

**Charakterisierung von Interaktionspartnern und
erste Hinweise auf die Funktion des
Cancer/Testis-Antigens 45**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

Anja Koop

Kiel, 2013

Referentin:

Prof. Dr. Karin Krupinska

Korreferent:

Prof. Dr. Ottmar Janssen

Tag der mündlichen Prüfung:

28.11.2012

Zum Druck genehmigt:

19.02.2013

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Tumorwachstum und Immuntherapie.....	1
1.2 <i>Cancer/Testis</i> -Antigene, eine Untergruppe der Tumorantigene.....	4
1.3 <i>Cancer/Testis</i> -Antigen 45.....	9
1.4 Der Zellkern.....	12
1.5 Fragestellung.....	14
2. Material	15
2.1 Geräte.....	15
2.2 Verbrauchsmaterial.....	16
2.3 Chemikalien.....	17
2.4 Kits.....	20
2.5 Molekularbiologische Enzyme (außerhalb der Kits).....	21
2.6 Puffer und Lösungen.....	21
2.7 Verwendete Zelllinien.....	28
2.8 Medien.....	28
2.9 Antikörper.....	29
2.10 siRNA's, Plasmide und Primer.....	30
3. Methoden	33
3.1 Zellbiologische Methoden.....	33
3.1.1 Kultivierung von Zellen.....	33
3.1.2 Kryokonservierung von Zellen.....	33
3.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität.....	34
3.1.4 Transiente Transfektion von Zellen.....	34
3.1.5 <i>Dual-Glo</i> Luciferase-Assay.....	35
3.1.6 Immunfluoreszenz-Analysen.....	36
3.1.7 Analyse lebender Zellen (Zellimpedanz-Messung).....	38
3.2 Biochemische Methoden.....	39
3.2.1 Herstellung monoklonaler Antikörper.....	39
3.2.2 Anreicherung und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	41
3.2.3 Zelllysate für SDS-Page und Western Blot-Analysen.....	41
3.2.4 Fraktionierung von Zytoplasma- und Kernproteinen.....	42
3.2.5 <i>In vivo</i> Tubulin Polymerisations-Assay.....	42
3.2.6 Immunpräzipitation.....	43
3.2.7 Präzipitation von GST-Fusionsproteinen.....	44
3.2.8 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	44
3.2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	44
3.2.10 Western Blot.....	46
3.2.11 2D-Gelelektrophorese.....	46
3.2.12 <i>Enzyme-linked Immunosorbant Assay</i> (ELISA).....	47
3.2.13 Messung der Zellproliferation.....	48
3.2.14 Analyse der Zelladhäsion.....	49
3.2.15 Analyse der Zellmigration im 2D-Modell.....	49
3.2.16 Analyse der Zellmigration und Zellinvasion im 3D-Modell.....	50
3.2.17 <i>Epitopmapping</i>	51
3.3 Probenvorbereitung zur massenspektrometrischen Analyse.....	52
3.3.1 Zelllyse für die 2D-DIGE-Analysen.....	52
3.3.2 Dokumentation, Gelanalyse und Ausstanzen individueller Proteinspots.....	52
3.3.3 Gelfärbungen nach der Elektrophorese.....	53
3.3.4 Proteolytische Spaltung und Massenspektrometrie.....	53

- Inhaltsverzeichnis -

3.4 Molekularbiologische Methoden.....	55
3.4.1 Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen	55
3.4.2 Isolation von genomischer DNA aus Zellen	55
3.4.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	55
3.4.4 cDNA-Synthese.....	56
3.4.5 Reguläre PCR.....	57
3.4.6 Aufreinigung der PCR-Produkte.....	58
3.4.7 Transformation kompetenter Bakterien.....	58
3.4.8 Aufreinigung von Plasmid-DNA.....	58
3.4.9 Sequenzierung der Plasmid-DNA	60
3.4.10 Restriktionsverdau	61
3.4.11 Agarose-Gelelektrophorese	61
3.4.12 Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen	61
4. Ergebnisse.....	62
4.1 CT45-Promotoranalyse	62
4.2 CT45-Akkumulation in verschiedenen Zelllinien	68
4.3 Einfluss von CT45 auf die Zellproliferation.....	70
4.4 Generierung monoklonaler Antikörper.....	75
4.5 CT45-Interaktionspartner.....	78
4.6 Analyse differentiell regulierter Proteine	89
4.7 Einfluss auf die Zellmorphologie	106
4.8 Regulation von Syncrip induziert morphologische Veränderungen	118
5. Diskussion	125
5.1 Der CT45-Minimalpromotor.....	125
5.2 CT45-Akkumulation in verschiedenen Tumorzelllinien.....	129
5.3 Funktionelle Charakterisierung von CT45	131
5.3.1 Zellproliferation	131
5.3.2 Kernproteine als Interaktionspartner	132
5.3.3 CT45-induzierte negative Regulation von Syncrip	139
5.3.4 CT45 beeinflusst die Zelladhäsion, Invasion und Migration	142
5.3.5 Syncrip als Regulator zwischen CT45 und dem Zytoskelett	146
5.3.6 Biologische Bedeutung von CT45.....	148
5.4. Schlussfolgerung	154
6. Zusammenfassung	155
7. Summary.....	157
8. Literaturverzeichnis	159
9. Anhang.....	171
10. Danksagung.....	174
11. Curriculum vitae	175
12. Publikationsliste	176
13. Erklärung.....	178

Abkürzungsverzeichnis

2D	zwei-Dimensional
3D	drei-Dimensional
ACN	Acetonitril
AK	Antikörper
AP-1/2	Aktivatorprotein 1/2
Arp2/3	Aktin-verwandtes Protein 2/3
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP/ADP	Adenosin-Triphosphat/Adenosin-Diphosphat
bp	Basenpaare
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	bovines Serum Albumin
BVA	biologische Varianzanalyse
bzw.	beziehungsweise
CAU	Christian-Albrechts Universität
Cdc42	<i>cell division cycle 42</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CMV	Cytomegalovirus
CpG	Cytosin-Phosphat Guanin
CT-Antigen	<i>Cancer/Testis</i> -Antigen
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigene 4</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDX56	<i>DEAD [Asp-Glu-Ala-Asp] box polypeptide 56</i>
DIA	differentielle in-Gel Analyse
DIGE	differentielle Gelelektrophorese
DMF	Dimethylformamid
DMSZ	deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EEF1	eukaryontischer Elongationsfactor 1
EEF2	eukaryontischer Elongationsfactor 2
Eg5	Kinesin 5
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbant Assay</i>
EML4	<i>echinoderm microtubule associated protein like 4</i>
ERK1/2	<i>extracellular regulated MAP kinase</i>
FAK	fokale Adhäsionskinase
FKS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA-x	<i>GATA binding factor x</i>

- Abkürzungsverzeichnis -

GM-CSF	<i>granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
GST	Gluthation S-Transferase
GTP/GDT	Guanosin-Triphosphat/Guanosin-Diphosphat
HL	Hodkgin´s-Lymphom
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
hnRNP Q	<i>heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein Q</i>
HSF1/2	<i>heat shock transcription factor 1/2</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Inr	Intitiator
IP	Immunpräzipitation
Kolp	Koimmunpräzipitation
Ku80	ATP-abhängige DNA Helikase II, 80 kDa Einheit
Lyf-1	<i>lymphoid transcription factor 1</i>
MAGE	<i>melanoma associated antigene</i>
mAK	monoklonaler Antikörper
MALDI	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEP50	<i>Methylosome protein 50</i>
MPSS	<i>massively parallel signature sequencing</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium
MW	Molekulargewicht
MZF1	<i>myeloid zinc finger 1</i>
NHL	<i>non-Hodkgin´s-Lymphom</i>
NONO	<i>non-POU domain containing, octamer binding protein</i>
NP-40	Nonident 40
NPM	Nukleophosmin
N-WASP	<i>neural Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
WAVE	<i>WASP family Verprolin-homologous protein</i>
NY-ESO-1	<i>New York esophagial squamous cancer antigen 1</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMZ	mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
Pbx-1	<i>pre-B-cell leukemia homeobox 1</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD	<i>Pull Down</i>
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin

- Abkürzungsverzeichnis -

pl	isoelektrischer Punkt
RACE-PCR	<i>rapid amplification of cDNA-ends-PCR</i>
RhoA	<i>ras homolog gene family, member A</i>
RLU	<i>relative light units per second</i> (relative Lichteinheiten pro Sekunde)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RS-Zelle	Reed-Sternberg-Zelle
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
scrRNA	<i>scramble RNA</i>
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SEREX	<i>serological analysis of recombinant cDNA expression libraries of human tumors with autologous serum</i>
SFPQ	<i>Splicing factor proline/glutamine-rich</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
snRNPs	<i>small nuclear Ribonucleoprotein particles</i>
SPAN-Xb	<i>sperm protein associated with the nucleus, X-linked, family member 1</i>
SRY	<i>sex determining region Y</i>
SSX4	<i>synovial sarcoma, X breakpoint 4</i>
STAT-x	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SV40	Simian-Virus 40
TCP-1	<i>T-complex protein 1</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TRAP-1	<i>TNF receptor-associated protein 1</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	Transkriptionsstart
v/v	Volumen pro Volumen
VADC2	<i>voltage-dependent anion-selektive Chanel protein 2</i>
w/v	Gewicht pro Volumen
WB	Western Blot

1. Einleitung

Für die pathologische Diagnostik und Prognostik ist die genaue biologische und molekulare Charakterisierung verschiedener Proteinfunktionen von großem Interesse. Das Wissen über die Vernetzung einzelner Proteine in die zahlreichen zellulären Signalwege kann neue Therapieansätze zur Behandlung von Krankheiten liefern. Am Institut für Hämatopathologie des UK-SH Campus Kiel sind zur Analyse von spezifischen Proteinakkumulationsmustern in verschiedenen Tumorklassifizierungen bzw. Tumorentitäten zahlreiche Antikörper entwickelt, getestet und charakterisiert worden. Diese Antikörper erleichtern die genaue Einordnung von pathologisch entarteten Geweben. In vielen Fällen resultiert eine verbesserte Diagnostik und Prognostik. In diesem Zusammenhang ist von Rudolf und Kollegen 1999 ein neuer Antikörper, Ki-A10, charakterisiert worden. Dieser monoklonale Antikörper erkennt in normalen, humanen Geweben nur Spermatogonien und Spermatozyten 1. Ordnung. Zusätzlich wurde eine heterogene Akkumulation des Antigens in Hodgkin's-Lymphomen und Seminomen beschrieben. In einer anschließenden Veröffentlichung von Heidebrecht und Kollegen (2006) ist das Ki-A10 spezifische Antigen als *Cancer/Testis*-Antigen 45 (CT-Antigen 45, CT45) identifiziert worden. *Cancer/Testis*-Antigene sind in den letzten Jahren auf Grund ihrer selektiven Genexpression in Keimzellgeweben und verschiedenen Tumoren, sowie der Tatsache, dass einige Vertreter dieser Proteinfamilie eine humorale oder T-Zell-spezifische Immunantwort induzieren können, in den Fokus des wissenschaftlichen und klinischen Interesses gelangt. Die biologische Bedeutung der meisten *Cancer/Testis*-Antigene für die verschiedenen Tumorentitäten ist nahezu unbekannt. Auf Grund der Bedeutung von CT45 in der pathologischen Diagnostik besteht ein großes Interesse an der Identifikation der biologischen Funktion dieses Proteins im Keimzellgewebe und vor allem im Tumorgewebe.

1.1 Tumorwachstum und Immuntherapie

Der wissenschaftliche Fokus im Zusammenhang mit der Identifizierung von CT-Antigenen liegt zum Teil in der Entwicklung einer immunbasierten Tumorthherapie. Daher wird zunächst die Rolle des Immunsystems für das Tumorwachstum erläutert. Anschließend wird die Einordnung der CT-Antigene in dieses System vorgenommen.

Tumore entwickeln sich oftmals im Anschluss an eine genetische Veränderung bzw. Mutation. Diese kann aus irreversiblen Fehlern während der Zellteilung und DNA-Replikation resultieren. Anschließend wird in einigen Zellen eine pathogene Transformation, mit der Konsequenz der uneingeschränkten Teilungsfähigkeit, induziert. Die Entartung von

Gewebe kann ebenfalls aus einem angeborenen genetischen Zustand hervorgehen. Zudem sind somatische Zellen von evolutionär bedingten Mutationen betroffen, die eine unkontrollierte Expansion bewirken können (Vesely et al., 2011).

Der Organismus hat zahlreiche Mechanismen entwickelt, die ein uneingeschränktes Tumorstadium verhindern können. Diese werden in intrinsische und extrinsische Tumor-Suppressionsmechanismen unterteilt (Smyth et al., 2006).

Intrinsische Tumor-Suppressionsmechanismen kontrollieren Veränderungen der DNA über zellinterne Signalwege. Die Mutationen werden über diese Kontrollmechanismen von der Zelle erkannt. Durch die daraus resultierende gezielte Aktivierung spezifischer Signalkaskaden kann eine Reparatur und Wiederherstellung hervorgehen. Versagen diese Mechanismen wird eine zelluläre Seneszenz, charakterisiert durch einen Zellzyklus-Arrest oder Zelltod, induziert. Diese Maßnahmen stellen eine entscheidende Barriere für die Entwicklung von Tumorzellen dar (Vesely et al., 2011). Die starke Mutationsbereitschaft des Tumorgewebes ist wiederum eine wirkungsvolle Strategie, diesen Mechanismen zu entgehen. Oftmals resultiert eine verstärkte Transformation, die durch eine zunehmende Expansion der Tumorzellen charakterisiert wird. Hanahan und Weinberg (2000) haben besondere Merkmale des Tumorgewebes nach dem Versagen der körpereigenen intrinsischen Suppressionsmechanismen zusammengefasst. In diesem Stadium induziert der Tumor neben einer verstärkten Angiogenese, eine Gewebeinvasion und Metastasierung, sowie ein uneingeschränktes Wachstum (Hanahan und Weinberg, 2000).

Das Versagen der intrinsischen Suppression hat zur Folge, dass das Tumorstadium von nun an von der Umgebung begrenzt wird. Im Vordergrund der extrinsischen Tumor-Suppressionsmechanismen steht das Immunsystem. Die Immunüberwachung entarteter Gewebe wird bereits über ein Jahrhundert diskutiert (Ehrlich P., 1909). Die Hypothese der Tumor-Immunüberwachung ist Mitte des letzten Jahrhunderts aufgestellt worden. Demnach ist die adaptive oder spezifische Immunabwehr essentiell für den Schutz vor einer sich ausbreitenden Krebserkrankung (Thomas L., 1959). In den letzten Jahren wird nicht nur die spezifische, sondern auch die unspezifische Immunabwehr im Kampf gegen das Tumorstadium hervorgehoben. In diesem Zusammenhang werden die natürlichen Killerzellen als wichtige Mediatoren genannt (Smyth et al. 2000). Das Immunsystem vermittelt über verschiedene Wege eine Zerstörung des entarteten Gewebes. Parallel wird aber durch das Immunediting eine für den Tumor vorteilhafte Entwicklung induziert (Dunn et al., 2002). Ausgehend vom Immunsystem unterliegt das Tumorgewebe einem sehr hohen Selektionsdruck und erreicht durch zahlreiche Mutationen eine Immunogenität (Khong et al.,

2002; Algarra et al., 2004). Das Immunediting wird demnach durch die eintretende Zerstörung des Tumorgewebes und das sich daraufhin einstellende Gleichgewicht zwischen Expansion und Zelltod charakterisiert. Der Tumor entwickelt in dieser Zeit Mutationen, die ein erneutes unbemerktes Wachstum induzieren können (Dunn et al., 2004). Zudem entgehen die Tumorzellen der Immunerkennung im Laufe ihrer Entwicklung durch die fehlende Akkumulation von Proteinantigenen oder HLA-Glykoproteinen auf der Zelloberfläche (Garrido et al., 2001; Seliger 2008).

Ein weiteres Problem ist die gesteigerte Induktion von Tumorzellen in Regionen chronischer Entzündungen (Balkwill et al., 2001). Leukozyten und andere phagozytierende Immunzellen generieren unter anderem reaktive Sauerstoff- und Nitrogenverbindungen, um DNA-Schäden und resultierend Apoptose in den entzündungsauslösenden Zellen zu induzieren (Maeda et al., 1998). Allerdings können die verursachten DNA-Schäden zu Mutationen und folglich zur Transformation und Entartung der verschiedenen Zellen führen. Die weitere Tumorentwicklung wird durch diverse Zytokine und Wachstumsfaktoren, die im Entzündungsherd Angiogenese, Proliferation und Migration von Immunzellen stimulieren sollen, angeregt (Coussens et al., 2002; Cavallo et al., 2011). Das Tumorgewebe reagiert nicht nur auf diese Signalmoleküle, sondern sezerniert seinerseits stimulierende Faktoren, die eine immunsupprimierende Umgebung induzieren (Nigoletti et al., 1989). Diese Umgebung resultiert vor allem aus der Aktivierung einer T-Zell-Untergruppe, den regulatorischen T-Zellen. Durch die hochaffine Erkennung von Selbstantigenen dienen diese T-Zellen dem Erhalt der Selbsttoleranz, so dass Autoimmunreaktionen blockiert werden (Schwartz, 2005). Das Tumorgewebe nutzt die regulatorischen T-Zellen zur Unterdrückung der Immunreaktion gegen sich selbst (Zou, 2006). Depletiert man diese T-Zell-Population während einer Vakzinierung wird eine verstärkte Tumormunität induziert und eine Antikörperantwort verstärkt (Colombo et al., 2007).

Das Immunsystem stellt demnach eine kritische Komponente im Kampf gegen die Tumorentwicklung dar. Von Cavallo und Kollegen werden drei Vorgehensweisen postuliert, die das Immunsystem im Kampf gegen den Tumor unterstützen sollen (Cavallo et al., 2011). Die Arbeitsgruppe befürwortet die Entwicklung effektiver Verfahren, die zum einen die Reaktivierung der immunologischen Signalwege gegen den Tumor bewirken sollen. Zum anderen soll eine Inhibition der immunsupprimierenden Eigenschaften erreicht werden. Als erster Schritt zur Vermeidung von Krebs wird das Eindämmen von chronischen Entzündungsreaktionen gesehen. Hier sind entzündungshemmende Medikamente, aber auch die Vakzinierung gegen bakterielle und virale Infektionen, hervorzuheben (Cuzick et al., 2009; Katasuma et al., 1995; Nanni et al., 2001). Auch die Identifikation von neuen

Tumorantigenen ist eine sinnvolle Möglichkeit, um das Tumorwachstum zu blockieren. Denkbar ist in diesem Zusammenhang eine Immunisierung gegen neu charakterisierte Onkoantigene (Finn, 2003). Cavallo und Kollegen (2011) klassifizierten eine Gruppe von Antigenen, die für die Entwicklung einer Tumor-Immuntherapie genutzt werden können. Diese Proteine sollen idealerweise entweder eine essentielle Rolle in der Tumorprogression und im Tumorwachstum spielen, oder ein Ziel für zytotoxische T-Zellen oder Antikörper darstellen (Cavallo et al., 2011). Interessant sind Moleküle, die an der Zelloberfläche lokalisiert sind. Diese stellen ein Ziel für die humorale Immunreaktion dar. Ein vielversprechendes Beispiel für ein mit der Zellmembran assoziiertes Tumorantigen ist der Rezeptor HER-2/neu (Quaglino et al., 2004). Auch sezernierte Proteine werden als wichtiges Target im Kampf gegen die Tumorexansion genannt. Zytoplasmatische und nukleäre Proteine können nur schwer vom Immunsystem erkannt werden und sind daher am wenigsten für eine Immuntherapie geeignet (Cavallo et al., 2007, Lollini et al., 2011).

1.2 *Cancer/Testis*-Antigene, eine Untergruppe der Tumorantigene

Die Tumorantigen-codierenden Gene werden selektiv von Krebszellen exprimiert und induzieren in den meisten Fällen eine Immunreaktion. Abhängig von der charakteristischen zellulären Akkumulation und der induzierten Aktivierung, werden diese Proteine in vier verschiedene Gruppen unterteilt (Rosenberg 2001). Hierzu zählen Differenzierungsantigene, Überexpressionsantigene, *Cancer/Testis* (CT)-Antigene und Mutationsantigene.

Die ersten Tumorantigene sind vor mehr als fünfzig Jahren in den Fokus der Wissenschaft geraten. Ein Meilenstein für die Tumorimmunologie war die Identifizierung der MAGE (*Melanoma associated antigen*)-Proteinfamilie in Patienten mit malignem Melanom (Van der Bruggen et al., 1991). Die damals als Tumorantigene bezeichneten Proteine MAGE-A1 und MAGE-A3 sind über eine „T-Zell-Epitop-Klonierung“ entdeckt worden (Glauber et al., 1994). Mit diesem Verfahren wird versucht, natürliche T-Zell-Epitope zu identifizieren. Oft wird zunächst das zum Epitop zugehörige Protein charakterisiert. Anschließend werden die Sequenzabschnitte, die mit dem T-Zell-Epitop korrespondieren, über weitere Verfahren determiniert (Scott et al., 1992). MAGE-A1 und MAGE-A3 induzierten interessanterweise in den damaligen Untersuchungen eine humorale sowie zelluläre Immunantwort (Celis et al., 1994; Caballero et al., 2009). Später ist die MAGE-Proteinfamilie den CT-Antigenen zugeordnet worden. Um die Identifizierung weiterer immunogener Tumorantigene, unabhängig von der betreffenden Krebserkrankung zu erleichtern, ist 1994 die *SEREX* (*serological analysis of recombinant cDNA expression libraries of human tumors with autologous serum*)-Methode von Sahin und Kollegen entwickelt worden (Sahin et al., 1995).

Die SEREX-Analyse basiert auf der Konstruktion von cDNA-Expressionsdaten aus primären oder metastasierenden humanen Tumoren. Anschließend wird ein Immunscreening mit autologen Patientenserum durchgeführt. Die SEREX-Methode identifiziert neue Tumorantigene, unter denen sich CT-Antigene befinden können. NY-ESO-1 (*New York eosphagial squamous cancer antigen 1*) und SSX4 (*synovial sarcoma, X breakpoint 4*) bezeichnen bekannte CT-Antigene, die mit Hilfe dieser Methode identifiziert worden sind. Beide Proteine induzieren eine humorale als auch zelluläre Immunantwort (Chen et al., 1997, Caballero et al., 2009). Die CT-Antigene gerieten aufgrund der häufigen und zudem starken immunogenen Wirkung zunehmend in den Fokus verschiedener Arbeitsgruppen, so dass 2005 eine weitere Methode zur gezielten Identifizierung und Analyse neuer CT-Antigene entwickelt wurde (Chen et al., 2005). Das MPSS (*massively parallel signature sequencing*) vergleicht mRNA-Expressionsprofile zwischen Testis, Melanom-Zelllinien und somatischen Geweben.

Interessant ist die inhomogene Gruppe der CT-Antigene insbesondere deshalb, weil die Genexpression im gesunden Organismus selektiv nur in Keimzellgeweben stattfindet. Erstmals charakterisierte die Arbeitsgruppe um Chen 1997 diese Proteingruppe. Die Autoren postulierten drei entscheidende Merkmale der CT-Antigene. Dazu zählt eine überwiegende Genexpression im Hoden und grundsätzlich nicht im normalen somatischen Gewebe. Charakteristisch sind zudem eine Genaktivierung und mRNA-Anreicherung in malignen Geweben, sowie eine verwandtschaftsunabhängige Genexpression in verschiedenen Tumorentitäten (Chen et al., 1997). Old (2001) erweiterte in einem späteren Übersichtsartikel die Definition der CT-Antigene. Die Akkumulation der mRNA findet demnach auch in der Plazenta und den fetalen Ovarien statt. Unreifes Keimzellgewebe, wie Spermatogonien, zeigen die stärkste Genexpression (Old, 2001). Sowohl der Hoden, als auch die Plazenta, zählen zu den immunprivilegierten Regionen im menschlichen Körper. In diesen Regionen werden keine HLA-Klasse 1-Moleküle auf der Oberfläche lokalisiert und die Blut-Hoden bzw. Blut-Plazenta-Schranke schützt vor dem Eindringen von Immunzellen und Antikörpern (Fischer et al., 1998). Dieser Mechanismus ist essentiell, da im Hoden erst während der Pubertät, also nach dem Aufbau der Selbsttoleranz, die Keimzellentwicklung zur Bildung von Spermien einsetzt. Die Toleranz gegen die im Rahmen der Spermatogenese exprimierten Autoantigene ist ein essentieller Schutz vor Autoimmunerkrankungen des Hodens (Jacobo et al., 2011). Auch der Schutz eines im Trophoblasten heranwachsenden Embryos vor dem mütterlichen Immunsystem muss gewährleistet sein, so dass auch hier das Eindringen von Immunzellen verhindert wird. Die selektiv im Tumorgewebe akkumulierenden CT-Antigene werden daher vom Immunsystem nicht als Selbstantigene erkannt. Daraus resultiert eine Immunreaktion außerhalb der immunprivilegierten Region. Ziel der Identifizierung und

Analyse weiterer CT-Antigene soll somit die Entwicklung einer spezifischen Immuntherapie mit anschließender zielgerichteter Zerstörung des Tumors sein.

Die CT-Antigene werden ihrerseits in zwei Gruppen unterteilt, die X-Chromosom lokalisierten CT-X-Antigene und die über das gesamte restliche Genom verteilten nicht-CT-X-Antigene (Simpson et al., 2005).

Die CT-X-Antigene akkumulieren in den proliferierenden Spermatogonien innerhalb der Testis. Mitglieder dieser Gruppe bilden meist Genfamilien und sind assoziiert mit invertierten DNA-Wiederholungen (Simpson et al., 2005). Die CT-X-Antigene umfassen die interessanteren Kandidaten zur Entwicklung eines CT-Antigen-basierten Tumorigenstoffs. Bis heute wurden 138 CT-X-Antigene identifiziert (<http://www.cta.lncc.br/>).

Die nicht-CT-X-Antigene bilden im Gegensatz dazu selten Genfamilien und werden in späteren Entwicklungsstadien des Hodens, wie den Spermatozyten, angereichert (Simpson et al., 2005). Da diese Gruppe der CT-Antigene für diese Arbeit unwesentlich ist, wird im Folgenden mit CT-Antigen die Gruppe der CT-X-Antigene angesprochen.

Wie die Genexpression der CT-Antigene im Tumorgewebe induziert wird, ist noch weitestgehend unbekannt. Die Arbeitsgruppe um Chen vermutet, dass die abweichende Akkumulation von CT-Antigenen im Tumorgewebe Folge einer Derepression ist, die eine sporadische Genaktivierung induziert (Chen et al., 1997). Zudem wird für die Genexpression der CT-Antigene in den Tumorzellen eine globale Demethylierung der Promotorregionen als Möglichkeit gesehen. Die epigenetische Reprogrammierung, bestehend aus Veränderungen in der DNA-Methylierung und Chromatinstruktur, findet während zwei Phasen des Lebenszyklus statt. Zum einen während der Gametogenese, zum anderen während der frühen Embryogenese (Kimmins et al., 2005). Einige Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass eine Genaktivierung der CT-Antigene während der Spermatogenese aus einer Demethylierung der entsprechenden CpG (Cytosin-phosphatidyl-Guanin)-Inseln resultiert (Weber et al., 1994; De Semt et al., 1999).

Alle bis dato identifizierten CT-Antigene besitzen methylierte CpG-Inseln im somatischen Gewebe. Während der Tumorgenese bestehen Parallelen zur Gameto- bzw. Spermatogenese. Es kommt zur ausgeprägten Hypomethylierung der DNA, die genspezifisch, aber auch Genomregion-umfassend auftreten kann (Simpson et al., 2005). Einige Jahre vorher erwähnt Old erstmals die Genexpression der CT-Antigene als mögliche Verbindung zwischen Gametogenese und Tumorgenese (Abbildung 1) (Old, 2001). Er stellt die Hypothese „*Gametogenic Program Induction in Cancer (GPIC)*“ auf. Diese Theorie beinhaltet, dass die abweichende Expression von Keimzellgenen in somatischen Zellen die

Aktivierung eines gametogenen Programms induziert. Dieses resultiert wiederum in der Tumorentwicklung (Old, 2001). Allerdings kann die DNA-Hypomethylierung nicht alleine für die Akkumulation von CT-Antigenen in Tumorgewebe verantwortlich gemacht werden. In Kolonkarzinomen wird zum Beispiel eine starke Hypomethylierung beobachtet. Die Genexpression von CT-Antigenen ist allerdings vergleichsweise gering (Goelz et al. 1985). Eine weitere Möglichkeit zur Genexpressionsregulation verschiedener CT-Antigene ist die Aktivierung einzelner Zytokine. Dies ist beispielsweise für SPAN-Xb (*sperm protein associated with the nucleus, X-linked*) in multiplen Myelomzellen beschrieben (Wang et al., 2006a). Die Autoren konnten zeigen, dass SPAN-Xb nicht nur über die Promotor-Hypomethylierung, sondern auch über eine Stimulation mit Interleukin-7 und GM-CSF (*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*), hochreguliert wird.

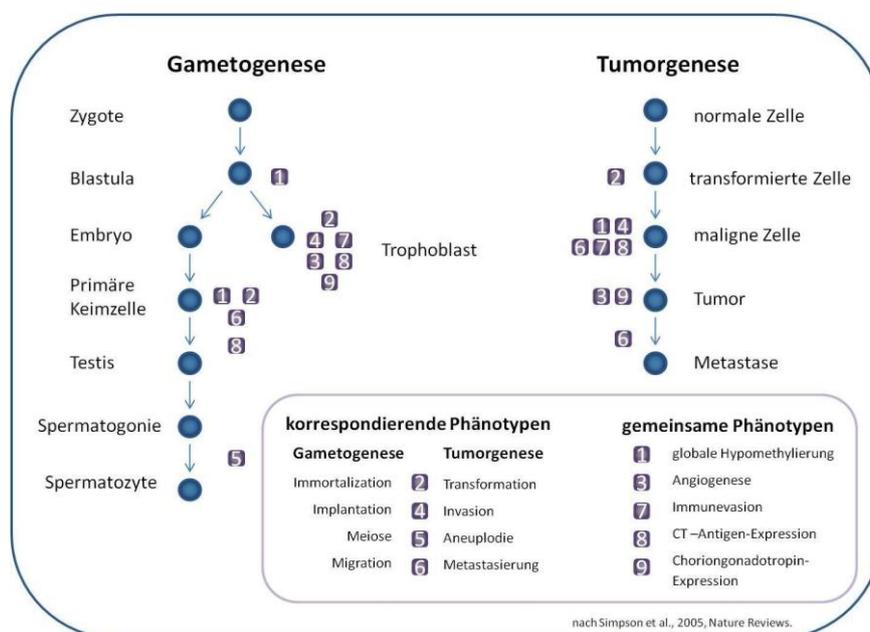


Abbildung 1: Gemeinsame Charakteristika zwischen Keimzell- und Tumorentwicklung. Gametogenese und Tumorgenese teilen einige essentielle Merkmale innerhalb der Differenzierungsstadien. Dazu zählt die Immortalisierung, die invasive Wanderung der Zellen, die Induktion von Meiose, die zur Aneuploidie führen kann und die Migration, die zur Metastasierung beiträgt. Alle Prozesse können ebenfalls die Zelltransformation begünstigen. Zu den gemeinsamen Phänotypen zwischen Keimzellen und Tumorzellen gehören die Demethylierung, die Induktion von Angiogenese, die Immunevasion (Selbstschutz des Tumorgewebes vor dem Immunsystem) und die Anreicherung von Choriongonadotropin.

Andere epigenetische Mechanismen, wie Histonmodifizierungen, scheinen ebenfalls für die Genexpression von CT-Antigenen von Bedeutung zu sein. In diesem Zusammenhang sind die Histon-Deacetylasen zu nennen. Eine Inhibition dieser Enzyme führt zur verstärkten Expression vieler Gene, unter anderem denen der CT-Antigene (Karpf A.R., 2006). Die Methylierung von Histonen scheint nach Link und Kollegen (2009) nur eine ergänzende Rolle zur DNA-Methylierung und anschließender Repression zu spielen.

Die CT-Antigene werden ebenfalls im Zusammenhang mit Tumor-Stammzellen diskutiert. Für verschiedene CT-Antigene wurde eine Genexpression in mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks nachgewiesen. Wahrscheinlich spielen diese Proteine daher nicht nur eine Rolle während der Gametogenese, sondern eventuell auch als Stammzellmarker (Cronwright et al., 2005). Costa und Kollegen diskutierten, dass die normalerweise während verschiedener Entwicklungsstadien angereicherten CT-Antigene die Zelldifferenzierung behindern, so dass eine Entartung der Zellen resultiert (Costa et al., 2007). Interessanterweise werden die Gene der CT-Antigene heterogen in nur wenigen Zellen eines Tumors exprimiert. Die Arbeitsgruppe um Costa postuliert, dass diese Zellen Charakteristika von Tumor-Stammzellen aufweisen, so dass sie als Vorläufer für metastasierende Zellen oder Rezidive gelten können (Costa et al., 2007). Eine zielgerichtete Immuntherapie gegen CT-Antigen-positive Tumor-Stammzellen wäre eventuell der Schlüssel für eine erfolgreiche Tumorthherapie. Chen und Kollegen (2011) konnten zeigen, dass die Gene der CT-Antigene während der fetalen Keimzellentwicklung in der Testis als auch in den Ovarien nahezu ausschließlich in prä-meiotischen Geweben exprimiert werden. Außerdem deuteten die Ergebnisse an, dass CT-Antigene größtenteils erst nach Verlust der pluripotenten Eigenschaften in den Geweben akkumulieren. In den untersuchten klassischen Seminomen (Keimzelltumore des Hodens) zeigt sich allerdings eine Koexpression zwischen dem Stammzellmarker OCT3/4 und den CT-Antigenen (Chen et al., 2011).

Zu der eigentlichen biologischen Funktion der CT-Antigene im Keimzell- oder Tumorgewebe ist bis heute wenig bekannt. Einige CT-Antigene sind näher charakterisiert, wie z.B. die Mitglieder der MAGE-Familie. Diese Proteine scheinen eine Funktion innerhalb der Zellzyklus- oder Apoptose-Regulation zu haben, so dass sie entscheidend zur Keimzellentwicklung, aber auch zur Tumorgenese beitragen können (Barker et al., 2002). Andere CT-Antigene sind essentiell für die Regulation der Spermatozyten-Struktur, für die Transkriptionsregulation oder Signaltransduktion, aber auch für enzymatische Aktivitäten oder Zell-Zell-Interaktionen. Desweiteren wurden für verschiedene CT-Antigene Helikase-ähnliche sowie Apoptose-inhibierende Funktionen beschrieben (Ghafouri-Fard et al. 2009).

Für eine Tumorstimmimpfung geeignete Kandidaten müssen eine humorale oder T-Zell-vermittelte Immunantwort induzieren. Bis dato gibt es allerdings nur gezielte Versuche mit NY-ESO-1- und MAGE-A1-Vakzinen. Dabei ist es gelungen, in Patienten eine starke humorale sowie zelluläre Immunantwort gegen NY-ESO-1 zu induzieren. Das Vakzin (NY-ESO-1 ISCOMATRIX®) wird bereits in Patienten mit malignem Melanom im Stadium III und IV im Rahmen der klinischen Phase II getestet (Ghafouri-Fard et al. 2009, Nicholaou et al., 2009).

1.3 Cancer/Testis-Antigen 45

Die Hauptrolle in meiner Arbeit spielt das CT-Antigen 45 (CT45). Identifiziert wurde CT45 (NM_152582) 2005 von Chen und Kollegen mit Hilfe der MPSS.

Die CT45-Genfamilie umfasst sechs Mitglieder und ist auf dem X-Chromosom Xq26.3 lokalisiert. Die sechs Gene entstammen Genduplikationen und die 1,008 Kilobasen (kb) großen Transkripte unterscheiden sich in 2-12 Basenpaaren (bp). Die translatierten Proteine umfassen 189 Aminosäuren. Jedes Gen umspannt einen Bereich von 8-9 kb und der gesamte Genlocus umfasst eine Region von 125 kb. Jeweils drei der Gene sind zentromerisch lokalisiert und werden in die telomerische Richtung transkribiert, die anderen drei telomerischen Gene in die entgegengesetzte zentromerische Richtung (Chen et al., 2005). Die CT45-Varianten 1-3 (zentromerisch) sind von 5 Exon-Bereichen durchzogen. Exon 1 beinhaltet eine 5'-untranslatierte Region zwischen 90 und 261 bp, eine kodierende Region von 570 bp und eine 3'-untranslatierte Region von 292 bp mit einem anschließenden Poly (A)-Schwanz (Chen et al., 2005) (Abbildung 2).

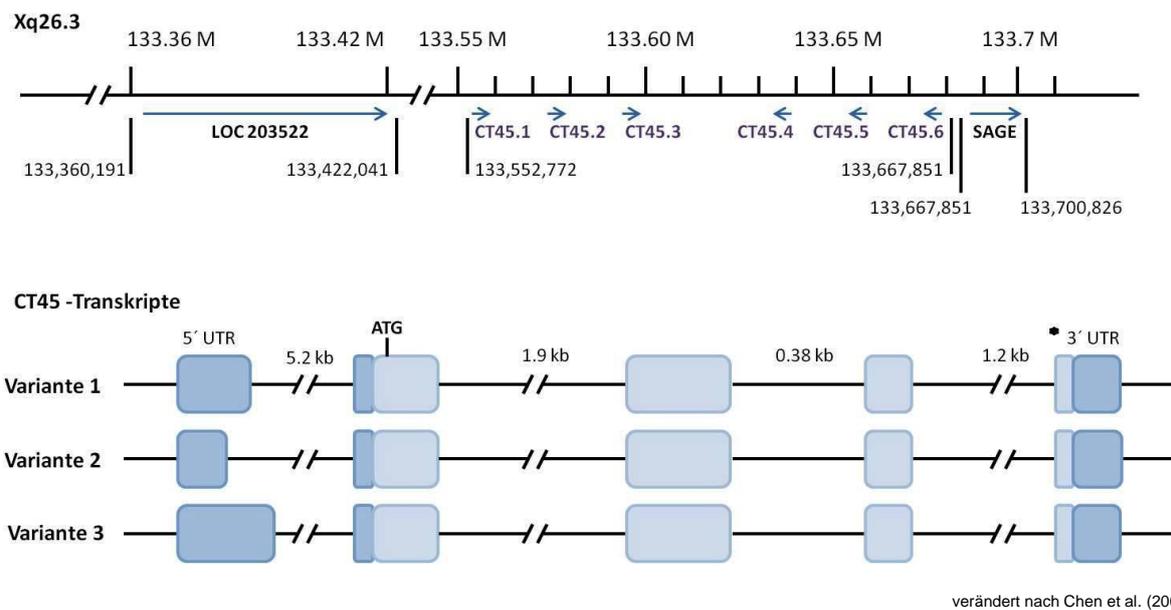


Abbildung 2: CT45-Genfamilie und -Transkriptvarianten. Dargestellt ist die Lokalisation der CT45-Genfamilie auf dem X-Chromosom, sowie die Lokalisation der homologen Proteine SAGE und LOC203522. Die drei CT45-Transkriptvarianten sind schematisch dargestellt. Die hellblauen Kästchen kennzeichnen die Exons. Dunkelblau steht für untranslatierte Bereiche (UTR) am 5'- und 3'-Ende. ATG bezeichnet das Start-Codon für die Translation und (*) das Terminationscodon.

Es existiert eine intronlose Kopie von CT45, ein Retrogen, auf Chromosom 5. Die cDNA-Sequenz entspricht der der Transkriptvariante 2. Auf Grund eines vorgelagerten Terminationscodons umfasst das resultierende Protein nur 160 Aminosäuren. Bei dieser CT45-Kopie handelt es sich wahrscheinlich um ein Pseudogen (Chen et al., 2005).

CT45 weist Sequenzhomologien zu drei Proteinen auf. Die Gene für die Proteine LOC203522 (NM_182540) und SAGE (NM_018666, ein CT-Antigen) befinden sich ebenfalls auf Xq26 (Abbildung 2). Ein weiteres homologes Protein ist DDX26 (NM_012141), ein *DEAD*-Box enthaltendes Protein. Das entsprechende Gen ist auf 13q14 lokalisiert. Die vier Proteinprodukte sind unterschiedlich groß. CT45 umfasst 189, SAGE 904, DDX26 887 und LOC203522 861 Aminosäuren. Die Sequenzhomologie betrifft einen Bereich an den C-terminalen Enden (Abbildung 3). Allerdings ist eine vergleichbare Funktion zwischen den Proteinen unwahrscheinlich, da sie nicht nur stark in der Größe divergieren, sondern auch in der Intron-Exon-Struktur (Chen et al., 2005).

```

DDX26      813  I K A Q I M K E I I R K P G R K Y E R I F T L L K H V O G S L Q T R L I F L Q N V I K E A S R F K K R M L I E Q I E N F I D
LOC203522  693  I K H Q I M K E V R K F G R K Y E R I F I L L E E V O G P L E M K K Q F V E F T I K E A A R F K R R V L I Q Y L E K V I L E
CT45.2     129  I K R K L M K E L R C V G O K Y E K I F E M L E G V O G P T A V R K R F F E S I I K E A A R C M R R D F V K H L K K K L K
SAGE       883  I K Y Q L M K E V R R F G Q N Y E R I F I L L E E V O G S M K V K R Q F V E F T I K E A A R F K K V V L I Q Q L E K A L K
    
```

Abbildung 3: Homologe Sequenzen zwischen CT45 (NP_689795), SAGE (NP_061136), DDX26 (NP_036273) und LOC 203522 (NP_872346). Mit CT45 identische Bereiche sind rot markiert. Gelb gekennzeichnet sind Regionen, die zwischen allen oder zwei der anderen Proteine homolog sind. (<http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>).

Die Proteinstruktur von CT45 umfasst zwei nukleäre Lokalisationssequenzen, eine mögliche N-Glykosylierungssequenz und mehrere mögliche Phosphorylierungsstellen (Heidebrecht et al., 2006) (Abbildung 4). Die theoretische Masse liegt bei 21,149 kDa. Heidebrecht und Kollegen zeigten, dass CT45 mit einer Halbwertszeit von drei Stunden phosphoryliert wird. Die nukleären Lokalisationssequenzen erklären die Anreicherung im Zellkern. Außerdem wurde von Heidebrecht und Mitarbeitern (2006) beschrieben, dass über eine Demethylierung in CT45-negativen HeLa-Zellen und stimulierten peripheren Blutlymphozyten die Genexpression von CT45 induziert werden kann.

CT45.2 (NP_686795), 189 AS

```

MTDKTEKVVAV    DPETVEKRPR    ECDSPSYOKR    ORMALLARKQ    GAGDSLIIAGS    AMSKEKCLMT
GHAI PPSQLD    SQIDDFTGFS    KDRMMQKPGS    NAPVGGNVTS    SFGDDLECR    ETASSPKSQQ
EINADIKRKL    VKELRCVGQK    YEKIFEMLEG    VQGP TAVRKR    FFESIIKEAA    RCMRRDFVKH
LKKKLRMI
    
```

Abbildung 4: Proteinsequenz von CT45.2. Eingezeichnet sind die nukleären Erkennungssequenzen (4, lila), die mögliche N-Glykosylierungssequenz (1, grau) und die möglichen Phosphorylierungsstellen an Serin (7, rot), Threonin (1, blau) und Tyrosin (1, grün). (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) (<http://www.elm.eu.orgsearch/>)

Von Cerveira und Kollegen (2010) ist zudem eine Spleißvariante zwischen dem Gen CT45-A2 und dem Gen MLL (codiert eine Histon-Methyltransferase) in einem Patienten mit BAL (biphänotypische akute Leukämie) beschrieben. Dies ist die erste Publikation, die ein

Fusionsgen zwischen MLL und einem CT-Antigen beschreibt, wobei die biologische Relevanz noch unklar ist (Cerveira et al., 2010).

Bereits vor der Sequenzierung und Klassifizierung von CT45 (Chen et al. 2005) existierte ein entsprechender monoklonaler Antikörper. 1999 publizierte die Arbeitsgruppe um Rudolph ihre Ergebnisse zu dem monoklonalen Antikörper Ki-A10. Ki-A10 erkennt ein nukleäres Antigen von 22/25 kDa, welches in einer späteren Publikation von Heidebrecht und Kollegen als CT45 identifiziert wurde. Der Antikörper Ki-A10 erkennt CT45 in unreifen Gonaden, Spermatogonien und Spermatozyten. Eine Anreicherung in reiferen Keimzellgeweben, wie den Spermatischen, den Spermatozoen, den Oozyten sowie dem somatischen Gewebe, war dagegen nicht detektierbar. Weiterhin konnte die Akkumulation in unterschiedlichen Keimzelltumoren, wie dem klassischen oder spermatozytischen Seminom, festgestellt werden (Rudolph et al., 1999).

Es folgten weitere Publikationen, die die Proteinakkumulation von CT45 in unterschiedlichen Tumorentitäten und Keimzellgeweben analysierten. Chen und Kollegen (2011) zeigten, dass CT45 in der humanen fetalen Testis während aller Entwicklungsstadien und auch in den prä-meiotischen Zellen des adulten Hodens akkumuliert. CT45 wird zudem in humanen fetalen Ovarien während der Oogonien-Entwicklung angereichert (prä-meiotische Stadien), aber nicht in der späteren Oozyte und den primordialen Follikeln (Chen et al., 2010). Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass CT45 möglicherweise zusammen mit anderen CT-Antigenen, eine Funktion während der Keimzellentwicklung hat. Publierte Screenings von unterschiedlichen Tumorentitäten zeigten, dass ein Großteil untersuchter Hodgkin's-Lymphome CT45-positiv ist. Die Arbeitsgruppe um Heidebrecht (2006) charakterisierte CT45 als möglichen diagnostischen Marker für klassische Hodgkin's-Lymphome. Berichtet wurde, dass 60 % der untersuchten Patientenproben in der Immunhistochemie CT45-positiv waren. Chen und Kollegen (2010) beschrieben eine ähnliche Anzahl CT45-positiver (58 %) klassischer Hodgkin's-Lymphome in ihren Untersuchungen. Es konnten allerdings nur in einem Patienten CT45-spezifische Antikörper mittels ELISA nachgewiesen werden (Chen et al. 2010).

Andrade und Kollegen publizierten 2009 einen Zusammenhang zwischen der Genexpression von CT45 in multiplen Myelomen und der Schwere des Krankheitsverlaufs in den betroffenen Patienten. Demnach ist bei CT45-Positivität das relative Risiko für eine schlechtere Prognose mit einer kürzeren Lebenserwartung bis zu sieben Mal höher als bei Patienten mit CT45-negativen multiplen Myelom. Bei der Analyse einer großen Anzahl von Gewebeproben zeigte sich, dass das CT45-Gen auch in einigen soliden Tumoren exprimiert

wird (Chen et al. 2009). Mit Hilfe eines auf mRNA-Ebene durchgeführten *Microarrays* konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass 37 % der Eierstock-, 13 % der Lungen- und weniger als 5 % der Mammakarzinome CT45-positiv sind. Die Arbeitsgruppe um Chen (2011a) beschrieb, dass CT45 und auch andere CT-Antigene verstärkt in Estrogen-Rezeptor (ER)-negativen Mammakarzinomen akkumulieren. Schrader und Kollegen wiesen zudem nach, dass 11 % der untersuchten Kolonkarzinome in der Immunhistochemie CT45-positiv waren (unveröffentlichte Daten).

Zusammenfassend gehört CT45 zu den CT-X-Antigenen und erfüllt alle der nach Simpson (2005) charakteristischen Merkmale. CT45 kann unter anderem in primären Spermatozyten detektiert werden, ist in einer Genfamilie codiert und wird über epigenetische Mechanismen (DNA-Methylierung) reguliert. Eine Genexpression in normalen somatischen Geweben konnte nicht analysiert werden. Dafür sind verschiedene Tumore zu einem unterschiedlich hohen Prozentsatz CT45-positiv.

Die Funktion von CT45 ist bis dato nicht bekannt. Es wird vermutet, dass CT45 die Transkriptionsregulation beeinflusst (Chen et al. 2010). Dafür spricht die sowohl während der Gametogenese als auch in den Tumorgeweben detektierte Akkumulation im Zellkern. Eine eventuelle Funktion während der Tumorgenese ist nicht bekannt. Dass CT45 ein potentielles Target für eine Immuntherapie gegen Krebserkrankungen, wie beispielsweise dem Hodgkin's-Lymphom darstellt, ist unwahrscheinlich. CT45 ist erstens ein Kernantigen und zweitens konnte keine signifikante Antikörperproduktion in Patienten mit CT45-positivem Tumor detektiert werden (Chen et al., 2010).

1.4 Der Zellkern

Der eukaryontische Zellkern ist sehr strukturiert und unterliegt einer hohen Dynamik. Der Zellkern ist von einer Doppelmembran umgeben, die im Inneren an die nukleäre Lamina grenzt. Die innere Membran, als auch die Kernlamina, scheinen die Genregulation durch direkte Chromatinbindung oder Interaktion mit Transkriptionsregulatoren zu beeinflussen (Hessen S., 2007).

Die Kernmembran ist von Kernporen durchzogen, die einen Austausch mit dem Zytoplasma erlauben. Die Kernporen setzen sich aus ungefähr 30 verschiedenen Proteinen zusammen. Die Regulation ist weitestgehend bekannt. Die Proteinkomplexe dienen nicht nur dem Transport von Signalmolekülen, sondern können auch an der Aktivierung von bestimmten Genen beteiligt sein (Zhao et al., 2009).

Zu den wichtigsten nukleären Kompartimenten gehören die Nukleoli, die Cajal-Körper, die *Nuclear Speckles*, die *Polycomb*-Körper und die *Paraspeckles*. Diese Kernbestandteile beschreiben membranlose, subnukleäre Proteinakkumulationen, die in einem ständigen Gleichgewicht dynamisch auf viele grundlegende physiologische Prozesse, wie z.B. Stress, metabolische Veränderungen oder veränderte zelluläre Signale reagieren (Yuntao et al., 2011).

Die Proteine, die sich im Nukleolus organisieren, sind essentiell für die Biogenese der ribosomalen RNA (rRNA). Der Nukleolus lokalisiert sich an multiplen, Tandem-angeordneten ribosomalen DNA (rDNA)-Clustern, die als Nukleolus-organisierende Regionen (NORs) bezeichnet werden. Diese Regionen sind beteiligt an der rDNA-Transkription, der prä-rRNA-Prozessierung und Modifikation, sowie dem initialen Aufbau und der Reifung der prä-Ribosomen (Pederson et al., 2010).

Die Bestandteile der Cajal-Körper organisieren den Aufbau und die Modifikation von snRNPs (*small nuclear Ribonucleoprotein particles*). Diese Proteine sammeln sich in diesem Kompartiment, bevor sie zu den *Speckles* oder an aktive Gene wandern, um dort ihre Funktion für das Spleißen von prä-mRNAs wahrzunehmen (Nizami et al., 2010).

Die Faktoren, die als *Polycomb*-Körper zusammengefasst werden, können eine Genrepression induzieren. Diese Kompartimente sind nahe am perizentromeren Chromatin lokalisiert (Kerppola T.K., 2009).

Die *Paraspeckles* spielen eine essentiell Rolle im Rahmen der Genexpressionskontrolle, die für eine Vielzahl zellulärer Prozesse, wie z.B. der Zelldifferenzierung, der Abwehr einer Virusinfektion oder zellulärem Stress notwendig wird. Zwei charakteristische Proteine der *Paraspeckle* sind NONO (*non-POU domain containing, octamer binding protein*) und SFPQ (*splicing factor proline/glutamine-rich*) (Fox und Lamond, 2011).

CT45 akkumuliert in den *Nuclear Speckles* (Heidebrecht, unveröffentlichte Daten). Die *Nuclear Speckles* bezeichnen Interchromatin-Regionen im Nukleoplasma, die essentiell an der Speicherung, dem Zusammenbau und der Modifizierung von prä-mRNA Spleißfaktoren beteiligt sind. Zu diesen Faktoren gehören unter anderem die snRNPs und die Serin/Argininreichen Proteine. Die Hauptaufgabe der *Nuclear Speckles* ist die Regulation von posttranslationalen Modifikationen, die für die Regulation der Spleißfaktoren entscheidend ist (Spector et al., 2010). Spezifische genreiche chromosomale Regionen organisieren sich um einen gemeinsamen *Nuclear Speckle*. Dieses Kernkompartiment dient als Anlagefläche für eine gesteigerte metabolische mRNA-Prozessierung, die zur Reifung und zum Export von mRNA führt (Shopland et al., 2003).

