Proliferation anregen [206]. Daher ist die Möglichkeit einer Voraussage des Verhaltens des Tumors auf solche Therapien dringend erforderlich. Ebenso sind Kombinationstherapien mit Agenzien, die diese Resistenzen herabsetzen oder ausschalten, wünschenswert. Sollte sich die sensitivierende Wirkung

der EMP3 Repression bestätigen, könnte EMP3 dahingehend eine wichtige, klinisch relevante Lücke füllen und als prädiktiver Marker die Diagnostik und Therapie von Gliomen und anderen Tumoren in Zukunft deutlich verbessern. Zudem könnte eine gegen EMP3 gerichtete Therapie unter Umständen auch Relevanz in anderen pathologischen Prozessen wie Autoimmunerkrankungen, chronischen Entzündungsprozessen, Infektionen und Sepsis eingesetzt werden. Um dies zu verifizieren sind allerdings definitiv weitere Studien notwendig.

4.8 Schlussfolgerung & Ausblick

Die hier präsentierten Daten können einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Funktion von EMP3 beitragen, es verbleiben jedoch eine Reihe offener Fragen. Dabei wird zunehmend deutlich, dass die Funktion von EMP3 komplex ist und sich seine Rolle nicht ohne weiteres als "Tumorsuppressor" oder "Onkogen" kategorisieren lässt. Vielmehr deuten die Ergebnisse dieser und anderer Studien darauf hin, dass es, in Abhängigkeit vom genetischem Hintergrund des Tumors, potentiell beide Rollen einnehmen kann.

EMP3 ist ein Marker mit prognostischer, möglicherweise auch mit prädiktiver Relevanz in Gliomen und anderen Tumoren und die verfügbaren funktionellen Daten lassen darauf schließen, dass EMP3 auch ein valides therapeutisches Target darstellen könnte.

Funktionell ist EMP3 Teil eines komplexen Interaktions- und Signaltransduktionsnetzwerkes, das vermutlich die Rekrutierung, Assemblierung und Distribution verschiedener Rezeptor- und Signalproteinkomplexe reguliert. EMP3 kann somit wichtige Signalwege modulieren und zelluläre Prozesse wie Proliferation, Migration, Überleben und Apoptose beeinflussen. Die genaue Funktion von EMP3 innerhalb dieses Netzwerkes bleibt jedoch im Moment noch spekulativ.

Um die klinische Relevanz der EMP3 Expression in Tumoren besser beurteilen zu können, sind weitere immunhistochemische Untersuchungen an einer größeren Serie klinisch dokumentierter Fälle notwendig. Dabei wäre von besonderem Interesse, ob die EMP3

Proteinmenge mit dem Ansprechen auf verschiedene Therapien korreliert, um die prädiktive Relevanz von EMP3 beurteilen zu können. Weiterhin wäre interessant, ob die Lokalisation von EMP3 innerhalb der Zellen Auswirkungen auf die Aggressivität des Tumors und den klinischen Verlauf hat (Kern, Zytoplasma, Membran) und von welchen Signalwegen und molekularen Veränderungen abhängig ist, ob EMP3 im Kern oder an der Membran lokalisiert ist.

Um die genaue Funktion von EMP3 zu verstehen, sind ebenfalls weitere Versuche notwendig. Um die Interaktionen genauer zu charakterisieren, könnten Doppel-Knockdown/Doppel-Überexpressions-Experimente mit EMP3 und den Interaktoren durchgeführt werden. Interessant wäre auch festzustellen, in welchen Kompartimenten die EMP3-Interaktor-Komplexe genau lokalisiert sind und welche weiteren Proteine an diesen Komplexen beteiligt sind. Für Rap2a, Rab10 und HTATIP2 wäre zudem interessant, ob sie in aktivem oder inaktivem oder beiden Zuständen mit EMP3 interagieren können.

Ein weiterer Aspekt, der definitiv weiterer Untersuchungen bedarf, ist die Rolle von EMP3 in der Regulation wichtiger Signalwege wie EGFR, ERK und AKT. Um die Hypothese zu bestätigen, dass EMP3 eine Rolle bei der Signaltransduktion spielt, sind Experimente mit Agonisten und Antagonisten gegen verschiedene Rezeptoren und Signalproteine notwendig. Auf diese Weise könnte auch ermittelt werden, wie EMP3 die Funktion von P2X7 moduliert oder umgekehrt und wie sich EMP3 in Reaktion auf extrazelluläre Stimuli verhält, beziehungsweise wie sich die Reaktion der Zelle in Abhängigkeit von EMP3 ändert. Darüber hinaus sind weitere Interaktionsexperimente denkbar, um festzustellen ob EMP3 möglicherweise auch direkt mit Rezeptoren wie EGFR, ErbB2, Integrinen, oder Signaltransduktionsproteinen wie Raf, MEK, ERK, PI3K und AKT interagieren kann.

Die bisher verfügbaren Daten rechtfertigen in jedem Fall die Funktion von EMP3 und seine Rolle in der Entstehung von Neoplasien weiter zu untersuchen.

5 Literaturverzeichnis

1. Kettenmann, H., H. Kettenmann, and B.R. Ransom, *Neuroglia*. 3rd ed. 2013, Oxford ; New York: Oxford University Press. xxii, 930 p.
2. Goodenberger, M.L. and R.B. Jenkins, *Genetics of adult glioma*. *Cancer Genet*, 2012. **205**(12): p. 613-21.
3. Louis D.N., O.H., Wiestler O.D., Cavenee W.K. (Eds.), ed. *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. 2007, International Agency for Research on Cancer (IARC) Press: Lyon.
4. Deimling, A.v., *Gliomas*. Recent results in cancer research 171. 2009, Berlin: Springer. xv, 259 p.
5. Hartmann, C., W. Mueller, and A. von Deimling, *Pathology and molecular genetics of oligodendroglial tumors*. *J Mol Med (Berl)*, 2004. **82**(10): p. 638-55.
6. Sherr, C.J., *Principles of tumor suppression*. *Cell*, 2004. **116**(2): p. 235-46.
7. Croce, C.M., *Oncogenes and cancer*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(5): p. 502-11.
8. Jenkins, R.B., H. Blair, K.V. Ballman, C. Giannini, R.M. Arusell, M. Law, H. Flynn, S. Passe, S. Felten, P.D. Brown, E.G. Shaw, and J.C. Buckner, *A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma*. *Cancer Res*, 2006. **66**(20): p. 9852-61.
9. Thomas, L., A.L. Di Stefano, and F. Ducray, *Predictive biomarkers in adult gliomas: the present and the future*. *Curr Opin Oncol*, 2013. **25**(6): p. 689-94.
10. von Deimling, A., D.N. Louis, K. von Ammon, I. Petersen, O.D. Wiestler, and B.R. Seizinger, *Evidence for a tumor suppressor gene on chromosome 19q associated with human astrocytomas, oligodendrogliomas, and mixed gliomas*. *Cancer Res*, 1992. **52**(15): p. 4277-9.
11. Bettegowda, C., N. Agrawal, Y. Jiao, M. Sausen, L.D. Wood, R.H. Hruban, F.J. Rodriguez, D.P. Cahill, R. McLendon, G. Riggins, V.E. Velculescu, S.M. Oba-Shinjo, S.K. Marie, B. Vogelstein, D. Bigner, H. Yan, N. Papadopoulos, and K.W. Kinzler,

- Mutations in CIC and FUBP1 contribute to human oligodendroglioma.* Science, 2011. **333**(6048): p. 1453-5.
12. Chehab, N.H., A. Malikzay, E.S. Stavridi, and T.D. Halazonetis, *Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(24): p. 13777-82.
 13. Levine, A.J., *p53, the cellular gatekeeper for growth and division.* Cell, 1997. **88**(3): p. 323-31.
 14. Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein, and C.C. Harris, *p53 mutations in human cancers.* Science, 1991. **253**(5015): p. 49-53.
 15. Consortium, T.U., *Activities at the Universal Protein Resource (UniProt).* Nucleic Acids Res., 2014. **42**: p. D191-D198.
 16. Sahm, F., C. Koelsche, J. Meyer, S. Pusch, K. Lindenberg, W. Mueller, C. Herold-Mende, A. von Deimling, and C. Hartmann, *CIC and FUBP1 mutations in oligodendrogliomas, oligoastrocytomas and astrocytomas.* Acta Neuropathol, 2012. **123**(6): p. 853-60.
 17. Yip, S., Y.S. Butterfield, O. Morozova, S. Chittaranjan, M.D. Blough, J. An, I. Birol, C. Chesnelong, R. Chiu, E. Chuah, R. Corbett, R. Docking, M. Firme, M. Hirst, S. Jackman, A. Karsan, H. Li, D.N. Louis, A. Maslova, R. Moore, A. Moradian, K.L. Mungall, M. Perizzolo, J. Qian, G. Roldan, E.E. Smith, J. Tamura-Wells, N. Thiessen, R. Varhol, S. Weiss, W. Wu, S. Young, Y. Zhao, A.J. Mungall, S.J. Jones, G.B. Morin, J.A. Chan, J.G. Cairncross, and M.A. Marra, *Concurrent CIC mutations, IDH mutations, and 1p/19q loss distinguish oligodendrogliomas from other cancers.* J Pathol, 2012. **226**(1): p. 7-16.
 18. Yan, H., D.W. Parsons, G. Jin, R. McLendon, B.A. Rasheed, W. Yuan, I. Kos, I. Batinic-Haberle, S. Jones, G.J. Riggins, H. Friedman, A. Friedman, D. Reardon, J. Herndon, K.W. Kinzler, V.E. Velculescu, B. Vogelstein, and D.D. Bigner, *IDH1 and IDH2 mutations in gliomas.* N Engl J Med, 2009. **360**(8): p. 765-73.
 19. Cohen, A.L., S.L. Holmen, and H. Colman, *IDH1 and IDH2 mutations in gliomas.* Curr Neurol Neurosci Rep, 2013. **13**(5): p. 345.
 20. Balss, J., J. Meyer, W. Mueller, A. Korshunov, C. Hartmann, and A. von Deimling,

- Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. Acta Neuropathol*, 2008. **116**(6): p. 597-602.
21. Hartmann, C., J. Meyer, J. Balss, D. Capper, W. Mueller, A. Christians, J. Felsberg, M. Wolter, C. Mawrin, W. Wick, M. Weller, C. Herold-Mende, A. Unterberg, J.W. Jeuken, P. Wesseling, G. Reifenberger, and A. von Deimling, *Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. Acta Neuropathol*, 2009. **118**(4): p. 469-74.
22. Dang, L., D.W. White, S. Gross, B.D. Bennett, M.A. Bittinger, E.M. Driggers, V.R. Fantin, H.G. Jang, S. Jin, M.C. Keenan, K.M. Marks, R.M. Prins, P.S. Ward, K.E. Yen, L.M. Liaw, J.D. Rabinowitz, L.C. Cantley, C.B. Thompson, M.G. Vander Heiden, and S.M. Su, *Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. Nature*, 2009. **462**(7274): p. 739-44.
23. Xu, W., H. Yang, Y. Liu, Y. Yang, P. Wang, S.H. Kim, S. Ito, C. Yang, P. Wang, M.T. Xiao, L.X. Liu, W.Q. Jiang, J. Liu, J.Y. Zhang, B. Wang, S. Frye, Y. Zhang, Y.H. Xu, Q.Y. Lei, K.L. Guan, S.M. Zhao, and Y. Xiong, *Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. Cancer Cell*, 2011. **19**(1): p. 17-30.
24. Lu, C., P.S. Ward, G.S. Kapoor, D. Rohle, S. Turcan, O. Abdel-Wahab, C.R. Edwards, R. Khanin, M.E. Figueroa, A. Melnick, K.E. Wellen, D.M. O'Rourke, S.L. Berger, T.A. Chan, R.L. Levine, I.K. Mellinghoff, and C.B. Thompson, *IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. Nature*, 2012. **483**(7390): p. 474-8.
25. Nounshmehr, H., D.J. Weisenberger, K. Diefes, H.S. Phillips, K. Pujara, B.P. Berman, F. Pan, C.E. Pelloski, E.P. Sulman, K.P. Bhat, R.G. Verhaak, K.A. Hoadley, D.N. Hayes, C.M. Perou, H.K. Schmidt, L. Ding, R.K. Wilson, D. Van Den Berg, H. Shen, H. Bengtsson, P. Neuvial, L.M. Cope, J. Buckley, J.G. Herman, S.B. Baylin, P.W. Laird, and K. Aldape, *Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. Cancer Cell*, 2010. **17**(5): p. 510-22.
26. Turcan, S., D. Rohle, A. Goenka, L.A. Walsh, F. Fang, E. Yilmaz, C. Campos, A.W. Fabius, C. Lu, P.S. Ward, C.B. Thompson, A. Kaufman, O. Guryanova, R. Levine, A.

- Heguy, A. Viale, L.G. Morris, J.T. Huse, I.K. Mellinghoff, and T.A. Chan, *IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype*. Nature, 2012. **483**(7390): p. 479-83.
27. Watanabe, T., S. Nobusawa, P. Kleihues, and H. Ohgaki, *IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas*. Am J Pathol, 2009. **174**(4): p. 1149-53.
28. Koivunen, P., S. Lee, C.G. Duncan, G. Lopez, G. Lu, S. Ramkissoon, J.A. Losman, P. Joensuu, U. Bergmann, S. Gross, J. Travins, S. Weiss, R. Looper, K.L. Ligon, R.G. Verhaak, H. Yan, and W.G. Kaelin, Jr., *Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation*. Nature, 2012. **483**(7390): p. 484-8.
29. Esteller, M., J. Garcia-Foncillas, E. Andion, S.N. Goodman, O.F. Hidalgo, V. Vanaclocha, S.B. Baylin, and J.G. Herman, *Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents*. N Engl J Med, 2000. **343**(19): p. 1350-4.
30. Hegi, M.E., A.C. Diserens, T. Gorlia, M.F. Hamou, N. de Tribolet, M. Weller, J.M. Kros, J.A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, J.E. Bromberg, P. Hau, R.O. Mirimanoff, J.G. Cairncross, R.C. Janzer, and R. Stupp, *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 997-1003.
31. Pegg, A.E., *Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases*. Mutat Res, 2000. **462**(2-3): p. 83-100.
32. Herrlinger, U., J. Rieger, D. Koch, S. Loeser, B. Blaschke, R.D. Kortmann, J.P. Steinbach, T. Hundesberger, W. Wick, R. Meyermann, T.C. Tan, C. Sommer, M. Bamberg, G. Reifenberger, and M. Weller, *Phase II trial of lomustine plus temozolomide chemotherapy in addition to radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma: UKT-03*. J Clin Oncol, 2006. **24**(27): p. 4412-7.
33. Weiler, M., C. Hartmann, D. Wiewrodt, U. Herrlinger, T. Gorlia, O. Bahr, R. Meyermann, M. Bamberg, M. Tatagiba, A. von Deimling, M. Weller, and W. Wick, *Chemoradiotherapy of newly diagnosed glioblastoma with intensified temozolomide*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2010. **77**(3): p. 670-6.

34. Gerson, S.L., *MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(4): p. 296-307.
35. Rivera, A.L., C.E. Pelloski, M.R. Gilbert, H. Colman, C. De La Cruz, E.P. Sulman, B.N. Bekele, and K.D. Aldape, *MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma*. Neuro Oncol, 2010. **12**(2): p. 116-21.
36. van den Bent, M.J., H.J. Dubbink, M. Sanson, C.R. van der Lee-Haarloo, M. Hegi, J.W. Jeuken, A. Ibdaih, A.A. Brandes, M.J. Taphoorn, M. Frenay, D. Lacombe, T. Gorlia, W.N. Dinjens, and J.M. Kros, *MGMT promoter methylation is prognostic but not predictive for outcome to adjuvant PCV chemotherapy in anaplastic oligodendroglial tumors: a report from EORTC Brain Tumor Group Study 26951*. J Clin Oncol, 2009. **27**(35): p. 5881-6.
37. Preusser, M., R. Charles Janzer, J. Felsberg, G. Reifenberger, M.F. Hamou, A.C. Diserens, R. Stupp, T. Gorlia, C. Marosi, H. Heinzl, J.A. Hainfellner, and M. Hegi, *Anti-O6-methylguanine-methyltransferase (MGMT) immunohistochemistry in glioblastoma multiforme: observer variability and lack of association with patient survival impede its use as clinical biomarker*. Brain Pathol, 2008. **18**(4): p. 520-32.
38. von Deimling, A., A. Korshunov, and C. Hartmann, *The next generation of glioma biomarkers: MGMT methylation, BRAF fusions and IDH1 mutations*. Brain Pathol, 2011. **21**(1): p. 74-87.
39. Wick, W., C. Meisner, B. Hentschel, M. Platten, A. Schilling, B. Wiestler, M.C. Sabel, S. Koeppen, R. Ketter, M. Weiler, G. Tabatabai, A. von Deimling, D. Gramatzki, M. Westphal, G. Schackert, M. Loeffler, M. Simon, G. Reifenberger, and M. Weller, *Prognostic or predictive value of MGMT promoter methylation in gliomas depends on IDH1 mutation*. Neurology, 2013. **81**(17): p. 1515-22.
40. Wick, W., M. Platten, C. Meisner, J. Felsberg, G. Tabatabai, M. Simon, G. Nikkhah, K. Papsdorf, J.P. Steinbach, M. Sabel, S.E. Combs, J. Vesper, C. Braun, J. Meixensberger, R. Ketter, R. Mayer-Steinacker, G. Reifenberger, M. Weller, and N.O.A.S.G.o.N.-o.W.G.o.G.C. Society, *Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2012. **13**(7): p. 707-15.

41. Preusser, M., *MGMT analysis at DNA, RNA and protein levels in glioblastoma tissue*. *Histol Histopathol*, 2009. **24**(4): p. 511-8.
42. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Genetic profile of astrocytic and oligodendroglial gliomas*. *Brain Tumor Pathol*, 2011. **28**(3): p. 177-83.
43. Killela, P.J., Z.J. Reitman, Y. Jiao, C. Bettegowda, N. Agrawal, L.A. Diaz, Jr., A.H. Friedman, H. Friedman, G.L. Gallia, B.C. Giovanella, A.P. Grollman, T.C. He, Y. He, R.H. Hruban, G.I. Jallo, N. Mandahl, A.K. Meeker, F. Mertens, G.J. Netto, B.A. Rasheed, G.J. Riggins, T.A. Rosenquist, M. Schiffman, M. Shih le, D. Theodorescu, M.S. Torbenson, V.E. Velculescu, T.L. Wang, N. Wentzensen, L.D. Wood, M. Zhang, R.E. McLendon, D.D. Bigner, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, N. Papadopoulos, and H. Yan, *TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(15): p. 6021-6.
44. Olar, A. and K.D. Aldape, *Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment*. *J Pathol*, 2014. **232**(2): p. 165-77.
45. Wen, P.Y. and S. Kesari, *Malignant gliomas in adults*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(5): p. 492-507.
46. Sahm, F., D. Capper, A. Jeibmann, A. Habel, W. Paulus, D. Troost, and A. von Deimling, *Addressing diffuse glioma as a systemic brain disease with single-cell analysis*. *Arch Neurol*, 2012. **69**(4): p. 523-6.
47. Hamza, M.A. and M. Gilbert, *Targeted therapy in gliomas*. *Curr Oncol Rep*, 2014. **16**(4): p. 379.
48. Auffinger, B., B. Thaci, P. Nigam, E. Rincon, Y. Cheng, and M.S. Lesniak, *New therapeutic approaches for malignant glioma: in search of the Rosetta stone*. *F1000 Med Rep*, 2012. **4**: p. 18.
49. Liehr, T., G. Kuhlenbaumer, P. Wulf, V. Taylor, U. Suter, C. Van Broeckhoven, J.R. Lupski, U. Claussen, and B. Rautenstrauss, *Regional localization of the human epithelial membrane protein genes 1, 2, and 3 (EMP1, EMP2, EMP3) to 12p12.3, 16p13.2, and 19q13.3*. *Genomics*, 1999. **58**(1): p. 106-8.
50. Taylor, V. and U. Suter, *Epithelial membrane protein-2 and epithelial membrane*

