

Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. K. Roosen

**Der Proteasomenaktivator PA28 γ bei der Tumorentstehung
und seine Verbindung zur Stresssignalgebung und zur Zellzyklusregulation**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Almuth Friederike Keßler

aus Würzburg

Würzburg, im September 2009

Referent: Professor Dr. med. K. Roosen

Korreferent: Professor Dr. med. A. Rosenwald

Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: Donnerstag, der 13.12.2012

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
Astrozytome, deren Merkmale und derzeitige Therapie-Ansätze	1
1.1 Klinik und prognostische Faktoren der astrozytären Tumore	1
1.2 Pathologie und Pathogenese der Astrozytome	2
1.3 Bisherige Therapien und neue Ansätze	4
1.4 Das Proteasom und seine Aktivatoren	6
1.5 Proteasomeninhibitoren als mögliche Therapie des Glioblastoms	8
1.6 PA28 γ und die Zellzyklusregulation	9
1.7 Der Zellzyklus und sein mitotischer Spindelkontrollpunkt	10
1.8 Ziel der Arbeit	15
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 Material	16
2.1.1 Geräte	16
2.1.2 Kits	17
2.1.3 Chemikalien	17
2.1.4 Verbrauchsmaterial	20
2.1.5 Lösungen und Medien	21
2.1.6 Zelllinien, Bakterien, Hefen	26
2.1.7 Plasmide	27
2.1.8 Antikörper	27
2.1.9 Marker	27
2.1.10 Primer	28
2.1.11 Enzyme	28
2.2 Methoden	30
2.2.1 Hefe Two-Hybrid Screen	30
2.2.1.1 Hefe-Transformation	32

2.2.1.2 Transformation von HF7c-Hefen mit pPC97-PA28 γ und pPC86-DNA-Bibliotheksfragment für den Hefe Two-Hybrid-Screen	34
2.2.1.3 Hefen einfrieren	36
2.2.1.4 X-Gal-Test	36
2.2.1.5 Hefe-Plasmidisolierung	37
2.2.1.6 Bakterien-Transformation	38
2.2.1.7 Plasmidextraktion aus Bakterien	38
2.2.1.8 DNA-Maxi-Präparation	39
2.2.1.9 DNA-Mini-Präparation	40
2.2.1.10 Aufreinigung von DNA über das Nucleobond AX Kit von Macherey-Nagel	41
2.2.1.11 Restriktionsverdau	41
2.2.1.12 Differenzierung zwischen pPC97-PA28 γ und pPC86-DNA-Bibliotheksfragment durch Agarose-Gelelektrophorese	41
2.2.1.13 Sequenzierung	42
2.2.1.14 Identifizierung unbekannter Sequenzen	43
2.2.2 Weitere RNA/DNA basierte Methoden	43
2.2.2.1 RNA-Isolation aus Tumorproben	43
2.2.2.2 Quantifizierung von RNA, photometrische Messung	44
2.2.2.3 Semiquantitative PCR Analyse	44
2.2.2.4 Erststrang cDNA Synthese	45
2.2.2.5 Gewinnung von Tumorproben und Normalhirngewebe	45
2.2.2.6 Semiquantitative RT-PCR Analyse	47
2.2.3 Zellkultur	48
2.2.3.1 Zellen auftauen	48
2.2.3.2 Zellen splitten	49

2.2.3.3 Zellen einfrieren	49
2.2.3.4 Zellen lysieren	49
2.2.4 GST-Pulldown-Assay	50
2.2.4.1 GST-Protein-Aufreinigung	50
2.2.4.2 Coomassie-Färbung	52
2.2.4.3 GST-Pulldown mit endogenem Mad2b aus GaMG-Zellysat	52
2.2.4.4 Western Blot	54
2.2.5 Transfektion mittels Elektroporation (Nucleofector Device Amaxa)	56
2.2.6 Proliferationsassay	57
3. ERGEBNISSE	59
3.1 PA28 γ interagiert mit Mad2b	59
3.2 PA28 γ -Expression in humanen Astrozytom-Proben mit Hilfe von semiquantitativer RT-PCR	61
3.3 Proliferationsassay	65
3.4 Hefe Two-Hybrid Screen mit PA28 γ	68
4. DISKUSSION UND AUSBLICK	71
4.1. PA28 γ interagiert mit Mad2b	72
4.2 Nachweis der PA28 γ Expression in humanem Astrozytom-Gewebe	73
4.3 Proliferationsassay	75
4.4 Hefe Two-Hybrid Screen mit PA28 γ	77
4.4.1 Ubiquitin-konjugierendes Enzym 9 (Ubc9)	77
4.4.2 Homeodomain interacting protein kinase 1 (HIPK1)	79
4.4.3 1A6/DRIM-interacting protein	81

4.4.4 Catenin α	81
4.4.5 CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBP β)	82
4.5 Ausblick	83
5. ZUSAMMENFASSUNG	86
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	88
5. LITERATUR	91

Danksagung

Lebenslauf

1. EINLEITUNG

Astrozytäre Tumore, deren Merkmale und derzeitige Therapie-Ansätze

In den vergangenen Jahrzehnten gab es weitgreifende Entwicklungen und Neuerungen im Bereich der Krebstherapie. Auch beim Glioblastoma multiforme (GBM), dem nach der World Health Organisation (WHO) klassifizierten Gliom Grad IV, wurde eine Verbesserung des Therapieerfolges und somit ein therapeutischer Fortschritt für den Patienten erzielt. Durch eine kombinierte Radiochemotherapie mit Temozolomid beträgt die mittlere Überlebensdauer nach Diagnose 14,6 Monate (Stupp et al., 2005). Dieser Zeitraum ist jedoch immer noch sehr kurz. Langfristiges Ziel der Forschung bzgl. der Therapie astrozytärer Tumore bleibt ein kurativer Ansatz.

1.1 Klinik und prognostische Faktoren der astrozytären Tumore

Für primäre Hirntumore gibt es zwei Erkrankungsgipfel: Im Kindesalter und bei Patienten zwischen 45 und 70 Jahren. Bei Kindern (unter 15) machen die primären Hirntumore insgesamt etwa 20% aller Krebserkrankungen aus (Reifenberger und Collins, 2004), während im Erwachsenenalter nur 2% aller Krebserkrankungen Hirntumore darstellen. Das Glioblastoma multiforme WHO Grad IV ist mit etwa 50% aller diagnostizierten der häufigste primäre Hirntumor bei Erwachsenen. (Kumar et al., 2003).

Klinisch auffällig werden astrozytäre Tumore abhängig von ihrer Lokalisation, Größe und Wachstumsgeschwindigkeit. Oft bestehen Symptome bei Diagnose, v. a. beim GBM, kürzer als sechs Monate (Tysnes et al., 2001).

Zeichen des erhöhten Hirndrucks können zur Erstmanifestation gehören. Hierzu zählen Kopfschmerzen, Erbrechen oder Sehstörung. Auch epileptische Anfälle, fokalneurologische Defizite, Vigilanzminderung oder psychische Veränderungen gehören zum Spektrum der ersten klinischen Zeichen (Ichimura et al., 2004).

Bei den astrozytären Tumoren wurden, analog zu anderen Krebserkrankungen, prognostische Faktoren analysiert. Positiv wirkt sich ein niedriges Ersterkrankungsalter aus. Auch ein hoher Karnofsky-Status, wenige Nekrosen und wenig Residual-Tumor nach chirurgischer Entfernung sind positiv zu werten (Reifenberger und Collins, 2004). Wird zum Beispiel mittels prä-operativer 5-ALA-Gabe das Glioblastom intraoperativ unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar, verbessert sich das Resektionsergebnis. Folgend ist meist in der früh-postoperativen Bildgebung kein kontrastmittelauffiner Tumor mehr nachweisbar. Dies verbessert die Prognose entscheidend (Pichlmeier et al., 2008).

1.2 Pathologie und Pathogenese der Astrozytome

Astrozytome gehören zur Gruppe der Gliome und entstehen aus Glia-Zellen, von denen man im zentralen Nervensystem (ZNS) vier Typen unterscheidet:

Astrozyten haben sehr vielfältige Funktionen, neben allgemeiner Stützfunktion sind sie auch für Ernährung und Regeneration, sowie für die Bildung von Glia-Narben zum Teilersatz von untergegangenen ZNS-Gewebe elementar. Zusätzlich sind sie an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke und an der Modulation von Signalübertragung beteiligt.

Oligodendrozyten bilden die Markscheide, während Mikrogliazellen für Immun- und Abräumvorgänge verantwortlich sind.

Ependymzellen schließlich dienen der Auskleidung der inneren Liquorräume. Die Gliazellen nehmen fast die Hälfte des gesamten ZNS-Volumens ein und stellen mehr als 90% der ZNS-Zellen (Trepel, 2004).

Astrozytome, wie bereit erwähnt aus Gliazellen entstehend, werden anhand ihrer Dignität in verschiedene Grade eingeteilt.

Die Einteilung der WHO orientiert sich an morphologischen Merkmalen, wie Nekrose, endotheliale Proliferation und Anstieg der Zelldichte bzw. Zellteilungen. Mit dem WHO-Grad steigt die Malignität (Poeck und Hacke, 2001).

Das pilozytische Astrozytom ist ein langsam wachsender astrozytärer Tumor des Kindesalters mit bevorzugter Lokalisation in den Mittellinienstrukturen des Gehirns. Es kann, wenn möglich, durch eine komplette chirurgische Resektion kurativ behandelt werden, und zeigt selten eine maligne Progression (Reifenberger und Collins, 2004). Das niedriggradige Astrozytom manifestiert sich bevorzugt bei jüngeren Erwachsenen mit einem Wachstumsgipfel zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr und besitzt eine geringe Wachstumstendenz. Allerdings infiltriert es benachbarte Strukturen, so dass eine vollständige Resektion auf zellulärer Ebene nicht möglich ist.

Das anaplastische Astrozytom entwickelt sich häufig aus einem niedriggradigen Astrozytom. Es unterscheidet sich morphologisch im Wesentlichen durch eine größere Zellteilungsaktivität, was sich klinisch durch ein rascheres Auftreten von Rezidiven zeigt (Reifenberger und Collins, 2004).

Als WHO Grad IV wird das Glioblastoma multiforme klassifiziert, wobei die Nekrosen oft zentral im Tumor liegen. Grad IV steht für aggressives Wachstum und hohe Invasivität. Zusätzlich sind im Gegensatz zu niedrigergradigen Astrozytomen oft Neoangiogenese und (meist zentral in der Raumforderung gelegene) Nekrosen zu finden. Das GBM ist ein anaplastischer, sehr zellreicher und schlecht differenzierter Tumor. Die Zellen sind rund oder pleomorph, gelegentlich mehrkernig mit nukleären Atypien. Typisch ist auch die Chromosomeninstabilität. Sie betrifft beim GBM unter anderem die Chromosomen 7, 10 und 17 (Reifenberger und Collins, 2004).

Entstehen können GBM entweder *de novo* oder sekundär aus niedriggradigen Astrozytomen, wobei sich diese „Weiterentwicklung“ meist nur über Monate erstreckt, teilweise aber auch über Jahre hinziehen kann.

1.3 Bisherige Therapien und neue Ansätze

Bis vor kurzem betrug die mittlere Überlebensdauer nach der Diagnose für GBM-Patienten ca. 12 Monate. Somit ist die Prognose für GBM-Patienten sehr schlecht. Durch den Einsatz einer kombinierten Strahlentherapie unter gleichzeitiger Gabe des Chemotherapeutikums Temozolomid konnte aber eine Steigerung der medianen Überlebensdauer auf 14,6 Monate erreicht werden (Stupp et al., 2005). Auch eine vollständige Resektion des Tumors verbessert die Prognose entscheidend. Allerdings kann das GBM unter anderem auf Grund der hohen Infiltrationsrate nie radikal operiert werden (Stupp et al., 2005). Deutliche klinische Besserung wird meist durch Bestrahlung und antiödematöse Therapie erreicht (Hentschel und Lang, 2003).

Um neue und erfolgversprechende Therapieansätze zu entwickeln, wie sie mit Temozolomid als einem ersten Beispiel erreicht werden konnten, ist die genaue Kenntnis der molekular-biologischen Grundlagen des GBMs, insbesondere von Signalwegen und Mutationen bzw. LOH, dem Verlust von Heterozygotität (engl. Loss of Heterozygosity), von Bedeutung.

Abb. 1 gibt einen kurzen Überblick der wichtigsten bisher identifizierten Veränderungen und zeigt neue Ansätze z. B. durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren, die derzeit auch für den Einsatz bei der GBM-Behandlung diskutiert werden.

In erster Linie sind anti-angiogenetische Ansätze vielversprechend (z.B. Avastin®), des Weiteren sogenannte „small molecules“ wie z.B. Thyrosinkinaseinhibitoren.

Ein weiterer Ansatz ist die direkte Beeinflussung der Apoptoseregulation. Apoptose ist eine Form des Zelltodes, die vom Organismus zur Entfernung von alternden, beschädigten oder entarteten Zellen benötigt wird.

Apoptose-induzierende Signalwege werden bereits mittels Chemotherapien und Bestrahlung gezielt beeinflusst. Allerdings zeigen sich spezifisch Glioblastomzellen wenig empfindlich gegenüber diesen Maßnahmen.

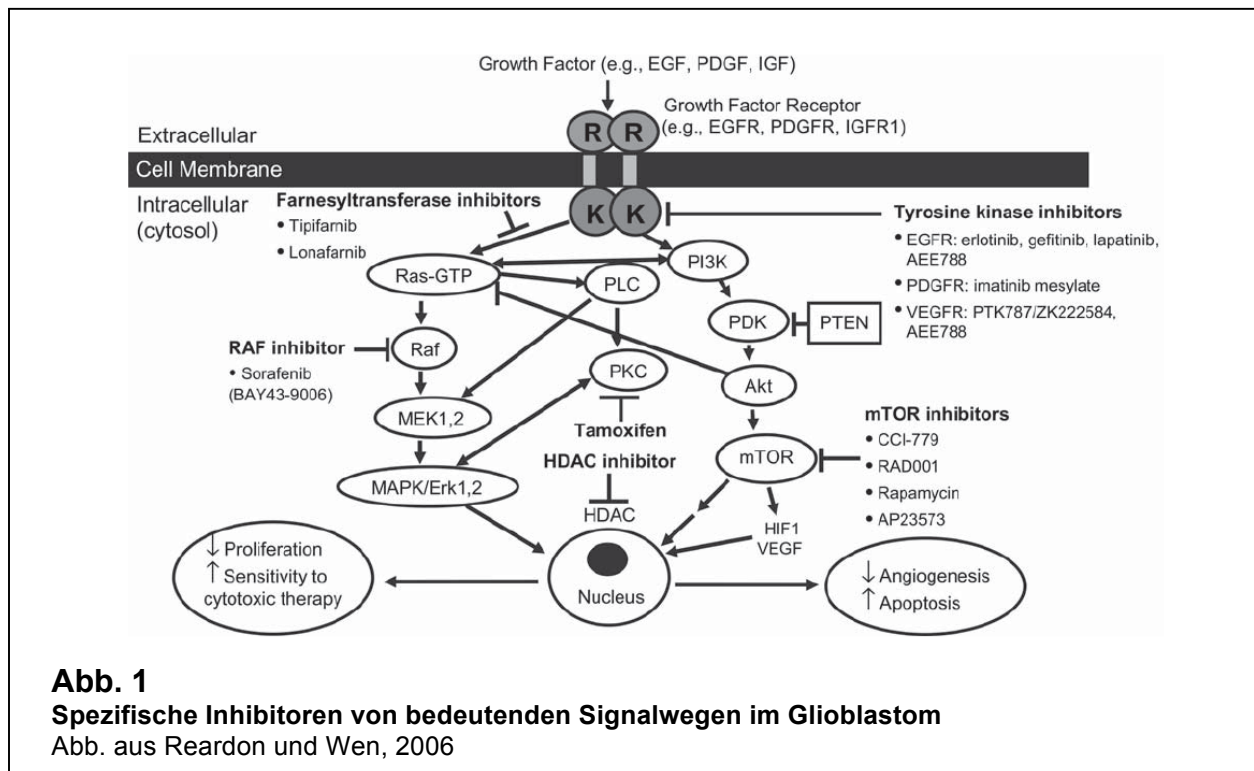
mTOR und die folgende Signalkaskade (in Abb. 1) spielen beim Glioblastom eine wichtige Rolle bzgl. Zellwachstum, Proliferation und Überleben der Zelle. An mTOR greift zum Beispiel Rapamycin als Inhibitor an. Es gibt Hinweise, dass die Unempfindlichkeit des

Glioblastoms gegenüber pro-apoptotischen Effekten, wie sie zum Beispiel durch APO2L/TRAIL ausgelöst werden, auf einer Aktivierung der mTOR-Signalkaskade beruht (Panner et al., 2006).

TRAIL (Tumor Nekrosis-Factor-related apoptosis inducing ligand) wird von Monozyten und B-Lymphozyten gebildet, und hat dementsprechend eine Rolle im Immunsystem. Es wird zu den Tumornekrosefaktoren gezählt, mit Apoptose-auslösender Wirkung in der Zielzelle. Diese wird durch aktivierte Caspase-8 vermittelt. Die höchste Konzentration ist in Lunge, Milz und Prostata zu finden (Thorpe et al., 2008).

TRAIL ist einer der wichtigsten Faktoren für die Inaktivierung von Tumorzellen. Er beeinflusst *in vitro* und *in vivo* das Wachstum von Tumorzellen im Mausmodell. Dabei werden gesunde, nicht tumoröse Zellen nicht geschädigt (Ashkenazi et al., 1999).

Primärkulturen von Astrozytomen aller WHO-Grade (nicht Glioblastomzelllinien) sind unempfindlich gegenüber TRAIL. Die Überwindung der TRAIL-Resistenz ist eine vielversprechende Option für neue GBM-Therapien, in diesem Beispiel über die Hemmung des mTOR-Signalweges mittels Rapamycin in Kombination mit APO2L/TRAIL gezeigt (Panner et al., 2006).



1.4 Das Proteasom und seine Aktivatoren

Ein weiterer Ansatz bezüglich Wachstum und Apoptose im GBM wurde ursprünglich von Yin et al. 2005 publiziert. Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass der Proteasomeninhibitor PS-341 zu Apoptose in humanen Glioblastomzelllinien und in Primärkulturen von Glioblastomen führt (Yin et al., 2005).

Das Proteasom selbst ist ein 1.700 kDa schwerer Proteinkomplex, der dem Abbau von Proteinen und Peptiden im Cytoplasma und im Zellkern dient. Der Kernkomplex des Proteasoms ist ein tonnenförmiger Zylinder, in dessen Innenseite sich das katalytische Zentrum befindet. Hier können an drei verschiedenen Proteolyse-Stellen verschiedenste Abbauvorgänge ablaufen. Der Kernkomplex besteht aus 28 Protein-Untereinheiten und ist in der Regel inaktiv, da der Zugangskanal verschlossen ist und Substrate nicht an das katalytische Zentrum gelangen können (Abb. 2a). Erst durch Verbindung des Kernkomplexes mit einem Proteasomenaktivator öffnet sich der Kanal, sodass das katalytische Zentrum für die Substrate zugänglich wird (Abb. 2b) (Groll et al., 2000).

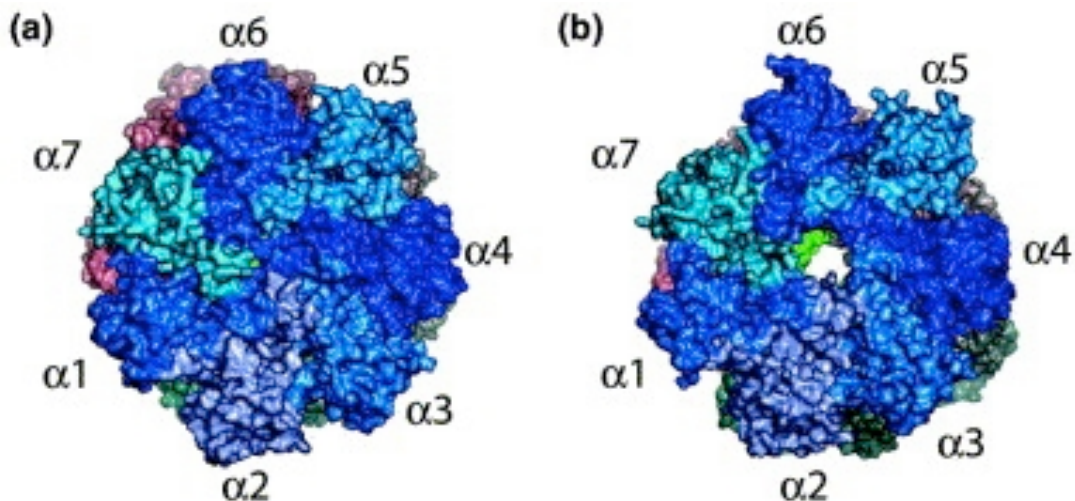


Abb. 2

Der Proteasomen 20S Komplex.

Blick auf den Zugangskanal, a) geschlossen, b) geöffnet

Grün: Katalytisches Zentrum

Abbildung aus Groll et al., 2000

Die Proteasomenaktivatoren steuern nicht nur Aktivität und Inaktivität des Proteasoms, sondern regulieren auch, welche Substrate Zugang zum katalytischen Zentrum bekommen und somit abgebaut werden können. Außerdem scheinen sie Einfluss auf die Lokalisation der Proteasomen zu haben.

Der Hauptproteasomenaktivator ist PA700. Er führt zum ATP-abhängigen Abbau von ubiquitinierten Proteinen und Peptiden.

PA28 α und PA28 β -Untereinheiten bilden einen weiteren, heptameren Aktivorkomplex, der eine wichtige Rolle bei der Immunantwort spielt, indem das Proteasom unter ihrer Kontrolle Peptide für die MHC Klasse I Rezeptoren herstellt. Induziert werden PA28 α und PA28 β durch Infektionen und Interferon γ .

Ein nukleär exprimiertes Homolog zu den beiden vorgenannten Proteasomenaktivator-untereinheiten ist PA28 γ . Seine Expression wird nicht durch Interferon γ gesteigert. Bei Infektionen sinkt sein Spiegel sogar. Über seine genaue Funktion und Regulation ist noch sehr wenig bekannt (Rechsteiner und Hill, 2005). Es wird im Gegensatz zu PA28 α und PA28 β in hoher Konzentration im Hirngewebe nachgewiesen, in anderen Geweben aber nur mäßig exprimiert (Rechsteiner und Hill, 2005).

Hinweise auf eine Rolle von PA28 γ bei der Proliferation lieferten Okamura et al. 2003. Sie zeigten, dass PA28 γ in Schilddrüsentumoren überexprimiert wird, wobei die Überexpression auf proliferierende Zellen beschränkt ist. Die PA28 γ -Spiegel steigen weiter mit höherer Malignität. In diesem Zusammenhang waren erhöhte Spiegel nur in Bereichen beschleunigten Wachstums nachweisbar.

Dieser erste Hinweis auf eine Funktion von PA28 γ bei der Regulation der Proliferation wird durch den Nachweis unterstützt, dass der Steroid Receptor Coactivator-3 (SRC-3) PA28 γ -abhängig degradiert wird. SRC-3 beeinflusst die Expression eines Östrogenrezeptors und darüber die Östrogen-abhängige Zellteilung (Li et al., 2006).

Desweiteren scheint PA28 γ in die Apoptoseregulation eingebunden zu sein. PA28 γ ^{-/-} Fibroblasten zeigen eine fast dreifach gesteigerte Apoptoserate. Es konnte auch eine Interaktion zwischen PA28 γ und MEKK3 nachgewiesen werden (Hagemann et al., 2003). MEKK3 führt über mehrere Schritte zur Aktivierung von JNK und p38, welche unter

anderem zentrale Rollen in Apoptose-Signalwegen spielen (Alberts et al., 2002). In diesem Zusammenhang könnte PA28 γ ein effektives und genaues Therapieziel bieten. Derzeit sind eher Proteasomeninhibitoren wie zum Beispiel PS-341 im Fokus der Forschung. Diese Proteasomeninhibitoren blockieren jedoch alle Proteasomenaktivitäten. Über die Regulation einzelner Proteasomenaktivatoren können beispielsweise nur Apoptose-induzierende Signalwege spezifisch beeinflusst werden.

1.5 Proteasomeninhibitoren als mögliche Therapie des Glioblastoms

Der Proteasomeninhibitor PS-341 befindet sich derzeit unter dem Namen Bortezomib (Velcade[®]; Millenium Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, MA, bzw Vertrieb in Deutschland durch Janssen Cilag) in einer Phase I-Studie für Patienten mit progressivem bzw. rezidivierendem GBM (Tremont-Lukats et al., 2003).

Bortezomib bindet reversibel an die β_5 -Untereinheit des katalytischen Zentrums des 20 S Proteasoms (Abb. 3) und verhindert dadurch den Abbau von Proteinen (Fernández et al., 2005).

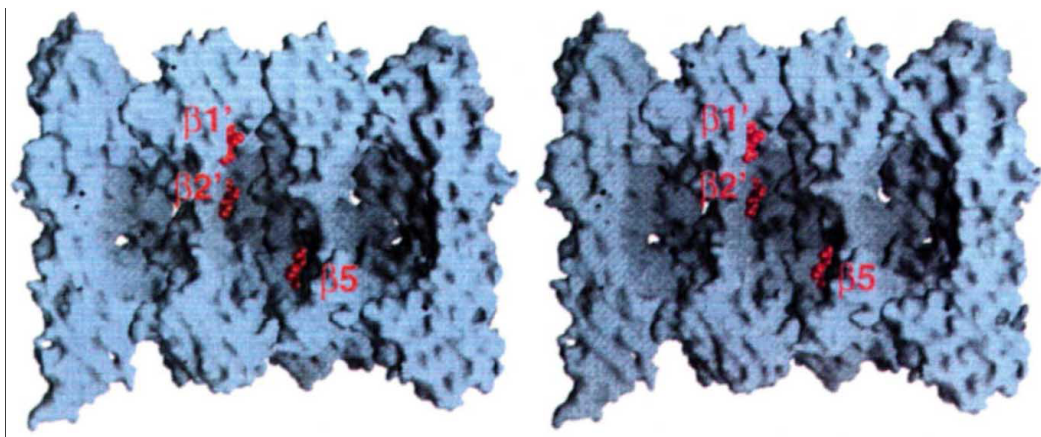


Abb. 3

Querschnitt durch den 20S Kernkomplex.

Die β -Untereinheiten des katalytischen Zentrums sind rot hervorgehoben. Bortezomib bindet an β_5 .
Abbildung aus Groll et al., 1997

Zugelassen ist Bortezomib als genereller Proteasomeninhibitor bereits als Therapeutikum beim multiplen Myelom, eine vom Knochenmark ausgehende Plasmazellvermehrung (auch Plasmozytom genannt), die den hämatoonkologischen Krankheitsbildern zugeordnet wird. Angewendet werden darf Bortezomib seit 2004 bei Plasmozytom-Patienten, bei denen eine Stammzelltransplantation erfolglos war oder bei denen Kontraindikationen gegen letztere gegeben sind (Richardson et al, 2005).

Bortezomib sensitiviert auch primäre Astrozytom-Kulturen für den Tumor Nekrosis-Factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL). Dies ist der gleiche Angriffspunkt wie der oben beschriebenen Mechanismus mittels Hemmung des mTOR-Signalweges durch Rapamycin. Im Gegensatz zu Glioblastomzelllinien sind Primärkulturen von Astrozytomen aller WHO-Grade unempfindlich gegenüber TRAIL. Unter zusätzlicher Behandlung durch Bortezomib zeigten sich aber auch Primärkulturen sensitiviert. Dies ist eine weitere vielversprechende Option für neue GBM-Therapien (Koschny et al., 2007).

