

**Aus der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie
(Direktorin: Prof. Dr. med. P. Ambrosch)
im Universitätsklinikum Schleswig- Holstein, Campus Kiel
der Christian- Albrechts- Universität zu Kiel**

**Untersuchung der Genexpression in humanen respiratorischen Zellen
nach Stimulation mit *Streptococcus pyogenes***

**Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian- Albrechts- Universität zu Kiel**

**vorgelegt von
Heike Struve
aus Vechta
Kiel 2010**

1. Berichterstatter: PD. Dr. Tibor Görögh
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Jens- Michael Schröder

Tag der mündlichen

Prüfung: 26.10.2010

Zum Druck genehmigt,

Kiel, den: 26.10.2010

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1	1
2	3
3	4
3.1	4
3.1.1	4
3.1.2	5
3.1.3	6
3.2	6
3.3	7
3.4	8
3.5	8
3.6	9
3.6.1	10
3.6.2	10
3.6.3	11
3.7	11
3.7.1	12
3.7.2	12
3.7.3	13
3.7.4	13
3.8	14
3.8.1	14
3.8.2	14
3.8.3	15
3.8.4	15
3.8.5	16
3.9	16
3.9.1	17
3.10	17
3.10.1	17

3.10.2	Northern- Hybridisierung	18
3.10.3	Anlagerung der DNS- Sonde an die mRNS	18
3.10.4	Detektion	18
4	Ergebnisse	20
4.1	Vergleichende Analyse des mRNS- Expressionsmusters	20
4.2	Reamplifikation des differentiell exprimierten Fragmentes	21
4.3	Klonierung des differentiell exprimierten Fragmentes und Transformation des Vektors in kompetente Zellen	22
4.4	Sequenzanalyse und Datenbankvergleich	23
4.5	Northern- Hybridisierung	26
5	Diskussion	27
5.1	Hitzeschockproteine	27
5.1.1	Einteilung der Hitzeschockproteine	28
5.2	HSPs: Universelle Proteine	29
5.3	HSP90	30
5.4	HSP90- Inhibitoren	31
5.5	HSPs und Apoptose	32
5.6	Schlussfolgerung	35
6	Zusammenfassung	36
7	Literaturverzeichnis	37
8	Danksagung	48
9	Lebenslauf	49

Abkürzungen

A	Adenin
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytidin
CDK	Cyclin- dependent kinase
CKI	Cyklin- kinase- inhibitor
DATP	Desoxyadenosintriphosphat
DDRT-PCR	Differential Display Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamin Tetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
FCS	Fetal Calf Serum
FISH	Fluoreszenz In Situ Hybridisierung
G	Guanin
HSP	Hitzeschockprotein
GF	Growth Factor
LOH	Loss of Heterozygosity
MEM	Minimal Essential Medium
MOPS	3- (N- Morpholino)- propansulfonsäure
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphate- Buffered- Saline
mRNS	messenger- Ribonucleinsäure
rpm	Rotation per minute
SDS	Sodiumdodecylsulphate
SSC	Sodiumsalt Citrate
T	Thymin
TAE	Tris- Acetat Ethylendiamin- Tetraessigsäure
TBE	Tris- Borsäure Ethylendiamin- Tetraessigsäure
TEMED	N,N,N,N'- Tetramethylethylendiamin

TSB	Trypticase- Soy- Broth
UV	Ultra Violet
x-Gal	5- Bromo- 4-Chloro- 3- Indolyl- B- D- Galaktopyranosid

1. EINLEITUNG

Im Allgemeinen versteht man unter einer Infektion die Vermehrung eines Mikroorganismus (Bakterien, Viren, Pilze) in einem Makroorganismus. So kommt der Mensch nach seiner Geburt mit einer Reihe von Mikroorganismen in Kontakt und enthält schließlich ca. 10-mal so viele Bakterienzellen wie Körperzellen vorhanden sind (Nicholson et al. 2004). Eine Infektionskrankheit hingegen ist eine Infektion, die zu nachweisbaren klinischen Symptomen führt und mit Schädigungen von Wirtsgeweben und Veränderungen in der Physiologie des Wirtes assoziiert ist (Domann et al. 2008).

Die Tonsillopharyngitis gehört zu den häufigsten Gründen für das Aufsuchen eines Arztes für Allgemeinmedizin bzw. für HNO-Erkrankungen. Sie zeigt einen Häufigkeitsgipfel im Alter von 4-7 Jahren, allerdings ist die Erkrankung auch in allen anderen Altersstufen im Rahmen von Klein- und Großepidemien nachzuweisen (Gerber et al. 1992, Huovinen et al. 1989). Einige der wichtigsten Erreger weisen neben der saisonalen Häufung auch eine Assoziation mit dem Alter der Patienten auf. So sind Adenoviren bei Kindern zwischen sechs Monaten und fünf Jahren die häufigsten Auslöser einer Pharyngitis, Entsprechendes gilt für *Streptococcus pyogenes* in der Altersgruppe der 5-12-jährigen Kinder und für Mykoplasmen bei Jugendlichen und Erwachsenen (Bisno 2001).

Streptococcus pyogenes der Gruppe A gehört zu den häufigsten bakteriellen Erregern von Infektionen der Haut und des Respirationstraktes. Racheninfektionen durch A-Streptokokken überwiegen in den gemäßigten Zonen, während in tropischen Ländern den Hautinfektionen die größte Bedeutung zukommt. Neben diesen eher weniger bedrohlichen Infektionen sind Streptokokken der Gruppe A aber auch Erreger wesentlich invasiverer Erkrankungen wie dem rheumatischem Fieber, der Glomerulonephritis oder der nekrotisierenden Faszitis mit toxischen Verlaufsformen, dem Streptokokken-Toxic-Shock-Syndrom (Hahn et al. 1999).

Ob sich eine Infektion etablieren oder verhindert werden kann hängt von verschiedenen Faktoren ab. Von Seiten des Keimes tragen dazu spezifische Eigenschaften bei, die als Pathogenitätsfaktoren bezeichnet werden und von Seiten des Wirtes spielen Abwehrmechanismen, die spezifisch oder unspezifisch auftreten können, eine maßgebliche Rolle (Domann et al. 2004). Zu diesem Abwehrsystem gehören neben physikalischen und

chemischen Hindernissen, die Fähigkeit zur Phagozytose, Fieber, sowie die Freisetzung verschiedener Substanzen wie z. B. das Komplementsystem, Interferone, Lysozym und β -Lysin (Kreutzig 1997). Eine weitere Möglichkeit, sich gegen pathogene Erreger zu wehren, besteht in der Expression induzierbarer antimikrobieller Peptide nach Einwirken infektiöser Reize. Zu diesen antimikrobiellen Peptiden gehören z.B. humane β -Defensine, RNase-7, AP LL-37, oder Psoriasin (Harder et al. 1997, 2000, 2001, 2002; Garcia et al. 2001; Frohm et al. 1997; Glaser et al. 2005).

Um molekulare Vorgänge zu analysieren, wie die Zellen auf infektiöse Reize reagieren, wurden im Folgenden respiratorische Epithelzellen mit *Streptococcus pyogenes* stimuliert. Respiratorische Epithelzellen wurden als Zell- Modell gewählt, weil sie die erste Barriere gegen Pathogene darstellen und, über ihre Funktion in der angeborenen (unspezifischen) Immunität jedoch noch wenig bekannt ist. Aufgrund seiner Häufigkeit als Erreger von Infektionen der oberen Atemwege wurde *Streptococcus pyogenes* als infektiöser Reiz gewählt.

Zur Beantwortung der Frage, wie die Zellen auf den Kontakt mit *Streptococcus pyogenes* reagieren, wurde eine vergleichende Genexpressionsanalyse mittels einer PCR- basierenden DNS- Fingerprint- Methode nach Liang und Pardee (1992, 1993) durchgeführt.

Als Ergebnis dieser Untersuchungen ließen sich verschiedene differentiell exprimierte Genabschnitte darstellen, von denen einer in dieser Arbeit näher analysiert wurde.

2. FRAGESTELLUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Vergleich des mRNA- Expressionsstatus von respiratorischen Epithelzellen, die mit *Streptococcus pyogenes* stimuliert waren, mit Zellen gleicher Art ohne Stimulation. Im Besonderen beschränken sich die Untersuchungen auf die Analyse der Überexpression eines Gens in den stimulierten Zellen, welches für ein Hitzeschockprotein (HSP) kodiert. Die dabei zugrunde liegenden Fragen sind folgende:

- Lässt sich der mRNA- Expressionsstatus der untersuchten respiratorischen Zellen mittels der DDRT- PCR- Methode vergleichend analysieren?
- Ist der Nachweis der Überexpression der HSP- mRNA in den stimulierten Zellen reproduzierbar?
- Lässt sich die Spezifität der HSP- mRNA überprüfen und bestätigen?
- Lässt sich ein Zusammenhang herleiten zwischen der Expression der HSP- mRNA und dem biologischem Verhalten respiratorischer Zellen?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Zellkulturen

Die Durchführung des Experimentes erfolgte an respiratorischen Epithelzellen der Zell- Linie A549. Hierbei handelt es sich um eine permanent wachsende Kultur (deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig), die aus einem explantierten Adenokarzinom der Lunge eines 58 Jahre alten kaukasischen Mannes, gewonnen wurde (Giard et al. 1973). Die A549 Zelllinie besitzt die morphologischen und biochemischen Eigenschaften einer pulmonalen Alveolarzelle Typ 2 (Smith und Torday 1977) und zeichnet sich durch adhärentes Wachstum aus.

3.1.1 Subkultivierung der Zellen

Die in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Subkulturen der A549- Zelllinie wurden unter sterilen Bedingungen bei 37 °C aufgetaut und in 10 ml Dulbecco's Eagle Medium (DMEM) überführt. Die Zellen wurden bei 1000rpm 10 min abzentrifugiert (Hettich, Universal 2-Zentrifuge, Tuttlingen), mit Phosphate- Buffered- Salin (PBS)-Lösung (Seromed, Berlin) resuspendiert, erneut abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert, in sterile Kulturflaschen (Falcon, Hamburg) überführt und im Zellbrutschrank (US- Autoflow, Nuair, Plymouth, USA) bei 37°C mit 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Kulturmedium enthielt 9,72g/l Minimal Essence Medium (MEM)- Trockensubstanz (Seromed, Berlin), 0,75g/l Natriumbicarbonat (Merck, Darmstadt), 2,5mg/ml Amphotericin B, 10%(v/v) fetales Kälberserum (FCS) (Seromed, Berlin) und 20U/ml Penicillin + 20mg/ml Streptomycin. Der pH- Wert des Mediums wurde mit 0,1N Natronlauge (Merck, Darmstadt) auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde das Medium in einem Bottle- Filter- system (Costar, Cambridge, USA) steril filtriert. Die angelegten Kulturen wurden für 7 Tage im Brutschrank belassen. Sie wurden lediglich zur Durchführung eines Mediumwechsels, der abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit alle 3-5 Tage erfolgte, herausgenommen. Nach 7 Tagen wurden die Kulturflaschen unter einem inversen Lichtmikroskop (Olympus T- 3, Olympus

Optical, Hamburg) auf Kontamination und homogenes Wachstum überprüft. Nach Erreichen einer Zellkonfluenz von 80-90% wurden die Zellen subkultiviert. Hierzu wurde das Kulturmedium entfernt und die Kultur mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch enzymatische Proteolyse mit 5ml 1%iger Trypsin- Ethylendiamin- Tetraaceticacid-Lösung (Trypsin- EDTA, Gibco BRL) vom Boden der Kulturflasche abgelöst, um dann für 5 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert zu werden. Die Ablösung der Zellen wurde mechanisch durch Schwenken und Klopfen der Flasche bzw. durch Spülen mit der elektrischen Pipette unterstützt, um eine irreversible Zellschädigung durch zu lange Trypsinierung zu vermeiden. Nach mikroskopischer Kontrolle der Zellablösung wurde die Trypsinwirkung sofort durch Zugabe eines gleichen Volumens an MEM mit 10% FCS unterbrochen. Die Zellen wurden resuspendiert und 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. (Hettich, Universal 2- Zentrifuge, Tuttlingen). Das Zellpellet wurde dann mit 3ml Medium pro Flasche (zur weiteren Kultivierung) bzw. 9ml pro 6- Loch- Platte (zur Stimulation) resuspendiert und in neue Flaschen bzw. 6- Loch- Platte (Falcon, Hamburg) ausgesät. Bis zur Stimulation wurden die Zellen maximal zweimal subkultiviert.

3.1.2 Kultivierung von *Streptococcus pyogenes*

Die zur Stimulation verwendeten Bakterien wurden von der Medizinischen Mikrobiologie der Universität Kiel bezogen. Es handelt sich um eine Bakterienkultur der American Type Culture Collection (ATCC), *Streptococcus pyogenes* Rosenbach (ATCC12344), der Lancefield Gruppe A, Typ1; F.Griffith SF130. Die Stammkulturen lagerten bei -70° C als Flüssigkulturen. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C auf Trypticase- SoyBroth (TSB)- Agarplatten im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Kiel. Das TSB- Medium zur Kultivierung von *Streptococcus pyogenes* enthielt 3g Sojamehl- Pepton, 17g Casein- Pepton, 2,5 g Glucose, 5g NaCl, und 2,5g Dikaliumhydrogenphosphat (ad 1l Aqua dest., pH 7,4 mit Salzsäure eingestellt) und wurde nach Hinzufügen von 15g Agar autoklaviert. Die Aufbewahrung der Platten erfolgte bei 4°C im Kühlschrank. Vor den Stimulationsversuchen wurde *Streptococcus pyogenes* in 8ml TSB- Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (250rpm) inkubiert. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten wurde durch das Ausplattieren von Verdünnungsstufen auf TSB- Agar bestimmt. Das TSB- Medium wurde mit *Streptococcus pyogenes* angeimpft, über 12 Stunden unter Schütteln (200rpm) inkubiert

und die Zellzahl anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 620 nm (A_{620}) bestimmt. Es wurde eine A_{620} von 0,2, entsprechend ca. 10^8 Bakterien, eingestellt und diese Suspension nochmals 1:10 in DMEM- Medium verdünnt, um eine Endkonzentration von 10^7 Bakterien/ml zu erhalten. Die Mikroorganismen wurden vor der Stimulation durch 60 minütige Inkubation bei 70°C im Wasserbad abgetötet, für 15 min bei 2000rpm und 4° C abzentrifugiert und in PBS- Puffer (pH 7,4) gewaschen. Außerdem wurde eine Sterilitätskontrolle von *Streptococcus pyogenes* auf Blutagar im Institut für Medizinische Mikrobiologie Kiel durchgeführt.