- protein-3: two novel members of the peripheral myelin protein 22 gene family.* Gene, 1996. **175**(1-2): p. 115-20.
51. Ben-Porath, I. and N. Benvenisty, *Characterization of a tumor-associated gene, a member of a novel family of genes encoding membrane glycoproteins.* Gene, 1996. **183**(1-2): p. 69-75.
52. Taylor, V., A.A. Welcher, A.E. Program, and U. Suter, *Epithelial membrane protein-1, peripheral myelin protein 22, and lens membrane protein 20 define a novel gene family.* J Biol Chem, 1995. **270**(48): p. 28824-33.
53. Jetten, A.M. and U. Suter, *The peripheral myelin protein 22 and epithelial membrane protein family.* Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2000. **64**: p. 97-129.
54. Fumoto, S., K. Tanimoto, E. Hiyama, T. Noguchi, M. Nishiyama, and K. Hiyama, *EMP3 as a candidate tumor suppressor gene for solid tumors.* Expert Opin Ther Targets, 2009. **13**(7): p. 811-22.
55. Alaminos, M., V. Davalos, S. Roperio, F. Setien, M.F. Paz, M. Herranz, M.F. Fraga, J. Mora, N.K. Cheung, W.L. Gerald, and M. Esteller, *EMP3, a myelin-related gene located in the critical 19q13.3 region, is epigenetically silenced and exhibits features of a candidate tumor suppressor in glioma and neuroblastoma.* Cancer Res, 2005. **65**(7): p. 2565-71.
56. Margetts, C.D., M. Morris, D. Astuti, D.C. Gentle, A. Cascon, F.E. McDonald, D. Catchpole, M. Robledo, H.P. Neumann, F. Latif, and E.R. Maher, *Evaluation of a functional epigenetic approach to identify promoter region methylation in pheochromocytoma and neuroblastoma.* Endocr Relat Cancer, 2008. **15**(3): p. 777-86.
57. Fumoto, S., K. Hiyama, K. Tanimoto, T. Noguchi, J. Hihara, E. Hiyama, T. Noguchi, and M. Nishiyama, *EMP3 as a tumor suppressor gene for esophageal squamous cell carcinoma.* Cancer Lett, 2009. **274**(1): p. 25-32.
58. Xue, Q., Y. Zhou, C. Wan, L. Lv, B. Chen, X. Cao, G. Ju, Y. Huang, R. Ni, and G. Mao, *Epithelial membrane protein 3 is frequently shown as promoter methylation and functions as a tumor suppressor gene in non-small cell lung cancer.* Exp Mol Pathol, 2013. **95**(3): p. 313-8.

59. Li, K.K., J.C. Pang, N.Y. Chung, Y.L. Ng, N.H. Chan, L. Zhou, W.S. Poon, and H.K. Ng, *EMP3 overexpression is associated with oligodendroglial tumors retaining chromosome arms 1p and 19q*. Int J Cancer, 2007. **120**(4): p. 947-50.
60. Kunitz, A., M. Wolter, J. van den Boom, J. Felsberg, B. Tews, M. Hahn, A. Benner, M. Sabel, P. Lichter, G. Reifenberger, A. von Deimling, and C. Hartmann, *DNA hypermethylation and aberrant expression of the EMP3 gene at 19q13.3 in Human Gliomas*. Brain Pathol, 2007. **17**(4): p. 363-70.
61. Ernst, A., S. Hofmann, R. Ahmadi, N. Becker, A. Korshunov, F. Engel, C. Hartmann, J. Felsberg, M. Sabel, H. Peterziel, M. Durchdewald, J. Hess, S. Barbus, B. Campos, A. Starzinski-Powitz, A. Unterberg, G. Reifenberger, P. Lichter, C. Herold-Mende, and B. Radlwimmer, *Genomic and expression profiling of glioblastoma stem cell-like spheroid cultures identifies novel tumor-relevant genes associated with survival*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(21): p. 6541-50.
62. Mellai, M., A. Piazzzi, V. Caldera, L. Annovazzi, O. Monzeglio, R. Senetta, P. Cassoni, and D. Schiffer, *Promoter hypermethylation of the EMP3 gene in a series of 229 human gliomas*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 756302.
63. Pasini, A., P. Iorio, E. Bianchi, S. Cerasoli, A.M. Cremonini, M. Faedi, C. Guarnieri, G. Guiducci, L. Riccioni, C. Molinari, C. Rengucci, D. Calistri, and E. Giordano, *LOH 19q indicates shorter disease progression-free interval in low-grade oligodendrogliomas with EMP3 methylation*. Oncol Rep, 2012. **28**(6): p. 2271-7.
64. Scrideli, C.A., C.G. Carlotti, Jr., O.K. Okamoto, V.S. Andrade, M.A. Cortez, F.J. Motta, A.K. Lucio-Eterovic, L. Neder, S. Rosemberg, S.M. Oba-Shinjo, S.K. Marie, and L.G. Tone, *Gene expression profile analysis of primary glioblastomas and non-neoplastic brain tissue: identification of potential target genes by oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR*. J Neurooncol, 2008. **88**(3): p. 281-91.
65. Noushmehr, H., D.J. Weisenberger, K. Diefes, H.S. Phillips, K. Pujara, B.P. Berman, F. Pan, C.E. Pelloski, E.P. Sulman, K.P. Bhat, R.G. Verhaak, K.A. Hoadley, D.N. Hayes, C.M. Perou, H.K. Schmidt, L. Ding, R.K. Wilson, D. Van Den Berg, H. Shen, H. Bengtsson, P. Neuvial, L.M. Cope, J. Buckley, J.G. Herman, S.B. Baylin, P.W. Laird, K. Aldape, and N. Cancer Genome Atlas Research, *Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma*. Cancer Cell,

2010. **17**(5): p. 510-22.
66. Evtimova, V., R. Zeillinger, and U.H. Weidle, *Identification of genes associated with the invasive status of human mammary carcinoma cell lines by transcriptional profiling*. *Tumour Biol*, 2003. **24**(4): p. 189-98.
67. Mackay, A., C. Jones, T. Dexter, R.L. Silva, K. Bulmer, A. Jones, P. Simpson, R.A. Harris, P.S. Jat, A.M. Neville, L.F. Reis, S.R. Lakhani, and M.J. O'Hare, *cDNA microarray analysis of genes associated with ERBB2 (HER2/neu) overexpression in human mammary luminal epithelial cells*. *Oncogene*, 2003. **22**(17): p. 2680-8.
68. Zhou, W., Z. Jiang, X. Li, F. Xu, Y. Liu, P. Wen, L. Kong, M. Hou, and J. Yu, *EMP3 overexpression in primary breast carcinomas is not associated with epigenetic aberrations*. *J Korean Med Sci*, 2009. **24**(1): p. 97-103.
69. Wang, Y.W., W.M. Li, W.J. Wu, C.Y. Chai, H.S. Liu, M.D. Lai, and N.H. Chow, *Potential Significance of EMP3 in Patients with Upper Urinary Tract Urothelial Carcinoma: Crosstalk with ErbB2/PI3K/Akt Pathway*. *J Urol*, 2013.
70. Burmester, J.K., B.K. Suarez, J.H. Lin, C.H. Jin, R.D. Miller, K.Q. Zhang, S.A. Salzman, D.J. Reding, and W.J. Catalona, *Analysis of candidate genes for prostate cancer*. *Hum Hered*, 2004. **57**(4): p. 172-8.
71. Bolin, L.M., T. McNeil, L.A. Lucian, B. DeVaux, K. Franz-Bacon, D.M. Gorman, S. Zurawski, R. Murray, and T.K. McClanahan, *HNMP-1: a novel hematopoietic and neural membrane protein differentially regulated in neural development and injury*. *J Neurosci*, 1997. **17**(14): p. 5493-502.
72. Wilson, H.L., S.A. Wilson, A. Surprenant, and R.A. North, *Epithelial membrane proteins induce membrane blebbing and interact with the P2X7 receptor C terminus*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(37): p. 34017-23.
73. Li, Z., S. Srivastava, X. Yang, S. Mittal, P. Norton, J. Resau, B. Haab, and C. Chan, *A hierarchical approach employing metabolic and gene expression profiles to identify the pathways that confer cytotoxicity in HepG2 cells*. *BMC Syst Biol*, 2007. **1**: p. 21.
74. Zucchi, I., C. Montagna, L. Susani, R. Montesano, M. Affer, S. Zanotti, E. Redolfi, P. Vezzoni, and R. Dulbecco, *Genetic dissection of dome formation in a mammary cell*

- line: identification of two genes with opposing action.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(24): p. 13766-70.
75. Li, J., B. Parker, C. Martyn, C. Natarajan, and J. Guo, *The PMP22 gene and its related diseases.* Mol Neurobiol, 2013. **47**(2): p. 673-98.
76. Nielsen, K., S. Heegaard, H. Vorum, K. Birkenkamp-Demtroder, N. Ehlers, and T.F. Orntoft, *Altered expression of CLC, DSG3, EMP3, S100A2, and SLPI in corneal epithelium from keratoconus patients.* Cornea, 2005. **24**(6): p. 661-8.
77. Chu, J., Z. Zhang, Y. Zheng, J. Yang, L. Qin, J. Lu, Z.L. Huang, S. Zeng, and Q. Luo, *A novel far-red bimolecular fluorescence complementation system that allows for efficient visualization of protein interactions under physiological conditions.* Biosens Bioelectron, 2009. **25**(1): p. 234-9.
78. Christians, A., C. Hartmann, A. Benner, J. Meyer, A. von Deimling, M. Weller, W. Wick, and M. Weiler, *Prognostic value of three different methods of MGMT promoter methylation analysis in a prospective trial on newly diagnosed glioblastoma.* PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33449.
79. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.* Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-7.
80. Steiner, L., *Antibodies - a Laboratory Manual - Harlow,E, Lane,D.* Nature, 1989. **341**(6237): p. 32-32.
81. Soderberg, O., M. Gullberg, M. Jarvius, K. Ridderstrale, K.J. Leuchowius, J. Jarvius, K. Wester, P. Hydbring, F. Bahram, L.G. Larsson, and U. Landegren, *Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation.* Nat Methods, 2006. **3**(12): p. 995-1000.
82. Weller, M., R. Stupp, G. Reifenberger, A.A. Brandes, M.J. van den Bent, W. Wick, and M.E. Hegi, *MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine?* Nat Rev Neurol, 2010. **6**(1): p. 39-51.
83. Quillien, V., A. Lavenu, L. Karayan-Tapon, C. Carpentier, M. Labussiere, T. Lesimple, O. Chinot, M. Wager, J. Honnorat, S. Saikali, F. Fina, M. Sanson, and D. Figarella-Branger, *Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, MethyLight, pyrosequencing, methylation-sensitive*