1.6 PA28 γ und die Zellzyklusregulation

Das Proteasom übt zentrale Steuerfunktionen in der Zelle aus. Insbesondere ist die Regulation des Zellzyklus vom zeitlich genau abgestimmten Auf- und Abbau spezifischer Faktoren abhängig. Die Rolle von PA28 γ ist hierbei aber noch wenig untersucht. Bei PA28 γ -defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese zwar gesund waren, aber deutlich langsamer wuchsen. Auch ergaben sich Hinweise auf Störung in Apoptose und Mitose. PA28 $\gamma^{-/-}$ Fibroblasten wiesen einen höheren Anteil an Zellen in der G1 Phase und eine geringere Sättigungsdichte auf (Murata et al., 1999). Außerdem beeinflusst PA28 γ den Ubiquitin-unabhängigen Abbau von p21, einem Zellzyklus-Inhibitor. Im Gegensatz dazu zeigt der 19 S Aktivator (PA700) nur geringen Einfluss auf die Abbaugeschwindigkeit von p21 (Chen et al., 2007). PA28 γ steht also in direktem Zusammenhang mit der Zellzyklusprogression.

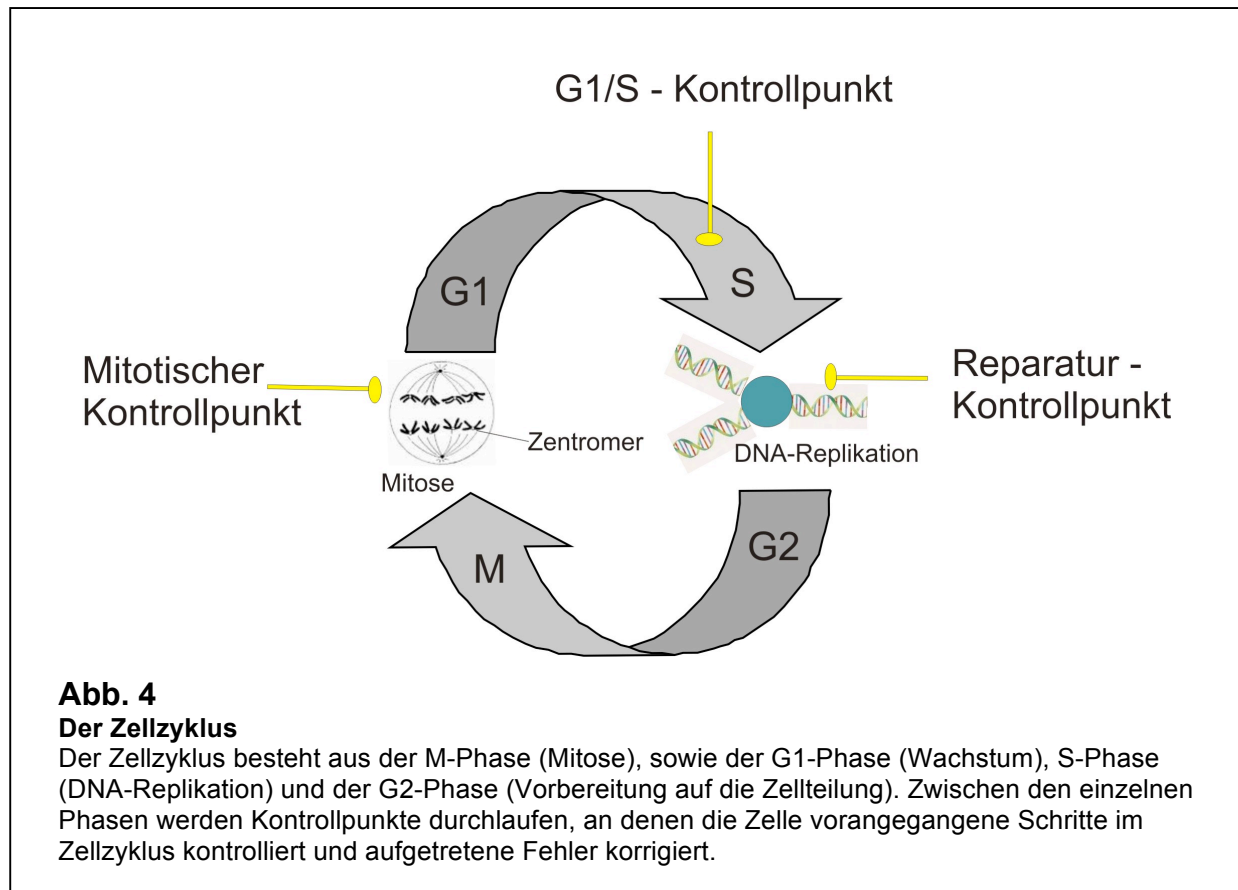
1.7 Der Zellzyklus und sein mitotischer Spindelkontrollpunkt

Eine Zelle durchläuft während ihres Zyklus (Abb. 4) mehrere Phasen. Man unterscheidet zunächst die Mitose, während der sich die Zelle teilt von der Interphase als Phase zwischen den Teilungen. Die Interphase gliedert sich in G1-, S- und G2-Phase. Die G1-Phase als postmitotische Phase dient dem Wachstum der Zelle nach der Zellteilung und der Synthese verschiedener Zellbestandteile. Die S-Phase dient als Synthesephase der Replikation der DNA, so dass nach der Zellteilung wieder Chromosomen aus zwei Chromatiden vorliegen. Die G2-Phase ist die prämitotische Phase, die der Vorbereitung der Zelle auf die Zellteilung dient. Dies geschieht mittels verstärkter Herstellung von Proteinen, die eine Rolle während der Mitose haben. Zusätzlich werden zum Beispiel Kontakte zu Nachbarzellen gelöst und vermehrt RNA-Moleküle angefertigt.

Während der Mitose (M-Phase) teilen sich die Chromosomen, der Zellkern und schließlich die Zelle selbst.

Zusätzlich kann die Zelle in die G0-Phase gehen. In dieser Phase befinden sich ruhende Zellen, die entweder nach einiger Zeit wieder in die G1-Phase wechseln und am normalen Zellzyklus teilnehmen können, oder ausdifferenzierte Zellen, die in der G0-Phase bleiben und sich nicht mehr teilen.

Während der Phasen des Zellzyklus durchläuft die Zelle mehrere Kontrollpunkte, während der vorangegangene Schritte des Zellzyklus überprüft werden (Abb. 4).



Werden dabei Fehler detektiert, so stoppt der Zellzyklus so lange, bis sie behoben worden sind. Ist die Zelle dazu nicht im Stande, so leitet sie die Apoptose ein.

So werden zum Beispiel am G1-Kontrollpunkt Umgebungsbedingungen kontrolliert wie z. B. Temperatur, Nährstoff-Versorgung und Zellgröße, bevor die Zelle mit der Teilung beginnt, um sicherzustellen, dass die Ressourcen ausreichen, den Zyklus komplett zu durchlaufen.

Nach der G1 und G2 Phase wird dann die DNA-Replikation überprüft und gefundene Schäden werden repariert. Im Allgemeinen kann der DNA-Reparaturkontrollpunkt jedoch zu jedem Zeitpunkt im Zellzyklus eingeschaltet werden (Alberts et al., 2002).

Eine weitere dieser Stationen ist der mitotische Kontrollpunkt. Auch hier ist das korrekte Zusammenspiel vieler verschiedener Proteine nötig, um einen fehlerfreien Ablauf zu gewährleisten.

Während der Mitose werden in der Anaphase die Chromosomen zur sogenannten Metaphaseplatte aufgereiht und von den Spindelkörpern ausgehende Mikrotubuli heften

sich an das Zentromer einer jeder Schwesterchromatide (Abb. 5a). Durch Verkürzung der Mikrotubuli trennen sich die beiden Schwesterchromatiden der Chromosomen (Abb. 5b) und werden gleichmäßig auf die Tochterzellen aufgeteilt, sodass diese jeweils einen identischen DNA-Satz erhalten. (Abb. 5c). Auf Ebene der ehemaligen Metaphaseplatte bildet sich nun die neue Zellmembran (Alberts et al., 2002).

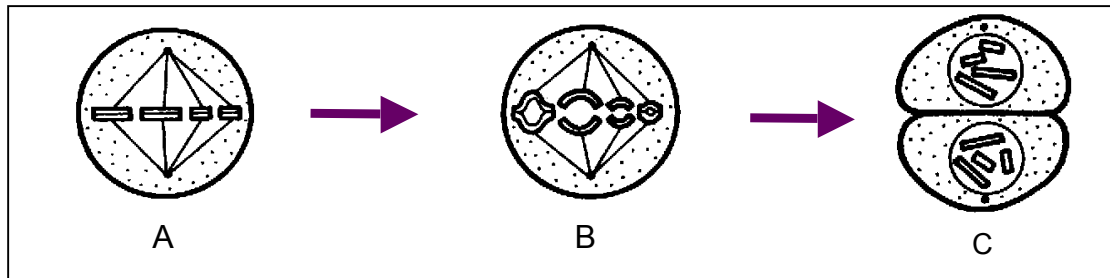


Abb. 5

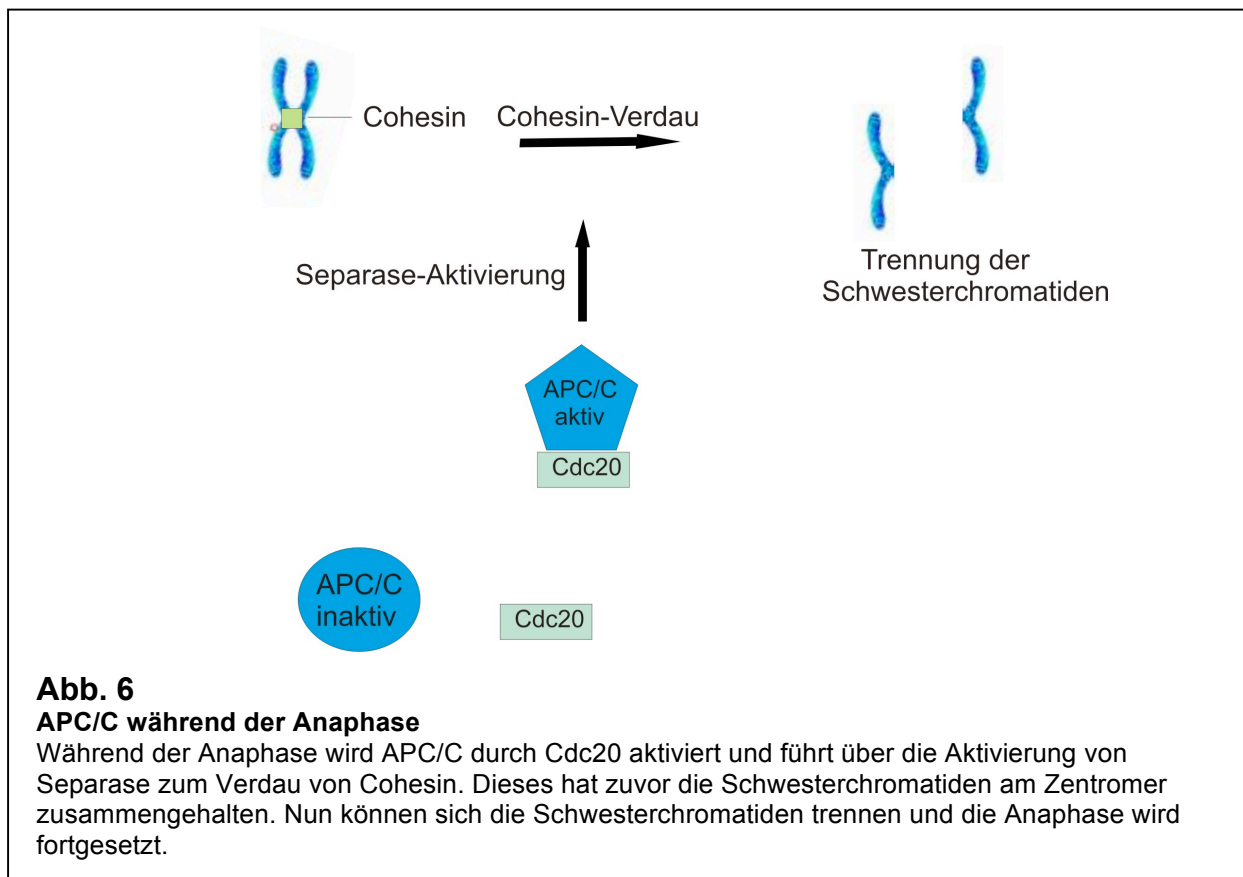
Die Mitose

Während der Mitose werden die Chromosomen in der Metaphaseplatte aufgereiht (A). Im Anschluss werden die Schwesterchromatiden durch Mikrotubuli auseinandergezogen (B). So erhalten die Tochterzellen (C) jeweils einen identischen DNA-Satz, während auf Ebene der Metaphaseplatte die neue Zellmembran entsteht.

Der mitotische Kontrollpunkt (Abb. 4) dient der Überprüfung der gleichmäßigen Verteilung der DNA auf die Tochterzellen. Erst wenn beide Zentromere der Schwesterchromatiden mit einem Mikrotubulus und somit mit dem Spindelkörper verbunden sind, kann die Zelle die Teilung der Chromosomen vornehmen. Somit wird durch den mitotischen Kontrollpunkt gewährleistet, dass nicht unbeabsichtigt zwei Schwesterchromatiden eines Chromosoms in eine Tochterzelle gelangen. Diese Tochterzelle besäße also in Folge dieses Chromosom doppelt, während es der anderen Tochterzelle völlig fehlen würde.

Fehlfunktionen im mitotische Kontrollpunkt führen häufig zu Chromosomeninstabilitäten (Bharadwaj und Yu, 2004), und können im weiteren Verlauf eine Ursache der Krebsentstehung sein (Sotilli et al., 2007). Gerade das GBM ist wie bereits auch niedriger gradige Astrozytome für solche Chromosomeninstabilität bekannt (Reifenberger und Collins, 2004).

Im mitotischen Kontrollpunkt findet ein sehr komplexes Zusammenspiel aus verschiedenen Proteinen statt. Eine zentrale Rolle spielt der anaphase-promoting-complex/cyclosome (APC/C), eine Ubiquitinligase. Durch Cdc20 aktiviert, bewirkt er durch Ubiquitinierung und proteasomalen Verdau eines Inhibitors die Aktivierung von Separase, einer Protease, die ihrerseits nun Cohesin verdauen kann, welches vor der Anaphase die Schwesterchromatiden zusammengehalten hat. Nach Aktivierung von APC/C durch Cdc20 können sich also die Schwesterchromatiden trennen und die Mitose kann fortgesetzt werden (Abb. 6) (Bharadwaj und Yu, 2004; Yu, 2002).



APC/C kann aber auch durch andere Proteine aktiviert werden, wie zum Beispiel Cdh1. Cdh1 ist wichtig in der frühen G1 Phase des Zellzyklus, in der die Konzentration von Cdc20 rapide abnimmt. Ist APC/C durch Cdh1 aktiviert, ändern sich auch die Zielproteine, die durch APC/C ubiquitiniert werden. Beispielsweise wird nun Cdc20 selbst ubiquitiniert

(Peters, 2002). Der genaue Regulationsmechanismus ist allerdings noch nicht geklärt. Jedoch wird am Übergang zwischen G1 und S-Phase Cdh1 inaktiviert und Cdc20 kann sich wieder anreichern, so dass es in der nächsten Mitose erneut als Aktivator von APC/C fungieren kann (Peters, 2002). APC/C in Verbindung mit Cdh1 ist verantwortlich für das Fortschreiten des Zellzyklus von der Mitose in die G1-Phase. Insgesamt ist der Komplex inaktiv während der G2-Phase. Vor kurzem wurde aber gezeigt, dass Cdh1 und der APC/C auch eine wichtige Rolle im DNA-Schaden-Kontrollpunkt der G2-Phase spielen (Bassermann et al., 2008; De Wulf und Visintin, 2008; Sudo et al., 2001). Jedoch konnte nun nachgewiesen werden, dass während eines kurzen Zeitraums in der G2-Phase der Komplex doch aktiviert wird, und zwar bei Auftreten von DNA-Schäden.

Auch das Protein mitotic arrest deficient 2 b (Mad2b), ein Interaktionspartner von Cdh1 (Pfleger et al., 2001) scheint hierbei involviert zu sein (Murakumo et al., 2000, Rabea et al., eingereicht).

Mad2b könnte eine Verbindung zwischen dem mitotischen und dem DNA-Reparaturkontrollpunkt herstellen. Ein naher Verwandter, das Protein Mad2a, spielt seinerseits eine wichtige Rolle im mitotischen Kontrollpunkt bei der Detektion der Mikrotubuli-Anheftung an die Chromatiden (Nasmyth, 2005).

In Vorarbeiten wurde mit Hilfe eines Hefe Two-Hybrid Screens PA28 γ als neuer Interaktionspartner sowohl von Mad2b als auch von Mad2a identifiziert.

1.8 Ziel der Arbeit

In der Zusammenschau von Literatur und Vorergebnissen aus dem tumorbiologischen Labor der neurochirurgischen Klinik der Universitätsklinik Würzburg stellte sich vermehrt die Frage nach der Funktion des Proteasomenaktivators PA28 γ . Welche Rolle spielt das Protein bei der Entartung von Tumorzellen? In wieweit und in welcher Form ist dieser Proteasomenaktivator an der vermehrten Zellproliferation im Glioblastom beteiligt? Welche spezifische Funktion besitzt er? Welcher Art ist die Interaktion von Mad2b und PA28 γ ? Ist auch in Astrozytomen die PA28 γ -Expression verändert?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst die Interaktion von den Proteinen PA28 γ und Mad2b *in vitro* mittels eines GST-Pulldown-Assays bestätigt. Die Expression von PA28 γ wurde auf RNA-Ebene in Proben von niedriggradigen Astrozytomen und Glioblastomen im Vergleich zu Normalhirngewebe untersucht. Eine mögliche Rolle von PA28 γ bei der Zellproliferation, spezifisch im Glioblastoma multiforme, wurde mittels eines Proliferationsassays in Zellkulturexperimenten betrachtet. Dazu wurde die Wachstumsgeschwindigkeit einer Glioblastomzelllinie im Leervektor-transfizierten Zustand mit der Wachstumsgeschwindigkeit unter PA28 γ -Überexpression verglichen.

Schließlich wurde ein Hefe Two-Hybrid Screen durchgeführt, um neue Interaktionspartner von PA28 γ aufzuspüren, die Hinweise auf mögliche Funktionen von PA28 γ liefern sollten. Diese Untersuchungen sind ein erster Schritt zur Aufklärung molekularer Mechanismen, die in der Glioblastombiologie eine Rolle spielen. Sie könnten die Grundlage für einen spezifischeren Ansatz neuer Therapien sein, die auf Proteasomenaktivität und Zellzyklusregulation abzielen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Abi Prism 3100	Applied Biosystems, Foster City, U.S.A
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
BioDoc Analyze (Kamera: Canon)	Biometra, Göttingen
Bottle Top Filter	Nalgene, Brüssel
Brutschränke, Inkubatoren	Heraeus Instruments, Hanau
Centrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg
Clean Bench	Nuaire, Plymouth, U.S.A.
Cryofuge 6000i	Heraeus Instruments, Hanau
Elektrophoresekammern	Gibco Brl + Neolab, Eggenstein
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Heizblock	Boekel Scientific, Feasterville, PA, U.S.A.
MacsMix	Miltenyi Biotec, Auburn, CA, U.S.A.
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach
Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments, Hanau
Mikropipetten 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Olympus BX41 Fluoreszenz	Olympus, Hamburg
Mikroskop Wilovert	Hundt, Wetzlar
Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg
Nucleofector Device	Lanza Cologne, Köln
pH Meter	WTW, Weilheim
Pipetboy	Integra Biosc., Ijamsville, MD, U.S.A.
Power Ease 500	Invitrogen, Karlsruhe
Rotamix	Heidolph, Schwabach

Schüttler Innova 4230	New Brunswick Sc., Edison, NJ, U.S.A.
Thermo Cycler T3000	Biometra, Göttingen
Vortex Genie-2	Scientific Ind., Bohemia, NY, U.S.A.
Waage Sartorius	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Hartenstein, Würzburg
X Cell Sure Lock Western Blot System	Invitrogen, Karlsruhe
Zentrifugationsbecher 500 ml	Heraeus Instruments, Hanau

2.1.2 Kits

Nucleofector Kit	Lanza Cologne, Köln
ECL-Western Blotting Analysis System	Amersham Biotech, Braunschweig
Nucleobond Ax Kit	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin RNA/Protein Kit	Macherey-Nagel, Düren
NuPAGE® MOPS SDS Buffer Kit (Bis-Tris Gels)	Invitrogen, Karlsruhe
Revert Aid H minus cDNA Synthesis Kit	Fermentas, Ontario, Kanada
Wizard Genomic DNA Purification Kit	Promega, Madison, WI, U.S.A.

2.1.3 Chemikalien

3-AT (3-Amino-1,2,4Triazol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.
10x Taq Puffer	Eppendorf, Hamburg
2-Propanol	Merck, Darmstadt
5x Taq Puffer	Eppendorf, Hamburg
6x Loading Dye	Fermentas, Ontario, Kanada
Adenin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.
Aceton	Roth, Karlsruhe
Agar noble	Becton Dickinson, Sparks, MD, U.S.A.
Agarose	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.

Aminosäuren	Gibco Brl Life Tech., Eggenstein
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Antibiotika: Ampicillin, Kanamycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.
Penicillin, Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Aprotinin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.
Bacto Peptone	Becton Dickinson, Sparks, MD, U.S.A.
Bacto Trypton	Becton Dickinson, Sparks, MD, U.S.A.
Borsäure	ICN, Meckenheim
Brilliant Blue G Concentrate	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.
Dextrose	Becton Dickinson, Sparks, U.S.A.
Difco Yeast nitrogen base w/o amino acids	Becton Dickinson, Sparks, U.S.A.
DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)	Cytogen, Berlin
DMF (N,N-dimethylformamide)	Merck, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe
dNTP	Fermentas, Ontario, Kanada
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.
EGTA (Ethylen-Glycol-bis(β -Aminoethyl- Ether)N,N,N',N'-Tetraacetat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.
Essigsäure (HAcetat)	Roth, Karlsruhe
Ethanol, 70%, absolut	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.
FCS (Fötales Kälberserum)	Gibco Brl Life Tech., Eggenstein
Glucose	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.
Gluthation Sepharose	Amersham Biotech, Braunschweig
Glycerin	Roth, Karlsruhe
HCl (Salzsäure)	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Becton Dickinson, Sparks, MD, U.S.A.
Heringssperma Carrier DNA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.

IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.
K-Acetat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.
KCl	Applicam, Darmstadt
Leupeptin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.
L-Glutamin	Gibco Brl Life Tech., Eggenstein
LiAc (Lithium Acetat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.
LiCl (Lithium Chlorid)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.
MES Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
MOPS Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O, Na ₂ HPO ₄ x 5 H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaAc (Natriumacetat)	Merck, Darmstadt
NaCl (Natriumchlorid)	Merck, Darmstadt
NaOH (Natriumhydroxid)	Merck, Darmstadt
Non fat dried milk (Milchpulver fettfrei)	Roth, Karlsruhe
Nucleofector Losungen R, T, V	Lanza Cologne, Koln
PBS (Phosphate buffered saline)	Biochrom AG, Berlin
PEG 4000 (Polyethylenglykol)	Merck, Darmstadt
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.
Protein-A-Sepharose	Amersham Biotech, Braunschweig
SDS (sodium dodecyl sulfate)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.
Tris Base, Tris-Cl	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.
Trypanblau 0,4%	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.
Trypsin-EDTA	Gibco Brl Life Tech., Eggenstein
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.
Tyrosin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.
Ultra pure water	Biochrom AG, Berlin
Uracil	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.

Vitamine	Gibco Brl Life Tech, Eggenstein
X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-Galactopyranosid)	Fermentas, Ontario, Kanada
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.

2.1.4 Verbrauchsmaterial

6, 24, 96 Well Platten	Corning, New York, NY, U.S.A.
Whatman Papier	Hartenstein, Würzburg
75 cm ² Zellkulturflaschen	Corning, New York, NY, U.S.A.
Blotmembran	Schleicher & Schuell, Dassel
Cryoröhrchen	Nailgene, Brüssel
Eppendorf Reaktionsgefäße (0,5-2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Falcon Röhrchen (15, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Glasperlen	B. Braun, Melsungen
Kolben 250 ml, 500 ml, 2 l	Schott Duran, Mainz
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel
Nucleofector Küvetten	Amaxa Biotech, Köln
Parafilm	Pechiney Packing, Chicago, IL, U.S.A.
Pasteurpipetten	Becton Dickinson, Sparks, MD, U.S.A.
Petrischalen	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen gestopft und ungestopft	Sarstedt, Nümbrecht
Polyacrylamidgele (10, 12%ig)	Invitrogen, Karlsruhe
Röntgenfilme	Amersham Biotech, Braunschweig
Whatman Papier	Schleicher und Schuell, Dassel

2.1.5 Lösungen und Medien

2x TY Ampicillin Platten

1 Liter 2x TY Medium werden mit 20 g Agar autoklaviert und nach Abkühlen auf ca 50° C mit 1 ml Ampicillin (100 mg/ml) versetzt. Anschließend werden Kulturplatten gegossen.

2x TY Medium

16 g Bacto Trypton, 10 g Hefeextrakt und 5 g NaCl werden in 1 l Aqua bidest. gelöst, auf pH 7,4 eingestellt und anschließend autoklaviert

Agarosegel für Gelelektrophorese

Für ein 1%iges Agarosegel werden 1,5 g Agarose in 150 ml 1x TAE Puffer kurz aufgekocht (Mikrowelle) und wieder auf ca. 50-60°C abgekühlt. Anschließend werden 5 µl Ethidiumbromidlösung (5 µg/µl) zugegeben und der Ansatz wird in eine passende Gelapparatur gegossen. Auf Grund der Lichtempfindlichkeit des Ethidiumbromids wird das Gel nach dem Gießen bis zur Verwendung lichtgeschützt im Kühlschrank gelagert (maximal 7 Tage).

Aminosäure-Mangellösung (100 ml)

Für 100 ml Aminosäure-Mangellösung benötigt man 0,2 g Arginin, 0,1 g Histidin, 0,6 g Isoleucin, 0,6 g Leucin, 0,4 g Lysin, 0,1 g Methionin, 0,6 g Phenylalanin, 0,5 g Threonin und 0,4 g Tryptophan in einem Endvolumen von 100 ml, gelöst in Aqua. dest. Nach Sterilfiltration wird die Lösung bei 4°C gelagert. Die jeweils nicht benötigten Aminosäuren werden beim Ansatz wegelassen.

Blocking Reagenz

5 % Milchpulver (fettfrei) werden in TBST gelöst.

Puffer X (500 ml):

10 ml 1 M Tris pH 7,4 werden mit 200 µl 0,5 M EDTA und 38 mg EGTA zu einem Endvolumen von 500 ml in Aqua dest. gelöst.

Puffer X 1 / X 2:

Für Puffer X 1 werden auf 50 ml Puffer X 50 µl 1 M DTT gegeben. Für Puffer X 2 wird zu 50 ml Puffer X 50 µl 1M DTT, 1 ml PMSF, 100 µl Aprotinin und 100 µl Leupeptin gegeben.

1 M DTT

3,09 g DTT (Dithiothreitol) werden in 20 ml 0,001 M Natriumacetat pH 5,2 gelöst, à 1 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Einfriermedium für Hefen

15% Glycerin-Lösung (steril)

Entfärbelösung

980 ml Wasser werden mit 800 ml Methanol, 200 ml Essigsäure und 20 ml Glycerol versetzt.

LiAc/TE-Mix (40 ml)

Der Lithiumacetat/TE-Mix wird erst vor Gebrauch frisch angesetzt. Hierfür benötigt man 400 µl 100 x TE-Puffer und vermischt diese mit 4 ml 10 x LiAc (1 M, pH 7,5) in 35,6 ml Wasser.

Lithium-Chlorid 8 M, 5 M

Lithium-Chlorid wird in einer Konzentration von 8 M bzw. 5 M in Aqua bidest. gelöst und anschließend autoklaviert.

