

Molekulare Funktion und Transport von MIA (Melanoma Inhibitory Activity)



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. Nat.)
der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg

vorgelegt von

Matthias Molnar

aus

Bremen

im Jahr

2015

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:
9. Februar 2015

Die Arbeit wurde angeleitet von:
Prof. Dr. Anja-Katrin Boßerhoff

Matthias Molnar

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	3
2.1	Aufbau der Haut.....	3
2.2	Die Extrazelluläre Matrix.....	4
2.3	Das maligne Melanom.....	6
2.3.1	Inzidenz und Risikofaktoren des malignen Melanoms.....	6
2.3.2	Klassifikation des malignen Melanoms	7
2.3.3	Pathogenese und Prognose.....	8
2.3.4	Entstehung und Progression des malignen Melanoms.....	10
2.4	Melanoma Inhibitory Activity (MIA).....	17
2.4.1	Chromosomale Lokalisation und Proteinstruktur von MIA	18
2.4.2	Die Bedeutung von MIA im malignen Melanom.....	18
2.5	Transport und Sekretion von Proteinen.....	19
2.5.1	Konstitutive und regulierte Sekretion von Proteinen	20
2.5.2	Der Signalpeptid abhängige Transport von Proteinen	20
2.5.3	Transport und Sekretion von Vesikeln	21
3	Zielsetzung.....	24
4	Ergebnisse	25
4.1	Analyse der Sekretion und des Transports von MIA in HeLa- und HEK-Zellen	25
4.1.1	Analyse der Sekretion von MIA in HeLa- und HEK-Zellen	25
4.1.2	Lokalisation von MIA	27
4.1.3	Identifizierung von MIA*	29
4.2	Einfluss der Dimerisierung auf die Sekretion von MIA.....	31
4.2.1	Analyse der Sekretion von MIA-G61R	31
4.2.2	Lokalisation von MIA-G61R	35
4.3	Einfluss des Signalpeptids auf die Sekretion von MIA	37
4.3.1	Analyse der Sekretion von MIA ohne Signalpeptid.....	37

4.3.2	Lokalisation von MIA ohne Signalpeptid	39
4.4	Mutagenese des Signalpeptids von MIA	41
4.4.1	Analyse der Sekretion verschiedener MIA-Signalpeptid-Mutanten	46
4.4.2	FACS-Analyse	51
4.4.3	Lokalisation der MIA-Signalpeptid-Mutanten	52
4.5	Untersuchung von MIA mit E-Cadherin-Signalpeptid	54
4.5.1	Analyse der Sekretion von E-CAD-MIA	54
4.5.2	Lokalisation von E-CAD-MIA	58
4.6	Inhibition des Vesikeltransports und Signalpeptidprozessierung	59
4.6.1	Analyse der Signalpeptidprozessierung durch siRNA- <i>Knockdown</i>	59
4.6.2	Analyse der Signalpeptidprozessierung durch Expression von Sar1p-H79G	62
5	Diskussion	66
5.1	HeLa- und HEK-Zellen als Modellsystem	66
5.2	Identifizierung von MIA mit Signalpeptid	69
5.3	Das Signalpeptid ist entscheidend für die Sekretion von MIA	70
5.4	Einfluss der Dimerisierung auf Transport und Sekretion von MIA	72
5.5	Prozessierung des Signalpeptids von MIA	73
5.6	Fazit	79
6	Material und Methoden	80
6.1	Materialien	80
6.1.1	Allgemeine Materialien	80
6.1.2	Geräte	83
6.1.3	Bakterien	86
6.1.4	Zelllinien	87
6.1.5	Vektoren	87
6.1.6	Rekombinante Proteine und Antikörper	88
6.1.7	Oligonukleotide	89
6.1.8	Antibiotika und Medien	92

6.1.9	Pufferlösungen	93
6.2	Methoden.....	96
6.2.1	Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	96
6.2.2	Molekularbiologische Arbeiten	98
6.2.3	Proteinbiochemische Arbeiten.....	104
6.2.4	Zellkulturmethoden.....	108
6.2.5	Statistik.....	110
7	Literaturverzeichnis.....	111
8	Abkürzungsverzeichnis.....	131
9	Danksagung	136

1 Zusammenfassung

MIA (*Melanoma Inhibitory Activity*) ist ein wichtiges Protein, das an der Progression und Metastasierung des malignen Melanoms beteiligt ist. MIA wird von Melanomzellen exprimiert und migrationsabhängig am distalen Zellpol sekretiert. Im Extrazellularraum fördert es die Ablösung der Tumorzellen von der Extrazellulären Matrix (*Extracellular matrix*, ECM) und dadurch die Migration und Invasion von Melanomzellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die gerichtete Sekretion von MIA und die Prozessierung des Signalpeptids analysiert. Dafür wurde zunächst die Lokalisation und Sekretion von MIA in transient mit pCMX-PL1-MIA transfizierten HeLa-Zellen, die keine endogene MIA-Expression aufweisen, untersucht. Die Analysen zeigten, dass MIA auch in diesen Zellen migrationsabhängig im hinteren Zellteil akkumuliert und sekretiert wird. Die Sekretion von MIA konnte zudem in transfizierten HEK-Zellen, die ebenfalls keine endogene MIA-Expression besitzen, nachgewiesen werden. Da bereits bekannt ist, dass MIA als Dimer funktionell aktiv ist, wurde des Weiteren untersucht, ob die Dimerisierung auch wichtig für den gerichteten Transport bzw. die Sekretion des Proteins ist. Die Analyse einer nicht-dimerisierungsfähigen MIA-Mutante zeigte, dass die Dimerisierung für diese Prozesse nicht notwendig ist und die Sekretion im Vergleich zu Wildtyp MIA sogar erhöht ist. Um den Einfluss des Signalpeptids von MIA auf den gerichteten Transport und die Sekretion zu prüfen, wurde zudem eine MIA-Mutante ohne Signalpeptid untersucht. Die Experimente konnten bestätigen, dass das Signalpeptid von MIA obligatorisch für die Sekretion des Proteins ist. Die Lokalisation von MIA scheint jedoch nicht zwingend durch das Signalpeptid definiert zu sein. So konnte auch MIA ohne Signalpeptid im hinteren Teil migrierender Zellen detektiert werden. Die Untersuchung eines chimären Proteins, bestehend aus dem Signalpeptid des membranständigen E-Cadherins und dem maturen MIA-Protein, zeigte darüber hinaus, dass MIA auch mit diesem Signalpeptid von transfizierten Zellen sekretiert wird. Zudem akkumuliert diese MIA-Mutante ebenso wie Wildtyp MIA und MIA ohne Signalpeptid im hinteren Zellteil, was die Annahme stützt, dass die Information der intrazellulären Lokalisation von MIA nicht im Signalpeptid kodiert ist, sondern eventuell durch weitere Eigenschaften des maturen Proteins bestimmt wird.

In Western Blot-Analysen von Proteinextrakten mit pCMX-PL1-MIA transfizierten HeLa-, HEK- und Mel Ei-Zellen, konnte neben der Bande des maturen MIAs eine weitere Bande detektiert werden, die der Größe von MIA mit Signalpeptid entspricht. Um die Prozessierung des Signalpeptids und dessen Einfluss auf die Sekretion von MIA zu analysieren, wurden

verschiedene MIA-Signalpeptid-Mutanten kloniert und getestet. Durch die Mutagenesestudie konnten zwei verschiedene Gruppen von Mutanten identifiziert werden. Die erste Gruppe wies das gleiche Bandenmuster wie Wildtyp MIA auf und wird von transfizierten HeLa- und HEK-Zellen sekretiert. Die zweite Gruppe wies ein verändertes Bandenmuster auf und wurde zudem nicht sekretiert. Beide Gruppen von MIA-Mutanten wiesen zwar eine migrationsabhängige Akkumulation im hinteren Zellteil auf, unterschieden sich allerdings teilweise in ihrer relativen Verteilung in der Zelle von Wildtyp MIA. Zudem wurde in dieser Arbeit durch die Modulierung des intrazellulären Vesikeltransports mittels siRNA-Technologie und Inhibitoren die Prozessierung des Signalpeptids weiter untersucht. Die Experimente mit transient transfizierten HeLa-Zellen zeigten ein verändertes Bandenmuster von MIA in Western Blot-Analysen, die darauf schließen lassen, dass das Signalpeptid nicht schon ko-translational beim Eintritt in das Endoplasmatische Reticulum abgespalten wird, sondern die Prozessierung zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen kann.

2 Einleitung

2.1 Aufbau der Haut

Die Haut ist das größte menschliche Organ mit einer Oberfläche von etwa 1,5 – 2 Quadratmetern. Sie schützt den Körper vor äußeren Einflüssen, reguliert den Wärme- und Wasserhaushalt, dient als Sinnesorgan und spielt eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr. All diese Eigenschaften lassen erahnen, dass die Haut ein sehr komplexes Gebilde ist und für die menschliche Homöostase eine entscheidende Rolle spielt.

Die Haut besteht aus drei verschiedenen Schichten, der Oberhaut (*Epidermis*), der Lederhaut (*Dermis*) und der Unterhaut (*Subcutis*). Den äußeren Abschluss bildet die circa 0,03 – 0,05 Millimeter dicke Oberhaut, die eine wichtige Schutzfunktion gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen besitzt. Die Oberhaut gehört zu den Epithelgeweben und ist von außen nach innen in Hornschicht (*Stratum corneum*), Körnerzellschicht (*Stratum granulosum*), Stachelzellschicht (*Stratum spinosum*) und Basalzellschicht (*Stratum basale*) gegliedert. An Handflächen und Fußsohlen befindet sich zudem zwischen der Hornschicht und der Körnerzellschicht die Glanzschicht (*Stratum lucidum*). Die Stachelzellschicht bildet zusammen mit der Basalschicht die sogenannte Keimschicht (*Stratum germinativum*). Den unteren Abschluss der Epidermis bildet die Basalmembran. Diese besteht aus der Basallamina und der *Lamina fibroreticularis*. Die Basallamina besteht wiederum aus der *Lamina rara* und der *Lamina densa* und enthält unter anderem Fibronektin, Kollagen Typ IV, Laminin und Proteoglykane. Die Basalmembran grenzt die Epidermis von der Dermis ab, hat Einfluss auf Zelldifferenzierung und Zellpolarität und übt darüber hinaus eine Stützfunktion aus.

Der hauptsächlich vorkommende Zelltyp in der Oberhaut sind die hornbildenden Zellen, die sogenannten Keratinozyten. Sie machen über 90 % der Oberhautzellen aus und produzieren das namensgebende Keratin. Im Laufe ihrer Differenzierung wandern sie von der untersten zur obersten Schicht der Epidermis und verhornen dabei schrittweise. Keratinozyten sind an Entzündungsprozessen, der Immunantwort sowie der Wundheilung beteiligt und können verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren herstellen. In Keratinozyten wird zudem Melanin gespeichert, welches sich um den Zellkern anlagert und die Haut vor Ultraviolettstrahlung (UV-Strahlung) und dadurch vor Erbgutschädigungen schützt. Das Melanin ist auch für die Bräunung der Haut verantwortlich.

In der Basalzellschicht befinden sich die Pigmentzellen der Haut, die Melanozyten, die über Hemidesmosomen mit der Basalmembran verbunden sind. Ein Melanozyt ist zudem mit etwa fünf bis 40 Keratinozyten vernetzt und synthetisiert Melanin, welches in Form von Melanosomen an die Keratinozyten weitergegeben wird⁶⁹. Die Produktion von Melanin wird durch UV-Strahlung induziert¹⁰⁰.

Die mittlere Hautschicht bildet die Dermis. Sie wird in die Papillenschicht (*Stratum papillare*) und die Netzsicht (*Stratum reticulare*) unterteilt und besteht vorwiegend aus Bindegewebsfasern. Außerdem enthält die Dermis Kollagenfasern und Elastin, wodurch die mechanische Stabilität der Haut erzeugt wird, sowie viele Blut- und Lymphgefäße. An der Grenze zwischen Epidermis und Dermis verläuft der Papillarkörper. Durch zahlreiche Ausstülpungen, den sogenannten Papillen, wird die Basalzellschicht der Oberhaut in der Dermis verankert und durch Blutgefäße mit Nährstoffen versorgt. In der Dermis befinden sich zudem die meisten Sinnesrezeptoren der Haut sowie zahlreiche Drüsen und Haarwurzeln.

Die Subcutis ist die unterste Hautschicht und enthält größere Blutgefäße und Nerven. Sie stellt die Verbindung zu unterliegenden Strukturen wie der Knochenhaut und Faszien dar und dient als Verschiebeschutz der Haut. Die Subcutis besteht aus lockerem Bindegewebe, in dem Fettzellen eingebettet sind. Sie fungiert als Wärmeisolator sowie als Energiespeicher und schützt unterliegende Organe.

2.2 Die Extrazelluläre Matrix

Als Extrazelluläre Matrix (*extracellular matrix*, ECM) bezeichnet man die Gesamtheit aller Makromoleküle im Interzellularraum. Sie stellt den nicht-zellulären Anteil des Bindegewebes dar und besteht aus einer amorphen Grundsubstanz und verschiedenen Fasern, die von Fibroblasten synthetisiert werden. Die amorphe Grundsubstanz ist aus Glykosaminoglykanen (GAGs) und Proteoglykanen (PGs) zusammengesetzt. Die Fasern gliedern sich in kollagene und retikuläre Fasern aus Kollagenfibrillen sowie in elastische Fasern aus Elastin und Mikrofibrillen. Die genaue Zusammensetzung der ECM unterscheidet sich zwischen verschiedenen Geweben und Organen zum Teil erheblich. Die Hauptaufgabe der ECM liegt in der Stabilisierung der Zellen eines Organismus, der Aufrechterhaltung der Form und der Gewährleistung von Elastizität sowie Zug- und Reißfestigkeit.

Glykosaminoglykane sind lineare Polysaccharide aus sich wiederholenden Disacchariden, die 1-3-glykosidisch mit einem Aminozyucker verbunden sind. Liegen die Glykosaminoglykane kovalent an Proteine gebunden vor, bezeichnet man diese Verbindung als Proteoglykane. Die

Hyaluronsäure ist das einzige nicht an ein Protein gebundene GAG und besitzt die Fähigkeit große Mengen an Wasser zu binden. Sie ist mitverantwortlich für die Elastizität der Haut und ist Hauptbestandteil der Gelenkflüssigkeit.

Proteoglykane werden in vier verschiedene Hauptgruppen unterteilt: die Heparansulfat-, Keratansulfat-, Chondroitinsulfat- und Dermatansulfat-Proteoglykane. Darüber hinaus können einzelne Proteoglykane mit verschiedenen Glykosaminoglykan-Ketten verbunden sein, wie beispielsweise Aggrecan²⁵². Proteoglykane bilden große Komplexe und können zudem mit Hyaluronsäure und mit Kollagenen verbunden sein. Sie sind in der Lage, Wasser zu speichern und tragen dadurch zur Elastizität der Haut bei und regulieren die Bewegung von Molekülen durch die Extrazelluläre Matrix. Außerdem haben sie Einfluss auf die Selbstassemblierung von Kollagenen.

Die am häufigsten vorkommenden Proteine in der ECM sind die Kollagene, von denen bislang 28 verschiedene Typen identifiziert wurden¹⁵². Kollagene bestehen jeweils aus drei langen linksgängigen Kollagenmolekülen, die gemeinsam eine rechtsgängige Superhelix (Tropokollagen) bilden, die über Wasserstoffbrücken stabilisiert wird und für die enorme Zug- und Reißfestigkeit der Haut verantwortlich ist^{70,239,240}. Die Aminosäuresequenz einer Kollagenkette ist immer $(\text{Glycin-X-Y})_n$, wobei Position X und Y aus jeder Aminosäure, meistens allerdings aus Prolin oder Hydroxyprolin und seltener aus Lysin bzw. Hydroxylysin besteht²⁷⁵. Kollagene können sowohl Homo- als auch Heterotrimere bilden, wobei hauptsächlich gemischte Superhelices entstehen²⁷⁵. Zur Familie der fibrillären Kollagene gehören die Kollagene I, II, III, V und XI. Kollagene vom Typ I, II und III können sich zu Kollagenmikrofibrillen zusammenlagern, die aus mindestens fünf Tripelhelices bestehen. Durch kovalente Verknüpfung mehrerer Mikrofibrillen entsteht schließlich eine Kollagenfaser. Kollagen Typ IV stellt eine Hauptkomponente der Basalmembran dar. Es bildet ein zweidimensionales Netzwerk und bindet an verschiedene Zelladhäsionsrezeptoren wie beispielsweise Integrine^{165,325,329}.

Das Strukturprotein Elastin ist für Form und Elastizität der Haut wichtig. Nach der Sekretion in den Extrazellularraum werden die einzelnen Elastin-Untereinheiten durch das Enzym Lysyloxidase vernetzt. Ein Elastin-Molekül besteht hauptsächlich aus zwei verschiedenen Domänen. Die hydrophobe Domäne setzt sich vorwiegend aus den Aminosäuren Alanin, Glycin, Prolin und Valin zusammen. Die hydrophile Domäne ist wichtig für die Vernetzung des Proteins und beinhaltet Lysine, welche in der Regel durch zwei bis drei Alanine voneinander getrennt vorliegen.

Ein weiterer Bestandteil der ECM sind die nicht kollagenen Glykoproteine, zu denen Fibronectin und Laminin gehören. Diese Moleküle haben regulatorische und funktionelle Aufgaben wie die Zell-Matrix-Wechselwirkung. Fibronectin kommt als Dimer vor und bindet an Integrine, Kollagene und Fibrin. Es ist unter anderem wichtig für die Zelladhäsion, Differenzierung, Migration und das Zellwachstum. Laminine sind heterotrimere Proteine, die sich aus einer alpha, beta und gamma-Kette zusammensetzen. Laminin bildet ein maschenartiges Netzwerk und verknüpft verschiedene Bestandteile der Basallamina miteinander^{66,334}.

Eine spezielle Differenzierungsform der ECM ist die Basalmembran, die unterhalb der Epithel-Zellschicht liegt und verhindert, dass sich die Zellen dieser Schicht verschieben. Die Hauptbestandteile der Basalmembran sind Kollagen Typ IV, Laminin, Perlecan und Nidogen.

Das Zusammenspiel der verschiedenen ECM-Komponenten macht diese extrem widerstandsfähig. Der Verbund von elastischen und zugfesten Bestandteilen ermöglicht es, Zellen an ihrem Platz zu halten sowie gleichzeitig Druck oder anderen mechanischen Belastungen standzuhalten. Eine entscheidende Rolle spielt die ECM bei der Metastasierung von Tumoren, da sie die Migration von Tumorzellen direkt beeinflusst. Tumorzellen sind in der Lage bestimmte Enzyme zu produzieren, die aktiv die ECM abbauen und den Zellen dadurch die Migration erleichtern. Dadurch steigt das invasive Potential der Zellen und somit deren Fähigkeit zur Metastasierung. Der genaue Abbau der Extrazellulären Matrix ist in Kapitel 2.3.4.4 beschrieben.

2.3 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom (schwarzer Hautkrebs) ist die Hautkrebsform mit der größten Mortalität. Der Tumor entwickelt sich aus den Melanozyten der Haut und weist sich durch ein besonders aggressives Wachstum und eine frühzeitige Metastasierung aus. Im Nachfolgenden sind die grundlegenden Informationen bezüglich Inzidenz und Risikofaktoren, Klassifikation, Pathogenese und Prognose sowie zur Entstehung und Progression des malignen Melanoms zusammengefasst.

2.3.1 Inzidenz und Risikofaktoren des malignen Melanoms

Die Anzahl der Neuerkrankungen des malignen Melanoms hat sich in den letzten 30 Jahren mehr als verdreifacht. Im Jahre 2008 erkrankten fast 18000 Menschen in Deutschland neu am schwarzen Hautkrebs. Männer und Frauen sind dabei in gleichem Maße von der Krankheit betroffen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Frauen bei 60 und für Männer bei 66 Jahren. Die 5-Jahres-Überlebensrate ist mit 91 % bei Frauen etwas höher als mit 87 % bei Männern.

Insgesamt starben 2008 etwa 2500 Menschen an den Folgen des malignen Melanoms (Quelle: Robert Koch Institut).

Im Rahmen des gesetzlichen Krebsfrüherkennungsprogramms besitzen seit 1. Juli 2008 krankenversicherte Personen ab 35 Jahren alle zwei Jahre den Anspruch auf eine Untersuchung des gesamten Körpers auf Hautveränderungen durch speziell ausgebildete Ärzte. Die Möglichkeit einer früheren Diagnose der meisten Melanome (T1-Stadium) trägt seitdem besonders zu einer leicht gesunkenen Mortalität, des an sich sehr aggressiven, malignen Melanoms bei (Quelle: Zentrum für Krebsregisterdaten).

Ein erhöhtes Risiko am schwarzen Hautkrebs zu erkranken haben Menschen mit besonders hellem Hauttyp und Personen mit vielen Pigmentmalen. Personen mit dem Hauttyp I und II, rötlichen oder blonden Haaren, Sommersprossen, Sonnenflecken oder einem familiären malignen Melanom haben ein bis zu 100-fach höheres Erkrankungsrisiko als Personen mit dunklerem Hauttyp. Menschen mit vielen oder atypischen Pigmentmalen weisen ein bis zu 15-fach erhöhtes Risiko einer Erkrankung auf (Quelle: Deutsche Krebshilfe).

Als wichtigster exogener Risikofaktor wird die UV-Exposition durch künstliches Solarien- oder Sonnenlicht, vor allem in der Kindheit und Jugend, angesehen^{88,182}. Sonnenbrände in diesem Alter können das Krebsrisiko um das Zwei- bis Dreifache erhöhen (Quelle: Deutsche Krebshilfe).

2.3.2 Klassifikation des malignen Melanoms

Bei der Klassifikation des malignen Melanoms werden klinisch und histopathologisch vier verschiedene Subtypen unterschieden, die circa 95 % aller Melanome ausmachen.

Die am häufigsten vorkommende Form des schwarzen Hautkrebses ist das superfiziell spreitende Melanom (SSM). Das SSM ist für über 50 % aller malignen Melanome verantwortlich und zeichnet sich durch ein relativ langsames, horizontales Wachstum in der Hautebene aus. Das SSM ist unregelmäßig pigmentiert und weist eine unscharfe Begrenzung auf.

Das noduläre maligne Melanom (NMM) ist die aggressivste Form und mit über 20 % der zweithäufigste Subtyp aller malignen Melanome. Das NMM ist durch ein schnelles vertikales Wachstum und eine frühe Metastasierung gekennzeichnet. In der Regel ist das NMM braun bis schwarz mit glatter oder ulzerierter Oberfläche. Es kann aber auch amelanotisch auftreten, dass heißt ohne sichtbare Pigmentierung.

Das Lentigo maligne Melanom (LMM) ist mit etwa 8 % das dritthäufigste auftretende Melanom. Ihm geht eine *Lentigo maligna* voraus, ein unkontrolliertes Wachstum atypischer Melanozyten ausgelöst durch chronische UV-Exposition. Das LMM weist zunächst ein radiales Wachstum auf

und beginnt erst nach bis zu 15 Jahren vertikal zu wachsen. Dieser Melanomtyp tritt meistens im Gesicht älterer Personen auf.

Den vierten Subtyp stellt das Akral-lentiginöse Melanom (ALM) dar. Es tritt nur in 5 % der Erkrankungen auf, ist allerdings das häufigste Melanom bei dunklem Hauttyp. Es entsteht an Handflächen und Fußsohlen und ist nicht mit der Exposition von UV-Strahlung assoziiert. Es ist zu Beginn meist unscharf begrenzt und inkohärent pigmentiert.

Darüber hinaus werden weiter Unterarten des malignen Melanoms unterschieden, die gemeinsam für etwa 5 % der Fälle verantwortlich sind. Hierzu zählen neben den amelanotischen Melanomen (AMM) weitere, seltene Melanomvarianten wie beispielsweise das Polypoide Melanom oder das Okuläre Melanom (Quelle: Deutsche Krebsgesellschaft).

2.3.3 Pathogenese und Prognose

Die Entstehung und Progression des malignen Melanoms kann durch das Clark-Modell in fünf Stadien unterteilt werden. Das erste Stadium der Pathogenese stellen normale, angeborene (kongenitale) und ungefährliche, später entstandene Nävi dar. Diese gutartigen (benigen) Neoplasien entstehen durch die Proliferation normaler Melanozyten und können im Lebensverlauf zu bösartigen (malignen) Tumoren transformieren, dies ist aber nicht mandatorisch. Die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung am schwarzen Hautkrebs nimmt allerdings mit steigender Anzahl benigner Nävi zu. In der Entwicklung zum malignen Melanom (Abbildung 1) entstehen zunächst dysplastische Nävi, welche als Vorläufer des malignen Melanoms betrachtet werden. Sie können sowohl aus bereits existierenden Nävi als auch aus bisher normaler Haut entstehen. Dysplastische Nävi weisen eine asymmetrische Form, ungleichmäßige Pigmentierung und unscharfe Begrenzungen auf. Die anschließende radiale Wachstumsphase (*radial growth phase*, RGP) wird als erstes malignes Stadium der Melanomentstehung betrachtet. In dieser Phase beginnen sich die Tumorzellen horizontal in der Epidermis auszubreiten. Außerdem ist es möglich, dass bereits vereinzelt Zellen die Basalmembran durchdringen, ein tieferes Eindringen in die Dermis ist allerdings noch nicht möglich. Dies geschieht erstmals in der vertikalen Wachstumsphase (*vertical growth phase*, VGP) des Melanoms, die sich durch eine gesteigerte Invasivität der Zellen auszeichnet. Das letzte Stadium der Pathogenese stellt das metastasierende Melanom dar, welches sich sowohl über die Blutbahn als auch über das lymphatische System weiter ausbreitet⁶³.

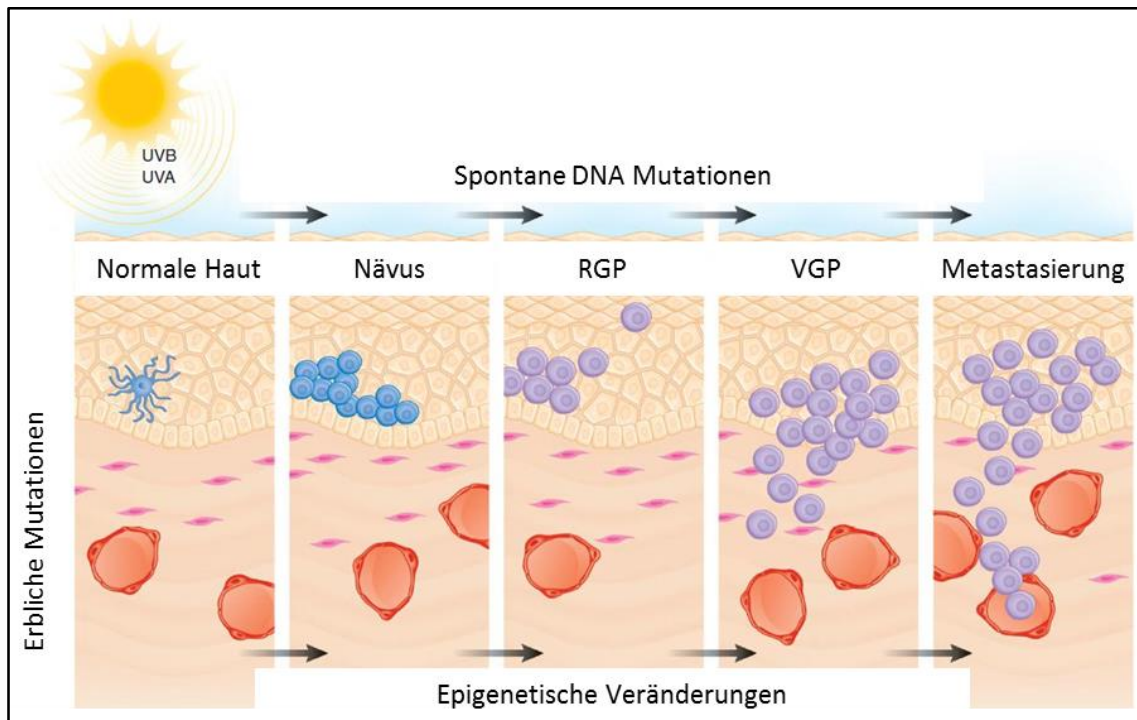


Abbildung 1: Progression des malignen Melanoms. Modifiziert nach Zaidi *et al.*³³⁵.

Die Prognose des malignen Melanoms wird durch verschiedene Faktoren bestimmt. Neben dem Subtyp (2.3.2) spielen hauptsächlich die Tumordicke nach Breslow⁴⁸, die Eindringtiefe nach Clark⁶⁴ sowie das Vorhandensein von Lymphknoten- und Fernmetastasen eine Rolle⁴⁹. Die Beurteilung der Tumordicke nach Breslow beruht auf der absoluten Dicke eines Tumors, unabhängig von der betroffenen Hautschicht. Nach Breslow werden fünf Stufen der Tumordicke unterschieden (I: Tumordicke < 0,75 mm; II: Tumordicke 0,76 – 1,49 mm; III: Tumordicke 1,5 – 2,49 mm; IV: Tumordicke 2,5 – 3,49 mm; V: Tumordicke > 3,5 mm). Der Clark-Level hingegen richtet sich nach der tiefsten betroffenen Hautschicht und ist ebenfalls in fünf Gruppen unterteilt (I: Tumorzellen oberhalb der Basalmembran; II: Invasion der Papillenschicht; III: Invasion bis zur Netzsicht; IV: Invasion in die Netzsicht; V: Invasion in die Subkutis).

Die höchste 5-Jahres-Überlebensrate mit über 90 % existiert, wenn die Tumordicke weniger als 0,76 mm beträgt (Breslow-Level I) und keine Invasion der Basalmembran (Clark-Level I) vorliegt. Wird ein Melanom zu diesem Zeitpunkt chirurgisch entfernt, besteht die höchste Heilungswahrscheinlichkeit für die Patienten. Mit steigendem Breslow- bzw. Clark-Level nimmt die 5-Jahres-Überlebensrate immer weiter ab und verschlechtert sich durch das Auftreten von Lymphknoten- und Fernmetastasen auf bis zu unter 10 %. Da sich das maligne Melanom als besonders resistent gegenüber Chemo- und Radiotherapien erweist, besteht derzeit nur bei einer frühzeitigen Erkennung und Entfernung des Primärtumors die Möglichkeit einer vollständigen Heilung.

2.3.4 Entstehung und Progression des malignen Melanoms

Die Entstehung und Progression des malignen Melanoms ist ein bis heute nur teilweise verstandener Prozess. Bereits angeborene Mutationen sowie verschiedene genetische Veränderungen in multiplen Signalwegen können dabei eine wichtige Rolle spielen.

Die Entstehung eines Melanoms wird oft mit einer hohen UV-Exposition der Haut in Verbindung gebracht. Eine starke UV-Exposition kann zu Schäden der DNA in Melanozyten, durch Bildung von Pyrimidin-Dimeren, und dadurch zu deren maligner Transformation führen^{98,226}. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass oft junge Personen mit vielen Nävi und einer starken UV-Exposition der Haut, in Verbindung mit Sonnenbränden, am malignen Melanom erkranken. Zudem entwickeln gerade ältere Personen an chronisch UV-Strahlung ausgesetzten Hautflächen Melanome. Die UV-Exposition kann allerdings nicht allein für die Entwicklung von Melanomen verantwortlich gemacht werden, da diese sich auch häufig an Stellen bilden, die nicht in besonderem Maße der Sonne ausgesetzt waren. Somit können auch weitere Faktoren bei der Entstehung des schwarzen Hautkrebs eine Rolle spielen. So werden verschiedene angeborene Mutationen, wie beispielsweise im *CDK4*- (*cyclin-dependent kinase 4*) oder *CDKN2A*-Gen (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) mit der Entstehung eines malignen Melanoms in Verbindung gebracht^{21,111}. Des Weiteren sind aber auch nachweislich erst später erworbene Mutationen in Molekülen verschiedenster Signalwege in diesen Prozess involviert. Zwei der wohl wichtigsten betroffenen Signalwege sind der MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)²⁷⁷ und der PI3K (*phosphatidylinositol-3-kinase*)²⁷⁶ Signalweg. Beide Kaskaden werden durch NRAS (*Neuroblastoma Rat Sarcoma*) aktiviert, welches als erstes Onkogen in der Melanomentstehung identifiziert wurde²¹⁸. Die wichtigste Schlüsselfigur im malignen Melanom stellt aber die Serin/Threonin-Proteinkinase B-Raf (*rapidly accelerated fibrosarcoma kinase B*) dar, die 2002 als weiteres Onkogen beschrieben wurde⁷⁴. B-Raf kann ebenso wie NRAS den MAPK-Signalweg stimulieren, der in den meisten Melanomen konstitutiv aktiv ist²¹⁶.

2.3.4.1 MAPK-Signalweg (Ras/Raf/MEK/ERK)

Der MAPK-Signalweg reguliert verschiedene zelluläre Prozesse wie Apoptose, Differenzierung, Proliferation, Adhäsion oder Wachstum. Die Aktivierung des MAPK-Signalwegs (Abbildung 2) erfolgt durch die Bindung von verschiedenen Wachstumsfaktoren oder Zytokinen an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen^{113,157,243}. Die Bindung induziert die Dimerisierung der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, was in der gegenseitigen Autophosphorylierung der Tyrosinreste der Rezeptoren resultiert^{166,302}. In diesem aktiven Zustand kann das Adapterprotein Grb2 (*growth binding factor 2*) an den Rezeptor binden und den GDP/GTP-Austauschfaktor SOS (*son of*

sevenless) zur Zellmembran rekrutieren^{83,313}. SOS ist nun in der Lage, verschiedene Ras-Moleküle (H-Ras, K-Ras, N-Ras) durch Phosphorylierung zu aktivieren¹⁴⁹, allerdings nur, wenn diese membrangebunden vorliegen^{10,52}. Dies wird durch die Farnesylierung eines C-terminalen Cysteins durch die Farnesyltransferase ermöglicht^{112,187,236,298}. Im GTP-gebundenen, aktiven Zustand (*RasG*) kann Ras wiederum mit Hilfe verschiedener Kinasen Mitglieder der Raf-Kinase Familie (A-Raf, B-Raf, C-Raf) phosphorylieren¹⁸⁸. Raf-Kinasen aktivieren die Kinasen MEK1 und MEK2, die ihrerseits ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*; auch MAPK: *mitogen activated protein kinase*) stimulieren und dadurch die Expression von Genen, die unter anderem an Proliferation, Migration Differenzierung und dem Überleben von Zellen beteiligt sind, induzieren^{191,192,241}.

Der MAPK-Signalweg ist in über 80 % aller malignen Melanome konstitutiv aktiv³¹⁰. Neben Mutationen in verschiedenen Kinasen ist dafür das Fehlen bestimmter Inhibitoren verantwortlich^{178,268}. Eine der häufigsten auftretenden Mutationen in malignen Melanomen, die auf die Exposition von UV-Strahlung zurückzuführen ist, ist die BRAF^{V600E}-Mutante, die in circa 45 – 60 % der Erkrankungen auftritt^{56,78,87,216,227}. Die B-Raf^{V600E}-Mutante phosphoryliert permanent MEK1/2 und stimuliert dadurch die Signalkaskade⁷⁴. N-Ras ist in etwa 15 % aller malignen Melanome mutiert und kann sowohl den MAPK- als auch den PI3K-Signalweg aktivieren^{5,87}. Sowohl die B-Raf- als auch die N-Ras-Mutation spielen eine entscheidende Rolle im schwarzen Hautkrebs und kommen zusammengerechnet in etwa 75 % aller malignen Melanome vor, allerdings treten beide Mutationen nur sehr selten gemeinsam auf^{108,133}. Dass bereits in ca. 80 % der benignen Nävi Mutationen in B-Raf bzw. N-Ras auftreten, lässt darauf schließen, dass der MAPK-Signalweg bereits früh in der Melanomentstehung eine wichtige Rolle spielt, jedoch nicht die alleinige Ursache für die maligne Transformation von normalen Melanozyten sein kann.

Neben den genannten Mutationen können ebenfalls Wachstumsfaktoren wie FGF (fibroblast growth factor) und HGF (*hepatocyte growth factor*)^{232,254}, die im malignen Melanom ständig neu gebildet werden, oder die Überexpression ihrer entsprechenden Rezeptoren⁷¹ den MAPK-Signalweg von außen her aktivieren. Wie bereits erwähnt, kann auch das Fehlen verschiedener Inhibitoren für die Aktivierung des MAPK-Signalwegs verantwortlich sein. Beispielsweise werden der Raf-Inhibitor RKIP (raf-1 kinase inhibitory protein)²⁶⁸ und Mitglieder der Sprouty-Familie (SPRY2 und SPRY4) im malignen Melanom schwächer exprimiert, wodurch die Abschaltung der MAPK-Signalkaskade nicht richtig funktioniert^{178,253,300}. Darüber hinaus kann der Tumorsuppressor PTEN Einfluss auf den MAPK-Signalweg nehmen, indem er durch die

Modulierung von Ras die aktivierte Signalkaskade, ausgelöst durch Integrine und Wachstumsfaktoren, unterdrückt^{119,314}.

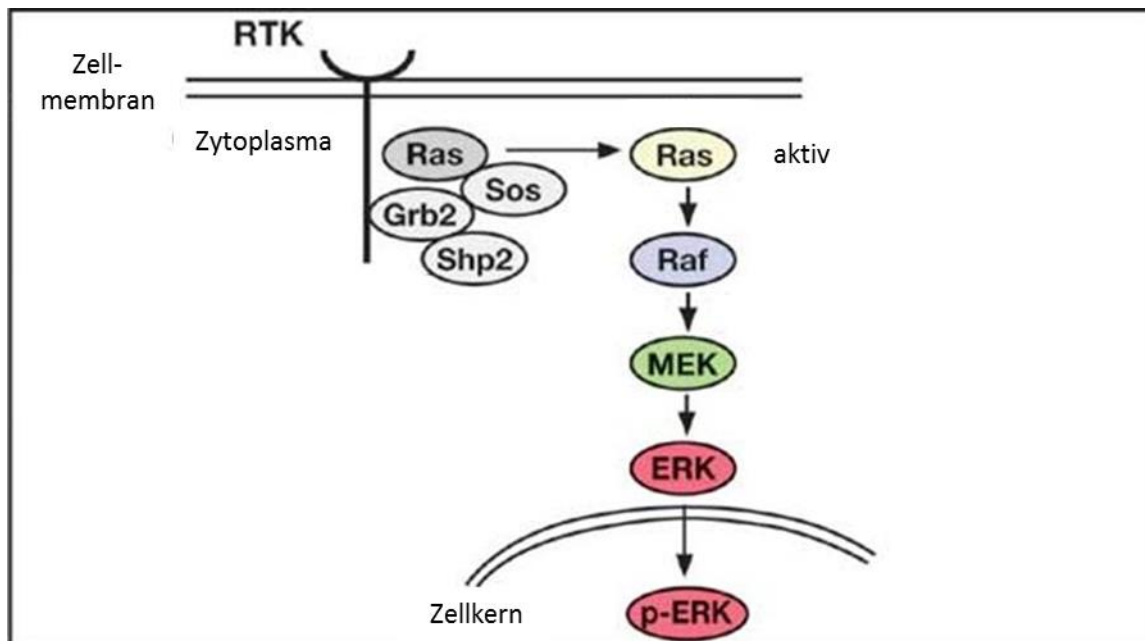


Abbildung 2: MAPK-Signalkaskade. Modifiziert nach Rodriguez-Viciana²⁴⁴.

Der MAPK-Signalweg an sich reguliert verschiedene Transkriptionsfaktoren und nimmt dadurch Einfluss auf die Expression verschiedenster Gene, die den Zellzyklus kontrollieren. ERK kann zum Beispiel die Aktivität von MITF (Microphthalmia-associated transcription factor) regulieren²⁷⁷. MITF wiederum kann unter anderem die Expression des antiapoptotisch wirkenden Proteins Bcl-2 beeinflussen und dadurch das Zellüberleben fördern¹⁹³. Weitere Ziele von ERK sind unter anderem die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-1⁵⁸. Die Aktivierung von Ets führt beispielsweise zur Expression von Cyclin D1, CDK1 (*Cyclin dependent kinase 1*) oder c-Myc (*myelocytomatosis*), die an der Regulation des Zellzyklus und der Zellproliferation beteiligt sind²¹⁵. Möglich ist auch eine erhöhte Expression von Matrix-degradierenden MMPs (*Matrix Metalloproteasen*) und uPAs (*Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator*), die die Metastasierung des malignen Melanoms fördern^{28,57}.

Die Aktivierung des MAPK-Signalwegs durch beispielsweise FGF2 (*Fibroblast growth factor 2*) inhibiert des Weiteren die Expression von E-Cadherin, indem dessen transkriptionelle Repressoren Slug, ZEB1 und Snail verstärkt exprimiert werden^{61,67,164}. E-Cadherin ist der wichtigste Mediator der Zelladhäsion zwischen Keratinozyten und Melanozyten. Kommt es zu einem Verlust von E-Cadherin, führt dies zu einer Lösung der Zellen voneinander²⁹⁶. Der genaue Einfluss von E-Cadherin auf die Melanomentstehung wird in Kapitel 2.3.4.3 genauer vorgestellt. Ein weiteres Ziel des MAPK-Signalwegs sind die Integrin-Zelladhäsionsmoleküle, wie unter

anderem Integrin $\alpha_5\beta_3$ ³⁰⁶, welches die Tumordicke, Invasivität und Metastasierung des malignen Melanoms beeinflussen kann¹⁴² und die Interaktion der Melanozyten mit anderen Zellen sowie der extrazellulären Matrix moduliert²⁷⁷. Zusätzlich kann der MAPK-Signalweg auch die Expression von Integrinen und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) induzieren^{23,104,277,322}, und dadurch die Invasivität von Tumorzellen und die Progression des malignen Melanoms fördern (Abbildung 3).

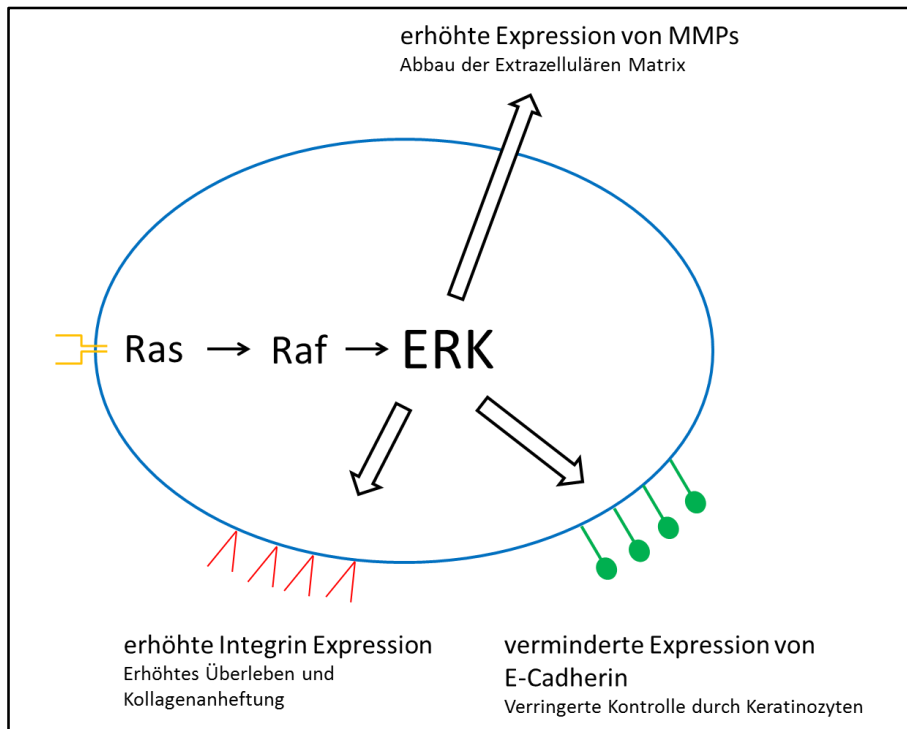


Abbildung 3: MAPK-Signalweg modifiziert nach Smalley²⁷⁷. Eine Induktion des Signalwegs führt zu einer gesteigerten Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sowie Integrinen und zu einer verminderten Expression von E-Cadherin. ECM = Extrazelluläre Matrix.

2.3.4.2 AKT (PI3K/PTEN/AKT)- Signalweg

Der AKT-Signalweg wird, ebenso wie der MAPK-Signalweg, durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktiviert. Die aktiven Rezeptoren sind in der Lage die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) zu phosphorylieren. Die aktive PI3K generiert daraufhin Phosphoinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP3) aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2). PIP3 rekrutiert anschließend PDK-1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*) und Akt, welches auch als Proteinkinase B bezeichnet wird, zur äußeren Zellmembran⁷³. Hier wird Akt durch PDK-1 phosphoryliert und somit aktiviert^{54,153}. Akt kann dann über mTOR (*mammalian target of rapamycin*) und NF κ B die Expression bestimmter Zielgene modulieren, die unter anderem an Zellüberleben, Invasivität, Angiogenese und Proliferation beteiligt sind⁷⁵.

Der AKT-Signalweg ist mit dem MAPK-Signalweg über das kleine G-Protein Ras verbunden. Das phosphorylierte Ras (RasG) ist in der Lage, neben Raf, auch die Phosphoinositid-3-Kinase zu aktivieren und dadurch den nachgeschalteten Signalweg zu aktivieren¹²⁵.

Ein wichtiger Inhibitor des Akt-Signalwegs ist der Tumorsuppressor PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), welcher PIP3 dephosphorylieren kann¹⁸³. PTEN ist in bis zu 28 % aller malignen Melanome durch Deletion verloren oder Methylierung inaktiv und kann dadurch den Akt-Signalweg nicht mehr regulieren^{24,295}, so dass dieser konstitutiv aktiv ist. In etwa 40 – 60 Prozent aller malignen Melanome finden sich aktivierende Mutationen, die zu einer erhöhten Expression von Akt und somit ebenfalls zu einer ständigen Aktivierung des Akt-Signalweges beitragen können. Dabei korreliert die Menge an aktiviertem Akt, insbesondere Akt3, mit der Progression der Erkrankung²⁸³.

Die Überexpression von Akt und die fehlende Regulation durch PTEN kann also zur dauerhaften Aktivierung des Akt-Signalweges führen, was eine unkontrollierte Expression verschiedener Zielgene zur Folge hat und zur Entartung der Zellen entscheidend beiträgt. Der Verlust von PTEN tritt im malignen Melanom häufig zusammen mit Mutationen in B-Raf auf, was ein verstärktes Tumorwachstum, durch Umgehung von Seneszenz, hervorruft⁷².

2.3.4.3 Weitere Signalwege der Melanomentstehung und fehlregulierte Moleküle

Zur Entstehung und Progression des malignen Melanoms tragen, neben Mutationen bestimmter Proteine wie B-Raf oder Akt, die eine wichtige Rolle bei der Steuerung verschiedener Signalwege spielen, weitere Faktoren bei. Es kommt beispielsweise zu einem veränderten Expressionsmuster verschiedener Zelladhäsionsproteine sowie zur Ausschüttung von tumorfördernden Wachstumsfaktoren und Zytokinen.

Ein wichtiges Ereignis in der Melanomentstehung ist ein Prozess, der der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) sehr ähnlich ist^{96,205}. Dabei erlangen epitheliale Zellen Eigenschaften von mesenchymalen Zellen, wodurch sie die Fähigkeit zur Migration und zur Invasion der Basalmembran erhalten. Besonders hervorzuheben ist hierbei die verminderte Expression von E-Cadherin⁹², die im malignen Melanom mit einer Erhöhung der N-Cadherin Expression einhergeht¹⁴³. Der Verlust von E-Cadherin führt dazu, dass die Melanom-Zellen nicht mehr der Kontrolle durch Keratinozyten unterliegen. Dies begünstigt zum einen das unkontrollierte Wachstum der Tumorzellen und ermöglicht ihnen zum anderen die Interaktion mit weiteren Melanomzellen, Fibroblasten oder Endothelzellen. Dadurch ist es den Tumorzellen möglich in tiefere Hautschichten vorzudringen und neue Tumornester auszubilden^{122,123,140,143,195}. Die verringerte Expression von E-Cadherin induziert darüber hinaus

die Expression von Melanom-assoziierten Molekülen²⁵¹. Die Reexpression von E-Cadherin kann dahingegen zu der Ausbildung neuer Kontakte zwischen den beiden Zelltypen führen und *in vitro* die Keratinozyten-vermittelte Wachstumskontrolle wieder herstellen^{140,167}.

Im malignen Melanom nimmt zwar die Expression von E-Cadherin im Vergleich zu normalen Melanozyten ab, allerdings kommt es dafür zu einer verstärkten Expression von N-Cadherin¹⁴³. Es konnte bereits gezeigt werden, dass N-Cadherin einerseits das Überleben und die Migrationsfähigkeit von Melanomzellen fördert und es den Zellen andererseits ermöglicht neue Zellkontakte, beispielsweise mit Fibroblasten, auszubilden¹⁶⁸. Die erhöhte Expression von N-Cadherin scheint direkt von der Expression von E-Cadherin beeinflusst zu werden. Der Verlust von E-Cadherin führt zunächst zu einer verstärkten Aktivierung von NFkappaB (nuclear factor kappa B)¹⁵⁹. NFkappaB wiederum kann durch eine direkte Bindung im Promoterbereich die Expression von N-Cadherin fördern und begünstigt dadurch die onkogene EMT des malignen Melanoms¹⁵⁸.

Eine weitere Rolle bei der Entstehung und Progression des malignen Melanoms nehmen fehlregulierte Wachstumsfaktoren und Zytokine ein, deren Ausschüttung die Zellproliferation und das Tumorstadium begünstigt^{116,169}. So werden schon in frühen Stadien der Melanomentstehung vermehrt bFGF (*Basic fibroblast growth factor*), HGF (*Hepatocyte growth factor*) oder SCF (*Stem cell factor*) produziert²⁰⁹. Des Weiteren sind im Melanom beispielsweise TGFbeta (*transforming growth factor beta*) und verschiedene BMPs (*bone morphogenetic proteins*) fehlreguliert^{141,224}. So werden im malignen Melanom unter anderem BMP4 und BMP7 verstärkt exprimiert, wodurch die Angiogenese und somit die Tumorstadium gefördert wird^{245,247}. Die Bildung von Blut- und Lymphgefäßen, die einerseits den Tumor versorgen und andererseits dessen Metastasierung ermöglichen, wird wiederum durch weitere proinvasive Faktoren wie zum Beispiel VEGF (*vascular endothelial growth factor*) begünstigt^{103,184}.

Zusammenfassend begünstigt das Zusammenspiel der verschiedenen, fehlregulierten Adhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren, Zytokine und weiteren proinvasiven Faktoren die Progression des malignen Melanoms.

2.3.4.4 Proteolytische Degradation der extrazellulären Matrix

Der Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix (*extracellular matrix*, ECM) ist ein natürliches Phänomen, welches beispielsweise bei der Embryogenese und der Wundheilung zum Tragen kommt. Die Degradation der ECM spielt allerdings auch in der Tumorentwicklung eine entscheidende Rolle, da hierdurch die Invasion und Metastasierung maligner Zellen begünstigt wird. Die wichtigsten Proteine, die an der Degradation der ECM beteiligt sind, sind die MMPs

(*matrix metalloproteinase*), uPAs (*urokinase-type plasminogen activator*) sowie verschiedene Cadhepsine, die eine Gruppe von Aspartyl-, Cystein- sowie Serinproteasen darstellen^{148,200,213}.