1.5 Fragestellung

Im Zentrum meiner Arbeit steht der Versuch, erste Erkenntnisse zur Funktion von CT45 in Tumorzellen zu erlangen. In Rahmen dessen sollten Experimente mit drei verschiedenen humanen Tumorzelllinien unterschiedlichen Ursprungs durchgeführt werden. CT45 ist ein im Zellkern lokalisiertes Protein, das in einem definierten Kernkompartiment, den *Nuclear Speckles*, akkumuliert. In der pathologischen Diagnostik wird CT45 zum einen als Marker zur Differenzierung zwischen Hodgkin's-Lymphomen und anderen Hodgkin-ähnlichen Läsionen eingesetzt. Zum anderen wird die Akkumulation von CT45 zur Untersuchung von Seminomen analysiert. Ziel meiner Arbeit war es, erste Hinweise auf eine zellbiologische Relevanz von CT45 zu erlangen.

Vor Beginn meiner Arbeit wurden bereits einige Voruntersuchungen durchgeführt. Erste mögliche Interaktionspartner sind nach Koimmunpräzipitationsexperimenten und anschließender massenspektrometrischer Analyse identifiziert worden. In anderen Experimenten wurde die methylierungsabhängige Genexpression von CT45 untersucht. Dabei wurden CpG-Inseln im Bereich des Transkriptionsstarts identifiziert, die nach Behandlung mit demethylierenden Reagenzien differentiell methyliert waren. Erste Untersuchungen wiesen zudem daraufhin, dass CT45 keinen Einfluss auf die Zellproliferation und die Zellzykluskontrolle hat.

Aufbauend auf der erfolgreichen Herunterregulation von CT45 über RNA-Interferenz, sollten mit weiterführenden Analyseverfahren Hinweise auf die biologische Funktion gewonnen werden. Die folgenden Stichpunkte benennen die verschiedenen Versuchsansätze:

- CT45-Herunterregulation in drei unterschiedlichen Tumorzellmodellen; Kinetik der Hemmung; Einfluss der Hemmung auf das Tumorwachstum und für entscheidende Prozesse wie Zellproliferation und Verlauf des Zellzyklus;
- Charakterisierung bekannter und neuer CT45-Interaktionspartner mit verschiedenen Methoden;
- Vergleich von Kontroll-scrRNA- und CT45-siRNA-behandelten Zellen mit Hilfe der 2D-DIGE-Plattform und anschließender massenspektrometrischer Analyse; Identifizierung von differentiell regulierten Proteinen;
- Eingrenzung des CT45-Minimalpromotors zur Identifizierung von potentiellen Transkriptionsfaktoren.

2. Material

2.1 Geräte

Absaugvorrichtung Filter Mate Harvester	Perkin Elmer, Dreieich
Agarose-Gel-Dokumentationsanlage Gel Imager	Intas, Göttingen
Agarose-Gel-Kammer Mini-Sub [®] Cell GT	Bio Rad, München
Agarose-Gel-Kammer Wide Mini-Sub [®] Cell GT	Bio Rad
Analysenwaage	Satorius, Göttingen
CO ₂ -Begasungsbrutschrank	Forma Sientific, USA
Digitales Aufnahmegerät (Digital Slight DS-L1)	Nikon, Düsseldorf
DNA/RNA-Photometer Nanodrop ND-1000	Nanodrop Technologies, USA
Durchflußzytometer FACS Calibur	Becton Dickinson (BD), Heidelberg
elektr. 8-Kanalpipette E8-200	Mettler, Toledo
Entwicklerkassetten Hypercassette™	GE Healthcare, München
Entwicklermaschine	Agfa, Gera
Ettan IPGphor	GE Healthcare
Ettan Dalt six	GE Healthcare
Ettan Spotpicker	GE Healthcare
Ettan DIGEster	GE Healthcare
Ettan Spotter	GE Healthcare
FB12 Luminometers	Zylux Corporation, USA
Feinwaage A120S	Sartorius
Flachbettscanner GS-800	Bio Rad
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen
Gelcaster	GE Healthcare
Gelelektrophorese-Kammer Protean [®] Xi Cell	Bio Rad
Gel Imager (Videokamera & Thermodrucker)	Intas, Göttingen
Heizblock Thermostat (DB2A und DB3A)	Technec, Wertheim
Heizblock HB-2	Wealtec, USA
Kühl-/Gefrierkombination	Liebherr, Oberhausen
Kühlfalle RVT-400	Savant, Farmingdale
Kühlzentrifuge Biofuge 15R	Heraeus, Osterode
Kühlzentrifuge Eppendorf	Eppendorf, Hamburg
Laser-Scanning Mikroskop LSM 510 Meta	Fujifilm, Düsseldorf
Lichtmikroskop Axioskop	Zeiss
Lichtmikroskop Axiovert 10	Zeiss
Magnetrührer RET basic	IKA Labortechnik, Staufen
MALDI-Tof/Tof 4700 Proteomic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt

Mikrowelle	Bosch, Stuttgart
Netzgerät Power Supply 250-2	Sigma Techware, München
Netzgerät Power Pack 200/300	Bio Rad
Neubauer-Zählkammer	Fischer, Frankfurt am Main
Nukleofektionsgerät Nucleofector™II	Lonza, Köln
pH-Meter wtw pH 315i	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
PCR-Maschine T-Gradient	Biometra, Göttingen
Reagenzglasschüttler Vortex-Genie 2	Scientific Industries, USA
Rollen-Mischgerät `Assistant` RM-5	Hecht, Sondheim
Rotator `Rotamix`	Heto-Holten, Wettenberg
Schüttelinkubator	GFL, Burgwedel
Schütteltisch	IKA Labortechnik
Schüttelwasserbad	GFL, Burgwedel
SpeedVac Plus SC110A	Savant
Spektrometer Smart Spec™3000	Bio Rad
Sterilbank `Lamin air`®	Heraus
Thermomixer compact	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415C, 5417C und 5417 R	Eppendorf
Typhoon Trio, Fluoreszenzscanner	GE Healthcare
Ultrazentrifuge für TLA-100	Beckmann-Coulter, Krefeld
Ultraschallbad	Branson, USA
Ultraschallstab	Branson
Wasserbad	GFL
Western Blot Transfer-Kammer `Transblot Cell`	Bio Rad
Wipptisch `Rocky`	Fröbel Labortechnik, Lindau
xCELLigence System	Roche, Basel
Zentrifuge Avanti™J-25I	Beckman Coulter,
Zentrifuge Labofuge GL	Heraus
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraus
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraus

2.2 Verbrauchsmaterial

Amicon Ultra-15	Millipore, Eschborn
Cellstar Klonierungsplatte, 24 Loch	Greiner, Frickenhausen
Bakterienimpfösen und -nadeln	Greiner
Centrion®-30 Konzentrator 30000 MWCO	Nunc, DK
Deckgläschen (18 mm)	Carl Roth, Karlsruhe
Einfrierröhrchen CryoTube™	Greiner
E-Platte 96-Loch	Roche

- 2. Material -

FACS-Röhrchen	Greiner
Filterpapier Whatman 3mm	Whatman, UK
Gel-Spotpicker (1,5 mm und 3 mm)	GE Healthcare
Hyperfilm™ECL-Chemilumineszenz-Film	Amersham, Freiburg
Microlance® Kanülen	Biostep GmbH, Jahnsdorf
Nitrozellulose-Membran Hybond™C Extra	Amersham
Objektträger	Roth
Opti-Tof® MALDI-Platte	Applied Biosystems
Parafilm	Pichiney Plastic Packaging, USA
Pasteurpipetten ungestopft	Hecht
PCR-Röhrchen Multiply® -µ Strip 0,2 ml Kette	Sarstedt, Nürnberg
PCR-Röhrchen Deckelkette	Sarstedt
Pipetten (5, 10, 25, 50 ml)	Greiner
Pipettierhilfen (2.5, 10, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf
Pipettierhilfe pipetus® akku	Hirschmann, Eberstadt
Pre-Separationsfilter	Miltenyi
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
Skalpell	Feather, Osaka, Japan
Spektrometer-Küvetten	Sarstedt
Spritzenvorsatzfilter 0,2 µm	Sartorius, Göttingen
Spritzenvorsatzfilter 0,45 µm	Sartorius
Spektrometerküvetten	Sarstedt
Spitzbodenplatte mit 96 Kavitäten	Nerbe plus, Winsen/Luhe
Spritzenvorstatzfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Sterilvakuumfilter	Millipore, Eschborn
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckmann & Coulter
Zellkultureinsatz	IBIDI
Zellkulturflaschen Cellstar (50, 250, 650 ml)	Greiner
Zellkulturplatten (12, 24, 96 Kavitäten)	Nunc
Zellkulturplatten, 10 cm	Falcon
Zellkulturplatten, 20 cm	Nunc
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	GREINER

2.3 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese® Gel 30	Roth
Acetonitril (<i>HPLC Ultra Gradient Grade</i>)	Roth
Agar-Agar	Serva, Heidelberg
Agarose	Invitrogen

- 2. Material -

Ampicillin	Merck, Darmstadt
Ammoniumbicarbonat (ABC)	Carl Roth
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Fluka
Ammoniumperoxodisulfid (APS)	Sigma, Deisenhofen
BES (N,N-bis (2-Hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure)	Merck
5-Brom-4-Chlor-3-Indooxyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal)	Sigma
Bromphenolblau	Merck
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva
3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS)	Calbiochem
Complete [®] Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Basel
Coomassie-Protein-Assay-Reagenz	GE Healthcare
Coomassie-Brilliant-Blau G250	Pierce, IL, USA
α-Cyano-4-Hydroxymizsäure (CHCA)	Merck
Cytochalasin D	Merck
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Merck
Digitonin	Merck
DMEM (<i>Dulbecco's minimum essential medium</i>)	Biochrom AG, Berlin
DNA 1 kb Marker	NEB, Frankfurt
DNA 100 bp Marker Hyperladder IV	Bioline, Luckenwalde
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
ddH ₂ O	Braun, Melsungen
dNTP Satz (100 mM)	Invitrogen
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	GE Healthcare
ECL-Detektionsreagenzien	GE Healthcare
Essigsäure	Carl Roth
Eisessig	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0,8 M, pH	Carl Roth
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	Merck
Ethanol (absolut)	Merck
Ethanol (absolut)	Sigma
Ethidiumbromid	Merck
Equilibrierungslösung A+B	Roche
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen
<i>Flamingo Fluorescent gel stain</i>	GE Healthcare
Glucose	Serva
Gluthation (reduziert)	Merck
Gluthation-Sepharose [™] 4B	GE Healthcare
Glycerin	Roth

- 2. Material -

Glycerol	Roth
Glycin	Merck
Harnstoff	Roth
HAT (Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin)-Medium	Merck
Hefe-Extrakt	Roth
IPG-Puffer	GE Healthcare
Isopropyl- β -thiogalactopyranosid (IPTG)	Merck
Iodacetamid (IAA)	GE Healthcare
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kalziumchlorid (CaCl_2)	Merck
Kristallviolett	Merck
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom AG, Berlin
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck
β -Mercaptoethanol	Calbiochem
Membran-Blockierungslösung	Invitrogen
Methanol	Sigma
Mounting Medium	Invitrogen
N,N'-Methylen-bisacrylamid	Roth
Natriumazid (NaN_3)	Merck
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck
Natriumcarbonat	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Nonident [®] (NP-40)	Fluka
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
Penicillin/Streptomycin (10000U/10000 μg)	Biochrom AG
Pepton	Roth
Phalloidin-Alexa488	Invitrogen
o-Phenylenediamine-dihydrochlorid (OPD)	Merck
Phosphat gepufferte Saline (PBS, 1 Einheit auf 10 l ddH_2O)	Biochrom AG
PhosSTOP [®] Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche
Pipes	Merck
Ponceau S-Konzentrat	Sigma
Polyethylenglycol (PEG)	Sigma
Propidiumjodid (PJ, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Serva
Protein Marker „Precision Plus“	Bio Rad
Protein G-Sepharose [™] 4B	Invitrogen
Protein A-Sepharose [™] 4B	Invitrogen
rekombinater RNAsin [®] Ribonuklease Inhibitor	Promega, Mannheim

- 2. Material -

RNAse A (1 mg/ml)	Qiagen
RPMI1640-Zellkulturmedium	Roth
Roti® Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth
Sodium Dodecyl Sulfate (10 % SDS in Wasser)	Merck
Sodium Dodecyl Sulfate	Serva
<i>Sybro Ruby gel stain</i>	Invitrogen
TEMED (N,N,N'N-Tetramethylethylendiamin)	Merck
Thioharnstoff	GE Healthcare
Trifluoressigsäure (TFA)	Fluka
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)	Merck
Triton X-100	Merck
Trypanblau (0,1 % in PBS)	Merck
Trypsin/EDTA (0,5 %/0,2 % (w/v))	Carl Roth
Tween 20	Biochrom AG
Wasserstoffperoxid	Merck

2.4 Kits

Big Dye Kit Terminator v 1.1	Qiagen
Bromdesoxyuridine (BrdU)-Assay	Roche
CellTiter 96® AQ _{ueous} Cell Proliferation Assay (MTS-Assay)	Promega, Mannheim
Cytofix/Cytosperm-Kit	BD
CytoSelect™ Cell Migration and Invasion Assay (8 µM)	BioCat, San Diego
CytoSelect™ Cell Migration and Invasion Assay (5 µM)	BioCat
DNA Clean & Concentrator-5 Kit	Zymoclean
Dye Ex 2.0 Spin Kit	Qiagen
Dual-Glo Luciferase Assay	Promega
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
Gel Extraction Kit	Zymoclean
Genomic DNA Purification Kit	Macherey-Nagel
Lonza Nucleofector Kit L	Lonza AG, Köln
Lonza Nucleofector Kit T	Lonza AG
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
ProteoJET™ Cytoplasmic & Nuclear Protein Extraction Kit	Fermentas
Rapid DNA Ligation Kit	Fermentas
RNesay Mini Kit	Qiagen

2.5 Molekularbiologische Enzyme (außerhalb der Kits)

Hind III + Restriktionspuffer 2	NEB
Xho I + Restriktionspuffer 2	NEB
Dream Taq™ Polymerase (5 U/μl)	Fermentas
T4-Ligase	NEB

2.6 Puffer und Lösungen

Molekularbiologie

50x TAE-Puffer (Tris/Acetat/EDTA-Puffer)	Tris Eisessig 0,5 M EDTA, pH 8 _{dd} H ₂ O Agarose	242 g 57,1 ml 100 ml auf 1 l 1 % (w/v)
1 % Agarose-Gel	1x TAE-Puffer Agarose	50-200ml 2 % (w/v)
DNA-Auftragspuffer	Bromphenolblau Glycerin in _{dd} H ₂ O	0,25 % (w/v) 30 % (v/v)
LB-Medium	Pepton Hefe-Extract NaCl autoklavieren Ampicillin _{dd} H ₂ O autoklavieren, Lagerung bei 4°C	10 g 5 g 0,25 g 50 μg/ml auf 1 l
LB-Agar	LB-Medium Agar-Agar autoklavieren, 20 ml Agar/Platte, Lagerung bei 4°C Ampicillin Bei Bedarf: X-Gal (40 mg/ml)	1 l 20 g 100 μg/ml 40 μg/Platte

- 2. Material -

SOC-Medium	Pepton	10 g
	Hefe-Extrakt	2,5 g
	NaCl	0,25 g
	KCl	1,25 g
	pH 7,0 einstellen	
	ddH ₂ O	auf 485 ml
	autoklavieren	
	Glucose 1 M	10 ml
MgCl ₂	5 ml	
<u>Proteinakkumulation</u>		
Lysepuffer	Triton X-100 in PBS	1 % (v/v)
Elutionspuffer	Tris-Puffer pH 8,0	50 mM
	Gluthation (reduziert)	10 mM
	ddH ₂ O	auf 10 ml

Protean II-System (Bio Rad) und Western Blot

Laufgel (10 % ig)	Acrylamid/Bisacrylamid	10 ml
	Tris-Puffer 1 M, pH 8,8	11,2 ml
	SDS 10 %	300 µl
	ddH ₂ O	8,7 ml
	APS 20 %	100 µl
	TEMED	<u>20 µl</u>
		30 ml
Sammelgel	Acrylamid/Bisacrylamid	1,67 ml
	Tris-Puffer 1 M, pH=6,8	1,25 ml
	SDS 10 %	100 µl
	ddH ₂ O	7,03 µl
	APS 20 %	50 µl
	TEMED	<u>10 µl</u>
	10 ml	
Elektrophoresepuffer (10x)	Tris	30,3 g
	Glycin	144 g
	SDS	10 g
	ddH ₂ O	auf 10 l
	pH auf 8,2-8,3 einstellen	

- 2. Material -

Probenpuffer	SDS	6 % (w/v)
	Glycin	30 % (w/v)
	Tris-Puffer 1 M, pH 6,8	200 mM
	Bromphenolblau	0,005 % (v/v)
	β-Mercaptoethanol	2-5 % (v/v)
Western Blot-Transferpuffer	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20 % (v/v)
	SDS 10 %	0,015 (v/v)
	ddH ₂ O	auf 4 l
Western Blot-Waschpuffer (TBS)	Tris	10 mM
	NaCl	150 mM
	auf pH 7,5-8 einstellen	
Western Blot-Waschpuffer (TBS-T)	Tris	10 mM
	NaCl	150 mM
	auf pH 7,5-8 einstellen	
	Tween 20	0,05 % (v/v)
BSA-Blockierungslösung	Tris	10 mM
	NaCl	150 mM
	auf pH 7,5-8 einstellen	
	10 % NaN ₃	1 % (v/v)
	BSA	5 % (w/v)
<i>Stripping</i> -Lösung	Tris pH 6,8	62,5 mM
	β-Mercaptoethanol	100 mM
	10 % SDS	2 % (v/v)
	ddH ₂ O	auf 500 ml
Ettan Dalt six (GE Healthcare)		
Trenngel (12,5 %)	Tris 1,5 M, pH 8,8	100 ml
	SDS 10 %	4 ml
	APS 20 %	1 ml
	TEMED	111 µl
	30 % Acrylamid, 0,8 % N,N'-Methylen-bisacrylamid, Verhältnis 37,5 : 1	166,7 ml
	ddH ₂ O	127 ml

- 2. Material -

Verdrängungslösung	Tris 1,5 M, pH 8,8	375 mM
	Glycerol (87/ (v/v))	50 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,002 % (w/v)
Equilibrierungslösung	Tris 1,5 M, pH 8,8	75 mM
	Harnstoff	6 M
	SDS	2 % (w/v)
	Glycerol (87 % (v/v))	30 % (v/v)
	Equilibrierungslösung A	+ 1 % DTT
	Equilibrierungslösung B	+ 2,5 % IAA
<i>Low-melting</i> Agarose	L.M.P. Agarose	0,5 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,005 % (w/v)
in 2 % Elektrophoresepuffer aufkochen und auf 40-50°C abkühlen		

Zellbiologie

Lysepuffer für Zellen

1 % NP-40	Nonident [®] P-40	1 % (v/v)
	Tris pH 7,4	20 mM
	NaCl	0,15 M
	EDTA	5 mM
	Aprotinin	2 µg/ml
	Leupeptin	2 µg/ml
	PMSF	1 mM
	Natriumorthovanadat	1 mM
	Natriumfluorid	10 mM
	Natriumpyrophosphat	1 mM
	Pepstatin A	2 µg
	2 % Triton X-100	Triton X-100
EDTA (0,8 M, pH)		0,2 % (v/v)
Complete [®] Protease-Inhibitor		20 % (v/v)
PhosSTOP [®] Phosphatase-Inhibitor		20 % (v/v)
2 % Triton X-100 (2D-DIGE)	Tris pH 7,4	30 mM
	Triton X-100	2 % (v/v)
	EDTA (0,8 M, pH)	0,2 % (v/v)
	Complete [®] Protease-Inhibitor	20 % (v/v)
	PhosSTOP [®] Phosphatase-Inhibitor	20 % (v/v)

- 2. Material -

Lysepuffer für Zellen (2D-DIGE)	Harnstoff	7 M
	Thioharnstoff	2 M
	CHAPS	4 % (w/v)
	Tris pH 8,5	30 mM
	Complete® Protease-Inhibitor	2,5 % (v/v)
2D-Lysepuffer (2x Probenpuffer)	Harnstoff	7 M
	Thioharnstoff	2 M
	CHAPS	4 % (w/v)
	500 µl aliquotiert, -20°C	
	DTT	2 % (w/v)
	IPG Puffer	2 % (w/v)
PEM-Waschpuffer	Pipes pH 6,8	100 mM
	EGTA	2 mM
	Pipes	100 mM
	MgCl ₂	1 mM
	Complete® Protease-Inhibitor	20 % (v/v)
	PhosSTOP® Phosphatase-Inhibitor	20 % (v/v)
PEM-Lysepuffer	Pipes pH 6,8	100 mM
	EGTA	2 mM
	MgCl ₂	1 mM
	Complete® Protease-Inhibitor	20 % (v/v)
	PhosSTOP® Phosphatase-Inhibitor	20 % (v/v)
	Triton X-100	0,05 % (v/v)
<u>Puffer für Immunpräzipitation</u>		
<i>Low salt</i>	Triton X-100	5 % (v/v)
<i>High salt</i>	Triton X-100	5 % (v/v)
	NaCl	0,5 M
<u>Puffer für mRNA-Immunpräzipitation</u>		
RSB 100-Puffer	Tris pH 7,4	10 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	2,5 mM
NET-2-Puffer	Tris pH 7,4	50 mM
	NaCl	150 mM

- 2. Material -

Puffer für CaPO₄-Transfektion

CaCl ₂	steril filtrieren (0,22 µM)	2,5 M
BES-Puffer (2x), pH 6,95	BES	50 mM
	NaCl	280 mM
	Na ₂ HPO ₄	1,5 mM
	steril filtrieren (0,22 µM)	

Färbelösungen für die 2D-Gelelektrophorese

Sypro Ruby

Fixierlösung	Methanol	40 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)

Färbelösung *Sypro Ruby gel stain*

Entfärbelösung	Methanol	10 % (v/v)
	Essigsäure	7 % (v/v)

Flamingo Pink

Fixierlösung	Ethanol	40 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)

Färbelösung *Flamingo Fluorescent gel stain*

Entfärbelösung	Tween20	0,1 % (w/v)
----------------	---------	-------------

Coomassie

Färbelösung	Methanol	410 ml
	Eisessig	70 ml
	Coomassie-Brilliant-Blau	0,125 g
	ddH ₂ O	520 ml

Entfärbelösung	Methanol	410 ml
	Eisessig	70 ml
	ddH ₂ O	520 ml

Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie

10x Ammoniumbicarbonat (ABC)	Ammoniumbicarbonat (MW 79,06)	250 mM
	Wasser (<i>HPLC Ultra Gradient Grade</i>)	192 mM

- 2. Material -

TFA 0,1 %	Trifluoressigsäure (TFA)	0,1 %
	Acetonitril (<i>HPLC Ultra Gradient Grade</i>)	3,2 mg
Matrixlösung (3,2 mg/ml)	α -Cyano-4-Hydroxymzimtsäure (CHCA)	650 μ l
	0,1 % TFA	
	Acetonitril (<i>HPLC Ultra Gradient Grade</i>)	350 μ l
25 mM Ammoniumbicarbonat + Acetonitril 1:1	Ammoniumbicarbonat	250 mM
	Wasser (<i>HPLC Ultra Gradient Grade</i>)	45 ml
	Acetonitril (<i>HPLC Ultra Gradient Grade</i>)	50 ml
Puffer für den ELISA		
Carbonatpuffer pH 9,6, 0,05 M	Natriumcarbonat	1,59 g
	Natriumhydrogencarbonat	2,93 g
	$\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$	auf 1 l
Citratpuffer, pH 5	Zitronensäure	21 g/l
	Dinatriumhydrogenphosphat	25,6 g/l
Citrat-Carbonatpuffer	Citrat-Puffer	49 ml
	Carbonat-Puffer	51 ml
Waschpuffer	NP-40	0,05 % in PBS
Blockierungslösung	Gelantine	1 % in Carbonatpuffer
Substratlösung	Citrat-Puffer	50 ml
	o-Phenylenediamine-dihydrochlorid	17,5 mg
	H_2O_2	16,5 μ l
Puffer für das Epitopmapping		
Regenerationspuffer I	Tris HCl (pH 6,7)	62,5 mM
	SDS	2 % (v/v)
	2-Mercaptoethanol	100 mM

- 2. Material -

Regenerationspuffer IIA	Harnstoff	8 M
	SDS	1 % (v/v)
	2-Mercaptoethanol	0,1 % (v/v)
Regenerationspuffer IIB	ddH ₂ O	400 ml
	Ethanol	500 ml
	Essigsäure	100 ml

2.7 Verwendete Zelllinien

Tabelle 1: Beschreibung der verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Herkunft	Ursprungsgewebe (human)	zur Verfügung gestellt:
L428 U266 BL HT1080	DMSZ ACC-197 DMSZ ACC-009 DMSZ ACC-315	Hodgkin´s-Lymphom Plasmazytom Fibrosarkom	Pathologie, Dr. Heidebrecht, Kiel
HeLa HEK293 Jurkat Je6.1 PHA-Blasten	DMSZ ACC-075 ATCC CRL-1573 ATCC TIB-152	Cervixkarzinom embryonale Nierenzelle immortalisierte T-Lymphozyten stimul. periphere Monozyten	Mol. Immunologie, Labor Prof. Janssen, Kiel
PC-3 HT-29	ATCC CRL-1435 ATCC HTB-38	Prostatakarzinom Kolon-Adenokarzinom	Mol. Immunologie, Labor PD Wesch, Kiel Mol. Immunologie, Labor Prof. D.Adam, Kiel
L540 UHO-1 KM-H2 DAUDI DG75 Ca46 GRANTA 519 Karpas 422 X63-Ag8.653	DMSZ ACC-72 DMSZ ACC-626 DMSZ ACC-3 ATCC CCL-231 ATCC CRL-2625 ATCC CRL-1648 DMSZ ACC-342 DMSZ ACC-32 ATCC PTA-6291	Hodgkin´s-Lymphom Non-Hodgkin´s-Lymphom Maus Myelom-Zelle	Mol. Immunologie, Labor Prof. Schütze, Kiel Mol. Immunologie, Labor Prof. Janssen, Kiel

2.8 Medien

Zellkulturmedien

Als Kulturmedien für die Zellen wurden DMEM und RPMI1640 verwendet. Für den Gebrauch in der Zellkultur wurde den Medien 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin und 10 % (v/v) FKS hinzugeführt. DMEM-Medium wurde zusätzlich um 1 % (v/v) L-Glutamin ergänzt.

HAT (Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin)-Medium

Dieses Medium ist ein Selektionsmedium und wird zur Herstellung von Hybridomzellen verwendet. Für den Gebrauch in der Zellkultur wird dem Medium 20 % (v/v) FKS und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin hinzugefügt

Einfriermedium

Die Zellkulturmedien werden mit 20 % (v/v) FKS und 10 % (v/v) DMSO versetzt.

2.9 Antikörper

Tabelle 2: Gekaufte Primär- und Sekundäntikörper für Western Blot (WB), Immunpräzipitation (IP), Pull Down und konfokale Mikroskopie (KM).

Antikörper	Spezies	Methode	Applikation	MW (kDa)	Firma
β-Aktin	Maus	WB	1:10000	42	Abcam
Annexin 1	Kaninchen	WB	1:1000	37	Cell Signaling
Arp2	Kaninchen	WB/KM	1:000/1:100	45	Abcam
α-Parvin	Kaninchen	KM	1:100	42	Abcam
Cdc42	Kaninchen	WB/KM	1:1000/1:100	21	Abcam
Cofilin	Kaninchen	WB/KM	1:1000/1:100	19	Cell Signaling
p-Cofilin	Kaninchen	WB/ KM	1:1000/1:100	19	Cell Signaling
DDX56	Kaninchen	WB/IP	1:1000/4 µg	56	Abcam
EEF2	Kaninchen	WB	1:10000	100	Abcam
Eg5	Kaninchen	WB/KM	1:1000/1:100	120	Abcam
		IP	1:60	120	Abcam
FAK	Kaninchen	WB	1:1000	125	Abcam
FAK p397	Kaninchen	KM	1:100	125	Cell Signaling
GAPDH	Kaninchen	WB	1:2000	37	Trevigen
GST	Maus	WB	1:2500	35	Abcam
MEP50	Kaninchen	WB/KM	1:1000/1:100	49	Cell Signaling
		IP	1:10		
NONO	Maus	WB/IP	1:5000/1:100	54	BD
Nukleolin	Kaninchen	WB/KM	1:5000/1:100	100	Abcam
		IP	4 µg		
NPM	Kaninchen	WB/KM	1:3000/1:100	37	Abcam
		IP	1:60		
NPM (T199)	Kaninchen	WB/KM	1:3000/1:100	37	Abcam
		IP	1:70		
pERM	Kaninchen	WB	1:1000	75-81	Cell Signaling
N-WASP	Kaninchen	WB/KM	1:1000/1:100	63	Abcam
RhoA	Kaninchen	WB/KM	1:1000/1:100	21	Cell Signaling
SFPQ	Kaninchen	WB/KM	1:3000/1:100	100	Abcam
		IP	4 µg		
Syncrip	Kaninchen	WB/KM	1µg/ml	55,60,70	GenWay
Syncrip	Maus	WB/KM	1:2000/1:100	55,60,70	Abcam
		IP	5µg		
TCP-1	Kaninchen	WB	1:5000	60	Abcam
TRAP 1-6	Kaninchen	WB	1:1000	76	Abcam
Vimentin	Kaninchen	WB/KM	1:1000/1:100	57	Abcam
Kaninchen-IgG-HRP	Esel	WB	1/7500		GE Healthcare
Maus-IgG-HRP	Schaf	WB	1/7500		GE Healthcare
Maus-IgM-HRP	Schaf	WB	1/7500		GE Healthcare

Tabelle 3: Hergestellte Primärantikörper. Gefärbt wurde mit den jeweiligen Antikörper-enthaltenden Kulturüberständen (u.Kb: unverdünnter Kulturüberstand, Kb: Kulturüberstand, WB: Western Blot, IP: Immunpräzipitation, KM: konfokale Mikroskopie).

Antikörper	Spezies	Methode	Applikation	MW (kDa)	Hersteller
Ki-A10	Maus	WB/IP KM	u.Kb Kb1/3	22-25	Pathologie, Dr. Heidebrecht, Kiel
Ki-EML4	Maus	WB/KM/IP	u.Kb	120	
Ki-Mit	Maus	WB/KM/IP	u.Kb.	120	
Ki-S2	Maus	WB	u.Kb	100	
Ki-CT45-1	Maus	WB/KM	u.Kb.	22-25	Mol. Immunologie, Labor Janssen, Kiel, eigene Herstellung
Ki-CT45-2	Maus	WB/KM	u.Kb.	22-25	
Ku80	Maus	WB/KM/IP	u.Kb.	80	

Tabelle 4: Fluoreszenz-markierte Antikörper für die konfokale Mikroskopie.

Antikörper	Spezies	Applikation	Firma
β-Tubulin Cy3	Kanninchen	1:200	Sigma
β-Aktin Cy3	Kanninchen	1:200	Abcam
Vimentin Alexa 488	Maus	1:200	Cell Signaling
Alexa Fluor 488	Maus IgG	1:200	Invitrogen
Alexa Fluor 488	Kanninchen IgG	1:200	Invitrogen
Alexa Fluor 488	Maus IgM	1:200	Invitrogen
Alexa Fluor 594	Maus IgG	1:200	Invitrogen
Alexa Fluor 594	Maus IgM	1:200	Invitrogen
Alexa Fluor 594	Kanninchen IgG	1:200	Invitrogen

2.10 siRNA's, Plasmide und Primer

siRNA's

Die gezielte Herunterregulation der CT45-Transkripte wurde mit einer siRNA der Firma Ambion erreicht. Als negative Kontrolle wurde eine als *scramble* (scr)-RNA bezeichnete Kontroll-siRNA ohne Funktion verwendet. In Tabelle 5 sind die Sequenzen dargestellt.

Tabelle 5: Zur negativen Regulation von CT45 verwendete siRNAs.

Name	ID	Sense-Sequenz	Antisense-Sequenz
CT45si	290481	GGAGAGAAAAGGAUCAGAUtt	AUCUGAUCCUUUUCUCUCtC
<i>Silencer Negative Control #1</i> siRNA	AM4611	Unbekannt	Unbekannt

Plasmide

Tabelle 6: Zur Herstellung von Fusionsproteinen und zur Induktion einer Überexpression verwendete Plasmide.

Insert	Vektor	Hersteller
GST-CT45	pGEX-5X-1	Pathologie, Labor Heidebrecht, Kiel
GST-EML4	pGEX-5X-1	
GST-EML4 N-Terminus	pGEX-5X-1	
GST-EML4 C-Terminus	pGEX-5x-1	
pRK5_CT45	pRK5	zur Verfügung gestellt, von Dr. M. Lettau, Kiel
GFP-NONO		

Primer (Expression, Klonierung und Sequenzierung)

Tabelle 7: Primer zur Charakterisierung der CT45-Genexpression.

	Vorwärts-Primer		Rückwärts-Primer		Annealing-Temperatur/°C	Größe der Amplifikate /bp
	Name	Sequenz	Name	Sequenz		
CT45-Expression	CT45- for 1	ATGACCGATAAAA CAGAGAAGG	CT45-rev 1	ACAAGTCTCGTCT CATACAT	58	560
	GAPDH- for	GACCCCTTCATTG ACCTC	GAPDH- rev	CCAAAGTTGTCAT GGATG	56	500

Tabelle 8: Primer für die mRNA-IP.

	Vorwärts-Primer		Rückwärts-Primer		Annealing-Temperatur/°C	Größe der Amplifikate /bp
	Name	Sequenz	Name	Sequenz		
mRNA-IP	Cdc42- for	ATGCAGACAATTA AGTGTGTTGTTGTG GGCGA	Cdc42- rev	TCATAGCAGCACA CACCTGCGGCTCT TCTT	68	550
	N-WASP- for	ATGAGCTCCGTCC AGCAG	N-WASP- rev	TCAGTCTTCCCAC TCATCATC	51	320
	Arp2- for	GGAGTTGGTGTTG CTGAAT	Arp2- rev	TAGTAGACCCTCC AGAAAGC	50	103
	Arp3- for	CAATCCTTGGAAA CTGCTA	Arp3- rev	CCATTTTGACCCA TCTGTA	50	103

Tabelle 9: Verwendete Sequenzierprimer (Vektor pGL3_basic).

	Name	Sequenz (5'-3')
Sequenzierprimer/ Vektor pGL3_basic	CT45/-1031 S1	GTCTCACTCTGTTACCCAGG
	CT45/-1031 S2	CCCCCTCAAATGAAAATTGCAG
	CT45/-1031 S3	GTTACCCAGGCGATTTTCATCC
	RV-3	CTAGCAAATAGGCTGTCCC
	GL-2	CTTTATGTTTTGGCGTCTTCCA

Tabelle 10: Beschreibung der Primer, die zur Generierung der Konstrukte für die CT45-Promotoranalyse verwendet wurden. Für die Klonierung wurden die Restriktionsenzyme *XhoI* und *HindIII* verwendet.

	Vorwärts-Primer		Rückwärts-Primer		Annealing-Temperatur (2 Schritt PCR)	Größe der Amplifikate/ bp
	Name	Sequenz (5'-3')/ <i>XhoI</i>	Name	Sequenz (5'-3')/ <i>HindIII</i>		
Klonierungsprimer mit Restriktionsschnittstellen	CT45/ -1031 for	GATACTCGAG AGTTACACGCTCAG	CT45/ +176 rev	GTGAAGCTT GTGGCACTTTCTAG	46°C/ 68°C	1207
			CT45/ +54 rev	GTGAAGCTT AAGGGAAGTAGCCA		1085
	CT45/ -254 for	GATACTCGAG GCCCAGCTAATTTGT	CT45/ +176 rev	GTGAAGCTT GTGGCACTTTCTAG	46°C/ 68°C	430
			CT45/ +114 rev	GTGAAGCTT GGAGTGATGTGCAT	48°C/ 68°C	368
			CT45/ +54 rev	GTGAAGCTT AAGGGAAGTAGCCA		303
	CT45/ -106 for	GATACTCGAG GTTGGTACTGAAGG	CT45/ +176 rev	GTGAAGCTT GTGGCACTTTCTAG	46°C/ 66°C	282
			CT45/ +114 rev	GTGAAGCTT GGAGTGATGTGCAT	48°C/ 68°C	220
			CT45/ +54 rev	GTGAAGCTT AAGGGAAGTAGCCA		160
	CT45/ -61 for	GATACTCGAG CTTCCTGGTTCTCT	CT45/ +176 rev	GTGAAGCTT GTGGCACTTTCTAG	46°C/ 68°C	237
			CT45/ +114 rev	GTGAAGCTT GGAGTGATGTGCAT	48°C/ 68°C	175
			CT45/ +54 rev	GTGAAGCTT AAGGGAAGTAGCCA		115
	CT45/ +6 for	GATACTCGAG AGGTTCCCAGTGTT	CT45/ +176 rev	GTGAAGCTT GTGGCACTTTCTAG	46°C/ 66°C	188
			CT45/ +114 rev	GTGAAGCTT GGAGTGATGTGCAT	48°C/ 68°C	120
			CT45/ +54 rev	GTGAAGCTT AAGGGAAGTAGCCA		60
	CT45/ +54 for	GATACTCGAG TGGCTACTTCCCTT	CT45/ +176 rev	GTGAAGCTT GTGGCACTTTCTAG	46°C/ 68°C	122
			CT45/ +114 rev	GTGAAGCTT GGAGTGATGTGCAT		90

3. Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von Zellen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % (v/v) CO₂ kultiviert. Der überwiegende Anteil der experimentellen Arbeiten wurde mit den in Suspension wachsenden Tumorzelllinien L428 und U266 BL und den adhärent wachsenden Tumorzelllinien HT1080 und HeLa durchgeführt. Von den in Tabelle 1 zusätzlich genannten Zellen wurden die Suspensionszellen GRANTA 519, Karpas 422, UHO-1, Ca46, L540, KM-H2, DAUDI, Ag8 und DG75 kurzfristig kultiviert. Alle weiteren in dieser Arbeit erwähnten Zellen wurden sofort nach Erhalt weiter verarbeitet.

Die in Suspension wachsenden Zellen wurden in RPMI1640-Medium mit 25 mM HEPES, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin und 10 % (v/v) FKS kultiviert. Die adhärent wachsenden Zellen in DMEM-Medium ohne HEPES, mit einem Glukosegehalt von 4,5 g/l, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin, 1 % (v/v) L-Glutamin und 10 % (v/v) FKS. Das FKS wurde vorher 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage passagiert. Die Suspensionszellen wurden je nach Bedarf 1/5 oder 1/10 geteilt und erneut in Kultur genommen. Die adhären Zellen wurden zunächst von der Zellkulturflasche durch Zugabe einer Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 % w/v)-Lösung 5-10 min bei 37°C abgelöst, zentrifugiert (5 min, 1400 rpm, RT), im einem Verhältnis zwischen 1/5 und 1/10 geteilt und weiter kultiviert.

3.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Die Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff dient der längerfristigen Lagerung von Zellen. Die Zellen wurden zentrifugiert und in einer Dichte von maximal 1-3 x 10⁷ Zellen pro ml in kaltem (4°C) Einfriermedium aufgenommen. Eine Zellschädigung durch Kristallbildung wird durch zugesetztes DMSO verhindert. Nach dem die eiskalte Zellsuspension in entsprechende Kryoröhrchen aliquotiert wurde, konnte sie unter Verwendung von luftgepolstertem Isolationsmaterial langsam auf -20°C abgekühlt werden. Nach einer zweiten Einfrierphase bei -80°C wurden die Zellen bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Bei Bedarf wurden die Zellen langsam bei RT aufgetaut und vorsichtig in warmes Kulturmedium aufgenommen. Nach dreimaligem Waschen im Kulturmedium wurde die Zellzahl und Zellvitalität bestimmt, um die Zellen anschließend bei 37°C zu kultivieren.

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Um die Anzahl lebender Zellen in einem bestimmten Volumen zu ermitteln, wurde eine 1:10 Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblaulösung hergestellt. 10 µl dieser Suspension wurden in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Trypanblau diente als Indikator für tote Zellen. Gezählt wurden nur die leuchtenden, lebenden Zellen in 2 Eckquadraten der Zählkammer. Ein Eckquadrat hat ein Volumen von 0,1 µl. Um die Zellzahl pro Milliliter zu ermitteln, wurde folgende Formel verwendet.

$$\frac{(\text{Zahl der Zellen in } n \text{ Eckquadraten})}{n} = \frac{\text{Zahl der Zellen}}{0,1 \mu\text{l}}$$

Die verwendeten Bedingungen führten zu folgender Vereinfachung:

$$\text{Zahl der Zellen in 2 Eckquadraten} \times 10^4 = \frac{\text{Zahl der Zellen}}{\text{ml}}$$

3.1.4 Transiente Transfektion von Zellen

Kalziumphosphat-Präzipitation

Die verwendete Zelllinie HeLa wurde mit Hilfe der Kalziumphosphat-Präzipitation transient transfiziert. Die Methode basiert auf der Bindung von DNA an kristallines Kalziumphosphat. Dieses präzipitiert bei der Mischung von Kalziumchlorid mit Natriumhydrogenphosphat. Die Zellen nehmen die DNA mit den Kristallen über Endozytose auf und die DNA kann exprimiert werden. Für die Transfektionen während dieser Arbeit wurden die in Tabelle 11 aufgelisteten, Zellzahlen, Kulturgefäße und DNA-Mengen verwendet.

Tabelle 11: Angabe der Zellzahlen, Kulturgefäße, DNA-Mengen und Puffervolumen, die für die Kalziumphosphat-Präzipitation verwendet wurden.

Kulturgefäß	Zellzahl	DNA-Menge	Puffervolumen (2x BES/2,5 M CaCl ₂)
12 Loch-Platte	1 x 10 ⁵ Zellen/ 1 ml	1 µg (äquimolar)	100 µl/10 µl
20 cm Schale	4 x 10 ⁶ Zellen/ 40 ml	20 µg	2 ml/200 µl

Vor der Transfektion wurden die in Tabelle 11 angegebenen Zellzahlen ausgesät und 18-24 h bis zu einer 70-80 %igen Konfluenz bei 37°C kultiviert. Für die Transfektion wurden gleiche Volumina 2x BES und 250 mM CaCl₂-Lösung verwendet. Die einzusetzende 2,5 M CaCl₂-Lösung wurde zunächst mit sterilem Wasser, welches bereits die zu transfizierende DNA enthielt, verdünnt. Anschließend wurde unter ständigem Schütteln (ca. 800 rpm) langsam und tropfenweise die CaCl₂/DNA-Lösung zu dem 2x BES gegeben. Diese Lösung wurde 10-

20 min bei RT inkubiert und anschließend tropfenweise auf die ausgesäten Zellen gegeben. Die transfizierten Zellen wurden nach 18-24-stündiger Inkubation für weitere Versuche verwendet.

Nukleofektion

Die Transfektion von HT1080-, U266 BL- und L428-Zellen mit siRNA erfolgte mit dem Nukleofektionssystem der Firma Lonza. Hierzu wurden 2×10^6 Zellen zentrifugiert (3 sec, 13000 rpm) und der Kulturüberstand anschließend verworfen. Die Zellen wurden in 100 μ l Nukleofektorlösung resuspendiert und mit 3 μ l siRNA (100 μ M) versetzt. Daraufhin wurde die Suspension in eine Einweg-Elektroporations-Küvette überführt und mit dem entsprechenden Programm (Tabelle 12) transfiziert. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei RT wurden die Zellen sorgfältig im vorgewärmten Medium resuspendiert und anschließend in 250 ml Zellkulturflaschen mit Filter bei 37°C kultiviert. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum zwischen 24 und 144h.

Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Zelllinien, Nukleofektorlösungen und Programme, die zur Nukleofektion verwendet wurden.

Zelltyp	Nukleofektorlösung	Programm
HT1080	T	L-005
L428 und U266BL	L	X-001

3.1.5 *Dual-Glo* Luciferase-Assay

Das Luciferase-System nutzt Biolumineszenz hervorrufende Gene als Reporter, um regulatorisch aktive Promotorbereiche nachzuweisen. Bei dem *Dual-Glo* Luciferase-Assay (Promega) wird die induzierbare Aktivität eines Reporterplasmids durch die Aktivität eines konstitutiv aktiven Kontrollplasmids quantifiziert. Das Reporterplasmid sollte für diesen Assay *Firefly*-Luciferase (aus *Photinus pyralis*) als Reporter gen enthalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden selbst konstruierte Reporterplasmide zur Promotoranalyse von CT45 verwendet. Das Kontrollplasmid enthielt *Renilla*-Luciferase, die über den Cytomegalovirus-Promoter konstitutiv exprimiert wird. Es wird davon ausgegangen, dass der virale Promotor nicht durch die eukaryontische Zelle reguliert wird und sich somit zur Quantifizierung der Ergebnisse eignet. Da *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase einen unterschiedlichen evolutionären Ursprung haben und dementsprechend andere Substrate umsetzen, ist es möglich, beide Luciferase-Aktivitäten in einem Testsystem auszuwerten.

Zur Durchführung des *Dual-Glo* Luciferase-Assay wurden HeLa-Zellen in einer 24-Lochplatte, wie in Tabelle 11 beschrieben, ausgesät und mit Hilfe der Kalziumphosphat-Präzipitation transient transfiziert. Für die Transfektion der HeLa-Zellen wurden äquimolare Mengen des Expressionsreporterplasmids und 0,001 µg/ml Kontrollplasmid verwendet. 24 h nach Transfektion wurde das Kulturmedium von den Zellen entfernt und frisches Medium zusammen mit *Dual-Glo* Luciferase-Reagenz in einem Verhältnis von 1:1 (75 µl) auf die Zellen gegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit wurden die Zellen durch den im Luciferase-Reagenz enthaltenen Puffer aufgeschlossen und die über die *Firefly*-Luciferase katalysierte Biolumineszenz gemessen. Das gesamte Volumen wurde dazu in ein FACS-Röhrchen pipettiert und mit Hilfe des FB12 Luminometers analysiert. Anschließend wurde zur Analyse der *Renilla*-Luciferase-Aktivität je 75 µl *Stop&Glo*-Reagenz zu den Proben gegeben. Nach mehrmaligem Schütteln während der 10-minütigen Inkubationszeit wurde die Luciferase-Aktivität ermittelt. Das *Stop&Glo*-Reagenz enthielt zusätzlich zum *Renilla*-Luciferase-Substrat eine Substanz, die die über die *Firefly*-Luciferase freigesetzte Biolumineszenz inhibiert. Für die Auswertung der Testergebnisse wurde folgende Formel verwendet.

$$\text{Reporteraktivität} = \frac{[\text{Messwert (Firefly – Luciferase)} - \text{Messwert (Hintergrund)}]}{[\text{Messwert (Renilla – Luciferase)} - \text{Messwert (Hintergrund)}]}$$

Es wurde der Mittelwert aus einer dreifachen Bestimmung berechnet und die entsprechende Standardabweichung ermittelt. Die erhaltenen Daten wurden graphisch dargestellt.

3.1.6 Immunfluoreszenz-Analysen

Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Signale von einzelnen Zellen detektiert und analysiert werden. Die Zellen werden hinsichtlich ihrer Größe und Granularität unterschieden. Diese Methode ermöglicht ebenfalls die Analyse des Zelltods und des Zellzyklus. Unter Verwendung spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper können quantitative Aussagen zur Oberflächenakkumulation bestimmter Proteine gemacht und das Vorhandensein von intrazellulären Proteinen überprüft werden.

Nachweis intrazellulärer Proteine

Um intrazelluläre Proteine färben zu können, müssen die Zellen vorher permeabilisiert und fixiert werden. Hierzu wurde das *Cytofix/Cytosperm* Kit der Firma Becton Dickinson verwendet. Jeweils $1-2 \times 10^5$ Zellen/ml wurden in einer 96-Loch-Spitzbodenplatte

zentrifugiert (1000 rpm, 4°C, 4 min) und einmal mit 100 µl kaltem Waschpuffer (PBS mit 1 % BSA und 0,1 % NaN₃) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl *Cytofix/Cytosperm*-Lösung resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit je 100 µl Perm-Waschlösung wurden die abzentrifugierten Zellen in einer Perm-Waschlösung plus Antikörper aufgenommen und 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgten erneut zwei Waschschrritte mit der Perm-Waschlösung, bevor die Zellen in 1 % PFA-Lösung fixiert wurden. Die durchflusszytometrische Analyse wurde spätestens 48 Stunden nach der Färbung durchgeführt.

Zellzyklusanalyse

Über die Analyse des Zellzyklus können Aussagen über Zellproliferationsraten innerhalb einer Zellpopulation gemacht werden. Die Zellen lassen sich auf Grund ihres DNA-Gehalts in 5 verschiedene Zellzyklusphasen einteilen. Um diese Phasen im Durchflusszytometer zu analysieren, verwendet man den Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid (PJ). Dieser Farbstoff interkaliert in doppelsträngige Nukleinsäuren. So wird die Unterscheidung zwischen den verschiedenen Zellzyklusphasen durch die Analyse des gemessenen PJ pro Zelle ermöglicht.

Für die Analysen wurden 2-4 x 10⁶ Zellen verwendet. Für die Färbung wurden diese in ein 15 ml-Röhrchen überführt und zweimal mit 1 ml PBS/EDTA (2 mM) gewaschen und anschließend in 500 µl PBS/EDTA (2 mM) aufgenommen. Zur Fixierung wurden die Zellen unter langsamem Schütteln tropfenweise mit 500 µl eiskalten Ethanol versetzt und 30 min bei 4°C inkubiert. Nach anschließendem Zentrifugieren (5 min, 1600 rpm) wurden die Zellen in 100 µl PBS/EDTA (2 mM) aufgenommen und mit 4 µl RNase A (1 mg/ml) und 100 µl PJ (50 µg/ml) versetzt. Bis zur Analyse am Durchflusszytometer wurden die Zellen 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Analyse erfolgte bei 560-640 nm und wurde mit der Software WinMDI ausgewertet. Zur Dubletten-Diskriminierung wurde im FL-2A/FL-2W-Dotplot eine definierte Region, die nur Einzelzellpopulationen enthält, zur Auswertung markiert. Die quantitative Beurteilung der Zellzyklusphasen erfolgte im FL-2A-Histogramm.

Immunfluoreszenz-Färbungen für die konfokale Mikroskopie

Färbung ausgesäter Zellen

Autoklavierte Objektträger wurden in einer passenden Kulturschale steril mit FKS benetzt und 60 min getrocknet. Anschließend wurden diese mit wenig Kulturmedium bedeckt. Daraufhin wurden ca. 2 x 10⁶ Zellen pro ml transient transfizierter oder untransfizierter Zellen tröpfchenweise auf fünf Objektträger verteilt und mit ausreichend Kulturmedium bedeckt. Die

Kultivierung erfolgte bei 37°C für 24-72 h. Für die folgende Immunfluoreszenz-Färbung wurden die zellbewachsenen Objektträger zunächst in einem Glasbehälter 3-mal unter Schütteln mit PBS gewaschen und anschließend 10 min bei -20°C mit eiskaltem Methanol permeabilisiert und fixiert. Daraufhin folgten erneut drei Waschschriffe mit PBS, bevor die Proben mit 10 %iger (w/v) BSA/PBS-Lösung für 1 h bei RT blockiert wurden. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für eine Stunde bei RT mit dem Primärantikörper gefärbt. Anschließend wurden die Proben gewaschen, bevor sie mit dem fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper eine Stunde bei RT im Dunklen inkubiert wurden. Eine Minute vor Ablauf der Zeit wurde zur Visualisierung der Zellkerne mit 1 µl einer DAPI-Lösung (1:1000 in 10 % BSA) für eine Minute gefärbt. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Alle verwendeten Antikörper wurden in 10 % BSA nach Herstelleranweisung oder nach vorheriger Optimierung verdünnt. Zum Schluss wurden die Zellen mit Eindeckmedium und Deckgläschen eingedeckt. Je nach Fragestellung wurden Doppelfärbungen oder Färbungen mit direktmarkierten Antikörpern durchgeführt.