Lösungen für Minipräp

Lösung A:

50 mM Glucose, 25 mM Tris pH 8 und 10 mM EDTA werden in Aqua bidest. angesetzt.

Lösung B:

0,2 M NaOH werden mit 1% SDS in Aqua bidest. angesetzt.

Lösung C:

3 M Na-Acetat werden mit 2 M Essigsäure (HAcetat) in Aqua bidest. angesetzt.

Lysepuffer (500 ml Stock)

5 ml Triton X-100, 4,38 g NaCl, 5 ml Tris pH 7,4 (1 M Stock), 1 ml EDTA (0,5 M Stock), 0,2 g EGTA und 2,5 ml IGEPAL CA-630 werden mit Aqua bidest. auf ein Volumen von 500 ml aufgefüllt.

Kurz vor Gebrauch werden zu 10 ml Lysepuffer 100 µl PMSF, 10 µl Leupeptin und 100 µl Aprotinin zugesetzt (Gebrauchslysepuffer).

PBS

0,14 M NaCl, 8 mM Na₂HPO₄ x 7H₂O, 1 mM KH₂PO₄ und 3 mM KCl werden in 1 l dd H₂O, pH 7,4 gelöst.

50% PEG 4000 (1 l)

500 g PEG 4000 werden in 1 l Aqua dest. gelöst und sterilfiltriert

PEG/LiAc-Mix (70 ml)

Auch dieser Mix wird erst kurz vor Gebrauch angesetzt. Hierfür mischt man 56 ml PEG mit 7 ml 10 x LiAc, 750 µl 100 x TE und 6,25 ml Wasser.

Plate Mixture

90 ml 45% PEG 4000 (81 ml 50% PEG + 9 ml H₂O) werden mit 10 ml 1 M LiOAc, 1 ml 1 M Tris-Cl (pH 7,5) und 0,2 ml 0,5 M EDTA gemischt.

Selektionsmedium / Selektionsplatten (1 l)

2 g Yeast nitrogen base w/o amino acids, 6 g Ammoniumsulfat, 55 mg Adenin, 55 mg Uracil und 55 mg Tyrosin werden abgewogen und mit Aqua dest. auf 900 ml aufgefüllt. Anschließend werden 25 g Agar hinzugefügt und das Medium wird autoklaviert. Nach Abkühlung auf 50°C werden noch 100 ml 20 % Glucose (steril) und 10 ml Aminosäure-Mangel-Lösung zugegeben und anschließend die Platten gegossen. Bei Mangel-Agar werden die entsprechenden Aminosäuren ausgespart, zum Beispiel wird bei Leucin/Trypsin-Mangel-Platten die Lösung ohne Leucin und Trypsin angesetzt. Nach Polymerisation des Agars werden die Platten im Kühlschrank mit dem Deckel nach unten gelagert, um Kondenswasserbildung auf dem Agar zu vermeiden. Für Flüssigmedium verzichtet man auf den Agar-Zusatz und stellt nach dem Autoklavieren die Flaschen kühl.

STET-Puffer (100 ml)

8 g Sucrose, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8, 5% Triton X-100 und 10 M Ammoniumacetat werden in Aqua bidest. zu einem Endvolumen von 100 ml gelöst.

TBE

90 mM Tris-Cl, 90 mM Borsäure und 2 mM EDTA werden in Aqua bidest. gelöst und auf pH 8 eingestellt.

TBST (1 l)

6,05 g Tris Base und 8,77 g NaCl werden in 1 l Aqua bidest. gelöst. Die Lösung wird mit HCl auf pH 8 eingestellt. Anschließend werden 10 ml Tween 20 zugesetzt.

TE-Puffer (100x TE 1 00ml)

1 M Tris-HCl pH 8 werden in 60 ml Aqua dest. gelöst. Der pH wird mit HCl auf pH 8 eingestellt. Dann werden 100 mM EDTA zugegeben. Der pH wird nachreguliert, die Lösung auf 100 ml aufgefüllt und autoklaviert.

Transferpuffer

50 ml 20x NuPage Transfer Buffer, 100 ml Methanol und 1 ml NuPage Antioxidant werden mit 849 ml Aqua dest. gemischt.

Western Strip Puffer

60 mM Tris-Cl pH 6,8 werden mit 100 mM β -Mercaptoethanol und 2% SDS (w/v) in Aqua dest. angesetzt.

X-Gal-Solution

20 mg/ml X-Gal werden in DMF gelöst und bei -20°C unter Lichtausschluss gelagert.

X-Puffer

10 ml Z-Puffer werden 27 μl β -Mercaptoethanol und 167 μl X-Gal zugesetzt. Auch diese Lösung sollte immer frisch vor Gebrauch angesetzt werden.

Yeast Extract (50 ml)

11,5 g Yeast Extract werden in 50 ml Aqua dest. gelöst und sterilfiltriert. Kurz vor Gebrauch werden noch 0,095 g IPTG hinzugefügt.

YEPD-Medium (1 l)

11 g Yeast Extract werden mit 22 g Bacto Peptone und 55 mg Adenin auf 900 ml mit Aqua dest. aufgefüllt, autoklaviert und auf 50°C abgekühlt. Anschließend werden 100 ml 20% Glucose (steril) hinzugefügt.

Einfriermedium

Zellkulturmedium mit 20% FCS wird vor Gebrauch 10% DMSO frisch zugesetzt und gut gekühlt verwendet.

Zellkulturmedium für Zelllinien (10% FCS)

500 ml DMEM (1 g/l Glucose) werden mit 60 ml FCS, 10 ml nicht-essentielle Aminosäuren, 10 ml L-Glutamin und 2 ml Penicillin/Streptomycin gemischt.

Zellkulturmedium für Primärzellen (20% FCS)

500 ml DMEM (1 g/l Glucose) werden mit 120 ml FCS, 6 ml nicht-essentielle Aminosäuren, 6 ml Vitaminen und 2 ml L-Glutamin gemischt.

Z-Puffer (1 l)

16,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 5,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ und 0,75 g KCl werden mit 0,246 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ gemischt und mit Aqua dest. auf ein Endvolumen von 1 Liter aufgefüllt. Der pH wird auf 7,0 eingestellt.

2.1.6 Zelllinien, Bakterien, Hefen

Zelllinien

Glioblastom-Zelllinien U251 und GaMG (Universität von Bergen, Haukeland Krankenhaus, Norwegen)

Bakterienstämme (E. coli)

DH 5 α

BL 21

Hefestamm

HF7c

2.1.7 Plasmide

pCMV5-Tag3A

pCMV5-Flag-PA28 γ

pPC97, pPC97-Mad2b, pPC97-PA28 γ

pPC86-cDNA-Bibliothek aus PC12-Zellen (Kalmes et al., 1998)

2.1.8 Antikörper

Anti rabbit, Sekundäntikörper

Santa Cruz Biotech., CA, U.S.A.

Anti mouse, Sekundäntikörper

Amersham Biotech, Braunschweig

Anti Mad2b, Primäntikörper

Abcam, Cambridge, MA, U.S.A.

Anti PA28 γ , Primäntikörper

Biomol, Hamburg

Anti myc, Primäntikörper

Santa Cruz Biotech., CA, U.S.A.

Anti flag, Primäntikörper

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.

2.1.9 Marker

Proteinmarker

SeeBlue Plus 2 prestained

Invitrogen, Karlsruhe

Multi Mark

Invitrogen, Karlsruhe

DNA Marker

Gene Ruler 100 bp Ladder Plus

Fermentas, Ontario, Kanada

2.1.10 Primer

Alle Primer wurden von MWG synthetisiert.

GAPDH forw. 5'- TGC CAG CCC CAG CGT CAA AG -3'
GAPDH rev. 5'- GCA GGG GGG AGC CAA AAG GG -3'

Mad2L2 forw. 5'- CAC TCG CAA CAT GGA GAA GA -3'
Mad2L2 rev. 5'- CCC TCA GCT GCC TTT ATG AG -3'

PA28 γ F1 forw. 5'- TCT GAT ATG ATG AGC CGA AGG -3'
PA28 γ R rev. 5'- CTT CAG GCA AAG GTA CTC AT -3'

pPC 86 forw. (AD) 5'- TAC CAC TAC AAT GGA TGA TG -3'
pPC 86 rev. (TERM) 5'- TTG ATT GGA GAC TTG ACC -3'

pPC 97 forw. (DB) 5'- TCA TCG GAA GAG AGT AGT -3'
pPC 97 rev. (TERM) 5'- TTG ATT GGA GAC TTG ACC -3'

β -Actin forw. 5'- CGT GCG TGA CAT TAA GGA GA -3'
 β -Actin rev. 5'- CAC CTT CAC CGT TCC AGT TT -3'

2.1.11 Enzyme

Polymerase

Master Taq Polymerase

Eppendorf, Hamburg

Restriktionsenzyme

Sal I	Fermentas, Ontario, Kanada
Not I	Fermentas, Ontario, Kanada
EcoRI	Fermentas, Ontario, Kanada
BamHI	Fermentas, Ontario, Kanada

Die Restriktionsenzyme wurden in Orange Puffer bzw Red Puffer (Fermentas, Ontario, Kanada) als Co-Verdau angesetzt.

Plasmid	Selektion in Hefe (Aminosäure- Produktion durch Plasmid kodiert)	Selektion in Bakterien (Resistenzgen des Plasmids gegen Antibiotikum)	Schnittstellen für Restriktionsverdau +Restriktionspuffer
GST/ GST-PA28 γ	-	Ampicillin	-
pPC97	Leucin	Ampicillin	Sal I /Not I + Orange
pPC86	Tryptophan	Ampicillin	Sal I/ Not I + Orange
pCMV5-Tag3A	-	Neomycin/ Kanamycin	-
pCMV5-Flag-PA28 γ	-	Ampicillin	EcoRI/ BamHI + Red

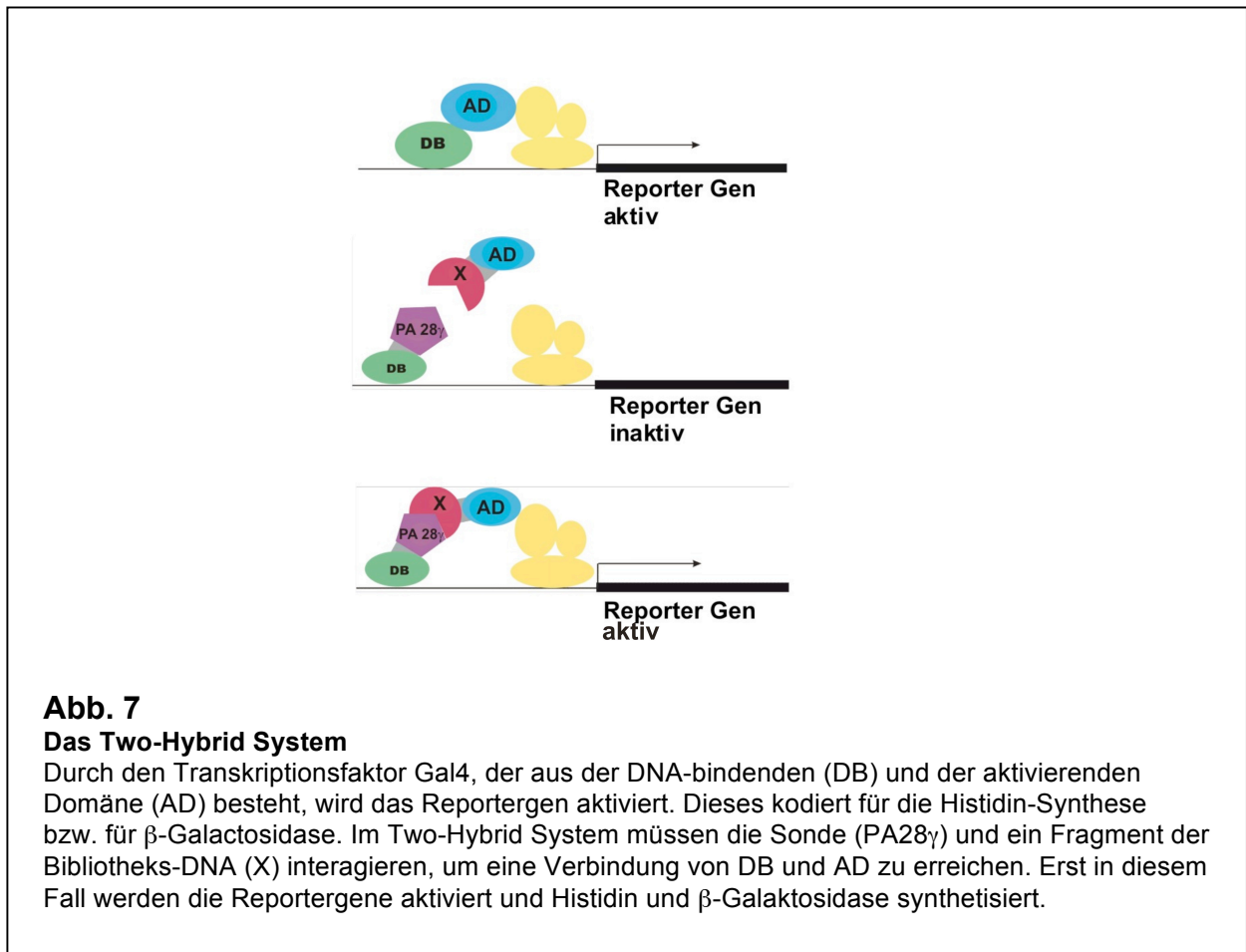
Tabelle 1

Übersicht über die Plasmide, genutzte Selektionsmechanismen und Schnittstellen für Restriktionsverdau sowie von Fermentas empfohlener Restriktionspuffer

2.2 Methoden

2.2.1 Hefe Two-Hybrid Screen

Das Hefe Two-Hybrid System ist ein Hefe-basiertes System zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen. Dabei kommt der Hefe Gal4 Transkriptionsfaktor zum Einsatz, der sich aus zwei funktionellen Domänen zusammensetzt: Eine DNA-bindende Domäne (DB) und eine die Transkriptionsmaschinerie aktivierende Domäne (AD) (Abb. 7).



Mit gentechnischen Methoden konnten die für diese Domänen kodierenden Bereiche der Gal4-cDNA voneinander getrennt und in die Vektoren pPC97 und pPC86 jeweils vor eine Multiple-Klonierungssequenz umkloniert werden (Chevray und Nathans, 1992).

Wenn man unter Berücksichtigung des Leserahmens hinter die DB zum Beispiel die cDNA von PA28 γ kloniert und hinter die AD Sequenzen einer cDNA Bibliothek, so kann man nach Hefe-Transformation mit beiden Plasmiden über geeignete Selektionsmedien diejenigen Hefeklonen identifizieren, in denen eine Bindung von PA28 γ an Proteinsegmente der cDNA-Bibliothek stattgefunden hat, da nur in diesem Fall die Funktion des Gal4-Transkriptionsfaktors rekonstituiert wird (Abb. 8).

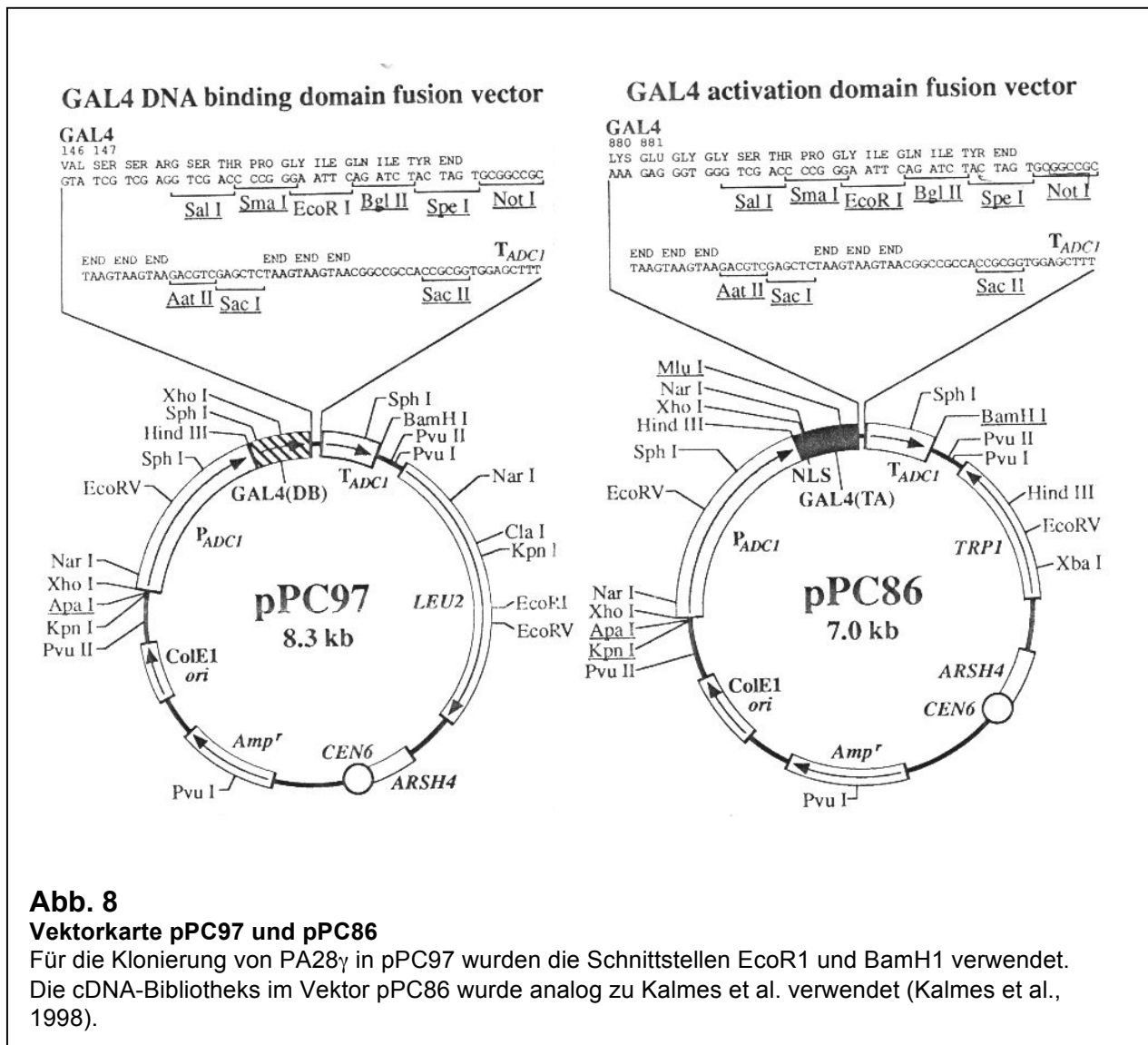


Abb. 8

Vektorkarte pPC97 und pPC86

Für die Klonierung von PA28 γ in pPC97 wurden die Schnittstellen EcoR1 und BamH1 verwendet. Die cDNA-Bibliotheks im Vektor pPC86 wurde analog zu Kalmes et al. verwendet (Kalmes et al., 1998).

In Abb. 9 sind die einzelnen Schritte eines Two-Hybrid Systems zusammenfassend dargestellt. Ihre Durchführung wird in den folgenden Abschnitten im Einzelnen ausführlich besprochen.

2.2.1.1 Hefe-Transformation

Um Plasmid-DNA in Hefen einzubringen, wie es zum Beispiel für den Hefe Two-Hybrid Screen nötig ist, wird die Hefe-Transformation verwendet (Abb. 9, Schritt 1).

Eine Kolonie des HF7c-Hefestammes wurde über Nacht bei 30°C und 200 rpm in YEPD-Medium inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde 1 ml Hefekultur pro benötigtem Ansatz kurz abzentrifugiert und der Überstand abgegossen (es verbleiben ca. 50 – 100 µl Medium im Eppendorf-Reaktionsgefäß).

Von der für 5 Minuten bei 95°C aufgekochten und dann auf Eis gestellten Heringssperma-Carrier-DNA (10 mg/ml) wurden 2 µl zu jedem Ansatz gegeben und alles gut resuspendiert. Die Heringssperma-Carrier-DNA hilft bei der Aufnahme der Plasmide in die Hefen.

Zu jedem Ansatz fügte man ca. 1 µg Plasmid hinzu. 500 µl Plate Mixture wurde untergemischt und 20 µl DTT hinzupipettiert.

Der Ansatz inkubierte für 6-8 Stunden bei Raumtemperatur (RT). Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 10 Minuten, um die Hefen aufnahmefähig für die Plasmide zu machen.

Anschließend nahm man 200 µl der sedimentierten Hefen und plattierte diese auf geeignetem Mangelagar aus (siehe Tabelle 1), um erfolgreich transformierte Hefeklone über die in den Plasmiden kodierte Aminosäure-Selektionsmarker hochzuziehen.

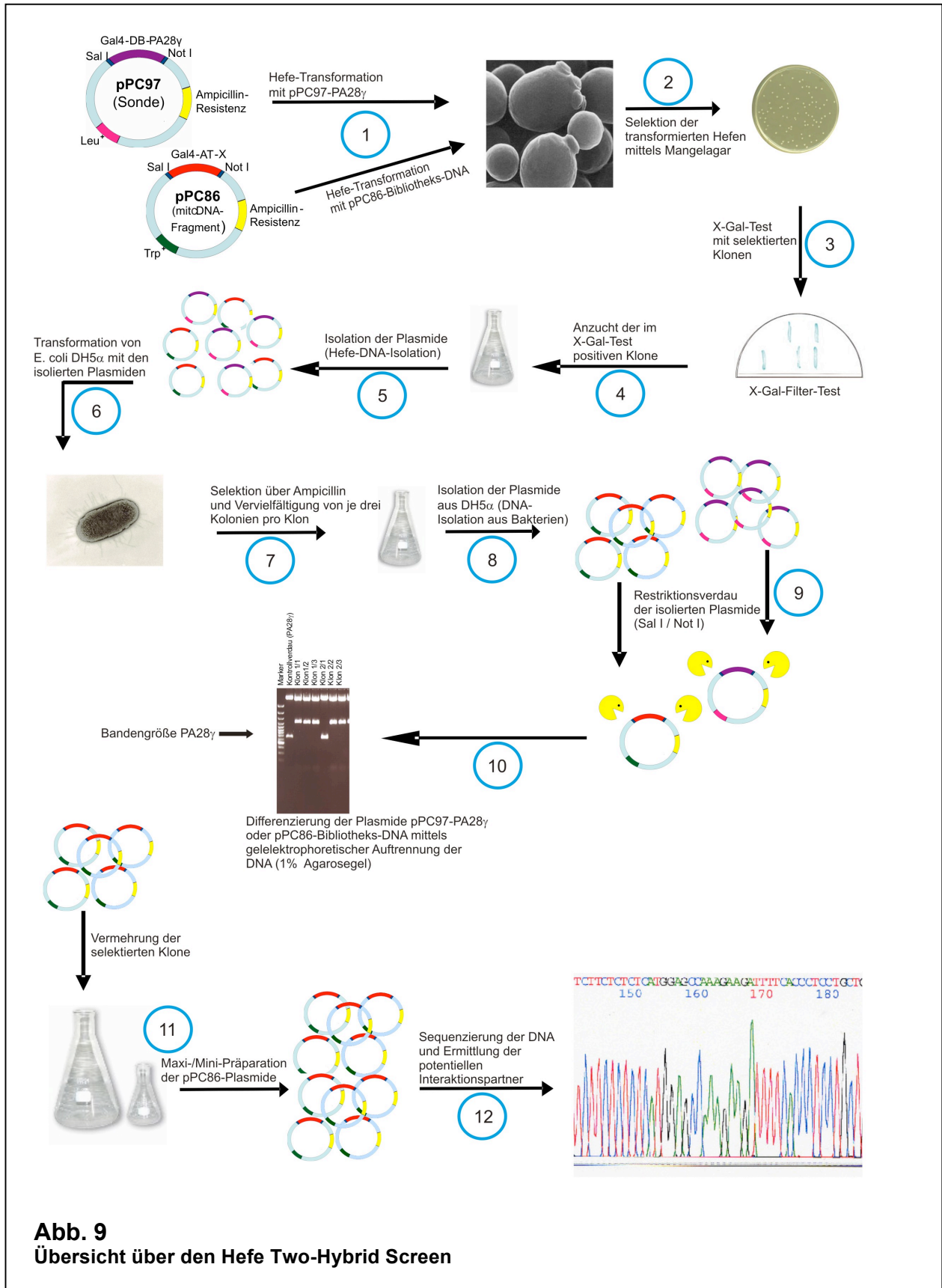


Abb. 9
Übersicht über den Hefe Two-Hybrid Screen

Zu Abb. 9

Übersicht über den Hefe Two-Hybrid Screen

Abkürzungen: Sal I / Not I: Schnittstellen für Restriktionsverdau; Trp⁺: Tryptophan-kodierendes Gen
Leu⁺: Leucin-kodierendes Gen; Gal4: Transkriptionsfaktor für Reporter-genaktivierung; AD:
aktivierende Domäne; DB: DNA-bindende Domäne; X: Fragment aus cDNA-Bibliothek; 1-12:
Schritte des Hefe Two-Hybrid Screens

Nach 2-3 Tagen bei 30°C zeigten sich Kolonien, die für den Two-Hybrid Screen oder andere Experimente weiterverwendet werden konnten.

Für den hier durchgeführten Two-Hybrid Screen wurde das Plasmid pPC97-PA28 γ als Sonde verwendet. Neben der Sequenz für ein DB-PA28 γ -Fusionsprotein enthält es auch ein für Leucin-Synthese kodierendes Gen. Erfolgreich transformierte Hefen konnten daher auf Leucin-Mangelmedium überleben, da sie über das pPC97-Plasmid selbst Leucin produzieren (Abb. 9, Schritt 2).

2.2.1.2 Transformation von HF7c-Hefen mit pPC97-PA28 γ und pPC86-DNA-Bibliotheksfragment für den Hefe Two-Hybrid Screen

Die mit pPC97-PA28 γ transformierten HF7c-Zellen wurden in zwei Schritten vermehrt: Zunächst wurden 50 ml Leucin-Selektionsmedium angeimpft und über Nacht bei 30°C und 230 rpm angezüchtet. Am folgenden Morgen überführte man die Übernachtskultur in 500 ml Leucin-Selektionsmedium und ließ die Zellen abermals bei 30°C und 230 rpm wachsen.

Die OD₆₀₀ der Übernachtskultur sollte bei photometrischer Messung >1 sein. Am dritten Tag impfte man 1,5 l YEPD-Medium mit der Übernachtskultur an, so dass eine OD₆₀₀ zwischen 0,3 und 0,5 erreicht wurde (ca. 375 ml der Übernachtskultur) und schüttelte für 4 Stunden bei 30°C und 200 rpm. Anschließend wurden die 1,5 l Flüssigkultur 10 min bei 4000x g und RT zentrifugiert und das in 40 ml Li-Ac/TE-Puffer resuspendierte Pellet für 15 min bei 30°C (ohne Schütteln) inkubiert.

Nach der Inkubation fügte man 280 ml des frisch angesetzten PEG/LiAc-Mix der Suspension zu. 4 ml Carrier-DNA (10 mg/ml) wurde nach 5-minütigem Kochen bei 95°C und anschließend kurzer Inkubationszeit auf Eis 1-2 mg Bibliotheks-Plasmid-DNA zugefügt (150 µl PC12-Bibliotheks-cDNA enthalten ca. 600 µg DNA). Diese Mischung wurde anschließend zur Suspension gegeben. Anschließend wurde bei 30°C für 30 min unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Danach wurden 35,2 ml DMSO sehr langsam unter Schwenken zutropft.

Unter gelegentlichem Schwenken folgte ein Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad für 30-60 Minuten. Anschließend drehte man die Kolben mit der Suspension 3 Minuten auf Eis und zentrifugierte die Suspension 10 min bei 4000x g und RT.