3.1.3 Stimulationsversuche an Zellkulturen

Bei einer Zellkonfluenz von 60-80% erfolgte die Stimulation. Die zu stimulierenden Zellen wurden vor Beginn des Experimentes in 6- Loch Kulturplatten (Becton Dickinson, Heidelberg) mit 2 ml Medium pro Loch überführt. Um ausschließen zu können, dass im FCS enthaltene, undefinierbare Faktoren die Stimulierbarkeit der Zellen beeinflussen, wurde das Zellmedium zwölf Stunden vor dem Versuch nach zweimaligem Waschen mit PBS durch FCS- freies Medium ersetzt. *Streptococcus pyogenes* wurde in einer Konzentration von 10^7 Bakterien/ml in serumfreiem 0,1% BSA (bovines Serumalbumin)- DMEM aufgenommen und zu den Zellen gegeben, die zuvor nochmals mit PBS gewaschen worden waren. Die Zugabe von BSA sollte eine möglichst unspezifische Wechselwirkung der Stimuli mit den Gefäßwänden verhindern. Die Stimulationszeit betrug 12 Stunden bei 37°C.

3.2 Isolierung der Gesamtzell- RNS

Aus den beiden subkultivierten, mit *Streptococcus pyogenes* stimulierten und den beiden nicht- stimulierten Zellkulturen respiratorischer Zellen, wurde die Gesamt- RNS mittels Trizol Total RNA Kit (Gibco, Ingolstadt) nach Angaben des Herstellers isoliert. Mittels dieser Methode wird die Gewinnung und schonende Lagerung der gesamten RNS aus einer Zellkultur ermöglicht, außerdem können alle unerwünschten Bestandteile wie DNS und Proteine aus der Zellkultur verworfen werden. Zuerst wurde das Inkubationsmedium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS- Puffer gewaschen. Anschließend wurde in jedes Loch einer 6- Loch- Platte 1 ml der Trizol- Lösung gegeben. Durch wiederholtes Auf- und Abziehen mit

einer möglichst kleinlumigen Pipette wurden das Ablösen und die Lyse der Zellen unterstützt. Zu jeweils 1 ml dieses Zell- Lysats wurde nach einer 5 minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur 200µl Chloroform (Merck, Darmstadt) gegeben und für etwa 15 Sekunden gemischt. Die für 2-3 min inkubierten Proben wurden dann für 15 min bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert (Centrifuge 5417 R, Eppendorf Hamburg). Die entstandene obere, wässrige Phase mit RNS, wurde von der unteren Chloroform- Phenol- Phase und der Interphase (Proteine und andere Zellbestandteile) getrennt und in ein neues Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) mit 500µl Isopropanol (Merck, Darmstadt) gegeben. Nach einer 10minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Präzipitation der RNS durch Zentrifugation bei 1200 rpm für 10 min bei 4° C. Nach Entfernung des Überstands wurde das RNS- Präzipitat mit 1ml 75% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (7500 rpm, 5min, 4°C). Das so entstandene Präzipitat konnte in 50µl 50% Formamid (Merck, Darmstadt)-H₂O gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20° C gelagert werden.

3.3 Photometrische Quantitätsbestimmung der RNS- Konzentration

Die RNS- Konzentration der Proben wurde in einem UV- Spektralphotometer (Uvikon 931, Kontron, Neufahrn) gemessen. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Suprasil Präzisionsküvetten aus Quarzglas (Hellma, München) wurden vor jeder Messung durch wiederholtes Spülen mit Aqua dest. und Ethanol gereinigt und dann mit einer Druckluftpistole getrocknet. Vor der ersten Messung erfolgte jeweils eine Eichung des Photometers mit 10 µl 50% Formamid (Merck, Darmstadt). Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes ließ sich aus der ermittelten Absorption die Konzentration der RNS in den Proben errechnen. Das Lambert- Beer'sche Gesetz lässt sich bei konstanter Wellenlänge, konstanter Schichtdicke und gleichbleibender Eingangslichtintensität auf folgende Formel vereinfachen: $C = A \times f \times d$ (C= Konzentration der Probe, A= Absorption, f= Umrechnungsfaktor, d= Pfadlänge). Bei den Messungen betrug f= 0,4.

3.4 Qualitative Kontrolle der RNS mittels Agarose- Gelelektrophorese

Die Überprüfung der Qualität der RNS erfolgte mittels Agarose- Gelelektrophorese. Auf diese Weise können denaturierte Proben, in denen die RNS nur noch in Bruchstücken vorliegt, herausgefiltert werden. Für das Gel wurden 1,5g Agarose (Merck, Darmstadt) und 2ml 50x TAE Puffer (bestehend aus 242g 1M Tris, 54,5g 1M Eisessig und 14,6g 1M EDTA auf einen Liter Aqua dest.) auf 100ml mit Aqua dest. aufgefüllt und anschließend kurz in einer Mikrowelle aufgeköcht. Dann wurden 10 µl einer 1%- igen EthidiumBromidlösung hinzugefügt, welche später der RNS in dem Gel die fluoreszierende Eigenschaft verleiht. Das Gel wurde anschließend in eine Trägerfolie gegossen. Für die Erstellung des Laufpuffers wurden 20ml 50x TAE Puffer auf 1l mit Aqua dest. aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Applikation der Proben auf das Gel (je 5µl Proben mit 1µl 0,1% (w/v) Bromphenolblau (Merck, Darmstadt) vermischt). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte unter einer Spannung von 90 V über 1 Stunde Laufzeit (Horizon 11.14, Gibco, Ingolstadt). Die Auswertung erfolgte mit einem UV- Spektrometer (BioDoc 2, Biometra, Göttingen). Anhand der Banden konnten Rückschlüsse auf die Qualität gezogen werden. Als Parameter dienten die Deutlichkeit der 18 und 28 Svedberg Banden der ribosomalen RNS und die Präsenz atypischer Banden als Hinweis auf unerwünschte Spaltprodukte.

3.5 Reverse Transkription der mRNA

Mittels reverser Transkriptase wurde die isolierte mRNA in cDNA umgeschrieben. Als Primer für die reverse Transkription wurde jeweils eines von 12 Oligonukleotiden mit der Sequenz T11NM gewählt. Hierbei stand N für die Basen Cytosin, Guanin, Adenin und Thymin und M stand für Adenin und Cytosin. Der Oligo- T- Teil der Primer band an den für mRNA-Moleküle spezifischen Poly- A- Schwanz. Durch die Kombinationsmöglichkeiten der variablen Basen N und M ist es möglich, die Gesamt- mRNA, die sich durch ihren, zu den 11 Thymin Basen komplementären, Poly- Adenin- Schwanz auszeichnet, in 12 Unterpopulationen zu untergliedern (Strauss et al. 1994). In dieser Arbeit ist eine der 12 Untergruppen bearbeitet worden. Das hier verwendete Oligonukleotidpaar wurde von MWG-Biotech, Ebersberg, synthetisiert. Für die Durchführung der Transkription wurden zunächst

1µl RNS und 1µl 20µM Oligo- dT Primer mit DEPC Wasser auf 8 µl aufgefüllt und in einem Thermo- Cycler (TE480, Perkin Elmer, Norwalk, USA) durch Erhitzen auf 70 °C denaturiert. Danach wurde die Probe auf Eis gelagert, um eine Renaturierung zu verhindern. In einem zweiten Ansatz (Mastermix) wurde nun in einem weiteren Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg DTT) eine Lösung, bestehend aus 4µl 5x 1st Strand Buffer (Gibco, Ingolstadt), 2µl 0,1 M DTT (Gibco, Ingolstadt), 5µl 2mM dNTPs (Gibco, Ingolstadt) und 1 µl des Enzyms reverser Transkriptase (Superskript, Gibco, Ingolstadt) hergestellt. Diese wurden dann zum ersten Ansatz hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde abschließend im TE 480 Thermocycler (Perkin Elmer, Norwalk, USA) mit Inkubationsschritten behandelt, welche ein Anlagern der Primer an die RNS, eine reverse Transkription und schließlich durch Erhitzen am Ende eine Denaturierung der Enzyme und der Matritzen- DNS bewirkten. Die Lagerung der synthetisierten cDNS- Proben erfolgte bei -27°C.

3.6 Differential Display Reverse Transcription Polymerase chain Reaction (DDRT PCR)

Die cDNS wurde nun im Thermocycler (DNA Thermal Cycler 480, Perkin- Elmer, Norwalk) mittels der Polymerase- Kettenreaktion nach dem Protokoll von Bauer und Mitarbeitern (1993) amplifiziert. Als Primer dienten der in der reversen Transkription verwendete Oligo- T- Primer als 3'- 5'- Primer und jeweils einer von 26 willkürlichen Dekamer- Primern als 5'- 3'- Primer. Jeder der 26 verschiedenen Dekamer Primer lagerte sich während der PCR an für ihn komplementäre Orte der cDNS an und amplifizierte jeweils für ihn spezifische Amplikons. Es wurde jede Primerkombination für jeweils eine PCR mit der cDNS der beiden mit *Streptococcus pyogenes* stimulierten und der beiden nicht- stimulierten A549- Zelllinien verwendet.

3.6.1 PCR mit radioaktiv markiertem Isotop

Es folgte die parallele Bearbeitung von jeweils 4 Ansätzen unter konstanten Bedingungen. Die Ansätze enthielten 20 µl Reaktionsgemisch mit je 2 µl cDNS- Probe einer der 4 Zelllinien (2 mal mit *Streptococcus pyogenes* stimulierte, 2 mal nicht- stimulierte A549- Zellkulturen), 0,2 µM eines der 26 Dekamer- Primer, 1µM des Oligo- T- Primers, der in der Reversen Transkription verwendet wurde, 1,5mM MgCl₂ (Gibco, Ingolstadt), 2 µl 10x PCR Reaktionspuffer (Gibco, Ingolstadt), 4 µM dNTPs, 60µCi [$\alpha^{33}\text{P}$]- ATP (Amersham, Braunschweig), ein radioaktiv markiertes Substrat, welches die spätere Darstellung der aufgetrennten Banden auf dem Röntgenfilm ermöglicht, und 1,5U Taq- Polymerase (Gibco, Ingolstadt). Zur Vermeidung von Verdunstungen während des Reaktionsablaufes im Thermocycler, wurde ein beheizter Deckel verwendet, der während der gesamten Reaktion auf 100° C aufgeheizt war. Die Reaktionsansätze durchliefen in dem Thermocycler 40 PCR- Zyklen. Um Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen DNS- Strängen aufzutrennen und den cDNS- Doppelstrang in Einzelstränge zu überführen, wurde das Reaktionsgemisch für 30s auf 94° C erhitzt. Anschließend wurden die Proben auf 40° C abgekühlt, um ein optimales Anlagern der Primer zu gewährleisten. Im nächsten Schritt wurde die Temperatur erneut für 15s auf 72° C angehoben, um eine optimale Temperatur für die Amplifikation zu gewährleisten. Nach 40 Zyklen wurde 5min bei 72° C inkubiert, um die abschließende Elongation zu stabilisieren. Die PCR- Produkte wurden bei 4°C gelagert.

3.6.2 Aufbereitung der PCR- Produkte

Das PCR- Produkt wurde mit 11µl eines Puffers, bestehend aus 97%-igem Formamid (Merck, Darmstadt) mit 10mM EDTA (Merck, Darmstadt) und 0,1% (w/v) Bromphenolblau (Merck, Darmstadt), versetzt. Zur Denaturierung der zu untersuchenden Produkte wurde das Gemisch anschließend für 2 Minuten gekocht und dann auf Eis abgekühlt.

3.6.3 Polyacrylamid- Gelelektrophorese und Autoradiographie

Mit Hilfe der Polyacrylamid (PAA)- Gelelektrophorese erfolgte die Auftrennung der PCR-Produkte unterschiedlicher Größe. Bevor die Gellösung in die vorgesehene Form gegossen werden konnte, musste am Boden der Form eine Gelbasis gegossen werden. Diese Gelbasis enthielt die oben erwähnten Polymerisationskatalysatoren in doppelter Konzentration. Ein 6% harnstoffhaltiges Sequenziergel wurde blasenfrei gegossen. Die Dicke des Gels betrug 0,8mm. Die Gellösung enthielt Tris- Bromid/EDTA- Puffer (Sambrook et al., 1989) mit 12,5% (v/v) Rotiphorese NF Acrylamid/Bis- Lösung (Roth, Karlsruhe), 0,42g/ml Harnstoff (Merck, Darmstadt). Als Katalysatoren der PAA- Polymerisation wurden [0,0125% (v/v)] 0,25 mg/ml Ammoniumperoxidsulfat [(APS), Merck, Darmstadt] sowie 0,0125% (v/v) N,N,N,N' Tetramethylethylendiamin [(TEMED), Serva, Heidelberg] benutzt. Vom aufbereiteten PCR- Produkt wurden jeweils 5µl in die dafür vorgesehenen Taschen appliziert. Die PCR- Produkte der nicht- stimulierten A549 Zelllinien, sowie die PCR-Produkte der mit *Streptococcus pyogenes* stimulierten A549 Zelllinien wurden stets in gleicher Reihenfolge nebeneinander aufgetragen. Als Elektrophorese- Pufferlösung diente eine Tris- Bor- Essigsäure (TBE)- Lösung folgender Zusammensetzung: 90mM Tris, 90mM Borsäure 2mM EDTA. Die Elektrophorese wurde in einem Two Step Direct Blotter (Hoefer, San Francisco, USA) bei konstanter Leistung von 40 Watt für 100 Minuten durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel auf eine Nitrocellulose Transfermembran (Schleicher und Schuell, Dassel) übertragen, mit Zellophan- Folie abgedeckt und in einem Slab Gel Dryer (LKB, Bromma, Schweden) getrocknet. Das getrocknete Gel wurde für 24h auf einen Röntgenfilm gelegt. Der Röntgenfilm wurde an den Stellen, an denen Banden amplifizierter DNS auftauchten, durch das in die Amplikons inkorporierte [$\alpha^{33}\text{P}$]- dATP (Amersham, Braunschweig) belichtet.