Die Expression von verschiedenen Cathepsinen (Aspartyl- und Cysteinproteasen), wie Cathepsin B, D, H, K und L ist im malignen Melanom stark erhöht^{26,230,327}. Diese Enzyme werden zunächst als Proproteine synthetisiert und anschließend in ihrer aktivierten Form in Lysosomen gespeichert. Sie sind am Abbau von verschiedenen ECM-Komponenten wie Aggrecan, Fibronectin, Kollagen und Laminin beteiligt^{26,161}.

Matrix-Metalloproteinasen werden aufgrund ihrer Spezifität und zellulären Verteilung in vier verschiedene Klassen unterteilt. Man unterscheidet Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und membranständige MMPs (MT-MMPs, membrane type-MMPs). Die Kollagenasen sind besonders am Abbau von fibrillärem Kollagen beteiligt. Gelatinasen können Kollagen Typ IV, Gelatin und Elastin degradieren. Stromelysine können verschiedenste ECM-Proteine, wie Fibronectin, Laminin und Proteoglykane, abbauen, sind allerdings nicht in der Lage Kollagene zu spalten¹³⁴. MMPs werden als inaktive Proproteine von den Zellen sezerniert und durch uPAs (*urokinase plasminogen activator*) oder andere MMPs aktiviert^{14,150}. MT-MMPs sind über eine Transmembrandomäne oder über einen GPI-Anker (*Glycosylphosphatidylinositol*) an der Zellmembran befestigt. Neben der Degradation der ECM können sie andere MMPs aktivieren und die Angiogenese und Invasivität der Tumorzellen fördern^{79,139,197,279,280}.

Im malignen Melanom sind verschiedenste MMPs überexprimiert, wie beispielsweise MMP-1, -2, -3, -8, -9, -10, -13 und MMP-15^{3,33,68,107}. Die Expression von MMPs kann durch Hormone, Onkogene, Wachstumsfaktoren (bFGF) und Zytokine (IL-1, IL-6, TNF α) induziert werden^{30,272}. Des Weiteren ist bekannt, dass auch BMPs (bone morphogenetic proteins) die MMP-Expression in Fibroblasten und Melanomzellen induzieren können²⁴⁶. Die Expression der MMPs wird dabei durch verschiedene Transkriptionsfaktoren der AP1- und Ets-Familien reguliert³¹⁵. MMPs werden allerdings nicht nur von Tumorzellen, sondern auch von umliegenden Stromazellen gebildet, die somit auch zu einer Degradation der ECM beitragen^{135,136}.

Neben MMPs sind im malignen Melanom oft auch die spezifischen Inhibitoren, die sogenannten TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases), fehlreguliert. So kann beispielsweise eine erhöhte Expression von TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-3 vorliegen, die ebenfalls den Abbau und die Modellierung der ECM beeinflusst¹³⁷.

Die uPAs (*urokinase-type plasminogen activator*) sind sekretierte Serin-Proteasen, die ebenfalls eine wichtige Rolle im malignen Melanom spielen²⁸². Die Bindung an den uPA-Rezeptor (uPAR) aktiviert die Umsetzung von Plasminogen zu Plasmin. Plasmin wiederum kann verschiedene

Matrixbestandteile, wie Fibronektin, Kollagen Typ I oder Laminin, abbauen und verschiedene MMPS, wie MMP-2 und MMP-9, aktivieren¹⁴. Die uPA-Aktivität wird durch spezifische Inhibitoren, PAI1 und PAI2 (plasminogen activator inhibitor 1/2) reguliert²⁸².

2.4 Melanoma Inhibitory Activity (MIA)

Das Protein MIA (melanoma inhibitory activity), welches auch als CD-RAP (cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein) bezeichnet wird, spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung, Extravasation und Metastasierung des malignen Melanoms. Mittlerweile sind drei MIA-Homologe entdeckt worden, die mit zur MIA-Familie gezählt werden: MIA-2⁴⁴, OTOR²⁴² (*otoraplin*, FDP = *fibrocyte derived protein*⁶⁵, MIAL = *MIA like gene*²³⁸) und TANGO⁴².

Erstmals wurde MIA 1989 in Zellkulturüberständen humaner HTZ-19 Melanomzellen identifiziert^{7,31,34}. In damaligen Studien wurde eine tumorsuppressive Wirkung postuliert, die namensgebend für MIA war. Später zeigte sich allerdings, dass MIA Kontakte zur ECM inhibiert, dadurch die Anhaftung von Tumorzellen vermindert und somit aktiv an der Metastasierung des malignen Melanoms beteiligt ist. MIA wird von Melanomzellen, im Vergleich zu normalen humanen epidermalen Melanozyten (NHEMs) verstärkt gebildet, konnte allerdings auch schon in benignen Nävi nachgewiesen werden⁴³. Neben dem Melanom konnte auch in anderen Tumorarten, wie zum Beispiel im Kolonkarzinom, Mammakarzinom, Nierenzellkarzinom oder Pankreaskarzinom die Expression von MIA bestätigt werden^{43,86,223}.

In gesundem Gewebe wird MIA hauptsächlich im Knorpel gebildet, wo es erstmals als CD-RAP beschrieben wurde^{41,81,324}. Es konnte gezeigt werden, dass MIA bei der Differenzierung von Knorpelgewebe eine Rolle spielt²⁶⁶. Des Weiteren wird MIA auch während der Embryogenese im Brustgewebe exprimiert. Die weiteren Mitglieder der MIA-Familie weisen dahingegen ein anderes Expressionsmuster auf. Während TANGO ubiquitär in allen Geweben vorkommt⁴², tritt OTOR ausschließlich im Innenohr auf²⁴². MIA-2 wird dahingegen spezifisch in der Leber exprimiert, wo es als Tumorsuppressor agiert^{44,127}.

MIA wird bereits seit längerem als klinischer Marker verwendet, der sowohl während der Therapie als auch zur Nachsorge eingesetzt werden kann^{37,40,235,255,256,284}. Für den Nachweis wird der Serumspiegel von MIA mittels ELISA bestimmt. Da der Serumspiegel mit der Progression der Erkrankung korreliert, kann die Bestimmung des MIA-Gehalts frühzeitig Rezidive anzeigen und somit zu einer schnelleren Behandlung und Nachsorge des malignen Melanoms beitragen³⁷⁻³⁹.

2.4.1 Chromosomale Lokalisation und Proteinstruktur von MIA

Das *MIA*-Gen ist auf Chromosom 19 lokalisiert und weist vier Exone auf^{41,156}. *MIA* wird zunächst als 131 Aminosäuren langes Vorläuferprotein gebildet und besitzt eine N-terminale Signalsequenz aus 24 Aminosäuren, welches die Sekretion des Proteins in den Extrazellularraum ermöglicht. Nach Abspaltung des Signalpeptids besitzt das mature Protein aus 107 Aminosäuren ein Molekulargewicht von circa 11 kDa. *MIA* weist eine globuläre Form auf und wird von zwei intramolekularen Disulfidbrücken stabilisiert, die wichtig für die korrekte Faltung und Funktion des Proteins sind²⁸⁹. Darüber hinaus besteht *MIA* aus sieben β -Faltblättern und zwei kurzen α -Helices, die durch mehrere *Loop*-Regionen miteinander verbunden sind¹⁸¹. Interessanterweise besitzt *MIA* eine SH3-ähnliche (*Src-homology 3*) Domäne²⁹⁰, die bisher noch nicht bei anderen sekretierten Proteinen nachgewiesen werden konnte. Allerdings tragen auch die anderen Mitglieder der *MIA*-Familie diese Domäne²⁸⁸, die normalerweise der Erkennung Prolinreicher Aminosäurebereiche dient und an der Vermittlung von Proteininteraktionen beteiligt ist.

2.4.2 Die Bedeutung von MIA im malignen Melanom

MIA ist an der Metastasierung und der hohen Invasivität des malignen Melanoms direkt beteiligt. Dies ist auf die Interaktion von *MIA* mit verschiedenen ECM-Bestandteilen zurückzuführen. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass *MIA* in Vesikeln zum hinteren Zellpol transportiert und dort Calcium-abhängig sekretiert wird²⁶³. Außerhalb der Zelle bindet *MIA* unter anderem an Cadherin-7³¹⁹, Fibronektin, Laminin³⁶ sowie die Zelladhäsionsrezeptoren Integrin $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_5\beta_1$ ^{18,36,39}. Die Bindung von *MIA* an die Integrine inhibiert diese, wodurch sich keine Zell-Matrix-Kontakte mehr ausbilden können und die Tumorzellen sich somit leichter aus dem bestehenden Zellverband lösen und in gesundes Gewebe einwandern können⁴⁵. Die gerichtete Sekretion von *MIA* am distalen Zellpol begünstigt dabei die gezielte Ablösung des hinteren Teils der Zellen und fördert somit die Migration in eine bestimmte Richtung. Wichtig für die Funktion von *MIA* ist außerdem die Eigenschaft, (*Head-to-Tail*) Dimere zu bilden. Nur in dieser Form ist *MIA* aktiv und beeinflusst die Zellmigration und Formation von Metastasen²⁶⁵.

Es gibt zudem Hinweise, dass *MIA* bereits in der frühen Melanomentstehung eine Rolle spielen könnte. Der Einfluss von *MIA* auf die Progression des malignen Melanoms wurde durch die *MIA*-defizienten Zelllinien HMB2-*MIA*5 und HMB2-*MIA*8 weiter untersucht. Im Vergleich zur parental HMB2-Zelllinie weisen die *MIA*-defizienten Klone eine veränderte Morphologie auf, die mit kleinerem Durchmesser und dendritischen Zellausläufern eher einem melanozytären Phänotyp entspricht. Die Klone sind zudem in der Lage sowohl in 2D-*Monolayer*-Kulturen als

auch im 3D-Sphäroid-Modell in *Clustern* zu wachsen. Des Weiteren zeigt sich ein verändertes Expressionmuster verschiedener Tumor-assoziierten Gene. So nimmt beispielsweise die Expression von MT1-MMP (*membrane type-1 matrix metalloproteinase*), t-PA (*tissue-type plasminogen activator*), Integrin $\beta 3$, SPARC (*secreted protein acidic and rich in cysteins*), Fibronektin und MCAM (*melanoma cell adhesion molecule*) in HMB2-MIA5 und HMB2-MIA8 deutlich ab. Besonders ist auch, dass die Expression von N-Cadherin zurück geht und dafür vermehrt E-Cadherin exprimiert wird, ein Ereignis, dass in der Progression des malignen Melanoms normalerweise genau andersherum abläuft. Auffällig war zudem die Re-Induktion der Pigmentsynthese der MIA-defizienten Klone im Vergleich zu normalen HMB2-Zellen. Dies ist vermutlich durch die Reexpression von Trp-1 (*tyrosinase related protein 1*) und Tyrosinase, die beide an der Melaninsynthese beteiligt sind, zu erklären. Dies ist in den MIA-defizienten Klonen wahrscheinlich auf eine erhöhte Expression von PAX3 (*paired box protein 3*) und eine reduzierte Expression von PIAS3 (*protein inhibitor of activated STAT 3*) zurückzuführen ist. Dem entsprechend resultierte die Reexpression von MIA in den MIA-defizienten Klonen in einer Herabregulation von Trp-1 und damit in einer Hemmung des melanozytären Phänotyps^{228,299}.

Der Einfluss von MIA auf die Entwicklung des malignen Melanoms wurde zudem *in vivo* bestätigt. Es konnte in zwei verschiedenen Systemen gezeigt werden, dass MIA zwar die Extravasation und die Metastasierung fördert, allerdings keinen Einfluss auf das Wachstum des Primärtumors, die Zellproliferation oder Apoptoserate hat^{38,120}.

Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass MIA die Progression des malignen Melanoms durch die Aktivierung Tumor-assoziierten Gene begünstigt und Einfluss auf die Pigmentsynthese und Morphologie der Zellen hat.

Darüber hinaus konnte MIA auch eine immunsuppressive Wirkung nachgewiesen werden. Diese beruht auf der Bindung an von Leukozyten exprimiertes Integrin $\alpha_4\beta_1$ ¹⁴⁶, die sich durch die Verhinderung der Dimerisierung des Proteins wieder aufheben lässt²⁶⁵. Untersuchungen von Marr *et al.* konnten des Weiteren zeigen, dass UV-Bestrahlung die Expression und Sekretion von MIA in WM35-Zellen fördert und dass funktionelles p53 für die Sekretion MIAs notwendig ist¹⁸⁹.

2.5 Transport und Sekretion von Proteinen

In eukaryotischen Zellen kommen viele unterschiedliche Proteine vor, die ihre Funktion in verschiedenen Bereichen und Organellen ausüben. Ein großer Teil der Proteine wird dabei im Zytosol der Zellen von freien Ribosomen synthetisiert. Viele Proteine werden allerdings in den verschiedenen Organellen der Zellen bzw. an deren Membranen, an der Zellmembran oder

außerhalb der Zelle benötigt. So müssen beispielsweise DNA- und RNA-Polymerasen in den Zellkern, Enzyme zur Proteinmodifikation in den Golgi-Apparat und verschiedene Bestandteile der extrazellulären Matrix zur Sekretion an die Zellmembran transportiert werden. Der gerichtete Transport von Proteinen an ihren Bestimmungsort wird dabei durch zwei grundlegende Mechanismen bewerkstelligt. Entscheidend ist zum einen der Signalpeptid-abhängige Transport (*signal-based targeting*) und zum anderen der vesikuläre Transport von Proteinen (*vesicle-based trafficking*).

Der Signal-abhängige Transport von Proteinen kann sowohl kotranslational als auch nach Beendigung der Translation stattfinden, wobei die Proteine direkt in spezifische Zellkompartimente wie das Endoplasmatische Reticulum (ER), Mitochondrien, Peroxisomen oder den Nukleus gelangen.

Der vesikuläre Transport von Proteinen stellt den sekretorischen Weg dar. Dabei werden synthetisierte Proteine in der Regel zunächst ins ER translatiert und gelangen von dort in Vesikeln verpackt zu anderen Organellen bzw. der Zelloberfläche, wo sie schließlich in den Extrazellularraum abgegeben werden.

2.5.1 Konstitutive und regulierte Sekretion von Proteinen

Grundsätzlich wird zwischen der konstitutiven und der regulierten Sekretion von Proteinen unterschieden. Bei der konstitutiven Sekretion werden Proteine kontinuierlich von den Zellen synthetisiert und abgegeben. Dementgegen steht die regulierte Sekretion, bei der die Abgabe erst durch bestimmte Stimuli induziert wird.

Zu den kontinuierlich sekretierten Proteinen gehören beispielsweise Kollagene, die permanent von Fibroblasten produziert werden. Ein klassisches Beispiel für ein reguliert sekretiertes Protein ist Insulin, das im Golgi-Apparat gespeichert wird und dessen Sekretion durch einen steigenden Blutzuckerspiegel induziert wird.

2.5.2 Der Signalpeptid abhängige Transport von Proteinen

Die Sekretion von Proteinen erfordert im Allgemeinen zunächst den Transport des Proteins in das Endoplasmatische Reticulum. Für die Erkennung und Translokation der Proteine sind spezielle Aminosäuresequenzen verantwortlich, sogenannte Signalpeptide. Diese hydrophoben, N-terminalen Sequenzen sind in der Regel zwischen 16 und 30 Aminosäuren lang und werden während der Translation durch zytosolische Ribosomen von dem SRP (*signal recognition particle*) erkannt^{85,106,131,145}. Das SRP bindet sowohl an die Signalsequenz als auch an die große ribosomale Untereinheit³¹⁸. Hierdurch wird die Translation der Proteine vorübergehend stark

verlangsamt oder ganz gestoppt^{162,308}. Der Komplex aus Ribosom, mRNA, wachsender Peptidkette und SRP bewegt sich daraufhin zur äußeren Membran des Endoplasmatischen Reticulums. Hier interagieren SRP und Ribosom mit dem SRP-Rezeptor, wobei die Bindung besonders stark ist, wenn sowohl das SRP als auch der SRP-Rezeptor in GTP-gebundener Form vorliegen¹⁸⁶. Das Ribosom und die wachsende Peptidkette werden nun schnell zu einer Art Kanal durch die ER-Membran, dem Translokon, transportiert³⁴⁰.

Durch die Bindung des SRPs an seinen Rezeptor und dem daraus entstehendem Pseudo-Dimer, wird die Hydrolyse der gebundenen GTPs ermöglicht, was die Ablösung des SRPs aus dem Komplex bewirkt¹⁰². Das Ribosom wiederum interagiert mit der Sec61alpha-Untereinheit des Translokons, welches noch aus der Sec61beta- und Sec61gamma-Untereinheit besteht²⁰. Die weitere Elongation der Peptidkette erfolgt dann durch das sogenannte Translokon direkt hinein ins Lumen des ERs^{217,316}. Bei den meisten sekretorischen Proteinen wird das Signalpeptid noch während der Translation durch das Ribosom abgespalten^{32,147}. Dafür ist eine transmembrane Signal-Peptidase verantwortlich, die bestimmte Aminosäuresequenzen detektiert und spezifisch schneidet^{219,301}.

Bei der Synthese hinein ins ER passieren lösliche Proteine die ER-Membran und gelangen somit ins Lumen des Endoplasmatischen Reticulums. Im Gegensatz dazu bleiben z.B. integrale Membranproteine zum Teil in der Membran des ERs verankert und ragen nur zum Stück ins Innere des ERs hinein^{199,271}. Außerdem können Proteine auch mehrmals die ER-Membran passieren, wie es beispielsweise bei den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Fall ist, die sieben Transmembranregionen aufweisen^{82,97}.

Im Inneren des Endoplasmatischen Reticulums werden die neu synthetisierten Proteine durch Chaperone, wie beispielsweise Calnexin, gefaltet, überprüft und gegebenenfalls modifiziert^{25,46,77}. Sekretorische Proteine werden anschließend in Vesikel verpackt vom ER abgegeben und zum Golgi-Apparat transportiert¹⁸⁰. Hier erfolgen weitere Proteinmodifikationen, wie beispielsweise Glykosylierung, und darüber hinaus dient der Golgi-Apparat als Speicher für sekretorische Proteine^{16,285}. Prozessierte Proteine werden vom Golgi-Apparat ebenfalls in Vesikeln abgeschnürt und abschließend zu ihrem finalen Bestimmungsort transportiert¹⁵⁵.

2.5.3 Transport und Sekretion von Vesikeln

Transportvesikel sind kleine, runde Bläschen, die von einer Doppelmembran umgeben sind. Sie entstehen durch Abschnürung von beispielsweise der ER- oder Golgi-Membran. Transportvesikel weisen verschiedene Oberflächenmoleküle auf, die entscheidend am

gerichteten Transport der Vesikel beteiligt sind. Als klassisches Beispiel wären hier COP I (*coat protein complex*) Vesikel, die den retrograden Transport von Proteinen vom Golgi-Apparat zum ER, und COP II Vesikel, die den anterograden Transport vom ER hin zum Golgi steuern, zu nennen. Transportvesikel interagieren über ihre Oberflächenmoleküle mit verschiedenen Adapter- und Transportproteinen, die die Vesikel entlang des Zytoskeletts an ihren Bestimmungsort bringen.

2.5.3.1 Rab-Proteine

Eine besondere Rolle im vesikulären Transport nimmt die Familie der Rab-Proteine (*Ras-related in brain*) ein, die zur Ras-Superfamilie monomerer G-Proteine gehört. Rab Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Vesikelabschnürung, dem Transport und dem Andocken an Zielmembranen. Rabs liegen in ihrer aktiven Form GTP-gebunden vor und sind membranständige Proteine, die ins Zytosol der Zellen hineinragen. Verschiedene regulatorische Proteine, wie beispielsweise GEFs (*guanine-exchange factor*), GAPs (*GTPase-activating proteins*), GDIs (*GDP-dissociation inhibitor*) und GDFs (*GDP-displacement factor*) können mit den Rab-Proteinen interagieren, ihre Aktivität beeinflussen und sogar den gerichteten Transport von Vesikeln steuern^{151,269,270,337}. Den größten Einfluss darauf haben allerdings die vielen verschiedenen Effektoren, mit denen die Rab-Proteine interagieren können^{101,286}. Sie ermöglichen zum einen die Fusion von Vesikeln mit ihrer Zielmembran²⁶⁰ und zum anderen sind sie aktiv an deren Transport beteiligt^{151,214}. Rab-Proteine können verschiedene Motorproteine rekrutieren und somit den vesikulären Transport entlang des Zytoskeletts regulieren. Der Transport kann dabei entlang des Aktin- als auch des Mikrotubuli-Netzwerks erfolgen, wobei der Großteil des intrazellulären Transports durch Mikrotubuli und die entsprechenden Motorproteine, Kinesin und Dynein, bewerkstelligt wird^{128,129,267,305}.

Im Menschen sind über 60 verschiedene Mitglieder der Rab-Familie bekannt³³⁷. Die einzelnen Rab-Proteine übernehmen verschiedenste Rollen beim intrazellulären Vesikeltransport und weisen sich durch eine Vielzahl an verschiedenen Effektoren aus. Dies ermöglicht den gezielten Transport von verschiedensten Vesikeln, was wiederum durch unterschiedliche Stimuli ausgelöst werden kann.

Rab 1 ist beispielsweise an der Abschnürung von COP II-Vesikeln und am Transport von Vesikeln vom ER zum Golgi-Apparat beteiligt⁴. Rab1 weist dabei eine Vielzahl von Interaktionspartnern auf, wie beispielsweise p115, GM130, Golgin-84, MICAL und Iporin^{19,114}. Rab 3 spielt eine wichtige Rolle bei Transport und Sekretion von synaptischen Vesikeln und interagiert mit Rabphilin-3²⁷⁴, Noc2¹⁸⁵ und Rim1³¹¹. Die Rolle von Rab3, bei der Ca²⁺-abhängigen Exozytose, scheint zumindest

teilweise auch von Rab 27 erfüllt zu werden²²², was darauf schließen lässt, dass verschiedene Rab-Proteine ähnliche Aufgaben erfüllen können. Als weiteres Beispiel konnte gezeigt werden, dass Rab 11 am basolateralen Transport von E-Cadherin beteiligt ist¹⁷⁹, allerdings auch eine entscheidende Rolle bei der Zell-Zell-Kommunikation während der Bewegung von Zellkollektiven hat und dazu unter anderem mit Moesin und Rac interagiert²³¹.

2.5.3.2 Weitere wichtige Moleküle für Transport und Sekretion von Vesikeln

Neben den bereits beschriebenen Rab-Proteinen (2.5.3.1) sind viele andere Proteine an dem intrazellulären Transport und der Sekretion von Vesikeln beteiligt. Von besonderer Bedeutung ist dabei der SNARE-Komplex, der die Vesikel- und Zellmembran nah aneinander bringt und dadurch deren Fusion ermöglicht²⁷⁸.

SNARE-Proteine (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*) bilden Komplexe in Membranen und katalysieren die Fusion von Vesikeln²⁷⁸. Dabei werden prinzipiell die v-SNAREs (*vesicle synaptosome-associated protein receptor*), auf der Vesikeloberfläche, von den t-SNAREs (*target synaptosome-associated protein receptor*) der Zielorganellen unterschieden. Die v-SNAREs bestehen aus VAMP-Proteinen (*Vesicle associated membrane proteins*), die auch als Synaptobrevine bezeichnet werden. Zu den t-SNAREs werden Syntaxine und SNAP-Proteine (*Synaptosomal associated proteins*) gezählt.

Für die Vesikelfusion mit der Zellmembran ist zudem eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration notwendig. Diese wird durch das Ca^{2+} -bindende Sensorprotein Synaptotagmin erkannt, welches beispielsweise mit SNAP-25 interagieren kann^{93,105,259,332}. Zudem wird Complexin für die Ca^{2+} -abhängige Fusion der Vesikel benötigt²³⁴.

Die Interaktion der verschiedenen Komplexe, insbesondere unter Beteiligung von VAMP, Synaptotagmin, Syntaxin und SNAP-25, der Vesikel und der Zellmembran ermöglicht eine gezielte Fusion der Membranen miteinander und reguliert die Exozytose von Proteinen^{225,248,249,303}.

3 Zielsetzung

MIA spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung, Extravasation und Metastasierung des malignen Melanoms. In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass MIA migrationsabhängig distal von Melanomzellen sezerniert wird und lokal an Zelladhäsionsmoleküle und verschiedene Komponenten der Extrazellulären Matrix (ECM) bindet. Dadurch fördert MIA, funktionell aktiv als Dimer, das Ablösen der Tumorzellen von der ECM und erhöht somit die Migration und Invasivität der Zellen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den gerichteten Transport von MIA zum distalen Zellpol genauer zu untersuchen und weitere Erkenntnisse über die Prozessierung des Proteins zu gewinnen. Im Rahmen dieser Dissertation sollte deshalb zunächst die intrazelluläre Lokalisation und die Sekretion von MIA in transient transfizierten HeLa- und HEK-Zellen, die keine endogene MIA-Expression aufweisen, untersucht werden. Des Weiteren sollte der Einfluss der Dimerisierung auf Transport, Sekretion und Lokalisation von MIA anhand einer nicht-dimerisierungsfähigen MIA-Mutante (MIA-G61R) analysiert werden. Die Rolle des Signalpeptids im Bezug auf die Sekretion und Lokalisation von MIA sollte darüber hinaus durch die Testung einer MIA-Mutante ohne Signalpeptid (MIA Δ sig), verschiedener MIA-Signalpeptid-Mutanten und einem chimären Protein bestehend aus dem maturen MIA-Protein und dem Signalpeptid von E-Cadherin (E-CAD-MIA) untersucht werden. Zusätzlich sollte die Prozessierung des Signalpeptids durch die Modulierung des intrazellulären Vesikeltransports, mittels siRNA-Technologie und den Einsatz verschiedener Inhibitoren, analysiert werden.

4 Ergebnisse

MIA spielt, wie bereits beschrieben, eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Metastasierung des malignen Melanoms. Es wird von Melanomzellen gebildet, migrationsabhängig in Vesikeln zum hinteren Zellpol transportiert und dort sekretiert²⁶³. Außerhalb der Zelle ist MIA als Dimer funktionell aktiv und kann Zell-Matrix-Kontakte inhibieren. Dadurch wird das Ablösen der Tumorzellen von der Extrazellulären Matrix gefördert und somit die Metastasierung des malignen Melanoms begünstigt^{45,265}. Der genaue Mechanismus des vesikulären Transports und der Sekretion von MIA ist allerdings bisher noch nicht hinreichend untersucht worden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb einerseits der Einfluss der Dimerisierung und andererseits des Signalpeptids auf diese grundlegenden Prozesse untersucht.

4.1 Analyse der Sekretion und des Transports von MIA in HeLa- und HEK-Zellen

In dieser Dissertation wurde der Transport und die Sekretion von MIA in zwei Zelllinien (HeLa, HEK293), die keine endogene MIA-Expression aufweisen, untersucht. Dazu wurden die Zellen transient mit einem MIA-Expressionskonstrukt transfiziert und anschließend mittels Western Blot, ELISA und Immunfluoreszenz analysiert. Dadurch sollte zum einen geklärt werden, ob der Transport und die gerichtete Sekretion von MIA auch in Nicht-Melanomzellen möglich ist und zum anderen, ob sich diese Zellen als Modellsystem für weitere Untersuchungen anbieten, die nicht von einer endogenen Expression des Proteins beeinflusst werden.

4.1.1 Analyse der Sekretion von MIA in HeLa- und HEK-Zellen

Um zu überprüfen, ob MIA von HeLa- und HEK-Zellen sekretiert werden kann, wurden die entsprechenden Zellen transient mit dem Leervektor pCMX-PL1 (Kontrolle) bzw. dem MIA-Expressionskonstrukt pCMX-PL1-MIA (MIA) transfiziert. Nach 24 Stunden wurde der Zellkulturüberstand gesammelt und via spezifischem ELISA der MIA-Gehalt quantifiziert. Zusätzlich wurden der Überstand und das Gesamtproteinextrakt durch Western Blot auf das Vorhandensein von MIA geprüft.

Die Western Blot Analyse zeigt nach transients Transfektion mit pCMX-PL1-MIA eine deutliche Expression von MIA sowohl in HEK- als auch in HeLa-Zellen, wohingegen in unbehandelten und Kontroll-transfizierten Zellen kein MIA zu finden ist (Abbildung 4). Im Gesamtproteinextrakt der MIA-exprimierenden Zellen lassen sich zwei spezifische Banden detektieren. Neben der maturen

Form des Proteins (MIA) mit einer absoluten Molekülmasse von etwa 11 kDa tritt eine weitere Bande bei etwa 16 kDa auf (MIA*).

Im Zellkulturüberstand ist MIA ebenfalls nur nach Transfektion mit pCMX-PL1-MIA zu finden. Hier tritt, im Gegensatz zum Gesamtproteinextrakt, allerdings nur die mature Form des Proteins auf (Abbildung 4).

Um die Sekretion von MIA zu verifizieren, wurde der Zellkulturüberstand transient transfizierter HEK- und HeLa-Zellen zusätzlich durch einen spezifischen ELISA quantifiziert (Abbildung 5). Die Analyse zeigt, dass sich im Überstand von Kontroll-transfizierten Zellen kein MIA befindet. Dahingegen weisen HEK-Zellen 24 Stunden nach Transfektion mit pCMX-PL1-MIA einen MIA-Gehalt von etwa 75 ng/ml und HeLa-Zellen von ca. 100 ng/ml auf.

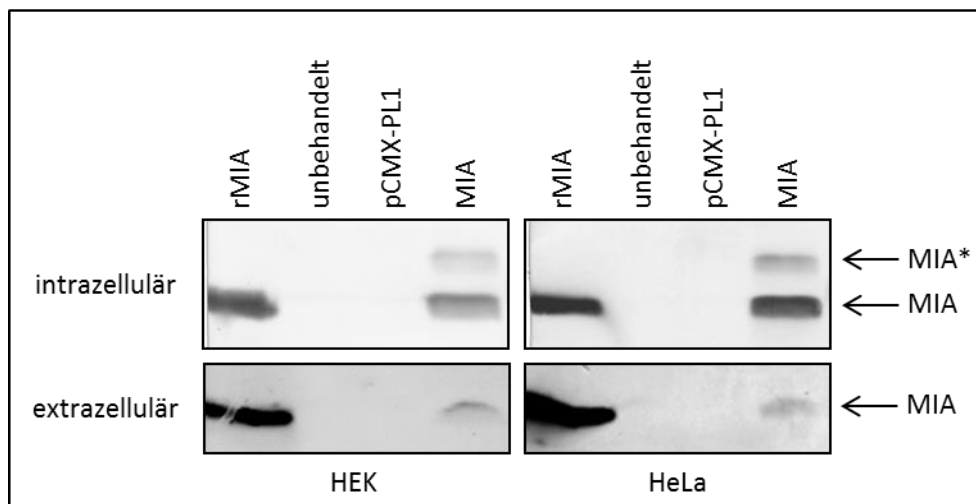


Abbildung 4: Western Blot Analyse transfizierter HEK- und HeLa-Zellen. MIA Protein wurde im Gesamtproteinextrakt (intrazellulär) bzw. Zellkulturüberstand (extrazellulär) von HEK- und HeLa-Zellen, die transient mit pCMX-PL1 (Kontrolle) oder pCMX-PL1-MIA transfiziert wurden, mittels Western Blot nachgewiesen. Unbehandelte bzw. Kontroll-transfizierte Zellen weisen weder intra- noch extrazellulär MIA auf. Nach Überexpression von MIA tritt intrazellulär, neben der maturen MIA-Form (MIA), eine zweite spezifische, größere Bande (MIA*) auf. Zudem ist MIA im Zellkulturüberstand von HEK- und HeLa-Zellen vorhanden. Als Ladekontrolle wurden 35 ng rekombinantes MIA (rMIA) aufgetragen.

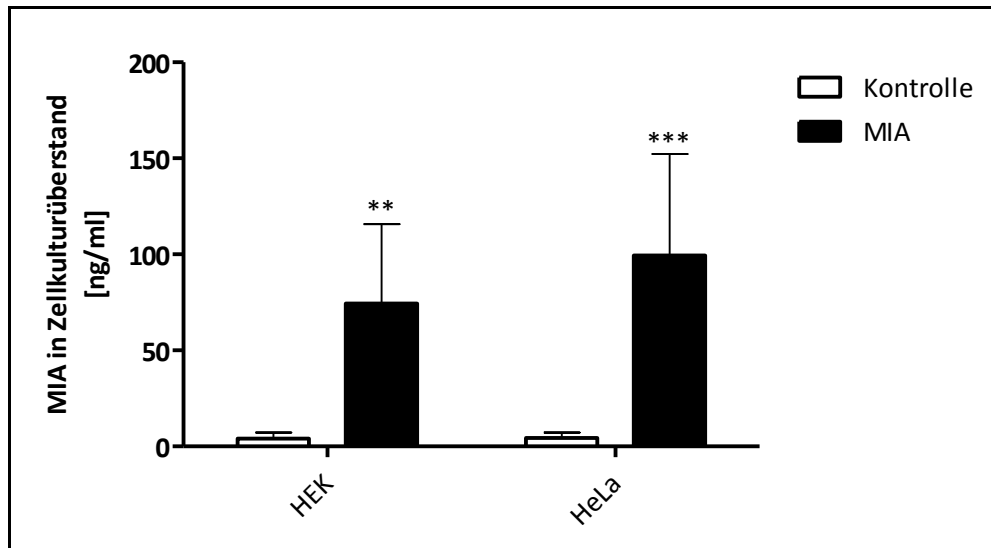


Abbildung 5: MIA-ELISA transfizierter HEK- und HeLa-Zellen. Die MIA-Konzentration im Zellkulturüberstand von HEK- und HeLa-Zellen, die für 24 Stunden mit pCMX-PL1 (Kontrolle) oder pCMX-PL1-MIA transfiziert wurden, wurde mittels spezifischem MIA-ELISA quantifiziert. Kontroll-transfizierte Zellen weisen kein MIA im Überstand auf, wohingegen Überstände von HEK- und HeLa-Zellen, die transient mit pCMX-PL1-MIA transfiziert wurden, MIA enthalten (Mittelwert \pm SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.1.2 Lokalisation von MIA

Die zelluläre Lokalisation von MIA wurde in zwei verschiedenen Systemen untersucht. Zunächst wurde das Verteilungsmuster von GFP-markiertem (grün fluoreszierendes Protein) MIA in Mel Im-Zellen analysiert (4.1.2.1). Zusätzlich wurde überprüft, ob MIA auch in HeLa-Zellen migrationsabhängig distal lokalisiert (4.1.2.2).

4.1.2.1 Lokalisation von MIA mit C-terminaler GFP-Markierung

Zur Visualisierung der intrazellulären Lokalisation von MIA wurde ein bereits vorhandenes MIA-Expressionskonstrukt mit C-terminaler GFP-Markierung (MIA-GFP) verwendet. Für die Analyse mittels Immunfluoreszenz wurden Mel Im-Zellen transient mit MIA-GFP transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert, mit DAPI eingedeckelt und anschließend die Lokalisation von MIA-GFP mittels Immunfluoreszenz untersucht.

Die Analyse der intrazellulären Lokalisation zeigt eine Akkumulation von MIA-GFP um den Zellkern bzw. im Endoplasmatischen Reticulum (Abbildung 6). Auf eine Verwendung des MIA-GFP Expressionskonstrukts für weitere Untersuchungen wurde aufgrund der Akkumulation des Proteins im Endoplasmatischen Reticulum verzichtet. Nachfolgende Lokalisationsstudien (4.1.2.2, 4.2.2, 4.3.2, 4.4.3 und 4.5.2) wurden deshalb mit nicht GFP-markiertem MIA durchgeführt, wobei der Nachweis über spezifische Antikörper erfolgte.

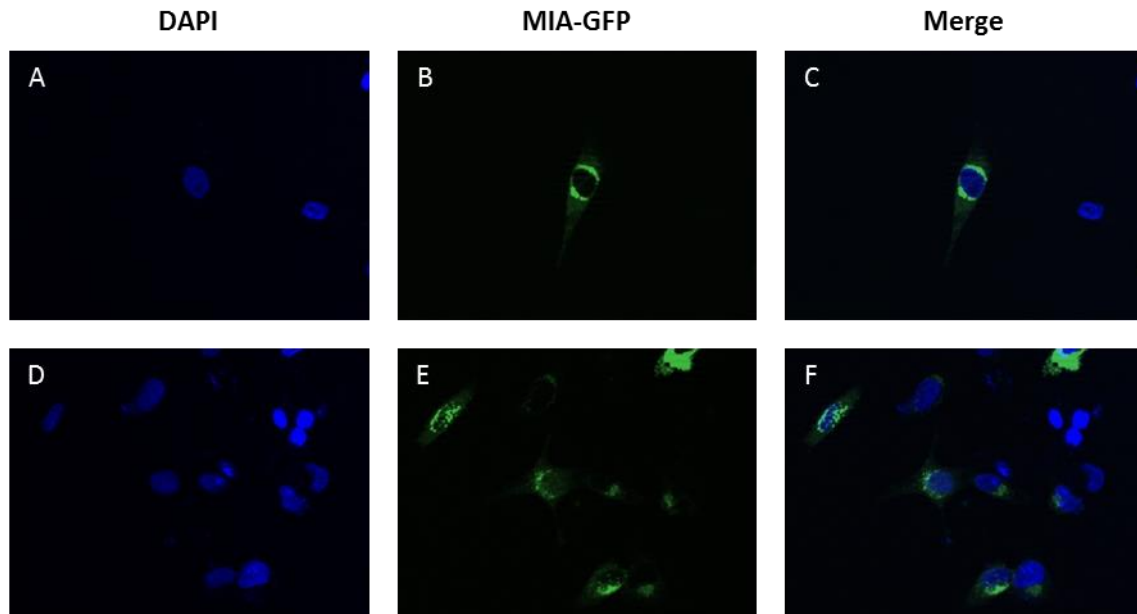


Abbildung 6: Immunfluoreszenz zur Analyse der intrazellulären Lokalisation von MIA-GFP. Um die intrazelluläre Lokalisation von MIA mit C-terminaler GFP-Markierung zu untersuchen wurden Mel Im-Zellen für 24 Stunden mit dem MIA-GFP-Konstrukt transfiziert. In der Immunfluoreszenz-Analyse sind die Zellkerne (A, D) sowie MIA-GFP (B, E) dargestellt. Die Analyse zeigt eine deutliche Akkumulation von MIA-GFP um den Zellkern bzw. im Endoplasmatischen Reticulum (C, F). Vergrößerung 40x.

4.1.2.2 Lokalisation von MIA – Immunfluoreszenz mit Antikörpernachweis

In diesem Abschnitt der Arbeit wurde die intrazelluläre Lokalisation von MIA in HeLa-Zellen untersucht. Die Verwendung dieses Systems hat wie bereits erwähnt den Vorteil, dass Lokalisationsvergleiche zwischen Wildtyp MIA und verschiedenen Mutanten möglich werden, die nicht durch die endogene Expression des Proteins beeinflusst werden. Zur Untersuchung der Lokalisation wurden HeLa-Zellen für 24 Stunden mit pCMX-PL1-MIA und einem Golgi-GFP Expressionskonstrukt (Endomannosidase) ko-transfiziert (6.2.4.3). Durch die Markierung des Golgi-Apparates kann die Orientierung der Zellen bestimmt werden, da sich der Komplex während der Migration hauptsächlich vor dem Zellkern befindet²²¹. Dahingegen liegt der Golgi-Apparat in ruhenden Zellen nicht lokalisiert vor.

In nicht migrierenden Zellen ist MIA ubiquitär im Zytosol vorzufinden und orientiert sich nicht in eine bestimmte Richtung (Abbildung 7 A – C). In migrierenden Zellen verlagert sich MIA dahingegen und akkumuliert am hinteren Zellpol (Abbildung 7 D – F), wie es bereits für Melanomzellen beschrieben wurde²⁶³.

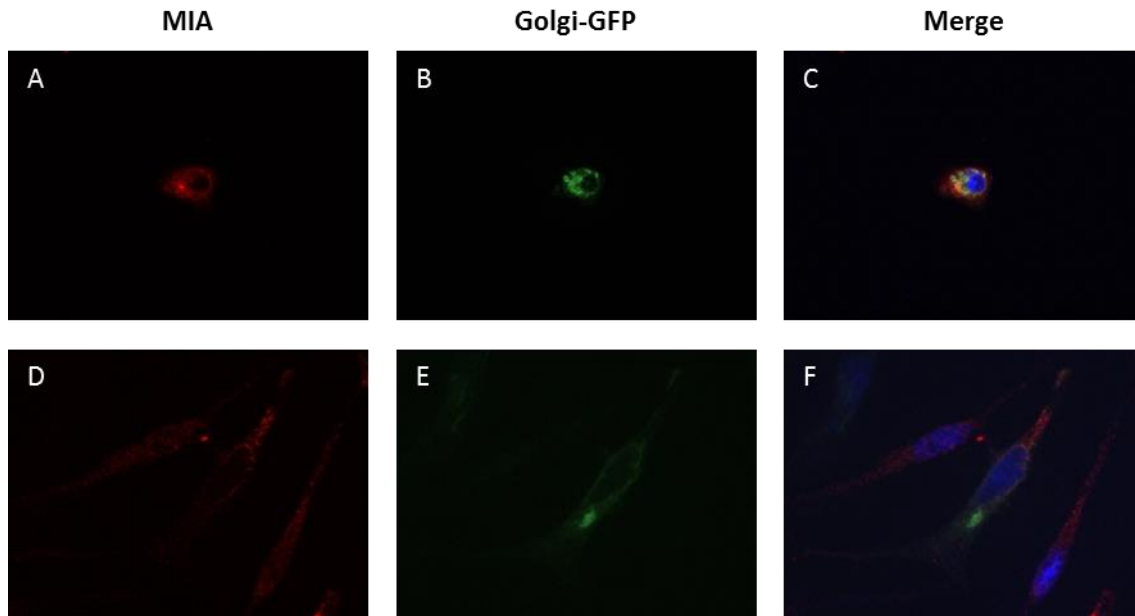


Abbildung 7: Immunfluoreszenz zur Analyse der intrazellulären Lokalisation von MIA. Um die intrazelluläre Lokalisation von MIA zu untersuchen wurden HeLa-Zellen mit pCMX-PL1-MIA und einem Golgi-GFP-Konstrukt ko-transfiziert. Zellkerne sind mit DAPI gefärbt (blau). Die Detektion von MIA erfolgte über den spezifischen primären Antikörper anti-MIA 7638 III und den sekundären Alexa Flour 594 goat anti-rabbit Antikörper (A, D). Die Analyse zeigt eine gleichmäßige Verteilung von MIA in ruhenden Zellen (A – C) und Akkumulation von MIA am distalen Zellpol in migrierenden Zellen (D – F). Vergrößerung: A – C 40x, D – F 63x.

4.1.3 Identifizierung von MIA*

Im Rahmen dieser Promotion wurde in Western Blot Analysen eine MIA-Bande (MIA*) mit einem Molekulargewicht von etwa 16 kDa detektiert (4.1.1; Abbildung 4). Um die genaue Identität des Proteins zu bestimmen, wurde zunächst MIA mittels eines Zentrifugationsassays angereichert (Abbildung 8; 6.2.3.7) und anschließend eine Immunpräzipitation mit spezifischem MIA-Antikörper durchgeführt (6.2.3.8). Die verschiedenen Präzipitate wurden erneut mittels SDS-PAGE aufgetrennt, durch Silberfärbung visualisiert (6.2.3.4), aus den Gelen ausgeschnitten und mittels LC-MS analysiert (6.2.3.10).

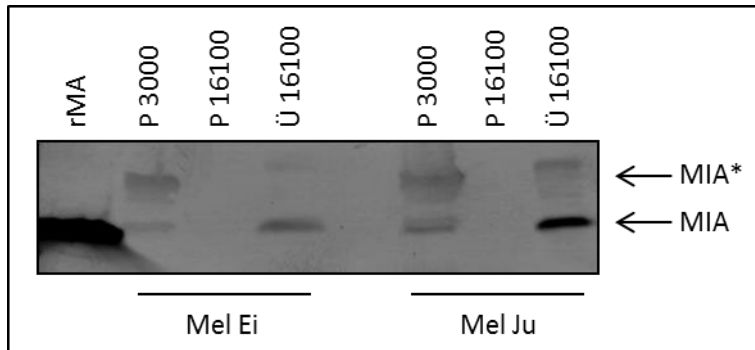


Abbildung 8: Western Blot nach Anreicherung von MIA mittels Zentrifugationsassay. 1×10^7 Mel Ei bzw. Mel Ju Zellen pro Milliliter PBS wurden mit 2 μ l Digitonin pro Million Zellen lysiert und anschließend durch mehrere aufeinander folgende Zentrifugationsschritte getrennt. Während MIA hauptsächlich im Überstand der Zentrifugation mit 16100 g akkumuliert, reichert sich MIA* zum Großteil im Pellet der Zentrifugation mit 3000 g an. Als Ladekontrolle wurden 35 ng rekombinantes MIA (rMIA) aufgetragen. (P 3000 = Pellet 3000 g; P 16100 = Pellet 16100 g; Ü 16100 = Überstand 16100 g).

In Abbildung 8 ist eine Anreicherung der größeren MIA-Bande (MIA*) in der Fraktion P 3000 sowohl in Mel Ei als auch in Mel Ju zu erkennen, wohingegen MIA zum Großteil im Überstand der Zentrifugation mit 16100 g akkumuliert.

Die Fraktion P 3000 wurde mittels Immunpräzipitation, mit spezifischem MIA-Antikörper, weiter aufgereinigt. Das Präzipitat wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel anschließend silbergefärbt. Die MIA*-Bande wurde aus den silbergefärbten SDS-Gelen (Abbildung 9) ausgeschnitten und via LC-MS (*Liquid chromatography-mass spectrometry*) durch Dr. Jörg Reinders (AG Oefner) untersucht. Es konnte das Peptidfragment GQVVYVFSK (MIA Position 65 – 75) identifiziert werden.

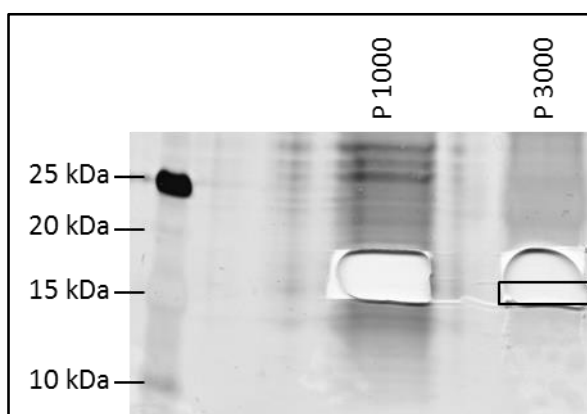


Abbildung 9: Silbergel zur Identifizierung von MIA*. Nach der Anreicherung von MIA mittels Zentrifugationsassay wurden die Fraktionen P 1000 und P 3000 mittels Immunpräzipitation weiter aufgereinigt und die Proteine erneut durch SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend silbergefärbt, die markierte Bande ausgeschnitten und mittels LC-MS analysiert.

4.2 Einfluss der Dimerisierung auf die Sekretion von MIA

In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass MIA in der Lage ist Dimere zu bilden und die Dimerisierung direkt die Funktionalität des Proteins beeinflusst²⁶⁵. Im Rahmen dieser Dissertation wurde untersucht, ob die Dimerisierung auch einen Einfluss auf den Transport bzw. die Sekretion von MIA hat. Dazu wurde mittels gezielter Mutagenese eine nicht dimerisierende MIA-Mutante (MIA-G61R) kloniert und anschließend charakterisiert.

4.2.1 Analyse der Sekretion von MIA-G61R

Um den Einfluss der Dimerisierung auf Transport und Sekretion zu untersuchen, wurden HeLa-, HEK-, und Mel Ei-Zellen transient mit pCMX-PL1 (Kontrolle), pCMX-PL1-MIA (MIA) oder pCMX-PL1-MIA-G61R (MIA-G61R) transfiziert. Nach 24 Stunden wurde der Zellkulturüberstand gesammelt, die Zellen geerntet und das Gesamtproteinextrakt sowie die RNA isoliert. Die Expression von MIA und MIA-G61R wurde via qRT-PCR untersucht (Abbildung 10). Nach Transfektion mit MIA bzw. MIA-G61R steigt die Expression in allen untersuchten Zelllinien an. In HeLa-Zellen ist MIA etwa 50000- und MIA-G61R knapp 90000-fach im Vergleich zur Kontrolle überexprimiert. In HEK-Zellen ist MIA etwa 15000-fach und MIA-G61R ca. 40000-fach erhöht. In Mel Ei-Zellen, die bereits endogen MIA exprimieren, steigt die Expression von MIA, im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen, um etwa das 35-fache und von MIA-G61R um das 44-fache an.

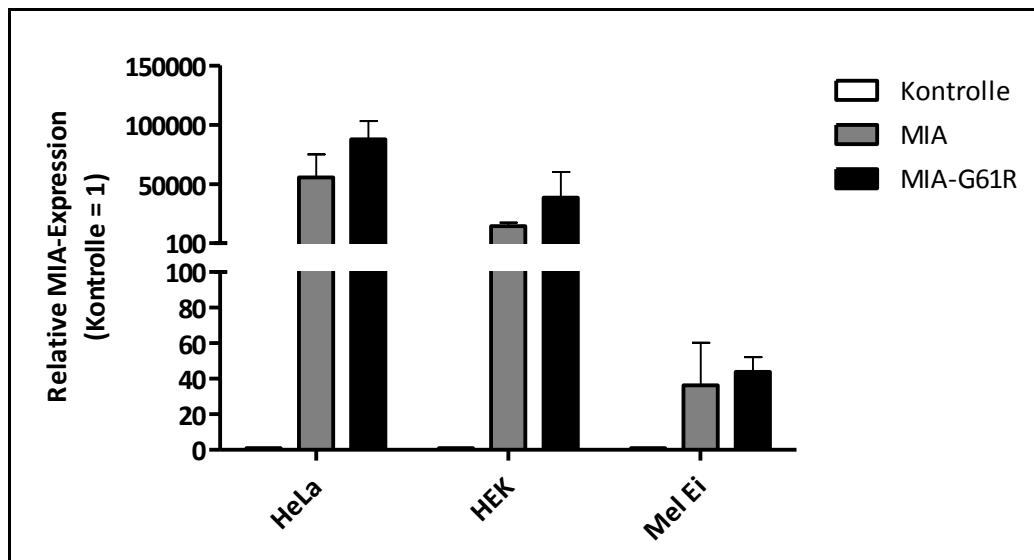


Abbildung 10: Relative Expression von MIA und MIA-G61R. HeLa-, HEK- und Mel Ei-Zellen wurden transient mit pCMX-PL1 (Kontrolle), pCMX-PL1-MIA oder MIA-G61R transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und anschließend die relative MIA-Expression mittels qRT-PCR bestimmt (Mittelwert \pm SD).

Die Expression von MIA und MIA-G61R wurde zusätzlich mittels Western Blot analysiert (Abbildung 11). HeLa- und HEK-Zellen weisen im Gegensatz zu Mel Ei-Zellen keine endogene

Expression von MIA auf, sodass weder im Gesamtproteinextrakt (intrazellulär) noch im Zellkulturüberstand (extrazellulär) Kontroll-transfizierter Zellen MIA nachweisbar ist. Mel Ei-Zellen exprimieren dementsgegen bereits MIA, welches sowohl intra- als auch extrazellulär mittels Western Blot detektiert werden kann. Nach Transfektion mit MIA bzw. MIA-G61R kann in allen drei Zelllinien MIA intra- als auch extrazellulär nachgewiesen werden.