- high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O6-methylguanine-DNA-methyltransferase in a series of 100 glioblastoma patients. Cancer, 2012. 118(17): p. 4201-11.*
84. Colella, S., L. Shen, K.A. Baggerly, J.P. Issa, and R. Krahe, *Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. Biotechniques, 2003. 35(1): p. 146-50.*
85. Tost, J., J. Dunker, and I.G. Gut, *Analysis and quantification of multiple methylation variable positions in CpG islands by Pyrosequencing. Biotechniques, 2003. 35(1): p. 152-6.*
86. Sofroniew, M.V., *Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. Trends Neurosci, 2009. 32(12): p. 638-47.*
87. Burda, J.E. and M.V. Sofroniew, *Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. Neuron, 2014. 81(2): p. 229-48.*
88. Ferrari, D., C. Pizzirani, E. Adinolfi, R.M. Lemoli, A. Curti, M. Idzko, E. Panther, and F. Di Virgilio, *The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. J Immunol, 2006. 176(7): p. 3877-83.*
89. Neary, J.T., Y. Kang, K.A. Willoughby, and E.F. Ellis, *Activation of extracellular signal-regulated kinase by stretch-induced injury in astrocytes involves extracellular ATP and P2 purinergic receptors. J Neurosci, 2003. 23(6): p. 2348-56.*
90. Wiley, J.S., R. Sluyter, B.J. Gu, L. Stokes, and S.J. Fuller, *The human P2X7 receptor and its role in innate immunity. Tissue Antigens, 2011. 78(5): p. 321-32.*
91. Sugawara, Y., H. Nishii, T. Takahashi, J. Yamauchi, N. Mizuno, K. Tago, and H. Itoh, *The lipid raft proteins flotillins/reggies interact with Galphaq and are involved in Gq-mediated p38 mitogen-activated protein kinase activation through tyrosine kinase. Cell Signal, 2007. 19(6): p. 1301-8.*
92. Boddul, S.V., J. Meng, J.O. Dolly, and J. Wang, *SNAP-23 and VAMP-3 contribute to the release of IL-6 and TNFalpha from a human synovial sarcoma cell line. FEBS J, 2014. 281(3): p. 750-65.*
93. Lee, S.M., H. Shin, S.W. Jang, J.J. Shim, I.S. Song, K.N. Son, J. Hwang, Y.H. Shin,

- H.H. Kim, C.K. Lee, J. Ko, D.S. Na, B.S. Kwon, and J. Kim, *PLP2/A4 interacts with CCR1 and stimulates migration of CCR1-expressing HOS cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **324**(2): p. 768-72.
94. Machida, N., M. Umikawa, K. Takei, N. Sakima, B.E. Myagmar, K. Taira, H. Uezato, Y. Ogawa, and K. Kariya, *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 as a putative effector of Rap2 to activate the c-Jun N-terminal kinase*. J Biol Chem, 2004. **279**(16): p. 15711-4.
95. Brambilla, R., V. Bracchi-Ricard, W.H. Hu, B. Frydel, A. Bramwell, S. Karmally, E.J. Green, and J.R. Bethea, *Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury*. J Exp Med, 2005. **202**(1): p. 145-56.
96. Rivera-Zengotita, M. and A.T. Yachnis, *Gliosis versus glioma?: don't grade until you know*. Adv Anat Pathol, 2012. **19**(4): p. 239-49.
97. Zarzaur, B.L. and K.A. Kudsk, *The mucosa-associated lymphoid tissue structure, function, and derangements*. Shock, 2001. **15**(6): p. 411-20.
98. Colman, H., L. Zhang, E.P. Sulman, J.M. McDonald, N.L. Shooshtari, A. Rivera, S. Popoff, C.L. Nutt, D.N. Louis, J.G. Cairncross, M.R. Gilbert, H.S. Phillips, M.P. Mehta, A. Chakravarti, C.E. Pelloso, K. Bhat, B.G. Feuerstein, R.B. Jenkins, and K. Aldape, *A multigene predictor of outcome in glioblastoma*. Neuro Oncol, 2010. **12**(1): p. 49-57.
99. Varelas, X., M.P. Bouchie, and M.A. Kukuruzinska, *Protein N-glycosylation in oral cancer: dysregulated cellular networks among DPAGT1, E-cadherin adhesion and canonical Wnt signaling*. Glycobiology, 2014.
100. Kumar, A., V. Rajendran, R. Sethumadhavan, and R. Purohit, *AKT kinase pathway: a leading target in cancer research*. ScientificWorldJournal, 2013. **2013**: p. 756134.
101. Roux, P.P. and J. Blenis, *ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(2): p. 320-44.
102. Deschenes-Simard, X., F. Kottakis, S. Meloche, and G. Ferbeyre, *ERKs in cancer: friends or foes?* Cancer Res, 2014. **74**(2): p. 412-9.

103. Van Meir, E.G., T. Kikuchi, M. Tada, H. Li, A.C. Diserens, B.E. Wojcik, H.J. Huang, T. Friedmann, N. de Tribolet, and W.K. Cavenee, *Analysis of the p53 gene and its expression in human glioblastoma cells*. *Cancer Res*, 1994. **54**(3): p. 649-52.
104. Xu, J., J.Y. Zhou, W.Z. Wei, and G.S. Wu, *Activation of the Akt survival pathway contributes to TRAIL resistance in cancer cells*. *PLoS One*, 2010. **5**(4): p. e10226.
105. Vilimanovich, U. and V. Bumbasirevic, *TRAIL induces proliferation of human glioma cells by c-FLIPL-mediated activation of ERK1/2*. *Cell Mol Life Sci*, 2008. **65**(5): p. 814-26.
106. Zhang, X.D., J.M. Borrow, X.Y. Zhang, T. Nguyen, and P. Hersey, *Activation of ERK1/2 protects melanoma cells from TRAIL-induced apoptosis by inhibiting Smac/DIABLO release from mitochondria*. *Oncogene*, 2003. **22**(19): p. 2869-81.
107. Opel, D., M.A. Westhoff, A. Bender, V. Braun, K.M. Debatin, and S. Fulda, *Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition broadly sensitizes glioblastoma cells to death receptor- and drug-induced apoptosis*. *Cancer Res*, 2008. **68**(15): p. 6271-80.
108. Gilmore, T.D., *Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives*. *Oncogene*, 2006. **25**(51): p. 6680-4.
109. Basseres, D.S. and A.S. Baldwin, *Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression*. *Oncogene*, 2006. **25**(51): p. 6817-30.
110. Monaco, C., E. Andreakos, S. Kiriakidis, C. Mauri, C. Bicknell, B. Foxwell, N. Cheshire, E. Paleolog, and M. Feldmann, *Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(15): p. 5634-9.
111. Oliva, M.M., T.C. Wu, and V.W. Yang, *Isolation and characterization of a differentiation-dependent gene in the human colonic cell line HT29-18*. *Arch Biochem Biophys*, 1993. **302**(1): p. 183-92.
112. Milde, S., C. Viebahn, and C. Kirchner, *Proteolipid protein 2 mRNA is expressed in the rabbit embryo during gastrulation*. *Mech Dev*, 2001. **106**(1-2): p. 129-32.

113. Breitwieser, G.E., J.C. McLenithan, J.F. Cortese, J.M. Shields, M.M. Oliva, J.L. Majewski, C.E. Machamer, and V.W. Yang, *Colonic epithelium-enriched protein A4 is a proteolipid that exhibits ion channel characteristics*. Am J Physiol, 1997. **272**(3 Pt 1): p. C957-65.
114. Wang, B., M. Nguyen, D.G. Breckenridge, M. Stojanovic, P.A. Clemons, S. Kuppig, and G.C. Shore, *Uncleaved BAP31 in association with A4 protein at the endoplasmic reticulum is an inhibitor of Fas-initiated release of cytochrome c from mitochondria*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 14461-8.
115. Timms, R.T., L.M. Duncan, I.A. Tchasovnikarova, R. Antrobus, D.L. Smith, G. Dougan, M.P. Weekes, and P.J. Lehner, *Haploid genetic screens identify an essential role for PLP2 in the downregulation of novel plasma membrane targets by viral E3 ubiquitin ligases*. PLoS Pathog, 2013. **9**(11): p. e1003772.
116. Annaert, W.G., B. Becker, U. Kistner, M. Reth, and R. Jahn, *Export of cellubrevin from the endoplasmic reticulum is controlled by BAP31*. J Cell Biol, 1997. **139**(6): p. 1397-410.
117. Sonoda, Y., M. Warita, T. Suzuki, H. Ozawa, Y. Fukuda, M. Funakoshi-Tago, and T. Kasahara, *Proteolipid protein 2 is associated with melanoma metastasis*. Oncol Rep, 2010. **23**(2): p. 371-6.
118. Ozawa, H., Y. Sonoda, T. Suzuki, N. Yoshida-Hoshina, M. Funakoshi-Tago, and T. Kasahara, *Knockdown of proteolipid protein 2 or focal adhesion kinase with an artificial microRNA reduces growth and metastasis of B16BL6 melanoma cells*. Oncol Lett, 2012. **3**(1): p. 19-24.
119. Doerks, T., S. Huber, E. Buchner, and P. Bork, *BSD: a novel domain in transcription factors and synapse-associated proteins*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(4): p. 168-70.
120. Cerra, M.C. and S. Imbrogno, *Phospholamban and cardiac function: a comparative perspective in vertebrates*. Acta Physiol (Oxf), 2012. **205**(1): p. 9-25.
121. MacLennan, D.H., M. Asahi, and A.R. Tupling, *The regulation of SERCA-type pumps by phospholamban and sarcolipin*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **986**: p. 472-80.
122. Vandecaetsbeek, I., P. Vangheluwe, L. Raeymaekers, F. Wuytack, and J.

- Vanoevelen, *The Ca²⁺ pumps of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(5).
123. Vafiadaki, E., D. Sanoudou, D.A. Arvanitis, D.H. Catino, E.G. Kranias, and A. Kontrogianni-Konstantopoulos, *Phospholamban interacts with HAX-1, a mitochondrial protein with anti-apoptotic function*. J Mol Biol, 2007. **367**(1): p. 65-79.
124. Vafiadaki, E., D.A. Arvanitis, S.N. Pagakis, V. Papalouka, D. Sanoudou, A. Kontrogianni-Konstantopoulos, and E.G. Kranias, *The anti-apoptotic protein HAX-1 interacts with SERCA2 and regulates its protein levels to promote cell survival*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(1): p. 306-18.
125. Vafiadaki, E., V. Papalouka, D.A. Arvanitis, E.G. Kranias, and D. Sanoudou, *The role of SERCA2a/PLN complex, Ca(2+) homeostasis, and anti-apoptotic proteins in determining cell fate*. Pflugers Arch, 2009. **457**(3): p. 687-700.
126. Han, W., P. Ding, M. Xu, L. Wang, M. Rui, S. Shi, Y. Liu, Y. Zheng, Y. Chen, T. Yang, and D. Ma, *Identification of eight genes encoding chemokine-like factor superfamily members 1-8 (CKLFSF1-8) by in silico cloning and experimental validation*. Genomics, 2003. **81**(6): p. 609-17.
127. Shao, L., Y. Cui, H. Li, Y. Liu, H. Zhao, Y. Wang, Y. Zhang, K.M. Ng, W. Han, D. Ma, and Q. Tao, *CMTM5 exhibits tumor suppressor activities and is frequently silenced by methylation in carcinoma cell lines*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(19): p. 5756-62.
128. Li, P., K. Liu, L. Li, M. Yang, W. Gao, J. Feng, Y. Lv, X. Qu, and B. Kong, *Reduced CMTM5 expression correlates with carcinogenesis in human epithelial ovarian cancer*. Int J Gynecol Cancer, 2011. **21**(7): p. 1248-55.
129. Wang, Y., J. Li, Y. Cui, T. Li, K.M. Ng, H. Geng, H. Li, X.S. Shu, H. Li, W. Liu, B. Luo, Q. Zhang, T.S. Mok, W. Zheng, X. Qiu, G. Srivastava, J. Yu, J.J. Sung, A.T. Chan, D. Ma, Q. Tao, and W. Han, *CMTM3, located at the critical tumor suppressor locus 16q22.1, is silenced by CpG methylation in carcinomas and inhibits tumor cell growth through inducing apoptosis*. Cancer Res, 2009. **69**(12): p. 5194-201.
130. Jin, C., Y. Wang, W. Han, Y. Zhang, Q. He, D. Li, C. Yin, L. Tian, D. Liu, Q. Song, and D. Ma, *CMTM8 induces caspase-dependent and -independent apoptosis through a mitochondria-mediated pathway*. J Cell Physiol, 2007. **211**(1): p. 112-20.