3.7 Vergleich der Bandenmuster

Das Elektrophorese- Bandenmuster der Röntgenfilme wurde auf Fragmente untersucht, die in den mit *Streptococcus pyogenes* stimulierten A549- Zelllinien im Vergleich zu den nicht- stimulierten A549- Zelllinien unterschiedlich stark ausgeprägt waren. Es folgte das

passgenaue Auflegen des Röntgenfilmes auf das getrocknete Gel und die Markierung der zu analysierenden Banden durch das Umstechen mit einer Nadel.

3.7.1 Reamplifikation differentiell exprimierter Fragmente

Aus dem, für die Autoradiographie verwendeten Gel, wurden nun die differentiell exprimierten cDNS- Fragmente mit einem sterilen Skalpell herausgeschnitten. Die gelbbeschichteten 3M- Watman- Papierträger wurden in sterile 1,5ml- Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) überführt.

Sie wurden für 10min bei Zimmertemperatur in 100 µl frisch autoklaviertem Aqua dest. eingeweicht und dann für 15min im Wasserbad gekocht. Der herausgelöste cDNS- Überstand wurde abpipettiert, in ein steriles 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und mit 10µl einer 3M Natriumazetat- Lösung (Merck, Darmstadt) und 450µl reinem Ethanol versetzt. Das Gemisch wurde dann für 60 min bei -80°C inkubiert und anschließend in einer kühlbaren Hochleistungs-Tischzentrifuge (Centrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg) bei 4°C und 14000U/min für 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das ausgefällte und abzentrifugierte cDNS- Pellet mit 200µl 85%igen Ethanol gespült. Schließlich wurde das cDNS- Pellet erneut für 1min bei 14000U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das cDNS- Pellet in 12µl frisch autoklaviertem Aqua dest. gelöst.

3.7.2 PCR- Protokoll zur Reamplifikation differentiell exprimierter Fragmente

Die Durchführung der PCR- Reaktion erfolgte im Thermocycler. Die PCR- Parameter wie Temperaturzyklen und Zeiten waren identisch mit denen in Kapitel 3.6.1. beschriebenen. Das PCR- Gemisch bestand aus 4µl der unter Kapitel 3.7.1. erwähnten Matrizen cDNS, 1µM des in der ersten PCR verwendeten Oligo- T- Primers, 0,2µM des verwendeten willkürlichen Dekamer- Primers, 1,5mM MgCl₂, 250µM dNTP, 4µl 10x PCR- Reaktionspuffer und 2,5U Taq- DNS- Polymerase in einem Gesamtvolumen von 40µl.

3.7.3 Aufarbeitung der PCR- Produkte

Mit 4µl des PCR- Produktes wurde unter Zusatz von 3µl Farbpuffer [Tris- EDTA- Puffer (Sambrook et al. 1989)] mit 0,1% (w/v) Bromphenolblau eine Elektrophorese durchgeführt. Das restliche PCR- Produkt wurde bei -28°C gelagert.

3.7.4 Polyacrylamid- Gelelektrophorese und Silbernitratfärbung

In einer Glaskassette wurde ein 1,5mm dickes, nichtdenaturierendes Polyacrylamid (PAA)- Gel auf eine acrylatbeschichtete Folie (Gel- Fix, Serva, Heidelberg) gegossen. Die Gelmischung enthielt 3- (N- Morpholino) Propansulfonsäure- Puffer [(MOPS- Puffer), Sambrook et al. 1989)], 6% (w/v) Polyacrylamid (Long Ranger Gel- Lösung, Boehringer-Mannheim, Mannheim), 3,5% (w/v) Glycerin (Merck, Darmstadt). Als Katalysatoren der PAA- Polymerisation dienten 0,5 mg/ml APS und 0,08% (v/v) TEMED. MOPS- Pufferlösung wurde als Elektrophoreselaufpuffer verwendet. Bei konstanter Spannung von 400V und konstanter Temperatur von 15°C wurde die Elektrophorese in einem Flat Bed Apparatus (FBE- 3000, Serva, Heidelberg) für 120 min durchgeführt. Neben den Geltaschen wurden einige Geltaschen in definierten Abständen mit einem Molekulargewichtsmarker (DNA Molecularweight Marker V, Boehringer-Mannheim, Mannheim) beschriftet. Nach der Elektrophorese wurden die DNS- Banden mit Silbernitrat angefärbt (Merril et al. 1981). Dazu wurde das Gel mit Aqua dest. gespült und anschließend in einer 10% (v/v) Ethanol (Merck, Darmstadt) und 0,5% (v/v) Eisessig- (Merck, Darmstadt) enthaltenen Lösung für 6 min fixiert. Anschließend erfolgte eine erneute Spülung mit Aqua dest. und eine 15 minütige Inkubation in einer 0,1%-igen Silbernitratlösung (Merck, Darmstadt). Schließlich wurde das Gel abermals mit Aqua dest. gespült und für 10-15 min in einer Lösung bestehend aus 1,5% (w/v) Natriumhydroxid (Merck, Darmstadt) und 0,5% (v/v) einer 37%-igen Formaldehydlösung (Merck, Darmstadt) entwickelt und für die photographische Dokumentation in eine luftdichte Plastikfolie eingeschweißt.

3.8 Klonierungsreaktion

Ließ sich im Elektrophoresegel die erfolgreiche Amplifikation eines differentiell exprimierten Fragmentes aufzeigen, so wurde das entsprechende Fragment in einen Plasmidvektor (pCR®2.1- TOPO® M- T, Promega, Heidelberg) ligiert. Der Vektor wurde dann in kompetente Zellen (JH- 109 E.coli, Promega, Heidelberg) eingeschleust und vermehrt. Anschließend wurde aus den Vektoren die Plasmid- DNS extrahiert und das ligierte DNS- Fragment sequenziert. Neben dem Galactosidase- Gen enthielt der verwendete Plasmidvektor das Ampicillin- Resistenz- Gen, das die Selektion von vektorhaltigen Bakterien in ampicillinhaltigem Medium ermöglichte. Bakterien, die in ihren Plasmid- Vektoren das fremde, zwischen dem Galactosidasegen integrierte DNS- Fragment enthielten, konnten 5-Bromo- 4-Chloro- 3 -Indolyl- B- D- Galaktopyranosid (X- Gal) nicht mehr zu einem blauen Farbstoff metabolisieren und ihre Kolonien blieben bei Anwesenheit von X- Gal auf dem ampicillinhaltigen Nährboden weiß.

3.8.1 Ligation

Die DNS- Konzentrationsbestimmung der Reamplifikationsprodukte differentiell exprimierter Banden erfolgte durch das gleiche photometrische Verfahren, das bereits unter 3.3 beschrieben wurde. Zur Ligation wurden 4µl des zu vervielfältigenden DNS- Fragmentes aus den Proben der PCR von 3.6.2. zusammen mit 1µl Salt Solution (Qiagen, Hilden) und 1µl TOPO Vektor (PCR®2.1- TOPO® M- T, Promega, Heidelberg) für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis überführt.

3.8.2 Transformation des Ligationskomplexes in kompetente Zellen

Das schonende Auftauen 50µl tiefgefrorener kompetenter Zellen erfolgte in einem Eisbad. Nach Zugabe von 2µl des Ligationsproduktes und kurzem, vorsichtigem Schwenken wurden die Zellen für 30min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen für 50 Sekunden im 42°C warmen Wasserbad hitzegeschockt und nochmals für 2 min auf Eis inkubiert.

3.8.3 Anzüchten der Bakterien und Selektion von Klonen

Zunächst wurden Agarplatten von 5-8mm Dicke vorbereitet. Sie enthielten 5g/l Bacto Yeast Extract, 10g/l Bacto Tryptone, 10g/l Natriumchlorid (Merck, Darmstadt), 100 mg/ml Ampicillin (Gibco, Ingolstadt) und 15g/l Agar- Agar (Serva, Heidelberg). Nach 30 minütiger Präinkubation bei 37°C wurden 100µl einer Lösung aus 40 mg/ml X- Gal und danach 40 µl 100 mM IPTG auf den Platten ausgestrichen und einige Minuten ausgetrocknet. Nun wurden 100 µl der transformierten Zellen mit einem abgeflamten Glasspatel auf den Agarplatten ausgestrichen, die Agarplatten umgedreht und für 20 Stunden bei 95% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂- Gehalt und 37°C inkubiert. Zur Unterstützung der Farbentwicklung der Kolonien wurden die Platten anschließend für 4 Stunden bei 4° C gelagert. Einige der weißen Klone wurden mit einer Pipettenspitze in jeweils 10 ml Nährmedium aus 5g/l Bacto Yeast Extract, 10g/l Natriumchlorid, 10g/l Bacto Tryptone, 30mg/ml Ampicillin und 5mM Glucose (Merck, Darmstadt) überführt und über Nacht inkubiert. Danach wurde 1ml dieser Kulturen entnommen, mit 100 µl einer 85%-igen Glycerinlösung versetzt und als Kontrollproben bei -80°C eingefroren. Der Rest der Zellsuspension wurde abzentrifugiert (Universal 2S Zentifuge, Hettich) und der Überstand verworfen. Aus dem Bakterienpellet wurden nun die Plasmide extrahiert.

3.8.4 Plasmidextraktion

Die Plasmidextraktion erfolgte mit dem Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers. Die Bakterien wurden lysiert und die Plasmidvektoren in einem Filter an Anionenaustauscherharze gebunden. Dann wurden die Filter mit Waschpuffern von Restsubstanzen gereinigt, die Plasmide mit einem speziellen Puffer aus dem Filter gelöst und schließlich mit Ethanol ausgefällt. Dann wurde die Plasmid- DNS in Tris/EDTA- Puffer (Sambrook et al. 1989) gelöst und bei -28° C gelagert. Die Bestimmung der Konzentration der Plasmid- DNS erfolgte photometrisch.

3.8.5 Kontrolle der Insert- DNS durch Restriktionsanalyse

Die multiple Klonierungsstelle des pCR®2.1- TOPO®- Vektors enthält spezifische Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease EcoR I. Das Reaktionsgemisch für die Analyse enthielt 1µg Plasmid- DNS, 2U des Restriktionsenzym (Appligene, Heidelberg), 2µl 10fach konzentrierten Reaktionspuffers (Promega, Heidelberg) und 0,1mg Rinderserum Albumin (BSA, MBI Fermentas, St.Leon- Roth). Das Gemisch wurde 3 Stunden bei 37°C inkubiert und zur anschließenden Denaturierung der Enzyme für 2 Minuten auf 65°C erwärmt. Dann wurden 4µl des Reaktionsproduktes mit 3 µl Farbpuffer (siehe Kapitel 3.6.3.) versetzt und in einer Agarose- Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.4) aufgetrennt.

3.9 Sequenzierung der Fragmente und Datenbankvergleich

Nach erfolgreicher Ligation und Transformation wurde 1 mg der Plasmid- DNS (aus Kapitel 3.8.4.) zur Vorbereitung für die automatische Sequenzierung in 25 Temperaturzyklen im Thermocycler markiert. Das Reaktionsgemisch beinhaltete in 20µl Volumen 1 µg Plasmid- DNS, 10pmol M13- Upstream oder M13- reverse- Primer, die sich an Plasmid- DNS anlagerten, 5% (v/v) Dimethylsulfoxid sowie 4 µl Reaktionspremix (Applied Biosystems, Warrington, Großbritannien) mit Taq- DNS- Polymerase und Substraten. Diese Vorbereitungsreaktion für die automatische Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip des Two Step Annealings, bei dem das Anlagern der Primer und die DNS- Polymerisation unter gleichen Temperaturbedingungen erfolgen. In den Temperaturzyklen wurde die DNS für 30s bei 96°C denaturiert, anschließend für 15 Sekunden bei 60°C zur Anlagerung der Primer inkubiert und dann wiederum für 4 Minuten auf 60°C zur DNS- Polymerisation erhitzt. Nach Abschluß der 25 Zyklen wurde die DNS entsprechend dem Protokoll von Applied Biosystems mit Ethanol ausgefällt, in 25ml TSR- Puffer (Perkin Elmer, Norwalk, USA) gelöst und 2 Minuten bei 95°C behandelt. Die automatische Sequenzierung erfolgte in einem Abi Prism TM 310 Genetic Analyser (Perkin Elmer, Norwalk, USA). Die Sequenz des DNS- Fragmentes wurde mit allen bisher bekannten DNS- Sequenzen in der Genbank des Nationalen Zentrums für Biotechnologische Informationen (NCBI, Bethesda, USA) verglichen und auf Homologien überprüft.

3.9.1 Hochstringente RT- PCR mit sequenzspezifischen Primern

Mittels reverser Transkriptase wurde isolierte mRNA, wie unter Kapitel 3.5 dargestellt, in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Aufgrund der Sequenzdaten des differentiell exprimierten Fragmentes wurden sequenzspezifische Primer konstruiert, die komplementären Sequenzen im cDNA- Pool erkannt und das differentiell exprimierte Fragment in einer hochstringenten PCR amplifiziert. Die Reaktionsansätze enthielten in einem Volumen von 50µl jeweils 5 µl 10x konzentrierten PCR Reaktionspuffer, 2,5U Taq- Polymerase, 0,2mM dNTPs, 1,5mM MgCl₂ und je 0,1 µmol des Upstream Primers M13 F (5'-GAT CAC TTA CGG AGA AAC AG-3') und des Downstream Primers M13 R (5'-TCG GTA ATT AAT GGA AAT TGG-3'). Das PCR- Programm 14* durchlief im Thermocycler 30 Temperaturzyklen, in denen die Temperatur zuerst für 45s auf 94°C angehoben wurde, dann für 30s auf 55°C abkühlte und anschließend für 90s auf 72°C nochmals erhitzt wurde. Zur Optimierung der Elongation wurde die Zeit nach Beendigung des letzten Zyklus um 5 Minuten verlängert. Das PCR- Produkt wurde abschließend von ungebundenen dNTPs, MgCl₂ und Primern gereinigt und in einer PAA- Gelelektrophorese (wie in 3.6) analysiert.