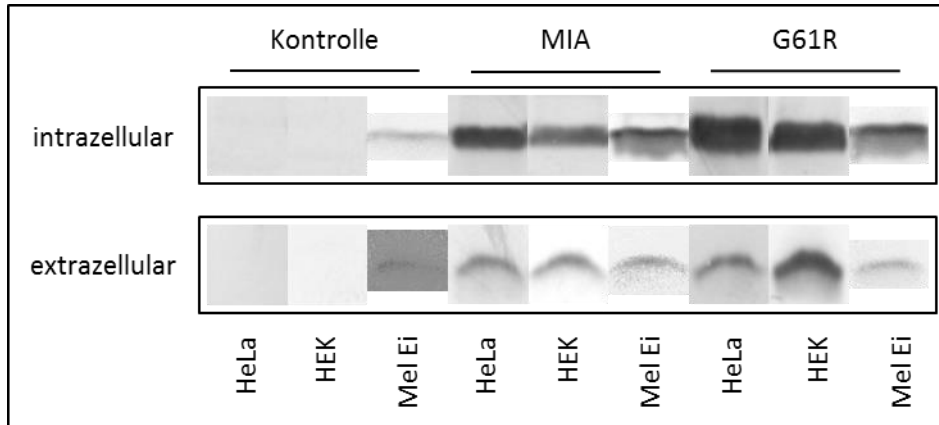


Abbildung 11: Western Blot-Analyse transient transfizierter HeLa- und HEK-Zellen. HeLa- bzw. HEK-Zellen wurden mit pCMX-PL1 (Kontrolle), pCMX-PL1-MIA (MIA) oder pCMX-PL1-MIA-G61R (G61R) transfiziert und anschließend das Gesamtproteinextrakt (intrazellulär) bzw. der Zellkulturüberstand (extrazellulär) mittels Western Blot analysiert.

Die Sekretion von MIA wurde neben der Analyse der Zellkulturüberstände via Western Blot zusätzlich noch mittels spezifischem MIA-ELISA quantifiziert (Abbildung 12). Während HeLa- und HEK-Zellen, die mit pCMX-PL1 (Kontrolle) transfiziert wurden, kein MIA sekretieren, weisen Mel Ei-Zellen bereits etwa 20 ng/ml MIA im Überstand auf. Nach Transfektion mit pCMX-PL1-MIA steigt der MIA-Gehalt im Überstand von HeLa-Zellen auf etwa 100 ng/ml und nach Transfektion mit MIA-G61R auf fast 400 ng/ml. In HEK-Zellen ist die Sekretion von MIA-G61R mit ca. 250 ng/ml ebenfalls im Vergleich zu MIA mit rund 75 ng/ml erhöht. Im Überstand von Mel Ei-Zellen liegt die MIA-Konzentration nach Transfektion bei über 40 ng/ml (MIA) bzw. 80 ng/ml (MIA-G61R).

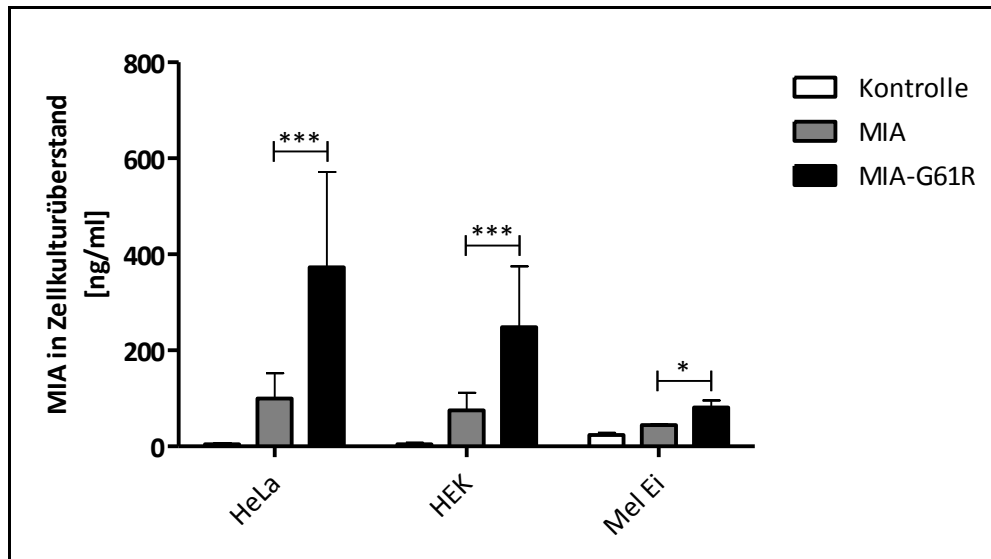


Abbildung 12: MIA-ELISA zur Quantifizierung der MIA-Sekretion. HeLa-, HEK- und Mel Ei-Zellen wurden transient mit pCMX-PL1 (Kontrolle), pCMX-PL1-MIA (MIA) oder pCMX-PL1-MIA-G61R (MIA-G61R) transfiziert und nach 24 Stunden der Zellkulturüberstand mittels spezifischem MIA-ELISA analysiert (Mittelwert \pm SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Da die Sekretion von MIA selbstverständlich direkt mit der Expression des Proteins zusammenhängt, wurde neben der absoluten Quantifizierung des Zellkulturüberstandes auch die relative Sekretion von MIA berechnet. Hierzu wurde einerseits die MIA-Konzentration der Überstände mit dem mRNA-Level der Zellen (Abbildung 13) und andererseits die sekretierte Menge von MIA, detektiert mittels Western Blot, densitometrisch mit dem intrazellulären MIA-Gehalt verglichen (Abbildung 14).

Unter Berücksichtigung des mRNA-Levels wird MIA-G61R in allen untersuchten Zelllinien stärker als Wildtyp MIA sekretiert. Während von HEK- und Mel Ei-Zellen etwa doppelt so viel MIA-G61R wie MIA abgegeben wird, ist die relative Sekretion von HeLa-Zellen sogar noch größer. Diese sekretieren ca. dreimal so viel MIA-G61R wie wtMIA (Abbildung 13).

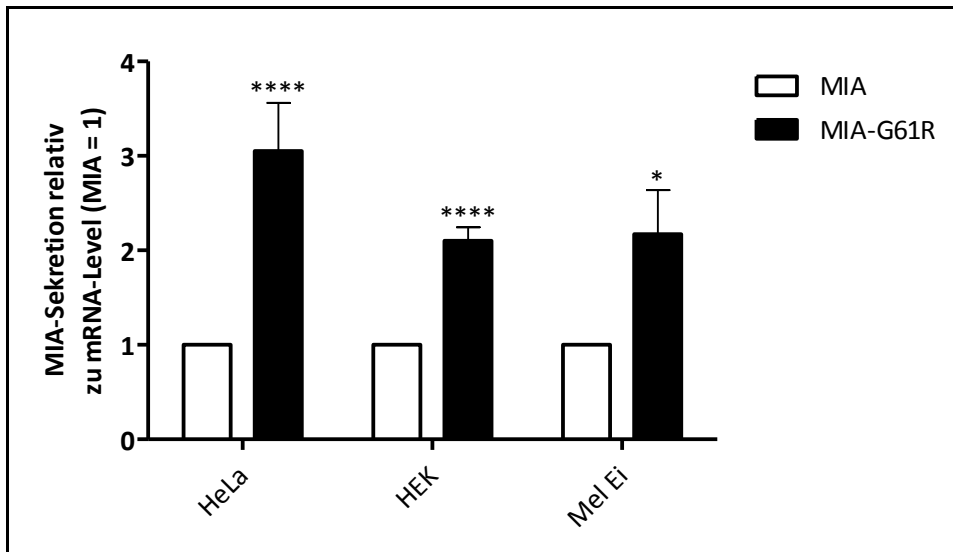


Abbildung 13: MIA-Sekretion relativ zu mRNA-Level. Um die relative Sekretion von MIA-G61R zu ermitteln wurden HeLa-, HEK- und Mel Ei-Zellen transient mit pCMX-PL1-MIA (MIA) oder pCMX-PL1-MIA-G61R (MIA-G61R) transfiziert. Nach 24 Stunden wurde die MIA-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA gemessen und die relative MIA-Expression via qRT-PCR bestimmt. Um die relative Sekretion von MIA zu definieren, wurde die MIA-Konzentration der Zellkulturüberstände in Abhängigkeit des mRNA-Levels bestimmt (Mittelwert \pm SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Der densitometrische Vergleich zwischen MIA im Gesamtproteinextrakt und Zellkulturüberstand aus Western Blot Analysen zeigt ebenfalls eine erhöhte Sekretion von MIA-G61R im Vergleich zu wtMIA. Während die Sekretion von MIA-G61R relativ zu wtMIA in HEK-Zellen allerdings nur noch um den Faktor 1,5 erhöht ist, bleibt sie in Mel Ei-Zellen etwa doppelt so hoch. Die relative Sekretion von MIA-G61R ist in HeLa-Zellen am größten. Diese Zellen sekretieren etwa viermal so viel MIA-G61R wie wtMIA (Abbildung 14).

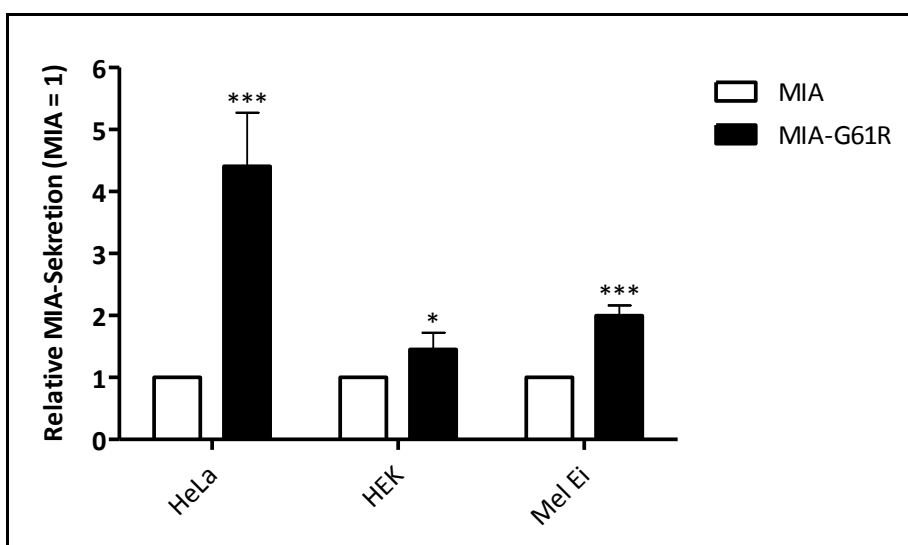


Abbildung 14: Relative Sekretion von MIA. Der densitometrische Vergleich von intra- und extrazellulärem MIA auf Western Blot Analysen wurde mit dem Programm ImageJ® durchgeführt (Mittelwert \pm SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.2.2 Lokalisation von MIA-G61R

Nachdem der Einfluss der Dimerisierung von MIA auf die Sekretion des Proteins untersucht wurde (4.2.1), wurde im Weiteren analysiert, ob die Dimerisierung auch eine Rolle beim gerichteten Transport und somit der intrazellulären Lokalisation von MIA spielt.

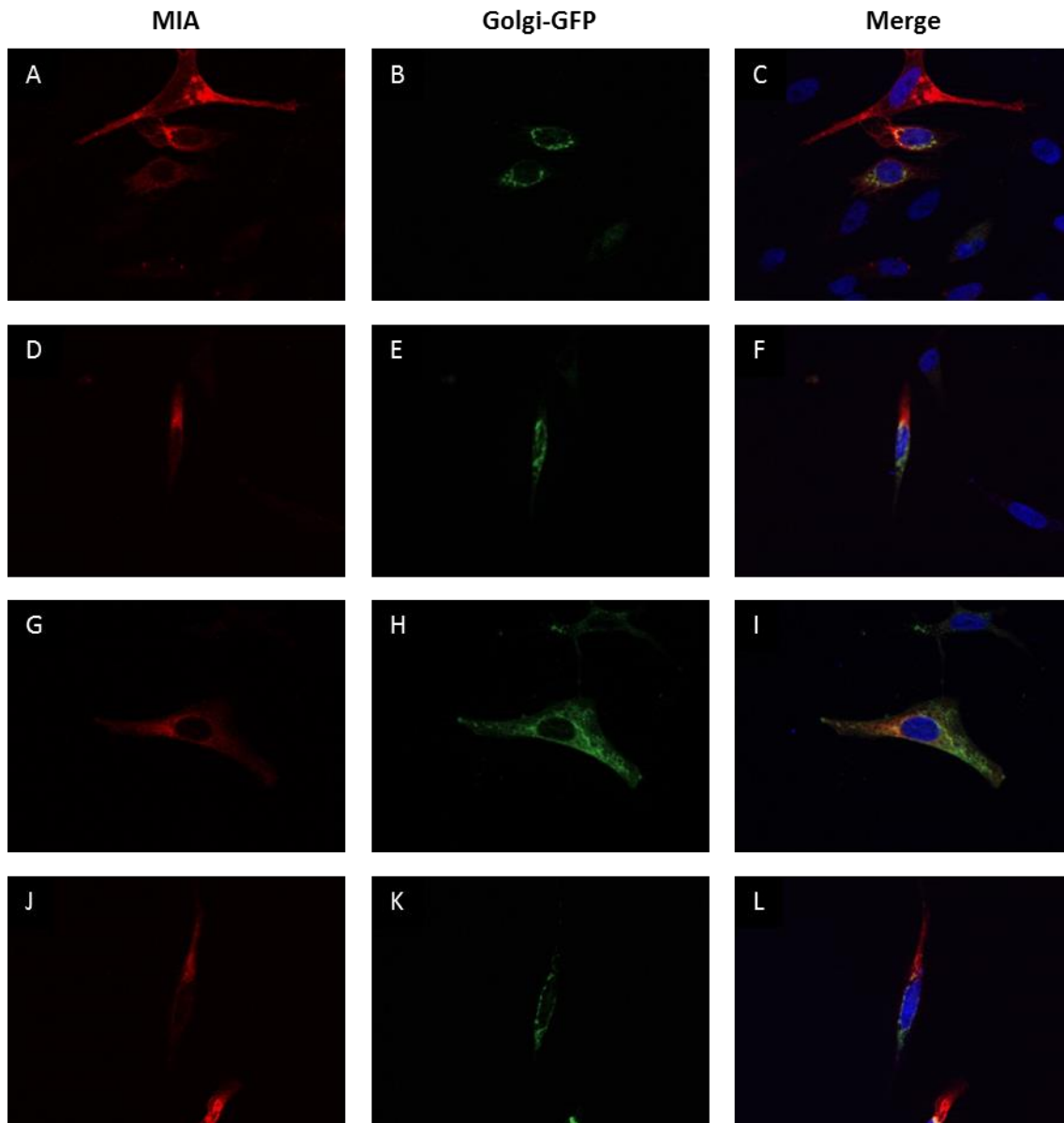


Abbildung 15: Immunfluoreszenz zur Analyse der intrazellulären Lokalisation von MIA und MIA-G61R. HeLa-Zellen wurden für 24 Stunden transient mit MIA (A – F) oder MIA-G61R (G – L) und einem Golgi-GFP-Konstrukt ko-transfiziert. Zellkerne sind mit DAPI gefärbt (blau). Die Detektion von MIA (rot) erfolgte über den spezifischen primären Antikörper anti-MIA 7638 III und den sekundären Antikörper Alexa Flour 594 goat anti-rabbit (A, D, G, J). Der Golgi-Apparat (grün) ist in ruhenden Zellen (B, H) gleichmäßig verteilt und lagert sich in migrierenden Zellen (E, K) vor dem Zellkern in Migrationsrichtung an. Die Analyse zeigt eine gleichmäßige Verteilung von MIA und MIA-G61R in ruhenden Zellen (C, I) und eine Akkumulation von MIA und MIA-G61R am distalen Zellpol von migrierenden Zellen (F, L). Vergrößerung 40x.

Für die Analyse wurden HeLa-Zellen transient mit pCMX-PL1-MIA oder der nicht dimerisierungsfähigen MIA-G61R-Mutante und einem Golgi-GFP-Konstrukt ko-transfiziert und anschließend via Immunfluoreszenz visualisiert (Abbildung 15). Der Vergleich der intrazellulären Lokalisation von MIA zeigt, dass sowohl Wildtyp MIA als auch das dimerisierungsunfähige MIA-G61R in ruhenden Zellen homogen im Zytosol der Zellen verteilt sind (Abbildung 15, C und I). In migrierenden Zellen hingegen akkumulieren beide Varianten am hinteren Zellpol (Abbildung 15, F und L).

Der genaue Vergleich der Lokalisation von MIA und MIA-G61R in migrierenden HeLa-Zellen erfolgte mit Hilfe des Programms ImageJ®. Für die Analyse wurde der hintere Zellteil in drei gleichgroße Bereiche (Abbildung 16) unterteilt: nah am Zellkern (proximal), der Bereich in der Mitte (medial) und der Bereich ganz am Ende der Zelle (distal). Der Vergleich zwischen MIA und MIA-G61R zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied in der intrazellulären Lokalisation der Proteine gibt. Etwa 40 % liegen jeweils im Drittel nahe des Zellkerns bzw. im mittleren Bereich vor und nur 20 % von MIA befinden sich am distalen Zellpol (Abbildung 17).

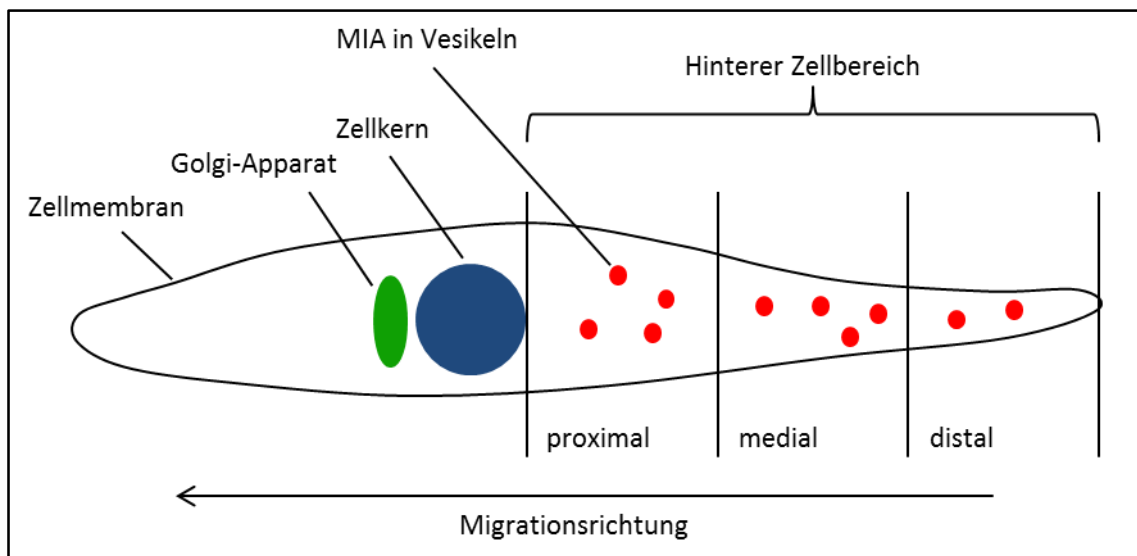


Abbildung 16: Schematische Darstellung einer migrierenden Zelle. Für die Analyse der zellulären Verteilung von MIA wurde der hintere Teil migrierender Zellen in drei gleichgroße Bereiche unterteilt (proximal, medial, distal).

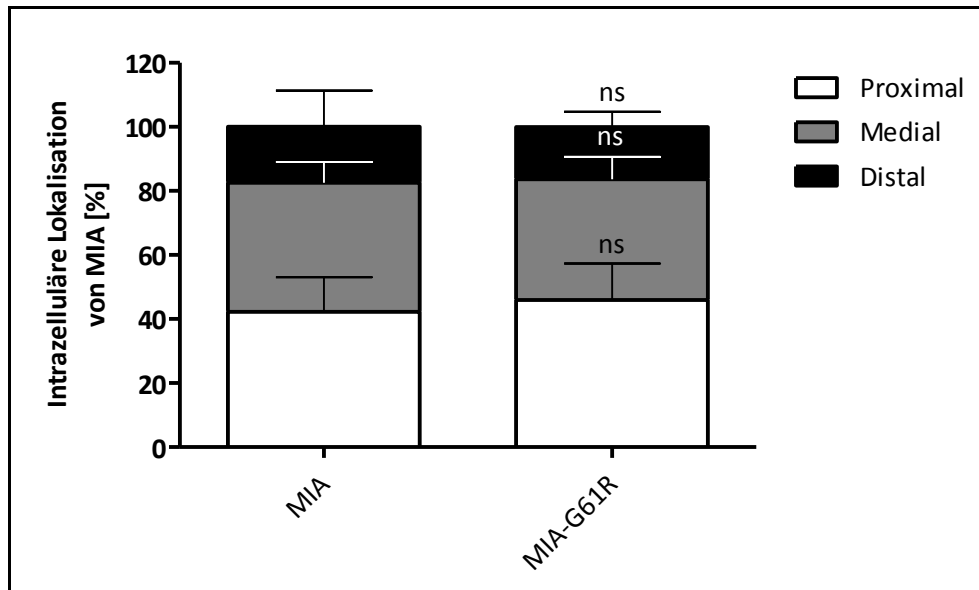


Abbildung 17: Intrazelluläre Lokalisation von MIA bzw. MIA-G61R. Die intrazelluläre Lokalisation von MIA wurde in HeLa-Zellen, die transient mit MIA oder MIA-G61R transfiziert wurden, mit Hilfe des Programms ImageJ® ausgewertet (Mittelwert \pm SD; ns = nicht signifikant).

4.3 Einfluss des Signalpeptids auf die Sekretion von MIA

4.3.1 Analyse der Sekretion von MIA ohne Signalpeptid

Die Abhängigkeit der Sekretion MIAs vom Signalpeptid wurde durch die Klonierung und Analyse eines MIA-Expressionskonstrukt ohne Signalpeptid (MIA Δ sig) getestet. Für die Untersuchung wurden HeLa-, HEK- und Mel Ei-Zellen transient mit pCMX-PL1-MIA bzw. pCMX-PL1-MIA Δ sig transfiziert. Nach 24 Stunden wurde der Zellkulturüberstand gesammelt und via MIA-ELISA und Western Blot analysiert. Zudem wurde aus den Zellen die RNA zur Bestimmung des mRNA-Levels via qRT-PC und das Gesamtproteinlysate zur Untersuchung der Proteinexpression isoliert.

Die Analyse im LightCycler 480 zeigt, dass MIA und MIA Δ sig in allen drei transfizierten Zelllinien exprimiert wird (Abbildung 18). In HeLa-Zellen ist die relative Expression von MIA etwa um 1×10^5 und von MIA Δ sig ca. um $1,5 \times 10^5$ im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen erhöht. In HEK-Zellen steigt die Expression um etwa das 50000- (MIA) bzw. 85000-fache (MIA Δ sig) an. Die relative Expression in transfizierten Mel Ei Zellen nimmt um den Faktor 23 (MIA) bzw. 12 (MIA Δ sig) zu.

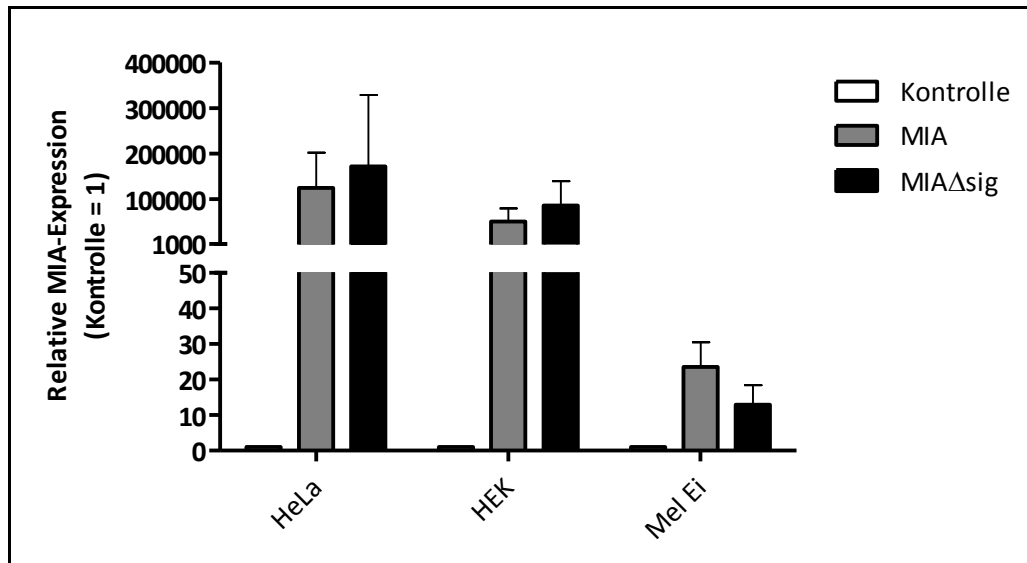


Abbildung 18: Relative Expression von MIA bzw. MIA Δ sig. HeLa-, HEK- und Mel Ei-Zellen wurden transient mit pCMX-PL1 (Kontrolle), pCMX-PL1-MIA oder pCMX-PL1-MIA Δ sig transfiziert. Nach 24 Stunden wurde die RNA isoliert und die relative Expression von MIA mittels qRT-PCR analysiert (Mittelwert \pm SD).

Die Untersuchung des Gesamtproteinextrakts mittels Western Blot bestätigt, dass sowohl MIA als auch MIA Δ sig nach Transfektion von allen Zelllinien exprimiert wird (Abbildung 17). In den entsprechenden Zellkulturüberständen kann allerdings nur Wildtyp MIA detektiert werden, MIA Δ sig ist nicht zu finden. Die einzige Ausnahme stellen Mel Ei-Zellen dar, die bereits eine gewisse Menge an MIA endogen produzieren und somit hier auch in Kontroll- bzw. MIA Δ sig-transfizierten Zellen eine geringe Menge MIA im Zellkulturüberstand zu finden ist.

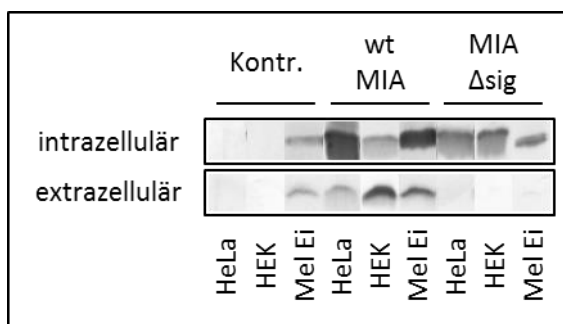


Abbildung 19: Western Blot Analyse. HeLa-, HEK- und Mel Ei-Zellen wurden transient mit pCMX-PL1 (Kontrolle), pCMX-PL1-MIA oder pCMX-PL1-MIA Δ sig transfiziert. Nach 24 Stunden wurden das Gesamtproteinextrakt (intrazellulär) bzw. der Zellkulturüberstand (extrazellulär) mittels Western Blot analysiert.

Die zusätzliche Analyse der Zellkulturüberstände durch spezifischen MIA-ELISA bestätigt, dass MIA ohne Signalpeptid nicht von den Zellen sekretiert wird (Abbildung 20). Während nach Transfektion mit pCMX-PL1-MIA die MIA-Konzentration im Überstand signifikant auf ca. 40 ng/ml von HeLa- und Mel Ei-Zellen bzw. auf etwa 60 ng/ml von HEK-Zellen steigt, bleibt die MIA-

Konzentration nach Transfektion mit pCMX-PL1-MIA Δ sig in allen drei Zelllinien konstant auf dem Niveau von Zellen, die mit dem Leervektor pCMX-PL1 transfiziert wurden.

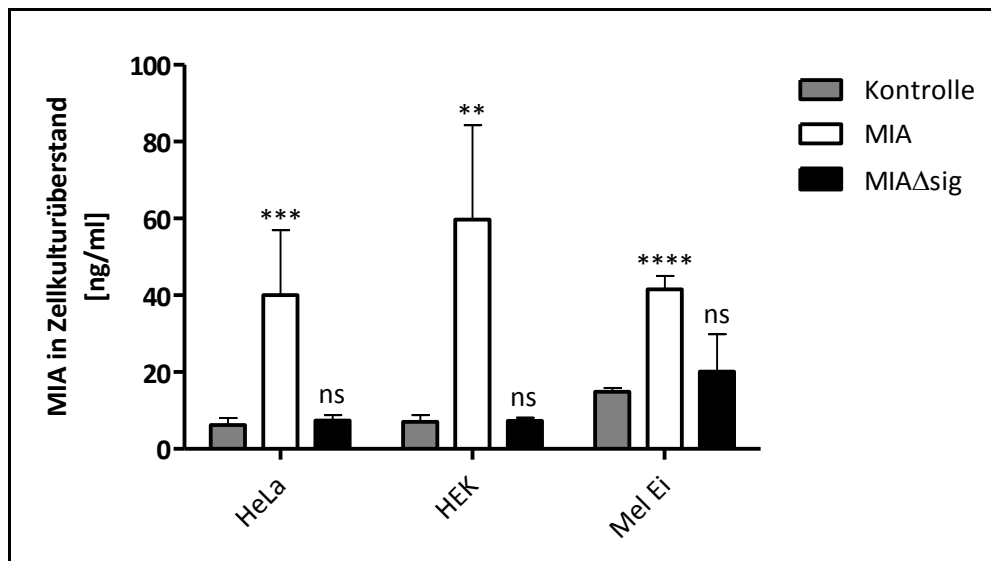


Abbildung 20: MIA-ELISA von Zellkulturüberständen. HeLa-, HEK- und Mel Ei-Zellen wurden transient mit pCMX-PL1 (Kontrolle), pCMX-PL1-MIA oder pCMX-PL1-MIA Δ sig transfiziert. Nach 24 Stunden wurde der Zellkulturüberstand gesammelt und die MIA-Konzentration mittels spezifischem MIA-ELISA quantifiziert. (Mittelwert \pm SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

4.3.2 Lokalisation von MIA ohne Signalpeptid

Neben dem Einfluss des Signalpeptids von MIA auf die Sekretion des Proteins wurde ebenfalls die intrazelluläre Lokalisation untersucht. Hierzu wurden wie bereits beschrieben HeLa-Zellen mit MIA ohne Signalpeptid (pCMX-PL1-MIA Δ sig) und einem Golgi-GFP-Konstrukt ko-transfiziert und anschließend via Immunfluoreszenz untersucht (6.2.3.9, 6.2.4.3).

Die Immunfluoreszenz-Analyse von MIA Δ sig zeigt, dass das Protein in ruhenden Zellen ebenso wie der Golgi-Apparat im Zytosol verteilt vorliegt (Abbildung 21 A – C). In migrierenden HeLa-Zellen akkumuliert MIA Δ sig in einigen Zellen im hinteren (Abbildung 21 D – F) und in anderen Zellen im vorderen Teil (Abbildung 21 G – I).

Der Vergleich der intrazellulären Verteilung von MIA und MIA Δ sig, die im hinteren Zellberich akkumulieren (vergleiche Abbildung 16) mit Hilfe des Programms ImageJ® zeigt, dass mehr MIA Δ sig in der Nähe des Zellkerns lokalisiert vorliegt als Wildtyp MIA (Abbildung 22). Der prozentuale Anteil steigt signifikant von 40 % (wtMIA) auf knapp 60 % an. Dementsprechend nimmt in mittlerer Entfernung der MIA-Gehalt signifikant von ca. 40 % (wtMIA) auf etwas mehr als 25 % ab. Die Menge an distal lokalisiertem MIA verändert sich nur gering und geht von rund 17 % (wtMIA) auf ca. 11 % (MIA Δ sig) zurück.

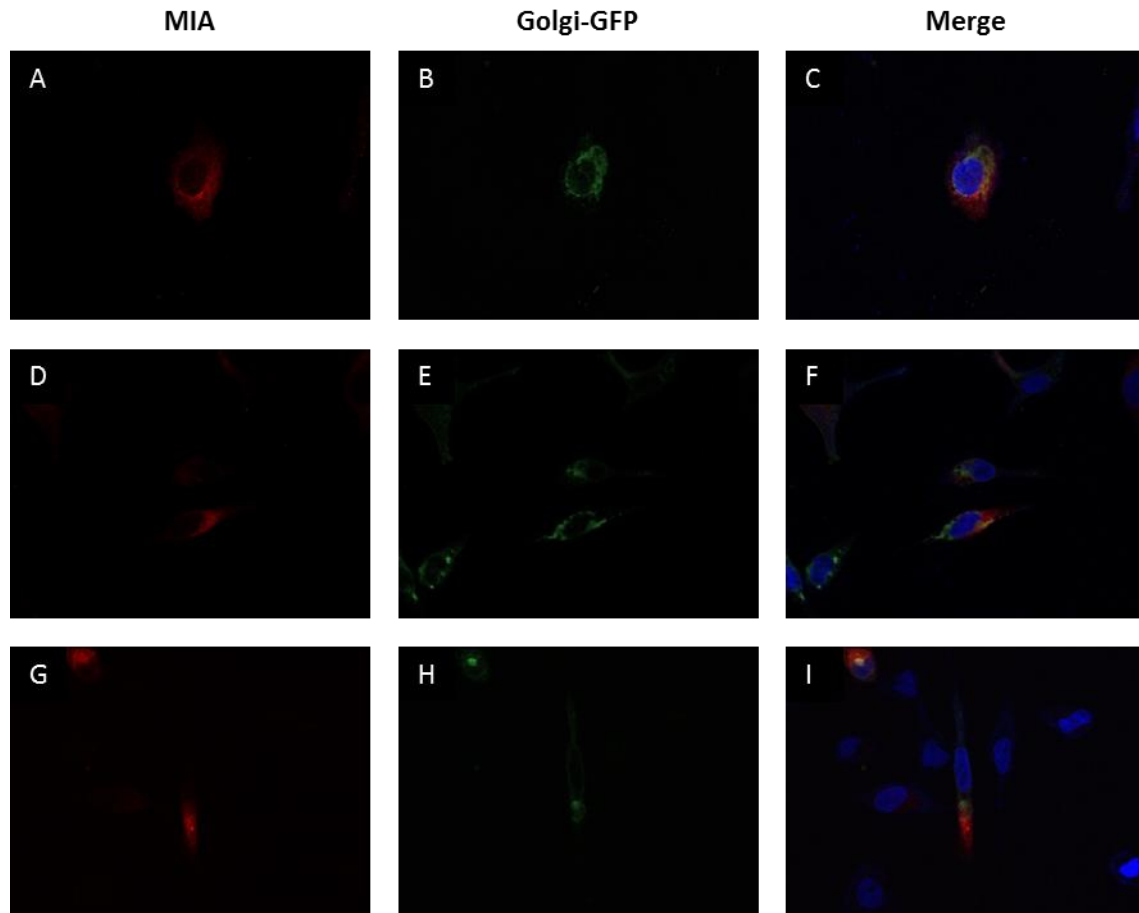


Abbildung 21: Immunfluoreszenz zur Analyse der intrazellulären Lokalisation von MIAΔsig. HeLa-Zellen wurden für 24 Stunden transient mit MIAΔsig und einem Golgi-GFP-Konstrukt ko-transfiziert. Zellkerne sind mit DAPI gefärbt (blau). Die Detektion von MIA (rot) erfolgte über den spezifischen primären Antikörper anti-MIA 7638 III und den sekundären Antikörper Alexa Flour 594 goat anti-rabbit (A, D, G). Der Golgi-Apparat (grün) ist in ruhenden Zellen (B) gleichmäßig verteilt und lagert sich in migrierenden Zellen (E, H) vor dem Zellkern in Migrationsrichtung an. Die Analyse zeigt eine gleichmäßige Verteilung von MIAΔsig in ruhenden Zellen (C) und eine mögliche Akkumulation von MIAΔsig sowohl im hinteren (F) als auch im vorderen (I) Teil migrierender HeLa-Zellen. Vergrößerung 40x.

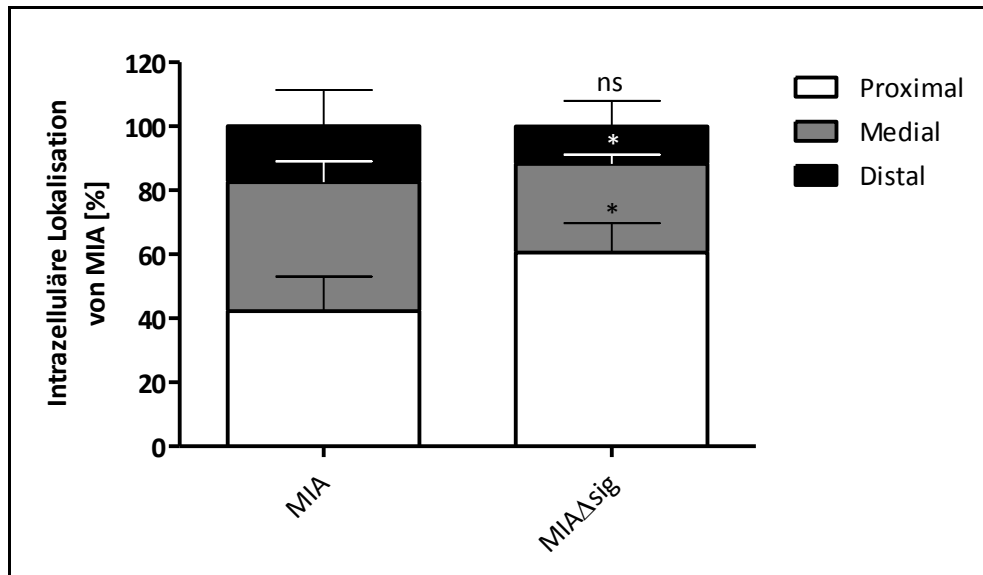


Abbildung 22: Intrazelluläre Lokalisation von MIA bzw. MIAΔsig. Die intrazelluläre Lokalisation von MIA im hinteren Zellbereich wurde in HeLa-Zellen, die transient mit MIA oder MIAΔsig transfiziert wurden, mit Hilfe des Programms ImageJ® bestimmt (Mittelwert ± SD; * $p \leq 0,05$, ns = nicht signifikant).

4.4 Mutagenese des Signalpeptids von MIA

Eine Mutagenese-Studie ermöglicht es, durch gezielten Austausch, die entscheidenden Aminosäuren eines Proteins für beispielsweise seine korrekte Faltung, Funktion, Prozessierung oder Transport zu bestimmen. Durch die gerichtete Mutagenese des Signalpeptids von MIA sollten in dieser Arbeit die entscheidenden Aminosäuren identifiziert werden, die für die Maturation des Proteins, in diesem Falle der Entfernung des Signalpeptids, verantwortlich sind und dadurch Einfluss auf Transport und Sekretion des Proteins nehmen.

Alle klonierten Mutanten (Tabelle 1) wurden durch gezielte Mutagenese erzeugt (6.2.2.12) und *in silico*, mit Hilfe des Programms SignalP, analysiert (Tabelle 2). Anschließend wurden sowohl HEK- als auch HeLa-Zellen, die beide keine endogene MIA-Expression aufweisen, mit den verschiedenen Expressionskonstrukten transfiziert (6.2.4.2). Von jeder Mutante wurde die relative mRNA-Expression, das Bandenmuster im Western Blot, die Menge sekretierten MIAs im Zellkulturüberstand sowie die intrazelluläre Lokalisation untersucht.

Tabelle 1: Übersicht über die MIA-Signalpeptid-Mutanten. Dargestellt sind die Aminosäuresequenz des Signalpeptids von MIA und die jeweiligen Mutationen. Die ausgetauschten Aminosäuren sind rot hinterlegt. Die potentielle Spaltstelle des Signalpeptids von Wildtyp MIA ist durch ein Minus (-) angezeigt.

MIA-Signalpeptid-Mutante	Aminosäure Sequenz
Wildtyp	MARSLVCLGVIIILLSAFSGPGVVRG-G
L8D	MARSLVCDGVIIILLSAFSGPGVVRG-G
S15L	MARSLVCLGVIIILLTAFSGPGVVRG-G
A16D	MARSLVCLGVIIILLSDFSGPGVVRG-G
A16D/V22D	MARSLVCLGVIIILLSDFSGPGDRG-G
F17D	MARSLVCLGVIIILLSADSGPGVVRG-G
P20L/G21L	MARSLVCLGVIIILLSAFSGLLVVRG-G
V22D	MARSLVCLGVIIILLSAFSGPGDRG-G
R23E	MARSLVCLGVIIILLSAFSGPGVEG-G
R23W	MARSLVCLGVIIILLSAFSGPGVWG-G
G24D	MARSLVCLGVIIILLSAFSGPGVRD-G
G25D	MARSLVCLGVIIILLSAFSGPGVVRG-D

Die Ergebnisse der *in silico*-Analyse mittels SignalP der verschiedenen MIA-Signalpeptid-Mutanten sind in Tabelle 2 zusammengefasst und graphisch in Abbildung 23 und Abbildung 24 dargestellt.

Wildtyp MIA weist bei der Analyse mit SignalP eine potentielle Schnittstelle zwischen der Position 24 und 25 auf. Die Aminosäuresequenz von Position 1 – 24 wird als potentielles Signalpeptid erkannt (Mean S) und der maximale Cleavage-Wert (C) liegt mit 0,629 bei Position 25. Der Y-Wert, welcher die Signalpeptid- und Spaltungswahrscheinlichkeit berücksichtigt, ist ebenfalls an Position 25 am höchsten, sodass Die Aminosäuresequenz von Position 1 – 24 als Signalpeptid erkannt wird (D).

Der Großteil der klonierten Mutanten (MIA-L8D, MIA-S15L, MIA-A16D, MIA-F17D, MIA-P20L/G21L, MIA-R23E, MIA-R23W, MIA-G25D) weist das gleiche Signalpeptid- und Spaltmuster wie Wildtyp MIA auf (Tabelle 2). Übereinstimmend weisen diese Mutanten ihre höchste Spaltwahrscheinlichkeit und den höchsten Signalpeptid-/Cleavage-Wert an Position 25 auf und besitzen ein spaltbares Signalpeptid von Position 1 – 24 mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,548 (MIA-L8D) bis 0,868 (MIA-S15L).

Die Doppelmutante MIA-A16D/V22D weist hingegen eine sehr geringe Spaltwahrscheinlichkeit von 0,161 (Max C) zwischen Position 23 und 24 auf. Der maximale Signalpeptid-/Cleavagescore (Max Y) ist an Position 24 am größten und die Analyse des potentiellen Signalpeptids zeigt eine im Vergleich zum Wildtyp um eine Aminosäure verkürzte Sequenz von Position 1 – 23 (Mean S = 0,715) an.

Die Mutanten MIA-V22D und MIA-G24D weisen ebenfalls eine sehr geringe Spaltwahrscheinlichkeit mit 0,213 bzw. 0,202 (Max C) zwischen Position 23 und 24 auf. Das potentielle Signalpeptid der beiden Mutanten ist im Vergleich zu Wildtyp MIA verkürzt und reicht nur von Position 1 – 16 (Mean S). Auch der Y-Wert ist an Position 17 am höchsten, sodass auf Grundlage der Berechnungen mit SignalP diese beiden Mutanten am wahrscheinlichsten zwischen Position 16 und 17 geschnitten werden (Cleavage).

Tabelle 2: Bewertung der MIA-Signalpeptid-Mutanten. Auf Grundlage der Berechnungen mit SignalP sind die maximale Spaltwahrscheinlichkeit (Max C), der maximale Signalpeptid-/Cleavagescore (Max Y), der mittlere Signalpeptidscore (Mean S), die Wahrscheinlichkeit für ein spaltbares Signalpeptid (D; Cutoff = 0,450) und die wahrscheinlichste Spaltstelle (Cleavage) der verschiedenen MIA-Signalpeptid-Mutanten angegeben (P = Position).

Mutant	Max C (P)	Max Y (P)	Mean S (P)	D (P)	Cleavage (P)
MIA	0,629 (25)	0,719 (25)	0,829 (1-24)	0,778 (1-24)	VRG-GP (24/25)
L8D	0,537 (25)	0,541 (25)	0,553 (1-24)	0,548 (1-24)	VRG-GP (24/25)
S15L	0,784 (25)	0,836 (25)	0,895 (1-24)	0,868 (1-24)	VRG-GP (24/25)
A16D	0,452 (25)	0,568 (25)	0,725 (1-24)	0,653 (1-24)	VRG-GP (24/25)
A16D/V22D	0,161 (24)	0,338 (24)	0,715 (1-23)	0,541 (1-23)	GDR-GG (23/24)
F17D	0,432 (25)	0,554 (25)	0,722 (1-24)	0,645 (1-24)	VRG-GP (24/25)
P20L/G21L	0,320 (25)	0,534 (25)	0,894 (1-24)	0,728 (1-24)	VRG-GP (24/25)
V22D	0,213 (24)	0,418 (17)	0,902 (1-16)	0,679 (1-16)	LSA-FS (16/17)
R23E	0,676 (25)	0,749 (25)	0,836 (1-24)	0,796 (1-24)	VEG-GP (24/25)
R23W	0,699 (25)	0,776 (25)	0,865 (1-24)	0,824 (1-24)	VWG-GP (24/25)
G24D	0,202 (24)	0,420 (17)	0,915 (1-16)	0,687 (1-16)	LSA-FS (16/17)
G25D	0,762 (25)	0,788 (25)	0,823 (1-24)	0,807 (1-24)	VRG-DP (24/25)

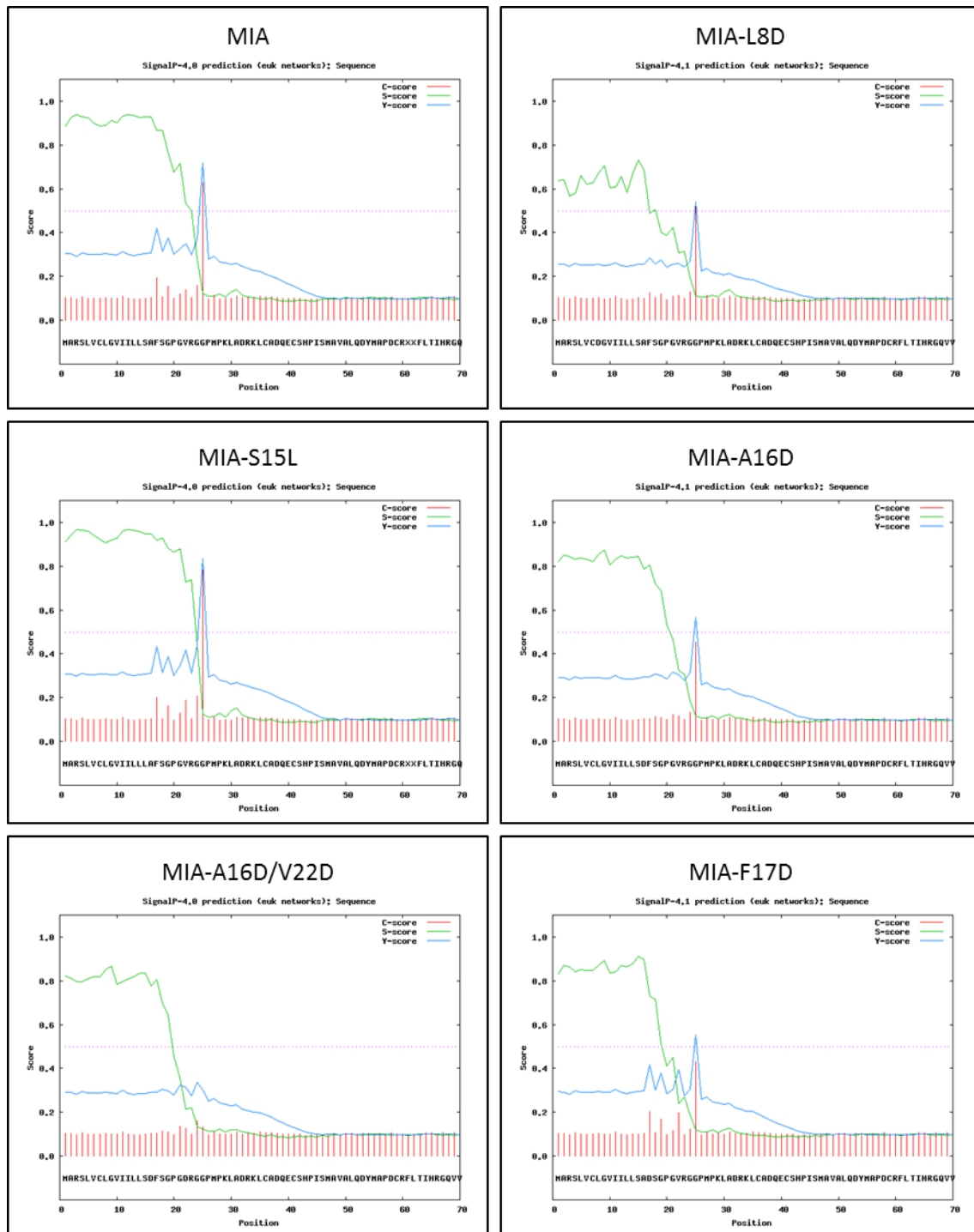


Abbildung 23: *In silico*-Analyse der MIA-Signalpeptid-Mutanten mittels SignalP. Mit Hilfe des Programms SignalP wurden *in silico* die potentielle Signalpeptidlänge und potentielle Spaltstellen der klonierten Mutanten analysiert. Ein hoher S-Score zeigt ein potentielles Signalpeptid an. Die erste Position nach einer möglichen Spaltstelle weist einen hohen C-Score auf. Der Y-Score verrechnet die maximale Spaltwahrscheinlichkeit (C-Score) und die maximale Änderung in der Signalpeptidbewertung (S-Score) und definiert die wahrscheinlichste Spaltstelle eines potentiellen Signalpeptids.