Nach Resuspension des Pellets in 300 ml 1x TE-Puffer und erneuter Zentrifugation wurde das Pellet noch einmal in 20 ml 1x TE-Puffer suspendiert.

Das das Bibliotheksfragment enthaltende Plasmid pPC86 trägt als Selektionsmarker ein für Tryptophan-Synthese kodierendes Gen (Abb. 7, AD).

Nach Transformation der Hefen mit beiden Plasmiden (pPC97-PA28γ und pPC86-Bibliotheksfragment) wuchsen sie selektiv auf Leucin-Tryptophan-Mangelagar, da sie beide Aminosäuren mittels ihrer Leucin- bzw. Tryptophan-Gene synthetisieren konnten. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden 5 µl bzw. 10 µl der Suspension auf Platten (Durchmesser 6 cm) mit Leucin-Tryptophan-Mangelagar ausplattiert. Die Kolonien wurden nach 24 Stunden Inkubation bei 30°C gezählt und von jeweils 5 µl bzw. 10 µl auf die Ausgangsmenge von 23 ml hochgerechnet. Der Mittelwert entspricht der Transformations-effizienz.

Um die Interaktion von PA28γ mit dem durch das DNA-Bibliotheks-Teilstück kodierte Protein zu überprüfen, wurde Leucin-Tryptophan-Histidin-Mangelmedium verwendet. Der Transkriptionsfaktor Gal4 wird nur bei Interaktion rekonstituiert und kann dann dadurch die Produktion von Histidin anschalten (Abb. 7). Bei Interaktion der durch die beiden Plasmide kodierten Proteine konnten die betreffenden Hefen also auch in Leucin-Tryptophan-Histidin-Mangelmedium überleben.

Daher wurde die restliche Suspension auf Platten mit Leucin-Tryptophan-Histidin-Mangelagar ausplattiert, die 3AT (3-Amino-Triazol) enthalten (350 µl / Platte). 3AT unterdrückt die Hefe-eigene Histidin-Synthese und fördert somit die Selektion über die Interaktion der Proteine durch Verhinderung des Auftretens falsch positiver Klone.

Nach 5-14 Tagen Bebrütung bei 30°C wurden die größeren, matten Kolonien durchnummeriert und auf Platten mit Leucin-Tryptophan-Histidin-Mangelagar ausgestrichen und nochmals 1-2 Tage bebrütet. Die Kolonien wurden dann erneut auf Platten mit Leucin-Tryptophan-Mangelagar (Kolonien zum Einfrieren bei -80°C am folgenden Tag) und eine Platte mit Leucin-Tryptophan-Histidin-Mangelagar (Kolonien für den X-Gal-Test) umgestrichen. Die im X-Gal-Test positiven Kolonien wurden ebenfalls eingefroren.

2.2.1.3 Hefen einfrieren

Hefen können zur späteren Verwendung zunächst tiefgefroren gelagert werden. Sie wurden in 1 ml 15% Glycerin-Lösung in einem Kryoröhrchen suspendiert und sofort bei -80°C eingefroren.

2.2.1.4 X-Gal-Test

Durch den X-Gal-Test (Abb. 9, Schritt 3) wird die Interaktion im Hefe Two-Hybrid System bestätigt. Neben einem Gen für die Histidin-Synthese wird bei Interaktion beider Proteine auch das LacZ-Gen angeschaltet. Es kodiert für das Enzym β -Galactosidase, die das Substrat X-Gal in einen blauen Farbstoff umsetzen kann. Eine Membran wurde auf die ausgestrichenen und über Nacht gewachsenen Kolonien gelegt, kurz angedrückt und vorsichtig wieder abgehoben. Zur Lyse der an der Membran haftenden Hefen wurde diese anschließend in flüssigen Stickstoff getaucht. Dann wurde die Membran auf einen mit X-

Puffer getränkten Whatman-Filter gelegt und über Nacht in einer Petrischale bei 37°C inkubiert. In die lysierten Zellen konnte X-Gal eindringen und durch β -Galactosidase umgesetzt werden. Blaufärbung tritt folglich nur bei Interaktion der Proteine und angeschaltetem LacZ-Gen ein.

Der X-Gal-Test sollte am Tag nach Ausstreichen der Hefen erfolgen, da die β -Galactosidaseproduktion nach einiger Zeit wieder abnimmt.

2.2.1.5 Hefe-Plasmidisolaton

Nach dem Hefe Two-Hybrid Screen müssen die Plasmide der als positiv getesteten Klone isoliert werden, um sie sequenzieren und in weiteren Versuchen nutzen zu können. Hierzu verwendet man eine Hefe-Plasmid-Isolation.

Zunächst wurden die sich im X-Gal-Test blau färbenden Klone über Nacht in Tryptophan-Mangelmedium vervielfältigt (Abb. 9, Schritt 4) und die Plasmide isoliert (Abb. 9, Schritt 5). Bei dieser Isolation erhielt man pPC97-PA28 γ und das interagierende pPC86-Bibliotheks-cDNA-Fragment.

Hefen gehören zu den Pilzen und verfügen über eine Chitin-Hülle. Um diese aufzubrechen, benötigt man neben chemischen Methoden auch den mechanischen Zellaufschluss mittels Glasperlen.

Nach kurzer Zentrifugation von 1,5 ml Übernachtskultur (Tryptophan-Mangel-Flüssigmedium) wurde das Pellet in 100 μ l STET-Puffer aufgenommen, etwa das gleiche Volumen Glasperlen hinzugefügt und das Ganze für 5 Minuten auf dem Vortex gemischt. Danach fügte man wieder 100 μ l STET-Puffer hinzu, mischte abermals und setzte nach dreiminütigem Kochen bei 95°C die Suspension kurz auf Eis. Diese wurde nach dem Abkühlen zentrifugiert (10 min bei 4°C und 14.000 rpm).

200 μ l des Überstandes wurden mit 150 μ l 5 M Ammoniumacetat gemischt und die Proteine 30 min bei -20°C gefällt. Anschließend folgten 10 min Zentrifugation bei 4°C und 20.000x g.

200 µl des Überstandes wurden zu 600 µl vorgekühltem Ethanol gegeben und nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert.

Das Pellet wurde in 10 µl TE-Puffer gelöst und konnte bei -20°C gelagert werden.

2.2.1.6 Bakterien-Transformation

Zur weiteren Vervielfältigung von Plasmiden wurden kompetente DH5α (E. coli) transformiert, da diese auf Grund ihrer weitaus kürzeren Verdopplungszeit und leichteren Transformierbarkeit für Plasmidvervielfältigung effizienter sind als Hefen (Abb. 9, Schritt 6).

200 µl kompetente DH5α wurden auf Eis aufgetaut. 1 µl Plasmid-DNA (1-5 µg) in 1x TE-Puffer wurden hinzugegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach folgten ein 30-sekündiger Hitzeschock und weitere 15 Minuten Inkubation auf Eis. Dadurch wurde die Plasmid-DNA von den Bakterien aufgenommen. Danach schüttelte die Suspension zur Erholung der Bakterien mit 150 µl 2x TY 1 Stunde bei 37°C.

Die im Two-Hybrid Screen verwendeten Plasmide trugen ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion erfolgreich transformierter Bakterien. Abweichende Resistenzgene und Selektionsmedien können Tabelle 1 in Material entnommen werden. Nach der Transformation wurden die Bakterien auf Ampicillin-Selektionsagar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet.

2.2.1.7 Plasmidextraktion aus Bakterien

Jeweils 3 Kolonien pro im X-Gal-Test positivem Klon wurden weiter vervielfältigt (Abb. 9, Schritt 7). Bei drei Kolonien liegt die Wahrscheinlichkeit, mindestens einmal das pPC86-Plasmid mit dem unbekanntem DNA-Fragment zu erhalten, bei 87 %.

Um Plasmid-DNA nach der Vervielfältigung aus Bakterien zu extrahieren, nutzte man Maxi- oder Mini-Präparationen, je nach DNA-Bedarf (Abb. 9 , Schritt 8 bzw. 11). Zuerst wurde die Bakterienhülle aufgebrochen, danach wurden die Proteine gefällt und mit den Zelltrümmern abzentrifugiert. Die Bakterien-DNA befindet sich an Membran gebunden im Pellet, während die freie Plasmid-DNA in Lösung verbleibt und hieraus später gefällt werden kann.

2.2.1.8 DNA-Maxi-Präparation

Die Übernachtskultur einer Bakterien-Transformation aus 100 ml 2x TY mit Ampicillin (37°C bei 200 rpm im Schüttler) wurde bei 4°C mit 3000x g mit Bremse zentrifugiert. Die pelletierten Bakterien wurden in 5 ml Lösung A resuspendiert. Es wurden 10 ml Lösung B hinzugefügt und geschwenkt, wodurch die Bakterien aufgebrochen wurden. Danach wurde die Suspension 5 Minuten auf Eis gestellt. Zur Fällung von Proteinen wurde 5 ml Lösung C zugegeben, nochmals geschwenkt und die Suspension 10 bis 20 Minuten auf Eis gelagert. Zum Filtern der gefällten Zellbestandteile wurde der Plasmid-DNA enthaltende Überstand durch 4 bis 5 Lagen Mullbinde filtriert und, mit dem gleichen Volumen Isopropanol versehen, für 10 Minuten auf Eis gelagert. Durch das Isopropanol und die Kühlung fällt die Plasmid-DNA aus.

Es folgte eine Zentrifugation bei 4°C mit 3000x g ohne Bremse für 10 Minuten. Das Pellet mit der Plasmid-DNA trocknete bei Raumtemperatur an, bevor es in 1 ml 1x TE-Puffer resuspendiert wurde und mit 4 µl RNase bei 37°C mindestens 2 h, besser über Nacht, inkubierte.

Nach der Inkubation wurde 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol hinzugefügt, die Lösung gut gemischt und für 2 Minuten mit 20.000x g zentrifugiert. Die untere organische Phase enthält Membranreste. Die die Plasmide enthaltende wässrige Phase wurde mit 1 Volumen Chloroform versehen, abermals gut gemischt und 1 min bei 20.000x g zentrifugiert.

Den neuen Überstand versah man mit 1/20 Volumen 8 M Lithiumchlorid, um Salze aus der Lösung zu entfernen und in Folge eine reinere DNA-Fällung zu erhalten. Der Überstand wurde zur Fällung der Plasmid-DNA nach Zugabe von 1 Volumen Isopropanol für ca. 5 Minuten auf Eis gestellt, anschließend 5 min bei 20.000x g zentrifugiert.

Die gefällte Plasmid-DNA wurde mit 80% Ethanol gewaschen und nach der Trocknung bei RT in 300-400 µl 1x TE-Puffer gelöst. Eine Lagerung ist bei -20°C möglich.

2.2.1.9 DNA-Mini-Präparation

Werden nur kleine Plasmidmengen z.B. für Testverdaue benötigt, so findet die DNA-Minipräparation Anwendung (Abb. 9, Schritt 8).

Die Zentrifugationsschritte für diesen Versuch erfolgten alle für 5 Minuten bei 20.000x g. Die Zeitangaben für Fällungen und Verdau sind Mindestangaben. Das Prinzip von Fällung und Lösung entspricht der Maxi-Präparation.

1,5 ml der Übernachtskultur (siehe Maxi-Präparation) wurden zentrifugiert. Das Bakterien-Pellet wurde in 100 µl Lösung A aufgenommen und anschließend mit 200 µl Lösung B gut gemischt. Danach fügte man 150 µl Lösung C hinzu und mischte abermals. Nach Abzentrifugation von gefällten Zellbestandteilen gab man zum Überstand 1 ml 100% Ethanol, und fällte die DNA für 10 Minuten bei -20°C. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet mit der gefällten Plasmid-DNA 2-3 Minuten bei RT getrocknet. Die anschließend in 50 µl 1x TE-Puffer gelöste DNA wurde mit 4 µl RNase versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert.

50 µl 5 M Lithiumchlorid wurde dem Ansatz zugefügt. Dieser inkubierte 5 Minuten bei -20°C. Nach Abzentrifugation wurde die Plasmid-DNA aus dem Überstand durch Zugabe von 300 µl 100% Ethanol und Lagerung für 10 Minuten bei -20°C gefällt. Das abzentrifugierte Plasmid-DNA-Pellet wurde in 30 µl 1x TE-Puffer gelöst und konnte bei -20°C gelagert werden.

2.2.1.10 Aufreinigung von DNA über das Nucleobond AX Kit von Macherey-Nagel

Zum Erhalt von hochreinen DNA-Lösungen für den Einsatz in der Zellkultur wurden Plasmide über das Nucleobond AX-Kit von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben extrahiert.

Die DNA wurde je nach Pelletgröße in 200-500 µl sterilem Wasser gelöst.

2.2.1.11 Restriktionsverdau

Die aus Bakterien isolierten Plasmide wurden mittels Restriktionsverdau identifiziert. Dieser erfolgte mit den Restriktionsenzymen Sal I und Not I (Abb. 9, Schritt 9), entsprechend den Schnittstellen der Plasmide für die Inserts PA28γ und dem Bibliotheks-DNA-Fragment (Abb. 9, Schritt 10).

Der Restriktionsverdau dient zum Schneiden von DNA an für das Restriktionsenzym spezifischen Schnittstellen. Hierzu mischte man pro Ansatz 5 µl Restriktionspuffer und je 1 µl der jeweiligen Restriktionsenzyme (siehe Tabelle 1) mit 10 µl DNA-Lösung (aus DNA-Minipräparation) und fügte zum Auffüllen auf 25 µl Gesamtvolumen entsprechend steriles Wasser hinzu. Den Ansatz ließ man für mindestens 2 h, besser über Nacht, bei 37°C inkubieren.

2.2.1.12 Differenzierung zwischen pPC97-PA28γ und pPC86-DNA-Bibliotheksfragment durch Agarose-Gelelektrophorese

In der Agarose-Gelelektrophorese liefen PA28γ-Inserts auf einer Höhe mit dem Kontrollverdau (PA28γ), die betreffenden Klone wurden somit als pPC97-PA28γ-tragend identifiziert. Banden anderer Größe waren unbekannte Inserts aus der pPC86-Bibliothek.

Klone mit diesem Plasmid wurden über eine Maxi-Präparation vervielfältigt, die Plasmide isoliert und zur Identifizierung des codierten Proteins sequenziert.

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wandert die negativ geladene DNA über die in der Gelkammer angelegte Spannung von 100 V zur Anode. Je kleiner das Fragment ist, desto weiter/schneller wandert es. Ethidiumbromid lagert sich in die DNA ein und wird später durch UV-Bestrahlung sichtbar gemacht, wobei die DNA-Fragmentgröße über den mitgelaufenen Marker bestimmt wird. Neben der Größe kann auch die Menge der DNA mittels Bandenstärkeabgleich zum Marker bestimmt werden. Für die Gelherstellung wurde 1,5 g Agarose in 150 ml TBST-Puffer unter kurzem Erwärmen gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurden auf 15 ml Agarose-TBST-Mischung 8 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) hinzugefügt und die Mischung in eine passende Kammer mit entsprechendem Kamm für die Geltaschen gegossen. Während des Abkühlens polymerisierte die Agarose, das Gel wurde fest.

Die DNA wurde vor dem Auftragen auf das Gel mit 6x Ladepuffer gemischt und für 5 Minuten bei 94°C denaturiert. Die Laufzeit bestimmt sich durch die DNA-Fragmentgröße, beträgt meistens jedoch ca. 45 Minuten.

Anhand der Bandengröße konnten Kolonien mit dem Plasmid pPC97-PA28γ von anderen DNA-Fragmenten unterschieden werden. PA28γ läuft bei 1000 bp.

2.2.1.13 Sequenzierung

Extrahierte Plasmide oder Bibliotheks-DNA-Fragmente wurden mittels DNA-Sequenzierung kontrolliert bzw. identifiziert (Abb. 9, Schritt 12).

1 µl Primer (entweder forward *oder* reverse) und 1-1,5 µg DNA wurden mit sterilem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 16 µl aufgefüllt und anschließend mittels Cycle Sequencing sequenziert (ABI Prism 3100 genetic analyser).

Die Sequenz für den jeweiligen Primer ist Tabelle 2 zu entnehmen.

Plasmid	Sequenz Forward Primer	Sequenz Reverse Primer
pPC86-Bibliotheks-DNA-Fragment	TACCACTACAATGGATGATG	TTGATTGGAGACTTGACC

Tabelle 2
Primer für Sequenzierungsansätze

2.2.1.14 Identifizierung unbekannter Sequenzen

Unbekannte Sequenzen konnten mittels NCBI-BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Internetadresse: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) (Altschul et al., 1990) mit den in der Datenbank gespeicherten Sequenzen verglichen und dadurch identifiziert werden.

In der Einstellung Basic Blast: nucleotide blast wählen und die Sequenzen im FASTA-Format eingeben.

2.2.2 Weitere RNA/DNA basierte Methoden

2.2.2.1 RNA-Isolation aus Tumorproben

Um aus chirurgisch entnommenen Gewebeproben RNA isolieren zu können, mussten diese entweder direkt verarbeitet werden oder bei -80°C eingefroren und später in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Die mRNA wurde aus 30 mg Biopsie-Gewebe mit dem Nucleo-Spin RNA/Protein-Kit von Machery-Nagel gemäß den Angaben des Herstellers gewonnen und während der Reinigung mit RNase-freier DNase I behandelt, um DNA-Verunreinigungen aus den Proben zu entfernen. Die RNA-Proben wurden in 60 µl RNase-freiem Wasser gelöst und bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 Quantifizierung von RNA, photometrische Messung

Durch photometrische Messung der optischen Dichte eines verdünnten RNA Ansatzes konnte die Konzentration der RNA errechnet werden. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum von RNA) unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors. Die Reinheit der RNA wurde über den Quotienten der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Werte zwischen 1,9 und 2,1 gelten als optimal. Die RNA-Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ berechnet sich nach der Formel $(\text{OD}_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Gesamtvolumen}) : 100$

2.2.2.3 Semiquantitative PCR Analyse

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung von genau definierten DNA-Abschnitten *in vitro*. Die beiden Stränge der DNA werden durch Erhitzen getrennt, so dass sich Primer anlagern können. Diese sind Startpunkte für die Elongation der DNA-Stränge durch die DNA-Polymerase. Durch Wiederholung des Vorgangs wird die DNA vervielfältigt.

Die semiquantitative reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR) Analyse dient der Untersuchung von Expressionsstärken auf RNA-Ebene, um zum Beispiel Hinweise auf Veränderungen in der Expressionsregulation bestimmter Proteine in verschiedenen Tumoren zu erhalten.

Die abgelesene RNA-Menge gibt Hinweise auf die Transkriptionsstärke eines Gens. Die RNA wird mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und im Anschluss als Ausgangsmaterial in einer PCR verwendet, um spezifische Sequenzen zu amplifizieren. Mittels Haushaltsgenen, die in jedem Gewebe annähernd gleich stark exprimiert sind, wird die Probenmenge angeglichen, so dass die RNA-Menge des untersuchten Gens objektiv beurteilt werden kann.

2.2.2.4 Erststrang cDNA Synthese

Damit eine RT-PCR Analyse durchgeführt werden kann, muss die gewonnene mRNA zuerst mit Hilfe einer reversen Transkriptase zu cDNA umgeschrieben werden. Hierzu wurde das RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas verwendet.

10-15 ng RNA (siehe Quantifizierung von RNA, photometrische Messung) und 0,5 µg Oligo(dT)₁₈ Primer wurden mit RNase-freiem Wasser auf 12 µl aufgefüllt und für 5 min bei 70°C inkubiert. Die Primer lagerten sich an die entfaltete, einsträngige RNA an. Anschließend wurden auf Eis 4 µl 5x Reaktionspuffer, 2 µl Ribonuclease inhibitor (20 U/µl) zur Vermeidung von RNA-Verlusten und 2 µl 10 mM dNTP Mix (10 mM) (Nucleotide für den Aufbau der cDNA) zugegeben und erneut für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. 1 µl (200 U/µl) RevertAid™ M-MuLV Reverse Transkriptase wurde zugefügt und die Mischung 60 Minuten bei 42°C inkubiert. Die reverse Transkriptase band an den an der RNA angelagerten Primern und begann mit der cDNA-Synthese. Diese wurde durch Erhitzen des Ansatzes auf 70°C abgestoppt und die cDNA bei -20°C aufbewahrt.

2.2.2.5 Gewinnung von Tumorproben und Normalhirngewebe

In dieser Arbeit wurden verschiedene Tumorproben auf den Gehalt von PA28γ-mRNA im Abgleich zu den Haushaltsgenen GAPDH und β-Aktin untersucht. Tabelle 3 zeigt einen Überblick über alle untersuchten Tumorproben und ihre Herkunft.

Die Patienten wurden prä-operativ über die Gewebeverwendung informiert und hatten ihre schriftliche Einwilligung für die wissenschaftliche Verwendung und Analyse gegeben. Die Verwendung der Proben erfolgte streng nach den Auflagen der Ethikkommission.

Die 15 niedriggradigen Astrozytom-Proben WHO Grad II (LGA) und die 15 GBM-Proben WHO Grad IV stammten von jeweils sieben weiblichen und acht männlichen Patienten (Tabelle 3).

Tumornummer	Alter (Jahr)	Geschlecht	Diagnose	Tumorlokalisation
2183	6	F	LGA ^{a,b}	Parietal
2227	29	F	LGA	Frontal
2280	54	F	LGA	Temporal
2285	54	M	LGA	Temporal
2366	45	F	LGA	Cerebellum
2442	3	M	LGA ^b	Mesencephalon
2510	35	M	LGA	Temporomesial
2573	12	F	LGA ^{a,b}	Parietal
2186	59	F	LGA	Frontal
2201	50	M	LGA ^c	Frontal
2222	24	M	LGA	Frontoparietal
2237	40	M	LGA ^d	Temporal
2651	20	F	LGA	Frontal
2653	34	M	LGA	Fronto-temporal
2763	46	M	LGA ^a	Fronto-temporal
2262	67	F	GBM	Fronto-parietal
2329	63	F	GBM	Frontal
2369	54	F	GBM ^c	Temporal
2374	18	F	GBM ^b	Frontal
2414	68	M	GBM	Frontal
2464	65	M	GBM	Parieto-occipital
2487	63	F	GBM	Temporal
2423	38	M	GBM ^{c,f}	Fronto-temporal
2426	60	M	GBM	Temporal
2467	41	M	GBM ^b	Bifrontal
2469	69	M	GBM	Temporal
2478	62	M	GBM	Temporal
2480	62	F	GBM ^e	Frontal
2608	52	M	GBM	Parietal
2779	59	F	GBM	Frontal

Tabelle 3

Analysierte Tumorproben

Abkürzungen: F: weiblich; M: männlich; LGA: niedriggradiges Astrozytom; GBM: Glioblastom
Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Proben vor weiterer Behandlung beim ersten chirurgischen Eingriff entnommen.

^a Protoplasmatisches Astrozytom

^b Keine Information über vorangegangene Therapie oder chirurgische Eingriffe

^c Probe von Rezidivtumor, der zuvor mit γ -Strahlung und Chemotherapie behandelt wurde

^d Probe von Rezidivtumor ohne vorangegangene Therapie mit γ -Strahlung und Chemotherapie

^e Probe von Rezidivtumor, keine Information über vorangegangene Therapien

^f sekundäres GBM, bei primärer Biopsie als Astrozytom WHO Grad III diagnostiziert

Bei allen GBM-Patienten wurde die chirurgische Tumorresektion an der neurochirurgischen Klinik der Universitätsklinik Würzburg durchgeführt, gefolgt von Bestrahlung und begleitender Chemotherapie mit Temozolomid. 2 Proben stammten von Rezidivtumoren (Tabelle 3).

Die drei Proben Normalhirn (temporal) wurden freundlicherweise von Thomas Freiman (Universitätsklinik Freiburg im Breisgau) überlassen und stammen von Epilepsie-Patienten. Diese Proben wurden streng anonymisiert. Auch hier wurden die Patienten prä-operativ über die Gewebeerwendung informiert und hatten ihre schriftliche Einwilligung für die wissenschaftliche Verwendung und Analyse gegeben. Das zur Untersuchung bereitgestellte Tumor-Material wäre andernfalls bereits intraoperativ verworfen worden.

Alle Proben wurden direkt nach Entnahme im Rahmen der Resektion bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Hirntumor-Klassifikation wurde an Hand histologischer Kriterien bestimmt, welche den WHO-Kriterien entsprechen.

2.2.2.6 Semiquantitative RT-PCR Analyse

Mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR-Analyse kann das Verhältnis einzelner mRNA-Mengen zueinander abgeschätzt werden.

Um die gewonnene RNA (siehe RNA-Isolation aus Tumorproben) zu amplifizieren, benötigt man passende Primer. Die für diese Arbeit verwendeten Primer sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Gen	Forward primer	Reverse primer	Tm (°C)	Zyklen	cDNA	Gen. DNA
					Fragment Größe (bp)	
PA28 γ	5'- TCTGATATGATGAGCCGAAGG-3'	5'-CTTCAGGCAAAGGTACTION-3'	59	32	291	1187
GAPDH	5'-GCAGGGGGGAGCCAAAAGGG-3'	5'-TGCCAGCCCCAGCGTCAAAG-3'	68	21	566	851
β -Aktin	5'-CGTGCGTGACATTAAGGAGA-3'	5'-CACCTCACCGTTCCAGTTT-3'	59	25	668	875

Tabelle 4
Primer und Bedingungen für die semiquantitative RT-PCR Analyse
 Abkürzungen: Tm: Annealing Temperatur; bp: Basenpaare, cDNA: komplementäre DNA, gen: genetisch, (Adaptiert aus Stojic et al., 2007)

Der PCR-Master Mix wurde mit einer Endkonzentration von 2,5 U Taq Polymerase pro 25 µl Reaktionsansatz 10x Puffer (1,5 mM MgCl₂) vorbereitet. Die PCR-Bedingungen wurden für das PA28γ-Primerpaar und die Primerpaare für GAPDH und β-Aktin optimiert, so dass die Proben linear verglichen werden konnten. Die Zyklen wurden wie folgt programmiert: 5 min bei 94°C; 21–32 Zyklen (Tabelle 4) für jeweils 30 Sekunden bei 94°C, 30 Sekunden bei der jeweiligen annealing Temperatur, 30 Sekunden bei 72°C und 10 min bei 72°C.

Anschließend wurden die PCR-Produkte mit Hilfe eines 1%-Agarose-Gels (0.07µg/ml Ethidiumbromid) aufgetrennt (siehe Gelelektrophoretische DNA-Auftrennung) und die Stärke der Ethidiumbromid-Fluoreszenz mittels BioDocAnalyze Software densitometrisch ausgewertet. Die Fluoreszenzstärke der PA28γ-Bande wurde in Relation zu der Fluoreszenzstärke der zugehörigen Banden von GAPDH und β-Actin gesetzt. Keine Expression entsprach 0%, die stärkste Bande wurde als 100% gewertet.

Die Ergebnisse wurden im Anschluss mit Microsoft Office Excel 2003 statistisch ausgewertet. Es werden Durchschnittswerte und Standardfehler bestimmt. Als statistisch signifikant galt ein Zweistichproben-t-Test mit $p < 0,05$.

2.2.3 Zellkultur

2.2.3.1 Zellen auftauen

Zum Auftauen von Zellen aus der Lagerung in flüssigem Stickstoff wurden diese zügig im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Sobald keine Eiskristalle mehr zu sehen waren, überführte man den gesamten Inhalt des Kryoröhrchens in eine 75 cm² Zellkulturflasche mit 20 ml vorgewärmten Medium. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um DMSO-Reste zu entfernen

2.2.3.2 Zellen splitten

Bei Konfluenz von 70-90% wurden die Zellen umgesetzt, da sie sonst überwachsen und Veränderungen von Funktion, Phänotyp und anderen zelltypischen Eigenschaften entwickeln können. Nach Abnahme des Mediums und Waschen der Zellen mit 5 ml PBS wurde 3 ml Trypsin in die 75 cm² Zellkulturflasche gegeben. Die Zellen lösten sich bei 37°C ab. Sobald die Zellen nicht mehr anhafteten, wurde die Reaktion zügig mit 5-7 ml warmen Medium abgestoppt, um Zellschäden durch das Trypsin zu vermeiden. Die Zellen wurden entsprechend dem gewünschten Teilungsverhältnis in Kulturflaschen überführt, in das bereits frisches vorgewärmtes Medium gegeben worden war.