3.10 Arbeitsschritte zur cDNA- mRNA- Hybridisierung

3.10.1 Markierungsreaktion

Das in cDNA umgeschriebene differentiell exprimierte mRNA- Fragment wurde mit einem DIG High Prime Labeling and Detection Kit (Boehringer- Mannheim, Mannheim) nach dem Protokoll des Herstellers mit Digoxigenin markiert. Dafür wurde das cDNA- Fragment (10ng bis 3µg) in 16 µl Aqua dest. gelöst und für 10 Minuten auf 100°C erhitzt. Dann wurde die Probe sofort auf Eis gestellt, mit 4µl DIG High Prime versetzt und zentrifugiert. Zum Schluss wurde das Gemisch für 20 Stunden bei 37°C inkubiert und die Markierungsreaktion durch kurzes Erhitzen auf 65°C gestoppt.

3.10.2 Northern- Hybridisierung

Um die Hybridisierungsreaktion durchzuführen wurde die Gesamt- RNS der beiden mit *Streptococcus pyogenes* stimulierten sowie der beiden nicht- stimulierten A549- Zelllinien (siehe Kapitel 3.2) in einem 1,2%-igen Agarosegel mit 1 Volumenanteil 50- fach MOPS und 2% (v/v) 0,22 M Formaldehyd aufgetrennt. Zur Färbung der 28 S und der 18 S rRNS- Fragmente wurde dem Gel 0,01% (v/v) einer 1% (w/v)-igen Ethidiumbromidlösung beigemischt. Mittels Kapillartransfer wurden nach der Elektrophorese die aufgetrennten RNS- Fraktionen aus dem Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Boehringer- Mannheim, Mannheim) übertragen. Die übertragene RNS wurde dann in 1/10 einer 20 fachen SSC- Lösung (3M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0) gewaschen und durch UV- Bestrahlung immobilisiert. Schließlich wurde die Membran für 1 Stunde bei 50° C mit 20-30ml DIG Easy Hyb- Lösung (Boehringer- Mannheim, Mannheim) prähybridisiert.

3.10.3 Anlagerung der DNS- Sonde an die RNS

Im Anschluß an die Prähybridisierung erfolgte die Hybridisierung. Es wurden 50ng/ml des in Punkt 3.10.1 beschriebenen Markierungsgemisches für 10 Minuten in kochendem Wasser denaturiert und sofort auf Eis gekühlt. Die denaturierte Probe wurde mit der auf 50-55°C vorgewärmten DIG Easy Hyb Prähybridisierungsreaktion vermischt und auf die Membran aufgetragen. Die Durchführung der Hybridisierungsreaktion erfolgte für 12-16 Stunden bei einer Temperatur von 50°C.

3.10.4 Detektion

Nach der Hybridisierung wurde die Membran zunächst für 2x 15 min in einer Lösung bestehend aus 2fach SSC und 0,1% Natriumdodecylsulfat (SDS) schüttelnd gewaschen. Danach wurde sie für 2 x 15 Minuten in 0,5fach SSC und 0,1% SDS bei einer Temperatur von 68° C abermals schüttelnd inkubiert. Der Blot wurde für 5 Minuten in Waschpuffer mit 0,1 M Maleinsäure, 0,15NaCl (pH 7,5) und 0,3% Tween 20 (Calbiochem, Bad Soden) gewaschen und anschließend in 100ml 10fach Blocking Solution 1:10 in Maleinsäurepuffer

mit 0,1 M Maleinsäure und 0,15M NaCl (pH 7,5) inkubiert. Dann wurde er für 30 Minuten in 20ml Antikörperlösung (anti- DIG- AP conjugate 1:10000 in Blocking- Lösung) inkubiert, für 2x 15 Minuten in Waschpuffer gewaschen und für 5 Minuten in einem Puffer, bestehend aus 0,1 M Tris/HCl, 0,1M NaCl, 50mM MgCl₂ (pH 9,5) equilibriert. Anschließend wurde die Membran mit der RNS- Seite nach oben auf eine transparente Folie gelegt und zur Färbung mit 1ml CSPD- Lösung Dinitrat 3- (4- Methoxy Spiro) 1,2 Dioxetane- 3,2- (5-chloro)tricyclodecan- 4-phenyl- phosphat (Boehringer- Mannheim, Mannheim) beschichtet. Sofort im Anschluß wurde sie mit einer transparenten Folie luftblasenfrei abgedeckt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die CSPD- Lösung wurde herausgedrückt, die Folien verschweißt, und die Membran erneut für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Zum Schluß wurde mit dem Blot ein Röntgenfilm (XAR- 5 Kodak, Rochester, New York, USA) für 5-20 Minuten autoradiographiert und entwickelt.

4. ERGEBNISSE

4. 1 Vergleichende Analyse des mRNS- Expressionsmusters

In dieser Promotionsarbeit wurden vergleichende Genexpressionsanalysen zwischen den mit *Streptococcus pyogenes* stimulierten und nicht stimulierten A549 respiratorischen Epithelzellen durchgeführt. Für die radioaktive Markierung der mRNS- Moleküle wurden pro cDNS- Synthese 60µCi [$\alpha^{33}\text{P}$] dATP verwendet. Diese Menge an Radioaktivität war ausreichend für den autoradiographischen Nachweis von vier PCR- Reaktionen mit jeweils zwei verschiedenen Primerpaaren. In einem Sequenziergel wurden die Amplikons von insgesamt 16 PCR- Reaktionen nebeneinander aufgetrennt und autoradiographiert. Die Zeit für die Exposition des Röntgenfilmes zur Detektion revers transkribierter mRNS- Moleküle betrug 12-24 h. Anschließend konnte das cDNS- Bandenmuster von jeweils zwei mit *Streptococcus pyogenes* stimulierten und zwei nicht- stimulierten Zellen miteinander verglichen werden. Es zeigte sich, dass im Mittel 80-120 Fragmente pro PCR mit einem der 26 Dekamer- *Upstream* und einem der 12 Oligo- T- *Downstream* Primer amplifiziert wurden. Bei dem Vergleich des Bandenspektrums zeigte sich ein weitgehend identisches Expressionsmuster in den 4 parallel bearbeiteten Proben. Gelegentlich ließen sich Banden nachweisen, die nur in einem der 4 Ansätze auftraten. Wiederholungsexperimente zeigten jedoch, dass die Expression solcher Fragmente nicht reproduzierbar war, weshalb diese für weitere Analysen nicht berücksichtigt wurden. Interessant waren die Banden, die in beiden stimulierten oder beiden nicht- stimulierten Zellen gleichzeitig und reproduzierbar vorkamen. Die Kombination des Dekamer- *Upstream* Primers 5'-TTT TTT TTT TTC A-3' mit dem Oligo- T- Primer 5'-GAT CCA GTA C-3' ließ einen solchen reproduzierbaren quantitativen Unterschied im cDNS- Expressionsmuster der stimulierten Zellen erkennen. Eine partielle Übersicht des Expressionmusters gibt die Abbildung 1 wieder. In Wiederholungsversuchen mit gleichen *Upstream*- und *Downstream*- Primern konnte die selektive Expression dieses Fragmentes bestätigt werden.

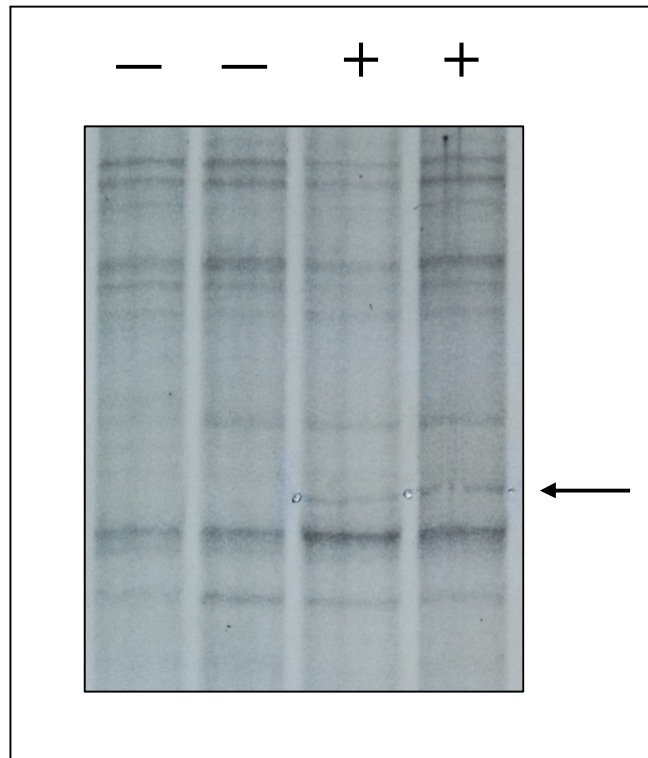


Abbildung 1

Ausschnitt aus dem Autoradiogramm revers transkribierter mRNA- Moleküle. Nicht-stimulierte (- -) und mit *Streptococcus pyogenes* stimulierte (+ +) Zellen. Der Pfeil deutet die differentielle Expression eines Genfragmentes an, das sich nur in den stimulierten Zellen darstellen läßt.

4.2 Reamplifikation des differentiell exprimierten Fragmentes

Durch passgenaues Auflegen des Röntgenfilmes auf das getrocknete PAA- Gel konnte das differentiell exprimierte Genfragment im Gel lokalisiert und ausgeschnitten werden. Nach dem Herauslösen aus dem Gel wurde das Fragment in einer erneuten PCR unter Verwendung der gleichen Primerkombination reamplifiziert. Anschließend erfolgte eine Auftrennung des Amplikons durch PAA- Gelelektrophorese (Abb.2). In dem Gel konnte eine distinkte Bande dargestellt werden, womit die Spezifität der verwendeten Primer für die komplementäre Sequenz des differentiell exprimierten Fragmentes gezeigt werden konnte. Mit Hilfe des mitgeführten DNS- Molekularstandards konnte eine annähernde Größe (ca. 80-90bp) des differentiell exprimierten Genfragmentes festgestellt werden. Um die genaue Länge des Fragmentes zu bestimmen, wurde es einer Sequenzanalyse unterzogen. Dieser Analyseschritt

erforderte die Anreicherung des Fragmentes durch dessen Klonierung in einen Klonierungsvektor.

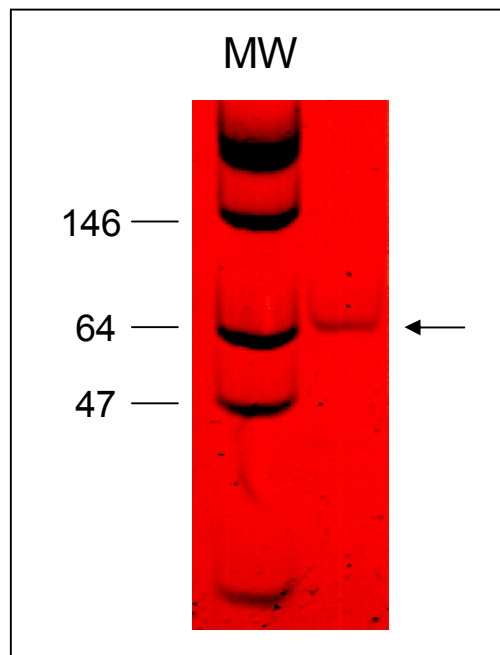


Abb. 2

Reamplifikation des differentiell exprimierten mRNA- Fragmentes und anschliessender Nachweis des Amplikons durch PAA- Elektrophorese und Silbernitratfärbung. Der Pfeil deutet das reamplifizierte Fragment an. MW: DNS- Molekularstandard

4.3 Klonierung des differentiell exprimierten Fragmentes und Transformation des Vektors in kompetente Zellen

Aufgrund erheblicher Sequenzüberlagerungen mit Dye- Terminatoren ist die Analyse kurzer PCR- Produkte von etwa 100-200bp durch direkte automatische Sequenzierung schwierig. Um dies zu vermeiden, wurden die cDNS- Fragmente in einen Klonierungsvektor integriert und anschließend sequenziert. Nach jedem Klonierungsexperiment konnte der Vektor in

kompetente Zellen transformiert und mit der Zellpopulation exponentiell vermehrt werden. Die Anzahl erfolgreich transformierter Zellkolonien auf den Agarnährböden betrug zwischen 100 und 150 Stück. Nach der Restriktionsanalyse des rekombinierten Vektors ließen sich in der Elektrophorese der pCR2.1- TOPO- Vektor und das differentiell exprimierte cDNA-Fragment als separate Banden auftrennen (Abbildung 3).