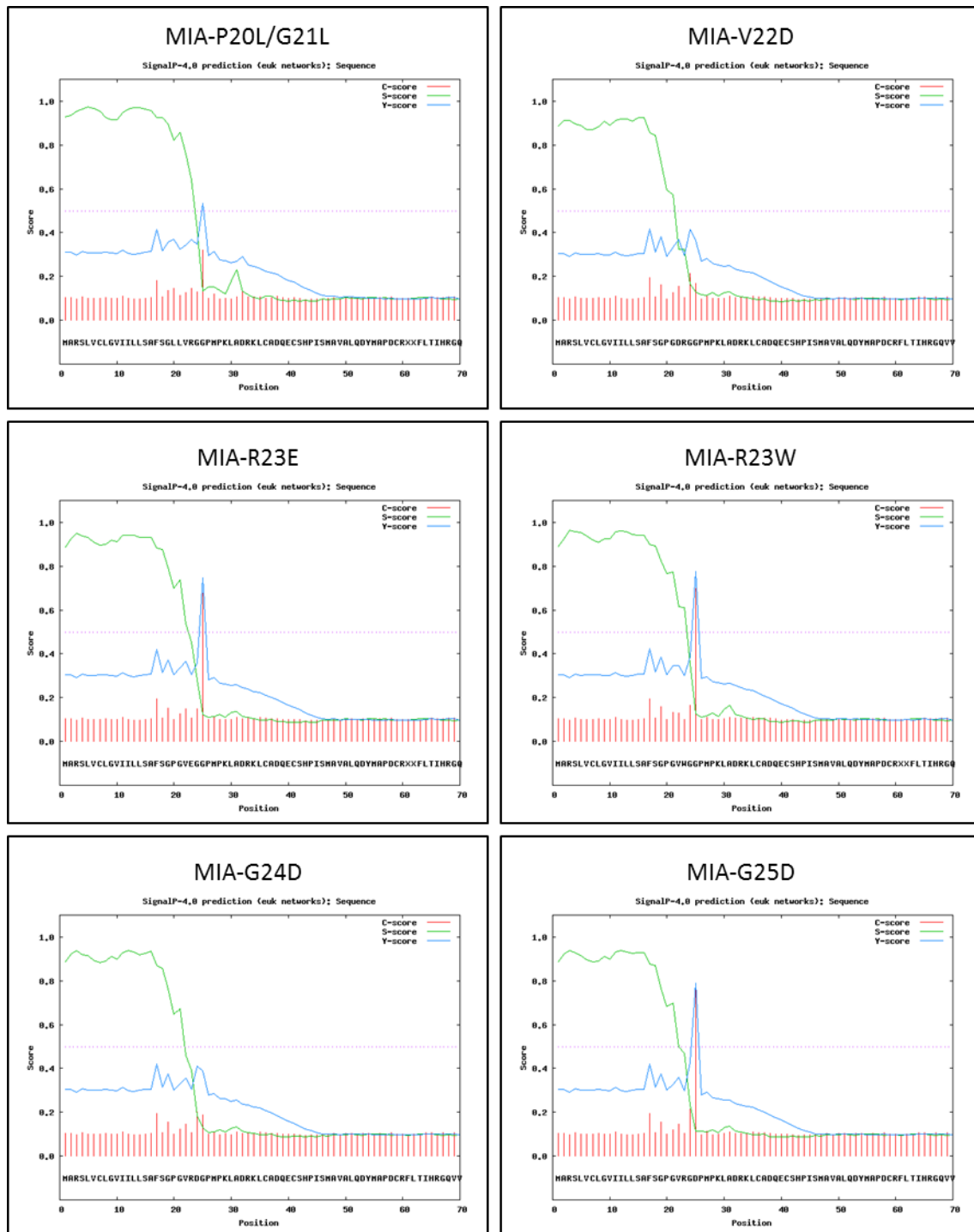


Abbildung 24: *In silico*-Analyse der MIA-Signalpeptid-Mutanten mittels SignalP. Mit Hilfe des Programms SignalP wurden *in silico* die potentielle Signalpeptidlänge und potentielle Spaltstellen der klonierten Mutanten analysiert. Ein hoher S-Score zeigt ein potentielles Signalpeptid an. Die erste Position nach einer möglichen Spaltstelle weist einen hohen C-Score auf. Der Y-Score verrechnet die maximale Spaltwahrscheinlichkeit (C-Score) und die maximale Änderung in der Signalpeptidbewertung (S-Score) und definiert die wahrscheinlichste Spaltstelle eines potentiellen Signalpeptids.

4.4.1 Analyse der Sekretion verschiedener MIA-Signalpeptid-Mutanten

Der Einfluss der verschiedenen Mutationen im Signalpeptid von MIA wurde experimentell untersucht, indem HeLa- und HEK-Zellen transient mit den verschiedenen Expressionskonstrukten transfiziert wurden. Nach 24 Stunden wurde der Zellkulturüberstand gesammelt und via MIA-ELISA und Western Blot analysiert. Zudem wurde aus den Zellen die RNA zur Bestimmung des mRNA-Levels via qRT-PCR und das Gesamtproteinlysate zur Untersuchung der Proteinexpression isoliert.

Zum Nachweis der Expression der verschiedenen MIA-Signalpeptid-Mutanten wurde zunächst die relative mRNA-Expression via qRT-PCR im Light Cycler 480 bestimmt (6.2.2.11). Die Expressionsanalyse zeigt, dass alle Mutanten sowohl in HeLa-Zellen (Abbildung 25) als auch in HEK-Zellen (Abbildung 26) exprimiert werden. Da die verschiedenen Mutanten zu unterschiedlichen Zeitpunkten kloniert und getestet wurden, unterscheidet sich die relative Expression zum Teil zwar stark, korreliert allerdings mit der Expressionsstärke des zeitgleich untersuchten Wildtyp MIAs. Die apparent hohen Standardabweichungen sind demnach vermutlich auf unterschiedliche Transfektionseffizienzen zurückzuführen.

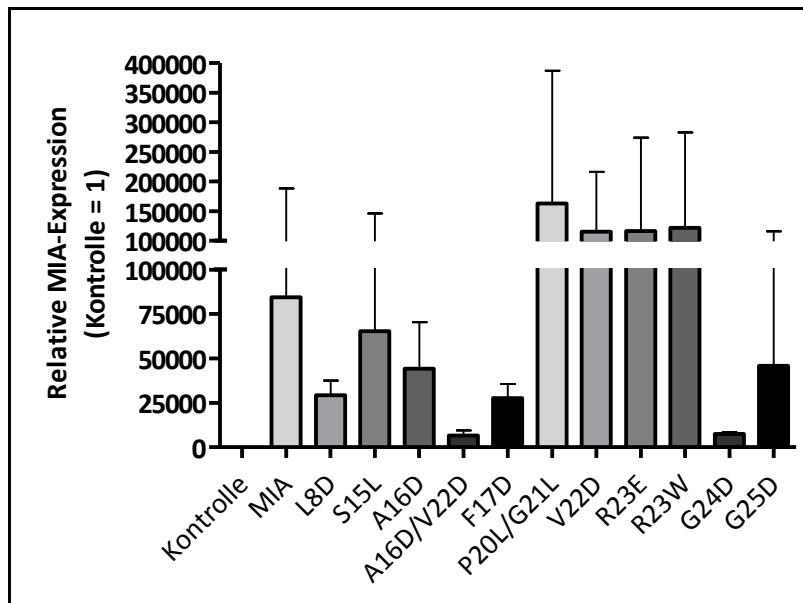


Abbildung 25: Relative Expression der MIA-Signalpeptid-Mutanten in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden transient mit pCMX-PL1 (Kontrolle), MIA oder den verschiedenen MIA-Signalpeptid-Mutanten transfiziert. Nach 24 Stunden wurde die RNA isoliert und die relative Expression von MIA mittels qRT-PCR analysiert (Mittelwert \pm SD).

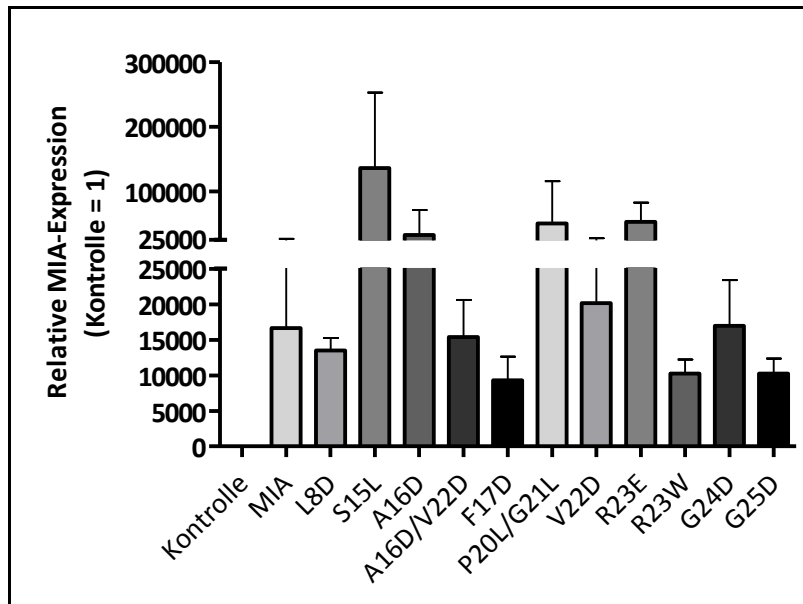


Abbildung 26: Relative Expression der MIA-Signalpeptid-Mutanten in HEK-Zellen. HEK-Zellen wurden transient mit pCMX-PL1 (Kontrolle), MIA oder den verschiedenen MIA-Signalpeptid-Mutanten transfiziert. Nach 24 Stunden wurde die RNA isoliert und die relative Expression von MIA mittels qRT-PCR analysiert (Mittelwert \pm SD).

Nachdem die grundsätzliche Expression der verschiedenen MIA-Signalpeptid-Mutanten auf RNA-Ebene bestätigt werden konnte, wurde zusätzlich das Gesamtproteinlysate sowie der Zellkulturüberstand transfizierter HeLa- und HEK-Zellen via Western Blot untersucht (Abbildung 27, Abbildung 28). Wildtyp MIA sowie alle MIA-Signalpeptid-Mutanten sind in beiden getesteten Zelllinien nach Transfektion intrazellulär nachweisbar. Auffällig ist allerdings die Verschiebung des Bandenmusters bei den Mutanten MIA-L8D, MIA-A16D/V22D, MIA-V22D und MIA-G24D. Hier ist nur eine Bande zu detektieren, die sich zwischen der MIA- und der MIA*-Bande befindet und ein Molekulargewicht von etwa 13 kDa aufweist. Darüber hinaus sind diese vier Mutanten, im Gegensatz zu den anderen untersuchten, nicht im Überstand der Zellen zu finden.

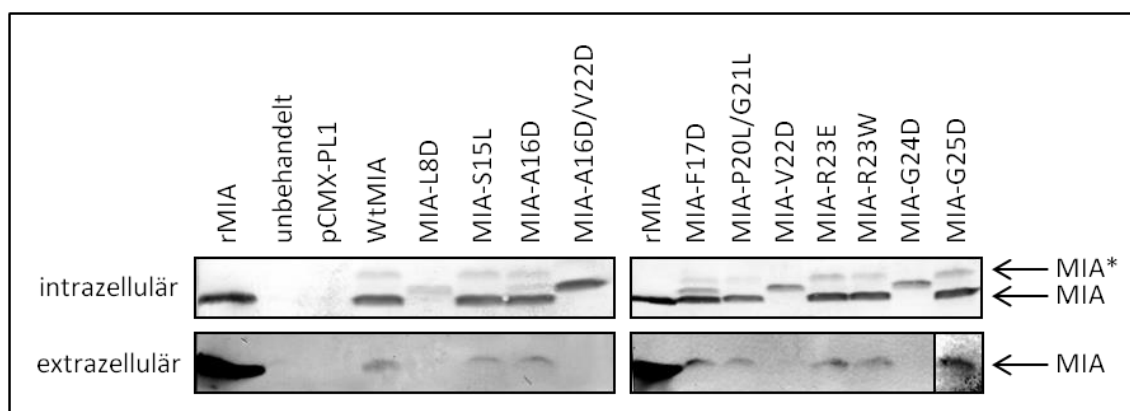


Abbildung 27: Western Blot Analyse der MIA-Signalpeptid-Mutanten in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden entweder unbehandelt oder 24 Stunden nach transienter Transfektion, mit pCMX-PL1 (Kontrolle), Wildtyp (wt) MIA oder einer MIA-Signalpeptid-Mutante, geerntet und das Gesamtproteinextrakt (intrazellulär) sowie der Zellkulturüberstand (extrazellulär) via Western Blot untersucht.

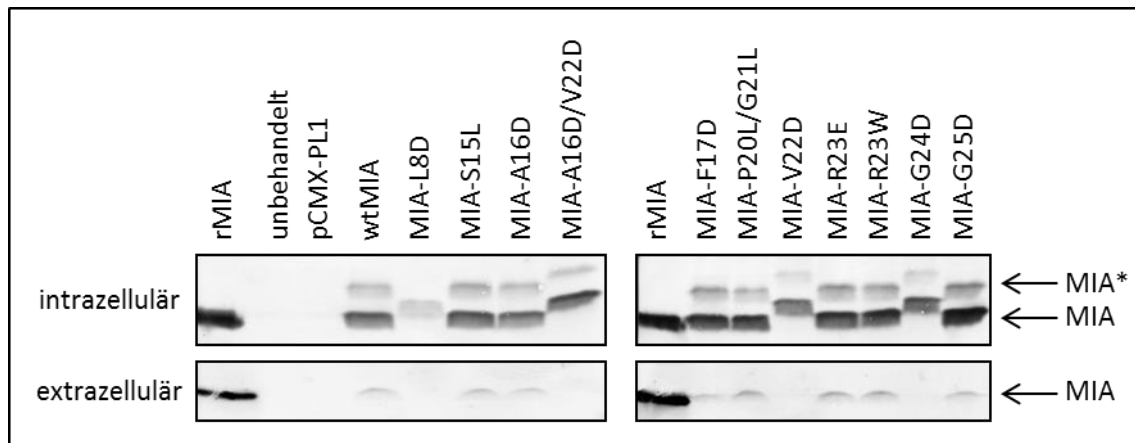


Abbildung 28: Western Blot Analyse der MIA-Signalpeptid-Mutanten in HEK-Zellen. HEK-Zellen wurden entweder unbehandelt oder 24 Stunden nach transienter Transfektion, mit pCMX-PL1 (Kontrolle), Wildtyp (wt) MIA oder einer MIA-Signalpeptid-Mutante, geerntet und das Gesamtproteinextrakt (intrazellulär) sowie der Zellkulturüberstand (extrazellulär) via Western Blot untersucht.

Ein unterschiedliches Expressionsmuster in HeLa- und HEK-Zellen zeigt sich bei den Mutanten MIA-A16D und MIA-F17D. Diese beiden Mutanten weisen in HEK-Zellen das normale Bandenmuster (MIA und MIA*) auf. Im Gegensatz dazu treten in HeLa-Zellen drei Banden auf, die sich auf Höhe des muren MIAs (MIA), MIA mit Signalpeptid (MIA*) und dazwischen befinden. Die MIA-A16D und MIA-F17D-Mutante werden sowohl von HEK als auch HeLa sekretiert und sind im Zellkulturüberstand transfizierter Zellen mittels Western Blot detektierbar. Die Zellkulturüberstände transient transfizierter HeLa- und HEK-Zellen wurden neben den Untersuchungen per Western Blot ebenfalls mittels ELISA auf die abgegebene MIA-Menge hin untersucht (Abbildung 29, Abbildung 30). Die Analyse zeigt, dass die Überstände von kontroll-transfizierten (pCMX-PL1) Zellen kein MIA enthalten. Im Gegensatz dazu lassen sich nach Transfektion mit dem Wildtyp MIA-Konstrukt ca. 50 ng/mL (HeLa) bzw. 70 ng/mL (HEK) MIA im Zellkulturüberstand finden. Die weitere Analyse der MIA-Konzentration im Zellkulturüberstand teilt die Mutanten in zwei Gruppen ein, die entweder von den Zellen sekretiert werden oder nicht. Die Signalpeptid-Mutanten MIA-S15L, MIA-A16D, MIA-F17D, MIA-P20LG21L, MIA-R23E und MIA-R23W werden sowohl von HeLa- als auch von HEK-Zellen sekretiert und lassen sich in den Zellkulturüberständen detektieren. Die abgegebene Menge unterscheidet sich dabei nicht signifikant von Wildtyp MIA. Die Signalpeptid-Mutanten MIA-L8D, MIA-A16D/V22D, MIA-V22D, MIA-G24D und MIA-G25D lassen sich demgegenüber nicht im Zellkulturüberstand transfizierter HeLa- und HEK-Zellen nachweisen. Die gemessenen Werte entsprechen dem Nullwert der ELISA-Messung bzw. den Werten mit pCMX-PL1 (Kontrolle) transfizierten Zellen und unterscheiden sich signifikant von der Konzentration mit pCMX-PL1-MIA transfizierter Zellen.

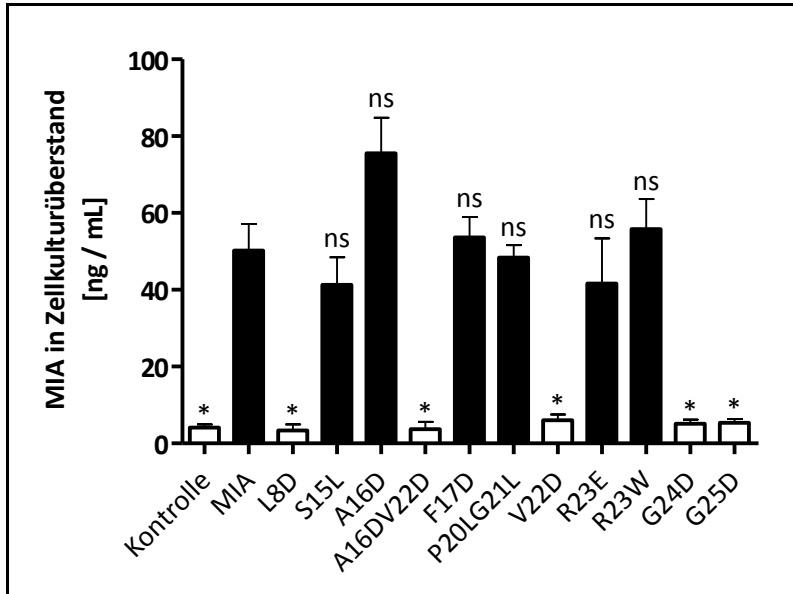


Abbildung 29: Sekretion der MIA-Signalpeptid-Mutanten in HeLa-Zellen. MIA-ELISA der Zellkulturüberstände transfizierter HeLa-Zellen. Die Überstände wurden 24 Stunden nach Transfektion gesammelt und mittels spezifischem ELISA die abgegebene MIA-Menge quantifiziert. Die Signifikanz wurde in Bezug auf die Sekretion von MIA berechnet (Mittelwert \pm SD; * $p \leq 0,001$; ns = nicht signifikant).

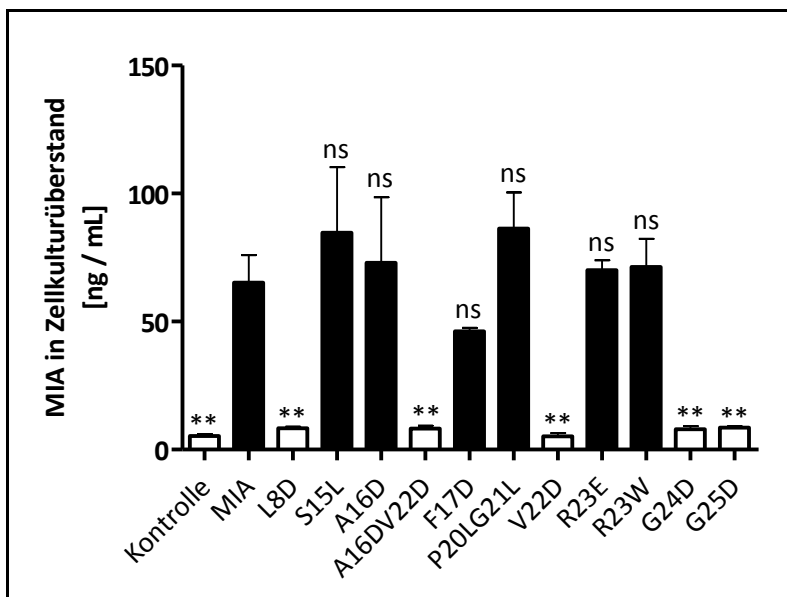


Abbildung 30: Sekretion der MIA-Signalpeptid-Mutanten in HEK-Zellen. MIA-ELISA der Zellkulturüberstände transfizierter HEK-Zellen. Die Überstände wurden 24 Stunden nach Transfektion gesammelt und mittels spezifischem ELISA die abgegebene MIA-Menge quantifiziert. Die Signifikanz wurde in Bezug auf die Sekretion von MIA berechnet (Mittelwert \pm SD; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns = nicht signifikant).

Unter Berücksichtigung des mRNA-Levels werden verschiedene MIA-Signalpeptid-Mutanten sowohl von HeLa- als auch von HEK-Zellen signifikant weniger sekretiert (Abbildung 31, Abbildung 32). In HeLa-Zellen werden von MIA-P20L/G21L und MIA-R23E nur etwa 70 – 75 % der Wildtyp MIA-Menge sekretiert. In HEK-Zellen werden MIA-S15L und MIA-P20L/G21L signifikant schwächer sekretiert. MIA-L8D, MIA-A16DV22D, MIA-V22D, MIA-G24D und

MIA-G25D sind mittels ELISA nicht detektierbar, sodass die relative Sekretion dieser Mutanten in beiden Zelllinien dementsprechend um den Nullwert liegt.

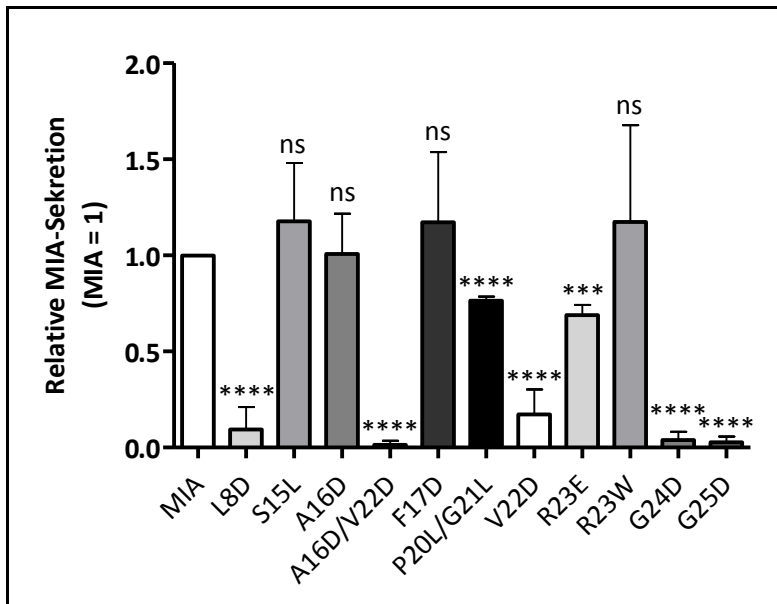


Abbildung 31: MIA-Sekretion relativ zu mRNA-Level in HeLa-Zellen. Um die relative Sekretion der verschiedenen MIA-Signalpeptid-Mutanten zu ermitteln wurden HeLa-Zellen transient mit pCMX-PL1-MIA (MIA) oder den entsprechenden Mutanten transfiziert. Nach 24 Stunden wurde die MIA-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA gemessen und die relative MIA-Expression via qRT-PCR bestimmt. Um die relative Sekretion von MIA zu definieren, wurde die MIA-Konzentration der Zellkulturüberstände in Abhängigkeit des mRNA-Levels bestimmt (Mittelwert \pm SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

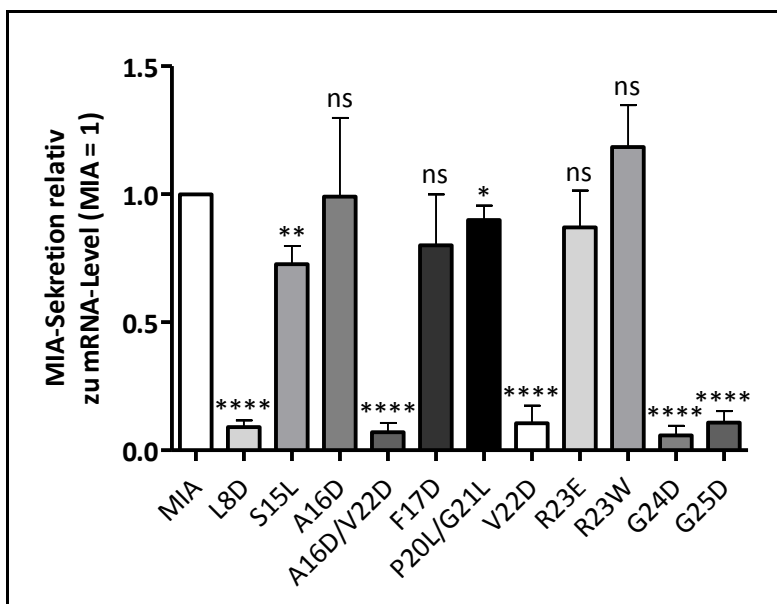


Abbildung 32: MIA-Sekretion relativ zu mRNA-Level in HEK-Zellen. Um die relative Sekretion der verschiedenen MIA-Signalpeptid-Mutanten zu ermitteln wurden HEK-Zellen transient mit pCMX-PL1-MIA (MIA) oder den entsprechenden Mutanten transfiziert. Nach 24 Stunden wurde die MIA-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA gemessen und die relative MIA-Expression via qRT-PCR bestimmt. Um die relative Sekretion von MIA zu definieren, wurde die MIA-Konzentration der Zellkulturüberstände in Abhängigkeit des mRNA-Levels bestimmt (Mittelwert \pm SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

4.4.2 FACS-Analyse

Einige MIA-Signalpeptid-Mutanten werden nach transienter Transfektion exprimiert aber nicht sekretiert. Um zu testen, ob diese Mutationen dazu führen, dass MIA außen an der Zellmembran hängen bleibt, wurden HeLa-Zellen transient mit pCMX-PL1-MIA bzw. exemplarisch pCMX-PL1-MIA-V22D transfiziert und der prozentuale Anteil MIA-positiver Zellen mittels FACS-Analyse ermittelt.

Die FACS-Messung wurde nur einmal durchgeführt und es wurde noch kein Protokoll für die Untersuchung etabliert. Die erste Analyse zeigt allerdings, dass im Vergleich zu unbehandelten Zellen (0,2 %) die Anzahl MIA-positiver Zellen nach Transfektion sowohl mit Fixierung (Abbildung 33 A – C) als auch ohne Fixierung (Abbildung 33 D – F) leicht zunimmt. Mit Fixierung sind 1 % der wtMIA und 0,8 % der MIA-V22D exprimierenden Zellen positiv. Ohne Fixierung sind mit 0,6 % etwas mehr MIA-V22D exprimierende Zellen positiv als wtMIA exprimierende Zellen (0,5 %). Insgesamt ist jedoch kein Unterschied in der Menge von MIA auf der Zelloberfläche zu erkennen. Die Etablierung eines Protokolls wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

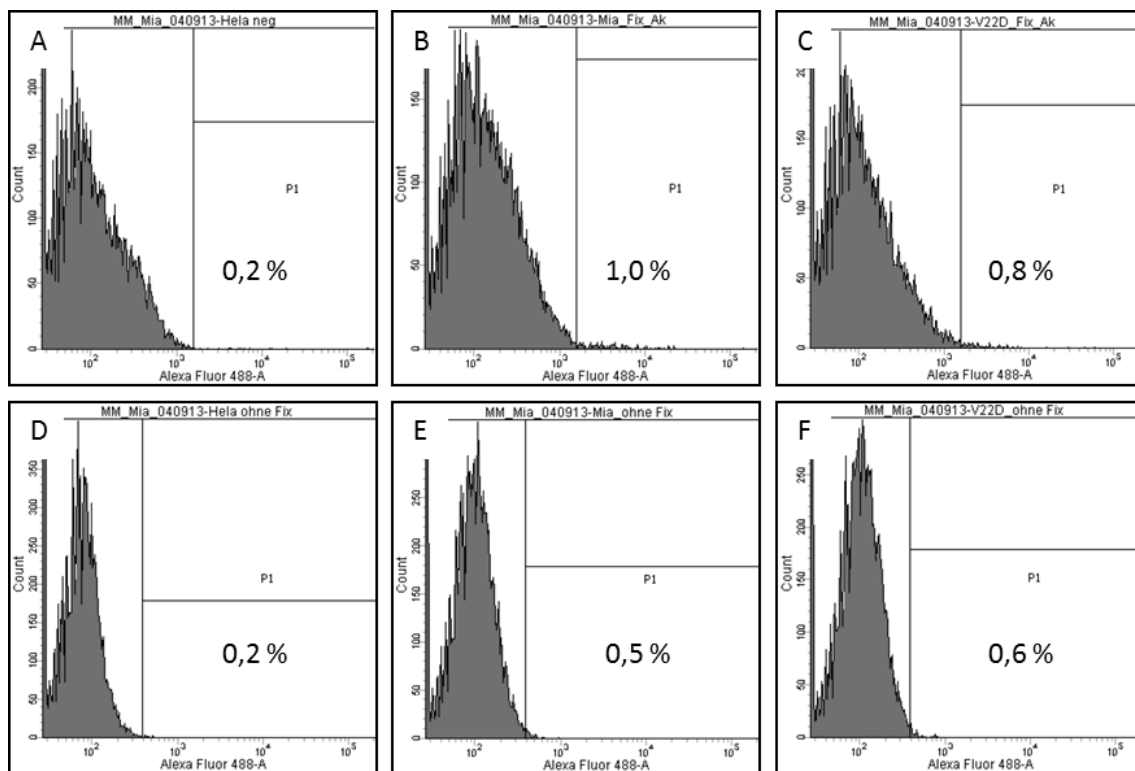


Abbildung 33: FACS-Analyse. HeLa-Zellen wurden transient mit pCMX-PL1-MIA (B, E) bzw. pCMX-PL1-MIA-V22D (C, F) transfiziert und nach 24 Stunden mittels FACS untersucht. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen (A, D) eingesetzt. Für die Analyse wurde MIA auf der Oberfläche von fixierten Zellen (A – C) bzw. unfixierten Zellen (D – F) gefärbt und untersucht. Angegeben ist jeweils der prozentuale Anteil positiver Zellen.

4.4.3 Lokalisation der MIA-Signalpeptid-Mutanten

Neben dem Einfluss der Signalpeptid-Mutation (Tabelle 1, 4.4) auf die Sekretion von MIA wurde zusätzlich die Lokalisation der einzelnen Mutanten mittels Immunfluoreszenz untersucht. Dazu wurden HeLa-Zellen mit pCMX-PL1-MIA oder den verschiedenen MIA-Signalpeptid-Mutanten zusammen mit einem Golgi-GFP-Konstrukt ko-transfiziert und anschließend wie beschrieben markiert und mikroskopiert (6.2.3.9).

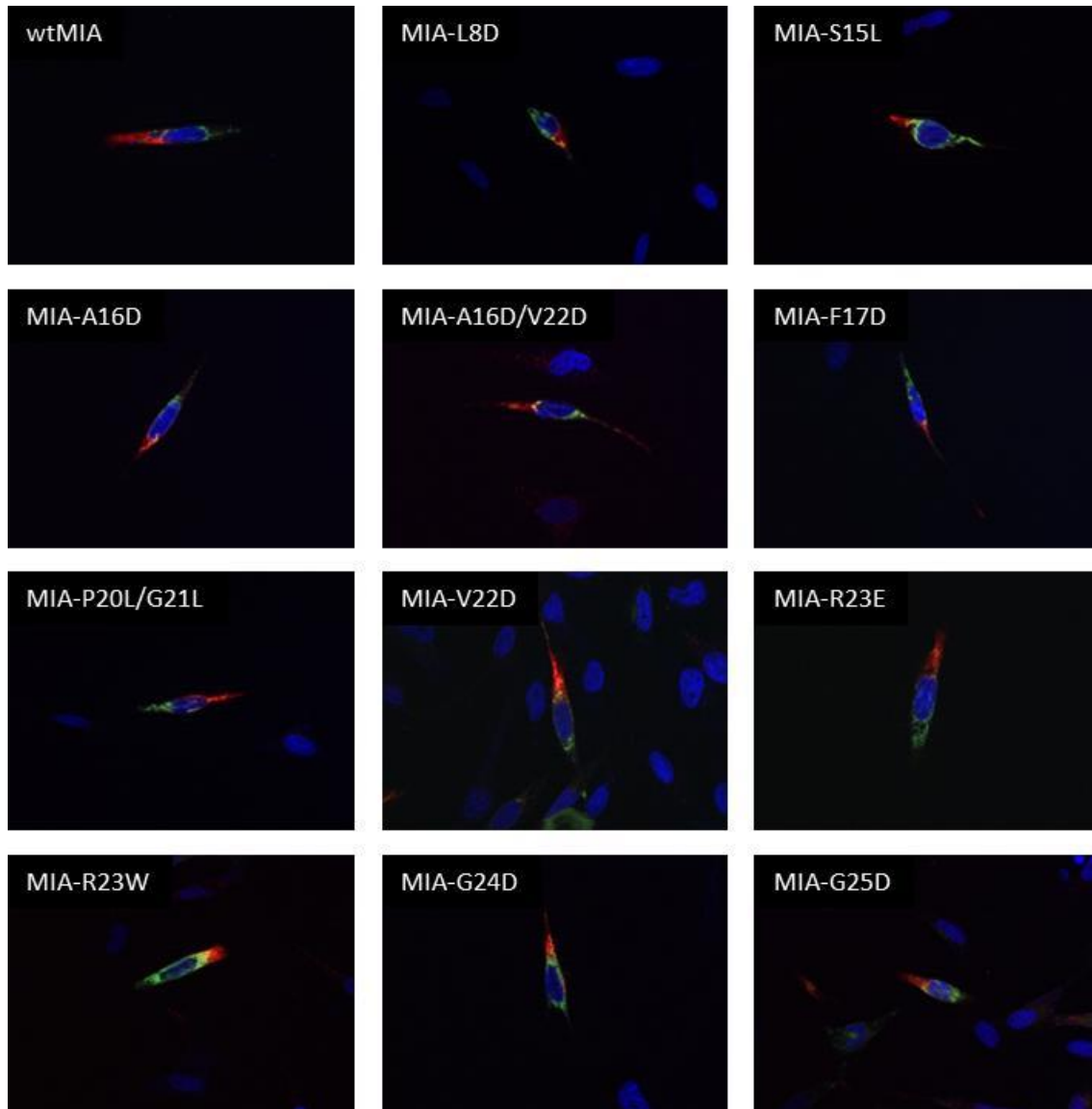


Abbildung 34: Lokalisation der MIA-Signalpeptid-Mutanten. Um die intrazelluläre Lokalisation der verschiedenen MIA-Signalpeptid-Mutanten zu untersuchen wurden HeLa-Zellen mit dem entsprechenden Expressions- und einem Golgi-GFP-Konstrukt ko-transfiziert. Zellkerne sind mit DAPI gefärbt (blau). Die Detektion von MIA (rot) erfolgte über den spezifischen primären Antikörper anti-MIA 7638 III und den sekundären Alexa Flour 594 goat anti-rabbit Antikörper. Der Golgi-Apparat (grün) lagert sich in migrierenden Zellen vor dem Zellkern an. Die Analyse zeigt eine Akkumulation aller MIA-Signalpeptid-Mutanten am distalen Zellpol. Vergrößerung 40x.

Die Analyse der intrazellulären Lokalisation zeigt zunächst keinen Unterschied in der allgemeinen intrazellulären Lokalisation der Mutanten im Vergleich zu Wildtyp MIA. In allen Fällen akkumuliert MIA in migrierenden Zellen im hinteren Zellteil (Abbildung 34). Der Vergleich der relativen Lokalisation zeigt allerdings, dass sich die untersuchten Mutanten in ihrer Lokalisation im hinteren Zellteil teilweise voneinander unterscheiden (Abbildung 35).

Die intrazelluläre Lokalisation von MIA und den verschiedenen MIA-Signalpeptid-Mutanten wurde mit Hilfe des Programms ImageJ® bestimmt. Wildtyp MIA liegt etwa zu je 40 % proximal bzw. medial vor und zu rund 20 % distal. Die Mutanten MIA-S15L, MIA-A16D, MIA-F17D, MIA-P20L/G21L, MIA-V22D und MIA-G25D weisen eine dazu fast identische Verteilung auf. Nur MIA-L8D liegt signifikant erhöht proximal (70 %) und nur zu etwa 5 % distal vor und unterscheidet sich somit am stärksten von wtMIA. Auch die Mutanten MIA-A16D/V22D, MIA-R23W akkumulieren zu größeren Teilen im Drittel nahe des Zellkerns, allerdings ist der Anteil von distal lokalisiertem MIA ähnlich dem Wildtyp. Allein MIA-R23E bildet in dieser Analyse eine Ausnahme und liegt als einzige Mutante, allerdings nicht signifikant, in geringerer Konzentration in der Nähe des Zellkerns (ca. 30 %) vor als wtMIA. Etwa 45 % von MIA-R23E sind medial lokalisiert und ca. 25 % distal (Abbildung 35).

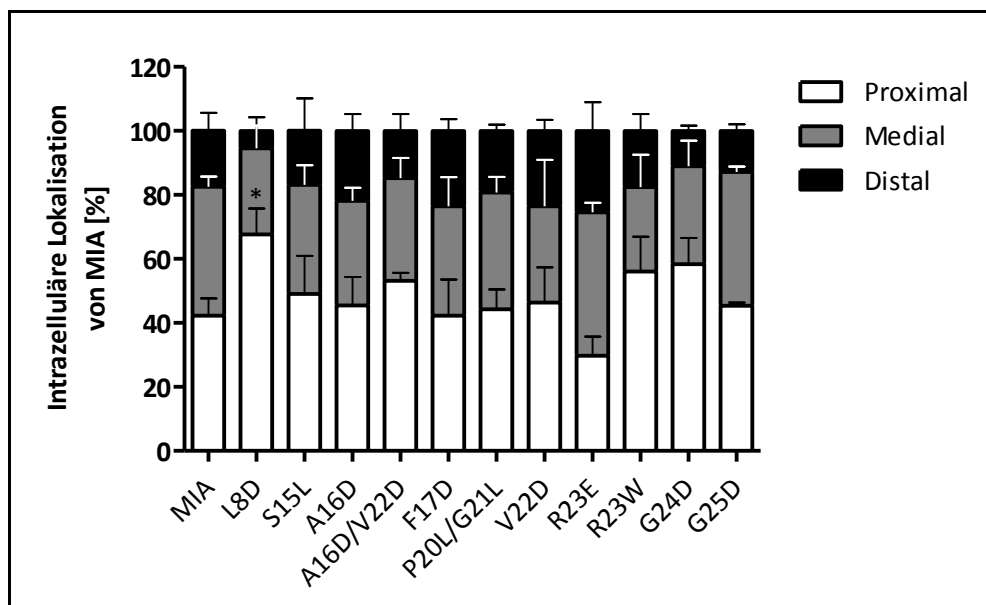


Abbildung 35: Intrazelluläre Lokalisation von MIA. Um die intrazelluläre Lokalisation von MIA und den verschiedenen MIA-Signalpeptid-Mutanten zu analysieren, wurde die mittels Immunfluoreszenz visualisierte Verteilung mit Hilfe des Programms ImageJ® statistisch ausgewertet. Dazu wurde der Bereich zwischen dem Zellkern und der distalen Zellmembran einer migrierenden Zelle in drei gleichgroße Bereiche unterteilt (Kernnah = proximal; mittig = medial; am Zellrand = distal; Mittelwert \pm SD; * $p \leq 0,05$; ohne Angabe = nicht signifikant).

4.5 Untersuchung von MIA mit E-Cadherin-Signalpeptid

Die Sekretion von Proteinen wird im Allgemeinen durch ein N-terminales Signalpeptid ermöglicht. Inwieweit das Signalpeptid auch einen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation bzw. den gerichteten Transport nehmen kann ist allerdings noch nicht hinreichend geklärt. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte MIA-Mutante ohne Signalpeptid (4.3) akkumuliert in migrierenden HeLa-Zellen, ebenso wie Wildtyp MIA, am distalen Zellpol. Dies weist darauf hin, dass die Information über die Lokalisation von MIA nicht im Signalpeptid verankert ist, sondern unter Umständen andere Faktoren eine Rolle spielen. Um weitere Information über den Einfluss des Signalpeptids zu erhalten, wurde ein chimäres Protein (E-CAD-MIA), bestehend aus dem Signalpeptid von E-Cadherin und dem MIA-Protein ab Aminosäure 25, kloniert und die Sekretion und intrazelluläre Lokalisation des Proteins analysiert.

4.5.1 Analyse der Sekretion von E-CAD-MIA

Um die Expression und Sekretion von E-CAD-MIA zu untersuchen, wurden HeLa-, HEK- und Mel Ei-Zellen transient mit pCMX-PL1 (Kontrolle), pCMX-PL1-MIA oder pCMX-PL1-E-CAD-MIA transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, das Gesamtproteinextrakt sowie die RNA isoliert und der Zellkulturüberstand gesammelt und analysiert.

Kontroll-transfizierte Zellen exprimieren im Vergleich zu Wildtyp MIA oder E-CAD-MIA transfizierten Zellen quasi kein MIA. Nach Transfektion steigt die Expression von MIA, sowohl für Wildtyp MIA als auch für E-CAD-MIA, in allen drei getesteten Zelllinien deutlich an. Dabei ist die relative Expression von E-CAD-MIA höher als die von normalem MIA. In HeLa-Zellen ist dieser Unterschied am größten. Hier ist die relative Expression von E-CAD-MIA mehr als fünfmal so hoch wie für Wildtyp MIA. In den anderen Zelllinien ist die Expression von E-CAD-MIA zwar auch erhöht, allerdings nur etwa um den Faktor 1,5 in HEK- bis 2 in Mel Ei-Zellen (Abbildung 36).

Die Expression von E-CAD-MIA wurde zusätzlich mittels Western Blot analysiert. Hierzu wurde aus transient transfizierten Zellen das Gesamtproteinextrakt (intrazellulär) und der Zellkulturüberstand (extrazellulär) untersucht (Abbildung 37). Während in Kontroll-transfizierten HEK- und HeLa-Zellen kein MIA gebildet wird, und auch nicht im Zellkulturüberstand zu finden ist, besitzen Mel Ei-Zellen eine endogene MIA-Produktion. In diesen Zellen kann MIA auch schon ohne Überexpression im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Nach Transfektion mit MIA tritt in allen Zelllinien das typische Bandenmuster aus MIA und MIA* (intrazellulär) auf und zudem lässt sich MIA im Zellkulturüberstand detektieren. Des Weiteren exprimieren alle Zelllinien nach Transfektion E-CAD-MIA. Auffällig ist allerdings, dass hier drei Banden auftreten (intrazellulär). So ist neben MIA und MIA* eine Bande mittlerer

Größe zu erkennen. Die zugehörige Analyse des Zellkulturüberstandes zeigt, dass E-CAD-MIA im Überstand aller Zelllinien vorkommt.

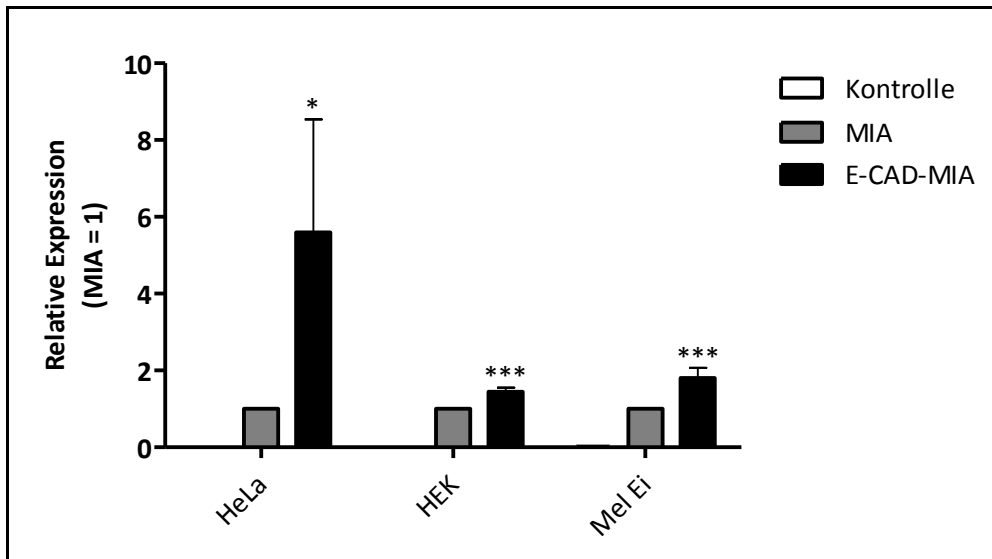


Abbildung 36: Relative Expression von E-CAD-MIA. HeLa-, HEK- und Mel Ei-Zellen wurden transient mit pCMX-PL1 (Kontrolle), pCMX-PL1-MIA oder pCMX-PL1-E-CAD-MIA transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert, mit DNase verdaut und anschließend die relative Expression mittels qRT-PCR im LC480 analysiert (Mittelwert \pm SD; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

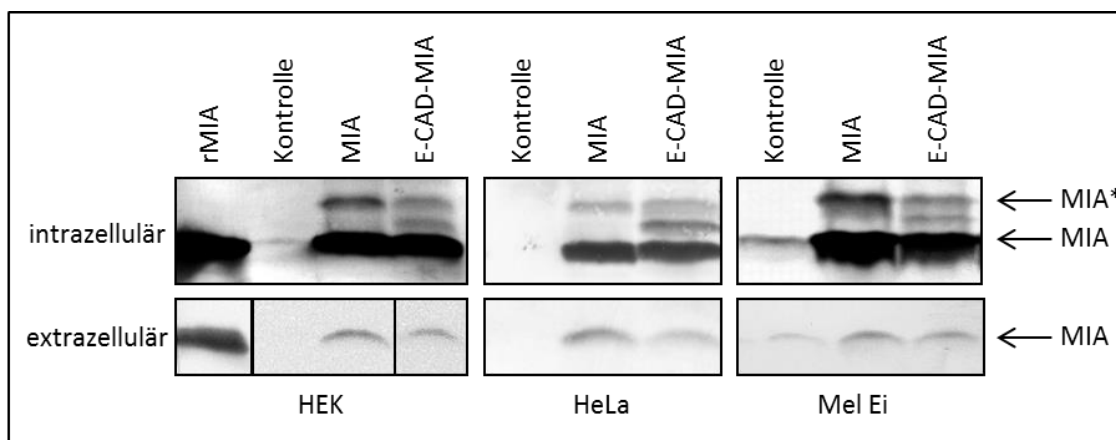


Abbildung 37: Western Blot-Analyse transfizierter HEK-, HeLa- und Mel Ei-Zellen. HEK-, HeLa- und Mel Ei-Zellen wurden transient mit pCMX-PL1 (Kontrolle), pCMX-PL1-MIA oder pCMX-PL1-E-CAD-MIA transfiziert. Nach 24 Stunden wurde das Gesamtproteinextrakt (intrazellulär) bzw. der Zellkulturüberstand (extrazellulär) mittels Western Blot analysiert.

Die Analyse mittels spezifischem MIA-ELISA (Abbildung 38) zeigt, dass die Zellkulturüberstände von Kontroll-transfizierten HeLa- und HEK-Zellen kein MIA enthalten. Im Gegensatz dazu liegt die MIA-Konzentration im Überstand von Mel Ei-Zellen bereits bei etwas über 20 ng/ml. Nach Transfektion mit pCMX-PL1-MIA steigt die MIA-Konzentration im Überstand von HeLa-Zellen auf ca. 90 ng/ml und von HEK-Zellen auf rund 80 ng/ml. In Mel Ei-Zellen verdoppelt sich die Menge sekretierten MIAs, nach Transfektion mit dem Wildtyp-Konstrukt, in etwa auf 40 ng/ml.

E-CAD-MIA ist ebenfalls nach Transfektion im Überstand aller untersuchten Zelllinien zu finden. Allerdings ist die Konzentration signifikant geringer als von MIA. Die Konzentration liegt in HeLa-Zellen bei ca. 35 ng/ml, in HEK-Zellen bei 40 ng/ml und in Mel Ei-Zellen bei etwa 30 ng/ml.

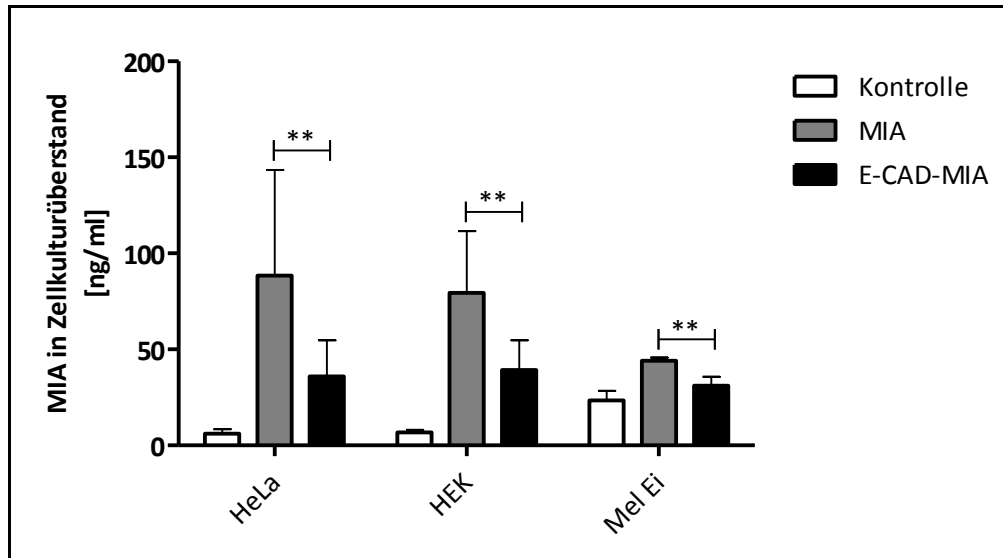


Abbildung 38: MIA-ELISA von Zellkulturüberständen. HeLa-, HEK- und Mel Ei-Zellen wurden transient mit pCMX-PL1 (Kontrolle), pCMX-PL1-MIA oder pCMX-PL1-E-CAD-MIA transfiziert. Nach 24 Stunden wurde die MIA-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels spezifischem MIA-ELISA quantifiziert (Mittelwert \pm SD; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

Neben der absoluten Sekretion wurde ebenfalls die relative Sekretion von E-CAD-MIA analysiert. Hierzu wurde zum einen die MIA-Konzentration im Zellkulturüberstand transfizierter Zellen im Verhältnis zum mRNA-Level (Abbildung 39) bestimmt. Zum anderen wurde die extrazelluläre Menge MIAs im Verhältnis zur intrazellulären Menge durch die densitometrische Auswertung von Western Blots analysiert (Abbildung 40).

Unter Berücksichtigung des mRNA-Levels wird E-CAD-MIA in allen drei getesteten Zelllinien deutlich schwächer als Wildtyp MIA sekretiert. Die relative Sekretion im Verhältnis zu MIA liegt in HeLa- und HEK-Zellen bei nur etwa 25 %. In Mel Ei-Zellen ist sie noch am größten, allerdings wird auch hier weniger als die Hälfte an MIA abgegeben (Abbildung 39).

Ein ähnliches Ergebnis liefert auch der densitometrische Vergleich von extra- und intrazellulärem MIA der Western Blot Analyse. Die relative Menge an sekretiertem E-CAD-MIA liegt in HEK-Zellen bei etwa 60 % und in HeLa-Zellen bei nur ca. 40 % im Vergleich zu Wildtyp MIA. In Mel Ei-Zellen ist demgegenüber kein Unterschied in der relativen Sekretion von MIA und E-CAD-MIA auszumachen (Abbildung 40). In diesen Zellen steigt zwar die mRNA-Expression von MIA an, jedoch scheint diese nicht zu einer Zunahme der Proteinmenge zu führen.