Färbung von Zytozentrifugen-Präparaten

Um Zellen schnell auf Objektträgern zu fixieren, kann die Zytozentrifuge verwendet werden. Für die Fertigung entsprechender Präparate wurden 1×10^5 Zellen in PBS gewaschen und anschließend in 1 ml 10 %iger (w/v) BSA/PBS-Lösung aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in entsprechende Zentrifugenaufsätze pipettiert, um über eine anschließende 3 minütige Zentrifugation (800 rpm) auf unbeschichtete Objektträger aufgebracht zu werden. Die Präparate wurden ca. 1-2 h luftgetrocknet. Die Färbung erfolgte wie für die ausgesäten Zellen beschrieben.

3.1.7 Analyse lebender Zellen (Zellimpedanz-Messung)

Mit Hilfe des xCELLigence-Systems der Firma Roche können geringste Veränderungen innerhalb der Zellkultur direkt erfasst werden. Dieses System ermöglicht die Analyse von Zellproliferation, Apoptose, Adhäsion, Zellinvasion und Migration über Messung des Wechselstromwiderstands (Impedanz) auf einer Goldelektrode. Die Zellen verhalten sich aufgrund ihrer isolierenden Plasmamembran wie dielektrische Partikel. Dies führt mit Zunahme der Zellkonfluenz zu einem Anstieg der Impedanz.

Für dieses Testsystem wurden die passenden 96 Loch E-Platten der Firma Roche verwendet. Es wurden 5×10^3 adhärenente Zellen pro Vertiefung und pro 100 µl ausgesät. Zunächst wurde die E-Platte mit 50 µl Kulturmedium befüllt und in das xCELLigence Gerät eingesetzt. Mit Hilfe der RTCA (*real time cell analyzer*)-Software wurde über 30 min jede

Minute die Impedanz gemessen und als Null-Wert gespeichert. Nun wurde 50 µl der entsprechenden Zellsuspension in jede Vertiefung pipettiert. Jede Probe wurde als vierfacher Wert aufgetragen. Nach erneutem Einsetzen der E-Platte in das xCELLigence Gerät wurde in Abständen von 5 Minuten die Impedanz aller Vertiefungen gemessen und gespeichert. Die Zellen wurden zwischen 48-110 h analysiert. Zur Überprüfung der Zellproliferation wurden die Zellen ca. 16 h vor Abbruch der Zellimpedanz-Messung für einen BrdU-Assay (Abschnitt 3.2.13) vorbereitet.

3.2 Biochemische Methoden

3.2.1 Herstellung monoklonaler Antikörper

Immunisierung der Balb/c-Mäuse

Zur Herstellung monoklonaler CT45-spezifischer Antikörper wurden 3 weibliche Balb/c-Mäuse immunisiert. Für die ersten drei Immunisierungen wurde das GST-CT45-Fusionsprotein in PBS (25 µg in 100 µl PBS pro Immunisierung) im Abstand von 10 Tagen subkutan appliziert. Anschließend wurde den Mäusen zur Überprüfung des CT45-Antikörpertiters Blut aus der Schwanzvene entnommen. Zur Verstärkung der Antikörperproduktion folgten weitere intraperitoneale Immunisierungen. Die erste Immunisierung erfolgte mit dem GST-CT45-Fusionsprotein in PBS (25 µg/100 µl). Danach schlossen sich im Abstand von sieben Tagen zwei weitere Applikationen mit CT45-Immupräzipitaten (Abschnitt 3.2.6), gebunden an Protein-G-SepahroseTM4B in 100 µl PBS, an.

Zellfusion zwischen murinen Milzzellen und Myelomzellen

Zur Überlebenssicherung der Immunglobulin-produzierenden murinen Lymphozyten in der Zellkultur erfolgte die Fusion mit der murinen Myelom-Zelllinie Ag8.653. Die hervorgehenden Zellhybride, die Hybridomzellen, sind unbegrenzt teilbar und produzieren zudem die gewünschten Antikörper.

Hierzu wurde die Milz der Mäuse steril entnommen und zunächst 3-mal in PBS gewaschen. Die präparierte Milz wurde daraufhin mit Pinzetten zerkleinert und das Milzgewebe in 50 ml PBS aufgenommen. Nachdem grobe Gewebestücke sedimentiert waren, wurde der zellhaltige Überstand in eine neues Gefäß überführt und 10 min bei 1000 rpm (RT) zentrifugiert. Die Zellen wurden erneut in PBS gewaschen und gezählt. Die Ag8.653 Zellen wurden ebenfalls einmal in PBS gewaschen und gezählt.

Für die Fusion wurden Milzzellen und Ag8.653-Zellen im Verhältnis 3:1 eingesetzt. Etwa ein Zehntel der Milzzellen wurden als *Feeder-Cocktail* zurückgehalten. Milz- und Ag8.653-Zellen wurden zusammen in einem Gefäß abzentrifugiert (5 min, 800 rpm, RT), der Überstand abgenommen und die Zellen durch leichtes Schwenken in einem Rest PBS resuspendiert. Daraufhin wurde 1 ml auf 37°C vorgewärmtes Polyethylenglycol (PEG) 1500 unter ständigem leichtem Schwenken innerhalb von 90 sec tropfenweise auf die Zellen gegeben. Direkt im Anschluss wurden 5 ml 37°C warmes PBS unter langsamen Schütteln tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Das PEG permeabilisiert die Zellmembran und ermöglicht so die Zellfusion. Damit fusionierte Zellen nicht auseinandergerissen werden, wurde sehr vorsichtig pipettiert und geschwenkt. Die Zellsuspension wurde mit den *Feeder*-Zellen in 250 ml vorgewärmtes HAT-Medium gegeben, auf zehn 24-Loch-Klonierungsplatten verteilt und bei 37°C kultiviert. Das HAT-Medium ermöglicht die Selektion erfolgreich fusionierter Zellen.

Selektion und Klonierung von Hybridomzellen

Nicht fusionierte Maus-Lymphozyten sterben mit der Zeit ab, wohingegen die Myelomzellen nach kurzer Zeit die Hybridome überwachsen würden. Um dieses zu verhindern, macht man sich einen Defekt der eingesetzten Myelomzellen (Ag8.653) im Nukleinsäurestoffwechsel zu nutze. Normalerweise kann die Nukleinsäuresynthese über einen Haupt- und einen Reservestoffwechselweg erfolgen. Der Hauptweg wird über den Zusatz von Aminopterin im HAT-Medium blockiert. Der Zusatz vom Hypoxanthin und Thymidin im HAT-Medium induziert gleichzeitig den Reservestoffwechselweg. Den Ag8.653 Zellen fehlt allerdings das für den Reserveweg notwendige funktionelle Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT). Dadurch reagieren die Zellen sensitiv auf den Zusatz von HAT (Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin). Die Purinsynthese wird blockiert und nicht fusionierte Ag8.653-Zellen sterben ab.

Die kultivierten Hybridome wurden alle 2-3 Tage, über einen Zeitraum von zwei Wochen, mit HAT-Medium versorgt. Anschließend wurde RPMI1640-Zellkulturmedium zur weiteren Kultivierung verwendet. Nachdem die Zellklone gut sichtbar waren, wurde der Kulturüberstand zum Nachweis spezifischer sezernierter Antikörper verwendet. Die Analyse erfolgte über den ELISA (Abschnitt 3.2.12) sowie über Immunfluoreszenz-Färbungen (Abschnitt 3.1.6). Es wurden alle gut wachsenden Hybridome ausgewählt, vereinzelt und weiter vermehrt. Zudem wurden die Hybridome kryokonserviert.

3.2.2 Anreicherung und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Zur Anreicherung rekombinanter GST-Fusionsproteine wurden transformierte Bakterien für 16-18 Stunden in 100 ml sterilem LB-Medium, unter Zusatz von 50 µg/ml Ampicillin, bei 37°C schüttelnd inkubiert. 33 ml dieser Vorkultur wurden anschließend in 330 ml LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin) gegeben und für weitere 4-5 Stunden expandiert. Nach einer Stunde wurde die Expression der Fusionsprotein-Gene durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension zentrifugiert (5000 rpm, 15 min, 4°C), der Überstand verworfen und das Bakteriensediment in 27 ml PBS resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wurden diese dreimal für jeweils drei Minuten mit Ultraschall behandelt und nach Zugabe von 3 ml 10 %igem Triton X-100 weitere 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellreste bei 13000 rpm für 30 min (4°C) abzentrifugiert. Die Proteine befinden sich in der Regel im Überstand, so dass dieser zur Präzipitation der GST-Fusionsproteine mit 1 ml Glutathion-Sepharose-4B (50 % (v/v) in PBS) versetzt wurde. Die Glutathion-Sepharose-4B wurden über Nacht bei 4°C mit dem Überstand rotiert. Um die Fusionsproteine von den Glutathion-Sepharose-4B zu lösen, wurden diese zunächst bei 4°C abzentrifugiert und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Daraufhin wurde mit 1 ml Elutionspuffer 3-5-mal für 10 min bei RT eluiert. Nach jedem Schritt wurde der Überstand abgenommen und die Proteinkonzentration photometrisch ermittelt. Nach vollständiger Elution wurde die Lösung über entsprechende Filtereinsätze mit PBS umgepuffert (1-2 h, 2000 rpm, 4°C). Je nach Proteingröße wurde die Porengröße der Filter angepasst. Die Konzentration der GST-Fusionsproteine wurde anschließend auf 1 mg/ml eingestellt. Aliquots wurden bei -80°C eingefroren. Die Reinheit der Proteine wurde über eine anschließende SDS-PAGE mit zusätzlicher Coomassie-Färbung überprüft.

3.2.3 Zelllysate für SDS-Page und Western Blot-Analysen

Während meiner Arbeit wurden verschiedene Lysepuffer und Bedingungen verwendet. Als Standardpuffer wurde ein 2 %iger Triton X-100-Puffer eingesetzt. Dem Puffer wurden zur Verhinderung von Proteindegradationen und Modifikationen Inhibitoren (Complete®- und PhosSTOP®-Tabletten, 1:10 (w/v)) sowie 0,02 % (v/v) EDTA zugesetzt. Für einige Fragestellungen erwies sich ein 1 %iger NP40-Puffer, in dem entsprechende Inhibitoren enthalten waren, als geeigneter.

Vor der Lyse wurden die Zellen zunächst dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der Überstand komplett entfernt und je nach Zellzahl eine bestimmte Menge Lysepuffer mit den Zellen resuspendiert. Je nach Fragestellung wurden grob gereinigte Kernlysate oder Gesamtzelllysate hergestellt. Für die grob gereinigten Kernlysate wurden die Zellen zunächst

2 min mit dem Lysepuffer auf Eis inkubiert und anschließend mittels *Quickspin* zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen und auf Eis gestellt. Das Sediment wurde erneut mit Lysepuffer für 20 min bei 4°C inkubiert und als grob aufgereinigtes Kernlysate verwendet. Für Gesamtzelllysate wurden die Zellen 20-30 min (bei 4°C) mit dem Lysepuffer inkubiert. Nach der Zelllyse wurden die Proben 10 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt für weitere Analysen verwendet oder bei -20°C eingefroren.

3.2.4 Fraktionierung von Zytoplasma- und Kernproteinen

Zur Fraktionierung von Zytoplasma- und Kernlysaten wurde das ProteoJET™ *Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction Kit* der Firma Fermentas verwendet. Die Probenaufarbeitung erfolgte entsprechend der Herstelleranweisung. Alle verwendeten Puffer wurden vor Verwendung mit 0,1 M DTT und den Protease/Phosphatase-Inhibitoren Complete® bzw. PhosSTOP® (1:10 (w/v)) versetzt. Zur Lyse wurden die Zellen einmal in PBS gewaschen, anschließend in *Cell lysis*-Puffer 10 min auf Eis inkubiert und daraufhin 7 min bei 500 x g zentrifugiert (4°C). Das Verhältnis zwischen Zellsediment und *Cell lysis*-Puffer betrug 1:10. In der Regel wurden $2-4 \times 10^6$ Zellen lysiert. Anschließend wurde der Überstand als Zytoplasmafraktion abgenommen, bei 20000 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert und zur weiteren Analyse verwendet. Das Sediment wurde 2-mal mit 500 µl *Nuclei washing*-Puffer gewaschen (Waschvorgang: 2 min auf Eis, anschließend 7 min bei 500 x g und 4°C zentrifugiert). Das Sediment wurde daraufhin in 150 µl *Nuclei storage*-Puffer + 15 µl *Nuclei lysis* Reagenz aufgenommen und 15 min bei 4°C und 1200 rpm geschüttelt. Zur Abtrennung von unlöslichem Material wurden die Proben daraufhin bei 20000 x g, 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde als Kernfraktion zusammen mit der Zytoplasmafraktion direkt für weitere Analysen verwendet oder bei -20°C eingefroren.

3.2.5 *In vivo* Tubulin Polymerisations-Assay

Diese Methode wurde von Wang et al. (2010) beschrieben und von mir übernommen. Die verwendeten Zellen wurden zunächst 2-mal in PEM-Puffer gewaschen (5 min, 1400 rpm, RT). Alle Puffer wurden vor Verwendung mit den Protease-Inhibitoren Complete® und PhosSTOP® (1:10, (w/v)) versetzt. Anschließend wurden die Zellen 30 min bei 37°C in einem 0,05 % Triton X-100 haltigem PEM-Puffer lysiert und daraufhin 30 min bei 15000 x g und 4°C zentrifugiert. Nun sollte sich polymerisiertes Tubulin im Sediment befinden und das Lösliche im Überstand. Der Überstand wurde abgenommen und direkt für weitere Analysen verwendet. Das Sediment wurde ein weiteres Mal in PEM-Puffer gewaschen und ebenfalls für weitere Analysen verwendet.

3.2.6 Immunpräzipitation

Koimmunpräzipitation von Proteinen

Um spezifische Proteine zu präzipitieren, wurde der gewünschte Antikörper nach Herstellerangaben zusammen mit 60 µl Protein G-Sepharose (50 % (v/v) in PBS) zu den entsprechenden Zelllysaten gegeben und 2-3 h bei 4°C rotiert. Es wurden 5×10^7 Zellen pro Ansatz verwendet. Anschließend wurde die Protein G-Sepharose, an der die Antikörper mit den präzipitierten Protein binden, abzentrifugiert und je nach Fragestellung gewaschen. Um ein aufgereinigtes Protein zu erhalten, wurde 2-mal mit *Low wash*-Puffer, 2-mal mit *High wash*-Puffer und erneut 2-mal mit *Low wash*-Puffer gewaschen. Diese Waschschriffe lösen leicht gebundene, kopräzipitierte Proteine. Um wiederum kopräzipitierte Proteine zu analysieren, wurde die Protein G-Sepharose 4-mal in Lysepuffer und anschließend 2-mal in PBS gewaschen. Nach den Waschschriffen wurde der Überstand vollständig abgenommen und die Protein G-Sepharose im Verhältnis 1:1 mit Lysepuffer verdünnt und in Probenpuffer aufgekocht (5 min, 100 °C). Die Analyse präzipitierter Proteine erfolgte nach der Auftrennung der Proben über eine SDS-Gelelektrophorese und anschließenden Western Blot.

Koimmunpräzipitation von mRNA

Zur Koimmunpräzipitation (Kolp) von mRNA wurden zunächst 1×10^7 Zellen pro Ansatz in 1 ml RSB100-Puffer + 0,5 mg/ml Digitonin aufgenommen und 20 min bei 4°C lysiert. Die Lysate wurden zunächst 5 min bei 1500 x g (4°C) zentrifugiert und der Überstand anschließend weitere 15 min bei 4000 x g (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde nun mit 100 µl Protein A-Sepharose (50 % (v/v) in RSB100-Puffer) versetzt. Für die Kolp wurden die Proben mit 5 µg des Syncrip-Antikörpers (Abcam) versetzt und 2 Stunden bei 4°C rotiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt, die Protein A-Sepharose dreimal mit NET-2-Puffer + 0,5 % (v/v) Triton X-100 gewaschen und 1:1 mit RSB100-Puffer versetzt. Die Protein A-Sepharose wurde 1:1 geteilt. Eine Hälfte wurde mit 3 x Probenpuffer versetzt, bei 100 °C 5 min inkubiert und über eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot analysiert. Die zweite Hälfte wurde zur Gewinnung von mRNA verwendet. Hierzu wurde das RNeasy Kit der Firma Qiagen nach Anleitung verwendet (Abschnitt 3.4.1). Anschließend wurde die isolierte mRNA in cDNA umgeschrieben (*First Strand cDNA Synthesis Kit*, Fermentas, Abschnitt 3.4.4). Zur Analyse der interagierenden mRNA wurden die entsprechenden cDNA-Sequenzen mit den spezifischen Primern während einer regulären PCR (Abschnitt 3.4.5) amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und über die Färbung mit Ethidiumbromid visualisiert und dokumentiert.

3.2.7 Präzipitation von GST-Fusionsproteinen

Zur Präzipitation von GST-Fusionsproteinen mit interagierenden Proteinen, wurden zunächst 5×10^6 Zellen lysiert. Anschließend wurden 25 µg des Fusionsproteins zusammen mit dem Zelllysate und 50 µl Glutathion-Sepharose (50 % (v/v) in PBS) für 2-3 h bei 4°C rotiert. Die Glutathion-Sepharose wurde anschließend abzentrifugiert, 3-mal in eiskaltem Lysepuffer und 2-mal in PBS gewaschen, bevor sie 1:1 mit Lysepuffer verdünnt und in Probenpuffer aufgekocht (5 min 100°C) wurde. Die Proben wurden mittels SDS-Gelelektrophorese separiert und über den Western Blot analysiert.

3.2.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe der Bradford-Methode (Pierce, 1976). Als Reagenz wurde Coomassie-Brilliant Blau G-250 verwendet. Dieser Triphenylmethan-Farbstoff bildet blaue Proteinkomplexe, die ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 595 nm zeigen. Die photometrische Messung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Zur Leerwertbestimmung wurde das Coomassie-Reagenz mit dem entsprechenden Lysepuffer versetzt. Es wurden jeweils 5 µl Proteinlösung bzw. Lysepuffer mit 995 µl Coomassie-Reagenz in Reaktionsgefäßen vermischt. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit bei RT wurde die Absorption in Halbmikroküvetten photometrisch gemessen. Eine im Photometer gespeicherte Standard-Eichkurve führte zur Ermittlung der jeweiligen Proteinkonzentration.

3.2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)-PAGE ermöglicht eine Größenauftrennung von Proteinen. Durch Verwendung eines Proteinstandards kann die jeweilige Proteingröße festgestellt werden. Damit sich die Proteine nach Größe, und nicht wie es beim Anlegen einer elektrischen Spannung zu erwarten wäre nach spezifischer Ladung auftrennen, wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt und aufgekocht. Das stark negativ geladene Detergenz SDS denaturiert die Proteine, lagert sich zudem an hydrophobe Regionen und maskiert die spezifischen Ladungen. Damit auch Disulfidbrücken gespalten werden, wird dem Probenpuffer zusätzlich das Reduktionsmittel β-Mercaptoethanol zugesetzt. Bromphenolblau markiert die Lauffront während der Elektrophorese und läuft aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften vor der Proteinfront. Die SDS-PAGE wurde auf zwei verschiedenen Wegen durchgeführt, dem Protean II-System der Firma BioRad und dem

Ettan DALTsix-System von GE Healthcare. Dieses zweite System wurde ausschließlich für 2D-Gelelektrophoresen genutzt.

Protean II-System (BioRad)

Damit eine optimale Auftrennung der Proteine stattfinden kann, wurde die Acrylamidkonzentration des Trenngels der Größe der zu untersuchenden Proteine angepasst. Um eine ebene Oberfläche im Trenngel zu erreichen wurde dieses mit 96 % Ethanol überschichtet. Nachdem die Polymerisation des Gels abgeschlossen war, wurde das Ethanol abgegossen und Reste durch Spülen mit destilliertem Wasser entfernt. Nun wurde das Sammelgel aufgegossen und der Proteinkamm luftblasenfrei eingesetzt. Der Gesamtproteingehalt der zu analysierenden Proben betrug 20-50 µg. Die Proben wurden mit einem Drittel des Endvolumens an Probenpuffer versetzt und 5 min bei 100 °C aufgeköcht. Nun wurden die Proben in die mit Laufpuffer gefüllten Taschen überführt. Aufgekochte Präzipitate auf Protein-G- oder Gluthation-Sepharose wurden direkt in die trockenen Geltaschen pipettiert und anschließend mit Laufpuffer überschichtet. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei 50-60 V oder über Tag bei angeschlossener Kühlung (konstant 20°C) und 250 V.

Coomassie-Färbung

Proteine können in Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Brilliant Blue angefärbt werden. Dazu wurden die Gele für 1-5 Stunden in einer Färbelösung inkubiert, danach entfärbt und schließlich eingescannt und dokumentiert.

Ettan DALTsix-System (GE Healthcare)

Auch bei Verwendung des Ettan DALTsix-Systems wurde die Acrylamidkonzentration den Anforderungen entsprechend angepasst. Die Acrylamidlösung wurde für mindestens zwei Stunden entgast und anschließend luftblasenfrei über die Rinne des *Gelcasters* bis ca. 1 cm unter das Plattenende gegossen. Um die Entstehung eines homogenen Acrylamidgels zu garantieren, wurde 1,5 ml einer Verdrängungslösung hinzugegeben. Dies verhindert, dass sich beim Auspolymerisieren entstehende Hitze am Boden der Kammer bildet. Auch ein langsames, gleichmäßiges Polymerisieren ist entscheidend für die Homogenität des Gels. Dies wurde durch empirisch bestimmte TEMED- und APS-Konzentrationen erreicht. Abschließend wurden die Gele mit fein vernebeltem destilliertem Wasser überschichtet. Die Kammer wurde mit Paraffin bedeckt und zum Auspolymerisieren über Nacht bei RT gelagert. Die reduzierten, alkylierten IPG-Streifen (siehe isoelektrische Fokussierung) wurden mit niedrig schmelzender Agarose in den mit destilliertem Wasser gewaschenen Geltaschen

fixiert. Für die Elektrophorese wurde zunächst die untere Pufferkammer mit 1 x Laufpuffer befüllt, anschließend die obere Kammer mit doppelt konzentriertem Laufpuffer. Gestartet wurde die Auftrennung für eine Stunde bei 10 mA/Gel, daraufhin 12-14 mA/Gel bei konstant 20°C über Nacht.

3.2.10 Western Blot

Der Transfer der separierten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte durch das *Tank-Blotting*. Die Komponenten der Transferkammer wurden zunächst im Western Blot-Transferpuffer equilibriert. Die einzusetzende Transfer-Kassette wurde von der Kathode zur Anode wie folgt zusammengesetzt: Schwamm, zwei *Whatman*-Papiere, Gel, Nitrozellulose-Membran, zwei *Whatman*-Papiere, Schwamm. Anschließend wurde diese in die Transferkammer gesetzt. Der Transfer erfolgte bei 4°C und 0,8 Ampere für zwei Stunden oder bei 0,15 Ampere über Nacht. Die Effizienz des Transfers wurde mit einer Ponceau S-Färbung überprüft. Hierzu wurde die Membran mit destilliertem Wasser gespült, anschließend für ca. 10 min mit der Ponceau S-Färbelösung gefärbt, überschüssige Lösung abgewaschen und das Ergebnis dokumentiert. Entfärbt wurde anschließend mit TBS, bevor die Membran mit 5 % BSA blockiert wurde. Nach kurzem Waschen mit TBS-T wurde der Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung (in TBS-T) über Nacht oder für eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für zehn Minuten mit TBS-T gewaschen, bevor sie für eine Stunde bei RT mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (1:7500 in TBS-T) inkubiert wurde. Nach drei weiteren Waschschrritten wurden die HRP-markierten Proteine über Inkubation mit einem ECL-Detektionsreagenz und nachfolgender Belichtung von Hyperfilm-ECL Filmen visualisiert. Teilweise erfolgte eine densitometrische Auswertung der Filme mit dem Flachbettscanner GS-800 von BioRad und der dazugehörigen *Quantatly One* Software.

3.2.11 2D-Gelelektrophorese

Vorbereitung

Mittels 2D-Gelelektrophorese lassen sich Proteine in der ersten Dimension anhand ihrer spezifischen Eigenladung (pI) und in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht (MW) auftrennen. Für die Probenanalyse wurden zunächst Streifen (immobiline *DryStrips*, pH 3-11 NL) mit einem in einer Acrylamidmatrix immobilisierten pH-Gradienten in einem entsprechenden Volumen *DeStreak*-Lösung (GE Healthcare) und 0,5 % Ampholyten rehydriert. Um die Austrocknung und Oxidation der Streifen während der etwa 10-stündigen Rehydrierung zu verhindern, wurden diese in Quellschalen mit je 3 ml Mineralöl (*DryStrip Cover Fluid*, GE Healthcare) überschichtet.

Markierung der Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen

Um eine differentielle Gelelektrophorese durchzuführen, wurden Fluoreszenzfarbstoffe (Cy2, Cy3 und Cy5) verwendet. Die Farbstoffe binden kovalent über reaktive N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Ester an primäre Amine. Für die DIGE-Versuche wurden nur durchschnittlich 3 % der Gesamtproteine fluoreszenzmarkiert (Minimalmarkierung). Es wurden 50 µg Protein mit 400 pmol der in 1 mM DMF-Lösung konstituierten Fluorochrome (CyDye) markiert (30 min, 4°C, pH 8,5). Gestoppt wurde die Reaktion über Zugabe von 1 µl Lysin (10 mM) für 10 min auf Eis. Dies führte zur Absättigung der reaktiven CyDyes. Zum Schluss wurden die verschieden markierten Proben vereinigt und isoelektrisch fokussiert.

Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Die zu analysierenden Proben wurden zunächst mit dem gleichen Volumen 2D-Probenpuffer (+ 2 % (v/v) Ampholyte, + 2 % (w/v) DTT) versetzt, 10 min auf Eis inkubiert und ultrazentrifugiert (180.000 x g, 20 min, 4°C). Die vorbereiteten IPG-Streifen wurden entsprechend der Markierungen auf der Keramik-Vorrichtung der IPGphor (GE Healthcare) platziert. Die Enden der Streifen wurden mit in Wasser getränkten Filterpapieren bedeckt, um anschließend dort die Elektroden zu befestigen. Die Proben wurden nun mittels Napf-Beladung (*cup loading*) appliziert, die Streifen in der Keramik-Vorrichtung mit Öl bedeckt und das Programm für die isoelektrische Fokussierung (IEF) gestartet. Das Limit für die anliegende Stromstärke wurde auf 75 µA pro Streifen festgesetzt. Die totale Fokussierungszeit betrug durchschnittlich 65-70 kWh.

SDS-PAGE (2. Dimension)

Für die anschließende SDS-PAGE wurden die Streifen nach Beendigung der isoelektrischen Fokussierung für 15 min reduziert und für weitere 15 min alkyliert. Nun konnte die gewaschene Geltasche des SDS-Gels mit den kurz in zweifachem Laufpuffer gespülten Streifen beladen werden.

3.2.12 Enzyme-linked Immunosorbant Assay (ELISA)

Der ELISA basiert auf der spezifischen Antigenerkennung durch einen entsprechenden Antikörper. Die erfolgreiche Antigen/Antikörperbindung wird über eine Farbreaktion quantifiziert. Dieser Test wurde zur Identifizierung von Hybridomzellen, die CT45-spezifische Antikörper sezernierten, verwendet. Die verwendeten 96-Loch *Mikrosorb*-Flachbodenplatten wurden zunächst mit 3 µg des GST-CT45-Fusionsproteins pro ml Carbonatpuffer (100 µl pro Vertiefung) für 2 Stunden bei RT beschichtet. Anschließend wurden die Überstände verworfen und die Platten mit 1 % (w/v) Gelatinelösung (200 µl pro Vertiefung) eine Stunde

bei RT blockiert. Als positive Kontrolle wurde der Ki-A10-Antikörper verwendet, als negative Kontrolle Maus-Normalserum (1:3000 in Waschpuffer). Getestet wurden zum einen Seren der immunisierten Mäuse, zum anderen Hybridomüberstände während der Klonierung (Abschnitt 3.6.1.). Nach Ausschlagen der Blockierungslösung wurden 100 µl positive/negative Kontrolle bzw. Serum in verschiedenen Verdünnungen (in Waschpuffer) oder Hybridomüberstand inkubiert (1 h, RT). Es folgten 3 Waschgänge mit je 200 µl Waschpuffer. Der Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper (1:1000 in Waschpuffer, 100 µl pro Vertiefung) wurde anschließend ebenfalls 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde einmal mit PBS gewaschen und die Substratlösung (100 µl pro Vertiefung) hinzugegeben. Die Platten wurden 2-10 min im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde mit 12,5 %iger Schwefelsäure (20 µl pro Vertiefung) gestoppt. Der Farbumschlag wurde im Mikrotiterplatten-Photometer bei 450 nm gemessen.

3.2.13 Messung der Zellproliferation

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurden zwei verschiedene Testsysteme verwendet. Zum einen der *CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega), der nach dem Prinzip des MTS (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium)-Assay funktioniert. Als zweites Testsystem wurde das 5-Brom-2'-desoxyuridine (BrdU) *Labeling and Detection Kit III* der Firma Roche verwendet. Dieser Test funktioniert analog zu dem [³H]-Thymidin-Einbau.

MTS-Assay (Promega)

Diese Methode basiert auf einem kolorimetrischen Farbumschlag, der die Menge an lebenden Zellen quantifiziert. MTS wird im Zusammenhang mit dem Elektronen-koppelnden Reagenz PMS (Phenazin Methosulfat) in metabolisch aktiven Zellen, von NADPH-Dehydrogenasen, zu einem löslichen Formazan reduziert. Die damit verbundene Farbreaktion kann bei 490 nm detektiert werden.

Für den Test wurden 5×10^3 adhärenente Zellen in 100 µl Kulturmedium pro Vertiefung einer 96-Lochplatte ausgesät. Suspensionszellen wurden in einer Konzentration von 5×10^4 pro 100 µl Kulturmedium und Vertiefung ausgesät. Die Zellen wurden 24-72 h kultiviert. Anschließend wurde 20 µl der MTS/PMS-Lösung zu den Zellen gegeben und 1-4 h bei 37°C inkubiert. Die Messung erfolgte im Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 492 nm. Alle Messungen wurden als Triplets durchgeführt und anschließend gemittelt.

BrdU-Assay (Roche)

BrdU wird analog zu [³H]-Thymidin in die DNA sich teilender Zellen eingebaut. Mit einem spezifischen Antikörper gegen BrdU lässt sich die Menge an eingelagertem BrdU ermitteln und es können Rückschlüsse auf die Proliferationsrate der Zellen gemacht werden.

Zunächst wurden 5×10^3 adhärenente Zellen (in 100 µl), bzw. 5×10^4 Suspensionszellen (in 200 µl), pro Vertiefung einer 96-Lochplatte ausgesät. Die Zellen wurden 24-72 h kultiviert. 2-18 Stunden vor Versuchsdurchführung wurden die Zellen mit 10 µM BrdU *Labeling Solution* inkubiert. Als Waschpuffer wurde PBS mit 10 % (v/v) FKS verwendet. Nach jedem Inkubationsschritt wurde dreimal mit 250 µl Waschpuffer pro Vertiefung gewaschen. Nach Entfernung des Kulturmediums wurden adhärenente Zellen direkt mit je 200 µl eiskalter Fixierlösung (70 % Ethanol, 0,5 M Salzsäure) bei -20°C für 30 min fixiert. Suspensionszellen wurden zunächst 10 min 300 x g zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Zellen 2 Stunden bei 60°C getrocknet. Anschließend wurden die Zellen ebenfalls fixiert. Um die DNA in Lösung zu bringen wurde anschließend mit je 100 µl Nukleaselösung (1:100 in Waschpuffer) 30 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Proben mit je 100 µl anti-BrdU-POD (1:100 in PBS+10 mg/ml BSA) für 30 min bei 37°C gefärbt. Nach dem letzten Waschgang wurden die Proben mit je 100 µl Peroxidase-Substrat für 2-30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Bei genügend starker Intensität des Farbumschlags wurden die Platten mit dem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 490 nm gemessen.

3.2.14 Analyse der Zelladhäsion

Zur Analyse der Zelladhäsion wurde ein entsprechender Adhäsionstest etabliert. Zunächst wurden adhärenente Zellen transfiziert (Nukleofektion) und für 24-72h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in eine 96-Lochplatte (5×10^3 Zellen pro 50 µl und Vertiefung) ausgesät und für eine Stunde inkubiert (37°C). Danach wurden die Zellen 3 min bei 3000 rpm geschüttelt, dreimal mit 200 µl Kulturmedium gewaschen und mit 50 µl 4 %igem Paraformaldehyd (in PBS) fixiert (15 min RT). Nach einem weiteren Waschgang, wurden die Zellen mit Kristallviolett-Lösung (5 mg/ml in 2 % Ethanol) für 10 min gefärbt. Es wurde anschließend mit Wasser gewaschen und die Zellen wurden mit 50 µl 2 %iger SDS-Lösung lysiert. Die Messung erfolgte anschließend im Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 550 nm.

3.2.15 Analyse der Zellmigration im 2D-Modell

Die Migration von adhärenenten Zellen wurde zum einen über den klassischen *Scratch-Assay* und zum anderen mit Hilfe eines ibidi-Zellkultureinsatzes durchgeführt. Dieser Silicon-

einsatz, bestehend aus zwei Kammern, wurde in einer Vertiefung einer 6-Lochplatte fixiert. Anschließend wurden 3×10^5 adhärenente Zellen in 70 μl Kulturmedium pro Kammer ausgesät. Versuchsabhängig wurde der Einsatz nach 24-48 h entfernt und die Migration der Zellen in den Spalt mikroskopisch über ein Kamerasystem dokumentiert. Für den *Scratch*-Assay wurden 2×10^5 Zellen pro Vertiefung in eine 6-Lochplatte gesät. Entsprechend des Versuchsansatzes wurde nach 24-48 Stunden mit einer 20 μl Pipettenspitze ein *Scratch* in die konfluente Zellschicht gekratzt. Auch hier wurde die Wanderung der Zellen in den Spalt mikroskopisch analysiert und mit einer Kamera dokumentiert.

3.2.16 Analyse der Zellmigration und Zellinvasion im 3D-Modell

Zur Analyse der Zellmigration bzw. Zellinvasion in einem dreidimensionalen System, wurde zum einen der *CytoSelect™ 24 Well-Cell Migration and Invasion Assay (8 μM)* (BioCat) für adhärenente Zellen, zum anderen der *CytoSelect™ 24 Well-Cell Migration Assay (5 μM)* (BioCat) für Suspensionszellen verwendet. Zur Untersuchung der Zellwanderung wurden *Transwell*-Einsätze genutzt, die als Migrationsbarriere zwischen den zwei Kammern eine Polycarbonatmembran mit definierter Porengröße (8 μM bzw. 5 μM) besitzen. Um das Invasionsverhalten der adhärenenten Zellen zu beurteilen, befand sich über der Polycarbonatmembran (8 μM) zusätzlich eine Basismembranmatrix. Die Analysen wurden genau nach Herstelleranweisung durchgeführt. Zur Untersuchung des CT45-induzierten Effekts auf die Migration bzw. Invasion, wurden die Zellen zunächst über die Nukleofektion mit CT45-siRNA bzw. Kontroll-scrRNA transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen abgelöst und für die Versuche verwendet. Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens adhärenenter Zellen, wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen pro 300 μl Kulturmedium (ohne FKS) in die obere Kammer des *Transwell*-Einsatzes ausgesät. Suspensionszellen wurden in einer Konzentration von 4×10^5 Zellen/100 μl FKS-freiem Medium in die obere Kammer gegeben. Für die Untersuchung der Invasion musste die Basismatrixmembran zunächst eine Stunde bei RT mit FKS-freiem Medium equilibriert werden. Anschließend wurden 3×10^5 Zellen pro 300 μl FKS-freiem Medium in die obere Kammer des *Transwell*-Einsatzes pipettiert. In die untere Kammer wurde jeweils 500 μl Kulturmedium mit 10 % FKS gegeben. Als negative Kontrolle wurden die Zellen mit 2 μM Cytochalasin D behandelt. Das Migrationsverhalten der adhärenenten Zellen wurde vier Stunden, das der Suspensionszellen sechs Stunden und das Invasionsverhalten 24 Stunden nach dem Aussäen der Zellen analysiert.

Analyse von adhärenenten Zellen

Zur Analyse der adhärenenten Zellen wurden zunächst die noch in der oberen Kammer vorhandenen Zellen mit einem feuchten Wattestäbchen entfernt. Anschließend wurden die in

die untere Kammer migrierten Zellen mit einer Färbelösung (400 µl) für 10 min bei RT gefärbt. Nach einigen Waschgängen mit $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ wurden die Zellen getrocknet (1 h, RT) und das Ergebnis durchlichtmikroskopisch dokumentiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen 10 min bei RT mit 200 µl einer Extraktionslösung schüttelnd inkubiert. 100 µl der Lösung wurden in eine 96-Loch-Flachbodenplatte übertragen und im Plattenphotometer bei 560 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Excel.

Analyse der Suspensionszellen

Zur Auswertung der Zellmigration wurden zunächst die noch an der Membranunterseite haftenden Zellen in 400 µl *Cell Detachment Solution* über 30 min bei 37°C abgelöst. Anschließend wurden 400 µl der Zellsuspension aus der unteren Kammer mit einer *Cell Detachment Solution* vereinigt und gut gemischt. 180 µl dieser Suspension wurden in eine 96-Loch-Flachbodenplatte pipettiert und mit 60 µl der 4 x *Lysis/CyQuant® GR dye solution* (1:75 Verdünnung des Fluoreszenzfarbstoffs) versetzt. Die Proben wurden 20 min bei RT inkubiert. Aus jedem Ansatz wurden 200 µl abgenommen und in eine leere Vertiefung der 96-Lochplatte gegeben. Die Auswertung erfolgte durch Messung der Emission bei 520 nm (Anregung bei 280 nm).

3.2.17 Epitopmapping

Mit Hilfe einer *Epitopmapping*-Membran der Firma JPT-Peptide Technologies, konnte das genaue Epitop der verwendeten CT45-spezifischen Antikörper analysiert werden. Auf der Membran befanden sich analog zu der CT45-Proteinsequenz 45 synthetisch hergestellte Peptidspots. In diesem Fall wurden nur lineare, kontinuierliche Bindungen der Antikörper analysiert, so dass die Peptide analog zur Primärstruktur auf die Membran aufgebracht wurden. Die Analyse der Epitope erfolgte nach Herstelleranweisung.

Vor Verwendung der *Epitopmapping*-Membran musste diese zunächst 5 min mit Methanol equilibriert werden. Nach anschließendem dreimaligem Waschen mit TBS wurde die Membran 2 Stunden mit 1 %iger (w/v) Blockierungslösung schwenkend inkubiert. Daraufhin folgte die Inkubation mit dem jeweiligen CT45-Antikörper für 3 Stunden. Vor und nach der Färbung mit dem anti-Maus HRP-konjugierten Sekundärantikörper (1h, RT), wurde 3 ml für 5 Minuten mit TBS gewaschen. Zum Schluss wurde mit dem ECL-Reagenz entwickelt. Um die Membran anschließend zu regenerieren und für weitere Antikörperreaktionen nutzbar zu machen, wurde diese zunächst dreimal für 10 min mit $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ gewaschen. Daraufhin wurde die Membran 30 min bei 50°C mit dem 2-Mercaptoethanol (100 mM)-haltigen Regenerationspuffer I inkubiert. Anschließend wurde jeweils dreimal für 10 min mit PBS und TBS-T

gewaschen. Daraufhin wurde eine Kontrollfärbung mit dem Sekundärantikörper durchgeführt. Zeigten sich nach der Entwicklung mit dem ECL-Reagenz gefärbte Proteinspots, wurde erneut regeneriert. Diesmal mit den Regenerationspuffern IIA und IIB. Der IIA-Puffer enthält zusätzlich zum 2-Mercaptoethanol 8 M Harnstoff. Es wurde zunächst zweimal 10 min mit ddH_2O gewaschen. Daraufhin wurde 10 min mit dem Regenerationspuffer IIA und anschließend 10 min mit dem Regenerationspuffer IIB inkubiert. Im Anschluss wurde jeweils zweimal mit ddH_2O und TBS-T gewaschen, bevor erneut die Kontrolle mit dem Sekundärantikörper durchgeführt wurde. Zur Lagerung bei 4°C wurde die Membran mit Methanol gewaschen (10 min, RT) und anschließend getrocknet.

3.3 Probenvorbereitung zur massenspektrometrischen Analyse

3.3.1 Zelllyse für die 2D-DIGE-Analysen

Die Lysate für die 2D-DIGE-Versuche wurden mit einem 2 %igem Triton X-100-Lysepuffer, basierend auf 30 mM Tris (pH 7,4), hergestellt. Es wurde auf PBS verzichtet, um zu verhindern, dass eine zu hohe Salzkonzentration die isoelektrische Fokussierung stört. Dem Lysepuffer wurden Protease/Phosphatase-Inhibitoren (Complete[®] und PhosSTOP[®]-Tabletten, 1:10 (w/v)) und 0,02 % (v/v) EDTA zugesetzt. Um zu verhindern, dass die zahlreichen zytoplasmatischen Proteine kernlokalisierte Proteine in dem 2D-Gel überlagern, wurden grob gereinigte Kernlysate verwendet (s. Abschnitt 3.6.2.). Nach der Proteinbestimmung wurde das Lysat 1:1 mit 2D-Lysepuffer verdünnt, in Ultra-Clear Zentrifugenröhrchen überführt und bei 68000 x g für 20 min bei 4°C ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -80°C eingefroren.

3.3.2 Dokumentation, Gelanalyse und Ausstanzen individueller Proteinspots

Die über Cy2, Cy3 und Cy5 fluoreszenzmarkierten Proteine in den 2D-Gelen konnten nach ihren spezifischen Emissionswellenlängen über den *Typhoon Trio*-Fluoreszenzscanner quantifiziert werden. Die Fluoreszenzintensität korreliert mit der Proteinmenge über einen weiten dynamischen Bereich, so dass die Auswertung mit einer geeigneten Software die Analyse von differentiell regulierten Proteinen erlaubt. Hier wurde die DIA (*Differential In-gel Analysis*) Software des DeCyder 6.5 Softwarepackets verwendet. Die Scans der verschiedenen Fluorochrome wurden in die DIA-Software geladen und die einzelnen Proteinspots nach Fluoreszenzintensität, Steilheit und Fläche analysiert. Ein berechneter Schwellenwert half bei der Festlegung von differentiellen Spots, die anschließend in die Liste der auszustanzenden Proteine übertragen wurden.

Das Ausstanzen der gewählten Proteine erfolgte nach Herstellerangaben. Die zur Gelfixierung verwendeten Glasplatten wurden funktionalisiert, in dem die hintere Platte silanisiert und die vordere mit *Repel-Silane ES* behandelt wurde. Die Liste der auszustanzenden Proteine wurde auf den Ettan-*Spotpicker* übertragen, der anhand von Referenzmarkierungen die gewählten 2 mm \varnothing Gelstücke in eine 96-Lochplatte transferierte. Das erfolgreiche Stanzen der Proteinspots wurde durch erneutes Scannen der Gele verifiziert.

3.3.3 Gelfärbungen nach der Elektrophorese

Da die CyDye-Markierungen das Molekulargewicht der Proteine verändern können, wurde eine Nachfärbung der Gele mit Fluoreszenzfarbstoffen vorgenommen.

Sypro Ruby-Färbung

Die Gele wurden für 3 Stunden fixiert und anschließend über Nacht mit Sypro Ruby gefärbt. Entfärbt wurde zweimal für 30 min. Daraufhin wurde das Gel zweimal 5 min mit $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ gewaschen. Das Ergebnis der Färbung wurde den Herstellerangaben zur Folge mit einer Anregungswellenlänge von 457 nm bei einer Emission von 610 nm BP30 dokumentiert.

Flamingo Pink-Färbung

Die Fixierung der Gele erfolgte für 3 Stunden, anschließend wurde 14 Stunden mit Flamingo Pink gefärbt. Entfärbt wurden die Gele nach zweimaligem Waschen für 5 min mit $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$. Die Fluoreszenz wurde nach Herstellerangaben bei 532 nm angeregt und bei 610 nm BP30 gemessen.

3.3.4 Proteolytische Spaltung und Massenspektrometrie

Es erfolgte ein manueller Verdau der Gelstücke. Hierzu wurde dreimal mit je 100 μl $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ (*HPLC-Grade*) für mindestens 5 min gewaschen. Die Spots wurden anschließend mit 100 μl 25 mM Ammoniumbicarbonat in 50 % Acetonitril (ACN) für 5 min umgepuffert und gleichzeitig dehydriert. Eine vollständige Dehydratation war an einer Weißfärbung der Spots zu erkennen. An dieser Stelle konnten die Proben bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren werden. Der anschließende tryptische Verdau erfolgte mit 100 ng porcinem Trypsin in 10 μl 25 mM Ammoniumbicarbonat bei 4°C für 15 min. Die rehydrierten Gelstücke wurden mit weiteren 10 μl 25 mM Ammoniumbicarbonat befüllt und über Nacht bei 37°C verdaut. Anschließend wurde der Verdau durch Zugabe von 10 μl 0,3 % Trifluoressigsäure (TFA) in ACN gestoppt. Die Elution der Peptide wurde durch eine 15-minütige Ultraschallbehandlung weiter unterstützt. Der Überstand konnte daraufhin abgenommen und

in eine 96-Loch-Rundbodenplatte überführt werden. Die Gelspots wurden nochmal mit 20 µl ACN rehydriert und der Überstand mit dem bereits abgenommenem vereinigt. Die eluierten Proben wurden in der Vakuumzentrifuge auf mittlerer Heizstufe 30 min eingeengt. Die Proben konnten nun in 0,8 µl Matrixlösung aufgenommen werden und auf eine 192-Loch MALDI-Edelstahlplatte aufgebracht und luftgetrocknet werden.

Peptidmassenanalyse

Die Peptidmassenanalyse erfolgte mit dem 4700 *Proteomics Analyzer* MALDI-Tof/Tof Massenspektrometer (Applied Biosystems, Darmstadt) und wurde von Herrn Dr. Christoph Gelhaus (Abteilung Zoophysilogie, Prof. Dr. M. Leippe, Zoologisches Institut, CAU Kiel) durchgeführt. Die Spots wurden mit 1000-2000 Laserimpulsen beschossen und die gemessenen Spektren kumuliert. Eine interne Kalibrierung erfolgte anhand der autolytischen Fragmente des porcinen Trypsins, diese wurden aus der Datenbanksuche ausgeschlossen.

Datenverarbeitung

Die Datenbanksuche mit den erhaltenen Peptidmassen wurde mit Hilfe der *Software GPS Explorer Version 3.6* (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Massen wurden dazu mit dem Programm an den MASCOT-Server Version 2.0 (*Matrix Science Ltd.*, London, UK) übertragen. Gesucht wurde dabei gegen eine *in-house* Datenbank, in der alle Proteine aus *Homo sapiens* (191694 Einträge, 28/02/2007) hinterlegt sind. Dabei wurde MASCOT mit den folgenden Einstellungen verwendet: Die Modifikation von Cysteinen durch Carboxyamidmethylierung wurde als obligatorisch betrachtet und die Oxidation von Methionin wurde als eine potentielle Modifikation eingestuft. Die maximale Anzahl an fehlenden tryptischen Spaltungen wurde auf eins gesetzt, monoisotopische Massen wurden zugelassen und die Massetoleranz wurde auf ± 20 ppm gesetzt. Die Proteine galten als sicher identifiziert, wenn ein MASCOT-Score ≥ 95 (entsprechende Identifikationswahrscheinlichkeit höher als 95 %) erreicht wurde.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen

Zunächst wurden ca. 4×10^6 Zellen in PBS gewaschen und das Zellsediment bei -80°C für mindestens eine Stunde eingefroren. Anschließend wurde das *RNesay Kit* der Firma Qiagen verwendet. Nach dem Auftauen wurden die Zellen mit 350 μl RLT-Puffer + 3,5 μl β -Mercaptoethanol versetzt und gut resuspendiert, bevor die Nukleinsäuren mit 350 μl 70 %igem Ethanol gefällt wurden. Die Proben wurden nun über entsprechende Säulen gegeben und 15 sec bei $8000 \times g$ zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säulen zunächst mit 700 μl RW1-Puffer und anschließend zweimal mit je 500 μl RPE-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschgang wurde 2 min zentrifugiert. Um die RNA von der Säule zu eluieren, wurde diese zunächst auf ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt, mit 30 μl RNase freiem Wasser versetzt und 1 min zentrifugiert. Der Durchlauf enthielt die RNA, die entweder direkt weiter verwendet oder bei -80°C eingefroren wurde.

3.4.2 Isolation von genomischer DNA aus Zellen

Für die Isolation von genomischer DNA wurde das *Genomic DNA Purification Kit* der Firma Macherey-Nagel verwendet. Es wurden zunächst 2×10^6 Zellen in 200 μl PBS aufgenommen. Anschließend wurden 25 μl Proteinase K, 200 μl BQ1-Puffer hinzugefügt, die Suspension gut resuspendiert und 15 min bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 200 μl Ethanol wurden die Proben auf spezifische Säulen übertragen und 1 min bei $11000 \times g$ zentrifugiert. Gewaschen wurde einmal mit 200 μl BQ2-Puffer und anschließend mit 350 μl BQ2-Puffer. Nach dem letzten Waschschrift wurde 5 min zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen und die genomische DNA durch Zugabe von 50 μl 70°C warmen BE-Puffers (1:3 verdünnt mit Wasser) und 1-minütiger Inkubation bei RT gelöst. Zentrifugiert wurde 1 min bei $11000 \times g$. Die genomische DNA wurde sofort weiter verwendet oder bei 4°C gelagert.

3.4.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Das Spektrophotometer Nanodrop ND-1000 (Betriebssoftware NanoDrop Version 3.3.0) ist geeignet zur Absorptionsmessung in einem Wellenlängenbereich von 220-750 nm UV/Vis. Nukleinsäuren zeigen aufgrund ihrer aromatischen Struktur ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Um die Reinheit der DNA zu ermitteln, also z.B. eine eventuelle Kontamination mit Proteinen (Absorptionsmaxima bei 280 nm) auszuschließen, wurde der Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Reine DNA sollte ein Verhältnis von 1,8, reine

RNA eines von 2,0 liefern. Ist das Verhältnis niedriger, könnte eine Proteinkontamination vorliegen.

3.4.4 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA wurde das *First Stand cDNA Synthesis Kit* der Firma Fermentas verwendet. Dieses Kit arbeitet mit der M-MuLV reversen Transkriptase. Degradation von RNA wurde durch einen *RiboLock*TM RNase Inhibitor verhindert. Es wurden zudem *Random Hexamer Primer* verwendet. Die Komponenten wurden wie folgt eingesetzt (Tabelle 13):

Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Substanzen zur cDNA-Synthese mit Angabe der verwendeten Mengen und Konzentrationen.

Komponente	Menge
gesamt RNA	1 µg
<i>Random Hexamer Primer</i>	1 µl
Wasser (Nuklease frei)	auf 11 µl
gut mischen, 5 min bei 65°C, anschließend 4°C	
Zugabe des Master Mix:	
5 x Reaktionspuffer	4 µl
<i>RiboLock</i> RNase Inhibitor (20 U/µl)	1 µl
10 mM dNTP	2 µl
M-MuLV reverse Transkriptase	2 µl
gesamt Volumen	20 µl

Die anschließende Reaktionszeit betrug 60 min bei 37 °C. Gestoppt wurde die Reaktion bei 70°C für 5 min. Die cDNA wurde im Anschluss entweder direkt für weitere Analysen verwendet oder bei -20°C gelagert.

3.4.5 Reguläre PCR

Zur Amplifikation individueller Transkripte aus cDNA oder genomischer DNA, wurden folgenden Komponenten verwendet (Tabelle 14):

Tabelle 14: Angabe der Substanzen und Puffer zur Durchführung einer regulären PCR unter Verwendung der Dream Taq™ Polymerase.

