



Identifizierung und Charakterisierung HLA-G-regulierender microRNAs

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Simon Jasinski-Bergner

geb. am 03.09.1983 in Lutherstadt Wittenberg

1. Gutachter: Prof. Sven-Erik Behrens
2. Gutachter: Prof. Barbara Seliger
3. Gutachter: Prof. Jörg Wischhusen

Verteidigungstermin: 10.09.2015

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	
1.1. Die Evolution des Immunsystems	S. 1
1.2. Das angeborene Immunsystem	S. 1
1.3. Das adaptive Immunsystem	S. 3
1.4. Die Antigen-Prozessierung und -Präsentation auf den HLA-Klasse I-Molekülen	S. 4
1.5. Die klassischen HLA-Klasse I-Moleküle	S. 5
1.6. Die nichtklassischen HLA-Klasse I-Moleküle am Beispiel von HLA-G	S. 7
1.6.1. Die Regulation der HLA-G-Expression	S. 10
1.7. <i>Tumor immune escape</i> -Mechanismen.....	S. 12
1.8. microRNAs	S. 14
2. Zielstellung	S. 19
3. Materialien	
3.1. Chemikalien	S. 21
3.2. Puffer	S. 22
3.3. Oligonukleotide	S. 23
3.4. Antikörper.....	S. 25
3.5. Enzyme	S. 26
3.6. Kits.....	S. 26
3.7. Verbrauchsmaterialien	S. 27
3.8. Geräte	S. 28
3.9. <i>Software</i>	S. 28
4. Methoden	
4.1. Zellkultur, verwendete Zelllinien und stabile Transfektanten.....	S. 30
4.2. Isolierung von DNA, RNA und microRNAs	S. 32
4.3. HLA-G-Allel-Genotypisierung	S. 32
4.4. cDNA-Synthese, semi-quantitative und quantitative PCR.....	S. 32
4.5. Proteinextraktion und Western Blot-Analyse.....	S. 33
4.6. Durchflusszytometrie.....	S. 33
4.7. CFSE-Markierung, Zellzyklusanalyse, Apoptose-Detektion und Zellviabilitätsmessung	S. 33
4.8. CD107a Degranulations-Assay	S. 34
4.9. Luziferase-Reportergen-Assay.....	S. 35

4.10.	Klonierung der Expressionsvektoren und miR-Decoys, sowie deren Transfektion	S. 36
4.11.	microRNA-Affinitätsaufreinigung (miTRAP)	S. 37
4.12.	Immunhistochemische Analysen unter Verwendung von NZK- <i>Tissue microarrays</i>	S. 37
4.13.	Zwei-dimensionale Gelelektrophorese (2-DE), Proteinvisualisierung und Bildauswertung.....	S. 39
4.14.	In-Gel Verdau und Massenspektrometrie	S. 40
4.15.	Verwendung von cDNA- <i>microarray</i> -Datenbanken zur Korrelation der Expression von 14-3-3 β und HLA-G mit den Überlebensdaten von Patienten mit ausgewählten Tumorerkrankungen.....	S. 42
4.16.	Statistische Methoden	S. 42
5.	Ergebnisse	
5.1.	Die Charakterisierung von NZK-Zellsystemen hinsichtlich der Expression von HLA-G und HLA-G-regulierenden miRs.....	S. 43
5.2.	Der Nachweis einer direkten Interaktion zwischen HLA-G-relevanten miRs mit der HLA-G-mRNA.....	S. 45
5.3.	Die Reduktion des HLA-G-Proteins durch stabile miR-152-Überexpression in HLA-G ⁺ JEG-3-Zellen.....	S. 49
5.4.	Die NK- und LAK-Zell-vermittelte HLA-G-abhängige Cytotoxizität	S. 50
5.5.	Die Identifizierung neuer HLA-G-regulierender miRs mit der miTRAP-Methode	S. 53
5.6.	Die Expression der neu-identifizierten HLA-G-regulierenden miRs in ausgewählten NZK-Zelllinien.....	S. 54
5.7.	Der Nachweis einer direkten Interaktion der neu-identifizierten HLA-G-regulierenden miRs mit der HLA-G-mRNA	S. 54
5.8.	Die Reduktion des HLA-G-Proteins durch stabile Überexpression von miR-548q und miR-628-5p in HLA-G ⁺ JEG-3-Zellen.....	S. 57
5.9.	Die Analyse der <i>in vivo</i> Expression HLA-G-regulierender miRs in HLA-G ⁺ und HLA-G ⁻ NZK-Tumorgeweben.....	S. 57
5.10.	Die Korrelation der HLA-G-Expression mit der Immunzellinfiltration in HLA-G ⁺ und HLA-G ⁻ NZK-Tumorgeweben.....	S. 62
5.11.	Die Auswirkung der HLA-G-Expression und der Immunzellinfiltration auf die klinischen Überlebensdaten der NZK-Patienten.....	S. 65

5.12.	Die Identifizierung von miR-152-regulierten Genen durch Proteom-Analyse	S. 67
5.13.	Die Herunterregulation des Proteins 14-3-3 β durch miR-152-Überexpression	S. 70
5.14.	Der Nachweis der direkten Interaktion von miR-152 mit dem 14-3-3 β -3'-UTR.....	S. 71
5.15.	Die funktionale Bedeutung der miR-152 und des 14-3-3 β -Proteins auf die Apoptoseregulation.....	S. 73
5.16.	Die Funktion der miR-152 und des 14-3-3 β -Proteins beim Zellzyklus und bei der Proliferation	S. 75
5.17.	Die Korrelation der Expression der miR-152-regulierten Zielgene HLA-G und 14-3-3 β mit den klinischen Überlebensdaten in verschiedenen humanen Tumorentitäten	S. 77
6.	Diskussion	
6.1.	Die miR-vermittelte posttranskriptionale Genregulation von HLA-G.....	S. 79
6.2.	Der Einfluss der HLA-G-Expression auf die Immunzellinfiltration und auf die Immunreaktion im Nierenzellkarzinom	S. 82
6.3.	Die duale Funktion der miR-152.....	S. 85
7.	Zusammenfassung	S. 89
8.	Ausblick	S. 92
9.	Literaturverzeichnis.....	S. 94
10.	Publikationsliste	S. 105
11.	Abbildungsverzeichnis	S. 106
12.	Tabellenverzeichnis	S. 109
13.	Abkürzungsverzeichnis	S. 110
14.	Erklärung	S. 112
15.	Lebenslauf	S. 113
16.	Danksagung	S. 114
17.	Anhang	
17.1.	Plasmidkarten der miR-Expressionsvektoren	S. 116
17.2.	Plasmidkarten der Luziferase-Reportergenkonstrukte	S. 117
17.3.	Plasmidkarten der Expressionsvektoren.....	S. 118

1. Einleitung

1.1. Die Evolution des Immunsystems

Mit der Entstehung mehrzelliger Organismen aus einzelligen Vorläufern entwickelten sich ebenfalls regulatorische Mechanismen, die Pathogenen und unkontrolliertem Zellwachstum entgegenwirken ^(1,2).

Die Notwendigkeit eines Organismus sich vor Pathogenen zu schützen ist sehr wichtig, da infektiöse Agenzien allgegenwärtig sind und einen entsprechenden Selektionsdruck auf den Organismus ausüben. Daher sind die Entstehung und die fortwährende Entwicklung passender Abwehrmechanismen begünstigt (Kenneth M. Murphy, Paul Travers, Mark Walport (2009), „Janeway Immunologie“, 7. Auflage, S. 894).

Selbst Prokaryoten besitzen molekulare Strategien, wie Restriktionsenzyme und antimikrobielle Peptide (AMPs), um Pathogene (z. B.: Bakteriophagen) abzuwehren. Dabei hat die Verwendung von AMPs zur Pathogenabwehr auch für das humane Immunsystem eine wichtige Bedeutung ⁽³⁾.

Die Induktion der Sekretion von AMPs setzt die Erkennung pathogener Antigene voraus. Stammesgeschichtlich sehr alte Erkennungssysteme für Pathogene sind die Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs). TLRs gehören zu den ubiquitär verbreiteten Mustererkennungsrezeptoren, die in Invertebraten bis hin zum Menschen vorkommen ⁽⁴⁾.

Ein weiteres ursprüngliches System der Pathogenabwehr ist das Komplementsystem in Verbindung mit den Fresszellen, welche opsonierte Pathogene phagozytieren. Die ersten primitiven Ansätze eines Komplementsystems konnten bereits bei Schwämmen (*Porifera*) identifiziert werden ⁽⁵⁾.

Die Entwicklung der adaptiven Immunantwort mit einem Antikörper-basierenden Immunsystem, der Präsenz von Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse I-Molekülen (HLA-Klasse I auch MHC-Klasse I), T-Zellrezeptoren (TCRs) und B-Zellrezeptoren (BCRs) beginnt mit dem Auftreten kiefertragender Wirbeltiere ⁽⁵⁾.

1.2. Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem des Menschen entspricht der vordersten Verteidigungslinie gegen eintretende Pathogene. Es lässt sich grob in zwei Kategorien unterteilen: (i) die Erkennung der Pathogen-assoziierten molekularen Muster und (ii) die Erkennung von Pathogen-infizierten Zellen ⁽⁶⁾.

Die Pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMPs) werden durch Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) erkannt. Dabei unterscheidet man sekretierte, membranständige und intrazelluläre PRRs. Beispiele für sekretierte PRRs sind (i) das Mannose-bindende Lektin (MBL)

und (ii) das C-reaktive Protein (CRP). Beide Plasmaproteine aktivieren das Komplementsystem über den Lektinweg ^(7,8).

Zu den membranständigen PRRs zählen die (i) Scavenger-Rezeptoren (SRs), die auf der Zelloberfläche von Phagozyten (z. B.: Monozyten/Makrophagen und dendritischen Zellen (DCs)) vorkommen, jedoch keine intrazelluläre Signalkaskade auslösen ^(9,10) im Gegensatz zu den (ii) Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs) und den (iii) C-Typ-Lektin Rezeptoren (CLRs), welche ebenfalls von Makrophagen und DCs exprimiert werden ⁽¹¹⁾.

Die intrazellulären PRRs, wie die RIG-I-ähnliche Proteine (RLRs) und die NOD-ähnlichen Rezeptoren (NLRs) erkennen ebenfalls definierte Pathogen-assoziierte Muster ⁽¹¹⁾. RLRs erkennen dsRNA und NLRs binden an bakterielle Lipopolysaccharide und Peptidoglykane. Die TLRs binden an bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), Lipoproteine, Lipopeptide und bestimmte Proteine, wie Flagellin, aber auch virale dsRNA und unmethylierte CpG-Inseln bakterieller und viraler DNA. MBL hingegen erkennt viele verschiedene Kohlenhydrate, was eine Interaktion mit Viren, Bakterien, Hefen, Pilzen und Protozoa erlaubt ⁽¹²⁻¹⁴⁾.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems ist das Komplementsystem, ein System aus Plasmaproteinen, die kaskadenartig aktiviert werden. Dabei werden Pathogene opsoniert, z. B. mit MBL oder mit Antikörpern des adaptiven Immunsystems, was bewirkt, dass Fresszellen rekrutiert werden und das Pathogen phagozytieren oder die opsonierten pathogenen Partikel verklumpen und keine pathologische Wirkung entfalten können. Während Antigen-Antikörper-Komplexe den klassischen Weg der Komplementaktivierung darstellen, führt die Bindung von MBL an das Pathogen zur Aktivierung des Komplementsystems über den Lektinweg. Zusätzlich wird noch ein dritter Mechanismus zur Komplementaktivierung abgegrenzt, ein alternativer Weg, bei dem sich spontan das Komplementprotein C3 an die Oberfläche von Pathogenen heftet ⁽¹⁵⁾.

Zu den Immunzellen des angeborenen Immunsystems gehören (i) Mastzellen, die nach Aktivierung Cytokine freisetzen und andere Immunzellen des angeborenen Immunsystems anlocken, wie z. B.: (ii) Makrophagen, (iii) DCs und (iv) neutrophile Granulozyten. Ferner zählen auch die eosinophilen und basophilen Granulozyten, sowie die NK-Zellen zum angeborenen Immunsystem. So können NK-Zellen Tumorzellen und viral-infizierte Zellen erkennen und lysieren, da in diesen Zielzellen oftmals inhibitorische NK-Zellrezeptorliganden (NKCR-L), wie HLA-Klasse I-Moleküle herunter- bzw. aktivierende NKCR-L, z. B.: MICA/B und ULBP1-3, hochreguliert sind (Jasinski-Bergner et al. 2014; ¹⁶). Diese Immunzellen können bestimmte inflammatorische Mediatoren sezernieren, wie Histamine, Prostaglandine, NO oder bestimmte Cytokine (u. a. IFN- γ , TNF- α , IL-1).

Außerdem stellen die unter 1.1. erwähnten antimikrobiellen Peptide ebenfalls einen wichtigen Teil des angeborenen Immunsystems dar. Ein interessantes Beispiel hierfür ist das APM Dermcidin, das in humanen Schweißdrüsen produziert und über die Hautoberfläche verteilt wird. Es wirkt u. a. gegen viele bekannte Keime (z. B.: Kolibakterien und Staphylokokken) wirkt ⁽¹⁷⁾. Aktuelle Studien untersuchen die Verwendung einiger dieser APMs als anti-tumorale Peptide (ACPs). Beispiele hierfür sind die APMs der Cecropin- und der Magainin-Gruppe ⁽¹⁸⁾. Aber auch physische Barrieren, z. B.: die Epithelzellen der Epidermis als Abgrenzung nach außen oder das Vorhandensein von mukösen Schleimschichten im respiratorischen, gastrointestinalen oder urogenitalen Trakt werden zum angeborenen Immunsystem gezählt ⁽¹⁹⁾.

1.3. Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem unterscheidet sich vom angeborenen Immunsystem durch die hohe Spezifität gegen ein bestimmtes Ziel-Antigen und basiert auf antigenspezifische Rezeptoren, die auf der Oberfläche von B- und T-Lymphozyten exprimiert werden. Die antigenspezifischen Rezeptoren werden bei B-Zellen allgemein als Immunglobuline (Igs) bezeichnet. Dabei unterscheidet man die membranständigen B- und T-Zellrezeptoren (BCR bzw. TCR) von den sezernierten Antikörpern (Ak) ⁽¹⁹⁾.

Die hohe Antigenspezifität des adaptiven Immunsystems wird ermöglicht durch die Fähigkeit der somatischen DNA-Rekombination der BCR- bzw. TCR-kodierenden Gene. Die variablen Regionen der BCRs bzw. TCRs sind in Form von Gensegmenten kodiert, die sich durch Genumlagerungen zu einem variablen Ganzen zusammenfügen. Beim BCR setzen sich die variablen Regionen der leichten Ketten (κ und λ) aus V- und J-Gensegmenten und die der schweren Kette aus V-, D- und J-Gensegmenten zusammen. Diese drei Ketten werden von jeweils einem Gen auf verschiedenen Chromosomen kodiert: die leichte κ -Kette auf Chromosom 2, die leichte λ -Kette auf Chromosom 22 und die schwere Kette auf Chromosom 14. Die somatischen Rekombinationen der variablen Regionen dieser drei Ketten erfolgen aus einem „Pool“ an verschiedenen V- und J- (und D-) Gensegmenten, welche im jeweiligen Gen kodiert werden, wobei die D-Gensegmente nur im Gen für die schwere Kette vorkommen. Zusätzlich zur somatischen DNA Rekombination dieser verschiedenen V-, J- und D-Gensegmente und der Vielfalt der Kombinationen der jeweiligen schweren Kette mit jeweils einer κ - und einer λ -Kette kommt es an den Verknüpfungsstellen dieser V- und J- (und D-) Gensegmente durch Hinzufügen oder Entfernen von Nukleotiden zur junktionalen Vielfalt. Diese V(D)J-Rekombination wird im Wesentlichen von den Enzymen RAG-1 und RAG-2 katalysiert ^(20,21).

Dem schließt sich noch eine sekundäre Phase der Diversifikation an durch somatische Hypermutation (Einführung von Punktmutationen in den variablen Regionen) und einem

Isotypenwechsel der Igs (Rekombination des VDJ- Gensegmentes der schweren Kette mit unterschiedlichen konstanten Regionen von anfänglich IgM und IgD zu IgG, IgA oder IgE).

Der membranständige TCR setzt sich aus einer α - (Genlocus auf Chromosom 14) und einer β -Kette (Genlocus auf Chromosom 7) zusammen. Beide Ketten haben eine variable und eine konstante Region. Die Variable Region der α -Kette besteht aus V- und J-Gensegmenten und die der β -Kette aus V-, J- und D-Gensegmenten. Im Unterschied zum BCR gibt es eine größere Diversifikation an den Verknüpfungsstellen der Gensegmente, jedoch keine somatische Hypermutation. Die Gensegmente des TCR werden analog zum BCR durch die gleichen Enzyme umgelagert. Sowohl die α -, als auch die β -Kette haben nur eine konstante Region. Eine kleine Population der T-Zellen trägt T-Zellrezeptoren, die aus einer γ - und einer δ -Kette bestehen. Im Vergleich zur α - oder β -Kette weisen die TCR- γ - und die TCR- δ -Genloci deutlich weniger V-Segmente auf ⁽²²⁻²⁴⁾.

Alle kernhaltigen Zellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche klassische Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I-Moleküle (HLA Ia), die zelluläre Peptide den CD8⁺ T-Killerzellen präsentieren. CD8 ist ein Korezeptor des TCR, der die Interaktion zwischen TCR und HLA I ermöglicht.

HLA II-Moleküle werden ausschließlich auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) exprimiert. Hierzu zählen: Makrophagen, DCs und B-Zellen, die mit den CD4⁺ T-Helferzellen interagieren. CD4 ist ebenfalls ein Korezeptor des TCR, der notwendig ist für die Interaktion zwischen TCR und HLA II.

1.4. Die Antigen-Prozessierung und -Präsentation auf den HLA-Klasse I-Molekülen

Damit über die HLA-Klasse I-Moleküle körpereigene und körperfremde Peptide den CD8⁺ T-Killerzellen präsentiert werden können, müssen vorher die entsprechenden Proteine zu Peptiden prozessiert werden. Die Gesamtheit der an diesem Prozess beteiligten Proteine wird als Antigen-Prozessierungsmaschinerie (APM) bezeichnet.

Zunächst werden zelluläre Proteine ubiquityliert und durch das Proteasom, ein Komplex aus 28 Untereinheiten, zu kurzen Peptiden gespalten.

Die entstehenden Peptide können noch durch weitere zelluläre Peptidasen prozessiert werden ⁽²⁵⁾, bevor sie über einen heterodimeren ATP-abhängigen Transporter aus dem Zytosol in das endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert werden. Dieses Heterodimer besteht aus den beiden Untereinheiten TAP1 und TAP2 ^(26,27). Im ER erfolgt vor Beladung der Peptide auf die HLA-Klasse I-Moleküle bei Bedarf eine weitere N-terminale proteolytische Prozessierung durch die IFN- γ -induzierbare Aminopeptidase ERAAP ⁽²⁷⁾. Bei der Beladung der HLA-Klasse I-Moleküle sind verschiedene Chaperone beteiligt. Das Chaperon Calnexin (CANX) bindet an die

HLA-Klasse I-alpha-Kette und hält diese in einen partiell ungefalteten Zustand, bis beta-2-Mikroglobulin (B2M) an die HLA-Klasse I-alpha-Kette bindet. Anschließend dissoziiert CANX und es binden die Chaperone Calretikulin (CALR) und Erp57. Über das Chaperon Tapasin (TPN) ist dieser Komplexes mit dem TAP-Transporter verbunden und es erfolgt die Beladung mit dem Peptid auf das HLA-Klasse I-Molekül ^(27,28).

Nach der Peptidbeladung wird das Trimer aus HLA-Klasse I-alpha-Kette, B2M und Peptid über Vesikel durch den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert und dort den CD8⁺ T-Killerzellen präsentiert.

Der Ablauf der Antigenprozessierung ist in der Abbildung 1.1. schematisch dargestellt.

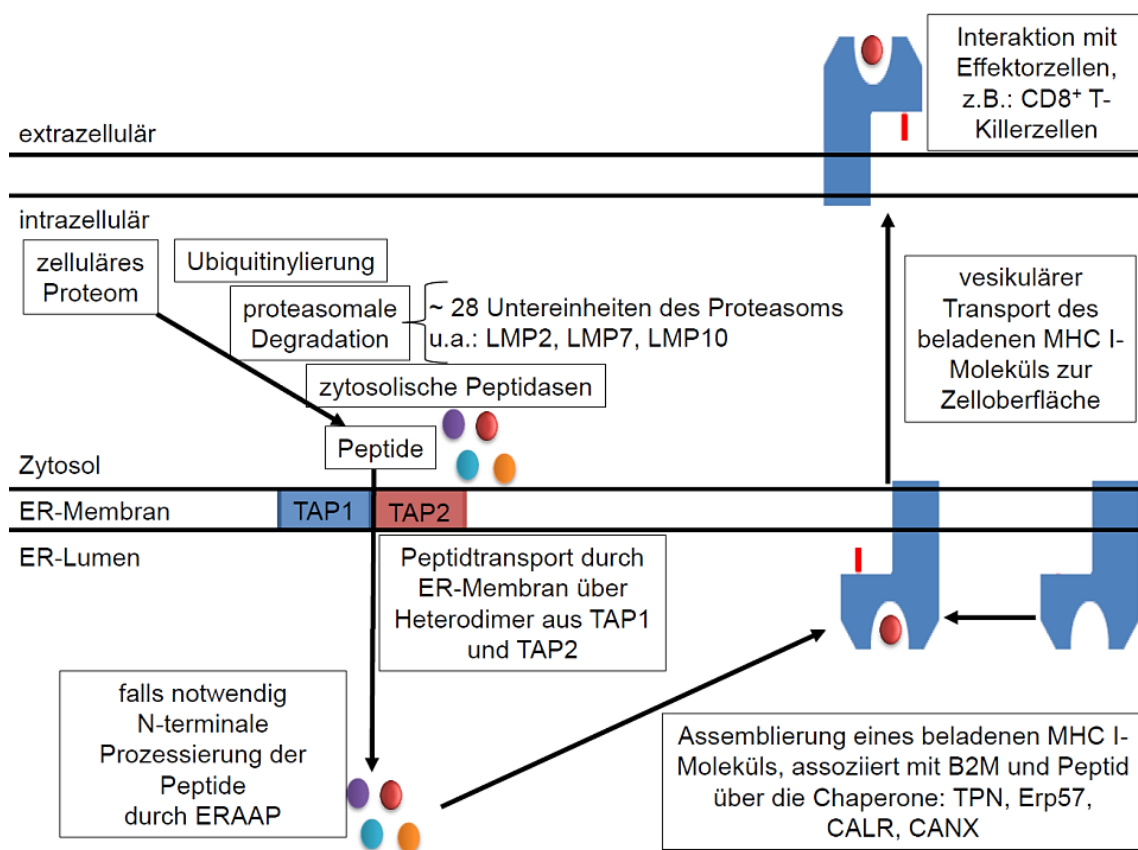


Abbildung 1.1. Schematische Darstellung der Antigen-Prozessierung und Assemblierung der HLA-Klasse I-Moleküle (modifiziert nach Bukur J., Jasinski S., Seliger B., 2012 ⁽²⁷⁾)

Endozytotisch aufgenommene Vesikel mit extrazellulären Proteinen können in HLA-Klasse II-exprimierenden APCs in das Cytoplasma gelangen. Diese Antigene werden über die reguläre APM und über HLA-Klasse I-Molekülen den CD8⁺ T-Zellen präsentiert. Dieser Mechanismus wird als Kreuzpräsentation bezeichnet ⁽²⁹⁾.

1.5. Die klassischen HLA-Klasse I-Moleküle

Die klassischen HLA-Klasse I (bzw. MHC Ia)-Moleküle werden unter physiologischen Bedingungen in allen nukleären Zellen exprimiert, was reife Erythrozyten ausschließt. Ferner wurde beobachtet, dass es bestimmte Gewebe im menschlichen Organismus gibt, die HLA-Klasse Ia-Moleküle nur gering oder nicht exprimieren. Diese immunprivilegierten Gewebe erlauben *per se* die Anwesenheit körperfremder Antigene, ohne Induktion einer Immunantwort. Dazu zählen insbesondere die feto-maternale Grenzfläche, die Cornea, das Gehirn und die Testes. In diesen Geweben wäre eine inflammatorische Reaktion u. U. gewebeschädigend und muss daher vermieden werden. Diese Toleranz wird nicht nur durch Herunterregulation der Expression von HLA-Klasse Ia- und/oder APM-Komponenten erzielt, sondern auch durch die verstärkte Expression, Sekretion oder Anwesenheit immunsuppressiver Faktoren (z. B. die Expression des immunsuppressiven nicht-klassischen HLA-Klasse I-Moleküls HLA-G (Abschnitt 1.6.), die Sekretion immunsuppressiver Cytokine (z. B. TGF- β) und/oder die Anwesenheit von Immunzellen mit immunsuppressiver Funktion (z. B. regulatorische T-Zellen; T_{regs}). Interessanterweise können Tumore die gleichen Strategien nutzen, um einer Immunantwort zu entgehen (Abschnitt 1.7.; ^{27,30-32}).

Für die alpha-Kette der HLA-Klasse I-Moleküle kodieren beim Menschen drei Gene: HLA-A, -B und -C. Sie liegen im HLA-Klasse I-Lokus auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6, wohingegen das Gen für B2M auf Chromosom 15 lokalisiert ist. Folglich können die zellulären Antigene über drei verschiedene HLA-Klasse I-Moleküle präsentiert werden (HLA-A, -B, -C).

Die Gene der HLA-Klasse Ia-Moleküle sind stark polymorph, so konnten bisher für HLA-A >2432, für HLA-B >3086 und für HLA-C >2035 verschiedene Allele beschrieben werden (<http://hla.alleles.org>; ^{33,34}). Tatsächlich beeinflusst der HLA-Polymorphismus die Antigenerkennung durch T-Zellen ⁽³⁵⁾.

Die drei HLA-Klasse Ia-Gene kodieren jeweils für die alpha-Kette des entsprechenden HLA-Klasse I-Moleküls, welche sich in die drei Domänen α_1 , α_2 und α_3 gliedern lässt. Die α_1 - und α_2 -Domänen bilden einen Spalt, die Peptidbindungsgrube. Dort können Peptide mit einer Länge von 8 bis 10 Aminosäuren gebunden und präsentiert werden. Die α_3 -Domäne besitzt eine Transmembranregion zur Verankerung an der Zellmembran ⁽³⁶⁾.

CD8⁺ T-Killerzellen erkennen das präsentierte Peptid auf den HLA-Klasse I-Molekülen über den TCR. Diese Interaktion allein ist aber nicht ausreichend für eine Aktivierung der T-Zelle. Zusätzlich muss der Korezeptor CD8, ein Heterodimer aus α - und β -Kette, der T-Zelle an das HLA-Klasse I-Molekül binden ⁽³⁷⁾.

Die klassischen HLA-Klasse I-Moleküle binden ferner an inhibitorische NKCRs, bestimmte inhibitorische KIRs (*Killer immunoglobulin-like receptors*), dadurch wird sichergestellt, dass gesunde humane Zellen mit normaler HLA-Ia-Expression nicht von NK-Zellen lysiert werden ⁽³⁸⁾.

1.6. Die nichtklassischen HLA-Klasse I-Moleküle am Beispiel von HLA-G

Neben den drei klassischen HLA-Klasse Ia-Molekülen (HLA-A, -B und -C) existieren noch weitere sogenannte nichtklassische HLA-Klasse Ib-Moleküle (HLA-G, HLA-E, HLA-F und HLA-H; ³⁹).

Da diese Dissertation auf die Untersuchungen zur posttranskriptionalen Genregulation von HLA-G fokussiert, soll im Folgenden HLA-G als nichtklassisches HLA-Klasse I-Molekül detailliert beschrieben werden.

Das HLA-G-Gen ist 4144 bp groß und ist im HLA-Klasse I-Lokus auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 lokalisiert. Im Vergleich zu den HLA-Klasse Ia-Molekülen ist bei HLA-G der Polymorphismus bedeutend schwächer ausgeprägt. Bisher wurden nur >50 verschiedene Allele identifiziert (<http://hla.alleles.org>; ^{33,34}).

Weitere Unterschiede zwischen dem HLA-G-Gen und den klassischen HLA-Klasse I-Genen betreffen den HLA-G-Promotor. Diesem fehlen respondierende Elemente des IFN- γ - und des NF- κ B-Signalweges. Dennoch wird HLA-G insbesondere durch IFN- γ induziert, wobei in aktuellen Publikationen ein posttranskriptionaler Mechanismus postuliert wird ^(40,41).

Im Gegensatz zu den HLA-Klasse Ia-Molekülen existieren von der HLA-G-mRNA durch alternatives Spleißen 7 verschiedene Isoformen. Die Isoformen HLA-G1 bis -G4 kodieren für membranständige Proteine, während die Isoformen HLA-G5 bis -G7 für soluble Proteine kodieren, die von der Zelle sezerniert werden können (Abbildung 1.2.; ⁴²). Bei HLA-G5 und HLA-G6 bleibt das Intron 4 erhalten, während bei HLA-G7 das Intron 2 nicht gespleißt wird. Dadurch entsteht jeweils ein vorzeitiges *Stop-Codon*, welches zum Verlust der Membrandomäne führt.

HLA-G mRNA

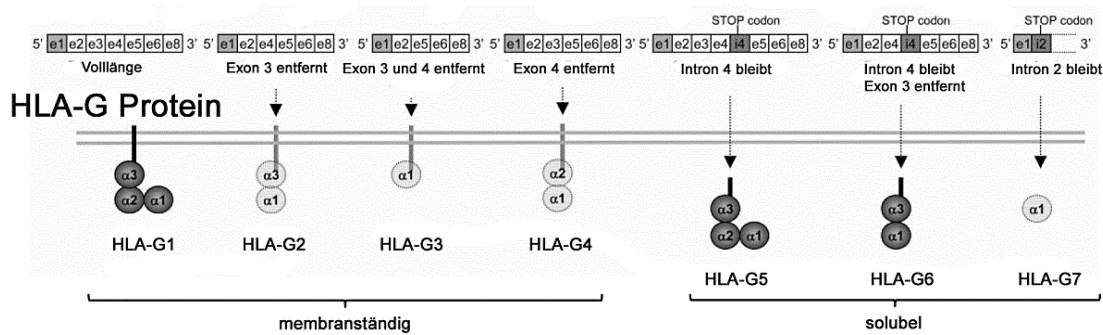


Abbildung 1.2. Schematische Darstellung der 7 verschiedenen Spleißvarianten der HLA-G-mRNA, sowie der resultierenden HLA-G-Proteine (modifiziert nach Hviid et al., 2006⁽⁴²⁾)

Im Gegensatz zu den klassischen HLA-Klasse I-Molekülen wird HLA-G nur selektiv in immunprivilegierten Geweben exprimiert. Dabei hat besonders die HLA-G-Expression in der feto-maternalen Grenzfläche eine besondere Bedeutung. Eine fehlende oder stark reduzierte HLA-G-Expression in diesem Gewebe ist assoziiert mit dem habituellen Abort (der wiederholten [3<] Fehlgeburt;^{43–45}).

Dieser Befund führte zur Hypothese, dass HLA-G an der Ausbildung einer immunologischen Toleranz, wie der zwischen dem Fetus mit maternalen und paternalen Antigenen und dem maternalen Immunsystem, beteiligt ist. Tatsächlich bindet HLA-G mit hoher Affinität an die inhibitorischen NK-Zellrezeptoren (NKCRs): ILT2, ILT4 und KIR2DL4, währenddessen das klassische HLA-Klasse I-Molekül HLA-C an die inhibitorischen NKCRs: KIR2DL1, KIR2DL2 und KIR2DL3 bindet (Jasinski-Bergner et al., 2014;¹⁶). ILT2 wird von NK-Zellen, sowie von CD8⁺, CD4⁺ T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und DCs exprimiert^(46–48), ILT4 wird dagegen nur auf myeloiden Zellen, wie Makrophagen und DCs gefunden^(49,50). KIR2DL4 wird ausschließlich von NK-Zellen exprimiert⁽⁵⁰⁾. ILT2 und ILT4 werden auch von den klassischen HLA-Klasse I-Molekülen gebunden, jedoch mit geringerer Affinität, als von HLA-G⁽⁵¹⁾. Dagegen ist HLA-G der einzige bisher bekannte Ligand für KIR2DL4⁽⁵⁰⁾.

HLA-G inhibiert die cytotoxische Aktivität von NK- und antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen^(52–54). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass HLA-G die Proliferation alloreaktiver T-Zellen inhibiert⁽⁵⁵⁾, was für die Transplantationsmedizin bedeutsam ist. Alloantigene sind Antigene eines anderen Individuums gleicher Spezies, die als körperfremd erkannt werden und eine Immunantwort auslösen können. Es wird aktuell diskutiert, ob HLA-G als immunsuppressiver Faktor nach Organtransplantationen als therapeutisches Agens appliziert werden kann⁽⁵⁶⁾. Weiterhin kann lösliches HLA-G in NK- und CD8⁺ T-Zellen Apoptose induzieren⁽⁵⁷⁾.

Neben der selektiven Expression von HLA-G in immunprivilegierten Geweben, kann eine pathologische Expression in soliden und hämatopoetischen Tumoren abgegrenzt werden, die aufgrund des starken immun- modulatorischen Potentials von HLA-G als Strategie des Tumors zur Immunevasion diskutiert wird (Abschnitt 1.7.).

Die Unterschiede zwischen HLA-G und den HLA-Klasse Ia-Molekülen werden in der Tabelle 1.1. gegenüber gestellt.

Tabelle 1.1. Gegenüberstellung wesentlicher Unterschiede zwischen HLA-G- und HLA-Klasse Ia-Molekülen

	HLA-G	HLA-Ia
Promotor-Region	keine respondierende Elemente des IFN- γ - und des NF- κ B-Signalweges	respondierende Elemente des IFN- γ - und des NF- κ B-Signalweges vorhanden
Polymorphismus des Gens	gering (HLA-G > 50 Allele)	hoch (HLA-A >2432 Allele, HLA-B >3086 Allele, HLA-C >2035 Allele)
alternatives Spleißen der mRNA	ja (7 verschiedene Isoformen; HLA-G1 bis G7)	nein
Existenz solubler Proteine	durch alternatives Spleißen (HLA-G5 bis G7) und durch <i>shedding</i>	durch <i>shedding</i>
Interaktion mit Immuneffektorzellen	hohe Affinität für die inhibitorischen Rezeptoren: ILT2, ILT4 und KIR2DL4 (u.a. auf NK- und CD8 ⁺ T-Zellen)	<u>aktivierend</u> : mit TCR auf CD8 ⁺ T-Zellen <u>inhibierend</u> : nur sehr geringe Affinität für ILT2 und ILT4 (u.a. auf NK- und CD8 ⁺ T-Zellen); HLA-C bindet ferner an KIR2DL1, KIR2DL2 und KIR2DL3 (auf NK-Zellen)
physiologische Expression	selektiv in immunprivilegierten Geweben exprimiert	in allen nukleären Zellen exprimiert, in immunprivilegierten Geweben herunterreguliert
physiologische Bedeutung	Vermittlung feto-maternaler Toleranz	Antigen-Präsentation (Immunüberwachung)
pathologische Expression	in Tumorerkrankungen häufig induziert	in Tumorerkrankungen häufig herunterreguliert
pathologische Bedeutung	<i>immune escape</i> -Mechanismus	(Tumor-) Antigen-Präsentation (Immunüberwachung)

1.6.1. Die Regulation der HLA-G-Expression

Die selektive HLA-G- Expression unterliegt verschiedenen regulatorischen Mechanismen. Demethylierung des Promotors, Cytokinstimulation mit IL-10 oder IFN- γ , Hitzestress oder Hypoxie induzieren die HLA-G-Transkription ^(58–60). Folglich führt die Promotormethylierung zu Inhibierung der HLA-G-Transkriptionsinitiation. Außerdem konnte der transkriptionale Repressor RREP-1 als weiteres regulatorisches Element der HLA-G-Expression identifiziert werden ⁽⁶¹⁾. Der Transkription folgt das Spleißen der HLA-G-mRNA, wobei auch die gereifte mRNA einer posttranskriptionalen Genregulation unterliegt, z. B.: durch miRs (Abbildung 1.3.).

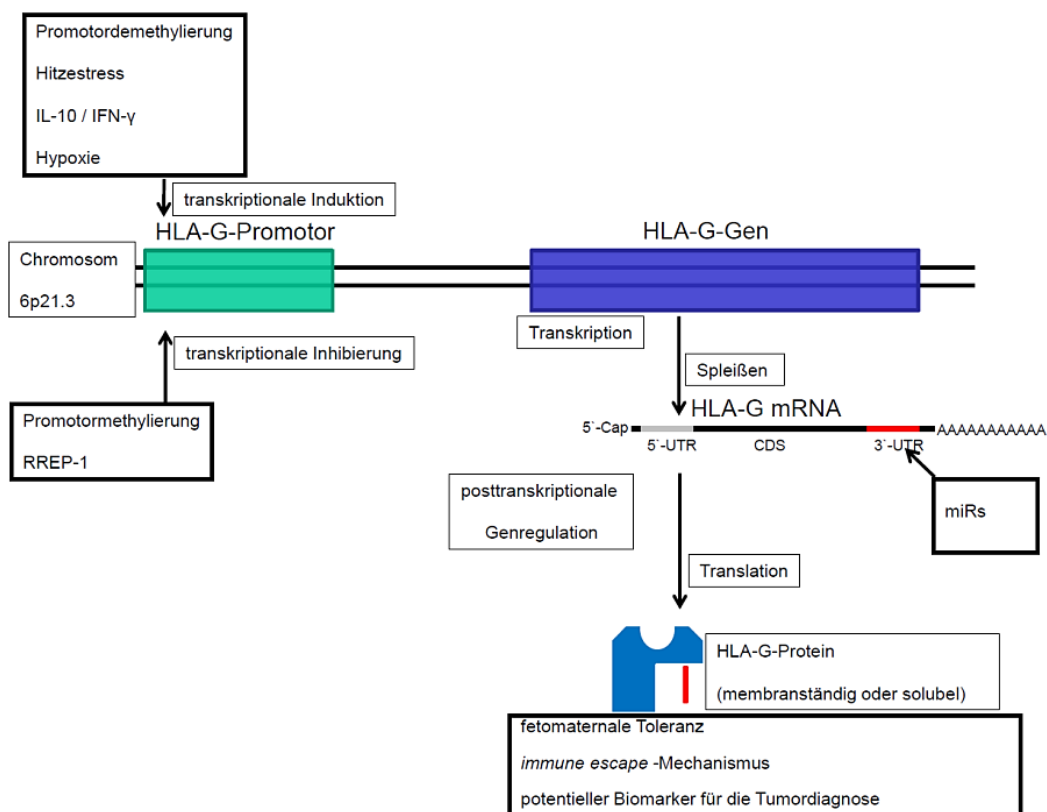


Abbildung 1.3. Regulation der HLA-G-Expression (modifiziert nach Bukur J., Jasinski S., Seliger B., 2012⁽²⁷⁾)

Die pathologische HLA-G-Expression in Tumoren ist durch das Auftreten einer diskordanten Expression zwischen HLA-G-mRNA und korrespondierendem Protein gekennzeichnet (Tabelle 1.2.; ⁶²).

Tabelle 1.2. Auswahl verschiedener Tumorentitäten und Charakterisierung der HLA-G-Expression hinsichtlich des diskordanten Expressionsmusters von HLA-G-mRNA zu HLA-G-Protein

Tumorentität	HLA-G-mRNA Frequenz (%)	HLA-G-Protein Frequenz (%)	Referenz
Nierenzellkarzinom	57	43	58
Melanom	70	30	63
Blasenkarzinom	29	17	64
colorektales Karzinom	87	54	65
Gliom	47	35	66

(modifiziert nach Seliger et al., 2011⁽⁶²⁾)

Diese diskordante HLA-G-Expression lässt die Vermutung zu, dass posttranskriptionale Genregulation stattfindet.

Nach der Transkription eines Gens erfolgt die Modifizierung („Reifung“) der mRNA. Dieser Vorgang beinhaltet zunächst das 5'-*capping* aus 7-Methylguanosintriphosphat, das mit dem ersten regulären Nukleotid der mRNA über eine 5'- 5'-Bindung verknüpft wird. Das 5'-*cap* ist wichtig für den Export der mRNA aus dem Zellkern in das Cytoplasma, es schützt die mRNA vor Exoribonukleasen, welche die mRNA vom 5'-Ende degradieren und das 5'-*cap* hat einen Einfluss auf das Spleißen^(67,68).

Am 3'-Ende werden die mRNAs mit Ausnahme der Histon-mRNAs polyadenyliert, wobei das Enzym Poly(A)-Polymerase ca. 250 Adenosinmonophosphate durch Hydrolyse von Adenosintriphosphaten anfügt. Dafür müssen die mRNAs 10 bis 30 Nukleotide nach dem Polyadenylierungssignal im 3'-UTR gespalten werden. Als kanonisches Polyadenylierungssignal dient AAUAAA. Deutlich seltener sind die Polyadenylierungssignale: AUUAAA, AAGAAA, UAUAAA und AGUAAA, welche bei manchen mRNAs alternative Polyadenylierungssignale darstellen können. Wenn diese alternative Polyadenylierungssignale verwendet werden, kann eine Verkürzung des 3'-UTRs resultieren, was mit dem Verlust von regulatorischen Bindungsstellen für miRs oder RNA-bindender Proteine (RBPs) einhergehen kann. Der Poly(A)-Schwanz dient als Schutz vor 3'-Exoribonukleasen, dem Kernexport der mRNA und der

Translationsinitiation. Der 3'-UTR von HLA-G ist 383 Nukleotide lang und enthält vier putative Polyadenylierungssignale (^{16,69-74}).

Durch alternatives Spleißen der HLA G-mRNA entstehen bis zu 7 verschiedene Isoformen (^{42,75}; siehe Abbildung 1.2.).

Zusätzlich wurden miRs identifiziert, welche die Translation von HLA-G inhibieren und dadurch dessen immunmodulatorische Funktionen aufheben können. Diese miRs sind zu einem die Mitglieder der miR-148-Familie (miR-148A, miR-148B und miR-152) und zusätzlich die miR-133A (⁷⁶⁻⁷⁸). Außerdem reguliert die miR-148A noch HLA-C, welches ähnlich wie HLA-G ein Ligand für inhibitorische NKCRs ist. Weitere aktuelle Publikationen zeigen, dass die miR-148-Familie Tumor-suppressiv wirkt (⁷⁹⁻⁸⁴).

1.7. Tumor immune escape-Mechanismen

Bereits 1909 veröffentlichte der Nobelpreisträger Paul Ehrlich die These der Immunogenität der Tumorerkrankungen (Ehrlich, Paul (1909): „Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. Beiträge zur experimentellen Pathologie und Chemotherapie“; S. 117-164). Tatsächlich ist das Immunsystem in der Lage Tumorzellen selektiv zu erkennen und zu eliminieren, weil Tumor-assoziierte Antigene (TAAs) über HLA-Klasse I-Moleküle präsentiert und durch CD8⁺ T-Zellen erkannt werden können. Körperfremde TAAs stammen entweder von den möglicherweise vorhandenen karzinogenen Viren oder von im Tumor sich anhäufenden Mutationen. Aber auch körpereigene Antigene, welche im Tumor verstärkt exprimiert oder anders modifiziert werden, können von T-Zellen erkannt werden. Es findet jedoch während der Reifung der T-Zellen im Thymus eine Selektion gegen autoreaktive T-Zellen statt, sodass nur T-Zellen deren TCR eine geringe Affinität zu körpereigenen Antigenen aufweist diese körpereigenen TAAs erkennen können (⁸⁵). Tatsächlich zeigten Vakzinierungsstudien mit TAAs bei Tumorpatienten, dass eine partielle oder vollständige Tumorregression bei 10-30 % der Patienten erzielt werden konnte (⁸⁶). Dennoch haben Tumore Strategien entwickelt das Immunsystem des Wirtes zu umgehen, sogenannte *immune escape*-Mechanismen. Diese verschiedenen immunsuppressiven Mechanismen können in Kombination auftreten und entsprechend additiv wirken.

Sehr häufig werden HLA-Klasse Ia-Moleküle und/oder APM-Komponenten in Tumoren vermindert oder überhaupt nicht mehr exprimiert. Bei verminderter Expression einer oder mehrerer APM-Komponenten können als Konsequenz verringerte Mengen der HLA-Ia-Moleküle auf der Zelloberfläche vorliegen. Entsprechend der *Missing-self*-Hypothese sollten NK-Zellen andere Körperzellen lysieren, die keine HLA Ia-Moleküle auf der Zelloberfläche mehr haben. Daher entgehen Tumore der Lyse durch CD8⁺ T-Zellen, indem sie HLA Ia-Moleküle auf der Zelloberfläche herunterregulieren, jedoch ist ein kompletter Verlust an HLA Ia-Molekülen auf der

Zelloberfläche eher selten. Eine Zusammenfassung liefert die Tabelle 1.3. modifiziert nach Bukur J., Jasinski S., Seliger B., 2012 ⁽²⁷⁾.

Tabelle 1.3. Tabellarische Zusammenfassung klinischer Studien zur verminderten Expression von HLA Ia und ausgewählter APM-Komponenten

Tumorentität	Anzahl der Proben	Methode	Frequenz der Herunterregulation in %							Literatur
			HLA Ia	TAP1	TAP2	LMP2	LMP7	TPN	B2M	
Brustkrebs	53	IHC	47	21	21	58	58	n. d.	n. d.	87
Cervixkarzinom	109	IHC	41	23	37	44	19	25	33	88
colorektales Karzinom	52	IHC	37	40	n. d.	37	37	62	0	89
ösophagealer Krebs	50	IHC	68	44	n. d.	n. d.	40	32	n. d.	90
Magenkrebs	60	IHC/RT-PCR	18	40	27	27	17	n. d.	43	91
Kehlkopfkrebs	63	IHC	81	71	n. d.	78	n. d.	79	87	92
Melanoma	108	IHC	66	62	63	68	45	n. d.	n. d.	93
nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom	190	IHC	80	n. d.	n. d.	n. d.	N. d.	n. d.	n. d.	94
Ovarialkarzinom	150	IHC	29	33	27	n. d.	n. d.	58	37	95
Nierenzellkarzinom	51	IHC	25-40	50-80	n. d.	56-100	20-56	77-100	3-25	96
Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches	25	IHC	48	52	88	88	60	n. d.	n. d.	97

(n. d., nicht determiniert; modifiziert nach Bukur J., Jasinski S., Seliger B., 2012 ⁽²⁷⁾)

Außerdem werden in Tumoren häufig immunsuppressive Moleküle verstärkt exprimiert, z. B.: HLA-G (Tabelle 1.2.), HLA-E, B7H1 oder B7H4, etc. ^(27,62,98–101). In der Publikation von Bukur J., Jasinski S., Seliger B., 2012 ⁽²⁷⁾ sind die Ergebnisse von klinischen Studien über die Expression von HLA-G in soliden und hämatopoetischen Tumoren zusammengefasst. Die Frequenz der HLA-G-Expression von den untersuchten Proben aus den jeweiligen Tumorentitäten reicht von 21,3 % (chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ) bis 93,3 % (Trophoblasten-Tumore). Klinische *in vivo*-Studien zeigen, dass die Expression von HLA-G in Tumoren mit einer

schlechteren Überlebensrate der Patienten korreliert und das HLA-G einen potentiellen prognostischen Marker darstellt ^(102,103).