131. Shi, S., M. Rui, W. Han, Y. Wang, X. Qiu, P. Ding, P. Zhang, X. Zhu, Y. Zhang, Q. Gan, and D. Ma, *CKLFSF2 is highly expressed in testis and can be secreted into the seminiferous tubules*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(8): p. 1633-40.
132. Han, W., Y. Lou, J. Tang, Y. Zhang, Y. Chen, Y. Li, W. Gu, J. Huang, L. Gui, Y. Tang, F. Li, Q. Song, C. Di, L. Wang, Q. Shi, R. Sun, D. Xia, M. Rui, J. Tang, and D. Ma, *Molecular cloning and characterization of chemokine-like factor 1 (CKLF1), a novel human cytokine with unique structure and potential chemotactic activity*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 1): p. 127-35.
133. Jin, C., P. Ding, Y. Wang, and D. Ma, *Regulation of EGF receptor signaling by the MARVEL domain-containing protein CKLFSF8*. FEBS Lett, 2005. **579**(28): p. 6375-82.
134. Li, H., X. Guo, L. Shao, M. Plate, X. Mo, Y. Wang, and W. Han, *CMTM5-v1, a four-transmembrane protein, presents a secreted form released via a vesicle-mediated secretory pathway*. BMB Rep, 2010. **43**(3): p. 182-7.
135. Niu, J., H. Li, Y. Zhang, J. Li, M. Xie, L. Li, X. Qin, Y. Qin, X. Guo, Q. Jiang, Y. Liu, S. Chen, X. Huang, W. Han, and G. Ruan, *Aberrant expression of CKLF-like MARVEL transmembrane member 5 (CMTM5) by promoter methylation in myeloid leukemia*. Leuk Res, 2011. **35**(6): p. 771-6.
136. Guo, X., T. Li, Y. Wang, L. Shao, Y. Zhang, D. Ma, and W. Han, *CMTM5 induces apoptosis of pancreatic cancer cells and has synergistic effects with TNF-alpha*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **387**(1): p. 139-42.
137. Shao, L., X. Guo, M. Plate, T. Li, Y. Wang, D. Ma, and W. Han, *CMTM5-v1 induces apoptosis in cervical carcinoma cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **379**(4): p. 866-71.
138. Xu, T., J. Li, Y.B. Xiao, Z.H. Liu, Q. Li, and X.F. Wang, *[CMTM5 inhibits the tumor cell behavior of prostate cancer by downregulation of HER2]*. Beijing Da Xue Xue Bao, 2010. **42**(4): p. 386-90.
139. Whitman, S., X. Wang, R. Shalaby, and E. Shtivelman, *Alternatively spliced products CC3 and TC3 have opposing effects on apoptosis*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(2): p. 583-93.

140. Ito, M., C. Jiang, K. Krumm, X. Zhang, J. Pecha, J. Zhao, Y. Guo, R.G. Roeder, and H. Xiao, *TIP30 deficiency increases susceptibility to tumorigenesis*. *Cancer Res*, 2003. **63**(24): p. 8763-7.
141. Shtivelman, E., *A link between metastasis and resistance to apoptosis of variant small cell lung carcinoma*. *Oncogene*, 1997. **14**(18): p. 2167-73.
142. Zhao, J., H. Ni, Y. Ma, L. Dong, J. Dai, F. Zhao, X. Yan, B. Lu, H. Xu, and Y. Guo, *TIP30/CC3 expression in breast carcinoma: relation to metastasis, clinicopathologic parameters, and P53 expression*. *Hum Pathol*, 2007. **38**(2): p. 293-8.
143. Li, X., Y. Zhang, S. Cao, X. Chen, Y. Lu, H. Jin, S. Sun, B. Chen, J. Liu, J. Ding, K. Wu, and D. Fan, *Reduction of TIP30 correlates with poor prognosis of gastric cancer patients and its restoration drastically inhibits tumor growth and metastasis*. *Int J Cancer*, 2009. **124**(3): p. 713-21.
144. Tong, X., K. Li, Z. Luo, B. Lu, X. Liu, T. Wang, M. Pang, B. Liang, M. Tan, M. Wu, J. Zhao, and Y. Guo, *Decreased TIP30 expression promotes tumor metastasis in lung cancer*. *Am J Pathol*, 2009. **174**(5): p. 1931-9.
145. Zhao, J., J. Chen, B. Lu, L. Dong, H. Wang, C. Bi, G. Wu, H. Guo, M. Wu, and Y. Guo, *TIP30 induces apoptosis under oxidative stress through stabilization of p53 messenger RNA in human hepatocellular carcinoma*. *Cancer Res*, 2008. **68**(11): p. 4133-41.
146. NicAmhlaoibh, R. and E. Shtivelman, *Metastasis suppressor CC3 inhibits angiogenic properties of tumor cells in vitro*. *Oncogene*, 2001. **20**(2): p. 270-5.
147. Zhao, J., B. Lu, H. Xu, X. Tong, G. Wu, X. Zhang, A. Liang, W. Cong, J. Dai, H. Wang, M. Wu, and Y. Guo, *Thirty-kilodalton Tat-interacting protein suppresses tumor metastasis by inhibition of osteopontin transcription in human hepatocellular carcinoma*. *Hepatology*, 2008. **48**(1): p. 265-75.
148. King, F.W. and E. Shtivelman, *Inhibition of nuclear import by the proapoptotic protein CC3*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(16): p. 7091-101.
149. Shi, M., S.G. Yan, S.T. Xie, and H.N. Wang, *Tip30-induced apoptosis requires translocation of Bax and involves mitochondrial release of cytochrome c and Smac/DIABLO in hepatocellular carcinoma cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2008.

- 1783**(2): p. 263-74.
150. Shi, M., X. Zhang, P. Wang, H.W. Zhang, B.H. Zhang, and M.C. Wu, *TIP30 regulates apoptosis-related genes in its apoptotic signal transduction pathway*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(2): p. 221-7.
 151. Xiao, H., V. Palhan, Y. Yang, and R.G. Roeder, *TIP30 has an intrinsic kinase activity required for up-regulation of a subset of apoptotic genes*. EMBO J, 2000. **19**(5): p. 956-63.
 152. Lee, S.H., S.K. Ju, T.Y. Lee, S.H. Huh, and K.H. Han, *TIP30 directly binds p53 tumor suppressor protein in vitro*. Mol Cells, 2012. **34**(5): p. 495-500.
 153. Jiang, C., M. Ito, V. Piening, K. Bruck, R.G. Roeder, and H. Xiao, *TIP30 interacts with an estrogen receptor alpha-interacting coactivator CIA and regulates c-myc transcription*. J Biol Chem, 2004. **279**(26): p. 27781-9.
 154. Zhang, C., A. Li, X. Zhang, and H. Xiao, *A novel TIP30 protein complex regulates EGF receptor signaling and endocytic degradation*. J Biol Chem, 2011. **286**(11): p. 9373-81.
 155. El Omari, K., L.E. Bird, C.E. Nichols, J. Ren, and D.K. Stammers, *Crystal structure of CC3 (TIP30): implications for its role as a tumor suppressor*. J Biol Chem, 2005. **280**(18): p. 18229-36.
 156. Takai, Y., T. Sasaki, and T. Matozaki, *Small GTP-binding proteins*. Physiol Rev, 2001. **81**(1): p. 153-208.
 157. English, A.R. and G.K. Voeltz, *Rab10 GTPase regulates ER dynamics and morphology*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(2): p. 169-78.
 158. Hutagalung, A.H. and P.J. Novick, *Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology*. Physiol Rev, 2011. **91**(1): p. 119-49.
 159. Chen, Y. and J. Lippincott-Schwartz, *Insulin triggers surface-directed trafficking of sequestered GLUT4 storage vesicles marked by Rab10*. Small GTPases, 2013. **4**(3): p. 193-7.
 160. Chen, Y. and J. Lippincott-Schwartz, *Rab10 delivers GLUT4 storage vesicles to the plasma membrane*. Commun Integr Biol, 2013. **6**(3): p. e23779.

161. Liu, Y., X.H. Xu, Q. Chen, T. Wang, C.Y. Deng, B.L. Song, J.L. Du, and Z.G. Luo, *Myosin Vb controls biogenesis of post-Golgi Rab10 carriers during axon development*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2005.
162. Wang, D., J. Lou, C. Ouyang, W. Chen, Y. Liu, X. Liu, X. Cao, J. Wang, and L. Lu, *Ras-related protein Rab10 facilitates TLR4 signaling by promoting replenishment of TLR4 onto the plasma membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(31): p. 13806-11.
163. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. Cell Death Differ, 2006. **13**(5): p. 816-25.
164. Park, D.S., J.H. Seo, M. Hong, and S.C. Choi, *Role of the Rap2/TNIK kinase pathway in regulation of LRP6 stability for Wnt signaling*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **436**(2): p. 338-43.
165. Mahmoudi, T., V.S. Li, S.S. Ng, N. Taouatas, R.G. Vries, S. Mohammed, A.J. Heck, and H. Clevers, *The kinase TNIK is an essential activator of Wnt target genes*. EMBO J, 2009. **28**(21): p. 3329-40.
166. Taira, K., M. Umikawa, K. Takei, B.E. Myagmar, M. Shinzato, N. Machida, H. Uezato, S. Nonaka, and K. Kariya, *The Traf2- and Nck-interacting kinase as a putative effector of Rap2 to regulate actin cytoskeleton*. J Biol Chem, 2004. **279**(47): p. 49488-96.
167. Wang, L., W. Zhan, S. Xie, J. Hu, Q. Shi, X. Zhou, Y. Wu, S. Wang, Z. Fei, and R. Yu, *Over-expression of Rap2a inhibits glioma migration and invasion by down-regulating p-AKT*. Cell Biol Int, 2014. **38**(3): p. 326-34.
168. Volonte, C., S. Apolloni, S.D. Skaper, and G. Burnstock, *P2X7 receptors: channels, pores and more*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2012. **11**(6): p. 705-21.
169. Anderson, C.M. and M. Nedergaard, *Emerging challenges of assigning P2X7 receptor function and immunoreactivity in neurons*. Trends Neurosci, 2006. **29**(5): p. 257-62.
170. Kim, M., L.H. Jiang, H.L. Wilson, R.A. North, and A. Surprenant, *Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex*. EMBO J, 2001. **20**(22): p. 6347-58.