Komponente	Menge
<u>Template:</u> cDNA	2 µl
genomische DNA	1-2 µg
10 x Reaktionspuffer	5 µl
Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer (10 pmol/µl)	je 2,5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Dream Taq™ Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
Wasser (Nuklease frei)	auf 50 µl

Als Kontrolle diente eine Probe ohne Template (Wasserkontrolle, WK). Die erfolgreiche Synthese der cDNA wurde standardmäßig über eine GAPDH-PCR überprüft. Es wurden folgende Programme als Grundlage zur Etablierung der einzelnen Schmelztemperaturen verwendet:

Programm für die Amplifikation

	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	4 min
Denaturierung	95°C	30 sec
Anlagerung	X°C	30 sec
Elongation	72°C	1 min/1kb
Elongation	72°C	10 min
Kühlung	4°C	∞

Programm für die Klonierung

	Temperatur	Zeit	
Denaturierung	95°C	4 min	
4 Zyklen	Denaturierung	95°C	30 sec
	Anlagerung	X°C	30 sec
	Elongation	72°C	1 min/1kb
32 Zyklen	Denaturierung	95°C	30 sec
	Anlagerung	X°C	30 sec
	Elongation	72°C	1 min/1kb
	Elongation	72°C	10 min
	Kühlung	4°C	∞

Für die Amplifikation von cDNA wurde die Anzahl der verwendeten Zyklen an die Abundanz der Produkte angepasst. Für die zwei-Schritt-Klonierungs-PCR wurde immer die angegebene Zyklenzahl verwendet. Die Anlagerungs- oder Schmelztemperatur wurde den entsprechenden Primern angepasst

3.4.6 Aufreinigung der PCR-Produkte

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das *DNA Clean & Concentrator-5 Kit* der Firma Qiagen verwendet. Zunächst wurde das PCR-Produkt 1:5 mit DNA-Bindungspuffer versetzt und in die entsprechende Säule übertragen. Nach einer Zentrifugation von 30 sec bei 10000 x g wurde zweimal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen und anschließend die DNA mit 6-10 µl destilliertem Wasser eluiert (1 min RT). Nach einer 1-minütigen Zentrifugation bei 10000 x g wurde das Produkt direkt verwendet oder bei -20°C eingefroren.

3.4.7 Transformation kompetenter Bakterien

Die gewünschten Plasmide sollten mit Hilfe des Bakteriums *E. coli* vermehrt werden. Dazu wurden 100 µl der chemisch kompetenten Bakterien (TOP 10) auf Eis aufgetaut und mit 20 µl eines Ligationsansatzes vermischt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Um die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterien zu ermöglichen, wurde der Ansatz 2 min bei 42°C und anschließend 10 min auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde in 900 µl SOC-Medium gegeben und 60 min bei 37°C schüttelnd inkubiert. Da die Aufnahme des Vektors zu einer Ampicillin-Resistenz führt, wurden zur Anzucht und Selektion der Bakterienklone LB-Agarplatten mit Ampicillinzusatz (50 µg/ml) verwendet. Ausplattiert wurden 100 µl der Bakteriensuspension. Die restliche Bakteriensuspension wurde 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert, das Bakterienpellet in 100 µl SOC-Medium resuspendiert und ausplattiert. Die LB-Agarplatten wurden 16 h bei 37°C inkubiert.

3.4.8 Aufreinigung von Plasmid-DNA

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde zunächst eine Mini-Präparation durchgeführt. Die relativ geringe Ausbeute an DNA wurde genutzt, um die fehlerfreie Genexpression der Konstrukte in den Bakterien zu überprüfen. Dazu wurde die DNA sequenziert. Proben, die keinerlei Mutationen und eine Genexpression im richtigen Leserahmen zeigten, wurden anschließend mit Hilfe der Maxi-Präparation aufgereinigt. Es wurden die Kits der Firma Qiagen verwendet.

Mini-Präparation

Für die Mini-Präparation wurden zunächst 3 ml LB-Medium (+ 50 µg/ml Ampicillin) mit den ausgewählten vereinzelt Bakterienkolonien in Schüttelröhrchen beimpft und 16-18 h bei 37°C angezchtet. Anschließend wurden 2 ml der Suspension in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 2000 rpm abzentrifugiert. Der Rest wurde in den Schüttelröhrchen bei 4°C gelagert und zum späteren Animpfen der Maxi-Präparation verwendet. Der

Suspensionsüberstand wurde abgenommen und die Sedimente mit 250 µl P1-Puffer resuspendiert. Der Puffer-P1 wurde zum RNA-Verdau mit RNase A versetzt und durch die Zugabe des Reagenz Lyse Blue konnte die vollständige Lyse anhand eines Farbumschlags festgestellt werden. Nach Zugabe von 250 µl P2-Puffer wurde gut resuspendiert. Anschließend wurden 350 µl N3-Puffer hinzugegeben, gemischt und bei 13000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine entsprechende Säule übertragen und 60 sec bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde einmal mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und die Plasmid-DNA wurde mit 30 µl Wasser eluiert (2 min bei 37°C). Die Säule wurde auf 1,5 ml Reaktionsgefäße übertragen und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die isolierte DNA wurde direkt weiter verwendet oder bei -20°C gelagert.

Maxi-Präparation

Die Maxi-Präparation diente der Anreicherung isolierter und gereinigter Plasmid-DNA in einem größeren Maßstab als durch die Mini-Präparation möglich war. Es wurden 330 µl LB-Medium mit Zusatz von 50 µg/ml Ampicillin in einem 1 Liter Erlenmeyerkolben mit 100 µl Bakteriensuspension versetzt und 16 h schüttelnd bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Glycerinkultur angelegt. Hierzu wurden 500 µl Bakteriensuspension auf Eis mit 500 µl Glycerin vermischt und bei -80°C eingefroren. Für die Isolation der Plasmid-DNA wurde ebenfalls ein Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Bakteriensuspension wurde 15 min bei 6000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wurde das Bakteriensediment in 10 ml P1-Puffer resuspendiert. Der Puffer-P1 wurde zum RNA-Verdau mit RNase A versetzt und durch die Zugabe des Reagenz Lyse Blue konnte die vollständige Lyse anhand eines Farbumschlags festgestellt werden. Die Lyse der Bakterien wurde durch 10 ml Puffer-P2 während einer Inkubationszeit von 5 min bei RT induziert und durch eine Blaufärbung angezeigt. Nach Zugabe von 10 ml Puffer-P3 wurde die Lösung invertiert, bis sie farblos erschien und 20 min auf Eis inkubiert. Bakterielle Proteine, DNA und weitere störende Bestandteile präzipitierten und wurden durch eine anschließende Filtration entfernt. Das Filtrat konnte auf die vorher mit QBT-Puffer equilibrierten Säulen pipettiert werden. Plasmid-DNA bindet unter niedrigen Salzkonzentrationen an die Säulen, während andere Bestandteile wie RNA und Proteine durch den QC-Puffer ausgewaschen werden. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit QF-Puffer. Die Plasmid-DNA wurde mit 10,5 ml Isopropanol präzipitiert und 45 min bei 10000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 5 ml 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten 10-minütigen Zentrifugation bei 10000 x g und 4°C wurde der Überstand komplett entfernt und das Sediment luftgetrocknet. Die getrocknete Plasmid-DNA wurde in 300 µl d_6H_2O gelöst und die

DNA-Konzentration mit Hilfe des NanoDrop-Photometers ermittelt. Die Präparation wurde über eine Restriktionsspaltung der isolierten DNA überprüft.

3.4.9 Sequenzierung der Plasmid-DNA

Die Sequenzierung der isolierten Plasmide erfolgte mit dem *Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit*. Die Sequenzierprimer und die Plasmid-DNA mussten zu den im Kit enthaltenen Komponenten gegeben werden. Das Prinzip des Sequenzierungskits beruht auf der Kettenabbruchreaktion nach Sanger (1977). Zunächst wurde über eine PCR-Reaktion durch Verlängerung der Sequenzierprimer in 3'-5'-Richtung eine Amplifikation einzelner Plasmid-Stücke (ca. 300 bp) erreicht. Im Kit enthalten sind zusätzlich zu den Desoxynukleotiden (dNTPs) auch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTPs). Ein Einbau dieser ddNTPs führt aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe zu einem Kettenabbruch. Es entstehen Fragmente unterschiedlicher Länge, die am Ende fluoreszenzmarkiert worden sind. Diese Markierungen ermöglichen die Sequenzierung der DNA. Die verwendeten Sequenzierprimer sind in Tabelle 9 aufgelistet. Die Zusammensetzung des Sequenzieransatzes findet sich in Tabelle 15:

Tabelle 15: Zusammensetzung des Sequenzierungsansatzes und Angabe des verwendeten PCR-Programms.

Substanz	Menge			
Plasmid-DNA	500 ng	96°C	3 min	} 25 Zyklen
Sequenzierprimer (5 pmol/μl)	1 μl	96°C	30 s	
5 x Sequenzierpuffer	2 μl	50°C	15 s	
Ready Reaction Mix 1.1	2 μl	60°C	4 min	
ddH ₂ O	ad 20 μl	4°C	∞	

Das PCR-Produkt wurde anschließend aufgereinigt, um unter anderem nicht eingebaute Nukleotide zu entfernen. Dazu wurde das *DyeEx*-Reaktionskit der Firma Qiagen verwendet. Die im Kit enthaltenen Säulen wurden mit den PCR-Produkten beladen. Es wurde 3 min bei 2700 rpm zentrifugiert. Störende Substanzen wurden in den Gelporen festgehalten. Das Eluat wurde für die Durchführung einer Sequenz-Kapillarelektrophorese verwendet. Die ermittelten Sequenzen konnten mit Hilfe der Internet Software *ClustalW* von *EMBL-EBI* mit den Originalsequenzen verglichen und überprüft werden.

3.4.10 Restriktionsverdau

In einem Gesamtvolumen von 50 µl wurden 1 µg der zu testenden DNA mit jeweils 20 U/µl der entsprechenden Restriktionsenzyme, 5 µl der zugehörigen Reaktionspuffer (10x) und der angepassten Menge an destilliertem Wasser versetzt. Der Ansatz wurde für 1-2 Stunden bei 37°C inkubiert und dann über eine Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

3.4.11 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente der Auftrennung von restriktionsverdauter Plasmid-DNA oder von PCR-Produkten. Aufgrund des linear zur Länge der DNA negativ geladenen Desoxyribose-Phosphat-Rückgrats findet ein Ladungstransport statt, wobei die Nukleinsäuren ihrem Molekulargewicht entsprechend zur Anode wandern. 10 µl des PCR Produkts, oder eines Restriktionsspaltungsprodukts, wurden mit 2 µl Auftragspuffer versetzt und auf ein 1 %iges (w/v) Agarosegel in TAE-Puffer mit Ethidiumbromid aufgetragen. Zusätzlich wurden zur Beurteilung der jeweiligen Bandengröße 5 µl eines 1 kb Größenstandards aufgetragen. Die DNA in den Proben konnte bei einer Spannung von 90-95 V aufgetrennt werden. Die durch Ethidiumbromid angefärbten Nukleinsäuren wurden in einer Geldokumentationsanlage durch UV-Licht sichtbar gemacht. Teilweise erfolgte eine densitometrische Auswertung der Banden mit der *AIDA Image Analyzer* Software 4.04.

3.4.12 Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen

Das Agarose-Gel wurde in der Geldokumentationsanlage bei 70 % UV belichtet, um mit einem Skalpell die Umrisse der Banden anzuzeichnen. Um die Zerstörung der DNA durch UV-Licht zu verhindern, wurde möglichst kurz belichtet. Die Banden konnten nun aus dem Gel entfernt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen werden. Durch erneutes Betrachten des Gels unter UV-Licht konnte sichergestellt werden, dass die Banden vollständig entfernt wurden. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem *Gel Extraction* Kit der Firma Zymoclean. Zur Lösung des Gels wurde die dreifache Menge an ADB-Puffer zu den Proben gegeben und 5-10 min bei 55°C inkubiert. Die Lösung wurde anschließend auf eine Zymo-SpinTM-Säule gegeben und für 60 sec bei 10000 x g zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit 200 µl Waschpuffer wurden 6-10 µl destilliertes Wasser auf die Säule gegeben und 60 sec inkubiert. Anschließend wurde die DNA in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und direkt weiter verwendet oder bei -20°C eingefroren.

4. Ergebnisse

4.1 CT45-Promotoranalyse

Der CT45-Promotor wird, wie auch alle anderen Promotoren der CT-Antigene (Simpson et al., 2005), über DNA-Demethylierung reguliert (Diplomarbeit N.Sellami). Welche Transkriptionsfaktoren an der Regulation der CT45-Genexpression beteiligt sind, sollte über eine Promotoranalyse geklärt werden. Als potenzieller Transkriptionsstart ist der in der Diplomarbeit von N. Sellami verwendete Bereich innerhalb der genomischen DNA, am Start des ersten Exons im CT45-Gen, gewählt worden (Abbildung 5).

Reportergen-Assay

Zur Eingrenzung des Minimalpromotors sind verschiedene Konstrukte auf der Grundlage der X-chromosomalen Sequenz von CT45-A2 (NG_021269.1) ausgewählt und in den pGL3_basic-Vektor kloniert worden (Abbildung 5). Der für den Reportergen-Assay gewählte Vektor besitzt keine interne Promotorsequenz. Das Reportergen, die nachgeschaltete *Firefly*-Luciferase, kann dementsprechend nur exprimiert werden, wenn die einklonierte Sequenz einen Minimalpromotor enthält. Als positive Kontrolle diente der pGL3_control-Vektor. Die *Firefly*-Luciferase wird in diesem Vektor über einen SV40-Minimalpromotor reguliert, der als Maß für die Basalaktivität eingesetzt wurde. Zur Auswertung der Ergebnisse ist der *Dual-Glo Luciferase-Assay* (Promega) verwendet worden. Die Transfektionseffizienz in den einzelnen Versuchen ist durch Kotransfektion eines pRL_CMV-Vektors in die Auswertung eingeflossen. Die in dem Vektor enthaltene Sequenz für die *Renilla*-Luciferase steht unter Kontrolle eines CMV (Cytomegalovirus) *immediate-early enhancer/promotor*. Dieser Promotor vermittelt eine strenge konstitutive Expression des Reportergens. *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase stehen in einem Analogie- und nicht in einem Homologieverhältnis. Die daraus resultierende unterschiedliche Substratspezifität ermöglicht die Analyse beider Enzymaktivitäten in einem Testsystem.

Das Gen für CT45-A2 erstreckt sich über einen Bereich von ca. 8000 Basenpaaren (bp), bestehend aus fünf transkribierten Sequenzen, den Exons, und den dazwischenliegenden regulierenden Introns. Das Start-Codon für die Translation beginnt mit dem zweiten Exon und endet im Letzten. Die 5'-untranslatierte Region befindet sich im ersten Exon. Die geplanten Konstrukte decken einen Bereich zwischen -1031 vor bzw. +176 Basen nach dem voraussichtlichen Transkriptionsstart (TSS) von CT45 ab (Abbildung 5).

CT45-A2 (NG_021269.1) schematisch

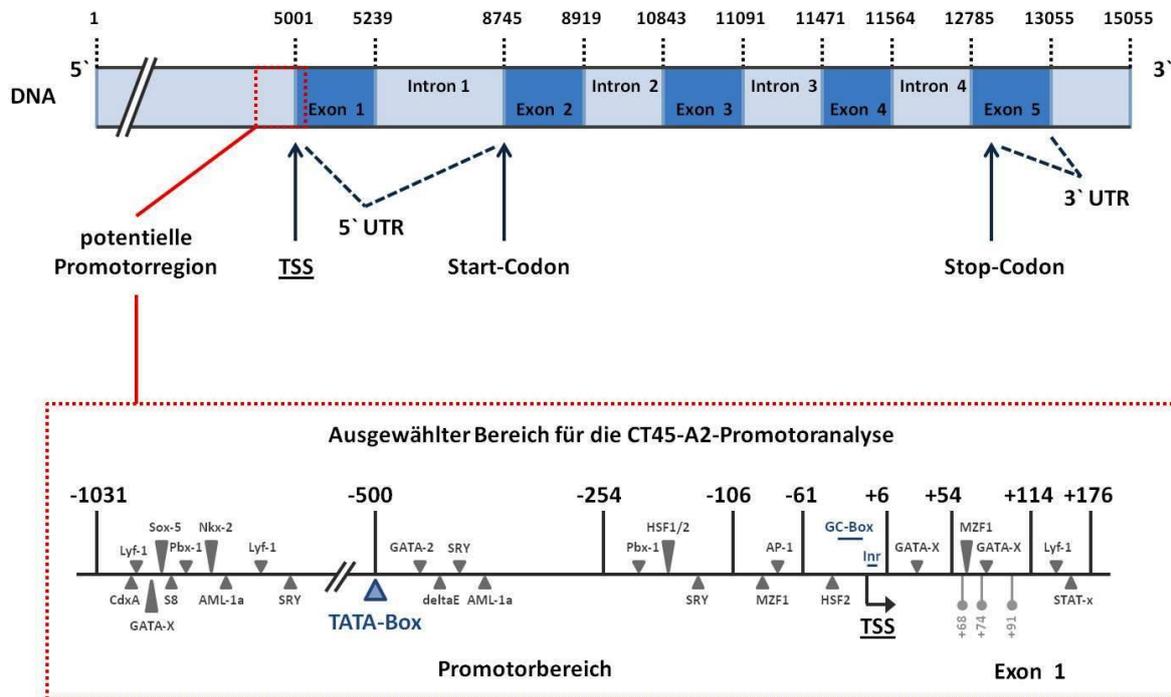


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Genlocus CT45-A2 (NG_021269.1). Die für das Gen bekannten Exons und Introns, sowie das Start- und Stop-Codon für die Translation, sind gekennzeichnet. Ebenfalls markiert sind die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen (UTR) und der potentielle Transkriptionsstart (TSS). Der zur Promotoranalyse herangezogene Bereich ist separat vergrößert. Eingezeichnet sind der TSS am Exon 1, sowie eine mögliche TATA-Box bzw. GC-Box und das Initiator-Element (Inr) im vermuteten Promotorbereich. Zudem sind die Basen, an denen die verwendeten Primer binden, gekennzeichnet. Mögliche Transkriptionsfaktoren [identifiziert über die Datenbanken *TFsearch* (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) und *Gene Promotor Miner* (<http://gpminer.mbc.nctu.edu.tw>)] sind schematisch eingezeichnet (graue Dreiecke). Zudem sind in Vorarbeiten identifizierte, für die methylierungsabhängige Transkription entscheidende, Cytidine markiert (●).

Für eine erfolgreiche Transkription gelten eine Reihe regulatorischer Promotorelemente als essentiell. Hierzu zählen zahlreiche Transkriptionsfaktor-Bindesequenzen, wie die TATA-Box, die CAAT-Box und die GC-Box, sowie verschiedene weitere Initiationsmotive wie das Initiator (Inr)-Element. Auch innerhalb der Promotorregion vorhandene CpG (Cytidin/Guanosin-Dinukleotid)-Inseln sind von regulatorischem Interesse (Suzuki et al., 2001). In dem ausgewählten Bereich befindet sich 500 Basenpaare vor dem TSS eine TATA-Box. Diese Sequenz wird generell als besonders wichtig beschrieben, da hier die spezifische Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren ermöglicht wird (Roeder 1996). Eine weitere, ebenfalls entscheidende Sequenz ist das Inr-Element (Sequenz: $A_{[+1]}NT$). Dieses Motiv konnte im Bereich des TSS identifiziert werden. Das Inr-Element ist als zentrales Promotorelement charakterisiert, das in der Funktion ähnlich der TATA-Box ist und unabhängig von dieser eine Genexpression induzieren kann (Smale et al., 2003). Zudem konnten in dem eingegrenzten Bereich eine Reihe spezifischer Bindungssequenzen für

verschiedene Transkriptionsfaktoren identifiziert werden (Abbildung 5). Hierzu ist die Datenbank *TFsearch* (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) bzw. der *Gene Promotor Miner* (<http://gpminer.mbc.nctu.edu.tw>) verwendet worden. Die bioinformatische Suche ergab zudem, dass in dem gesamten Bereich vor dem ersten Exon keine CAAT-Box lokalisiert ist. Die Konsensussequenz der CAAT-Box befindet sich üblicherweise 70-105 Basenpaare vor dem TSS (Suzuki et al., 2001). Etwa 45-74 Basen vor dem TSS ist desweiteren häufig eine GC-Box (Suzuki et al., 2001) lokalisiert. In der Sequenz von CT45-A2 befindet sich diese nur 20 Basen vor dem TSS. An die beiden erwähnten Sequenzen, CAAT- und GC-Box, binden verschiedene RNA Polymerase II-Aktivatorproteine, die die Promotoreffizienz steigern können (Gronostajski, 2000). Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass sich innerhalb der potentiellen Promotorregion eine CpG-Insel befindet (Diplomarbeit N. Sellami). Demethylierte CpG-Inseln ermöglichen die Interaktion spezifischer Transkriptionsfaktoren, die die Expression des Zielgenes induzieren (Costello et al., 2000). Es konnte bereits analysiert werden, dass die Demethylierung der CT45-Promotorregion an drei definierten Cytidinen entscheidend für die Genexpression ist (Diplomarbeit N. Sellami) (Abbildung 5). Im Design der Primer wurde diese CpG-Insel berücksichtigt.

Äquimolare Mengen der in den pGL3_basic-Vektor klonierten Konstrukte sind mittels Kalziumphosphat-Präzipitation transient in Hela-Zellen transfiziert worden. 16 Stunden nach der Transfektion wurde der *Dual-Glo* Luciferase-Assay (Promega) durchgeführt und die Biolumineszenz beider Luciferasen ermittelt und ausgewertet (Abbildung 6). Für die Auswertung wurden zunächst die Biolumineszenzwerte des pGL3_basic-Vektors von den *Firefly*-Luciferase-Aktivitäten abgezogen. Mittelwerte einer dreifachen Bestimmung wurden anschließend als prozentualer Anteil der *Renilla*-Luciferase-Aktivität ausgedrückt. Die Aktivität des CMV-Promotors im RL_CMV-Vektor war in der Regel etwa fünfzigfach stärker, als die des SV40-Promotor des pGL3_control-Vektors. Die Aktivität des längsten klonierten CT45-Promotorabschnitts lag ebenfalls in diesem Bereich.

Die relative Luciferase-Aktivität bzw. Genexpressionsaktivität des Kontrollvektors pGL3_control lag bei 2,5 Lichteinheiten pro Sekunde (RLU/s). Der längste in den pGL3_Basic-Vektor klonierte Promotorabschnitt umfasst die Region -1031/+176 des CT45-A2-Gens. Die relative Luciferase-Aktivität lag bei 2,7 RLU/s (Abbildung 6). Innerhalb dieses Konstrukts sollte sich entsprechend des Programms *TFsearch* eine Bindestelle für das TATA-Box-bindende Protein (TBP) befinden. Bekannt ist, dass sich in Vertebraten die TATA-Box-Konsensussequenz ca. 30 Nukleotide stromaufwärts des TSS (Position -30) befindet. Im Fall des CT45-A2 Gens konnte eine entsprechende Konsensussequenz an der Position

-500 detektiert werden (Abbildung 5). Ob diese TATA-Box eine Funktion für den analysierten CT45-Transkriptionsstart hat, ist aufgrund der großen Entfernung fraglich. Zudem spricht der Vergleich zwischen den Luciferase-Aktivitäten der Konstrukte -254/+176 und -1031/+176 in diesem Zusammenhang für eine nicht funktionelle TATA-Box. Der -254/+176 pGL3_basic-Vektor induziert eine Aktivität von 2,3 RLU/s. Die Luciferase-Aktivität ist damit nicht signifikant geringer als die durch das TATA-Box-enthaltene Konstrukt (2,7 RLU/s) vermittelte.

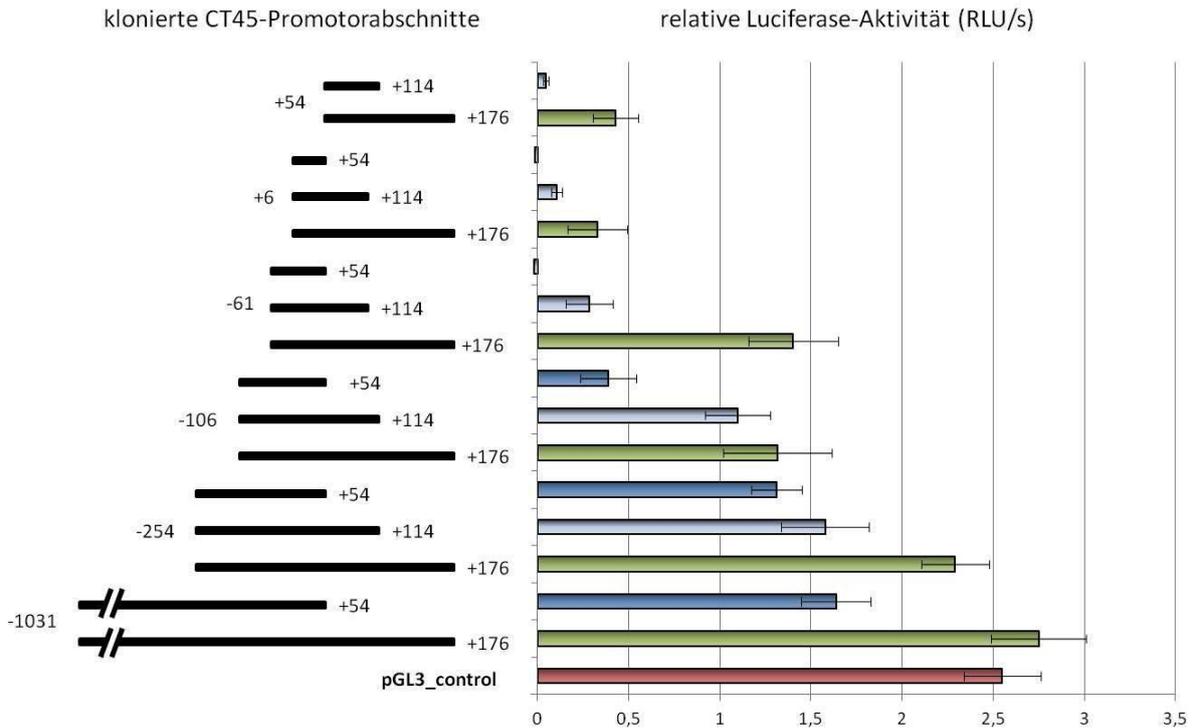


Abbildung 6: Ergebnis des *Dual-Glo* Luciferase-Assays zur Analyse des CT45-Minimalpromotors. Schematisch dargestellt sind die untersuchten Promotorabschnitte, die in den pGL3_basic-Vektor kloniert wurden. Rechts ist das Ergebnis des Reporteragen-Assays gezeigt. Die relative Luciferase-Aktivität ist in RLU/s (*relative light units per second*): relative Lichteinheiten pro Sekunde, angegeben. Die Standardabweichung wurde aus Dreifachwerten ermittelt.

Wird der Bereich stromaufwärts des Transkriptionsstarts weiter verkürzt, auf -106 oder -61 Basen, verringerte sich die Genexpressionsaktivität auf 1,4 RLU/s. Es machte keinen Unterschied, ob der Bereich um 148 Basen oder 193 Basen verkürzt wurde. Wird der Bereich am 5'-Ende allerdings vollständig entfernt (Konstrukt +6/+176), lag die Luciferase-Aktivität nur noch bei 0,3 RLU/s. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass der Bereich zwischen 0 und der Position -61 eine wichtige verstärkende Funktion für die CT45-Genexpression besitzt. In diesem Bereich ist die bereits erwähnte GC-Box lokalisiert, die durch Interaktion mit spezifischen Transkriptionsfaktoren vermutlich einen positiven Effekt auf die Promotoraktivität hat.

Zur näheren Eingrenzung des Promotorbereichs wurde die Sequenz am 3'-Ende ebenfalls verändert. Dieser Bereich wurde in den Versuchen von +176 auf +114 bzw. +54 verkürzt. Ist der stromaufwärts gelegene Bereich am 5'-Ende länger als 61 Basen, bleibt die Luciferase-Aktivität weitestgehend erhalten. Das Konstrukt -106/+54 induziert allerdings nur noch eine Luciferase-Aktivität von 0,4 RLU/s. Verkürzt man die Sequenz stromaufwärts auf -61 Basen und überprüft die Genexpressionsaktivität der Varianten mit den unterschiedlich langen 3'-Enden, wird die Relevanz des Bereichs stromabwärts eindeutig. Das Konstrukt -61/+176 hat noch eine relativ hohe Expressionsaktivität mit den bereits erwähnten 1,4 RLU/s. Wird der Bereich stromabwärts um 62 Basen (-61/+114) verkürzt, resultiert nur noch eine Luciferase-Aktivität von 0,28 RLU/s. Weiteres einschränken des 3'-Bereichs auf 54 Basen lässt keine Promotoraktivität mehr zu. Das komplette Entfernen des 5'-Endes resultiert in einer schwachen Expressionsaktivität des +6/+176-Konstrukts (0,33 RLU/s). Die Sequenz +6/+114 induziert noch eine minimale Luciferase-Aktivität (0,12 RLU/s). Das +6/+54-Konstrukt vermittelt keine Reporter-gen-Aktivität. Folglich kann zusammengefasst werden, dass der Bereich bis +54 Basen eine eingeschränkte, eher verstärkende Relevanz für die Promotoraktivität besitzt. Weiteres Verkürzen der Sequenz am 5'-Ende sollte die Signifikanz des Bereiches zwischen +114 und +176 stromaufwärts des Transkriptionsstarts festigen. Das Konstrukt +114/+176 konnte nicht hergestellt werden. Die Betrachtung der Konstrukte +54/+176 und +54/+114 resultierte in einer Luciferase-Aktivität von 0,4 RLU/s bzw. 0,04 RLU/s. In den Arbeiten von N. Sellami wurde analysiert, dass die Demethylierung an 3 Cytidinen in dem Bereich zwischen +54 und +114 essentiell für die Genexpression von CT45 ist. Daher liegt eine Relevanz dieses Bereichs für die Promotoraktivität vor.

Aufgrund der Ergebnisse war zunächst der Bereich zwischen +114 und +176 interessant. Hier konnten zwei potentielle Bindemotive für Transkriptionsfaktoren ermittelt werden und zwar für Lyf-1 (*lymphoid transcription factor 1*) [Position +134] und STAT-x (*signal transducer and activator of transcription*) [Position +143] (TFsearch). Die Sequenz zwischen +114 und +176 scheint allerdings nicht alleine für die Transkription von CT45 entscheidend zu sein. Die Basen zwischen -61 und -106 stromaufwärts sind ausschlaggebend für eine Expressionsaktivität unabhängig von der Länge am 3'-Ende. In diesem Bereich befinden sich spezifische Bindemotive für die Transkriptionsfaktoren AP-1 (*activator protein-1*) [Position -91] und MZF1 (*myeloid zinc finger 1*) [Position -82].

Wenn man die verstärkenden Effekte weiterer Sequenzen auf die Luciferase-Aktivität betrachtet, ist allerdings die gesamte Sequenz von -254 bis +176 interessant für die Analyse wichtiger Transkriptionsfaktoren, die die Genexpression von CT45 regulieren. Hier genannt

seien SRY (*sex determining region Y*), Pbx-1 (*pre-B-cell leukemia homeobox 1*), HSF1/2 (*heat shock transcription factor 1/2*), MZF1 (*myeloid zinc finger 1*) und GATA-x (*GATA binding factor x*), die teilweise mehrere spezifische Konsensussequenzen in dem genannten Bereich haben (Abbildung 5). Die genannten Transkriptionsfaktoren sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Funktionelle Beschreibung der potentiell an der CT45-Genexpressionsregulation beteiligten Transkriptionsfaktoren (TF) mit Angabe der DNA-Bindemotive.

TF	DNA-Bindemotiv	Funktion
AP-1	Leucin-Zipper	<ul style="list-style-type: none"> reguliert die Genexpression nach verschiedenen Stimuli wie Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Stress und bakterieller bzw. viraler Infekte (Hess et al., 2004), kontrolliert Entzündungen, Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose (Ameyar et al., 2003) hochreguliert in diversen Tumoren, entscheidend beteiligt an onkogenen Transformationen und Tumorprogression (Eferl und Wagner, 2003)
GATA-x	Zinkfingerdomäne	<ul style="list-style-type: none"> hochkonserviert (Bresnick et al., 2005), essentiell für die Hämatopoese (GATA 1-3) und Organentwicklung (GATA 4-6) (Orkin, 1992; Charron & Nemer, 1999)
HSF1	HSE (<i>heat shock element</i>)-Domäne	<ul style="list-style-type: none"> Stress-induzierter Regulator für Transkription von Hitzeschockproteinen (McMillan et al., 1998)
HSF2	HSE (<i>heat shock element</i>)-Domäne	<ul style="list-style-type: none"> reguliert die neuronale Spezifizierung und Spermatogenese, bindet konstitutiv an HSP-Promotoren (Kallio et al., 2002; Akerfelt et al., 2008)
Lyf-1	Zinkfingerdomäne	<ul style="list-style-type: none"> essentieller Faktor für die normale Hämatopoese und Entwicklung maligner Zellen, sowie Tumorsuppressor durch die Aktivierung oder Repression verschiedener Gene (Molnár et al., 1994; Winandy et al., 1995)
MZF1	Zinkfingerdomäne	<ul style="list-style-type: none"> Genexpression korreliert mit hämatopoetischer Zelldifferenzierung und Zellproliferation (Bavisotto et al., 1991; Perrotti et al., 1995)
Pbx-1	TALE (<i>Three Amino acid Loop Extension</i>) Homöodomäne	<ul style="list-style-type: none"> entscheidend für multiple Entwicklungsprozesse, beteiligt an einer chromosomalen Translokation in humaner akuter lymphoider prä-B Zell Leukämie (Nourse et al., 1990; Bürglin 1997)
SRY	HMG (<i>high mobility group</i>)-Domäne	<ul style="list-style-type: none"> auf dem Y-Chromosom codiert, essentiell für die männliche Geschlechtsentwicklung (Sinclair et al., 1990; Kashimada et al., 2010)
STAT-x	GAS-Sequenz (palindromisches DNA-Element)	<ul style="list-style-type: none"> Aktivierung über Phosphorylierung, dimerisierte STAT-Moleküle translozieren in den Zellkern und regulieren Zellproliferation, Überleben, Selbsterneuerung und weitere wichtige zelluläre Prozesse (Pauku et al., 2004) in Tumorzellen häufig fehlreguliert, eine permanente Zellteilung resultiert (Frank, 2003)

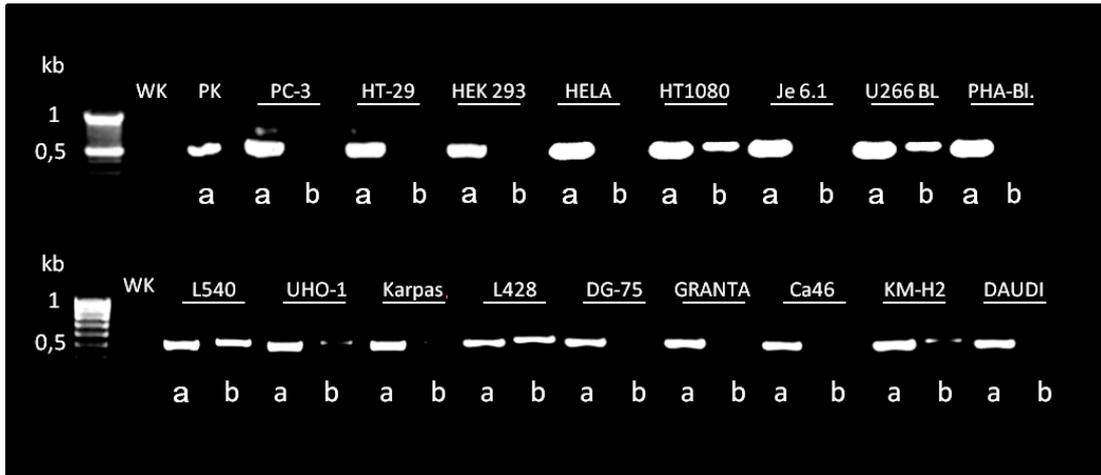
4.2 CT45-Akkumulation in verschiedenen Zelllinien

Um die Untersuchungen zur Klärung der Funktion von CT45 auf eine breite Basis zu stellen, sollten Experimente mit CT45-positiven Zelllinien unterschiedlicher Herkunft durchgeführt werden. Die CT45-Akkumulation in den verschiedenen Zelllinien wurde zum einen auf RNA-Ebene, zum anderen über eine Immunfluoreszenz-Färbung analysiert (Abbildung 7). Das CT45-Gen wird zu einem hohen Prozentsatz in Keimzelltumoren, Hodgkin's-Lymphomen und multiplen Myelomen exprimiert. Aber auch einige andere solide Tumore akkumulieren CT45 zu einem geringen Prozentsatz der jeweiligen Fälle (Heidebrecht et al., 2006; Andrade et al., 2009; Chen et al., 2009, 2010, 2011).

Zur Überprüfung der Anreicherung auf mRNA-Ebene wurden 4×10^6 Zellen der ausgewählten Zelllinien zur Isolierung von Gesamt-RNA mit dem RNesay Kit (Qiagen) verwendet. Anschließend wurde 1 μg Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. Die CT45-Sequenz wurde mit Hilfe spezifischer Primer amplifiziert und anschließend im Agarose-Gel aufgetrennt und dokumentiert. Parallel dazu wurden einige Zelllinien mit Hilfe einer Immunfluoreszenz-Färbung auf die Akkumulation von CT45 untersucht.

Auf mRNA-Ebene konnten vier Zelllinien (U266 BL [multiples Myelom/Plasmazytom-Zelllinie], L540 & L428 [Hodgkin's-Lymphom-Zelllinien] und HT1080 [Fibrosarkom-Zelllinie]) als CT45-positiv identifiziert werden (Abbildung 7 A). Die beiden Hodgkin's-Lymphom Zelllinien KM-H2 und UHO-1 zeigten einen leichten CT45-positiven Hintergrund. Alle weiteren untersuchten Zelllinien, wie die immortalisierte T-Lymphozyten-Zelllinie Je 6.1 Jurkat, die embryonale Nieren-Zelllinie HEK 293, die Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3, die Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29, die Cervixkarzinom-Zelllinie HeLa, die stimulierten peripheren Monozyten (PHA-Blasten), sowie alle untersuchten *non*-Hodgkin's-Lymphom-Zelllinien (DG-75, GRANTA 519, Ca46, DAUDI, Karpas 422) waren CT45-negativ. Dieses Ergebnis konnte über die durchgeführten Immunfluoreszenz-Färbungen bestätigt werden. Die vier Zelllinien, L428, L540, U266 BL und HT1080 waren zu nahezu 100 % CT45-positiv. CT45 konnte in distinkten Regionen des Zellkerns detektiert werden (Abbildung 7 B). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Zelllinie KM-H2 zu einem geringen Prozentsatz (< 10 % der Zellen) schwach CT45-positiv war (Abbildung 7B). Dieser Befund stimmte mit den RT-PCR-Experimenten überein. Die Anreicherung von CT45 in distinkten Arealen des Zellkerns ist charakteristisch (Heidebrecht et al. 2006). In Experimenten von Heidebrecht und Kollegen wurde gezeigt, dass dieses Muster der typischen Verteilung bestimmter Kernkompartimente, den *Nuclear Speckles*, entspricht (Heidebrecht, unveröffentlichte Daten).

A



B

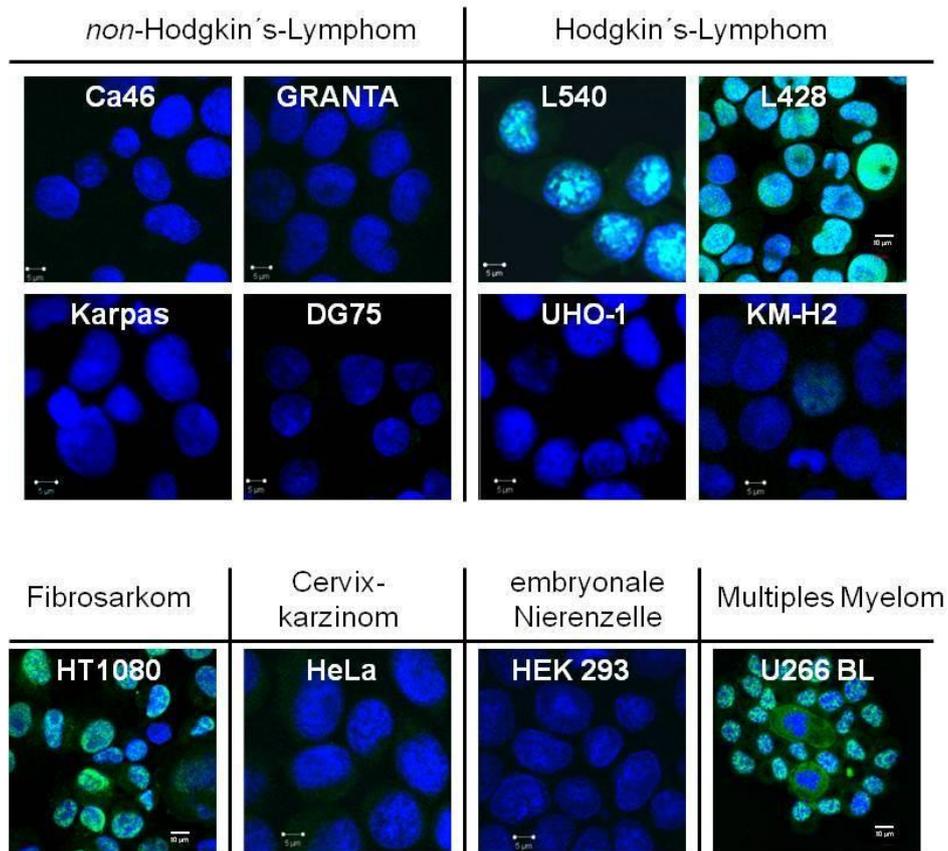


Abbildung 7: CT45-Akkumulation in verschiedenen Zelllinien. A: Zur Analyse der CT45-Menge wurden die cDNAs der entsprechenden Zelllinien mit den Primern CT45-for1, CT45-rev1 und den GAPDH (Haushaltsgen zur Kontrolle der cDNA-Qualität)-Primern GAPDH-for und GAPDH-rev amplifiziert. Das GAPDH-Amplifikat umfasst 500 bp, das CT45-Amplifikat 560 bp. Als positive Kontrolle (PK) wurde cDNA von L428-Zellen verwendet. Die Wasserkontrolle (WK) kennzeichnet den PCR-Ansatz ohne cDNA. (a: GAPDH [Kontrolle] b: CT45) B: Immunfluoreszenz-Färbungen einiger in A untersuchter Zelllinien. Die Zellen wurden über die Zytospin-Präparation auf Objektträger gebracht und mit dem CT45-spezifischen monoklonalen Antikörper Ki-A10 gefärbt. Die Visualisierung erfolgte mit einem Alexa488-gekoppelten Sekundärintikörper (grün). Die DNA-Färbung erfolgte mit DAPI (blau). In der RT-PCR stark positive Zelllinien waren auch in der Immunfluoreszenz-Färbung zu nahezu 100 % CT45-positiv (L428, L540, U266 BL und HT1080-Zellen).

Zur Bestimmung der möglichen Funktion von CT45 wurden drei Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs (L428-, U266 BL- und HT1080-Zellen) ausgewählt. L428- und U266 BL-Zellen wachsen in Suspension. L428 ist eine Hodgkin's-Lymphom-Zelllinie, die 1983 von Kirchner und Kollegen beschrieben wurde. Die Autoren zeigten, dass die L428-Zellen in allen Eigenschaften identisch mit Biopsie-Präparaten von Hodgkin's- und Sternberg-Reed-Zellen waren. Die U266 BL-Zellen wurden 1970 von Nilsson und Kollegen etabliert und als IgE-sezernierendes multiples Myelom beschrieben. Beobachtet wurde, dass es wenig Unterschiede zwischen der etablierten Zelllinie und den ursprünglich isolierten Zellen gab. HT1080-Zellen wachsen adhärent und sind gut für morphologische Studien geeignet. Diese Zelllinie ist 1974 von der Arbeitsgruppe um Rasheed beschrieben worden. Die HT1080-Zellen entstammen einem nicht bestrahlten oder chemotherapeutisch behandelten Patienten, so dass keine zusätzlichen Mutationen induziert worden sind (Rasheed et al., 1974). Zudem wurde eine CT45-negative Zelllinie, die Cervixkarzinom-Zelllinie HeLa, ausgewählt, um Studien nach CT45-Überexpression durchzuführen.

4.3 Einfluss von CT45 auf die Zellproliferation

Eine gesteigerte Proliferationsrate ist ein häufiges Charakteristikum für Tumorzellen. Ob CT45 einen Einfluss auf die Zellteilung hat, wurde über verschiedene Analyseverfahren untersucht. Zum einen ist die Zellviabilität über die Aktivität der mitochondrialen Reduktase mit Hilfe des MTS-Assays (Promega) analysiert worden. Die Teilungsrate der Zellen wurde mit Hilfe des BrdU-Assays (Roche) untersucht. BrdU (Bromdesoxyuridine) ist ein Thymidinanalog und wird demnach in sich teilende Zellen eingebaut. Über die Menge an eingelagertem BrdU kann im Anschluss die Zellteilungsrate ermittelt werden. In Abbildung 9 und Abbildung 10 sind die Ergebnisse dieser beiden Versuchsansätze dargestellt. Zusätzlich ist die Anreicherung des Proliferationsmarkers repp86 im Western Blot überprüft und der Einfluss von CT45 auf den Zellzyklus betrachtet worden (Abbildung 11 und Abbildung 12). Für die Untersuchung des Zellzyklus wurden die entsprechenden Zellen mit PJ (Propidiumjodid) markiert und durchflusszytometrisch analysiert.

Für jedes dargestellte Experiment ist die negative Regulation, bzw. die Überexpression von CT45 durch einen entsprechenden Western Blot überprüft worden (Ergebnisse nicht für jeden Versuch gezeigt). Eine exemplarische Kinetik nach CT45-Herunterregulation für jede hier verwendete Zelllinie, bzw. die Überexpression in HeLa-Zellen 16 Stunden nach der Transfektion, ist in Abbildung 8 gezeigt. Die CT45-Akkumulation war in allen Zelllinien 72-96 Stunden nach Transfektion deutlich reduziert. In den L428- und U266 BL-Zellen war 72 Stunden nach der siRNA-Transfektion nahezu kein CT45 detektierbar. Die HT1080-Zellen

zeigten bereits nach 24 Stunden eine signifikante Hemmung. Die Färbung von β -Aktin diente als Ladekontrolle und blieb über die gesamte Zeit konstant. CT45 konnte zudem in HeLa-Zellen überexprimiert werden.

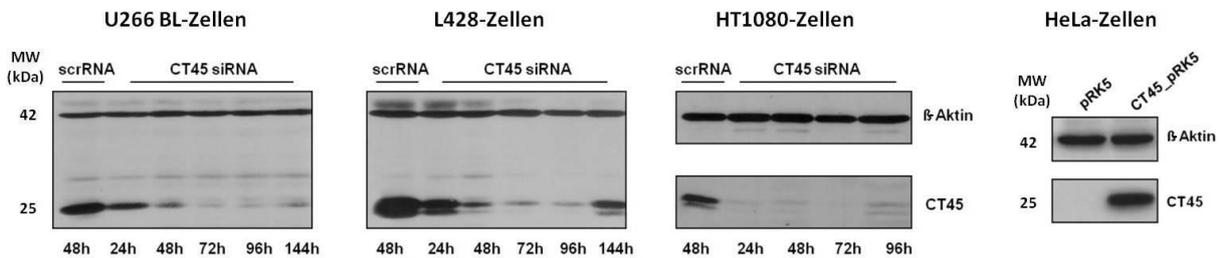


Abbildung 8: Herunterregulation von CT45 über RNA-Interferenz (Nukleofektor Kit T bzw. L, Lonza) in HT1080-, U266 BL- und L428-Zellen, bzw. CT45-Überexpression in HeLa-Zellen. Die Akkumulation von CT45 konnte in allen drei verwendeten Zelllinien erfolgreich reduziert werden. 72 und 96 Stunden nach Transfektion wurde die stärkste negative Regulation beobachtet. In HeLa-Zellen konnte CT45 überexprimiert werden. In der Vektorkontrolle (pRK5) war keine CT45-Anreicherung nachweisbar. Die Analyse der β -Aktin-Proteinmenge diente als Beladungskontrolle.

Die Proliferationsanalysen wurden über eine Zeitspanne bis 72 bzw. 96 Stunden nach Transfektion mit CT45-siRNA bzw. Kontroll-scrRNA durchgeführt. Die Analyse des Zellzyklus erfolgte 72 Stunden nach Transfektion. Wie exemplarisch in den Kinetiken (Abbildung 8) dargestellt ist, ist die Akkumulation von CT45 zu diesen Zeitpunkten deutlich verringert. Zudem ist der Einfluss von überexprimiertem CT45 in HeLa-Zellen auf den Zellzyklus überprüft worden. Diese Analyse erfolgte 16-18 Stunden nach der Transfektion.

Das Ergebnis des MTS-Assays ist in Abbildung 9 zusammengefasst. Untersucht sind HT1080- und L428-Zellen bis 72 Stunden nach Transfektion.

MTS-Assay

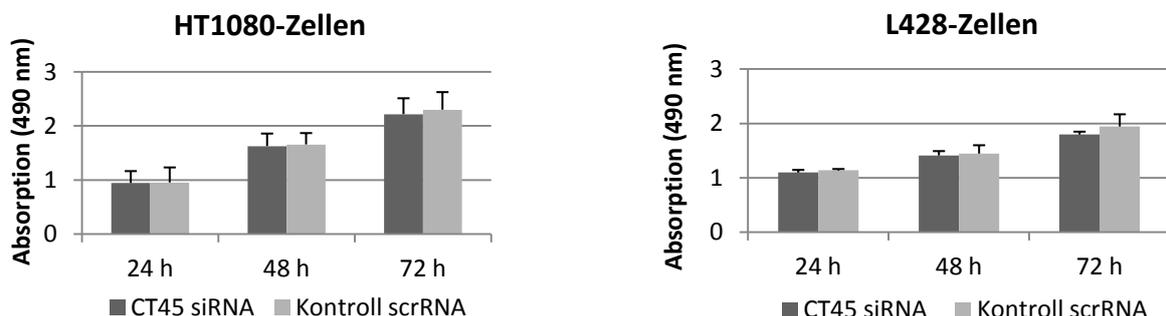


Abbildung 9: Einfluss von CT45 auf die Zellviabilität. Der MTS-Assay (Promega) ist 24–72 Stunden nach Transfektion (Nukleofektor Kit T bzw. L, Lonza) der Zellen (HT1080- und L428-Zellen) mit CT45-siRNA bzw. Kontroll-scrRNA durchgeführt worden. Der Test wurde in einer 96-Kavitäten-Platte durchgeführt. Die Standardabweichung ergab sich aus einer dreifachen Bestimmung. Die Absorption, bzw. die Aktivität der zelleigenen mitochondrialen Reduktase, konnte nach vorgeschriebener Testausführung in einem entsprechenden Plattenphotometer ermittelt werden. Es konnte kein Unterschied in der Zellviabilität detektiert werden.

Zu jedem betrachteten Zeitpunkt war die Absorption zwischen Kontroll- und CT45-regulierten Zellen nahezu identisch. Folglich hat CT45 keinen Einfluss auf die metabolische Aktivität der Zellen. Dieses Resultat lässt ebenfalls auf eine vergleichbare Zellzahl und somit auf eine gleiche Proliferationsrate schließen.

Eine genauere Aussage hinsichtlich der Zellteilungsrate erlaubt der BrdU-Assay. Dieser Test wurde in den drei Zelllinien HT1080, L428 und U266 BL über einen Zeitraum von 96 Stunden nach der Transfektion durchgeführt (Abbildung 10).