Weiterhin wirkt das Tumormikromilieu selbst immunmodulatorisch. Die Tumorzellen können immunsuppressive Cytokine, wie z. B.: TGF- β oder IL-10, aber auch den solublen FAS-Liganden, der bei Immuneffektorzellen Apoptose induzieren kann, sezernieren ^(104–107).

In Tumorzellen wird Glukose hauptsächlich zu Laktat metabolisiert („Warbureffekt“; ¹⁰⁸). Dies bewirkt eine metabolische Azidose, sodass im Tumormikromilieu ein saurer pH von 6,0 bis 6,5 vorherrscht. Im Gegensatz dazu liegt der physiologischen Wert im extrazellulären Raum bei pH 7,5 ⁽¹⁰⁹⁾. Dieser saure pH-Wert im Tumormikromilieu inhibiert die T-Zellfunktionen von CTLs und trägt durch Hemmung der Cytotoxizität und der Cytokinsekretion ebenfalls zum *immune escape* bei ⁽¹¹⁰⁾.

Das Wachstum eines soliden Tumors erfolgt häufig schneller als die Gefäßneubildung, weshalb im Tumormikromilieu oft hypoxische Bedingungen vorherrschen. Die Hypoxie bewirkt die Induktion des Transkriptionsfaktors *hypoxia-inducible factor 1-alpha* (HIF-1 α), der u. a. die Transkription der immun-modulatorischen Faktoren B7H1 und HLA-G bewirkt ^(59,111,112).

Ferner bewirkt das Tumormikromilieu die Rekrutierung von myeloiden Suppressorzellen (MDSCs) und regulatorischen T-Zellen (T_{regs}), die suppressiv auf CTLs, NKs DCs und Makrophagen wirken und zum *immune escape* beitragen.

1.8. microRNAs

microRNAs (miRs) sind kleine (~22 Nukleotide), nicht-kodierende, einzelsträngige RNA-Moleküle, die sequenzspezifisch an mRNA-Moleküle binden und deren Translation inhibieren. Dieser Prozess, wird als RNA Interferenz (RNAi) bezeichnet.

miRs stellen eine wichtige Komponente der posttranskriptionalen Genregulation dar. Bis jetzt wurden mehr als 2500 humane miRs in der Datenbank www.mirbase.org aufgelistet ^(113–115).

Mehr als die Hälfte der miR-kodierenden Gene sind in Introns lokalisiert und ein weiterer Teil der miR-kodierenden Gene befindet sich auf Exons nicht-kodierender Transkripte ⁽¹¹⁶⁾. Zusätzlich können miR-kodierende Gene zwischen zwei kodierenden Genen liegen (intergenische Region), was eigene miR-Promotoren voraussetzt. Dafür spricht, dass viele miR-Gene, die in den Introns kodierender Gene liegen, unabhängig von diesem „Wirtspromotor“ transkribiert werden können, was eigene miR-Promotoren erfordert. Tatsächlich ist über miR- Promotoren noch wenig bekannt. Aktuell wird an verlässlichen miR-Promotor-Prädikationsmethoden gearbeitet. ^(117–119).

Die Transkription der miR-Gene erfolgt durch die RNA-Polymerase II ^(118,120), wobei als primäres Transkript die pri-miRNA entsteht. Das primäre Transkript kann mehrere hundert bis mehrere tausend Nukleotide lang und polycistronisch sein, d.h. für mehrere miRs kodieren, da miR-Gene

häufig in *Clustern* lokalisiert sind ⁽¹²¹⁾. Die pri-miRNA enthält neben dem 5'-7-Methylguanosintriphosphat-*Cap* und den 3'-poly(A)-Schwanz ⁽¹²²⁾.

Aufgrund der Sequenz der pri-miR können sich bestimmte Sekundärstrukturen ausbilden, sogenannte *stem-loops*, die von dem Drosha-DGCR8-Komplex erkannt werden. Dieser Komplex schneidet ungefähr 11 Nukleotide entfernt von dem doppelsträngigen Bereich der *stem-loops* im einzelsträngigen Bereich. Drosha ist ein RNase-Klasse III-Enzym. DGCR8 wird auch als Pasha bezeichnet und kann doppelsträngige RNA erkennen und binden. Diese Prozessierung der pri-miRNA zu ~65 Nukleotide langen pre-miRs erfolgt noch im Zellkern ⁽¹²³⁾.

Das Protein Exportin-5 (XPO5) ist ein pre-miR-spezifisches Transportmolekül, für den nukleären Export der pre-miRs in das Cytoplasma. Im Zellkern bindet XPO5 unter hoher RanGTP-Konzentration an die pre-miRNA. Anschließend erfolgt der Transport ins Cytoplasma, wo der Komplex aus XPO5, RanGTP und pre-miRNA durch GTP-Hydrolyse dissoziiert ^(124,125).

Im Cytoplasma wird die pri-miR durch Dicer, ein weiteres RNase-Klasse III-Enzym, prozessiert. Im Detail handelt es sich dabei um einen Komplex, bestehend aus der RNase-Klasse III Dicer-1, dem RNA-bindenden Protein Loqs und dem Protein Ago1 ⁽¹²⁶⁾. Dieser Komplex erkennt die partiell doppelsträngige pre-miR und entfernt sowohl den *loop*, als auch die einzelsträngigen Bereiche, welche den *stem-loop* der pre-miR flankieren ⁽¹²⁷⁾.

Die verbleibende noch doppelsträngige miR wird anschließend von einer ATP-abhängigen Helikase entwunden zu zwei Einzelsträngen von jeweils ~22 nt Länge. Meistens ist nur einer der beiden miR-Stränge biologisch aktiv, während der andere Strang degradiert wird ⁽¹²⁸⁾.

Es folgt die Assemblierung des RISC-Komplexes. Dafür wird der verbleibende miR-Einzelstrang (*guide strand*) von der Hauptkomponente des RISC-Komplexes, dem Protein Argonaute 1 (Ago1), gebunden. Im RISC-Komplex beladen, bindet die miR sequenzspezifisch an die Ziel-mRNA ⁽¹²⁶⁾. Für die sequenzspezifische Bindung der miR an die Ziel-mRNA ist die *seed region* der miR von besonderer Bedeutung. Die *seed region* erstreckt sich vom 2. bis zum 7. Nukleotid der miR und weist eine perfekte Watson-Crick-Komplementarität zur Zielsequenz auf ⁽¹²⁹⁾. Die miR bindet präferentiell in der 3'-UTR der Ziel-mRNA, jedoch konnten Bindung von miRs im 5'-UTR, sowie in der kodierenden Sequenz (CDS) der Ziel-mRNA nachgewiesen werden ^(130–134).

Die Bindung der miR an der Ziel-mRNA bewirkt die translationale Inhibierung der mRNA, welche zwar nicht zwangsläufig, jedoch meist zur Degradation der mRNA führt ^(135,136). So kann die miR-Bindung eine mRNA auch reversibel translational inhibieren, indem diese mRNA in P-bodies gespeichert wird (Abbildung 1.4.; ¹³⁷).

Interessanterweise können miRs selbst durch die beiden Adenosindesaminasen ADAR1 und ADAR2 posttranskriptional modifiziert werden (*RNA-editing*), was Auswirkungen auf die Interaktion von miR und Ziel-mRNA haben kann ⁽¹³⁸⁾.

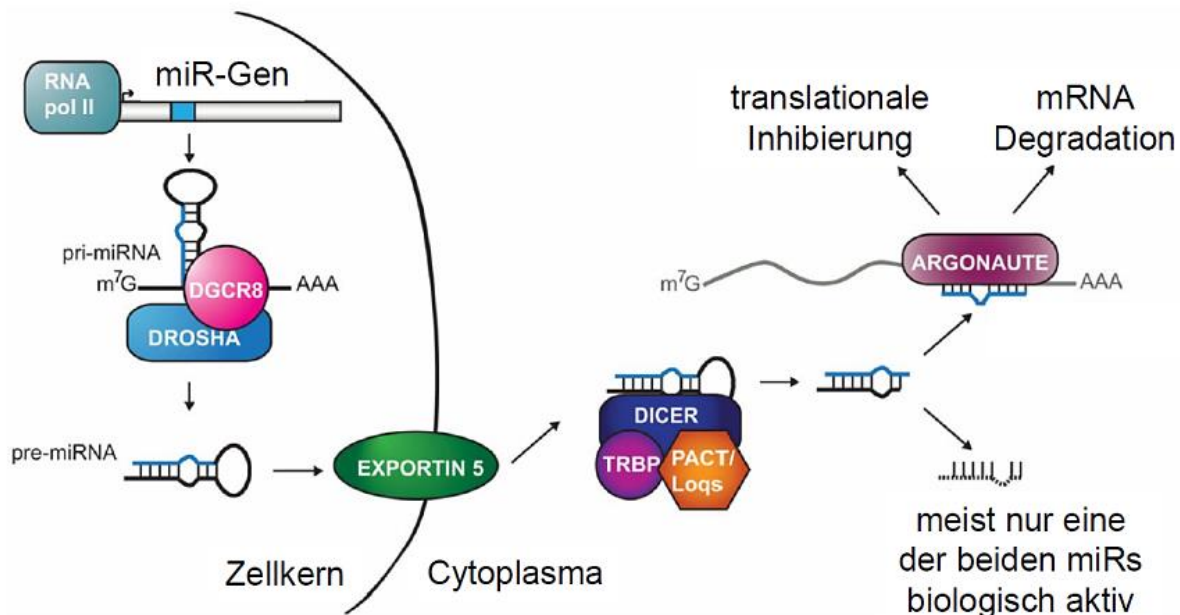


Abbildung 1.4. Transkription, Prozessierung und biologische Aktivität von miRs (modifiziert nach Finnegan und Pasquinelli, 2013 ⁽¹³⁶⁾).

Der Zusammenhang zwischen miR-Expression und Tumorgenese führte zur Unterscheidung von Tumor-suppressiven und onkogenen miRs ^(139,140).

Das gehäuft auftretende diskordante Verhältnis von HLA-G-mRNA und korrespondierendem Protein erlaubt die Schlussfolgerung einer posttranskriptionalen Genregulation, die möglicherweise miR-mediert ist. Die Tabelle 1.4. zeigt das Ergebnis der Charakterisierung von Nierenzellkarzinom (NZK)- Zelllinien hinsichtlich der konstitutiven HLA-G-Expression. Circa 30 % der HLA-G-mRNA⁺ Zelllinien exprimieren nicht das korrespondierende HLA-G-Protein (Tabelle 1.2. und Tabelle 1.4.).

Tabelle 1.4. Charakterisierung von Nierenzellkarzinom-Zelllinien hinsichtlich der konstitutiven Expression von HLA-G- mRNA und -Protein

Zelllinie	Konstitutive Expression von	
	HLA-G-mRNA	HLA-G-Protein
MZ1257RC	-	-
MZ1790RC	-	-
MZ1851RC	+	+
MZ1940RC	-	-
MZ1973RC	-	-
MZ2175RC	-	-
MZ2514RC	-	-
MZ2733RC	+	+
MZ2861RC	+	-
MZ2862RC	+	+
MZ2877RC	+	+
MZ2905RC	+	-
MZ2931RC	+	+

(modifiziert nach Dunker et al., 2008 ⁽⁵⁸⁾)

Entsprechende *in silico*-Analysen favorisierten die miR-148-Familie, bestehend aus miR-152 (Chromosom 17q21), miR-148A (Chromosom 7p15) und miR-148B (Chromosom 12q13). Ferner wurde diskutiert, ob ein Einzel-Nukleotidpolymorphismus (SNP) an dieser miR-Bindungsstelle die Interaktion zwischen miR und HLA-G-mRNA beeinflussen könnte ^(141–143).

Tatsächlich zeigen *in silico*-Analysen, dass die freie Energie (ΔG) der miR-mRNA-Interaktion der miRs der miR-148-Familie mit den 3'-UTRs der beiden HLA-G-Allele, aufgrund des C/G-Polymorphismus an der Stelle +3142 des HLA-G-Gens, unterschiedlich ist (Abbildung 1.5.).

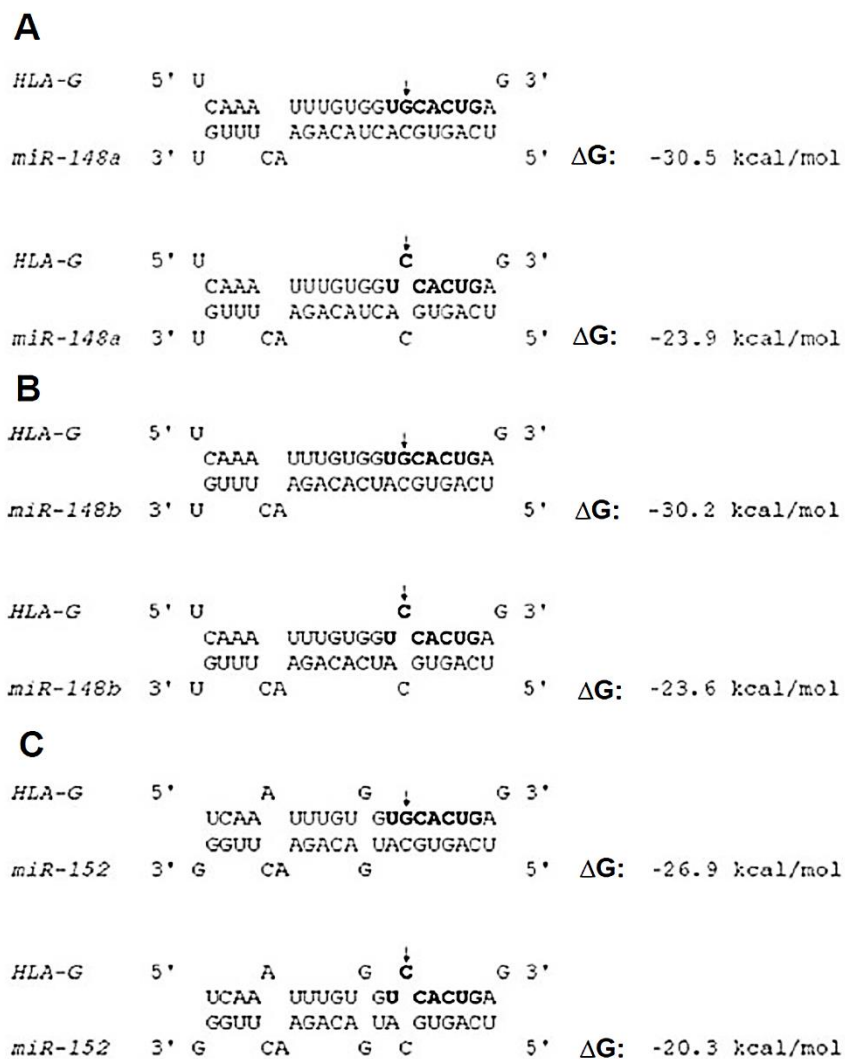


Abbildung 1.5. Sequentieller Abgleich von miR-152, -148A und -148B mit deren Bindungsstelle an der HLA-G-mRNA

(oben HLA-G-Allel: G*010103; unten HLA-G-Allel: G*010104) und die kalkulierte freie Energie (ΔG) modifiziert nach Tan et al., 2007⁽¹⁴¹⁾

Tatsächlich konnte mittlerweile die miR-vermittelte Herunterregulation des HLA-G-Proteins durch die miR-152, -148A und -133A nachgewiesen werden, wobei die miR-133A keinen Effekt auf die HLA-G-mRNA hatte^(76,77).

Interessanterweise können den HLA-G-regulierenden miRs Tumor-suppressive Funktionen zugeordnet werden^(83,144).

2. Zielstellung

Das Ziel dieser Dissertation ist die Untersuchung der posttranskriptionalen Genregulation von HLA-G in humanen NZK-Tumoren. Dabei soll der Fokus auf die posttranskriptionale Genregulation von HLA-G durch miRs gesetzt werden. Ferner soll die Bedeutung von verschiedenen SNPs in putativen miR-Bindungsstellen (die Allelspezifität der miRs) charakterisiert werden.

Zur Analyse der miR-medierten Genregulation sollen entsprechende Standardtechniken etabliert werden. Es werden miR-Expressionssysteme kloniert und durch stabile Transfektion in HLA-G⁺ Tumorzelllinien eingebracht, sowie die HLA-G-Expression nachfolgend charakterisiert. Des Weiteren sollen Luziferase-Reporter-Experimente die Interaktion zwischen miR und HLA-G-mRNA weitergehend untersuchen. In Zusammenarbeit mit dem GRK1591 (DFG) wird eine spezifische miR-Affinitätsaufreinigung unter Verwendung des HLA-G-3'-UTRs durchgeführt, zum Nachweis der direkten miR-HLA-G-mRNA-Interaktion und zur Identifizierung weiterer HLA-G-regulierender miRs, z. B.: unter Verwendung von miR-*microarrays* in Kooperation mit Prof. Ena Wang vom NIH (*National Institutes of Health*), Bethesda, USA. Bei erfolgreicher Identifikation neuer putativer HLA-G-regulierender miRs, sollen diese miRs hinsichtlich der Interaktion mit HLA-G weitergehend analysiert werden.

Bei erfolgreicher Verminderung der HLA-G-Expression in Folge der miR-Überexpression, soll zusätzlich überprüft werden, ob die NK- und T-Zell-vermittelte Cytotoxizität beeinflusst ist. Dafür werden mit den entsprechenden Tumorzelllinien bzw. mit den entsprechenden Transfektanden und mit, aus Blutspenden, aufgereinigten NK- und T-Zellen *in vitro* CD107a-Degranulations-Experimente durchgeführt.

In Kooperation mit Prof. A. Hartmann (Institut für Pathologie, der Universität Erlangen-Nürnberg, Deutschland) werden aus paraffinierten NZK-Gewebsschnitten miRs isoliert und mit der HLA-G-Expression, sowie mit klinischen Parametern assoziiert, wie Überleben, Tumor-*grading* und –*staging*. Dafür werden Gewebeproben aus sogenannten *Tissue microarrays* (TMAs) verwendet. Zusätzlich soll untersucht werden, inwiefern die HLA-G-Expression jener NZKs mit der Anzahl und Aktivität von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) korreliert.

Die Mitglieder der miR-148-Familie, z. B.: miR-152, regulieren u. a. HLA-G und HLA-C, ferner wirken diese miRs Tumor-suppressiv (Abschnitt 1.8.). Es soll daher ebenfalls Gegenstand dieser Doktorarbeit sein, weitere Gene zu identifizieren, die in ihrer Expression durch diese miRs reguliert werden. Dafür wird in der miR-152-defizienten Choriokarzinomzelllinie, JEG-3, die miR-152 überexprimiert und mit einer entsprechenden Kontroll-Transfektande vergleichend eine Proteomanalyse mittels 2D-Gel-Elektrophorese in Kombination mit MALDI-TOF-

Massenspektrometrie durchgeführt. Identifizierte putative miR-152 Ziel-Gene sollen folgend mit molekularbiologischen Methoden validiert und deren biologische Funktion im Kontext der Tumoronkologie und –immunologie untersucht werden.

3. Materialien

3.1. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2-Jodacetamid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
7-AAD	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
α -Cyanohydroxymizsäure	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland
Aceton	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Acetonitril	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
<i>Acrylamide/Bis solution, 29:1 (40 %)</i>	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Agarose	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ampicillin	CARL ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat	CARL ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ampuwa	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Amylose Resin	NEB, Ipswich, MA, USA
Annexin V	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Axitinib	Pfizer, Berlin, Deutschland
β -Mercaptoethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Bromophenolblau	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
CaCl ₂	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
CFSE	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
CHAPS	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Cisplatin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Coomassie-Brilliantblau G-250	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dimethylbenzylammoniumpropan-sulfonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
DMEM (mit und ohne Phenolrot)	Gibco® Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DTT	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Ethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethidiumbromid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
FKS	Gibco® Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
G-418/ Geneticin	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Harnstoff	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Gibco® Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
IL-2	Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kanamycin	CARL ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin	Lonza, Basel, Schweiz
LB-Agar	CARL ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium	CARL ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

<i>low melting agarose</i>	BioLine GmbH, Luckenwalde, Deutschland
<i>LMW calibration kit for SDS-electrophoresis</i>	GE Healthcare, Easton Turnpike, Fairfield, CT, USA
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
MgCl ₂	CARL ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
n-Butanol	CARL ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	CARL ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O	CARL ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NaOH	CARL ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Na ₂ S ₂ O ₃	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumpyruvat (100 mM)	Gibco® Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NDSB-201	Calbiochem®, Merck, Darmstadt, Deutschland
NH ₄ HCO ₃	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Nonidet P40	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Paclitaxel	Bristol-Myers Squibb, New York City, USA
<i>PageRuler Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA, Pasching, Österreich
Pharmalyte (pH 3,0 bis 10)	VWR®, Darmstadt, Deutschland
ortho-Phosphorsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Plus one drystrip cover fluid</i>	GE Healthcare, Easton Turnpike, Fairfield, CT, USA
Phosphataseinhibitorcocktail	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Proteaseinhibitorcocktail	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Puromycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
RPMI 1640 (mit Phenolrot)	Gibco® Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Salzsäure	CARL ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SDS	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
<i>skim milk powder</i>	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
TEMED	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trichloressigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trifluoressigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Thioharnstoff	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TRIS	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trizol	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Trypanblau	Gibco® Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Trypsin/EDTA (10 x)	PAA, Pasching, Österreich
Tween® 20	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
X-vivo 15-Medium	Lonza, Basel, Schweiz

3.2. Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Annexin V-Bindungspuffer	140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl ₂ ; 10 mM HEPES/NaOH; pH 7,4
Laufpuffer (10-fach)	250 mM Tris; 2 M Glycin
SDS-Laufpuffer (1-fach)	100 ml 10-fach Laufpuffer; 900 ml H ₂ O; 5 ml SDS (20 %-ig; V/V)
PBS (10-fach)	684 mM NaCl; 13,4 mM KCl; 7,3 mM KH ₂ PO ₄ ; 40,4 mM Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O; pH 7,4
Rabilloud Puffer (1-fach)	7 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 0,2 M NDSB-201; 4 % (w/V) CHAPS; 1 % (w/V) DTT; 0,5 % (V/V) Pharmalyte, Bromphenolblau
RIPA-Puffer	25 mM Tris-HCl (pH 7,6); 150mM NaCl; 1% (V/V) NP-40;

	1% (w/V) Natriumdesoxycholat; 0,1% (w/V) SDS
TAE (50-fach)	2 M Tris; 0,05 M EDTA; 5,7 % (V/V) Essigsäure
TBS (10-fach)	0,2 M Tris; 1,4 M NaCl; pH 7,6 mit HCL
TBST-T	100 ml 10-fach TBS; 900 ml H ₂ O; 1 ml Tween-20-Lösung
Transferpuffer	100 ml 10-fach Laufpuffer; 200 ml Methanol; 700 ml H ₂ O

3.3. Oligonukleotide

Name	Applikation	Sequenz (5' → 3')	Kondition
miR-133A	<i>stem-loop</i> Primer	GTCGTATCCAGTGCAGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATA CGACCAGCTG	42 °C
miR-133Afw	qPCR	GCCCTTTGGTCCCCTTCAAA	60 °C
miR-141	<i>stem-loop</i> Primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGAT ACGACCCATCT	42 °C
miR-141fw	qPCR	GCCCTAACACTGTCTGGTAA	60 °C
miR-148A	<i>stem-loop</i> Primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGAT ACGACACAAAAG	42 °C
miR-148Afw	qPCR	GCCCTCAGTGCACACTACAGA	60 °C
miR-148B	<i>stem-loop</i> Primer	GTCGTATCCAGTGCAGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATA CGACACAAAAG	42 °C
miR-148Bfw	qPCR	GCCCTCAGTGCATCACAGGA	60 °C
miR-152	<i>stem-loop</i> Primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGAT ACGACCCAAGT	42 °C
miR-152fw	qPCR	GCCCTCAGTGCATGACAGA	60 °C
miR-541	<i>stem-loop</i> Primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGAT ACGACAGTCCA	42 °C
miR-541fw	qPCR	GCCCTGGTGGGCACAGAATC	60 °C
miR-548q	<i>stem-loop</i> Primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGAT ACGACCCGCCA	42 °C
miR-548qfw	qPCR	GCCCGCTGGTGCAAAAGTAA	60 °C
miR-628-5p	<i>stem-loop</i> Primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGAT ACGACCCTCTA	42 °C
miR-628-5pfw	qPCR	GCCCATGCTGACATATTTAC	60 °C
<i>stem-loop</i> PCR rev	qPCR	GTGCAGGGTCCGAGGT	60 °C
Klon miR-152fw	Klonierung	AAACTCGAGTTCTGGGTCCGTTTGGAGT	60 °C
Klon miR-152rev	Klonierung	AAAGAATTCGTTCTGCCAGCCCT	60 °C
Klon miR-541fw	Klonierung	AAACTCGAGAGAATTTCCAGAAGCAACAG	60 °C
Klon miR-541rev	Klonierung	AAAGAATTCAGGATCCCTCAAAGAGTA	60 °C
Klon miR-548qfw	Klonierung	AAAGAATTCGGCACGTTTCTTTCAACC	60 °C
Klon miR-548qrev	Klonierung	AAACTCGAGCTGCAAGATGCCGAAATG	60 °C
Klon miR-628fw	Klonierung	AAACTCGAGGCCATCCCTTACATGCCTTTC	60 °C
Klon miR-628rev	Klonierung	AAAGAATTCACACCTGAGGCGACGGCATCTT	60 °C
Klon HLA-G CDS fw	Klonierung	AAAGGATCCCCAAGGATGGTGGTCATGG	60 °C
Klon HLA-G CDS rev	Klonierung	AAAACGCGTAAAGTTCTCATG	60 °C
Klon 14-3-3β CDS fw	Klonierung	AAAGGATCCTTCGCTCGGAAGGGTCTTTG	58 °C
Klon 14-3-3β CDS rev	Klonierung	AAAACGCGTTTTCTAGGCTGAGGCTGTG	58 °C
qPCRHLAGfw ⁽¹⁴⁵⁾	qPCR	TTGCTGGCCTGGTTGTCTT	60 °C
qPCRHLAGrev ⁽¹⁴⁵⁾	qPCR	TTGCCACTCAGTCCCACACAG	60 °C
Forward GAPDH (Fermentas)	qPCR	CAAGGTCATCCATGACAACCTTG	60 °C
Reverse GAPDH (Fermentas)	qPCR	GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG	60 °C
HPRT fw	qPCR	CCCTGGCGTCGTGATTAGTGATGAT	60 °C
HPRT rev	qPCR	TGCTTTGATGTAATCCAGCAGGTCAGC	60 °C
qPCR 14-3-3β fw	qPCR	GGAAGGAAGAGGTCATCTCGC	60 °C
qPCR 14-3-3β rev	qPCR	TGCTTCTCTATCCACAGCCG	60 °C

G.257 ⁽¹⁴⁶⁾	PCR	GGAAGAGGAGACACGGAACA	61 °C
G.1225 ⁽¹⁴⁶⁾	PCR	TGAGACAGAGACGGAGACAT	61 °C
HLA-GmiTrap fw	Klonierung	AAAGAATTCAAACAGCTGCCCTGTGT	60 °C
HLA-GmiTRAPrev	Klonierung	AAACTCGAGCTCTCAAATTCAGGAATC	60 °C
miTRAP 14-3-3β fw	Klonierung	AAAGAATTCTTACTGAGCACCTTGGTGAG	58 °C
miTRAP 14-3-3β rev	Klonierung	AAACTCGAGTTCACAACCACGGGTGTGCT	58 °C
luc ACTB fw	Klonierung	AAAACACTAGTAGGCGGACTATGACTTAGTT	60 °C
luc ACTB rev	Klonierung	AAAACGCGTACTGGTCTCAAGTCAGTGTA	60 °C
luc HLA-G fw	Klonierung	AAAACACTAGTGTGCTGTGGAGAAAGAAGAG	60 °C
luc HLA-G rev	Klonierung	AAAACGCGTAAAGTTCTCATGTCTTCCATT	60 °C
luc 14-3-3β fw	Klonierung	AAAACACTAGTTTACTGAGCACCTTGGTGAG	58 °C
luc 14-3-3β rev	Klonierung	AAAACGCGTTTACAACCACGGGTGTGCT	58 °C
mut152 fw (HLA-G)	FusionsPCR	CTCAAATTTGTGGTCCACTCGAGCTATAACTTACTTCTGTGTT	60 °C
mut152 rev (HLA-G)	FusionsPCR	AATACAGAAGTAAGTTATAGCTCGAGTGGACCACAAATTTGAG	60 °C
Δ152#1fw (14-3-3β)	FusionsPCR	AATGCAGTAGTGAATGTGGAAGCTCTTTTCTTGCTTTGTT	60 °C
Δ152#1rev (14-3-3β)	FusionsPCR	AACAAAGCAAGAAAAGAGCTTCCACATTCACTACTGCATT	60 °C
Δ548q628fw (in HLA-G)	FusionsPCR	AAGAACCCTGCACCCCTGTGCCACCATGACCC	60 °C
Δ548q628rev (in HLA-G)	FusionsPCR	CACAGGGGTGCAGGGTTCTTGAAGTCACAAAGGG	60 °C
152decoyse1	Hybridisierung/ Klonierung	GATCCGGACGGCGCTAGGATCATCAACCCAAGTTCTGTGCTATGACTGACAAGTATT	
152decoyse2	Hybridisierung/ Klonierung	CTGGTCACAGAATACAACCCAAGTTCTGTGCATGACTGACAAGATGATCCTAGCGCCGTCTTTTTTG	
152decoyas2	Hybridisierung/ Klonierung	GAATTCAAAAAGACGGCGCTAGGATCATCTTGTGAGTCAATGACAGAACTTGGGTTGTATTCTGTG	
152decoyas1	Hybridisierung/ Klonierung	ACCAGAATACTTGTGAGTGCATGACAGAACTTGGGTTGATGATCCTAGCGCCGTCCG	
HLAGEX2se ⁽⁵⁸⁾	PCR	GGGTCCGGCGGGTCTCAA	62 °C
HLAGEX2as ⁽⁵⁸⁾	PCR	TCCGTGGGGCATGGAGGT	62 °C
HLAGEX3se ⁽⁵⁸⁾	PCR	CCCAGACCCTCTACCTGGGAGA	65 °C
HLAGEX3as ⁽⁵⁸⁾	PCR	CTCTCCTTGTGCTAGGCCAGGCTGGGAGG	65 °C
HLAGEX4se ⁽⁵⁸⁾	PCR	CCATGAGAGATGCAAAGTGCT	55 °C
HLAGEX4as ⁽⁵⁸⁾	PCR	TGCTTCCCTAACAGACATGAT	55 °C
SeqHLAGEX2 ⁽⁵⁸⁾	Sequenzierung	ATGGAGGTGGGGTTCGTGATCT	
SeqHLAGEX3 ⁽⁵⁸⁾	Sequenzierung	GGTGGTCCGGGCGAGGGCGAGGCT	
SeqHLAGEX4 ⁽⁵⁸⁾	Sequenzierung	CCATGAGAGATGCAAAGTGCT	
qPCR CDK1 fw	qPCR	AGCCGGGATCTACCATACCC	60 °C
qPCR CDK1 rev	qPCR	CTGGCAAGGCCAAAATCAGC	60 °C
qPCR CDK2 fw	qPCR	CACTGAGACTGAGGGTGTGC	60 °C
qPCR CDK2 rev	qPCR	GGAGGATTTGAGGAGCTCGG	60 °C
qPCR CDK4 fw	qPCR	GGCTTTACTGAGGCGACTGG	60 °C
qPCR CDK4 rev	qPCR	TGGTCGGCTTACAGAGTTTCC	60 °C
qPCR CDK6 fw	qPCR	TCACACCGAGTAGTGCATCG	60 °C
qPCR CDK6 rev	qPCR	GACTTCGGGTGCTCTGTACC	60 °C
qPCR CCNB fw	qPCR	AAGGCGAAGATCAACATGGC	60 °C
qPCR CCNB rev	qPCR	CACAGGTCTTCTTCTGCAGGG	60 °C
qPCR CCNA fw	qPCR	TGTCACCGTTCTCCTTGG	60 °C
qPCR CCNA rev	qPCR	ACTGACATGGAAGACAGGAACC	60 °C
qPCR CCND1 fw	qPCR	CAGAAGCGAGAGCCGAGC	60 °C

qPCR CCND1 rev	qPCR	CCACGAACATGCAAGTGGC	60 °C
qPCR CCNE fw	qPCR	CCATCATGCCGAGGGAGC	60 °C
qPCR CCNE rev	qPCR	TTTGCCCAGCTCAGTACAGG	60 °C
qPCR BAX fw	qPCR	CTGAGCAGATCATGAAGACAGG	60 °C
qPCR BAX rev	qPCR	CTCCATGTTACTGTCCAGTTCG	60 °C
qPCR BAD fw	qPCR	TGAGCCGAGTGAGCAGGAAG	60 °C
qPCR BAD rev	qPCR	ATGATGCTTGCCGGAGCCTG	60 °C
qPCR Bcl2 fw	qPCR	GGAGGATTGTGGCCTTCT	60 °C
qPCR Bcl2 rev	qPCR	TGCCGGTTCAGGTACTCA	60 °C
qPCR Survivin fw	qPCR	CACCGCATCTCTACATTCAAGA	60 °C
qPCR Survivin rev	qPCR	CAAGTCTGGCTCGTTCTCAGT	60 °C
qPCR Mcl1 fw	qPCR	GAGTTGTACCGGCAGTCGCT	60 °C
qPCR Mcl1 rev	qPCR	AGTTTGTTACGCCGTGCTG	60 °C
qPCR PTEN fw	qPCR	TCCACAAACAGAACAAAGATGCT	60 °C
qPCR PTEN rev	qPCR	CTCTGGATCAGAGTCAGTGGTG	60 °C
qPCR TP53 fw	qPCR	CCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCC	65 °C
qPCR TP53 rev	qPCR	GGATGGTGGTACAGTCAGAGCCAA	65 °C

3.4. Antikörper

Antigen	Firma	Klon/Konjugat	Applikation
14-3-3β	Santa Cruz Biotechnology	polyklonal C-20	Western Blot
ACTB	Cell Signaling	monoklonal, 8H10D10	Western Blot
α-Kaninchen	Dako	polyklonal/ HRP	Western Blot
α-Maus	Dako	polyklonal/ HRP	Western Blot
BAX	Cell Signaling	monoklonal, D2E11	Western Blot
<i>cleaved</i> Caspase 3	Cell Signaling	monoklonal, 5A1E	Western Blot
CD3	Beckman Coulter	monoklonal, UCHT1/PE	Durchflusszytometrie
CD3	Thermo Scientific	monoklonal, SP7	Immunhistochemie
CD4	Leica	monoklonal ,1F6	Immunhistochemie
CD8	Dako	monoklonal, C8/144B	Immunhistochemie
CD16	Beckman Coulter	monoklonal, 3G8/PE	Durchflusszytometrie
CD25	Cell Marque Corporation	monoklonal, 4C9	Immunhistochemie
CD56	Beckman Coulter	monoklonal, N901 (HLDA6)/PE	Durchflusszytometrie
CD56	BD Pharmingen	monoklonal, B159/FITC	Durchflusszytometrie
CD56	Cell Marque Corporation	monoklonal, MRQ-42	Immunhistochemie
CD69	Leica	monoklonal, CH11	Immunhistochemie
CD107a	BD Pharmingen	monoklonal, H4A3/FITC	Durchflusszytometrie
FoxP3	Abcam	monoklonal, 236A/E7	Immunhistochemie
GAPDH	Cell Signaling	monoklonal, 14C10	Western Blot
HLA-ABC	Beckman Coulter	monoklonal, B9.12.1/FITC	Durchflusszytometrie
HLA-G	EXBIO	monoklonal, MEM-G/1	Western Blot
HLA-G	EXBIO	monoklonal, MEM-G/4	Western Blot
HLA-G	EXBIO	monoklonal, MEM-G/9/FITC	Durchflusszytometrie
HLA-G	Abcam	monoklonal, 4H84	Immunhistochemie
Isotypkontrolle IgG1	Beckman Coulter	monoklonal, 679.1Mc7 /FITC	Durchflusszytometrie

Maus
 Isotypkontrolle IgG1 Beckman Coulter monoklonal, 679.1Mc7/PE Durchflusszytometrie
 Maus

3.5. Enzyme

Enzym	Firma	Applikation
AgeI	NEB	Restriktionsverdau
BamHI	Fermentas	Restriktionsverdau
Benzonase	Novagen	Proteinextraktion
BglII	Fermentas	Restriktionsverdau
Clal	NEB	Restriktionsverdau
EcoRI	Fermentas	Restriktionsverdau
DNase I	NEB	RNA-Präparation
DpnI	NEB	Restriktionsverdau
HindIII	Fermentas	Restriktionsverdau
KpnI	Fermentas	Restriktionsverdau
MluI	NEB	Restriktionsverdau
<i>Mung Bean</i> Nuklease	NEB	Klonierung
NheI	NEB	Restriktionsverdau
PciI	NEB	Restriktionsverdau
Phusion® <i>High-Fidelity</i> DNA-Polymerase	NEB	PCR
PspOMI	NEB	Restriktionsverdau
Q5® <i>High-Fidelity</i> DNA-Polymerase	NEB	PCR
Proteinase K	Promega	RNA-Aufreinigung
RNase A	Macherey-Nagel	Plasmid-Präparation
Reverse-Transkriptase	Fermentas	cDNA-Synthese
<i>Shrimp Alkaline</i> Phosphatase	Fermentas	Klonierung
SpeI	NEB	Restriktionsverdau
T4 DNA-Ligase	Promega	Klonierung
T4 Polynukleotid-Kinase	NEB	Phosphorylierung
T7 RNA Polymerase	Promega	<i>in vitro</i> -Transkription
Taq DNA-Polymerase	Invitrogen	PCR
Trypsin	Promega	Massenspektrometrie
XbaI	Fermentas	Restriktionsverdau
XhoI	NEB	Restriktionsverdau

3.6. Kits

Kit	Firma	Applikation
<i>BCA Protein Assay Reagent</i>	Thermo Scientific	Proteinkonzentrations-bestimmung
<i>Beta-Glo® Assay System</i>	Promega	beta-Galaktosidasemessung
<i>Cell Proliferation Kit II</i>	Roche	<i>XTT</i> -Assay
<i>Effectene Transfection Reagent</i>	Qiagen	Zelltransfektion
<i>Luciferase Assay Reagent</i>	Promega	Luziferase-Messung
<i>Lumi-Light Western Blotting Substrate</i>	Roche	Western Blot
<i>MEGAclean™ Kit</i>	Ambion	RNA-Aufreinigung
<i>NK Cell Isolation Kit, human</i>	Miltenyi Biotec	NK-Zellaufreinigung

<i>NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up</i>	Macherey-Nagel	DNA-Aufreinigung
<i>NucleoSpin® Plasmid miniprep</i>	Macherey-Nagel	Plasmid-Extraktion
<i>Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG</i>	Invitrogen	qPCR
<i>Platinum®Taq DNA Polymerase</i>	Invitrogen	PCR
<i>QIAamp DNA Mini Kit</i>	Qiagen	DNA-Extraktion
<i>RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit</i>	Fermentas	cDNA-Synthese
<i>RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7</i>	Promega	<i>in vitro</i> -Transkription
<i>TOPO® TA Cloning® Kit with pCR®2.1-TOPO®</i>	Invitrogen	externer qPCR-Standard

3.7. Verbrauchsmaterialien

Name	Firma	Applikation
0,2 ml Reaktionsgefäße	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel	Molekularbiologie
1,5 ml Reaktionsgefäße	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel	Molekularbiologie
2,0 ml Reaktionsgefäße	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel	Molekularbiologie
15 ml Greiner	Greiner Bio-One GmbH	Zellkultur
50 ml Greiner	Greiner Bio-One GmbH	Zellkultur
5 ml Pipetten	TPP Techno Plastic Products AG	Zellkultur
10 ml Pipetten	TPP Techno Plastic Products AG	Zellkultur
25 ml Pipetten	TPP Techno Plastic Products AG	Zellkultur
25 cm ² Zellkulturflasche	Sarstedt	Zellkultur
75 cm ² Zellkulturflasche	Sarstedt	Zellkultur
175 cm ² Zellkulturflasche	Sarstedt	Zellkultur
6- <i>well</i> Platten	Sarstedt	Zellkultur
96- <i>well</i> Platten	Sarstedt	Zellkultur
(<i>round bottom</i>)		
96- <i>well</i> Platten	Sarstedt	Zellkultur
(<i>flat bottom</i>)		
FACS-Röhrchen	Sarstedt	Durchflusszytometrie
Halbmikroküvetten	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel	Molekularbiologie
Immobiline™ dryStrip	GE Healthcare	Isoelektrische Fokussierung
pH 3-10 NL, 18 cm		
LS-Säulen	Miltenyi	Zellkultur
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld-Superior	Zellkultur
(0,0025 mm ²)		
Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schuell	Western Blot
Pasteurpipetten	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co KG	Zellkultur
PARAFILM® M	Sigma-Aldrich	Mikrobiologie
Pipetten	Eppendorf, Gilson	Molekularbiologie/ Zellkultur
Pipettenspitzen	Sarstedt	Molekularbiologie/ Zellkultur
(0-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)		
Whatman-Papier	Whatman	Western Blot

3.8. Geräte

Name	Firma	Applikation
<i>96-well labcycler Gradient</i>	Sensoquest	PCR
Absaugpumpe	KNF Neuberger, GmbH	Zellkultur
Agarosegel-Laufkammer	Biometra, GmbH	Molekularbiologie
Allegra® X-15R Zentrifuge	Beckman Coulter	Zellkultur
<i>BD FACSCanto™</i>	BD Biosciences	Durchflusszytometrie
<i>BD FACScan™</i>	BD Biosciences	Durchflusszytometrie
<i>BD LSRFortessa™</i>	BD Biosciences	Durchflusszytometrie
<i>BIO-RAD 96-well iCycler</i>	BIO-RAD Laboratories, Inc.	qPCR
CO ₂ -Inkubator	Binder	Zellkultur
<i>Ettan IPGphor 2</i>	GE Healthcare	2D-Gelelektrophorese
Eppendorf Biophotometer	Eppendorf AG	Photometer
Gelkassette DALT 25 x 20 cm, 1,5 mm	Amersham Pharmacia Biotech	2D-Gelelektrophorese
<i>ISO-DALT® electrophoresis system</i>	Hoefer, Inc.	2D-Gelelektrophorese
<i>Herolab spot hunter</i>	Herolab GmbH	Massenspektrometrie
<i>Hoefer EPS 2A200</i>	Hoefer, Inc.	2D-Gelelektrophorese
<i>Large Dodeca stainer</i>	BIO-RAD Laboratories, Inc	2D-Gelelektrophorese
<i>LAS 3000 CCD camera system</i>	FUJIFILM	Western Blot
Mikrozentrifuge Z233 MK-2	Hermle Labortechnik	Zellkultur
Microlumat Plus CB 96V	Berthold Technologies	Luziferase-Messung
<i>Microplate reader (MRX-TC)</i>	Dynex Technologies	Zellviabilitätsmessung
<i>Mini-PROTEAN® Tetra Cell</i>	BIO-RAD Laboratories, Inc.	Western Blot
<i>MTP 384 ground steel target</i>	Bruker Daltonics, Inc.	Massenspektrometrie
<i>Power supply</i>	BIO-RAD Laboratories, Inc	Molekularbiologie
<i>Rotor-Gene</i>	Qiagen	qPCR
<i>Scanner PowerLook 1100</i>	Umax	2D-Gelelektrophorese
<i>Sterilwerkbank: HERA safe</i>	Heraeus Sepatech GmbH	Zellkultur
<i>Telaval 3 inverted Microscope</i>	Carl Zeiss Jena	Zellkultur
Thermoblock	Eppendorf AG	Molekularbiologie
<i>Trans-Blot® Tank</i>	BIO-RAD Laboratories, Inc.	Western Blot
Ultraschall-Homogenisator	SONOPULS Bandelin	Zellaufschluss
<i>ultrafleXtreme™</i>	Bruker Daltonics, Inc.	Massenspektrometrie
Waage	Ohaus Europe, GmbH	Molekularbiologie

3.9. Software

Name	Firma	Applikation
<i>Adobe Photoshop Elements 4.0</i>	Adobe	Bildgestaltung
<i>Aida Image Analyzer 4.1</i>	FUJIFILM	Western Blot
<i>BD CellQuest Pro Software</i>	BD Biosciences	Durchflusszytometrie
<i>Clone Manager 5</i>	Sci-Ed Software	Klonierung
<i>Decodon Delta 2D</i>	Decodon GmbH	2D-Gelelektrophorese
<i>Endnote</i>	Thomson Reuters	Textverarbeitung
<i>FACSDiva software package</i>	BD Biosciences	Durchflusszytometrie
<i>flexAnalysis software (3.3.80.0)</i>	Bruker Daltonics, Inc.	Massenspektrometrie
<i>Kaluza® Flow Analysis Software</i>	Beckman-Coulter	Durchflusszytometrie

<i>MetaVue™ Research Imaging Software</i>	Molecular Devices, LLC	Zellkultur
<i>Mendeley Desktop</i>	Mendeley	Textverarbeitung
<i>Microsoft Excel 2010</i>	Microsoft	Tabellenkalkulation
<i>Microsoft PowerPoint 2010</i>	Microsoft	Bildgestaltung
<i>Microsoft Word 2010</i>	Microsoft	Textverarbeitung
<i>miRDB</i>	(147,148)	miR-Analyse
<i>miRwalk</i>	(149)	miR-Analyse
<i>R2: microarray analysis and visualization platform</i>	http://r2.amc.nl	Expressionsanalyse
<i>RNA hybrid</i>	(150)	miR-Analyse
<i>Targetscan</i>	(151)	miR-Analyse
<i>Vue scan</i>	Umax	2D-Gelelektrophorese
<i>WINGLOW SOFTWARE</i>	Berthold Technologies	Luziferase-Messung

4. Methoden

4.1. Zellkultur, verwendete Zelllinien und stabile Transfektanten

Die *human embryonal kidney* Zelllinie HEK293T (ATCC® CRL-3216™), die murine Fibroblastenzelllinie NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™), die B2M-defiziente B-Zelllinie Daudi (ATCC® CCL-213™) und die HLA-G⁺ Choriokarzinomzelllinie JEG-3 (ATCC® HTB-36™) wurden von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) erworben. Des Weiteren wurden die Melanomzelllinien buf1088, FM82 und WM1862 und sechs Nierenzellkarzinom- Zelllinien MZ1257RC, MZ1790RC, MZ1795RC, MZ1851RC, MZ2733RC und MZ2905RC verwendet, welche von Patienten mit metastatischen Melanomen oder Nierenzellkarzinomen etabliert wurden und in der Literatur beschrieben worden sind ^(152–155).