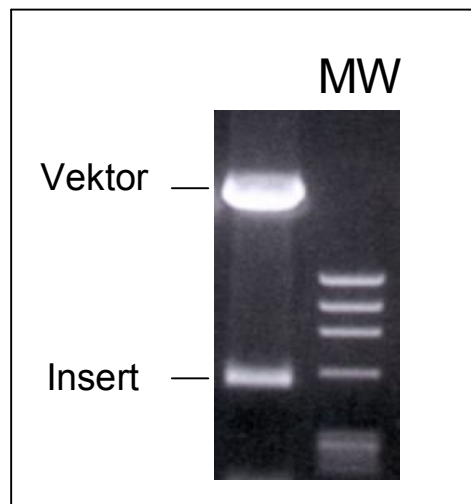


Abb. 3

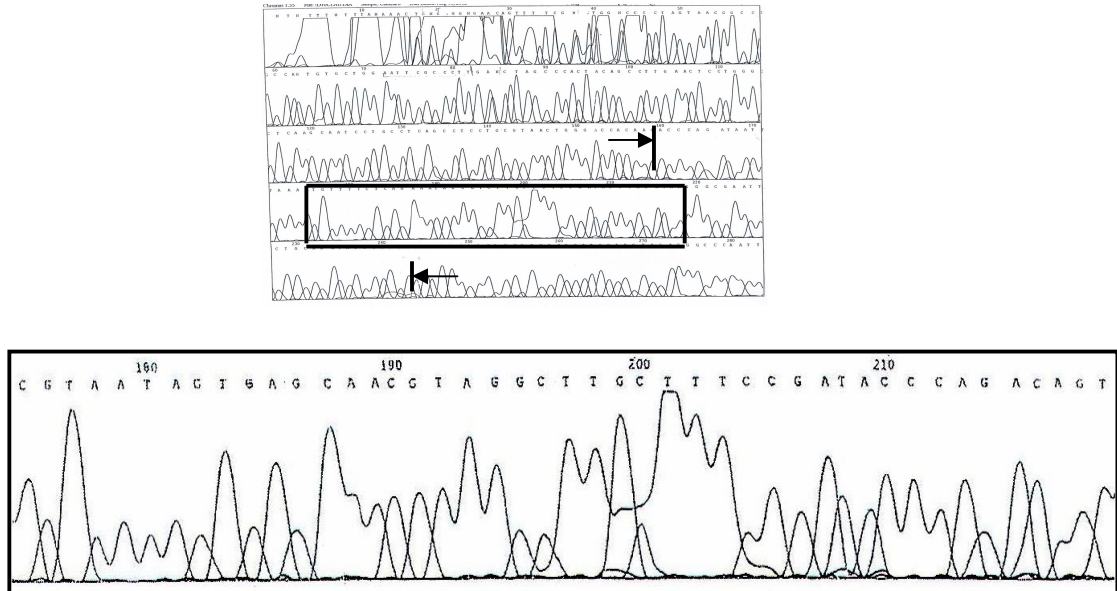
Das Restriktionsenzym *EcoR*- I schneidet die Insert- DNS aus dem Vektor heraus. Nach anschließender Elektrophorese in Ethidiumbromid- haltigem Agarosegel lassen sich Vektor und Insert auftrennen. Die rechte Spalte enthält DNS- Molekulargewichtsstandards.

4.4 Sequenzanalyse und Datenbankvergleich

Zur Ermittlung der Basensequenz und der genauen Länge des differentiell exprimierten Fragmentes wurden Sequenzanalysen durchgeführt. Von der Agarplatte wurden vier positive Zellklone isoliert, in Lysogeny Broth (LB)- Medium überführt und über Nacht auf eine Dichte von $2-3 \times 10^6$ Zellen gezüchtet. Nach Extraktion der Plasmide aus den Zellen konnte nach Anwendung der unter Kapitel 3.9 beschriebenen Methode die Länge des cDNS- Inserts mit 98bp erfaßt werden. Die Sequenzanalyse ist in Abbildung 4 demonstriert. Die ermittelte Sequenz wurde nach dem „Nukleotid-Blast“- Programm des „National Center of Biotechnical Information“ (NCBI) der National Library of Medicine NLM (Bethesda, MD, USA) mit Sequenzen bekannter humaner Gene auf Homologien untersucht. Beim Datenbankvergleich

wurde unter der Zugangsnummer NM_007355 eine übereinstimmende Homologie des differentiell exprimierten Fragmentes mit Sequenzen der humanen HSP-90-mRNS gefunden.

A



B

LOCUS NM_007355 2567 bp mRNA linear PRI 01-JUN-2008
Homo sapiens heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1 (HSP90AB1), mRNA.

1	CTCCGGCGCA	GTGTTGGGAC	TGTCCTGGGTA	TCGGAAAGCA	AGCCTACGTT	GCTCACTATT
61	ACGTATAATC	CTTTCTTTT	CAAGATGCCT	GAGGAAGTGC	ACCATGGAGA	GGAGGAGGTG
121	GAGACTTTTG	CCTTCAGGC	AGAAATTGCC	CAACTCATGT	CCCTCATCAT	CAATACCTTC
181	TATTCCAACA	AGGAGATTTT
...
2461	GTTGTGTATT	GTGGTTTATT	TTATTTTCTT	CATTTTGTTT	TGAAATTAAA	GTATGCAAAA
2521	TAAAGAATAT	GCCGTTTAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAA	

Abb. 4

Analyse der Sequenz des differentiell exprimierten mRNA Fragmentes.

A: Die automatische Sequenzierung ermöglichte die Sequenz des differentiell exprimierten mRNA-Fragmentes (innerhalb der Pfeile) zu bestimmen. Von dem eingerahmten Feld im kleinen Bild ist eine Vergrößerung dargestellt, um das Sequenzprofil zu verdeutlichen. Jeder Peak repräsentiert eine Base, die mit einem der Buchstaben A, G, C oder T gekennzeichnet ist.

B: Die Genbankrecherche ergab übereinstimmende Homologie mit Sequenzen der humanen HSP-90-mRNS (Zugangsnummer NM_007355). Die rot markierte Sequenzreihe ist rückwärts gelesen komplementär mit der in der Vergrößerung gezeigten Sequenz im Teil A. Das Polyadenylierungssignal und der Poly(A)-Schwanz sind fett angezeigt.

Bei weiterer Genbankrecherche ließ sich auch feststellen, dass eine kurze, aus 25-34bp bestehende Sequenzregion des differentiell exprimierten Genfragmentes auch mit Sequenzen anderer Hitzeschock mRNS homolog sind (Abb. 5), was auf eine molekulare Verwandtschaft zwischen den Hitzeschockproteinen schließen lässt.

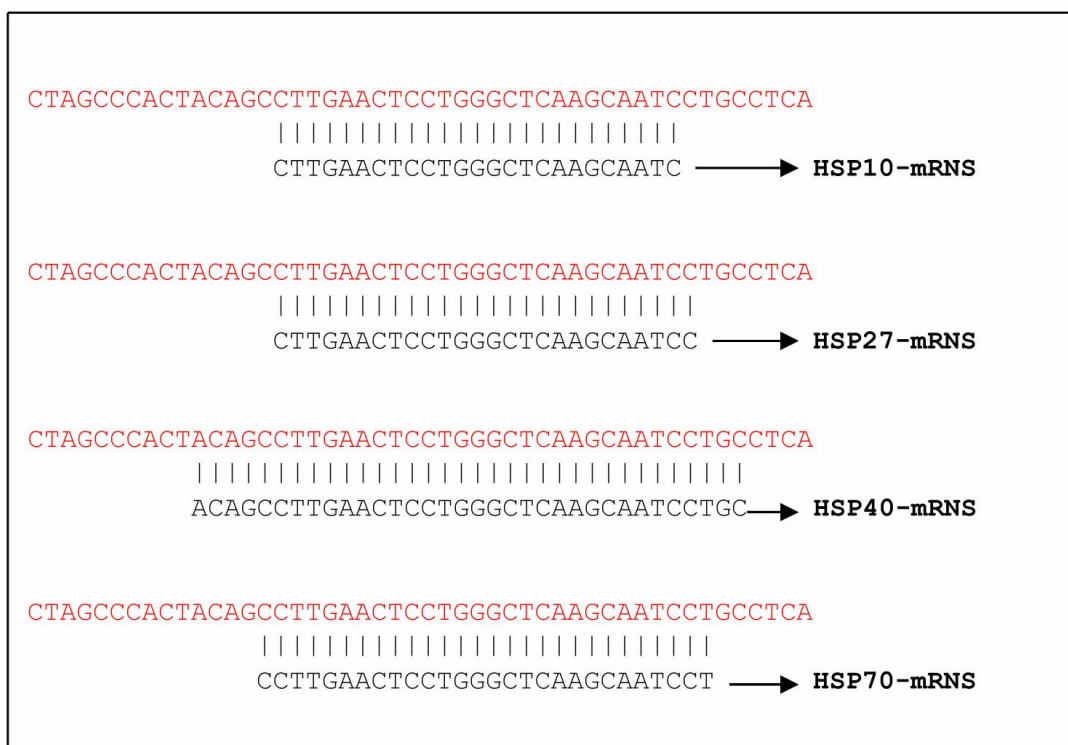


Abb. 5

Die rot markierte Sequenz präsentiert einen Teil von der Sequenz der differentiell exprimierten mRNS in 5' zu 3' Richtung. Die mit den Balken verbundenen Basen zeigen jeweils einen homologen Bereich mit HSP10-, HSP27-, HSP40- und HSP70-mRNS.

4.5 Northern- Hybridisierung

Mittels einer cDNS- Sonde, die zu der HSP90- mRNA komplementär ist, wurde mit der Northern- Hybridisierung, die Überexpression der HSP90- mRNA in den mit *Streptococcus pyogenes* stimulierten Zellen überprüft. Die Hybridisierung ergab eine deutliche Expression in den stimulierten Proben im Vergleich zu denen, die nicht mit den Bakterien stimuliert waren und damit ließ sich die differentielle Expression der HSP90- mRNA bestätigen.

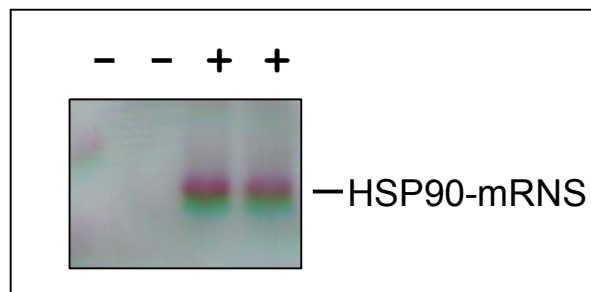


Abb. 6

Northern- Hybridisierung zum Nachweis der Expression der HSP90-mRNA. Auf dem Röntgenfilm erkennt man in beiden mit *Streptococcus pyogenes* stimulierten Zellen (+ +) eine ausgeprägte HSP90- mRNA Bande, im Gegensatz zu nicht- stimulierten Zellen (- -). Belichtungszeit 1h.

5 Diskussion

Durch vergleichende Genexpressionsanalyse ließ sich die Überexpression eines Gens in den mit *Streptococcus pyogenes* stimulierten Zellen im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen nachweisen. Nachdem die Überexpression dieses Gens durch Wiederholungsversuche und durch Northern- Hybridisierung bestätigt werden konnte, erfolgte ein Sequenzabgleich gegen bekannte Gene über das BLAST- Programm und es wurde eine übereinstimmende Sequenzhomologie mit einem Mitglied (HSP90- mRNA) der Familie der Hitzeschockproteine gefunden.

5.1 Hitzeschockproteine

Die HSPs wurden zuerst an Tieren entdeckt. Ritossa (1962) beschrieb als erster, dass spezifische Genorte in den Riesenchromosomen der Speicheldrüse von *Drosophila* durch einen kurzzeitig einwirkenden Hitzeschock aktiviert werden können. Weitere Befunde (zusammengefasst von Ashburner und Bonner, 1979) belegen, dass der Hitzeschock die Bindung der Ribosomen an die normale mRNA unterdrückt und es dadurch zum Zerfall der meisten Polysomen kommt. Gleichzeitig werden neue Hitzeschock- mRNAs transkribiert und neue Polysomen gebildet, die Produkte mit der allgemeinen Bezeichnung Hitzeschockproteine (HSP) liefern.

HSPs bilden eine besondere Gruppe von Proteinen, die anderen Proteinen bei der Faltung oder bei der Erhaltung ihrer Sekundärstruktur unter Extrembedingungen helfen. Sie werden in erhöhtem Maße gebildet, nachdem Zellen Hitze oder anderen Arten von belastenden Umwelteinflüssen wie Ultraviolettstrahlung, Schwermetallen oder verschiedenen chemischen Verbindungen ausgesetzt wurden. In diesen Situationen zellulären Stresses stabilisieren HSPs zelluläre Proteine, um sie vor Denaturierung zu schützen oder beschleunigen den Abbau nicht mehr funktionsfähiger Proteine über das Proteasom (Haysday und Singh 2000).

5.1.1 Einteilung der HSPs

HSPs werden nach ihrer Molekülmasse unterteilt in die Familien der kleinen HSPs (z.B. HSP27), HSP40, HSP60 (Chaperonine) sowie die HSP70/HSP90- Hitzeschockproteine (Hasday und Singh 2000).

HSP25/27 ist normalerweise im Zytosol lokalisiert, während einer Stresssituation wird es in den Zellkern transloziert. Die Aminosäuresequenz zwischen HSP25 z.B. bei der Maus und HSP 27 beim Menschen ist mit über 80% homolog. Dies deutet darauf hin, dass HSPs konservativen Charakter haben und evolutionär betrachtet sehr alt sind.

HSP60 wird sowohl in Bakterien, im Chlorophyll der Pflanzen und in den Mitochondrien bei Mensch und Tier gefunden. Es ist hauptsächlich an der Reaktivierung denaturierter Proteine beteiligt. Im Muskelgewebe hat es im Wesentlichen die Aufgabe, die Proteine zu falten und unter Stresssituationen eine Schutzfunktion (molekulares Chaperon) zu erfüllen. Außerdem übernimmt es eine Aufgabe als „Gefahrssignal“ für das angeborene Immunsystem (Breloer et al. 2001).

HSP70 wird sehr stark unter Stresssituationen exprimiert und macht 20% der Gesamtzellproteinmasse nach entsprechender Stimulation aus (Neuland et al. 2005). Es ist hauptsächlich im Cytosol, in den Mitochondrien und im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Es dient ebenfalls als „Gefahrssignal“ für das angeborene Immunsystem, außerdem hat es eine Zytokin-ähnliche Funktion und dient der Cross-Präsentation von Tumorantigenen. An der Zelloberfläche wirkt es zu dem noch als Aktivierungssignal für NK- Zellen (Milani 2007).

HSP90 macht 1-2% der gesamten zellulären Proteine aus. Es ist im Zytosol und im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Es ist ebenfalls ein „Gefahrssignal“ für das angeborene Immunsystem, übernimmt die Cross- Präsentation von Tumorantigenen und besitzt eine ATP- abhängige Chaperonfunktion (Milani 2007).

HSP110 und Grp 170 dienen vorwiegend der Cross- Präsentation von Tumorantigenen.