BrdU-Assay

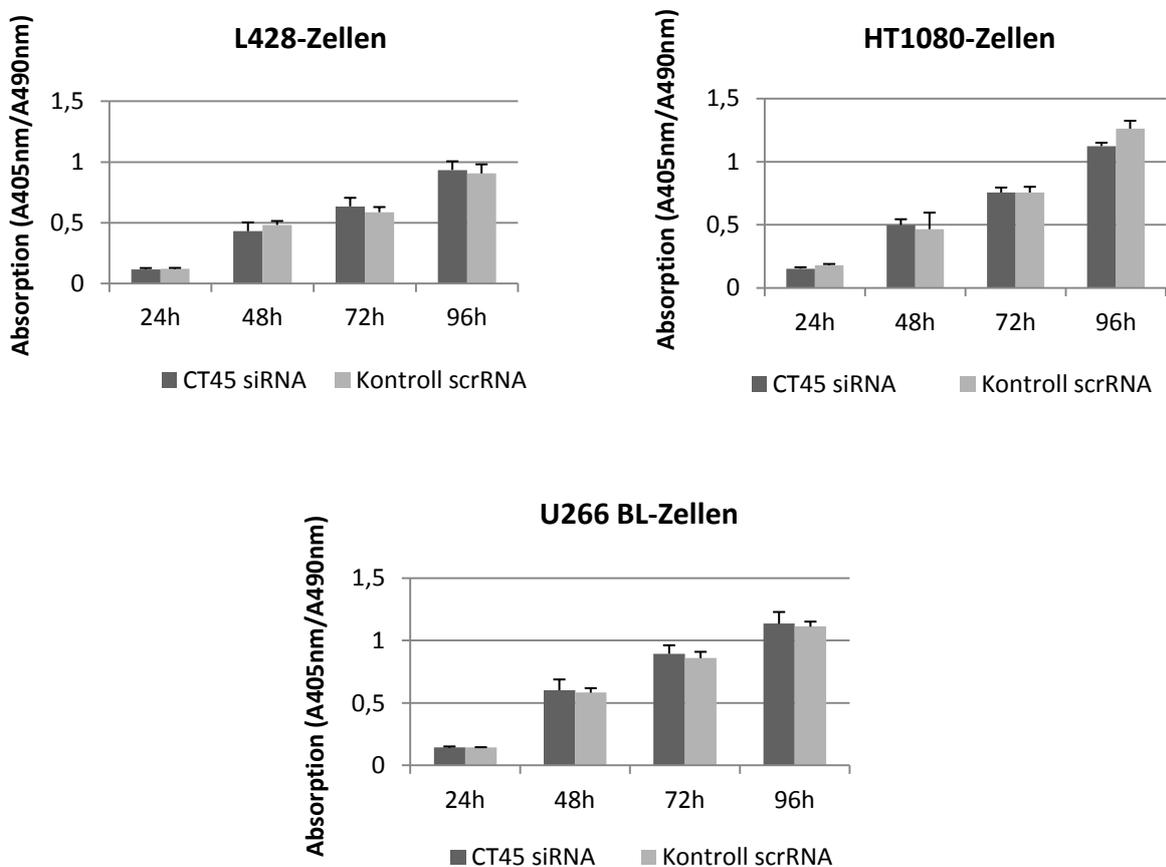


Abbildung 10: Untersuchung der Proliferation nach CT45-Herunterregulation. Der BrdU-Assay (Roche) wurde 24 bis 96 Stunden nach Transfektion (Nukleofektor Kit T bzw. L, Lonza) der Zellen in einer 96-Kavitäten-Platte durchgeführt. Zur Ermittlung der Standardabweichung wurden dreifach-Werte analysiert. Der BrdU-Einbau ist nach vorgeschriebener Testdurchführung in einem Plattenphotometer gemessen worden. Es konnte kein Effekt auf die Proliferation detektiert werden.

Auch in diesem Testsystem hat die Herunterregulation von CT45 in den drei verwendeten Zelllinien keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation. In allen Versuchen konnte zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied in der Zellteilungsrate beobachtet werden.

Eine weitere Möglichkeit, den Einfluss von CT45 auf die Proliferation auszuschließen, ist die Analyse von Proliferationsmarkern. Ein entsprechender proliferationsassoziierter Marker kann über die Verwendung des monoklonalen Antikörpers Ki-S2 detektiert werden. Ki-S2 erkennt das Protein p100 oder repp86 (Heidebrecht et al., 1997). Heidebrecht und Kollegen ermittelten, dass repp86 ausschließlich während der S-, G₂- und M-Phase des Zellzyklus angereichert wird. Eine erhöhte Proliferationsrate sollte demnach eine verstärkte Akkumulation von repp86 induzieren.

Für diesen Versuch wurde die Akkumulation von CT45 in HT1080- und L428-Zellen reduziert. Die Proben wurden mit Hilfe des Western Blots analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt. Wie zu vermuten war, konnte auch über diesen Versuchsansatz kein CT45-vermittelter Effekt auf die Proliferation detektiert werden. Nach Herunterregulation von CT45 blieb die Anreicherung von repp86 bei gleichmäßiger Beladung (β -Aktin) über 144 Stunden konstant (Abbildung 11).

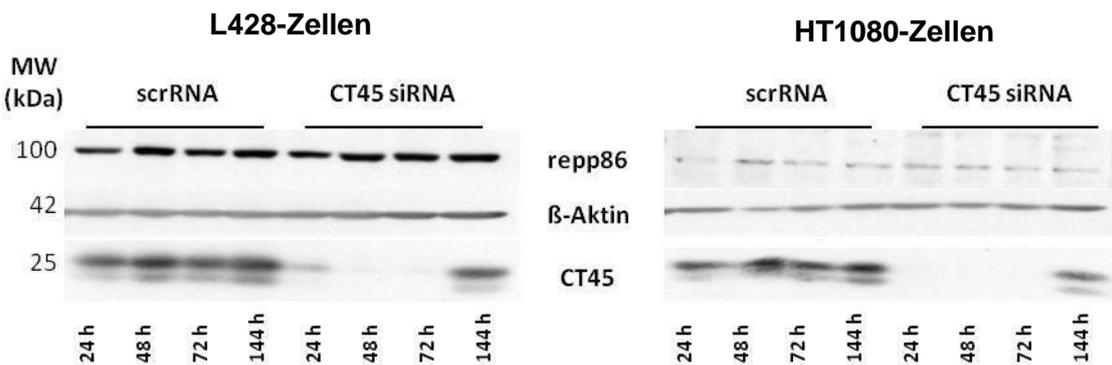


Abbildung 11: Akkumulation des Proliferationsmarkers repp86, analysiert im Western Blot. HT1080- und L428-Zellen wurden mit CT45-siRNA und Kontroll-scrRNA transfiziert. Nach SDS-PAGE und Western Blot wurden die entsprechenden Membranen mit den Antikörpern gegen β -Aktin (Beladungskontrolle) sowie gegen repp86 (Ki-S2) und CT45 (L428: Ki-A10, HT1080: Ki-CT45-1) gefärbt. Es konnte kein Unterschied in der repp86-Akkumulation detektiert werden.

Die bisherigen Experimente veranschaulichen deutlich, dass CT45 die Zellteilung nicht beeinflusst. Eine weitere Methode um diese Ergebnisse zu hinterfragen, ist die Analyse des Zellzyklus. Der Zellzyklus entarteter Zellen ist nicht mehr den Kontrollmechanismen des Organismus untergeordnet, sondern findet autonom statt. Die Zellen teilen sich unkontrolliert und unbegrenzt. Zur Analyse des Zellzyklus wurde die prozentuale Zellzahl, die sich in einer bestimmten Zellzyklusphase befindet, analysiert. Der Zellzyklus wird allgemein in zwei Phasen unterteilt, in die Mitose und die Interphase. Die Interphase lässt sich genauer in drei weitere Stadien teilen, die G₁-, S- und G₂-Phase (Howard und Plec, 1953).

Nachdem sich die Zelle in der Mitose, oder M-Phase, geteilt hat, beginnt die postmitotische G₁-Phase. Die Zelle wächst und die Chromosomen besitzen zunächst nur ein Chromatid. In

der sich anschließenden S-Phase beginnt die Reduplikation der DNA. Es liegen anschließend jeweils zwei Chromatiden pro Chromosom vor. Um sich erneut auf die Zellteilung in der Mitose vorzubereiten, rundet sich die Zelle in der G₂-Phase ab und vergrößert sich. Nicht teilungsfähige ausdifferenzierte Zellen verbleiben in einer Ruhephase, der sogenannten G₀-Phase.

Zelllinie

Zellzyklus-Analyse

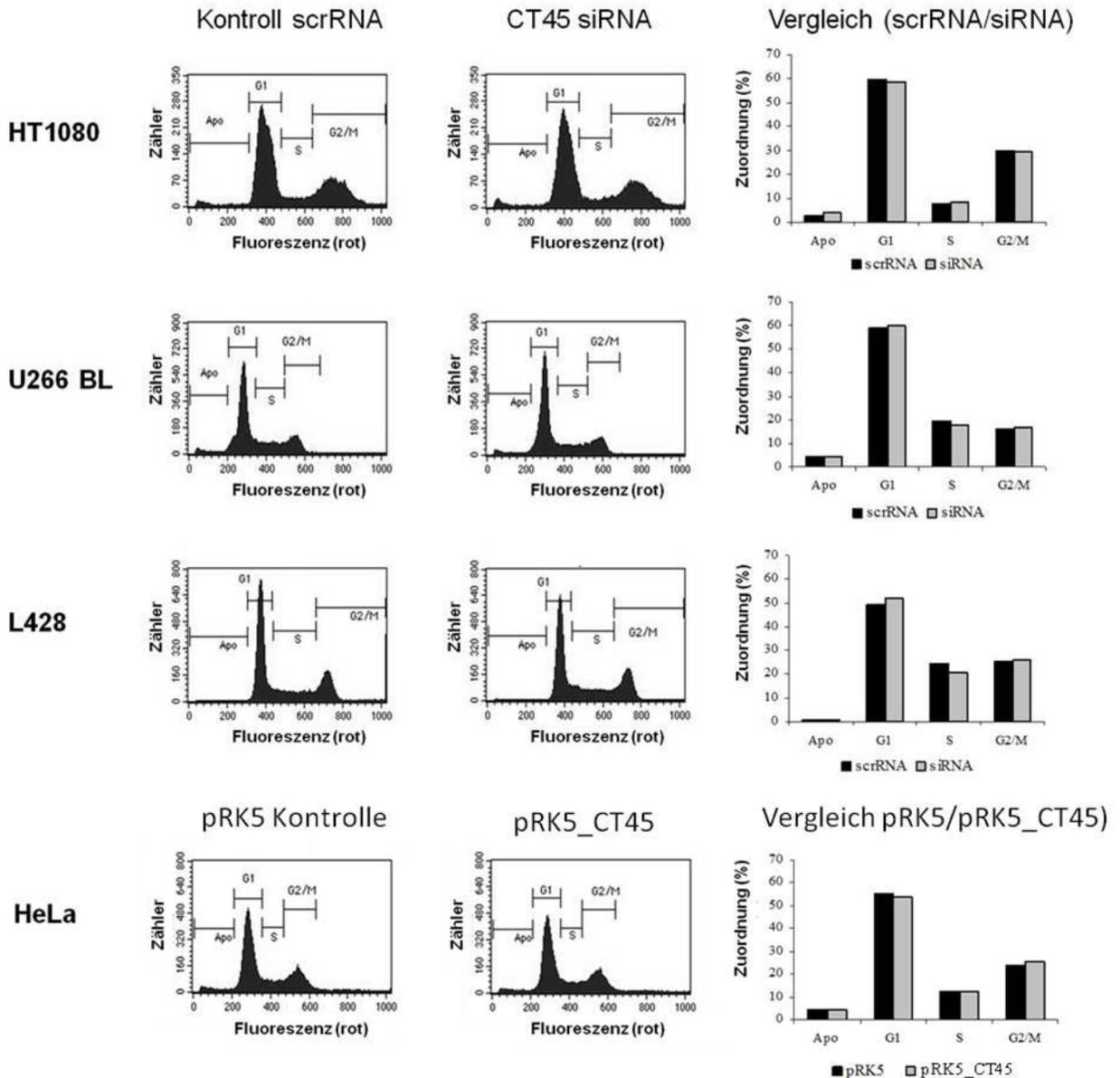


Abbildung 12: Einfluss von CT45 auf den Zellzyklus, untersucht in den vier Zelllinien HT1080, U266 BL, L428 und HeLa. HT1080-, U266 BL- und L428-Zellen wurden mit CT45-siRNA bzw. Kontroll-scrRNA transfiziert. 72 Stunden nach Transfektion ist der Zellzyklus analysiert worden. Die HeLa-Zellen wurden über die CaPO₄-Präzipitation mit dem pRK5_CT45-Überexpressionskonstrukt transfiziert. Zur Zellzyklus-Analyse sind die Zellen mit Ethanol permeabilisiert, fixiert und anschließend mit PJ markiert worden. Vor der Auswertung und Zuordnung der Zellen zu einer bestimmten Zellzyklus-Phase sind doppelte Zellen depletiert worden. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus mindestens dreien. Der Vergleich der zugeordneten Zellpopulationen erfolgte mit Excel (APO: Zellen in Apoptose, G1: Zellen in G₁-Phase, S: Zellen in S-Phase, G2/M: Zellen in G₂- bzw. M-Phase).

Die Differenzierung zwischen den einzelnen Phasen im Durchflusszytometer erfolgte über die Markierung der DNA mit dem Farbstoff Propidiumjodid (PJ). PJ interkaliert in die DNA und ermöglicht die Quantifizierung des DNA-Anteils pro Zelle. Der Zellzyklus wurde 72 Stunden nach Transfektion mit CT45-siRNA bzw. Kontroll-scrRNA, oder 16 Stunden nach CT45-Überexpression in HeLa-Zellen, durchgeführt. Die Ergebnisse der Zellzyklus-Analysen sind in Abbildung 12 zusammengefasst. Deutlich zu erkennen war, dass CT45 in allen analysierten Zelllinien keinen Einfluss auf den Zellzyklus hat. In der Histogramm-Darstellung wurden die gezählten Zellen gegen die Fluoreszenz abgebildet. Anhand der Fluoreszenzstärke sind die Zellen den entsprechenden Zellzyklus-Phasen zugeordnet worden. Die Zellzahl in einer Zellzyklusphase wurde in einem Balkendiagramm veranschaulicht. CT45-siRNA transfizierte Zellen wurden den Kontrollzellen gegenüber gestellt.

Schlussendlich konnte über die durchgeführten Experimente festgestellt werden, dass CT45 keinen Effekt auf die Zellproliferation, Zellviabilität und den Zellzyklus vermittelt.

4.4 Generierung monoklonaler Antikörper

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurde bereits 1999 ein monoklonaler CT45-Antikörper (Ki-A10) von Rudolph und Kollegen beschrieben. 2006 wurde Ki-A10 von der Arbeitsgruppe um Heidebrecht als CT45-spezifisch charakterisiert. Für zahlreiche meiner Versuche wurde dieser Antikörper verwendet. Da Ki-A10 im Western Blot häufig Probleme bereitete, war es dennoch notwendig, neue CT45-spezifische monoklonale Antikörper zu etablieren. Dazu wurden BALB/c-Mäuse mit einem GST-CT45-Fusionsprotein und zusätzlich mit CT45-Koimmunpräzipitaten (Kolp) immunisiert. Dieses sollte die Identifikation neuer CT45-Interaktionspartner ermöglichen. Auf diese Weise wurden nicht nur neue Antikörper gegen CT45 etabliert, sondern auch mindestens ein neuer Interaktionspartner identifiziert.

Charakterisierung neuer monoklonaler CT45-Antikörper

Die erfolgreiche Immunisierung der BALB/c-Mäuse ist vor der Fusion durch die Analyse der entsprechenden Mausseren im ELISA untersucht worden. Die Antigen-Beschichtung der ELISA-Platten erfolgte mit dem GST-CT45-Fusionsprotein. Im Anschluss wurden die aus der Maus entnommenen Milzzellen mit der Myelomzelllinie Ag8.653 fusioniert. Erfolgreich fusionierte Hybridome wurden über die Durchführung von ELISAs und Immunfluoreszenz-Färbungen auf die Sezernierung CT45-spezifischer Antikörper getestet. Positive Hybridome wurden weiter kultiviert und näher charakterisiert. Auf diese Weise konnten zwei neue CT45-spezifische monoklonale Antikörper (Ki-CT45-1 und Ki-CT45-2) etabliert werden. Zusätzlich

wurden mehrere neue Hybridome etabliert, die spezifische Antikörper gegen weitere Kernantigene produzierten.

Im Anschluss an die Klonierung der neuen CT45-spezifischen Antikörper wurde ein *Epitopmapping* durchgeführt (Abbildung 13). Es zeigte sich, dass die beiden neuen monoklonalen Antikörper, Ki-CT45-1 und Ki-CT45-2, spezifisch für ein anderes Epitop, als der herkömmliche Antikörper Ki-A10, waren. Ki-A10 erkennt die Peptide 21 und 22 auf der Epitopmembran, wohingegen die beiden neuen Antikörper die ersten beiden Peptide auf der Membran binden. Die Kontrollfärbung mit dem anti-Maus-HRP zeigte in keinem Fall eine Färbung dieser Spots.

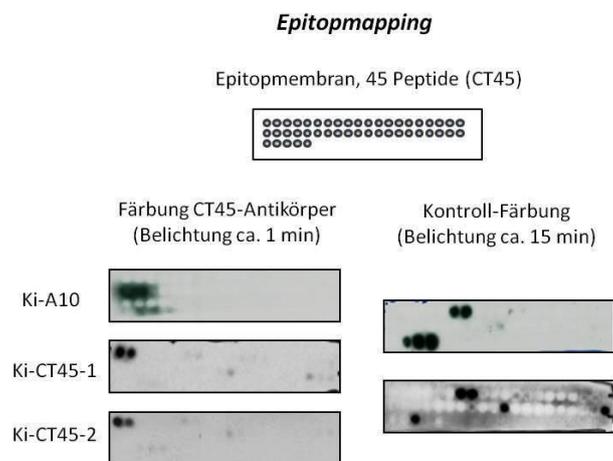


Abbildung 13: Epitopmapping. Zur Übersicht ist eine schematische Zeichnung der Epitopmembran mit den 45 Peptid-Spots dargestellt. Zu erkennen ist, dass der Antikörper Ki-A10 die Peptide 21 und 22 des Proteins CT45 erkennt (überlappende Sequenz: MQKPGSNAPVG). Die beiden Antikörper Ki-CT45-1 und Ki-CT45-2 färben hingegen die ersten beiden Peptid-Spots (überlappende Sequenz: TEKVAVDPETV). Als Kontrolle wurde die Membran zwischen den einzelnen Antikörper-Färbungen mit einem anti-Maus HRP inkubiert.

Außerdem ist in Immunfluoreszenz-Färbungen und Western Blot-Analysen überprüft worden, ob die Antikörper Ki-CT45-1 und 2 das CT45-charakteristische Muster im Zellkern färben und die CT45-spezifischen Banden im Western Blot erkennen (Abbildung 14). Ein Vergleich der Immunfluoreszenz-Färbungen zwischen den beiden neu generierten monoklonalen Antikörpern Ki-CT45-1 bzw. 2 und dem herkömmlichen Antikörper Ki-A10 zeigte ein identisches Muster im Zellkern (Abbildung 14A). Alle drei Antikörper definieren CT45 in den *Nuclear Speckles*. Die drei Antikörper wurden außerdem im Western Blot auf Lysate der drei Zelllinien L428, HT1080 und U266 BL getestet (Abbildung 14B). CT45 unterliegt posttranslationalen Modifikationen, wie beispielsweise der Phosphorylierung. Daher erkennt der Antikörper Ki-A10 in der Regel eine Doppelbande bei 22 und 25 kDa. In U266 BL-Zelllysaten wurde häufig nur die Bande bei 25 kDa detektiert. Zudem konnte die

Akkumulation von CT45 in HT1080-Zellen nur schwach und erst nach langer Belichtung detektiert werden.

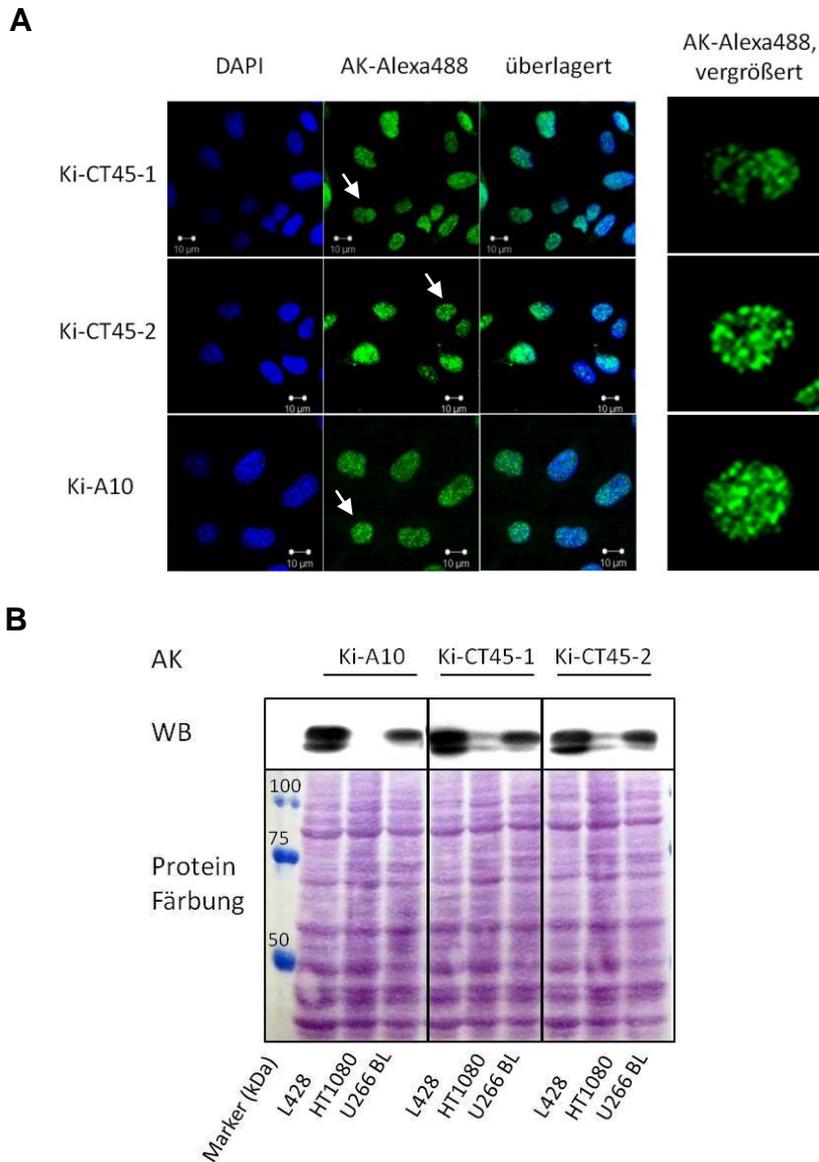


Abbildung 14: Vergleich der CT45-Antikörper in der Immunfluoreszenz-Färbung und im Western Blot. A: Immunfluoreszenz-Färbungen von HT1080-Zellen. Alle drei CT45-spezifischen Antikörper detektierten die typische nukleäre Anreicherung von CT45 (*Nuclear Speckles*) (verwendeter 2. Antikörper: Alexa-488-gekoppelter anti-Maus). Der Zellkern wurde mit DAPI blau angefärbt. B: Im Western Blot sind nicht nur die drei CT45-Antikörper, sondern auch die drei Zelllinien L428-, U266 BL- und HT1080 analysiert worden. Es wurden jeweils 50 µg Lysat pro Spur aufgetragen, die Belichtungszeit für die drei Antikörper war vergleichbar. Als Beladungskontrolle diente die Protein-Färbung mit Ponceau S. Alle drei Antikörper detektierten die stärkste CT45-Akkumulation in den L428-Zellen. In den HT1080-Zellen wurde CT45 mit den Antikörpern Ki-CT45-1 und Ki-CT45-2 deutlicher nachgewiesen.

Vergleicht man diese Befunde mit den Färbungen der beiden neuen Antikörper, ergibt sich bezüglich der L428 und U266 BL-Lysate kein Unterschied. Allerdings detektierten Ki-CT45-1 und 2 in HT1080-Zelllysaten die CT45-Doppelbande nach deutlich kürzerer Belichtungszeit.

Monoklonale Antikörper spezifisch für Kernantigene

Zusätzlich zur Immunisierung mit dem GST-CT45-Fusionsprotein wurden den Mäusen CT45-Koimmunpräzipitate appliziert. Ziel war die Generierung monoklonaler Antikörper gegen CT45-interagierende Proteine. Die entsprechenden Hybridomüberstände wurden in Immunfluoreszenz-Färbungen auf nukleär-färbende Antikörper untersucht. Ebenfalls wurde analysiert, ob spezifische Proteinbanden über den Western Blot detektierbar sind. Es konnten drei Hybridomüberstände identifiziert werden, die mit nukleären Antigenen reagierten (Abbildung 15). Die drei getesteten Überstände detektierten ein ähnliches Muster im Zellkern, das eine Anfärbung der Nukleoli vermuten ließ.

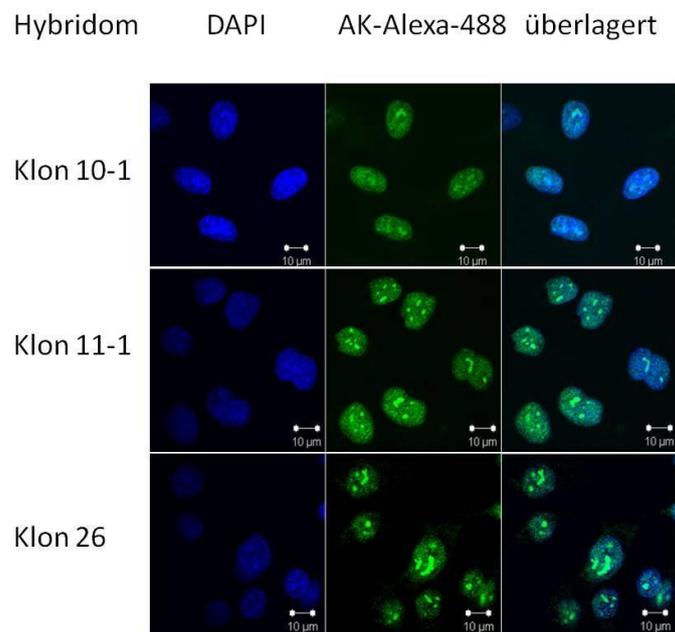


Abbildung 15: Immunfluoreszenz-Färbungen von HT1080-Zellen mit den Hybridomüberständen von Klon 10.1, 11.1 und 26. Als Sekundärantikörper wurde ein anti-Maus Alexa488 (grün)-markierter Antikörper verwendet. Die DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Alle drei monoklonalen Antikörper färbten nukleäre Antigene, vermutlich in den Nukleoli.

Die Hybridomüberstände von Klon 10.1 und Klon 11.1 färbten im Western Blot eine deutliche Bande bei ca. 80 kDa. Das Protein konnte anschließend mittels massenspektrometrischer Analyse, durchgeführt von Herrn Dr. Buck, UK Eppendorf, als ATP-abhängige DNA Helikase Ku80 identifiziert werden. Die Hybridome bekamen daher die Bezeichnung Ki-Ku80. Die Identifizierung des von Klon 26 erkannten Antigens steht noch aus.

4.5 CT45-Interaktionspartner

Im Laufe dieser Arbeit konnten einige CT45-Interaktionspartner identifiziert werden. Erste Vorarbeiten hierzu wurden von Herrn Dr. Heidebrecht (UK-SH, Campus Kiel) in Kooperation mit Herrn Dr. Buck (UKE Hamburg) geleistet. Durchgeführt wurden Koimmunpräzipitationen

mit dem Antikörper Ki-A10 aus L428-Zelllysaten. Nach Färbung des SDS-Gels mit Coomassie Blau wurden die sichtbaren Proteinbanden ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert.

Tabelle 17: Zusammenfassung einiger interessanter Funktionen der potentiellen CT45-Interaktionspartner.

Interaktionspartner	Funktionen
Nukleophosmin (NPM)	<ul style="list-style-type: none"> • ubiquitär exprimiertes, nukleäres Phosphoprotein einer Histon-Chaperon-Familie (Frohlock et al., 2007) • Phosphorylierung am Threonin 199 (Thr199) induziert Akkumulation in den <i>Nuclear Speckles</i> (Tarapore et al., 2006)
SFPQ	<ul style="list-style-type: none"> • prä-mRNA-assoziierter modifizierender Spleißfaktor (Patton et al., 1993)
NONO	<ul style="list-style-type: none"> • besitzt RNA-Bindesequenz, keine direkte Beteiligung am Spleißen (Yang et al., 1993) • SFPQ und NONO bilden Heterodimere, die in den nukleären <i>Paraspeckles</i> lokalisiert und an der Zurückhaltung defekter RNA beteiligt sind (Zhang et al., 2001; Fox et al., 2010)
DDX56	<ul style="list-style-type: none"> • ATP-abhängige RNA-Helikase, die in den Nukleoli lokalisiert und an der Ribosom-Biogenese beteiligt ist (Zaires et al., 2000)
MEP50	<ul style="list-style-type: none"> • reguliert die Aktivität des Methylosom-Komplexes, induziert die Demethylierung interagierender Proteine (Friesen et al., 2002)
Nukleolin	<ul style="list-style-type: none"> • funktionell vielfältiges, ubiquitär exprimiertes, nicht ribosomales Protein, hauptsächlich in den Nukleoli lokalisiert; wichtigste Aufgabe ist die Synthese ribosomaler RNA und die Ribosomen-Biogenese (Pederson, 1998)
Ku80	<ul style="list-style-type: none"> • vielfältige Funktionen für die Regulation nukleärer Prozesse, wie der DNA-Reparatur, der Aufrechterhaltung der Telomere und der Apoptose-Regulation (Jin et al., 1993; Hsu et al., 1999)
EML4	<ul style="list-style-type: none"> • Mikrotubuli-assoziertes Protein, über Phosphorylierung reguliert (Houtmann et al., 2007); essentiell für den korrekten Aufbau der Mikrotubuli (Pollmann et al., 2006)
Eg5	<ul style="list-style-type: none"> • beeinflusst die Stabilität des Mikrotubuli-Gerüsts über eine zytoplasmatische Interaktion mit NPM (Wang et al., 2010)

Als mögliche Interaktionspartner sind unter anderem die Kernproteine Nukleophosmin, Nukleolin, SFPQ (*Splicing factor proline/glutamin rich*), NONO (*non PDU domain-containing octamer-binding protein*), DDX56 (*DEAD [Asp-Glu-Ala-Asp] box polypeptide 56*) sowie MEP50 (*Methylosome protein 50*) analysiert worden. Ku80 (ATP-abhängige DNA Helikase II,

80 kDa Einheit) wurde bereits im Abschnitt 4.4 vorgestellt. Außerdem wurde eine Interaktion zwischen CT45 dem Mikrotubuli-assoziierten Protein EML4 (*echinoderm microtubule associated protein like 4*), sowie dem Kinesin (Eg) 5, untersucht. Die wesentlichen Funktionen der potentiellen Interaktionspartner sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Die mögliche Interaktion zwischen den vorgestellten Proteinen und CT45 konnte im Rahmen meiner Arbeit genauer charakterisiert werden.

Zur Verifizierung der Interaktionen wurden Koimmunpräzitationen (Kolp) und *Pull Down* (PD)-Experimente mit dem GST-CT45-Fusionsprotein aus L428-Zelllysaten durchgeführt (Abbildung 16 und Abbildung 17). Zunächst werden die Ergebnisse aus der Kolp vorgestellt.

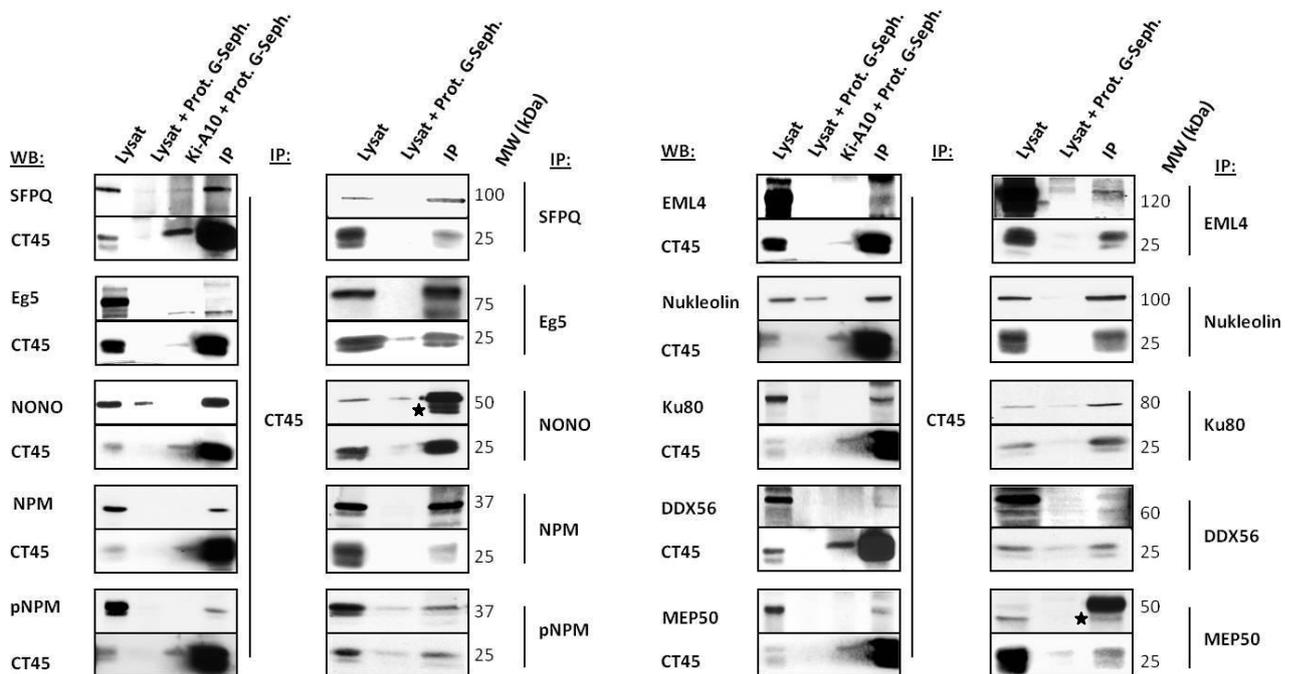


Abbildung 16: Kolp zwischen CT45 und den beschriebenen Proteinen. Aufgetragen wurde das L428-Zelllysate, eine Kontrolle zum Ausschluss unspezifischer Bindungen (L428-Zelllysate inkubiert mit Protein G-Sepharose), eine negative Kontrolle zum Nachweis der CT45-Immünpräzitation (Inkubation des Antikörper Ki-A10 mit Protein G-Sepharose, da CT45 mit 25 kDa direkt auf Höhe der leichten Antikörperkette migriert) und die IP (Immünpräzitation: L428-Zelllysate inkubiert mit Protein G-Sepharose und Ki-A10, bzw. mit den entsprechenden Antikörpern gegen die möglichen Interaktionspartner). * Erklärung siehe Text.

Für die Kolp wurde das L428-Zelllysate mit Protein G-Sepharose und Ki-A10 bzw. den spezifischen Antikörpern gegen die potentiellen Interaktionspartner inkubiert. Mögliche unspezifische Bindungen wurden über die Inkubation des Zelllysats mit Protein G-Sepharose ausgeschlossen. In allen Versuchen wurden keine oder nur schwache unspezifische Bindungen an die Protein G-Sepharose detektiert. Zusätzlich wurde das unbehandelte L428-Zelllysate aufgetragen, in dem alle Proteine deutlich nachgewiesen werden konnten. Da das CT45-Molekulargewicht (MW) mit 25 kDa mit dem der leichten Antikörperkette überlagert,

wurde die CT45-Präzipitation an die Protein G-Sepharose separat überprüft. CT45 konnte mit allen vorgestellten Proteinen (SFPQ, NONO, EML4, Eg5, MEP50, NPM, DDX56, Ku80 und Nukleolin) koimmunpräzipitiert werden (Abbildung 16). Aus der Literatur war zudem bekannt, dass NPM phosphorylierungsabhängig (Thr199) in den *Nuclear Speckles* akkumuliert (Tarapore et al., 2006). Daher wurde die Interaktion mit pNPM (Thr199) separat analysiert und konnte bestätigt werden. Zur Festigung der Ergebnisse wurde CT45 an die Protein-G-Sepharose präzipitiert und die Bindung der beschriebenen Proteine überprüft. Eg5 konnte als einzige Ausnahme nicht mit CT45 koimmunpräzipitiert werden. Alle anderen Proteine wurden in der entsprechenden Kolp detektiert (Abbildung 16). Beobachtet wurde zudem, dass nicht alle Proteine in gleicher Intensität darstellbar waren. Die Affinität von SFPQ, NONO, Nukleolin, Ku80 und NPM/pNPM zu CT45 scheint stärker zu sein, als die der anderen drei Proteine (EML4, DDX56, MEP50). Die spezifischen Proteinbanden dieser drei Proteine konnten erst nach langer Belichtungszeit visualisiert werden. Die breiten Banden (★) nach Präzipitation von NONO und MEP50 sind auf das Molekulargewicht (NONO: 54 kDa; MEP50: 44 kDa) und die Nähe zur schweren Antikörperkette (50 kDa) zurückzuführen.

Die Ergebnisse aus der Kolp sollten über PD-Experimente mit dem GST-CT45-Fusionsprotein, ebenfalls aus L428-Zelllysat, bestätigt werden (Abbildung 17A). Die Interaktion zwischen CT45 und EML4 wurde unter Verwendung verschiedener GST-EML4-Fusionsproteine untersucht (Abbildung 17B).

Auch in diesen Versuchen konnte eine Interaktion mit fast allen Proteinen nachgewiesen werden. Zur Kontrolle unspezifischer Bindungen wurde das Zelllysat mit GST alleine inkubiert. Die GST-Bande konnte bei 25-27 kDa detektiert werden. Es wurden keine unspezifischen Hintergrundfärbungen nachgewiesen, die das Ergebnis in Frage stellen könnten. Das verwendete GST-CT45-Fusionsprotein migriert auf knapp 50 kDa und konnte nach der Ponceau S-Färbung, sowie nach der Inkubation mit dem Antikörper Ki-A10, detektiert werden. Alle untersuchten Proteine konnten deutlich im L428-Zelllysat visualisiert werden.

Zwischen GST-CT45 und SFPQ, NONO, NPM/pNPM, Ku80 bzw. Nukleolin war eine starke Kopräzipitation detektierbar. DDX56 und MEP50 konnten allerdings nur schwach nach Inkubation mit dem Fusionsprotein dargestellt werden. Dieses korreliert mit den Ergebnissen aus der Kolp. Eg5 und GST-CT45 konnten nicht miteinander kopräzipitiert werden. Die Interaktion zwischen CT45 und EML4 wurde über verschiedene Fusionsproteine untersucht (Abbildung 17B). In dem PD mit dem GST-EML4-Fusionsprotein konnte eine deutliche

Interaktion mit CT45 detektiert werden. Als Kontrolle wurde GST-EML4 alleine aufgetragen. CT45 konnte hier nicht dargestellt werden. Weitere PD-Experimente mit dem C-terminalen bzw. N-terminalen GST-EML4-Fusionsprotein zeigten zudem, dass CT45 mit dem N-Terminus interagiert. In der GST-Kontrolle wurden keine unspezifischen Bindungen detektiert.

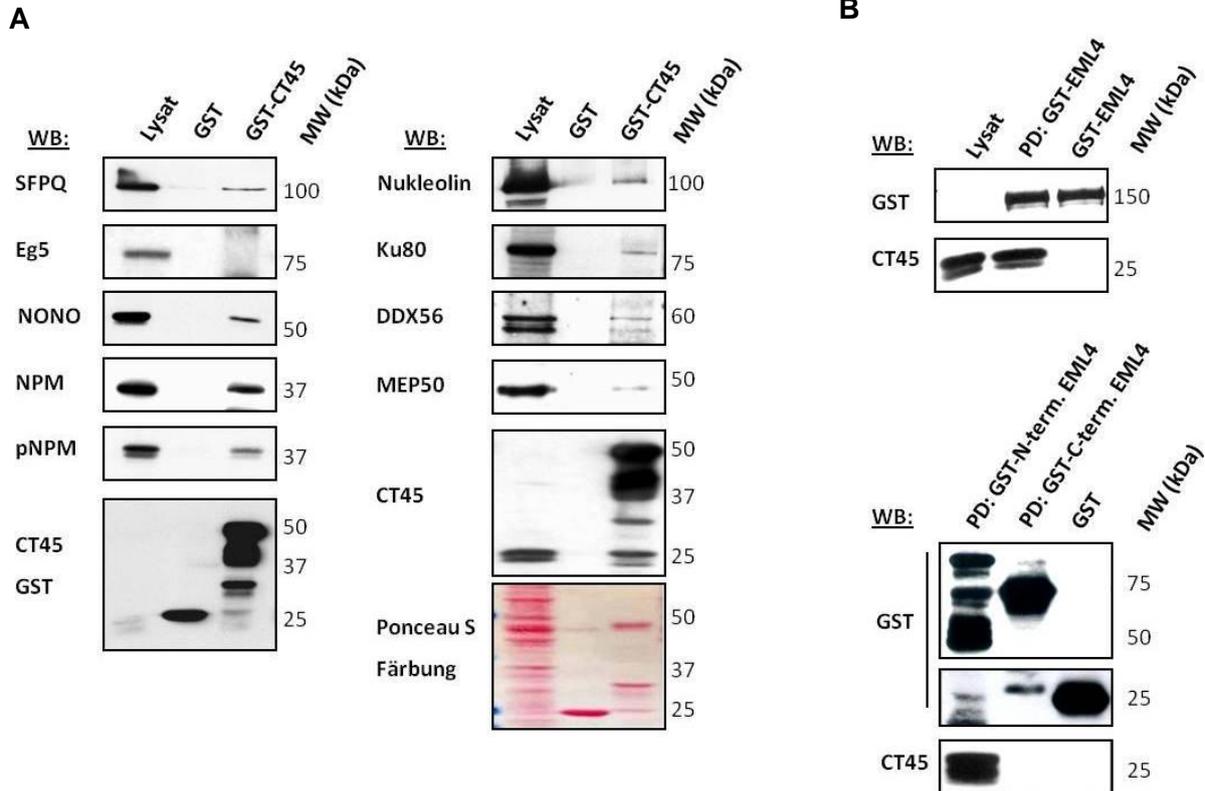
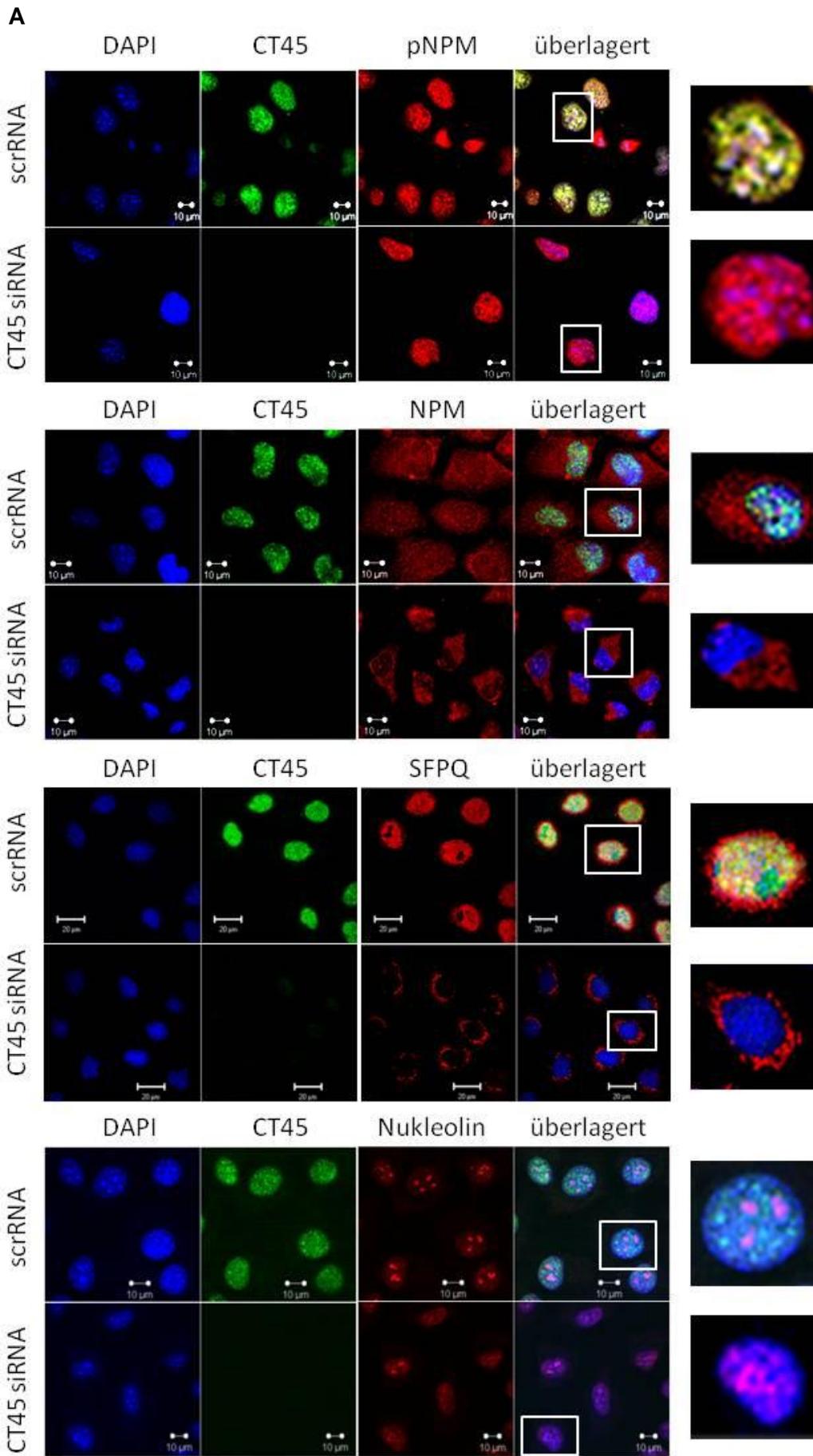


Abbildung 17: Pull down (PD)-Experimente mit einem GST-CT45-Fusionsprotein und verschiedenen GST-EML4-Fusionsproteinen aus L428-Zelllysate. A: Aufgetragen wurde das Zelllysate, die GST-Kontrolle und der PD mit GST-CT45 (GST: GST inkubiert mit Glutathion-Sepharose. PD GST-CT45: L428-Zelllysate inkubiert mit dem GST-CT45-Fusionsprotein und Glutathion-Sepharose). Ponceau S-Färbung zur Visualisierung des gesamten aufgetragenen Proteins. B: Pull down (PD) mit GST-EML4-Fusionsproteinen in L428-Zelllysaten. GST-EML4: Kontrolle, nur Fusionsprotein mit Glutathion-Sepharose. PD GST-EML4, GST-N-term. EML4, GST-C-term. EML4: L428 Gesamtzelllysate inkubiert mit den verschiedenen GST-EML4-Fusionsproteinen und Glutathion-Sepharose. GST: L428-Zelllysate inkubiert mit GST und Glutathion-Sepharose.

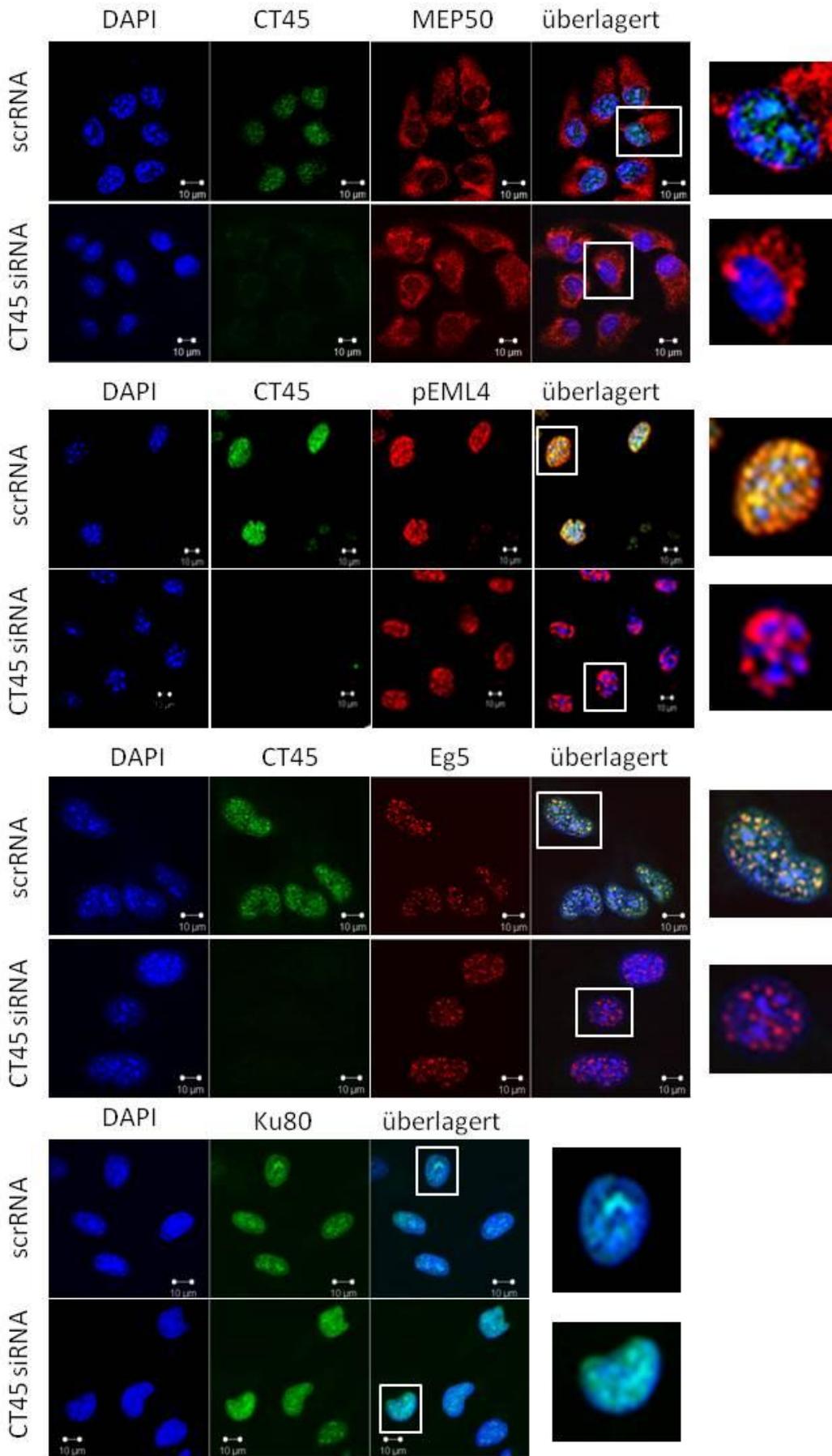
Zur weiteren Überprüfung der beschriebenen Ergebnisse wurde die Kolo-kalisation zwischen CT45 und den untersuchten Interaktionspartnern über Doppelimmunfluoreszenz-Färbungen in HT1080-Zellen überprüft. Die Analyse der Protein-Überlagerung *in situ* sollte Hinweise auf eine direkte Wechselwirkung der Proteine in den *Nuclear Speckles* geben. Zusätzlich wurde analysiert, ob die Herunterregulation von CT45 einen Effekt auf die Anreicherung und Verteilung der betrachteten Proteine hat. Hierzu wurde die Proteinakkumulation von CT45 über RNA-Interferenz in den HT1080-Zellen negativ reguliert. 72 Stunden nach der Transfektion mit CT45-siRNA bzw. scrRNA wurden Doppelimmunfluoreszenz-Färbungen angefertigt (Abbildung 18). Der Zellkern wurde mit DAPI (blau) markiert. CT45 wurde in allen

Färbungen, außer parallel zur Überexpression mit einem GFP-NONO-Konstrukt, in grün visualisiert. Die nukleäre Anreicherung von CT45 in den *Nuclear Speckles* konnte in allen Kontrollproben detektiert werden. Zudem war die Herunterregulation von CT45 in den entsprechenden Proben nachweisbar. Die CT45-Interaktionspartner wurden in rot dargestellt. Die Kolokalisation zwischen DDX56 und CT45 konnte nicht analysiert werden, da kein entsprechender Antikörper zur Verfügung stand.