Die Zelllinien Daudi und JEG-3 wurden in RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) kultiviert. Für die anderen Zelllinien wurde DMEM (Invitrogen) verwendet.

Dem RPMI 1640 und dem DMEM wurden 10 % FKS (Invitrogen), 2 mM L-Glutamin (Lonza, Basel, Schweiz) und 1 % (V/V) von 100-fachem Penicillin/Streptomycin (PAA) hinzugegeben.

Aufgereinigte Lymphokin-aktivierte Killerzellen (LAK-) und NK-Zellen wurden aus peripheren Blutproben gesunder Spender generiert ⁽¹⁵²⁾ mit einem Ficoll- Gradienten (BiochromAG, Berlin, Deutschland). NK-Zellen wurden mit dem *human NK Cell Isolation* Kit (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) und dem auto-MACS Kit (Miltenyi Biotec) aufgereinigt. Die Reinheit der NK- (96.6 %) und LAK-Zellen (92.3 %) wurden mittels Durchflusszytometrie überprüft. Aufgereinigte NK- und LAK-Zellen wurden in X-vivo 15 Medium (Lonza) kultiviert, welchem folgende Komponenten zugefügt worden sind: 1 % (V/V) Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin und 1 % (V/V) Penicillin/Streptomycin, sowie IL-2 200 U/ml für NK-Zellen bzw. 2000 U/ml für LAK-Zellen.

Stabile Transfektanden wurden selektioniert und kultiviert mit 5 µl einer 0,1 g/ml G-418-Lösung pro ml Zellkulturmedium oder mit 5 µl einer 0,1 mg/ml Puromycin-Lösung pro ml Zellkulturmedium. Alle verwendeten stabilen Transfektanten und deren genetische Modifikationen sind in Tabelle 4.1. aufgelistet.

Für die Herstellung von Kryokulturen wurden die Zellen trypsiniert, mit PBS gewaschen und in reinem FKS mit 10 % DMSO (V/V) resuspendiert und in Kryogefäße pipettiert. Anschließend wurden die Kryogefäße zum Durchmischen invertiert und in spezielle Einfrierboxen bei -80 °C eingefroren. Nach 24 h wurden die Kryogefäße von -80 °C zu -150 °C überführt.

Zellpellets beliebiger Zellzahl zur weiteren RNA- oder Proteinextraktion wurden durch Trypsinieren, zweimaliges Waschen mit PBS und Einfrieren bei -80 °C gewonnen. Die Zellpellets für die miTRAP-Experimente wurden in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Tabelle 4.1. Auflistung der verwendeten stabilen Transfektanten

Name der stabilen Transfektante	genetische Modifikation	ursprüngliche Zelllinie
JEG-3 + pmR(mock)	pmR-m-cherry-Leervektor (Clontech, USA)	JEG-3
JEG-3 + pmR(miR-152)	pmR-m-cherry mit Gen der miR-152 (Überexpression der miR-152)	JEG-3
JEG-3 + pmR(miR-541)	pmR-m-cherry mit Gen der miR-541 (Überexpression der miR-541)	JEG-3
JEG-3 + pmR(miR-548q)	pmR-m-cherry mit Gen der miR-548q (Überexpression der miR-548q)	JEG-3
JEG-3 + pmR(miR-628-5p)	pmR-m-cherry mit Gen der miR-628-5p (Überexpression der miR-628-5p)	JEG-3
JEG-3 + pmR(miR-152) + pExp(mock)	pmR-m-cherry mit Gen der miR-152 (Überexpression der miR-152) + pMiR-Report-Leervektor (Ambion, USA)	JEG-3
JEG 3 + pmR(miR-152) + pExp(14-3-3 β)	pmR-m-cherry mit Gen der miR-152 (Überexpression der miR-152) + pMiR-Report-mit der CDS von 14-3-3 β anstatt der CDS der Luziferase (Überexpression von 14-3-3 β)	JEG-3
BUF1088 + pmR(mock)	pmR-m-cherry-Leervektor (Clontech, USA)	BUF1088
BUF1088 + pmR(miR-152)	pmR-m-cherry mit Gen der miR-152 (Überexpression der miR-152)	BUF1088
NIH/3T3 + pExp(HLA-G)	pMiR-Report-mit der CDS und dem 3'-UTR von HLA-G anstatt der CDS der Luziferase (Überexpression von HLA-G)	NIH/3T3
NIH/3T3 + pExp(HLA-G) pmR(mock)	pMiR-Report-mit der CDS und dem 3'-UTR von HLA-G anstatt der CDS der Luziferase (Überexpression von HLA-G) + pmR-m-cherry-Leervektor (Clontech, USA)	NIH/3T3
NIH/3T3 + pExp(HLA-G) pmR(miR-152)	pMiR-Report-mit der CDS und dem 3'-UTR von HLA-G anstatt der CDS der Luziferase (Überexpression von HLA-G) + pmR-m-cherry mit Gen der miR-152 (Überexpression der miR-152)	NIH/3T3

4.2. Isolierung von DNA, RNA und microRNAs

Die Isolierung von DNA erfolgte mittels QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers. RNA wurde unter Verwendung des TRIZOL-Reagenz (Invitrogen) isoliert, was die Analyse der mRNA- und der miR-Expression ermöglicht.

Die extrahierte RNA wurde mit DNaseI inkubiert (NEB, Ipswich, MA, USA; 30 min bei Raumtemperatur), welche mit EDTA (5 mM Endkonzentration) und Hitze (75 °C, 10 min) inaktiviert worden ist.

4.3. HLA-G-Allel-Genotypisierung

Für die HLA-G-Allel-Genotypisierung wurden die Exons 2, 3 und 4 des HLA-G-Gens mittels PCR amplifiziert und die PCR-Produkte sequenziert. Dafür wurden Oligonukleotide verwendet, die in der Tabelle 3.3. aufgelistet sind ⁽⁵⁸⁾. Die Sequenzen der PCR-Produkte wurden mit den entsprechenden HLA-G-Allel-Sequenzen verglichen, die in der Datenbank (www.hla.alleles.org) hinterlegt sind.

4.4. cDNA-Synthese, semi-quantitative und quantitative PCR

Die cDNA-Synthese erfolgte unter Verwendung von 2 µg RNA mit *random hexamer* Oligonukleotiden (Fermentas, Mannheim, Deutschland) und dem *RevertAid™ H Minus First Strand cDNA synthesis Kit* (Fermentas) nach dem Protokoll des Herstellers.

Für die miR-spezifische cDNA-Synthese wurden spezielle *stem-loop* Oligonukleotide (Tabelle 3.3.; ^{156,157}), 0,5 µg RNA und das *RevertAid™ H Minus First Strand cDNA synthesis Kit* (Fermentas) verwendet. Die Reverse Transkription und alle erforderlichen PCR Reaktionen wurden in einem 96-*well* labcycler (Sensoquest, Göttingen, Deutschland) ausgeführt.

Für die qPCR wurden spezifische Oligonukleotide (Tabelle 3.3.) und das Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) verwendet. Zur Quantifizierung der miRs wurde ein BIO-RAD 96-*well* iCycler (BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) und für die relative Quantifizierung der mRNAs ein rotorgene cycler (Qiagen) verwendet.

Für die qPCR von miRs wurde die absolute Kopienzahl unter Verwendung eines externen miR-spezifischen TOPO-TA-Plasmid-Standards (Invitrogen) bestimmt, der durch Klonierung des *stem-loop*-PCR-Produktes der zu quantifizierenden miR hergestellt wurde.

Relative mRNA-Expression für spezifische Gene wurde normalisiert auf GAPDH. Die verwendeten Oligonukleotide sind in der Tabelle 3.3. aufgeführt.

4.5. Proteinextraktion und Western Blot-Analyse

Zur Proteinextraktion wurden Zellpellets von $1 \cdot 10^7$ Zellen einer bestimmten Zelllinie in RIPA-Puffer aufgenommen, welcher zusätzlich 1:250 Proteaseinhibitorcocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) und 1:1000 Benzonase (10000 U/ μ l; Novagen, Darmstadt, Deutschland) enthielt. Nach einer Inkubation von 20 min bei 4 °C erfolgte eine Zentrifugation mit 13000 rpm bei 4 °C. Die Überstände wurden in ein neues Gefäß überführt und die Proteinkonzentration mittels BCA Protein Assay Reagent (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) bestimmt.

Es wurden 50 bzw. 70 μ g Proteinextrakt pro Tasche eines 10 bzw. 12 %-igen Polyacrylamid-Gels aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) über Nacht bei 100 mA in einem Trans-Blot® Tank (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) geblottet.

Zur Detektion wurden verschiedene Primärantikörper verwendet (Kapitel 3.4.). Die spezifisch an ihr Antigen gebundenen Primärantikörper wurden mittels HRP-konjugierten Sekundärantikörpern (DAKO, Hamburg, Deutschland) markiert. Der Zugabe der Substratlösung *Lumi-Light Western Blotting Substrate* (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) folgte die Detektion der Lumineszenz mit dem CCD-Kamera-System (Fuji BAS 3000, Fuji GmbH, Düsseldorf, Deutschland).

4.6. Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie wurden Fluoreszenz-markierte Antikörper und entsprechende Immunglobulin-Isotypenkontrollen verwendet (Tabelle 3.4.).

Die Antikörper wurden nach den Angaben der Hersteller eingesetzt. Zum Färben der Zellen mit den markierten Antikörpern wurden zwischen $1 \cdot 10^5$ bis $2 \cdot 10^5$ Zellen benutzt. Die Messung erfolgte am FACSCAN (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) oder am LSRFortessa (BD). Anschließend wurden die Messdaten mit der *FACS Diva analysis software* (BD) oder mit der *Kaluza® Flow analysis Software* (Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland) ausgewertet. Die Daten wurden entweder als *mean specific fluorescence intensities* (MFI) oder als Histogramme dargestellt.

4.7. CFSE-Markierung, Zellzyklusanalyse, Apoptose-Detektion und Zellviabilitätsmessung

Zur Analyse der Zellproliferation und der Apoptoseinduktion wurden *5,6- carboxyfluorescein diacetate-succinimidyl ester* (CFSE) (Invitrogen, Eugene, USA) bzw. *allo-phycoyanine* (APC)-konjugiertes Annexin V (BD Pharmingen™) in Kombination mit dem Vitalfarbstoff *7-amino-actinomycin D* (7-AAD, BD Pharmingen™) entsprechend den Herstellerangaben und folgender Literatur ⁽¹⁵⁸⁾ verwendet. Es wurden $5 \cdot 10^5$ Zellen mit CFSE markiert. Anschließend wurden die

Zellen in 6-*well* Platten (SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland) gestreut und für 96 h ohne Selektionsantibiotika kultiviert. Nach dem Färben der trypsinisierten Zellen mit dem Vitalfarbstoff 7-AAD erfolgte die Analyse in der Durchflusszytometrie.

Zur Analyse des Zellzyklus bzw. der Genexpression der Zellzyklus-regulierenden oder die Apoptose-regulierenden Gene wurden die zu untersuchenden Zellen zunächst synchronisiert durch Kultivierung mit Minimalmedium (0,5 % FKS (V/V)) für 48 h. Danach wurden die Zellen für weitere 48 h in regulärem Medium kultiviert, bevor die Zellen zur weiteren Analyse verwendet wurden.

Für die Messung des Zellzyklus wurden zunächst die Zellkerne präpariert, indem die Zellen für 20 min bei 4 °C mit 10 mM Zitronensäure, versetzt mit 0,5 % Tween 20 (w/V), inkubiert wurden. Danach wurden die Zellkerne gewaschen und für 24 h bei 4 °C mit 70 %-igem Ethanol fixiert. Anschließend wurden die Zellkerne erneut gewaschen und mit RNase A (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor für 10 min mit Propidiumiodid die DNA gefärbt wurde. Dem folgte die Analyse in der Durchflusszytometrie⁽¹⁵⁸⁾.

Zur Bestimmung der Apoptoseinduktion wurden $1 \cdot 10^5$ JEG-3 Zellen/*well* eingestreut und für 48 h ohne Selektionsantibiotika kultiviert. Nach der Färbung mit APC-Annexin V (BD Phamingen™) und 7-AAD entsprechend den Herstellerangaben, erfolgte in der Durchflusszytometrie die Analyse.

Um die Zellviabilität der Transfektanden unter Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Paclitaxel (Bristol-Myers Squibb, New York City, USA) zu untersuchen, wurde ein XTT-assay (*Cell Proliferation Kit II*, Roche, Mannheim, Deutschland) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Messung der Absorption erfolgte am *Microplate Reader* (MRX-TC, Dynex Technologies, Denkendorf, Deutschland). Danach wurde die Absorption der Paclitaxel-behandelten Zellen als Prozentzahl gegen die DMSO-behandelten Kontrollzellen dargestellt. Die IC_{50} -Werte wurden entsprechend der Publikation Stehle et al., 2013⁽¹⁵⁸⁾ berechnet.

4.8. CD107a-Degranulations-Assay

Aufgereinigte Immuneffektorzellen (NK- und LAK- Zellen) wurden in 96-*well* Platten (runder Boden) mit den jeweiligen Zielzellen im Verhältnis 10:1 co-kultiviert. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt wurden die Zellen für 4 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit den entsprechenden Antikörpern gegen CD107a (FITC) und CD56 (PE) bei NK-Zellen oder gegen CD107a (FITC) und CD3 (PE) bei LAK-Zellen markiert, bevor die Zellen in der Durchflusszytometrie analysiert wurden.

4.9. Luziferase-Reporter-Gen-Assay

Zur Charakterisierung der direkten Interaktion und der exakten Bindungsstelle einer miR an einer mRNA wurden Luziferase Reporter-Genexperimente durchgeführt.

Zunächst wurden *in silico*-Analysen der miR-152 Bindungsstelle am 3'-UTR der mRNA von HLA-G und 14-3-3 β mit der *online*-Datenbank RNAhybrid⁽¹⁵⁹⁾ ausgeführt. Anschließend wurde der 3'-UTR von HLA-G bzw. ein Fragment des 3'-UTRs von 14-3-3 β , inklusive der *in silico*-präzidierten miR-152-Bindungsstelle in den Vektor pMIR-REPORT™ (Ambion, Austin, Texas, USA) mit den Restriktionsenzymen SpeI (NEB) und MluI (NEB) hinter die für die Luziferase-kodierende Sequenz kloniert.

Zur Bestimmung der Spezifität der Interaktion zwischen miR-152 und HLA-G bzw. 14-3-3 β , wurde die entsprechende miR-152 Bindungsstelle im Luziferase-Reporter-Genkonstrukt deletiert bzw. mutiert mittels Fusions-PCR (Oligonukleotide siehe Tabelle 3.3).

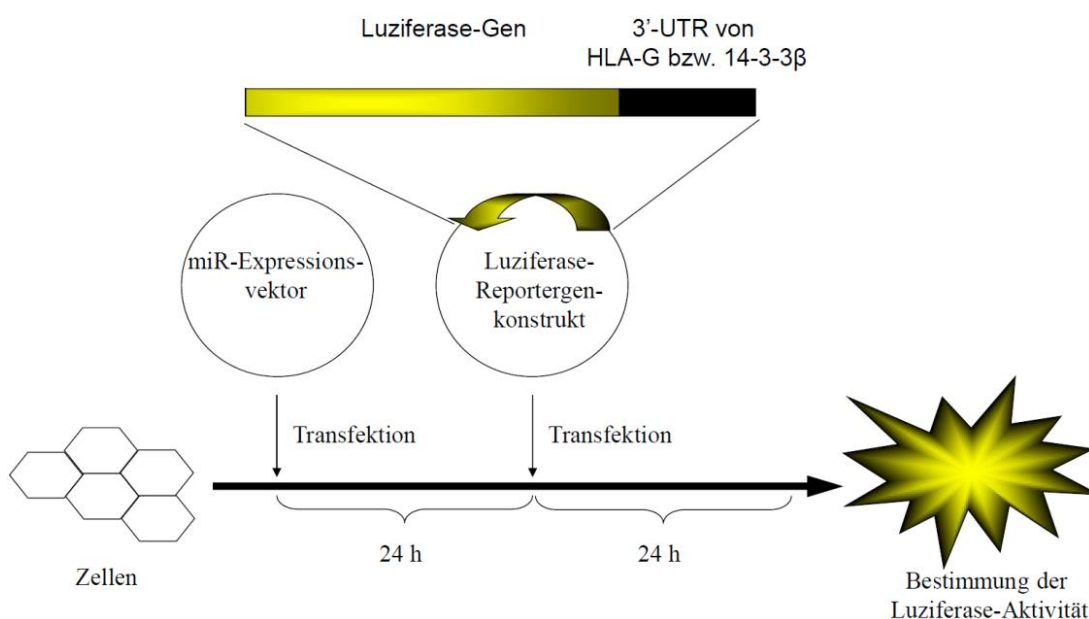


Abbildung 4.1. Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs der Luziferase-Reporter-Gen-Assays

Zur Transfektion wurden $1 \cdot 10^4$ HEK293T Zellen in 96-well Platten mit flachem Boden eingestreut, für 24 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit den miR-Expressionsvektoren oder mit dem entsprechenden Leervektor transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit *Effectene Transfection Reagent* (Qiagen). Nach weiteren 24 h Inkubation bei 37 °C erfolgte eine zweite Transfektion mit den jeweiligen Luziferase-Reporter-Genkonstrukten, sowie mit einem Vektor kodierend für β -Galaktosidase (β -gal), der zur Normalisierung der Transfektionseffizienz dient.

Erneut 24 h später wurden die Zellen in einem 1-fach Lysepuffer (Promega, Madison, WI, USA) aufgenommen und die Luziferase- und β -Galaktosidase-Aktivitäten an einem Luminometer (Microumat Plus CB 96V, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) bestimmt. Dafür wurden kommerziell verfügbare Substratlösungen (Promega) verwendet ⁽¹⁶⁰⁾. Die Ergebnisse wurden als relativer Quotient der Luziferase- und β -Galaktosidase- Aktivitäten dargestellt. Die Abbildung 4.1. zeigt schematisch den experimentellen Ablauf.

4.10. Klonierung der Expressionsvektoren und miR-Decoys, sowie deren Transfektion

Zur Generierung des HLA-G-Expressionsvektors wurde cDNA von JEG-3-Zellen verwendet, welche homozygot für das HLA-G-Allel G*010103 sind. Es wurde eine Fusions-PCR durchgeführt. Das erste PCR-Produkt wurde mit dem Vorwärtsprimer 5'-AAAGGATCCCCAAGGATGGTGGTCATGG-3' und dem Rückwärtsprimer 5'-TTGCCACTCAGTCCCACACAG-3' amplifiziert. Zur Generierung des zweiten PCR-Produktes wurde der zweite Vorwärtsprimer 5'-TTGCTGGCCTGGTTGTCCTT-3' und der zweite Rückwärtsprimer 5'-AAAACGCGTAAAGTTCTCATGTCTTCCATTT-3' verwendet. Beide sich überlappende PCR-Produkte wurden über ein Agarosegel (SERVA, Heidelberg, Deutschland) aufgereinigt (MACHEREY-NAGEL Inc., Bethlehem, PA, USA) und als *templates* für eine Fusions-PCR mit dem ersten Vorwärtsprimer und dem zweiten Rückwärtsprimer verwendet. Das resultierende PCR-Produkt wurde in den pMIR-REPORT Vektor (Ambion) mit den Restriktionsenzymen BamHI und MluI (Fermentas) kloniert, das Luziferase-Gen ersetzend.

Für die Klonierung des 14-3-3 β Expressionsvektors wurde cDNA von JEG-3-Zellen als *template* für die PCR verwendet (Vorwärtsprimer 5'-AAAGGATCCTTCGCTCGGAAGGGTCTTTG-3' und Rückwärtsprimer 5'-AAAACGCGTTTTCTAGGCTGAGGCTGTG-3'). Das PCR-Produkt wurde in den pMIR-REPORT vector (Ambion) mit den Restriktionsenzymen BamHI und MluI kloniert, ebenfalls das Luziferase-Gen ersetzend.

Die miR-Gene wurden mit ihren 5'- und 3'- flankierenden Sequenzen aus genomischer DNA amplifiziert und in den pmR-m-cherry-Vektor (Clontech, Mountain View, CA, USA) in die *multiple cloning site* (MCS), im 3'-UTR des m-cherry-Gens, kloniert.

Zur Klonierung der miR-Decoy-Konstrukte wurde die Technik von Haraguchi et al., 2009 ⁽¹⁶¹⁾ angewendet. Dazu wurden komplementäre Oligonukleotide (Tabelle 3.3.) hybridisiert und in den Vektor pLVX-IRES-ZsGreen (Clontech) kloniert, über die Restriktionsenzyme BamHI und EcoRI (Fermentas).

Die HEK293T-Zellen wurden transient, JEG-3- und murine NIH/3T3-Zellen stabil transfiziert - mit den jeweiligen Expressionsvektoren bzw. den respektiven Leervektor-Kontrollen (mock-

Vektoren). Dafür wurde Effectene Transfection Reagent (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

4.11. microRNA-Affinitätsaufreinigung (miTRAP)

Die 3'-UTR-Sequenzen von HLA-G und 14-3-3 β , welche bereits als Luziferase-Reportergen-Konstrukte kloniert worden waren (siehe 4.9.), wurden in einen anderen Vektor umklontiert, direkt vor (5') einer Sequenz, die für vier MS2 *loops* kodiert und hinter (3') einem T7-Promotor. Anschließend wurden diese Sequenzen *in vitro* transkribiert mit dem T7-RiboMAX™-System (Promega) und zur Anreicherung von HLA-G- bzw. 14-3-3 β -spezifischer miRs aus dem Zelllysat der Zelllinie MZ2905RC (HLA-G-mRNA⁺/Protein⁻) verwendet. Dafür wurde zusätzlich ein Fusionsprotein, bestehend aus MS2 *loop*- und Maltose-bindendes Protein eingesetzt, welches freundlicherweise von Prof. Hüttelmaier (MLU Halle-Wittenberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurde. Für den *pull down* wurden Amylose *beads* (Amylose Resin; NEB, Ipswich, MA, USA) verwendet. Die miR-Anreicherung wurde mit qPCR validiert. Die vollständige Methode wird detailliert in der Publikation Braun et al., 2014⁽¹⁶²⁾ beschrieben.

Die Abbildung 4.2. (Jasinski-Bergner et al., 2014;¹⁶³) zeigt das Prinzip der miTRAP.

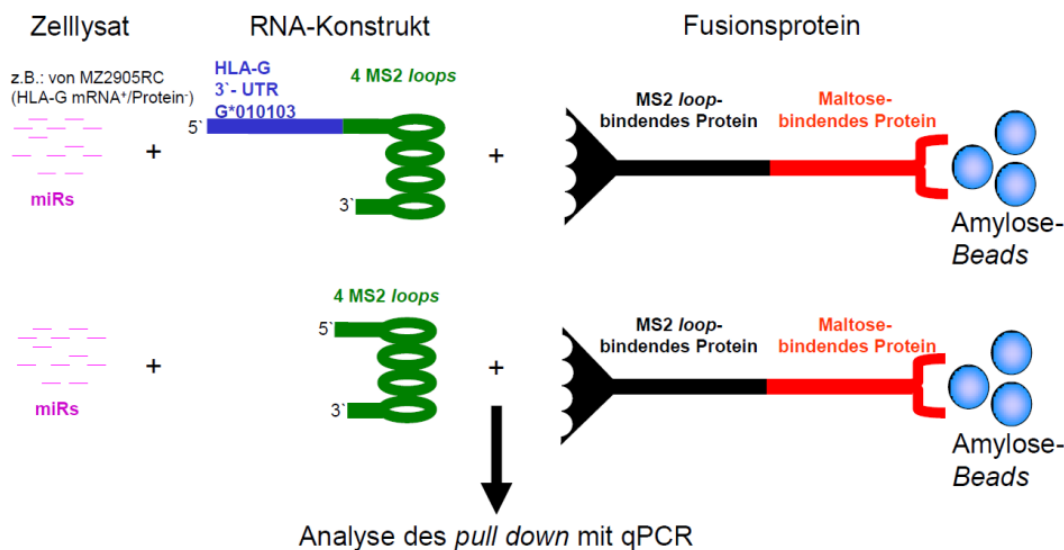


Abbildung 4.2. Schematische Darstellung des miTRAP-Experimentes (Jasinski-Bergner et al., 2014;¹⁶³)

4.12. Immunhistochemische Analysen unter Verwendung von NZK-Tissue microarrays

Die *Tissue microarrays* (TMA) beinhalteten 453 Formalin-fixierte, paraffinierte NZK-Gewebeproben mit korrespondierenden, dem Tumor-angrenzenden, normalen Gewebeproben⁽¹⁶⁴⁾. Das Probenmaterial wurde im Zeitraum von 2002 bis 2011 gesammelt. Die Proben bzw. die

Färbungen wurden von zwei erfahrenen Pathologen (A. Hartmann und V. Spath) begutachtet. Dies beinhaltete ebenfalls die Klassifizierung des NZK-Subtyps, sowie das Tumor-*grading* und -*staging* entsprechend den Kriterien der *World Health Organization* (WHO) von 2004. Die Studie wurde von dem Ethik-Gremium der Universität Erlangen-Nürnberg genehmigt und orientierte sich an den Prinzipien, welche in der Erklärung von Helsinki hinterlegt sind.

5 µm breite Schnitte wurden von den TMA-Gewebeblöcken angefertigt, bevor die HLA-G-Expression durch immunhistochemische Färbung nachgewiesen worden ist. Hierzu wurde der HLA-G-spezifische mAk [4H84] (Abcam, Cambridge, MA, USA) in einer Verdünnung von 1:50 mit dem Antibody Diluent (Dako) verwendet. Parallel dazu wurden die Immunzellinfiltrationen untersucht unter Verwendung von Antikörpern (Name der Antikörper in Klammern) gegen folgende Antigene: CD3 (mAb SP7, Thermo Scientific, Fremont, CA, USA), CD4 (mAb 1F6, Leica, Nussloch, Germany), CD8 (mAb C8/144B, Dako), CD56 (mAb MRQ-42, Cell Marque Corporation, Rocklin, CA, USA), CD25 (mAb 4C9, Cell Marque Corporation), CD69 (mAb CH11, Leica) und FoxP3 (mAb 236A/E7, Abcam).

Zur Visualisierung wurde das Envision™ detection system (Dako) eingesetzt, unter Verwendung eines HRP-verbundenen anti-Maus-Sekundärantikörpers und 3,3'-*diaminobenzidine* (DAB+) *substrate chromogen* (Dako).

Die Abbildung 4.3. zeigt den Aufbau eines *Tissue microarrays* und die geplanten Experimente.

RCC-Tissue microarray

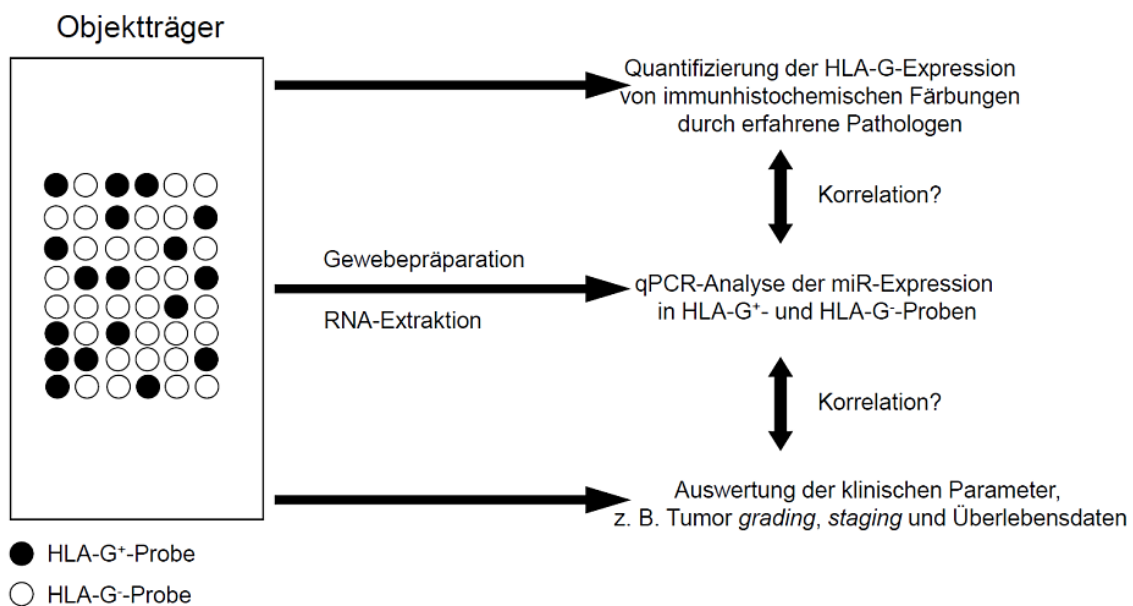


Abbildung 4.3. Der Aufbau eines *Tissue microarrays* und die geplanten Experimente

Die HLA-G-Expression wurde als *immunoreactive score* (IRS) dargestellt. Dabei wird gibt die Zahl vor der Klammer die Intensität der HLA-G-Expression an, wobei 0 für keine Expression, 1 für schwache Expression, 2 für mittlere Expression und 3 für starke Expression steht. In den Klammern wird eine Prozentzahl angegeben, die beschreibt wieviel Prozent der Zellen des jeweiligen Gewebeschnittes HLA-G⁺ waren. Hingegen wurden die Immunzellinfiltrationen als Mittelwert absoluter positiver (angefärbter) Zellen pro Viertel eines Objektschnittes bei 400-facher Vergrößerung dargestellt.

4.13. Zwei-dimensionale Gelelektrophorese (2-DE), Proteinvisualisierung und Bildauswertung

Als Ausgangsmaterial wurden gefrorene Zellpellets (-80 °C; 1 * 10⁷ Zellen/Probe – für drei biologische Replikate) verwendet. Die Zellen wurden in einem Lysepuffer aufgenommen: 7 M Harnstoff (Applichem, Darmstadt, Deutschland), 2 M Thioharnstoff (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland), 0,2 M Dimethylbenzylammoniumpropansulfonat (NDSB-256, Merck, Darmstadt, Deutschland), 1 % Dithiothreitol (DTT; Applichem, Darmstadt, Deutschland), 4 % 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS; Applichem), 0,5 % Pharmalyte (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) und eine Spatelspitze Bromophenolblau (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland). Das Zelllysate wurde anschließend mit Ultraschall behandelt, zwei Zyklen mit jeweils fünf Impulsen (0,5 s pro Impuls) bei maximaler Einstellung am Gerät (Bandelin UW 2070 Sonicator, MS 73-Nadel; Bandelin, Berlin, Deutschland). Danach wurden die Proben zentrifugiert (18000 × g, 90 min, 15 °C) und der Überstand weiterverwendet. Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde nach Lichtenfels et al., 2001 durchgeführt⁽¹⁵³⁾. Die einzelnen Proben (500 µg Protein in einem Volumen von 350 µl Lysepuffer) wurden auf IPG- (Immobilisierte pH-Gradienten) Streifen (pH 3-10 NL, 18 cm, GE Healthcare, München, Deutschland) aufgetragen und mit 450 µl *Immobiline DryStrip Cover Fluid* (GE Healthcare) bedeckt. Nach 2 h der Rehydrierung, erfolgte die isoelektrische Fokussierung (IEF) bei 20°C an einem *Ettan IPGphor 2* (GE Healthcare) mit folgenden Einstellungen: 30 V 10 h, 500 V 1 h, 1000 V 1 h, 5000 V 1 h und 8000 V zu einer Summe von 45000 Vh. Danach wurden die IPG-Streifen äquilibriert durch Inkubation für 15 min in 12 ml Äquilibrierungspuffer (6 M Harnstoff, 2 % SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 8.8), 30 % Glycerin und 1.5 % DTT. Dem schloss sich eine Inkubation für 15 min in 12 ml Äquilibrierungspuffer mit 4.8 % Iodoacetamid, statt DTT (alle Chemikalien von Applichem).

Es folgte die Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension durch SDS-PAGE. Dafür wurde die *PROTEAN plus Dodeca Cell* (Bio-Rad) mit 1,5 mm dicken und 13 %-ig konzentrierten Polyacrylamidgelen verwendet. Die IPG-Streifen wurden vertikal auf den SDS-Gelen mit 1,5 %

low melting Agarose (BioLine GmbH, Luckenwalde, Deutschland) und einer Spatelspitze Bromophenolblau fixiert. Die Elektrophorese erfolgte mit konstanter Spannung (20 V für 1 h; 120 V für 15 h) bei 10 °C.

Anschließend wurden die Gele mit kolloidalem *Coomassie Brilliant Blue G250* gefärbt (10 % Ammoniumsulfat (Applichem), 10 % Phosphorsäure (Merck KGaA), 0,12 % *Coomassie Brilliant Blue G250* (Applichem), 20 % Methanol (Merck KGaA); ¹⁶⁵). Die Entfärbung der Gele erfolgte in ddH₂O.

Für die weiterfolgende Analyse wurden die Gele mit einem konventionellen Scanner (UMAX Image Scanner, GE Healthcare) mit einer Auflösung von 600 dpi eingescannt und im TIFF-Format gespeichert. Danach wurden die 2D-Gel-Bilder mit dem Computerprogramm *Delta2D Software* Version 4.0.8 (DECODON GmbH, Greifswald, Deutschland) analysiert. Die entsprechenden Gelbilder wurden mit der *Delta2D Software* übereinander gelegt und ein synthetisches Fusionsgel kreiert. Differentiell-exprimierte Proteinspots wurden am Fusionsgel durch die *Software* detektiert. Für die sechs Pärchen an Gelen (sechs vom mock-Vektor transfiziertem JEG-3-Transfektand und sechs vom miR-152-Expressionsvektor transfiziertem JEG-3-Transfektand) wurde die Signifikanz der differentiell-exprimierten Proteine berechnet. Proteinspots, deren relative Expression mindestens 2-fach verändert (Zu- oder Abnahme) bei einer 95 %-igen Konfidenz (t-test; $p < 0.05$) wurden für weiterführende Analysen verwendet. Der schematische Ablauf dieser Experimente ist in Abbildung 4.4. dargestellt.

4.14. In-Gel Verdau und Massenspektrometrie

Damit die Proteine identifiziert werden konnten, wurden die entsprechenden Proteinspots aus, mit kolloidalen *Coomassie Brilliant Blue G250* gefärbten, 2D-Polyacrylamidgelen herausgeschnitten. Dafür wurde der *Herolab spot hunter* (Herolab GmbH, Wiesloch, Deutschland) mit einer Pickvorrichtung von 1,5 mm Durchmesser verwendet. Anschließend erfolgte der tryptische Verdau und das Auftragen der resultierenden Peptide auf das *MALDI-target*, modifiziert nach Lichtenfels et al., 2001 ⁽¹⁵³⁾.

Zunächst wurden die ausgeschnittenen Proteinspots durch Zugabe von 50 %-igen (V/V) Acetonitril entfärbt. Danach wurden die Gelstückchen zweimal mit 100 µl 50 %-igen (V/V) Acetonitril und einmal mit 100 µl 100 %-igen (V/V) Acetonitril gewaschen. Nach Trocknung wurden 5 µl Trypsinlösung mit der Konzentration von 17 ng/µl Trypsin (Promega, Madison, WI, USA) gelöst in 25 mM NH₄CO₃ und mit 0,4 mM CaCl₂ dazu pipettiert und für 2 h auf Eis inkubiert, gefolgt von einer weiteren Inkubation über Nacht bei 37 °C.

Die Gelstückchen wurden im Wasserbad für 10 min mit Ultraschall behandelt, bevor 1 µl des Überstandes (inklusive der trypsinierten Peptide) mit 1 µl einer *alpha-cyano-4-hydroxycinnamic*

acid- (HCCA) Matrix (in 50 %-igem Acetonitril und 0,1 %-iger Trifluoressigsäure) gemischt wurde. Danach wurde 1 µl dieses Gemisches direkt auf das MALDI-*target* aufgetragen und getrocknet.

Die Spektren wurden kalibriert mit einem externen Standard, *Bruker's Peptide calibration standard II* (Bruker Daltonics Inc, Bremen, Deutschland). Die MALDI-TOF-MS- Messung wurde am *ultrafleXtreme™ mass spectrometer* (Bruker Daltonics Inc) bei einer Spannung von 25000 V durchgeführt. Die Spektren wurden mit der *flexAnalysis*-(3.3.80.0) *software* analysiert.

Mit der MASCOT Suchmaschine (<http://www.matrixscience.com>) konnten die erhaltenen Daten einzelnen Proteinen zugeordnet werden. Dafür wurden folgende Parameter bei MASCOT verwendet: (i) *homo sapiens sequences*; (ii) *fixed modification, carbamidomethylation of cysteins*; (iii) *cleavage enzyme, trypsin*; (iv) *a maximum of one missed cleavage was allowed; and mass tolerance (monoisotopic), ± 50.0 ppm*. Der Proteinidentifizierung lag die sequentielle Übereinstimmung mit den Peptidsequenzen zu Grunde, die in der Massenspektrometrie ermittelt wurden. Proteine mit der MASCOT-Bewertung über 57 wurden für weitere Experimente verwendet.

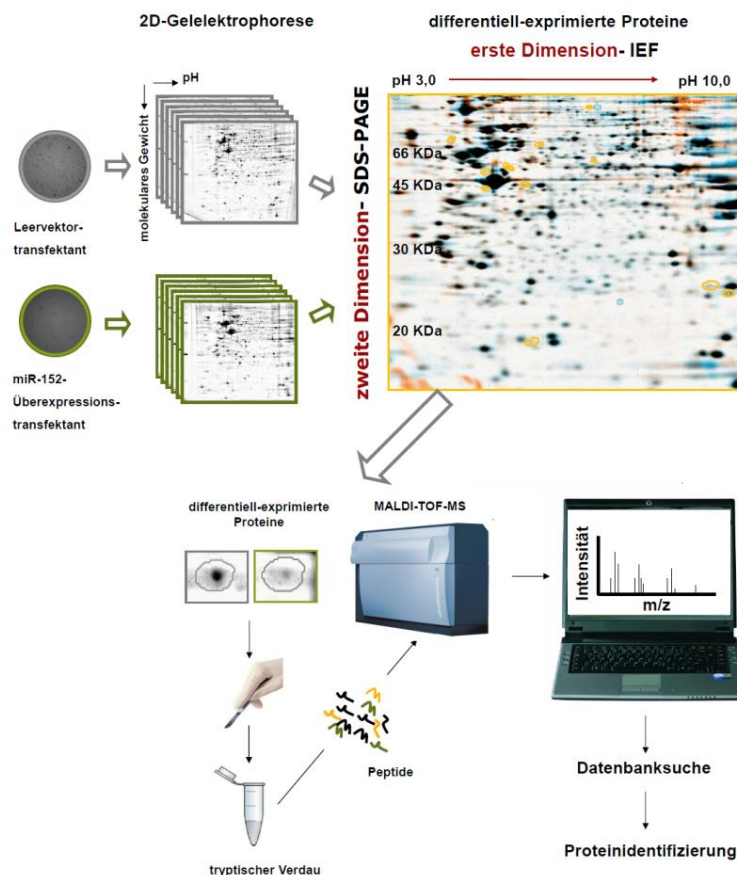


Abbildung 4.4. Ablauf der 2D-Gelelektrophorese in Kombination mit Proteomanalyse und nachgeschalteter Identifizierung der differentiell-exprimierten Proteine mit der Massenspektrometrie (modifiziert nach einer Abbildung von Dr. Franziska Stehle)

Aufgrund der Heterogenität der ermittelten Proteine wurde ein Annotationclustering durchgeführt unter Verwendung von *gene ontology* (GOMiner software; ¹⁶⁶), dafür wurden Informationen über die Funktionen der Proteine, sowie deren zellulärer Lokalisation genutzt.

4.15. Verwendung von cDNA-*microarray*-Datenbanken zur Korrelation der Expression von 14-3-3 β und HLA-G mit den Überlebensdaten von Patienten mit ausgewählten Tumorerkrankungen

Die Transkriptomdaten von Patientenproben verschiedener Tumorerkrankungen wurden hinsichtlich der 14-3-3 β - und HLA-G-Expression, sowie deren Korrelation mit den Überlebensdaten der Patienten analysiert. Dafür wurde die Datenbank *R2: microarray analysis and visualization platform* (<http://r2.amc.nl>) verwendet.

4.16. Statistische Methoden

Die Ergebnisse wurden dargestellt als Mittelwerte mit dazugehöriger Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten (biologische Replikate). Bei den dargestellten Abbildungen von Western-Blot- und Durchflusszytometrie-Analysen handelt es sich gegebenenfalls um representative Bilder eines von mindestens drei biologischen Replikaten. Für die statistische Auswertung der Luziferase-Reporter-Experimente wurden von sechs Replikaten der höchste und der niedrigste Wert entfernt und mit den restlichen vier Werten Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

Die Daten wurden mit Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) analysiert und visualisiert. Ferner wurden die Unterschiede zwischen den einzelnen Experimenten auf statistische Signifikanz überprüft. Dafür wurden entsprechende t-Tests berechnet. Bei einem Wert von $p < 0,05$ wurde der Effekt als statistisch signifikant bewertet und mit einem Stern markiert (mit zwei Sternen bei $p < 0,005$).

Die statistische Auswertung und die Generierung der Kaplan-Meier-Kurven erfolgte durch Frau Dr. Christine Stöhr (Pathologisches Institut, Universitätsklinikum Erlangen) unter Verwendung der Software SPSS Statistics 21 (IBM Corporation, New York, NY, USA). Weiterführende Informationen sind in der Publikation Jasinski-Bergner et al., 2015 (akzeptiert bei *Oncolmmunology*) nachlesbar.

5. Ergebnisse

5.1. Die Charakterisierung von NZK-Zellsystemen hinsichtlich der Expression von HLA-G und HLA-G-regulierenden miRs

In den wissenschaftlichen Publikationen Seliger et al., 2011 und Seliger et al., 2008^(58,62) werden die hohe Frequenz der pathologischen HLA-G-Expression im Nierenzellkarzinom (NZK), sowie die diskordante Expression zwischen HLA-G-mRNA und korrespondierendem Protein beschrieben. Zur weiterführenden Analyse wurde ein Zellsystem verwendet, bestehend aus fünf NZK-Zelllinien (MZ1257RC, MZ1790RC, MZ1795RC, MZ2733RC, MZ2905RC), der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293T und als HLA-G-positiv-Kontrolle die Choriokarzinomzelllinie JEG-3. Diese humanen Zelllinien wurden hinsichtlich ihrer HLA-G-Expression charakterisiert. Für den Nachweis der HLA-G-mRNA wurde eine spezielle semi-quantitative PCR nach Real et al., 1999⁽¹⁴⁶⁾ durchgeführt. Der Vorwärtsprimer bindet im Exon 2 und der Rückwärtsprimer bindet im 3'-UTR, sodass die sechs Isoformen HLA-G1 bis HLA-G6, nicht jedoch HLA-G7, (Abbildung 1.2.) amplifiziert und im Agarosegel ihrer Größe entsprechend aufgetrennt werden können.

In drei Zelllinien kann HLA-G-Transkript detektiert werden, in der positiv-Kontrolle JEG-3 und in den NZK-Zelllinien MZ2733RC und MZ2905RC (Abbildung 5.1.A). Im nachfolgenden Schritt wurde das HLA-G-Protein in den Zelllinien durch Western Blot-Analyse detektiert. In zwei Zelllinien ist das HLA-G-Protein nachweisbar: in den JEG-3-Zellen und deutlich schwächer in der NZK-Zelllinie MZ2733RC. Die Zelllinie MZ2905RC zeigt eine diskordante HLA-G-Expression, zwar ist das HLA-G-Transkript detektierbar, jedoch nicht das korrespondierende Protein (Abbildung 5.1.B). Aufgrund dieser diskordanten HLA-G-Genexpression (Tabelle 1.2. und 1.4.) wird eine posttranskriptionale Genregulation postuliert.

In der Literatur werden die miRs der miR-148-Familie: miR-152, miR-148A und miR-148B, sowie die miR-133A als HLA-G-regulierend beschrieben⁽⁷⁶⁻⁷⁸⁾. Deshalb wurde die Expression dieser miRs in den Zelllinien durch qPCR unter Bestimmung absoluter Kopienzahlen gegen einen entsprechenden qPCR-Plasmidstandard quantifiziert (Abbildung 5.1.C). Als interne Kontrolle diente die miR-141, welche keine *in silico*-präzidierte Bindungsstelle im HLA-G-3'-UTR besitzt und in den Zelllinien vergleichsweise homogen exprimiert wird. Tatsächlich zeigen die HLA-G-Protein⁺ Zelllinie JEG-3 eine stark verminderte Expression der miR-152 (Reduktion um drei Zehnerpotenzen) und die HLA-G-Protein⁺ Zelllinie MZ2733RC eine reduzierte Expression der miR-148A (Reduktion um zwei Zehnerpotenzen). Die Zelllinie MZ2905RC (HLA-G-mRNA⁺ und HLA-G-Protein⁻) hat die höchste miR-152-Expression.

Die Expression der miR-148B ist kaum detektierbar. Die Expression der miR-133A zeigt in den ausgewählten Zelllinien keine Korrelation mit der HLA-G-Expression. Interessanterweise ist eine inverse Korrelation der HLA-G-Proteinexpression in den entsprechenden Zelllinien mit der Expression der miR-152 und der miR-148A detektierbar.