2.2.3.3 Zellen einfrieren

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie in 2.2.3.2 beschrieben trypsiniert und mit Medium bei 200x g und 4°C 10 Minuten (ohne Bremse) zentrifugiert. Das Medium wurde abgossen und die Zellen wurden pro Zellkulturflasche in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und sofort in Kryoröhrchen bei -80°C eingefroren. Eine Langzeitlagerung fand in flüssigen Stickstoff (-195°C) statt.

Es sollten beim Einfrieren von Zellen alle verwendeten Medien, Zusätze und Röhrchen gut gekühlt und auf Eis gelagert sein. Außerdem sollte möglichst zügig gearbeitet werden, um Zellen vor Schäden durch DMSO in nicht gefrorenem Zustand zu schützen.

2.2.3.4 Zellen lysieren

Zellyse wird zum Beispiel zur Proteinextraktion benötigt. Die Platte mit adhärenenten Zellen wurde zweimal mit 4 ml PBS gewaschen. Alle Schritte wurden dann auf Eis durchgeführt. Nach Zugabe von 500 µl Gebrauchslyse-Puffer wurden die Zellen mit dem Zellschaber abgelöst, gleiche Zellansätze gegebenenfalls vereinigt und die Suspension wird 10 min bei

20.000x g zentrifugiert. Hierbei wurden DNA, Zelltrümmer und andere größere Bestandteile sedimentiert, während Proteine im Überstand verblieben. Dieser konnte bei -20°C gelagert werden.

2.2.4 GST-Pulldown-Assay

Der GST-Pulldown dient dem Nachweis von Protein-Interaktionen *in vitro*. Hierzu benötigt man eines der interagierenden Proteine als GST-Fusionsprotein, das andere frei verfügbar in Lösung. In dieser Arbeit fanden die Proteine GST, GST-PA28 γ und endogenes Mad2b Verwendung. Die gereinigten GST-Proteine (Schritt 1 in Abb. 10) binden zunächst die Gluthation-Sepharose (Schritt 2 in Abb. 10). Während Schritt 3 binden über Nacht die Interaktionspartner aneinander. Durch Zentrifugation wird die Sepharose mit den daran haftenden GST-Proteinen als Pellet (Schritt 4 in Abb. 10) und bei Interaktion auch der an GST-PA28 γ gebundene Interaktionspartner sedimentiert. Nach Waschen und Elution wird der an das GST-Fusionsprotein gebundene Interaktionspartner im Western Blot nachgewiesen (Schritt 5).

2.2.4.1 GST-Protein-Aufreinigung

Zunächst mussten die GST-Proteine aus Bakterien extrahiert werden (Schritt 1 in Abb. 10) Nach Anzucht der entsprechenden Bakterien auf Agar wurden 100 ml 2x TY mit Ampicillin mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Am Morgen wurde ein Liter 2x TY + Ampicillin mit 20 ml der Übernacht-Kultur angeimpft und weiter bei 37°C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht war. Frisch angesetzter Hefeextrakt/IPTG-Mix wurde der Zellkultur zur Induktion der Protein-Synthese zugegeben, 3 h bei 30°C mit 200 rpm geschüttelt und 15 min bei 4°C und 3000x g zentrifugiert.

Das Pellet wurde in 25 ml Puffer X 1 suspendiert und 10 min bei 4°C und 3000x g zentrifugiert. Jetzt wurde das Pellet in 25 ml Puffer X 2 resuspendiert und zum Aufbrechen der Bakterien über Nacht bei -20°C eingefroren.

Am nächsten Tag wurden die aufgetauten Zellen mittels Ultraschall nach folgendem Schema aufgebrochen: 15 Sekunden Ultraschall, 5 Sekunden Trockeneis-Ethanol-Bad. Insgesamt wurden diese Schritte viermal wiederholt, dann wurden Zellreste bei 4°C über 20 Minuten mit 12.000x g abzentrifugiert. Die Suspension wurde auf Eis gelagert.

2,66 ml Gluthation Sepharose wurden 2x mit 5 ml Puffer X 2 gewaschen.

Der Überstand des zentrifugierten Zelllysates enthält die GST-Proteine und wurde zu der gewaschenen Gluthation Sepharose gegeben (Schritt 2 in Abb. 10) und zwei Stunden auf dem Roller inkubiert, um eine Bindung der Gluthation Sepharose an das GST-Fusionsproten zu erreichen. Daraufhin wurde bei 2000x g eine Minute lang bei 4°C zentrifugiert, wobei Gluthation-Sepharose und GST-Proteine sedimentiert wurden. Das Pellet wusch man 4x mit 10 ml Puffer X 2 und resuspendierte es danach in 2 ml Puffer X. Lagerung war bei 4°C möglich.

2.2.4.2 Coomassie-Färbung

Zur Kontrolle und Bestimmung der Proteinmenge aus der GST-Proteinreinigung dient die Coomassie-Färbung.

Jeweils 5 µl, 10 µl und 20 µl des GST sowie 10 µl, 20 µl und 40 µl des GST-Fusionsproteins (GST-PA28γ) wurden kurz abzentrifugiert und mit 20 µl SDS Sample Buffer bei 95°C gekocht. Hierbei löst sich das GST-Protein von der Gluthation-Sepharose. Nach Abzentrifugieren der Gluthation-Sepharose verbleiben die GST-Proteine im Überstand und wurden komplett auf ein 10%iges Bis-Tris-Acrylamid-Gel mit nicht-reduzierendem MES-Puffer aufgetragen. Das Gel lief im Programm Nu Page Gel, Laufdauer 40 Minuten bei 200 Volt.

Anschließend wurde das Gel 15 Minuten in die Coomassie-Färbelösung gelegt und danach über Nacht in der Entfärbelösung entfärbt. Es empfiehlt sich ein gelegentlicher

Wechsel der Entfärbe-Lösung. Nur an Protein gebundenes Coomassie-Blau verbleibt nach der Entfärbung im Gel. So konnte der Aufreinigungserfolg kontrolliert werden.

Anschließend wurde das Gel bei 80°C eine Stunde getrocknet.

2.2.4.3 GST-Pulldown mit endogenem Mad2b aus GaMG-Zelllysate

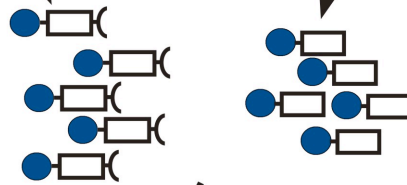
Je 100 µl Zelllysate aus GaMG-Zellen mit endogenem Mad2b (Lyse nach Protokoll) wurden mit GST bzw GST-PA28γ (Menge je nach Ergebnis des Coomassie-Gels, meist zwischen 5 µl und 40 µl) über Nacht auf dem Roller bei 4°C inkubiert. (Schritt 3 in Abb. 10)

Am folgenden Morgen (Schritt 4 in Abb. 10) wurden die Proteine 10 Sekunden abzentrifugiert und das Pellet 3x mit Lysis-Puffer gewaschen. 40 µl Sample Buffer ohne Reducing Agent wurden zum Pellet gegeben. Die Suspension wurde für 5 Minuten zur Proteindenaturierung bei 95°C gekocht. Nach erneuter Zentrifugation wurde mit 20 µl des die Proteine enthaltenden Überstandes ein Western Blot durchgeführt (12% Bis-Tris-Gel in MOPS-Puffer, Schritt 5 in Abb. 10).

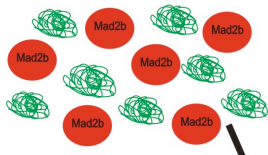
Schritt 1
Bakterienlyse und
Extraktion der Proteine
GST bzw. GST-PA28 γ



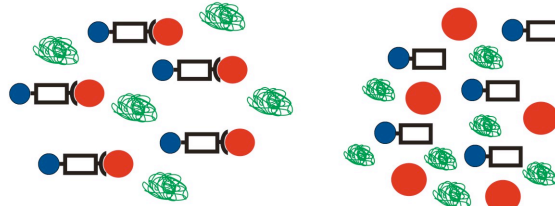
Schritt 2
Bindung der GST-Proteine
an Gluthation-Sepharose



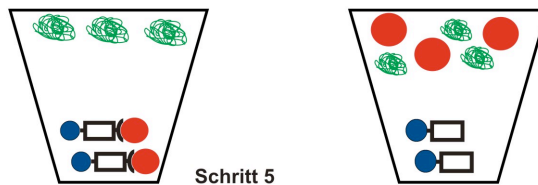
Zellysate



Schritt 3
Bindung von endogenem
Mad2b (Zellysate)
an PA28 γ (GST-gekoppelt)



Schritt 4
Abzentrifugieren
der GST-Proteine und
ihrer Interaktionspartner



Schritt 5
Waschen, Eluieren
Nachweis des
Interaktionspartners
(Mad2b) im Western Blot

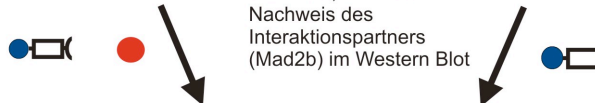


Abb. 10
Überblick über den GST-Pulldown

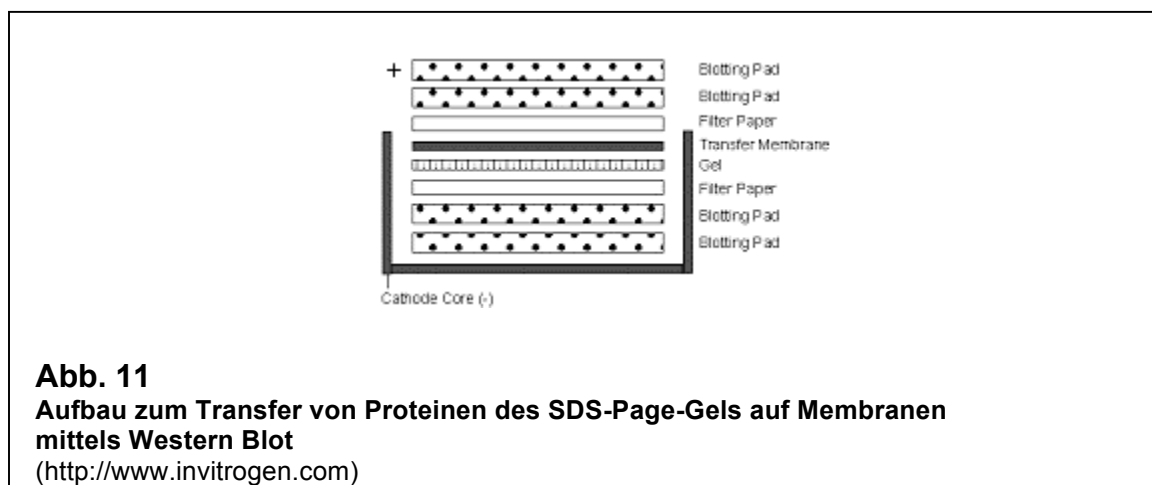
2.2.4.4 Western Blot

Um bestimmte Proteine aus Zelllysaten oder aus dem GST-Pulldown-Assay identifizieren oder auch quantifizieren zu können, nutzt man den Western Blot. Proteine werden durch Elektrophorese in einem Gel aufgetrennt und anschließend vom Gel durch elektrische Spannung auf eine Membran übertragen und dort mit entsprechenden Antikörpern detektiert. Die Größe der Proteine wird über mitlaufende Marker bestimmt, deren Bandengrößen bekannt sind.

6,25 µl 4x NuPage Sample Buffer wurden mit 2,5 µl NuPage Reducing Agent sowie 16,25 µl der Probe gemischt und die Proteine 10 Minuten bei 70°C denaturiert.

Die Puffer und das Gel wurden nach Herstellerangaben vorbereitet. Nach Spülung der Taschen mit dem entsprechenden Puffer, um Gelrückstände auszuwaschen, und Beladen des Gels wurde die innere Kammer der X Cell Sure Lock Elektrophoresekammer mit Puffer und 500 µl Antioxidant gefüllt, die äußere Kammer nur mit Puffer. Anschließend wurde das Netzgerät mit entsprechender Zeit, Volt und Ampere-Zahl gestartet.

Für diese Arbeit wurden, wenn nicht anders erwähnt, 12%-Bis-Tris-Gele sowie MOPS-Puffer verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 200 V und einer Stromstärke von ca. 120 mA bei 40 Minuten Laufdauer.



Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde das Gel aus der Kammer genommen, von den Plastikplatten befreit und in Transferpuffer gelegt. Das Sandwich mit zugeschnittener Nitrozellulose, Whatman-Filter, Gel und Pads baute man wie folgt blasenfrei im Transferpuffer zusammen (Abb. 11): 3 Blotting Pads, 1 Whatman-Filter, 1 Gel, 1 Nitrozellulose, 1 Whatman-Filter, 3 Blotting Pads. Das Sandwich wurde mit dem Gel zur Kathode und mit der Nitrozellulose zur Anode in das Blotmodul gelegt. Das Blotmodul wurde in einer sauberen Kammer fixiert und mit Transferpuffer gefüllt. Die Kammer füllte man mit 600 ml Aqua dest. und transferierte die Proteine 1 h bei 30 V auf die Nitrozellulose-membran. Nach erfolgtem Protein-Transfer wurde der Marker auf der Nitrozellulose markiert, die Membran 30 Minuten in 5% Milchpulver in TBST geblockt, um unspezifische Antikörperbindung an die Membran zu unterbinden, und anschließend mit dem in 5% Milchpulver-TBST verdünnten Primärantikörper bei RT inkubiert.

Primär-AK	Verdünnung Primär-AK	Inkubationszeit Primär-AK	Zugehöriger Sekundär-AK	Verdünnung Sekundär-AK
Anti-flag	1:500	1,5h bis über Nacht	Anti-Maus	1:1000
Anti-Mad2b	1:1000	1,5h bis über Nacht	Anti-Kaninchen	1:1000
Anti-myc	1:500	1,5h bis über Nacht	Anti-Kaninchen	1:1000
Anti-PA28 γ	1:20000	2h	Anti-Kaninchen	1:1000

Tabelle 5

Primär-Antikörper (AK) mit Verdünnung, Inkubationszeit und zugehörigem Sekundär-Antikörper

Nun folgten drei 5-minütige Waschschrte in TBST. Dadurch wurden Antikörper, die unspezifisch gebunden hatten, entfernt. Die Membran wurde mit dem Sekundärantikörper in TBST für 2 h bei RT inkubiert und danach 5x 5 Minuten in TBST gewaschen.

Anschließend wurde Enhanced Chemoluminescence (ECL) Lösung auf die Membran gegeben. Der Sekundärantikörper ist an eine Meerrettichperoxidase gekoppelt und kann das Luminol in der ECL Lösung umsetzen. Dabei wird Licht emittiert, das durch Auflegen eines ECL Hyperfilms dokumentiert wird.

Der Blot wurde zur weiteren Verwendung in TBST im Kühlschrank gelagert. Zur Inkubation mit weiteren Primärantikörpern wurde er gestrippt, d. h. die bereits gebundenen Antikörper wurden wieder entfernt. Hierzu wurde der Blot 2-3 h, evtl auch über Nacht, in Strip-Puffer geschwenkt, danach 5-7 Mal in TBST gewaschen und in 5% Milchpulver in TBST geblockt. Danach wurde wie oben beschrieben weiter verfahren.

2.2.5 Transfektion mittels Elektroporation (Nucleofector Device Amaxa)

DNA kann mittels Elektroporation in Zellen geschleust werden. Das jeweilige kodierte Protein wird überexprimiert und kann im Folgenden zum Beispiel für Funktionsanalysen aufgereinigt werden. Bei der Elektroporation wird die Zellmembran durch einen kurzen Stromstoß reversibel für die DNA permeabel gemacht.



Abb. 12

Nucleofector Device Amaxa

Amaxa Transfektionssystem für Elektroporation

Von links: Nucleofector Device Amaxa Transfektionsgerät, Nucleofectorlösung und Transfektionsgefäße

Für diese Arbeit wurde das Nucleofector-Kit von Amaxa verwendet (Abb. 12). Es kamen die Glioblastomzelllinien GaMG und U251 und dafür optimierte Transfektionsbedingungen zum Einsatz (Hagemann et al., 2006).

2.2.6 Proliferationsassay

Ein Proliferationsassay dient der Bestimmung der Proliferationsrate verschiedener Zellen. In diesem Fall wurde das Protein PA28 γ überexprimiert und das Wachstumsverhalten der überexprimierenden (pCMV5-Flag-PA28 γ) im Vergleich zu Leervektor-transfizierten (pCMV5-Tag3A) U251-Zellen untersucht.

Für den Proliferationsassay benötigte man pro Tag und Ansatz drei Schälchen mit jeweils 50.000 Zellen. Da bereits während der Transfektion eine erhebliche Anzahl Zellen absterben, setzte man jeweils zwei Ansätze pro Plasmid an. Die Transfektion wurde nach dem optimierten Amaxa-Protokoll durchgeführt. Direkt nach der Transfektion wurden die Zellen in vorgewärmtes Medium überführt und die Anzahl lebender Zellen wurde noch einmal bestimmt, indem man 180 μ l Trypanblau mit 20 μ l Zellsuspension mischte. Aus dieser Mischung wurden 20 μ l in eine Rosenthal-Zählkammer gegeben und die lebenden Zellen ausgezählt: Abgestorbene Zellen nehmen das Trypanblau auf und färben sich deutlich dunkelblau, während lebende Zellen sich weiß abzeichnen.

Die lebenden Zellen in den 16 Quadraten unter dem Mikroskop wurden gezählt.

Die Zellzahl pro ml Suspension lässt sich mit folgender Formel berechnen:

$$\text{Zellzahl / ml} = (\text{Anzahl der gezählten Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^3) : 3,2$$

Anschließend wurden je 50.000 Zellen mit 5 ml vorgewärmtem Medium in 6 cm Petrischalen ausplattiert. Transfiziert wurden die Plasmide pCMV5-Tag3A als Leervektor und pCMV5-Flag-PA28 γ . Überschüssige Zellen wurden kultiviert und dienten als Positivkontrolle.

Die Zellzahl wurde folgend alle 24 h bestimmt. Als Ausgangswerte verwendete man die Zellzahlen des ersten Zähltages, da in den ersten 24 h durch Transfektionsbelastung die Zellzahl noch einmal sank. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag.

Zum Zählen trypsinisierte man die Zellen mit 0,4 ml Trypsin-EDTA nach Protokoll ab, stoppte die Reaktion mit 1 ml Medium ab und bestimmte die Zellzahl pro Schälchen.

Die Gesamtzahl der Zellen berechnete sich auf 1,4 ml (1 ml Medium plus 0,4 ml Trypsin). Währenddessen standen die Zellen auf Eis. Die Zellen wurden bei 200x g 7 min

abzentrifugiert, mit 0,5 ml PBS pro Schälchen gewaschen und Zellen der gleichen Ansätze eines Tages vereinigt. Die vereinigten Zellen wurden in 0,4 ml Lysis-Puffer lysiert, für 10 Minuten bei 20.000x g zentrifugiert und der Überstand für den späteren Western Blot zur Überprüfung von Proteinmengen, Transfektionserfolg und Verlauf der Proteinexpression bei -20°C weggefroren.

3. ERGEBNISSE

3.1 PA28 γ interagiert mit Mad2b

Nachdem PA28 γ als Interaktionspartner von Mad2b in einem Hefe Two-Hybrid Screen identifiziert worden war (Vorarbeiten des tumorbiologischen Labors der neurochirurgischen Klinik der Universitätsklinik Würzburg), sollte diese Interaktion *in vitro* mittels GST-Pulldown-Assay bestätigt werden. Dazu musste zunächst freies GST und GST-PA28 γ gewonnen werden. Die entsprechenden Expressionsplasmide waren im tumorbiologischen Labor der neurochirurgischen Klinik der Universitätsklinik Würzburg vorhanden. Die GST-Proteine wurden bakteriell exprimiert und die Ausbeute der gereinigten Proteine auf einem Coomassie-Gel kontrolliert (Abb. 13).

Die doppelte Bande der GST-PA28 γ -Aufreinigung resultiert aus der Fusionstrennung von GST und PA28 γ bei einigen Proteinen.

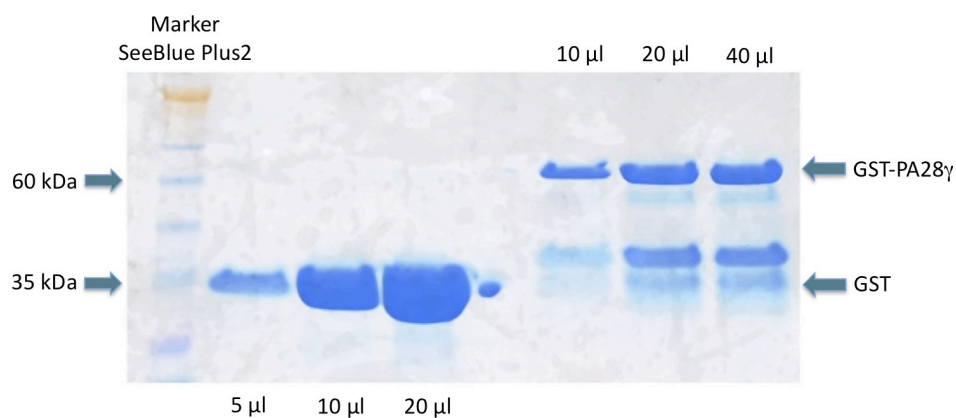


Abb. 13

Coomassie-Gel mit gereinigten GST-Proteinen

Kontrolle der Expressionsstärke und Ausbeute nach bakterieller Expression und Reinigung. Um mit vergleichbaren Proteinmengen zu arbeiten, wurden 5 µl GST und 40 µl GST-PA28 γ verwendet. Als Marker wurde Seeblue Plus2 von Invitrogen verwendet. Die GST-Bande erscheint bei 35kDa, GST-PA28 γ erscheint bei 60kDa.

Um vergleichbare Proteinmengen einzusetzen, wurden für den nachfolgenden GST-Pulldown Assay 5 µl GST bzw. 40 µl GST-PA28 γ verwendet.

Die Glioblastomzelllinie GaMG wurde aufgrund ihrer hohen endogenen Expression von Mad2b eingesetzt (Abb. 14: Mad2b im Totallysat). Nach Bindung von GST bzw. GST-PA28 γ an Glutathion-Sepharose wurden die Ansätze mit GaMG-Zelllysat inkubiert. Der verwendete Mad2b-Antikörper detektierte spezifisch die 21 kD Bande des Mad2b Proteins. In den Negativkontrollen konnte gezeigt werden, dass der Mad2b-Antikörper nicht direkt an GST (Abb. 14: Puffer + GST) oder an GST-PA28 γ (Abb.14: Puffer + GST-PA28 γ) bindet. Ebenso bindet das Mad2b-Protein aus dem Zelllysat nicht direkt an GST (Abb. 14: Mad2b + GST). Während die Negativkontrollen somit unspezifische Bindungen ausschlossen, konnte spezifisch in dem Ansatz ein Mad2b Pulldown detektiert werden, in dem GaMG Zelllysat mit GST-PA28 γ zusammengebracht worden war (Abb. 14: Mad2b und GST-PA28 γ).

Dies bestätigte die Interaktion zwischen Mad2b und PA28 γ *in vitro*.

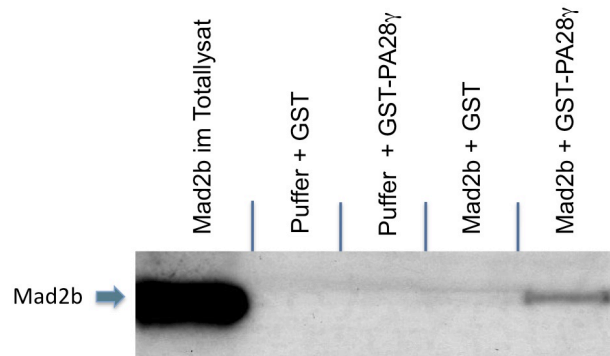


Abb. 14

Mad2b interagiert mit PA28 γ im GST-Pulldown

Spezifischer Pulldown von Mad2b durch GST-PA28 γ (Spur 5), aber nicht durch freies GST (Spur 4).

Totallysat aus GaMG Zellen diente als Positivkontrolle für die Mad2b Expression (Spur 1). Lysispuffer wurde als Negativkontrolle ohne Mad2b Proteine verwendet (Spur 2 und 3), der Mad2b-Antikörper bindet nicht an GST oder GST-PA28 γ selbst.

3.2 PA28 γ -Expression in humanen Astrozytom-Proben mit Hilfe von semiquantitativer RT-PCR

Okamura et al. konnten PA28 γ -Überexpression in den stark proliferierenden Bereichen von Schilddrüsentumoren nachweisen (Okamura et al., 2005). Da auch astrozytäre Tumore mit ansteigender WHO Gradierung eine ansteigende Proliferationsrate aufweisen (Furnari et al., 2007), wurden 3 Normalhirnproben, 15 Astrozytome Grad II und 15 Glioblastome mit Hilfe von semiquantitativer RT-PCR auf ihre PA28 γ mRNA-Expression untersucht (Abb. 15). Um sicherzustellen, dass gleiche RNA-Mengen im Assay eingesetzt wurden, wurden die zellulären Haushaltsgene GAPDH und β -Actin verwendet. Von ihnen ist bekannt, dass sie von astrozytären Zellen gleichbleibend exprimiert werden (Said et al., 2007). Abb. 15 zeigt, dass in allen untersuchten Proben eine deutliche PA28 γ mRNA-Expression nachweisbar war.

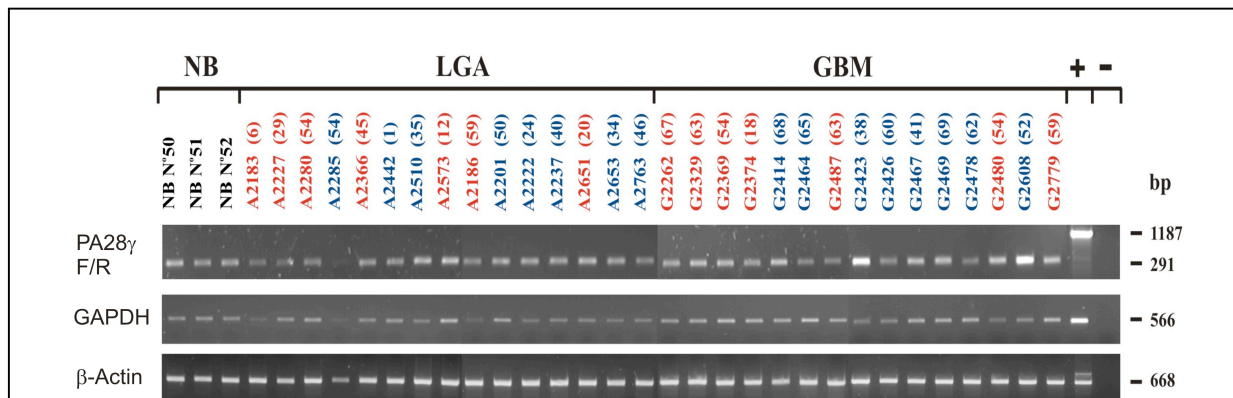


Abb. 15

PA28 γ mRNA-Expression

Die mRNA-Expression von PA28 γ in 15 niedriggradigen Astrozytomen (LGA) und 15 Glioblastomen (GBM) wurde im Vergleich zu 3 Normalhirnproben (NB) semiquantitativ analysiert.

Als Ladekontrolle dienten GAPDH und β -Actin.