171. Papp, L., E.S. Vizi, and B. Sperlagh, *P2X7 receptor mediated phosphorylation of p38MAP kinase in the hippocampus*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **355**(2): p. 568-74.
172. Ferrari, D., S. Wesselborg, M.K. Bauer, and K. Schulze-Osthoff, *Extracellular ATP activates transcription factor NF-kappaB through the P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF-kappaB p65*. J Cell Biol, 1997. **139**(7): p. 1635-43.
173. Franke, H., A. Gunther, J. Grosche, R. Schmidt, S. Rossner, R. Reinhardt, H. Faber-Zuschratter, D. Schneider, and P. Illes, *P2X7 receptor expression after ischemia in the cerebral cortex of rats*. J Neuropathol Exp Neurol, 2004. **63**(7): p. 686-99.
174. Hu, C., D. Hardee, and F. Minnear, *Membrane fusion by VAMP3 and plasma membrane t-SNAREs*. Exp Cell Res, 2007. **313**(15): p. 3198-209.
175. Jena, B.P., *Role of SNAREs in membrane fusion*. Adv Exp Med Biol, 2011. **713**: p. 13-32.
176. Yamamoto, H., T. Ida, H. Tsutsuki, M. Mori, T. Matsumoto, T. Kohda, M. Mukamoto, N. Goshima, S. Kozaki, and H. Ihara, *Specificity of botulinum protease for human VAMP family proteins*. Microbiol Immunol, 2012. **56**(4): p. 245-53.
177. McMahon, H.T., Y.A. Ushkaryov, L. Edelman, E. Link, T. Binz, H. Niemann, R. Jahn, and T.C. Sudhof, *Cellubrevin is a ubiquitous tetanus-toxin substrate homologous to a putative synaptic vesicle fusion protein*. Nature, 1993. **364**(6435): p. 346-9.
178. Riggs, K.A., N. Hasan, D. Humphrey, C. Raleigh, C. Nevitt, D. Corbin, and C. Hu, *Regulation of integrin endocytic recycling and chemotactic cell migration by syntaxin 6 and VAMP3 interaction*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 16): p. 3827-39.
179. St-Denis, J.F. and S.W. Cushman, *Role of SNARE's in the GLUT4 translocation response to insulin in adipose cells and muscle*. J Basic Clin Physiol Pharmacol, 1998. **9**(2-4): p. 153-65.
180. Veale, K.J., C. Offenhauser, N. Lei, A.C. Stanley, J.L. Stow, and R.Z. Murray, *VAMP3 regulates podosome organisation in macrophages and together with Stx4/SNAP23 mediates adhesion, cell spreading and persistent migration*. Exp Cell

- Res, 2011. **317**(13): p. 1817-29.
181. Luftman, K., N. Hasan, P. Day, D. Hardee, and C. Hu, *Silencing of VAMP3 inhibits cell migration and integrin-mediated adhesion*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **380**(1): p. 65-70.
182. Proux-Gillardeaux, V., J. Gavard, T. Irinopoulou, R.M. Mege, and T. Galli, *Tetanus neurotoxin-mediated cleavage of cellubrevin impairs epithelial cell migration and integrin-dependent cell adhesion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(18): p. 6362-7.
183. Tayeb, M.A., M. Skalski, M.C. Cha, M.J. Kean, M. Scaife, and M.G. Coppelino, *Inhibition of SNARE-mediated membrane traffic impairs cell migration*. Exp Cell Res, 2005. **305**(1): p. 63-73.
184. Zhao, F., J. Zhang, Y.S. Liu, L. Li, and Y.L. He, *Research advances on flotillins*. Virol J, 2011. **8**: p. 479.
185. Riento, K., M. Frick, I. Schafer, and B.J. Nichols, *Endocytosis of flotillin-1 and flotillin-2 is regulated by Fyn kinase*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 7): p. 912-8.
186. Cremona, M.L., H.J. Matthies, K. Pau, E. Bowton, N. Speed, B.J. Lute, M. Anderson, N. Sen, S.D. Robertson, R.A. Vaughan, J.E. Rothman, A. Galli, J.A. Javitch, and A. Yamamoto, *Flotillin-1 is essential for PKC-triggered endocytosis and membrane microdomain localization of DAT*. Nat Neurosci, 2011. **14**(4): p. 469-77.
187. Amaddii, M., M. Meister, A. Banning, A. Tomasovic, J. Mooz, K. Rajalingam, and R. Tikkanen, *Flotillin-1/reggie-2 protein plays dual role in activation of receptor-tyrosine kinase/mitogen-activated protein kinase signaling*. J Biol Chem, 2012. **287**(10): p. 7265-78.
188. Kurrle N., J.B., Meister M., Tikkanen R., ed. *Function of Flotillins in Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Endocytosis: Role of Tyrosine Phosphorylation and Oligomerization*. Protein Phosphorylation in Human Health. 2012, InTech Publisher: Croatia.
189. Fecchi, K., D. Volonte, M.P. Hezel, K. Schmeck, and F. Galbiati, *Spatial and temporal regulation of GLUT4 translocation by flotillin-1 and caveolin-3 in skeletal muscle cells*. FASEB J, 2006. **20**(6): p. 705-7.

190. Santamaria, A., E. Castellanos, V. Gomez, P. Bénédict, J. Renau-Piqueras, J. Morote, J. Reventos, T.M. Thomson, and R. Paciucci, *PTOV1 enables the nuclear translocation and mitogenic activity of flotillin-1, a major protein of lipid rafts*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(5): p. 1900-11.
191. Gomez, V., M. Sese, A. Santamaria, J.D. Martinez, E. Castellanos, M. Soler, T.M. Thomson, and R. Paciucci, *Regulation of aurora B kinase by the lipid raft protein flotillin-1*. J Biol Chem, 2010. **285**(27): p. 20683-90.
192. Hemler, M.E., *Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(1): p. 49-60.
193. Morales, S.A., D. Telander, L. Notterpek, M. Wadehra, J. Braun, and L.K. Gordon, *Rewiring integrin-mediated signaling and cellular response with the peripheral myelin protein 22 and epithelial membrane protein 2 components of the tetraspan web*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(8): p. 5465-72.
194. Wadehra, M., A. Forbes, N. Pushkarna, L. Goodglick, L.K. Gordon, C.J. Williams, and J. Braun, *Epithelial membrane protein-2 regulates surface expression of alphavbeta3 integrin in the endometrium*. Dev Biol, 2005. **287**(2): p. 336-45.
195. Wadehra, M., L. Goodglick, and J. Braun, *The tetraspan protein EMP2 modulates the surface expression of caveolins and glycosylphosphatidyl inositol-linked proteins*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(5): p. 2073-83.
196. Wadehra, M., H. Su, L.K. Gordon, L. Goodglick, and J. Braun, *The tetraspan protein EMP2 increases surface expression of class I major histocompatibility complex proteins and susceptibility to CTL-mediated cell death*. Clin Immunol, 2003. **107**(2): p. 129-36.
197. Morales, S.A., S. Mareninov, P. Coulam, M. Wadehra, L. Goodglick, J. Braun, and L.K. Gordon, *Functional consequences of interactions between FAK and epithelial membrane protein 2 (EMP2)*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(10): p. 4949-56.
198. Wadehra, M., R. Iyer, L. Goodglick, and J. Braun, *The tetraspan protein epithelial membrane protein-2 interacts with beta1 integrins and regulates adhesion*. J Biol Chem, 2002. **277**(43): p. 41094-100.
199. Fu, M., R. Rao, D. Sudhakar, C.P. Hogue, Z. Rutta, S. Morales, L.K. Gordon, J.

- Braun, L. Goodglick, and M. Wadehra, *Epithelial membrane protein-2 promotes endometrial tumor formation through activation of FAK and Src*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e19945.
200. Wickner, W. and R. Schekman, *Membrane fusion*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(7): p. 658-64.
201. Zhang, C., A. Li, S. Gao, X. Zhang, and H. Xiao, *The TIP30 protein complex, arachidonic acid and coenzyme A are required for vesicle membrane fusion*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e21233.
202. Fu, M., E.L. Maresh, G.F. Helguera, M. Kiyohara, Y. Qin, N. Ashki, T.R. Daniels-Wells, N. Aziz, L.K. Gordon, J. Braun, Y. Elshimali, R.A. Soslow, M.L. Penichet, L. Goodglick, and M. Wadehra, *Rationale and preclinical efficacy of a novel anti-EMP2 antibody for the treatment of invasive breast cancer*. Mol Cancer Ther, 2014. **13**(4): p. 902-15.
203. Morales, S.A., D.G. Telander, S. Mareninov, A. Nagy, M. Wadehra, J. Braun, and L.K. Gordon, *Anti-EMP2 diabody blocks epithelial membrane protein 2 (EMP2) and FAK mediated collagen gel contraction in ARPE-19 cells*. Exp Eye Res, 2012. **102**: p. 10-6.
204. Fu, M., E.L. Maresh, R.A. Soslow, M. Alavi, V. Mah, Q. Zhou, A. Iasonos, L. Goodglick, L.K. Gordon, J. Braun, and M. Wadehra, *Epithelial membrane protein-2 is a novel therapeutic target in ovarian cancer*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(15): p. 3954-63.
205. Shimazaki, K., E.J. Lepin, B. Wei, A.K. Nagy, C.P. Coulam, S. Mareninov, M. Fu, A.M. Wu, J.D. Marks, J. Braun, L.K. Gordon, and M. Wadehra, *Diabodies targeting epithelial membrane protein 2 reduce tumorigenicity of human endometrial cancer cell lines*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(22): p. 7367-77.
206. Azijli, K., B. Weyhenmeyer, G.J. Peters, S. de Jong, and F.A. Kruyt, *Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: discord in the death receptor family*. Cell Death Differ, 2013. **20**(7): p. 858-68.