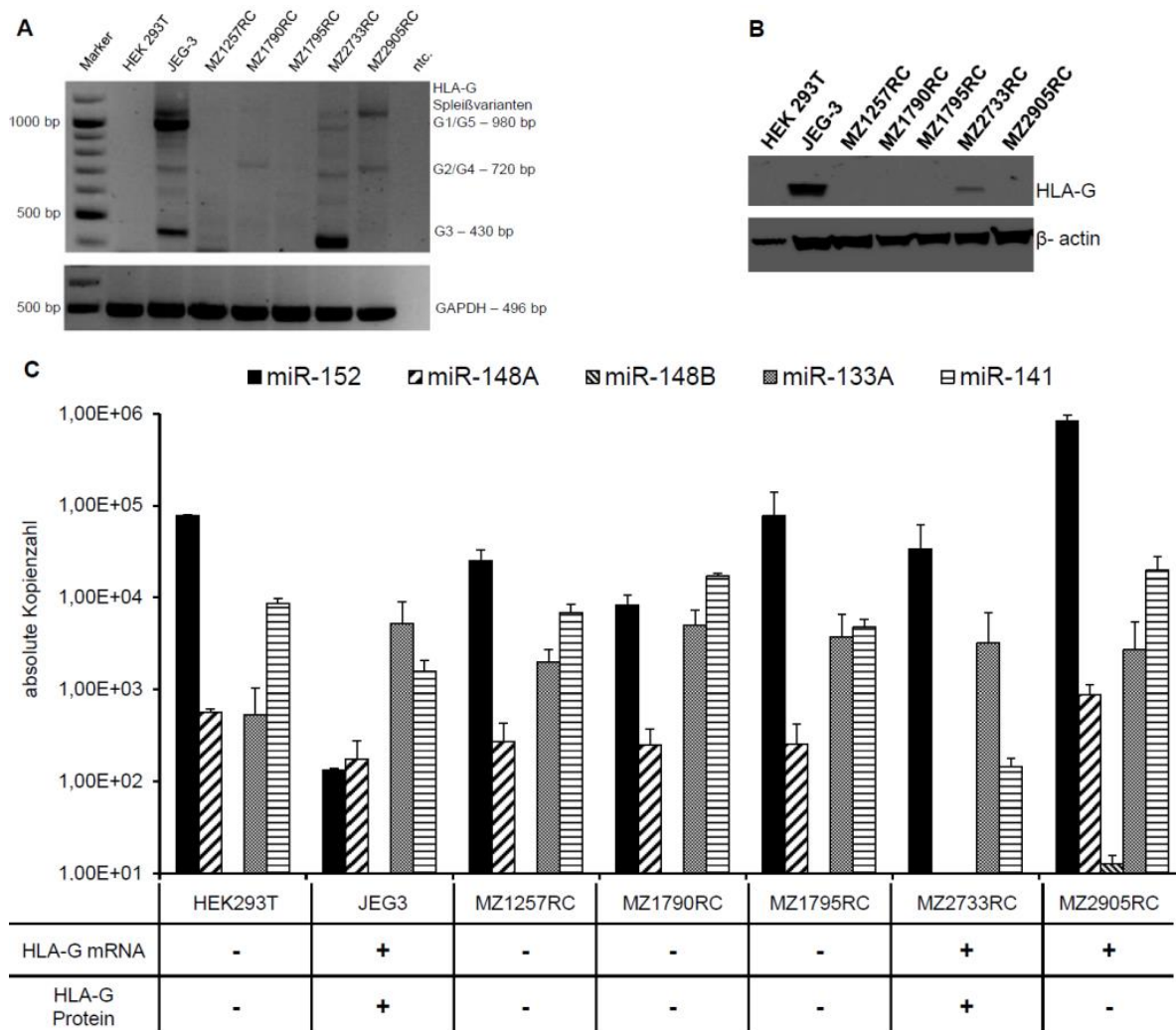


Abbildung 5.1. Untersuchung der HLA-G-Expression bzw. der Expression von HLA-G-regulierenden miRNAs in ausgewählten RCC-Zelllinien

A: Nachweis der HLA-G-mRNA mit semi-quantitativer PCR nach Real et al., 1999 ⁽¹⁴⁶⁾; B: Nachweis des HLA-G-Proteins mit Western Blot-Analyse; C: Quantifizierung der putativ HLA-G-regulierenden miRNAs der miR-148-Familie und der miR-133A, sowie als interner HLA-G-unabhängiger Standard der miR-141 in den ausgewählten Zelllinien.

5.2. Der Nachweis einer direkten Interaktion zwischen HLA-G-relevanten miRs mit der HLA-G-mRNA

In Kooperation mit Juliane Braun und Prof. S. Hüttelmaier, im Rahmen des GRK1591, wurde eine Methode zur Affinitätsaufreinigung von miRs angewendet, welche als miTRAP bezeichnet wird⁽¹⁶²⁾. Der *in vitro* transkribierte 3'-UTR von HLA-G (G*010103) wurde mittels *MS2-tagging*, unter Verwendung eines Fusionsproteins, an Amylose *beads* gebunden und zur spezifischen Anreicherung von HLA-G-regulierenden miRs aus dem Zelllysate der NZK-Zelllinie MZ2905RC (HLA-G-mRNA⁺ und HLA-G-Protein⁻) verwendet. Eine schematische Darstellung dieses Experimentes ist in Abbildung 4.2. zusammengefasst. Die Anreicherung HLA-G-bindender miRs wurde durch qPCR nachgewiesen, im Vergleich zur Kontrolle bestehend aus einer Sequenz für vier *MS2 loops* ohne HLA-G-3'-UTR.

Das Ergebnis ist in der Abbildung 5.2.A als Mittelwert mit Standardabweichung von drei biologischen Replikaten dargestellt. Die Quantität der untersuchten miRs im eingesetzten Volumen des Zelllysates, welches für die jeweiligen Affinitätsaufreinigungen verwendet worden ist, wird als *Input* bezeichnet. Erkennbar ist, dass die untersuchten miRs im eingesetzten Zelllysate detektierbar sind, jedoch unterschiedliche Expressionsniveaus aufweisen, analog zur Quantifizierung der miRs in der Zelllinie MZ2905RC aus Abbildung 5.1.C.

Zur Überprüfung einer möglichen unspezifischen Anreicherung der untersuchten miRs in den miTRAP-Eluaten, wurden miTRAP-Eluate unter Verwendung einer Kontroll-RNA-Sequenz als Köder verwendet, die nur für die vier *MS2 loops* kodiert. Tatsächlich konnte keine unspezifische Anreicherung der untersuchten miRs beobachtet werden.

In den miTRAP-Eluaten unter Verwendung des HLA-G-3'-UTRs als Köder ist erkennbar, dass die miRs der miR-148-Familie sehr stark angereichert werden können. Am stärksten wurde die miR-152 und danach die miR-148A angereichert. Die miR-148B wird nur sehr schwach exprimiert (siehe *Input*) und wird deutlich schwächer angereichert. Als HLA-G-regulierende miR wird ebenfalls die miR-133A beschrieben, jedoch führt die Überexpression der miR-133A in HLA-G-positiven Zellen nicht zur Herunterregulation der HLA-G mRNA, sondern nur zur Verminderung des HLA-G Proteins (Wang et al., 2012;⁷⁶). Von den HLA-G-regulierenden miRs wird die miR-133A nur sehr schwach angereichert. Die miR-141, die nicht am HLA-G-3'-UTR bindet, war im Zelllysate enthalten (siehe *Input*) kann jedoch nicht mit dem HLA-G-3'-UTR angereichert werden (negativ-Kontrolle).

Zur besseren Vergleichbarkeit der ermittelten Bindungsaffinitäten der in der Literatur beschriebenen HLA-G-regulierenden miRs wurden aus den Mittelwerten der spezifischen Anreicherung (mit HLA-G-3'-UTR als Köder) und der unspezifischen Anreicherung (nur die RNA-Sequenz der vier *MS2 loops* als Köder) Quotienten berechnet, welche im Folgenden als

Anreicherungsfaktoren bezeichnet werden (siehe Abbildung 5.2.A). Unter Verwendung dieser Anreicherungsfaktoren lassen sich die HLA-G-relevanten miRs hinsichtlich ihrer Affinität für den HLA-G-3'-UTR folgend gliedern miR-152 > miR-148A > miR-148B > miR-133A.

Mit dem miTRAP-Experiment kann eine direkte Interaktion zwischen HLA-G-3'-UTR und den miRs der miR-148-Familie bestätigt werden. Die Ergebnisse des miTRAP-Experimentes zeigen, dass die miR-152 das stärkste regulatorische Potenzial der bisher bekannten HLA-G-regulierenden miRs besitzt. Daher erfolgten die Luziferase-Reporterexperimente in Kombination mit der Überexpression von miR-152. Die miR-133A konnte nur sehr schwach bis nicht mit dem HLA-G-3'-UTR angereichert werden und wurde daher in den folgenden Experimenten nicht mehr berücksichtigt.

In den folgenden Luziferase-Reporter-Experimenten soll die Interaktion zwischen miR-152 und HLA-G-3'-UTR weiterführend analysiert werden. Dafür wurden die 3'-UTRs von zwei HLA-G-Allelen (G*010103 und G*010104) hinter einer Sequenz kloniert, welche für die *firefly*-Luziferase kodiert. Die beiden HLA-G-Allele unterscheiden sich durch einen C/G-Polymorphismus an der Stelle +3142 des HLA-G-Gens, direkt in der *in silico*-präzidierten Bindungsstelle der miRs der miR-148-Familie (siehe Abbildung 5.3.).

Abbildung 5.2.B zeigt die signifikante Verminderung der Luziferase-Aktivität des Reporter-Konstruktes mit dem HLA-G-3'-UTR des G*010103-Alleles in Kombination mit der miR-152-Überexpression, im Vergleich zur mock-Kontrolle. Währenddessen die Luziferase-Aktivität des Reporter-Konstruktes mit dem HLA-G-3'-UTR des G*010104-Alleles durch miR-152-Überexpression ebenfalls stark vermindert werden kann, jedoch nicht mehr signifikant. Interessanterweise ist die Luziferase-Aktivität der HLA-G-Konstrukte des G*010104-Alleles *per se* höher, als die des G*010103-Alleles, was durch das Vorhandensein endogener miRs der miR-148-Familie in den HEK293T-Zellen, in denen die Luziferase-Reporter-Assays durchgeführt wurden, erklärt werden könnte.

Die miR-152 hat keine Bindungsstelle im 3'-UTR von β -Aktin, sodass die Luziferase-Aktivität dieser Konstrukte durch die miR-152-Überexpression nicht vermindert wurde.

Im Gegensatz zur miR-152 führt die Überexpression der miR-541, als Kontroll-miR nicht zur Verminderung der Luziferase-Aktivität der HLA-G- bzw. der β -Aktin-Reporter-Konstrukte (Abbildung 5.2.C). Bisher ist nur ein Gen bekannt, welches durch miR-541 in seiner Expression reguliert wird, das Gen: NEUROG3⁽¹⁶⁷⁾.

Die Mutagenese der miR-152-Bindungsstelle im HLA-G-3'-UTR durch Einfügen eines zusätzlichen Cytosin-Nukleotides an der Stelle, welche die miR-152 mit ihrer *seed region* bindet, vermindert die Interaktion der miR-152 mit der HLA-G-mRNA und stabilisiert das mutierte Luziferase-Reporter-Konstrukt signifikant, im Vergleich zum HLA-G-Wildtyp-Konstrukt

(G*010103-Allel; Abbildung 5.2.D und Abbildung 5.3.). Dies bedeutet, dass die endogenen miRs der miR-148-Familie der HEK293T-Zellen, in denen dieses Experiment durchgeführt worden ist, schlechter an den mutierten HLA-G-3'-UTR binden können, welches auch die *in silico*-Kalkulationen der freien Energie (ΔG) andeuten (Abbildung 5.3.). Durch die Luziferase-Reporter-Gen-Analysen wurde die *in silico*-vorhergesagte Position der miR-152-Bindungsstelle am HLA-G-3'-UTR bestätigt.

Ferner konnten die endogenen miR-152-Moleküle der HEK293T-Zellen durch die Verwendung eines miR-152-spezifischen Decoy-Vektors, nach Haraguchi et al., 2009 ⁽¹⁶¹⁾, abgefangen werden, was ebenfalls in einer Stabilisierung der Luziferase-Aktivität des HLA-G-Reporter-Gen-Konstruktes resultierte (Abbildung 5.2.E).

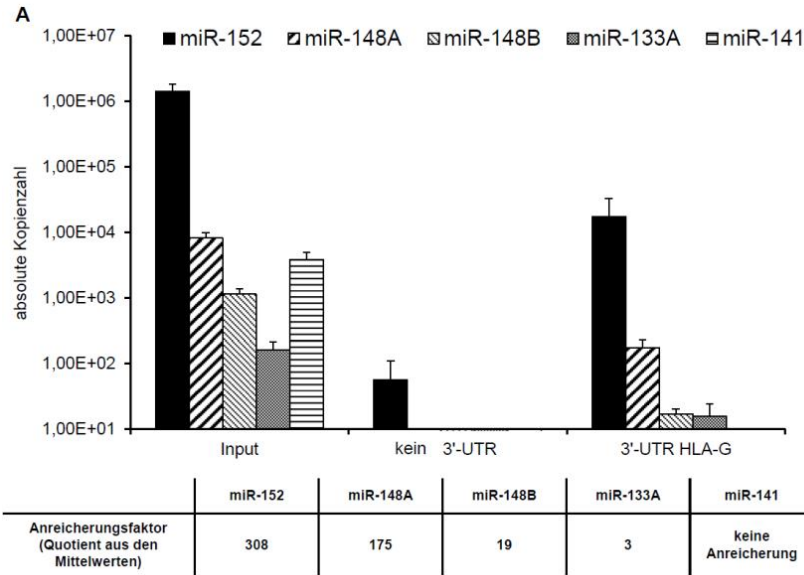


Abbildung 5.2. Nachweis der direkten Interaktion zwischen dem HLA-G-3'-UTR und den HLA-G-regulierenden miRs

A: miTRAP-Experiment:

eine Anreicherung der HLA-G-relevanten miRs mit dem HLA-G 3'-UTR als Köder aus Zelllysaten der MZ2905RC-Zellen.

Zur besseren Übersicht wurde ein Anreicherungsfaktor (Quotient der Mittelwerte der spezifischen und der unspezifischen Anreicherung) berechnet.

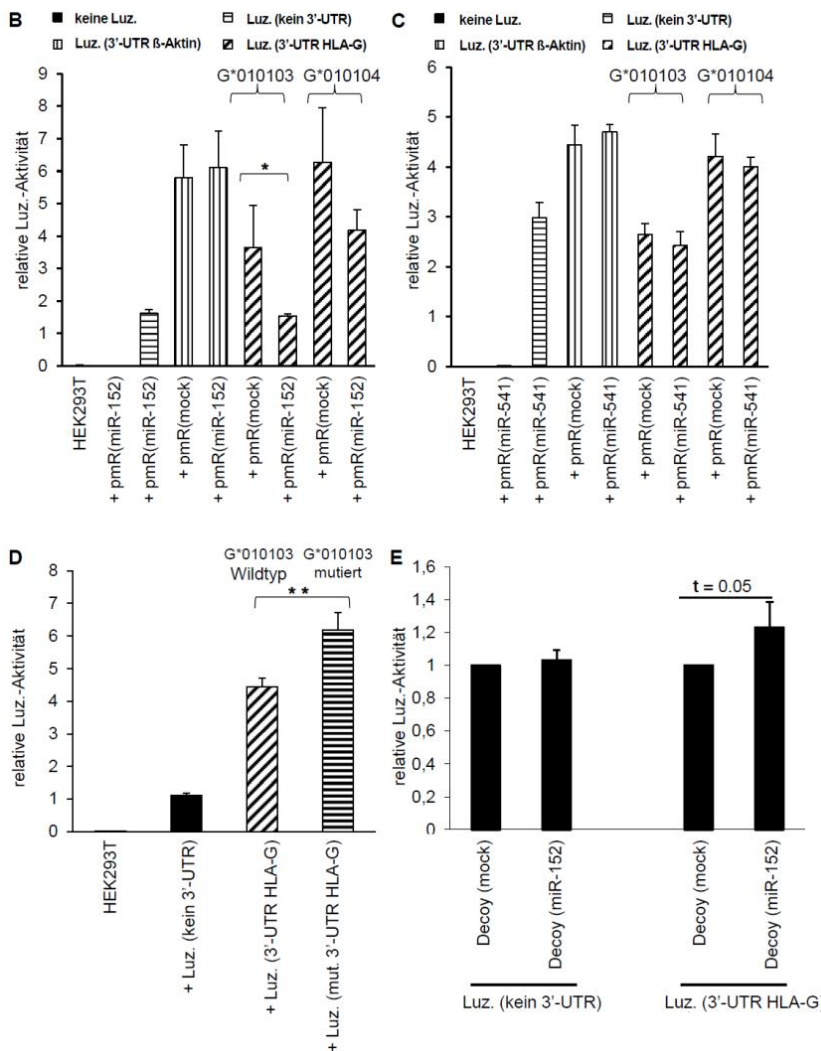
B: Luziferase-Reportergen-Experiment:

Die Überexpression der besonders stark HLA-G-regulierenden miR-152 führt zu einer starken, z. T. signifikanten Reduktion der Luziferaseaktivität der HLA-G-3'-UTR-beinhaltenden Luziferase-Reportergen-Konstrukte. Außerdem reguliert die miR-152-Überexpression die Luziferaseaktivität des HLA-G-Alleles G*010103 stärker, als die des G*010104-Alleles. Die Ursache ist ein SNP in der miR-152-Bindungsstelle. Der 3'-UTR von β -Aktin dient als negativ-Kontrolle, da er keine Bindungsstelle der miR-152 enthält.

C: Die Überexpression einer Kontroll-miR, der miR-541, hat keinen Einfluss auf die Luziferase-Reportergen-Konstrukte mit HLA-G-3'-UTR.

D: Die Mutation der miR-152-Bindungsstelle im HLA-G-3'-UTR führt zur signifikanten Stabilisierung dieses Luziferase-Reportergen-Konstruktes durch reduzierte Bindung endogener miRs in den HEK293T-Zellen, in denen das Experiment durchgeführt worden ist.

E: Das Verwenden eines miR-152-Decoy-Konstruktes (nach Haraguchi et al., 2009; ¹⁶¹), welche die endogene miR-152 abfangen, stabilisiert das HLA-G-Luziferase-Reportergen-Konstrukt.



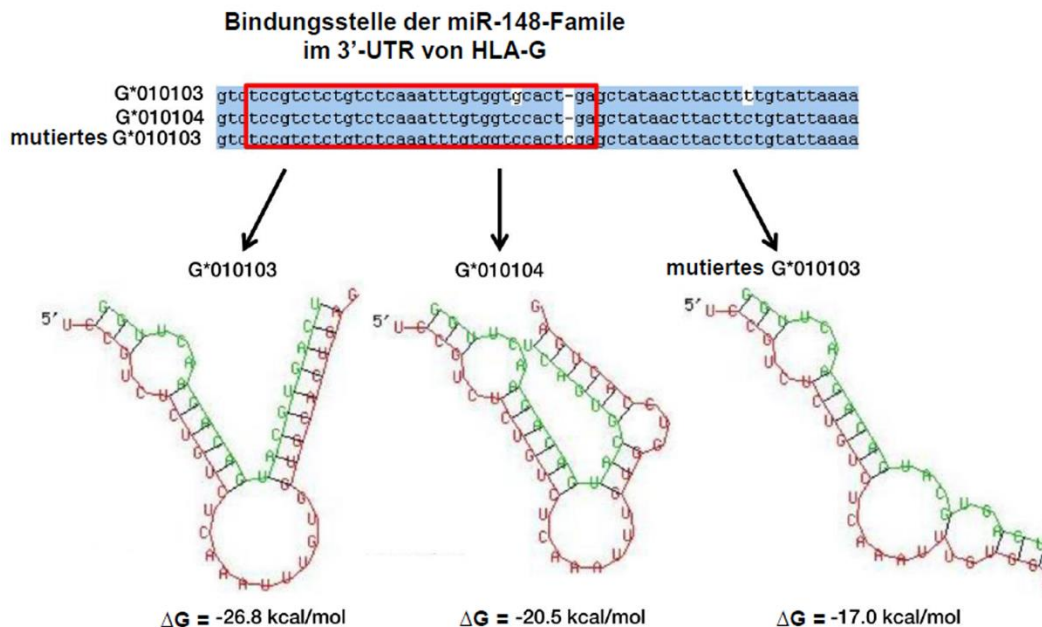


Abbildung 5.3. Vergleich der Sequenzen der verwendeten HLA-G-Luziferase-Reporter-Gen-Konstrukte

Ausschnitt des Sequenzabgleiches der HLA-G-3'-UTRs der beiden wildtypischen Allele G*010103 und G*010104, sowie des mutierten G*010103 Luziferase-Reporter-Gen-Konstruktes. Die miR-152-Bindungsstelle wurde farblich umrandet und die *in silico*-vorhergesagten Strukturen und deren freie Bindungsenergien (ΔG) wurden mit der Software RNAhybrid kalkuliert und visualisiert (rot –HLA-G-mRNA und grün-miR-152).

5.3. Die Reduktion des HLA-G-Proteins durch stabile miR-152-Überexpression in HLA-G⁺ JEG-3-Zellen

In der miR-152-defizienten Zelllinie JEG-3 wurde durch stabile Transfektion die miR-152 überexprimiert. Dadurch wird die Expression der miR-152 um drei Zehnerpotenzen gesteigert. Zusätzlich wurde die HLA-G-nicht relevante miR-541 als negativ-Kontrolle überexprimiert. Die Überexpression der miR-152 und der miR-541 hat keinen Einfluss auf die Expression der internen Kontroll-miR der miR-141 (Abbildung 5.4.A). Die Rekonstitution der miR-152-Expression in den miR-152-defizienten JEG-3-Zellen führt zu einer starken Reduktion der HLA-G-mRNA und zu einem kompletten Verlust des HLA-G-Proteins (Abbildung 5.4.B und C).

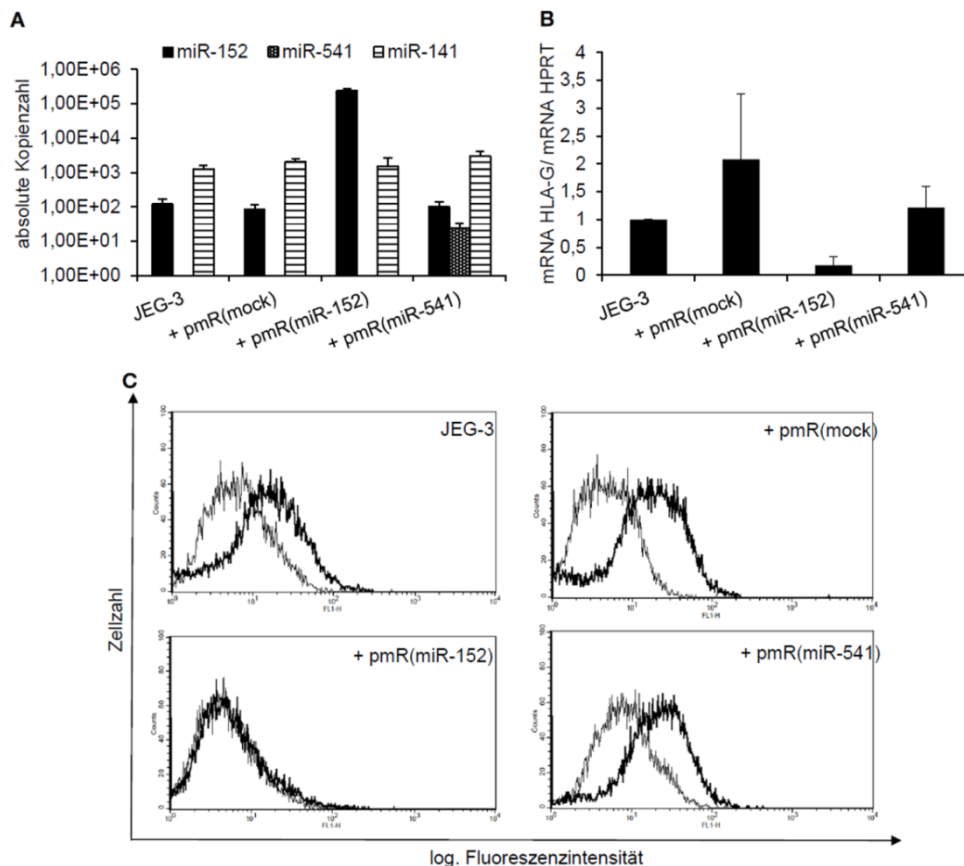


Abbildung 5.4. Rekonstitution der miR-152-Expression in miR-152-defizienten JEG-3-Zellen

A: Durch stabile Transfektion eines miR-152-Expressionsvektors in miR-152-defiziente JEG-3-Zellen kann die miR-152-Expression um drei Zehnerpotenzen verstärkt werden. B: Als Konsequenz wird die HLA-G-mRNA stark reduziert (qPCR) und die HLA-G-Translation vollständig unterdrückt. C: Das HLA-G-Protein ist nicht mehr detektierbar (Durchflusszytometrie); grau-Isotypkontrolle und schwarz-anti-HLA-G-Antikörper.

5.4. Die NK- und LAK-Zell-vermittelte HLA-G-abhängige Cytotoxizität

Die JEG-3-Zellen eignen sich nicht für *in vitro* Cytotoxizitäts-Experimente, wie den CD107a-Aktivierungs-Assay (Abbildung 5.5. A und B). Zwar wurde die positiv-Kontrolle (HEK293T-Zellen) sowohl von NK-Zellen, als auch von LAK-Zellen lysiert, nicht jedoch die JEG-3-Zellen. Deshalb ist ein HLA-G-abhängiges *in vitro*-Cytotoxizitäts-Experiment mit dem JEG-3-Transfektionssystem nicht möglich. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der Publikation Manaster et al., 2012⁽⁷⁷⁾. Darin wurde beschrieben, dass die JEG-3-Zellen für diese Experimente ungeeignet sind, da sie keine Liganden für die NK-Zellrezeptoren exprimieren. Folglich musste ein Zellsystem gewählt werden, welches möglichst keine anderen Oberflächenproteine exprimiert, die zusätzlich zum HLA-G in Interaktion mit Immuneffektorzellen treten könnten, aktivierend oder inhibierend. Diese Zellen sollten ebenfalls leicht zu transfizieren sein, um miR-Expressionsplasmide einbringen zu können. Daher wurde ein HLA-G-Überexpressionsplasmid kloniert und in murinen NIH/3T3-Zellen stabil transfiziert, sowie im

Anschluss die miR-Expressionsplasmide. Beide Transfektionen wurden stabil unter Verwendung von zwei verschiedenen Selektionsantibiotika durchgeführt. Zunächst wurden das HLA-G-Plasmid bzw. die respektive mock-Kontrolle und anschließend die miR-152 bzw. die dazugehörige mock-Kontrolle in murinen NIH/3T3-Zellen stabil transfiziert. Diese Transfektanden wurden hinsichtlich des HLA-G-Proteinstatus im Western Blot analysiert. Da der anti-HLA-G-Antikörper, MEM-G/9, nur den HLA-G-B2M-Komplex bindet, wurde für die Western Blot-Analyse der anti-HLA-G-Antikörper MEM-G/4 verwendet (Abbildung 5.5. E). Die HLA-G-Expression in den HLA-G⁺ NIH/3T3-Transfektanden ist deutlich stärker, als die der JEG-3-Zellen, welche als positiv-Kontrolle für die Western-Blot-Analyse dienen. Durch das Einbringen des miR-152-Expressionsplasmides in die HLA-G⁺ NIH/3T3-Transfektanden wird diese HLA-G-Proteinmenge komplett herunterreguliert.

Das Einbringen des HLA-G-Proteins in die NIH/3T3-Zellen führt zu einer verminderten Lyse dieser Zellen durch humane NK- und LAK-Zellen. Dieser Effekt wurde durch die zusätzliche Überexpression der miR-152 in diesen Zellen und den damit verbundenen Verlust des HLA-G-Proteins umgekehrt. Dieser Effekt ist bei den LAK-Zellen sogar statistisch signifikant (Abbildung 5.5. C und D).

In verschiedenen Publikationen wurden murine Zellen verwendet, um humane HLA-Moleküle zu studieren, wobei die zusätzliche Notwendigkeit von humanen B2M in murinen Zellen kontrovers diskutiert wird ^(168,169). Außerdem konnte in der Literatur gezeigt werden, dass HLA-G B2M-unabhängig in Form von Dimeren oder Trimeren auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden kann und in dieser Form ebenfalls inhibierend auf die NK-Zell-vermittelte Cytotoxizität wirkt ^(170,171).

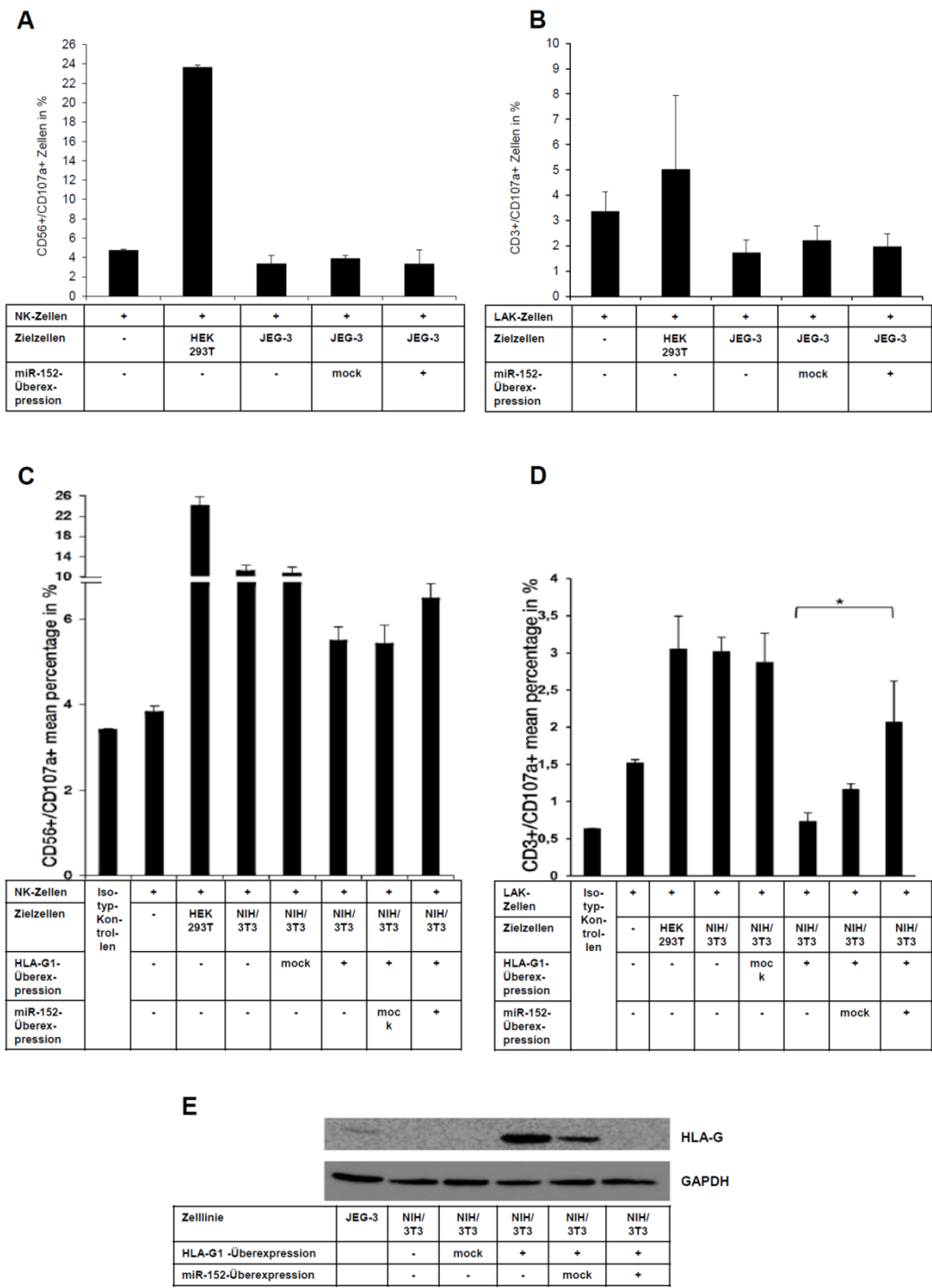


Abbildung 5.5. HLA-G-abhängige *in vitro* Cytotoxizitäts-Experimente

A und B: Aufgrund fehlender Expression von Liganden für NK-Zellrezeptoren in JEG-3-Zellen ist es nicht möglich ein HLA-G-abhängiges *in vitro* Cytotoxizitäts-Experiment mit diesen Zellen zu zeigen⁽⁷⁷⁾. Western Blot-Analyse der HLA-G-Expression nach stabiler Transfektion von HLA-G in murinen NIH/3T3-Zellen, zeigt stärkere HLA-G-Expression in den NIH/3T3-Transfektanten, als bei der positiv-Kontrolle den JEG-3-Zellen (E). HLA-G-abhängige Cytotoxizität vermittelt durch NK- und LAK-Zellen im NIH/3T3-Transfektionssystem (C und D).

5.5. Die Identifizierung neuer HLA-G-regulierender miRs mit der miTRAP-Methode

Basierend auf der erfolgreichen Anwendung der miTRAP zur spezifischen Anreicherung regulatorischer miRs der miR-148-Familie aus einem Zelllysats (4.11 und 5.2.) wurden die miTRAP-Eluate einer Aufreinigung mit dem HLA-G-3'-UTR und einer entsprechenden mock-Kontrolle unter der Verwendung des Zelllysats der MZ2905RC zu einem Kooperationspartner: Prof. Ena Wang (NIH, Bethesda, USA) geschickt und dort mit miR-*microarrays* analysiert. Dadurch konnten vier neue putativ-HLA-G-regulierende miRs identifiziert werden: miR-548q, miR-628-5p, miR-1263 und miR-3927.

Diese miRs, sowie die miRs der miR-148-Familie wurden mittels qPCR in den miTRAP-Eluaten validiert und die spezifische Anreicherung dieser miRs mit dem HLA-G-3'-UTR im Verhältnis zur mock-Kontrolle berechnet (Tabelle 5.1.).

Die miRs: miR-152, miR-148A und miR-148B wurden am stärksten angereichert, sodass diesen miRs wahrscheinlich eine Schlüsselrolle in der posttranskriptionalen Genregulation von HLA-G zukommt. Dagegen wurden die miRs: miR-548q und mir-628-5p deutlich schwächer angereichert. Für diese miRs kann über eine Rolle als Feinregulatoren spekuliert werden (analog zur miR-133A). Die miRs-1263 und miR-3927 wurden nicht angereichert und im Folgenden nicht weiter analysiert.

Tabelle 5.1. Validierung der miR-microarray-Daten mittels qPCR

miR	Anreicherungsfaktor der miRs mit dem HLA-G-3'-UTR im Verhältnis zur mock-Kontrolle
miR-141	keine Anreicherung
miR-152	822
miR-148A	114
miR-148B	36
miR-548q	5
miR-628-5p	7
miR-1263	keine Anreicherung
miR-3927	keine Anreicherung

Die Berechnung des Anreicherungs-faktors erfolgte analog zur Abbildung 5.2A; sehr starke Anreicherung der miR-152, miR-148A und miR-148B, eine deutlich schwächere Anreicherung der miR-548q und der miR-628-5p und keine Anreicherung (Quotient = 1) der miR-1263 und der miR-3927 bzw. der HLA-G-irrelevanten Kontrolle miR-141.

5.6. Die Expression der neu-identifizierten HLA-G-regulierenden miRs in ausgewählten NZK-Zelllinien

In den unter 5.1. charakterisierten NZK-Zelllinien wurde die Expression der neu-identifizierten HLA-G-regulierenden miRs untersucht. Während für die miR-548q keine Korrelation zum HLA-G-Protein nachgewiesen werden kann, wird die miR-628-5p in der HLA-G⁺ Choriokarzinomzelllinie JEG-3 um zwei Zehnerpotenzen vermindert exprimiert (im Vergleich zu den anderen Zelllinien). In den HLA-G⁺ MZ2733RC-Zellen konnte keine verminderte Expression von miR-548q oder miR-628-5p detektiert werden.

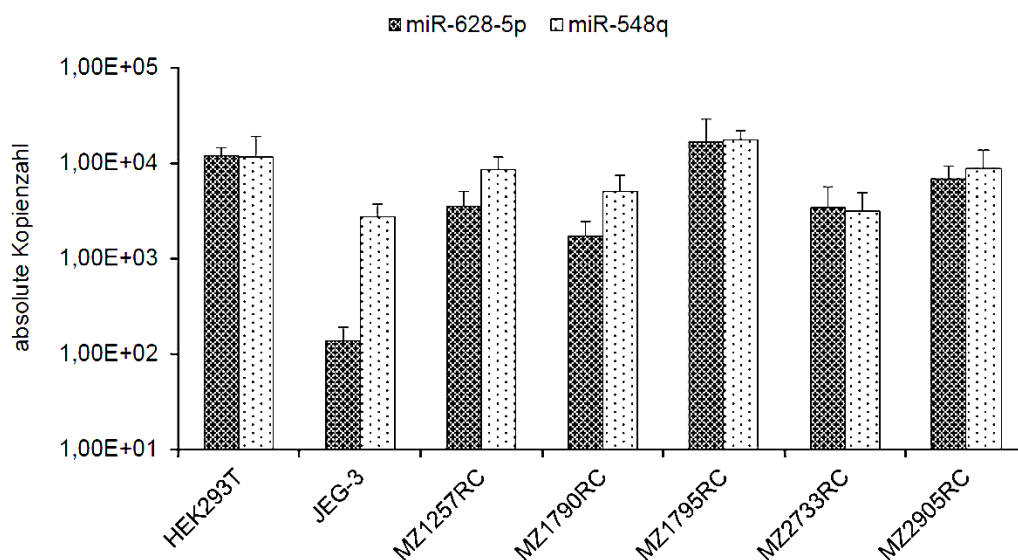


Abbildung 5.6. Charakterisierung der Expression von miR-548q und miR-628-5p in ausgewählten Zelllinien
Quantifizierung der Expression von miR-548q und miR-628-5p in dem unter 5.1. charakterisierten NZK-Zellsystem. Die miR-628-5p zeigt in der HLA-G⁺ Choriokarzinomzelllinie JEG-3 eine um zwei Zehnerpotenzen verminderte Expression.

5.7. Der Nachweis einer direkten Interaktion der neu-identifizierten HLA-G-regulierenden miRs mit der HLA-G-mRNA

Die *in silico*-präzidierten Bindungsstellen der miR-548q und miR-628-5p am HLA-G-3'-UTR und die kalkulierte freie Energie (ΔG) der jeweiligen miR-mRNA-Interaktion sind in Abbildung 5.7.A dargestellt. Beide miRs binden an der gleichen Position im HLA-G-3'-UTR. Im folgenden Luziferase-Reportergen-Assay konnte durch die Überexpression der miR-152 als positiv-Kontrolle, sowie durch die Überexpression der miR-548q und der miR-628-5p die Luziferase-Aktivität des Reportergens mit dem HLA-G-3'-UTR (G*010103) reduziert werden. Dies war statistisch signifikant für miR-152 und miR-548q. Als Kontroll-miR (negativ-Kontrolle) wurde die miR-541 überexprimiert, welche nicht am HLA-G-3'-UTR bindet (Abbildung 5.7. B und C).

Die gemeinsame Bindungsstelle der miR-548q und der miR-628-5p am HLA-G-3'-UTR des Reporter-gen-Konstruktes wurde deletiert. Die Bindung der miR-152 wird dadurch nicht beeinflusst, sodass die Luziferase-Aktivität des Reporter-gen-Konstruktes durch die miR-152 noch immer signifikant reduziert wurde. Das Deletieren der Bindungsstelle der miR-548q und der miR-628-5p im HLA-G-3'-UTR des Luziferase-Reporter-gen-Konstruktes führte dazu, dass die Luziferase-Aktivität nicht mehr durch die Überexpression der miR-548q und der miR-628-5p herunterreguliert werden kann. Tatsächlich zeigte sich eine Stabilisierung dieses Luziferase-Reporter-gen-Konstruktes (Abbildung 5.7. D). Alle Luziferase-Werte wurden auf die Kontroll-miR miR-541 normalisiert. Die Experimente erfolgten als transiente Transfektionen in HEK293T-Zellen.

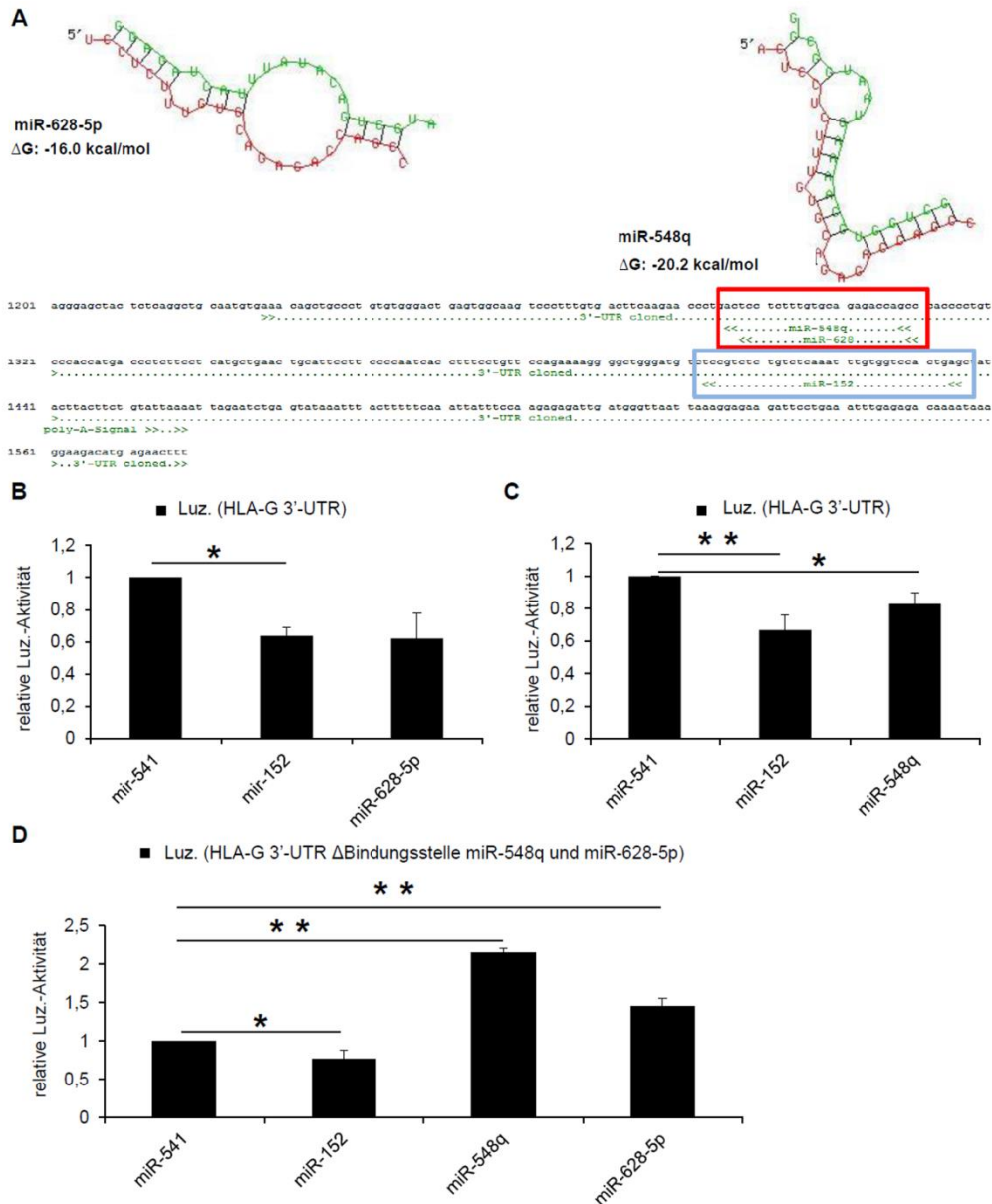


Abbildung 5.7. Charakterisierung der miR-548q und miR-628-5p Bindungsstellen am HLA-G 3'-UTR
A: Die *in silico* Analyse mit der Software RNAhybrid zeigt die Position der Bindungsstellen der miR-548q und miR-628-5p am HLA-G-3'-UTR. B und C: Die Überexpression von miR-548q und miR-628-5p reduziert die Luciferase-Aktivität des Reporter-gen-Konstruktes mit dem HLA-G-3'-UTR, wobei die miR-152 als positiv-Kontrolle verwendet wurde. D: Die Deletion der gemeinsamen Bindungsstelle von miR-548q und miR-628-5p am HLA-G-3'-UTR führt zur Stabilisierung dieses Konstruktes und verhindert die miR-548q und miR-628-5p vermittelte Reduktion der Luciferase-Reporter-gen-Aktivität. Die Bindung von miR-152 am HLA-G 3'-UTR ist davon nicht betroffen. B-D: Die Luciferase-Reporter-gen-Experimente erfolgten in HEK293T-Zellen. Die Überexpression der miR-541 dient als negativ-Kontrolle und zur Normalisierung.

5.8. Die Reduktion des HLA-G-Proteins durch stabile Überexpression von miR-548q und miR-628-5p in HLA-G⁺ JEG-3-Zellen

Die Überexpressionsvektoren für die miR-548q und miR-628-5p wurden in die HLA-G⁺ Zelllinie JEG-3 stabil transfiziert. Anschließend wurde analog zum Kapitel 5.3. die HLA-G-Expression mittels qPCR und Durchflusszytometrie analysiert.

Die Überexpression von miR-548q und miR-628-5p führt zur Reduktion von HLA-G-mRNA und – Protein (statistisch signifikant). Jedoch ist die Reduktion von HLA-G deutlich schwächer, als bei der Überexpression von miR-152, welche zum kompletten Verlust des HLA-G-Proteins führt. Der Effekt der HLA-G-Reduktion durch die jeweilige miR-Überexpression korreliert mit den *in silico* kalkulierten freien Energien (ΔG) und den Ergebnissen der miTRAP. Die Überexpression der Kontroll-miR miR-541 hat keine Auswirkung auf die HLA-G-Expression (Abbildung 5.8.).

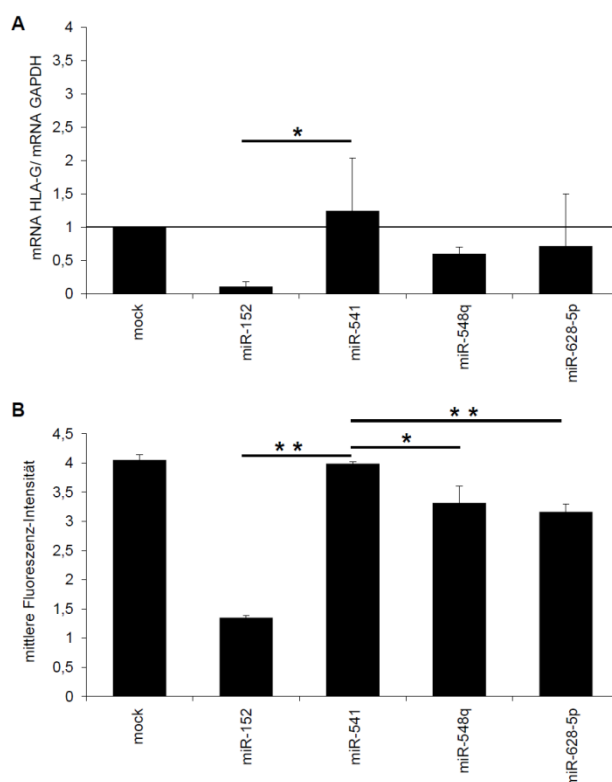


Abbildung 5.8. Stabile Überexpression der miR-548q und miR-628-5p in den HLA-G⁺ JEG-3-Zellen

A: Die stabile Transfektion der miR-548q und der miR-628-5p in HLA-G⁺ JEG-3-Zellen führt zur Reduktion der HLA-G-mRNA und des HLA-G-Proteins (signifikant). B: Der reduktive Effekt von miR-548q und miR-628-5p auf HLA-G ist signifikant, aber deutlich schwächer, als der von miR-152. A und B: Die Überexpression der Kontroll-miR miR-541 hat keinen Effekt auf HLA-G.