5.2 HSPs: Universelle Proteine

In physiologisch normalen Situationen spielen ubiquitär vorkommende HSPs eine wichtige Rolle als Chaperone, die zum einen an der korrekten Faltung und Reifung von Proteinen beteiligt sind, zum anderen vermitteln sie die Translokation von Proteinen über Membranen (Buchner und Walter 2002). Diese nicht stressinduzierten Hitzeschockproteine werden auch heat shock cognates (Hsc) (Haysday und Singh 2000) genannt.

Darüber hinaus wurden HSPs mit den verschiedensten Erkrankungen, insbesondere Tumoren assoziiert. HSPs spielen eine wichtige Rolle in der Onkogenese zum Beispiel durch die Interaktion mit p53, sowie eine zytoprotektive Rolle bei der Apoptose (Jolly und Morimoto 2000).

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass HSPs ein „Gefahrssignal“ für das angeborene Immunsystem darstellen, indem sie dendritische Zellen aktivieren (Breloer et al. 2001, Kuppner et al. 2001, Singh-Jasuja et al. 2000), die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL1, IL6 und TNF- α induzieren (Asea et al. 2000) und von immunkompetenten Effektorzellen als Zielstrukturen erkannt werden können.

Natürliche Killerzellen (NK- Zellen) werden beispielsweise durch die Bindung an HSP70, das von manchen Tumoren auf der Zelloberfläche exprimiert wird, aktiviert (Multhoff et al. 1997). Als molekulare Chaperone sind HSPs auch an der Präsentation tumorspezifischer immunogener Peptide beteiligt (Srivastava, Udono 1994), indem sie mit Peptiden Komplexe bilden (HSP- Peptidkomplexe). Nach Bindung dieser HSP- Peptidkomplexe an dendritische Zellen werden die Peptide von dendritischen Zellen aufgenommen, über MHC Klasse I und II präsentiert und zur T- Zell- Stimulierung angeboten (Udono, Srivastava 1993, Binder et al. 2001, Castelli et al. 2001, Wang et al. 2001, Noessner et al. 2002). Die Beobachtung, dass HSPs das angeborene und das adaptive Immunsystem aktivieren, bildete die Grundlage für den Einsatz von HSPs als Vakzine in klinischen Studien (Srivastava et al. 1998, Melcher et al. 1998).

5.3 HSP90

Das molekulare Chaperon HSP90 ist verantwortlich für die Faltung und Aktivierung vieler Substratproteine. Zu den wichtigsten Vertretern von HSP90 abhängigen Proteinen zählen Steroidhormon-Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren, Kinasen und das Tumorsuppressorprotein P53 (Wegele et al. 2004).

Am Beispiel der Steroidhormonrezeptoren soll die komplexe Funktion von HSP90 gezeigt werden. Die Studien von Pratt (1993) und Smith (1993) zeigten die zentrale Bedeutung des HSP90 in Bezug auf die Regulation und Aktivierung des hormonfreien Steroidrezeptors (Pratt 1993, Smith 1993).

Ein Heterokomplex aus HSP90 und 7 weiteren Proteinen, gebunden an den hormonfreien Rezeptor, bilden die Voraussetzung für eine Hormonbindung (Jakob 1994, Pratt 1993, Smith et al. 1995, Morishima et al. 2000). Nach der Ligandenbindung und Dissoziation des Heterokomplexes in die individuellen Proteine unterliegt der hormonegebundene Rezeptor einer Vielzahl von Modifikationen, die schließlich in seine Funktion als Transkriptionsfaktor münden. Bedeutend für die Funktion des HSP90 als Rezeptorregulator ist seine Verbindung mit der Hormonbindedomäne des Aporezeptors (Bohen und Yamamoto, 1994). Diese Domäne ist für die Hormonbindung in Anwesenheit des Liganden verantwortlich, ebenso für die Inaktivierung der DNA- Bindungsdomäne des Rezeptors in Abwesenheit des Liganden (Godowski et al. 1987). Die Untersuchungen von Smith (1993) und Morishima (2000) lassen vermuten, dass die Aufgabe des HSP90 nicht nur darin besteht, die Inaktivierung des Steroidrezeptors in Abwesenheit des Liganden zu veranlassen, sondern vielmehr darin, den Rezeptor in einem aktivierten Zustand zu halten (Smith 1993, Morishima et al. 2000). Die Verbindung von HSP90 mit hormonfreiem Rezeptor induziert eine Rezeptorkonformation mit großer Ligandenaffinität (Smith 1993, Hutchinson et al. 1992, Stancato et al. 1996).

Der rezeptorstabilisierende Heterokomplex am Beispiel des Progesteronkomplexes setzt sich aus HSP90 und 5 weiteren Proteinen zusammen (Whitesell et al. 1994): HSP70, Hip, Hop, Immunophilinen und p23. HSP70 veranlasst die Proteinfaltung und bereitet die Konformation für die HSP90- Bindung vor (Hutchinson et al. 1993). Hip (p48) scheint die ATPase-Aktivität von HSP70 zu regulieren (Hoehfeld et al. 1995), während die Rolle von Hop (HSP70- HSP90- Multichaperonkomplex) noch nicht ganz geklärt werden konnte (Smith 1993). So vermuten Chen et al. (1996), dass Hop nicht für die Freigabe der Hormonbindedomäne erforderlich ist, die Prozessrate aber wesentlich erhöht (Chen et al.

1996). Als weitere Gruppe werden die Immunophiline FKBP54, FKBP52 und Cyp 40 beschrieben. Owens- Grillo et al. (1995) und Ratajczak et al. (1996) konnten zeigen, dass HSP90 nur eine Immunophilinbindungsdomäne aufweist, so dass die drei Isomerasen jeweils um die Domäne konkurrieren. In den Komplexen wird jeweils nur eine der drei Isomerasen gefunden, allerdings sind während der Komplexbildung alle drei Enzyme anwesend (Owens-Grillo et al. 1995, Ratajczak et al. 1996).

Schließlich konnte noch p23 nachgewiesen werden, das mit HSP90 und Immunophilin in vitro eine ATP- abhängige Verbindung eingeht (Johnson et al. 1994) und diese stabilisiert (Dittmar et al. 1998).

Eine weitere HSP90- abhängige Proteingruppe sind verschiedene virale und zelluläre Proteinkinasen. HSP90 wurde in Verbindungen mit neusynthetisierten Tyrosinkinasen gefunden, ein Komplex der sich trennt, sobald die Kinasen die Plasmamembran erreichen (Brugge et al. 1981). HSP90 spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung dieser Kinasen. So konnte gezeigt werden, dass HSP90 und sein Partnerprotein p50 stabile Komplexe mit Temperatur sensitivem pp60^{v-src} Mutanten unter ungünstigen Temperaturen eingeht. Temperaturänderungen in einen erträglichen Bereich führen zu einer Dissoziation des Komplexes und der Insertion von pp60^{v-src} in die Plasmamembran (Brugge 1986). Diese Annahme wird untermauert durch die Untersuchungen von Ziemiecki et al. (1986) und Xu et al. (1999) die zeigten, dass Hsp90 mit der Tyrosinkinase und den Onkogenen pp60^{v-src}, fes und fgr stabile Komplexe bildet. Dies führt zur Veränderung der Aktivität und Substratspezifität der Tyrosinkinase wodurch unter Umständen Tumorentstehung begünstigt wird (Ziemiecki et al. 1986, Xu et al. 1999).

5.4 HSP90- Inhibitoren

Die Behandlung von Tumorzellen mit HSP90- Inhibitoren führt zur selektiven Degradation wichtiger Proteine mit fundamentaler Bedeutung für Prozesse wie Zellproliferation, Regulation des Zellzyklusses und Apoptose (Neckers et al. 1999, Kelland et al. 1999). Das HSP90 weist eine hoch konservierte Struktur auf, die aus der aminoterminalen ATPase-Domäne, einer Mitteldomäne und einer carboxyterminalen Dimerisierungsdomäne besteht.

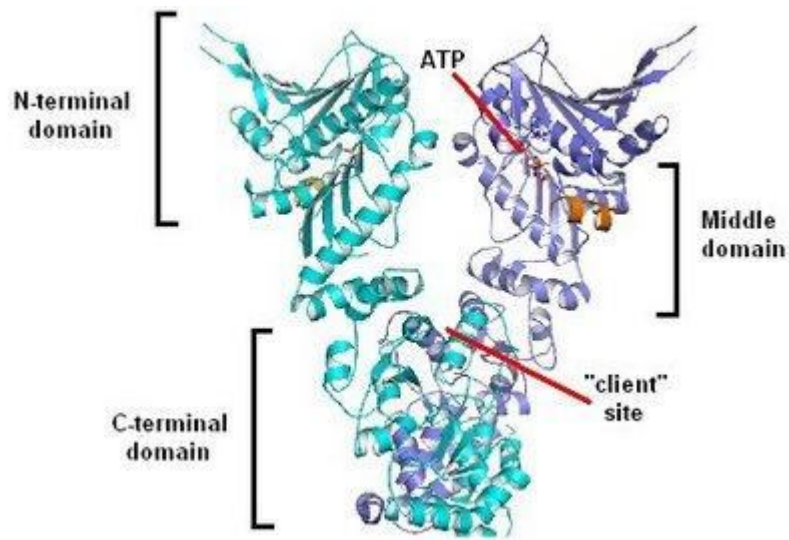


Abbildung 6: Domänenstruktur der HSP90 nach Wegele et al. (2004)

Die unterschiedlichen Klassen von natürlichen Substanzen mit hoher Spezifität und Affinität an die ATP- Bindetasche von HSP90 und die Identifizierung einer Reihe von Antitumorproteinen als HSP90 Substrate, führten zu dem Gedanken HSP90 als „drug target“ zu nutzen (Neckers 2002). So konnten Lang et al. (2007) zeigen, dass die Hemmung von HSP90 mit den Geldanamycinderivaten 17- AAG (17- Allylamino- 17- demethoxygeldanamycin) und 17- DMAG 17- (dimethylaminoethylamino)- 17- demethoxygeldanamycin die Blockade von IGF- IR und STAT3 in Pankreastumoren blockiert und dadurch zu einer Hemmung des Tumorwachstums führt (Lang et al. 2007). Auch Hostein et al. (2001) untersuchten die Auswirkung von 17AAG auf den Zellzyklus von Adenokarzinomzellen des Kolons und konnten die Induktion von Apoptose durch die Blockade von c- Raf- 1, ERK- 1/2, N- ras, Ki- ras und c-Akt demonstrieren (Hostein et al. 2001). Mit PU3, einem von Purinen abgeleiteten HSP90- Inhibitor konnte bei Mammakarzinomzellen durch Degradation des Signalproteins ERBB2 der Zellzyklus beeinflusst und das Tumorwachstum gehemmt werden (Chiosis et al. 2002).

5.5 HSPs und Apoptose

Nach Einwirkung schädlicher äußerer Reize können humane Zellen einerseits Resistenz gegen diese entwickeln oder durch programmierten Zelltod (Apoptose) absterben (Chandler et al. 1994, Green 1998, Stewart 1994). Beiden Verhaltensmustern liegen molekulare

Mechanismen zugrunde. In Abhängigkeit von der Stärke des äußeren Impulses muss sich eine Zelle entscheiden, ob sie ihre molekularen Abwehrmechanismen nutzt oder ob sie den Weg der Apoptose einschlägt.

Schett et al. (2000) haben die gegenseitige Beeinflussung von Fas- Aktivierung und Stressproteinantwort und der daraus resultierenden Entscheidung über Apoptose oder Resistenzentwicklung der Zellen untersucht (Schett et al. 2000). In diesem Zusammenhang wurden die molekularen Mechanismen der Bildung von HSP70 relativ gut erforscht. Nach dem äußeren Stimulus wird ein im Zytoplasma liegender Transkriptionsfaktor, HSF- 1, durch Phosphorylierung aktiviert. Danach wandert er in den Zellkern und bindet an eine Stelle der DNA, die die Promotorregion (HSE) des HSP70 Gens enthält, wodurch die Expression des HSP- 70- Gens erhöht wird (Kroeger et al 1993, Price et al 1991).

Unter den verschiedenen molekularen Mechanismen der Apoptose vermittelt das Protein Fas in erster Linie die Apoptose im Gefolge von extrazellulären proapoptotischen Signalen. Als transmembranöses Protein bindet Fas mit seinem extrazellulären Anteil seinen natürlichen Bindungspartner, den (proapoptotischen) Fas- Liganden, mit seinem intrazellulären, zytoplasmatischen Anteil (auch als "death domain" bezeichnet) dagegen vermittelt Fas die Einleitung der Apoptose an das Zellinnere. In erster Linie kommt es dabei zur Aktivierung von Proteasen der ICE- (interleukin- 1 converting enzyme-) Familie, die als Effektoren der Apoptose gelten (Mosser et al. 1997). Die Höhe der HSP- 70- Bildung, die durch den HSF- 1 Transkriptionsfaktor strikt reguliert wird, ist ausschlaggebend für die zelluläre Resistenz gegen negative äußere Einflüsse. Der Mechanismus der HSF1/hsp70- Stressantwort konnte bereits in Wiederholungsexperimenten mit Zytoprotektion und zellulärem Überleben in Zusammenhang gebracht werden (Jolly und Morimoto 2000).