Wie von Tarapore und Kollegen (2006) beschrieben, wurde pNPM (Thr199) ausschließlich nukleär und angereichert in den *Nuclear Speckles* visualisiert. Die Interaktion zwischen CT45 und pNPM (Thr199) konnte daher über eine deutliche Kolokalisation (Gelbfärbung) in den *Nuclear Speckles* gezeigt werden (Abbildung 18). Der gegen das gesamte zelluläre NPM gerichtete Antikörper färbte hingegen sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma. Es konnte nur eine schwache Kolokalisation mit CT45 detektiert werden. Interessanterweise schien sich die Anreicherung von zytoplasmatischem NPM in den beiden Proben zu unterscheiden. In den CT45-siRNA transfizierten Zellen akkumulierte NPM stärker im Bereich des Zellkerns, während die Verteilung in den Kontrollzellen bis weit in die Peripherie reichte. In den Doppelimmunfluoreszenz-Färbungen von CT45 und SFPQ konnte ebenfalls eine starke Kolokalisation nachgewiesen werden. Zudem hatte die Herunterregulation von CT45 einen Einfluss auf die SFPQ-Verteilung im Zellkern. In den CT45-positiven HT1080-Zellen akkumuliert SFPQ im Nukleoplasma, aber auch an der Kernmembran (Patton et al., 1993; Meissner et al. 2000). Nach CT45-Herunterregulation konnte SFPQ nahezu ausschließlich an der Kernmembran lokalisiert werden. CT45 und Nukleolin zeigten keine Überlagerung. Nukleolin akkumuliert hauptsächlich in den Nukleoli. Die Herunterregulation von CT45 induzierte aber in einigen Zellen eine Umverteilung von Nukleolin aus den Nukleoli ins Nukleoplasma. Zwischen CT45 und MEP50 konnte ebenfalls keine Kolokalisation visualisiert werden. MEP50 ist nahezu ausschließlich im Zytoplasma angereichert. Die negative Regulation der CT45-Proteinmenge hatte zudem keinen Effekt auf das Verteilungsmuster von MEP50. Die Detektion von EML4 mit dem Antikörper Ki-EML4a war nicht möglich, da dieser, genau wie Ki-A10, ein in der Maus generierter IgG1-Antikörper ist. Daher wurde ein weiterer EML4-spezifischer Antikörper verwendet (Ki-Mit; IgM). Ki-Mit erkennt spezifisch phosphoryliertes EML4 (Pollmann et al., 2006). Sehr gut zu erkennen war, dass pEML4 und CT45 eine vergleichbare Lokalisation im Zellkern aufweisen. Somit konnte eine starke Überlagerung der beiden Proteine in den *Nuclear Speckles* detektiert werden. Die Interaktion kann somit durch die starke Kolokalisation bestätigt werden. Nach Herunterregulation von CT45 konnte jedoch kein Effekt auf das Verteilungsmuster oder die Akkumulation von pEML4 beobachtet werden. CT45 und Eg5 zeigten ebenfalls eine deutliche Kolokalisation in



B



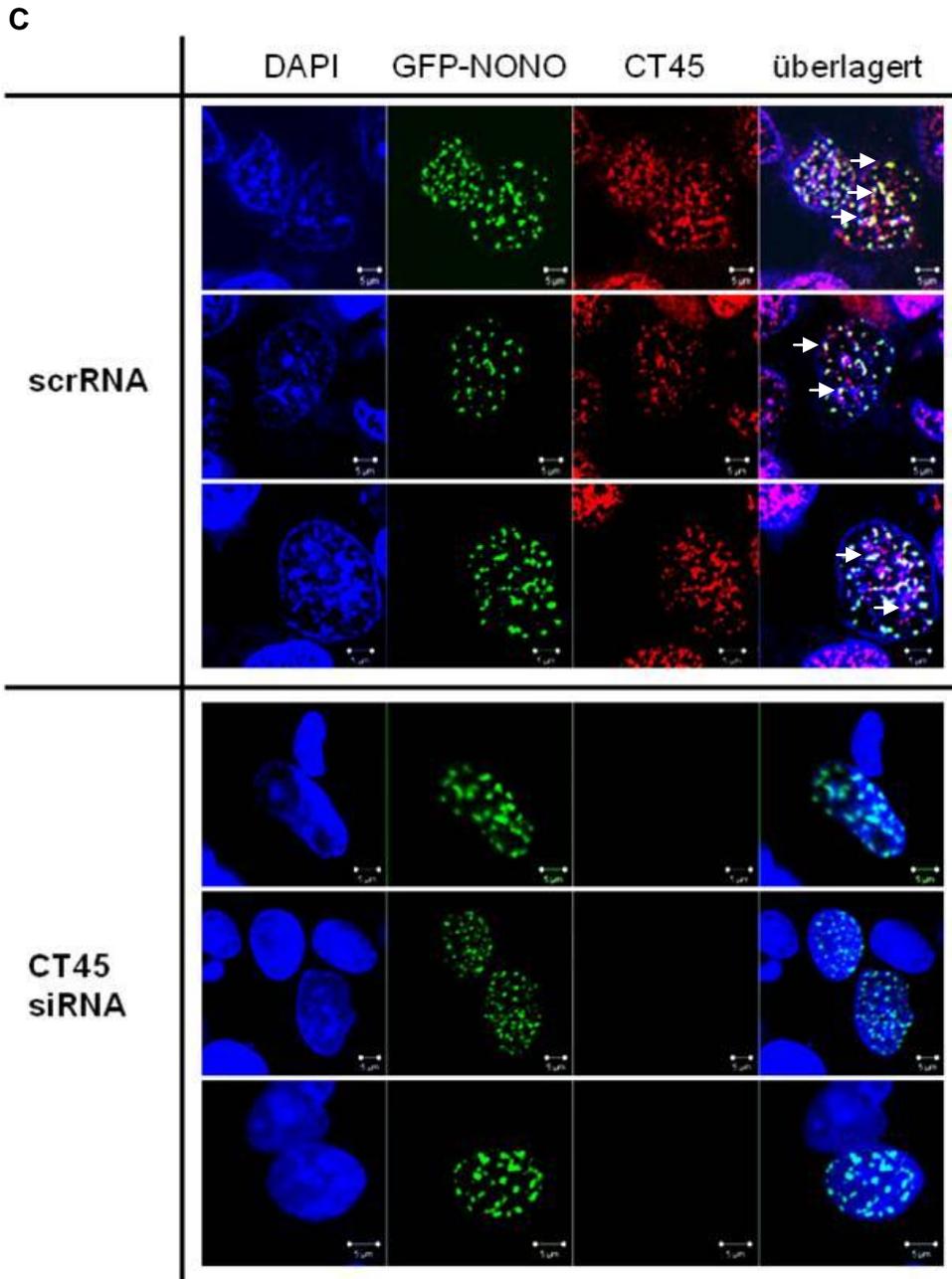


Abbildung 18: Immunfluoreszenz-Färbungen der möglichen Interaktionspartner nach CT45-Herunterregulation in HT1080-Zellen (siRNA/scrRNA Transfektion, mittels Nukleofektor Kit T, Lonza). Die DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt. A+B: CT45 wurde mit Ki-A10, Ku80 mit Ki-Ku80 und beide mit einem anti-Maus Alexa488 (grün)-markierten Sekundärantikörper gefärbt. Alle anderen Proteine wurden mit den spezifischen Primärantikörpern und einem anti-Kaninchen Alexa594 (rot)-markierten Sekundärantikörper visualisiert. C: Zur Analyse von NONO erfolgte eine zweite Transfektion mit einem GFP-NONO-Überexpressionsvektor (grün). CT45 wurde mit dem Ki-A10-Antikörper und mit einem Alexa594 (rot)-markierten Antikörper visualisiert. Eine Kolokalisation zeigt sich durch eine Gelbfärbung.

den *Nuclear Speckles*. CT45 hatte allerdings keine Auswirkungen auf die Eg5-Verteilung innerhalb der Zelle. Die Antikörper (IgG1) gegen CT45 und Ku80 wurden in der Maus generiert, so dass keine Doppelimmunfluoreszenz-Färbungen erfolgen konnten. Eine Aussage über eine Kolokalisation ist dementsprechend nicht möglich. Ku80 konnte in den Kontrollzellen im Nukleoplasma, aber überwiegend in den Nukleoli detektiert werden. Durch

die negative Regulation der CT45-Proteinmenge veränderte sich die Verteilung von Ku80 in vielen Zellen. Ku80 wurde überwiegend diffus im Nukleoplasma detektiert. Die Analyse der Kolo-kalisation zwischen NONO und CT45 erfolgte nach Transfektion der HT1080-Zellen mit einem GFP-NONO-Überexpressionskonstrukt. Eine Kolo-kalisation zwischen NONO und CT45 findet an einigen distinkten Punkten im Zellkern statt. Die Akkumulation und Lokalisation von NONO ist nicht durch eine Herunterregulation von CT45 beeinflussbar.

Abschließend wurde analysiert, ob CT45 die zelluläre Abundanz der Interaktionspartner verändert. Hierzu wurde ein Western Blot nach Separierung zwischen Kern- und Zytoplasmafraktion durchgeführt (Abbildung 19). Die Herunterregulation von CT45 erfolgte mittels RNA-Interferenz. L428- und HT1080-Zellen wurden mit der entsprechenden CT45-siRNA oder der Kontroll-scrRNA transfiziert. Die Fraktionierung zwischen Zytoplasma- und Kernproteinen erfolgte mit dem *ProteoJET™ Cytoplasmic & Nuclear Protein Extraction Kit* (Fermentas). Entsprechende Lysate wurden über einen Zeitraum bis 144 Stunden nach der Transfektion angefertigt.

Die für CT45 charakteristischen Doppelbanden bei 22 und 25 kDa konnten in beiden Zelllinien nur in der Kernfraktion visualisiert werden (Abbildung 19). Durch die RNA-Interferenz ist die CT45-Akkumulation zwischen 24 und 72 Stunden reduziert. GAPDH wurde als zytoplasmatischer Marker verwendet und war nicht im Zellkern detektierbar. Eine gute Aufreinigung der Fraktionen war demnach gelungen. β -Aktin diente als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der SDS-Gele. Alle Proteine konnten auf ihrer charakteristischen Höhe im SDS-Gel detektiert werden. NPM wurde in beiden Zelllinien ausschließlich in der Kernfraktion visualisiert. Der Antikörper gegen pNPM (Thr 199) detektierte zusätzlich eine Bande im Zytoplasma. Die Phosphorylierung in den L428-Zellen war stärker, als in den HT1080-Zellen. Obwohl im Laufe der Kinetik eine Regulation stattgefunden hat, wurde ein CT45-induzierter Effekt nicht festgestellt. MEP50 und EML4 wurden ausschließlich im Zytoplasma detektiert, wohingegen DDX56, NONO, Nukleolin und SFPQ nur im Kern nachgewiesen werden konnten. Ku80 war in den HT1080-Zellen ausschließlich in der Kernfraktion, in den L428-Zellen allerdings zusätzlich im Zytoplasma lokalisiert. Die CT45-Herunterregulation hatte weder einen Einfluss auf die Verteilung zwischen Zellkern und Zytoplasma, noch auf die zelluläre Anreicherung der beschriebenen Proteine. Dies bestätigt die Ergebnisse aus den *in situ*-Untersuchungen. Die visualisierte Translokalisierung einiger Proteine innerhalb des Zellkerns wurde nicht näher untersucht.

- 4. Ergebnisse -

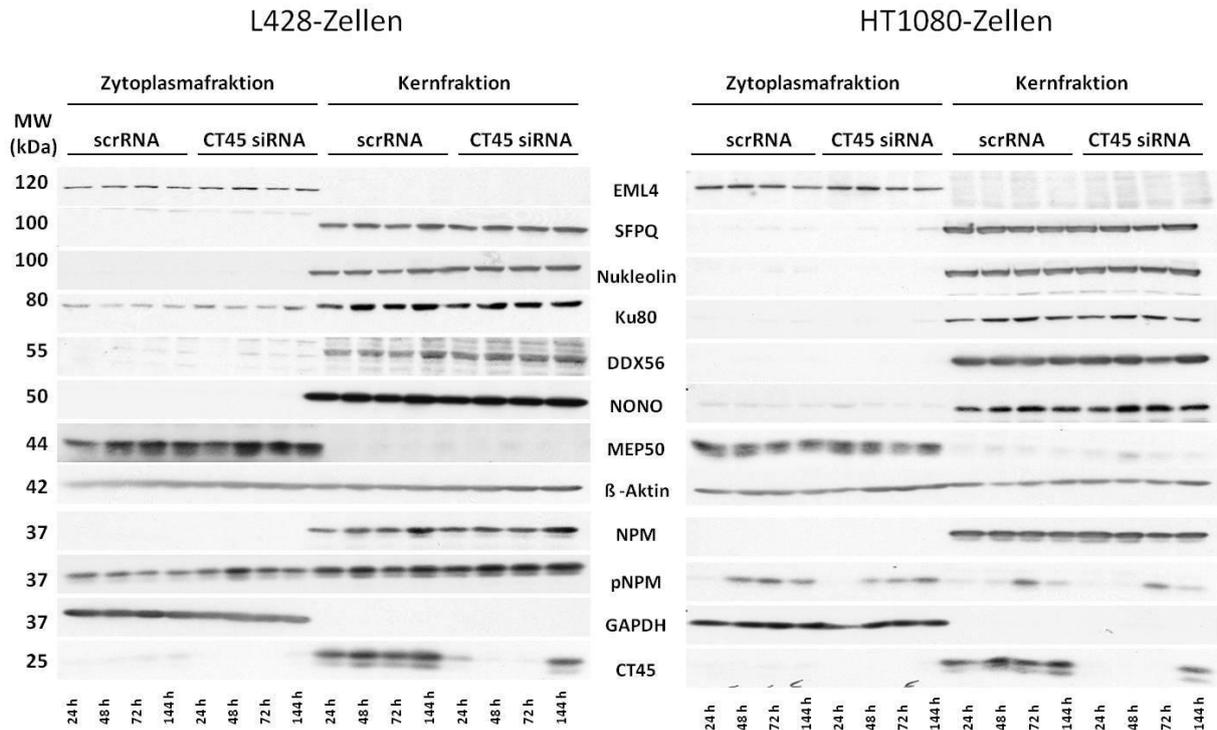


Abbildung 19: Western Blot-Analyse nach CT45-Herunterregulation über RNA-Interferenz (Nukleofektion, Lonza) in L428 und HT1080-Zellen. Fraktionierung zwischen Zytoplasma- und Kernfraktion über das *ProteoJET™ Cytoplasmic & Nuclear Protein Extraction Kit* von Fermentas mit anschließender Western Blot-Analyse. Die β -Aktin-Anreicherung wurde als Ladekontrolle verwendet, GAPDH als zytoplasmatischer Marker. CT45 diente als Marker für die Kernfraktion (L428-Lysate gefärbt mit Ki-A10, HT1080 Lysate gefärbt mit Ki-CT45-1). Alle weiteren, analysierten Proteine wurden mit den entsprechenden Primärantikörpern detektiert. Es wurden keine CT45-induzierten Effekte auf die Akkumulation der untersuchten Proteine analysiert.

Zusammenfassend sind die Ergebnisse aus den vorgestellten Experimenten dieses Kapitels in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Zusammenfassung der vorgestellten Regulations- und Interaktionsstudien. (Analysemethoden: Kolp [Koimmunpräzipitation], PD [Pull Down], WB [Western Blot], IF [Immunfluoreszenz]).

Interaktionspartner	Wechselwirkung bestätigt über:			Effekte auf die Protein-:	
	Kolp	PD	Kolokalisation (IF)	Akkumulation (WB)	Lokalisation (IF)
NPM	✓	✓	✓	-	✓
pNPM (Thr199)	✓	✓	✓	-	-
SFPQ	✓	✓	✓	-	✓
NONO	✓	✓	✓	-	-
DDX56	✓	✓	?	-	-
MEP50	✓	✓	-	-	-
Nukleolin	✓	✓	-	-	✓
Ku80	✓	✓	?	-	✓
EML4	✓	✓	✓	-	-
Eg5	-	-	✓	-	-

4.6 Analyse differentiell regulierter Proteine

Eine globale Analyse CT45-regulierter Proteine mittels differentieller 2D-Gelelektrophorese sollte Hinweise erbringen, in welchem zellbiologischen Kontext CT45 seine Funktion ausübt. CT45 wurde in L428- und HT1080-Zellen herunterreguliert oder in HeLa-Zellen überexprimiert. Die Proteine wurden mit Fluoreszenzfarbstoffen (Cy3 [grün] bzw. Cy5 [rot]) markiert und zweidimensional aufgetrennt. Über die Auswertung der Fluoreszenzintensitäten konnte die relative Abundanz einzelner Proteine erfasst werden. Selektierte Spots wurden ausgestanzt, tryptisch verdaut und massenspektrometrisch analysiert. Es sind in allen Fällen fünf biologische Replika angefertigt worden.

Lokalisation von CT45 im 2D-Gel

Um zu überprüfen, ob CT45 im 2D-Gel detektiert werden kann, wurde zunächst die Lokalisation nach zweidimensionaler Auftrennung geklärt. Zur Analyse wurden 150 µg eines grob gereinigten L428-Kernlysats verwendet. Methodisch wurde das Zellpellet in Triton X-100-Lysepuffer zwei Minuten inkubiert, anschließend abzentrifugiert und das verbleibende Pellet erneut für zwanzig Minuten lysiert. Der Überstand wurde für die 2D-Gelelektrophorese verwendet. Das 2D-Gel wurde im Anschluss mit dem Fluoreszenzfarbstoff Sybro Ruby angefärbt, um die gesamten Proteine im Lysat zu visualisieren. Sybro Ruby detektiert sensitiv bis zu einem ng Protein und bindet nicht kovalent. Daher konnte nach der Dokumentation des Gels der Farbstoff entfärbt und die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert werden.

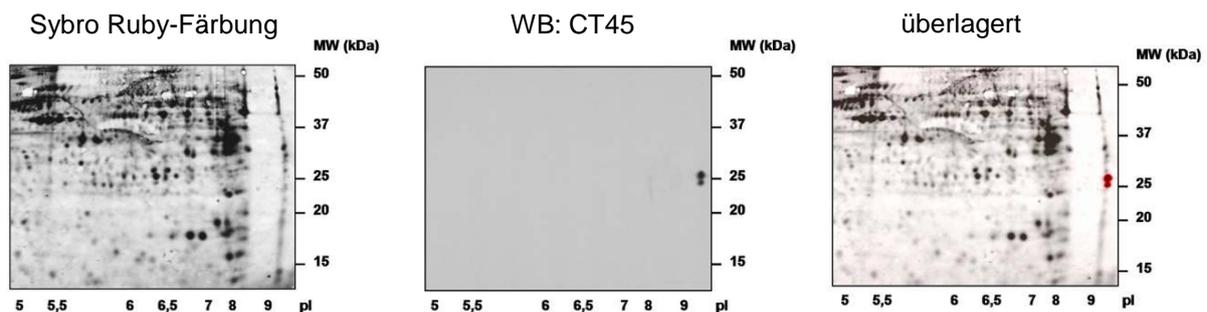


Abbildung 20: Lokalisation von CT45 im 2D-Gel. Dargestellt ist ein Ausschnitt des Gels (bis 50 kDa) A: Färbung des 2D-Gels mit Sybro Ruby zur Visualisierung aller Proteine. B: Western Blot des entsprechenden 2D-Gels und anschließende Färbung mit Ki-A10. C: Überlagerung der Sybro Ruby-Färbung mit den detektierten CT45-Proteinspots nach dem Western Blot. CT45 konnte nicht über die Sybro Ruby-Färbung im 2D-Gel visualisiert werden.

CT45 wurde mit dem spezifischen Antikörper Ki-A10 detektiert. Durch die Überlagerung der CT45-Proteinspots mit der Sybro Ruby-Färbung konnte die Lokalisation nach zweidimensionaler Auftrennung ermittelt werden (Abbildung 20). Der analysierte isoelektrische Punkt (pI) von CT45 lag demnach bei ungefähr 10. Dieses Ergebnis stimmte

mit dem berechneten Wert von pI 9,82 überein (http://web.expasy.org/compute_pi/). Zu beobachten war zudem, dass über die Sybro Ruby-Färbung CT45 nicht im 2D-Gel visualisiert werden konnte. Vermutlich wird CT45, in Relation zur Gesamtproteinmenge, nur in geringer Konzentration in der Zelle angereichert. Die CT45-Herunterregulation bzw. Überexpression für die 2D-DIGE-Experimente wurde daher separat über den Western Blot überprüft.

2D-DIGE-Analyse

Die Herunterregulation von CT45 in L428- und HT1080-Zellen erfolgte mit dem Nukleofektionssystem der Firma Lonza über RNA-Interferenz. Es wurden für beide Zelllinien fünf biologische Replikate angefertigt. Für die CT45-Überexpression wurden der Kontrollvektor pRK5 und das Konstrukt pRK5_CT45 über die Kalziumphosphat-Präzipitation in HeLa-Zellen transfiziert.

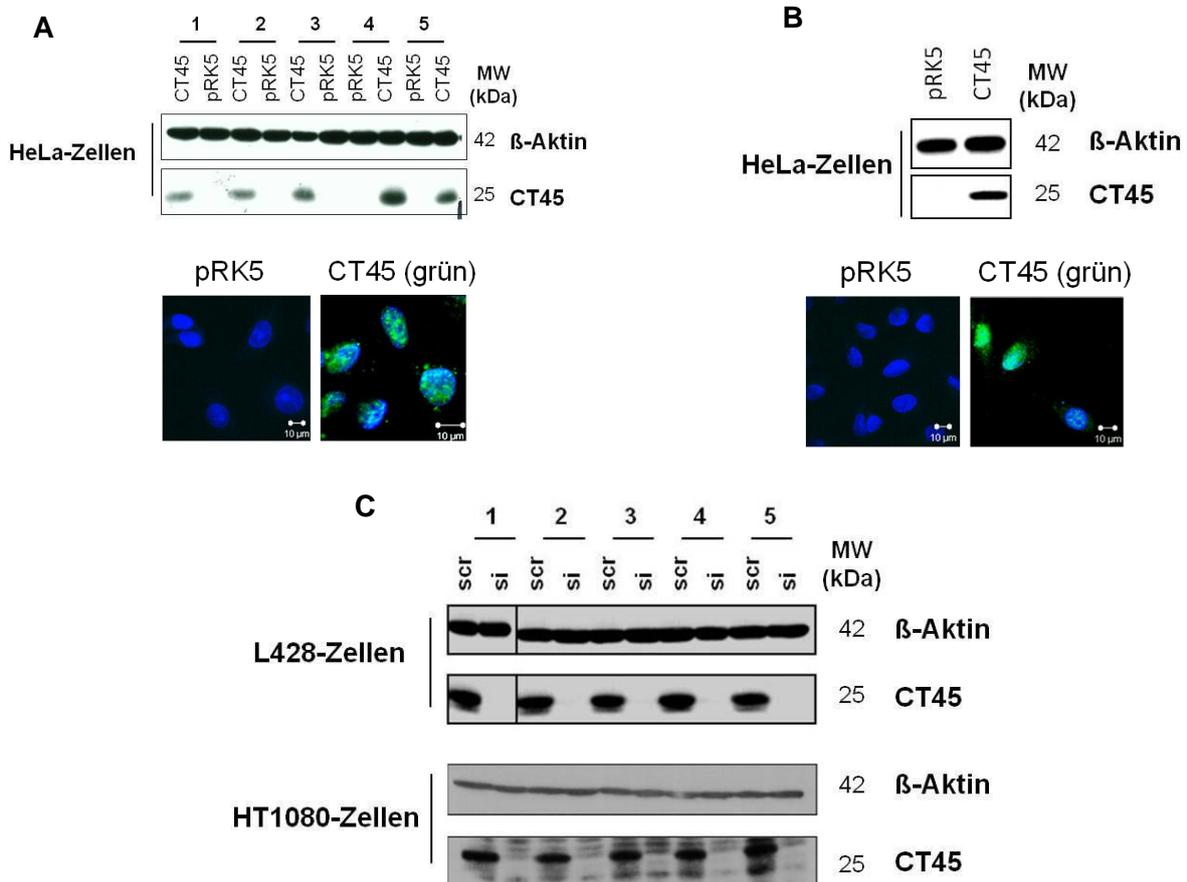


Abbildung 21: Kontrolle der negativen CT45-Regulation in HT1080-, L428- und HeLa-Zellen. A+B: In allen Ansätzen konnte die CT45-Akkumulation über den Western Blot, als auch über die Immunfluoreszenz-Färbung (exemplarisches Beispiel einer Zytopsin-Präparation), gezeigt werden. β -Aktin diente als Beladungskontrolle. Die DNA wurde mit DAPI (blau) markiert. CT45 wurde mit dem Ki-A10-Antikörper und einem Alexa488 (grün)-markiertem Sekundärantikörper visualisiert. C: Herunterregulation von CT45 in HT1080- und L428-Zellen. Die Transfektion der spezifischen siRNA bzw. scrRNA erfolgte mittels Nukleofektion. Die stark reduzierte CT45-Proteinkonzentration wurde im Anschluss an den Western Blot detektiert. CT45 wurde mit Ki-A10 nachgewiesen. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Es wurden zwei verschiedene Versuchsansätze nach Überexpression durchgeführt. Zum einen wurde in einem Etablierungsexperiment ein Versuchsansatz zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit dreimal separat zweidimensional aufgetrennt und ausgewertet. In einem weiteren Experiment wurden fünf biologische Replikate angefertigt und analysiert.

Die CT45-regulierten HT1080- und L428-Zellen wurden 48 Stunden, die HeLa-Zellen 18 Stunden nach der Transfektion in 2 % Triton X-100 (2D)-Lysepuffer lysiert. Da der Fokus auch hier auf der Analyse von Kernproteinen lag, ist erneut die bereits vorgestellte grobe Aufreinigung der Kernfraktionen vorgenommen worden. Im Anschluss an die Zelllyse und Proteinbestimmung wurden zunächst die Proben für den Kontroll-Western Blot angefertigt (Abbildung 21). Das restliche Lysat wurde 1:1 mit 2D-Lysepuffer versetzt und für die weitere Analyse vorbereitet.

Die Regulation von CT45 konnte in allen verwendeten Zelllinien nachgewiesen werden. Die Färbung von β -Aktin diente der Beladungskontrolle. In den HeLa-Zellen wurde die CT45-Bande nach Überexpression bei 25 kDa detektiert. Zudem wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt um den Prozentsatz positiver Zellen beurteilen zu können. CT45 war in 80 % der Zellen angereichert und in den *Nuclear Speckles* visualisierbar (Abbildung 21A +B). Die Herunterregulation von CT45 konnte ebenfalls in HT1080- und L428-Zellen in allen Replikaten nachgewiesen werden (Abbildung 21C). Die vorbereiteten Proben konnten somit für die 2D-DIGE-Analyse verwendet werden.

Die Proben wurden mit den verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Cy3, Cy5) markiert, vereinigt und zweidimensional aufgetrennt. Durch eine unterschiedliche Farbstoffkombination („DyeSwap“) wurde eine eventuelle CyDye-spezifische Färbung bestimmter Proteine ausgeschlossen. Im Anschluss an die zweidimensionale Auftrennung wurden die Gele über Anregung der fluoreszenzspezifischen Emissionswellenlängen mit Hilfe des *Typhoon Trio*-Fluoreszenzscanner eingelesen und quantifiziert. Für die genaue Quantifizierung differentiell regulierter Proteine wurde die *DeCyder*-Software verwendet. Nach entsprechender Auswertung wurden interessante Proteinspots ausgestanzt und massenspektrometrisch analysiert. Da das direkte Ausstanzen CyDye-markierter Proteine aufgrund des Eigengewichts der Fluorochrome (434-464 Da) zu erheblichen Ungenauigkeiten in der Identifikation der Proteine führen kann (Hrebicek et al., 2007), erfolgte zunächst eine zusätzliche post-elektrophoretische Färbung der Gele mit dem Fluoreszenzfarbstoff Flamingo Pink. Die detektierten differentiellen Proteine wurden automatisch ausgestanzt und manuell für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet.

Für die HT1080- und L428-Zellen ist jeweils ein exemplarisches Gel aus den fünf unabhängigen Experimenten dargestellt (Abbildung 22). Die optische Betrachtung der Gele, nach Überlagerung der Fluoreszenzkanäle zeigte, dass der Großteil der Proteine in beiden Zelllinien nicht durch CT45 reguliert wird. Dies ist durch die weiß-violette Färbung der Punkte zu erkennen. Rote Punkte kennzeichneten in diesem Fall Proteine, die in den Kontrollproben stärker angereichert wurden. Grüne hingegen Proteine, die in den CT45-herunterregulierten Proben in höherer Konzentration vorlagen. Anschließend erfolgte die Flamingo Pink-Färbung der Gele.

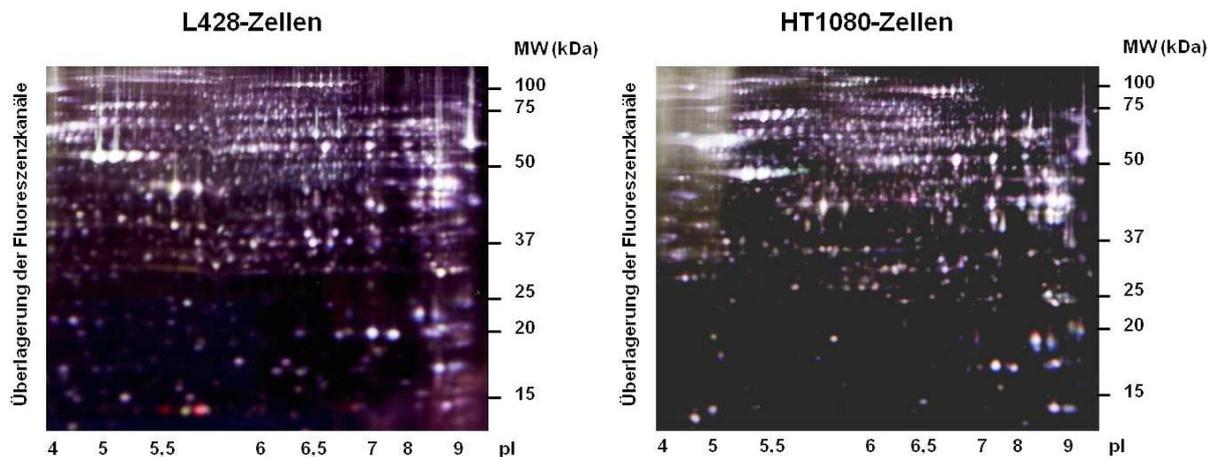


Abbildung 22: Differenzielle 2D-Gelelektrophorese von L428- und HT1080-Zellen nach CT45-Herunterregulation. Es wurde exemplarisch ein repräsentatives Gel von fünf abgebildet. Dargestellt ist das Gel nach Anregung der verschiedenen Emissionswellenlängen. Die CT45-siRNA behandelten Zellen wurden mit Cy3 (grün) markiert, die Kontrollzellen mit Cy5 (rot). Eine identische Abundanz der Proteine in beiden Proben zeichnet sich durch eine weiß-violette Färbung der Proteinspots aus.

Die Auswertung der 2D-DIGE-Experimente erfolgte mit Hilfe der „differentiellen in-Gel Analyse“ (DIA) und der „biologischen Varianzanalyse“ (BVA) des *DeCyder*-Programms. Aufgrund der statistischen Signifikanz wurden nur Proteine ausgestanzt und massenspektrometrisch analysiert, die in mindestens drei der fünf unabhängig durchgeführten Experimente eine vergleichbare Regulation zeigten. Die Identifizierung der Proteine erfolgte über eine Peptidmassenanalyse und Abgleich der Daten mit der MASCOT-Datenbank. Die Berechnungen des Programms ergaben, dass in den HT1080-Zellen nach CT45-Herunterregulation drei Proteine in allen fünf Gelen signifikant differentiell reguliert waren. Dies waren Annexin 1, Ezrin und Syncrip (hnRNP Q). Für die L428-Zellen wurden nach CT45-Herunterregulation ebenfalls drei Proteine in mindestens vier von fünf Gelen signifikant differentiell reguliert. Es handelte sich um Syncrip, EEF2 (eukaryontischer Elongationsfactor 2) und NPM. Leider wurden in dem ersten Etablierungsexperiment der HeLa-Zellen nicht in allen drei Gelen identische Resultate erzielt. Die Auswertung der Ergebnisse über das DIA-Programm ergab, dass in zwei Gelen hauptsächlich

Haushaltsgene bzw. hoch abundante Proteine wie beispielsweise Aktin oder Albumin als reguliert identifiziert wurden. Daher ist nur ein Gel für die Auswertung herangezogen worden, so dass keine statistische Auswertung erfolgen konnte. Der Fokus wurde daher auf die Betrachtung regulatorisch interessanter Proteine gelegt. In dem ausgewählten 2D-Gel wurden mit Hilfe des DIA-Programms drei interessante Proteine, TCP-1 (*T-complex protein 1*), TRAP1 (*TNF receptor-associated protein 1*) und erneut NPM (Nukleophosmin) zur näheren Analyse aus den insgesamt identifizierten Proteinen ausgewählt. In dem zweiten Überexpressionsexperiment wurden zwei Proteine in vier von fünf Gelen gleichermaßen reguliert und über die MALDI-Analyse identifiziert. Dies waren VDAC2 (*voltage-dependent anion-selective Chanel protein 2*) und EEF1 (*eukaryotic elongation factor 1*).

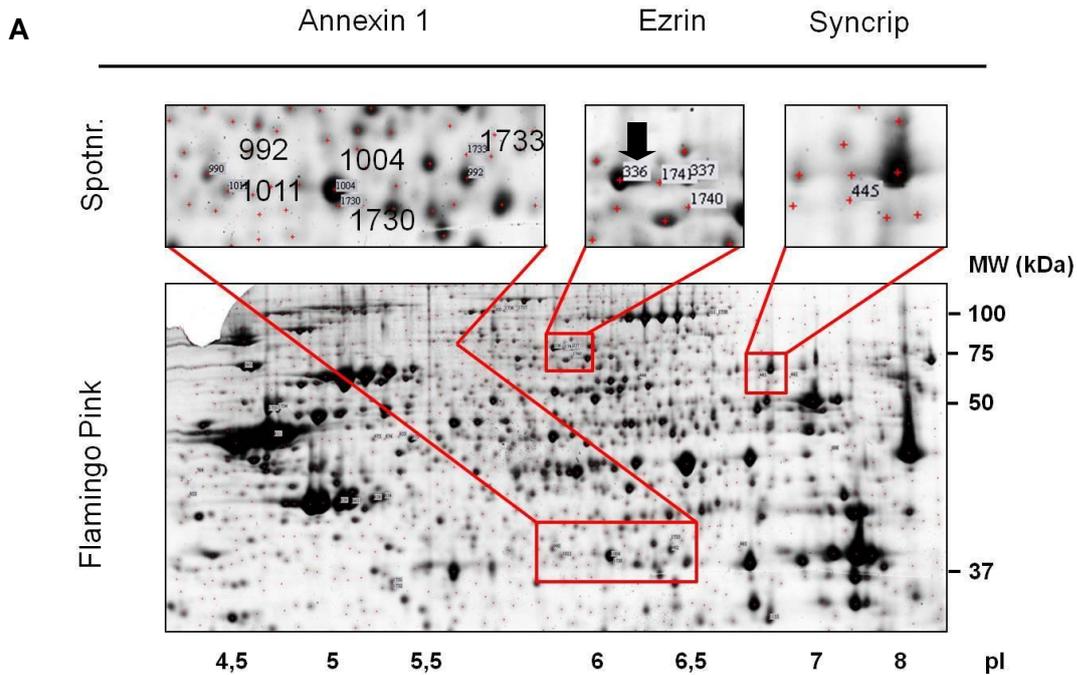
Die wesentlichen Funktionen der erwähnten differentiell regulierten Proteine sind in Tabelle 19 zusammengefasst. NPM wird hier nicht erwähnt, da dieses Protein bereits in Tabelle 17 beschrieben wurde. Auf andere identifizierte Proteine wird in dieser Arbeit nicht näher eingegangen.

Tabelle 19: Übersicht über die Funktionen der identifizierten differentiell regulierten Proteine.

Proteine	wesentliche Funktionen
Annexin 1	<ul style="list-style-type: none"> wirkt antiinflammatorisch und regulierend auf die Zellproliferation und Differenzierung, sowie auf die Apoptose (Gavins et al., 2003, Cirino et al., 1993; Alldridge et al., 1999; Hsiang et al., 2006)
Syncrip	<ul style="list-style-type: none"> mRNA-interagierendes Protein, wichtig für den mRNA-Transport und das Spleißen (Harries et al., 1999)
EEF2	<ul style="list-style-type: none"> reguliert die GTP-abhängige Translokation einer wachsenden Proteinkette von der A-Position zur P-Position an den Ribosomen.
Ezrin	<ul style="list-style-type: none"> mit Radixin und Moesin wichtige Verbindung zwischen dem Aktin-Zytoskelett und der Zellmembran (Sato et al., 1992)
TCP-1	<ul style="list-style-type: none"> Chaperoninkomplexe, beteiligt an der Faltung von nativem Aktin und Tubulin (Sternlicht et al., 1993)
TRAP-1	<ul style="list-style-type: none"> Hitzeschockprotein und demnach ein <i>pro-survival</i> Protein (Felts et al., 2000)
VADC2	<ul style="list-style-type: none"> lokalisiert an der äußeren mitochondrialen Membran, beteiligt an der mitochondrial-vermittelten Apoptoseregulation (Madesh and Hajnoczky, 2001)
EEF1	<ul style="list-style-type: none"> Regulation wichtiger zellulärer Prozesse wie Proliferation, Signal-Transduktion, Beweglichkeit und Embryogenese (Moriya et al.; 2001; Kaur und Ruben, 1994; Riis et al., 1990)

Zur genauen Auswertung der experimentellen Daten aus der 2D-DIGE-Analyse und der anschließenden Peptidmassenbestimmung musste zunächst sichergestellt werden, dass die Lokalisation der im 2D-Gel identifizierten und mit Flamingo Pink gefärbten Proteinspots mit der theoretischen Masse und dem berechneten pI übereinstimmen.

Zunächst gehe ich auf die differentiell regulierten Proteine in den HT1080-Zellen ein (Abbildung 23).



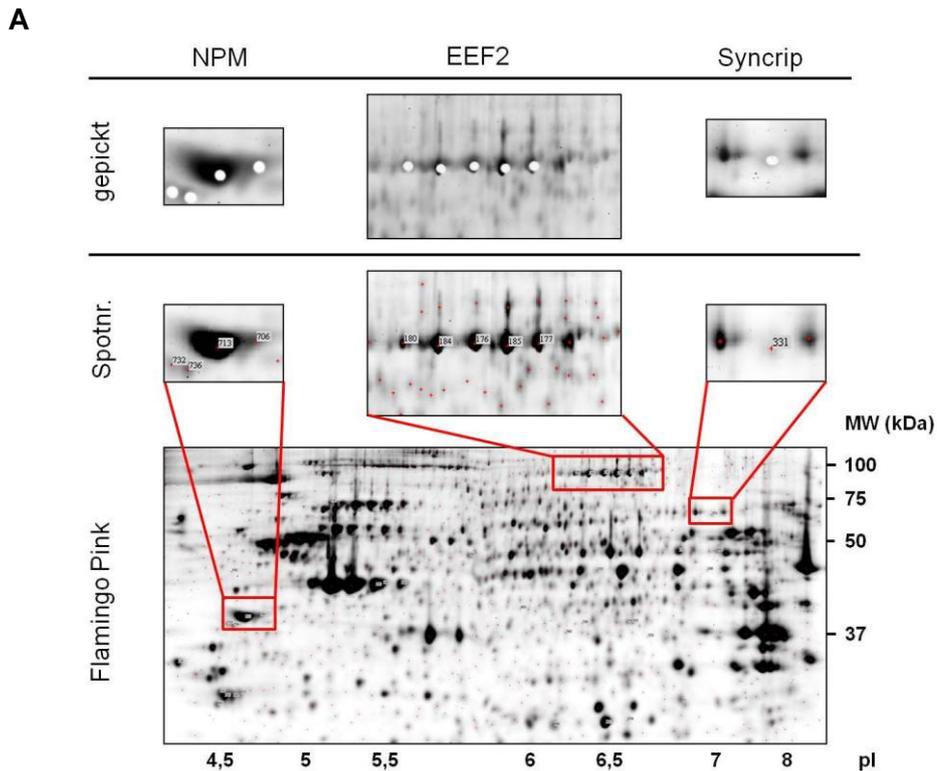
B **MASCOT-Daten nach MALDI-Analyse**

Spotnr.	Proteinname	NCBI-Nr.	theoretisches MW (kDa)	theoretischer pI
992	Annexin I	gi 157829895	35,24	7,77
1004	Annexin I	gi 119582950	40,47	6,57
1011	Annexin I	gi 197692249	38,88	6,57
1730	Annexin I	gi 4502101	38,91	6,57
1733	Annexin I	gi 119582952	40,28	7,6
445	Syncrip	gi 119569012	65,88	7,18
337	Ezrin	gi 46249758	69,31	5,94
336	Ezrin	gi 28436809	68,63	5,88

Abbildung 23: Abgleich der ausgestanzten, identifizierten Proteine mit den theoretischen Daten. A: Darstellung eines exemplarischen, repräsentativen mit Flamingo Pink gefärbten Gels mit vergrößerter Abbildung der signifikant regulierten Proteinspots. B: Die Tabelle zeigt die theoretischen Daten zu den analysierten Proteinen nach CT45-Herunterregulation in HT1080-Zellen. Die Zuordnung der Proteinspots ist über die Spotnummer möglich. Die untersuchten Proteine konnten an der richtigen Position im 2D-Gel detektiert werden. (NCBI: National Center for Biotechnology Information).

Nach der MALDI-Analyse konnten fünf unterschiedlich abundante Proteinspots als Annexin 1 identifiziert werden. Die Lokalisation dieser Isoformen im 2D-Gel stimmte weitestgehend mit den theoretischen Daten überein. Demnach liegt die berechnete Masse zwischen 38 und 40 kDa. Die Annexin 1-Isoformen konnten nach zweidimensionaler Auftrennung auf einer Höhe von ca. 37 kDa visualisiert werden. Der pI sollte theoretisch zwischen 6,5 und 7,7 liegen, lag mit einem Wert zwischen 6 und 6,8 allerdings etwas niedriger. Syncrip hat ebenfalls mehrere Isoformen. In allen Gelen konnte allerdings nur der Proteinspot der Isoform CRA_e als reguliert identifiziert werden. Andere identifizierte Isoformen waren ebenfalls reguliert. Allerdings konnten die Proteinspots nur in einem oder zwei Gelen detektiert werden, so dass die biologische Varianzanalyse der Spots nicht möglich war. Aus diesem Grund wird hier nur diese Variante vorgestellt. Die Syncrip-Isoform konnte im 2D-Gel bei einer Größe von ungefähr 60 kDa detektiert werden, der pI lag bei ungefähr 6,8. Dies stimmte mit den theoretischen Daten überein, wonach Syncrip ein molekulares Gewicht von 65,88 kDa und einen pI von 7,18 haben sollte. Das Protein Ezrin konnte bei einer molekularen Masse von 70 kDa und einem pI von ungefähr 6 lokalisiert werden. Hier wurde ebenfalls eine gute Übereinstimmung mit den theoretischen Daten erreicht. Das theoretische Gewicht sollte bei 69 kDa und der pI bei 5,9 liegen.

Die in den L428-Zellen analysierten differentiell regulierten Proteine wurden ebenfalls im 2D-Gel auf die Übereinstimmung zwischen tatsächlicher Lokalisation und theoretischen Daten untersucht (Abbildung 24). In diesem Versuch wurden fünf Isoformen von EEF2 als unterschiedlich reguliert identifiziert. EEF2 hat den MASCOT-Daten zur Folge einen theoretischen pI von 6,41. Dies stimmt mit der Lokalisation der Proteinspots im 2D-Gel überein, die zwischen 6,3 und 6,6 detektiert wurden. Auch die molekulare Masse von ca. 100 kDa entsprach der theoretischen Masse von 96,24 kDa. Es konnten zwei NPM-Isoformen als reguliert beurteilt werden. Die Proteinspots wurden bei einem pI von 4,6 und einem Molekulargewicht von ca. 37 kDa lokalisiert. Der pI sollte 4,7 und die molekulare Masse 31 kDa betragen. Syncrip wurde bereits in den HT1080-Zellen als signifikant reguliert beobachtet. In den L428-Zellen wurde die gleiche Isoform CRA_e als reguliert in vier Gelen identifiziert. Die molekulare Masse sollte 65 kDa betragen, der pI 7,18. Dies stimmte mit der Spotlokalisierung im 2D-Gel überein.



B MASCOT-Daten nach MALDI-Analyse

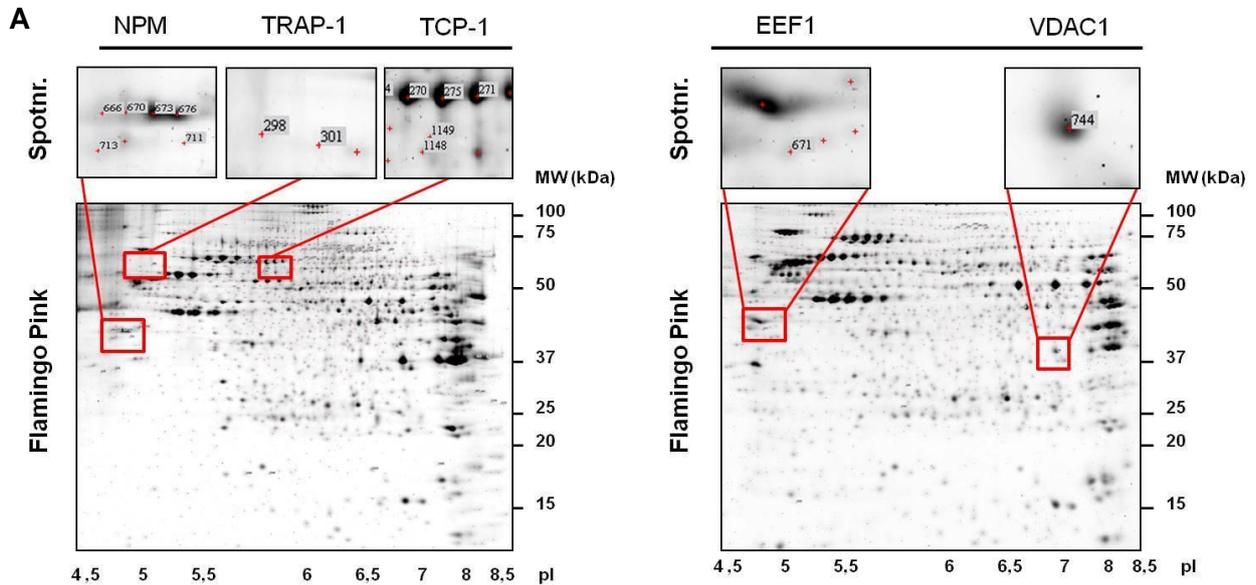
Spotnr.	Proteinname	NCBI-Nr.	theoretisches MW (kDa)	theoretischer pI
706	NPM	gi 825671	31,09	4,71
713	NPM	gi 58220457	33,02	4,6
331	Syncrip	gi 119569012	65,88	7,18
176	EEF2			
177	EEF2			
180	EEF2	gi 4503483	96,24	6,41
185	EEF2			
184	EEF2			

Abbildung 24: Siehe Bildunterschrift zur Abbildung 23. Dargestellt ist ein repräsentatives mit Flamingo Pink gefärbtes 2D-Gel zur Analyse differentiell regulierter Proteine nach CT45-Herunterregulation in L428-Zellen. Abgebildet ist zudem ein Flamingo Pink-gefärbtes 2D-Gel nach dem Ausstanzen der Proteinspots.

Im Folgenden wird die Lokalisation der differentiell regulierten Proteine nach CT45-Überexpression in HeLa-Zellen beschrieben.

TCP-1 migriert im 2D-Gel auf eine Höhe von ca. 60 kDa, was gut mit dem tatsächlichen Gewicht übereinstimmt. Auch der pI von 6 stimmt mit der Lage im 2D-Gel überein. TRAP-1 läuft ungefähr auf gleicher Höhe, welches mit den theoretischen Daten zusammenpasst. Die

Lokalisation im Gel entspricht bezüglich des isoelektrischen Punkts, nicht ganz dem berechneten pI von 5,5. TRAP-1 migriert eher bei pI 5. NPM ist im Gel bei ca. 37 kDa lokalisiert und damit höher als die theoretische Masse von 32,6 kDa. Der theoretische pI stimmt allerdings mit dem analysierten pI von 4,7 überein.



B MASCOT-Daten nach MALDI-Analyse

Spotnr.	Proteinname	NCBI-Nr.	theoretisches MW (kDa)	theoretischer pI
1148	TCP-1	gi 36796	60,9	6,0
298	TRAP-1	gi 119605747	64,7	5,5
670				
673	NPM	gi 58220469	32,6	4,7
676				
744	VDAC2	gi 48146045	30,4	6,8
671	EEF1	gi 25453472	31,1	4,9

Abbildung 25: siehe Bildunterschrift zur Abbildung 23. Hier dargestellt sind die mit Flamingo Pink gefärbten Gele und Spot-Zuordnungen zu den 2D-Experimenten nach CT45-Überexpression in HeLa-Zellen.

Der Datenabgleich des zweiten Überexpressionsexperiments ergab ebenfalls eine gute Übereinstimmung. VDAC2 migriert im Gel bei einem pI von ca. 7, der theoretische pI liegt bei 6,8. EEF1 besitzt einen theoretischen pI von 4,6 und liegt im Gel bei 5. Das berechnete Molekulargewicht beider Proteine liegt bei ungefähr 30 kDa. Im Gel migrierten beide Proteine allerdings zwischen 37 und 40 kDa.

Die relative Abundanz der einzelnen Proteine konnte mit Hilfe des DIA-Programms analysiert werden. Anhand der exemplarisch für ein Gel dargestellten Histogramme ließen sich zunächst nach Festlegung eines Grenzbereiches (vertikale Linien) alle regulierten Proteine darstellen. Grüne Punkte kennzeichnen Proteine, die in dem gewählten Grenzbereich nicht reguliert werden. Die roten Punkte stellen die nach CT45-Herunterregulation weniger abundanten, die blauen Punkte die heraufregulierten Proteine dar. Eine gelbe Markierung erhielten die zuvor beschriebenen Proteine. Die Spotnummern wurden wie in der Abbildung gekennzeichnet vereinfacht.

Zunächst wird auf die Ergebnisse bezüglich der HT1080-Zellen eingegangen (Abbildung 26).