5.9. Die Analyse der *in vivo* Expression HLA-G-regulierender miRs in HLA-G⁺ und HLA-G⁻ NZK-Tumorgeweben

In Kooperation mit Prof. Arndt Hartmann und den Mitarbeitern des Institutes für Pathologie, der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg wurden aus Formalin-fixierten und

paraffinierten Gewebsschnitten von NZK-Läsionen sogenannte *Tissue microarrays* (TMA) erstellt.

Die klinischen Daten wurden freundlicherweise von den Urologen der Klinik für Urologie der Universität Erlangen-Nürnberg zur Verfügung gestellt. In der Tabelle 5.2. werden die Charakteristika der Patienten und Tumore zusammengefasst.

Tabelle 5.2. Zusammenfassung der Charakteristika der Patienten und der NZK-Tumoren der verwendeten *Tissue microarrays*

Geschlecht	weiblich	166/445 (37.3%)
	männlich	279/445 (62.7%)
Alter bei Diagnose (in Jahren)	Mittel	63,6
	Median	65
	Minimum	23
	Maximum	92
Altersgruppe	≤ 65	278 (53.3%)
	66+	244 (36.9%)
Status	Tumor-spezifischer Tod	35/380 (9.2%)
	Tod aus anderen Gründen	66/380 (17.4%)
	lebend bei letztem Kontakt	
	(zensiert)	279/380 (73.45%)
Zeit zum letzten Kontakt (in Monaten)	Minimum	0
	Maximum	160
	Mittel	44.7
	Median	36
NZK-Subtyp	klarzellig	345/440 (78.4%)
	papillär	49/440 (11.1%)
	chromophob	29/440 (6.6%)
	andere	17/440 (3.9%)

Diese TMA wurden immunhistochemisch bezüglich der HLA-G-Expression analysiert und durch die erfahrenen Pathologen, Prof. A. Hartmann und Frau Dr. V. Spath, ausgewertet. Die

Ergebnisse wurden zusammen mit wesentlichen klinischen Daten in der Tabelle 5.3. zusammengefasst.

Tabelle 5.3. Auflistung von 72, zur späteren miR-Quantifizierung ausgewählten, NZK-Gewebeschnitten (36 HLA-G⁻ und 36 HLA-G⁺)

Tumor- probe	HLA-G-Protein - IHC		NZK Subtyp	WHO Grading	Metastasen
	membranös	cytoplasmatisch			
I 1	-	-	chromophob	G2	n.d.
I 3	-	-	chromophob	G2	n.d.
I 5	-	-	klarzellig	G2	nein
I 6	-	-	klarzellig	G1	n.d.
I 7	-	-	klarzellig	G3	n.d.
I 9	-	-	chromophob	G2	n.d.
I 10	-	-	klarzellig	G2	n.d.
I 12	-	-	chromophob	G2	n.d.
I 14	-	-	klarzellig	G2	n.d.
I 26	-	-	chromophob	G2	n.d.
I 32	-	-	klarzellig	G2	n.d.
I 41	-	-	papillär/klarzellig	n.d.	n.d.
I 42	-	-	chromophob	G2	n.d.
I 51	-	-	klarzellig	G2	n.d.
I 56	-	-	klarzellig	G2	n.d.
I 59	-	-	papillär	G2	n.d.
II 2	-	-	klarzellig	G2	n.d.
II 5	-	-	klarzellig	G2	nein
V 13	-	-	klarzellig	G3	n.d.
V 15	-	-	klarzellig	G2	n.d.
V 19	-	-	chromophob	G2	n.d.
V 20	-	-	klarzellig	G3	ja
V 21	-	-	klarzellig	G2	n.d.
V 28	-	-	klarzellig	G2	n.d.
V 35	-	-	klarzellig	G3	n.d.
V 51	-	-	chromophob	G2	n.d.
V 54	-	-	klarzellig	G2	nein
VI 3	-	-	klarzellig	G2	nein
VI 5	-	-	klarzellig	G3	nein
VI 7	-	-	sarcomatös	G3	nein
VI 8	-	-	klarzellig	G2	nein
VI 9	-	-	klarzellig	G2	nein
VI 10	-	-	chromophob	G2	nein
VI 12	-	-	klarzellig	G2	nein
VI 13	-	-	klarzellig	G2	nein
VI 20	-	-	klarzellig	G3	nein
I 8	2(100)	2(80)	klarzellig	G3	n.d.
I 25	3(100)	2(80)	klarzellig	G2	n.d.
I 29	3(100)	2(100)	klarzellig	G2	n.d.
I 37	3(100)	2(90)	klarzellig	G2	n.d.
I 44	3(100)	3(100)	klarzellig	G3	n.d.
I 46	3(100)	-	papillär/klarzellig	G2	n.d.
II 4	3(100)	2(80)	n.n.bez.	n.d.	n.d.
II 10	3(100)	1(100)	klarzellig	G3	nein
II 39	3(100)	2(100)	klarzellig	G2	nein
II 58	3(80)	2(40)	klarzellig	G2	n.d.
III 2	3(100)	2(100)	klarzellig	G3	n.d.
III 11	3(80)	2(80)	klarzellig	G3	n.d.
III 20	3(100)	2(50)	klarzellig	G3	n.d.
III 31	3(100)	2(40)	klarzellig	G2	ja
III 33	3(90)	3(90)	klarzellig	G2	n.d.
III 36	3(90)	2(90)	klarzellig	G3	n.d.

III 39	3(90)	3(50)	klarzellig	G3	n.d.
III 45	3(100)	2(80)	klarzellig	G2	n.d.
IV 2	3(100)	3(100)	klarzellig	G3	ja
IV 10	3(100)	2(80)	klarzellig	G2	n.d.
V 16	3(100)	-	klarzellig	G1	n.d.
V 24	3(100)	2(50)	klarzellig	G2	n.d.
V 26	3(100)	1(100)	klarzellig	G2	n.d.
V 39	3(100)	3(100)	klarzellig	G2	n.d.
V 43	3(70)	-	klarzellig	G2	n.d.
V 55	3(100)	1(100)	klarzellig	G3	ja
V 56	3(100)	2(100)	klarzellig	G3	ja
VI 16	3(100)	2(100)	klarzellig	G3	ja
VI 23	3(80)	2(60)	klarzellig	G2	nein
VI 26	3(100)	2(100)	klarzellig	G2	nein
VI 46	3(100)	2(80)	klarzellig	G3	n.d.
VII 1	3(100)	2(100)	klarzellig	G2	ja
VII 21	3(100)	-	klarzellig	G1	n.d.
VIII 1	3(100)	-	klarzellig	G2	n.d.
VIII 24	3(100)	1(100)	papillär	G2	n.d.
VIII 27	3(100)	1(50)	klarzellig	G2	n.d.

Es wurde zwischen membranösem und cytoplasmatischem HLA-G unterschieden. Die Zahlen vor der Klammer geben die Intensität der HLA-G-Expression an, wobei 1 für schwache Expression, 2 für mittlere Expression und 3 für starke Expression steht. In den Klammern wird eine Prozentzahl angegeben, die beschreibt wieviel Prozent der Zellen des jeweiligen Gewebeschnittes HLA-G⁺ waren (*immunoreactive score*, IRS). Zusätzlich sind wichtige klinische Parameter, wie NZK-Subtyp, Geschlecht des Patienten, *Tumorgrading* (nach WHO-Klassifizierung) und Metastasenbildung zusammengefasst.

Als Beispiele für die immunhistochemischen HLA-G-Färbungen sind in der Abbildung 5.9. jeweils ein HLA-G⁻ (A) und ein HLA-G⁺ Tumor (B) dargestellt.

Das Ausmaß der Abweichung des Tumorgewebes von dem normalen Gewebe wird mit dem *Tumorgrading* beschrieben, wobei die Streuung des Tumors durch das *Tumorstaging* eingeteilt wird. Der Tabelle 5.3. ist zu entnehmen, dass das HLA-G-Protein mit höherem *Tumorgrading* korreliert, so waren 17% der 36 HLA-G⁻ Tumore Grad G3 und 37 % der 36 HLA-G⁺ Tumore Grad G3.

In dieser Studie wurden >440 NZK-Tumore immunhistochemisch auf HLA-G gefärbt. Dabei wurde zwischen membranständiger und cytoplasmatischer HLA-G-Expression unterschieden. Je nach Färbeintensität, welche mit der Quantität des HLA-G-Proteins korreliert, wurde die HLA-G-Expression eingeteilt in schwach (1), mittel (2) und stark (3). In der Tabelle 5.4. wird dargestellt, dass die HLA-G-Expression mit dem *Tumorgrading* korreliert. Die NZK-Läsionen mit der stärksten HLA-G-Expression haben den höchsten prozentualen Anteil an G3-befundeten Tumoren (statistische Auswertung aller n>440 NZK-Tumoren).

Tabelle 5.4. Korrelation der HLA-G-Expression mit dem *Tumorigradung* bei NZK-Tumoren

HLA-G Expression		WHO Grad G1 [%]	WHO Grad G2 [%]	WHO Grad G3 [%]
HLA-G membranös	HLA-G negativ	13.4	63.6	23.0
	HLA-G schwach	16.2	71.6	12.2
	HLA-G moderat	17.1	63.2	19.7
	HLA-G stark	10.6	56.1	33.3
HLA-G cytoplasmatisch	HLA-G negativ	17.5	62.3	20.1
	HLA-G schwach	8.6	69.1	22.2
	HLA-G moderat	6.2	70.8	23.1
	HLA-G stark	15.8	36.8	47.4

Je stärker die HLA-G Expression ist, desto höher ist der prozentuale Anteil an Tumoren mit *Tumorigradung* G3 (respektive Signifikanzberechnungen: HLA-G membranös $p = 0.415$ und HLA-G cytoplasmatisch $p = 0.009$).

Im nachfolgendem wurden aus 72 Tumoren, die in Tabelle 5.3. aufgeführt sind, miRs isoliert und quantifiziert. Dafür wurde die miR-Expression zwischen den 36 HLA-G⁻ und den 36 HLA-G⁺ Tumoren verglichen. Es wurden folgende miRs untersucht: miR-148A, miR-152, miR-548q und miR-628-5p (Abbildung 5.9.).

Die Expression der miR-148A und der miR-133A (Abbildung 5.9.C, E) korreliert invers mit der HLA-G-Expression in NZK-Tumoren. Dies bedeutet, dass HLA-G⁺ Tumore ein signifikantes Defizit in der miR-148A-Expression aufweisen, was ebenfalls für die getestete HLA-G⁺ NZK-Zelllinie MZ2733RC (Abbildung 5.1.) der Fall ist. Zwischen der Expression der miR-152 (Abbildung 5.9.D) und der HLA-G-Expression konnte keine unterschiedliche Expression beobachtet werden. Die miR-548q zeigt keinen Zusammenhang zur HLA-G-Expression (Abbildung 5.9.E). Im Gegensatz dazu ist die miR-628-5p in HLA-G⁺ Tumoren deutlich reduziert, jedoch nicht statistisch signifikant. Die miR-148B war in HLA-G⁺ und in HLA-G⁻ Tumoren kaum detektierbar.

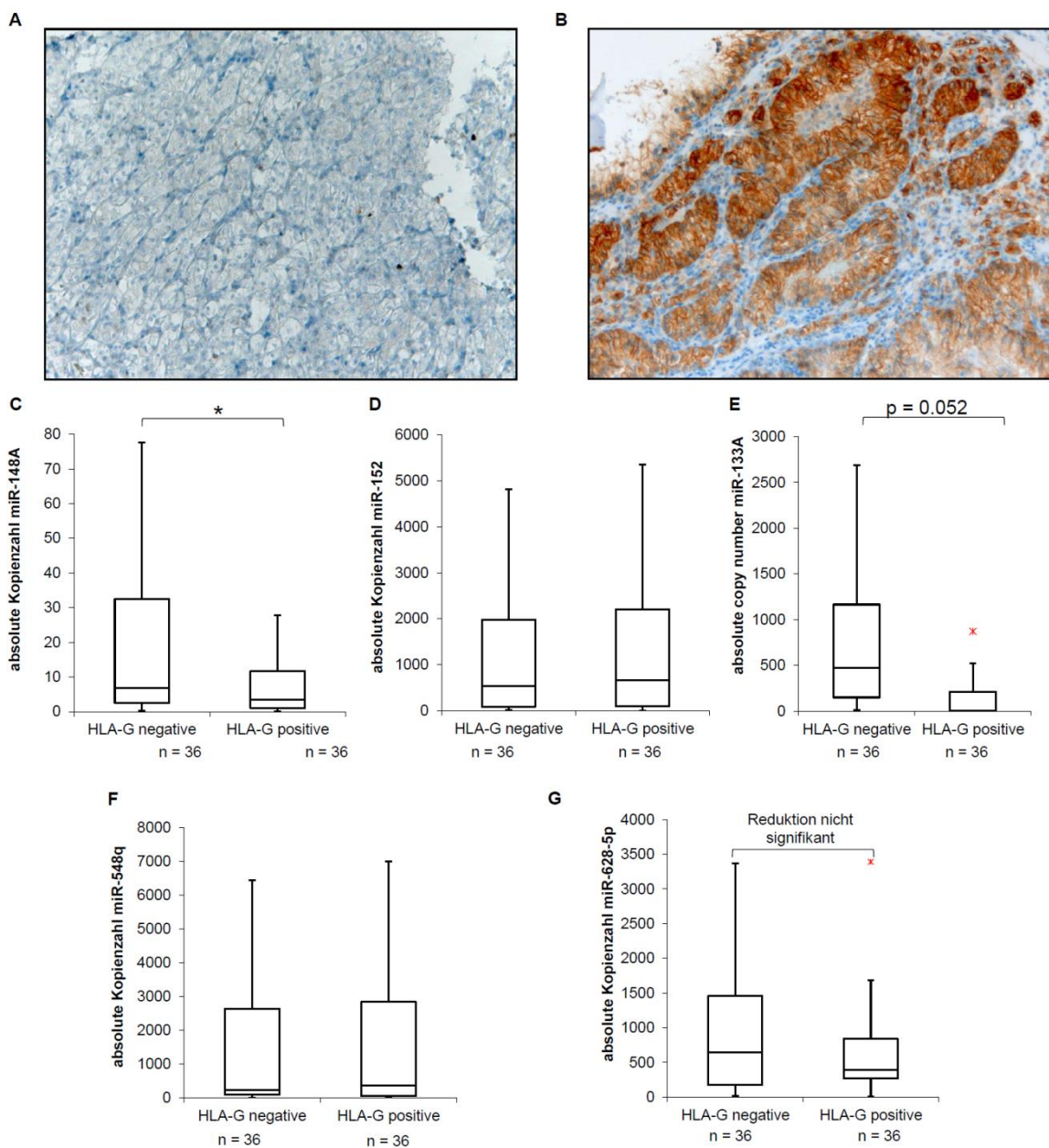


Abbildung 5.9. Vergleich der Expression der HLA-G-regulierenden miRs in ausgewählten NZK-Tumoren

A: HLA-G⁻ Tumor und B: HLA-G⁺ Tumor. C-G: In 36 HLA-G⁻ und 36 HLA-G⁺ Tumoren (siehe Tabelle 5.3.) wurden die HLA-G-relevanten miRs quantifiziert. C: miR-148A, D: miR-152, E: miR-133A, F: miR-548q und G: miR-628-5p. Für miR-148A, miR-133A und miR-628-5p zeigt sich eine diskordante Expression dieser miRs mit dem HLA-G-Protein. Die Reduktion dieser miRs in HLA-G⁺ Tumoren ist nur für miR-148A statistisch signifikant.

5.10. Die Korrelation der HLA-G-Expression mit der Immunzellinfiltration in HLA-G⁺ und HLA-G⁻ NZK-Tumorgeweben

Zusätzlich zur HLA-G-Expression wurde ebenfalls die Immunzellinfiltration in HLA-G⁺ und HLA-G⁻ NZK-Tumorproben immunhistochemisch analysiert.

Um Immunzellpopulationen voneinander abzugrenzen, ist es oftmals notwendig mehr, als nur einen Marker gleichzeitig anzufärben. Dies ist jedoch bei der Immunhistochemie nicht gegeben, sodass nur einzelne Marker angefärbt und anschließend ausgezählt werden konnten.

Interessanterweise gibt es in HLA-G⁺ Tumoren signifikant mehr CD3⁺-Zellen (Abbildung 5.10. A, B und E). Des Weiteren ist die Zahl der Tumor-infiltrierenden CD8⁺-Zellen ebenfalls signifikant erhöht (Abbildung 5.10. C, D und F). Die absoluten Zahlen in den jeweiligen NZK-Läsionen von CD3⁺- und CD8⁺-Zellen sind beinahe identisch.

Die Zahl der CD56⁺-Zellen und der CD4⁺-Zellen ist in HLA-G⁺ und HLA-G⁻ NZK-Tumoren gleich. Dies bedeutet, dass es keine HLA-G-relevanten Unterschiede in der Präsenz von NK-, NKT- und CD4⁺ T-Helferzellen gibt. Ebenfalls kaum detektierbar ist der Marker FoxP3, sodass CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen (T_{reg}) ebenfalls nicht unterschiedlich präsent sein können.

Im Gegensatz dazu gibt es signifikante Unterschiede in der Präsenz von CD3⁺CD8⁺ T-Killerzellen. Zur Beantwortung der Frage, ob diese signifikant erhöhte Anzahl der CD3⁺CD8⁺ Tumor-infiltrierenden T-Killerzellen ebenfalls mit einer erhöhten Aktivierung einhergeht, wurden die Aktivierungsmarker CD69 und CD25 immunhistochemisch gefärbt. Tatsächlich ist der Marker CD69 erhöht in den HLA-G⁺ NZK-Tumoren (Abbildung 5.10. I), jedoch nicht statistisch signifikant. Sowohl NK-, als auch T-Zellen können nach Aktivierung CD69 verstärkt auf der Zelloberfläche aufweisen. Der Marker CD25 ist in HLA-G⁺ und in HLA-G⁻ NZK-Proben kaum detektierbar.

Obwohl signifikant mehr CD3⁺CD8⁺ T-Killerzellen in den HLA-G⁺ NZK-Tumoren nachweisbar waren, ist der Aktivierungsmarker CD69 in der HLA-G⁺ Gruppe nur leicht erhöht, jedoch nicht statistisch signifikant. Ferner ist die HLA-G-Expression mit erhöhtem Tumorgrad verbunden.

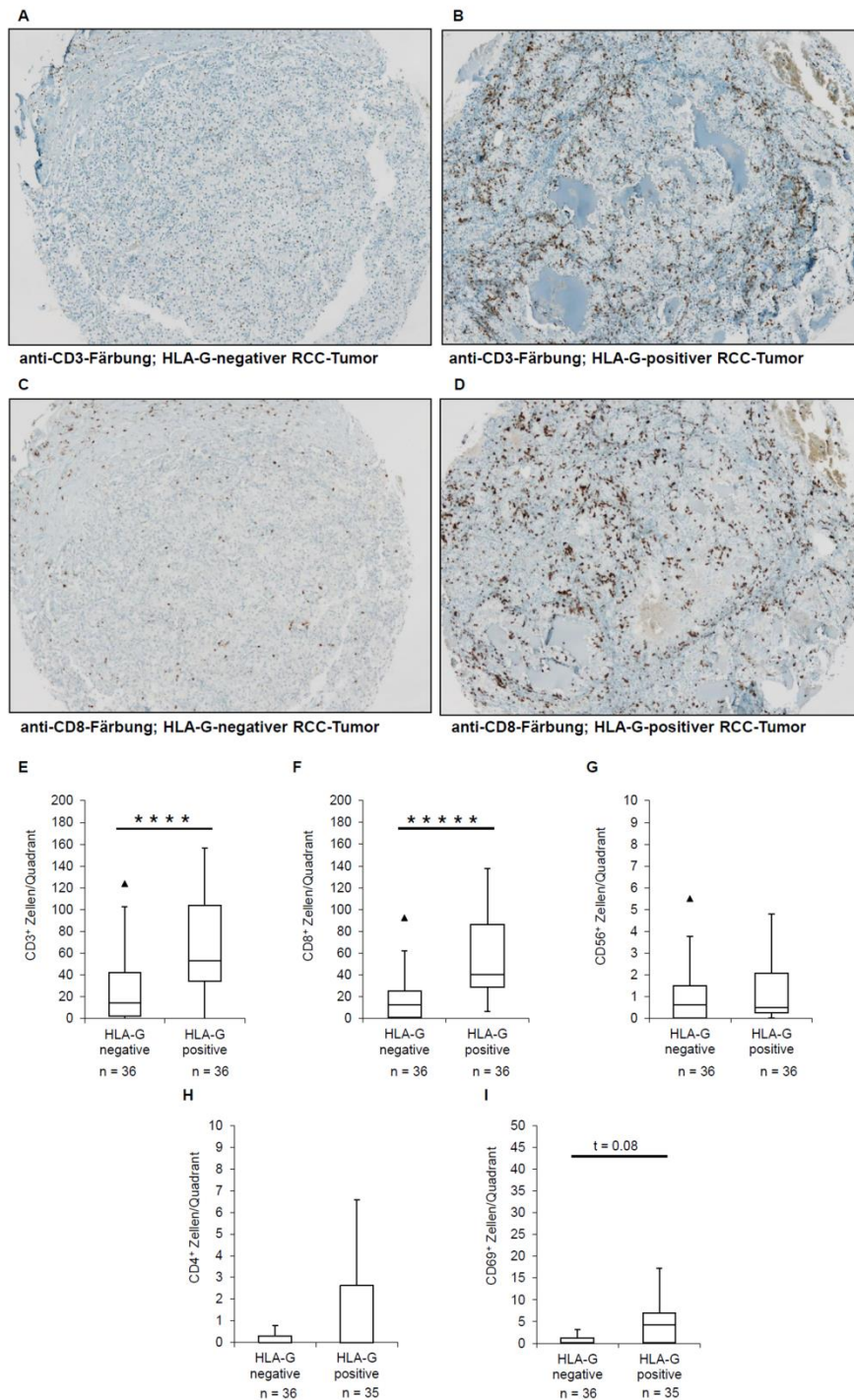


Abbildung 5.10. Korrelation der HLA-G-Expression mit der Immunzellinfiltration in NZK-Tumoren

Immunhistochemische Färbung von CD3 (A und B) und CD8 (C und D) in HLA-G⁻ und HLA-G⁺ NZK-Tumoren. Die angefärbten Zellen wurden gezählt und anschließend in HLA-G⁻ und in HLA-G⁺ Proben verglichen. Die Ergebnisse sind als Box-Whisker-Plots dargestellt. Sowohl CD3⁺-Zellen (E), als auch CD8⁺-Zellen (F) waren statistisch signifikant erhöht in HLA-G⁺ NZK-Tumoren. Die absoluten Zellzahlen schließen andere CD3⁺-Immunzellen allerdings weitestgehend aus. Tatsächlich konnte weder für CD56 (G), CD4 (H) oder FoxP3 (nicht abgebildet) eine entsprechende unterschiedliche Verteilung gefunden werden. CD4 und FoxP3 waren sogar kaum detektierbar. Aufgrund der signifikant erhöhten Präsenz von CD3⁺CD8⁺-T-Zellen in HLA-G⁺ NZK-Tumoren wurden auch die Aktivierungsmarker CD69 und CD25 analysiert. Zwar ist der Aktivierungsmarker CD69 in HLA-G⁺ NZK-Tumoren stärker präsent, allerdings nicht signifikant (I). CD25 hingegen kann sowohl in HLA-G⁺, als auch in HLA-G⁻ NZK-Tumoren kaum detektiert werden.

5.11. Die Auswirkung der HLA-G-Expression und der Immunzellinfiltration auf die klinischen Überlebensdaten der NZK-Patienten

Zur Beantwortung der Frage, ob HLA-G oder die Anwesenheit von bestimmten TILs in den NZK-Tumoren mit einem besseren oder schlechteren Überleben der Patienten assoziiert sind, wurden folgenden Marker mit den krankheitsspezifischen Überlebensdaten korreliert und die Ergebnisse als Kaplan-Meier-Plots visualisiert: HLA-G, CD3, CD8, CD56, CD4, FoxP3, CD69 und CD25 (Abbildung 5.11.). Es wurden ausschließlich krankheitsspezifische Todesfälle einbezogen, sodass die Kaplan-Meier-Kurven nicht die X-Achse schneiden.

Im Vergleich der HLA-G⁺ (membranständig) Tumore mit den HLA-G⁻ Tumoren zeigt sich, dass es keinen signifikanten Unterschied im Überleben gibt, was vermutlich an der generell schlechten Prognose und an der oftmals kurzen Überlebensrate von NZK-Patienten liegen könnte. Die Marker CD3, CD8, CD56 und CD69 zeigen ebenfalls keine klinische Relevanz.

Dagegen ist die Präsenz von CD4⁺ Zellen in NZKs fast signifikant ($p = 0,097$) mit einem besseren Überleben assoziiert. Da der Marker CD3 jedoch ohne jegliche Konsequenz für das Überleben ist, können bei den CD4⁺-TILs die CD3⁺CD4⁺ T-Helferzellen ausgeschlossen werden. CD4 findet sich auch auf der Oberfläche von Granulozyten und B-Zellen. Zur Beantwortung, welche CD4⁺CD3⁻ Immunzellen zu einem besseren Überleben von NZK-Patienten beitragen, sind weitere immunhistochemische Färbungen der NZK-TMAs notwendig.

Die Anwesenheit von FoxP3⁺ und CD25⁺ TILs war mit einem deutlich schlechteren Überleben verbunden, was vermutlich auf immunsuppressive CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T_{regs} zurückgeht, welche in nur sehr geringer Anzahl nachweisbar sind (Kapitel 5.10.).

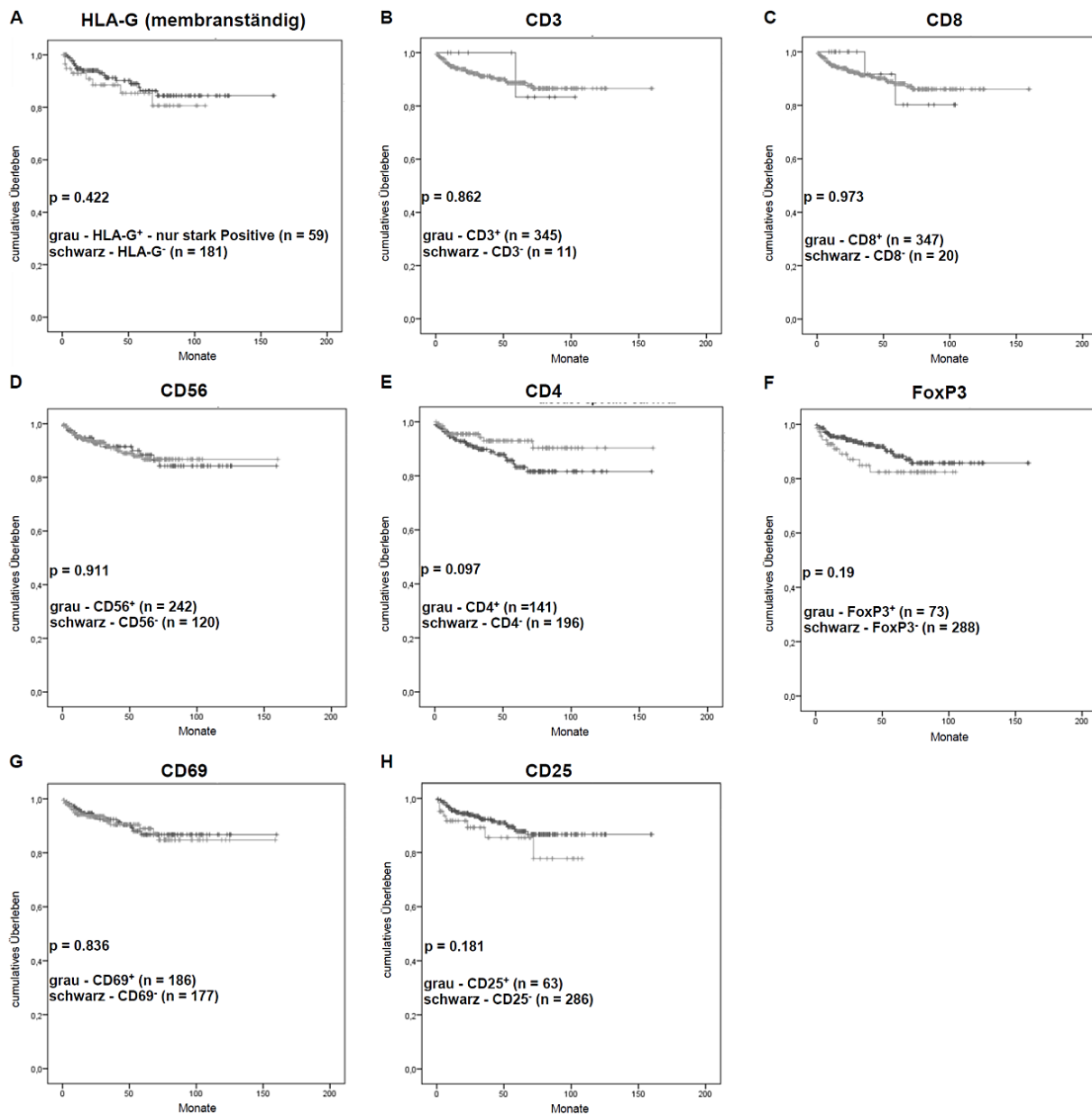


Abbildung 5.11. Korrelation zwischen der Präsenz von TILs und der HLA-G-Expression mit den krankheitsspezifischen Überlebensdaten von NZK-Patienten, visualisiert als Kaplan-Meier-Plots

A-D und G zeigen die Korrelation von HLA-G, CD3, CD8, CD56 und CD69 mit den krankheitsspezifischen Überlebensdaten von einer für den jeweiligen Marker negativen und positiven Patientengruppe. Für keinen dieser Marker konnte eine Korrelation mit den Überlebensdaten gezeigt werden. Die Präsenz von CD4-positiven Zellen in NZKs war fast signifikant ($p = 0,097$) mit einem besseren Überleben assoziiert (E). Die Anwesenheit von FoxP3-positiven und CD25-positiven Zellen war mit einem deutlich schlechteren Überleben verbunden (F und H). Es wurden ausschließlich die krankheitsspezifischen Todesfälle für die Berechnungen verwendet, daher können die Kaplan-Meier-Kurven *per se* nicht die X-Achse schneiden.

5.12. Die Identifizierung von miR-152-regulierten Genen durch Proteom-Analyse

miRs regulieren ihre jeweiligen Ziel-mRNAs unabhängig voneinander, können aber bei hinreichender Sequenzhomologie überlappende redundante Funktionen zeigen, insbesondere miRs einer miR-Familie ⁽¹⁷²⁾. Die miR-148-Familie reguliert u. a. HLA-G und HLA-C ^(77,173). Ferner konnte gezeigt werden, dass die miR-148-Familie Tumor-suppressiv wirkt ^(79,80,84). Daher sollte untersucht werden, welche anderen immunologisch und onkologisch relevanten Gene durch die miR-148-Familie reguliert werden können.

Die posttranskriptionale Genregulation durch miRs führt zur Inhibierung der Translation der Ziel-mRNA. Diese mRNAs müssen nicht zwangsläufig degradiert werden. Daher wurde auf Proteomebene, anstatt auf Transkriptomebene, nach weiteren Genen gesucht, die durch die miR-152 reguliert werden können.

Dafür wurde die miR-152 defiziente Zelllinie JEG-3 stabil mit dem miR-152-Expressionsvektor transfiziert, was zur ca. 1000-fachen Steigerung der miR-152-Expression führte (Abbildung 5.4A und 5.12.).

Die Proteine der zu untersuchenden Proben, wurden in erster Dimension nach ihrem Isoelektrischenpunkt durch Isoelektrischefokussierung und anschließend in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht im Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach der Identifizierung unterschiedlich-exprimierter Proteine wurden diese ausgeschnitten, tryptisch verdaut und in der Massenspektrometrie analysiert (Abbildung 4.4.).

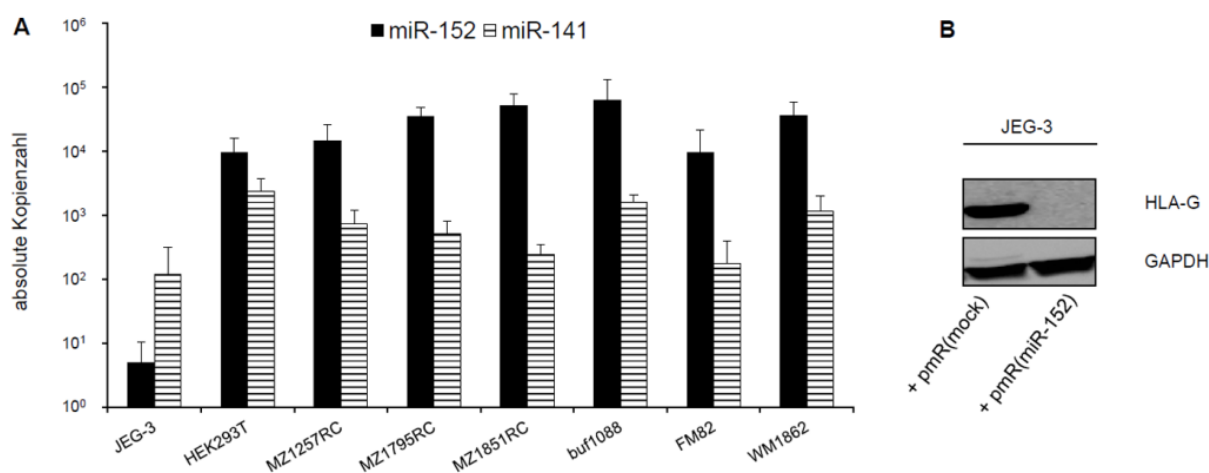


Abbildung 5.12. Nachweis der Funktionalität der miR-152-Überexpression

A: Die Zelllinie JEG-3 hat ein Defizit in der miR-152-Expression im Vergleich mit anderen Zelllinien (HEK293T, drei NZK-Zelllinien: MZ1257RC, MZ1795RC, MZ1851RC und drei Melanom-Zelllinien: buf1088, FM82 und WM1862). B: Die stabile Transfektion eines miR-152-Überexpressionsvektors führt zur Herunterregulation von HLA-G-Protein. Die Darstellung zeigt eine entsprechende Western-Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers MEM-G/1 gegen HLA-G).

Die Funktionalität der Überexpression von miR-152 wurde überprüft, indem das bereits in der Literatur beschriebene miR-152-Zielgen HLA-G durch Western-Blot-Analyse quantifiziert wurde. Tatsächlich wird HLA-G durch die miR-152-Überexpression vollständig herunterreguliert (Abbildung 5.12.B, siehe auch Abschnitt 5.3.).

Als Kontrolle, wurde die JEG-3-Transfektante verwendet, die mit dem respektiven mock-Vektor stabil transfiziert worden ist. Es wurde keine Kontroll-miR-Transfektante verwendet, wie z. B. die miR-541-Transfektante, weil diese eigene Ziel-Gene regulieren könnte - unabhängig zur miR-152.

Die Abbildung 5.13. zeigt beispielhaft zwei eingescannte präparative 2D-Polyacrylamidgele, wobei das eine Gel von der miR-152-Überexpressions- und das andere Gel von der mock-Kontrolle stammt. Mit Hilfe der *Software* Delta2D wurden diese beiden Gele aufeinander ausgerichtet und ausgewertet, sodass unter Verwendung der Massenspektrometrie unterschiedlich-exprimierte Proteine identifiziert werden konnten (Kapitel 4.13. und 4.14.).

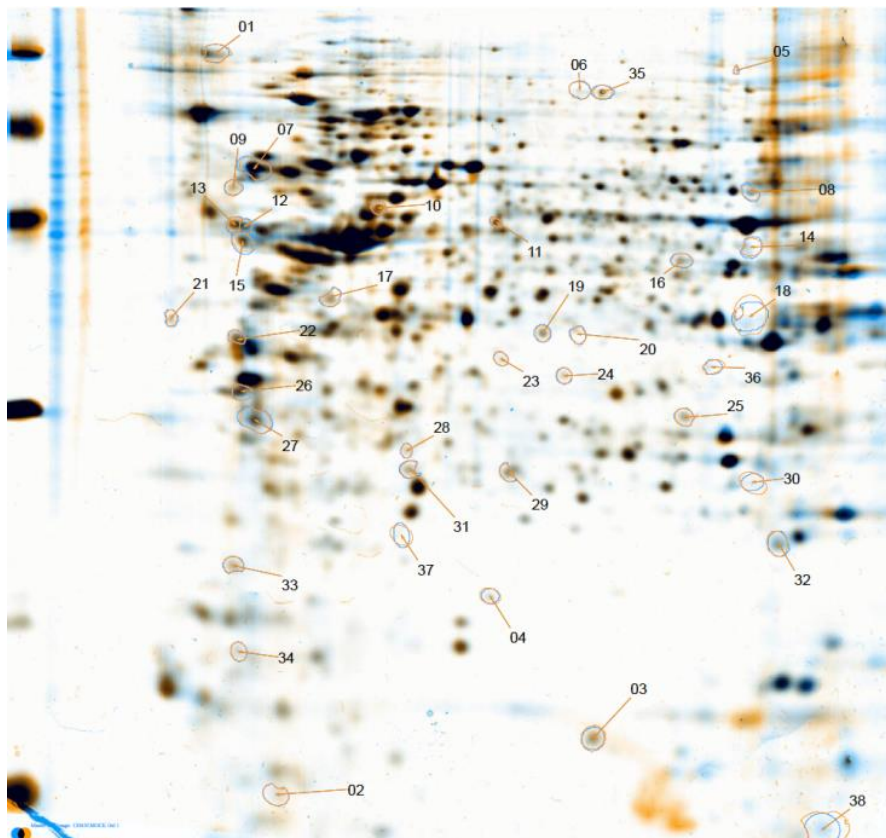


Abbildung 5.13. Visuelle Auswertung der 2D-Polyacrylamidgele

Beispielhafte Darstellung zweier präparativer 2D-Polyacrylamidgele nach dem Ausrichten und dem Auswerten mit der *Software* Delta2D. Die Proteinauftrennung wurde für die Transfektante JEG-3 + pmR(mock) und JEG-3 + pmR(miR-152) dargestellt. Die Auswertung mit der *Software* führte zur Identifizierung mehrerer differenziell exprimierter Proteine (Umrandung und Nummerierung dieser Proteinflecken).

Die Tabelle 5.5. fasst die 24 unterschiedlich regulierten Proteine zusammen, welche mit der Massenspektrometrie identifiziert werden konnten. Durch die miR-152-Überexpression wurden 14 Proteine herunterreguliert und 10 Proteine hochreguliert.

Mit diesen 24 Proteinen wurde unter Verwendung der GO-Annotationen ein *Annotation-Clustering* durchgeführt und die Ergebnisse als Kuchendiagramme dargestellt. Die Gruppierung erfolgte nach biologischen Prozessen, zellulärer Lokalisation und nach den molekularen Funktionen (Abbildung 5.14.).

Ein Großteil der regulierten Proteine sind am Metabolismus und an der Biogenese beteiligt. Da jedoch das anti-apoptotische Protein 14-3-3 β eine besondere Funktion bei der zellulären Proliferation und der onkogenen Transformation einnimmt ⁽¹⁷⁴⁾, sowie in verschiedenen humanen Tumoren häufig überexprimiert wird ⁽¹⁷⁵⁾, wurde bei den nachfolgenden Experimenten der Fokus auf das Protein 14-3-3 β gesetzt.

Tabelle 5.5. Zusammenfassung der 24 differentiell-regulierten Proteine nach miR-152-Überexpression in JEG 3-Zellen

Spotnr.	Gen-Symbol	Protein-accession-Nr.	Sequenzübereinstimmung (%)	Mascot-score	x-fache Veränderung
02	TXN	P10599	80	106	2,2
04	NME1	P15531	69	94	2,3
05	EEF2	P13639	31	151	13,2
06	EZR	P15311	34	172	2,3
07	HSP90B1	P14625	22	132	0,5
08	FSCN1	Q16658	48	176	2,0
10	KRT8	P05787	48	195	0,5
11	HSPD1	P10809	34	140	0,4
13	HSP90AA1	P07900	18	96	0,3
14	PAICS	P22234	28	93	2,5
16	ENO1	P06733	41	115	0,4
17	EIF2S1	P05198	35	105	0,3
18	ANXA2	P07355	36	102	2,7
19	PDIA6	Q15084	49	180	0,2
20	PSMD14	O00487	46	106	2,4
21	CALR	P27797	24	65	2,8
22	PCNA	P12004	68	145	0,4
24	TUFM	P49411	44	165	0,4
25	PDIA3	P30101	25	107	0,4
26	YWHAE	P62258	47	102	0,5
27	YWHAB	P31946	31	74	0,5
29	GRB2	P62993	36	63	0,4
30	C21orf33	P30042	45	90	2,4
31	KRT19	P08727	38	152	0,5

Durch die Überexpression von miR-152 in JEG-3-Zellen konnten 14 Proteine als hoch- und 10 Proteine als herunterreguliert identifiziert werden. Die x-fache Veränderung beschreibt den Quotienten mock/miR-152-Überexpression.

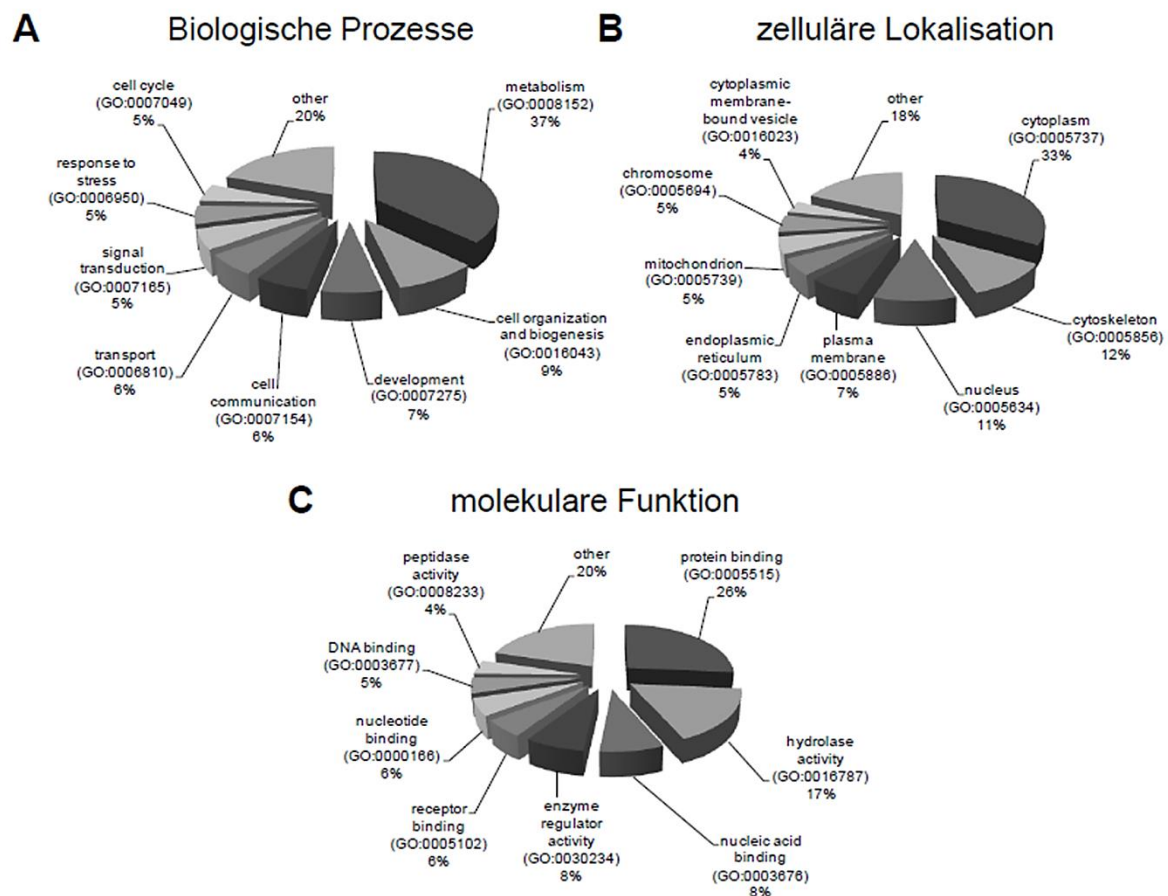


Abbildung 5.14. Annotation-Clustering der differentiell-exprimierten Gene

Darstellung des *Annotation-Clustering* unter Verwendung der GO-Annotationen für die 24 regulierten Proteine als Kuchendiagramme für A: Biologische Prozesse, B: zelluläre Lokalisation und C: molekulare Funktion.

5.13. Die Herunterregulation des Proteins 14-3-3 β durch miR-152-Überexpression

Die stabile Überexpression von miR-152 führt in JEG-3-Zellen und in der Melanom-Zelllinie buf1088 zur Herunterregulation der 14-3-3 β -mRNA und des 14-3-3 β -Proteins (Abbildung 5.15 A und B).

Western-Blot-Analysen in den drei NZK-Zelllinien MZ1257RC, MZ1795RC, MZ1851RC und in den drei Melanom-Zelllinien buf1088, FM82 und WM1862, sowie in HEK293T- und JEG-3-Zellen, zeigen eine heterogene Expression von 14-3-3 β . Besonders stark ist die Expression von 14-3-3 β in den HEK293T-Zellen und in der Zelllinie WM1862. Es kann keine Korrelation zwischen 14-3-3 β und der miR-152 in den verwendeten Zelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 5.12.A und 5.15.C). Jedoch können weitere regulatorische Mechanismen vorliegen, z.B. andere miRs, Mutationen oder Promotormethylierungen.

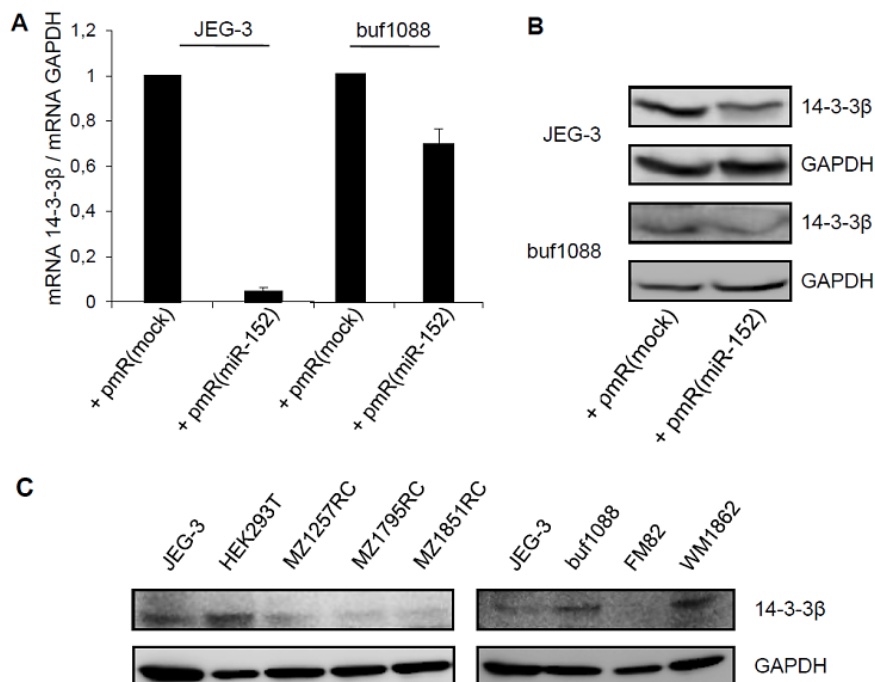


Abbildung 5.15. Validierung der miR-152-abhängigen Herunterregulation von 14-3-3β

Die stabile Überexpression von miR-152 in den Zelllinien JEG-3 und buf1088 führt zur Reduktion von 14-3-3β-mRNA und -Protein (A und B). Das Protein 14-3-3β wird in den verwendeten Tumorzelllinien verschiedenen Gewebsursprungs heterogen exprimiert. Eine Korrelation zwischen 14-3-3β-Protein und miR-152-Expression ist nicht detektierbar.