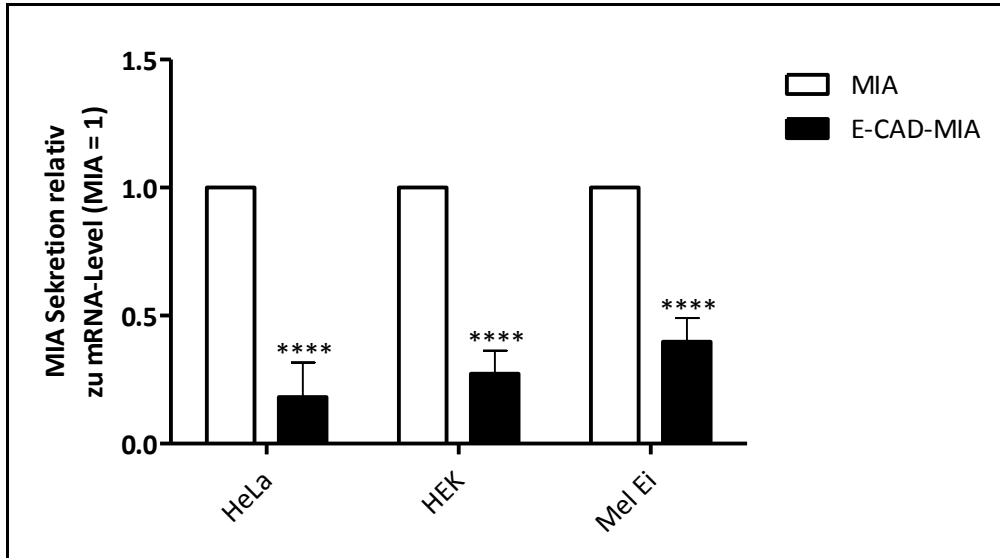


Abbildung 39: Sekretion von MIA relativ zum mRNA-Level. Um die relative Sekretion MIAs zu bestimmen, wurde die mittels ELISA gemessene Konzentration von MIA im Zellkulturüberstand in Bezug auf den via qRT-PCR bestimmten mRNA-Level analysiert (Mittelwert \pm SD; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).

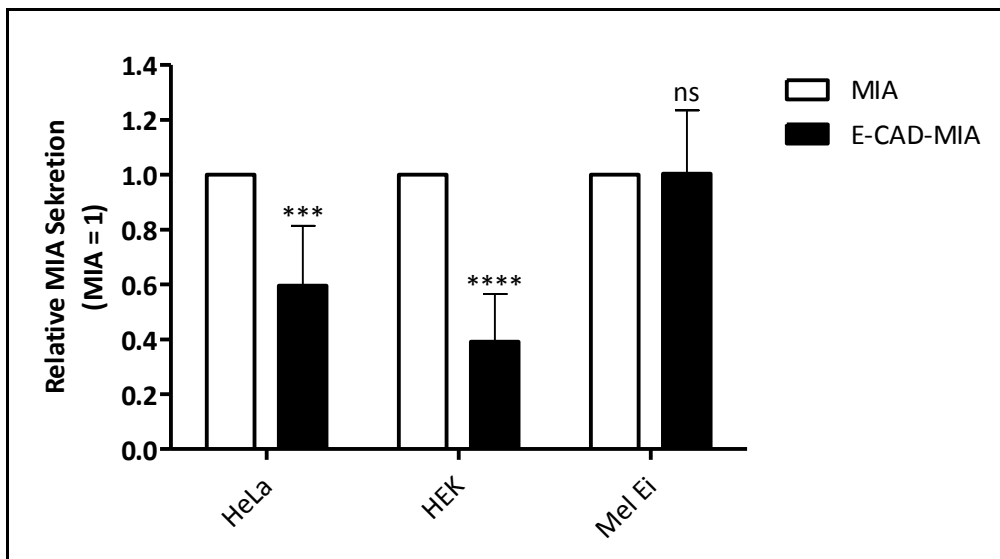


Abbildung 40: Densitometrische Auswertung zur Bestimmung der relativen Sekretion von MIA. Die mittels Western Blot detektierte MIA-Menge im Zellkulturüberstand (extrazellulär) und Gesamtproteinextrakt (intrazellulär) transifizierter Zellen wurde densitometrisch analysiert und das Verhältnis von sekretiertem zu nicht-sekretiertem MIA kalkuliert (Mittelwert \pm SD; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$; ns = nicht signifikant).

Die Untersuchungen des chimären MIA-Proteins mit N-terminalem Signalpeptid von E-Cadherin zeigen, dass E-CAD-MIA von allen getesteten Zelllinien exprimiert wird. Die Analyse des Zellkulturüberstandes konnte zudem die Sekretion des Proteins bestätigen.

4.5.2 Lokalisation von E-CAD-MIA

Neben der Sekretion wurde auch der Einfluss des E-Cadherin Signalpeptids auf die intrazelluläre Lokalisation von MIA untersucht. Hierzu wurden wie bereits beschrieben HeLa-Zellen mit pCMX-PL1-E-CAD-MIA und einem Golgi-GFP-Konstrukt ko-transfiziert und anschließend via Immunfluoreszenz untersucht (6.2.3.9, 6.2.4.3).

E-CAD-MIA liegt in ruhenden Zellen verteilt im Zytosol vor (Abbildung 41 C) und akkumuliert in migrierenden Zellen am distalen Zellpol (Abbildung 41 F).

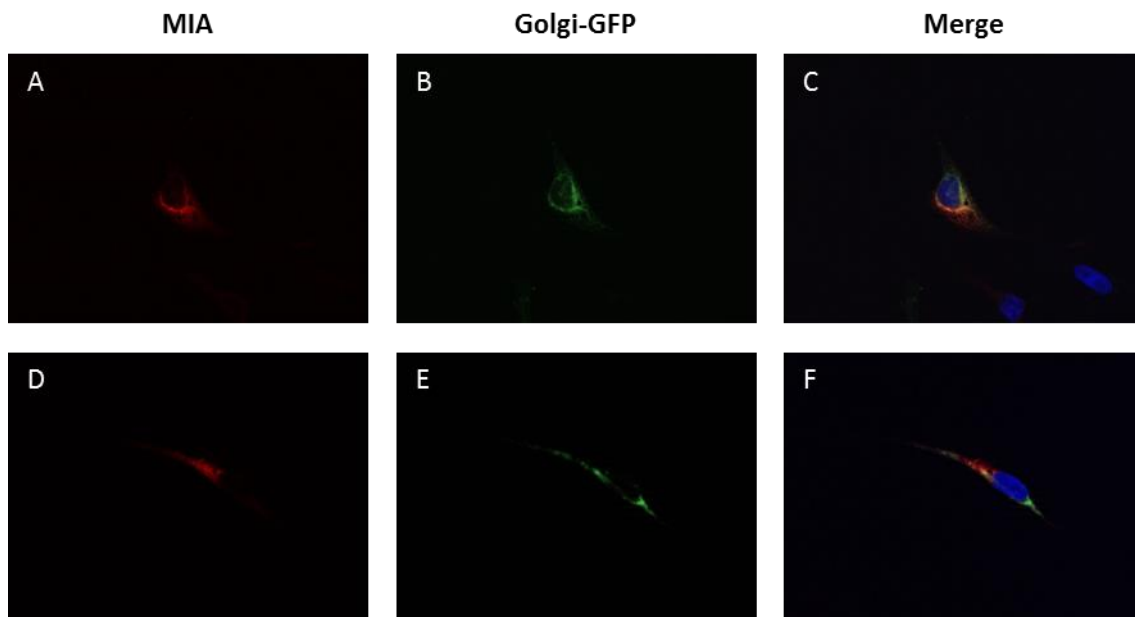


Abbildung 41: Immunfluoreszenz zur Analyse der intrazellulären Lokalisation von E-CAD-MIA. HeLa-Zellen wurden für 24 Stunden transient mit pCMX-PL1-E-CAD-MIA und einem Golgi-GFP-Konstrukt ko-transfiziert. Zellkerne sind mit DAPI gefärbt (blau). Die Detektion von MIA (rot) erfolgte über den spezifischen primären Antikörper anti-MIA 7638 III und den sekundären Antikörper Alexa Flour 594 goat anti-rabbit (A, D). Der Golgi-Apparat (grün) ist in ruhenden Zellen (B) gleichmäßig verteilt und verlagert sich in migrierenden Zellen (E). Die Analyse zeigt eine gleichmäßige Verteilung von E-CAD-MIA in ruhenden Zellen (C) und eine Akkumulation von E-CAD-MIA am distalen Zellpol in migrierenden HeLa-Zellen (F). Vergrößerung 40x.

4.6 Inhibition des Vesikeltransports und Signalpeptidprozessierung

Um die Prozessierung des Signalpeptids von MIA räumlich genauer zu untersuchen und mögliche Proteine zu identifizieren, die an dem Transport und der Sekretion von MIA beteiligt sind, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit der zelluläre Vesikeltransport moduliert. Dazu wurde der Einfluss verschiedener Rab-Proteine, die an unterschiedlichen Punkten des intrazellulären Vesikeltransports beteiligt sind, mittels siRNA-*Knockdown* auf die Sekretion von MIA analysiert (4.6.1). Zusätzlich wurde durch die Expression von dominant negativem Sar1p (Sar1p-H79G) die Vesikelknospung am Endoplasmatischen Reticulum inhibiert (4.6.2).

4.6.1 Analyse der Signalpeptidprozessierung durch siRNA-*Knockdown*

Die Prozessierung des Signalpeptids von MIA wurde analysiert, indem HeLa- und HEK-Zellen zunächst mit verschiedenen siRNAs gegen Rab1A, Rab6A und Rab11A, Proteinen die an unterschiedlichen Punkten des intrazellulären Vesikeltransports eine Rolle spielen, und nach 24 Stunden zusätzlich mit pCMX-PL1-MIA transfiziert wurden.

Die Expression von MIA nimmt sowohl in HeLa- als auch in HEK-Zellen nach Behandlung mit siRab1A und siRab11A leicht zu und ist nach Behandlung mit siRab6A auf etwa 25 % reduziert (Abbildung 42). Die Expressionsanalyse mittels qRT-PCR zeigt zudem eine Reduktion des mRNA-Levels von Rab1A, Rab6A und Rab11A von über 90 % nach Behandlung mit der entsprechenden siRNA in beiden untersuchten Zelllinien (Abbildung 43).

Die Menge an sekretiertem MIA nimmt nach siRNA-Behandlung ab (Abbildung 44). Auffällig ist, dass bereits nach Transfektion mit *scrambled* siRNA (Kontrolle) die MIA-Konzentration im Überstand von 225 ng/ml (HeLa) bzw. 100 ng/ml (HEK) um etwa 50 % abfällt. siRab1- und siRab11-behandelte Zellen geben etwa gleich viel MIA ab wie Kontroll-transfizierte Zellen. Die MIA-Konzentration nach *Knockdown* von Rab6 sinkt zwar deutlicher auf ca. 25 ng/ml (HeLa) bzw. 15 ng/ml ab, allerdings sind bei dieser Behandlung mehr Zellen abgestorben. Der Vergleich der Sekretion von MIA relativ zum mRNA-Level (Abbildung 45) zeigt, dass nach siRNA-Behandlung in HeLa-Zellen etwa 25 % weniger MIA abgegeben wird, als in Kontroll-transfizierten Zellen. Für Rab1 und Rab11 ist dies auch in HEK-Zellen zu beobachten, allerdings steigt hier die relative Sekretion nach Behandlung mit siRab6 sogar leicht an. Insgesamt betrachtet ist durch den *Knockdown* von Rab1, Rab6 und Rab11 kein Effekt auf die Sekretion von MIA zu erkennen.

Die Analyse des Gesamtproteinextrakts mittels Western Blot zeigt, dass sowohl in HeLa- als auch in HEK-Zellen nach Transfektion mit MIA die typischen zwei Banden MIA und MIA* auftreten. Durch die Behandlung mit allen siRNAs nimmt die Intensität von MIA* ab. In HeLa-Zellen scheint

nach Behandlung mit siRab1A und siRab11A zudem eine Bande mittlerer Größe zu entstehen, die jedoch nicht in HEK-Zellen zu erkennen ist. In siRab6A-transfizierten Zellen ist übereinstimmend mit den Expressionsdaten generell nur eine reduzierte Menge von MIA enthalten (Abbildung 46).

Da die hier beschriebenen Experimente nur ein- bis zweimal durchgeführt werden konnten, ist eine Wiederholung geplant, um die gemessenen Effekte zu bestätigen.

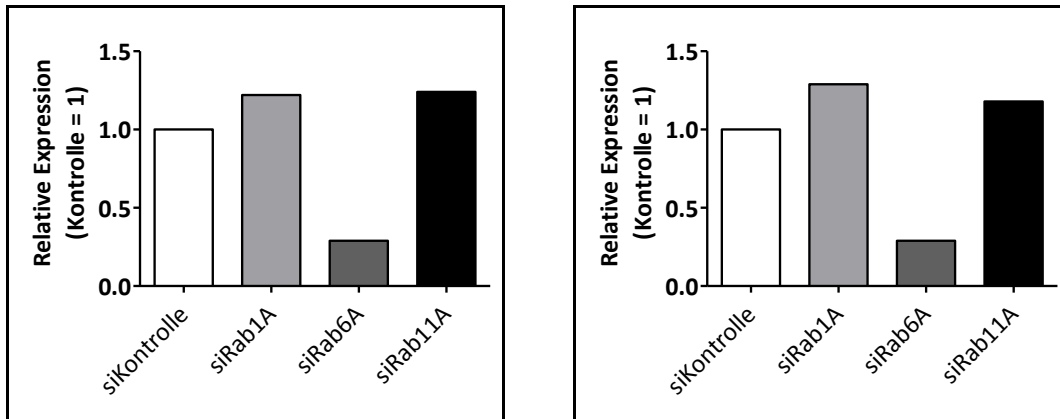


Abbildung 42: Relative Expression von MIA nach siRNA-Behandlung in HeLa- (links) bzw. HEK-Zellen. HeLa- oder HEK-Zellen wurden mit scrambled siRNA (Kontrolle), siRab1A, siRab6A oder siRab11A transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen zusätzlich transient mit pCMX-PL1-MIA transfiziert. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, ihre RNA isoliert und anschließend die relative Expression, im Verhältnis zur Kontrolle, mittels qRT-PCR im LC480 analysiert (n = 1).

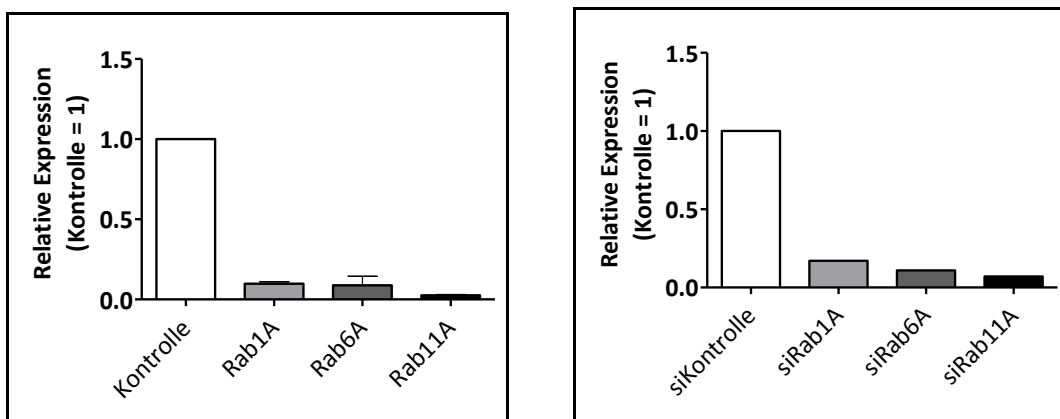


Abbildung 43: Relative Expression von Rab1A, Rab6A bzw. Rab11A nach siRNA-Behandlung in HeLa- bzw. HEK-Zellen. HeLa- oder HEK-Zellen wurden mit scrambled siRNA (Kontrolle), siRab1A, siRab6A oder siRab11A transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen zusätzlich transient mit pCMX-PL1-MIA transfiziert. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, ihre RNA isoliert und anschließend die relative Expression, im Verhältnis zur Kontrolle, mittels qRT-PCR im LC480 analysiert (HeLa n = 2, Mittelwerte \pm SD; HEK n = 1).

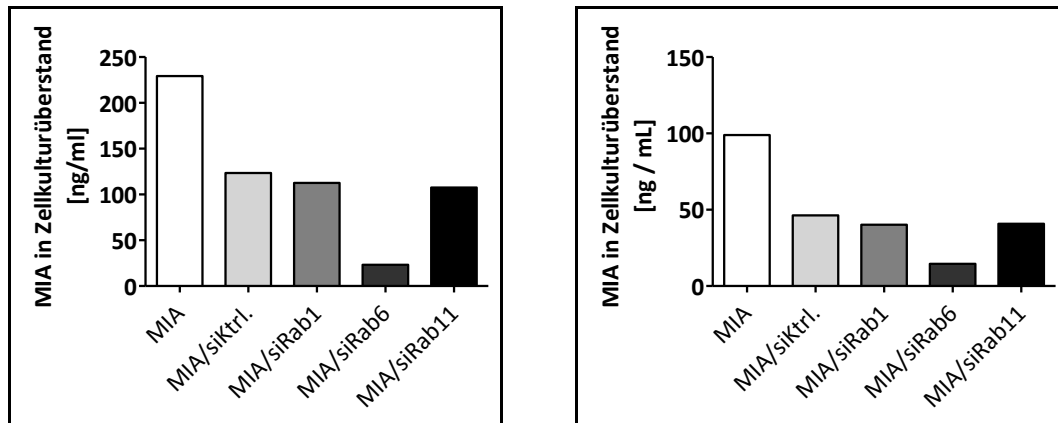


Abbildung 44: Sekretion von MIA nach siRNA-Behandlung in HeLa- bzw. HEK-Zellen. MIA-ELISA der Zellkulturüberstände transfizierter Zellen. Die Überstände wurden 24 Stunden nach Transfektion gesammelt und mittels spezifischem ELISA die abgegebene MIA-Menge quantifiziert (n = 1).

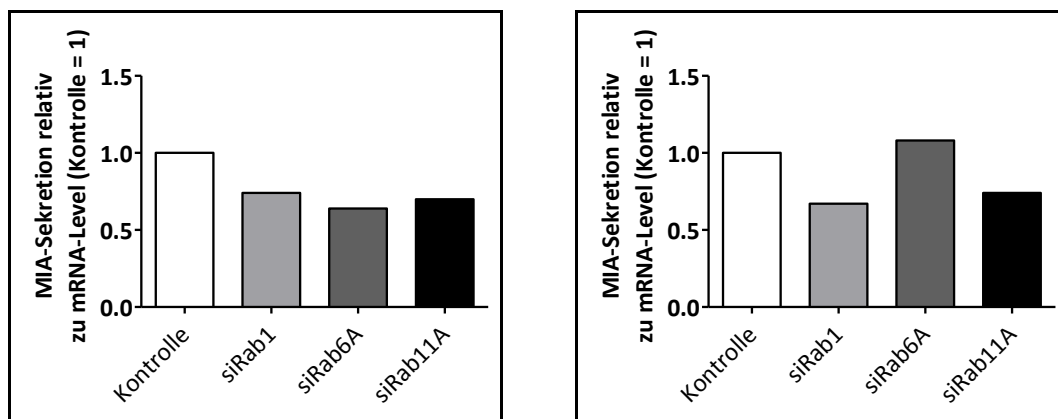


Abbildung 45: Sekretion von MIA relativ zum mRNA-Level in HeLa- bzw. HEK-Zellen. Um die relative Sekretion MIAs zu bestimmen, wurde die mittels ELISA gemessene Konzentration von MIA im Zellkulturüberstand in Bezug auf den via qRT-PCR bestimmten mRNA-Level analysiert (n = 1).

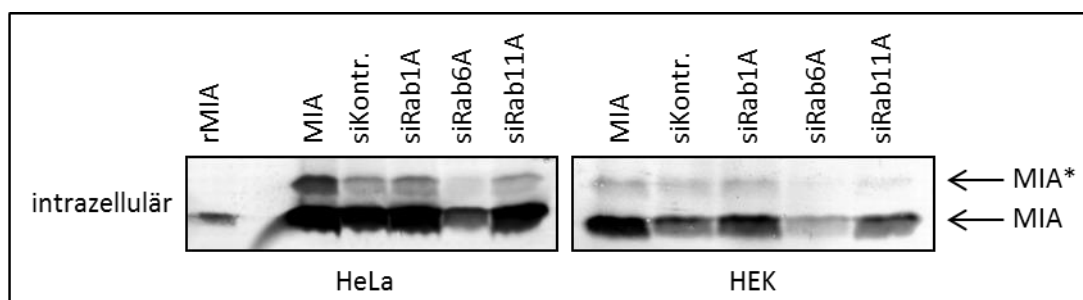


Abbildung 46: Western Blot-Analyse von HeLa- und HEK-Zellen nach siRNA-Behandlung. HeLa- bzw. HEK-Zellen wurden transient mit scrambled siRNA (siKontrolle) bzw. siRNA gegen Rab1A, Rab6A oder Rab11A transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen zusätzlich mit MIA transfiziert. Weitere 24 Stunden später wurden die Zellen geerntet, das Gesamtproteinextrakt isoliert und via Western Blot analysiert (rMIA = rekombinantes MIA; 35 ng).

4.6.2 Analyse der Signalpeptidprozessierung durch Expression von Sar1p-H79G

In einem weiteren Experiment zur Untersuchung der Prozessierung des Signalpeptids von MIA, wurde der intrazelluläre Vesikeltransport durch die Expression von dominant negativem Sar1p (Sar1p-H79G) gestört. Die Expression von Sar1p-H79G verhindert die Abschnürung von Vesikeln aus dem Endoplasmatischen Retikulum und induziert dadurch eine Akkumulation von sekretorischen Proteinen im ER^{8,15,333}.

Für die Analyse wurden HeLa-, HEK- und Mel Ei-Zellen transient mit pCMX-PL1-MIA und pcDNA3-Sar1p-H79G bzw. den entsprechenden Kontrollen ko-transfiziert. Nach 24 Stunden wurde der Zellkulturüberstand gesammelt, die MIA-Konzentration bestimmt und mittels Western Blot analysiert. Ebenfalls wurde das Gesamtproteinextrakt isoliert und via Western Blot das Bandenmuster von MIA untersucht. Aus HEK-Zellen wurde zudem die RNA isoliert, um die Expression und die relative Sekretion von MIA zu bestimmen.

Die Analyse der MIA-Konzentration im Zellkulturüberstand zeigt eine deutliche Reduktion der Sekretion bei gleichzeitiger Expression von Sar1p-H79G in allen drei Zelllinien (Abbildung 47). Die Konzentration sinkt von etwa 70 ng/ml auf 12 ng/ml (HeLa), von 110 ng/ml auf 15 ng/ml (HEK) bzw. von 80 ng/ml auf knapp 40 ng/ml (Mel Ei). Zu berücksichtigen ist allerdings, dass in den beispielhaft analysierten HEK-Zellen die MIA-Expression nach ko-Transfektion mit Sar1p-H79G signifikant vermindert ist (Abbildung 48). Die relative Sekretion ist jedoch trotzdem signifikant reduziert und geht im Vergleich zu Wildtyp MIA um fast 80 % zurück (Abbildung 49).

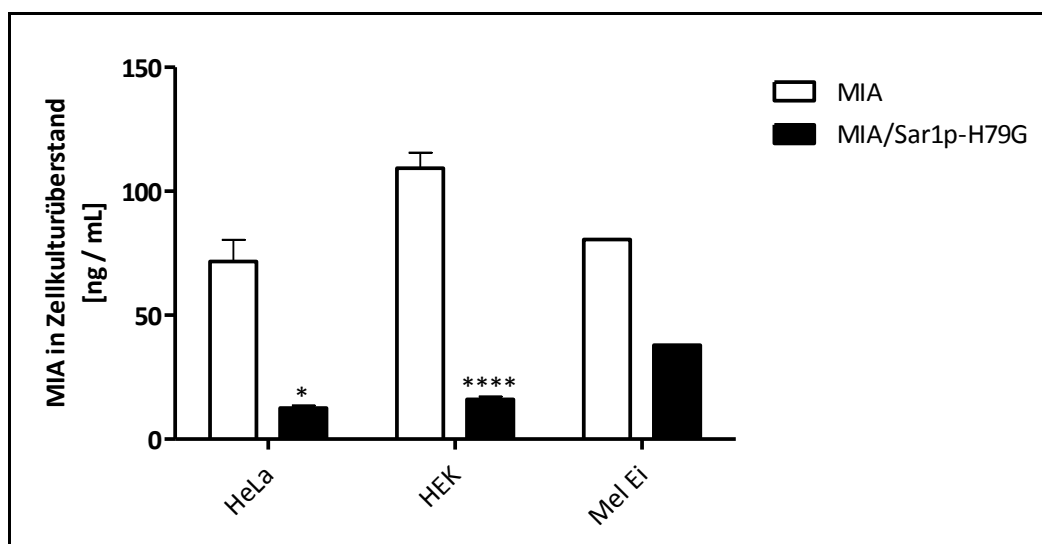


Abbildung 47: MIA-ELISA der Zellkulturüberstände transfizierter Zellen. Die Überstände wurden 24 Stunden nach Transfektion mit MIA bzw. ko-Transfektion mit MIA und dominant negativem Sar1p (Sar1p-H79G) gesammelt und mittels spezifischem ELISA die abgegebene MIA-Menge quantifiziert (HeLa n = 2; HEK n = 3; Mel Ei n = 1).

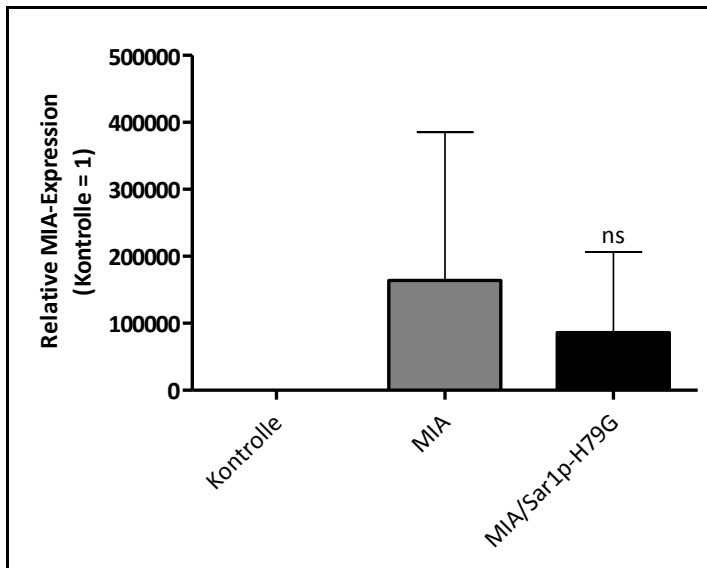


Abbildung 48: Relative Expression von MIA in HEK-Zellen. HEK-Zellen wurden allein mit pCMX-PL1 (Kontrolle) bzw. pCMX-PL1-MIA oder zeitgleich mit pCMX-PL1-MIA und pcDNA3-Sar1p-H79G transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, ihre RNA isoliert und anschließend die relative Expression, im Verhältnis zur Kontrolle, mittels qRT-PCR im LC480 analysiert (Mittelwert \pm SD; ns = nicht signifikant).

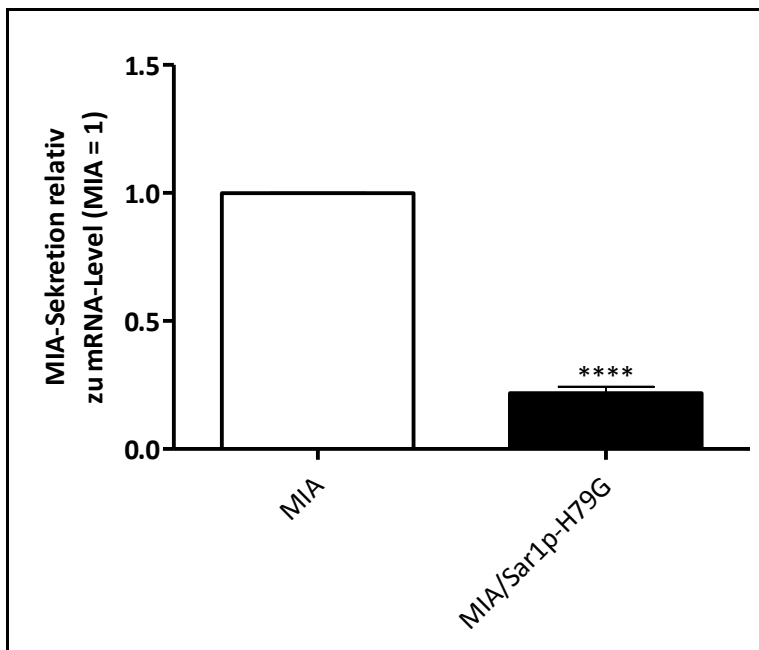


Abbildung 49: Sekretion von MIA relativ zum mRNA-Level in HEK-Zellen. Um die relative Sekretion MIAs zu bestimmen, wurde die mittels ELISA gemessene Konzentration von MIA im Zellkulturüberstand in Bezug auf den via qRT-PCR bestimmten mRNA-Level analysiert (Mittelwerte \pm SD; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).

Die Western Blot Analysen der drei untersuchten Zelllinien sind in Abbildung 50 (HeLa), Abbildung 51 (HEK) und Abbildung 52 (Mel Ei) dargestellt. Nach Transfektion mit MIA ist in allen Zelllinien intrazellulär sowohl das normale MIA als auch MIA* vorzufinden und zudem im Zellkulturüberstand zu finden. Die Ko-Transfektion mit MIA und pcDNA3, dem Leervektor von Sar1p-H79G, verändert das Bandenmuster in keiner der untersuchten Zelllinien und nimmt auch

keinen Einfluss auf das extrazelluläre Vorhandensein von MIA. Nach Ko-Transfektion mit pCMX-PL1-MIA und pcDNA3-Sar1p-H79G ist in HeLa- und HEK-Zellen allerdings kein MIA mehr außerhalb der Zellen zu finden, im Überstand von transfizierten Mel Ei-Zellen kann es aber noch detektiert werden. Des Weiteren wird die MIA*-Bande sowohl in HEK- als auch in Mel Ei-Zellen schwächer. In HeLa-Zellen ist dem hingegen ein anderes Bandenmuster vorzufinden. Hier tritt nach der Ko-Transfektion mit pCMX-PL1-MIA und pcDNA3-Sar1p-H79G neben MIA und MIA* noch eine dritte Bande mittlerer Größe auf.

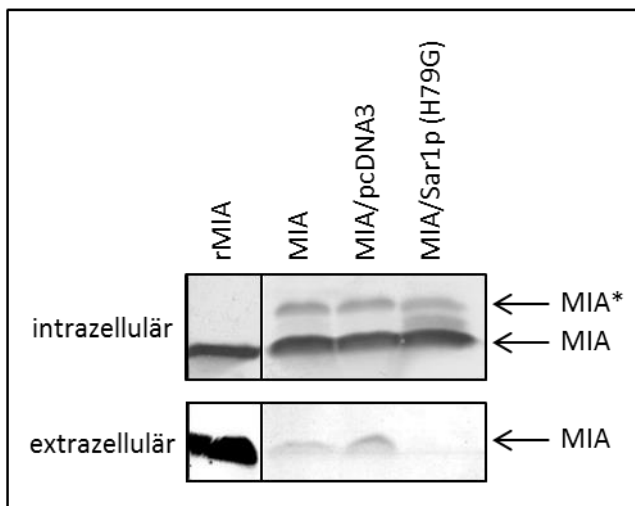


Abbildung 50: Western Blot-Analyse nach Inhibition des intrazellulären Vesikeltransport mit dominant negativem Sar1p in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden transient mit MIA, MIA/pcDNA3 bzw. MIA/Sar1p-H79G transfiziert. Nach 24 Stunden wurde das Gesamtproteinextrakt isoliert und mittels Western Blot analysiert.

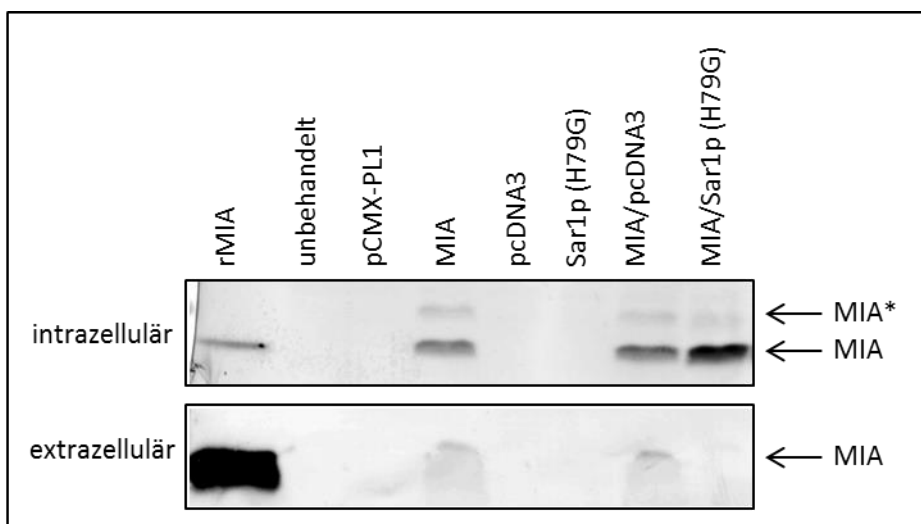


Abbildung 51: Western Blot-Analyse nach Inhibition des intrazellulären Vesikeltransport mit dominant negativem Sar1p in HEK-Zellen. HEK-Zellen wurden transient mit pCMX-PL1, pCMX-PL1-MIA, pcDNA3 Sar1p-H79G, MIA/pcDNA3 bzw. MIA/Sar1p-H79G transfiziert. Nach 24 Stunden wurde das Gesamtproteinextrakt isoliert und mittels Western Blot analysiert.

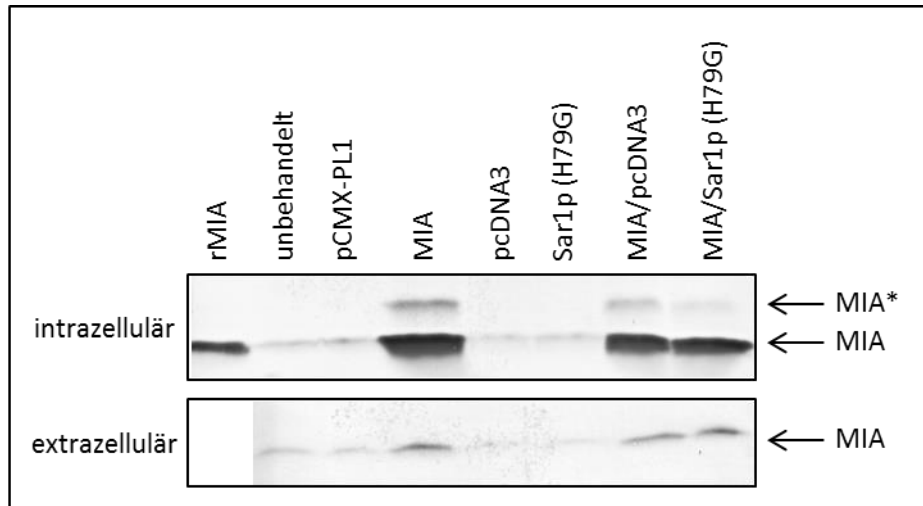


Abbildung 52: Western Blot-Analyse nach Inhibition des intrazellulären Vesikeltransport mit dominant negativem Sar1p in Mel Ei-Zellen. Mel Ei-Zellen wurden transient mit pCMX-PL1, pCMX-PL1-MIA, pcDNA3 Sar1p-H79G, MIA/pcDNA3 bzw. MIA/Sar1p-H79G transfiziert. Nach 24 Stunden wurde das Gesamtproteinextrakt isoliert und mittels Western Blot analysiert.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertation wurde das Protein MIA, welches eine wichtige Rolle bei der Entstehung, Progression und Metastasierung des malignen Melanoms spielt, untersucht³⁶. Aus früheren Studien ist bereits bekannt, dass MIA migrationsabhängig in Vesikeln zum distalen Zellende transportiert wird²⁶³. Hier kommt es zu einer Ca^{2+} -abhängigen Fusion der Vesikel mit der Zellmembran, in deren Folge MIA in den extrazellulären Raum abgegeben wird. Außerhalb der Zelle ist MIA in der Lage Zell-Matrix-Kontakte zu inhibieren⁴⁵. Dadurch fördert MIA das Ablösen der Zellen von der ECM und trägt entscheidend zu einem erhöhten migratorischen Potential der Tumorzellen bei²⁶⁴. Frühere Studien konnten zudem belegen, dass MIA nur als Dimer funktionell aktiv ist²⁶⁵.

5.1 HeLa- und HEK-Zellen als Modellsystem

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Transport und die Sekretion von MIA nicht nur in Melanomzellen, sondern auch in anderen Zelllinien möglich sind. MIA wird nach transienter Transfektion sowohl von HeLa- als auch von HEK-Zellen sekretiert. Zudem konnte eine migrationsabhängige Akkumulation von MIA im hinteren Bereich von HeLa-Zellen beobachtet werden. Eine Analyse der Lokalisation von MIA in HEK-Zellen wurde noch nicht durchgeführt, könnte aber Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

HeLa- und HEK-Zellen sind Zellen, die aus dem Zervix-Karzinom¹⁴⁴ (HeLa) bzw. aus embryonalen Nierenzellen¹¹⁵ (HEK) gewonnen wurden. Diese Zelllinien sind zwar nicht melanozytären Ursprungs, allerdings werden sie sehr oft als Modell-Linien verwendet. HeLa-Zellen beispielsweise sind eines der meist genutzten Modellsysteme für zell- und molekularbiologische Untersuchungen, auch wenn sie im Vergleich zu normalen humanen Geweben eine Vielzahl von fehlregulierten Genen und einen veränderten Chromosomensatz aufweisen¹⁶³. Wichtig für die Verwendung dieser Zelllinien als Modell ist selbstverständlich die Vergleichbarkeit mit Melanomzellen. Die allgemeine Fähigkeit zur Migration und Invasion von HeLa-Zellen wurde schon mehrfach belegt^{53,175,339}. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass diese Migration die Translokation von MIA in den hinteren Zellbereich induziert und dass MIA von HeLa-Zellen sekretiert wird. HeLa-Zellen exprimieren somit nicht nur die für den Transport und die Sekretion notwendigen Proteine, sondern sind auch in der Lage die Information für einen gerichteten Transport zu erkennen und dementsprechend umzusetzen.

Auch die verwendeten HEK-Zellen sind in der Lage zu migrieren²⁸¹ und Proteine zu sekretieren^{35,51}. Die durchgeführten Analysen dieser Arbeit mit HEK-Zellen bestätigen ebenfalls, dass die Sekretion von MIA nach Überexpression auch in dieser Zelllinie möglich ist. Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass die bereits in Melanomzellen beschriebene migrationsabhängige Translokation und Sekretion von MIA²⁶³ auch in nicht melanozytären Zellen beobachtet werden kann. Die an diesen Prozessen beteiligten Proteine und Strukturen werden demnach nicht spezifisch von Melanomzellen gebildet, sondern sind auch in anderen Zellsystemen vorhanden. Daraus kann man schließen, dass die Mechanismen, die den gerichteten Transport von MIA in den hinteren Zellbereich ermöglichen, auch für die Verteilung von anderen Proteinen genutzt werden.

Wie der bereits für Melanomzellen beschriebene und nun auch für HeLa-Zellen belegte migrationsabhängige Transport von MIA zum distalen Zellpol gesteuert wird, ist bis heute noch nicht geklärt. Der gerichtete Transport von Proteinen in Vesikeln ist jedoch kein Einzelfall. In den Axonen und Synapsen des Nervensystems kommt es beispielsweise zu einem sehr genau regulierten Vesikeltransport und der gezielten Abgabe von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt. Der anterograde Transport vom Zellkörper entlang des Axons bis zur Synapse ist also notwendig, um Neurotransmitter an ihre Zielmembranen zu befördern. Der axonale Vesikeltransport wurde im Vergleich zur basolateralen Verteilung von Vesikeln schon sehr gut untersucht. So ist beispielsweise bekannt, dass das Motorprotein KIF1A der Kinesin Superfamilie (KIF) entscheidend am schnellen axonalen Transport beteiligt ist und mit Rab3A, Synaptophysin und Synaptotagmin assoziiert ist^{47,331}. Eine Modulation des Transports wird durch das Zusammenspiel verschiedener Rab-Proteine und deren Effektoren möglich¹⁷. Weitere bekannte Motive für einen apikalen Proteintransport sind unter anderem der GPI-Anker (Glycosyl-phosphatidylinositol)¹⁷⁶, N-Glykane²⁵⁷, O-Glykane³²⁸ und transmembrane Proteinsequenzen¹⁷⁴.

Die Sortierung von Proteinen in den hinteren Zellbereich, wie sie bei MIA auftritt, ist demhingegen ungleich weniger aufgeklärt. Besser als in Melanomzellen ist der Transport von Proteinen in polarisierten Epithelzellen untersucht. Hier ist zum Beispiel bekannt, dass Aquaporine (AQP) unterschiedlich verteilt werden. Während AQP2 apikal transportiert wird, sind AQP3 und AQP4 nur basolateral vorhanden⁵⁰. Für die basolaterale Sortierung scheint oft eine kurze zytoplasmatische Domäne verantwortlich, wie sie unter anderem der LDL-Rezeptor (*low density lipoprotein*)^{55,198,291} oder der Kit-Ligand (KitL)⁸⁰ besitzen. Dieses Strukturmotiv (RNxDxxS/TxxS)³³⁰ ist in MIA allerdings nicht vorhanden. Für den basolateralen Transport von E-Cadherin in Epithelzellen ist beispielsweise Rab11 verantwortlich¹⁷⁹. Als weitere wichtige

Moleküle für den basolateralen Transport wurden unter anderem Rab8, Cdc42 (*cell division control protein 42*) und μ 1B identifiziert^{95,179}. Der genaue Mechanismus dieses Transports konnte bis heute noch nicht aufgeklärt werden, allerdings gibt es Hinweise, dass nicht alle Proteine auf die gleiche Art sortiert werden. So konnten Ang *et al.* schon 2004 zeigen, dass manche Proteine nicht direkt vom Golgi-Apparat, sondern über REs (*recycling endosome*) zur Plasmamembran transportiert werden⁶.

Der gerichtete Transport von Proteinen ist auch in Neuronen wichtig, die ebenfalls eine Gruppe von polarisierten Zellen darstellen. Hier werden spezifische Proteine gezielt in Dendriten oder das Axon transportiert^{130,138}. Für diese Prozesse sind wiederum verschiedene Adapter- und Motorproteine verantwortlich. Rab11 ist in diesem Zelltyp am Transport von beispielsweise Integrin α_9 oder β_1 in den hinteren Bereich des Axons beteiligt⁹⁰. Der genaue Mechanismus bzw. die entscheidenden Proteinstrukturen für Interaktion und Transport konnten bislang allerdings noch nicht aufgeklärt werden, allerdings scheint eine Zusammenspiel mit RCP (*Rab coupling protein*) notwendig⁹⁰. Der Neurotrophinrezeptor TrkB (Tyrosinkinase-Rezeptor B) wiederum benötigt eine Interaktion mit Rab27 um gerichtet im Axon vom Zellkörper zur Synapse transportiert zu werden⁹. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der anterograde axonale Transport von Synaptophysin-positiven Vesikeln in Neuronen eine Beteiligung von Rab33a voraussetzt²⁰⁷.

Der direktionale Proteintransport ist allerdings nicht nur bei stationären Zellen zu beobachten, sondern spielt auch eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der Zellpolarität und der Zellmigration^{76,132,336}. Während der Migration werden beispielsweise Integrine in Vesikeln gerichtet zum vorderen Ende der Zelle transportiert¹²⁶. Auch der Transport von MMPs in Fokalkontakte³¹² oder Invadopien²⁰⁴ erfolgt gerichtet und kann letztendlich das invasive Potential von Tumorzellen erhöhen³²³. Der migrationsabhängige Transport von MIA ist also kein Einzelfall, sondern ist auch bei anderen Proteinen zu beobachten.

Alles in allem zeigen diese Analysen, dass die Sekretion von MIA auch in nicht-Melanomzellen möglich ist und die migrationsabhängige Translokalisierung auch in HeLa-Zellen erfolgt. Erkennung und Transport bzw. Sekretion scheinen also auf einem allgemeinen Mechanismus zu beruhen, der nicht melanomspezifisch ist. So werden auch diverse Proteine, die am intrazellulären Transport von Vesikeln beteiligt sind, von allen untersuchten Zelllinien exprimiert. Zu nennen sind hier insbesondere die Mitglieder der Rab-Proteinfamilie, die an Knospung, Transport und Fusion von Vesikeln beteiligt sind. Je nach Zelltyp können verschiedene Kombinationen von Rab-Proteinen exprimiert werden und je nach Tumorart sind zudem andere

Rab-Proteine fehlreguliert¹¹⁰. Rab7 wird beispielsweise im Lungenkarzinom verstärkt exprimiert²⁰⁶, während im Kolonkarzinom weniger Rab25 gebildet wird²⁰⁸ und im Ovarialkarzinom eine erhöhte Expression von Rab25 festgestellt werden konnte⁶². Diverse Rab-Proteine, wie zum Beispiel Rab7, Rab11 oder Rab27, werden sowohl von Melanomzellen als auch von den hier untersuchten HEK und HeLa-Zellen hergestellt^{22,27,91} und übernehmen wahrscheinlich in den verschiedenen Zelltypen ähnliche Aufgaben. Der gerichtete Transport von MIA kann demnach in allen Zellsystemen beobachtet werden, die die richtige Kombination aus Adapter- und Transportproteinen exprimieren. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bestätigen zudem, dass die untersuchten Zellsysteme die entscheidenden Kriterien erfüllen, um im Weiteren den Transport und die Sekretion von MIA genauer zu untersuchen.

5.2 Identifizierung von MIA mit Signalpeptid

Während der Untersuchungen dieser Arbeit wurde in verschiedenen Western Blots eine Bande detektiert, die als MIA mit nicht gespaltenem Signalpeptid identifiziert werden konnte. Es scheint also möglich, dass MIA zunächst als eine Art Vorläuferprotein synthetisiert wird und das Signalpeptid erst posttranslational abgespalten wird.

Wie bereits unter 2.5.2 beschrieben, erfolgt die Prozessierung klassischer Signalpeptide normalerweise kotranslational. Nach der Erkennung des Signalpeptids durch das SRP stoppt die Translation des Proteins und geht erst nach Abspaltung des Signalpeptids weiter. Wenn diese Art der Prozessierung für MIA zutrifft, hätte in Western Blot-Analysen jedoch nur die Bande des maturen MIA-Proteins auftreten dürfen. Die Analyse zeigt jedoch nach Überexpression von MIA zwei Banden, sowohl in transfizierten HeLa- als auch HEK-Zellen. Des Weiteren konnte diese Bande auch in nicht-transfizierten Mel Ei- und Mel Ju-Zellen nach Anreicherung von MIA mittels Zentrifugationsassay detektiert werden. Dies stellt einen Beweis dar, dass diese MIA-Form auch im natürlichen System ohne experimentelle Überexpression, wenn auch nur zu einem sehr geringen Anteil, vorkommt. Die Untersuchung der beschriebenen Bande mittels LC-MS konnte bestätigen, dass sich MIA in dieser befindet. Ein Nachweis des Signalpeptids *per se* war bislang nicht erfolgreich. Da es sich hierbei allerdings um eine kurze, sehr hydrophobe Aminosäuresequenz handelt, ist der Nachweis über diese Methode besonders schwierig. Die Identifizierung von MIA in der MIA*-Bande stellt aber einen klaren Hinweis dar, dass es sich um eine weitere, bislang noch nicht beschriebene Form von MIA handelt.

Proteine werden oft nicht gleich in ihrer maturen, sondern in Form von Vorläuferproteinen (Präproteinen) synthetisiert. Insbesondere sekretierte Protein wie MIA können in diesem

Zusammenhang erwähnt werden. Die Vorläuferproteine tragen spezifische N-terminale Signale, die für die Sortierung eine wichtige Rolle spielen. Sie bestimmen beispielsweise ob ein Protein in ein spezifisches Kompartiment transportiert oder sekretiert wird. Die Prozessierung dieser Proteine kann dabei in einem oder mehreren Schritten erfolgen. Das N-terminale Signalpeptid von Präproinsulin wird zum Beispiel beim Eintritt des Proteins in das Endoplasmatische Reticulum abgespalten¹⁷⁷. Das entstandene Proinsulin wird daraufhin zum Golgi-Apparat transportiert, wo durch die spezifischen Proprotein-Konvertasen 1 und 2 die C-Kette des Proteins entfernt wird und Insulin seine endgültige Struktur erhält¹²⁴. Ein weiteres Beispiel sind die sekretierten MMPs, die in ihrer Vorläuferform in Vesikeln zur äußeren Zellmembran transportiert werden. Sie hängen während des Transports mit einem Ende in der Vesikelmembran fest. Durch die Vesikelfusion mit der Zellmembran werden die MMPs nicht sofort in den extrazellulären Raum abgegeben, sondern sind noch in der Zellmembran verankert. Erst durch die Abspaltung des membranständigen Teils löst sich das mature MMP von der Mutterzelle²⁹⁷.

Die aufgeführten Beispiele zeigen, dass eine posttranslationale Prozessierung von MIA keinen Einzelfall in der Literatur darstellen würde. Auf den Einfluss des Signalpeptids und dessen Prozessierung wird allerdings erst im weiteren Verlauf dieser Arbeit im Detail eingegangen (5.3 & 5.5).

5.3 Das Signalpeptid ist entscheidend für die Sekretion von MIA

Die Sortierung von Proteinen spielt eine entscheidende Rolle für das Überleben von Zellen. So müssen bestimmte Proteine beispielsweise in den Zellkern, das Endoplasmatische Reticulum, den Golgi-Apparat oder aus der Zelle transportiert werden, um ortsspezifisch ihre Funktion ausüben zu können. Damit diese Proteine von den Zellen richtig erkannt und dann in das entsprechende Kompartiment transportiert bzw. sekretiert werden können, müssen sie in gewisser Weise markiert sein. Für die klassische Sortierung und Sekretion ist dafür ein Signalpeptid verantwortlich.

Das MIA-Protein besitzt eine hydrophobe N-terminale Aminosäuresequenz, die als Signalpeptid fungiert. Die Analysen dieser Arbeit zeigen, dass MIA ohne dieses Signalpeptid nicht sekretiert wird und lassen den Schluss zu, dass die Sekretion auf dem klassischen Transportweg über ER und Golgi-Apparat erfolgt^{194,220,249,258,309,316}. Diese Erkenntnis deckt sich mit den Ergebnissen einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe, die zeigen konnte, dass die Sekretion von MIA durch die Behandlung mit Brefeldin A, einem Stoff der den retrograden Transport vom

Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Reticulum induziert und somit die Sekretion von vesikulär transportierten Proteinen inhibiert, verhindert wird²⁶³. Es gibt allerdings auch Proteine ohne klassisches Signalpeptid, die auf einem unkonventionellen Weg sekretiert werden. Erstmals wurde dieser Mechanismus für Interleukin 1 (IL-1 beta) beschrieben^{201,250}. Mittlerweile sind viele weitere Proteine bekannt, die ER/Golgi-unabhängig sekretiert werden²¹¹. Der Wachstumsfaktor FGF2 ist ein gut beschriebenes Beispiel für diesen Sekretionsweg, aber auch Annexin A2, IL-1 alpha oder Galectine besitzen keine Signalpeptide und werden auf diesem unkonventionellen Weg sekretiert^{154,307}. Da MIA ohne Signalpeptid weder mittels Western Blot, noch ELISA im Überstand transient transfizierter Zellen nachweisbar war, ist eine unkonventionelle Sekretion des Proteins aber unwahrscheinlich. Zudem kann der unkonventionelle Sekretionsweg nicht durch die Hemmung des Transports durch den ER/Golgi-Komplex inhibiert werden, wie es wie bereits erwähnt bei MIA möglich ist²⁶³. Die Analyse von MIA ohne Signalpeptid bestätigt also die Annahme, dass MIA auf dem klassischen Weg sekretiert wird und dass das Signalpeptid für diesen Prozess zwingend notwendig ist.