Die farbige angegebenen Zahlen verschlüsseln Patienten, A steht für Astrozytom, G für GBM. Blau bedeutet männlicher Patient, rot steht für weiblicher Patient. Die Zahlen in Klammern geben das Alter des Patienten zum OP-Zeitpunkt an.

+ und - steht für die Positiv- und Negativkontrolle.

In allen untersuchten Proben war eine deutliche PA28 γ mRNA-Expression nachweisbar.

Mittels BioDoc Analyse, einem Programm zur Auswertung von Expressionsstärken, wurde die relative Intensität der einzelnen Banden bestimmt.

Wie in Kapitel 2.2.2.6 „Semi quantitative RT-PCR Analyse“ beschrieben, wurde die Fluoreszenz-Intensität der PCR-Produkt-Banden densitometrisch ausgewertet und zunächst in Relation zu den Housekeeping-Genen GAPDH und β -Actin gesetzt, um einen Korrekturfaktor für die Fluoreszenz-Intensitäten von PA28 γ in den untersuchten Tumorproben zu bestimmen. Diese auf die Housekeeping-Gene normalisierten Fluoreszenz-Intensitäten wurden dann korreliert.

Keine nachweisbare Expression wurde als 0%, die stärkste Bande als 100% gewichtet, ohne dass bei dieser semi quantitativen PCR-Methode absolute Expressionsstärken bestimmt werden konnten. Die Ergebnisse wurden im Anschluss mit Microsoft Office Excel 2003 statistisch ausgewertet. Es wurden Durchschnittswerte und Standardfehler bestimmt. Als statistisch signifikant galt $p < 0,05$ in einem Zweistichproben-t-Test.

Diese Analyse ergab, dass in den Astrozytomproben im t-Test bei unterschiedlichen Varianzen signifikant weniger PA28 γ -mRNA exprimiert wurde als in den damit verglichenen Glioblastomproben ($p < 0,05$). Jedoch zeigten die Tumorproben im Vergleich zu den Normalhirnproben keine signifikante Expressionsänderung (Abb. 16).

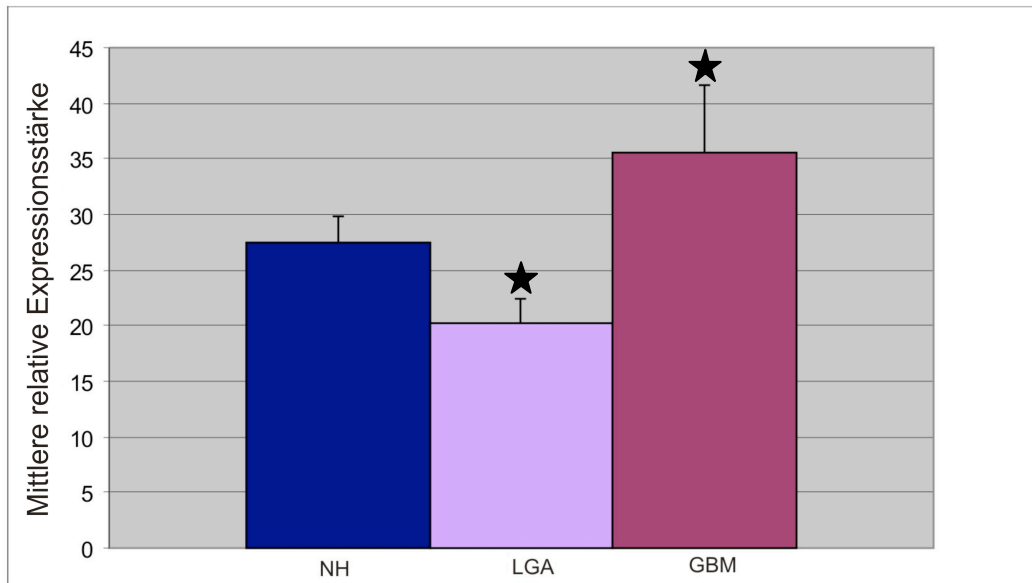


Abb. 16

Mittlere relative Expression von PA28 γ mRNA

Mittels BioDoc Analyse (Biometra, Göttingen) wurde die Intensität der einzelnen Banden aus der semiquantitativen PCR (Abb. 15) bestimmt und statistisch analysiert.

Die Expression von PA28 γ war im t-Test bei unterschiedlichen Varianzen sowohl in niedriggradigen Astrozytomen als auch in den Glioblastomproben nicht signifikant verändert zu den Normalhirnproben. Das Expressionsniveau der Astrozytomproben war jedoch signifikant niedriger als das der Glioblastomproben. ($p < 0,05$)

Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

Abkürzungen: NH: Normalhirn; LGA: Astrozytom WHO Grad II;
GBM: Glioblastoma multiforme WHO Grad IV

★ : Signifikante Änderung der Expressionsstärke (t-Test bei unterschiedlichen Varianzen),

Auch eine Boxplotanalyse zur relativen Expressionstärke bestätigte obigen Befund (Abb. 17).

Wie an den Whiskers (vertikale Linien ober- und unterhalb der Boxen) ersichtlich, gab es bei den Glioblastomen eine breite Streuung der PA28 γ mRNA Expressionsintensität.

Jedoch lagen die Ausreißer innerhalb eines Bereiches von 3x Interquartilenabstand (IQR, bedeutet Länge der Box) und konnten somit als „mild“ klassifiziert werden.

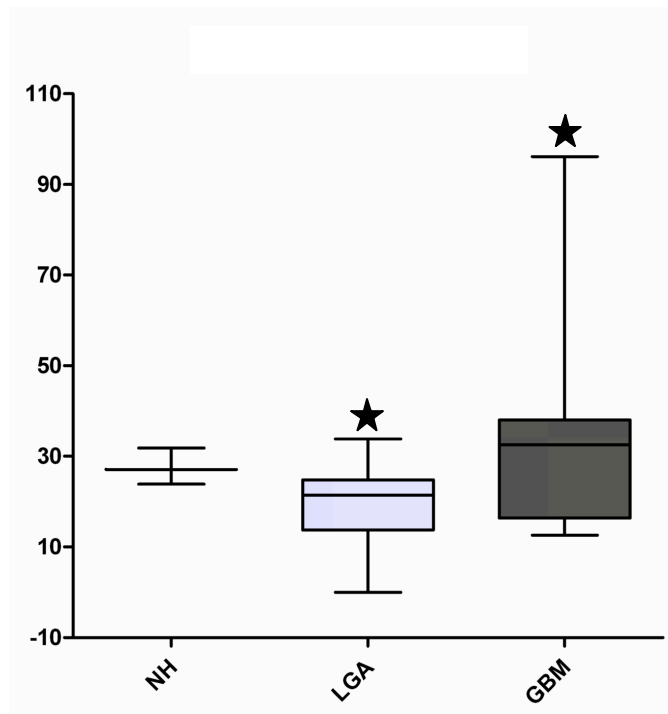


Abb. 17

Boxplotanalyse zur relativen Expressionstärke von PA28 γ mRNA aus der semiquantitativen RT-PCR (Abb. 15)

Die Expressionstärke in den verglichenen Proben zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Astrozytomen WHO Grad II und den Glioblastomen. Im Vergleich Tumorproben zu Normalhirn war jedoch keine Signifikanz bzgl. der Expressionsniveau-Differenz zu sehen.

Bei den Glioblastomen fiel eine breite Streuung auf. Jedoch lagen die Ausreißer innerhalb des Bereiches von 3x Interquartilenabstand (IQR) und konnten somit als „mild“ klassifiziert werden.

Abkürzungen: NH: Normalhirn; LGA: Astrozytom WHO Grad II;

GBM: Glioblastoma multiforme WHO Grad IV

★ : signifikante Änderung des Expressionsniveaus im t-Test bei unterschiedlichen Varianzen ($p < 0,05$)

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass PA28 γ mRNA sowohl von normalen Gehirnzellen, als auch von entartetem Gewebe unabhängig von der WHO Gradierung exprimiert wurde. Das Expressionsniveau zeigte zwar einen signifikanten Unterschied zwischen untersuchten Astrozytom- und Glioblastomproben, jedoch war die Expressionstärke beider Tumorarten nicht signifikant verändert im Vergleich zum Normalhirngewebe. Auf Grund der semiquantitativen Natur dieser Analyse können nur Tendenzen und keine absoluten Zahlen angegeben werden.

3.3 Proliferationsassay

Trotz der gleichmäßigen PA28 γ mRNA Expression im Vergleich von Tumorproben zu Normalhirngewebe war nicht auszuschließen, dass das Protein die Proliferation von GBM Zellen beeinflusst. Okamura et al. hatten so einen Zusammenhang von Proliferationsrate und PA28 γ Proteinexpression für Neoplasmen der Schilddrüse diskutiert (Okamura et al., 2005).

Es wurde untersucht, ob eine PA28 γ -Überexpression ähnliche Effekte in Glioblastomzelllinien hervorrufen kann. Dazu wurde ein Proliferationsassay mit der GBM-Zelllinie U251 durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem Plasmid pCMV5-Tag3A-PA28 γ transfiziert, welches eine Flag-Markierung zur besseren Antikörperdetektion enthält. Als Gegenkontrolle dienten Leervektor-transfizierte Zellen, die unter ansonsten identischen Bedingungen kultiviert und analysiert wurden. Proliferationsgeschwindigkeit und Signifikanz wurden in Bezug auf die ermittelten Werte von Tag 1 bestimmt und über einen Zeitraum von 6 Tagen beobachtet.

Pro Tag und Transfektionsvektor wurden 2 - 3 Messwerte genommen. An Tag 6 konnte für die Leervektor-transfizierten Zellen nur noch ein Wert bestimmt werden, da am Transfektionstag nicht mehr genügend Zellen für eine zweite Schale für Messtag 6 vorhanden waren. In den ersten 24 Stunden nach Transfektion wurde ein vermehrtes Absterben der Zellen beobachtet.

Ob die Transfektion erfolgreich war, wurde im Western Blot mittels Anti-Flag-Primärantikörper überprüft (Abb. 18). Bereits an Tag 2 konnte eine deutliche PA28 γ Protein-Expression beobachtet werden, die an Tag 4 und 5 ihren Höhepunkt erreichte und dann wieder abfiel.

Vor der Lyse der Zellen wurde die Zellanzahl mit der Fuchs-Rosenthalkammer bestimmt. Für den Western Blot wurde jeweils gleiche Zellzahl pro Tag lysiert, so dass die Gesamtproteinmengen pro Tag vergleichbar waren.

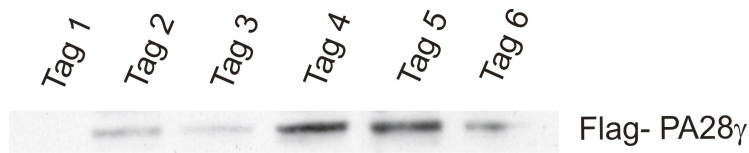


Abb. 18

Western Blot Nachweis der transienten PA28 γ Expression

Die PA28 γ Expression nahm ab Tag 2 zu, erreichte an Tag 4 und 5 ihren Höhepunkt, um danach wieder abzusinken. Um eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Tage zu gewährleisten, wurde für den Western Blot jeweils die gleiche Zellzahl pro Tag lysiert.

Innerhalb der ersten 24 h nach der Transfektion war ein gesteigertes Absterben PA28 γ transfizierterter Zellen im Vergleich zur Leervektorkontrolle zu erkennen. Im Vergleich zu Leervektor-transfizierten Zellen war eine tendentielle, allerdings nicht signifikante Verlangsamung der Proliferation PA28 γ überexprimierender Zellen zu beobachten. An Tag 4, dem Tag mit der höchsten PA28 γ Proteinexpression stagnierte die Zellvermehrung im Vergleich zum Vortag sogar, während die Zellzahl der leervektortransfizierten Zellen weiter zunahm (Abb. 19). Diese Daten könnten darauf hindeuten, dass PA28 γ in astrozytären Tumorzellen einen inhibierenden Effekt auf die Proliferation innehat.

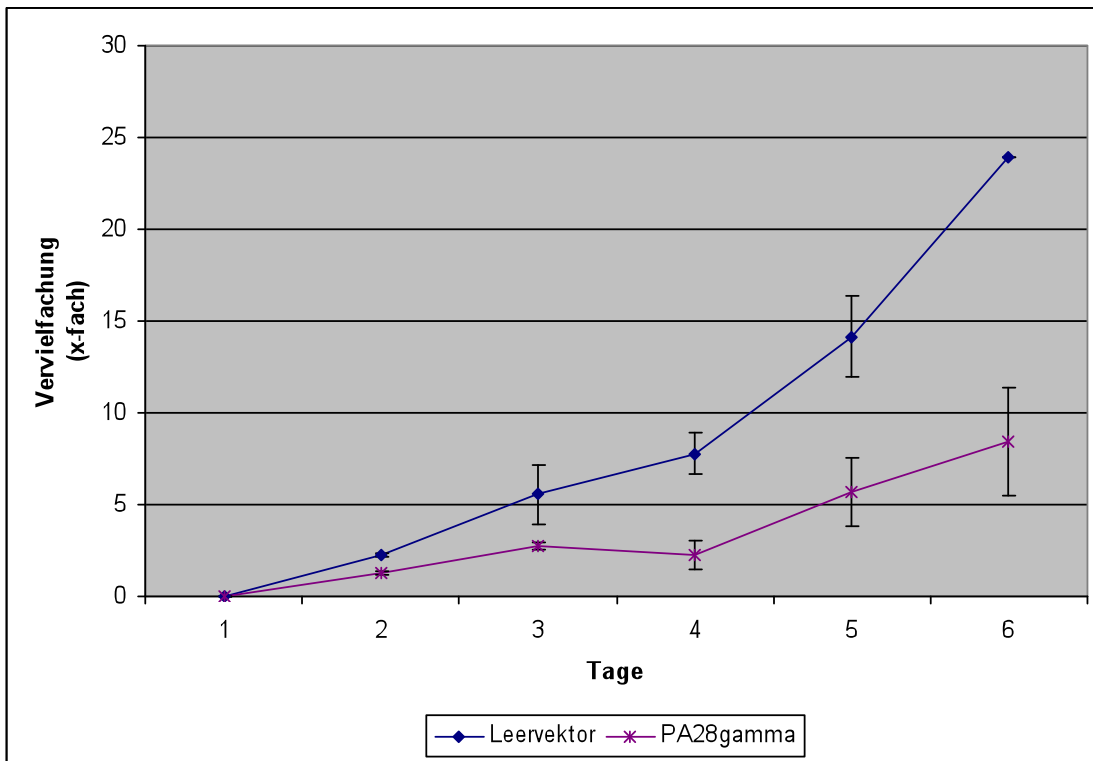


Abb. 19

Vergleich der Proliferationsgeschwindigkeit von Leervektor- und PA28 γ -transfizierten Zellen

Der Proliferationsassay wurde mit der Zelllinie U251 durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem Plasmid pCMV5-Tag3A-PA28 γ transfiziert. Als Gegenkontrolle dienen Leervektor-transfizierte Zellen unter gleichen Bedingungen (pCMV5-Tag3A). Pro Tag und Transfektionsvektor wurden 2-3 Messwerte genommen (Ausnahme Tag 6 mit 1 Messwert für den Leervektor).

Es zeigte sich eine nicht signifikante tendentielle Verlangsamung des Wachstums nach PA28 γ -Überexpression.

Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

3.4 Hefe Two-Hybrid Screen mit PA28 γ

Regulation und Funktion von PA28 γ sind bisher nur unzureichend geklärt (Rechsteiner und Hill, 2005). Die Identifikation neuer Interaktionspartner könnte hier neue Hinweise liefern. Daher wurde ein Hefe Two-Hybrid Screen mit pPC97-PA28 γ als Sonde und einer PC12 cDNA-Bibliothek (Kalmes et al., 1998) durchgeführt. HF7c Hefezellen wurden mit beiden Plasmiden transformiert. Die Transformationseffizienz betrug $11,52 \times 10^6$ bei $8,5 \times 10^6$ unabhängigen cDNA Klonen in der Bibliothek. Das bedeutet, dass die gesamte Bibliothek durch den Screen abgedeckt wurde. 492 Klone waren Histidin-positiv und 43 davon zeigten sich auch im β -Galactosidase-Assay positiv. Von den 43 β -Galactosidase-positiven Klonen erwiesen sich in nachfolgenden Untersuchungen 19 Klone als falsch positiv, 22 repräsentierten PA28 γ und 5 stellten bisher unbekannte Interaktionspartner von PA28 γ dar. Durch Sequenzierung der im Screen gefischten cDNA-Fragmente konnten die folgenden Proteine mittels der NCBI-Datenbank identifiziert werden, wobei sich die initial genannten Werte auf das jeweilige Protein in der Ratte beziehen:

1A6/DRIM interacting protein (KIAA 0649) besteht aus 1165 Aminosäuren (AS) (Mensch: 1209 AS). Im Screen wurden die Aminosäuren 654 – 742 (712 – 784 beim humanen Ortholog) gefischt. In diesem Bereich findet sich keine bekannte Domäne.

Homeodomain interacting protein kinase 1 (HIPK1; KIAA 0630) ist eine Serin/Threonin Proteinkinase. Die Kinase-Domäne befindet sich zwischen Aminosäure 190 und 431 des 1166 Aminosäuren großen Proteins. Das im Two-Hybrid Screen mit PA28 γ gefischte Fragment erstreckte sich von AS 801 bis 986, lag also außerhalb der katalytischen Domäne im regulatorischen Bereich von HIPK1.

Catenin α (Cadherin-assoziiertes Protein) ist 908 AS groß. Aminosäure 326 bis 360 repräsentieren den PA28 γ interagierenden Klon und liegen damit innerhalb der Vinculin-Domäne des Proteins, die sich von AS 19 bis 870 erstreckt.

CAATT/enhancer binding protein β (C/EBP β) ist 269 AS groß. AS 1 bis 113 repräsentieren den PA28 γ interagierenden Klon. Die Domäne des basic region leucin zipper (bZIP2) liegt im Bereich AS 222-274, deckt sich somit nicht mit dem Interaktionsbereich von C/EBP β mit PA28 γ .

Das Ubiquitin konjugierende Enzym (Ubc9) ist 158 Aminosäuren groß, von denen die ersten 84 AS die Interaktionsdomäne mit PA28 γ darstellen. Die katalytische Domäne (UbcC) liegt auf AS-Position 7-139. Der mit PA28 γ gefischte Bereich deckt die katalytische Domäne zu etwa 2 Dritteln.



1A6/DRIM interacting protein (KIAA 0649)

Accession-Nummer: XM_341392
 Übereinstimmung mit Datenbank (NCBI): 100%
 1165 AS, Position 654-742 gefischter Klon (89 AS)



Homeodomain interacting protein kinase 1 (KIAA 0630)

Accession-Nummer: XM_345267
 Übereinstimmung mit Datenbank (NCBI): 98%
 1166 AS, Position 190 - 431 2PHK-Domäne, Position 801 - 986 gefischter Klon (186 AS)



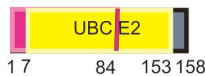
Catenin α (Cadherin-assoziiertes Protein)

Accession-Nummer: NM_001007145
 Übereinstimmung mit Datenbank (NCBI): 94%
 908 AS, Position 19 - 870 Vinculin-Domäne, Position 326 - 360 gefischter Klon (35 AS)



CAATT/enhancer binding protein β (C/EBP β)

Accession-Nummer: NM_024125
 Übereinstimmung mit Datenbank (NCBI): 92%
 296 AS, Position 1-113 gefischter Klon, Position 222-274 bZIP-Domäne



Ubiquitin konjugierendes Enzym (Ubc9)

Accession-Nummer: BC086592
 Übereinstimmung mit Datenbank (NCBI): 100%
 158 AS, Position 1-84 gefischter Klon, Position 7 - 153 Ubc E2 Domäne

Abb. 20

Schematische Darstellung der Proteinsequenzen der neuen PA28 γ -Interaktionspartner aus dem Hefe Two-Hybrid Screen

- Protein in Gesamtlänge
- gefischter Abschnitt im jeweiligen Protein
- bekannte Domäne im Protein

Zahlen: 1./letzte Aminosäuren-Position des bezeichneten Bereichs im Protein;
 AS: Aminosäure; bZIP2: Basic Leucin-Zipper 2; UbcE2: Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2

4. DISKUSSION UND AUSBLICK

Die Standardtherapie von Glioblastomen besteht aus operativer Resektion des Tumors, gefolgt von Chemotherapie mit dem DNA-Alkylanz Temozolomid und begleitender γ -Bestrahlung (Stupp et al., 2005). Den beiden letzteren Therapiebestandteilen gilt als gemeinsamer Ansatz, dass sie DNA-Schäden setzen, die ein Absterben der Tumorzelle herbeiführen sollen. Allerdings wirken zelluläre DNA-Reparaturmechanismen diesem therapeutischen Ziel entgegen. So kann das Enzym M-Guanin Methyltransferase (MGMT) direkt die von Temozolomid induzierten DNA-Addukte wieder entfernen. Patienten, die auf Grund einer Methylierung des MGMT-Promotors weniger MGMT herstellen konnten, profitierten deutlich mehr von einer Behandlung mit Temozolomid, da die durch dieses DNA-Alkylanz hervorgerufenen DNA-Schäden weit weniger gut repariert werden konnten (Hegi et al., 2005). Auch werden die durch Bestrahlung hervorgerufenen DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche an DNA-Reparaturkontrollpunkten detektiert. Diese verschaffen der Zelle durch einen Zellzyklusarrest Zeit, mit Hilfe von Rekombinationsvorgängen auch diese Defekte wieder zu entfernen (Ashwell und Zabludoff, 2008).

Vor kurzem konnte das Tumorbiologische Labor der neurochirurgischen Klinik der Universitätsklinik Würzburg zeigen, dass Mad2b – welches ursprünglich als Komponente des mitotischen Spindelkontrollpunktes identifiziert worden war – auch eine Funktion im Reparaturkontrollpunkt nach DNA-Schäden hat (Rabea et al., eingereicht). Werden solche Schäden z.B. durch Cisplatin, UV B-Bestrahlung oder Aphidicolin erzeugt, so interagiert Mad2b mit Cdc20 (Rabea et al., eingereicht). Eine solche Wechselwirkung inhibiert APC/C und ruft dadurch einen G2/M Zellzyklusarrest hervor (Pfleger et al., 2001; Chen und Fang, 2002). Ein Ausschalten von Mad2b durch spezifische siRNAs führte zu einem vermehrten Auftreten von Spindel- und Zellkerndefekten nach DNA-Schädigung (Rabea et al., eingereicht). Das Vorhandensein von Mad2b ist also wichtig zur Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität einer Zelle, die bereits in niedergradigen Astrozytomen erheblich gestört ist (Reifenberger und Collins, 2004).

Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Mad2b Proteinexpression in höhergradigen Gliomen reduziert ist (Rabea et al., eingereicht).

Mit Hilfe eines Hefe Two-Hybrid Screens wurde in Vorarbeiten der Proteasomenaktivator PA28 γ als neuer Interaktionspartner von Mad2b identifiziert (Hagemann et al., unveröffentlichte Daten). Interessanterweise wurde vor kurzem gezeigt, dass die Überexpression einer dominant-negativen PA28 γ Mutante in Zellen Spindel- und Zellkerndefekte hervorruft (Zannini et al., 2008), die denen in Mad2b depletierten Zellen ähneln (Rabea et al., eingereicht). Diese Befunde könnten auf einen funktionellen Zusammenhang während der DNA-Schadensdetektion und –Reparatur hindeuten. Gestützt wird diese Annahme dadurch, dass PA28 $\gamma^{-/-}$ Fibroblasten einen höheren Anteil an Zellen in der G1 Phase aufweisen, die nicht in die S-Phase eintreten konnten (Murata et al., 1999). In dieser Arbeit sollten nun weitere Hinweise bezüglich der Funktion von PA28 γ gefunden werden. Zunächst wurde die Interaktion von Mad2b und PA28 γ mit Hilfe eines GST-Pulldown-Versuches verifiziert. Daran schlossen sich Untersuchungen zur PA28 γ mRNA Expression in humanen Gliomproben an und es wurde untersucht, inwieweit PA28 γ Einfluss auf die Proliferation von Glioblastomzellen nimmt. Schließlich wurde ein Hefe Two-Hybrid Screen mit PA28 γ durchgeführt, um neue Interaktionspartner aufzufinden, die auf die Funktion von PA28 γ in der Zellzykluskontrolle hinweisen.

4.1 PA28 γ interagiert mit Mad2b

Mit Hilfe der Glioblastomzelllinie GaMG, mit der die beste PA28 γ Überexpression gelang, konnte die Interaktion von PA28 γ und Mad2b *in vitro* bestätigt werden. Diese Zelllinie wurde auch gewählt, weil sie eine hohe endogene Mad2b Expression aufweist, so dass dieses Protein nicht überexprimiert werden musste. Eine *in vivo* Bestätigung der Wechselwirkung z.B. durch Co-Immunoprecipitationsexperimente steht noch aus. Eine Versuchsreihe mit diesem Ziel ist jedoch aktuell in Arbeit. Auch wenn dieses *in vivo* Ergebnis noch fehlt, so bestätigte der GST-Pulldown doch die Two-Hybrid Daten und zeigte zum ersten Mal einen funktionellen Zusammenhang zwischen Mad2b und PA28 γ . Die physiologische Relevanz dieser Interaktion ist noch ungeklärt. Sowohl bei Ausschalten

der Mad2b-Funktion als auch der PA28 γ -Wirkung treten Zellzyklusdefekte auf (Rabea et al., eingereicht; Zannini et al., 2008). Daher liegt eine Funktion während des DNA-Reparaturkontrollpunktes in der Mitosephase nahe. So zeigen PA28 γ Mangelzellen überzählige Zentrosomen, welche zu multipolaren Spindeln führen (Zannini et al., 2008). Gestützt wird diese Annahme durch den von PA28 γ vermittelten, Ubiquitin-unabhängigen Abbau von p21, einem Zyklin-abhängigen Kinaseinhibitor, der in die Signalgebung bei der DNA-Schadenskontrolle eingebunden ist (Chen et al., 2007).

Die Induktion der p21 Expression führt zu einem Zellzyklusarrest, während eine transkriptionelle Hemmung verschiedene Effekte hat (Gartel und Radhakrishnan, 2005). Während PA28 γ als Proteasomenaktivator den Ubiquitin-unabhängigen Abbau von p21 beeinflusst, zeigt der 19S Aktivator (PA700) nur einen geringen Einfluss auf die Abbaugeschwindigkeit von p21. Somit handelt es sich um eine spezifische Einflussnahme von PA28 γ auf den p21-Spiegel und nicht um einen unspezifischen Abbau durch das Proteasom (Chen et al., 2007).

Es ist daher denkbar, dass Mad2b mittels Interaktion mit PA28 γ über proteasomalen Abbau reguliert wird. Andererseits ist aber auch eine Regulation der PA28 γ Aktivität durch Mad2b vorstellbar. Untersuchungen zur Klärung dieser Frage stehen noch aus.

4.2 Nachweis der PA28 γ Expression in humanem Astrozytom-Gewebe

Von Mad2b konnte gezeigt werden, dass dessen mRNA Konzentration mit steigendem Malignitätsgrad des Glioms korreliert, während sich die Proteinkonzentration verringert (Rabea et al., eingereicht). Zhang et al. konnten nachweisen, dass in Zellen mit verminderter Mad2b-Konzentration die DNA-Reparatur nach der Replikation abgeschwächt ist (Zhang et al., 2007). Hier sollte nun festgestellt werden, ob vergleichbare Expressionsänderungen auch bei PA28 γ nachweisbar sind. PA28 γ ist allgemein im Hirngewebe deutlich exprimiert (Rechsteiner und Hill, 2005). Schilddrüsentumore zeigen mit steigender Malignität auch eine vermehrte PA28 γ Expression, wobei diese erhöhte

Expression sich auf stark proliferierende Bereiche konzentriert und zwar um so mehr, je höher die Proliferationsrate ist (Okamura et al., 2005). Da auch höhergradige Astrozytome für ihre hohe Proliferationsrate bekannt sind und die Teilungsrate mit zunehmendem Malignitätsgrad ansteigt (Reifenberger und Collins, 2004), war in dieser Arbeit die PA28 γ Expression von besonderem Interesse. Bei der Untersuchung von 15 Astrozytomen WHO-Grad II und 15 Glioblastomen konnte auf mRNA Ebene eine gleichmäßige Expression nachgewiesen werden. Es ergaben sich keine signifikanten Veränderungen der PA28 γ mRNA Expression zwischen den Tumorgaden bzw. im Vergleich zum Normalhirngewebe. Jedoch konnte nachgewiesen werden, dass die PA28 γ -mRNA-Expression im Glioblastom WHO Grad IV signifikant höher ist als im Astrozytom WHO Grad II.