5.14. Der Nachweis der direkten Interaktion von miR-152 mit dem 14-3-3β-3'-UTR

Unter Verwendung der Internet-Datenbanken miRanda, miRDB, miRwalk, Targetscan und RNAhybrid^(148,151,159,176) wurden *in silico*-Analysen durchgeführt, die eine miR-152-Bindungsstelle im 3'-UTR der 14-3-3β-mRNA vorhersagen (Abbildung 5.16. D).

Für weiterführende Interaktionsanalysen wurde in Analogie zu 5.2. ein Teil des 14-3-3β-3'-UTRs, der die *in silico*-präzidierte miR-152-Bindungsstelle enthält, als 3'-UTR eines Luziferase-Reportergens kloniert (2414-3067 nt der 14-3-3β-mRNA-Sequenz).

In Kombination mit dem miR-152-Expressionsplasmid wird die Luziferase-Aktivität des 14-3-3β-Konstruktes signifikant herunterreguliert. Durch die Deletion der miR-152-Bindungsstelle (Δ) wird der reduktive Effekt der miR-152 aufgehoben. Die Überexpression der negativ-Kontrolle miR-541 und der mock-Vektor haben keinen Effekt auf die Luziferase-Aktivität des 14-3-3β-Konstruktes (Abbildung 5.16. A).

Der miR-152-Decoy-Vector stabilisiert die Luziferase-Aktivität des Luziferase-Reportergens mit dem 14-3-3β-3'-UTR (Abbildung 5.16. B).

Als Beweis einer direkten Interaktion zwischen miR-152 und dem 14-3-3β-3'-UTR wurden miTRAP-Experimente durchgeführt (Abschnitt 4.11.), dafür wurde der HLA-G-3'-UTR als positiv-

Kontrolle verwendet. Die Anreicherung der miR-152 ist mit dem 14-3-3 β -3'-UTR stärker, als mit der verwendeten positiv-Kontrolle dem HLA-G-3'-UTR. Unter der Verwendung einer Kontroll-RNA-Sequenz, erfolgte keine Anreicherung von miR-152 (< 10 Kopien). Die interne Kontrolle miR-141 ist in der *Input*-Kontrolle (äquivalentes Volumen an Zelllysate) enthalten, wird jedoch nicht angereichert (Abbildung 5.16. C).

Die Abbildung 5.16. D fasst schematisch die Interaktion zwischen miR-152 und dem 14-3-3 β -3'-UTR zusammen und zeigt die deletierte Sequenz der miR-152-Bindungsstelle im 14-3-3 β -3'-UTR.

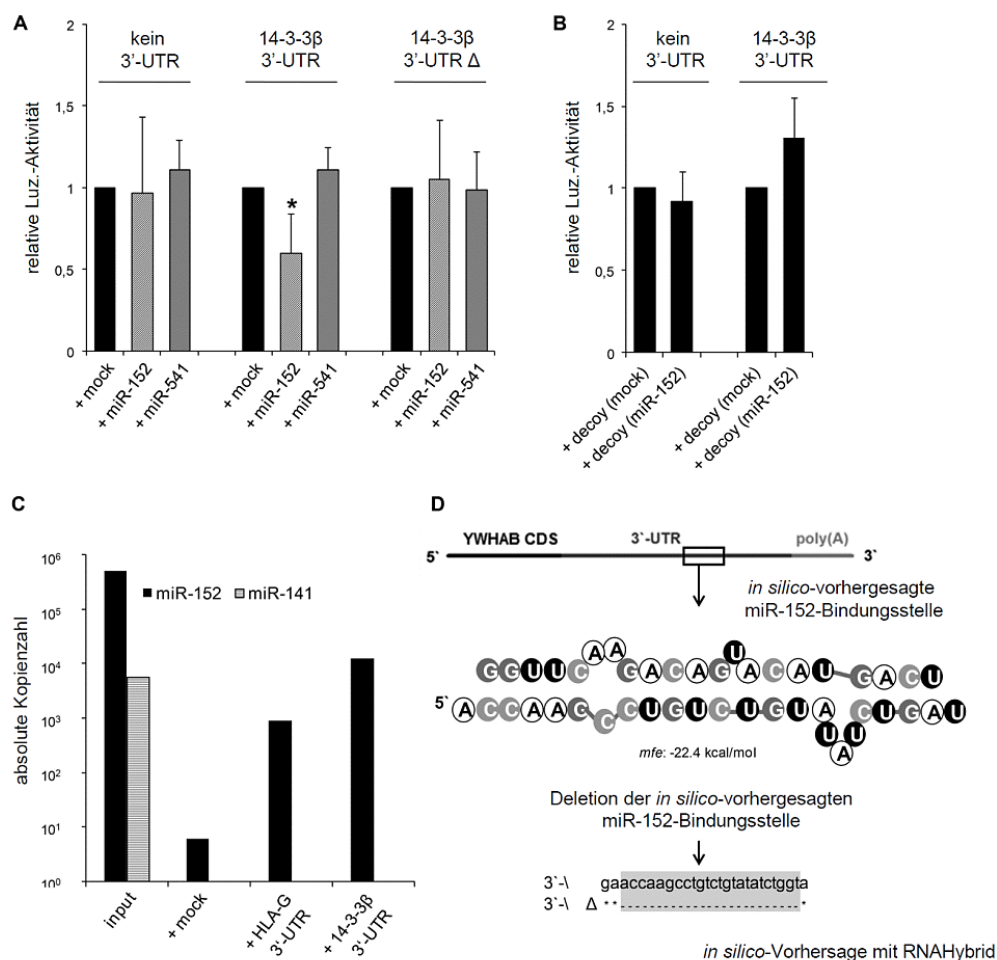


Abbildung 5.16. Nachweis der direkten Interaktion zwischen der miR-152 und dem 14-3-3 β -3'-UTR

A: Durch miR-152-Überexpression vermittelte Reduktion der Luciferase-Aktivität des Luciferase-Reportergenkonstruktes mit 14-3-3 β -3'-UTR. Die Deletion der miR-152-Bindungsstelle stabilisiert das Luciferase-Reportergenkonstrukt mit dem 14-3-3 β -3'-UTR Δ in Kombination mit der miR-152-Überexpression. Die mock- und die negativ-Kontrolle miR-541 haben keinen Einfluss auf 14-3-3 β . B: In der Kombination mit dem miR-152-Decoy wird das Luciferase-Reportergenkonstrukt mit dem 14-3-3 β -3'-UTR stabilisiert. C: Das miTRAP-Experiment zeigt die Anreicherung der miR-152 aus dem Zelllysate der NZK-Zelllinie MZ2905RC mit dem HLA-G-3'-UTR als positiv-Kontrolle und sogar stärker mit dem 14-3-3 β -3'-UTR. Die interne Kontrolle miR-141, präsent im Zelllysate (*Input*), kann weder mit dem HLA-G- noch mit dem 14-3-3 β -3'-UTR angereichert werden. D: Schematische Darstellung der direkten Interaktion zwischen miR-152 mit dem 14-3-3 β -3'-UTR, sowie der *in silico*-kalkulierten Bindungswärme dieser Interaktion und der Sequenz des Luciferase-Reportergenkonstruktes mit deletierter miR-152-Bindungsstelle im 14-3-3 β -3'-UTR (Δ).

5.15. Die funktionale Bedeutung der miR-152 und des 14-3-3 β -Proteins auf die Apoptoseregulation

In der Literatur wird dem Protein 14-3-3 β eine proliferative und anti-apoptotische Funktion zugeordnet. Ebenfalls konnte in klinischen Studien gezeigt werden, dass die Expression von 14-3-3 β mit verringerten Überlebensdaten von Tumorpatienten korreliert ^(175,177–180).

Für funktionelle Experimente wurde in den miR-152-überexprimierenden JEG-3-Zellen das Protein 14-3-3 β rekonstituiert, indem ein Vektor stabil in diese Zellen transfiziert wurde, der die 14-3-3 β -kodierende Sequenz (CDS) ohne 3'-UTR enthält. Die Überprüfung dieser Überexpression erfolgte durch qPCR- und Western-Blot-Analyse (Abbildung 5.17. A und B).

Die Überexpression von miR-152 wirkt Tumor-suppressiv ^(79,80,84) und reguliert u. a. das anti-apoptotische 14-3-3 β -Protein herunter. Als Konsequenz kann das pro-apoptotische BAX-Protein verstärkt detektiert werden, jedoch ohne einen Effekt auf die gespaltene Caspase 3. Zur Verstärkung der Apoptose erfolgte eine Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Paclitaxel [25 nM]. Dadurch kann in der Transfektante mit der 14-3-3 β -Rekonstitution eine verminderte Menge an BAX-Protein detektiert werden, im Vergleich zu den Transfektanden mit miR-152-mediiert Herunterregulation von 14-3-3 β . Aber dies ist ebenfalls ohne Effekt auf die gespaltenen Caspase 3 (Abbildung 5.17. C).

Die beiden Transfektanden mit dem größten Unterschied in der 14-3-3 β -Proteinmenge (JEG-3 + pmR(miR-152) + pExp(mock) [wenig 14-3-3 β -Protein] und JEG-3 + pmR(miR-152) + pExp(14-3-3 β) [stärkste 14-3-3 β -Proteinexpression]) zeigen bei der Behandlung mit steigender Paclitaxel-Konzentrationen [0–20 μ M] eine veränderte Viabilität. Durch Rekonstitution des anti-apoptotischen Proteins 14-3-3 β ist zwar kein signifikanter Unterschied bei den IC₅₀-Werten (3,2 \pm 0,5 nM) der Paclitaxelbehandlung zwischen den beiden Transfektanden erkennbar, jedoch kann in der Gegenwart von Paclitaxel die Viabilität von 52 \pm 3 % auf 62 \pm 3 % durch 14-3-3 β -Rekonstitution erhöht werden (Abbildung 5.17.D).

Die Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Paclitaxel ([25 nM]; 72 h) induziert im Vergleich zur DMSO-Kontrolle die Apoptose. Durch die Rekonstitution von 14-3-3 β kann die von Paclitaxel induzierte Apoptose vermieden werden (Abbildung 5.17. E).

Zur Beantwortung der Frage, welche anderen Apoptose-relevanten Gene durch die Rekonstitution des 14-3-3 β verstärkt exprimiert werden, wurde eine Auswahl an Apoptose-regulierenden Genen mittels qPCR analysiert. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden vorher die beiden Transfektanden (JEG-3 + pmR(miR-152) + pExp(mock) [kein 14-3-3 β -Protein] und JEG 3 + pmR(miR-152) + pExp(14-3-3 β) [stärkste 14-3-3 β -Proteinexpression]) durch Kultivierung mit FKS-reduziertem Medium (0,5 % V/V) für 48 h synchronisiert. Danach wurden die Zellen in regulärem Medium mit 10 % FKS (V/V) für weitere 48 h kultiviert.

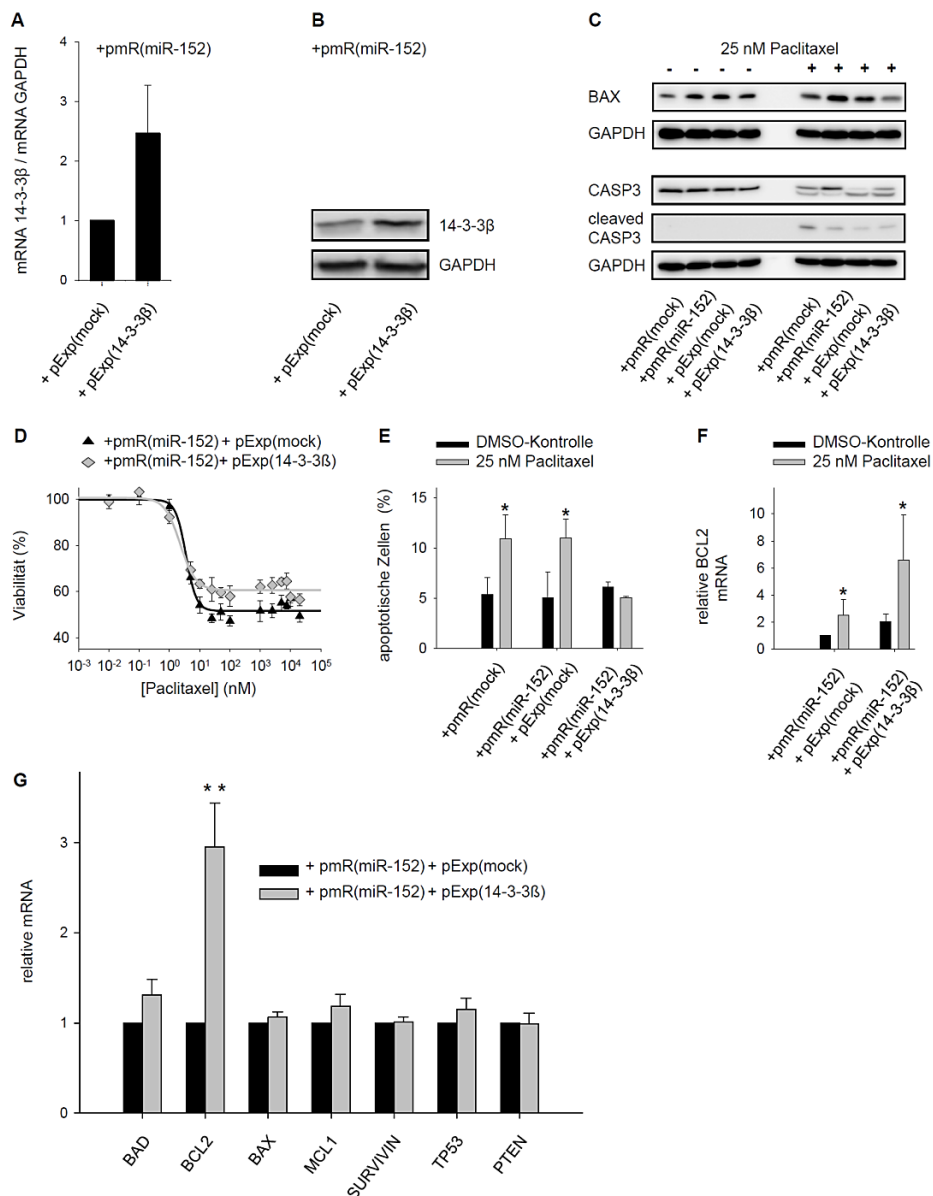


Abbildung 5.17. Rekonstitution der 14-3-3β-Expression in den 14-3-3β-defizienten JEG-3-Transfektanten mit miR-152-Überexpression durch stabile Transfektion eines 14-3-3β-Expressionsplasmides für funktionale Analysen

A: Validierung der 14-3-3β-Rekonstitution mit qPCR und B: mit Western-Blot. C: Western-Blot: Das pro-apoptotische Protein BAX wird durch miR-152-Überexpression induziert. Dies wird durch die 14-3-3β-Rekonstitution nicht beeinflusst. Jedoch ist kein Effekt bei der gespaltenen Caspase 3 sichtbar. Bei der Behandlung der Transfektanten mit 25 nM Paclitaxel bewirkt die Rekonstitution des anti-apoptotischen 14-3-3β eine verminderte Induktion des pro-apoptotischen BAX, jedoch erneut ohne Auswirkung auf die gespaltenen Caspase 3. D: XTT-Assay: Durch Rekonstitution des anti-apoptotischen 14-3-3β zeigen die Zellen eine höhere Viabilität unter Behandlung mit steigender Paclitaxel-Konzentration, als die Kontroll-Transfektanten mit herunterreguliertem 14-3-3β aufgrund der miR-152-Überexpression. Der IC₅₀-Wert zeigt keinen signifikanten Unterschied. E: Zur Analyse der Apoptoserate mit und ohne Paclitaxel ([25 nM]; 72h) wurden die Zellen nach der Behandlung mit Annexin V (FITC)- und 7AAD-gefärbt und in der Durchflusszytometrie analysiert. Durch die Rekonstitution des anti-apoptotischen Proteins 14-3-3β kann durch die Behandlung mit 25 nM Paclitaxel nach 72 h keine Apoptose induziert werden, im Gegensatz zu den anderen Transfektanten. Die Behandlung mit der DMSO-Kontrolle zeigt keinen Effekt auf die Apoptoseinduktion. F: qPCR: Aufgrund der 14-3-3β-Rekonstitution wird das ebenfalls anti-apoptotische Gen BCL2 verstärkt exprimiert (siehe auch Abbildung 5.17. G). Durch Behandlung mit 25 nM Paclitaxel wird das Gen BCL2 in der 14-3-3β-überexprimierenden Transfektanten sogar nochmals verstärkt exprimiert. G: qPCR: Die Analyse weiterer Apoptose-relevanter Gene zeigt, dass durch die Rekonstitution des anti-apoptotischen 14-3-3β nur das anti-apoptotische BCL2 signifikant hochreguliert wird. Abbildung verändert nach Jasinski-Bergner und Stehle et al., 2014⁽¹⁶³⁾.

In der Expression der ausgewählten Gene zeigt nur das anti-apoptotische BCL2 eine signifikant stärkere Expression in der Transfektante JEG-3 + pmR(miR-152) + pExp(14-3-3 β) [am meisten 14-3-3 β -Protein] (Abbildung 5.17.G). Die 14-3-3 β -vermittelte Induktion von BCL2 ist unter Behandlung mit 25 nM Paclitaxel sogar noch stärker (Abbildung 5.17. F).

Dies bedeutet, dass durch die Überexpression der Tumor-suppressiven miR-152 in den JEG-3-Zellen die Sensitivität für die Apoptose erhöht wird, durch Herunterregulation von dem anti-apoptotischen 14-3-3 β und durch Hochregulation von dem pro-apoptotischen BAX. Analog dazu erfolgt durch Rekonstitution des anti-apoptotischen 14-3-3 β -Proteins eine Hochregulation der Expression des anti-apoptotischen BCL2, was zu einer verminderten Apoptosesensitivität führt. Diese Beobachtungen werden durch die Ergebnisse der Apoptose- und Viabilitäts-Experimente bestätigt.

5.16. Die Funktion der miR-152 und des 14-3-3 β -Proteins beim Zellzyklus und bei der Proliferation

In der Literatur werden die miRs der miR-148-Familie als Tumor-suppressiv beschrieben, die u. a. anti-proliferativ wirken ^(82,84). Ebenfalls wird berichtet, dass das Protein 14-3-3 β proliferativ wirkt ⁽¹⁷⁵⁾.

Zur funktionellen Analyse der stabilen Überexpression von miR-152 und der damit verbundenen Herunterregulation von u. a. 14-3-3 β , sowie der Rekonstitution von 14-3-3 β wurden die JEG-3-Transfektanden hinsichtlich der Proliferation analysiert.

Zunächst wurden die Zellen der beiden Transfektanden mit dem größten Unterschied in der 14-3-3 β -Proteinmenge (JEG-3 + pmR(miR-152) + pExp(mock) [wenig 14-3-3 β -Protein] und JEG-3 + pmR(miR-152) + pExp(14-3-3 β) [am meisten 14-3-3 β -Protein]) mit dem Farbstoff CFSE markiert. Dieser wird mit jeder Zellteilung auf die beiden Tochterzellen verteilt, sodass mit fortwährender Proliferation die Intensität der Zellfärbung abnimmt. In Abbildung 5.18. A ist zu erkennen, dass 72 h nach der Färbung in Kombination mit Paclitaxelbehandlung [25 nM] die Transfektante mit 14-3-3 β -Rekonstitution deutlich besser proliferiert, als die 14-3-3 β -defiziente Transfektante (75 % statt 59 % der Zellen im *gate*). Dieser Effekt ist statistisch signifikant. Die Behandlung mit DMSO anstelle von 25 nM Paclitaxel zeigt jedoch, dass ohne das Apoptose-induzierende Chemotherapeutikum Paclitaxel keine unterschiedliche Proliferation messbar ist. Zur weiterführenden Analyse des Effektes von 14-3-3 β auf die Proliferation wurde bei den beiden Doppel-Transfektanden (JEG-3 + pmR(miR-152) + pExp(mock) [wenig 14-3-3 β -Protein] und JEG 3 + pmR(miR-152) + pExp(14-3-3 β) [viel 14-3-3 β -Protein]) eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Dafür wurden die Zellen zunächst für 48 h in Minimalmedium (0,5 % FKS [V/V]) zur Synchronisation des Zellzyklus kultiviert. Danach wurde das Minimalmedium gegen

Komplettmedium (10 % FKS [V/V]) ausgewechselt und nach weiteren 48 h erfolgte die Zellzyklusanalyse in der Durchflusszytometrie. Durch die Rekonstitution des Proteins 14-3-3 β erhöhte sich der prozentuale Anteil der Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle, was sich mit dem Befund der CFSE-Färbung deckt (Abbildung 5.18. B).

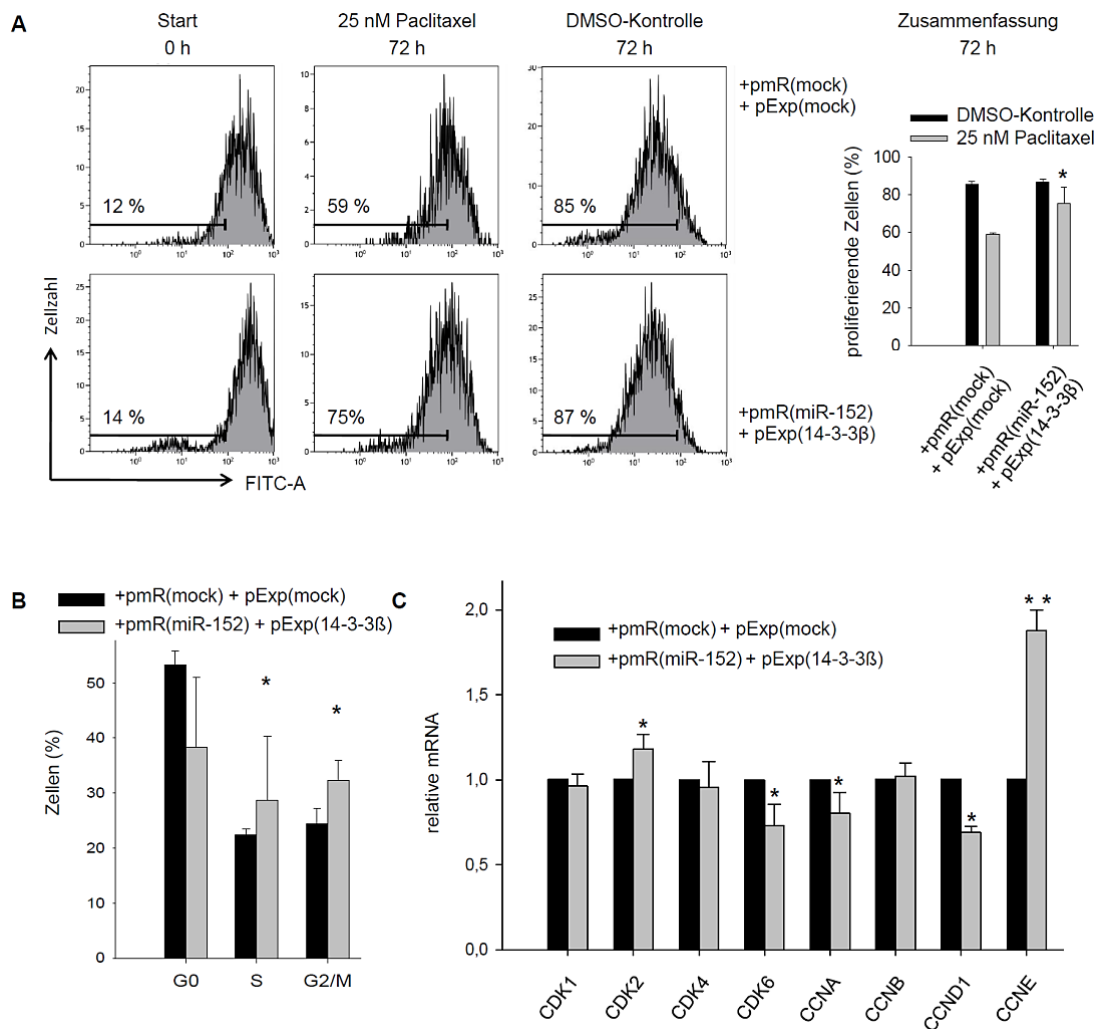


Abbildung 5.18. Einfluss von 14-3-3 β auf die Proliferation und die Zellzyklusregulation

A: Die Analyse der CFSE-Färbung der JEG-3-Transfektanden nach 72 h zeigt, dass durch Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Paclitaxel [25 nM] die Zellen in Abhängigkeit der 14-3-3 β -Proteinmenge proliferieren, geringerer prozentualer Anteil der Zellen im Gate von der Transfektande (JEG-3 + pmR(miR-152) + pExp(mock) [wenig 14-3-3 β -Protein] im Vergleich zur Transfektande JEG 3 + pmR(miR-152) + pExp(14-3-3 β) [am meisten 14-3-3 β -Protein]). B: Durch die 14-3-3 β -Rekonstitution ist der prozentuale Anteil der Zellen in der G2/M-Phase im Vergleich zur mock-Kontrolle (kein 14-3-3 β -Protein) signifikant größer. C: Die Analyse der Genexpression der Zykline und der Zyklin-abhängigen Kinasen mittels qPCR zeigt eine signifikante Hochregulation von CCNE und CDK2, die einen Komplex bilden, der den Übergang von der G1-zur S-Phase reguliert und die Zellteilung determiniert. B und C: Zur Analyse der Zellen erfolgte eine Synchronisation der Zellen für 48 h in Minimalmedium, danach wurden die Zellen für weitere 48 h in Komplettmedium kultiviert und analysiert.

In der Abbildung 6.2. ist der Verlauf des Zellzyklus mit seinen Phasen schematisch dargestellt. Der Eintritt der Zellen in die jeweilige Zellzyklusphase wird durch zwei Proteinklassen reguliert: die Cyclinen und die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK).

Zur weiterführenden Analyse wurden mittels qPCR die Expression der Cycline und Cyclin-abhängigen Kinasen untersucht. Für dieses Experiment wurden die Zellen analog zur vorhergehenden Zellzyklusanalyse synchronisiert.

Interessanterweise kann durch die 14-3-3 β -Rekonstitution eine signifikante Hochregulation von CCNE und CDK2 beobachtet werden (Abbildung 5.18.C). CCNE und CDK2 bilden einen Komplex, der den Übergang von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus reguliert. Dieser Übergang determiniert die Zellteilung.

Im Gegensatz dazu waren CDK6, CCNA und CCND1 signifikant herunterreguliert (Abbildung 5.18.C und Abbildung 6.2.)

5.17. Die Korrelation der Expression der miR-152-regulierten Zielgene HLA-G und 14-3-3 β mit den klinischen Überlebensdaten in verschiedenen humanen Tumorentitäten

Während die HLA-G-Expression einen Tumor ermöglicht einer Immunantwort zu entkommen, indem es die cytotoxische Aktivität von Immuneffektorzellen inhibiert, senkt die gleichzeitige Expression von 14-3-3 β die Sensitivität der Tumorzellen zur Apoptoseinduktion, z. B. bei der Behandlung mit Chemotherapeutika bzw. von Immuneffektorzellen vermittelt. Außerdem wirkt die erhöhte 14-3-3 β -Proteinmenge proliferativ.

Zur Beantwortung der Frage, ob die Expressionen der beiden miR-152-regulierten Gene HLA-G und 14-3-3 β in humanen Tumoren miteinander korrelieren bzw. eine klinische Relevanz zeigen, wurden die Überlebensdaten von Patienten verschiedener Tumorerkrankungen analysiert. Leider standen keine Daten von NZK- oder Melanom-Patienten bezüglich der 14-3-3 β -Expression zur Verfügung, sodass zur Beantwortung dieser Fragestellung die *in silico* Datenbank *R2: microarray analysis and visualization platform* (<http://r2.amc.nl>) verwendet wurde. Die Daten basieren auf cDNA-*microarrays* (Transkriptdaten) von *in vivo* Tumormaterial folgender Tumorentitäten Neuroblastom, Gliom, Lungenkarzinom und Osteosarkom. Die Patienten wurden bezüglich der Expressionsstärke von HLA-G und von 14-3-3 β , durch die *Software* selbst, in eine Gruppe mit niedriger und in eine Gruppe mit hoher Expression unterteilt. In allen vier untersuchten Tumorentitäten zeigt sich, dass alle Patienten mit höherer Expression von HLA-G und von 14-3-3 β eine schlechtere Prognose haben, als die Gruppe mit jeweils niedrigerer Expression. Des Weiteren zeigt sich, dass die Kaplan-Meier-Kurven der HLA-G-Gruppen und der 14-3-3 β -Gruppen zueinander sehr ähnlich verlaufen. Ebenfalls ist die Probengröße der Gruppen mit niedriger oder mit hoher Expression sowohl für HLA-G-, als auch

für die 14-3-3 β -Analyse zueinander ähnlich, außer beim Gliom (Abbildung 5.19.). Die Expressionen von HLA-G und von 14-3-3 β lassen eine Korrelation untereinander vermuten. Außerdem kann aus den Kaplan-Meier-Kurven geschlossen werden, dass beide Gene klinische Relevanz besitzen und die Expressionsstärke beider Gene einen potentiellen prognostischen Marker darstellen könnte, was für beide Gene unabhängig in verschiedenen klinischen Studien angedeutet wurde (102,103,175,179,180).

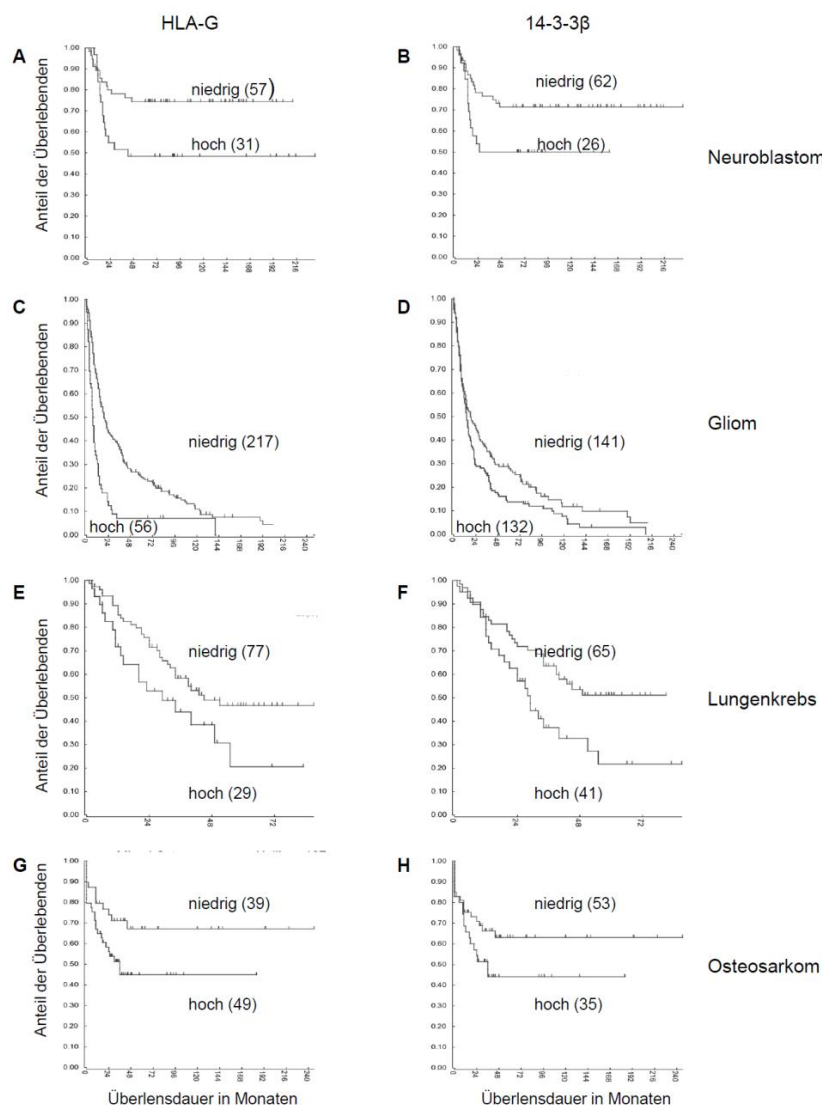


Abbildung 5.19. Kaplan-Meier-Kurven von cDNA-microarray-Daten (Transkriptdaten) aus Tumorzellen (*in vivo*) bezüglich der Korrelation der HLA-G- und der 14-3-3 β -Expression mit den Überlebensdaten der Patienten verschiedener Tumorentitäten

A und B: Neuroblastom, C und D: Gliom, E und F: Lungenkrebs und G und H: Osteosarkom. Dafür wurde die *in silico* Datenbank R2: *microarray analysis and visualization platform* (<http://r2.amc.nl>) verwendet. Die Darstellung erfolgt als Kaplan-Meier-Kurven. Es zeigt sich, dass die Expression von HLA-G und die Expression von 14-3-3 β sehr ähnlich mit dem Überleben der Patienten korrelieren. Ferner ist erkennbar, dass die Einteilung der Tumorzellen als hoch- oder niedrig-exprimierend, was durch die Software automatisch erfolgte, ebenfalls in eine jeweils ähnlich große Anzahl an Proben resultiert, mit der Ausnahme des Glioms. Beide Beobachtungen lassen eine gemeinsame Regulation der beiden miR-152-Zielgene HLA-G und 14-3-3 β vermuten. Außerdem ist die Stärke der Expression von HLA-G und von 14-3-3 β mit einer deutlich schlechteren Prognose für die Patienten verbunden.

6. Diskussion

6.1. Die miR-vermittelte posttranskriptionale Genregulation von HLA-G

Die pathologische HLA-G-Expression kann mit hoher Frequenz im Nierenzellkarzinom detektiert werden. Sie ist gekennzeichnet von einer diskordanten Expression zwischen HLA-G-mRNA und korrespondierendem Protein ^(62,181).

Tatsächlich wurden parallel und unabhängig von dieser Studie HLA-G-regulierende miRs identifiziert. Für die miR-148-Familie (miR-148A, miR-148B und miR-152) konnte eine Interaktion mit der HLA-G-mRNA gezeigt werden, was zur Herunterregulation des HLA-G-Proteins führte. Dies war in *in vitro*-Experimenten mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber der von NK-Zellen vermittelten Cytotoxizität verbunden ^(77,78,141). Zusätzlich wurde die miR-133A als HLA-G-regulierend beschrieben, wobei miR-133A-Überexpression das HLA-G-Protein vermindert, nicht jedoch die HLA-G-mRNA ⁽⁷⁶⁾.

Diese Arbeit untersucht die posttranskriptionale Genregulation von HLA-G und deren klinischer Relevanz im Nierenzellkarzinom. Dazu wurden zunächst verschiedene NZK-Zelllinien, die Choriokarzinomzelllinie JEG-3 (als positiv-Kontrolle) und die HEK293T-Zellen hinsichtlich ihrer HLA-G-Expression charakterisiert. Danach wurden in diesen Zellen die HLA-G-relevanten miRs quantifiziert und mit der HLA-G-Expression korreliert. Tatsächlich weisen die Zelllinien mit HLA-G-Protein Defizite in der Expression der miRs der miR-148-Familie auf. In der Choriokarzinomzelllinie JEG-3 wird die miR-152 um drei Zehnerpotenzen vermindert exprimiert, als in den anderen analysierten Tumorzelllinien. Die HLA-G-Protein⁺ NZK-Zelllinie MZ2733RC weist hingegen eine Reduktion in der Expression der miR-148A um zwei Zehnerpotenzen auf. In Vertebraten werden miRs Gewebe-spezifisch exprimiert und können in pathophysiologischen Situationen, z. B. bei Tumorerkrankungen, veränderte Expressionsprofile aufweisen ⁽¹⁸²⁾. Außerdem konnte gezeigt werden, dass verschiedene Cytokine, wie u.a. Interferon- γ oder TGF- β und bestimmte Substanzen, wie das demethylierende DAC (5-Aza-2'-desoxycytidin) oder der Histon-Deacetylasen-Inhibitor TSA (Trichostatin A) die Expression einzelner miRs beeinflussen können ^(183–185).

Im Folgenden wurde die Interaktion von HLA-G und der miR-148-Familie weitergehend untersucht. Durch Rekonstitution der miR-152-Expression in den JEG-3-Zellen wurden das HLA-G-Protein komplett und die –mRNA sehr stark herunterreguliert. Die Analyse der miR-152-Bindungsstelle am HLA-G-3'-UTR erfolgte u. a. durch die Verwendung von Luziferase-Reporter-Experimenten.

Die miR-152 bindet an den HLA-G-3'-UTR Allel-spezifisch. Diese Allel-Spezifität zwischen der miR-152 und den beiden HLA-G-Allelen G*010103 und G*010104 wird durch einen C/G-

Polymorphismus an der Stelle +3142 nt des HLA-G-Gens bewirkt, direkt in der miR-152-Bindungsstelle. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der *in silico*-berechneten Bindungswärmen der miR-152 mit den 3'-UTRs der beiden HLA-G-Allelen. Ebenfalls bestätigen diese Daten die Ergebnisse der Publikation von Tan et al., 2007⁽¹⁴¹⁾. Jedoch konnten Manaster et al., 2012⁽⁷⁷⁾ die Beobachtung der Allel-Spezifität der miR-152 nicht beobachten. Zusätzliche Analysen in Kombination mit anderen HLA-G-Allelen könnten diese Kontroverse weiterführend untersuchen. Aktuelle Publikationen berichten zunehmend über Allel-spezifische miRs^(186; 187; 188; 189).

Dieses Ergebnis wird durch die Mutagenese der miR-152-Bindungsstelle am HLA-G-3'-UTR bekräftigt. Das Einführen eines zusätzlichen Cytosins in der miR-152-Bindungsstelle führte zur signifikanten Stabilisierung jenes Luziferase-Konstruktes (Abbildung 5.3.). In der Literatur werden sogar Krankheits-assoziierte SNPs und miRs beschrieben. Mishra et al. 2007,⁽¹⁹⁰⁾ untersuchen einen SNP, der nur in der Nähe der betreffenden miR-Bindungsstelle gelegen ist, aber dennoch die Interaktion der miR mit ihrer Ziel-mRNA negativ beeinflusst. Es ist sehr wahrscheinlich, dass in bestimmten Fällen SNPs die Bindung von miRs an ihre Ziel-mRNAs beeinflussen können⁽¹⁹¹⁾.

Eine direkte Interaktion der miRs der miR-148-Familie mit dem HLA-G-3'-UTR konnte neben den Luziferase-Reporter-Gen-Experimenten, u. a. in Kombination mit der miR-152-Blockierung und mit dem miTRAP-Experiment demonstriert werden. Dabei wurden die miR-152, die miR-148A und die miR-148B spezifisch aus einem Zelllysate mit dem HLA-G-3'-UTR angereichert. Ferner wurden die miTRAP-Eluate verwendet, um zusätzliche HLA-G-regulierende miRs zu identifizieren. Dafür wurden in Kooperation mit Prof. E. Wang miR-*microarrays* durchgeführt, welche zur Identifizierung von miR-548q und miR-628-5p als neue HLA-G-regulierende miRs führten. Bei der Verwendung von miR-*microarrays* zur Identifizierung neuer HLA-G-regulierender miRs aus den miTRAP-Eluaten wirken die vorhandenen Sonden auf dem *microarray* limitierend, da andere miRs nicht detektiert werden können. Zur Vermeidung dieses Effektes wäre eine Analyse der miTRAP-Eluate mit *Next-Generation-Sequencing* denkbar.

Die Validierung der miR-*microarray*-Daten in den miTRAP-Eluaten durch qPCR zeigte für die einzelnen miRs einen jeweils spezifischen Anreicherungsfaktor (Tabelle 5.1.). Dabei wurden die miRs der miR-148-Familie mit dem HLA-G-3'-UTR deutlich stärker angereichert, als die miR-548q oder die miR-628-5p. Am schwächsten wurde die miR-133A angereichert. Ebenfalls konnten sowohl die stabile Überexpression der HLA-G-regulierenden miRs in HLA-G⁺ JEG-3-Zellen, als auch die Luziferase-Reporter-Gen-Experimente zeigen, dass die miR-152 das HLA-G-Protein deutlich stärker herunterreguliert, als die miR-548q oder die miR-628-5p, was ebenfalls durch die *in silico* ermittelten freien Energien (ΔG) der miR-mRNA-Interaktionen bestätigt wird.

Der Fakt, dass die Überexpression der miR-152 das HLA-G-Protein vollständig herunterreguliert, während die miR-548q und die miR-628-5p nur eine teilweise Reduktion des HLA-G-Proteins bewirken, führt zur Postulierung, dass die HLA-G-regulierenden miRs sich unterteilen lassen in Schlüssel-Regulatoren (*key regulators*) und Fein-Regulatoren (*fine tuners*). Eine Beobachtung, die für einen möglichen therapeutischen Einsatz dieser miRs gegen die HLA-G-Expression in humanen Tumoren brücksichtigt werden sollte.

Tatsächlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in *in vivo* NZK-Tumorproben die Expression von miR-148A und von miR-628-5p in HLA-G⁺ NZK-Tumoren zum Teil signifikant verringert ist im Vergleich zu HLA-G⁻ NZK-Tumoren.

Die Abbildung 6.1. soll zusätzlich den Balanceakt der Regulation von aktivierenden und inhibierenden Immunzellrezeptor-Liganden verdeutlichen. Insbesondere die Beteiligung und Bedeutung von miRs soll hervorgehoben werden, welche oft in Tumorerkrankungen disreguliert sind und in Abhängigkeit ihrer Zielgene u.U. eine Tumor-suppressive oder onkogene Funktion ausüben können.

Zusätzlich soll erwähnt werden, dass die posttranskriptionale Genregulation von HLA-G über miRs durch sogenanntes 3'-UTR *shortening* (Verkürzung des 3'-UTR) beeinflusst werden könnte. Mayr und Bartel 2009 ⁽⁷³⁾ berichten, dass durch die Verwendung alternativer Polyadenylierungsstellen (*poly(A) sites*) kürzere 3'-UTRs entstehen können, was Auswirkungen auf regulatorische miRs haben kann. Neben dem kanonischen Polyadenylierungssignal: AAUAAA existieren noch die folgende Varianten: AUUAAA, AAGAAA, UAUAAA, AGUAAA. Tatsächlich zeigt eine *in silico*-Analyse des nur 383 nt langen 3'-UTR von HLA-G, dass vier putative Polyadenylierungsstellen vorhanden sind. Hier könnten weiterführende Experimente untersuchen, ob dieser Effekt tatsächlich bei der posttranskriptionalen Genregulation von HLA-G auftritt.

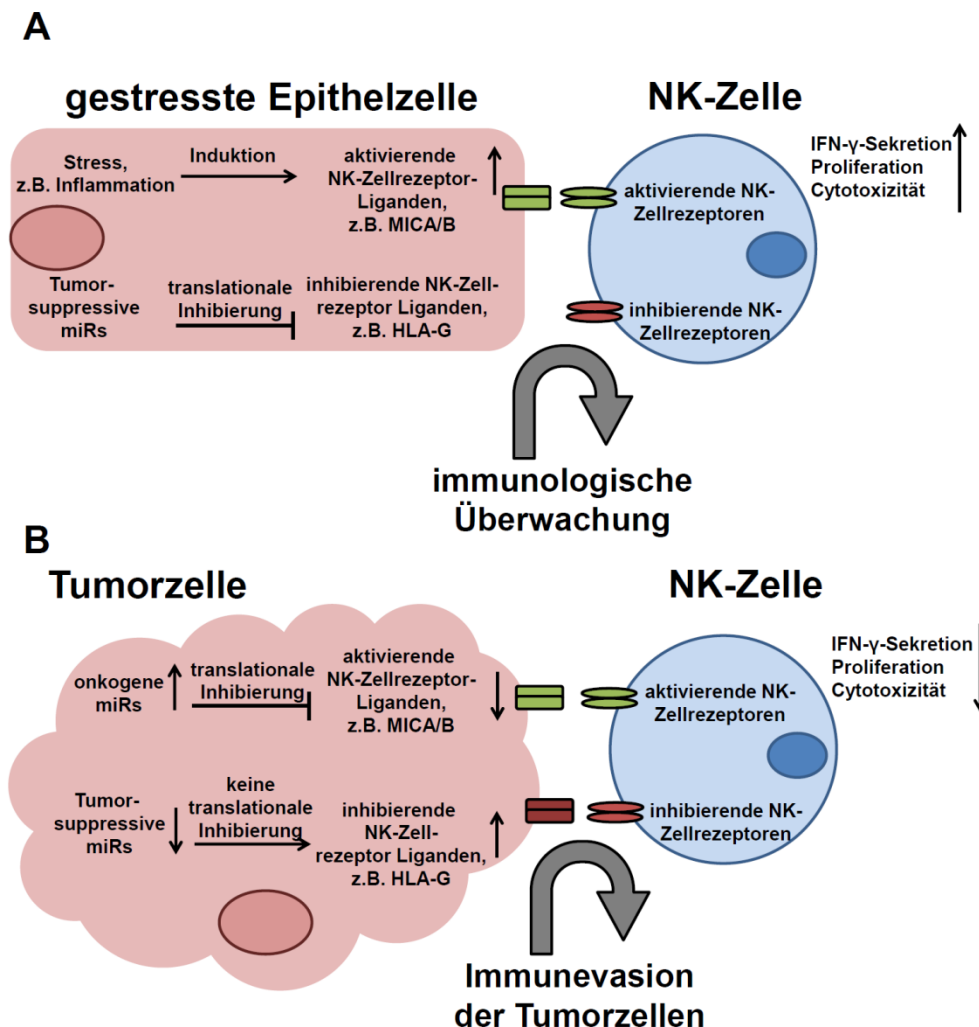


Abbildung 6.1. Schematische Darstellung der posttranskriptionalen Genregulation von aktivierenden und inhibierenden Immunzellrezeptor-Liganden auf Zielzellen im Kontext mit NK-Zellen

A: eine gesunde und gestresste Epithelzelle und B: eine Tumorzelle (modifiziert nach Jasinski-Bergner et al., 2014; ¹⁶)

6.2. Der Einfluss der HLA-G-Expression auf die Immunzellinfiltration und auf die Immunreaktion im Nierenzellkarzinom

In vorhergehenden Studien konnte gezeigt werden, dass die HLA-G-Expression mit hoher Frequenz in verschiedenen humanen Tumoren detektiert werden kann, u. a. im Nierenzellkarzinom ^(58,152,192). Die Expression von HLA-G in Tumoren wird mit einem fortgeschrittenen Krankheitsbild und mit einer schlechteren Prognose für die Patienten assoziiert ^(193; 102; 194; 195).