Die Lokalisation von MIA ohne Signalpeptid in HeLa-Zellen konnte bislang nicht eindeutig definiert werden. Es konnten sowohl migrierende Zellen detektiert werden, in denen MIA hinten, als auch solche, in denen MIA vermehrt vorne vorlag. Wie es zu dieser unterschiedlichen Verteilung kommen kann, ist bislang noch nicht aufgeklärt. Da die Sekretion von MIA durch das Signalpeptid gesteuert wird, könnte man generell davon ausgehen, dass die migrationsabhängige Lokalisation im hinteren Zellbereich ebenfalls durch das Signalpeptid und den damit verbundenen vesikulären Transport ermöglicht wird. Ohne das Signalpeptid würde MIA somit die Fähigkeit zu migrationsabhängigen Translokation in den hinteren Zellbereich verlieren und gleichmäßig im Zytosol vorliegen, wie es auch teilweise beobachtet wurde. Wie es manchmal doch zu einer Akkumulation von MIA ohne Signalpeptid sowohl im hinteren als auch im vorderen Bereich von migrierenden Zellen kommt ist noch unklar. Möglicherweise interagiert MIA mit Proteinen auf der Außenseite bestimmter Vesikel und kann dadurch in der Zelle verteilt werden. Beschrieben wurde bereits der Transport von Proteinen durch sogenannte *signal patches*, 3-dimensionale Strukturen die erst im fertig gefalteten Protein entstehen, ermöglicht wird^{29,326}. Der Transport von Cathepsin B in den Zellkern²⁹ oder die Sekretion von Ovalbumin²⁹⁴ wird beispielsweise auf diese Art gesteuert. Dass MIA ohne Signalpeptid ebenso wie Wildtyp MIA gerichtet in der Zelle transportiert werden zu können scheint, spricht dafür, dass die Lokalisation von MIA nicht allein durch das Signalpeptid, sondern eventuell auch durch andere Strukturen des Proteins mitbestimmt wird. Eine Mutagenese verschiedener Aminosäuren auf der Oberfläche von MIA könnte helfen die Strukturen zu ermitteln, die möglicherweise an der

Sortierung von MIA in spezielle Vesikel und dadurch am gerichteten Transport beteiligt sind. Der alleinige Einfluss des Signalpeptids könnte zudem in weiteren Studien durch die Analyse eines grün fluoreszierenden Proteins, welches N-terminal mit dem Signalpeptid von MIA markiert ist, untersucht werden. Wird die Lokalisation und Sekretion durch das Signalpeptid bestimmt, sollte das MIA-Signal-GFP-Konstrukt in migrierenden Zellen im hinteren Bereich akkumulieren und zudem das GFP sekretiert werden.

5.4 Einfluss der Dimerisierung auf Transport und Sekretion von MIA

Der Einfluss der Dimerisierung auf den gerichteten Transport und die Sekretion von MIA wurde durch die Untersuchung der dimerisierungsunfähigen MIA-G61R-Mutante bestimmt. Die durchgeführten Analysen zeigen, dass der gerichtete Transport und die Sekretion von MIA-Monomeren möglich sind und nicht von der Dimerisierung des Proteins abhängen.

Im Allgemeinen ist es so, dass die Dimerisierung von Proteinen eine entscheidende Rolle für ihre Funktionalität haben kann. So sind beispielsweise die Lipoprotein Lipase³³⁸ oder die Endotheliale Lipase¹¹⁸ nur als Dimere funktionell aktiv. Dies konnte bereits auch für MIA bewiesen werden²⁶⁵. Durch die Untersuchung verschiedener Mutanten konnte eine direkte Verbindung mit der Funktionalität des Proteins hergestellt werden²⁶⁵. Die Analysen zeigten, dass mit nicht-dimerisierungsfähigen MIA-Mutanten behandelte Mel Im-Zellen *in vitro* eine reduzierte funktionelle Aktivität aufweisen. Die Inhibition der Dimerisierung durch den Einsatz des Dodecapeptids AR71 konnte dies bestätigen und zeigte zudem im Mausmodell, dass die intravenöse Behandlung mit AR71 zu einer reduzierten Metastasenbildung führt²⁶⁵. Inwieweit die Dimerisierung von MIA auch eine Rolle für den Transport bzw. die Sekretion spielen könnte, wurde allerdings bislang noch nicht untersucht. Es ist jedoch bereits bekannt, dass für den Transport einiger Proteine deren Dimerisierung notwendig ist. So weist Prenylin beispielsweise eine C-terminale Domäne auf, die notwendig für die Dimerisierung des Proteins ist. Durch Punktmutationen konnte gezeigt werden, dass der Transport von Prenylin vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat nur funktioniert, wenn die Dimerisierung des Proteins erfolgen kann¹⁷³. Die Dimerisierung der Lactase-Phlorizin Hydrolase (LPH) findet ebenfalls im Endoplasmatischen Retikulum statt und ist notwendig für den weiteren Transport des Proteins²⁰³. Die Analyse nicht-dimerisierungsfähiger Mutanten zeigte eine Akkumulation der LPH im ER und schließlich eine Degradation des Proteins. Im Gegensatz dazu zeigen die Untersuchungen dieser Arbeit, dass die Dimerisierung weder die Lokalisation noch die Sekretion von MIA beeinflusst. Die dimerisierungsunfähige MIA-G61R-Mutante ist ebenso wie Wildtyp MIA in migrierenden HeLa-Zellen im hinteren Zellteil lokalisiert und wird sekretiert. Die

Sekretion dieser Mutante ist im Vergleich zu wtMIA sogar erhöht und demonstriert damit eindeutig, dass die Dimerisierung für diese Prozesse nicht notwendig ist.

Die erhöhte Sekretionsrate von MIA-G61R lässt die Vermutung zu, dass die Monomerisierung den Transport oder die spätere Sekretion des Proteins begünstigt. Allgemein werden für die Abgabe von Proteinen aus dem ER zwei verschiedene Mechanismen postuliert, die wahrscheinlich beide zeitgleich ablaufen. Neben der ungerichteten Abschnürung von Vesikeln mit ihrer Fracht nach dem Prinzip des Massenstroms (*bulk flow*)³¹⁷, der sowohl monomeres als auch dimeres MIA transportieren würde, kommt es ebenso zur Konzentrierung bestimmter Proteinen im ER bevor sie weiter zum Golgi-Apparat gelangen^{13,196}. Es gibt also ebenfalls Vesikel, die Proteine mit entsprechenden Motiven erkennen und bevorzugt transportieren²¹². Wenn MIA ein solches Signal besitzt, und dieses möglicherweise durch eine bereits im ER auftretende Dimerisierung verdeckt sein würde, könnte dies zu einer geringeren Sekretion von Wildtyp MIA im Vergleich zu dimerisierungsunfähigen Formen kommen. Da MIA *Head-to-Tail*-Dimere bildet, müsste zwar eine Erkennungsstelle stets zugänglich bleiben, allerdings könnte durch die Dimerisierung der Prozess insgesamt gestört sein. Wo in der Zelle genau die Dimerisierung von MIA stattfinden kann und ob der intrazelluläre Transport nur als Monomer oder auch als Dimer möglich ist, ist bis heute auch noch nicht aufgeklärt und könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

5.5 Prozessierung des Signalpeptids von MIA

Die bisherigen Analysen dieser Arbeit zeigen, dass die Dimerisierung nicht entscheidend für den Transport und die Sekretion von MIA ist, aber dass eine Sekretion ohne das Signalpeptid nicht möglich ist. Um weitere Erkenntnisse über die Funktion und die Prozessierung des Signalpeptids zu erhalten, wurden deshalb verschiedene MIA-Mutanten analysiert. Durch die Untersuchungen konnten Mutationen identifiziert werden, die das unter 4.1.3 beschriebene Bandenmuster aus MIA und MIA* sowie die Sekretion nicht beeinflussen, als auch Mutationen, die eine Veränderung des Bandenmusters bewirkten und einen Stopp der Sekretion zur Folge hatten. Die Sekretion von MIA ist demnach durch das Signalpeptid modulierbar. Interessanterweise hatten die Mutationen jedoch keinen Einfluss auf die migrationsabhängige Akkumulation von MIA im hinteren Zellbereich, selbst wenn sie die Sekretion des Proteins verhinderten. Darüber hinaus konnten durch die Analyse von MIA mit dem Signalpeptid von E-Cadherin und die Modulation des intrazellulären Vesikeltransports Hinweise gefunden werden, dass die Prozessierung des Signalpeptids möglicherweise in zwei Schritten erfolgt.

Die Prozessierung bzw. Spaltung eines typischen Signalpeptids findet wie beschrieben normalerweise während der Translation des Proteins ins Lumen des ERs statt. Je nach Struktur kann das Signalpeptid allerdings auch in der Membran des Endoplasmatischen Reticulums verankert bleiben, ohne dass es von einer Signalpeptidase (SPase) abgeschnitten wird. Dies ist beispielsweise bei Transmembranproteinen beschrieben²³³.

Dass Western Blot Analysen nach Überexpression sowohl Wildtyp MIA mit Signalpeptid als auch ohne Signalpeptid aufweisen, ist ein Indiz dafür, dass die Spaltung des Signalpeptids nicht kotranslational stattfindet. Durch die Anreicherung von MIA mittels Zentrifugationsassay konnte zudem bestätigt werden, dass auch im natürlichen System eine geringe Menge MIA mit nicht gespaltenem Signalpeptid vorliegt. Eine mögliche Erklärung für das Auftreten dieser MIA-Form ist, dass die Translokation von MIA ins Endoplasmatische Reticulum posttranslational erfolgt. Auf diese Weise könnte sowohl MIA mit Signalpeptid als auch MIA ohne Signalpeptid detektiert werden. Gegen diese Theorie spricht allerdings, dass Signalpeptide für eine posttranslationale Translokation im Vergleich zu normalen Signalpeptiden weniger hydrophob sind^{84,210} und das Signalpeptid von MIA jedoch einen sehr hydrophoben Kernbereich besitzt (Aminosäuresequenz: LGVILL). Zudem sind Vorläuferproteine, die posttranskriptionell ins ER transportiert werden, normalerweise weniger als 75 Aminosäuren lang²⁶¹, wie es beispielsweise bei Melittin²⁰² oder GLa (*peptide with amino-terminal glycine and carboxyl-terminal leucinamide*)²⁶² zu beobachten ist. MIA besteht demhingegen aus 131 Aminosäuren und scheint daher nicht dieses Kriterium zu erfüllen. Die Struktur des Signalpeptids und die Größe von MIA sprechen also dafür, dass die Translokation ins ER kotranslational stattfindet. Demnach müsste das Vorhandensein von MIA mit Signalpeptid durch eine posttranslationale Spaltung des Signalpeptids erklärt werden. Für die Spaltung membranständiger Proteine oder Signalpeptide sind verschiedene Intramembranproteasen verantwortlich. Das besondere an diesen Proteasen ist, dass ihr aktives Zentrum im Inneren der Zellmembran liegt. Prinzipiell werden Site-2 Proteasen (S2P)⁵⁹, Rhomboidasen¹²¹, Presenilin¹⁷⁰, Signalpeptidpeptidasen (*signal peptide peptidase*, SPP)¹⁰⁹ und SPP-ähnliche (SPPL)⁹⁹ unterschieden³²¹. Die Rhomboidasen stellen eine Gruppe von Serinproteasen dar, die zuerst in der Fruchtfliege entdeckt wurden. Diese Gruppe von Intramembranproteasen besitzt sieben Transmembranregionen und kommt hauptsächlich im Golgi-Apparat vor³⁰⁴. Sie sind beispielsweise für die Aktivierung von Spitz, einem EGF-ähnlichen Protein, verantwortlich und induzieren durch die Prozessierung dessen Sekretion. Neue Erkenntnisse weisen darauf hin, dass Rhomboidasen auch in der Zellmembran vorkommen und sie in Tumorzellen verstärkt exprimiert sein können^{1,89,341}. RHBDL2 (*Rhomboid-like protein 2*) ist beispielsweise in der Lage EGF nach der Transmembrandomäne zu schneiden und dadurch

dessen Sekretion zu ermöglichen². Dies führt zu einer gesteigerten Aktivierung der EGF-Rezeptoren und somit der Signalweiterleitung von Wachstumsfaktoren. Es gibt allerdings auch ER-ständige Rhomboidasen, die offenbar gemeinsam mit den eng verwandten iRhoms, welche kein aktives Zentrum besitzen, an der ER-assoziierte Degradation (ERAD) von Proteinen beteiligt sind^{94,117}. Eine weitere Gruppe von Proteasen, die nach dem Endoplasmatischen Reticulum aktiv sein können, sind die Proprotein Konvertasen. Ein bekanntes Beispiel dieser Gruppe ist Furin, welches unter anderem MT1-MMP, den TGF-beta 1 Vorläufer oder den Willebrand Faktor aktivieren kann^{12,160,237,320}. Furin kommt sowohl im Golgi-Apparat als auch in der Zellmembran vor und kann die Invasivität von Tumorzellen, durch eine gesteigerte Prozessierung von Tumor-assoziierten Proproteinen, erhöhen¹¹. Diese Vielzahl an beschriebenen Intramembranproteasen könnte prinzipiell für eine posttranslationale Prozessierung des Signalpeptids von MIA in verschiedenen Kompartimenten der Zelle verantwortlich sein. Eine posttranslationale Prozessierung des Signalpeptids im ER wurde beispielsweise für HIV-1 gp120 beschrieben^{171,172}, scheint aber nur bei posttranslational translozierten Proteinen vorzukommen.

Durch die Mutagenese des Signalpeptids konnten verschiedene Aminosäuren identifiziert werden, die die Prozessierung des Signalpeptids modulieren und teilweise Einfluss auf die Sekretion von MIA nehmen. Eine mögliche Erklärung für die veränderten Bandenmuster wäre, dass die Prozessierung des Signalpeptids manchmal fehlerhaft ist. Die Mutationen könnten möglicherweise die Erkennung der Spaltsequenz durch ER-membranständige Signalpeptidasen beeinflussen, wodurch ein verändertes Schnittmuster induziert wird, wie es für verschiedene Mutanten durch die *in silico*-Analyse mittels SignalP (4.4) bereits vorausgesagt wurde. Anstatt einer vollständigen Prozessierung des Signalpeptids könnte beispielsweise nur ein Teil des Peptids entfernt werden, was sich im Auftreten der mittleren Bande widerspiegeln würde. Je nach Mutation könnte die Erkennung und Spaltung des Signalpeptids teilweise, wie beispielsweise bei MIA-F17D, oder ganz, wie bei MIA-V22D, beeinflusst werden. Eine einzige mittelgroße Bande (MIA-V22D) würde demnach auf eine immer falsche Spaltung zurückzuführen sein und das Auftreten von drei Banden (MIA-F17D) auf eine nur eingeschränkt richtige Prozessierung hinweisen. Warum bei Auftreten der mittleren Bande jedoch fast immer kein MIA mit Signalpeptid mehr gefunden werden konnte ist noch unklar. Eventuell wird das Signalpeptid bei diesen Mutanten ausschließlich kotranslational entfernt, weshalb kein MIA mit Signalpeptid detektiert werden kann. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Prozessierung dieser Mutanten besser funktioniert, und deshalb keine Akkumulation von MIA* im ER auftritt oder dass die Syntheserate dieser Mutanten verringert ist und das System deshalb nicht überladen ist. Gegen den letzten Punkt spricht allerdings, dass sich die Expression und

Proteinmenge in den Analysen nicht von den normal prozessierten Mutanten unterscheidet. Die Mutationen könnten allerdings auch die Erkennung des Signalpeptids durch das SRP verhindern. Dadurch würde die Synthese von MIA komplett im Zytosol stattfinden und somit die Sekretion über den klassischen ER/Golgi-Komplex ausschließen. Diese Theorie erklärt zwar warum verschiedene Mutanten nicht mehr sekretiert werden können, allerdings sollte es nicht zu einer Verschiebung des Bandenmusters in detektierter Art kommen. Wenn MIA nicht mehr ins ER transportiert wird, sollte nur eine einzige MIA-Bande detektierbar sein, die der Größe von MIA* entspricht. Die Analyse zeigte jedoch eine mittelgroße Bande und widerspricht somit dieser Idee. Die drei Banden von MIA-F17D stellen darüber hinaus einen ersten Hinweis dar, dass die Spaltung des Signalpeptids unter Umständen auch in zwei aufeinander folgenden Schritten erfolgen könnte. Auf diese Theorie wird später nochmals genauer eingegangen. Auffälligerweise hat keine Mutation die migrationsabhängige Akkumulation von MIA im hinteren Zellbereich beeinflusst, selbst wenn die Mutanten nicht mehr sekretiert wurden. Dies ist ein Indiz dafür, dass der gerichtete Transport von MIA nicht durch das Signalpeptid definiert wird, sondern dieses nur eine Rolle für die Sekretion des Proteins spielt.

Weitere Hinweise auf die Prozessierung und den gerichteten Transport von MIA konnten die Analysen von E-CAD-MIA liefern. E-Cadherin besitzt ebenso wie MIA ein N-terminales Signalpeptid, welches den Transport ins Endoplasmatische Reticulum steuert. E-Cadherin wird zunächst als 140 kDA großes Proprotein synthetisiert und erst im Golgi-Apparat seine N-terminale Pro-Region durch Proprotein Konvertasen abgespalten und damit in seine aktive Form überführt^{190,229}. E-Cadherin wird dann ungerichtet von den Zellen zur äußeren Zellmembran transportiert und ist somit überall in der Zellmembran zu finden²⁸⁷. Die Analyse des chimären E-CAD-MIA-Proteins, bestehend aus dem Signalpeptid von E-Cadherin und dem maturen MIA-Protein, zeigt eine Akkumulation von E-CAD-MIA im hinteren Teil von migrierenden HeLa-Zellen und deutet damit an, dass das Signalpeptid von E-Cadherin entgegen den Erwartungen nicht den gerichteten Transport beeinflusst. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Information für den gerichteten Transport von MIA im maturen Protein kodiert sein könnte. Die Analyse des Bandenmusters von E-CAD-MIA zeigt in allen getesteten Zelllinien drei verschiedene Banden, die MIA, MIA* und einem Protein mittlerer Größe entsprechen. Dies könnte einerseits bedeuten, dass die Prozessierung dieses Signalpeptids in zwei Schritten erfolgt, oder andererseits, dass die Spaltstelle mit dem nachgeschalteten MIA-Protein nicht eindeutig von den Signalpeptid Peptidasen erkannt werden kann und somit ein gewisser Teil der Mutanten falsch geschnitten wird und dadurch die Bande mittlerer Größe entsteht. Die

Sekretion von E-CAD-MIA ist im Vergleich zu Wildtyp MIA zwar reduziert, allerdings wird MIA immer noch sekretiert.

Eine Prozessierung des Signalpeptids in zwei Schritten, wie sie aus den Beobachtungen von HeLa-Zellen postuliert werden kann, wurde für das Endoplasmatische Reticulum noch nicht dokumentiert. Es ist allerdings bekannt, dass zum Beispiel von dem Signalpeptid von OTC (Ornithin-Transcarbamylase) beim Eintritt in ein Mitochondrium zunächst die ersten 24 Aminosäuren und erst später nochmals 8 Aminosäuren entfernt werden²⁹³. Die Prozessierung des Signalpeptids von MDH (Malatdehydrogenase) erfolgt ebenfalls in zwei Schritten²⁹². Generell ist die Prozessierung eines Signalpeptids in zwei Schritten also durchaus möglich. Da die Analyse der verschiedenen Mutanten kein klares Bild über die Spaltung des Signalpeptids liefern konnte, wurden im weiteren Verlauf verschiedene Methoden zur Eingrenzung der Prozessierung getestet. Zunächst wurde durch den Einsatz von verschiedenen Proteaseinhibitoren versucht, die Prozessierung von MIA zu unterdrücken. Dies scheiterte jedoch aufgrund der hohen Toxizität der Inhibitoren. In einem weiteren Schritt sollte überprüft werden, ob das Signalpeptid evtl. im Golgi-Apparat durch die bereits beschriebenen Rhomboidasen prozessiert wird. Die Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren führte allerdings ebenfalls nicht zu einem Ergebnis, da entweder durch kurze Behandlungszeiten keine Effekte auftraten oder die Zellen bei steigender Behandlungszeit starben (Daten nicht gezeigt). Anstatt die Proteasen zu inhibieren, wurde deshalb der intrazelluläre Vesikeltransport moduliert. Dadurch sollte insbesondere die Frage beantwortet werden, ob das Signalpeptid von MIA schon im ER oder erst später abgespalten wird. Kommerziell erwerbliche Inhibitoren des Golgi-Transports beruhen auf einem Zerfall dessen und der Rückwandlung zum Endoplasmatischen Reticulum. Durch den Einsatz dieser Chemikalien werden somit auch alle Golgi-spezifischen Enzyme ins ER zurückgebracht, weshalb sich diese Inhibitoren nicht für unsere Untersuchungen eigneten. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit direkt verschiedene Proteine manipuliert, die am intrazellulären Vesikeltransport beteiligt sind. Ziel war es, durch die Inhibition des vesikulären Proteintransports vom ER zum Golgi-Apparat, des intra-Golgi bzw. des Golgi-Zellmembran Transports, den genauen Ort der Prozessierung des Signalpeptids von MIA zu definieren. Im Zuge dessen wurden verschiedene Rab-Proteine analysiert. Insbesondere wurde der Einfluss von Rab1A, Rab6A und Rab11A auf den Transport von MIA untersucht. Rab1 ist notwendig für den anterograden Transport von Vesikeln vom Endoplasmatischen Reticulum zum Golgi-Apparat^{17,337}. Dementgegen ist Rab6 am retrograden Transport vom Golgi zum ER beteiligt²¹⁴. Für Rab11 wurde beschrieben, dass es an der basolateralen Sortierung von E-Cadherin¹⁷⁹ und des VSV G Proteins (*vesicular stomatitis virus*)⁶⁰

beteiligt ist und notwendig für den Transport der Vesikel vom Golgi-Apparat zur Zellmembran ist.

Die Untersuchungen dieser Arbeit konnten keinen direkten Einfluss der oben genannten Rab-Proteine auf die Sekretion von MIA nachweisen. Die Prozessierung des Signalpeptids wird in HeLa-Zellen, jedoch nicht in HEK-Zellen, durch den *Knock-down* von Rab1 und Rab11 beeinflusst. Hier entsteht jeweils zusätzlich zu MIA und MIA* eine Bande mittlerer Größe. Die Manipulation von Rab1 sollte zu einer Anreicherung von MIA im ER und der *Knock-down* von Rab11 zu einer Akkumulation im Golgi-Apparat führen. Dass die mittlere MIA-Bande schon nach der Behandlung mit siRNA gegen Rab1 auftritt, ist ein Indiz dafür, dass die Prozessierung des Signalpeptids von MIA in zwei Schritten ablaufen könnte, wobei die erste Prozessierung bereits im ER auftritt. Das Auftreten der Bande durch Manipulation von Rab11 könnte dafür sprechen, dass MIA nach der ersten Prozessierung zum Golgi-Apparat weiter transportiert wird, aber erst beim Austritt aus diesem oder zu einem noch späteren Zeitpunkt das Signalpeptid komplett entfernt wird. Da MIA nach jedem *Knock-down* allerdings immer noch sekretiert wird und der Großteil des Proteins komplett prozessiert in den Proteinextrakten gefunden werden kann, scheinen definitiv noch andere Proteine als Rab1 und Rab11 am Transport von MIA beteiligt zu sein. Das Auftreten der mittleren Bande konnte ebenfalls nach Expression von dominant negativem Sar1p (Sar1p-H79G) beobachtet werden. Dies sollte zu einer Akkumulation von MIA im Endoplasmatischen Retikulum führen, da durch den Verlust von Sar1p keine Vesikel mehr aus dem ER abknospen können. Dass MIA bei jedoch gleichzeitiger Expression von Sar1p-H79G weiterhin schwach sekretiert wird, ist vermutlich dadurch zu erklären, dass keine hundertprozentige Transfektionseffizienz vorlag und somit einige Zellen immer noch funktionell aktives Sar1p exprimieren. Durch die Expression konnte jedoch erneut in HeLa-Zellen eine MIA-Bande mittlerer Größe erzeugt werden, wie sie auch nach dem Ausschalten von Rab1 zu beobachten ist. Die Inhibition der Vesikelabknosung aus dem ER geht also in beiden Fällen mit der Entstehung einer mittlgroßen MIA-Bande einher. Dieses Ergebnis bekräftigt somit die Annahme, dass die Prozessierung von MIA in zwei Schritten erfolgt. In HEK- und Mel Ei-Zellen nimmt durch gleichzeitige Expression von MIA und Sar1p-H79G die Menge an prozessiertem MIA zu, ohne dass eine mittlere Bande auftritt.

Die Zunahme an prozessiertem MIA resultiert wahrscheinlich daraus, dass MIA zwar von den Zellen prozessiert aber nicht mehr sekretiert wird. Warum allerdings in diesen Zelllinien keine mittlere Bande auftritt, ist noch unklar und soll Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

5.6 Fazit

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung von MIA keinen Einfluss auf den migrationsabhängigen Transport in den hinteren Zellbereich hat und nicht notwendig für die Sekretion des Proteins ist. Für diese ist jedoch das Signalpeptid zwingend erforderlich. Des Weiteren konnten verschiedene Aminosäuren identifiziert werden, die für eine korrekte Prozessierung des Signalpeptids und die Sekretion von MIA wichtig sind, jedoch nicht dessen Lokalisation beeinflussen. Zudem gibt es verschiedene Hinweise, dass die Spaltung des Signalpeptids nicht kotranslational sondern erst später und möglicherweise in zwei Schritten erfolgt. Dies konnte allerdings nicht vollständig aufgeklärt werden und bleibt daher Gegenstand weiterer Untersuchungen. Die migrationsabhängige Akkumulation von MIA im hinteren Zellbereich scheint darüber hinaus im maturen Protein kodiert zu sein und nicht wie bislang angenommen allein durch das Signalpeptid bestimmt zu werden.

6 Material und Methoden

6.1 Materialien

6.1.1 Allgemeine Materialien

BD Discovery Labware Falcon™, Boston, USA	Einmalartikel für Zellkultur, Polystyrene Round-Bottom Tubes
	4-Chamber-Slide Kammer für Immunfluoreszenz
Behrens, Hamburg	Agar
Bio-Rad, München	Immun-Blot™ PVDF Membran, Precision Plus Protein™ Standard Kaleidoscope™
BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, USA	SeaKern® LE Agarose
Biozym Scientific GmbH, Oldendorf	Biozym LE Agarose
Braun, Frankfurt am Main	Aqua injectable
Carl Zeiss, München-Hallbergmoos	AxioCam, MR Grab Software
GE Healthcare, Buckinghamshire, England	Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System, Amersham Hyperfilm™ Protein G Sepharose™
GraphPad Software Inc., San Diego , USA	GraphPad Prism 5.04 Software
Invitrogen, Carlsbad, USA	Alexa Fluor® 594 goat anti-rabbit

	BCIP/NBT-Lösung Digitonin (5 %) Lipofectamine Plus™ Reagent, SuperScript™ II Reverse Transcriptase Kit, Ready-Load™ 100bp und 1 kb DNA Ladder, TOPO® TA Cloning Kit Dual Promoter SilverQuest™ Silver Staining Kit
J. T. Baker, Griesheim	Ethanol, Methanol und alle nicht weiter aufgeführten flüssigen Chemikalien
New England Biolabs, Ipswich, USA	Restriktionsendonukleasen, NEB Puffer für Restriktionsenzyme, T4 DNA Ligase, Antarktische Phosphatase, NEB DH10-beta competent <i>E.coli</i> dam ⁻ /dmc ⁻ competent <i>E. coli</i>
PAA Laboratories Inc., Dartmouth, USA	Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM), Phosphate Buffered Saline (PBS) RPMI 1640
PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach	Fötales Kälberserum (FKS), Penicillin/Streptomycin
Pierce/Peribo Science, Bonn	BCA Protein Assay Kit
Qiagen, Hilden	HiSpeed™ Plasmid Midi Kit, QIAquick® Gel Extraction Kit, HiPerFect Transfection Reagent, siRNAs

Roche Diagnostics, Mannheim	Taq [®] -DNA Polymerase, RNase A, dN ₆ -Primer, LightCycler [®] 480 SYBR Green I Master, Ethidiumbromid MIA-ELISA
Roth, Karlsruhe	Roti [®] Load1 4x denaturierend
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	Alle nicht aufgeführten Chemikalien in Pulverform in <i>p.a.</i> Qualität Acrylamid 40 % Lösung, Ampicillin, Bromphenolblau, BSA, DMSO, DTT, TEMED, SDS, Tween-20, Trypsin
TaKaRa Bio INC., Shiga, Japan	SYBR [®] Premix Ex Taq [™] (Perfect Real Time)
Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA	Vectashield [®] Mounting Medium with DAPI
VWR, Darmstadt	96-well Platten für BCA-Messungen, Lab- Tek [™] Chamber Slides
Whatman International Ltd., Maldstode, England	Whatman 3MM Filterpapier,

6.1.2 Geräte

Autoklaven

Tuttnauer/Systec, Wetztenberg	Tischautoklav Modell 2540 EL, Autoklav 2540 EK
-------------------------------	---

Blotapparaturen

Bio-Rad Laboratories GmbH, München	Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell
------------------------------------	---------------------------------------

Brutschränke

Heraeus, Hanau	Zellinkubator CO ₂ -Auto Zero, Begasungsbrutschrank BB6220, CO ₂ -Inkubator HeraCell 240
----------------	--

Gelelektrophoreseapparaturen

Bio-Rad Laboratories GmbH, München	Wide Mini Sub® Cell GT
------------------------------------	------------------------

Heiz- und Kühlblöcke

Eppendorf, Hamburg	Thermomixer 5436, Thermomixer comfort, Thermomixer compact
--------------------	--

Mikroskope

Carl Zeiss, Jena	Axiovert 10, Axiovert 200, Axio Imager Zeiss Z1 Fluoreszenzmikroskop
------------------	---

Leica Microsystems CMS GmbH, Bensheim	DM IL Type 090-135.001
---------------------------------------	------------------------

Spannungsgeräte

Bio-Rad Laboratories GmbH, München	PowerPac basic, PowerPac HC
------------------------------------	--------------------------------

GE Healthcare Life Science, Freiburg

Electrophoresis Power Supply 1001,
Electrophoresis Power Supply 301

Sterilwerkbenke

Heraeus, Hanau

LaminAir HB 2448
HeraSafe KS 18

Thermocycler

Roche Diagnostics, Mannheim

LightCycler® 480

Waagen

Sartorius, Göttingen

R160P,
L2200S

Zentrifugen

Eppendorf, Hamburg

MiniSpin Plus,
Centrifuge 5810R

Heraeus, Hanau

Biofuge 13,
Biofuge 22R,
Megafuge 1.0

Kisker, Steinfurt

Tischzentrifuge

Roche Diagnostics, Mannheim

LC Carousel Centrifuge

Sonstige Geräte

BD Bioscience, San Jose, USA

Durchflusszytometer FACSCanto™ II

Bühler, Edmund, Tübingen

Schüttler SM25

Heidolph, Kelheim

Magnetrührer MR2000,

	Magnetrührer MR2002 Vortexer REAX 2000
IKA-Labortechnik, Staufen	Schüttler IKA-Vibrax VXR
MWG Biotech, Ebersberg	ELISA-Reader Emax Geldokumentationssystem 2001i
Peglab Biotechnologie GmbH, Erlangen	Nanodrop® ND1000 UV/Vis Spektralphotometer, Nanodrop® ND2000 UV/Vis Spektralphotometer
Savant, New York, USA	Speedvac Concentrator SC 110
WTW, Weilheim	pH-Meter pH522

6.1.3 Bakterien

Bezeichnung	Genotyp
dam⁻/dmc⁻ Competente <i>E. coli</i> K12-Bakterienstamm (NEB, C2925)	<i>ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10) Tet^S endA1 rpsL136 (Str^R) dam13::Tn9 (Cam^R) xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2</i>
DH10-beta™ <i>E. coli</i> (High Efficiency) K12-Bakterienstamm (NEB, C3019)	<i>araD139 Δ(ara-leu)7697 fhuA lacX74 galK (φ80 Δ(lacZ)M15) mcrA galU recA1 endA1 nupG rpsL (Str^R) Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i>
XL1-Blue Superkompetente <i>E. coli</i> (Agilent, 200236) (QuickChange II)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>
XL2-Blue Ultracompetent MRF' cells (Stratagene, 200151)	<i>Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)Amy Cam^r]</i>
TOP10F' (TOPO-Cloning)	<i>F' [lacI^q Tn10 (Tet^R)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>

6.1.4 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
HEK-293	Humane embryonale Nierenzelllinie
HeLa	Humane epitheliale Zervixkarzinomzelllinie
Mel Ei	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Im	Humane Melanomzelllinie aus Melanommetastase
Mel Ju	Humane Melanomzelllinie aus Melanommetastase
Mel Juso	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor (DSMZ-Nr. ACC74)
SkMel 28	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor (ATCC-Nr. HTB-72)

6.1.5 Vektoren

pCMX-PL1

Das pCMX-PL1 Plasmid wird zu Expression von Genen in Säugerzellen verwendet. Die verschiedenen MIA-Mutanten wurden in diesem Vektor kloniert.

pEGFP-N1

Die Klonierung in den pEGFP-Vektor erlaubt die Verknüpfung eines Proteins mit einem grün fluoreszierenden Protein (GFP). Bei der Expression wird das entsprechende Protein mit C-terminal gekoppeltem GFP translatiert und ermöglicht so die Visualisierung im Fluoreszenzmikroskop.

phMGFP

Die Klonierung in den phMGFP-Vektor (Promega) erlaubt die Verknüpfung eines Proteins mit einem grün fluoreszierenden Protein (GFP). Bei der Expression wird das entsprechende Protein mit C-terminal gekoppeltem GFP translatiert und ermöglicht so die Visualisierung im Fluoreszenzmikroskop.

pcDNA3

Zur konstitutiven Expression von Genen in Säugerzellen kann das pcDNA3 Plasmid (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet werden.

pCRII-TOPO

Die Klonierung in TOPO-Plasmide (Invitrogen, Carlsbad, USA) erlaubt es, PCR Produkte direkt in den Vektor, ohne Verwendung von Restriktionsenzymen, zu ligieren. Da die Orientierung des PCR-Produkts während des Einbaus nicht beeinflusst werden kann, tragen nur 50 % der transgenen Vektoren das Insert in der richtigen Orientierung.

6.1.6 Rekombinante Proteine und Antikörper

6.1.6.1 Rekombinante Proteine

Als Ladekontrolle für Western Blot-Analysen wurden 35 ng rekombinantes humanes MIA eingesetzt.

6.1.6.2 Primäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Anwendung	Verdünnung
MIA 7638 III	BioGenes (Berlin)	Western Blot	1:2000
MIA 7638 III	BioGenes (Berlin)	Immunfluoreszenz	1:200
MIA 7638 III	BioGenes (Berlin)	FACS	1:500
β-Aktin	Sigma-Aldrich	Western Blot	1:5000

6.1.6.3 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Anwendung	Verdünnung
Anti-mouse AP	Cell Signaling	Western Blot	1:5000
Anti-rabbit AP	Cell Signaling	Western Blot	1:2000
Anti-rabbit Alexa Fluor 594	Invitrogen	Immunfluoreszenz	1:150
Anti-rabbi FITC	Dako (Hamburg)	FACS	1:50

* AP = Alkalische Phosphatase

6.1.7 Oligonukleotide

6.1.7.1 Oligonukleotide für Expressionsanalysen (qRT-PCR)

Primername	Nukleotidsequenz (forward/reverse)
β-Aktin (human)	5'-CTACGTCGCCCTGGACTTCGAGC-3'/ 5'-GATGGAGCCGCCGATCCACACGG-3'
FYCO1 (human)	5'-CCTGGCGTCGAGGGGCTTTG-3'/ 5'-TGCATGCGCTCCCGTAGCTG-3'
MIA (human)	5'-CATGCATGCGGTCCTATGCCCCAAGCTG-3'/ 5'-GATAAGCTTTCACTGGCAGTAGAAATC-3'
Rab1	5'-CACAGCAGGCCAGGAAAGAT-3'/ 5'-GCACTGGTTTCCAAAAACGGA-3'
Rab3A	5'-TGCAGGACGTCACGGAGGACTG-3'/ 5'-AAGGCAGGCGTGAACGAGTCG-3'
Rab3B	5'-ACCGTCACGAGAAGCGGGTG-3'/ 5'-AGCCCATGGCCCCACGGTAA-3'
Rab4B	5'-AGCTTCGGCAGCCTCGGAGT-3'/ 5'-CCGTGGCTCAGTCTTGCCCC-3'
Rab6	5'-CGGGAATCCGCTGAGGAAAT -3'/ 5'-ATCAAGCTCCTGAACCGCTC -3'
Rab7A	5'-ACAAAGCGGGCACAGGCCTG-3'/ 5'-GCCCCCTCAGCAACTGCAGC-3'
Rab11	5'-AGCAAGAGCACCATTGGAGT -3'/ 5'-GGAAGTGCCTGAGATGACG -3'
Rab23	5'-TCCGAGGAGCCATCGGCAGTT-3'/ 5'-TCCTCCTGACCTGCAGTGTCCTCA-3'
Rab27A	5'-TGATGGAGCGAACTGCTTTTC-3'/ 5'-CCCTACACCAGAGTCTCCCAA-3'
SYNCRIP	5'-GAGGTCGAGGGCGTGGAGGT-3'/ 5'-CCCCGCGGCCTCTTTGTTGT-3'

SYT11	5'-TCATGCTGCCACCAGCAGGC-3'/ 5'-CAGCCTCTGCTGCGTCCACC-3'
SYT6	5'-TGGCTGACCGCAAGCTGCAT-3'/ 5'-TGAGGGTGAGCCTGCCTGCA-3'

6.1.7.2 Oligonukleotide für Site-Directed Mutagenese

Primername	Nukleotidsequenz (forward/reverse)
MIA-L8D	5'-GGTCCCTGGTGTGCGATGGTGTGCATCATCTTGC-3'/ 5'-GCAAGATGATGACACCATCGCACACCAGGGACC-3'
MIA-S15L	5'-GTCATCATCTTGCTGCTGGCCTTCTCCGGACCTGG-3'/ 5'-CCAGGTCCGGAGAAGGCCAGCAGCAAGATGATGAC-3'
MIA-A16D	5'-CATCTTGCTGTCTGACTTCTCCGGACC-3'/ 5'-GGTCCGGAGAAGTCAGACAGCAAGATG-3'
MIA-F17D	5'-TTGCTGTCTGCCGACTCCGGACCTGGT-3'/ 5'-ACCAGGTCCGGAGTCGGCAGACAGCAA-3'
MIA-P20LG21L	5'-TCTGCCTTCTCCGGACTTCTTGTGAGGGGTGGTCCTA-3'/ 5'-TAGGACCACCCCTGACAAGAAGTCCGGAGAAGGCAGA-3'
MIA-V22D	5'-TCCGGACCTGGTGACAGGGGTGGTCCT-3'/ 5'-AGGACCACCCCTGTACCAGGTCCGGA-3'
MIA-R23E	5'-CCGGACCTGGTGTGAGGGTGGTCCTATGCC-3'/ 5'-GGCATAGGACCACCCTCGACACCAGGTCCGG-3'
MIA-R23W	5'-GGACCTGGTGTCTGGGGTGGTCCTATGC-3'/ 5'-GCATAGGACCACCCAGACACCAGGTCC-3'
MIA-G24D	5'-CCTGGTGTGAGGGATGGTCCTATGCCC-3'/ 5'-GGGCATAGGACCATCCCTGACACCAGG-3'
MIA-G25D	5'-CCTGGTGTGAGGGGTGATCCTATGCCC-3'/ 5'-GGGCATAGGATCACCCCTGACACCAGG-3'
MIA-G61R	5'-CGGCTCTTCTGGCGCGGCAGCGTTCAG-3'/ 5'-CTGAACGCTGCCGCGCCAGAAGAGCCG-3'

6.1.7.3 Primer für Klonierungen und SOE-PCR

Primernamen	Nukleotidsequenz
E-Cad Signal an MIA fwd	5'-CCTCTGGCTCTGCCAGGGTCCTATGCCCAAGCTGGC-3'
E-Cad Signal an MIA rev	5'-GGGTGGCAGGGCTCCGGCTACCCCTGACACCAGGTCC-3'
MIA Signal fwd EcoR I	5'-GACGAATTCATGGCCCGGTCCCTGGTG-3'
MIA Signal fwd Nhe I	5'-GCTAGCATGGCCCGGTCCCTGGTGTGCCTTGG-3'
MIA Signal rev Age I	5'-ACCGGTACAGGACCACCCCTGACACCAGGTCCGG-3'
MIA Signal rev BamH I	5'-GGATCCCCACCCCTGACACCAGGTCC-3'
MIA Signal rev Hind III	5'-GACAAGCTTTCACTGGCAGTAGAAATCCCA-3'
MIA Signal rev Bcl I	5'-TGATCACACCACCCCTGACACCAGGTCC-3'
MIA ohne Signal fwd	5'-GACGAATTCCTATGCCCAAGCTGGCTG-3'

6.1.7.4 siRNAs (small interfering RNA)

Die eingesetzten siRNAs wurden von Qiagen (Hilden) synthetisiert.

Bezeichnung	Zielsequenz
siKontrolle (unspezifische siRNA)	Nicht verfügbar
siFYCO1	AAGCCACGTCATATAACTCAA
siMIA	GACAGACAAATGGGATTTCTA
siRab1A	GTCCAGCATGAATCCCGAATA
siRab3A	CCCGTCACCCTTATTTATTAT
siRab6A	CCCACTTATTGTACCTTGTA
siRab7A	CACGTAGGCCTTCAACACAAT
siRab11A	CGAAATGAGTTTAATCTGGAA
siRab27A	AAGATAGATGTTTCATATTGAA
siSYNCRIP	TGGAACGAGTGAAGAAGTTAA
siSYT11	CTGGATCTTGTATAGACCAAT

6.1.8 Antibiotika und Medien

6.1.8.1 Antibiotika

Antibiotika	Stocklösung	Verdünnung
Ampicillin	50 mg/ml in ddH ₂ O	1:500
Kanamycin	10 mg/ml in ddH ₂ O	1:100
Penicillin /Streptomycin	10000 U/ml Penicillin G; 10 mg/ml Streptomycin	1:100

6.1.8.2 Medien zur Anzucht von *E. coli* und humanen Zelllinien

Luria Bertani Medium	10 g/l Trypton 5 g/l 10 g/l NaCl → in H ₂ O gelöst und autoklaviert → Agarplatten: Zugabe von 15 g/l Agar → Selektion: Zugabe von 100 µg/l Ampicillin
Dulbeccos Modified Eagle Medium	DMEM: PAA, Darthmouth, USA 10 % FKS 1 % Penicillin/Streptomycin
RPMI (Roswell Park Memorial Institute)	RPMI: PAA, Darthmouth, USA 10 % FKS 1 % Penicillin/Streptomycin + 13,3 ml Natriumbicarbonat-Lösung (7,5 %)

6.1.9 Pufferlösungen

6.1.9.1 Agarose-Gelelektrophorese

50x TAE Puffer	2 M Tris/Acetat 50 mM EDTA
Elektrodenpuffer	1x TAE
Agarosegel	1 – 2 % (w/v) Agarose in 1x TAE
Ladepuffer	40 % (v/v) Saccharose 0,25 % (w/v) Xylencyanol 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
Ethidiumbromidlösung	1 Tropfen (0,5 %) pro 100 ml H ₂ O

6.1.9.2 RIPA-Puffer

RIPA-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 7,5 150 mM NaCl 1 % (w/v) Nonidet(R) P40 0,5 % (w/v) Natriumdesoxycholat 0,1 % (w/v) SDS Proteaseinhibitoren
--------------------	---

6.1.9.3 SDS-Gelelektrophorese

Trenngel (15 %)	3,75 ml 1M Tris/HCl pH 8,8 3,75 ml Acrylamid 2,35 ml ddH ₂ O 100 µl SDS (10 % oder 40%) 50 µl APS (25 %) 10 µl TEMED
Sammelgel (4 %)	450 µl 1M Tris/HCl pH 6,8 375 µl Acrylamid 2,85 ml ddH ₂ O 37,5 µl SDS (10 %) 25 µl APS (25 %) 3,5 µl TEMED
SDS-PAGE Elektrodenpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,5 200 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
SDS-PAGE Probenpuffer	Roti®-Load 1 (4x) denaturierend, Roth
Native-PAGE Probenpuffer	RunBlue, Expedeon Ltd., Harston, UK NATIVE Sample Buffer (4x)
Größenstandard	Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards (Bio-Rad, München)

6.1.9.4 Western Blot

Transferpuffer	10 % (v/v) Methanol 25 mM Tris 190 mM Glycin
Blockierlösung	3 % BSA/PBS
Entwickler	BCIP/NBT Kit (Invitrogen) 1 ml Lösung A 1 ml Lösung B 8 ml ddH ₂ O

6.1.9.5 Puffer für Plasmid-Mini-Präparation

Lösung I	50 mM Glukose 25 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA
Lösung II	200 mM NaOH 1 % SDS
Lösung III	60 ml 5 M KOAc 11,5 ml Eisessig 28,5 ml ddH ₂ O

6.1.9.6 Allgemeine Puffer und Lösungen

1x PBS pH 7,4 für Zellkultur	PAA, Dartmouth, USA
10x PBS pH 7,4	80 g/l NaCl 1 g/l KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄
PEG-Mix für DNA-Fällung	52,5 g PEG 8000 40 ml NaOAc pH 5,2 1,32 ml 1M MgCl ₂ → mit ddH ₂ O auf 200 ml
RNase A Lösung	10 mM Tris/HCl pH 7,0 10 mg/ml RNase A (Firma)

6.2 Methoden

6.2.1 Arbeiten mit *Escherichia coli*

6.2.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Escherichia coli Bakterien (6.1.3) wurden auf Agarplatten bzw. in LB-Flüssigmedium (6.1.8.2) kultiviert. Zur selektiven Amplifikation transformierter Bakterien wurden die Agarplatten bzw. das Flüssigmedium mit geeignetem Antibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin, 6.1.8.1) versetzt. *E. coli* Zellsuspensionen wurden mit einem sterilen Trigalski Spatel ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Flüssigkulturen wurden mit einer gepickten Kolonie angeimpft und bei 37 °C im Bakterienschüttler für 16 Stunden angezogen.

6.2.1.2 Transformation von XL-2 kompetenten *E. coli*

Zur Transformation chemisch kompetenter XL-2 *E. coli* Zellen wurden 100 ng Plasmid-DNA beziehungsweise ein kompletter Ligationsansatz einer Klonierung (6.2.2.6) zu 100 µl Zellen gegeben und der Ansatz für 30 Minuten auf Eis, bei gelegentlichem Mischen, inkubiert. Zur Aufnahme der Fremd-DNA in die Bakterien erfolgte ein Hitzeschock für 60 – 75 Sekunden bei 42 °C. Nach dem Hitzeschock wurde der Transformationsansatz sofort wieder auf Eis abgekühlt und anschließend mit 500 µl LB-Medium versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C unter leichtem Schütteln (300 rpm) wurden die Zellen für fünf Minuten bei 4000 rpm (1200 g) pelletiert und das überstehende LB-Medium dekantiert. Das Bakterienpellet wurde in der Restflüssigkeit resuspendiert und anschließend auf Luria Bertani Agarplatten (6.1.8.2) mit geeignetem Selektionsantibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin; 6.1.8.1) ausplattiert und für 16 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

6.2.1.3 Transformation von *dam*⁻/*dmc*⁻ *E. coli* und DH-10β kompetenten *E. coli*

Zur Transformation chemisch kompetenter DH-10β *E. coli* Zellen wurden 100 ng Plasmid-DNA beziehungsweise ein kompletter Ligationsansatz einer Klonierung (6.2.2.6) zu 50 µl Zellen gegeben und der Ansatz für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Aufnahme der Fremd-DNA in die Bakterien erfolgte ein Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42 °C. Nach dem Hitzeschock wurde der Transformationsansatz sofort wieder auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 950 µl LB-oder SOC-Medium zu den Bakterien gegeben und diese eine Stunde unter leichtem Schütteln (300 rpm) bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen für fünf Minuten bei 4000 rpm (1200 g) pelletiert und das überstehende LB-Medium dekantiert. Das Bakterienpellet wurde in der Restflüssigkeit resuspendiert und anschließend auf Luria Bertani Agarplatten (6.1.8.2) mit

geeignetem Selektionsantibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin; 6.1.8.1) ausplattiert und für 16 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

6.2.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräparation)

Die Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* Zellen erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Für die Minipräparation wurden 5 ml steriles LB-Medium mit Selektionsantibiotikum (Ampicillin 1:500, Kanamycin 1:100; 6.1.8.1) versetzt, mit einer Einzelkolonie angeimpft und für 16 Stunden bei 37 °C im Bakterieneschüttler inkubiert. Ein Milliliter der Flüssigkultur wurde für fünf Minuten mit 3000 rpm zentrifugiert und das Bakterienpellet in 100 µl Lösung I (6.1.9.5) resuspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurden 200 µl Lösung II (6.1.9.5) zugegeben und der Ansatz vorsichtig geschwenkt. In diesem Schritt werden in der Lösung enthaltene Proteine denaturiert und die chromosomale DNA der Bakterien zerstört. Anschließend wurden 150 µl Lösung III (6.1.9.5) zugegeben, die Ansätze kurz geschwenkt und erneut fünf Minuten auf Eis inkubiert. Durch eine fünfminütige Zentrifugation mit 13000 rpm wurde im nächsten Schritt die Plasmid-DNA von denaturierten Proteinen, hochmolekularer RNA und chromosomaler DNA getrennt. Der Plasmid-DNA-haltige Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt, mit 900 µl reinem Ethanol gemischt und zehn Minuten auf Eis ausgefällt. Das Präzipitat wurde für 10 Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in 10 µl RNase-Mix (120 µl ddH₂O gemischt mit 5 µl RNase A) gelöst und für 20 Minuten bei 37 °C mit 300 rpm geschüttelt, um mögliche Verunreinigungen mit RNA zu entfernen.

6.2.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA (Midipräparation)

Um größere Mengen Plasmid-DNA zu isolieren, wurde das HighSpeed Plasmid Midi Kit (Qiagen) verwendet. Für die Präparation wurde 50 ml steriles LB-Medium mit geeignetem Selektionsantibiotikum versetzt (6.1.8.1), mit 100 µl einer 5 ml Übernachtskultur (Flüssigkultur; 6.2.1.1) angeimpft und für 16 Stunden bei 37 °C im Bakterieneschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Bakteriensuspension für 15 Minuten mit 4000 rpm bei 4 °C pelletiert und anschließend die Plasmid-DNA nach Anleitung des Herstellers präpariert. Isolierte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

6.2.2 Molekularbiologische Arbeiten

6.2.2.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die sequenzspezifisch DNA erkennen und schneiden. Sie können sowohl für die Analyse als auch zur Klonierung von DNA eingesetzt werden.