Die Signaltransduktion von Fas von der Ligand- /Rezeptorbindung bis zum apoptotischen Zelltod ist im Bezug auf die HSP70- Aktivierung relativ gut aufgeklärt. Die ICE- Proteinkaskade ist hierbei von zentraler Bedeutung, denn durch Hemmung dieser Eiweiße konnte eine Blockade der Fas- medierten Apoptose erreicht werden (Tomioka 2002). Durch den Einsatz von ICE- Inhibitoren ließ sich zeigen, dass die ICE- Proteinkaskade eine essentielle Rolle bei der Hemmung der HSF1/HSP70- Aktivierung spielt (Mosser et al. 1997). Im Gegenzug ließ sich auch ein protektiver Effekt einer Überexpression von HSP70 nachweisen. Diese protektive Wirkung von HSP70 wird zum einen durch seine Rolle beim Schutz der Proteinfaltung und- entfaltung begründet (Jolly und Morimoto 2000), zum anderen aber auch durch die Hemmung proapoptotischer Signaltransduktionswege zu erklären sein (Ravagnan, 2001). Es konnte nachgewiesen werden, dass bei HSP70- transfizierten und

überexprimierten Zellen sogenannte Stress-aktivierte Proteinkinasen (SAPK) hinunterreguliert werden (Mosser et al 1997). Weiterhin ist auch eine negative Regulation von HSP70 auf die ICE-Kaskade, insbesondere auf die Caspase 3 bekannt. Beide Proteine sind Komponenten des pro-apoptischen Signaltransduktionsweges, deren Hemmung durch HSP 70 zur anti-Apoptose führen kann (Porter 1999). Die Inhibierung der Apoptose durch die Interaktion von HSPs mit Proteinen des Granzym/Perforin-Weges konnte auch an HSP72-defizienten Tumorzellen untermauert werden (Dressel, Elsner et al. 2000).

Das HSP60, welches in den Mitochondrien lokalisiert ist, galt als einziges bekanntes HSP proapoptisch (Garrido, Gurbuxani et al. 2001).

Auch Morimoto und Jolly (2000) beschreiben einen Zusammenhang zwischen HSPs und der Apoptose und sprechen von einem Cross-talk und Verbindungspunkten zwischen den einzelnen Signalwegen. Die Annahme, dass HSPs die Apoptose beeinflussen korreliert mit der Feststellung, dass häufig in Tumoren eine große Menge HSPs gefunden wird (Samali, Orrenius 1998, Vayssier, Polla 1998, Jattela 1999). Apoptose ist das negative Gegenstück zur Proliferation; deshalb wird ein Defekt in der Regulierung der Apoptose mit der Tumorentstehung in Zusammenhang gebracht (Stewart 1994, Steller 1995, Evan, Littlewood 1998). In Tumorzellen ist das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Zelltod zu Gunsten der Proliferation gestört und es entsteht ein kontinuierliches Zellwachstum als Ergebnis der Expression antiapoptischer Proteine (Jolly und Morimoto 2000). Zu diesen Proteinen gehören Mitglieder der Bcl-2 Familie, Mitglieder der Familie der apoptosehemmenden Proteine, aber auch Mitglieder der HSPs, hier im besonderen HSP 70 und HSP 27, die es Tumorzellen ermöglichen eine Resistenz gegen Apoptose zu entwickeln (Jaattella 1999, Adams, Cory 1998, LaCass et al. 1998).

Eine weitere Art der Apoptosehemmung durch HSP 70 wurde von Ravagnan et al. beschrieben, indem es den Apoptoseprotease aktivierenden Faktor 1 blockiert (Ravagnan 2001). Morimoto und Jolly (2000) betrachten die Hemmung der Caspase 3 als eine Möglichkeit der Beeinflussung der Apoptose durch HSP70. Bei der Untersuchung des zugrunde liegenden Mechanismus wird dem HSP70 eine besondere Bedeutung eingeräumt, aufgrund seiner Bindung an proapoptische Proteine wie p53 und c-myc (Pinhasi-Kimhi et al. 1986, Koskinen et al. 1991).

5.6 Schlussfolgerung

Die zuvor dargestellten molekularbiologischen Befunde verdeutlichen die Vielfältigkeit der Aufgaben der HSPs vor allem im Rahmen der Infektabwehr als universelles Abwehrsystem, aber auch ihre Bedeutung in der Tumorentstehung.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Zellen eines alten Abwehrsystems bedienen, mit dem sie sich gegen äußeren Stress schützen können.

Die Tatsache, dass in den untersuchten respiratorischen Zellen nach Stimulation mit *Streptococcus pyogenes* HSPs überexprimiert werden, lässt auf die Funktion der HSPs im Zusammenhang mit dem schädigendem Effekt der Bakterien schließen. Dass diese Zellen nach der Stimulation mit den Bakterien durch die Überexpression der HSPs auf „Abwehr“ schalten, ist physiologisch nachvollziehbar. Wie auch die Untersuchungen von Höllriegl zeigen, reagieren die gleichen respiratorischen Zellen nach der Stimulation mit *Streptococcus pyogenes* mit Änderungen ihrer Proteinsynthese und es wurde dabei die Überexpression des Retinoblastomagens nachgewiesen (Höllriegel 2009). Bedenkt man, dass Retinoblastoma als Tumorsuppressor im Zellzyklus den E2F- Transkriptionsfaktor bindet und dadurch den Eintritt der Zellen in die S- Phase verhindert, so ist auch in diesem Falle klar, dass durch den Stimulus ein Vorgang ausgelöst wird, der den Apoptoseweg aktiviert. Damit lassen sich eindeutige Parallelen zu den Ergebnissen dieser Arbeit herleiten.

Es sei anzumerken, dass der Effekt der HSPs bifunktional verlaufen kann: Zum einen stabilisieren sie die Zellen und ermöglichen ihnen das Überleben unter schwierigen Umweltbedingungen wie Hitze, oxidativem Stress, Zytokinen, Schwermetallionen (usw.), und zum anderen, wenn der Einfluss irreversible Schäden verursacht, wird ähnlich wie beim Schutz vor Tumorzellentstehung, die Apoptosemaschinerie eingeschaltet.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der mRNA- Expressionsstatus respiratorischer Epithelzellen, die mit *Streptococcus pyogenes* stimuliert waren, mit Zellen gleicher Art ohne Stimulation mittels einer PCR- basierenden Fingerprint- Methode vergleichend analysiert. Die Untersuchungen sollten Antwort auf die Frage geben, ob durch diesen Stimulus die Expression bestimmter Gene beeinflusst wird.

Es wurde die Gesamt- RNS aus den jeweiligen Zellen extrahiert und die mRNA mit Hilfe von reverser Transkriptase und dekamer Upstream- und Oligo- T Downstream- Primer in cDNS- Populationen transkribiert.

Die resultierende cDNS wurde in Gegenwart von [$\alpha^{33}\text{P}$]dATP amplifiziert, elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographiert. Pro RT- PCR- Reaktion wurden im Mittel 80-120 partielle mRNA- Fragmente amplifiziert.

Beim Vergleich der Trennmuster der Amplikons konnte in den Zellen, die mit *Streptococcus pyogenes* stimuliert waren, ein differentiell exprimiertes Genfragment nachgewiesen werden im Vergleich zu den nicht- stimulierten Zellen. Das Genfragment wurde isoliert, in pCR2.1- TOPO- Vektor kloniert, in kompetente Zellen transfiziert und sequenziert.

Nach der Sequenzierung wurde es mit einer Länge von 98bp mit in der Datenbank gespeicherten Genen auf Sequenzhomologie überprüft. Ergebnisse der Homologiestudien ergaben eine übereinstimmende Homologie des Genfragmentes mit Sequenzen der humanen HSP90- mRNA.

Anschließende Reamplifikations- und Hybridisierungs- Experimente konnten die differentielle Expression dieses Gens in den stimulierten Zellen bestätigen.

In Anbetracht der Funktion und Bedeutung der HSPs, die Zellmembran und die verschiedenen subzellulären Organellen gegen biotische und abiotische äußere Einflüsse zu schützen und zu stabilisieren, deuten die hier erzielten Befunde darauf hin, dass die respiratorischen Epithelzellen auf den Kontakt mit *Streptococcus pyogenes* mit einer verstärkter Expression des HSP90 antworten, um gegenüber diesem Erreger eine Widerstandsfähigkeit zu entwickeln und sich zu schützen.

7 Literaturverzeichnis

Die mit (x) gekennzeichneten Literaturangaben sind nicht direkt in dieser Arbeit

zitiert, sie sind aber für das allgemeine Verständnis der Thematik sehr hilfreich und werden deshalb trotzdem mit angegeben.

Adams JM, Cory S (1998): The Bcl-2 protein family; arbiters of cell survival. *Science* 281:1322-6

Asea A, Kraeft SK, Kurt- Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW (2000): HSP70 stimulates cytokine production through a CD 14 dependent pathway, demonstrating a dual role as a chaperone and cytokine. *Nat. Med* 6:435-42

Ashburner M, Bonner JJ (1979): The induction of gene activity in Drosophila by heatshock. *Cell* 17:241-254

Bauer D, Muller H, Reich J, Riedel H, Ahrenkiel V, Warthoe P, Strauss M (1993): Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT- PCR). *Nucleic Acids Res* 21 4272-80 (x)

Bauer D, Warthoe P, Rohde M, Strauss M (1994): Detection and differential display of expressed genes by DDRT- PCR. *PCR Methods Appl* 4: 97-108 (x)

Binder RJ, Blachere NE, Srivastava PK (2001): Heat shock protein- chaperoned peptides but not free peptides introduced into the cytosol are presented efficiently by major histocompatibility complex I molecules. *J Biol.Chem* 276:17163-71

Bisno AL (2001): Acute pharyngitis . *N Engl J Med* 344(3): 205-11

Bohen SP, Yamamoto RI (1994): Modulation of steroid receptor signal transduction by heat shock proteins. In: The biology of heat shock proteins and molecular chaperones, Eds:

Moromoto RI, Tissiers A, Georgopoulos, 313-334, *CSHL Press*, Cold Spring Harbour, New York

Buchner J, Walter S (2002): Molecular chaperones- cellular machines for protein folding, *Angew Chem. Int. Ed.* 41:1098-13

Breloer M, Dorner B, More SH, Roderian T, Fleischer B, von Bonin A (2001): Heat shock protein as a “danger signal”: eucaryotic HSP 60 enhances and accelerates antigen-specific IFN- gamma production in T cells. *Eur J Immunol* 31:2051-59

Brugge JS, Erikson E, Erikson RL (1981): The specific interaction of the Rous sarcoma virus transforming protein, pp60src, with two cellular proteins. *Cell* 25, 363-372

Brugge JS (1986): Interaction of the Rous sarcoma virus protein pp60^{src} with the cellular proteins pp50 and pp90. *Curr Top Microbiol Immunol* 123, 1-22

Casteli C, Ciupitu AM, Rini F, Rivoltini L, Mazzocchi A, Kiessling R. (2001): Human heat shock 70 peptide complexes specifically activate antimelanoma T cells. *Cancer Res* 61:222-27

Chandler D, El- Nagggar AK, Brisbay S, Redline RW, McDonnell TJ (1994): Apoptosis and expression of the bcl-2 proto- oncogene in the fetal and adult human kidney: evidence for the contribution of bcl- 2 expression to renal cancerogenesis. *Hum Pathol* 25: 789-96

Chen S, Prapapanich V, Rimermen RA, Honore B, Smith DF (1996): Hsp90 chaperone activity requires the full- length protein and interaction among its multiple domains. *Mol Endocrinol* 10:682-693

Chiosis G, Lucas B, Shtil A, Huezos H, Rosen N (2002): Development of a purine- scaffold novel class of HSP90 binders that inhibit the proliferation of Cancer cells and induce the degradation of her2 tyrosine kinase. *Bioorganic Med Chem*, Vol 10, 3555-3564

Dittmar KD, Banach M, Galigniana M, Pratt WB (1998): The role of DnaJ- like proteins in glucocorticoid receptor hsp90 heterocomplex assembly by the reconstituted hsp90.p60.hsp70 foldosome complex. *J Biol Chem* 273:7358-7366

Domann E, Hong G, Imirzalioglu C (2004): Culture- independent identification of pathogenic bacteria and polymicrobial infections in the genitourinary tract of renal transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 41:5500-5510

Domann E, Imirzalioglu C, Hain T, Chakraborty T (2008): Hidden pathogens uncovered: metagenomic analysis of urinary tract infections. *Andrologia*, 40(2): 66-71

Dressel R, Elsner L (2000): Heat shock protein 70 is able to prevent heat shock- induced resistance of target cells to CTL. *J Immunol* 164(5):2362-71

Evan G, Littlewood T (1998): A matter of life and cell death. *Science* 81: 1317-22.

Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Stahle- Backdahl M, Liden S, Wigzell H, Gudmundsson GH (1997): The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human Keratinocytes during inflammatory disorders. *J Bio Chem* 272, 16258-15263

Garcia JR, Krause A, Schulz S, Rodruiguez- Jimenez FJ, Kluver E, Adermann K, Forßmann WG (2001): Human beta- defensin- 4: a novel inducible peptide with a specific salt sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J* 15, 1819-1821

Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G (2001): Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 286(3):433-42

Gerber A, Joder P, Möhr P (1992): Pneumonie in der Praxis. *Pharma-Kritik*, 14, Nr 2.

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP (1973): In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from series of solid tumors. *J Nat Cancer Inst* 1973, 51

Glaser R, Harder J, Lange H, Bartels J, Christophers E, Schröder JM (2005): Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from Escherichia coli infection. *Nat Immunol* 6: 57-64

Green DR (1998): Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 94: 695-8

Godowski PJ, Rusconi S, Miesfeld R, Yamamoto KR (1987): Glucocorticoid receptor mutants that are constitutive activators of transcriptional enhancement. *Nature* 326, 365-368

Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U, (1999): *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* Springer Verlag Berlin Heidelberg
ISBN 3-540-64484-9

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM (1997): A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387, 861

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM (2001): Isolation and characterization of human beta- defensin- 3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 276, 5707-5713

Harder J, Meyer- Hoffert U, Teran LM, Schwichtenberg L, Bartels J, Maune S, Schröder JM (2000): Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*, TNF- α and IL- 1 β , but not IL- 6 , induce human β - defensin- 2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Bio* 22, 714-721

Harder J, Schröder JM (2002): Rnase-7: a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem* 277(48):46779-84

Haysday JD, Singh IS (2000): Fever and the heat shock response: distinct, partially overlapping processes. *Cell Stress Chaperones* 5 (5):471-480.