HLA-G bindet an die inhibierende Oberflächenrezeptoren ILT2, ILT4 und KIR2DL4 (Tabelle 6.1.), die unterschiedlich auf NK-, Antigen-präsentierenden und T-Zellen gefunden werden können. Carossella et al., 2005 ⁽⁵⁰⁾ berichten, dass diese inhibitorischen Rezeptoren durch

HLA-G auf NK-, Antigen-präsentierenden- und T-Zellen hochreguliert werden, was das inhibitorische Potential von HLA-G verstärken würde.

Table 6.1. Zusammenfassung aller bekannten aktivierenden und inhibierenden NK-Zellrezeptoren und ihrer Liganden, sowie deren jeweilige chromosomale Lokalisierung

	NK-Zell-Rezeptor	chromosomale Lokalisierung	Ligand(en)	chromosomale Lokalisierung
aktivierende NK-Zell-Rezeptoren	NKp30	6p21	B7H6	11p15
	NKp44	6p21	virales	-
	NKp46	19q13	Hemagglutinin	-
	NKp80	12p13	AICL	12p13-p12
	NKR2B4	1q23	CD48	1q21-q22
	NKG2D	12p13-p12	MICA	6p21
			MICB	6p21
			ULBP1	6q25
			ULBP2	6q25
			ULBP3	6q25
			ULBP4	6q25
			ULBP5	6q24-q25
			ULBP6	6q25
	LETAL	6q25		
	CD16	1q23	IgGs	14q32
	DNAM-1	18q22	CD112	19q13
NTB-A (auf NK-Zellen)	1q23	NTB-A (auf CD4+ T-Zellen)	1q23	
CRACC	1q23-24	unbekannt	-	
NKG2C/CD94	12p13/12p13	HLA-E	6p21	
NKG2E/CD94	12p13/12p13			
aktivierende KIRs	19q13	weitesgehend unbekannt	-	
Inhibierende NK-Zell-Rezeptoren	NKG2A/CD94	12p13/12p13	HLA-E	6p21
	NKG2B/CD94	12p13/12p13		
	ILT2	19q13	HLA-G	6p21
	ILT4	19q13		
	KIR2DL4	19q13		
	KIR2DL1	19q13	HLA-C	6p21
	KIR2DL2	19q13		
	KIR2DL3	19q13		

modifiziert nach Jasinski-Bergner et al., 2014 ⁽¹⁶⁾

In dieser Arbeit wurden murine NIH/3T3-Zellen stabil mit einem HLA-G-Überexpressionsvektor transfiziert. HLA-G kann auch als beta-2-Mikroglobulin-freies Protein zur Zelloberfläche gelangen, als Homodimer oder Homotrimer ^(170,171). Das Fehlen von humanem beta-2-Mikroglobulin verhinderte nicht die inhibitorische Wirkung von HLA-G. Diese HLA-G-

Überexpression führte in den *in vitro* Experimenten zur verminderten NK-Zell- und LAK-Zell-vermittelten Cytotoxizität. Dieser Effekt konnte durch die zusätzliche stabile Überexpression und die damit verbundene HLA-G-Reduktion rückgängig gemacht werden. Die humane miR-152 und die murine miR-152 besitzen die gleiche Sequenz. In anderen Publikation wurden ebenfalls in murinen NIH/3T3-Zellen humane miRs überexprimiert, z.B. bei Jioa et al., 2010 ⁽¹⁹⁶⁾.

In den *in vivo* NZK-Tumorproben ist eine Korrelation zwischen der Stärke der HLA-G-Expression und der pathologischen Einteilung des Tumorgades entsprechend den Kriterien der WHO (2004) zu erkennen. Je stärker die HLA-G-Expression ist, desto höher ist der prozentuale Anteil der Proben mit weiter fortgeschrittener Dedifferenzierung des Tumorgewebes (höhere Einstufung des Tumorgades). Die Einteilung des Tumorgades wiederum korreliert mit der Prognose für die Patienten.

In der Analyse der krankheitsspezifischen Todesfälle kann bei den untersuchten Proben jedoch kein signifikanter Unterschied bezüglich der Überlebensdaten zwischen NZK-Patienten mit starker HLA-G-Expression und mit Patienten ohne HLA-G-Expression beobachtet werden. Dieser Befund kann die oftmals deutlichen Effekte anderer klinischer Studien zwischen der HLA-G-Expression und verminderten Überlebensdaten nicht bestätigen. So zeigen Tuncel et al., 2013 ⁽¹⁹⁷⁾, dass bei Patienten mit Magenkarzinom die HLA-G-Expression einen nachteiligen Effekt auf das Überleben hat. Jedoch können Li et al., 2009 ⁽¹⁹²⁾ ebenfalls keinen Effekt zwischen der HLA-G-Expression und klinischer Parameter in 109 NZK-Tumoren demonstrieren. Möglicherweise spielt die Tumorentität ebenfalls eine bedeutende Rolle.

Die *in vitro* Cytotoxizitäts-Experimente zeigen deutlich, dass HLA-G inhibierend auf die cytotoxische Aktivität der NK- und T-Zellen wirkt. Daher wurden in Kooperation mit Prof. A. Hartmann des Institutes für Pathologie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg die *Tissue microarrays* immunhistochemisch auf die Oberflächenmarker bestimmter Tumor-infiltrierender Immunzellen gefärbt (*immunoscore*). Zur sicheren Abgrenzung einzelner Populationen von Immunzellen sind oftmals zwei oder mehr Marker notwendig. So werden beispielsweise T-Killerzellen als CD3⁺CD8⁺ beschrieben. Aus technischen Gründen konnte jedoch nur jeweils ein Marker gefärbt werden.

Die Ergebnisse des *immunoscore* zeigen sehr eindeutig, dass in HLA-G⁺ NZK-Tumoren signifikant mehr CD3⁺ und CD8⁺ Zellen vorhanden sind, im Vergleich zu HLA-G⁻ NZK-Tumoren. Die Marker CD4, CD56, CD69, FOXP3 und CD25 hingegen zeigen entweder keinen signifikanten Unterschied oder sind generell nur sehr gering detektierbar. Die absoluten Zahlen der CD3⁺ und CD8⁺ Tumor-infiltrierenden Zellen sind annähernd gleich groß, sodass es sich mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um CD3⁺CD8⁺ T-Killerzellen handelt. Der Fakt, dass CD3⁺ Zellen signifikant unterschiedlich vorhanden waren in HLA-G⁺ und HLA-G⁻ NZK-Tumoren und CD4⁺

und CD56⁺ Zellen nur sehr gering vorhanden und nicht signifikant unterschiedlich detektierbar waren, schließt NK-, NKT- und T-Helferzellen als unterschiedlich vorhandene Tumorphilierende Immunzellpopulationen zwischen HLA-G⁺ und HLA-G⁻ NZK-Tumoren aus.

Die Färbung der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen HLA-G⁺ und HLA-G⁻ NZK-Tumoren. Dieses Ergebnis könnte bedeuten, dass die in den HLA-G⁺ Tumoren signifikant mehr vorhandenen CD3⁺CD8⁺ T-Killerzellen hauptsächlich inaktiv sind und daher trotz stärkerer Infiltration mit T-Killerzellen keine besseren Effekte für das Überleben der Patienten erkennbar sind. Wenn die HLA-G-Expression als Ursache dieser Inaktivierung der T-Killerzellen fungiert, so sind unter Umständen Immuntherapien bei HLA-G⁺ NZK-Tumoren als nur bedingt wirksam einzustufen. Eine entsprechende Erfassung des HLA-G-Status bei der Diagnostik wäre sinnvoll bei der Wahl der therapeutischen Maßnahmen.

Der einzige Marker, der tendenziell einen positiven Effekt auf das Überleben zeigt ($p = 0,097$), ist die Anwesenheit von Zellen mit dem Marker CD4 auf der Zelloberfläche, da CD3 keinen Effekt hat, könnte es sich hierbei um CD3⁻CD4⁺ Zellen handeln, z. B. Granulozyten, dendritische Zellen oder Makrophagen. Hier sind weiterführende Untersuchungen notwendig, zur Identifizierung der betreffenden Immunzellpopulation, deren Anwesenheit als Tumorphilierende Zellen einen deutlichen Vorteil auf das Überleben der Patienten aufweist.

Tatsächlich berichten Giraldo et al., 2015⁽¹⁹⁸⁾, dass eine stärkere Infiltration des NZK mit CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ Zellen mit einem schlechteren Überleben der Patienten einhergeht.

6.3. Die duale Funktion der miR-152

In der miR-152-defizienten JEG-3-Zelllinie wurde durch stabile Überexpression die miR-152-Expression rekonstituiert, in Folge dessen wurde das bekannte miR-152-Zielgen HLA-G herunterreguliert, was die Funktionalität der miR-152 Überexpression beweist. Durch vergleichende Proteomanalyse der miR-152 Überexpressionstransfektande mit der entsprechenden mock-Transfektande mittels 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie konnten 24 differentiell-regulierte Proteine identifiziert werden. Davon waren 14 Proteine hoch- und 10 Proteine herunterreguliert. In der aktuellen Literatur können zunehmend Publikationen gefunden werden, die über Proteomanalyse neue miR-Zielgene identifizieren, z. B. Diao et al., 2010⁽¹⁹⁹⁾. Diese Herangehensweise bietet im Vergleich zu cDNA-*microarrays* den Vorteil, ebenfalls diejenigen regulierten Zielgene zu erfassen, die auf mRNA-Ebene keine oder nur eine geringe quantitative Veränderungen aufweisen aufgrund der translationalen Inhibierung, verursacht durch die miR-Bindung an der Ziel-mRNA. Tatsächlich muss die Bindung einer miR an ihrer Ziel-mRNA nicht zum Abbau dieser mRNA führen, sondern beispielsweise zu einer temporären Speicherung in *P-Bodies*, wie von Liu et al., 2005⁽²⁰⁰⁾ berichtet wird. Dieser Effekt

könnte bei der Verwendung von *cDNA-microarrays* fälschlicherweise sogar als Anreicherung erfasst werden. Jedoch führt die miR-vermittelte temporäre Speicherung der Ziel-mRNA in *P-Bodies* genauso, wie der der miR-verursachte mRNA-Abbau in beiden Fällen zur translationalen Inhibierung, sodass die Proteomanalyse eine interessante Strategie darstellt.

Zur Identifizierung neuer miR-152-regulierter Zielgene wurden die in der Proteomanalyse als herunterreguliert detektierten Gene weitergehend untersucht. Dabei wurde der Fokus sehr früh auf das putative miR-152-Zielgen 14-3-3 β gelegt, da in den Transfektanden deutliche Unterschiede in der Proliferation beobachtet werden konnten. Die initiale Literaturrecherche ergab, dass 14-3-3 β sehr stark anti-apoptotisch und proliferativ in hepatozellulären Karzinom-Zellen (HCC) wirkt und in HCC-Tumoren mit deutlich reduzierten Überlebenszeiten assoziiert werden kann, z.T. besser als bisher verwendete prognostische Marker ⁽¹⁷⁵⁾.

Zunächst wurden die Ergebnisse der Proteomanalyse mittels qPCR und Western-Blot in den JEG-3-Transfektanden, sowie in einem weiteren Transfektionsmodell bestehend aus BUF1088-Melanomzellen, validiert. Beim *Screening* von willkürlich ausgewählten Melanomzelllinien konnte jedoch keine Korrelation zwischen der miR-152- und der 14-3-3 β -Expression detektiert werden. Dabei muss jedoch erwähnt werden, dass nur die JEG-3-Zellen tatsächlich ein Defizit in der miR-152-Expression aufweisen. Ferner sind weitere regulatorische Mechanismen denkbar, die an der Regulation von 14-3-3 β beteiligt sind, z. B. Promotormethylierungen oder Mutationen. Im Zusammenhang für 14-3-3 β sind diese regulatorischen Mechanismen noch nicht untersucht worden. Jedoch konnte für 14-3-3 σ und 14-3-3 γ demonstriert werden, dass die Promotorregionen hypermethyliert vorliegen können ^(201,202).

Durch *in silico*- und *in vitro*-Interaktionsstudien konnte sowohl eine direkte Interaktion der miR-152 mit dem 14-3-3 β -3'-UTR, als auch die Position dieser Interaktion im 14-3-3 β -3'-UTR identifiziert werden.

Für folgende funktionale Studien bezüglich der Rolle von 14-3-3 β auf Apoptose und Proliferation wurde in der JEG-3-miR-152-Überexpressionstransfektande das Protein 14-3-3 β rekonstituiert, durch stabile Transfektion eines Expressionsplasmides, kodierend für die 14-3-3 β CDS ohne den dazugehörigen 3'-UTR.

Im Kontext der posttranskriptionalen Genregulation von 14-3-3 β durch die Tumor-suppressive miR-152 konnten für 14-3-3 β anti-apoptotische Aktivitäten durch signifikante Hochregulation des ebenfalls anti-apoptotischen Genes BCL2 identifiziert werden. Dies führte zu einer erhöhten Viabilität der Transfektande mit rekonstituierter 14-3-3 β -Expression in Kombination mit einer Paclitaxelbehandlung. Paclitaxel gehört zu den Taxanen und stammt von der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*). Es stabilisiert die Mikrotubuli und verhindert deren Depolymerisation. Daher wirkt es als Mitoseinhibitor.

Im Einklang mit den Effekten von 14-3-3 β auf die Apoptose stehen ebenfalls die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse. Durch 14-3-3 β -vermittelte Induktion des CCNE/CDK2-Komplexes kann eine erhöhte Proliferationsrate erklärt werden. Die genaue Wirkung von 14-3-3 β auf den Zellzyklus ist in der Abbildung 6.2. dargestellt.

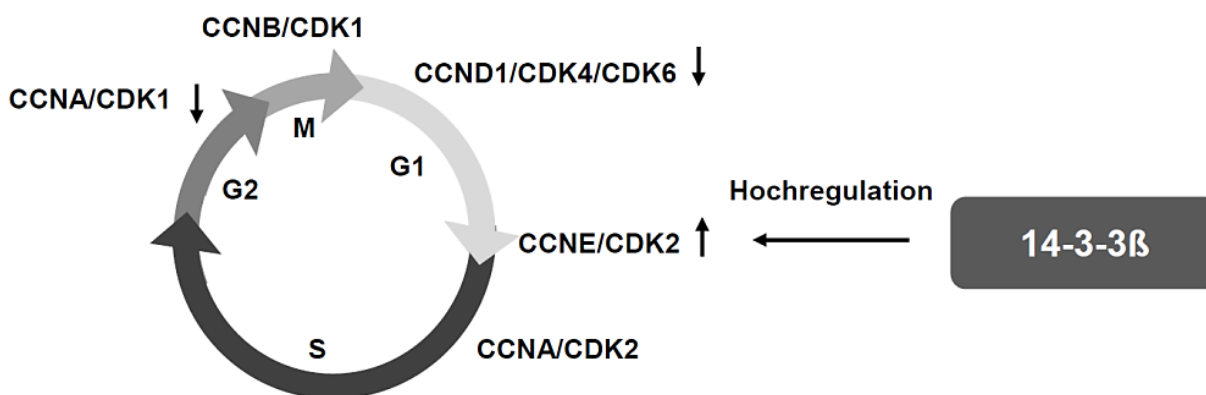


Abbildung 6.2. Der Wirkung von 14-3-3 β auf die Regulation des Zellzyklus

Besonders stark werden CCNE und CDK2 hochreguliert. Dieser Komplex regelt einen irreversiblen Übergang von der G1- zur S-Phase und terminiert damit die Einleitung zur Zellteilung.

Daher muss von einer klinischen Relevanz der 14-3-3 β -Expression ausgegangen werden, wie es von aktuellen Publikationen berichtet wird, z. B. Liu et al., 2011 ⁽¹⁷⁵⁾. Eine immunhistochemische Färbung des 14-3-3 β -Proteins auf den *Tissue microarrays* mit anschließender Korrelation der 14-3-3 β -Expression mit den klinischen Parametern, wie Überlebensdaten und Tumorgrad wäre sinnvoll und ist in Vorbereitung. Aufgrund dieser noch ausstehenden Experimente wurde die Datenbank *R2: microarray analysis and visualization platform* verwendet. Bei dieser *in silico*-Analyse werden die Ergebnisse von cDNA-*microarrays* aus Tumorproben verschiedener Tumorentitäten mit den dazugehörigen Überlebensdaten korreliert. Bei der Analyse dieser Transkriptdaten aus *in vivo*-Material können jedoch nicht mögliche posttranskriptionale Effekte berücksichtigt werden, d.h. die Ergebnisse der cDNA-*microarrays* müssen nicht die Ergebnisse einer Protein-basierenden Analyse (z.B. die immunhistochemische Färbung der *Tissue microarrays*) widerspiegeln.

Bei der Auswertung dieser cDNA-*microarray*-Daten konnte gezeigt werden, dass je höher die 14-3-3 β -Expression ist, desto schlechter sind die Überlebensdaten für die vier untersuchten Tumorentitäten Neuroblastom, Gliom, Lungenkarzinom und Osteosarkom (keine Daten für das Nierenzellkarzinom oder Melanom verfügbar).

Ferner korrelieren die Expressionen der beiden miR-152-Zielgene 14-3-3 β und HLA-G miteinander und zeigen negative Auswirkungen auf die Überlebensdaten. In Übereinstimmung damit wird in aktuellen Publikationen beschrieben, dass 14-3-3 β und 14-3-3 ζ in humanen Tumoren verschiedener Entitäten häufig überexprimiert vorliegen und mit Tumorprogression und verminderter Überlebensdauer einhergehen ^(175,203,204).

Dies zeigt eindeutig, dass die Tumor-suppressive miR-152 ^(79–83) eine duale Funktion einnimmt. Auf der einen Seite wird das immunmodulatorische HLA-G durch die miR-152 negativ reguliert, was eine mögliche Immunevasion der betreffenden Zellen verhindern könnte und auf der anderen Seite wird das anti-apoptotische 14-3-3 β ebenfalls durch die miR-152 negativ reguliert, sodass eine verminderte Apoptosesensitivität und eine gesteigerte Proliferation der betreffenden Zellen unterbunden wird (Abbildung 6.3.).

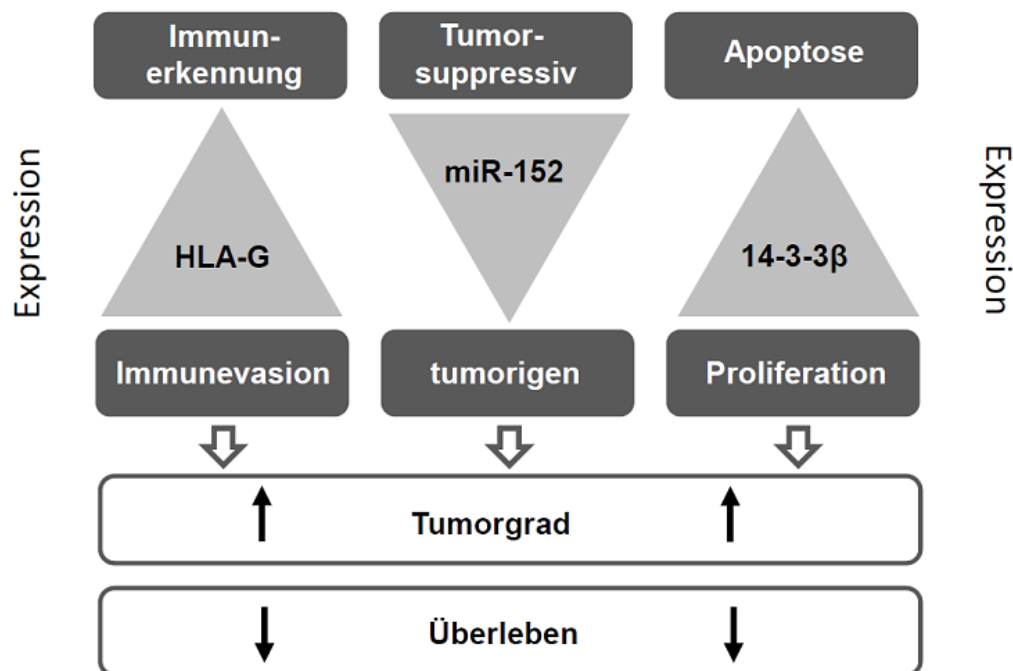


Abbildung 6.3. Schematische Darstellung der dualen Funktion der Tumor-suppressiven miR-152

Durch deren negative Regulation von dem immunmodulatorischen Molekül HLA-G wird eine mögliche Immunevasion der Zelle unterbunden und durch die negative Regulation des anti-apoptotischen und proliferativ-wirkenden 14-3-3 β ebenfalls eine Tumor-suppressive Funktion erfüllt.

7. Zusammenfassung

Zum Beginn dieser Dissertation wurde in der aktuellen Literatur über eine mögliche posttranskriptionale Genregulation von HLA-G durch miRs der miR-148-Familie diskutiert, insbesondere aufgrund der diskordanten Expression zwischen HLA-G-mRNA und korrespondierendem Protein^(62,141–143).

In dieser Dissertation konnte die posttranskriptionale Genregulation von HLA-G durch die miRs der miR-148-Familie nachgewiesen werden. Außerdem wurden zwei weitere HLA-G-regulierende miRs identifiziert (miR-548q und miR-628-5p) und ihre Interaktion mit der HLA-G-mRNA weitergehend charakterisiert. Die Ergebnisse der miTRAP- und der Luziferase-Reporter-Experimente erlauben ferner die Einteilung der HLA-G-regulierenden miRs in Schlüssel-Regulatoren mit besonders hoher Affinität zur HLA-G-mRNA, wie miR-152, miR-148A und miR-148B und in Feinregulatoren mit deutlich geringerer Affinität, wie miR-548q, miR-628-5p und miR-133A. Diese Aussagen basieren auf experimentellen Ergebnissen und *in silico* kalkulierten Bindungsenergien der miRs mit der HLA-G-mRNA unter Verwendung der Software RNAhybrid.

In der Bindungsstelle der miRs der miR-148-Familie befindet sich ein C/G-Polymorphismus an der Stelle +3142 des HLA-G-Gens. Unter Verwendung von *in silico*-Analysen und von Luziferase-Reporter-Experimenten konnte demonstriert werden, dass dieser Polymorphismus einen Einfluss auf die Interaktion der miRs der miR-148-Familie mit dem HLA-G-3'-UTR bewirkt. Anschließende *in vitro* Cytotoxizitäts-Experimente beweisen das immunmodulatorische Potenzial von HLA-G und den negativen Einfluss der miR-152 auf diesen Effekt.

Die Analyse von 36 HLA-G⁺ und 36 HLA-G⁻ paraffinierten NZK-Gewebeschnitten (*in vivo* Proben) zeigte, dass nur drei der sechs untersuchten HLA-G-regulierenden miRs (miR-148A, miR-133A und miR-628-5p) in HLA-G⁺ Tumoren eine inverse Expression aufweisen. Dieser Effekt war für die miR-148A statistisch signifikant.

Außerdem wurden die 453 Gewebeschnitte des *Tissue microarray* durch die beiden erfahrenen Pathologen Herr Prof. A. Hartmann und Frau Dr. V. Spath hinsichtlich des Tumorgades nach den Kriterien der WHO (2004) eingeteilt. Anschließend konnte eine Korrelation zwischen der HLA-G-Expression mit einem höheren Tumorgad, d.h. einer fortgeschrittener Dedifferenzierung des Tumorgewebes im Vergleich zum Ursprungsgewebe festgestellt werden.

Ferner wurde mit immunhistochemischen Färbungen in den 453 Gewebeschnitten des *Tissue microarray* die Immunzellinfiltration analysiert. Mit dem Ergebnis, dass HLA-G⁺ NZK-Tumore signifikant mehr CD3⁺ und CD8⁺ Immunzellen enthalten, als HLA-G⁻ NZK-Tumore. Jedoch zeigen die HLA-G⁺ Proben im Vergleich mit den HLA-G⁻ Proben keine signifikanten

Unterschiede in der Anzahl an Immunzellen mit den Aktivierungsmarkern CD69 und CD25, was durch die inhibitorische Funktion von HLA-G erklärt werden könnte. Die anderen untersuchten Marker CD4, CD56 und FoxP3 zeigten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zwischen HLA-G⁺ und HLA-G⁻ NZK-Tumoren.

Obwohl die HLA-G-Expression mit einem höheren Tumorgrad korrelierte und die zahlreichen infiltrierenden CD3⁺ und CD8⁺ Immunzellen in den HLA-G⁺ NZK-Tumoren hauptsächlich inaktiv vorlagen, könnte bei der Auswertung der krankheitsspezifischen Überlebensdaten kein signifikanter Effekt der HLA-G-Expression auf die Überlebensdauer der NZK-Patienten nachgewiesen werden. Ferner wurden die Anwesenheit bzw. das Fehlen von den Tumorf infiltrierenden Immunzellen mit den Überlebensdaten korreliert. Dabei zeigte sich, dass nur der Marker CD4 einen beinahe signifikanten positiven Einfluss auf die Überlebensdauer von NZK-Patienten hat, nicht jedoch der Marker CD3, was T-Helferzellen ausschließen sollte.

Parallel zu diesen Experimenten wurden die miR-152-defiziente Transfektante JEG-3 + pmR(mock) und die miR-152-überexprimierende Transfektante JEG-3 + pmR(miR-152) verwendet, um durch eine vergleichende Proteom-Analyse neue Zielgene der miR-152 zu identifizieren. Dabei wurden 24 differentiell-exprimierte Proteine entdeckt, von denen 14 hochreguliert und 10 herunterreguliert waren.

Unter den 10 herunterregulierten potentiellen miR-152-Zielgenen wurde das Gen 14-3-3 β für weiterführende Analysen ausgewählt, weil es aufgrund der Literaturrecherche als ein anti-apoptotisches und proliferatives Gen die beobachteten Proliferationsunterschiede in den Transfektanden erklären könnte. Tatsächlich konnte in den JEG-3-Transfektanden [JEG-3 + pmR(mock) und JEG-3 + pmR(miR-152)] und in einem weiteren Transfektionsystem bestehend aus der Melanomzelllinie buf1088 [buf1088 + pmR(mock) und buf1088 + pmR(miR-152)] die Herunterregulation von 14-3-3 β durch die Überexpression der miR-152 mittels qPCR und Western-Blot validiert werden.

Anschließende Luziferase-Reportergen-Experimente konnten die direkte Interaktion zwischen der miR-152 und dem 14-3-3 β -3'-UTR nachweisen, sowie die genaue Position dieser Interaktion bestimmen. Ebenfalls konnte durch das miTRAP-Experiment diese direkte Interaktion bestätigt werden. Interessanterweise wurde bei diesem Experiment die miR-152 deutlich stärker mit dem 14-3-3 β -3'-UTR angereichert, als mit dem HLA-G-3'-UTR, welcher bei diesem Experiment als positiv-Kontrolle verwendet worden ist.

Durch die stabile Überexpression der miR-152 in der JEG-3 + pmR(miR-152)-Transfektante wurde das 14-3-3 β -Protein komplett herunterreguliert. Für weiterführende funktionelle Experimente wurde die 14-3-3 β -Expression rekonstituiert, indem nur die 14-3-3 β -CDS ohne entsprechenden 3'-UTR, sowie eine entsprechende mock-Kontrolle, stabil in die JEG-3 +

pmR(miR-152)-Transfektande transfiziert worden sind. Folgende Analysen zeigten eine 14-3-3 β -abhängige Apoptose-Sensitivität der Transfektanden. Durch die Rekonstitution der 14-3-3 β -Expression wurde das anti-apoptotische BCL2 induziert. Dies führte ebenfalls zu einer erhöhten Viabilität der Transfektande mit rekonstituierter 14-3-3 β -Expression unter Paclitaxel-Behandlung. Außerdem konnte eine 14-3-3 β -abhängige Proliferation, durch 14-3-3 β -vermittelte Induktion des CCNE/CDK2-Komplexes, gezeigt werden. Durch Auswertung von cDNA-*microarrays*, die auf *in vivo*-Material basieren, konnte demonstriert werden, dass HLA-G und 14-3-3 β eine ähnliche Expression in den jeweiligen Proben aufweisen und beide sich negativ auf die Überlebensdaten von Tumorpatienten auswirken.

Die Daten dieser Dissertation demonstrieren die duale Funktion der tumor-suppressiven miR-152. Auf der einen Seite wird das immunmodulatorische HLA-G negativ reguliert, sodass eine mögliche Immunevasion unterdrückt wird und gleichzeitig wird das anti-apoptotische und proliferativ-wirkende 14-3-3 β negativ reguliert, sodass in diesen Zellen Apoptose induziert werden und eine unkontrollierte Zellteilung eingeschränkt werden können.

8. Ausblick

Bei der Identifizierung weiterer HLA-G-regulierender miRs wurden die miTRAP-Eluate mit miR-microarrays analysiert. Dabei sind die, auf dem Chip-aufgetragenen, Sonden limitierend. Die miTRAP-Eluate könnten ebenfalls mit *Next-Generation-Sequencing* analysiert werden, dabei würden alle miRs, die mit dem HLA-G-3'-UTR angereichert wurden, identifiziert werden. Dafür könnten unterschiedliche Zelllinien, aus unterschiedlichen Tumorentitäten, als Zelllysat verwendet werden.

Bei der Verwendung von dem miTRAP-Experiment in Kombination mit der Massenspektrometrie könnten HLA-G-mRNA-bindende Proteine identifiziert werden, welche regulierend wirken könnten und anschließend mit weiteren Experimenten charakterisiert werden.

Ausblickend sollten bezüglich der beiden neu-identifizierten HLA-G-regulierenden miRs (miR-548q und miR-628-5p) verschiedene Experimente ausgeführt werden. So müssten noch entsprechende Decoy-Konstrukte kloniert werden und damit die Funktionen der miR-548q und der miR-628-5p blockiert werden, was in einer Stabilisierung des HLA-G-Proteins resultieren sollte. Zusätzlich fehlen für diese beiden miRs noch *in vitro* Cytotoxizitäts-Experimente. Dabei ergibt sich jedoch ein Problem. Die miR-152 zeigte in den bisherigen Experimenten ein deutlich stärkeres Potential, bei der Herunterregulation von HLA-G, als die miR-548q bzw. als die miR-628-5p. Dies führte zu dem Postulat, dass die miR-152 ein Schlüssel-Regulator für HLA-G ist, während die miR-548q und die miR-628-5p Feinregulatoren für die HLA-G-Expression darstellen.

Jedoch waren die Cytotoxizitäts-Experimente mit der miR-152 und den HLA-G⁺ NIH/3T3-Zellen nur teilweise signifikant, sodass mit der miR-548q und mit der miR-628-5p im NIH/3T3-Transfektionssystem keine deutlichen Effekte zu erwarten sind. Daher ist es notwendig andere Tumor-Zelllinien mit einem HLA-G-Expressionsvektor zu transfizieren, welcher neben der HLA-G-CDS noch den HLA-G-3'-UTR enthält. Jedoch ist es erst möglich diese Tumorzelllinien hinsichtlich HLA-G-abhängiger Cytotoxizitäts-Experimenten zu charakterisieren, wenn die Transfektion und Selektion erfolgreich abgeschlossen worden sind. Aufgrund der besseren Transfizierbarkeit werden dafür verschiedene Melanomzelllinien verwendet werden. Parallel dazu werden die miR-Überexpressionsplasmide von den derzeitigen Vektoren mit einem Geneticin-Resistenzgen in Vektoren mit einem Puromycin-Resistenzgen umklontiert. Diese Konstrukte sollen dann zu unserem Kooperationspartner Prof. O. Mandelboim von der Universität Jerusalem in Israel versendet werden, da dort bereits ein HLA-G⁺ Zellsystem besteht, welches für HLA-G-abhängige Cytotoxizitäts-Experimente verwendet werden könnte.

Zusätzlich besteht die Möglichkeit in Kooperation mit Prof. Müller-Tidow von der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg miRs an Antikörper zu koppeln. Folgend könnten HLA-G⁺ Xenografts in Mäusen in *in vivo*-Studien mit diesen miR-Antikörper-Konstrukten therapiert werden, was möglicherweise in weiteren Projekten oder gar in pharmazeutischer Applikation resultieren könnte.

Bei der Analyse der Tumor-infiltrierenden Immunzellen auf den *Tissue microarrays* mit anschließender Korrelation der Immunzellmarker mit der Überlebensdauer der NZK-Patienten wurde der Marker CD4 identifiziert, dessen Anwesenheit beinahe signifikant besser zum Überleben der Patienten beigetragen hat. Jedoch konnte dieser Effekt für die anderen Marker: CD3, CD8, CD25, CD56, CD69, FoxP3 und HLA-G nicht gezeigt werden, sodass diese CD4⁺-Zellen vermutlich keine T-Helferzellen sind, sondern möglicherweise Granulozyten, Makrophagen oder dendritische Zellen. Hier sind weiterführende Analysen, z. B. das immunhistochemische Färben weiterer Oberflächenmarker, sinnvoll.

Zusätzlich wäre es sinnvoll ebenfalls 14-3-3 β auf den 453 NZK-Tumoren des *Tissue microarrays* immunhistochemisch zu färben und anschließend mit der miR-152-Expression, mit der HLA-G-Expression, mit der Immunzellinfiltration, mit dem Tumorgrad und mit den Überlebensdaten zu korrelieren, was ebenfalls in Vorbereitung ist.

Außerdem sollten die 14-3-3 β -relevanten Viabilitäts-Experimente analog zu dem Paclitaxel mit weiteren klinisch-relevanten Substanzen durchgeführt werden, z. B. Doxorubicin, Cyclophosphamid oder Methotrexat.

Das Protein 14-3-3 β wird ebenfalls in der Maus exprimiert. Es ist konserviert in Mensch, Schimpanse, Rhesusaffe, Hund, Kuh, Ratte, Huhn, Zebrafisch und Frosch (ncbi-Datenbank). Die murine miR-152 hat exakt die gleiche Sequenz, wie die humane miR-152. Tatsächlich ist die miR-152-Bindungsstelle im 3'-UTR des murinen 14-3-3 β identisch mit der entsprechenden humanen Sequenz. Ansonsten gibt es erhebliche sequenzielle Unterschiede zwischen murinem und humanem 14-3-3 β -3'-UTR, während die CDS jeweils 741 nt lang zu 90 % und die Aminosäuresequenz sogar zu 98 % übereinstimmen. Daher sind ebenfalls weiterführende 14-3-3 β -Studien in einem *in vivo* Mausmodell denkbar.

9. Literatur

1. Bailey, M., Christoforidou, Z. & Lewis, M. Evolution of immune systems: specificity and autoreactivity. *Autoimmun Rev* **12**, 643–647
2. Trosko, J. E. & Ruch, R. J. Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front Biosci* **3**, d208–36 (1998).
3. Wiesner, J. & Vilcinskis, A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence* **1**, 440–464
4. Mushegian, A. & Medzhitov, R. Evolutionary perspective on innate immune recognition. *J Cell Biol* **155**, 705–710 (2001).
5. Dzik, J. M. The ancestry and cumulative evolution of immune reactions. *Acta Biochim Pol* **57**, 443–466
6. Iwasaki, A. A virological view of innate immune recognition. *Annu Rev Microbiol* **66**, 177–196
7. Ng, P. M. *et al.* C-reactive protein collaborates with plasma lectins to boost immune response against bacteria. *Embo J* **26**, 3431–3440 (2007).
8. Dommett, R. M., Klein, N. & Turner, M. W. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens* **68**, 193–209 (2006).
9. Rice, P. J. *et al.* Human monocyte scavenger receptors are pattern recognition receptors for (1→3)-beta-D-glucans. *J Leukoc Biol* **72**, 140–146 (2002).
10. Peiser, L., Mukhopadhyay, S. & Gordon, S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* **14**, 123–128 (2002).
11. Geijtenbeek, T. B. & Gringhuis, S. I. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol* **9**, 465–479 (2009).
12. Creagh, E. M. & O'Neill, L. A. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol* **27**, 352–357 (2006).
13. Inohara, N. & Nunez, G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* **3**, 371–382 (2003).
14. Turner, M. W. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol* **40**, 423–429 (2003).
15. Frank, M. M. & Fries, L. F. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today* **12**, 322–326 (1991).
16. Jasinski-Bergner, S., Mandelboim, O. & Seliger, B. The role of microRNAs in the control of innate immune response in cancer. *J Natl Cancer Inst* **106**,
17. Schitteck, B. *et al.* Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat Immunol* **2**, 1133–1137 (2001).
18. Gaspar, D., Veiga, A. S. & Castanho, M. A. From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Front Microbiol* **4**, 294
19. Chaplin, D. D. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* **125**, S3–23

20. Fanning, L. J., Connor, A. M. & Wu, G. E. Development of the immunoglobulin repertoire. *Clin Immunol Immunopathol* **79**, 1–14 (1996).
21. Weigert, M. *et al.* The joining of V and J gene segments creates antibody diversity. *Nature* **283**, 497–499 (1980).
22. Davis, M. M. & Bjorkman, P. J. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* **334**, 395–402 (1988).
23. Lafaille, J. J., DeCloux, A., Bonneville, M., Takagaki, Y. & Tonegawa, S. Junctional sequences of T cell receptor gamma delta genes: implications for gamma delta T cell lineages and for a novel intermediate of V-(D)-J joining. *Cell* **59**, 859–870 (1989).
24. Rowen, L., Koop, B. F. & Hood, L. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science* **272**, 1755–1762 (1996).
25. Vigneron, N. & Van den Eynde, B. J. Insights into the processing of MHC class I ligands gained from the study of human tumor epitopes. *Cell Mol Life Sci* **68**, 1503–1520
26. Bahram, S., Arnold, D., Bresnahan, M., Strominger, J. L. & Spies, T. Two putative subunits of a peptide pump encoded in the human major histocompatibility complex class II region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10094–10098 (1991).
27. Bukur, J., Jasinski, S. & Seliger, B. The role of classical and non-classical HLA class I antigens in human tumors. *Semin Cancer Biol* **22**, 350–358
28. Wearsch, P. A. & Cresswell, P. The quality control of MHC class I peptide loading. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 624–631 (2008).
29. Carbone, F. R., Kurts, C., Bennett, S. R., Miller, J. F. & Heath, W. R. Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. *Immunol Today* **19**, 368–373 (1998).
30. Hong, S. & Van Kaer, L. Immune privilege: keeping an eye on natural killer T cells. *J Exp Med* **190**, 1197–1200 (1999).
31. Lehtimäki, S. & Lahesmaa, R. Regulatory T Cells Control Immune Responses through Their Non-Redundant Tissue Specific Features. *Front Immunol* **4**, 294
32. Wilczynski, J. R., Radwan, M. & Kalinka, J. The characterization and role of regulatory T cells in immune reactions. *Front Biosci* **13**, 2266–2274 (2008).
33. Robinson, J., Malik, A., Parham, P., Bodmer, J. G. & Marsh, S. G. IMGT/HLA database--a sequence database for the human major histocompatibility complex. *Tissue Antigens* **55**, 280–287 (2000).
34. Robinson, J., Waller, M. J., Parham, P., Bodmer, J. G. & Marsh, S. G. IMGT/HLA Database--a sequence database for the human major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Res* **29**, 210–213 (2001).
35. Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. & Rammensee, H. G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* **351**, 290–296 (1991).
36. Bouvier, M. Accessory proteins and the assembly of human class I MHC molecules: a molecular and structural perspective. *Mol Immunol* **39**, 697–706 (2003).
37. Gaspar Jr., R. *et al.* Clustering of class I HLA oligomers with CD8 and TCR: three-dimensional models based on fluorescence resonance energy transfer and crystallographic data. *J Immunol* **166**, 5078–5086 (2001).
38. Held, W. A KIR-TLR connection. *Blood* **116**, 1629–1630

39. Tabayoyong, W. B. & Zavazava, N. Soluble HLA revisited. *Leuk Res* **31**, 121–125 (2007).
40. Castelli, E. C., Veiga-Castelli, L. C., Yaghi, L., Moreau, P. & Donadi, E. A. Transcriptional and posttranscriptional regulations of the HLA-G gene. *J Immunol Res* **2014**, 734068
41. Wastowski, I. J. *et al.* Human leukocyte antigen-G is frequently expressed in glioblastoma and may be induced in vitro by combined 5-aza-2'-deoxycytidine and interferon-gamma treatments: results from a multicentric study. *Am J Pathol* **182**, 540–552
42. Hviid, T. V. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum Reprod Update* **12**, 209–232 (2006).
43. Larsen, M. H. *et al.* Human leukocyte antigen-G in the male reproductive system and in seminal plasma. *Mol Hum Reprod* **17**, 727–738
44. Le Discorde, M., Moreau, P., Sabatier, P., Legeais, J. M. & Carosella, E. D. Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. *Hum Immunol* **64**, 1039–1044 (2003).
45. Peng, B., Zhang, L., Xing, A. Y., Hu, M. & Liu, S. Y. [The expression of human leukocyte antigen G and E on human first trimester placenta and its relationship with recurrent spontaneous abortion]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* **39**, 976–979 (2008).
46. Doniz-Padilla, L. *et al.* Analysis of expression and function of the inhibitory receptor ILT2 in lymphocytes from patients with autoimmune thyroid disease. *Eur J Endocrinol* **165**, 129–136
47. Lombardelli, L. *et al.* HLA-G5 induces IL-4 secretion critical for successful pregnancy through differential expression of ILT2 receptor on decidual CD4(+) T cells and macrophages. *J Immunol* **191**, 3651–3662
48. Li, C., Houser, B. L., Nicotra, M. L. & Strominger, J. L. HLA-G homodimer-induced cytokine secretion through HLA-G receptors on human decidual macrophages and natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 5767–5772 (2009).
49. Nakajima, H. *et al.* Transcriptional regulation of ILT family receptors. *J Immunol* **171**, 6611–6620 (2003).
50. LeMaout, J., Zafaranloo, K., Le Danff, C. & Carosella, E. D. HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. *Faseb J* **19**, 662–664 (2005).
51. Shiroishi, M. *et al.* Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8856–8861 (2003).
52. Rouas-Freiss, N., Marchal, R. E., Kirszenbaum, M., Dausset, J. & Carosella, E. D. The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors? *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5249–5254 (1997).
53. Riteau, B. *et al.* HLA-G2, -G3, and -G4 isoforms expressed as nonmature cell surface glycoproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytotoxicity. *J Immunol* **166**, 5018–5026 (2001).
54. Le Gal, F. A. *et al.* HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol* **11**, 1351–1356 (1999).
55. Riteau, B. *et al.* HLA-G inhibits the allogeneic proliferative response. *J Reprod Immunol* **43**, 203–211 (1999).
56. Naji, A. *et al.* Concise review: combining human leukocyte antigen G and mesenchymal stem cells for immunosuppressant biotherapy. *Stem Cells* **31**, 2296–2303
57. Contini, P. *et al.* Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. *Eur J Immunol* **33**, 125–134 (2003).

58. Dunker, K. *et al.* Expression and regulation of non-classical HLA-G in renal cell carcinoma. *Tissue Antigens* **72**, 137–148 (2008).
59. Bourguignon, M. *et al.* Increased soluble human leukocyte antigen-G levels in peripheral blood from climbers on Mount Everest. *Hum Immunol* **71**, 1105–1108
60. Ibrahim, E. C., Morange, M., Dausset, J., Carosella, E. D. & Paul, P. Heat shock and arsenite induce expression of the nonclassical class I histocompatibility HLA-G gene in tumor cell lines. *Cell Stress Chaperones* **5**, 207–218 (2000).
61. Flajollet, S., Poras, I., Carosella, E. D. & Moreau, P. RREB-1 is a transcriptional repressor of HLA-G. *J Immunol* **183**, 6948–6959 (2009).
62. Amiot, L., Ferrone, S., Grosse-Wilde, H. & Seliger, B. Biology of HLA-G in cancer: a candidate molecule for therapeutic intervention? *Cell Mol Life Sci* **68**, 417–431
63. Chang, C. C., Murphy, S. P. & Ferrone, S. Differential in vivo and in vitro HLA-G expression in melanoma cells: potential mechanisms. *Hum Immunol* **64**, 1057–1063 (2003).
64. El-Chennawi, F. A. *et al.* Expression of HLA-G in cancer bladder. *Egypt J Immunol* **12**, 57–64 (2005).
65. Fukushima, Y. *et al.* Increased expression of human histocompatibility leukocyte antigen-G in colorectal cancer cells. *Int J Mol Med* **2**, 349–351 (1998).
66. Wiendl, H. *et al.* A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. *J Immunol* **168**, 4772–4780 (2002).
67. Konarska, M. M., Padgett, R. A. & Sharp, P. A. Recognition of cap structure in splicing in vitro of mRNA precursors. *Cell* **38**, 731–736 (1984).
68. Stevens, A. An exoribonuclease from *Saccharomyces cerevisiae*: effect of modifications of 5' end groups on the hydrolysis of substrates to 5' mononucleotides. *Biochem Biophys Res Commun* **81**, 656–661 (1978).
69. Marzluff, W. F., Wagner, E. J. & Duronio, R. J. Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nat Rev Genet* **9**, 843–854 (2008).
70. Balbo, P. B. & Bohm, A. Mechanism of poly(A) polymerase: structure of the enzyme-MgATP-RNA ternary complex and kinetic analysis. *Structure* **15**, 1117–1131 (2007).
71. Beaulieu, E., Freier, S., Wyatt, J. R., Claverie, J. M. & Gautheret, D. Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes. *Genome Res* **10**, 1001–1010 (2000).
72. Colgan, D. F. & Manley, J. L. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev* **11**, 2755–2766 (1997).
73. Mayr, C. & Bartel, D. P. Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells. *Cell* **138**, 673–684 (2009).
74. Collier, J. M., Gray, N. K. & Wickens, M. P. mRNA stabilization by poly(A) binding protein is independent of poly(A) and requires translation. *Genes Dev* **12**, 3226–3235 (1998).
75. Lang, K. M. & Spritz, R. A. In vitro splicing pathways of pre-mRNAs containing multiple intervening sequences? *Mol Cell Biol* **7**, 3428–3437 (1987).
76. Wang, X. *et al.* Evidence that miR-133a causes recurrent spontaneous abortion by reducing HLA-G expression. *Reprod Biomed Online* **25**, 415–424

77. Manaster, I. *et al.* MiRNA-mediated control of HLA-G expression and function. *PLoS One* **7**, e33395
78. Zhu, X. M. *et al.* Overexpression of miR-152 leads to reduced expression of human leukocyte antigen-G and increased natural killer cell mediated cytotoxicity in JEG-3 cells. *Am J Obstet Gynecol* **202**, 592 e1–7
79. Zhu, C. *et al.* miR-152 controls migration and invasive potential by targeting TGF α in prostate cancer cell lines. *Prostate* **73**, 1082–1089
80. Xiang, Y. *et al.* MiR-152 and miR-185 co-contribute to ovarian cancer cells cisplatin sensitivity by targeting DNMT1 directly: a novel epigenetic therapy independent of decitabine. *Oncogene* **33**, 378–386
81. Xu, Q. *et al.* A regulatory circuit of miR-148a/152 and DNMT1 in modulating cell transformation and tumor angiogenesis through IGF-IR and IRS1. *J Mol Cell Biol* **5**, 3–13
82. Zhou, X. *et al.* Altered expression of miR-152 and miR-148a in ovarian cancer is related to cell proliferation. *Oncol Rep* **27**, 447–454
83. Tsuruta, T. *et al.* miR-152 is a tumor suppressor microRNA that is silenced by DNA hypermethylation in endometrial cancer. *Cancer Res* **71**, 6450–6462
84. Song, Y. X. *et al.* MicroRNA-148b is frequently down-regulated in gastric cancer and acts as a tumor suppressor by inhibiting cell proliferation. *Mol Cancer* **10**, 1
85. Topfer, K. *et al.* Tumor evasion from T cell surveillance. *J Biomed Biotechnol* **2011**, 918471
86. Parmiani, G. *et al.* Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: what have we achieved? Where are we going? *J Natl Cancer Inst* **94**, 805–818 (2002).
87. Vitale, M. *et al.* HLA class I antigen and transporter associated with antigen processing (TAP1 and TAP2) down-regulation in high-grade primary breast carcinoma lesions. *Cancer Res* **58**, 737–742 (1998).
88. Mehta, A. M., Jordanova, E. S., Kenter, G. G., Ferrone, S. & Fleuren, G. J. Association of antigen processing machinery and HLA class I defects with clinicopathological outcome in cervical carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* **57**, 197–206 (2008).
89. Atkins, D. *et al.* MHC class I antigen processing pathway defects, ras mutations and disease stage in colorectal carcinoma. *Int J Cancer* **109**, 265–273 (2004).
90. Ayshamgul, H., Ma, H., Ilyar, S., Zhang, L. W. & Abulizi, A. Association of defective HLA-I expression with antigen processing machinery and their association with clinicopathological characteristics in Kazak patients with esophageal cancer. *Chin Med J (Engl)* **124**, 341–346
91. Kang, J. K., Yoon, S. J., Kim, N. K. & Heo, D. S. The expression of MHC class I, TAP1/2, and LMP2/7 gene in human gastric cancer cell lines. *Int J Oncol* **16**, 1159–1163 (2000).
92. Ogino, T. *et al.* HLA class I antigen down-regulation in primary laryngeal squamous cell carcinoma lesions as a poor prognostic marker. *Cancer Res* **66**, 9281–9289 (2006).
93. Kageshita, T., Hirai, S., Ono, T., Hicklin, D. J. & Ferrone, S. Down-regulation of HLA class I antigen-processing molecules in malignant melanoma: association with disease progression. *Am J Pathol* **154**, 745–754 (1999).
94. Ramnath, N. *et al.* Is downregulation of MHC class I antigen expression in human non-small cell lung cancer associated with prolonged survival? *Cancer Immunol Immunother* **55**, 891–899 (2006).
95. Han, L. Y. *et al.* HLA class I antigen processing machinery component expression and intratumoral T-Cell infiltrate as independent prognostic markers in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* **14**, 3372–3379 (2008).