Für die Spaltung von Plasmid-DNA wurden, je nach Zweck, Reaktionen verschiedener Größe (Tabelle 3) durchgeführt. Die Ansätze wurden jeweils für zwei Stunden bei optimaler Reaktionstemperatur der verwendeten Restriktionsendonukleasen inkubiert und danach gegebenenfalls hitzeinaktiviert. Anschließend wurden die Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese (6.2.2.2) aufgetrennt und analysiert.

Tabelle 3: Reaktionsansätze zur Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

	Analyse	Gelaufreinigung	Fällung
DNA (Plasmid)	0,5 µg	5 µg	10 µg
Enzym-Puffer (10x)	1 µl	4 µl	10 µl
Enzym	1 µl	1 µl	2 µl
BSA (10x)*	1 µl	4 µ	10 µ
mit ddH₂O auf	10 µl	40 µl	100 µl

* BSA wurde zugegeben, wenn die verwendeten Enzyme es erforderten

Für die Spaltung von PCR-Produkten (6.2.2.10) wurden diese zunächst durch Fällung (6.2.2.4) konzentriert. Die Restriktion erfolgte anschließend in einem Volumen von 20 µl mit 1 – 2 µl Enzym, 2 µl des entsprechenden Puffers (10x) und gegebenenfalls 2 µl BSA (10x) für zwei Stunden bei optimaler Reaktionstemperatur der verwendeten Restriktionsendonukleasen.

Für anschließende Klonierungsarbeiten wurden geschnittene DNA-Fragmente entweder aus Agarose-Gelen isoliert (6.2.2.3) oder mittels Fällung (6.2.2.4) aufgereinigt und konzentriert.

6.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Durch Agarose-Gelelektrophorese kann DNA der Größe nach aufgetrennt werden. Für die Analyse wurden je nach Größe der zu untersuchenden Fragmente 1 – 2 %-ige Agarosegele (6.1.9.1) verwendet. DNA-Fragmente wurden bei einer konstanten Spannung von 120 V aufgetrennt, zehn Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (6.1.9.1) inkubiert und abschließend mittels UV-Licht visualisiert. Um die Größe der Fragmente bestimmen zu können, wurden zwei verschiedene DNA-Größenstandards (100 bp bzw. 1 kb; 6.1.1) eingesetzt.

6.2.2.3 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen

DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (6.2.2.2) aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und anschließend unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA erfolgte nach Anleitung des Herstellers mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, 6.1.1).

6.2.2.4 Fällung von DNA

Um DNA zu konzentrieren, abgespaltene DNA-Fragmente, Enzyme und Phosphatgruppen zu entfernen oder um DNA in ein anderes Puffersystem zu überführen, können verschiedene Fällungsmethoden angewendet werden.

Für die Fällung mit Natriumacetat und Alkohol wurden zur einer DNA-Lösung ein Zehntel Volumen 3 M Natriumacetat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) und zwei Volumen reiner Ethanol p.a. gegeben und kurz gemischt. Nach 15-minütiger Inkubation bei -20°C wurden die Ansätze 15 Minuten bei 13200 rpm (16000 g) zentrifugiert, die Überstände dekantiert und anschließend die Reaktionsgefäße über Kopf stehen gelassen. Nachdem die Restflüssigkeit abgelaufen war, wurden die Ansätze kurz bei 37°C getrocknet. Die DNA wurde abschließend in ddH₂O resuspendiert und gegebenenfalls mittels Agarose-Gelelektrophorese (6.2.2.2) kontrolliert.

Um besonders reine DNA zu erhalten, wurde eine PEG-Fällung durchgeführt. Hierzu wurden PCR-Produkte (6.2.2.10) oder verdaute DNA (6.2.2.1) mit dem gleichen Volumen PEG-Mix (6.1.9.6) gemischt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 13200 rpm (16100 g) wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und das Pellet vorsichtig mit 100 µl reinem Ethanol p.a. überschichtet. Die Ansätze wurden erneut für zehn Minuten bei 13200 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet fünf Minuten in der Speedvac bzw. 20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in ddH₂O gelöst.

6.2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde photometrisch durch die Messung der optischen Dichte (OD), bei einer Wellenlänge von 260 nm, bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine OD von 1,0 in etwa einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA bzw. 40 µg/ml RNA.

Um die Reinheit von Nukleinsäurelösungen zu ermitteln, kann zusätzlich die UV-Absorption bei 280 nm gemessen und mit der OD_{260} ins Verhältnis gesetzt werden. Als rein gelten OD_{260}/OD_{280} -Verhältnisse von etwa 1,8 für DNA- und 2,0 für RNA-Lösungen.

6.2.2.6 Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmide

Expressionsplasmide werden verwendet, um Proteine in verschiedenen Zellsystemen exprimieren zu können. Die Expressionsplasmide besitzen mit der *Multiple Cloning Site* (MCS) eine Region, in der sich viele verschiedene Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen befinden. Durch den Verdau mit definierten Enzymen kann das Plasmid linearisiert und ein DNA-Stück, das ebenfalls mit entsprechenden Enzymen verdaut wurde, in das Plasmid eingesetzt werden.

Für die Klonierung in ein Expressionsplasmid wurde das Produkt einer PCR (6.2.2.10) entweder aus einem Agarose-Gel isoliert (6.2.2.3) oder mittels Fällung (6.2.2.4) konzentriert und umgepuffert. Im nächsten Schritt wurden sowohl das PCR-Produkt als auch das eingesetzte Plasmid mit einer oder zwei Restriktionsendonukleasen geschnitten (6.2.2.1). Hierbei ist zu beachten, dass die entstehenden Überhänge von Plasmid und PCR-Produkt komplementär zueinander sind und dadurch eine spätere Ligation möglich ist. Die Restriktion von Plasmid-DNA und PCR-Produkten erfolgt, abhängig von der gewählten Aufreinigungsart, wie unter 6.2.2.1 beschrieben.

Für Klonierungen, bei denen nur mit einer Restriktionsendonuklease gearbeitet wird, muss zudem das geschnittene Plasmid dephosphoryliert werden, um eine Re-Ligation des linearisierten Vektors zu verhindern. In einem typischen Reaktionsansatz wurde 1 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 2 µl Antarktischer Phosphatase-Puffer (10x) und 1 µl Antarktischer Phosphatase (NEB) bei 37 °C für 15 Minuten (5'-Überhänge und stumpfe Enden) bzw. eine Stunde (3'-Überhänge) dephosphoryliert. Die Antarktische Phosphatase wurde anschließend durch fünfminütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert und der dephosphorylierte Vektor gefällt (6.2.2.4).

Für die Ligationsreaktion wurden 1 µl Vektor und 3 – 5 µl Insert mit 2 µl Ligationspuffer und 1 µl T4 DNA Ligase (NEB) in einem Gesamtvolumen von 20 µl für zwei Stunden bei 37 °C oder über Nacht bei 16 °C im Thermoblock inkubiert. Für die anschließende Transformation von Bakterienzellen (6.2.1.2; 6.2.1.3) wurde der gesamte Ligationsansatz eingesetzt.

6.2.2.7 RNA-Isolation aus Säugerzellen

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Säugerzellen wurde mit dem E.Z.N.A.® Total RNA Kit I (Omega Bio-tek, VWR, Darmstadt) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die für die Extraktion verwendeten Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, geerntet und für vier Minuten bei 1200 rpm (100 g) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde erneut mit PBS gewaschen, pelletiert und anschließend in 350 µl TRK-Lyse Puffer (1 ml Lysepuffer wurde mit 20 µl 2-Mercaptoethanol versetzt) resuspendiert. Zu dem Lysat wurde 350 µl 70 % Ethanol *p.a.* gegeben, der Ansatz gemischt, auf die mitgelieferte Säule pipettiert und anschließend für eine Minute mit 10000 rpm zentrifugiert. Die Säulen wurden schrittweise mit 500 µl Waschpuffer I, 500 µl Waschpuffer II und 350 µl Waschpuffer II gewaschen und abschließend nochmals für 2 Minuten mit 13200 rpm zentrifugiert, um residuale Pufferreste zu entfernen. Im letzten Schritt wurde die RNA mit 20 – 40 µl ddH₂O (DEPC) eluiert. Isolierte RNA wurde bei -20 °C gelagert.

6.2.2.8 DNase Verdau isolierter RNA

Um mögliche DNA-Verunreinigungen durch Expressionsplasmide aus isolierter RNA (6.2.2.7) zu entfernen, wurde ein DNase-Verdau mit dem DNase I Kit (Fermentas) durchgeführt. In einem Reaktionsansatz wurde 1 µg RNA mit 2 µl DNase I (1 U/µl) und 2 µl DNase-Puffer (10x) in einem Gesamtvolumen von 20 µl für zwei Stunden bei 37 °C verdaut. Die Inaktivierung der DNase erfolgte durch Zugabe von 2 µl EDTA (50 mM) und Hitzeinaktivierung für zehn Minuten bei 65 °C. DNase-behandelte RNA wurde bei -20 °C gelagert.

6.2.2.9 Reverse Transkription

Durch Reverse Transkription ist es möglich, RNA in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Auf diese Weise kann beispielsweise isolierte mRNA in cDNA transkribiert werden, welche daraufhin durch normale PCR vervielfältigt und gegebenenfalls quantifiziert werden kann.

Je Reaktionsansatz wurden 500 ng RNA mit 4 µl First Strand Puffer (5x), 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl dNTP Mix (0,01 M) und 1 µl dN₆-Primer (Random Hexamer Primer; 2 mg/ml) versetzt und mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 19 µl aufgefüllt. Nach fünfminütiger Inkubation bei 70 °C, um mögliche Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen, wurde je Reaktionsansatz 1 µl Superscript® II Reverse Transkriptase (Invitrogen) zugegeben und das Gemisch eine Stunde bei

37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase für 10 Minuten bei 70 °C hitzeinaktiviert und der Ansatz mit 1 µl RNase A Lösung (6.1.9.6) für 20 – 30 Minuten bei 37 °C verdaut. Die fertige cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

6.2.2.10 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) können gezielt DNA-Fragmente vervielfältigt und zusätzlich mit beliebigen DNA-Überhängen oder Restriktionsschnittstellen versehen werden.

Zur Initiation einer PCR werden die Reaktionsansätze für fünf Minuten bei 94 °C denaturiert, so dass die anfangs doppelsträngige DNA (dsDNA) aufschmilzt und als einzelsträngige DNA (ssDNA) vorliegt. Die anschließende Amplifikation besteht aus der Hybridisierungsphase (*Annealing*), in der sich die Primer an das einzelsträngige DNA-*Template* anlagern, der Elongationsphase, in der die Primer komplementär zur DNA-Matrize durch eine DNA-Polymerase verlängert werden, und der abschließenden Denaturierungsphase, in der die neu synthetisierte dsDNA wieder aufgeschmolzen wird und dadurch als ssDNA für den nächsten Zyklus bereit steht. Abschließend wurden die Reaktionen auf 4 °C gekühlt.

Ein typischer Reaktionsansatz zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR beinhaltete 10 ng DNA-Template (Plasmid-DNA), 5 µl PCR-Puffer (10x), je 0.5 µl forward- und reverse-Primer (20 mM), 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM), 0,5 µl Taq-DNA-Polymerase und ddH₂O *ad* 50 µl. Der Reaktionsansatz wurde im Thermocycler inkubiert (Tabelle 4). Die optimale Hybridisierungstemperatur wurde für jedes Primerpaar experimentell bestimmt.

Tabelle 4: Programm PCR im Thermocycler. Die optimale Hybridisierungstemperatur (Annealing) wurde für jedes Primerpaar experimentell bestimmt.

Programm	Temperatur [°C]	Dauer	Zyklen
Initiation	94	5 min	1
	Annealing	1 min	
Amplifikation	72	1 min / kb	45
	94	1 min	
Abkühlung	4	für immer	1

PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (6.2.2.2) untersucht und kurzfristig im Kühlschrank bzw. längerfristig bei -20 °C gelagert.

6.2.2.11 Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)

Mittels qRT-PCR im LightCycler® 480 (Roche) wurde der mRNA-Gehalt bestimmter Gene und damit die Stärke der Expression in verschiedenen Zelllinien bestimmt. Für die Analyse wurde 1 µl cDNA-Template (6.2.2.9) mit 10 µl Light-Cycler® 480 SYBR Green I Master, 8 µl ddH₂O und je 0,5 µl spezifischer forward- und reverse-Primer (20 µM) in einem Gesamtvolumen von 20 µl untersucht. Die Reaktionsansätze wurden im LightCycler® 480 mit dem in Tabelle 5 aufgeführten Programm analysiert.

Tabelle 5: Programm qRT-PCR im Light Cycler 480. Die Messtemperatur wurde an die jeweils verwendeten Primerpaare angepasst.

Programm	Zieltemperatur [°C]	Messung	Dauer [mm:ss]	Rampe [°C/s]	Zyklen
Präinkubation	95	keine	10:00	4,4	1
Amplifikation	95	Keine	00:10	4,4	45
	60	keine	00:10	2,2	
	72	keine	00:20	4,4	
	Messtemperatur	einfach	00:01	4,4	
Schmelzkurve	95	Keine	00:05	4,4	1
	65	Keine	01:00	2,2	
	97	kontinuierlich	5/s	0,11	
Abkühlung	40	keine	00:30	2,2	1

Die eingesetzten Oligonukleotide (Primer) wurden für eine Hybridisierungstemperatur von 60 °C generiert. Die optimale Messtemperatur wurde für jedes Primerpaar experimentell optimiert. Als Standard zur Quantifizierung wurde die Expression relativ zu β-Aktin bestimmt. Die Analyse erfolgte mit der Light Cycler® Software nach Anleitung des Herstellers.

6.2.2.12 Ortsspezifische Mutagenese

Für die Herstellung verschiedener MIA-Mutanten wurde das QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) verwendet, durch welches gezielt Punktmutationen in bestehenden Plasmiden erzeugt werden können. Die Mutagenese und anschließende Transformation in superkompetente XL1-Blue *E. coli*-Zellen wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Nach Präparation (6.2.1.5) wurden die mutierten Plasmide zur Prüfung

ihrer Korrektheit von den Firmen Entelechon (Bad Abbach) bzw. Geneart (Regensburg) sequenziert.

6.2.3 Proteinbiochemische Arbeiten

6.2.3.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten

Zur Extraktion von Gesamtprotein wurden kultivierte humane Zellen mit PBS gewaschen, geerntet und für vier Minuten bei 1200 rpm (100 g) pelletiert. Nach erneutem Waschen mit 1 ml PBS wurden die Zellpellets in 50 – 200 µl RIPA-Puffer (6.1.9.2) gelöst und für 15 Minuten bei 4 °C mit 300 rpm geschüttelt. Durch zehnmütige Zentrifugation bei 4 °C mit 13200 rpm (16100 g) wurden anschließend grobe Zellbestandteile wie Membranen sowie Zellkerne von den gelösten Proteinen im Überstand getrennt. Der proteinhaltige Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C gelagert.

6.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten

Die Konzentration von Proteinlysaten wurde mit Hilfe des BCA-Protein-Assay Kits (Pierce; 6.1.1) bestimmt. Diese Methode beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der Proteine in alkalischer Lösung einen Komplex mit Cu^{2+} -Ionen bilden, wodurch diese zu Cu^+ -Ionen reduziert werden. Die im Kit enthaltene Bicinchoninsäure bildet mit Cu^+ -Ionen einen violetten Farbkomplex, der photometrisch durch die Messung der Absorption bei 562 nm untersucht werden kann.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung wurde im Doppelansatz durchgeführt. Zu 0,5 – 5 µl einer Proteinlösung wurden 200 µl der alkalischen BCA- Cu^{2+} -Lösung (50 Teile Lösung A auf einen Teil Lösung B) in die Kammer einer 96-well Platte gegeben. Die Platte wurde unter leichtem Schütteln für etwa 10 – 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Absorption der Lösung bei 562 nm im ELISA-Reader (MWG Biotech; 6.1.2) bestimmt. Zur Quantifizierung der Proteinkonzentration wurde parallel eine Verdünnungsreihe BSA mit bekannter Konzentration gemessen.

6.2.3.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Durch die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine aufgrund ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Bei dieser Methode werden durch Denaturierung mögliche Disulfidbrücken sowie Tertiär- und Quartärstrukturen der Proteine zerstört, so dass die native Konformation keinen Einfluss mehr auf die elektrophoretischen Eigenschaften der Proteine hat. Zusätzlich lagern sich negativ geladene SDS-Moleküle an Aminosäuren im Verhältnis von 1:2 an, wodurch alle Proteine ein gleiches Ladungs-Größen-Verhältnis erhalten.

Zur Vorbereitung für die SDS-PAGE wurden Gesamtproteinextrakte (6.2.3.1) in 1x Roti®-Load 1 (Roth) Probenpuffer für zehn Minuten bei 70 °C denaturiert und anschließend bei einer konstanten Spannung von 100 V in 15%-igen Polyacrylamidgelen (6.1.9.3) aufgetrennt. Als Größenstandard wurde der Precision Plus Protein™ Kaleidoscope Standard (Bio-Rad) eingesetzt.

6.2.3.4 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamid Gelen

Die Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen (6.2.3.3), für eine anschließende LC-MS (*Liquid chromatography-mass spectrometry*, 6.2.3.10), wurde nach Anleitung des Herstellers mit dem SilverQuest™ Silver Staining Kit (Invitrogen) durchgeführt.

6.2.3.5 Western Blot

Durch Western Blot Analysen können spezifisch Proteine nachgewiesen werden. Die zuvor durch SDS-PAGE (6.2.3.3) aufgetrennten Proteine werden bei dieser Methode mittels Elektrophorese auf PVDF-Membranen (Polyvinylidenfluorid) transferiert und anschließend über spezifische primäre Antikörper markiert und durch Alkalische Phosphatase (AP) bzw. Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierte sekundäre Antikörper detektiert und visualisiert.

Nach der Elektrophorese wurden die fertigen SDS-Polyacrylamidgele für 15 Minuten in Transferpuffer (6.1.9.4) äquilibriert. Parallel wurden die PVDF-Membranen zunächst fünf Minuten in Methanol *p.a.* und dann fünf Minuten in Transferpuffer (6.1.9.4) inkubiert und dadurch für den Proteintransfer vorbereitet. Der Transfer auf die Membran erfolgte per Elektrophorese für 45 Minuten bei einer konstanten Spannung von 15 V bei 400 mA in einer Blotkammer (Bio-Rad; 6.1.2).

Anschließend an den Proteintransfer wurden die unspezifischen Bindungsstellen der PVDF-Membranen durch eine einstündige Inkubation in Blockierlösung (3 % BSA/PBS) bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln abgesättigt. Die anschließende Inkubation der Membran mit primärem Antikörper, in geeigneter Konzentration (6.1.6) in Blockierlösung, erfolgte unter leichtem Schütteln bei 4 °C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für fünf Minuten wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem entsprechenden AP-konjugiertem sekundären Antikörper in geeigneter Konzentration (6.1.6) in PBS inkubiert. Abschließend wurde die Membran dreimal für zehn Minuten mit PBS gewaschen und mit BCIP/NBT-Lösung (Invitrogen, 6.1.9.4) entwickelt.

6.2.3.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Quantifizierung der MIA-Konzentration in Zellkulturüberständen wurde ein spezifischer MIA-ELISA (Roche; 6.1.1) verwendet. Bei dieser Methode wird MIA-Protein über einen Biotin-konjugierten Antikörper an Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten (96-well) gebunden und durch einen zweiten Peroxidase-konjugierten Antikörper markiert. Durch Zugabe von ABTS, welches von der Peroxidase umgesetzt wird, entsteht ein Farbumschlag der Lösung von grün nach violett, der die photometrische Bestimmung der MIA-Konzentration ermöglicht.

Der MIA-ELISA wurde mit einem Viertel Volumen der nach Anleitung des Herstellers empfohlenen Antikörpermenge und dementsprechend mehr Inkubationspuffer durchgeführt (Tabelle 6). Für die Reaktion wurden 20 µl der zu analysierenden Probe (1:10 mit Inkubationspuffer verdünnt) mit 180 µl Reaktionslösung versetzt und für 90 Minuten mit 450 rpm bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach dreimaligem Waschen für eine Minute mit 300 µl Waschpuffer wurden 200 µl ABTS-Lösung zugegeben und die Ansätze 10 – 20 Minuten unter Schütteln (450 rpm) entwickelt. Die Absorption der Lösung wurde bei 405 nm im ELISA-Reader bestimmt. Zur Quantifizierung der MIA-Konzentration wurde parallel eine Verdünnungsreihe MIA mit bekannter Konzentration gemessen.

Tabelle 6: Reaktionslösung MIA-ELISA

Reagent	Volumen [µl]
anti-MIA biotin	12,5
Inkubationspuffer	1775
anti-MIA HRP	12,5

6.2.3.7 Zentrifugationsassay

Für die Anreicherung von MIA mittels Zentrifugation wurden Mel Ei- bzw. Mel Ju-Zellen verwendet. Die kultivierten Zellen wurden kurz mit PBS gewaschen, geerntet und für 4 Minuten bei 1200 rpm (100 g) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde erneut mit PBS gewaschen und anschließend in einer Konzentration von 1×10^7 -Zellen pro Milliliter in PBS resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 2 µl Digitonin (5 %, Invitrogen) pro Million Zellen zugegeben und die Ansätze 10 – 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Kontrolle der Zellpermeabilisierung wurde 1 µl der Zellsuspension mit 1 µl Trypanblau und 8 µl PBS auf einem Objektträger gemischt und die Blaufärbung der Zellen im Mikroskop beobachtet. Zur Trennung verschiedener Fraktionen wurden die Ansätze zunächst für 15 Minuten bei 4 °C und 5700 rpm (3000 g) zentrifugiert. Der

Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut 15 Minuten bei 4 °C und 13200 rpm (16100 g) pelletiert.

6.2.3.8 Immunpräzipitation

Nach der Anreicherung von MIA mittels Zentrifugation (6.2.3.7), wurden die erhaltenen Fraktionen, zur weiteren Aufreinigung von MIA, in einer anschließenden Immunpräzipitation eingesetzt. Alle Arbeiten erfolgten auf Eis und es wurde nur vorgekühltes PBS (4 °C) verwendet. Eingesetzte Protein G Sepharose™ Beads (GE Healthcare) wurden mindestens viermal mit 1 ml PBS gewaschen.

Die Pellets bzw. der Überstand der MIA-Anreicherung wurde mit PBS auf ein Volumen von mindestens 500 µl aufgefüllt und gelöst. Nach Zugabe von 20 µl Protein G Sepharose™ Beads wurden die Ansätze über Nacht bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden durch eine zweiminütige Zentrifugation, mit 2000 rpm (400 g) bei 4 °C, unspezifisch an die Beads gebundene Proteine pelletiert (Preclearing). Der Überstand der Zentrifugation wurde mit 10 µl primären Antikörper (anti-MIA 7638 III, 6.1.6) versetzt und für 24 Stunden bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 20 µl Protein G Sepharose™ Beads wurden die Ansätze wiederum über Nacht bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Abschließend wurden die Beads mit 2000 rpm bei 4 °C pelletiert und mehrmals mit 1 ml PBS gewaschen.

6.2.3.9 Immunfluoreszenz

Um die intrazelluläre Lokalisation von MIA und verschiedenen MIA-Mutanten zu untersuchen wurden 20000 HeLa Zellen pro 4-Chamber-Slide Kammer (BD Biosciences, Material) in 500 µl DMEM ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 8 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die transiente Transfektion mit verschiedenen MIA-Mutanten und einem Golgi-GFP-Konstrukt, zur Markierung der Migrationsrichtung, erfolgte wie unter 6.2.4.3 beschrieben.

24 Stunden nach der Transfektion wurden die Umrandungsstege der 4-Chamber-Slides entfernt und die Objektträger kurz in PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch fünfminütige Inkubation mit 5 % Formalin (Paraformaldehyd) bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 5 Minuten wurden unspezifische Bindungsstellen mit 1 % BSA/PBS bei 4 °C für 24 – 48 Stunden in einer Feuchtkammer blockiert. Die darauffolgende Markierung von MIA mit primärem Antikörper erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur (anti-MIA 7638 III pure; 1:200 in 1 % BSA/PBS; 6.1.6). Anschließend wurden die Objektträger dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen und für eine Stunde mit fluoreszenzmarkiertem sekundären Antikörper (Alexa Fluor® 594 goat anti-rabbit; 1:150 in PBS, Invitrogen) inkubiert.

Zur Entfernung von ungebundenem Antikörper wurden die Objektträger dreimal für 10 Minuten mit PBS gewaschen und abschließend mit DAPI-haltigem Mounting Medium (VectaShield; 6.1.1) eingedeckelt. Die Analyse der Fluoreszenzfärbung erfolgte am Axio Imager Zeiss Z1 Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, 6.1.2).

6.2.3.10 Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)

Die LC-MS wurde in Kooperation durch die AG Oefner durchgeführt²⁷³.

6.2.3.11 FACS (Fluorescence-activated cell sorting)

Um die Menge von MIA auf der Oberfläche von Zellen zu untersuchen wurden HeLa-Zellen wie unter 6.2.4.2 beschrieben mit MIA bzw. einer MIA-Signalpeptid-Mutante transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in den 6-well Platten mit PBS gewaschen, mit 0,02 % EDTA von den Platten gelöst und in FACS-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und entweder zuerst eine Stunde auf Eis mit primärem Antikörper (anti-MIA 7638 III, 1:500 in 2 % BSA/PBS) inkubiert und dann fixiert (0,25 % Paraformaldehyd in PBS, auf Eis, 1 Stunde) oder erst fixiert und dann mit primärem Antikörper inkubiert. Nach beiden Schritten wurden die Zellen jeweils zweimal mit PBS gewaschen. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte für eine Stunde auf Eis durch einen FITC-konjugierten sekundären anti-rabbit Antikörper (1:50 in 2 % BSA/PBS). Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden die Zellpellets in 500 µl PBS resuspendiert und anschließend im FACSCanto™ II analysiert.

6.2.3.12 Densitometrie

Die Densitometrie, sowohl zur Quantifizierung von Western Blots als auch zur Analyse der intrazellulären Lokalisation von MIA (Immunfluoreszenz), erfolgte mit Hilfe des Programms ImageJ®.

6.2.4 Zellkulturmethoden

6.2.4.1 Kultivierung von humanen Zelllinien

Für die Kultivierung von humanen Zelllinien wurden zwei verschiedene Kulturmedien eingesetzt. HEK293-, HeLa- sowie Mel Ei-Zellen wurden in DMEM mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin und Mel Ju-Zellen in RPMI-Medium mit 10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 13,3 ml Natriumbicarbonat (7,5 %) bei 37 °C und 8 % CO₂ kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen kurz mit PBS gewaschen und mit 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA in PBS von den Kulturflaschen gelöst. Anschließend wurden die Zellen in entsprechendem Medium aufgenommen und für 4 Minuten bei 1200 rpm (100 g) zentrifugiert. Die pelletierten

Zellen wurden in DMEM bzw. RPMI-Medium resuspendiert und 1:3 – 1:20 verdünnt in neuen Zellkulturflaschen ausgesät.

6.2.4.2 Transiente Transfektion von humanen Zellen

Die transiente Transfektion von humanen Zelllinien mit Expressionsplasmiden erfolgte im Doppelansatz durch Lipofektion. Es wurde das Lipofectamin LTX Transfektions Kit (Invitrogen) eingesetzt.

Für eine transiente Transfektion in 6-well Platten wurden 2×10^5 – 3×10^5 Zellen in 2 ml DMEM mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin pro Kammer ausgesät und 4 – 24 Stunden bei 37 °C und 8 % CO₂ inkubiert. Unmittelbar vor der Transfektion wurde das Medium der Zellen ersetzt und anschließend 40 µl eines Transfektionsansatzes zugegeben. Zur Herstellung eines Transfektionsansatzes wurde 1 µg DNA mit DMEM (ohne FKS) auf ein Volumen von 34 µl aufgefüllt und mit 6 µl Lipo Plus Reagenz versetzt (Ansatz A). Parallel wurden 5 µl Lipofectamin LTX Reagenz mit 35 µl DMEM (ohne FKS) gemischt (Ansatz B). Nach zehnminütiger Inkubation wurde Ansatz B vorsichtig mit Ansatz A vereint und erneut für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um den fertigen Transfektionsansatz zu erhalten. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und weiter untersucht.

6.2.4.3 Transiente Transfektion für Immunfluoreszenz

Für eine transiente Transfektion in 4-Chamber-Slides (BD Biosciences) wurden 2×10^5 HeLa Zellen pro Kammer in 500 µl DMEM ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 8 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium ersetzt und die Zellen mit 10 µl eines Transfektionsansatzes für die Immunfluoreszenz (Tabelle 7) pro 4-Chamber-Slide Kammer transfiziert (6.2.4.2).

Tabelle 7: Transfektionsansatz für Immunfluoreszenz

Reagenz	Ansatz A	Ansatz B
MIA-Konstrukt DNA	0,5 µg	
Golgi-GFP DNA	0,5 µg	
Lipo Plus Reagenz	6 µl	
Lipofectamin LTX		5 µl
mit DMEM ohne FKS auf	40 µl	40 µl

6.2.4.4 siRNA Transfektion

Die Transfektion verschiedener siRNAs erfolgte mit dem Lipofectamine® RNAiMAX Kit (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers.

6.2.5 Statistik

Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte mit der GraphPad Prism® Software (GraphPad Software Inc.). Alle Experimente wurden in mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen wiederholt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert bzw. prozentualer Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Signifikanzberechnungen zwischen einzelnen Gruppen wurden mit dem Student's unpaired t-test bestimmt. Die verwendeten Signifikanzniveaus lagen bei * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$ bzw. waren nicht signifikant (ns).

7 Literaturverzeichnis

- 1 Abba, M. C. *et al.* Rhomboid domain containing 2 (RHBDD2): a novel cancer-related gene over-expressed in breast cancer. *Biochimica et biophysica acta* **1792**, 988-997, doi:10.1016/j.bbadis.2009.07.006 (2009).
- 2 Adrain, C. *et al.* Mammalian EGF receptor activation by the rhomboid protease RHBDL2. *EMBO reports* **12**, 421-427, doi:10.1038/embo.2011.50 (2011).
- 3 Airola, K. *et al.* Expression of collagenases-1 and -3 and their inhibitors TIMP-1 and -3 correlates with the level of invasion in malignant melanomas. *British journal of cancer* **80**, 733-743, doi:10.1038/sj.bjc.6690417 (1999).
- 4 Allan, B. B., Moyer, B. D. & Balch, W. E. Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion. *Science* **289**, 444-448 (2000).
- 5 Alsina, J. *et al.* Detection of mutations in the mitogen-activated protein kinase pathway in human melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **9**, 6419-6425 (2003).
- 6 Ang, A. L. *et al.* Recycling endosomes can serve as intermediates during transport from the Golgi to the plasma membrane of MDCK cells. *The Journal of cell biology* **167**, 531-543, doi:10.1083/jcb.200408165 (2004).
- 7 Apfel, R. *et al.* Purification and analysis of growth regulating proteins secreted by a human melanoma cell line. *Melanoma research* **2**, 327-336 (1992).
- 8 Aridor, M., Bannykh, S. I., Rowe, T. & Balch, W. E. Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *The Journal of cell biology* **131**, 875-893 (1995).
- 9 Arimura, N. *et al.* Anterograde transport of TrkB in axons is mediated by direct interaction with Slp1 and Rab27. *Developmental cell* **16**, 675-686, doi:10.1016/j.devcel.2009.03.005 (2009).
- 10 Aronheim, A. *et al.* Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. *Cell* **78**, 949-961 (1994).
- 11 Arsenault, D., Lucien, F. & Dubois, C. M. Hypoxia enhances cancer cell invasion through relocalization of the proprotein convertase furin from the trans-Golgi network to the cell surface. *Journal of cellular physiology* **227**, 789-800, doi:10.1002/jcp.22792 (2012).
- 12 Artenstein, A. W. & Opal, S. M. Proprotein convertases in health and disease. *The New England journal of medicine* **365**, 2507-2518, doi:10.1056/NEJMra1106700 (2011).
- 13 Balch, W. E., McCaffery, J. M., Plutner, H. & Farquhar, M. G. Vesicular stomatitis virus glycoprotein is sorted and concentrated during export from the endoplasmic reticulum. *Cell* **76**, 841-852 (1994).
- 14 Baramova, E. N. *et al.* Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro-MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation. *FEBS letters* **405**, 157-162 (1997).
- 15 Barlowe, C., d'Enfert, C. & Schekman, R. Purification and characterization of SAR1p, a small GTP-binding protein required for transport vesicle formation from the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* **268**, 873-879 (1993).
- 16 Barlowe, C. K. & Miller, E. A. Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics* **193**, 383-410, doi:10.1534/genetics.112.142810 (2013).
- 17 Barr, F. A. Review series: Rab GTPases and membrane identity: causal or inconsequential? *The Journal of cell biology* **202**, 191-199, doi:10.1083/jcb.201306010 (2013).
- 18 Bauer, R. *et al.* Regulation of integrin activity by MIA. *The Journal of biological chemistry* **281**, 11669-11677, doi:10.1074/jbc.M511367200 (2006).

- 19 Bayer, M. *et al.* Identification and characterization of Iporin as a novel interaction partner for rab1. *BMC cell biology* **6**, 15, doi:10.1186/1471-2121-6-15 (2005).
- 20 Becker, T. *et al.* Structure of monomeric yeast and mammalian Sec61 complexes interacting with the translating ribosome. *Science* **326**, 1369-1373, doi:10.1126/science.1178535 (2009).
- 21 Begg, C. B. *et al.* Lifetime risk of melanoma in CDKN2A mutation carriers in a population-based sample. *Journal of the National Cancer Institute* **97**, 1507-1515, doi:10.1093/jnci/dji312 (2005).
- 22 Bello-Morales, R. *et al.* Role of the small GTPase Rab27a during herpes simplex virus infection of oligodendrocytic cells. *BMC microbiology* **12**, 265, doi:10.1186/1471-2180-12-265 (2012).
- 23 Benbow, U., Tower, G. B., Wyatt, C. A., Buttice, G. & Brinckerhoff, C. E. High levels of MMP-1 expression in the absence of the 2G single nucleotide polymorphism is mediated by p38 and ERK1/2 mitogen-activated protein kinases in VMM5 melanoma cells. *Journal of cellular biochemistry* **86**, 307-319, doi:10.1002/jcb.10225 (2002).
- 24 Bennett, D. C. How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? *Pigment cell & melanoma research* **21**, 27-38, doi:10.1111/j.1755-148X.2007.00433.x (2008).
- 25 Benyair, R., Ron, E. & Lederkremer, G. Z. Protein quality control, retention, and degradation at the endoplasmic reticulum. *International review of cell and molecular biology* **292**, 197-280, doi:10.1016/B978-0-12-386033-0.00005-0 (2011).
- 26 Berdowska, I. Cysteine proteases as disease markers. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **342**, 41-69, doi:10.1016/j.cccn.2003.12.016 (2004).
- 27 Berg-Larsen, A., Landsverk, O. J., Progidia, C., Gregers, T. F. & Bakke, O. Differential regulation of Rab GTPase expression in monocyte-derived dendritic cells upon lipopolysaccharide activation: a correlation to maturation-dependent functional properties. *PloS one* **8**, e73538, doi:10.1371/journal.pone.0073538 (2013).
- 28 Besch, R., Berking, C., Kammerbauer, C. & Degitz, K. Inhibition of urokinase-type plasminogen activator receptor induces apoptosis in melanoma cells by activation of p53. *Cell death and differentiation* **14**, 818-829, doi:10.1038/sj.cdd.4402065 (2007).
- 29 Bestvater, F., Dallner, C. & Spiess, E. The C-terminal subunit of artificially truncated human cathepsin B mediates its nuclear targeting and contributes to cell viability. *BMC cell biology* **6**, 16, doi:10.1186/1471-2121-6-16 (2005).
- 30 Bianchini, F., D'Alessio, S., Fibbi, G., Del Rosso, M. & Calorini, L. Cytokine-dependent invasiveness in B16 murine melanoma cells: role of uPA system and MMP-9. *Oncology reports* **15**, 709-714 (2006).
- 31 Blesch, A. *et al.* Cloning of a novel malignant melanoma-derived growth-regulatory protein, MIA. *Cancer research* **54**, 5695-5701 (1994).
- 32 Blobel, G. & Dobberstein, B. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *The Journal of cell biology* **67**, 835-851 (1975).
- 33 Bodey, B., Bodey, B., Jr., Siegel, S. E. & Kaiser, H. E. Matrix metalloproteinase expression in malignant melanomas: tumor-extracellular matrix interactions in invasion and metastasis. *In Vivo* **15**, 57-64 (2001).
- 34 Bogdahn, U. *et al.* Autocrine tumor cell growth-inhibiting activities from human malignant melanoma. *Cancer research* **49**, 5358-5363 (1989).
- 35 Boisclair, Y. R., Yang, Y. W., Stewart, J. M. & Rechler, M. M. Insulin-like growth factor-I and insulin stimulate the synthesis of IGF-binding protein-2 in a human embryonic kidney cell line. *Growth regulation* **4**, 136-146 (1994).

- 36 Bosserhoff, A. K. Melanoma inhibitory activity (MIA): an important molecule in melanoma development and progression. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* **18**, 411-416, doi:10.1111/j.1600-0749.2005.00274.x (2005).
- 37 Bosserhoff, A. K. *et al.* Melanoma inhibitory activity (MIA), a serological marker of malignant melanoma. *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer* **158**, 158-168 (2001).
- 38 Bosserhoff, A. K., Echtenacher, B., Hein, R. & Buettner, R. Functional role of melanoma inhibitory activity in regulating invasion and metastasis of malignant melanoma cells in vivo. *Melanoma research* **11**, 417-421 (2001).
- 39 Bosserhoff, A. K., Golob, M., Buettner, R., Landthaler, M. & Hein, R. [MIA ("melanoma inhibitory activity"). Biological functions and clinical relevance in malignant melanoma]. *Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* **49**, 762-769 (1998).
- 40 Bosserhoff, A. K. *et al.* Melanoma-inhibiting activity, a novel serum marker for progression of malignant melanoma. *Cancer research* **57**, 3149-3153 (1997).
- 41 Bosserhoff, A. K. *et al.* Mouse CD-RAP/MIA gene: structure, chromosomal localization, and expression in cartilage and chondrosarcoma. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **208**, 516-525, doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199704)208:4<516::AID-AJA7>3.0.CO;2-L (1997).
- 42 Bosserhoff, A. K., Moser, M. & Buettner, R. Characterization and expression pattern of the novel MIA homolog TANGO. *Gene expression patterns : GEP* **4**, 473-479, doi:10.1016/j.modgep.2003.12.002 (2004).
- 43 Bosserhoff, A. K., Moser, M., Hein, R., Landthaler, M. & Buettner, R. In situ expression patterns of melanoma-inhibiting activity (MIA) in melanomas and breast cancers. *The Journal of pathology* **187**, 446-454, doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199903)187:4<446::AID-PATH267>3.0.CO;2-Y (1999).
- 44 Bosserhoff, A. K., Moser, M., Scholmerich, J., Buettner, R. & Hellerbrand, C. Specific expression and regulation of the new melanoma inhibitory activity-related gene MIA2 in hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* **278**, 15225-15231, doi:10.1074/jbc.M212639200 (2003).
- 45 Bosserhoff, A. K. *et al.* Active detachment involves inhibition of cell-matrix contacts of malignant melanoma cells by secretion of melanoma inhibitory activity. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **83**, 1583-1594 (2003).
- 46 Braakman, I. & Balleid, N. J. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annual review of biochemistry* **80**, 71-99, doi:10.1146/annurev-biochem-062209-093836 (2011).
- 47 Brady, S. T., Pfister, K. K. & Bloom, G. S. A monoclonal antibody against kinesin inhibits both anterograde and retrograde fast axonal transport in squid axoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 1061-1065 (1990).
- 48 Breslow, A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Annals of surgery* **172**, 902-908 (1970).
- 49 Breslow, A. Tumor thickness, level of invasion and node dissection in stage I cutaneous melanoma. *Annals of surgery* **182**, 572-575 (1975).
- 50 Brown, D. & Breton, S. Sorting proteins to their target membranes. *Kidney international* **57**, 816-824, doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00920.x (2000).
- 51 Bub, A., Rechkemmer, G., Hock, D. & Forssmann, W. G. Secretion of a urodilatin-like immunoreactive (URO-like-IR) substance from a human kidney cell line (HEK-293). *European journal of medical research* **1**, 479-483 (1996).

- 52 Buday, L., Egan, S. E., Rodriguez Viciano, P., Cantrell, D. A. & Downward, J. A complex of Grb2 adaptor protein, Sos exchange factor, and a 36-kDa membrane-bound tyrosine phosphoprotein is implicated in ras activation in T cells. *The Journal of biological chemistry* **269**, 9019-9023 (1994).
- 53 Cao, Y. *et al.* Tim-3 expression in cervical cancer promotes tumor metastasis. *PloS one* **8**, e53834, doi:10.1371/journal.pone.0053834 (2013).
- 54 Caron, R. W. *et al.* Activated forms of H-RAS and K-RAS differentially regulate membrane association of PI3K, PDK-1, and AKT and the effect of therapeutic kinase inhibitors on cell survival. *Molecular cancer therapeutics* **4**, 257-270 (2005).
- 55 Casanova, J. E., Apodaca, G. & Mostov, K. E. An autonomous signal for basolateral sorting in the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor. *Cell* **66**, 65-75 (1991).
- 56 Casula, M. *et al.* BRAF gene is somatically mutated but does not make a major contribution to malignant melanoma susceptibility: the Italian Melanoma Intergroup Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **22**, 286-292, doi:10.1200/JCO.2004.07.112 (2004).
- 57 Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A. & Chakraborti, T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Molecular and cellular biochemistry* **253**, 269-285 (2003).
- 58 Chauhan, S. & Boyd, D. D. Regulation of u-PAR gene expression by H2A.Z is modulated by the MEK-ERK/AP-1 pathway. *Nucleic acids research* **40**, 600-613, doi:10.1093/nar/gkr725 (2012).
- 59 Chen, G. & Zhang, X. New insights into S2P signaling cascades: regulation, variation, and conservation. *Protein science : a publication of the Protein Society* **19**, 2015-2030, doi:10.1002/pro.496 (2010).
- 60 Chen, W., Feng, Y., Chen, D. & Wandinger-Ness, A. Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor. *Molecular biology of the cell* **9**, 3241-3257 (1998).
- 61 Cheng, J. C., Klausen, C. & Leung, P. C. Hydrogen peroxide mediates EGF-induced down-regulation of E-cadherin expression via p38 MAPK and snail in human ovarian cancer cells. *Mol Endocrinol* **24**, 1569-1580, doi:10.1210/me.2010-0034 (2010).
- 62 Cheng, K. W. *et al.* The RAB25 small GTPase determines aggressiveness of ovarian and breast cancers. *Nature medicine* **10**, 1251-1256, doi:10.1038/nm1125 (2004).
- 63 Clark, W. H., Jr. *et al.* A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Human pathology* **15**, 1147-1165 (1984).
- 64 Clark, W. H., Jr. & Mihm, M. C., Jr. Lentigo maligna and lentigo-maligna melanoma. *The American journal of pathology* **55**, 39-67 (1969).
- 65 Cohen-Salmon, M. *et al.* Fdp, a new fibrocyte-derived protein related to MIA/CD-RAP, has an in vitro effect on the early differentiation of the inner ear mesenchyme. *The Journal of biological chemistry* **275**, 40036-40041, doi:10.1074/jbc.M002876200 (2000).
- 66 Colognato, H. & Yurchenco, P. D. Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **218**, 213-234, doi:10.1002/(SICI)1097-0177(200006)218:2<213::AID-DVDY1>3.0.CO;2-R (2000).
- 67 Conacci-Sorrell, M. *et al.* Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *The Journal of cell biology* **163**, 847-857, doi:10.1083/jcb.200308162 (2003).
- 68 Corte, M. D. *et al.* Collagenase-3 (MMP-13) expression in cutaneous malignant melanoma. *The International journal of biological markers* **20**, 242-248 (2005).

- 69 Costin, G. E. & Hearing, V. J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **21**, 976-994, doi:10.1096/fj.06-6649rev (2007).
- 70 Cowan, P. M., McGavin, S. & North, A. C. The polypeptide chain configuration of collagen. *Nature* **176**, 1062-1064 (1955).
- 71 Cruz, J., Reis-Filho, J. S., Silva, P. & Lopes, J. M. Expression of c-met tyrosine kinase receptor is biologically and prognostically relevant for primary cutaneous malignant melanomas. *Oncology* **65**, 72-82, doi:71207 (2003).
- 72 Dankort, D. *et al.* Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nature genetics* **41**, 544-552, doi:10.1038/ng.356 (2009).
- 73 Datta, S. R., Brunet, A. & Greenberg, M. E. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & development* **13**, 2905-2927 (1999).
- 74 Davies, H. *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**, 949-954, doi:10.1038/nature00766 (2002).
- 75 Davies, M. A. The role of the PI3K-AKT pathway in melanoma. *Cancer J* **18**, 142-147, doi:10.1097/PPO.0b013e31824d448c (2012).
- 76 De Luca, M., Pellegrini, G., Zambruno, G. & Marchisio, P. C. Role of integrins in cell adhesion and polarity in normal keratinocytes and human skin pathologies. *The Journal of dermatology* **21**, 821-828 (1994).
- 77 Dejgaard, S., Nicolay, J., Taheri, M., Thomas, D. Y. & Bergeron, J. J. The ER glycoprotein quality control system. *Current issues in molecular biology* **6**, 29-42 (2004).
- 78 DeLuca, A. M., Srinivas, A. & Alani, R. M. BRAF kinase in melanoma development and progression. *Expert reviews in molecular medicine* **10**, e6, doi:10.1017/S1462399408000604 (2008).
- 79 Desch, A. *et al.* Highly invasive melanoma cells activate the vascular endothelium via an MMP-2/integrin alphavbeta5-induced secretion of VEGF-A. *The American journal of pathology* **181**, 693-705, doi:10.1016/j.ajpath.2012.04.012 (2012).
- 80 Deshpande, S. *et al.* Kit ligand cytoplasmic domain is essential for basolateral sorting in vivo and has roles in spermatogenesis and hematopoiesis. *Developmental biology* **337**, 199-210, doi:10.1016/j.ydbio.2009.10.022 (2010).
- 81 Dietz, U. H. & Sandell, L. J. Cloning of a retinoic acid-sensitive mRNA expressed in cartilage and during chondrogenesis. *The Journal of biological chemistry* **271**, 3311-3316 (1996).
- 82 Ding, X., Zhao, X. & Watts, A. G-protein-coupled receptor structure, ligand binding and activation as studied by solid-state NMR spectroscopy. *The Biochemical journal* **450**, 443-457, doi:10.1042/BJ20121644 (2013).
- 83 Dong, C., Waters, S. B., Holt, K. H. & Pessin, J. E. SOS phosphorylation and disassociation of the Grb2-SOS complex by the ERK and JNK signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* **271**, 6328-6332 (1996).
- 84 Duffy, J., Patham, B. & Mensa-Wilmot, K. Discovery of functional motifs in h-regions of trypanosome signal sequences. *The Biochemical journal* **426**, 135-145, doi:10.1042/BJ20091277 (2010).
- 85 Egea, P. F., Stroud, R. M. & Walter, P. Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Current opinion in structural biology* **15**, 213-220, doi:10.1016/j.sbi.2005.03.007 (2005).
- 86 El Fitori, J. *et al.* Melanoma Inhibitory Activity (MIA) increases the invasiveness of pancreatic cancer cells. *Cancer cell international* **5**, 3, doi:10.1186/1475-2867-5-3 (2005).
- 87 Ellerhorst, J. A. *et al.* Clinical correlates of NRAS and BRAF mutations in primary human melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**, 229-235, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2276 (2011).