Okamura zeigte einen deutlichen Anstieg der PA28 γ -Expression mit steigender Malignität im Schilddrüsentumor (Okamura et al., 2005). In dieser Arbeit wurde zunächst ein nicht signifikanter Abfall der PA28 γ -Expression vom Normalhirngewebe zum Astrozytom WHO Grad II gezeigt. Schließt man aus Okamuras Ergebnissen auf einen proliferativen Effekt von PA28 γ , könnte hier eine Gegenregulation der Zelle eingetreten sein, um eine stärkeren Kontrolle von Zellzyklus und Proliferation zu erreichen. Dies ist ein natürlicher Anti-Tumor-Mechanismus der Zelle und des Körpers (Kumar et al., 2003).

Im Glioblastom WHO Grad IV steigt die Expression von PA28 γ im Vergleich zum Astrozytom WHO Grad II signifikant an (t-Test bei unterschiedlichen Varianzen, $p < 0,05$). Dies könnte zum Beispiel durch weitere Mutationen verursacht werden, die zu einer Deregulation von Zellzyklus und Proliferation führen. Gleichzeitig würde auch die Expression von mRNA und in Folge dessen von Proteinen wieder zunehmen, welche zuvor reprimiert waren.

Insgesamt beschränkten sich die Untersuchungen dieser Arbeit auf die mRNA Expression von PA28 γ . Die Proteinkonzentration konnte bisher in Western-Blots leider nicht zuverlässig gemessen werden. mRNA- und Proteinkonzentrationen müssen aber nicht unbedingt korrelieren (Rabea et al., eingereicht). Daher wäre eine Proteinbestimmung sehr wichtig, um die Frage zu beantworten, ob sich die PA28 γ Proteinexpression in astrozytären Tumoren vergleichbar zur Expression in Schilddrüsentumoren verhält.

Zusätzlich konnte Okamura deutliche Schwankungen der PA28 γ Expression auch innerhalb des Tumorgewebes feststellen (Okamura et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur die durchschnittliche PA28 γ mRNA Expression von Tumorproben ausgewertet, nicht die Konzentrationen in unterschiedlichen Regionen desselben Tumors, so dass Konzentrationschwankungen innerhalb des Tumors in dieser Untersuchung nicht erfasst und somit auch nicht ausgeschlossen werden können.

4.3 Proliferationsassay

Das Glioblastoma multiforme WHO Grad IV zeichnet sich unter anderem durch starke Proliferation aus. Verschiedene Befunde weisen auf eine Einflussnahme von PA28 γ auf die Zellteilungsrate hin:

In Schilddrüsentumoren wird PA28 γ vorwiegend in proliferierenden Zellen überexprimiert (Okamura et al., 2005). Der Steroid Receptor Coactivator 3 (SRC-3), der die (Estradiol-abhängige) Zellteilung reguliert, PA28 γ -abhängig degradiert (Li et al., 2006).

PA28 γ -defiziente Mäuse waren zwar gesund, wuchsen aber deutlich verlangsamt (Murata et al., 1999).

Nach Zusammenfassung der aufgeführten Daten wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Proliferationsassay mit der GBM Zelllinie U251 durchgeführt, um den Einfluss von PA28 γ auf die Proliferationsrate in einer Glioblastomzelllinie zu testen. Entgegen der Erwartung ließ sich eine nicht signifikante tendentielle Verlangsamung der Zellteilung nach PA28 γ Überexpression feststellen. Parallel dazu wurde ein vermehrtes Absterben der Zellen unter PA28 γ Überexpression beobachtet. Im Vergleich zu den mit Leervektor transfizierten Zellen starben innerhalb von 24 h nach der Transfektion vermehrt PA28 γ überexprimierende Zellen ab (Daten nicht gezeigt). Diese Befunde widersprechen Ergebnissen von Zhang et al. (2008), die eine Förderung des Abbaus des Tumorsuppressor-Proteins p53 durch Zusammenwirken von MDM2 und PA28 γ und eine daraus resultierende Apoptosehemmung diskutieren.

p53 ist im GBM häufig mutiert. Neben Apoptose-Induktion bewirkt p53 eine Proliferationshemmung. Es ist zentrale Steuerstelle für stressinduzierte Signalkaskaden, die zu einem Zellzyklusarrest oder direkt zur Apoptose führen. So wird p53 zum Beispiel bei irreparablen DNA-Schäden aktiviert (Kumar et al., 2003).

Der Widerspruch zwischen den Beobachtungen in dieser Arbeit und den Ergebnissen der zitierten Veröffentlichungen könnte durch unterschiedliche Funktionen von PA28 γ in verschiedenen Zelllinien bedingt sein, oder aber auch durch zelltypspezifische Interaktionspartner.

Eine andere Arbeitsgruppe stellte fest, dass PA28 γ -Inaktivierung zu einer erhöhten Aktivität von p53 führt und dadurch die Apoptoserate steigert (Zhang, Zhang, 2008). Dass es sich bei dem in dieser Arbeit beobachteten Zelltod um Apoptose von PA28 γ überexprimierenden Zellen handelt, konnte in einer weiterführenden Arbeit bestätigt werden (Glorius, 2008). PA28 γ -transfizierte COS-7 Zellen wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung und Western Blot auf aktivierte Caspase-3 untersucht. Caspasen stellen eine Familie von Cystein-Proteasen dar, die Proteinketten spezifisch hinter einem Aspartatrest spalten (Cohen, 1977). Sie sind die hauptsächlichen Effektormoleküle beim programmierten Zelltod. Caspase-3 ist das Schlüsselenzym in der Signaltransduktion der Apoptose. Dieses Enzym liegt in der inaktivierten Form als Procaspase-3 mit einem Molekulargewicht von 32 kDa vor. In apoptotischen Zellen wird es in zwei Fragmente von 17 und 19 kDa gespalten (Fernandes-Alnemri et al., 1994). Da die Gegenwart aktivierter Caspase-3 als spezifisch für apoptotische Zellen angesehen wird, eignet sich ihre Detektion hervorragend für den Nachweis apoptotischer Zellen.

In PA28 γ -überexprimierenden Zellen konnte ein signifikant erhöhter Caspase-3-Spiegel im Vergleich zu Leervektor-transfizierten Zellen gemessen werden. Somit wurde nachgewiesen, dass in diesen Zellen vermehrt Apoptose induziert wurde (Glorius, 2008). Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit zwar kein Einfluss von PA28 γ -Überexpression auf die Zellproliferation gefunden werden, aber es ergaben sich erste Hinweise auf eine mögliche Funktion von PA28 γ bei der Apoptoseregulation.

4.4 Hefe Two-Hybrid Screen mit PA28 γ

Trotz eindeutiger Hinweise auf eine Funktion von PA28 γ in der Regulation von Apoptose und DNA-Schadenskontrolle, sind der genaue Signalweg und die Regulationsmechanismen dieser Funktionen noch nicht bekannt.

Weitere Hilfe zur Klärung dieser Mechanismen könnten Interaktionspartner geben. Daher wurde ein Hefe Two-Hybrid Screen durchgeführt. Dieses System ermöglicht die Detektion von Protein-Protein Interaktionen. Hierfür werden beide zu untersuchenden Proteine gleichzeitig im Zellkern von Hefezellen über Plasmide zur Expression gebracht. Da die Interaktion im Zellkern der Hefe stattfindet, können falsch positive Ergebnisse erhalten werden. Es ist daher unabdingbar, die festgestellte Interaktion mit Hilfe alternativer Methoden wie z.B. GST-Pulldown Assay oder Co-Immunopräzipitation zu bestätigen (Toby und Golemis, 2001).

Der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Screen zeigte eine sehr hohe Transformations-effizienz. Die analysierte PC12 cDNA Bibliothek umfasst $8,5 \times 10^6$ Klone (Kalmes et al., 1998) im Screen konnten $11,52 \times 10^6$ Klone abgedeckt werden, so dass die gesamte cDNA Bibliothek getestet wurde. PA28 γ kann mit sich selbst interagieren. Wie erwartet, wurden mehrere sequenzierte Interaktionspartner als PA28 γ bestätigt.

Zusätzlich konnten fünf neue Interaktionspartner identifiziert werden: Ubiquitin-konjugierendes Enzym 9 (Ubc9), Homeodomain interacting protein kinase 1 (HIPK1), 1A6/DRIM-Interacting protein, Catenin α und CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBP β).

4.4.1 Ubiquitin-konjugierendes Enzym 9 (Ubc9)

Ubiquitin konjugierendes Enzym 9 (Ubc9) ist das einzige bekannte SUMO E2-konjugierende Enzym (Desterro et al., 1997) und sorgt gemeinsam mit E3-Ligasen für die Bindung von small ubiquitin related modifier (SUMO) an das Zielprotein (Anckar und Sistomen, 2007). Der Vorgang der Sumoylierung ist ähnlich einer Ubiquitinierung. SUMO

wird wie Ubiquitin an spezielle Lysin-Reste des Zielproteins reversibel gebunden. Allerdings führt es nicht wie Ubiquitin zum Abbau der Zielproteine, sondern kann vielmehr den Abbau hemmen, indem es eine Ubiquitinierung durch Blockierung der Ubiquitin-Bindestellen unterbindet (Anckar und Sistonen, 2007). Ähnlich wie eine Ubiquitinierung kann die posttranslationale Modifikation von Proteinen durch SUMO die zelluläre Lokalisation und Aktivität eines Zielproteins regulieren (Nowak und Hammerschmidt, 2006). Zusätzlich sorgt Sumoylierung für Substratspezifität (Karamouzis et al., 2008). Dadurch können Zellprozesse wie Transkription, DNA-Reparatur oder Zellzyklusprogression beeinflusst werden (Gill, 2004). Desweiteren ist SUMO an Vorgängen der Signaltransduktion beteiligt (Desterro et al., 1998) und spielt eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Integrität des Genoms (Anckar und Sistonen, 2007). *In silico* Analysen identifizierten Sumoylierungsstellen innerhalb von PA28 γ (Weigel, 2007), der im Two-Hybrid Screen gefundene Interaktionsbereich deckt die Ubc9 katalytische Domäne fast vollständig ab und in einem *in vitro* Sumoylierungsassay konnte tatsächlich eine PA28 γ Sumoylierung durch Ubc9 nachgewiesen werden (Glorius, 2008). Dieser funktionelle Zusammenhang liefert einen indirekten Beweis für die Interaktion von PA28 γ und Ubc9. Zusätzlich ist bekannt, dass Ubc9 unter anderem, wie auch PA28 γ , im Zellkern zu finden ist (Nowak und Hammerschmidt, 2006). Der Effekt der Sumoylierung auf die PA28 γ Funktion bleibt spekulativ. Es konnte allerdings eine Verbindung von Ubc9 und der Zellzyklusprogression im Kontext mit der Sumoylierung von Zellzyklusproteinen gezeigt werden (Seufert et al., 1995). Die Ubc9 Aktivität hat auch Einfluss auf die korrekte Chromosomenverteilung während der Mitose (Al-Khodairy et al., 1995). Ein solcher Einfluss konnte ebenfalls für Mad2b (Rabea et al., eingereicht) und PA28 γ gezeigt werden (Zannini et al., 2008). Zusätzlich interagiert PA28 γ mit der SUMO E3-Ligase protein inhibitor of activated Stat1 (PIAS1) (Murata et al., 1999), die auch als Apoptoseregulator fungiert. Neben der Funktion von PA28 γ bei der DNA-Schadenskontrolle ist dies ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Rolle von PA28 γ in der Apoptoseregulation.

4.4.2 Homeodomain interacting protein kinase 1 (HIPK1)

HIPK1, HIPK2 und HIPK3 bilden eine nukleäre Serin/Threoninkinasefamilie (Kim et al., 1998). Allen dreien wird eine wichtige Rolle bei der Regulation der Transkription zugeschrieben (Ecsedy et al., 2003). Eine Funktion von HIPK1 ist die Serin-Phosphorylierung des Tumorsuppressorproteins p53 (Kondo et al., 2003). p53 wird auch durch PA28 γ reguliert (Zhang und Zhang, 2008) und spielt eine Rolle in der Apoptoseregulation (Pietsch et al., 2008). Zusätzlich hat p53 eine Funktion in der DNA-Schadenserkennung, vor allem im Rahmen des DNA-Reparaturkontrollpunkts (Alberts et al., 2002).

HIPK1 und PA28 γ teilen sich noch weitere Interaktionspartner. So bindet HIPK1 über die gleiche Bindungsdomäne sowohl p53 als auch Ubc9 (Johnson et al., 1997). In dieser Arbeit wurden HIPK1 und Ubc9 erstmals als Interaktionspartner von PA28 γ nachgewiesen. Zusätzlich wird HIPK1 über Sumoylierung reguliert, was wiederum eine Verbindung zu Ubc9 und PA28 γ darstellt. Der Tumornekrosefaktor α (TNF- α) fördert die Desumoylierung von HIPK1 und induziert Apoptose über die Aktivierung der ASK1-JNK Kaskade (Li et al., 2008).

Daxx ist ein weiterer gemeinsamer Interaktionspartner. Es wurde als direkter Interaktionspartner von PA28 γ in einem Hefe Two-Hybrid Screen in HeLa Zellen gefunden (Rechsteiner und Hill, 2005). Die physiologische Rolle von Daxx wird kontrovers diskutiert. Daten weisen sowohl auf eine pro- als auch auf eine kontra-apoptische Funktion hin.

Daxx-Mangel-Zellen sind deutlich empfindlicher gegenüber Apoptose-auslösenden Agentien. Ebenso kommt es zu vermehrter Expression von pro-apoptotisch wirkenden Caspasen. Die Expression von Daxx scheint somit, zumindest in HeLa-Zellen, anti-apoptotische Effekte zu haben (Chen und Chen, 2003).

Andererseits konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Daxx Zellen mittels Fas-Signalweg für Apoptose sensitiviert (Torii et al., 1999). Zum Beispiel wird unter oxidativem Stress in HeLa-Zellen die Apoptoserate durch erhöhte Daxx-Expression gesteigert (Kim et al., 2005).

Zusätzlich werden HIPK1 und Daxx Funktionen in der Transkriptionsregulation zugeschrieben. Aktiviertes HIPK1 phosphoryliert Daxx und steuert dadurch seine Aktivität als Transkriptionsrepressor bestimmter Tumorsuppressorgene wie PML (promyelozytisches Leukämie-Protein) (Ecsedy et al., 2003).

PML bildet mit anderen Proteinen sogenannte PODs (PML Onkogen-Domänen). Ein möglicher Interaktionspartner von PML ist Daxx (Ecsedy et al., 2003). Diese Verbindung in PODs führt zu Apoptose. (Zhong et al., 2000).

HIPK1 wiederum beeinflusst einerseits die subnukleäre Daxx-Lokalisation und andererseits die Bildung von PODs durch PML und Daxx (Ecsedy et al., 2003).

Hier spielt Sumoylierung eine wichtige Rolle. Sumoylierung von Transkriptionsfaktoren führt zu Rekrutierung von Daxx und dieses folgend zu einer Transkriptionshemmung. Wird allerdings PML sumoyliert, löst sich Daxx von den Transkriptionsfaktoren und bildet durch Bindung an PML PODs (Shih et al., 2007). Hierdurch wird, wie oben erwähnt, Apoptose induziert.

Es ist bekannt, dass auch p53 durch Daxx gehemmt werden kann und diese Inhibition gleichzeitig mit der p53-induzierten Apoptose stattfindet. MDM2 scheint die Daxx-p53 Interaktion zu verstärken, wobei MDM2 p53 in seiner Aktivität hemmt (Zhao et al., 2004). Gleichzeitig ist ein PA28 γ -geförderter Abbau von p53 durch MDM2 bekannt (Zhang et al., 2008). Über HIPK1 als Interaktionspartner von PA28 γ und Daxx ergibt sich eine neue Schnittstelle bezüglich der Apoptose. Durch diese verschiedenen Interaktionen und gegenseitigen Regulationen wird die bereits mehrfach bedachte Möglichkeit einer Funktion von PA28 γ in der Apoptose stark unterstützt, da PA28 γ sowohl mit HIPK1, als auch mit Daxx, selbst Interaktionspartner von HIPK1, interagieren kann und zusätzlich ein Einfluss auf p53 besteht.

Der Interaktionsbereich von HIPK1 für PA28 γ liegt zwischen den Aminosäuren 801 und 986 und somit außerhalb der Domäne der Serin/Threonin Protein Kinase 2 PHK (NCBI-Datenbank). Dies lässt viel Raum für Spekulation bezüglich der Interaktionsart. Folglich muss die Interaktionsdomäne von HIPK1 mit PA28 γ weiter eingegrenzt werden. Die PA28 γ -HIPK1 Interaktion ist nicht nur wegen der Rolle dieser Kinase in der

Apoptoseregulation von Bedeutung, sondern insbesondere auch, weil Beobachtungen an HIPK1-defizienten Mäusen darauf schließen lassen, dass HIPK1 das Fortschreiten maligner Prozesse hemmen kann (Li et al., 2008).

4.4.3 1A6/DRIM-interacting protein

Ein weiterer neu identifizierter Interaktionspartner von PA28 γ ist KIAA0649, welches auch als 1A6/DRIM-interacting (DRIM: downregulated in metastasis) protein bekannt ist. Es wird in hoher Konzentration im Hirngewebe gefunden (Yang et al., 2005). Der Interaktionsbereich von 1A6/DRIM-interacting protein für PA28 γ befindet sich zwischen den Aminosäuren 712-784 beim humanen Ortholog. Eine Domänenstruktur ist für dieses Protein noch unbekannt (Yang et al., 2005).

Diesem noch relativ wenig erforschten Protein werden onkogene Eigenschaften zugeschrieben. So konnte erhöhte Expression in Brustkrebsgewebe, in Magenkarzinomen und Ösophagustumoren nachgewiesen werden. Seine Rolle in der Tumorgenese ist allerdings noch nicht geklärt (Yang et al., 2005; Liu et al., 2003).

Als Interaktionspartner von PA28 γ ergibt sich nun ein Hinweis auf eine mögliche Rolle für die Tumorentstehung im Hirngewebe.

4.4.4 Catenin α

Als weiterer Interaktionspartner wurde cadherin associated protein (Catenin) α gefunden. Es dient der Vermittlung von Interzellulärkontakten sowie der Koordination der Aktin-Dynamik und dient als Bindeglied zwischen Zelladhäsion und Proliferation (Vasioukhin et al., 2001). Catenin α verfügt über eine Vinculin-Domäne. Diese sorgt zusammen mit E-Cadherin und anderen Bindungsproteinen für adherente Interzellulärverbindungen (Alberts et al., 2002). Zusätzlich scheint es Tumorsuppressoreigenschaften zu besitzen. Es gibt Hinweise, dass verschiedene Karzinome (Untersuchung vor allem im Bereich des Magen-

Darm-Trakts) deutlich vermindert Catenin α exprimieren und die betroffenen Zellen somit über E-Cadherin einen geschwächten Zell-Zell Kontakt haben (Shiozaki et al., 1994; Bullions et al., 1997). Dies ist besonders bei hochinvasiven Tumoren von Bedeutung. Da auch das Glioblastoma multiforme für seine starke Invasivität bekannt ist, könnte das Zusammenspiel von PA28 γ und Catenin α hier einen besonderen Stellenwert haben.

Invasive Tumoren durchbrechen auf verschiedene Weise den Interzellulärkontakt, so dass Tumorzellen in das umliegende Gewebe einwandern können. Durch Mutation von zum Beispiel E-Cadherin oder Catenin α geschwächte interzelluläre Kontakte führen zu besseren Wanderungsbedingungen für die Tumorzellen (Alberts et al., 2002). Daher ist Catenin α im Rahmen dieser Arbeit als Interaktionspartner von PA28 γ besonders interessant.

Der Interaktionsbereich für PA28 γ liegt genau in der Vinculin-Domäne. Hier kann spekuliert werden, inwieweit PA28 γ diese Domäne und somit die Interzellulärkontakte beeinflusst. Allerdings ist in diesem Zusammenhang die *in vivo* Bestätigung der Interaktion essentiell, da beide Proteine normalerweise in unterschiedlichen Zellkompartimenten vorkommen.

4.4.5 CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBP β)

Die C/EBPs sind eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die für die Zelldifferenzierung und –funktion in verschiedenen Geweben notwendig sind. Es gibt sechs verschiedene C/EBPs. Sie alle binden als Dimere an die DNA-Sequenz CCAAT im Promotor von C/EBP-regulierten Zielgenen und beeinflussen dadurch deren Transkription. Die Dimerbildung erfolgt mittels der bZIP-Domäne, im Falle von C/EBP β durch die bZIP2-Domäne. Diese Domäne liegt nicht im Bereich der PA28 γ -Bindestelle, so dass PA28 γ vermutlich keinen Einfluss auf die Dimer-Bildung hat (Lewin, 2002).

Der Zellkerntransfer von C/EBP β wird während Entzündungsreaktionen durch TNF α induziert (Descombes und Schibler, 1991). Außerdem ist C/EBP β an Proliferation und Zelldifferenzierung beteiligt. Eine C/EBP β -Defizienz führt zu Arrest in der G1/S Phase des Zellzyklus (Grimm et al., 2005).

C/EBP β wird durch die Bindung von SUMO-2 und SUMO-3 sumoyliert. Dadurch wird die transkriptionsaktivierende Funktion von C/EBP β unterdrückt. In Folge dessen kann z. B. der Cyclin-D Promoter nicht mehr durch C/EBP β aktiviert werden (Eaton et al., 2003). Cyclin-D wiederum steuert mit weiteren Cyclinen das Durchlaufen des Zellzyklus (Lewin, 2002). So könnte die Sumoylierung von C/EBP β in Zusammenhang mit dem oben erwähnten G1/S Phase Arrest in CEBP/ β defizienter Zellen stehen.

Zusätzlich konnte vor kurzem der Einfluss von C/EBP β auf die Expression des anti-apoptisch wirkenden Bcl-xl-Gens nachgewiesen werden (Connors et al., 2008).

Da die Erkenntnisse dieser Arbeit auf eine Rolle von PA28 γ in der Apoptose hinweisen, ist in diesem Zusammenhang auch ein Einfluss auf die Apoptose durch die Interaktion CEBP/ β -PA28 γ denkbar. So könnte eine PA28 γ abhängige, proteasomale Degradierung von CEBP/ β die Expression von Bcl-xl induzieren und in Folge dessen Apoptose hemmen. Gleichzeitig weisen oben genannte Ergebnisse auf Proliferationsregulation hin. Der detaillierte Einfluss von PA28 γ auf CEBP/ β ist jedoch in weiteren Versuchen zu klären.

4.5 Ausblick

Insgesamt konnten im Hefe Two-Hybrid Screen verschiedene Hinweise für eine Rolle von PA28 γ in der Apoptoseregulation gefunden werden. Zunächst ist hier die Interaktion mit Ubc9 zu nennen, das wie auch die E3-Ligase PIAS in Apoptosezusammenhang beschrieben wurde. PA28 γ steuert den Abbau von p53 und weist über die hier neu beschriebene Interaktion mit HIPK1 in die gleiche Richtung und auch die für PA28 γ und HIPK1 gemeinsam beschriebene Interaktion mit Daxx hat eine apoptotische Funktion. In einem

Proliferationsassay konnte zwar keine signifikante Änderung der Zellteilungsgeschwindigkeit beobachtet werden, doch zeigten sich in den ersten Tagen deutlich vermehrt abgestorbene Zellen in den PA28 γ überexprimierenden Ansätzen. Dass es sich hierbei tatsächlich um Apoptose handelte, konnte später verifiziert werden (Glorius, 2008).

Die Interaktion von Ubc9 mit PA28 γ war ein erster Hinweis für eine mögliche Sumoylierung von PA28 γ . *In silico* Analysen fanden Sumoylierungsstellen (Weigelin, 2008) und die Ubc9 vermittelte PA28 γ Sumoylierung wurde schließlich in einem *in vitro* Assay bestätigt. Da die PA28 γ mRNA Expression im Vergleich zum Normalhirn allerdings keine signifikanten Änderungen mit steigender WHO-Gradierung von malignen humanen Gliomen aufwies, könnte eine Regulation der PA28 γ Aktivität über eine z. B. stabilisierende Sumoylierung stattfinden.

Zusammengenommen weisen diese Befunde, wie auch die PA28 γ Interaktion mit 1A6/DRIM-interacting protein auf eine Rolle von PA28 γ bei der Tumorentstehung, Apoptoseregulation und im Zusammenhang mit Mad2b bei der DNA-Reparatur hin. Einen anderen Aspekt beleuchtet die Interaktion mit Catenin α . Hierüber könnte PA28 γ Einfluss auf Interzellulärkontakte nehmen. Gerade für Glioblastome mit ihrem ausgeprägten Migrations- und Invasionsverhalten könnte dieser Aspekt von besonderer Bedeutung sein. Allerdings muss hier Interaktion *in vivo* noch bestätigt werden.

Weitere offene Fragen sind:

- Ist auch die PA28 γ Proteinkonzentration in astrozytären Tumoren konstant?
- Wird PA28 γ Aktivität tatsächlich über Sumoylierung gesteuert? Spielt auch Phosphorylierung eine Rolle? Eine Interaktion von PA28 γ mit MEKK3, einer stressaktivierten Kinase, die bei der TNF-vermittelten NF κ B Aktivierung eine Rolle spielt, konnte bereits nachgewiesen werden (Hagemann et al., 2003).
- Wie wirken Mad2b und PA28 γ bei der DNA-Schadensdetektion und der Auslösung des G2/M Zellzyklusarrestes zusammen? Hierzu werden gerade Experimente angegangen, die nach Einsatz von DNA-schädigenden Mitteln wie Cisplatin oder γ -

Bestrahlung, Interaktion, Expressionsniveau und Aktivierungsstatus von Mad2b und PA28 γ analysieren.

Da chromosomale Instabilität eines der Hauptkennzeichen von Glioblastomen ist und die Therapie hauptsächlich auf die Auslösung von Apoptose in Tumorzellen auf Grund von induzierten DNA-Schäden abzielt, sind Mad2b und PA28 γ besonders lohnende Ausgangspunkte für die weitere Forschung. Sie regulieren DNA-Schadenserkenung und Apoptosereaktionen über verschiedene Interaktionspartner. Die Tumorzelle soll DNA-Schäden zwar detektieren, jedoch nicht reparieren, sondern die Apoptose auslösen. PA28 γ könnte hier ein zentraler Faktor sein, dessen Manipulation die etablierten Therapieformen unterstützen und deren Wirkung verbessern könnte.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Glioblastom ist der häufigste hirneigene Tumor des Erwachsenen. Es ist hoch invasiv, stark proliferierend und mit einer schlechten Prognose assoziiert. Heutige Therapieansätze zielen, neben der möglichst vollständigen Resektion des Tumorgewebes, vor allem auf Apoptoseinduktion durch DNA-Schäden in Tumorzellen. Daher ist die Aufklärung der molekularen Grundlagen dieser Prozesse essentiell, um Verbesserungen bei den Behandlungsmöglichkeiten erzielen zu können.