96. Seliger, B. *et al.* Characterization of human lymphocyte antigen class I antigen-processing machinery defects in renal cell carcinoma lesions with special emphasis on transporter-associated with antigen-processing down-regulation. *Clin Cancer Res* **9**, 1721–1727 (2003).
97. Meissner, M. *et al.* Defects in the human leukocyte antigen class I antigen processing machinery in head and neck squamous cell carcinoma: association with clinical outcome. *Clin Cancer Res* **11**, 2552–2560 (2005).
98. Seliger, B., Marincola, F. M., Ferrone, S. & Abken, H. The complex role of B7 molecules in tumor immunology. *Trends Mol Med* **14**, 550–559 (2008).
99. Seliger, B. & Quandt, D. The expression, function, and clinical relevance of B7 family members in cancer. *Cancer Immunol Immunother* **61**, 1327–1341
100. Quandt, D., Fiedler, E., Boettcher, D., Marsch, Wc. & Seliger, B. B7-h4 expression in human melanoma: its association with patients' survival and antitumor immune response. *Clin Cancer Res* **17**, 3100–3111
101. Quandt, D., Jasinski-Bergner, S., Muller, U., Schulze, B. & Seliger, B. Synergistic effects of IL-4 and TNFalpha on the induction of B7-H1 in renal cell carcinoma cells inhibiting allogeneic T cell proliferation. *J Transl Med* **12**, 151
102. De Kruijf, E. M. *et al.* HLA-E and HLA-G expression in classical HLA class I-negative tumors is of prognostic value for clinical outcome of early breast cancer patients. *J Immunol* **185**, 7452–7459
103. Cao, M. *et al.* Plasma soluble HLA-G is a potential biomarker for diagnosis of colorectal, gastric, esophageal and lung cancer. *Tissue Antigens* **78**, 120–128
104. Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A. K. & Flavell, R. A. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* **24**, 99–146 (2006).
105. Gerlini, G. *et al.* Metastatic melanoma secreted IL-10 down-regulates CD1 molecules on dendritic cells in metastatic tumor lesions. *Am J Pathol* **165**, 1853–1863 (2004).
106. Kim, R., Emi, M., Tanabe, K. & Arihiro, K. Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. *Cancer Res* **66**, 5527–5536 (2006).
107. Whiteside, T. L. The role of death receptor ligands in shaping tumor microenvironment. *Immunol Invest* **36**, 25–46 (2007).
108. Warburg, O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* **124**, 269–270 (1956).
109. Choi, S. Y., Collins, C. C., Gout, P. W. & Wang, Y. Cancer-generated lactic acid: a regulatory, immunosuppressive metabolite? *J Pathol* **230**, 350–355
110. Calcinotto, A. *et al.* Modulation of microenvironment acidity reverses anergy in human and murine tumor-infiltrating T lymphocytes. *Cancer Res* **72**, 2746–2756
111. Mole, D. R. *et al.* Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem* **284**, 16767–16775 (2009).
112. Barsoum, I. B., Smallwood, C. A., Siemens, D. R. & Graham, C. H. A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells. *Cancer Res* **74**, 665–674
113. Berezikov, E. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nat Rev Genet* **12**, 846–860
114. Fang, Z., Du, R., Edwards, A., Flemington, E. K. & Zhang, K. The sequence structures of human microRNA molecules and their implications. *PLoS One* **8**, e54215

115. Kozomara, A. & Griffiths-Jones, S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* **39**, D152–7
116. Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L. & Bradley, A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* **14**, 1902–1910 (2004).
117. Ozsolak, F. *et al.* Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev* **22**, 3172–3183 (2008).
118. Marsico, A. *et al.* PROMiRNA: a new miRNA promoter recognition method uncovers the complex regulation of intronic miRNAs. *Genome Biol* **14**, R84
119. Monteys, A. M. *et al.* Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *Rna* **16**, 495–505
120. Lee, Y. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* **23**, 4051–4060 (2004).
121. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281–297 (2004).
122. Cai, X., Hagedorn, C. H. & Cullen, B. R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna* **10**, 1957–1966 (2004).
123. Han, J. *et al.* Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* **125**, 887–901 (2006).
124. Bohnsack, M. T., Czaplinski, K. & Gorlich, D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna* **10**, 185–191 (2004).
125. Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E. & Kutay, U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**, 95–98 (2004).
126. Leuschner, P. J., Obernosterer, G. & Martinez, J. MicroRNAs: Loquacious speaks out. *Curr Biol* **15**, R603–5 (2005).
127. Lund, E. & Dahlberg, J. E. Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **71**, 59–66 (2006).
128. Schwarz, D. S. *et al.* Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**, 199–208 (2003).
129. Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P. & Burge, C. B. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* **115**, 787–798 (2003).
130. Zhou, X., Duan, X., Qian, J. & Li, F. Abundant conserved microRNA target sites in the 5'-untranslated region and coding sequence. *Genetica* **137**, 159–164 (2009).
131. Moretti, F., Thermann, R. & Hentze, M. W. Mechanism of translational regulation by miR-2 from sites in the 5' untranslated region or the open reading frame. *Rna* **16**, 2493–2502
132. Duursma, A. M., Kedde, M., Schrier, M., le Sage, C. & Agami, R. miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *Rna* **14**, 872–877 (2008).
133. Forman, J. J., Legesse-Miller, A. & Collier, H. A. A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 14879–14884 (2008).
134. Elcheva, I., Goswami, S., Noubissi, F. K. & Spiegelman, V. S. CRD-BP protects the coding region of betaTrCP1 mRNA from miR-183-mediated degradation. *Mol Cell* **35**, 240–246 (2009).

135. Pratt, A. J. & MacRae, I. J. The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *J Biol Chem* **284**, 17897–17901 (2009).
136. Finnegan, E. F. & Pasquinelli, A. E. MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **48**, 51–68
137. Bhattacharyya, S. N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E. I. & Filipowicz, W. Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **71**, 513–521 (2006).
138. Kawahara, Y. *et al.* Redirection of silencing targets by adenosine-to-inosine editing of miRNAs. *Science* **315**, 1137–1140 (2007).
139. Calin, G. A. *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15524–15529 (2002).
140. Nelson, K. M. & Weiss, G. J. MicroRNAs and cancer: past, present, and potential future. *Mol Cancer Ther* **7**, 3655–3660 (2008).
141. Tan, Z. *et al.* Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. *Am J Hum Genet* **81**, 829–834 (2007).
142. Veit, T. D. & Chies, J. A. Tolerance versus immune response -- microRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. *Transpl Immunol* **20**, 229–231 (2009).
143. Castelli, E. C. *et al.* In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. *Hum Immunol* **70**, 1020–1025 (2009).
144. Dong, Y. *et al.* Tumor suppressor functions of miR-133a in colorectal cancer. *Mol Cancer Res* **11**, 1051–1060
145. Pavan, L. *et al.* Human invasive trophoblasts transformed with simian virus 40 provide a new tool to study the role of PPARgamma in cell invasion process. *Carcinogenesis* **24**, 1325–1336 (2003).
146. Real, L. M. *et al.* Expression of HLA G in human tumors is not a frequent event. *Int J Cancer* **81**, 512–518 (1999).
147. Wang, X. & El Naqa, I. M. Prediction of both conserved and nonconserved microRNA targets in animals. *Bioinformatics* **24**, 325–332 (2008).
148. Wang, X. miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *Rna* **14**, 1012–1017 (2008).
149. Chin, J. H. & Hoffman, B. B. Age-related deficit in beta receptor stimulation of cAMP binding in blood vessels. *Mech Ageing Dev* **53**, 111–125 (1990).
150. Rehmsmeier, M., Steffen, P., Hochsmann, M. & Giegerich, R. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *Rna* **10**, 1507–1517 (2004).
151. Lewis, B. P., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**, 15–20 (2005).
152. Bukur, J. *et al.* Functional role of human leukocyte antigen-G up-regulation in renal cell carcinoma. *Cancer Res* **63**, 4107–4111 (2003).
153. Lichtenfels, R., Ackermann, A., Kellner, R. & Seliger, B. Mapping and expression pattern analysis of key components of the major histocompatibility complex class I antigen processing and presentation pathway in a representative human renal cell carcinoma cell line. *Electrophoresis* **22**, 1801–1809 (2001).

154. Seliger, B. *et al.* Ubiquitin COOH-terminal hydrolase 1: a biomarker of renal cell carcinoma associated with enhanced tumor cell proliferation and migration. *Clin Cancer Res* **13**, 27–37 (2007).
155. Herrmann, F., Trowsdale, J., Huber, C. & Seliger, B. Cloning and functional analyses of the mouse tapasin promoter. *Immunogenetics* **55**, 379–388 (2003).
156. Chen, C. *et al.* Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **33**, e179 (2005).
157. Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E. F. & Hellens, R. P. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods* **3**, 12 (2007).
158. Stehle, F. *et al.* Reduced immunosuppressive properties of axitinib in comparison with other tyrosine kinase inhibitors. *J Biol Chem* **288**, 16334–16347
159. Kruger, J. & Rehmsmeier, M. RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acids Res* **34**, W451–4 (2006).
160. Bukur, J., Herrmann, F., Handke, D., Recktenwald, C. & Seliger, B. Identification of E2F1 as an important transcription factor for the regulation of tapasin expression. *J Biol Chem* **285**, 30419–30426
161. Haraguchi, T., Ozaki, Y. & Iba, H. Vectors expressing efficient RNA decoys achieve the long-term suppression of specific microRNA activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **37**, e43 (2009).
162. Braun, J., Misiak, D., Busch, B., Krohn, K. & Huttelmaier, S. Rapid identification of regulatory microRNAs by miTRAP (miRNA trapping by RNA in vitro affinity purification). *Nucleic Acids Res* **42**, e66
163. Jasinski-Bergner, S. *et al.* Identification of 14-3-3beta gene as a novel miR-152 target using a proteome-based approach. *J Biol Chem* **289**, 31121–31135
164. Kononen, J. *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* **4**, 844–847 (1998).
165. Candiano, G. *et al.* Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* **25**, 1327–1333 (2004).
166. Zeeberg, B. R. *et al.* GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome Biol* **4**, R28 (2003).
167. Joglekar, M. V, Parekh, V. S. & Hardikar, A. A. New pancreas from old: microregulators of pancreas regeneration. *Trends Endocrinol Metab* **18**, 393–400 (2007).
168. Weiss, E. H. *et al.* HLA class-I-transgenic mice as model system to study MHC-restricted antigen recognition in man. *Scand J Rheumatol Suppl* **87**, 91–96 (1990).
169. Boucherma, R. *et al.* HLA-A*01:03, HLA-A*24:02, HLA-B*08:01, HLA-B*27:05, HLA-B*35:01, HLA-B*44:02, and HLA-C*07:01 monochain transgenic/H-2 class I null mice: novel versatile preclinical models of human T cell responses. *J Immunol* **191**, 583–593
170. Gonen-Gross, T. *et al.* The CD85J/leukocyte inhibitory receptor-1 distinguishes between conformed and beta 2-microglobulin-free HLA-G molecules. *J Immunol* **175**, 4866–4874 (2005).
171. Howangyin, K. Y. *et al.* Multimeric structures of HLA-G isoforms function through differential binding to LILRB receptors. *Cell Mol Life Sci* at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22802125>

172. Ooi, C. H. *et al.* A densely interconnected genome-wide network of microRNAs and oncogenic pathways revealed using gene expression signatures. *PLoS Genet* **7**, e1002415
173. Kulkarni, S. *et al.* Differential microRNA regulation of HLA-C expression and its association with HIV control. *Nature* **472**, 495–498
174. Takihara, Y., Matsuda, Y. & Hara, J. Role of the beta isoform of 14-3-3 proteins in cellular proliferation and oncogenic transformation. *Carcinogenesis* **21**, 2073–2077 (2000).
175. Liu, T. A. *et al.* Increased expression of 14-3-3beta promotes tumor progression and predicts extrahepatic metastasis and worse survival in hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* **179**, 2698–2708
176. Dweep, H., Sticht, C., Pandey, P. & Gretz, N. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by 'walking' the genes of three genomes. *J Biomed Inform* **44**, 839–847
177. Gardino, A. K. & Yaffe, M. B. 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis. *Semin Cell Dev Biol* **22**, 688–695
178. Hermeking, H. The 14-3-3 cancer connection. *Nat Rev Cancer* **3**, 931–943 (2003).
179. Nomura, M. *et al.* 14-3-3 Interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax. *J Biol Chem* **278**, 2058–2065 (2003).
180. Zhao, J., Meyerkord, C. L., Du, Y., Khuri, F. R. & Fu, H. 14-3-3 proteins as potential therapeutic targets. *Semin Cell Dev Biol* **22**, 705–712
181. Bukur, J. & Seliger, B. The role of HLA-G for protection of human renal cell-carcinoma cells from immune-mediated lysis: implications for immunotherapies. *Semin Cancer Biol* **13**, 353–359 (2003).
182. Dillhoff, M., Wojcik, S. E. & Bloomston, M. MicroRNAs in solid tumors. *J Surg Res* **154**, 349–354 (2009).
183. Schmitt, M. J. *et al.* Interferon-gamma-induced activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) up-regulates the tumor suppressing microRNA-29 family in melanoma cells. *Cell Commun Signal* **10**, 41
184. Kong, W. *et al.* MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Mol Cell Biol* **28**, 6773–6784 (2008).
185. Liu, S., Howell, P. M. & Riker, A. I. Up-regulation of miR-182 expression after epigenetic modulation of human melanoma cells. *Ann Surg Oncol* **20**, 1745–1752
186. Cheng, M. *et al.* A microRNA-135a/b binding polymorphism in CD133 confers decreased risk and favorable prognosis of lung cancer in Chinese by reducing CD133 expression. *Carcinogenesis* **34**, 2292–2299
187. Liu, M. E. *et al.* A functional polymorphism of PON1 interferes with microRNA binding to increase the risk of ischemic stroke and carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* **228**, 161–167
188. Mopidevi, B., Ponnala, M. & Kumar, A. Human angiotensinogen +11525 C/A polymorphism modulates its gene expression through microRNA binding. *Physiol Genomics* **45**, 901–906
189. Wang, W. *et al.* A miR-570 binding site polymorphism in the B7-H1 gene is associated with the risk of gastric adenocarcinoma. *Hum Genet* **132**, 641–648
190. Mishra, P. J., Humeniuk, R., Longo-Sorbello, G. S., Banerjee, D. & Bertino, J. R. A miR-24 microRNA binding-site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13513–13518 (2007).

191. Bruno, A. E. *et al.* miRdSNP: a database of disease-associated SNPs and microRNA target sites on 3'UTRs of human genes. *BMC Genomics* **13**, 44
192. Li, B. L. *et al.* Characterization of HLA-G expression in renal cell carcinoma. *Tissue Antigens* **74**, 213–221 (2009).
193. Yie, S. M. & Hu, Z. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) as a marker for diagnosis, prognosis and tumor immune escape in human malignancies. *Histol Histopathol* **26**, 409–420
194. Donadi, E. A. *et al.* Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cell Mol Life Sci* **68**, 369–395
195. Ferguson, R. *et al.* Human leukocyte antigen G polymorphism is associated with an increased risk of invasive cancer of the uterine cervix. *Int J Cancer* **131**, E312–9
196. Jiao, J., Herl, L. D., Farese, R. V & Gao, F. B. MicroRNA-29b regulates the expression level of human progranulin, a secreted glycoprotein implicated in frontotemporal dementia. *PLoS One* **5**, e10551
197. Tuncel, T. *et al.* Immunoregulatory function of HLA-G in gastric cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* **14**, 7681–7684
198. Giraldo, N. *et al.* Orchestration and Prognostic Significance of Immune Checkpoints in the Microenvironment of Primary and Metastatic Renal Cell Cancer. *Clin Cancer Res* at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=25688160
199. Diao, S. *et al.* Proteomic identification of microRNA-122a target proteins in hepatocellular carcinoma. *Proteomics* **10**, 3723–3731
200. Liu, J., Valencia-Sanchez, M. A., Hannon, G. J. & Parker, R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* **7**, 719–723 (2005).
201. Liu, S., Howell, P., Ren, S., Fodstad, O. & Riker, A. I. The 14-3-3sigma gene promoter is methylated in both human melanocytes and melanoma. *BMC Cancer* **9**, 162 (2009).
202. Mai, T. *et al.* Induction of activation-induced cytidine deaminase-targeting adaptor 14-3-3gamma is mediated by NF-kappaB-dependent recruitment of CFP1 to the 5'-CpG-3'-rich 14-3-3gamma promoter and is sustained by E2A. *J Immunol* **191**, 1895–1906
203. Neal, C. L. & Yu, D. 14-3-3zeta as a prognostic marker and therapeutic target for cancer. *Expert Opin Ther Targets* **14**, 1343–1354
204. Nishimura, Y. *et al.* Overexpression of YWHAZ relates to tumor cell proliferation and malignant outcome of gastric carcinoma. *Br J Cancer* **108**, 1324–1331

10. Publikationsliste

1.

Seliger B, **Jasinski S**, Dressler SP, Marincola FM, Recktenwald CV, Wang E, Lichtenfels R.
 „Linkage of microRNA and proteome-based profiling data sets: a perspective for the prioritization of candidate biomarkers in renal cell carcinoma?“
 J Proteome Res. 2011 Jan 7;10(1):191-9. doi: 10.1021/pr1011137. PMID: 21142213

2.

Bukur J, **Jasinski S**, Seliger B.
 “The role of classical and non-classical HLA class I antigens in human tumors.”
 Semin Cancer Biol. 2012 Aug;22(4):350-8. doi: 10.1016/j.semcancer. 2012.03.003. Epub 2012 Mar 24. Review.
 PMID: 22465194

3.

Quandt D, **Jasinski-Bergner S**, Müller U, Schulze B, Seliger B.
 “Synergistic effects of IL-4 and TNF α on the induction of B7-H1 in renal cell carcinoma cells inhibiting allogeneic T cell proliferation.”
 J Transl Med. 2014 May 30;12:151. doi: 10.1186/1479-5876-12-151. PMID: 24885059

4.

Jasinski-Bergner S, Mandelboim O, Seliger B.
 “The Role of MicroRNAs in the Control of Innate Immune Response in Cancer.”
 J Natl Cancer Inst. 2014 Sep 12;106(10). pii: dju257. Print 2014 Oct. Review. PMID: 25217579

5.

Jasinski-Bergner S, Stehle F, Gonschorek E, Kalich J, Schulz K, Huettelmaier S, Braun J, Seliger B.
 “Identification of 14-3-3 β as a novel miR-152 Target using a Proteome-based Approach.”
 J Biol Chem. 2014 Sep 16. pii: jbc.M114.556290. [Epub ahead of print] PMID: 25228695

6.

Jasinski-Bergner S, Stoehr C., Bukur J., Massa C., Braun J., Huettelmaier S., Spath V., Wartenberg R., Legal W. Taubert H., Wach S., Wullich B., Hartmann A., Seliger B.
 “Clinical relevance of miR-mediated HLA-G regulation and the associated immune cell infiltration in renal cell carcinoma.”
Oncoimmunology akzeptiert im Januar 2015: 2014ONCOIMM0373

7.

Rothe K., Quandt D., Schubert K., Rossol M., Klingner M., **Jasinski-Bergner S**., Scholz R., Seliger B., Pierer M, Baerwald C., Wagner U.
 “Latent CMV infection in rheumatoid arthritis increases frequencies of cytolytic LIR-1+ CD8+ T cells“
Arthritis & Rheumatology in Revision

11. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.	
Schematische Darstellung der Antigen-Prozessierung und Assemblierung der HLA-Klasse I-Moleküle	S. 5
Abbildung 1.2.	
Schematische Darstellung der 7 verschiedenen Spleißvarianten der HLA-G-mRNA, sowie der resultierenden HLA-G-Proteine	S. 8
Abbildung 1.3.	
Regulation der HLA-G-Expression.....	S. 10
Abbildung 1.4.	
Transkription, Prozessierung und biologische Aktivität von miRs	S. 16
Abbildung 1.5.	
Sequentieller Abgleich von miR-152, -148A und -148B mit deren Bindungsstelle an der HLA-G-mRNA	S. 18
Abbildung 4.1.	
Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs der Luziferase-Reportergen-Assays	S. 35
Abbildung 4.2.	
Schematische Darstellung des miTRAP-Experimentes	S. 37
Abbildung 4.3.	
Der Aufbau eines <i>Tissue microarrays</i> und die geplanten Experimente	S. 38
Abbildung 4.4.	
Ablauf der 2D-Gelelektrophorese in Kombination mit Proteomanalyse und nachgeschalteter Identifizierung der differentiell-exprimierten Proteine mit der Massenspektrometrie	S. 41
Abbildung 5.1.	
Untersuchung der HLA-G-Expression bzw. der Expression von HLA-G-regulierenden miRs in ausgewählten RCC-Zelllinien	S. 44
Abbildung 5.2.	
Nachweis der direkten Interaktion zwischen dem HLA-G-3'-UTR und den HLA-G-regulierenden miRs	S. 48
Abbildung 5.3.	
Vergleich der Sequenzen der verwendeten HLA-G-Luziferase-Reportergen-Konstrukte	S. 49

Abbildung 5.4.	
Rekonstitution der miR-152-Expression in miR-152-defizienten JEG-3-Zellen	S. 50
Abbildung 5.5.	
HLA-G-abhängige <i>in vitro</i> Cytotoxizitäts-Experimente	S. 52
Abbildung 5.6.	
Charakterisierung der Expression von miR-548q und miR-628-5p in ausgewählten Zelllinien.....	S. 54
Abbildung 5.7.	
Charakterisierung der miR-548q und miR-628-5p Bindungsstellen am HLA-G 3'-UTR.....	S. 56
Abbildung 5.8.	
Stabile Überexpression der miR-548q und miR-628-5p in den HLA-G ⁺ JEG-3-Zellen	S. 57
Abbildung 5.9.	
Vergleich der Expression der HLA-G-regulierenden miRs in ausgewählten NZK-Tumoren.....	S. 62
Abbildung 5.10.	
Korrelation der HLA-G-Expression mit der Immunzellinfiltration in NZK-Tumoren	S. 64
Abbildung 5.11.	
Korrelation zwischen der Präsenz von TILs und der HLA-G-Expression mit den krankheitsspezifischen Überlebensdaten von NZK-Patienten, visualisiert als Kaplan-Meier-Plots	S. 66
Abbildung 5.12.	
Nachweis der Funktionalität der miR-152-Überexpression	S. 67
Abbildung 5.13.	
Visuelle Auswertung der 2D-Polyacrylamidgele.....	S. 68
Abbildung 5.14.	
<i>Annotation-Clustering</i> der differentiell-exprimierten Gene.....	S. 70
Abbildung 5.15.	
Validierung der miR-152-abhängigen Herunterregulation von 14-3-3 β	S. 71
Abbildung 5.16.	
Nachweis der direkten Interaktion zwischen der miR-152 und dem 14-3-3 β -3'-UTR	S. 72
Abbildung 5.17.	
Rekonstitution der 14-3-3 β -Expression in den 14-3-3 β -defizienten JEG-3-Transfektanden mit miR-152-Überexpression durch stabile Transfektion eines 14-3-3 β -Expressionsplasmides für funktionale Analysen.....	S. 74

Abbildung 5.18.	
Einfluss von 14-3-3 β auf die Proliferation und die Zellzyklusregulation.....	S. 76
Abbildung 5.19.	
Kaplan-Meier-Kurven von cDNA- <i>microarray</i> -Daten (Transkriptdaten) aus Tumorproben (<i>in vivo</i>) bezüglich der Korrelation der HLA-G- und der 14-3-3 β -Expression mit den Überlebensdaten der Patienten verschiedener Tumorentitäten	S. 78
Abbildung 6.1.	
Schematische Darstellung der posttranskriptionalen Genregulation von aktivierenden und inhibierenden Immunzellrezeptor-Liganden auf Zielzellen im Kontext mit NK-Zellen.....	S. 82
Abbildung 6.2.	
Der Wirkung von 14-3-3 β auf die Regulation des Zellzyklus.....	S. 87
Abbildung 6.3.	
Schematische Darstellung der dualen Funktion der Tumor-suppressiven miR-152	S. 88

12. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1.	
Gegenüberstellung wesentlicher Unterschiede zwischen HLA-G- und HLA-Klasse Ia-Molekülen	S. 9
Tabelle 1.2.	
Auswahl verschiedener Tumorentitäten und Charakterisierung der HLA-G-Expression hinsichtlich des diskordanten Expressionsmusters von HLA-G-mRNA zu HLA-G-Protein.....	S. 11
Tabelle 1.3.	
Tabellarische Zusammenfassung klinischer Studien zur verminderten Expression von HLA Ia und ausgewählter APM-Komponenten.....	S. 13
Tabelle 1.4.	
Charakterisierung von Nierenzellkarzinom-Zelllinien hinsichtlich der konstitutiven Expression von HLA-G- mRNA und -Protein	S. 17
Tabelle 4.1.	
Auflistung der verwendeten stabilen Transfektanten.....	S. 31
Tabelle 5.1.	
Validierung der miR-microarray-Daten mittels qPCR.....	S. 53
Tabelle 5.2.	
Zusammenfassung der Charakteristika der Patienten und der NZK-Tumoren der verwendeten Tissue microarrays.....	S. 58
Tabelle 5.3.	
Auflistung von 72, zur späteren miR-Quantifizierung ausgewählten, NZK-Gewebeschnitten (36 HLA-G ⁻ und 36 HLA-G ⁺)	S. 59
Tabelle 5.4.	
Korrelation der HLA-G-Expression mit dem Tumorgrading bei NZK-Tumoren.....	S. 61
Tabelle 5.5.	
Zusammenfassung der 24 differentiell-regulierten Proteine nach miR-152-Überexpression in JEG 3-Zellen.....	S. 69
Tabelle 6.1.	
Zusammenfassung aller bekannten aktivierenden und inhibierenden NK-Zellrezeptoren und ihrer Liganden, sowie deren jeweilige chromosomale Lokalisierung	S. 83

13. Abkürzungsverzeichnis

°C, Grad Celsius; Δ , deletierter 3'-UTR; Φ , kein 3'-UTR; 14-3-3 Protein *beta/ alpha/ YWHAB, tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide*; 7-AAD, (7-amino-actinomycin D); ACP, antitumorales Peptid; ACTB, beta-Aktin; AMP, antimikrobielles Peptid; Ak, Antikörper; APC, Antigen-präsentierende Zelle; B2M, beta-2-Mikroglobulin; B7-H1, *B7 homolog 1*; β -gal, beta-Galaktosidase; BAD, *BCL2-associated agonist of cell death*; BAX, *BCL2-associated X protein*; BCR, B-Zellrezeptor; bp, Basenpaare; bzw., beziehungsweise; c, Konzentration; CALR, Calretikulin; CANX, Calnexin; cDNA, komplementäre DNA; ccRCC, klarzelliges Nierenzellkarzinom; CCD, *Charge-coupled Device*; CDK, Zyklin-abhängige Kinase; CDS, kodierende Sequenz; CFSE, *carboxyfluorescein succinimidyl ester*; CLR, C-Typ-Lektin-Rezeptor; COPZ2, *coatamer protein complex, subunit zeta 2*; CRP, C-reaktives Protein; CTL, cytotoxischer T-Lymphozyt; DAC, *5'-aza-2'-desoxycytidine*; DAB, *3,3'-diaminobenzidine*; DC, dendritische Zelle; ddH₂O, doppelt-destilliertes Wasser; DGCR8, *DiGeorge syndrome critical region gene 8*; d.h., das heißt; DMSO, Dimethylsulfoxid; DNA, Desoxyribonukleinsäure; dpi, *dots per inch*; DTT, Dithiothreitol; EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure; ER, endoplasmatisches Retikulum ; ERAAP, *ER aminopeptidase associated with antigen processing*; etc., et cetera; FITC, Fluoresceinisothiocyanat; FKS, fötales Kälberserum; g, Gramm; GAPDH, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*; GmbH, Gesellschaft mit beschränkter Haftung; HEPES, Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure; HIF-1 α , *hypoxia-inducible factor 1 alpha* ; HLA, *human leucocyte antigen* ; HLA-G, *human leukocyte antigen G*; HRP, Meerrettich-Peroxydase; li, invariante Kette; IEF, isoelektrische Fokussierung; Ig, Immunglobulin; IHC, Immunhistochemie; IL-1, Interleukin-1; IL-2, Interleukin-2; IL-10, Interleukin 10; ILT2, *immunoglobulin-like transcript 2*; ILT4, *immunoglobulin-like transcript 4*; IFN- γ , Interferon gamma; k, kilo; l, Liter; LAK, Lymphokin-aktivierte Killerzellen; LMP2/7/10, *low molecular weight protein 2/7/10*; LPS, Lipopolysaccharide; Luz., Luziferase; mAk, monoklonaler Antikörper; MBL, Mannose-bindende Lektin; MCS, *multiple cloning site*; MDSC, *myeloid-derived suppressor cell*; MFI, *mean specific fluorescence intensities*; MHC, Haupthistokompatibilitätskomplex; MIIC, MHC II-Kompartiment; min, Minuten; miR, microRNA; miTRAP, *microRNA Trapping by RNA Affinity Purification*; mRNA, *messenger RNA*; n.d., nicht determiniert; NIH, *National Institutes of Health*; NK, natürliche Killerzellen; NKCR, NK-Zellrezeptor; NKCR-L, NK-Zellrezeptorliganden; NLR, NOD-ähnlicher Rezeptor; NO, Stickstoffmonoxid; nt, Nukleotide, ntc., *non-template control*; NZK, Nierenzellkarzinom; PAGE, Polyacrylamidgelelektrophorese; PAMPs, Pathogen-assoziierte molekulare Muster; PBLs, periphere Blutlymphozyten; P-bodies, *processing bodies*; PCR, Polymerasekettenreaktion; PE,

Phycoerythrin; PRRs, Mustererkennungsrezeptoren; qPCR, quantitative PCR; ®, registrierte Warenmarke; RBP, RNA-bindendes Protein; RCC, Nierenzellkarzinom; RISC, *RNA-induced silencing complex*; RLR, RIG-I-ähnliches Protein; RNA, Ribonukleinsäure; rpm, Umdrehungen pro Minute; RREP-1, *ras-responsive element binding protein 1*; S., Seite; SDS, Natriumdodecylsulfat; sHLA-G, solubles HLA-G; SNP, *single nucleotide polymorphism*; SR, Scavenger-Rezeptor; t, Zeit; TAA, Tumor-assoziiertes Antigen; TAP1, *Transporter associated with Antigen Processing 1*; TAP2, *Transporter associated with Antigen Processing 2*; TCR, T-Zellrezeptoren; TEMED, Tetramethylethylendiamin; TGF- β , *transforming growth factor β* ; TKI, Tyrosinkinase-Inhibitor; TLR, Toll-ähnlicher Rezeptor; TMA, *Tissue microarray*; TNF- α , Tumornekrosefaktor-alpha; TPN, Tapasin; T_{reg}, regulatorische T-Zelle; TM, unregistrierte Warenmarke; Tris, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan; U, units; u. a., unter anderem; UTR, untranslatierte Region; u. U., unter Umständen; V, Volumen; w, *weight*; WB, Western Blot; WHO, *World Health Organization*; WT, Wildtyp; XPO5, Exportin-5; z. B., zum Beispiel; z. T., zum Teil

14. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe und diese Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Außerdem habe ich die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Halle/Saale, den 12.03.2015

15. Lebenslauf**Name:** Simon Jasinski-Bergner**geboren am:** 03.09.1983 in Lutherstadt Wittenberg**Anschrift:** Delitzscher Str. 17, 04519 Rackwitz**Familienstand:** verheiratet mit Juliane Bergner (Diplom-Biologin)**Schulbildung:**

1990-1994 „Grundschule Am Lerchenberg“ in Lutherstadt Wittenberg

1995-2003 „Martin-Luther-Gymnasium“ in Lutherstadt Wittenberg

Zivildienst:

2003-2004 Evangelisches Krankenhaus „Paul Gerhardt Stift“ in Lutherstadt Wittenberg

Hochschulbildung:2004-2009 „Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg“, Studium der Biochemie (Diplom),
Abgeschlossen mit dem Diplom in Biochemie
mehrmonatige Arbeit als studentische Hilfskraft am Leibniz-Institut für
Pflanzenbiochemie in Halle (AG Prof. Wasternack)
sechswöchiges Forschungsgruppenpraktikum an der Max-Planck-
Forschungsstelle "Enzymologie der Proteinfaltung" (Prof. Fischer) in Halle
(Saale)2010-2015 Promotion am Institut für Medizinische Immunologie an der Martin-Luther-
Universität bei Frau Prof. Seliger**Sonstiges:** Erwerb des Scheins: "Tierschutz, Versuchstierkunde und tierexperimentelles
Arbeiten"**Teilnahme an nationalen und internationalen *Meetings*:**Konferenzen: 2010: "Tumor Immunology meets Oncology VI", Halle
2011: "Tumor Immunology meets Oncology VII", Halle (**Vortrag**)
2012: "Tumor Immunology meets Oncology VIII", Halle
2012: "Posttranscriptional Control of Gene Expression –
Mechanisms and Role in Pathogenesis", Halle (**Poster**)
2012: "Antigen Processing and Presentation in Health and
Disease", Luxembourg (**Poster**)
2013: "Tumor Immunology meets Oncology IX", Halle
2014: 4. Symposium „Klinische und experimentelle Forschung beim
Nierenzellkarzinom“, Saarbrücken (**Vortrag**)
2014: „microRNAs and Immune System“, Zürich, Schweiz
2014: "Tumor Immunology meets Oncology X", Halle
2014: "Symposium on Novel Applications of Deep Sequencing in Medicine,
Genomics, and Biodiversity Research", Halle

16. Danksagung

Diese Dissertation wurde im Zeitraum von April 2010 bis März 2015 am Institut für Medizinische Immunologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung der Institutsdirektorin Frau Prof. Barbara Seliger angefertigt. Ich möchte mich im Folgenden bei Personen bedanken, ohne deren Hilfe und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich möchte Frau Prof. Barbara Seliger für die Überlassung des Themas, für die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Dissertation vom Beginn an, für die Möglichkeit eigene Ideen einzubringen und für die wunderbare Betreuung danken. Die vielen Diskussionen auch außerhalb des Institutes, sowohl projektbezogen, als auch allgemein-wissenschaftlicher Natur, habe ich stets mit großem Interesse geführt.

Außerdem möchte ich mich bei den folgenden Post-Doktoranden des Institutes für Medizinische Immunologie bedanken, ohne deren direkte experimentelle Beteiligung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Frau Dr. Franziska Stehle ("Franzi") möchte ich für die Unterstützung bei der Identifizierung weiterer miR-152-regulierter Gene und für die freundschaftliche Zusammenarbeit am Institut sowie für die tolle Zeit danken.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Dr. Jürgen Bukur bedanken für das Erlernen molekularbiologischer und immunologischer Techniken, sowie für die Möglichkeit bei experimentellen Fragestellungen von seinen umfangreichen praktischen und theoretischen Erfahrungen zu profitieren.

Außerdem möchte ich Frau Dr. Dagmar Quandt danken, dass ich in Kooperation Einblicke in andere immunologisch sehr interessante Projekte gewinnen konnte.

Ferner möchte ich mich bei Peter, Eva, Marian und Falk den Medizin-Doktoranden und Studenten, mit denen ich zusammengearbeitet habe, bedanken.

Des Weiteren danke ich Nicole, Kristin, Jana, Claudia, Jette, André, Corinna, Antje und allen anderen Kollegen und ehemaligen Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Immunologie für die tolle Zusammenarbeit und für die angenehme Atmosphäre.

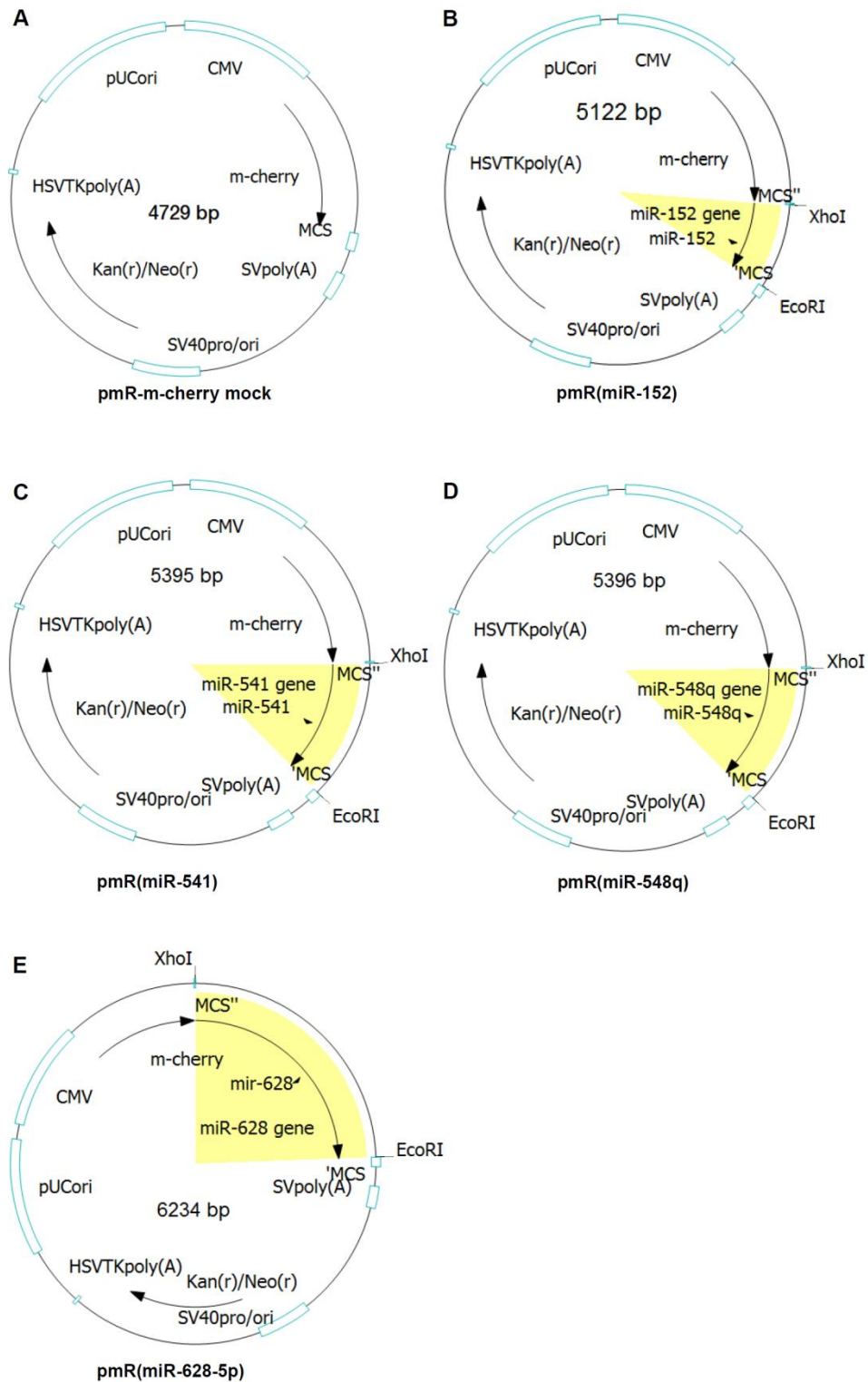
Für die Möglichkeit dem GRK1591 ("*Posttranscriptional control of gene expression: mechanisms and role of pathogenesis*") als Stipendiat und als Assoziierter anzugehören möchte ich Herrn Prof. Stefan Hüttelmaier und allen anderen Mitgliedern danken. Die Gelegenheiten meine Daten regelmäßig zu präsentieren, mit anderen Wissenschaftlern zu diskutieren, mich mit anderen Doktoranden auszutauschen, Experimente und experimentelle Techniken aus anderen Arbeitsgruppen zu erlernen, nationale und internationale Konferenzen zu besuchen und Erfahrungen zu gewinnen waren eine enorme Bereicherung.

Auch möchte ich allen Koautoren, den externen Kooperationspartnern und meinen Gutachtern meinen Dank aussprechen.

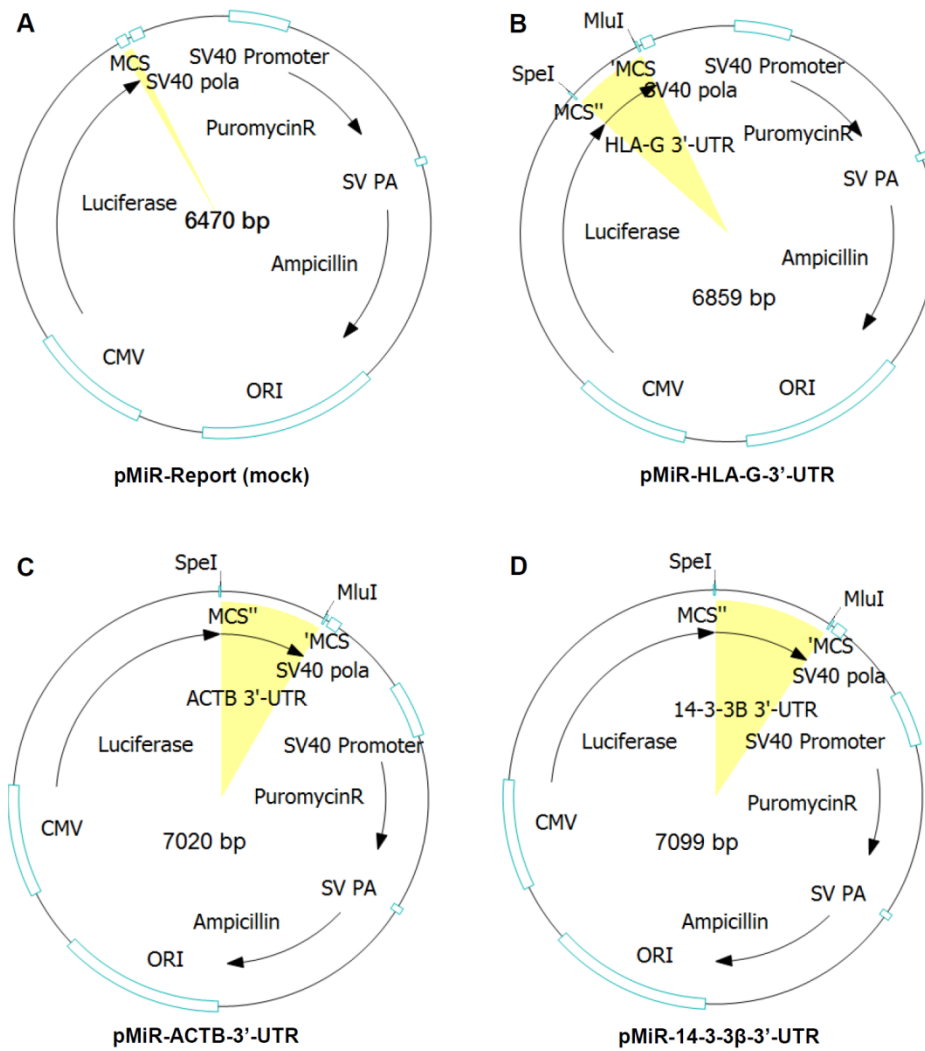
Besonders möchte ich meiner Familie danken, meiner Frau Juliane, meinen Kindern Marlon und Annabelle, meiner Mutter und meinen Schwiegereltern sowie allen anderen für die Hilfe, die Unterstützung und das Verständnis bezüglich der langen Arbeitszeiten.

17. Anhang

17.1. Plasmidkarten der miR-Expressionsvektoren



17.2. Plasmidkarten der Luziferase-Reportergenkonstrukte



17.3. Plasmidkarten der Expressionsvektoren