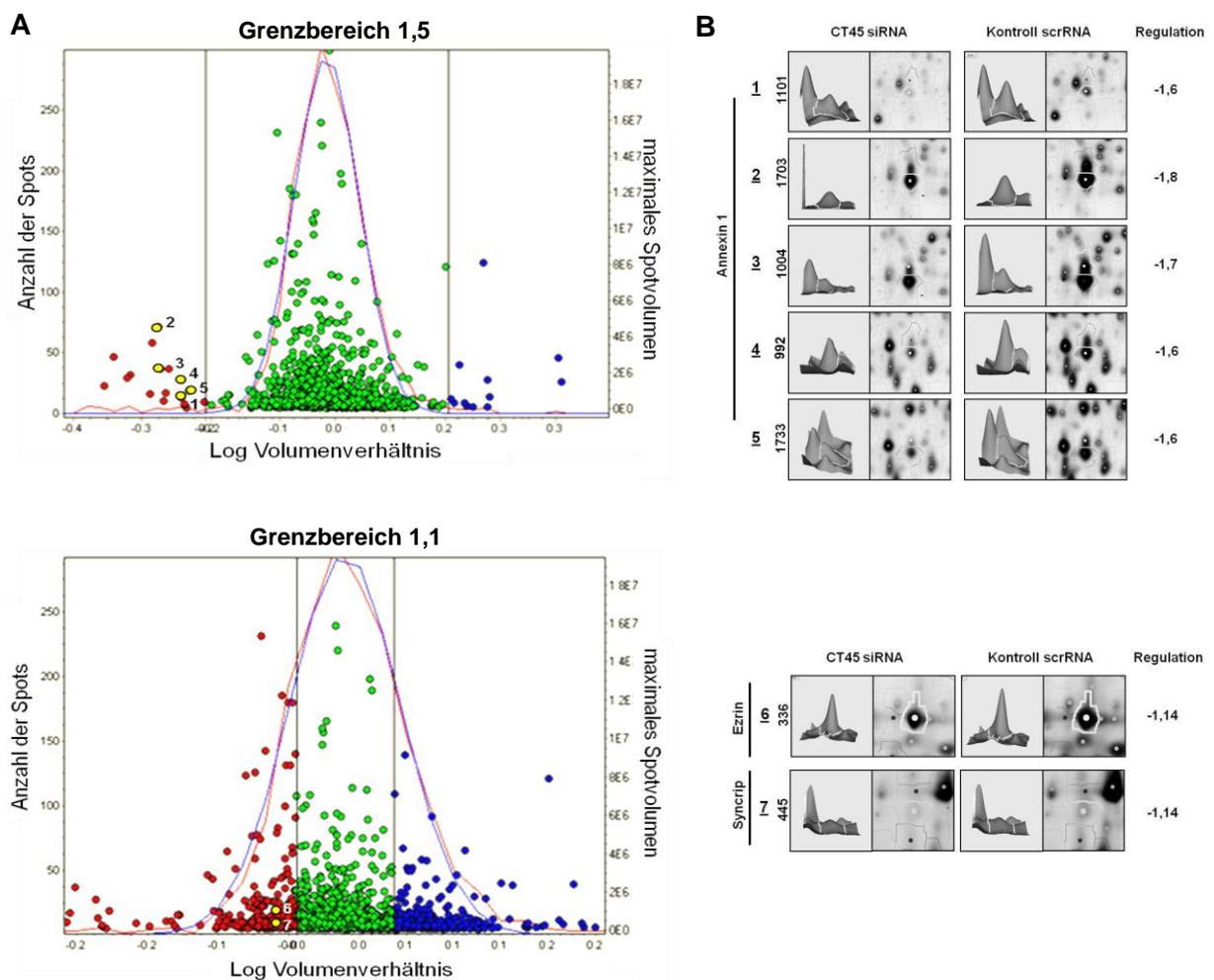


Abbildung 26: Differenzielle Regulation von Annexin 1, Ezrin und Syncrip nach CT45-Herunterregulation in HT1080-Zellen. A: Histogramm der DeCyder-Analyse aus dem Vergleich CT45-siRNA mit Kontroll-scrRNA transfizierter Zellen. Die rote Linie gibt das durchschnittliche Spotvolumen wieder, die blaue Linie stellt die Gaußsche-Regressionskurve dar. Die Höhe der Punkte kennzeichnet das maximale Spotvolumen. Die vertikalen Linien kennzeichnen den eingestellten Grenzbereich, wobei grüne Punkte für eine ähnliche Abundanz, blaue für erhöhte und rote für verminderte Volumenverhältnisse stehen. B: Detailliertere Beschreibung der beschriebenen differentiell regulierten Proteine. Die dreidimensionalen Bilder der Spots verdeutlichen die Volumenveränderung. Die weiße Umrandung kennzeichnet die Spots in den Gelen.

In diesem repräsentativem Gel waren von insgesamt 1784 detektierten Proteinen 1 % (18) nach CT45-Herunterregulation heraufreguliert und nur 0,7 % (12) negativ reguliert. Von den 18 stärker abundanten Proteinen waren nur fünf signifikant über die fünf Gele reguliert. Diese konnten dem Protein Annexin 1 zugeordnet werden. Eine genauere Darstellung der Volumenverhältnisse der einzelnen Annexin 1-Proteinspots für das exemplarische Gel ist in Abbildung 26B zusammengefasst. Die einzelnen Proteinspots der Annexin 1-Isoformen sind zwischen 1,6- und 1,8-fach reguliert. Die Spotnummern der Proteine wurden vereinfacht mit 1-5 benannt. Zur Visualisierung der Syncrip- und Ezrin-Proteinspots im Histogramm musste der Grenzbereich auf 1,1 verkleinert werden. Mit diesen Einstellungen waren in dem exemplarischen Gel laut DIA-Programm von den insgesamt 1784 detektierten Proteinen 18,3 % (327) nach CT45-Herunterregulation stärker und 20,8 % (371) schwächer abundant. Trotz des hohen Prozentsatzes an regulierten Proteinen waren nur die beiden erwähnten Proteine signifikant über alle fünf Ansätze verändert. Dies spricht für eine erhöhte Ungenauigkeit in diesem Grenzbereich. Eine genaue Volumenveränderung der Ezrin- und Syncrip-Proteinspots ist in Abbildung 26B dargestellt. Die verringerte Abundanz dieser beiden Proteine nach CT45-Herunterregulation war mit 1,14 sehr gering und kann nur schwer an der Volumenänderung identifiziert werden.

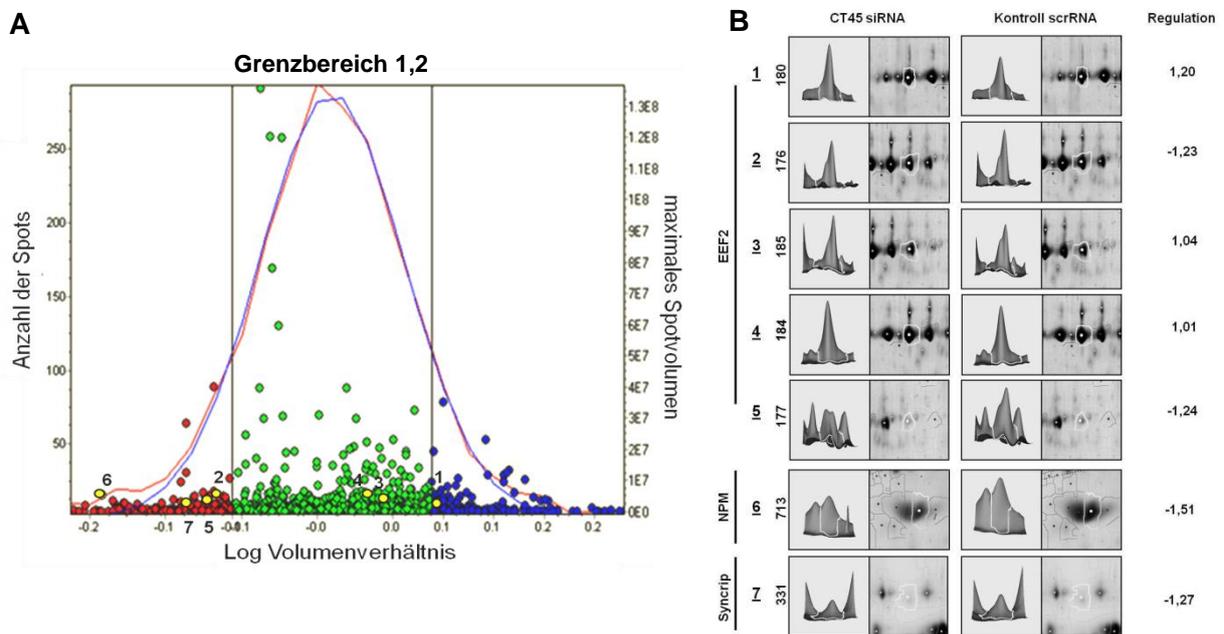


Abbildung 27: siehe Bildunterschrift Abbildung 26. Dargestellt ist die Regulation der Proteine EEF2, NPM und Syncrip in L428-Zellen.

In dem repräsentativen Gel zur Analyse der Ergebnisse bezüglich der L428-Zellen wurden insgesamt 1652 Proteine detektiert. Davon waren bei Einstellung des Grenzbereichs auf 1,2 139 (8,4 %) Proteine nach CT45-siRNA-Transfektion heraufreguliert und 88 (5,3 %) negativ reguliert.

vermindert. Somit war auch in diesem Versuch eine Minderheit der insgesamt detektierten Proteine differentiell reguliert. Es wurde ebenfalls eine detaillierte Darstellung der Volumenveränderung der EEF2-, NPM- und Syncrip-Proteinspots vorgenommen. Die EEF2-Isoformen waren teilweise sehr schwach und zudem in unterschiedliche Richtungen reguliert. Zwei Isoformen (Spotnr. 176 [2] & 177 [5]) unterlagen einer Verringerung des Volumenverhältnisses um ca. 1,2 nach Herunterregulation von CT45. Das Volumen der drei weiteren EEF2-Proteinspots (Spotnr. 180 [1], 184 [4] & 185 [3]) wurde hingegen erhöht, wobei die Spots 184 und 185 nur 0,4-fach reguliert wurden. Der als NPM identifizierte Spot zeigte in diesem Experiment eine Volumenabnahme nach CT45-Herunterregulation um ungefähr 1,5 und somit die stärkste Veränderung der hier beschriebenen Proteine. Das Volumen des Syncrip-Proteinspots wurde nach CT45-Herunterregulation um 1,27 verringert. Dies entspricht ungefähr der Volumenänderung aus dem 2D-DIGE-Versuch mit den HT1080-Zellen.

In dem Etablierungsexperiment nach CT45-Überexpression in HeLa-Zellen wurden insgesamt 1633 Proteinspots in dem einen auswertbaren Gel detektiert.

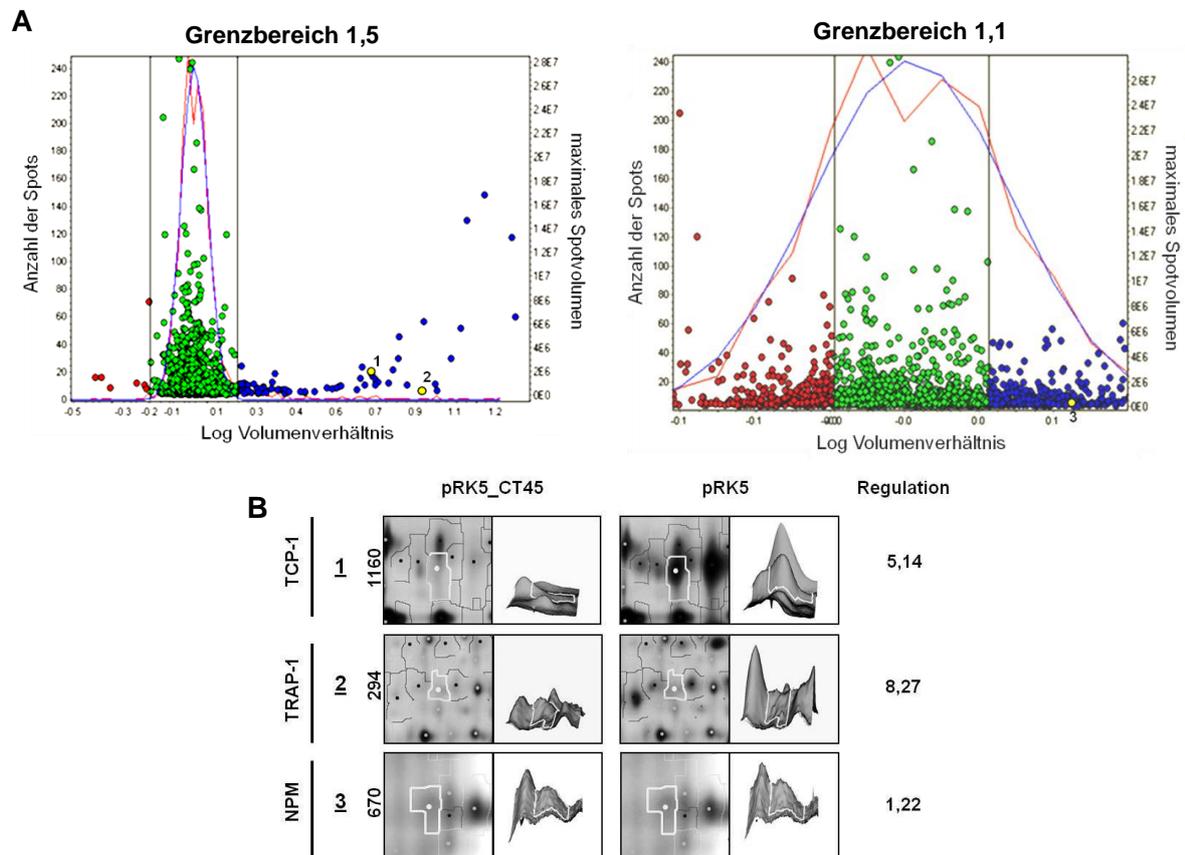


Abbildung 28: siehe Bildunterschrift Abbildung 26. Dargestellt ist die Regulation der Proteine TCP-1, TRAP-1 und NPM in HeLa-Zellen nach CT45-Überexpression.

Davon waren bei Einstellung des Grenzbereiches auf 1,5 70 (4,1 %) Proteine nach CT45-Überexpression weniger abundant und 7 (0,4 %) heraufreguliert. TCP-1 und TRAP-1 wurden innerhalb dieses Histogramms visualisiert. Die Verringerung des Grenzbereichs auf 1,1 war nötig um den NPM-spezifischen Proteinspot im Histogramm zu lokalisieren. Bei dieser Einstellung waren nach CT45-Überexpression 917 Proteinspots identisch, 437 (25,6 %) herunterreguliert und 356 (20,8 %) verstärkt abundant. Die Volumenverhältnisse veranschaulichten die relativ starke Regulation der TCP-1 und TRAP-1-Proteinspots. Es findet demnach eine Herunterregulation nach CT45-Überexpression um den Faktor 5,14 bei TCP-1 und 8,27 bei TRAP-1 statt. NPM wurde in diesem Experiment nach CT45-Überexpression um einen verhältnismäßig geringen Faktor von 1,22 herunterreguliert. Da keine statistischen Aussagen getroffen werden konnten ist eine Verifikation unbedingt notwendig.

In dem zweiten Experiment nach CT45-Überexpression wurden bei Betrachtung der Histogramm-Einstellung eines repräsentativen Gels mit der Einstellung des Grenzbereichs auf 1,5 insgesamt 1270 Proteine detektiert.

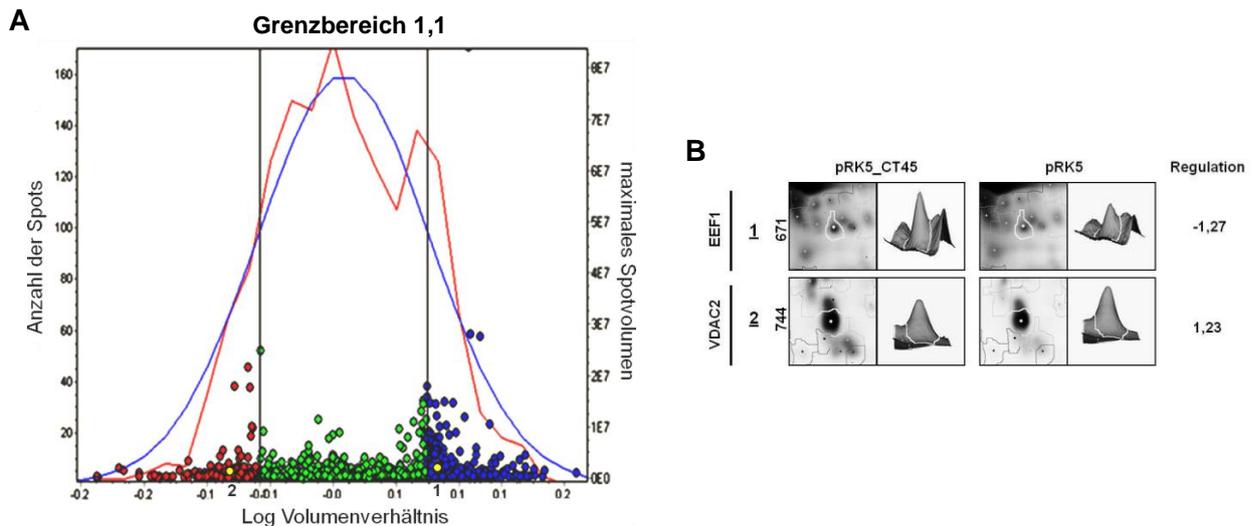


Abbildung 29: siehe Bildunterschrift Abbildung 26. Abgebildet ist die Volumenregulation für die Proteine EEF1 und VDACC2 nach Überexpression von CT45 in HeLa-Zellen.

Davon waren nur 10 (0,8 %) nach CT45-Überexpression stärker abundant und 33 (2,6 %) herunterreguliert. Hinzu kam, dass die massenspektrometrische Analyse nur zur Identifizierung einer geringen Anzahl an Proteinspots führte. Die Proteinspots der beiden genannten Proteine zeigten eine Volumenregulation, die bei Einstellung des Grenzbereichs von 1,1 im Histogramm visualisiert werden konnten. Bei Einstellung dieses Bereichs waren 25 % (317) Proteine herunter- und 29,3 % (372) heraufreguliert. Eine genaue Veranschaulichung der Volumenverhältnisse ist in Abbildung 29 gezeigt. EEF1 wird nach

CT45-Überexpression um den Faktor 1,27 hochreguliert und VDAC2 um den Faktor 1,23 herunterreguliert. Somit ergibt sich erneut eine sehr schwache durch CT45-induzierte differentielle Regulation der beiden Proteine.

Die statistische Auswertung der erwähnten Proteinspots über die fünf Versuchsansätze wurde mit Hilfe der „biologischen Varianzanalyse“ (BVA) der DeCyder Software durchgeführt (Abbildung 30).

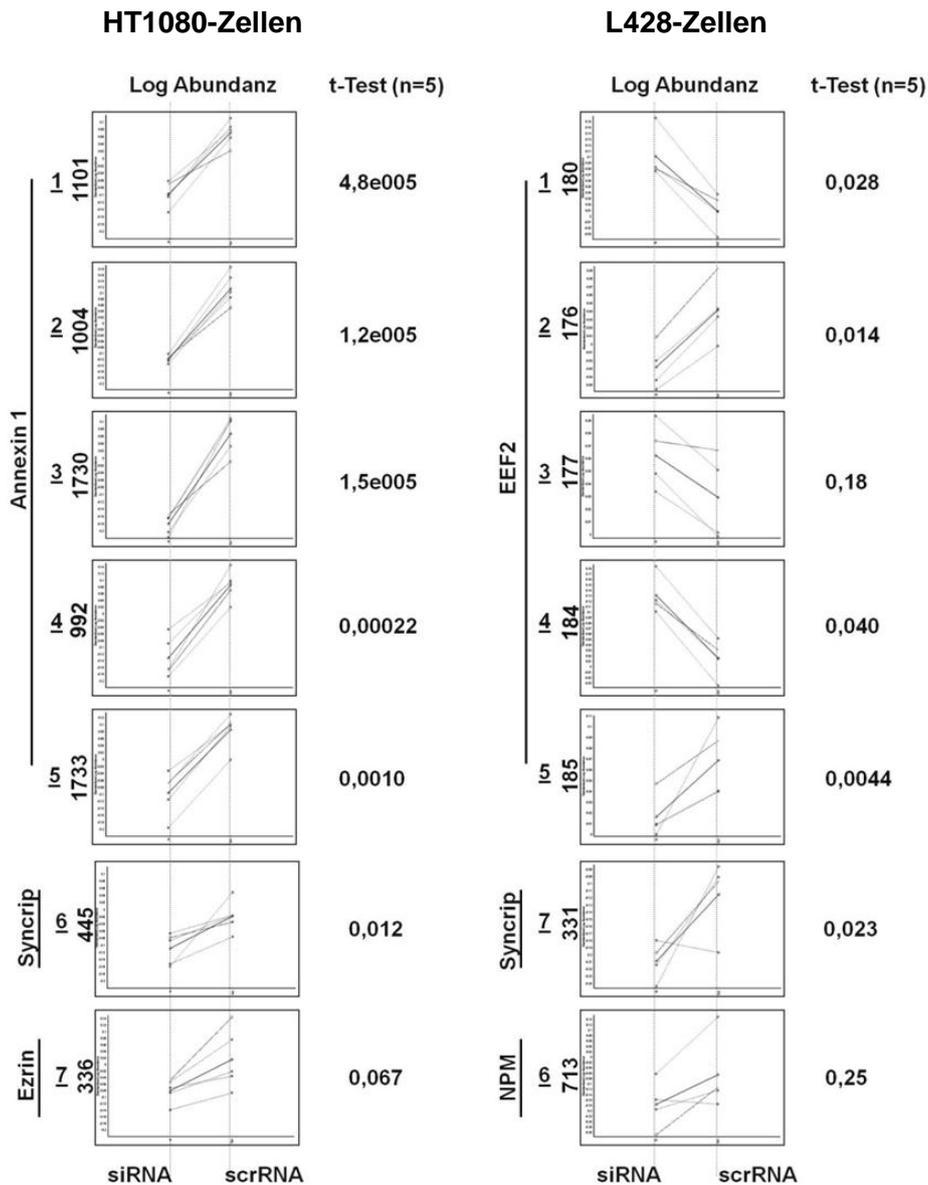


Abbildung 30: Biologische Varianzanalyse der differentiell regulierten Proteine in HT1080- und L428-Zellen. Das Mittel über alle fünf unabhängigen Experimente zeigt die Abundanz der Regulation. Die durchgezogene Linie kennzeichnet die Regulation in dem vorher beschriebenen exemplarischen Experiment. Die eingefügte Nummerierung enthält die Spotnummer und ermöglicht die Zuordnung. Die gestrichelten Linien geben die Regulation in den vier weiteren Gelen an.

Alle beschriebenen Proteinspots sind laut Varianzanalyse (t-Test, n=5) signifikant reguliert. Eine Darstellung der logarithmischen Abundanz über alle fünf Gele veranschaulichte das Ergebnis aus dem t-Test.

Wie bereits beschrieben wird Annexin 1 in HT1080-Zellen stärker reguliert als Syncrip und Ezrin. Auch die Abundanz der Regulation über die fünf angefertigten Gele ist mit einem t-Test von $4,5 \cdot 10^{-5}$ bis 0,001 für die fünf Isoformen sehr viel höher. Die Regulation von Syncrip und Ezrin schwankte in den einzelnen Gelen teilweise stark, so dass Syncrip über die fünf Experimente einen t-Test von 0,012 und Ezrin von 0,067 hatte. In den L428-Zellen wurden einige EEF2-Isoformen stärker reguliert (t-Test: 0,0044), andere hingegen weniger stark (t-Test: 0,18). Die Regulation von NPM ist mit einem t-Test von 0,25 am wenigsten abundant. Die differentielle Regulation von Syncrip hat mit einem t-Test von 0,023 einen vergleichbaren Wert wie in den HT1080-Zellen. Das zweite Experiment nach Überexpression wurde ebenfalls über die BVA betrachtet. Statistisch wurden EEF1 und VDAC2 in allen vier Gelen gleich stark reguliert (Daten nicht gezeigt). Da allerdings die Regulation sehr schwach war und diese Proteine in keinem vorherigen Experiment analysiert wurden, erfolgte keine weitere Verifikation.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass insgesamt alle Proteine nur schwach differentiell reguliert waren. Die CT45-vermittelte Regulation dieser Proteine muss demnach über weitere Methoden verifiziert werden.

Verifikation der 2D-Ergebnisse

Die Ergebnisse aus den 2D-DIGE-Experimenten sollten über die Durchführung von Western Blot-Analysen bestätigt werden. Hierzu wurde zunächst die zur Kontrolle der CT45-Herunterregulation in HT1080- und L428-Zellen verwendete Nitrozellulose-Membran (Abbildung 21) mit Antikörpern gegen Syncrip und Annexin 1 gefärbt (Abbildung 31).

In den gezeigten Western Blots (Abbildung 31) konnte das Ergebnis aus der 2D-DIGE-Analyse bestätigt werden. Im Zusammenhang mit den HT1080-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass Annexin 1 in allen fünf Experimenten nach negativer Regulation der CT45-Proteinmenge reproduzierbar herunterreguliert wurde. Im Durchschnitt beträgt die Regulation bei Betrachtung der relativen optischen Dichte aller fünf Probenpaare ungefähr 40 %. Die CT45-vermittelte Herunterregulation von Syncrip in den HT1080-Zellen konnte ebenfalls verifiziert werden. Es wurde ein Antikörper gegen die Syncrip-Isoformen 1-3 verwendet. Die detektierte stärkste Bande entspricht der Isoform 3, die auf eine Höhe von 70 kDa wandert.

Syncrip wurde um durchschnittlich 25 % reguliert. In den L428-Zellen wurde Syncrip (70 kDa) in vier der fünf Versuchsansätze differentiell reguliert. In einem Ansatz war keine Regulation zu analysieren. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen aus der biologischen Varianzanalyse (Abbildung 30). Die ermittelte Regulationsstärke für die verifizierten Proteine ist vergleichbar mit der differentiellen Anreicherung, die in den 2D-Experimenten analysiert wurde.

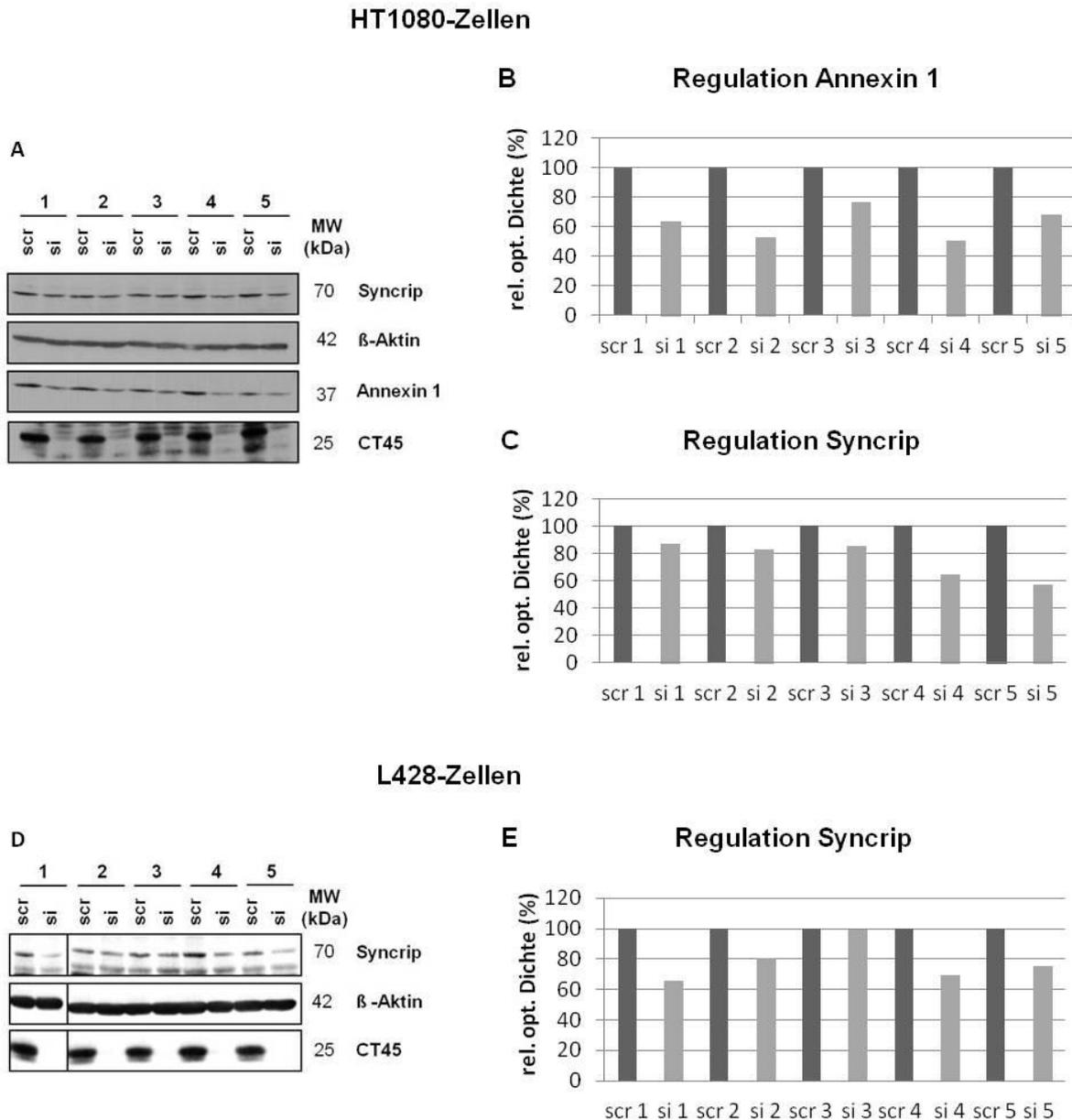


Abbildung 31: Verifikation der 2D-DIGE-Ergebnisse (Western Blot), durchgeführt in HT1080- und L428-Zellen. A+D: Färbung der in Abbildung 21 verwendeten Nitrozellulose-Membran mit Antikörpern gegen Annexin 1, Syncrip und β-Aktin (Ladekontrolle) sowie KiA10. B,C+E: Densitometrische Auswertung der Banden aus A+D. Die relative optische Dichte der CT45-spezifischen Bande in der scrRNA-Kontrollprobe wurde auf 100 % gesetzt. Die in den 2D-DIGE-Experimenten ermittelte Regulation von Annexin 1 und Syncrip konnte im Western Blot verifiziert werden.

Die Regulation von Ezrin und EEF2 konnte in diesen Gelen nicht analysiert werden. Somit wurden weitere Experimente zur Verifizierung herangezogen (Abbildung 32). CT45 wurde in HT1080-Zellen über RNA-Interferenz negativ reguliert. Die Zellysate wurden über einen Zeitraum von 144 Stunden angefertigt. Parallel wurden Kontroll-Zellysate für alle Zeitpunkte analysiert. Der Antikörper gegen Ezrin färbte allerdings in meinen Versuchen nicht ohne deutlichen Hintergrund. Ein polyklonaler Antikörper gegen phosphoryliertes Ezrin (Thr353) konnte allerdings erfolgreich verwendet werden (Abbildung 32). Die Funktion von Ezrin wird über Phosphorylierung reguliert. Wenn die verringerte CT45-Akkumulation zu einer Herunterregulation von Ezrin führt, sollte dieses auch einen Einfluss auf die phosphorylierte Form haben. In diesem Experiment konnte allerdings keine veränderte Regulation von pEzrin nach CT45-Herunterregulation analysiert werden.

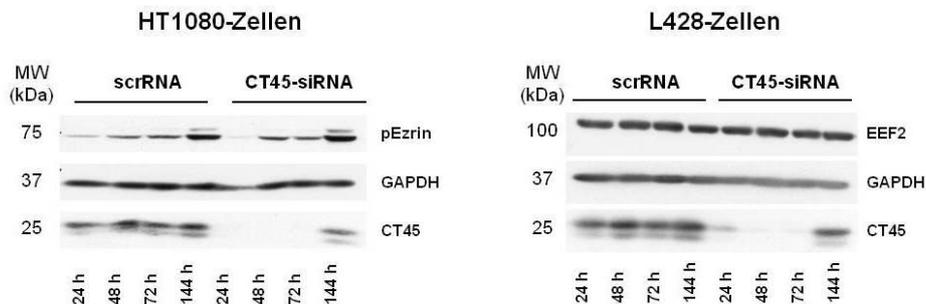


Abbildung 32: Einfluss von CT45 auf die Regulation von pEzrin in HT1080- und EEF2 in L428-Zellen. Die Zellen wurden mit CT45-siRNA und Kontroll-scrRNA transfiziert. 24-144 Stunden nach Transfektion wurden Zellysate hergestellt, über eine SDS-Page aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Anfärbt wurde CT45 zur Kontrolle der Herunterregulation, sowie GAPDH als Beladungskontrolle. Es konnte kein CT45-vermittelter Effekt auf die Regulation von pEzrin in HT1080-Zellen und EEF2 in L428-Zellen nachgewiesen werden.

EEF2 hat mehrere Isoformen, die zudem in den 2D-DIGE-Experimenten unterschiedlich reguliert waren. Daher lässt sich die Regulation im Western Blot schwierig nachweisen. Trotzdem wurde in anschließenden Experimenten die Abundanz von EEF2 nach CT45-Herunterregulation in L428-Zellen überprüft. In Abbildung 32 ist eine deutliche Verringerung CT45-Akkumulation gezeigt. Es wurden Zellysate nach CT45-siRNA- und Kontroll-scrRNA-Transfektion hergestellt und über den Western Blot analysiert. Es konnte, wie zuvor vermutet, keine Regulation von EEF2 beobachtet werden. Ein weiteres zu verifizierendes Protein war NPM. NPM wurde bereits im vorherigen Kapitel als CT45-Interaktionspartner vorgestellt. In den dargestellten Experimenten wird NPM nicht über CT45 reguliert.

Zur Überprüfung der Ergebnisse aus dem zuvor beschriebenen 2D-DIGE-Etablierungsexperiment nach CT45-Überexpression wurden ebenfalls Western Blot-Analysen durchgeführt. Hierzu wurden in drei separaten Ansätzen HeLa-Zellen mit den

pRK5_CT45-Überexpressionskonstrukt und mit dem pRK5-Kontrollvektor transfiziert. Die Zellen wurden mit Triton X-100-Lysepuffer lysiert, über die SDS-Page aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (Abbildung 33).

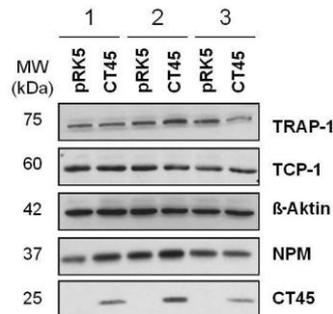


Abbildung 33: Überexpression von CT45 in HeLa-Zellen. CT45 konnte in allen drei Ansätzen überexprimiert (CaPO₄-Transfektion) werden. Die Detektion erfolgte über den Ki-A10-Antikörper. β -Aktin diente als Beladungskontrolle. TRAP-1, TCP-1 und NPM wurden über die entsprechenden Antikörper auf der Membran detektiert. TCP-1 und TRAP-1 sind in den drei separaten Experimenten nicht reguliert. NPM scheint nach CT45-Überexpression eher heraufreguliert zu sein.

Die Überexpression von CT45 war in allen drei Ansätzen zu detektieren. Zudem bestätigt die Färbung von β -Aktin die gleichmäßige Beladung des SDS-Gels. TCP-1 und TRAP-1 sollten, nach Auswertung des 2D-DIGE-Experiments, nach CT45-Überexpression fünf bzw. achtfach herunterreguliert werden. Im Western Blot konnte dieses Ergebnis nicht bestätigt werden. Beide Proteine wurden nicht reguliert. NPM sollte ebenfalls in CT45-überexprimierten Proben herunterreguliert werden, allerdings lässt der Western Blot eher eine Heraufregulation vermuten. Diese Resultate bestätigen die Ergebnisse aus der 2D-DIGE nicht.

4.7 Einfluss auf die Zellmorphologie

Aufgrund einiger in den vorherigen Abschnitten vorgestellter Ergebnisse wurde ein CT45-induzierter Einfluss auf die Zellmorphologie vermutet. Ein Hinweis für diese Beobachtungen war hauptsächlich die veränderte Adhärenz von HT1080-Zellen nach CT45-Herunterregulation. Diese wurde generell im Anschluss an die Präparation von Immunfluoreszenz-Färbungen beobachtet. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden Experimente geplant, die den CT45-induzierten Effekt auf die Zellmorphologie und das Zytoskelett näher charakterisieren sollten. Analysiert wurde zum einen, ob verschiedene Zytoskelett-Proteine nach Verringerung der CT45-Akkumulation Unterschiede im Verteilungsmuster zeigen. Anschließend wurde untersucht, ob Änderungen in der Zellimpedanz, im Adhärenzverhalten und in der Zellmigration bzw. -invasion resultieren.

CT45 beeinflusst die Zellmorphologie

Um eine veränderte Zytoskelett-Struktur genauer zu charakterisieren, wurde die Verteilung verschiedener Zytoskelett-Proteine wie β -Tubulin, EML4, β -Aktin oder Vimentin, nach CT45-Herunterregulation in HT1080-Zellen analysiert. Die genannten Proteine sind Teil der drei wichtigsten Zytoskelett-Komponenten, den Mikrotubuli (β -Tubulin, EML4), den Mikrofilamenten (Aktin) und den Intermediär-Filamenten (Vimentin). Eine veränderte Zellmorphologie sollte sich demnach in dem Verteilungsmuster dieser Proteine zeigen.

Die in Abbildung 34 dargestellten Immunfluoreszenz-Färbungen zeigten deutlich, dass nach CT45-Herunterregulation eine veränderte Zellmorphologie resultiert. Die negative Regulation von CT45 (grün) konnte in allen Zellen detektiert werden. Die dargestellte Durchlicht-Aufnahme zeigte deutlich, dass die Präparate vor der Färbung mit einer identischen Zellzahl bewachsen waren (Abbildung 34). Die Objektträger wurden nach den jeweiligen Antikörperinkubationen mit starken Schüttelbewegungen gewaschen. Dies induzierte ein verstärktes Ablösen der CT45-siRNA behandelten Zellen (Abbildung 34). Die Färbung von β -Aktin (rot) veranschaulichte diesen Effekt. Beobachtet wurde zudem, dass der vorher gleichmäßige Zellrasen über weite Bereiche des Objektträgers mit Löchern durchzogen war.

Die β -Tubulin-Färbung machte außerdem Veränderungen in der Mikrotubuli-Architektur deutlich. In den Kontrollzellen sind ausgeprägte, weit verzweigte Tubulin-Filamente über den gesamten Zellkörper sichtbar. Die Mikrotubuli-Struktur in den CT45 siRNA-regulierten Zellen vermittelt im Vergleich dazu einen weniger geordneten und stark kondensierten Eindruck. Die Färbung des Mikrotubuli-assoziierten Proteins EML4 bestätigt den morphologischen Unterschied. CT45 konnte hier nicht separat visualisiert werden, da beide Antikörper gleichen Ursprungs sind (Maus IgG1). Die morphologischen Veränderungen werden ebenfalls über die Visualisierung der Vimentin-enthaltenen Intermediär-Filamente bestätigt. In den Kontrollzellen konzentriert sich Vimentin stark im Bereich des Zellkerns, verzweigt allerdings bis in die Zellperipherie, so dass einzelne Intermediär-Filamente sichtbar werden. Nach CT45-Herunterregulation wirken die Intermediär-Filamente stark kondensiert. Es sind nur vereinzelt verzweigte Filamente sichtbar.

Um Anhaltspunkte zur Klärung dieser Befunde zu erhalten, sollte zunächst analysiert werden, ob eventuell die Tubulin- oder Aktin-Polymerisation beeinflusst wird. Die entsprechenden Filamente sind hochdynamisch organisiert.

- 4. Ergebnisse -

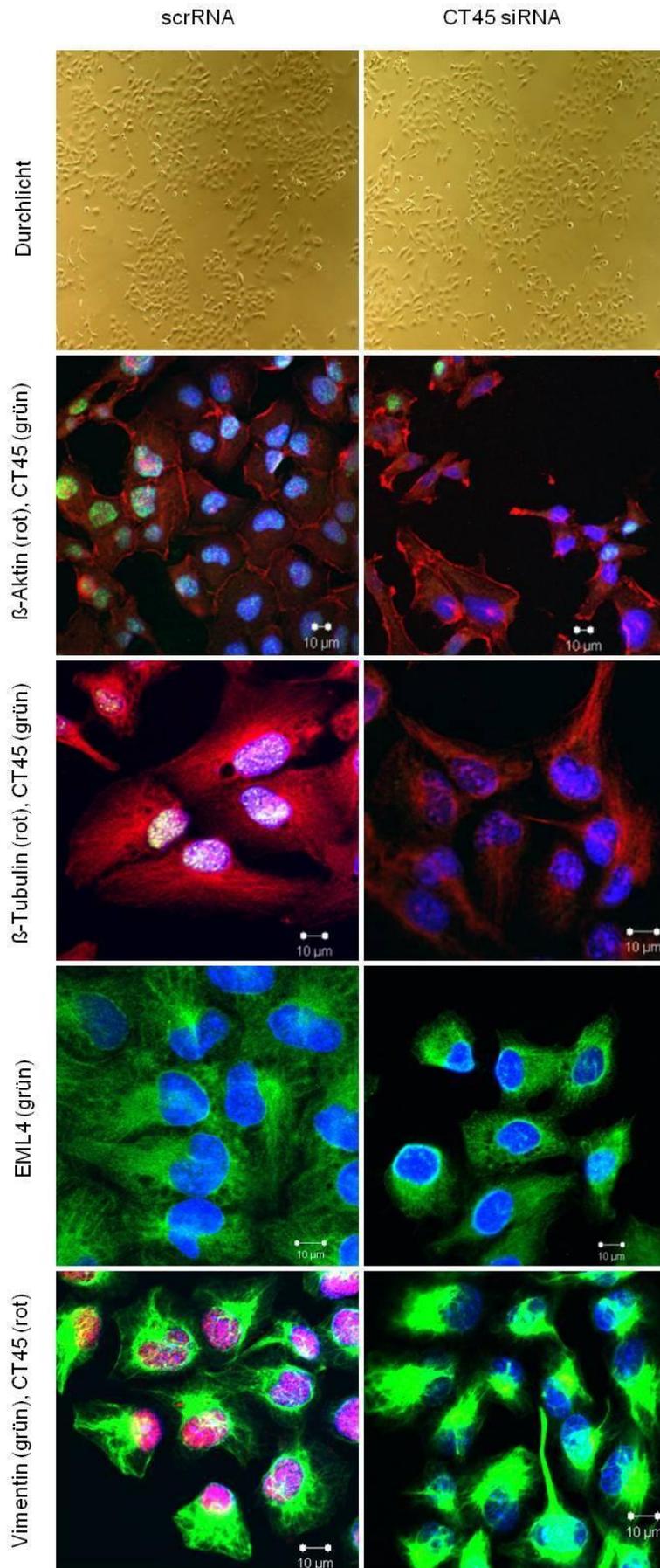


Abbildung 34: CT45-vermittelte Veränderung der Zellmorphologie. HT1080-Zellen wurden mit CT45-siRNA und Kontroll-scrRNA transfiziert und auf sterile FKS-beschichtete Objektträger ausgesät. 72 Stunden nach Transfektion erfolgte die Immunfluoreszenz-Färbung. β -Aktin, β -Tubulin und Vimentin wurden mit direktmarkierten Antikörpern detektiert (β -Aktin-Cy3, β -Tubulin-Cy3, Vimentin-Alexa488) gefärbt. CT45 wurde zunächst mit Ki-A10 und anschließend mit einem anti-Maus Alexa488- oder Alexa594-markiertem Sekundäntikörper gefärbt. EML4 wurde mit Ki-EML4 und einem anti-Maus Alexa488-Sekundäntikörper visualisiert. In allen Färbungen konnte ein Effekt auf die Zellmorphologie nach CT45-Herunterregulation detektiert werden.

Durch eine FACS-Färbung mit Phalloidin sollte zwischen monomeren (G-) und polymerisiertem (F-) Aktin unterschieden werden. Phalloidin ist ein Toxin aus dem Pilz *Amanita phalloides* und bindet selektiv und stöchiometrisch an F-Aktin. Somit kann die Menge an polymerisiertem Aktin zwischen Kontrollzellen und CT45-herunterregulierten Zellen verglichen werden. Es konnte allerdings kein Unterschied detektiert werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Das Verhältnis zwischen löslichem und polymerisiertem Tubulin wurde über einen *in vivo polymerized Tubulin Assay* quantifiziert (Wang et al., 2010). Durch Verwendung eines speziellen PEM-Puffers wurde erreicht, dass polymerisiertes Tubulin pelletiert vorliegt und sich Lösliches im Überstand befindet. Die Analyse erfolgte über den Western Blot. Auch in diesem Versuch konnte nach CT45-Herunterregulation kein Unterschied zwischen polymerisierten und löslichem Tubulin analysiert werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Da das Ablösen der CT45-herunterregulierten Zellen nur nach starken Schüttelbewegungen induziert werden konnte, ist vermutlich die Adhäsion der Zellen verändert. Daher wurden die zellulären fokalen Adhäsionspunkte über verschiedene Immunfluoreszenz-Färbungen analysiert (Abbildung 35). Als zentrale Proteine an den fokalen Adhäsionspunkten werden in der Literatur unter anderem die fokale Adhäsionskinase FAK und das Protein α -Parvin genannt. FAK ist beschrieben als eine nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinase, die als zentrales Molekül an der Integrin-vermittelten Regulation der Zelladhäsion, Zellmigration und Angiogenese mitwirkt (Guan & Shalloway, 1992). Entscheidend für die Funktion von FAK ist die Autophosphorylierung an Y397 innerhalb der regulatorischen N-terminalen FERM (Ezrin-Radixin-Moesin)-Domäne (Zhao & Guan, 2011). α -Parvin ist sowohl an den fokalen Adhäsionspunkten, als auch an der Spitze von Zellmembranfortsätzen, den Lamellipodien, lokalisiert. Dieses Protein ist entscheidend für die Regulation der Aktin-Filament-Dynamik (Rony & Streil, 2011). FAK Y397 und α -Parvin wurden in den entsprechenden Immunfluoreszenz-Färbungen als Marker für die fokalen Adhäsionspunkte verwendet (Abbildung 35).

Die Visualisierung von FAK Y397 (rot) in Abbildung 35 verdeutlichte, dass nach CT45 Herunterregulation weitaus weniger aktivierte fokale Adhäsionspunkte vorhanden sind. α -Parvin konnte in den Kontrollzellen an den zahlreichen fokalen Adhäsionspunkten und zusätzlich in den Lamellipodien detektiert werden. Nach negativer Regulation von CT45 veränderte sich das α -Parvin-Muster in vielen Zellen. Man erkennt keine distinkte Anreicherung, sondern eher eine konfuse Lokalisation über das gesamte Zytoplasma.

- 4. Ergebnisse -

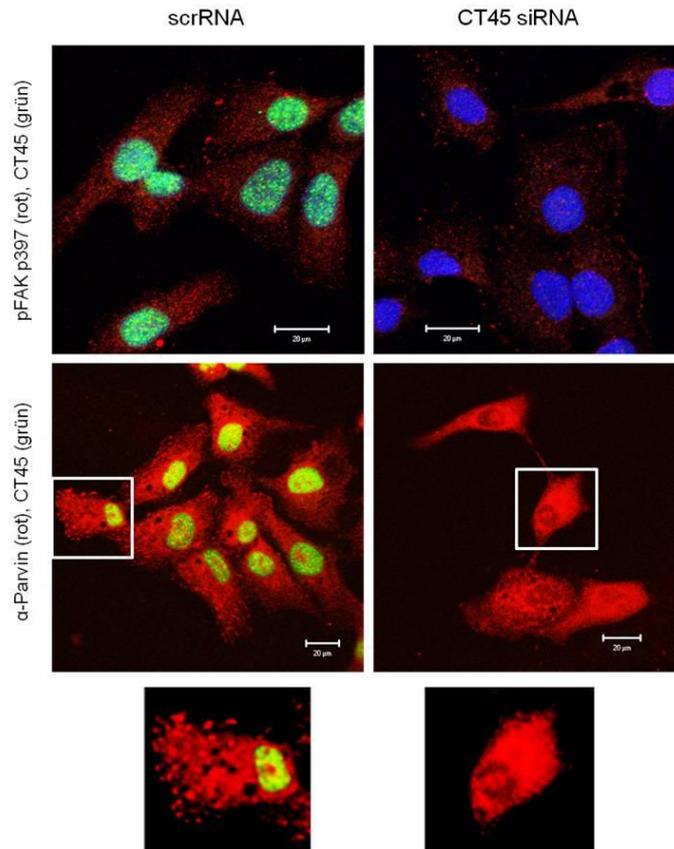


Abbildung 35: CT45 hat einen Einfluss auf die Phosphorylierung von FAK (Y397) und die Verteilung von α -Parvin. CT45 wurde in HT1080-Zellen über RNA-Interferenz (Nukleofektion, Lonza) herunterreguliert und die Zellen wurden auf Objektträger ausgesät. Nach 72 Stunden wurden Immunfluoreszenz-Färbungen angefertigt. Die Färbungen gegen FAK (Y397) und α -Parvin erfolgten mit den spezifischen Primärantikörpern und einem anti-Kaninchen Alexa594-markiertem Sekundärantikörper. CT45 wurde mit Ki-A10 und einem anti-Maus Alexa488-markiertem Sekundärantikörper visualisiert. Die Menge an Y397 FAK scheint nach CT45-Herunterregulation reduziert und die Verteilung von α -Parvin ist in vielen Zellen verändert.

Desweiteren wurden Versuche durchgeführt, die eine physiologische Relevanz der hier aufgeführten Beobachtungen klären sollten. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob ein CT45-vermittelter Effekt auf die Zelladhäsion resultiert (Abbildung 36). Hierzu wurden die HT1080-Zellen zunächst 24, 48 und 72 Stunden nach der Nukleofektion in 96-Loch-Platten ausgesät und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend sollte die Stärke der Zelladhäsion durch ausgiebiges Schütteln (3000 rpm für 3 min) analysiert werden. Die Auswertung erfolgte nach Kristallviolett-färbung und Lyse der verbleibenden, adhärenen HT1080-Zellen im Plattenphotometer.

Für die Auswertung wurde der Wert der Kontrollzellen auf 100 Prozent und die CT45-siRNA-behandelten Zellen hierzu in Relation gesetzt (Abbildung 36). In den Versuchen konnte kein signifikanter Unterschied in der Adhärenz der Zellen beobachtet werden. Man erkennt 48 Stunden nach CT45-Herunterregulation eine um 20 Prozent reduzierte Zellzahl. Allerdings ist

die Standardabweichung sehr hoch. Daher kann mit dieser Testmethode keine eindeutige Aussage über einen CT45-induzierten Effekt auf das Adhäsionsverhalten der Zellen getroffen werden.

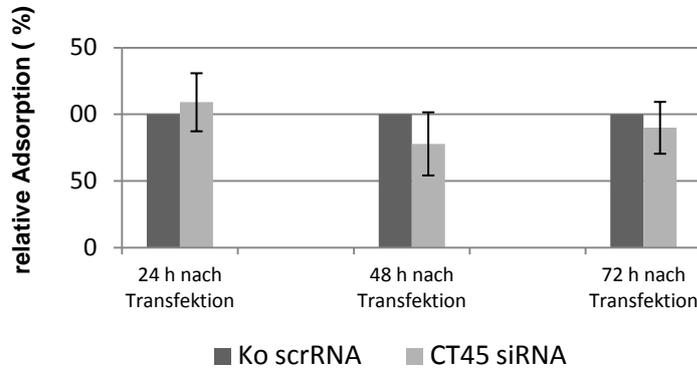


Abbildung 36: CT45-vermittelter Effekt auf die Zelladhärenz. CT45 wurde in HT1080-Zellen über RNA-Interferenz herunterreguliert. Nach 24-72 Stunden wurden die Zellen in eine 96-Loch-Platte ausgesät. Die Adhärenz wurde nach starkem Schütteln der Platten (3 min, 3000 rpm), sowie anschließender Färbung und Lyse der Zellen im Plattenphotometer ausgewertet (Werte für die Kontroll-scrRNA transfizierten Proben wurden auf 100 % gesetzt). Aufgrund der hohen Standardabweichung konnte kein Effekt auf die Adhärenz beobachtet werden.

Eine sehr genaue Echtzeit-Analyse der eintretenden Veränderungen innerhalb der Zellmorphologie bzw. Zelladhärenz wird durch die Messung der Zellimpedanz gewährleistet. Auch Unterschiede in der Zellproliferation können mit dieser Methode untersucht werden. Das CT45 keinen Einfluss auf die Zellproliferation hat, wurde bereits in Abschnitt 4.3 gezeigt. Daher war diese Methode zur Analyse morphologischer Unterschiede geeignet. Zur Messung der Zellimpedanz wurden die Zellen in eine 96-Loch E-Platte (Roche), die zu 80 % mit einer flachen Goldfilm-Elektrode am Boden ausgestattet ist, ausgesät. Der Wechselstromwiderstand (Impedanz) der zellbedeckten Elektrode wird bei einer oder bei mehreren Frequenzen als Funktion der Zeit gemessen. Die isolierenden Eigenschaften der äußeren Plasmamembran lässt die Zellen wie dielektrische Partikel wirken. Die Impedanz steigt mit zunehmendem Zellbewuchs, bis sich eine kontinuierliche Zellschicht gebildet hat. Bei kontinuierlichen Zellschichten wird die gemessene Impedanz maßgeblich durch die Zellform bestimmt. Ändert sich die Zellform, so ändern sich die Stromwege um und durch die Zelle, so dass sich die gemessene Impedanz entsprechend verändert. Durch die zeitaufgelöste Impedanzmessung können somit Zellform-Änderungen zeitaufgelöst und in sub-mikroskopischer Auflösung verfolgt werden (Xiao et al., 2002).