Der Proteasomenaktivator PA28 γ wird im Hirngewebe stark exprimiert, über seine Funktion ist jedoch nur wenig bekannt. Er wurde als Interaktionspartner des Zellzyklus- und DNA-Schadensregulators Mad2b in einem Hefe Two-Hybrid Screen identifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Wechselwirkung mittels eines GST-Pulldown Experimentes bestätigt. Obwohl PA28 γ in Verbindung mit der Zellproliferation gebracht wird, konnte in GBM-Zelllinien keine signifikante Änderung der Zellteilungsraten beobachtet werden. Allerdings unterstützte die vermehrte Expression von PA28 γ die Apoptose. Um durch neue Interaktionspartner von PA28 γ Hinweise auf dessen Funktion zu erhalten, wurde ein Hefe Two-Hybrid Screen durchgeführt:

PA28 γ steuert den Abbau von p53 und verweist über die hier neu beschriebene Interaktion mit HIPK1 ebenfalls auf den programmierten Zelltod. Dieser pro-apoptische Zusammenhang wird unterstützt durch die Interaktion mit 1A6/DRIM-interacting protein. Die Interaktion der Sumo E2 Ligase Ubc9 mit PA28 γ war ein erster Hinweis für eine Sumoylierung des Proteasomenaktivators, die die PA28 γ Aktivität regulieren könnte. Gleichzeitig ist Ubc9, wie auch die E3-Ligase PIAS, im Zusammenhang mit Apoptose beschrieben worden. Diese Fragestellungen wurden in weiterführenden Arbeiten erforscht.

Einen anderen Aspekt beleuchtet die Interaktion von PA28 γ mit Catenin α . Durch diese Wechselwirkung könnte PA28 γ Einfluß auf Interzellulärkontakte nehmen. Gerade im Hinblick auf das GBM, charakterisiert durch ausgeprägtes Migrations- und Invasionsverhalten, könnte die Regulation von Interzellulärkontakten von besonderer Bedeutung sein.

Aufgrund der oben beschriebenen Eigenschaften von PA28 γ sollte dieses Protein für eine Therapie mittels DNA-Schäden induzierter Apoptose erforscht werden. PA28 γ könnte bei diesen Vorgängen ein zentraler Faktor sein, dessen Manipulation die etablierten Therapieformen unterstützen und deren Wirkung verbessern.

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb	Abbildung
AD	aktivierende Domäne
Ak	Antikörper
APC/C	anaphase-promoting-complex/cyclosome
Aqua dest.	destilliertes und entkalktes Wasser
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
bZIP 2	basic region leucin zipper
bzw	beziehungsweise
C	Celsius
Catenin α	Cadherin-assoziiertes Protein
C/EBP β	CAATT/enhancer binding protein β
DB	DNA-bindende Domäne
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMF	N,N-dimethylformamide
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRIM	downregulated in metastasis
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylen-Glycol-bis(β -Aminoethyl-Ether)N,N,N',N'-Tetraacetat
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
et al.	et alii (und andere)
FCS	Fötale Kälberserum
GBM	Glioblastoma multiforme
h	Stunde
HCl	Salzsäure

HIPK1	Homeodomain interacting protein kinase 1
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IQR	Interquartilenabstand
Hacetat	Essigsäure
HIPK1	Homeodomain interacting protein kinase 1
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
LGA	niedriggradiges Astrozytom
LiAc	Lithium Acetat
LiCl	Lithium Chlorid
LOH	Loss of Heterozygosity (Verlust von Heterozygotität)
M	Molar
Mad2b	mitotic arrest deficient 2 b
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinase
MEKK	MAPK/ERK Kinase
min	Minute
l	Liter
mg	Milligramm
MGMT	M-Guanin Methyltransferase
ml	Milliliter
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NB	Normalhirnprobe
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG 4000	Polyethylenglykol
PIAS1	protein inhibitor of activated Stat1

PML	promyelozytisches Leukämie-Protein
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	PML Onkogen-Domäne
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptions-PCR
SDS	sodium dodecyl sulfate
SCR-3	Steroid Rezeptor Coactivator-3
SUMO	small ubiquitin related modifier
Tm	Annealing Temperatur
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	Tumor Nekrosis-Factor-related apoptosis inducing ligand
Ubc9	Ubiquitin konjugierende Enzym
UbcC	katalytisches Zentrum von UBC9
V	Volt
w/o	without
WHO	World Health Organisation
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-Galactopyranosid
ZNS	Zentrales Nervensystem
3-AT	3-Amino-1,2,4-Triazol

LITERATUR

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Wlater, P., Molecular Biology of the Cell (2002) fourth edition, Garland Science (Tayler & Francis Group) New York, NY, S. 990 – 1010, S. 1075, S. 1350, S. JNK und p38
2. Al-Khodairy, F., Enoch, T., Hagan, I. M., Carr, A. M., The Schizosaccharomyces pombe hus5 gene encodes a ubiquitin conjugating enzyme required for normal mitosis (1995) J Cell Sci., 108: 475-486
3. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs (1997) Nucleic Acids Res, 25(17): 3389-3402
4. Anckar, J., Sistonen, L., SUMO: getting it on (2007) Biochemical Society Transaction, 35(6): 1409-1413
5. Ashkenazi, A., Pai, R. C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D. A., Marsters, S. A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A. E., Hebert, A., DeForge, L., Koumenis, I. L., Lewis, D., Harris, L., Bussiere, J., Koeppen, H., Shahrokh, Z., Schwall, R. H.. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand (1999) J. Clin. Invest., 104: 155-162
6. Ashwell, S., Zabludoff, S., DNA damage detection and repair pathways - recent advances with inhibitors of checkpoint kinases in cancer therapy (2008) Clin Cancer Res., 14(13): 4032-4037
7. Bharadwaj, R., Yu, H., The spindle checkpoint, aneuploidie and cancer, (2004) Oncogene, 23: 2016-2027

8. Bassermann, F., Frescas, D., Guardavaccaro, D., Busino, L., Peschiaroli, A., Pagano, M., The Cdc14B-Cdh1-Plk1 axis controls the G2 DNA-damage-response checkpoint (2008) *Cell*, 134(2): 256-267
9. Bullions, L. C., Notterman, D. A., Chung, L. A., Levine, A. J., Expression of Wild-Type α -Catenin Protein in Cells with a Mutant α -Catenin Gene Restores Both Growth Regulation and Tumor Suppressor Activities (1997) *Mol. Cell. Biol.*, 17(8): 4501–4508
10. Chen X., Barton L. F., Yong C., Clurman B. E., Roberts J. M., Ubiquitin-Independent Degradation of Cell-Cycle Inhibitors by the REG γ Proteasome (2007) *Mol. Cell*, 26: 834-852
11. Chen, J., Fang, G., MAD2B is an inhibitor of the anaphase-promotin complex (2002) *Genes Dev.*, 15: 1765-1770
12. Chen, L. Y., Chen, J. D., Daxx silencing sensitizes cells to multiple apoptotic pathways (2003) *Mol Cell Biol.*, 23(20): 7108-7121
13. Chevray, P. M., Nathans, D., Protein interaction cloning in yeast: Identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun (1992) *Proc. Nat. Acad.*, 89: 5789-5793
14. Cohen, G. M., Caspases: the executioners of apoptosis (1977) *Biochem J.*, 326: 1-16
15. Connors, S. K., Balusu, R., Kundu, C. N., Jaiswal, A. S., Gairola, C. G., Narayan, S., C/EBPbeta-mediated transcriptional regulation of bcl-xl gene expression in human breast epithelial cells in response to cigarette smoke condensate (2009) *Oncogene*: 28(6): 921-32

16. Descombes, P., Schibler, U., A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA (1991) *Cell*, 67(3): 569-579
17. Desterro, J. M., Rodriguez, M. S., Hay, R. T., SUMO-1 modification of I κ B inhibits NF- κ B activation (1998) *Mol. Cell* 2: 233-239
18. Desterro, J. M., Thomson, J., Hay, R. T., Ubc9 conjugates SUMO but not ubiquitin (1997) *FEBS Lett.*, 417: 297-300
19. De Wulf, P., Visintin, R., Cdc14B and APC/C Tackle DNA Damage (2008) *Cell*, 134: 210-212
20. Eaton, E. M., Sealy, L.J., Modification of CCAAT/enhancer-binding protein-beta by the small ubiquitin-like modifier (SUMO) family members, SUMO-2 and SUMO-3 (2003), *Biol Chem*, 278(35): 33416-33421
21. Ecsedy, J. A., Michaelson, J. S., Leder, P., Homeodomain-interacting protein kinase 1 modulates Daxx localization, phosphorylation, and transcriptional activity (2003) *Mol Cell Biol.*, 23(3): 950-960
22. Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., Alnemri, E. S., CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme (1994) *J Biol Chem.*, 269 (49): 30761-30764
23. Fernández, Y., Miller, T. P., Denoyelle, C., Esteban, J. A., Tang, W. H., Bengston, A. L., Soengas, M. S., Chemical blockage of the proteasome inhibitory function of bortezomib: impact on tumor cell death (2005) *J Biol Chem*, 281(2): 1107-1118

24. Furnari, F. B., Fenton, T., Bachoo, R. M., Mukasa, A., Stommel, J. M., Stegh, A., Hahn, W. C., Ligon, K. L., Louis, D. N., Brennan, C., Chin, L., DePinho, R. A., Cavenee, W. K., Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. (2007) *Genes Dev.*, 21(21): 2683-2710
25. Gartel, A. L., Radhakrishnan, S. K., Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences (2005) *Cancer Res.*, 65(10): 3980-3985
26. Gill, G., SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? (2004) *Genes&Development*, 18: 2046-2059
27. Glorius, P., Der mitotische Zellzykluskontrollpunkt astrozytärer Gliome: Funktions- und Expressionsanalysen von PA28 γ , Ubc9, sowie der neuen Proteine RIKEN 1700017B05 und KIAA1731 (2008) Diplomarbeit an der Fakultät für Biologie, Bayrische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
28. Grimm, S., Contreras, A., Barcellos-Hoff, M.-H., Rosen, J. M., Cell Cycle Defects Contribute to a Block in Hormone-induced Mammary Gland Proliferation in CCAAT/Enhancer-binding Protein (C/EBP β)-null Mice (2005) *JBC*, 280: 36301-36309
29. Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D., Huber, R., Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution (1997) *Nature*, 386: 437-438
30. Groll, M., Bajorek, M., Köhler, A., Moroder, L., Rubin, D. M., Huber, R., Glickman, M. H., Finley, D., A gated channel into the proteasome core particle (2000) *Nat. Struct. Biol.*, 7: 1062-1067

31. Hagemann, C., Patel, R., Blank, J. L.: MEKK3 interacts with the PA28 γ regulatory subunit of the proteasome (2003) *Biochem. J.*, 373:71-79
32. Hagemann, C., Meyer, C., Stojic, J., Eicker, S., Gerngras, S., Kühnel, S., Roosen, K., Vince, G. H., High efficiency transfection of glioma cell lines and primary cells for overexpression and RNAi experiments (2006) *J Neurosci Methods*, 156(1-2): 194-202
33. Hegi, M. E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J. E. C., Hau, P., Mirimanoff, R. O., Cairncross, J. G., Janzer, R. C., Stupp, R., MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma (2005) *N Engl J Med*, 352: 997–1003
34. Hentschel, S. J., Lang, F. F., Current surgical management of glioblastoma (2003) *Cancer J.* 2: 113 – 125
35. Ichimura, K., Ohgaki, H., Kleihues, P., Collins, V. P., Molecular pathogenesis of astrocytic tumours (2004) *J Neurooncol.* 70:137-60
36. Johnson, E. S., Blobel, G., Ubc9p Is the Conjugating Enzyme for the Ubiquitin-like Protein Smt3p (1997) *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*: 272 (43): 26799-26802
37. Kalmes, A., Hagemann, C., Weber, C. K., Wixler, L., Schuster, T., Rapp U. R., Interaction between the Protein Kinase B-Raf and the Ψ -Subunit of the 11S Proteasome Regulator (1998) *Cancer Research*, 58: 2986-2990

38. Karamouzis, M. V., Konstantinopoulos, P. A., Badra, F. A., Papavassiliou, A.G., SUMO and estrogen receptors in breast cancer (2008) *Breast Cancer Res Treat.*, 107: 195-210
39. Kim, K. S, Hwang, H. A., Chae, S. K., Ha, H., Kwon, K. S., Upregulation of Daxx mediates apoptosis in response to oxidative stress (2005) *J Cell Biochem.* 96(2): 330-8
40. Kim, Y. H., Choi, C. Y., Lee, S. J., Conti, M. A., Kim, Y., Homeodomain-interacting protein kinases, a novel family of co-repressors for homeodomain transcription factors (1998) *J Biol Chem*, 273: 25875–25879
41. Kondo, S., Lu, Y., Debbas, M., Lin, A. W., Sarosi, I., Itie, A., Wakeham, A., Tuan, J., Saris, C., Elliott, G., Ma, W., Benchimol, S., Lowe, S. W., Mak, T. W., Thukral, S. K., Characterization of cells and gene-targeted mice deficient for the p53-binding kinase homeodomain-interacting protein kinase 1 (HIPK1) (2003) *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(9): 5431-5436
42. Koschny, R., Holland, H., Sykora, J., Haas, T. L., Sprick, M. R., Ganten, T. M., Krupp, W., Bauer, M., Ahnert, P., Meixensberger, J., Walczak, H., Bortezomib Sensitizes Primary Human Astrozytoma Cells of WHO Grades I to IV for Tumor Nekrosis Factor-related Apoptosis-inducing ligand (2007) *Clin Cancer Research* 13 (11): 3403-3412
43. Kumar, V., Cotran, R. S., Robbins, S. L., Perkins, J. A., *Basic Pathology* (2003) Saunders-Verlag (Elsevier)
44. Lewin, B., *Molekularbiologie der Gene*, 2. Auflage, 2002, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, S. 669, S. 695

45. Li, X., Lonard, D. M., Jung, S. Y., Malovannaya, A., Feng, Q., Qin, J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., O'Malley, B. W., The SRC-3/AIB1 coactivator is degraded in a ubiquitin- and ATP-independent manner by the REGgamma proteasome (2006) *Cell*, 124(2): 381-392
46. Li, X., Luo, Y., Yu, L., Lin, Y., Luo, D., Zhang, H., He, Y., Kim, Y. O., Kim, Y., Tang, S., Min, W., SENP1 mediates TNF-induced desumoylation and cytoplasmic translocation of HIPK1 to enhance ASK1-dependent apoptosis (2008) *Cell Death Differ.*, 15(4): 739-750
47. Liu, Y. Q., Zhao, H., Ning, T., Ke, Y., Li, J. Y., Expression of 1A6 gene and its correlation with intestinal gastric carcinoma (2003) *World J Gastroenterol*, 9(2): 238-241
48. Murakumo, Y., Roth, T., Ishii, H., Rasio, D., Numata, S.-I., Croce, C.M., Rishel, R., A human REV7 homolog that interacts with the polymerase zeta catalytic subunit hREV3 and the spindle assembly checkpoint protein hMAD2 (2000) *JBC*, 275: 4391-4397
49. Murata, S., Kawahara, H., Tohma, S., Yamamoto, K., Kasahara, M., Nabeshima, Y., Tanaka, K., Chiba, T., Growth retardation in mice lacking the proteasome activator PA28gamma (1999) *Cell*, 85: 707-720
50. Murata, S., Kawahara, H., Tohma, S., Yamamoto, K., Kasahara, M., Nabeshima, Y., Tanaka, K., Chiba, T., Growth Retardation in Mice Lacking the Proteasome Activator PA28 γ (1999) *J Biol Chem.*, 274: 38211-38215
51. Nasmyth, K., How do so few control so many? (2005) *Cell*, 120: 739-746

52. Nowak, M., Hammerschmidt, M., Ubc9 regulates mitosis and cell survival during zebrafish development. (2006) *Mol Biol Cell.*, 17: 5324-5336
53. Okamura, T., Taniguchi, S.-I., Ohkura, T., Yoshida, A., Shimizu, H., Sakai, M., Maeta, H., Fukui, H., Ueta, Y., Hastome, I., Shigemasa, C.: Abnormally high expression of proteasome activator γ in thyroid neoplasm. (2005) *J. Clin. Endocrin. Metabol.*, 88: 1374-1383
54. Panner, A., Parsa, A. T., Pieper, R. O., Use of APO2L/TRAIL with mTOR inhibitors in the treatment of glioblastoma multiforme (2006) *Expert Review of Anticancer Therapy*, 6 (9): 1313-1322
55. Peters J.-M., The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond (2002) *Mol. Cell*, 9: 931-943
56. Pflieger C. M., Salic, A., Lee, E., Kirschner, M.W., Inhibition of Cdc1-APC by the Mad2-related protein MAD2L2: a novel mechanism for regulating Cdh1 (2001) *Genes & Dev.*, 15: 1759-1764
57. Pichlmeier, U., Bink, A., Schackert, G., Stummer, W., ALA Glioma Study Group, Resection and survival in glioblastoma multiforme: an RTOG recursive partitioning analysis of ALA study patients (2008) *Neuro Oncol.*, 10: 1025-34
58. Pietsch, E. C., Sykes, S. M., McMahon, S. B., Murphy, M. E., The p53 family and programmed cell death (2008) *Oncogene*, 27(50): 6507-6521
59. Poeck, K., Hacke, W., Neurologie, 11. Auflage, Springer-Verlag Berlin 2001

60. Rabea, R., Blank, J. L., Creasey, K., Duca, E., John, N., Manickam, P., Brandeis, M., Hagemann, C., Vince, G. H., Roosen, K., Patel, R., Human Mad2B links DNA-Damage to the mitotic checkpoint, eingereicht
61. Reardon, D., A., Wen, P., Y., Therapeutic Advances in the Treatment of Glioblastoma: Rationale and Potential Role of Targeted Agents (2006) *Oncologist*, 11: 152-164
62. Rechsteiner, M., Hill, C. P., Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors (2005) *Trends Cell Biol*, 15(1): 27-33
63. Reifenberger, G., Collins, V. P., Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas (2004) *J Mol Med*, 82: 656–670
64. Richardson, P.G., Sonneveld, P., Schuster, M. W., Irwin, D., Stadtmauer, E. A., Facon, T., Harousseau, J. L., Ben-Yehuda, D., Lonial, S., Goldschmidt, H., Reece, D., San-Miguel, J. F., Bladé, J., Boccadoro, M., Cavenagh, J., Dalton, W. S., Boral, A. L., Esseltine, D. L., Porter, J.B., Schenkein, D., Anderson, K. C.; Assessment of Proteasome Inhibition for Extending Remissions (APEX) Investigators, Bortezomib or High Dose Dexamethason for Relapsed Multiple Myeloma (2005) *NEJM*, 325: 2546-2549
65. Said, H. M., Hagemann, C., Stojic, J., Schoemig, B., Vince, G. H., Flentje, M., Roosen, K., Vordermark, D., GAPDH is not regulated in human glioblastoma under hypoxic conditions. (2007) *BMC Mol Biol.*, 8: 55
66. Seufert, W., Futcher, B., Jentsch, S., Role of a ubiquitin-conjugation enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. (1995) *Nature*, 373: 78-81

67. Shih, H. M., Chang, C. C., Kuo, H. Y., Lin, D. Y., Daxx mediates SUMO-dependent transcriptional control and subnuclear compartmentalization (2007) *Biochem Soc Trans.*, 35(6): 1397-1400
68. Shiozaki, H., Iihara, K., Oka, H., Kadowaki, T., Matsui, S., Gofuku, J., Inoue, M., Nagafuchi, A., Tsukita, S., Mori, T., Immunohistochemical detection of alpha-catenin expression in human cancers (1994) *Am J Pathol.*: 144(4): 667-674
69. Sotilli, R., Hernando, E., Teruya-Feldstein, J., Cordon-Cardo, C., Lowe, S., Benezra, R., Mad2 overexpression promotes aneuploidie and tumorigenesis in mice (2007) *Cancer Cell*, 11: 9-23
70. Stojic, J., Hagemann, C., Haas, S., Herbold, C., Kühnel, S., Gerngras, S., Roggendorf, W., Roosen, K., Vince, G. H., Expression of matrix metalloproeinases MMP-1, MMP-11 and MMP-19 is correlated with the WHO-grading of human malignant gliomas (2007) *Neuroscience Research*, 60: 40-49
71. Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R. O.; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group., Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma (2005) *N Engl J Med*, 352(10): 987-996
72. Sudo, T., Ota, Y., Kotani, S., Nakao, M., Takeda, S., Saya, H., Activation of Cdh1-dependent APC is required for G1 cell cycle arrest and DNA damage-induced G2 checkpoint in vertebrate cells (2001) *Embo J.* 20: 6499 – 6508

73. Thorpe, J. A., Christian, P. A., Schwarze, S. R., Proteasome inhibition blocks caspase-8 degradation and sensitizes prostate cancer cells to death receptor-mediated apoptosis (2008) *Prostate*, 68(2): 200-209
74. Toby, G. G., Golemis, E. A., Using the yeast interaction trap and other two-hybrid-based approaches to study protein-protein interactions (2001) *Methods*, 3: 201-217
75. Torii, S., Egan, D. A., Evans, R. A., Reed, J. C., Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs) (1999) *EMBO J.*, 18(21): 6037-6049
76. Tremont-Lukats I.W., Gilbert M.R., Advances in molecular therapies in patients with brain tumors. (2003) *Cancer Control*, 10: 125-137
77. Trepel, M., *Neuroanatomie, Struktur und Funktion*, 3. Auflage, Urban & Fischer, München, 2004, S. 7-9
78. Tysnes B.B., Mahesparan R., Biological mechanisms of glioma invasion and potential therapeutic targets (2001) *J Neurooncol*, 53: 129-147
79. Vasioukhin, V., Bauer, C., Degenstein, L., Wise, B., Fuchs, E., Hyperproliferation and defects in epithelial polarity upon conditional ablation of alpha-catenin in skin (2001) *Cell* 104: 605-617
80. Weigelin, B., Klonierung und Charakterisierung neuer Proteine mit einer Funktion im Zellzyklus astrozytärer Tumore. (2007) Diplomarbeit an der Fakultät für Biologie Julius-Maximilians-Universität Würzburg

81. Yang L., Zhao J., Lu W., Li Y., Du X., Ning T., Lu G., Ke X., KIAA0649, a 1A6/DRIM-interacting protein with the oncogenic potential (2005) *BBRC* 334: 884-890
82. Yin D., Zhou H., Kumagau T. et al., Proteasome inhibitor PS-341 causes cell growth arrest and apoptosis in human glioblastoma multiforme (GBM). (2005) *Oncogene*, 24: 334-354
83. Yu, H., Regulation of APC-Cdc20 by the spindle checkpoint (2002) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 14: 706-714
84. Zhang, L., Yang, S.-H., Sharrocks, A. D., Rev7/MAD2B Links c-Jun N-Terminal Protein Kinase Pathway Signaling to Activation of the Transcription Factor Elk-1 (2007) *Molecular and Cellular Biology*, 27: 2861–2869
85. Zhang, Z., Zhang, R., Proteasome activator PA28 gamma regulates p53 by enhancing its MDM2-mediated degradation (2008) *EMBO J.*, 27(6): 852-64
86. Zhao, L. Y., Liu, J., Sidhu, G. S., Niu, Y., Liu, Y., Wang, R., Liao, D., Negative regulation of p53 functions by Daxx and the involvement of MDM2 (2004) *J Biol Chem*, 279(48): 50566-50579
87. Zannini, L., Lecis, D., Buscemi, G., Carlessi, L., Gasparini, P., Fontanella, E., Lisanti, S., Barton, L., Delia, D., REGgamma proteasome activator is involved in the maintenance of chromosomal stability (2008) *Cell Cycle*, 7(4): 504-512
88. Zhong, S., Salomoni, P., Ronchetti, S., Guo, A., Ruggero, D., Pandolfi, P. P., Promyelocytic leukemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis (2000) *J. Exp. Med.*, 191: 631–640

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. K. Roosen bedanken für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und des Arbeitsplatzes im Tumorbiologischen Labor der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg. Die Zeit im Labor vertiefte meine Faszination für die Grundlagen- und Tumor-Forschung immens. Zugleich ist Herr Prof. K. Roosen Erstgutachter dieser Arbeit, auch hierfür ein herzliches Dankeschön! Danken möchte ich auch posthum Herrn Prof. Dr. W. Roggendorf für die Übernahme des Zweitgutachtens und aktuell Prof. Dr. A. Rosenwald für die Tätigkeit als Koreferent!

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. G. H. Vince und Herrn Dr. C. Hagemann für die Begleitung des Themas. Sie waren immer geduldige und lehrreiche Ansprechpartner und wesentlich an der Fortführung der Experimente beteiligt. Ein besonderer Dank gilt Dr. C. Hagemann auch für meine Integration in die Arbeitsgruppe. Ein solch hervorragendes Arbeitsklima ist selten zu finden. (Gewisse früh-morgendliche Ausnahmen lasse ich an dieser Stelle außer Acht ☺.)

Besonderer Dank gebührt Frau Stefanie Gerngras für meine Einarbeitung und alle wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Hilfestellungen. Dank auch für alle Diskussionsbereitschaft, die uns beiden Unterstützung im Labor und im Leben waren. Auch allen anderen (teils temporären) Mitgliedern der Tumorbiologischen Arbeitsgruppe danke ich für Beistand, Gespräche und neue Denkanstöße, besonders Frau Sigrid Kühnel als größte Konstante!

Und schließlich Danke der besonderen Spezies der Biologen in meinem Leben, allen voran meinem Freund und meinem Vater, Seite an Seite mit meiner Mutter und unserem Hund. Danke allen weiteren, ebenfalls ganz besonderen und teils vierbeinigen, Freunden (inklusive einer außergewöhnlichen Katze mit eben solcher Familie: Danke an alle Scheuermanns einschließlich endlich eingehiratetem Zuwachs).

Ihr alle habt mich immer, und vor allem in diesem Forschungsjahr mit allen Hoch- und Tiefphasen, begleitet und unterstützt.

Schriftenverzeichnis

Expression of human endogenous retrovirus K (HERV-K) in human astrocytic tumors

A. F. Kessler, C. Hagemann, M. Wiesner, J. Denner, G. H. Vince, R.-I. Ernestus; Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie. Polnische Gesellschaft für Neurochirurgen. 62. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC), Joint Meeting mit der Polnischen Gesellschaft für Neurochirurgen (PNCH). Hamburg, 07.-11.05.2011. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2011. DocMI.05.12

The cohesin-interacting protein, precocious dissociation of sisters 5A/sister chromatid cohesion protein 112, is up-regulated in human astrocytic tumors

C. Hagemann, B. Weigelin, S. Schommer, M. Schulze, N. Al-Jomah, J. Anacker, S. Gerngas, S. Kühnel, A. F. Kessler, B. Polat, R.-I. Ernestus, R. Patel, G. H. Vince; Int J Mol Med 27: 39-51, 2011

Analysis of mitotic checkpoint function in human malignant gliomas

C. Hagemann, A. F. Kessler, B. Polat, R. Patel, R.-I. Ernestus, G. H. Vince; 15th World Congress on Advances in Oncology and 13th International Symposium on Molecular Medicine. Loutraki, Greece, 07.-09.10.2010. Int. J. Mol. Med. 26, Suppl. 1: S12, 2010

The role of MAD2A in mitotic spindle checkpoint function and for survival of glioblastoma cells

A. F. Kessler, C. Hagemann, S. Gerngas, R. Patel, R.-I. Ernestus, G. H. Vince; Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie. 61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC) im Rahmen der Neurowoche 2010 Mannheim, 21. - 25.09.2010. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2010. DocV1539 DOI: 10.3205/10dgnc016

Der Proteasomen-Aktivator PA28 γ bei der Tumorentstehung und seine Verbindung zur Stresssignalgebung und zur Zellzyklusregulation

A. F. Keßler; Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg 2009

Stipendien und Preise

Stiftung für Neurochirurgische Forschung, Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie

Forschungspreis für das Projekt:

Chromosomale Instabilität des Glioblastoms – Expression der mitotischen Kontrollpunktproteine Pds5A, Pds5B und Mad2A im Kontext der Tumorprogression und Patientenprognose