Hoehfeld J, Minami Y, Hartl F-U (1995): Hip, a new cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell* 83, 589-598

Hostein I, Robertson D, DiStefano F, Workman P, Clarke AP (2001): Inhibition of Signal Transduction by the HSP90 Inhibitor 17- Allylamino- 17- demthoxygeldanamycin results in Cytostasis and Apoptosis. *Cancer Re* 61, 4003-4009

Huonovinen S. Klossner ML, Katila LM, Huonovinen P (1989): Plasmid- mediated beta-lactamases among aminoglycosides resistant gram- negative bacilli. *Scan J. Infect. Diseases* Vol.21, 303-309

Hutchinson KA, Czar M, Scherrer L, Pratt W.B. (1992): Monovalent cation selectivity for ATP- dependent association of the glucocorticoid receptor with hsp70 and hsp90. *J Biol Chem* 267:14047-14053

Hutchinson KA, Dittmar KD, Czar MJ, Pratt WB (1993): Proof that HSP70 is required for assembly of the glucocorticoid receptor into a heterocomplex with HSP90. *J Biol Chem* 269, 5043-5049

Jaattella M (1999): Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res* 1999; 248:30-43.

Jaattella M (1999): Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann Med* 1999;31:261-71

Jakob U, Buchner J (1994): Assisting spontaneity– the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones. *Trends in Biochem Sci* 19, 205-211

Johnson JL, Beito TG, Kreo CJ, Toft DO (1994): Characterisation of a novel 23- kilodalton protein of unactive progesterone receptor complexes. *Mol Cell Biol* 14, 1956-1963

Johnson JL, Toft DO (1994): A novel chaperone complex for steroid receptors involving heat shock protein, immunophilins and p23. *J Biol Chem* 269, 24989-24993

Jolly C., Moromoto R (2000): Role of heat shock protein response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Nat Cance rInst* 92:1564-72

Kelland LR, Sharp SY, Rogers PM, Myers TG, Workman P (1999): DT- diaphoresis expression and tumor cell sensitivity to 17-allylamino,17-demethoxygeldanamycin an inhibitor of heat shock protein 90, *J Natl Cancer Inst*, Vol. 91, 1940-1949

Koskinen PJ, Sistonen L, Evan G, Morimoto R, Alitalo K (1991): Nuclear colocalization of cellular and viral myc proteins with HSP70 in myc- overexpressing cells. *J Virol* 65:842-51

Kreutzig T (1997), *Kurzlehrbuch Biochemie*, Gustav Fischer Verlag GmbH & Co Kg, Stuttgart, ISBN 3-437-51050-9

Kroeger PE, Sarge KD, Morimoto RI (1993): Mouse heat shock transcription factor 1 and 2 prefer a trimeric binding site but interact differently with the HSP70 heat shock element. *Mol Cell Biol* 13:3370-83

Kuppner M, Gastpar R, Gelwer S, Noessner E, Ochmann O, Scharner et al. (2001): The role of heat shock protein (HSP70) in dendritic cell maturation : HSP70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocytes precursors. *Eur J Immunol* 31:1602-09

LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE (1998): The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 17:3247-59

Lang S, Moser C, Gaumann A, Klein D, Glockzin G, Popp F, Dahlke M (2007): Targeting Heat shock Protein 90 in Pancreatic Cancer Impairs Insulin- like Growth Factor- 1 Receptor Signaling, Disrupts an Interleukin- 6/Signal- Transducer and Activator of Transcription3/Hypoxia- Inducible Factor- 1 α Autocrine Loop, and Reduces Orthotopic Tumor Growth. *Clin Cancer Res* 13(21)

Liang P, Averboukh L, Pardee AB (1993): Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res* 21: 3269-75

Liang P, Pardee AB (1992): Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-71

Melcher A, Todryk S, Hardwich N, Ford M, Jacobsen M, Vile RG (1998): Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of heat shock proteins expression. *Nat Med* 4;581-87

Merill CR, Goldmann D, Sedmann SA, Ebert MH (1981): Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variations in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 211, 1437-1438

Milani V (2007): Hitzeschockproteine, Hyperthermie und Immunkompetenz. *J Onkologie* 04 197-202

Morishima Y, Murphy PJM, Li P-D, Sanchez ER, Pratt W B (2000): Stepwise assembly of a glucocorticoid receptor hsp90 heterocomplex resolves two sequential ATP- dependent events involving first hsp70 and then hsp90 in opening of the steroid binding pocket. *J Biol Chem* DOI 10.1074 (x)

Morishima Y, Kanelakis KC, Silverstein A, Dittmar K, Estrada L, Pratt WB (2003): The Hsp90 cochaperone p23 is the limiting component of the multiprotein Hsp90/Hsp70- based chaperone system in vivo where it acts to stabilizise the client protein (middle dot)Hsp90 complex. *J Biol Chem* 278: 48754-48763

Mosser D, Caron AW, Bourget L, Laruse- Denis C, Massi B (1997): Role of human heat shock protein hsp70 in protection against stress- induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 17; 5317-5327

Multhoff G, Botzler C, Jennen L, Schmidt J, Ellwart J, Issels R (1997): Heat shock protein 72 on tumor cells: a recognition structure for natural killer cells. *J Immunol* 158:4341-50

Neckers L, Schulte TW, Momnaugh E (1999): Geldanamycin as a potential anti- cancer agent:its molecular target and biochemical activity. *Invest. New Drugs*, Vol 17, 361-373

Neckers L (2002): HSP90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutics agents. *Trends in Mol Med* 8(4 Suppl.), S55-S61

Neuland HG, Duchstein HJ, Menge M (2005): Hitzeschockproteine als zellulärer Abwehrmechanismus gegenüber dem Einfluss äußerer Stressoren auf die Muskulatur.

Orthopädische Praxis 41,8 433-436

Nicholson JK, Holmes E, Lindon JC, Wilson ID (2004): The challenges of modeling mammalian biocomplexity. *Nat. Biotechnol* 22 1268-1274

Noessner E, Gaspar R, Milani V, Brandl A, Hutzler PJ, Kuppner MC, Roos M, Kremmer E, Asea A, Calderwood SK, Issels RD (2002): Tumor- derived heat shock protein70 peptide complexes are cross- presented by human dendritic cells. *J Immunol* 169 5424-32

Owens- Grillo JK, Hoffmann K, Hutchinson KA, Yem AW, Deibel MR, Handschumacher RE, Pratt WB (1995): The cyclosporin A- binding immunophilin Cyp- 40 and the FK 506- binding immunophilin hsp56 bind to a common site on hsp90 and exist in independent cytosolic heterocomplexes with the untransformed glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 270, 20479-20484

Pinhasi- Kimhi O, Michalovitz D, Ben- Zeev A, Oren M (1986): Specific interaction between the p53 cellular tumour antigen and major heat shock proteins. *Nature* 1986; 320: 182-4

Porter A, Jänicke R (1999): Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Diff* Vol 6, Nr2. 99-104

Pratt WB (1993): The role of heat shock proteins in regulation the function, folding and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 268, 21455-21458

Price BD, Calderwood SK (1991): Ca²⁺ is essential for multistep activation of heat shock factor in permeabilized cells. *Mol Cell Biol* 11:3365-8

Ratajczak T, Carrello A (1996): Cyclophilin 40 (Cyp-40), mapping of its hsp90 binding domain and evidence that FKBP52 competes with Cyp-40 for hsp90 binding. *J Biol Chem* 271, 2961-2965

Ravagnan L, Gurbuxani S, Santos A, Maisse C, Daugas E (2001): Heat- shock protein 70 antagonizes apoptosis- inducing factor. *Nat Cell Biol* 3, 839-843

Ritossa F (1962): A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. *Experimenta*, 18: 571-573

Samali A., Orrenius S (1998): Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress Chaperones*; 3:228-36

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, New York* (x)

Schett G, Steiner CW, Winkler S, Graninger W, Smolen J, Xu Q, Steiner G (2000): Die gegenseitige Beeinflussung von Fas- Aktivierung und Stressproteinantwort entscheidet über Apoptose oder Resistenzentwicklung von Zellen. *Acta Med. Austriaca* 27:94-98

Singh-Jasuja H, Scherer HU, Hilf N, Arnold- Schild D, Rammensee HG, Toes REM (2000): The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down regulation of its receptor. *Eur J Immunol* 30:2211-15

Smith BT, Torday JS (1977): Factors affecting lecithin synthesis by fetal lung cells in culture. *Pediat. Res.* 8, 848-851

Smith DF (1993): Dynamics of heat shock proteins 90- progesterone receptor binding and the disactivation loop model for steroid receptor complexes. *Mol Endocrin* 7, 4-11

Smith DF, Sullivan WP, Marion TN, Taitsu K, Madden B, McCornick DJ, Toft DO (1993): Identification of a 60 kDa stress- related protein, p60, which interacts with HSP90 and HSP70. *Mol Cell Biol* 13, 869-876

Smith DF, Whitesell L, Nair SC, Chen S, Prapapanich V, Rimerman RA (1995): Progesterone receptore strucure and function altered geldanamycin, an HSP90 binding agent. *Mol Cell Biol* 15, 6804-6812

Srivastava PK, Udono H (1994): Heat shock protein- peptide complexes in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 6:728-32

Srivastava P, Menoret A, Basu S, Binder R, McQuade K (1998): Heat shock protein come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world. *Immunity* 8:657-65

Stancato LF, Silverstein AM, Gitler C, Groner B, Pratt WB (1996): Use of thiol specific derivatizing agent N-iodoacetyl-3-[¹²⁵I] iodotyrosine to demonstrate conformational differences between the unbound and hsp90- bound glucocorticoid receptor hormone binding domain. *J Biol Chem* 271:8831-8836

Steller H (1995): Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267:1445-9.

Stewart BW (1994): Mechanism of apoptosis; integration of genetic, biochemical, and cellular indicators. *J Nat Cancer Inst* 86:1286-96

Strauss JH, Strauss EG (1994): The alphaviruses: geneexpression, replication, evolution. *Microbiol Rev* 58: 491-562

Tomioka M, Sameshima M, Nakano H, Kubo T, Shinohara K, Seyama Y, Kawashima S, Tome S (2002): A possible intermediate step during apoptotic execution. *Hum Cell* 15(1):43-51

Udono H, Srivastava PK (1993): Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *J Exp Med* 178; 1391-96

Vayssier M, Polla BS (1998): Heat shock proteins chaperoning life and death. *Cell Stress Chaperones* 3; 221-7

Wang XY, Kazim L, Repasky E, Subject J (2001): Characterization of heat shock protein 110 and glucose-regulated 170 as cancer vaccine and the effect of fever-range hyperthermia on vaccine activity. *J Immunol* 165: 490-497

Wegele H, Muller L, Buchner J (2004): Hsp70 and Hsp90- a relay team for protein folding. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 151, 1-44 (Springer Verlag Heidelberg, 1-44)

Whitesell L, Shifrin SD, Schwab G, Neckers LM (1992): Benzoquinonoid ansamycins possess selective tumoricidal activity unrelated to src kinase inhibition. *Cancer Res* 52:1721-8

Whitesell L, Mimnaugh EG, De Costa B, Myers CE, Neckers LM (1994): Inhibition of heat shock protein Hsp90- pp60 v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: Essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 8324-8328

Xu Y, Lindquist S (1993): Heat shock protein hsp90 governs the activity of pp60v-src kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7074-8

Xu Y, Singer MA, Lindquist S (1999): Maturation of the tyrosin kinase s-src as a kinase and as a substrate depends on the molecular chaperone Hsp90. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:109-14

Ziemiecki A, Catelli MG, Joab I, Moncharmont B (1986): Association of the heat shock protein hsp90 with steroid hormone receptors and tyrosine kinase oncogene products. *Biochem Biophys Res Commun* 138:1298-307.

8 Danksagung

Frau Prof. Dr. med. P. Ambrosch, Direktorin der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian- Albrechts- Universität zu Kiel, danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Mein größter Dank gilt Herrn PD Dr. rer. nat. T. Görögh aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian- Albrechts- Universität zu Kiel für seine Hilfen bei der Einarbeitung in die verschiedenen molekularbiologischen Untersuchungstechniken, seine fachlichen Ratschläge bei der Durchführung des experimentellen Teils der Arbeit, seine konstruktive Kritik zur formellen Gestaltung der Arbeit und für seine Geduld.

Außerdem danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern im Labor für experimentelle Onkologie der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian- Albrechts-Universität zu Kiel. Hier danke ich besonders Frau A. Røen- Tietgen, für ihre technische und stets hilfsbereite Assistenz.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie für ihre Unterstützung.

9 Lebenslauf

Angaben zur Person

Anschrift	Heike Struve geb. Hagen Grindelberg 79 20144 Hamburg 040/67307039 0178/2941022
Geburtsdatum	23.07.1977
Geburtsort	Vechta
Familienstand	verheiratet
Konfession	evangelisch

Schule

1983- 1987	Grundschule Vechta
1987- 1996	Liebfrauenschule, Vechta, Gymnasium
21.05.1996	Abitur

Beruf und Studium

1996- 1997	Freiwilliges soziales Jahr Marienhospital, Bonn
WS 97/98 bis SS 99	Studium der Medizin Ludwig-Maximilians-Universität, München Ärztliche Vorprüfung
WS 99/00	Ausbildung zum Rettungssanitäterhelfer Nachtwachen im Klinikum Großhadern, München

SS 00 bis SS 04	Studium der Medizin Christian-Albrechts-Universität, Kiel
April 03 bis August 03	Praktisches Jahr, Städtisches Krankenhaus, Kiel Innere Medizin
August 03 bis Oktober 03	Praktisches Jahr, Klinikum Itzehoe Chirurgie
Oktober 03 bis Dezember 03	Praktisches Jahr, Raigmore Hospital, Inverness Chirurgie
Dezember 03 bis März 04	Praktisches Jahr, Klinikum Itzehoe Anästhesie
24.05.2004	Ärztliche Prüfung
Juni 04 bis November 05	Assistenzärztin in der Abteilung für Allgemein- Gefäß- und Visceralchirurgie im Klinikum Itzehoe
Seit Februar 09	Assistenzärztin in der Abteilung für Orthopädie im Reha- Zentrum Harburg
Familie	
09.03.2006	Geburt des 1. Kindes
07.09.2007	Geburt des 2. Kindes
Sonstiges	
Sprachkenntnisse	Englisch Französisch