- 88 Elwood, J. M. & Gallagher, R. P. Body site distribution of cutaneous malignant melanoma in relationship to patterns of sun exposure. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **78**, 276-280, doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19981029)78:3<276::AID-IJC2>3.0.CO;2-S (1998).
- 89 Etheridge, S. L., Brooke, M. A., Kelsell, D. P. & Blaydon, D. C. Rhomboid proteins: a role in keratinocyte proliferation and cancer. *Cell and tissue research* **351**, 301-307, doi:10.1007/s00441-012-1542-1 (2013).
- 90 Eva, R. *et al.* Rab11 and its effector Rab coupling protein contribute to the trafficking of beta 1 integrins during axon growth in adult dorsal root ganglion neurons and PC12 cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**, 11654-11669, doi:10.1523/JNEUROSCI.2425-10.2010 (2010).
- 91 Fan, G. H., Lapierre, L. A., Goldenring, J. R., Sai, J. & Richmond, A. Rab11-family interacting protein 2 and myosin Vb are required for CXCR2 recycling and receptor-mediated chemotaxis. *Molecular biology of the cell* **15**, 2456-2469, doi:10.1091/mbc.E03-09-0706 (2004).
- 92 Fenouille, N. *et al.* The epithelial-mesenchymal transition (EMT) regulatory factor SLUG (SNAI2) is a downstream target of SPARC and AKT in promoting melanoma cell invasion. *PloS one* **7**, e40378, doi:10.1371/journal.pone.0040378 (2012).
- 93 Fernandez-Chacon, R. *et al.* Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* **410**, 41-49, doi:10.1038/35065004 (2001).
- 94 Fleig, L. *et al.* Ubiquitin-dependent intramembrane rhomboid protease promotes ERAD of membrane proteins. *Molecular cell* **47**, 558-569, doi:10.1016/j.molcel.2012.06.008 (2012).
- 95 Folsch, H. Regulation of membrane trafficking in polarized epithelial cells. *Current opinion in cell biology* **20**, 208-213, doi:10.1016/j.ceb.2008.01.003 (2008).
- 96 Franco-Chuaire, M. L., Magda Carolina, S. C. & Chuaire-Noack, L. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): principles and clinical impact in cancer therapy. *Investigacion clinica* **54**, 186-205 (2013).
- 97 Fredholm, B. B., Hokfelt, T. & Milligan, G. G-protein-coupled receptors: an update. *Acta Physiol (Oxf)* **190**, 3-7, doi:10.1111/j.1365-201X.2007.01689.x (2007).
- 98 Freeman, S. E. *et al.* Wavelength dependence of pyrimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated in situ with ultraviolet light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 5605-5609 (1989).
- 99 Friedmann, E. *et al.* SPPL2a and SPPL2b promote intramembrane proteolysis of TNFalpha in activated dendritic cells to trigger IL-12 production. *Nature cell biology* **8**, 843-848, doi:10.1038/ncb1440 (2006).
- 100 Friedmann, P. S. & Gilchrist, B. A. Ultraviolet radiation directly induces pigment production by cultured human melanocytes. *Journal of cellular physiology* **133**, 88-94, doi:10.1002/jcp.1041330111 (1987).
- 101 Fukuda, M. Distinct Rab binding specificity of Rim1, Rim2, rabphilin, and Noc2. Identification of a critical determinant of Rab3A/Rab27A recognition by Rim2. *The Journal of biological chemistry* **278**, 15373-15380, doi:10.1074/jbc.M212341200 (2003).
- 102 Fulga, T. A., Sinning, I., Dobberstein, B. & Pool, M. R. SRbeta coordinates signal sequence release from SRP with ribosome binding to the translocon. *The EMBO journal* **20**, 2338-2347, doi:10.1093/emboj/20.9.2338 (2001).
- 103 Gaggioli, C. & Sahai, E. Melanoma invasion - current knowledge and future directions. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* **20**, 161-172, doi:10.1111/j.1600-0749.2007.00378.x (2007).
- 104 Genersch, E., Hayess, K., Neuenfeld, Y. & Haller, H. Sustained ERK phosphorylation is necessary but not sufficient for MMP-9 regulation in endothelial cells: involvement of

- Ras-dependent and -independent pathways. *Journal of cell science* **113 Pt 23**, 4319-4330 (2000).
- 105 Geppert, M. *et al.* Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* **79**, 717-727 (1994).
- 106 Gierasch, L. M. Signal sequences. *Biochemistry* **28**, 923-930 (1989).
- 107 Giricz, O., Lauer, J. L. & Fields, G. B. Variability in melanoma metalloproteinase expression profiling. *Journal of biomolecular techniques : JBT* **21**, 194-204 (2010).
- 108 Goel, V. K., Lazar, A. J., Warneke, C. L., Redston, M. S. & Haluska, F. G. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *The Journal of investigative dermatology* **126**, 154-160, doi:10.1038/sj.jid.5700026 (2006).
- 109 Golde, T. E., Wolfe, M. S. & Greenbaum, D. C. Signal peptide peptidases: a family of intramembrane-cleaving proteases that cleave type 2 transmembrane proteins. *Seminars in cell & developmental biology* **20**, 225-230, doi:10.1016/j.semcdb.2009.02.003 (2009).
- 110 Goldenring, J. R. A central role for vesicle trafficking in epithelial neoplasia: intracellular highways to carcinogenesis. *Nature reviews. Cancer* **13**, 813-820, doi:10.1038/nrc3601 (2013).
- 111 Goldstein, A. M. *et al.* Rarity of CDK4 germline mutations in familial melanoma. *Melanoma research* **12**, 51-55 (2002).
- 112 Goldstein, J. L., Brown, M. S., Stradley, S. J., Reiss, Y. & Gierasch, L. M. Nonfarnesylated tetrapeptide inhibitors of protein farnesyltransferase. *The Journal of biological chemistry* **266**, 15575-15578 (1991).
- 113 Goodall, J. *et al.* The Brn-2 transcription factor links activated BRAF to melanoma proliferation. *Molecular and cellular biology* **24**, 2923-2931 (2004).
- 114 Grabski, R., Hay, J. & Sztul, E. Tethering factor P115: A new model for tether-SNARE interactions. *Bioarchitecture* **2** (2012).
- 115 Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology* **36**, 59-74 (1977).
- 116 Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C. & Marais, R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* **445**, 851-857, doi:10.1038/nature05661 (2007).
- 117 Greenblatt, E. J., Olzmann, J. A. & Kopito, R. R. Making the cut: intramembrane cleavage by a rhomboid protease promotes ERAD. *Nature structural & molecular biology* **19**, 979-981, doi:10.1038/nsmb.2398 (2012).
- 118 Griffon, N. *et al.* Identification of the active form of endothelial lipase, a homodimer in a head-to-tail conformation. *The Journal of biological chemistry* **284**, 23322-23330, doi:10.1074/jbc.M109.037002 (2009).
- 119 Gu, J., Tamura, M. & Yamada, K. M. Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways. *The Journal of cell biology* **143**, 1375-1383 (1998).
- 120 Guba, M. *et al.* Overexpression of melanoma inhibitory activity (MIA) enhances extravasation and metastasis of A-mel 3 melanoma cells in vivo. *British journal of cancer* **83**, 1216-1222, doi:10.1054/bjoc.2000.1424 (2000).
- 121 Ha, Y., Akiyama, Y. & Xue, Y. Structure and mechanism of rhomboid protease. *The Journal of biological chemistry* **288**, 15430-15436, doi:10.1074/jbc.R112.422378 (2013).
- 122 Haass, N. K., Smalley, K. S. & Herlyn, M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. *Journal of molecular histology* **35**, 309-318 (2004).
- 123 Haass, N. K., Smalley, K. S., Li, L. & Herlyn, M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* **18**, 150-159, doi:10.1111/j.1600-0749.2005.00235.x (2005).

- 124 Halban, P. A. Proinsulin processing in the regulated and the constitutive secretory pathway. *Diabetologia* **37 Suppl 2**, S65-72 (1994).
- 125 Haluska, F. G. *et al.* Genetic alterations in signaling pathways in melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **12**, 2301s-2307s, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2518 (2006).
- 126 Hasan, N. & Hu, C. Vesicle-associated membrane protein 2 mediates trafficking of alpha5beta1 integrin to the plasma membrane. *Experimental cell research* **316**, 12-23, doi:10.1016/j.yexcr.2009.10.007 (2010).
- 127 Hellerbrand, C. *et al.* The novel gene MIA2 acts as a tumour suppressor in hepatocellular carcinoma. *Gut* **57**, 243-251, doi:10.1136/gut.2007.129544 (2008).
- 128 Hirokawa, N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* **279**, 519-526 (1998).
- 129 Hirokawa, N., Noda, Y. & Okada, Y. Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Current opinion in cell biology* **10**, 60-73 (1998).
- 130 Hirokawa, N. & Takemura, R. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nature reviews. Neuroscience* **6**, 201-214, doi:10.1038/nrn1624 (2005).
- 131 Hiss, J. A. & Schneider, G. Architecture, function and prediction of long signal peptides. *Briefings in bioinformatics* **10**, 569-578, doi:10.1093/bib/bbp030 (2009).
- 132 Ho, E. & Dagnino, L. Epidermal growth factor induction of front-rear polarity and migration in keratinocytes is mediated by integrin-linked kinase and ELMO2. *Molecular biology of the cell* **23**, 492-502, doi:10.1091/mbc.E11-07-0596 (2012).
- 133 Hocker, T. & Tsao, H. Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. *Human mutation* **28**, 578-588, doi:10.1002/humu.20481 (2007).
- 134 Hofmann, U. B., Becker, J. C. & Brocker, E. B. [Role of matrix-degrading enzymes in melanoma progression]. *Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* **53**, 587-595, doi:10.1007/s00105-001-0301-0 (2002).
- 135 Hofmann, U. B., Eggert, A. A., Blass, K., Brocker, E. B. & Becker, J. C. Stromal cells as the major source for matrix metalloproteinase-2 in cutaneous melanoma. *Archives of dermatological research* **297**, 154-160, doi:10.1007/s00403-005-0588-2 (2005).
- 136 Hofmann, U. B., Houben, R., Brocker, E. B. & Becker, J. C. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie* **87**, 307-314, doi:10.1016/j.biochi.2005.01.013 (2005).
- 137 Hofmann, U. B., Westphal, J. R., Van Muijen, G. N. & Ruiter, D. J. Matrix metalloproteinases in human melanoma. *The Journal of investigative dermatology* **115**, 337-344, doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00068.x (2000).
- 138 Horton, A. C. & Ehlers, M. D. Neuronal polarity and trafficking. *Neuron* **40**, 277-295 (2003).
- 139 Hotary, K., Allen, E., Punturieri, A., Yana, I. & Weiss, S. J. Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3. *The Journal of cell biology* **149**, 1309-1323 (2000).
- 140 Hsu, M. Y. *et al.* E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *The American journal of pathology* **156**, 1515-1525, doi:10.1016/S0002-9440(10)65023-7 (2000).
- 141 Hsu, M. Y., Rovinsky, S., Penmatcha, S., Herlyn, M. & Muirhead, D. Bone morphogenetic proteins in melanoma: angel or devil? *Cancer metastasis reviews* **24**, 251-263, doi:10.1007/s10555-005-1575-y (2005).
- 142 Hsu, M. Y. *et al.* Adenoviral gene transfer of beta3 integrin subunit induces conversion from radial to vertical growth phase in primary human melanoma. *The American journal of pathology* **153**, 1435-1442 (1998).

- 143 Hsu, M. Y., Wheelock, M. J., Johnson, K. R. & Herlyn, M. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research* **1**, 188-194 (1996).
- 144 Hsu, T. C. Cytological studies on HeLa, a strain of human cervical carcinoma, I. Observations on mitosis and chromosomes. *Texas reports on biology and medicine* **12**, 833-846 (1954).
- 145 Izard, J. W. & Kendall, D. A. Signal peptides: exquisitely designed transport promoters. *Molecular microbiology* **13**, 765-773 (1994).
- 146 Jachimczak, P. *et al.* Inhibition of immunosuppressive effects of melanoma-inhibiting activity (MIA) by antisense techniques. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **113**, 88-92, doi:10.1002/ijc.20549 (2005).
- 147 Jackson, R. C. & Blobel, G. Post-translational cleavage of presecretory proteins with an extract of rough microsomes from dog pancreas containing signal peptidase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5598-5602 (1977).
- 148 Jedszko, C. & Sloane, B. F. Cysteine cathepsins in human cancer. *Biological chemistry* **385**, 1017-1027, doi:10.1515/BC.2004.132 (2004).
- 149 Jeng, H. H., Taylor, L. J. & Bar-Sagi, D. Sos-mediated cross-activation of wild-type Ras by oncogenic Ras is essential for tumorigenesis. *Nature communications* **3**, 1168, doi:10.1038/ncomms2173 (2012).
- 150 Johnson, J. L., Dwivedi, A., Somerville, M., George, S. J. & Newby, A. C. Matrix metalloproteinase (MMP)-3 activates MMP-9 mediated vascular smooth muscle cell migration and neointima formation in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **31**, e35-44, doi:10.1161/ATVBAHA.111.225623 (2011).
- 151 Jordens, I., Marsman, M., Kuijl, C. & Neefjes, J. Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic* **6**, 1070-1077, doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00336.x (2005).
- 152 Kadler, K. E., Baldock, C., Bella, J. & Boot-Handford, R. P. Collagens at a glance. *Journal of cell science* **120**, 1955-1958, doi:10.1242/jcs.03453 (2007).
- 153 Kamimura, Y. & Devreotes, P. N. Phosphoinositide-dependent protein kinase (PDK) activity regulates phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent and -independent protein kinase B activation and chemotaxis. *The Journal of biological chemistry* **285**, 7938-7946, doi:10.1074/jbc.M109.089235 (2010).
- 154 Kandaswamy, K. K. *et al.* SPRED: A machine learning approach for the identification of classical and non-classical secretory proteins in mammalian genomes. *Biochemical and biophysical research communications* **391**, 1306-1311, doi:10.1016/j.bbrc.2009.12.019 (2010).
- 155 Keller, P. & Simons, K. Post-Golgi biosynthetic trafficking. *Journal of cell science* **110 (Pt 24)**, 3001-3009 (1997).
- 156 Koehler, M. R. *et al.* Assignment of the human melanoma inhibitory activity gene (MIA) to 19q13.32-q13.33 by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Genomics* **35**, 265-267 (1996).
- 157 Kosako, H., Gotoh, Y., Matsuda, S., Ishikawa, M. & Nishida, E. Xenopus MAP kinase activator is a serine/threonine/tyrosine kinase activated by threonine phosphorylation. *The EMBO journal* **11**, 2903-2908 (1992).
- 158 Kuphal, S. & Bosserhoff, A. K. Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on endogenous N-cadherin expression in malignant melanoma. *Oncogene* **25**, 248-259, doi:10.1038/sj.onc.1209054 (2006).
- 159 Kuphal, S., Poser, I., Jobin, C., Hellerbrand, C. & Bosserhoff, A. K. Loss of E-cadherin leads to upregulation of NFkappaB activity in malignant melanoma. *Oncogene* **23**, 8509-8519, doi:10.1038/sj.onc.1207831 (2004).

- 160 Kusakabe, M., Cheong, P. L., Nikfar, R., McLennan, I. S. & Koishi, K. The structure of the TGF-beta latency associated peptide region determines the ability of the proprotein convertase furin to cleave TGF-betas. *Journal of cellular biochemistry* **103**, 311-320, doi:10.1002/jcb.21407 (2008).
- 161 Lah, T. T. & Kos, J. Cysteine proteinases in cancer progression and their clinical relevance for prognosis. *Biological chemistry* **379**, 125-130 (1998).
- 162 Lakkaraju, A. K., Mary, C., Scherrer, A., Johnson, A. E. & Strub, K. SRP keeps polypeptides translocation-competent by slowing translation to match limiting ER-targeting sites. *Cell* **133**, 440-451, doi:10.1016/j.cell.2008.02.049 (2008).
- 163 Landry, J. J. *et al.* The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3 (Bethesda)* **3**, 1213-1224, doi:10.1534/g3.113.005777 (2013).
- 164 Lau, M. T., So, W. K. & Leung, P. C. Fibroblast growth factor 2 induces E-cadherin down-regulation via PI3K/Akt/mTOR and MAPK/ERK signaling in ovarian cancer cells. *PloS one* **8**, e59083, doi:10.1371/journal.pone.0059083 (2013).
- 165 Leitinger, B. Transmembrane collagen receptors. *Annual review of cell and developmental biology* **27**, 265-290, doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154013 (2011).
- 166 Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117-1134, doi:10.1016/j.cell.2010.06.011 (2010).
- 167 Li, G., Fukunaga, M. & Herlyn, M. Reversal of melanocytic malignancy by keratinocytes is an E-cadherin-mediated process overriding beta-catenin signaling. *Experimental cell research* **297**, 142-151, doi:10.1016/j.yexcr.2004.03.012 (2004).
- 168 Li, G., Satyamoorthy, K. & Herlyn, M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer research* **61**, 3819-3825 (2001).
- 169 Li, G., Satyamoorthy, K. & Herlyn, M. Dynamics of cell interactions and communications during melanoma development. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* **13**, 62-70 (2002).
- 170 Li, X. *et al.* Structure of a presenilin family intramembrane aspartate protease. *Nature* **493**, 56-61, doi:10.1038/nature11801 (2013).
- 171 Li, Y. *et al.* Effects of inefficient cleavage of the signal sequence of HIV-1 gp 120 on its association with calnexin, folding, and intracellular transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 9606-9611 (1996).
- 172 Li, Y., Luo, L., Thomas, D. Y. & Kang, C. Y. Control of expression, glycosylation, and secretion of HIV-1 gp120 by homologous and heterologous signal sequences. *Virology* **204**, 266-278 (1994).
- 173 Liang, Z., Veeraprame, H., Bayan, N. & Li, G. The C-terminus of prenylin is important in forming a dimer conformation necessary for endoplasmic-reticulum-to-Golgi transport. *The Biochemical journal* **380**, 43-49, doi:10.1042/BJ20031788 (2004).
- 174 Lin, S., Naim, H. Y., Rodriguez, A. C. & Roth, M. G. Mutations in the middle of the transmembrane domain reverse the polarity of transport of the influenza virus hemagglutinin in MDCK epithelial cells. *The Journal of cell biology* **142**, 51-57 (1998).
- 175 Lin, Y. *et al.* NHE1 mediates migration and invasion of HeLa cells via regulating the expression and localization of MT1-MMP. *Cell biochemistry and function*, doi:10.1002/cbf.1815 (2011).
- 176 Lisanti, M. P., Caras, I. W., Davitz, M. A. & Rodriguez-Boulton, E. A glycopospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells. *The Journal of cell biology* **109**, 2145-2156 (1989).
- 177 Liu, M. *et al.* Impaired cleavage of preproinsulin signal peptide linked to autosomal-dominant diabetes. *Diabetes* **61**, 828-837, doi:10.2337/db11-0878 (2012).

- 178 Lo, T. L. *et al.* The ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibitor and likely tumor suppressor proteins, sprouty 1 and sprouty 2 are deregulated in breast cancer. *Cancer research* **64**, 6127-6136, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1207 (2004).
- 179 Lock, J. G. & Stow, J. L. Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin. *Molecular biology of the cell* **16**, 1744-1755, doi:10.1091/mbc.E04-10-0867 (2005).
- 180 Lord, C., Ferro-Novick, S. & Miller, E. A. The highly conserved COPII coat complex sorts cargo from the endoplasmic reticulum and targets it to the golgi. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**, doi:10.1101/cshperspect.a013367 (2013).
- 181 Loughheed, J. C., Holton, J. M., Alber, T., Bazan, J. F. & Handel, T. M. Structure of melanoma inhibitory activity protein, a member of a recently identified family of secreted proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 5515-5520, doi:10.1073/pnas.091601698 (2001).
- 182 MacKie, R. M., Hauschild, A. & Eggermont, A. M. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **20 Suppl 6**, vi1-7, doi:10.1093/annonc/mdp252 (2009).
- 183 Maehama, T. & Dixon, J. E. PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends in cell biology* **9**, 125-128 (1999).
- 184 Mahabeleshwar, G. H. & Byzova, T. V. Angiogenesis in melanoma. *Seminars in oncology* **34**, 555-565, doi:10.1053/j.seminoncol.2007.09.009 (2007).
- 185 Manabe, S. *et al.* Identification and characterization of Noc2 as a potential Rab3B effector protein in epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* **316**, 218-225, doi:10.1016/j.bbrc.2004.02.026 (2004).
- 186 Mandon, E. C., Jiang, Y. & Gilmore, R. Dual recognition of the ribosome and the signal recognition particle by the SRP receptor during protein targeting to the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology* **162**, 575-585, doi:10.1083/jcb.200303143 (2003).
- 187 Manne, V. *et al.* Identification and preliminary characterization of protein-cysteine farnesyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 7541-7545 (1990).
- 188 Marais, R., Light, Y., Paterson, H. F., Mason, C. S. & Marshall, C. J. Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry* **272**, 4378-4383 (1997).
- 189 Marr, D. G., Poser, I., Shellman, Y. G., Bosserhoff, A. K. & Norris, D. A. Ultraviolet radiation induces release of MIA: a new mechanism for UVR-induced progression of melanoma. *International journal of oncology* **25**, 105-111 (2004).
- 190 Masterson, J. & O'Dea, S. Posttranslational truncation of E-cadherin and significance for tumour progression. *Cells, tissues, organs* **185**, 175-179, doi:10.1159/000101318 (2007).
- 191 McCubrey, J. A. *et al.* Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Advances in enzyme regulation* **46**, 249-279, doi:10.1016/j.advenzreg.2006.01.004 (2006).
- 192 McCubrey, J. A. *et al.* Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et biophysica acta* **1773**, 1263-1284, doi:10.1016/j.bbamcr.2006.10.001 (2007).
- 193 McGill, G. G. *et al.* Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell* **109**, 707-718 (2002).
- 194 Mellman, I. & Warren, G. The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell* **100**, 99-112 (2000).
- 195 Miller, A. J. & Mihm, M. C., Jr. Melanoma. *The New England journal of medicine* **355**, 51-65, doi:10.1056/NEJMra052166 (2006).

- 196 Mizuno, M. & Singer, S. J. A soluble secretory protein is first concentrated in the endoplasmic reticulum before transfer to the Golgi apparatus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 5732-5736 (1993).
- 197 Morrison, C. J. *et al.* Cellular activation of MMP-2 (gelatinase A) by MT2-MMP occurs via a TIMP-2-independent pathway. *The Journal of biological chemistry* **276**, 47402-47410, doi:10.1074/jbc.M108643200 (2001).
- 198 Mostov, K., ter Beest, M. B. & Chapin, S. J. Catch the mu1B train to the basolateral surface. *Cell* **99**, 121-122 (1999).
- 199 Mothes, W. *et al.* Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. *Cell* **89**, 523-533 (1997).
- 200 Mueller, B. M. Different roles for plasminogen activators and metalloproteinases in melanoma metastasis. *Current topics in microbiology and immunology* **213 (Pt 1)**, 65-80 (1996).
- 201 Muesch, A. *et al.* A novel pathway for secretory proteins? *Trends in biochemical sciences* **15**, 86-88 (1990).
- 202 Muller, G. & Zimmermann, R. Import of honeybee prepromelittin into the endoplasmic reticulum: structural basis for independence of SRP and docking protein. *The EMBO journal* **6**, 2099-2107 (1987).
- 203 Naim, H. Y. & Naim, H. Dimerization of lactase-phlorizin hydrolase occurs in the endoplasmic reticulum, involves the putative membrane spanning domain and is required for an efficient transport of the enzyme to the cell surface. *European journal of cell biology* **70**, 198-208 (1996).
- 204 Nakahara, H. *et al.* Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 7959-7964 (1997).
- 205 Nakamura, M. & Tokura, Y. Epithelial-mesenchymal transition in the skin. *Journal of dermatological science* **61**, 7-13, doi:10.1016/j.jdermsci.2010.11.015 (2011).
- 206 Nakano, T. *et al.* Establishment of a human lung cancer cell line with high metastatic potential to multiple organs: gene expression associated with metastatic potential in human lung cancer. *Oncology reports* **28**, 1727-1735, doi:10.3892/or.2012.1972 (2012).
- 207 Nakazawa, H. *et al.* Rab33a mediates anterograde vesicular transport for membrane exocytosis and axon outgrowth. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **32**, 12712-12725, doi:10.1523/JNEUROSCI.0989-12.2012 (2012).
- 208 Nam, K. T. *et al.* Loss of Rab25 promotes the development of intestinal neoplasia in mice and is associated with human colorectal adenocarcinomas. *The Journal of clinical investigation* **120**, 840-849, doi:10.1172/JCI40728 (2010).
- 209 Nesbit, M. *et al.* Basic fibroblast growth factor induces a transformed phenotype in normal human melanocytes. *Oncogene* **18**, 6469-6476, doi:10.1038/sj.onc.1203066 (1999).
- 210 Ng, D. T., Brown, J. D. & Walter, P. Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *The Journal of cell biology* **134**, 269-278 (1996).
- 211 Nickel, W. The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *European journal of biochemistry / FEBS* **270**, 2109-2119 (2003).
- 212 Nishimura, N. & Balch, W. E. A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science* **277**, 556-558 (1997).
- 213 Nomura, T. & Katunuma, N. Involvement of cathepsins in the invasion, metastasis and proliferation of cancer cells. *The journal of medical investigation : JMI* **52**, 1-9 (2005).

- 214 Novick, P. & Zerial, M. The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Current opinion in cell biology* **9**, 496-504 (1997).
- 215 Oikawa, T. ETS transcription factors: possible targets for cancer therapy. *Cancer science* **95**, 626-633 (2004).
- 216 Omholt, K., Platz, A., Kanter, L., Ringborg, U. & Hansson, J. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **9**, 6483-6488 (2003).
- 217 Osborne, A. R., Rapoport, T. A. & van den Berg, B. Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annual review of cell and developmental biology* **21**, 529-550, doi:10.1146/annurev.cellbio.21.012704.133214 (2005).
- 218 Padua, R. A., Barrass, N. & Currie, G. A. A novel transforming gene in a human malignant melanoma cell line. *Nature* **311**, 671-673 (1984).
- 219 Paetzel, M., Karla, A., Strynadka, N. C. & Dalbey, R. E. Signal peptidases. *Chemical reviews* **102**, 4549-4580 (2002).
- 220 Palade, G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* **189**, 347-358 (1975).
- 221 Palazzo, A. F. *et al.* Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization. *Current biology : CB* **11**, 1536-1541 (2001).
- 222 Pavlos, N. J. *et al.* Quantitative analysis of synaptic vesicle Rabs uncovers distinct yet overlapping roles for Rab3a and Rab27b in Ca²⁺-triggered exocytosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**, 13441-13453, doi:10.1523/JNEUROSCI.0907-10.2010 (2010).
- 223 Perez, R. P., Zhang, P., Bosserhoff, A. K., Buettner, R. & Abu-Hadid, M. Expression of melanoma inhibitory activity in melanoma and nonmelanoma tissue specimens. *Human pathology* **31**, 1381-1388 (2000).
- 224 Perrot, C. Y., Javelaud, D. & Mauviel, A. Insights into the Transforming Growth Factor-beta Signaling Pathway in Cutaneous Melanoma. *Annals of dermatology* **25**, 135-144, doi:10.5021/ad.2013.25.2.135 (2013).
- 225 Pevsner, J. *et al.* Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex. *Neuron* **13**, 353-361 (1994).
- 226 Pfeifer, G. P. & Besaratinia, A. UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **11**, 90-97, doi:10.1039/c1pp05144j (2012).
- 227 Pollock, P. M. *et al.* High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature genetics* **33**, 19-20, doi:10.1038/ng1054 (2003).
- 228 Poser, I., Tatzel, J., Kuphal, S. & Bosserhoff, A. K. Functional role of MIA in melanocytes and early development of melanoma. *Oncogene* **23**, 6115-6124, doi:10.1038/sj.onc.1207797 (2004).
- 229 Posthaus, H. *et al.* Proprotein cleavage of E-cadherin by furin in baculovirus over-expression system: potential role of other convertases in mammalian cells. *FEBS letters* **438**, 306-310 (1998).
- 230 Quintanilla-Dieck, M. J., Codriansky, K., Keady, M., Bhawan, J. & Runger, T. M. Cathepsin K in melanoma invasion. *The Journal of investigative dermatology* **128**, 2281-2288, doi:10.1038/jid.2008.63 (2008).
- 231 Ramel, D., Wang, X., Laflamme, C., Montell, D. J. & Emery, G. Rab11 regulates cell-cell communication during collective cell movements. *Nature cell biology* **15**, 317-324, doi:10.1038/ncb2681 (2013).

- 232 Recio, J. A. & Merlino, G. Hepatocyte growth factor/scatter factor activates proliferation in melanoma cells through p38 MAPK, ATF-2 and cyclin D1. *Oncogene* **21**, 1000-1008, doi:10.1038/sj.onc.1205150 (2002).
- 233 Rehm, A., Stern, P., Ploegh, H. L. & Tortorella, D. Signal peptide cleavage of a type I membrane protein, HCMV US11, is dependent on its membrane anchor. *The EMBO journal* **20**, 1573-1582, doi:10.1093/emboj/20.7.1573 (2001).
- 234 Reim, K. *et al.* Complexins regulate a late step in Ca²⁺-dependent neurotransmitter release. *Cell* **104**, 71-81 (2001).
- 235 Reiniger, I. W. *et al.* "Melanoma inhibitory activity" (MIA): a promising serological tumour marker in metastatic uveal melanoma. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* **243**, 1161-1166, doi:10.1007/s00417-005-1171-4 (2005).
- 236 Reiss, Y. *et al.* Nonidentical subunits of p21H-ras farnesyltransferase. Peptide binding and farnesyl pyrophosphate carrier functions. *The Journal of biological chemistry* **266**, 10672-10677 (1991).
- 237 Remacle, A. G., Rozanov, D. V., Fugere, M., Day, R. & Strongin, A. Y. Furin regulates the intracellular activation and the uptake rate of cell surface-associated MT1-MMP. *Oncogene* **25**, 5648-5655, doi:10.1038/sj.onc.1209572 (2006).
- 238 Rendtorff, N. D., Frodin, M., Attie-Bitach, T., Vekemans, M. & Tommerup, N. Identification and characterization of an inner ear-expressed human melanoma inhibitory activity (MIA)-like gene (MIAL) with a frequent polymorphism that abolishes translation. *Genomics* **71**, 40-52, doi:10.1006/geno.2000.6409 (2001).
- 239 Rich, A. & Crick, F. H. The structure of collagen. *Nature* **176**, 915-916 (1955).
- 240 Rich, A. & Crick, F. H. The molecular structure of collagen. *Journal of molecular biology* **3**, 483-506 (1961).
- 241 Roberts, P. J. & Der, C. J. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* **26**, 3291-3310, doi:10.1038/sj.onc.1210422 (2007).
- 242 Robertson, N. G. *et al.* A novel conserved cochlear gene, OTOR: identification, expression analysis, and chromosomal mapping. *Genomics* **66**, 242-248, doi:10.1006/geno.2000.6224 (2000).
- 243 Robinson, D. R., Wu, Y. M. & Lin, S. F. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* **19**, 5548-5557, doi:10.1038/sj.onc.1203957 (2000).
- 244 Rodriguez-Viciana, P. *et al.* Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome. *Science* **311**, 1287-1290, doi:10.1126/science.1124642 (2006).
- 245 Rothhammer, T., Bataille, F., Spruss, T., Eissner, G. & Bosserhoff, A. K. Functional implication of BMP4 expression on angiogenesis in malignant melanoma. *Oncogene* **26**, 4158-4170, doi:10.1038/sj.onc.1210182 (2007).
- 246 Rothhammer, T., Braig, S. & Bosserhoff, A. K. Bone morphogenetic proteins induce expression of metalloproteinases in melanoma cells and fibroblasts. *Eur J Cancer* **44**, 2526-2534, doi:10.1016/j.ejca.2008.07.029 (2008).
- 247 Rothhammer, T. *et al.* Bone morphogenetic protein 7 (BMP7) expression is a potential novel prognostic marker for recurrence in patients with primary melanoma. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers* **3**, 111-117 (2007).
- 248 Rothman, J. E. & Warren, G. Implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics. *Current biology : CB* **4**, 220-233 (1994).
- 249 Rothman, J. E. & Wieland, F. T. Protein sorting by transport vesicles. *Science* **272**, 227-234 (1996).

- 250 Rubartelli, A., Cozzolino, F., Talio, M. & Sitia, R. A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *The EMBO journal* **9**, 1503-1510 (1990).
- 251 Russo, A. E. *et al.* Melanoma: molecular pathogenesis and emerging target therapies (Review). *International journal of oncology* **34**, 1481-1489 (2009).
- 252 Sandy, J. D., Flannery, C. R., Neame, P. J. & Lohmander, L. S. The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence for the involvement in osteoarthritis of a novel proteinase which cleaves the Glu 373-Ala 374 bond of the interglobular domain. *The Journal of clinical investigation* **89**, 1512-1516, doi:10.1172/JCI115742 (1992).
- 253 Sasaki, A. *et al.* Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1. *Nature cell biology* **5**, 427-432, doi:10.1038/ncb978 (2003).
- 254 Satyamoorthy, K. *et al.* Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer research* **63**, 756-759 (2003).
- 255 Schaller, U. C. *et al.* Melanoma inhibitory activity: a novel serum marker for uveal melanoma. *Melanoma research* **12**, 593-599, doi:10.1097/01.cmr.0000043146.28051.b8 (2002).
- 256 Schaller, U. C. *et al.* [Melanoma inhibitory activity (MIA). Evaluation of a new tumor-associated antigen as a serum marker for uveal melanomas]. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* **97**, 429-432 (2000).
- 257 Scheiffele, P., Peranen, J. & Simons, K. N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature* **378**, 96-98, doi:10.1038/378096a0 (1995).
- 258 Schekman, R. & Orci, L. Coat proteins and vesicle budding. *Science* **271**, 1526-1533 (1996).
- 259 Schiavo, G., Stenbeck, G., Rothman, J. E. & Sollner, T. H. Binding of the synaptic vesicle v-SNARE, synaptotagmin, to the plasma membrane t-SNARE, SNAP-25, can explain docked vesicles at neurotoxin-treated synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 997-1001 (1997).
- 260 Schimmoller, F., Simon, I. & Pfeffer, S. R. Rab GTPases, directors of vesicle docking. *The Journal of biological chemistry* **273**, 22161-22164 (1998).
- 261 Schlenstedt, G., Gudmundsson, G. H., Boman, H. G. & Zimmermann, R. A large presecretory protein translocates both cotranslationally, using signal recognition particle and ribosome, and post-translationally, without these ribonucleoparticles, when synthesized in the presence of mammalian microsomes. *The Journal of biological chemistry* **265**, 13960-13968 (1990).
- 262 Schlenstedt, G. & Zimmermann, R. Import of frog prepropeptide GLa into microsomes requires ATP but does not involve docking protein or ribosomes. *The EMBO journal* **6**, 699-703 (1987).
- 263 Schmidt, J., Friebe, K., Schonherr, R., Coppolino, M. G. & Bosserhoff, A. K. Migration-associated secretion of melanoma inhibitory activity at the cell rear is supported by KCa3.1 potassium channels. *Cell research* **20**, 1224-1238, doi:10.1038/cr.2010.121 (2010).
- 264 Schmidt, J., Riechers, A. & Bosserhoff, A. K. MIA--a new target protein for malignant melanoma therapy. *Histology and histopathology* **28**, 421-426 (2013).
- 265 Schmidt, J. *et al.* Targeting melanoma metastasis and immunosuppression with a new mode of melanoma inhibitory activity (MIA) protein inhibition. *PloS one* **7**, e37941, doi:10.1371/journal.pone.0037941 (2012).
- 266 Schubert, T. *et al.* Modulation of cartilage differentiation by melanoma inhibiting activity/cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein (MIA/CD-RAP). *Experimental & molecular medicine* **42**, 166-174, doi:10.3858/emm.2010.42.3.017 (2010).

- 267 Schuh, M. An actin-dependent mechanism for long-range vesicle transport. *Nature cell biology* **13**, 1431-1436, doi:10.1038/ncb2353 (2011).
- 268 Schuierer, M. M., Bataille, F., Hagan, S., Kolch, W. & Bosserhoff, A. K. Reduction in Raf kinase inhibitor protein expression is associated with increased Ras-extracellular signal-regulated kinase signaling in melanoma cell lines. *Cancer research* **64**, 5186-5192, doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3861 (2004).
- 269 Seabra, M. C., Mules, E. H. & Hume, A. N. Rab GTPases, intracellular traffic and disease. *Trends in molecular medicine* **8**, 23-30 (2002).
- 270 Seabra, M. C. & Wasmeier, C. Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Current opinion in cell biology* **16**, 451-457, doi:10.1016/j.ceb.2004.06.014 (2004).
- 271 Shao, S. & Hegde, R. S. Membrane protein insertion at the endoplasmic reticulum. *Annual review of cell and developmental biology* **27**, 25-56, doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154125 (2011).
- 272 Shellman, Y. G., Makela, M. & Norris, D. A. Induction of secreted matrix metalloproteinase-9 activity in human melanoma cells by extracellular matrix proteins and cytokines. *Melanoma research* **16**, 207-211, doi:10.1097/01.cmr.0000215033.92693.73 (2006).
- 273 Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical chemistry* **68**, 850-858 (1996).
- 274 Shirataki, H., Sasaki, T. & Takai, Y. Rabphilin-3: a target molecule for Rab3 small G proteins. *Methods in enzymology* **329**, 75-82 (2001).
- 275 Shoulders, M. D. & Raines, R. T. Collagen structure and stability. *Annual review of biochemistry* **78**, 929-958, doi:10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833 (2009).
- 276 Shull, A. Y. *et al.* Novel somatic mutations to PI3K pathway genes in metastatic melanoma. *PloS one* **7**, e43369, doi:10.1371/journal.pone.0043369 (2012).
- 277 Smalley, K. S. A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *International journal of cancer. Journal international du cancer* **104**, 527-532, doi:10.1002/ijc.10978 (2003).
- 278 Sorensen, J. B. SNARE complexes prepare for membrane fusion. *Trends in neurosciences* **28**, 453-455, doi:10.1016/j.tins.2005.06.007 (2005).
- 279 Sounni, N. E. *et al.* Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in A2058 melanoma cells is associated with MMP-2 activation and increased tumor growth and vascularization. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **98**, 23-28 (2002).
- 280 Sounni, N. E. *et al.* MT1-MMP expression promotes tumor growth and angiogenesis through an up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **16**, 555-564 (2002).
- 281 Sroka, J. *et al.* Overexpression of thioredoxin reductase 1 inhibits migration of HEK-293 cells. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **99**, 677-687, doi:10.1042/BC20070024 (2007).
- 282 Stabuc, B. *et al.* Urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 and type 2 in stage I malignant melanoma. *Oncology reports* **10**, 635-639 (2003).
- 283 Stahl, J. M. *et al.* Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer research* **64**, 7002-7010, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1399 (2004).
- 284 Stahlecker, J. *et al.* MIA as a reliable tumor marker in the serum of patients with malignant melanoma. *Anticancer research* **20**, 5041-5044 (2000).
- 285 Stanley, P. Golgi glycosylation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**, doi:10.1101/cshperspect.a005199 (2011).

- 286 Stein, M. P., Dong, J. & Wandering-Ness, A. Rab proteins and endocytic trafficking: potential targets for therapeutic intervention. *Advanced drug delivery reviews* **55**, 1421-1437 (2003).
- 287 Steinhusen, U. *et al.* Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **276**, 4972-4980, doi:10.1074/jbc.M006102200 (2001).
- 288 Stoll, R. & Bosserhoff, A. Extracellular SH3 domain containing proteins--features of a new protein family. *Current protein & peptide science* **9**, 221-226 (2008).
- 289 Stoll, R., Lodermeier, S. & Bosserhoff, A. K. Detailed analysis of MIA protein by mutagenesis. *Biological chemistry* **387**, 1601-1606, doi:10.1515/BC.2006.199 (2006).
- 290 Stoll, R. *et al.* The extracellular human melanoma inhibitory activity (MIA) protein adopts an SH3 domain-like fold. *The EMBO journal* **20**, 340-349, doi:10.1093/emboj/20.3.340 (2001).
- 291 Sugimoto, H. *et al.* Differential recognition of tyrosine-based basolateral signals by AP-1B subunit mu1B in polarized epithelial cells. *Molecular biology of the cell* **13**, 2374-2382, doi:10.1091/mbc.E01-10-0096 (2002).
- 292 Sztul, E. S., Chu, T. W., Strauss, A. W. & Rosenberg, L. E. Import of the malate dehydrogenase precursor by mitochondria. Cleavage within leader peptide by matrix protease leads to formation of intermediate-sized form. *The Journal of biological chemistry* **263**, 12085-12091 (1988).
- 293 Sztul, E. S. *et al.* Import of rat ornithine transcarbamylase precursor into mitochondria: two-step processing of the leader peptide. *The Journal of cell biology* **105**, 2631-2639 (1987).
- 294 Tabe, L. *et al.* Segregation of mutant ovalbumins and ovalbumin-globin fusion proteins in *Xenopus* oocytes. Identification of an ovalbumin signal sequence. *Journal of molecular biology* **180**, 645-666 (1984).
- 295 Tamura, M. *et al.* Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* **280**, 1614-1617 (1998).
- 296 Tang, A. *et al.* E-cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes in vitro. *Journal of cell science* **107** (Pt 4), 983-992 (1994).
- 297 Taraboletti, G. *et al.* Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *The American journal of pathology* **160**, 673-680, doi:10.1016/S0002-9440(10)64887-0 (2002).
- 298 Tassin, J. P., Boutin, J. A., Ernould, A. P. & Atassi, G. [Farnesyltransferase as target for non-cytotoxic anti-cancer agents: first steps]. *Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales* **185**, 306-311 (1991).
- 299 Tatzel, J., Poser, I., Schroeder, J. & Bosserhoff, A. K. Inhibition of melanoma inhibitory activity (MIA) expression in melanoma cells leads to molecular and phenotypic changes. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* **18**, 92-101, doi:10.1111/j.1600-0749.2005.00212.x (2005).
- 300 Tsavachidou, D. *et al.* SPRY2 is an inhibitor of the ras/extracellular signal-regulated kinase pathway in melanocytes and melanoma cells with wild-type BRAF but not with the V599E mutant. *Cancer research* **64**, 5556-5559, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1669 (2004).
- 301 Tuteja, R. Type I signal peptidase: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics* **441**, 107-111, doi:10.1016/j.abb.2005.07.013 (2005).
- 302 Ullrich, A. & Schlessinger, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**, 203-212 (1990).

- 303 Ungar, D. & Hughson, F. M. SNARE protein structure and function. *Annual review of cell and developmental biology* **19**, 493-517, doi:10.1146/annurev.cellbio.19.110701.155609 (2003).
- 304 Urban, S. & Dickey, S. W. The rhomboid protease family: a decade of progress on function and mechanism. *Genome biology* **12**, 231, doi:10.1186/gb-2011-12-10-231 (2011).
- 305 Vale, R. D. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* **112**, 467-480 (2003).
- 306 Vellon, L., Menendez, J. A. & Lupu, R. A bidirectional "alpha(v)beta(3) integrin-ERK1/ERK2 MAPK" connection regulates the proliferation of breast cancer cells. *Molecular carcinogenesis* **45**, 795-804, doi:10.1002/mc.20242 (2006).
- 307 Voss, M., Schroder, B. & Fluhrer, R. Mechanism, specificity, and physiology of signal peptide peptidase (SPP) and SPP-like proteases. *Biochimica et biophysica acta* **1828**, 2828-2839, doi:10.1016/j.bbamem.2013.03.033 (2013).
- 308 Walter, P. & Blobel, G. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *The Journal of cell biology* **91**, 557-561 (1981).
- 309 Walter, P., Gilmore, R. & Blobel, G. Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Cell* **38**, 5-8 (1984).
- 310 Wang, A. X. & Qi, X. Y. Targeting RAS/RAF/MEK/ERK signaling in metastatic melanoma. *IUBMB life* **65**, 748-758, doi:10.1002/iub.1193 (2013).
- 311 Wang, X., Hu, B., Zimmermann, B. & Kilimann, M. W. Rim1 and rabphilin-3 bind Rab3-GTP by composite determinants partially related through N-terminal alpha-helix motifs. *The Journal of biological chemistry* **276**, 32480-32488, doi:10.1074/jbc.M103337200 (2001).
- 312 Wang, Y. & McNiven, M. A. Invasive matrix degradation at focal adhesions occurs via protease recruitment by a FAK-p130Cas complex. *The Journal of cell biology* **196**, 375-385, doi:10.1083/jcb.201105153 (2012).
- 313 Watanabe, T. *et al.* Significance of the Grb2 and son of sevenless (Sos) proteins in human bladder cancer cell lines. *IUBMB life* **49**, 317-320, doi:10.1080/15216540050033195 (2000).
- 314 Weng, L. P., Smith, W. M., Brown, J. L. & Eng, C. PTEN inhibits insulin-stimulated MEK/MAPK activation and cell growth by blocking IRS-1 phosphorylation and IRS-1/Grb-2/Sos complex formation in a breast cancer model. *Human molecular genetics* **10**, 605-616 (2001).
- 315 Westermarck, J. & Kahari, V. M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **13**, 781-792 (1999).
- 316 Wickner, W. & Schekman, R. Protein translocation across biological membranes. *Science* **310**, 1452-1456, doi:10.1126/science.1113752 (2005).
- 317 Wieland, F. T., Gleason, M. L., Serafini, T. A. & Rothman, J. E. The rate of bulk flow from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *Cell* **50**, 289-300 (1987).
- 318 Wild, K., Halic, M., Sinning, I. & Beckmann, R. SRP meets the ribosome. *Nature structural & molecular biology* **11**, 1049-1053, doi:10.1038/nsmb853 (2004).
- 319 Winklmeier, A., Contreras-Shannon, V., Arndt, S., Melle, C. & Bosserhoff, A. K. Cadherin-7 interacts with melanoma inhibitory activity protein and negatively modulates melanoma cell migration. *Cancer science* **100**, 261-268, doi:10.1111/j.1349-7006.2008.01048.x (2009).

- 320 Wise, R. J. *et al.* Expression of a human proprotein processing enzyme: correct cleavage
of the von Willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site. *Proceedings of*
321 *the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 9378-9382 (1990).
- 322 Wolfe, M. S. Intramembrane-cleaving proteases. *The Journal of biological chemistry* **284**,
13969-13973, doi:10.1074/jbc.R800039200 (2009).
- 323 Woods, D. *et al.* Induction of beta3-integrin gene expression by sustained activation of
the Ras-regulated Raf-MEK-extracellular signal-regulated kinase signaling pathway.
Molecular and cellular biology **21**, 3192-3205, doi:10.1128/MCB.21.9.3192-3205.2001
(2001).
- 324 Woskowicz, A. M., Weaver, S. A., Shitomi, Y., Ito, N. & Itoh, Y. MT-LOOP-dependent
localization of MT1-MMP to the cell adhesion complexes promotes cancer cell invasion.
The Journal of biological chemistry, doi:10.1074/jbc.M113.496067 (2013).
- 325 Xie, W. F., Zhang, X. & Sandell, L. J. The 2.2-kb promoter of cartilage-derived retinoic
acid-sensitive protein controls gene expression in cartilage and embryonic mammary
buds of transgenic mice. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix*
Biology **19**, 501-509 (2000).
- 326 Xu, H. *et al.* Discoidin domain receptors promote alpha1beta1- and alpha2beta1-
integrin mediated cell adhesion to collagen by enhancing integrin activation. *PloS one* **7**,
e52209, doi:10.1371/journal.pone.0052209 (2012).
- 327 Yang, Y. *et al.* Highly conserved salt bridge stabilizes rigid signal patch at extracellular
loop critical for surface expression of acid-sensing ion channels. *The Journal of biological*
chemistry **287**, 14443-14455, doi:10.1074/jbc.M111.334250 (2012).
- 328 Yang, Z. & Cox, J. L. Cathepsin L increases invasion and migration of B16 melanoma.
Cancer cell international **7**, 8, doi:10.1186/1475-2867-7-8 (2007).
- 329 Yeaman, C. *et al.* The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of
neurotrophin receptors in polarized MDCK cells. *The Journal of cell biology* **139**, 929-940
(1997).
- 330 Yeh, Y. C., Lin, H. H. & Tang, M. J. A tale of two collagen receptors, integrin beta1 and
discoidin domain receptor 1, in epithelial cell differentiation. *American journal of*
physiology. Cell physiology **303**, C1207-1217, doi:10.1152/ajpcell.00253.2012 (2012).
- 331 Yokode, M. *et al.* Cytoplasmic sequence required for basolateral targeting of LDL
receptor in livers of transgenic mice. *The Journal of cell biology* **117**, 39-46 (1992).
- 332 Yonekawa, Y. *et al.* Defect in synaptic vesicle precursor transport and neuronal cell death
in KIF1A motor protein-deficient mice. *The Journal of cell biology* **141**, 431-441 (1998).
- 333 Yoshihara, M. & Littleton, J. T. Synaptotagmin I functions as a calcium sensor to
synchronize neurotransmitter release. *Neuron* **36**, 897-908 (2002).
- 334 Yoshimura, S. *et al.* Dynamics of Golgi matrix proteins after the blockage of ER to Golgi
transport. *Journal of biochemistry* **135**, 201-216 (2004).
- 335 Yurchenco, P. D., Cheng, Y. S. & Colognato, H. Laminin forms an independent network
in basement membranes. *The Journal of cell biology* **117**, 1119-1133 (1992).
- 336 Zaidi, M. R., Day, C. P. & Merlino, G. From UVs to metastases: modeling melanoma
initiation and progression in the mouse. *The Journal of investigative dermatology* **128**,
2381-2391, doi:10.1038/jid.2008.177 (2008).
- 337 Zambruno, G. *et al.* Expression of integrin receptors and their role in adhesion, spreading
and migration of normal human melanocytes. *Journal of cell science* **105 (Pt 1)**, 179-190
(1993).
- 338 Zerial, M. & McBride, H. Rab proteins as membrane organizers. *Nature reviews.*
Molecular cell biology **2**, 107-117, doi:10.1038/35052055 (2001).
- 339 Zhang, L., Lookene, A., Wu, G. & Olivecrona, G. Calcium triggers folding of lipoprotein
lipase into active dimers. *The Journal of biological chemistry* **280**, 42580-42591,
doi:10.1074/jbc.M507252200 (2005).

- 339 Zhang, L. *et al.* Effect of matrine on HeLa cell adhesion and migration. *European journal of pharmacology* **563**, 69-76, doi:10.1016/j.ejphar.2007.01.073 (2007).
- 340 Zimmermann, R., Eyrisch, S., Ahmad, M. & Helms, V. Protein translocation across the ER membrane. *Biochimica et biophysica acta* **1808**, 912-924, doi:10.1016/j.bbamem.2010.06.015 (2011).
- 341 Zou, H. *et al.* Human rhomboid family-1 gene RHBDF1 participates in GPCR-mediated transactivation of EGFR growth signals in head and neck squamous cancer cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **23**, 425-432, doi:10.1096/fj.08-112771 (2009).

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQP	Aquaporin
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bFGF	Basic Fibroblast growth factor
BMP	Bone morphogenetic protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
Ca	Kalzium
Cdc	Cell division control protein
cDNA	komplementäre DNA
COP	Coat protein complex
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix

EDTA	Ethylendiamin-N',N',N',N', Tetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERAD	ER-assoziierte Degradation
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat.: „und andere“)
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FGF	Fibroblast growth factor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm; Gravitationskraft
G	Guanin
GAG	Glykosaminoglykan
GAP	GTPase activating protein
GDF	GDP-displacement factor
GDI	GDP-dissociation inhibitor
GDP	Guanine diphosphate (Guanosindiphosphat)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GEF	Guanine-exchange factor
GLa	Peptide with amino-terminal glycine and carboxyl-terminal leucinamide
GP	Glykoprotein
GPI	Glycosyl-Phosphatidylinositol
GTP	Guanine triphosphate (Guanosintriphosphat)
h	Stunde(n)
HGF	Hepatocyte growth factor
HIV-1 gp120	Human immunodeficiency virus Glykoprotein 120
IL	Interleukin
iRhom	Katalytisch inaktive Rhomboidase

k	Kilo (10^3)
kb	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton
KitL	Kit-Ligand
l	Liter
LB	Luria Bertani
LDL	Low density lipoprotein
LPH	Lactase-Phlorizin Hydrolase
m	Meter; Milli (10^{-3})
M	Mol; molar
mA	Milliampere
MAP	Mitogen activated protein
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MDH	Malatdehydrogenase
MIA	Melanoma Inhibitory Activity
min	Minute(n)
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	messenger-RNA
MT1-MMP	Membrane type Matrix-Metalloprotease 1
μ	Mikro (10^{-6})
n	Nano (10^{-9})
NBT	Nitroblau Tetrazoliumchlorid
NHEM	Normale humane epidermale Melanozyten
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OTC	Ornithin-Transcarbamylase
p	Pico (10^{-12})
PAA	Poly-Acrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PG	Proteoglykan
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
Rab	Ras-related in brain
Ras	Rat sarcoma
RE	Recycling endosome
RHBDL2	Rhomboid-like protein 2
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
s	Sekunde(n)
SCF	Stem cell factor
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat; Natriumdodecylsulfat
SPase	Signalpeptidase
SPP	Signal peptide peptidase
SPPL	Signal peptide peptidase like
S2P	Site-2 protease
T	Thymin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-1,2-diamin
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Unit; Uracil
UV	Ultraviolett

V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VSV	Vesicular stomatitis virus
W	Watt
wt	Wildtyp
(v/v)	Volumenverhältnis (volume per volume)
(w/v)	Masse pro Volumen (weight per volume)
°C	Grad Celsius

9 Danksagung

Ich bedanke mich hiermit bei allen Personen, die mich während meiner Promotion unterstützt und begleitet haben.

Insbesondere möchte ich mich bei Prof. Dr. Anja-Katrin Boßerhoff für die Vergabe dieses interessanten Themas, die intensive Betreuung und ihre hilfreichen Anregungen und Ideen bedanken.

Vielen Dank an den Leiter des Instituts für Pathologie Prof. Dr. Ferdinand Hofstädter für die Möglichkeit, diese Arbeit am Universitätsklinikum Regensburg durchführen zu können.

Ein großes Dankeschön an meine Mentoren Prof. Dr. Rainer Deutzmann und Prof. Dr. Peter Oefner, die mich mit ihren Ideen bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Vielen Dank an die gesamte Arbeitsgruppe Boßerhoff für die Hilfe im Labor, die freundliche Atmosphäre und die gemeinsame Zeit zusammen.

Ein großes Dankeschön geht an meine Familie, die mir mein Studium und meine Promotion ermöglicht haben. Vielen Dank, dass ihr mich auf diesem Weg unterstützt habt.

Ganz besonders möchte ich mich bei dir bedanken Eva, weil du immer für mich da bist, an mich glaubst und mir selbst in schwierigsten Zeiten eine unglaubliche Kraft verleihst.