6 Eigene Veröffentlichungen

Christians, A., C. Hartmann, A. Benner, J. Meyer, A. von Deimling, M. Weller, W. Wick, and M. Weiler, *Prognostic value of three different methods of MGMT promoter methylation analysis in a prospective trial on newly diagnosed glioblastoma*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. E33449.

Ahmadi, R., F. Stockhammer, N. Becker, K. Hohlen, M. Misch, A. Christians, C. Dictus, C. Herold-Mende, D. Capper, A. Unterberg, A. von Deimling, W. Wick, and C. Hartmann, *No prognostic value of IDH1 mutations in a series of 100 WHO grade II astrocytomas*. J Neurooncol, 2012. **109**(1): p. 15-22.

Christians, A., S. Pusch, D. Capper, A. Habel, C. Hartmann, H. Zentgraf, and A. von Deimling. *Characterization of the putative tumor suppressor EMP3*. in *DKFZ PhD Poster Session*. 2011. Heidelberg: (Poster).

Meyer, J., S. Pusch, J. Balss, D. Capper, W. Mueller, A. Christians, C. Hartmann, and A. von Deimling, *PCR- and restriction endonuclease-based detection of IDH1 mutations*. Brain Pathol, 2010. **20**(2): p. 298-300.

Christians, A., C. Hartmann, A. Benner, J. Meyer, A. von Deimling, W. Wick, and M. Weiler. *Direct comparison of three different methods of MGMT promoter methylation analysis in respect to clinical outcome in the UKT-05 trial*. in *Neurowoche 2010*. 2010. Mannheim: (Poster).

Korshunov, A., J. Meyer, D. Capper, A. Christians, M. Remke, H. Witt, S. Pfister, A. von Deimling, and C. Hartmann, *Combined molecular analysis of BRAF and IDH1 distinguishes pilocytic astrocytoma from diffuse astrocytoma*. Acta Neuropathol, 2009. **118**(3): p. 401-5.

Hartmann, C., J. Meyer, J. Balss, D. Capper, W. Mueller, A. Christians, J. Felsberg, M. Wolter, C. Mawrin, W. Wick, M. Weller, C. Herold-Mende, A. Unterberg, J.W. Jeuken, P. Wesseling, G. Reifenberger, and A. von Deimling, *Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas*. Acta Neuropathol, 2009. **118**(4): p. 469-74.

Reiter, M., V.M. Walf, A. Christians, M.W. Pfaffl, and H.H. Meyer, *Modification of mRNA expression after treatment with anabolic agents and the usefulness for gene expression-biomarkers*. Anal Chim Acta, 2007. **586**(1-2): p. 73-81.

7 Anhang

7.1 Puffer und Stammlösungen

Bezeichnung	pH	Zusammensetzung (1x)	Kat./Prod. Nr.	Hersteller
Zellysepuffer	8,0	50 mM Tris 150 mM Natriumchlorid 1 mM EDTA 0,2% (v/v) Nonidet P-40	---	---
MOPS-SDS-Laufpuffer	7,7	50 mM MOPS 50 mM Tris 1 mM EDTA 0,1% SDS	NP0001	Invitrogen
NuPAGE Transfer Buffer	K/A	Keine Angabe + 10% (v/v) Methanol + 0,05% SDS + 1 ml Antioxidant	NP0006	Invitrogen
Sörensenpuffer	8,3	50 mM Natriumcitrat 25% (v/v) EtOH	---	---
Sample Reducing Agent	K/A	500 mM Dithioreitol (DTT)	NP0009	Invitrogen
NuPAGE Sample Buffer	8,4	Keine Angabe	NP0007	Invitrogen
TBS-T	7,6	25 mM Tris 150 mM Natriumchlorid 2,68 mM Kaliumchlorid (0,05% (v/v) Tween 20)	A5001	AppliChem
DPBS	7,0–7,3	2,67 mM Kaliumchlorid 1,47 mM KH ₂ PO ₄ 137,93 mM Natriumchlorid 8,06 mM Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	14190-094	Invitrogen

TBE	7,6	89 mM Tris 89 mM Borat 2 mM EDTA	---	---
Elutionspuffer (Pierce Co-IP Kit)	2,8	Keine Angabe	(26149)	Thermo Scientific
Tango- Restriktionspuffer	7,9	33 mM Tris-Acetat 10 mM Magnesiumacetat 66 mM Kaliumacetat 0,1 mg/ml BSA	BY5	Thermo Scientific
TE	7,5	10 mM Tris 1 mM EDTA	---	---
Lithium-Acetat-Puffer	7,5	100 mM LiAc	---	---
Hefe- Transformationspuffer	7,5	40% PEG 3350 10 mM tris 1 mM EDTA 100 mM LiAc	---	---
Glycoprotein Denaturing Buffer	K/A	5% SDS 400 mM Dithioreithol (DTT)	(P0704S)	New England Biolabs
G7 Reaction Buffer	7,5	500 mM Natriumphosphat	(P0704S)	New England Biolabs

Bezeichnung	Zusammensetzung	Anmerkungen
1000x Kupfersulfat- Stammlösung	25 g/L (100 mM) CuSO ₄ ·5H ₂ O	steril filtriert
20x SD	134 g/L Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren)	steril filtriert, Lagerung bei 4°C
100x Aminosäure- Stammlösung	6 g/L Leucin 2 g/L Arginin 6 g/L Isoleucin 4 g/L Lysin 6 g/L Phenylalanin 5 g/L Threonin	steril filtriert, Lagerung bei 4°C
100x Methionin- Stammlösung	1 g/L Methionin	steril filtriert, Lagerung bei 4°C

100x Tryptophan-Stammlösung	4 g/L Tryptophan	steril filtriert, Lagerung bei 4°C
100x Histidin-Stammlösung	1 g/L Histidin	steril filtriert, Lagerung bei 4°C
1% Uracil-Stammlösung	10 g/L Uracil 100 mM NaOH	steril filtriert
1% Adenin-Stammlösung	10 g/L Adenin 100 mM NaOH	steril filtriert
40% Glucose-Lösung	400 g/L Glucose	autoklaviert
Carrier-DNA (ssDNA)	2 g/L Heringsspermien-DNA in sterilem TE-Puffer (s.o.)	Lagerung bei -20°C; vor Gebrauch erhitzt auf 100°C für 5 min und auf Eis abgekühlt
50% Polyethylenglykol-Lösung	500 g/L PEG MW 3350	steril filtriert, Lagerung bei 4°C

7.2 Primer

Bezeichnung	Richtung	Sequenz 5' - 3'	Tm [°C]
EMP3_B1	F	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGTCACCTCCTTGTCTGGTG	51,5
EMP3_STOP_B2	R	CAAGAAAGCTGGGTTTCACTCCCGCTTCCGTAGG	55
EMP3_w/oSTOP_B2	R	CAAGAAAGCTGGGTTCTCCCGCTTCCGTAGGTGG	56,8
P24 EMP3_rA	R	CAAGAAAGCTGGGTTTCAAGGTGTAGAGCTGGAACATGAACAG	54,5
P25 EMP3_fB	F	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGCGACGAGGAGGTCTCTTC	54,8
P28 EMP3_NGly1_s	F	CTGAATCTCTGGTACGACTGCACCTGGAACGCCGACACCAAAACATG GGC	53,1
P29 EMP3_NGly1_r	R	GCCCATGTTTTGGTGTGCGCGTTCCAGGTGCAGTCGTACCAGAGATT CAG	53,1
P30 EMP3_NGly2_s	F	CCAAAACATGGGCCTGCTCCGCTGTCAGCGAGAATGGCTGG	51,8
P31 EMP3_NGly2_r	R	CCAGCCATTCTCGCTGACAGCGGAGCAGGCCCATGTTTTGG	51,8
P26 AttB1	F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCACC	52,3
P27 AttB2	R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT	36,1
P2X7_B1	F	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGAACTGCTGTGCTCCCATAT	56,6
P2X7_STOP_B2	R	CAAGAAAGCTGGGTTCTAGTAAGGACTCTTGAAGCC	44,7
P2X7_w/oSTOP_B2	R	CAAGAAAGCTGGGTTGTAAGGACTCTTGAAGCCACT	47,1

VAMP3_B1	F	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGTCTACAGGTCCAACCTGCTG	60,3
VAMP3_STOP_B2	R	CAAGAAAGCTGGGTTTCATGAAGAGACAACCCACACG	60,3
VAMP3_w/oSTOP_B2	R	CAAGAAAGCTGGGTTTGAAGAGACAACCCACACG	56,8
HTATIP2_B1	F	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGGCCGAAACAGAAGCCCTG	62
HTATIP_STOP_B2	R	CAAGAAAGCTGGGTTTCATGGCTTGAGAGAGCCATG	57,3
HTATIP2_w/oSTOP_B2	R	CAAGAAAGCTGGGTTTGGCTTGAGAGAGCCATGC	58,8
CMTM5_B1	F	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGCTCAGTGCTCGAGATCG	59,4
CMTM5_STOP_B2	R	CAAGAAAGCTGGGTTTCACTGCTGGTCCCCCTG	60,5
CMTM5_w/oSTOP_B2	R	CAAGAAAGCTGGGTTCTGCTGGTCCCCCTG	56
RAP2A_B1	F	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGCGCGAGTACAAAGTGG	56,7
RAP2A_STOP_B2	R	CAAGAAAGCTGGGTTCTATTGTATGTTACATGCAGAACA	55,9
RAP2A_w/oS_B2	R	CAAGAAAGCTGGGTTTTGTATGTTACATGCAGAACAGCA	57,6
RAB10_B1	F	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGGCGAAGAAGACGTACG	56,7
RAB10_STOP_B2	R	CAAGAAAGCTGGGTTTCAGCAGCATTGCTCTTCC	57,3
RAB10_w/oSTOP_B2	R	CAAGAAAGCTGGGTTGCAGCATTGCTCTTCCAGC	59,4
PLP2_B1	F	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGGCGGATTCTGAGCGC	58,2
PLP2_STOP_B2	R	CAAGAAAGCTGGGTTCTACACCGGGCCATCTGC	60,5
PLP2_w/oSTOP_B2	R	CAAGAAAGCTGGGTTCCACCGGGCCATCTGC	56
TMEM51_B1	F	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGATGGCCCAGTCCAAG	56
TMEM51_STOP_B2	R	CAAGAAAGCTGGGTTTCAGTCGGGCGGCCGGGT	65,1
TMEM51_w/oSTOP_B2	R	CAAGAAAGCTGGGTTGTCGGGCGGCCGGGT	61,5
BSDC1_B1	F	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGGCGGAAGGGGAGGAC	60,5
BSDC1_STOP_B2	R	CAAGAAAGCTGGGTTTCACTCCCAGTCTCCCCT	61,4
BSDC1_w/oSTOP_B2	R	CAAGAAAGCTGGGTTCTCCCAGTCTCCCCT	57,6
PLN_B1	F	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGGAGAAAGTCCAATACCTCACT	59,3
PLN_STOP_B2	R	CAAGAAAGCTGGGTTTCAGAGAAGCATCACGATGATAC	58,9
PLN_w/oSTOP_B2	R	CAAGAAAGCTGGGTTGAGAAGCATCACGATGATAC	55,3
FLOT1_B1	F	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGTTTTTCACTTGTGGCCC	55,3
FLOT1_STOP_B2	R	CAAGAAAGCTGGGTTTCAGGCTGTTCTCAAAGGC	56,7
FLOT1_w/oSTOP_B2	R	CAAGAAAGCTGGGTTGGCTGTTCTCAAAGGCTTGT	57,3
S100A10_B1	F	CAAAAAAGCAGGCTCCACCATGCCATCTCAAATGGAACACG	58,4
S100A10_STOP_B2	R	CAAGAAAGCTGGGTTTCACTTCTTTCCCTTCTGCTTCAT	59,3
S100A10_w/oSTOP_B2	R	CAAGAAAGCTGGGTTCTTCTTTCCCTTCTGCTTCAT	55,9
P73 pCup_Kol	F	GTATCAATTGCATTATAATATCTTCTTGTAGTG	55,7
P74 CYC_Kol	R	CTTTTCGGTTAGAGCGGATGTG	55,5
P75 pCup_Seq	F	GTGCAATATCATATAGAAGTCATCGAAATAG	55,8

EMP3_PSQ1_F	F	TGAGGGTAGGAGGGAGAGAAGA	53,6
EMP3_PSQ1_R	R	CTCTCCCCTCCAATCCAAA	51,3
EMP3_PSQ1_Seq(1)	F	GTAGGAGGGAGAGAAGAG	38,9
EMP3_PSQ2_F	F	GTGAAAGGAGGGAGGAGA	45,6
EMP3_PSQ2_R	R	AATCCCAACCCTAAATAAC	42,6
EMP3_PSQ2_Seq(2)	R	AACCAACTAAAACTTACC	37,9

7.3 shRNA Sequenzen

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'
shE1	TGGTCAGCGGCATCATCTACATCCACCTA
shE2	TGCGACGAGGAGGTCTCTTCTATGCCACC
shE3	TGGCTGAAGGCGGTGCAGGTCCTCATGGT
shE4	CCTTCACATCCTCATTCTTATACTGCTTT
shE5	GCGCCTTGATCTATGCCATTCACCTCAAGAGAGTGAATGGCATAGATCAAGGCGC
shE6	GAGTCCCTGAATCTCTGGTTTCAAGAGAACCAGAGATTCAGGGACTC

7.4 Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Klonalität	Anwendungen	Hersteller
Anti-EMP3 Antibody, clone 3D4	Maus	Monoklonal	IF, 1:100 IHC, 1:100 WB, 1:250	Sigma-Aldrich
Anti-EMP3 Antibody HPA051163	Kaninchen	Polyklonal	IHC, 1:100 WB, 1:200	Sigma-Aldrich
Anti-EMP3 Antibody	Ziege	Polyklonal	IHC, 1:100 WB, 1:200	Santa-Cruz
PLP2 Antibody (Y-18)	Kaninchen	Polyklonal	IF/PLA, 1:20 WB, 1:100	Santa-Cruz

CKLFSF5 Antibody [N1N2], N-term	Kaninchen	Polyklonal	IF/PLA, 1:20 WB, 1:200	Genetex
P2X7 Antibody	Kaninchen	Polyklonal	IF/PLA, 1:100 WB, 1:200	Genetex
VAMP3 Antibody	Kaninchen	Polyklonal	IF/PLA, 1:100 WB, 1:500	ThermoScientific
BSDC1 Antibody, N-term	Kaninchen	Polyklonal	IF/PLA, 1:50 WB, 1:250	Genetex
Anti-PLN Antibody	Kaninchen	Polyklonal	IF/PLA, 1:25 WB, 1:200	Sigma-Aldrich
CC3 Antibody	Kaninchen	Polyklonal	IF/PLA, 1:50 WB, 1:500	Genetex
RAP2A Antibody [N1C3-2]	Kaninchen	Polyklonal	IF/PLA, 1:50 WB, 1:500	Genetex
Rab10 (D36C4) XP® Rabbit mAb	Kaninchen	Monoklonal	IF/PLA, 1:20 WB, 1:500	Cell Signaling
Flotillin 1 Antibody [C3], C-term	Kaninchen	Polyklonal	IF/PLA, 1:50 WB, 1:500	Genetex
Anti-FLAG M2 mouse	Maus	Monoklonal	IF, 1:100 WB, 1:500	Sigma-Aldrich
Myc-Tag (71D10) Rabbit mAb	Kaninchen	Monoklonal	IF, 1:100 WB, 1:500	Cell Signaling
Phospho-p44/42 (Erk1/2) (T202/Y204) D13.14.4 Rabbit mAb	Kaninchen	Monoklonal	WB, 1:500	Cell Signaling
p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) Rabbit mAb	Kaninchen	Monoklonal	WB, 1:500	Cell Signaling
Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP® Rabbit mAb	Kaninchen	Monoklonal	WB, 1:500	Cell Signaling
Akt (pan) (11E7) Rabbit mAb	Kaninchen	Monoklonal	WB, 1:500	Cell Signaling
p53 (7F5) Rabbit mAb	Kaninchen	Monoklonal	WB, 1:500	Cell Signaling
Phospho-EGF Receptor (Y1068) (D7A5) XP® Rabbit mAb	Kaninchen	Monoklonal	WB, 1:500	Cell Signaling
EGF Receptor (D38B1) XP® Rabbit mAb	Kaninchen	Monoklonal	WB, 1:500	Cell Signaling
p38 MAPK (D13E1) XP® Rabbit mAb	Kaninchen	Monoklonal	WB, 1:500	Cell Signaling
Phospho-p38 MAPK (T180/Y182) (D3F9) XP® Rabbit mAb	Kaninchen	Monoklonal	WB, 1:500	Cell Signaling
Phospho-SAPK/JNK (T183/Y185)	Kaninchen	Monoklonal	WB, 1:500	Cell Signaling

(81E11) Rabbit mAb				
SAPK/JNK (56G8) Rabbit mAb	Kaninchen	Monoklonal	WB, 1:500	Cell Signaling
DR4 Antibody	Kaninchen	Polyklonal	WB, 1:200	Genetex
DR5 Antibody	Kaninchen	Polyklonal	WB, 1:200	Genetex
C-Myc (D84C12) XP® Rabbit mAb	Kaninchen	Monoklonal	WB, 1:500	Cell Signaling
NF- κ B p65 (F-6)	Maus	Monoklonal	WB, 1:200	Santa-Cruz
Bak (D2D3) Rabbit mAb	Kaninchen	Monoklonal	WB, 1:500	Cell Signaling
Bid Antibody (Human specific)	Kaninchen	Polyklonal	WB, 1:500	Cell Signaling
Bax (D2E11) Rabbit mAb	Kaninchen	Monoklonal	WB, 1:500	Cell Signaling
Bad (D24A9) Rabbit mAb	Kaninchen	Monoklonal	WB, 1:500	Cell Signaling
Bim (C34C5) Rabbit mAb	Kaninchen	Monoklonal	WB, 1:500	Cell Signaling
Bcl-2 (50E3) Rabbit mAb	Kaninchen	Monoklonal	WB, 1:500	Cell Signaling
Bcl-xl (54H6) Rabbit mAb	Kaninchen	Monoklonal	WB, 1:500	Cell Signaling
β -Actin (8H10D10) Mouse mAb	Maus	Monoklonal	WB, 1:500	Cell Signaling
GAPDH (D16H11) XP® Rabbit mAb	Kaninchen	Monoklonal	WB, 1:500	Cell Signaling
Anti-mouse IgG (H+L), HRP-linked Antibody	Pferd	Monoklonal	WB, 1:4000	Cell Signaling
Anti-Rabbit IgG (H+L), HRP-linked Antibody	Ziege	Monoklonal	WB, 1:4000	Cell Signaling
Calnexin (C5C9) Rabbit mAb	Kaninchen	Monoklonal	IF, 1:100	Cell Signaling
RCAS (D2B6N) XP® Rabbit mAb	Kaninchen	Monoklonal	IF, 1:100	Cell Signaling
Anti-TMEM51 Antibody	Kaninchen	Polyklonal	IF/PLA, 1: WB, 1:200	Sigma-Aldrich
Anti-LAMP1 Antibody	Kaninchen	Polyklonal	IF, 1:100	Sigma-Aldrich

8 Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Andreas von Deimling bedanken, der mir die Bearbeitung dieses Projektes in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht und als Gutachter und Betreuer dieser Arbeit fungiert hat.

Prof. Dr. Stefan Wiemann möchte ich dafür danken, dass er sich bereit erklärt hat, bei der Beurteilung der vorliegenden Arbeit als Gutachter und Prüfer mitzuwirken. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Stefan Wölfl, der sich bereit erklärt hat, für die mündliche Prüfung den Prüfungsvorsitz zu übernehmen, sowie bei Prof. Dr. Peter Angel, der ebenfalls bereit war, als Prüfer bei der mündlichen Disputation zu fungieren.

Allen Kolleginnen und Kollegen der Neuropathologie Heidelberg danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre, die außerordentlich gute Zusammenarbeit, kompetente fachliche Unterstützung und viele schöne Erinnerungen an die Zeit dort.

Insbesondere danke ich Dr. David Capper und Prof. Dr. Christian Hartmann für ihre fachliche Unterstützung und Beratung, Antje Habel für ihre hervorragende technische Unterstützung und Jessica Eisel für ihre guten Tipps und das Gegenlesen und Korrigieren dieser Arbeit.

Ganz besonderen Dank möchte ich jedoch an Dr. Stefan Pusch richten, von dem ich nicht nur außerordentlich viel lernen konnte, sondern der mir auch stets in allen Belangen mit Rat und Tat zur Seite stand und ohne dessen Unterstützung viele Aspekte dieses Projektes nicht realisierbar gewesen wären!