Für entsprechende Impedanz-Messungen wurde das xCelligence-System (RTCA SP-Instrument) der Firma Roche verwendet. Die CT45-regulierten bzw. die Kontroll-HT1080-Zellen wurden in die 96-Loch E-Platte ausgesät und über 72-110 Stunden beobachtet. Die

Datenauswertung erfolgte mit der entsprechenden RTCA-Software (Roche). Als Wert für die Impedanz wird ein dimensionsloser Parameter, der Zellindex, angegeben (Abbildung 37).

Vor dem Start der eigentlichen Zellimpedanz-Messung wurden die 96-Loch E-Platten mit Medium befüllt und im Zellkulturinkubator zur Einstellung der Nullwert-Linie inkubiert. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 30 min, wobei minütlich ein Wert aufgezeichnet wurde. Kavitäten, in denen zu diesem Zeitpunkt bereits eine Impedanz messbar war, wurden nicht für die geplanten Versuche verwendet. Anschließend wurden die entsprechend behandelten Zellen in die vorgesehenen Kavitäten ausgesät. Es wurden jeweils mindestens dreifach-Werte analysiert. Zu Beginn des Experiments, über ca. eine Stunde, wurde der Zellindex minütlich aufgezeichnet, anschließend alle fünf Minuten (Abbildung 37).

Die Zellimpedanz wurde in dem dargestellten, repräsentativen Experiment über einen Zeitraum von 108 Stunden aufgezeichnet (Abbildung 37). Die erfolgreiche Herunterregulation von CT45 wurde für jedes Experiment über eine Western Blot-Analyse überprüft (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich zum Zellindex wurde mit Hilfe der RTCA-Software die Änderung des Zellindex über einen definierten Zeitraum, ausgedrückt als Steigung pro Stunde, angegeben. In dem abgebildeten Versuch ist zu erkennen, dass nach dem Aussäen der Zellen in die E-Platte, die unbehandelten HT1080-Zellen schneller adhäreren. Daher steigt der Zellindex stärker an, als bei den si/scrRNA transfizierten Zellen. Über die ersten 35 Stunden ist zudem kein Unterschied zwischen den CT45-regulierten und den Kontrollzellen zu beobachten. Verdeutlichend hierzu ist die Steigung der drei Proben über die ersten 34 Stunden des Versuchsverlaufs dargestellt. 39 Stunden nach Transfektion wurde beobachtet, dass sich der Zellindex zwischen Kontroll- und CT45-regulierten Zellen verschiebt. Im weiteren Verlauf des Experiments wird diese Differenz immer größer, so dass bei der Betrachtung der Steigung über 68 Stunden eine 20 %ige Abweichung zwischen den beiden Proben entsteht. Demnach ist die Zellimpedanz nach CT45-Herunterregulation vermindert. Das Auseinanderdriften der Kurven ist übereinstimmend mit der in vorherigen Abschnitten gezeigten Kinetik der CT45-Herunterregulation. 24 Stunden nach siRNA-Transfektion ist in der Regel noch keine vollständige Herunterregulation von CT45 zu beobachten. 48 Stunden nach der Transfektion wurde grundsätzlich eine 90 %ige Reduktion der CT45-Proteinmenge beobachtet.

Die Ursache für die CT45-induzierte verminderte Zellimpedanz könnte neben veränderter Adhärenz auch in einer veränderten Proliferationsrate der Zellen liegen. Obwohl im Abschnitt 4.3 bereits über verschiedene Testverfahren analysiert wurde, dass CT45 keinen Einfluss auf die Proliferation hat, wurden die Zellen parallel zur Impedanzmessung, mit BrdU markiert

(Ergebnisse nicht gezeigt). In diesen Versuchen konnte deutlich gezeigt werden, dass auch in diesem Zusammenhang die Proliferation als Ursache für die beobachteten Effekte auf die Zellimpedanz nicht in Frage kam.

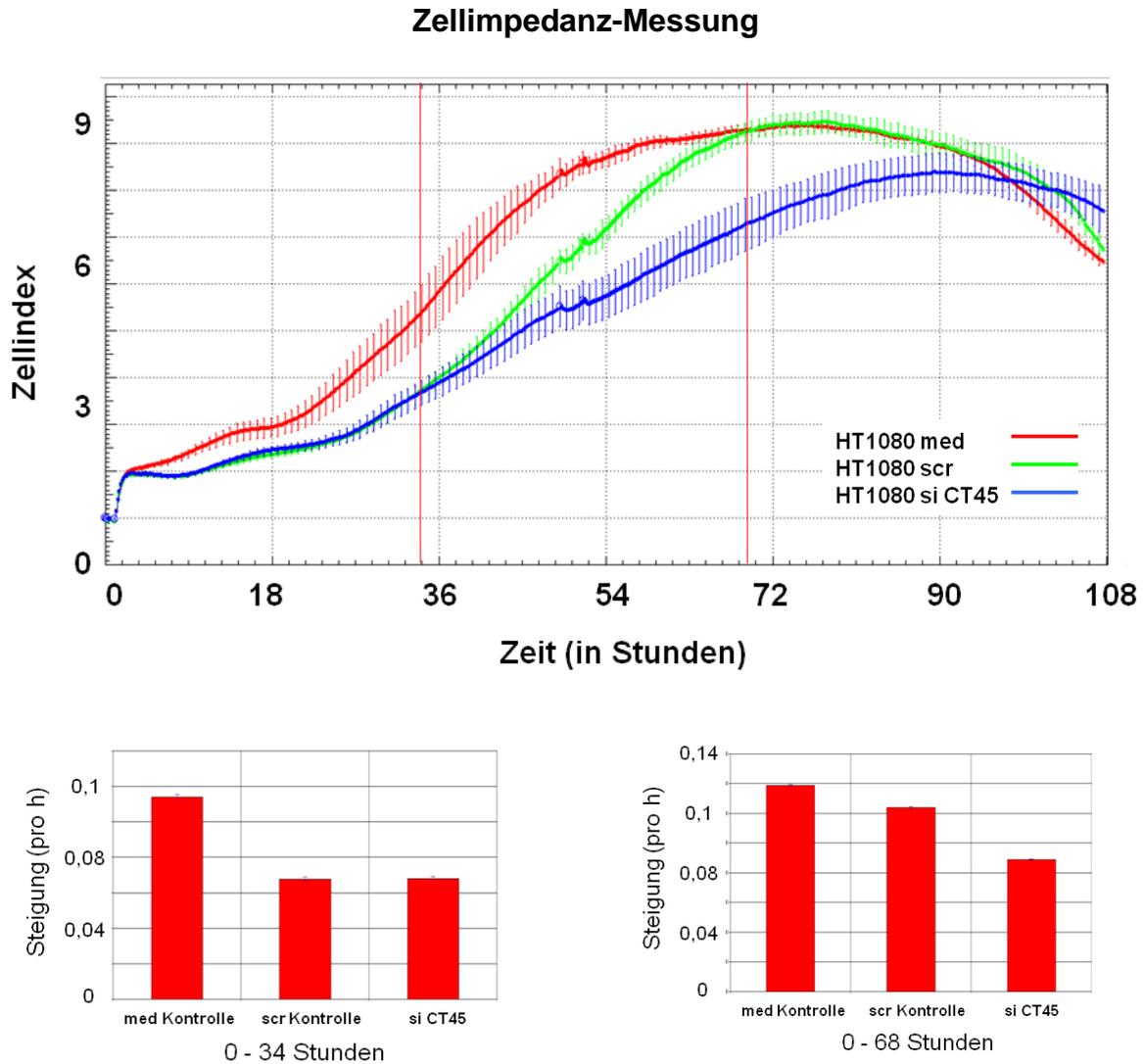


Abbildung 37: CT45 hat einen Einfluss auf die Zellimpedanz. CT45 wurde in HT1080-Zellen über RNA-Interferenz herunterreguliert. Die Zellen wurden im Anschluss in eine 96-Loch E-Platte (Roche) ausgesät und die Zellimpedanz wurde mit Hilfe des xCelligence Systems (Roche), über einen Zeitraum von 108 Stunden, analysiert. (HT1080 med Kontrolle: untransfiziert; HT1080 scr Kontrolle: scrRNA transfiziert; HT1080 si CT45: CT45-siRNA transfiziert).

Nicht nur die Zelladhärenz, sondern auch die Zellmigration wird entscheidend durch die Regulation der Zellmorphologie und damit einhergehend des Zytoskeletts, beeinflusst. Daher sollte die Zellmigration nach CT45-Herunterregulation über die Verwendung eines ibidi-Zellkultureinsatzes analysiert werden (Abbildung 38). Der ibidi-Zellkultureinsatz erlaubt durch das Aussäen einer definierten Zellzahl in zwei durch einen Spalt getrennte Kavitäten die Analyse der Zellmigration in einem 2D-Modell. In Abbildung 38A ist ein repräsentatives

Ergebnis aus diesem Versuch dargestellt. Der Spalt ist 500 μM breit (Abbildung 38C). Zur Analyse der Migration wurden die Zellen mit einem Durchlichtmikroskop und einem angeschlossenen Kamerasystem fotografiert.

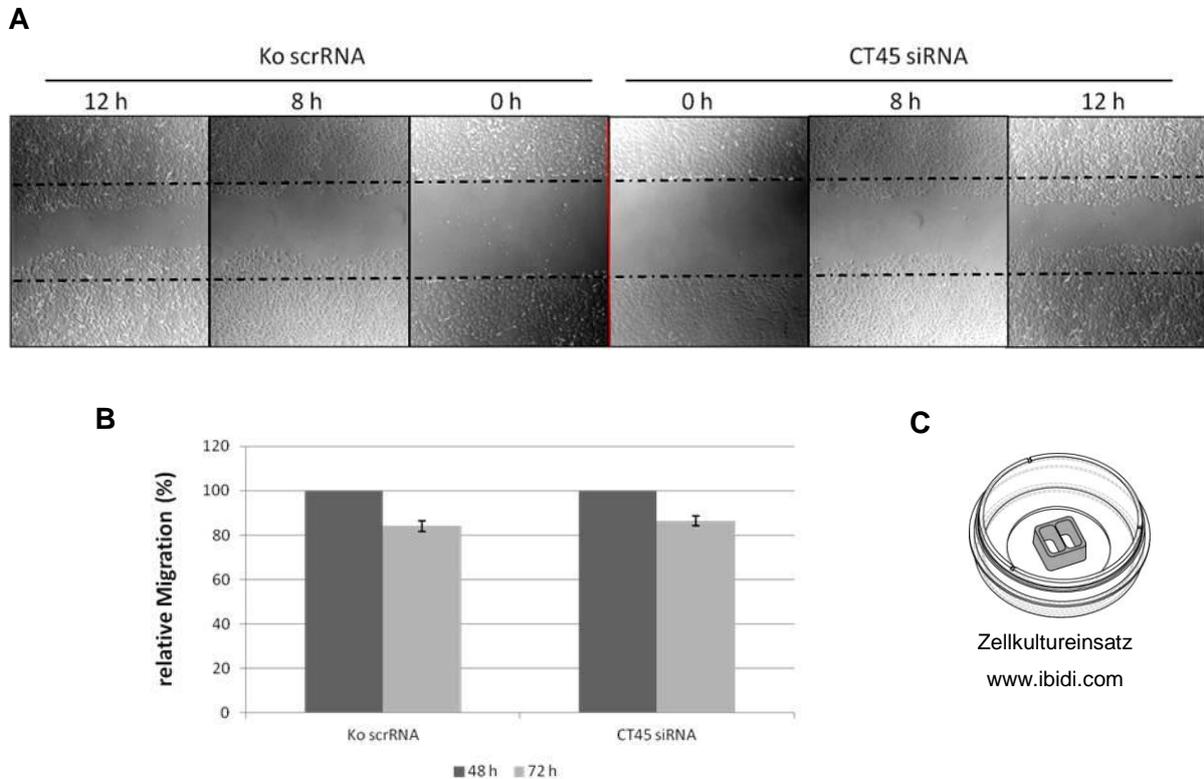


Abbildung 38: CT45 hat keinen Einfluss auf die Zellmigration in einem 2D-Modell. In HT1080-Zellen wurde die Akkumulation von CT45 negativ reguliert (Nukleofektion). 48 und 72 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen in den ibidi-Zellkultureinsatz ausgesät und die Migration in den vorhergesehenen Spalt (500 μM Durchmesser) wurde über 12 Stunden analysiert. **A:** Durchlichtmikroskopische Aufnahmen der in den Spalt migrierenden Zellen. **B:** Analyse von acht biologischen Wiederholungen und Auswertung mit Excel. Die Spaltgröße von 500 μM wurde auf 100 % gesetzt und die Verkleinerung des Spalts dazu in Relation. **C:** Schematische Darstellung des verwendeten Zellkultureinsatzes (ibidi). Es ist kein Unterschied nach CT45-Herunterregulation zu beobachten.

Über Verwendung der Software konnte die Veränderung der Spaltbreite gemessen werden. Zur Auswertung wurde die Breite des Spalts zum Startpunkt des Versuchs auf 100 % gesetzt und die Veränderung hierzu in Relation. Die Ergebnisse machten deutlich, dass CT45 in diesem Versuchsmodell keinen Einfluss auf die Migration der HT1080-Zellen hat. Man erkennt rein optisch keinen Unterschied im Migrationsverhalten zwischen den CT45-siRNA bzw. scrRNA transfizierten HT1080-Zellen. Auch die Auswertung von acht biologisch unabhängigen Experimenten bestätigt das Ergebnis. Es konnte keine Differenz festgestellt werden. Die negative Regulation der CT45-Proteinmenge wurde für jeden Versuch über eine Immunfluoreszenz-Färbung überprüft (Ergebnisse nicht gezeigt).

Aus verschiedenen Publikationen geht hervor, dass eine invasive Migration von Tumorzellen unter anderem charakteristisch über spezialisierte Zellfortsätze, die als Invadopodien

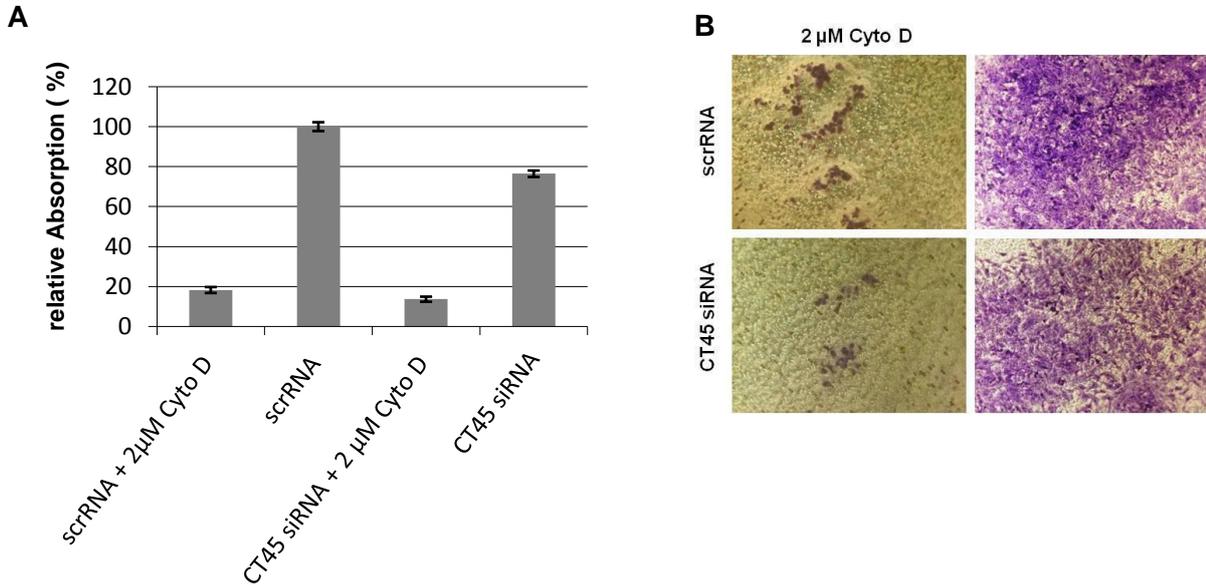
bezeichnet werden, vermittelt wird (Murphy und Courtneidge, 2011; Oser et al., 2011; Gligorijevic et al., 2012). Beschrieben wurde, dass N-WASP (*neural Wiskott-Aldrich syndrome protein*) als zentrales Molekül essentiell für die Vermittlung der dreidimensionalen (3D), Invadopodien-bedingten Migration ist (Gligorijevic et al., 2012). Aus den publizierten Daten geht hervor, dass der beschriebene N-WASP-vermittelte Signalweg vor allem die dreidimensionale Migration bzw. Invasion beeinflusst. Um zu analysieren, ob CT45 eventuell an der Vermittlung von invasiven Prozessen durch dreidimensionale Strukturen beteiligt ist, wurden entsprechende Versuche durchgeführt (Abbildung 39).

Verwendet wurde hierzu der *CytoSelect Cell Migration and Invasion Assay (Transwell-Assay)* der Firma BioCat. Für die Versuche wurden zunächst HT1080-Zellen, in denen zuvor CT45 über RNA-Interferenz herunterreguliert wurde, analysiert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in die entsprechenden *Transwells* ausgesät. Die Zellen migrierten gegen einen FKS-Konzentrationsgradienten entweder durch eine Polycarbonatmembran (8 µM große Poren) oder wanderten invasiv zunächst durch eine Membranmatrix und anschließend durch die Polycarbonatmembran (8 µM große Poren). Als negative Kontrolle wurden die HT1080-Zellen nach der Transfektion mit Cytochalasin D (2 µM) inkubiert. Der Migrationstest wurde vier Stunden, der Invasionstest 24 Stunden nach Aussaat der Zellen in die *Transwells* ausgewertet. Die Auswertung erfolgte nach Färbung der durchgewanderten Zellen und anschließender photometrischer Messung. Die ermittelten Werte für die Kontrollzellen wurden auf 100 % gesetzt und die Werte der CT45-siRNA behandelten hierzu in Relation.

In den durchgeführten *Transwell*-Versuchen ist ein deutlicher CT45-induzierter Effekt auf die Zellmigration und Zellinvasion zu beobachten (Abbildung 39). Nach Herunterregulation von CT45 konnte eine 23 %ige Inhibition der Migration durch die 8 µM großen Poren der Polycarbonatmembran analysiert werden (Abbildung 39A). Die Inhibition der Aktin-Polymerisation durch das Mykotoxin Cytochalasin D wurde als negative Kontrolle verwendet. Dieses Toxin hatte einen sehr starken Effekt auf das Migrationsverhalten der Zellen. Die Migration konnte um 80 % reduziert werden. Die Ergebnisse konnten optisch über ein durchlichtmikroskopisches Bild bestätigt werden. Die Analyse der Zellinvasion ergab ein vergleichbares Resultat. Nach negativer Regulation der CT45-Proteinmenge war eine um 25 % reduzierte Invasion durch die Membranmatrix und die Polycarbonatmembran zu beobachten (Abbildung 39C). Durch Inkubation mit Cytochalasin D konnte die Invasion um 62 % reduziert werden (Abbildung 39B). Die Daten nach photometrischer Auswertung

konnten auch hier über die optische Beobachtung der Proben bestätigt werden (Abbildung 39D).

Analyse der Zellmigration



Analyse der Zellinvasion

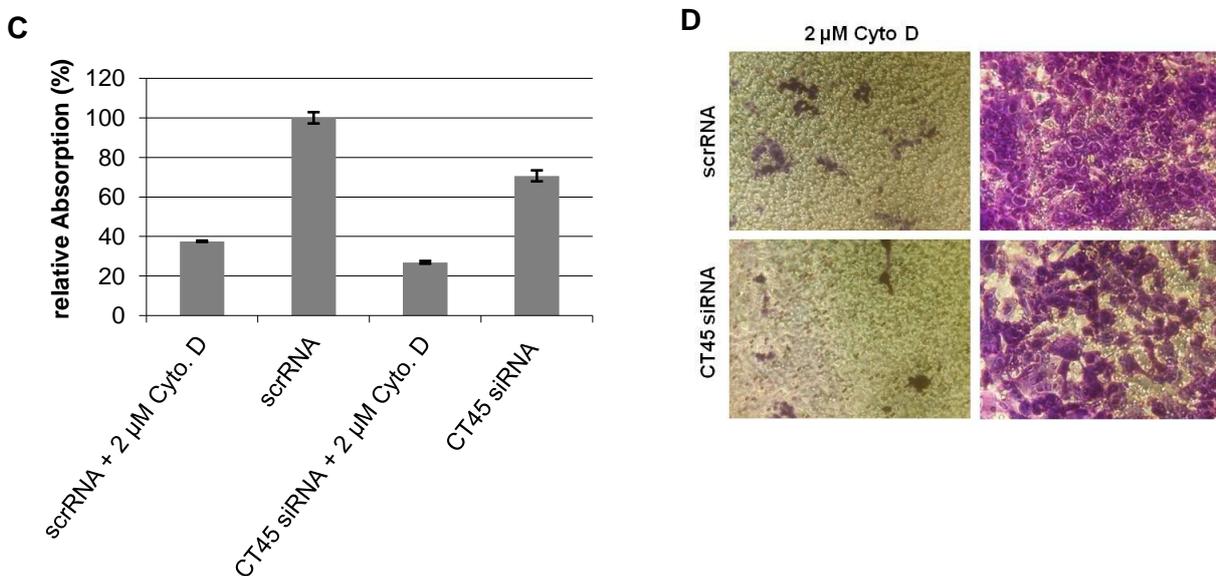


Abbildung 39: CT45 beeinflusst die Zellmigration und Invasion in HT1080-Zellen im 3D-Modell. Zunächst wurde CT45 über RNA-Interferenz herunterreguliert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen in FKS-freiem Medium aufgenommen und in die obere Kammer der *Transwells (BioCat Migration and Invasion Assay)* ausgesät. Als negative Kontrolle wurden scrRNA sowie CT45-siRNA transfizierte Zellen vor dem Aussäen mit 2 µM Cytochalasin D versetzt. In die untere Kammer wurde Medium + 10 % FKS überführt. Der Migrations-Assay (A+B) wurde 4 Stunden nach Aussaat der Zellen, der Invasions-Assay (C+D) 24 Stunden nach Aussaat der Zellen ausgewertet. Die durchgewanderten Zellen wurden angefärbt, getrocknet und der Farbstoff durch Lyse der Zellen freigesetzt. Vor der Lyse wurden die violett-gefärbten Zellen im Durchlichtmikroskop photographiert (B+D). Die Absorption wurde photometrisch ermittelt. Nach Herunterregulation von CT45 wurde die Migration bzw. die Invasion der Zellen um ungefähr 23 Prozent inhibiert (A+C). Im durchlichtmikroskopischen Bild ist die verminderte Migration bzw. Invasion ebenfalls gut sichtbar. Nach Cytochalasin D-Behandlung (2 µM) ist die erwartete Inhibition der Zellwanderung zu beobachten.

Um zu analysieren, ob die Suspensionszelllinie L428 nach CT45-Herunterregulation ebenfalls einer veränderten Migration unterliegt, wurde der *CytoSelect Cell Migration Assay* (5 µm) der Firma BioCat verwendet. Die Polycarbonatmembran in den *Transwells* hatte für diese Versuche einen Durchmesser von 5 µm. Als negative Kontrolle wurden die Zellen ebenfalls mit Cytochalasin D behandelt.

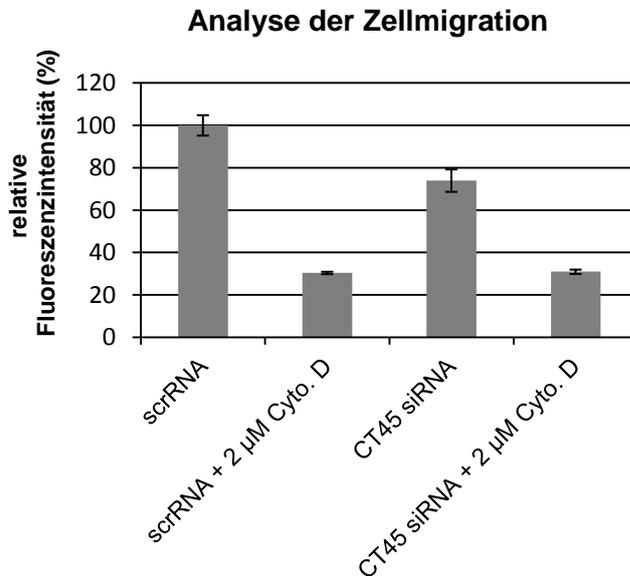


Abbildung 40: CT45 beeinflusst die Zellmigration in L428-Zellen im 3D-Modell. CT45 wurde über RNA-Interferenz in L428-Zellen herunterreguliert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen in FKS-freiem Medium aufgenommen und in die obere Kammer der *Transwells* (*BioCat Migration Assay*) ausgesät. Als negative Kontrolle wurden scrRNA sowie CT45-siRNA transfizierte Zellen vor dem Aussäen mit 2 µM Cytochalasin D behandelt. Die untere Kammer wurde mit Medium + 10 % FKS versetzt. Der Migrations-Assay wurde 6 Stunden nach Aussaat der Zellen ausgewertet. Die migrierten Zellen wurden fluoreszenzmarkiert. Die Fluoreszenzintensität (Absorption 280 nm/Emission 520 nm) wurde photometrisch ermittelt. Nach Herunterregulation von CT45 wurde die Migration der Zellen um ungefähr 24 Prozent reduziert. Nach Cytochalasin D-Behandlung (2 µM) ist die erwartete Inhibition der Zellwanderung zu beobachten.

Die Migration erfolgte ebenfalls gegen einen FKS-Konzentrationsgradienten und wurde 6 Stunden nach Aussaat der Zellen in die entsprechenden *Transwells* ausgewertet. Hierzu wurden die durch die Membran gewanderten Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt und die Fluoreszenzintensität der Proben über ein Plattenphotometer analysiert. Die Werte der Kontrollzellen wurden auf 100 % gesetzt und die ermittelten Werte nach CT45-Herunterregulation hierzu in Relation (Abbildung 40).

In den L428-Zellen ist nach negativer Regulation der CT45-Proteinmenge ein ähnlicher Effekt, wie bereits in den HT1080-Zellen detektiert wurde, zu beobachten. Die Zellen zeigten ein um ca. 24 % vermindertes Migrationsverhalten durch die Poren der Polycarbonatmembran. Nach Cytochalasin D-Behandlung war die Migration stark eingeschränkt.

4.8 Regulation von Syncrip induziert morphologische Veränderungen

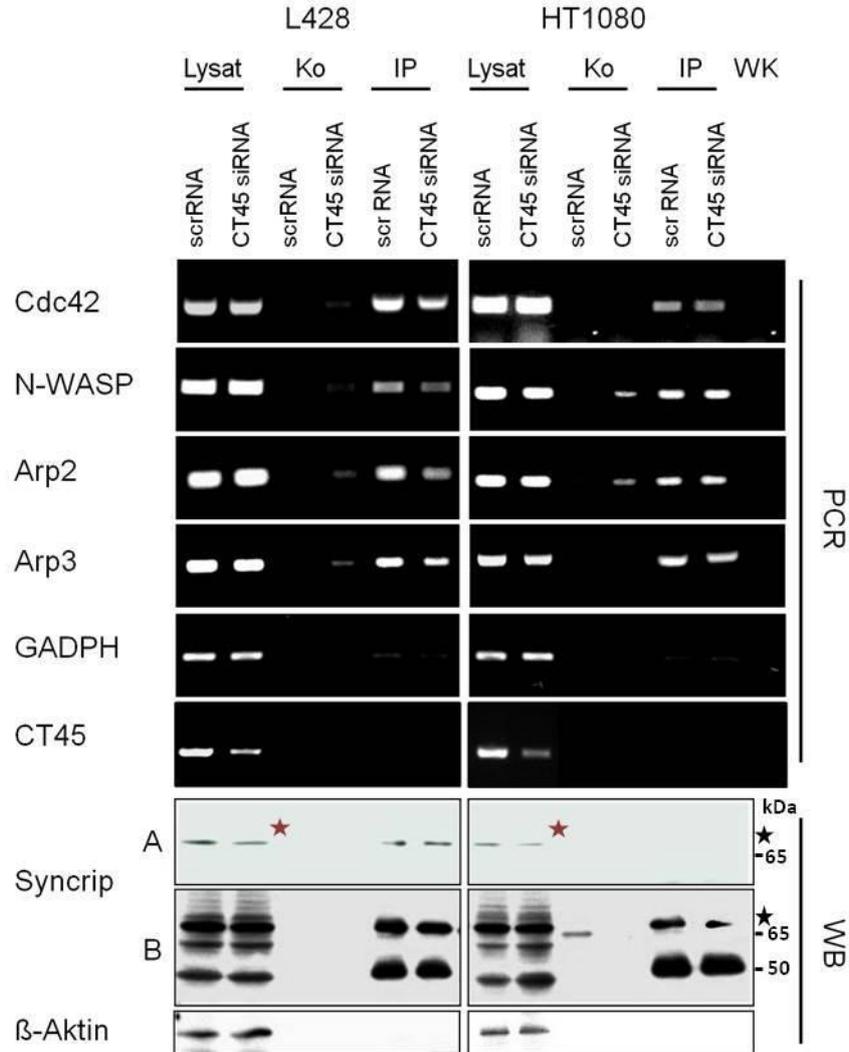
CT45 induziert eine negative Regulation des mRNA-interagierenden Proteins Syncrip (Abschnitt 4.6, 2D-DIGE-Analysen nach CT45-Herunterregulation). In Western Blot-Analysen konnte eine differentielle Regulation der Isoform 3 detektiert werden. In zwei Publikationen wurde beschrieben, dass die murine Isoform 1 mit der mRNA Zytoskelett-assoziiierter Proteine interagiert und deren Transport und/oder Translation reguliert (Xing et al., 2012; Chen et al., 2012). Die Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die negative Regulation von murinem (m) Syncrip 1 zu morphologischen Veränderungen innerhalb neuronaler Zellen führt, so dass das Migrationsverhalten negativ beeinflusst wird. Die verringerte mSyncrip 1-Proteinmenge induziert demnach eine Inhibition des mRNA-Transports der Proteine des Cdc42/N-WASP/Arp2/3-Komplexes und eine verstärkte Translation von RhoA. Der Cdc (*cell division cycle*) 42-Signalweg ist essentiell für die Regulation der Aktin-Dynamik. Initialer Schritt in dieser Signalkaskade ist die Induktion einer Konformationsänderung von N-WASP, das daraufhin mit dem Arp2/3-Komplex interagieren kann (Higgs et al., 2001). Die sieben Untereinheiten des Arp (*actin related Protein*) 2/3-Komplexes wechselwirken direkt mit Aktin und treiben die Polymerisation und resultierend die Migration voran (Liao et al., 2011). RhoA (*ras homolog gene family, member A*) ist eine mit dem Aktin-Zytoskelett assoziierte GTPase und induziert eine verstärkte Phosphorylierung von Cofilin, welches unter anderem zur verstärkten Depolymerisation von Aktin führt (Xing et al., 2012). Die Autoren postulierten, dass mSyncrip 1 die Translation von RhoA in murinen Nervenzellen negativ reguliert, so dass über Cofilin Veränderungen in der Morphologie und dem Migrationsverhalten resultieren.

Die Arbeitsgruppen erhoben ihre Befunde an primären Neuronen aus Ratten und Mäusen oder murinen Myoblastom-Zelllinien. Gezeigt wurde, dass eine negative Regulation von Syncrip zu morphologischen Unterschieden in den Zellen führt. Um diese Ergebnisse auf das humane CT45-assoziierte Modell übertragen zu können, etablierte ich die in den Veröffentlichungen beschriebene mRNA-IP. Die Autoren haben die zytoplasmatisch lokalisierte mSyncrip-Isoform 1 (auch genannt hnRNP Q1 [*heterogenous nuclear ribonucleo-protein Q1*]) als essentiell für diesen Weg identifiziert (Chen et al., 2012; Xing et al., 2012). Die beiden anderen Varianten sind den Autoren zufolge im Zellkern lokalisiert und hauptsächlich an Spleißprozessen beteiligt. Der von uns verwendete Antikörper gegen Syncrip, 18E4, detektiert laut Literatur alle drei humanen Isoformen (Syncrip 1-3), wobei 1 auf 55, 2 auf 60 und 3 auf 70 kDa detektiert werden soll (Mourelatos et al., 2001). Den Herstellerangaben (Abcam) war zu entnehmen, dass die stärkste Bande bei 70 kDa detektiert wird. Diese wurde auch in den abgebildeten Versuchen als prominente Bande

dargestellt. Weitere Banden waren erst nach langer Belichtung schwach zu detektieren. Den Daten von Xing und Kollegen (2012) zufolge liegt das murine Syncrip 1 ebenfalls auf einer Höhe von 70 kDa. Aus einem Sequenzalignment (s. Anhang) (www.ebi.ac.uk/web_clustalw) der murinen Sequenz für die Isoform 1 (NP_062640.2) mit den drei humanen Sequenzen von Syncrip 1-3 (AAK59705.1; AAK59704.1, AAK59703.1) geht hervor, dass die murine Isoform 1 identisch zu der humanen Syncrip Variante 3 ist. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass die detektierte Bande bei 70 kDa die auch in den Publikationen analysierte Isoform von Syncrip repräsentiert und diese beiden Varianten in ihrer Funktion homolog sind. Vor diesem Hintergrund wurden die entsprechenden Versuche durchgeführt. Im Folgenden wird im Kontext mit den hier vorgestellten Versuchen mit Syncrip die humane 70 kDa Isoform angesprochen.

Mit Hilfe der mRNA-Immunpräzipitation (mRNA-IP) sollten erste Hinweise auf den Einfluss von Syncrip auf die CT45-induzierten morphologischen Veränderungen in HT1080 und L428-Zellen gewonnen werden. Diese Methode wurde analog zu dem von Chen und Kollegen (2012) publizierten Protokoll etabliert. Über dieses Verfahren sollte die Interaktion zwischen Syncrip und den mRNAs von Cdc42, N-WASP und Arp2 und 3 im humanen System analysiert werden. CT45 wurde zunächst in HT1080 und L428-Zellen über RNA-Interferenz herunterreguliert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in RSB100-Puffer mit Zusatz von 0,5 mg/ml Digitonin lysiert und nach verschiedenen Zentrifugationsschritten mit Protein A-Sepharose und dem anti-Syncrip-Antikörper rotiert. Die Verwendung von Digitonin als Detergenz im Zusammenhang mit den Zentrifugationsschritten stellt sicher, dass nur die äußere Plasmamembran, nicht aber die Kernmembran, solubilisiert wird. Dies dient der Vermeidung von unspezifischen Reaktionen mit anderen mRNA-interagierenden nukleären Proteinen. Nach mehreren Waschschritten wurde die Protein A-Sepharose 1:1 geteilt, so dass ein Teil für die Western Blot-Analyse und ein Teil für die mRNA-Extraktion (RNeasy, Qiagen) und RT-PCR verwendet werden konnte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 41 gezeigt. Über die Durchführung der mRNA-IP konnte in ersten initialen Experimenten gezeigt werden, dass die untersuchten mRNAs des Cdc42/N-WASP/Arp2/3-Komplex mit Syncrip interagieren. GAPDH wurde als negative Kontrolle verwendet. Es konnte keine Interaktion mit Syncrip detektiert werden. In dem durchgeführten Kontroll-Western Blot wurde die Immunpräzipitation von Syncrip an die Protein A-Sepharose gezeigt.

A



B

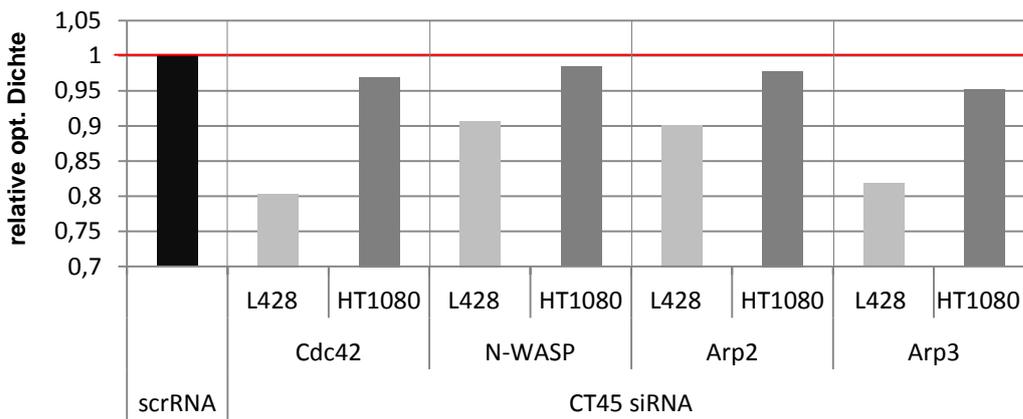


Abbildung 41 : Syncrip interagiert mit der mRNA von Cdc42, N-WASP, Arp2 und Arp3 in L428- und HT1080-Zellen. A: L428- und HT1080-Zellen wurden mit CT45-siRNA und scrRNA transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert (RSB100 + 50 mg/ml Digitonin) und für die IP mit dem anti-Syncrip Antikörper (5 µg) und Protein A-Sepharose rotiert. Als Kontrolle (Ko) wurde das Lysat nur mit Protein A-Sepharose rotiert. Die verwendete Protein A-Sepharose wurde 1:1 geteilt. Eine Hälfte wurde zur Kontrolle der Syncrip-IP über das Western Blot (WB)-Verfahren verwendet (A [kurz] + B [lang] bezeichnen unterschiedliche Belichtungszeiten, ★ kennzeichnet die Höhe der Syncrip-

spezifischen Bande. β -Aktin wurde als Beladungskontrolle verwendet. Die verschiedenen PCRs wurden nach Isolation der mRNA mit dem RNesay Kit (Qiagen) und dem Umschreiben in cDNA (*First Strand cDNA Synthesis Kit*, Fermentas) durchgeführt. Die Banden im Agarose-Gel wurden mit Etidiumbromid gefärbt und dokumentiert. WK bezeichnet die Wasserkontrolle B: Die verschiedenen mRNA-spezifischen Banden wurden densitometrisch ausgewertet und die relative optische Dichte ermittelt. Die Bande der scrRNA-Kontrolle wurde auf eins gesetzt und die Banden nach CT45-siRNA Transfektion hierzu in Relation. Es konnte ermittelt werden, dass Syncrip in L428- und HT1080-Zellen mit den untersuchten mRNAs des Cdc42/N-WASP/ARP2/3-Komplex interagiert, aber nicht mit GAPDH mRNA. Die densitometrische Auswertung ergab, dass nach CT45-Herunterregulation in L428-Zellen weniger spezifische mRNA an Syncrip bindet.

Zudem wurde die Regulation von CT45 eindeutig nachgewiesen. Die CT45-induzierte Herunterregulation von Syncrip war zudem in HT1080-, als auch in L428-Zelllysaten (*), detektierbar. β -Aktin wurde als Beladungskontrolle gefärbt. Die negative Regulation der CT45-Proteinmenge hatte keinen Einfluss auf die Menge der untersuchten mRNAs im Zelllysat. In einigen der durchgeführten Kontrollen (Ko) wurden schwache Banden detektiert. Diese wurden aufgrund der geringen Intensität vernachlässigt. Die Daten von Chen und Kollegen (2012) bezüglich der Interaktion zwischen Syncrip und der mRNA von Cdc42, Arp2/3 und N-WASP können auf das hier untersuchte System übertragen werden. Nach densitometrischer Auswertung der Banden mit der *Aida Image Analyzer* Software 4.04 konnte vor allem in den analysierten IPs aus L428-Zellen nach CT45-Herunterregulation eine geringere Abundanz der untersuchten mRNAs detektiert werden (Abbildung 41B). Die Menge an detektierter Cdc42- und Arp3-mRNA war nach negativer Regulation von CT45 um ungefähr 20 % reduziert. Der Anteil an präzipitierter N-WASP- bzw. Arp2-mRNA war um 10 % verringert. In den HT1080-Zellen wurde nur ein minimaler Effekt nach CT45-Herunterregulation beobachtet.

Aufbauend auf den Daten von Chen und Mitarbeitern (2012) sollte überprüft werden, ob sich auch in dem hier zu analysierenden humanen Modell die Verteilung der angesprochenen Proteine durch einen verminderten Syncrip-vermittelten mRNA-Transport verändert. Hierzu wurden Immunfluoreszenz-Färbungen von HT1080-Zellen nach negativer Regulation der CT45-Proteinmenge durchgeführt. Analysiert wurde die Verteilung von Cdc42, N-WASP und Arp2.

Um die Zellgröße definieren zu können, wurden Doppelfärbungen mit β -Aktin (direkt markiert, Cy3, rot) angefertigt. Die Präparate wurden 72 Stunden nach Transfektion mit CT45-siRNA bzw. Kontroll-scrRNA gefärbt (Abbildung 42). CT45 (rot) ist in der Doppelfärbung mit Arp2 (grün) visualisiert. Syncrip, Cdc42 und N-WASP (grün) wurden zusammen mit β -Aktin (rot) gefärbt. Arp2 war in den Kontrollzellen deutlich in nadelförmigen Membranfortsätzen, vermutlich den Filopodien, angereichert. Diese Fortsätze sind reich an Aktin und haben eine sensorische

- 4. Ergebnisse -

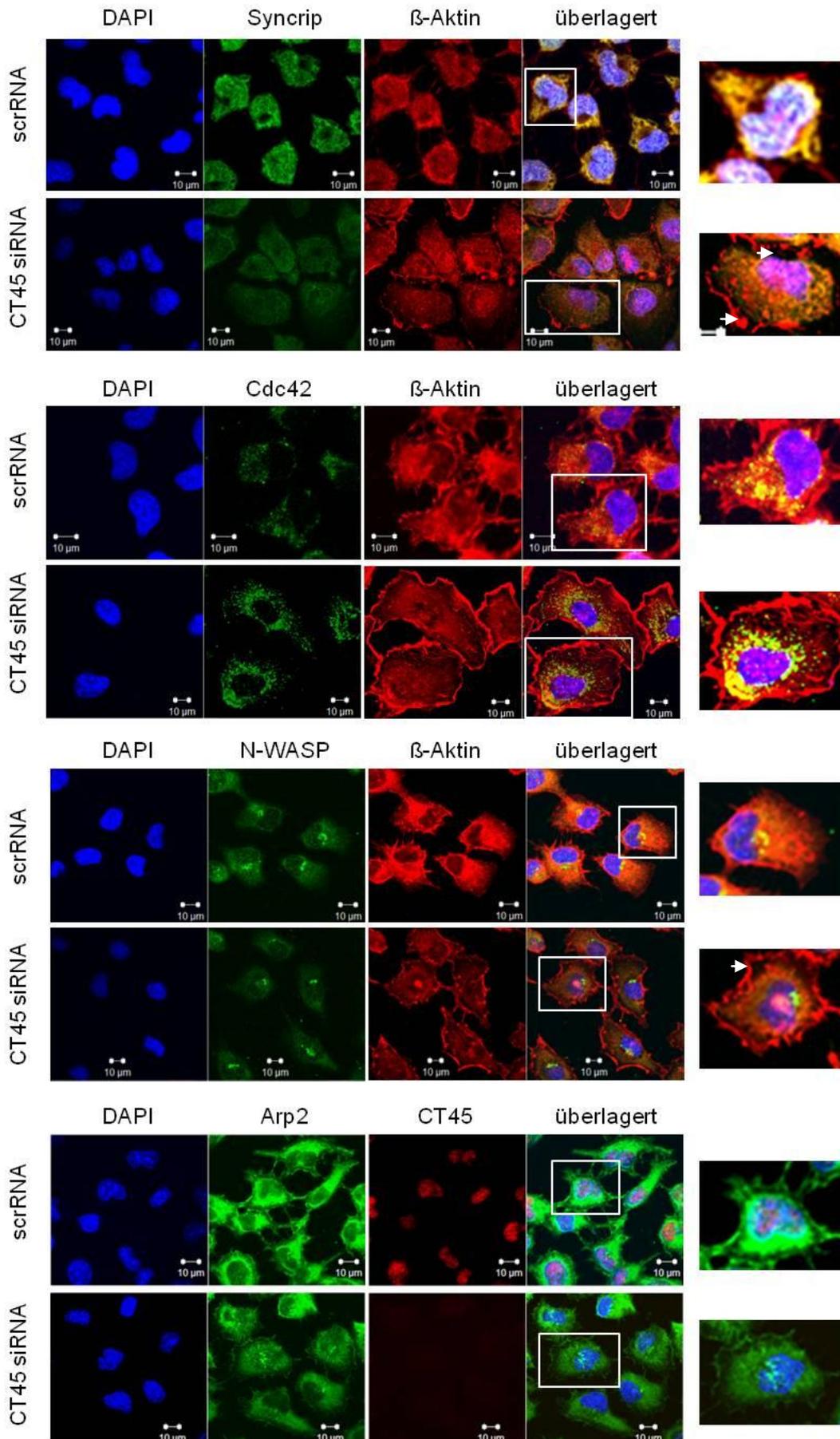


Abbildung 42: Effekt auf die zytoplasmatische Verteilung von Syncrip, Cdc42, N-WASP und Arp2 in HT1080-Zellen. Die Herunterregulation von CT45 erfolgte über RNA-Interferenz (Nukleofektor Kit T, Lonza). 72h nach Transfektion wurden Immunfluoreszenz-Färbungen angefertigt. β -Aktin wurde mit einem direkt markierten (Cy3, rot) anti-Kaninchen Antikörper detektiert. CT45 wurde mit dem Antikörper Ki-A10 und einem Alexa594-markiertem Sekundäntikörper visualisiert. Syncrip, Cdc42, Arp2 und N-WASP wurden mit den spezifischen Primäntikörpern und einem anti-Maus (Syncrip) bzw. anti-Kaninchen (Cdc42, N-WASP, Arp2) Alexa488 (grün)-gekoppelten Sekundäntikörper detektiert. Die DNA wurde mit DAPI (blau) markiert. Die Herunterregulation von CT45 konnte nachgewiesen werden. In den Kontrollzellen (scrRNA) ist eine starke Kolokalisation (gelb) zwischen Syncrip bzw. Cdc42 und β -Aktin zu erkennen. Die zytoplasmatische Verteilung von Syncrip, N-WASP und Cdc42 ist nach Verringerung der CT45-Akkumulation in Bereichen an der Zellmembran verändert. Die drei Proteine waren in vielen Zellen nicht bis an die Zytoplasmamembran verteilt. Arp2 ist in den Kontrollzellen stärker an der Membran und vor allem an den Membranfortsätzen lokalisiert.

aber auch migrationsfördernde Funktion. In den CT45-regulierten Proben war die detektierte Arp2-Intensität insgesamt geringer. Das Protein war hauptsächlich diffus im Zytoplasma lokalisiert und es wurden weitaus weniger 'Filopodien' detektiert. Syncrip wirkte nach CT45-Herunterregulation ebenfalls schwächer angereichert. Interessanterweise fiel durch den Vergleich der Proben bei einer Vielzahl der Zellen auf, dass Syncrip, Cdc42 und N-WASP, nach Verringerung des CT45-Akkumulation, nicht in allen peripheren Bereichen mit Nähe zur Plasmamembran visualisiert werden konnten. In den Kontrollzellen waren die Proteine immer in diesen Regionen detektierbar. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen, die von Chen und Kollegen (2012) im Zusammenhang mit einer Herunterregulation von Syncrip publiziert wurden. Zudem konnte eine deutliche Kolokalisation (gelb) zwischen β -Aktin und Syncrip bzw. Cdc42 detektiert werden. Die Überlagerung war in den CT45-regulierten Zellen nur in wenigen Bereichen zu beobachten. Eine starke zytoplasmatische Kolokalisation zwischen β -Aktin und N-WASP war in beiden Proben nicht zu detektieren.

In einem weiteren Versuchsansatz sollte analysiert werden, ob die von Xing und Kollegen (2012) postulierten Effekte auf die RhoA-Regulation und die Phosphorylierung von Cofilin auf das hier verwendete humane Modell übertragbar sind. Daher wurde in ersten Experimenten analysiert, ob die durch CT45-induzierte negative Regulation von Syncrip, die Proteinmenge von RhoA erhöht und dieses eine verstärkte Phosphorylierung von Cofilin vermittelt. Zusätzlich wurde die Proteinanreicherung von Cdc42, N-WASP und Arp2 im Western Blot überprüft. Die Arbeitsgruppe um Chen (2012) konnte keine veränderte Akkumulation in Gesamtzelllysaten ermitteln.

Analysiert wurden Lysate aus L428- und HT080-Zellen 72 Stunden nach der Transfektion mit CT45-siRNA und Kontroll-scrRNA (Abbildung 43). Die verringerte Abundanz von CT45, sowie die CT45-induzierte Herunterregulation von Syncrip, wurden nachgewiesen (Abbildung 43B). Beobachtet wurde zudem, dass CT45 die Anreicherung von Cdc42-, N-WASP- und Arp2 nicht verändert (Abbildung 43A). Interessanterweise war nach CT45-Herunterregulation eine verstärkte Abundanz von RhoA, vor allem in HT1080-Zellen, zu detektieren (Abbildung

43A). Auch eine gesteigerte Phosphorylierung von Cofilin am Ser-3 konnte vor allem in HT1080-Zellen gezeigt werden. β -Aktin wurde als Beladungskontrolle gefärbt. Dieser Effekt war in L428-Zellen nicht detektierbar.

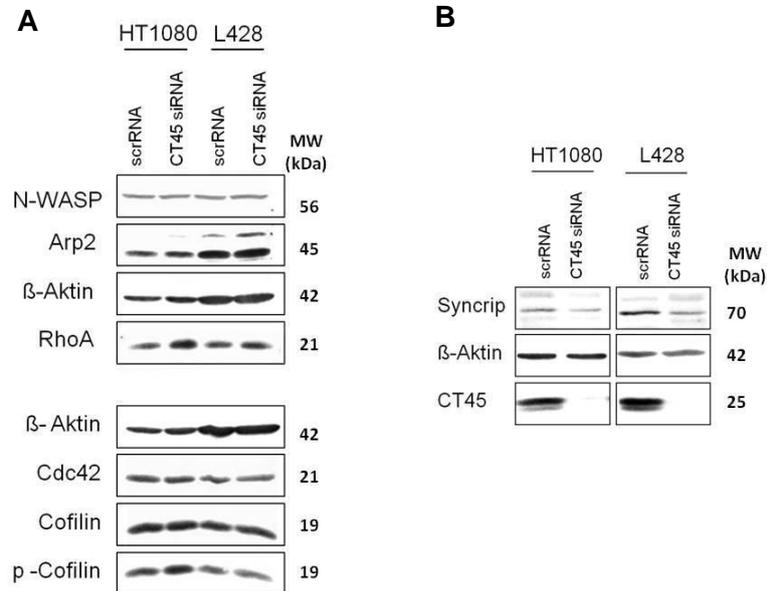


Abbildung 43: CT45 induziert eine Anreicherung von RhoA und die Phosphorylierung von Cofilin (Ser-3) in HT1080-Zellen. HT1080- und L428-Zellen wurden mit CT45-siRNA und Kontroll-scrRNA transfiziert. 72 Stunden nach Transfektion wurden Zelllysate angefertigt und über das Western Blot-Verfahren analysiert. **A:** Die Herunterregulation von CT45 war detektierbar. Zudem wurde Syncrin negativ reguliert. **B:** Es konnte eine verstärkte Akkumulation von RhoA in L428- und HT1080-Zellen sowie eine Zunahme der Phosphorylierung von Cofilin (Ser-3) in HT1080-Zellen nach CT45-Herunterregulation detektiert werden. Die Proteinmengen von Cdc42, N-WASP und Arp2 wurden nicht beeinflusst.

Die publizierten Daten (Chen et al., 2012; Xing et al., 2012) sind somit weitestgehend auf humane Fibroblasten übertragbar. Diese ersten Experimente müssen über weiterführende Versuche näher charakterisiert und bestätigt werden. So könnten neue Erkenntnisse zur Erklärung des CT45-induzierten Effekts auf die Zellmigration und Invasion erlangt werden.

5. Diskussion

CT45 ist als CT-X-Antigen klassifiziert. Entscheidendes Kriterium dieser Proteine ist neben der X-chromosomalen Lokalisation eine Genexpression in den prä-meiotischen Keimzellen des Hodens und der Placenta. Postuliert wird, dass die Genexpression über entwicklungsbedingte DNA-Demethylierungen induziert wird. Interessantes Merkmal der CT-X-Antigene ist die abweichende Akkumulation in verschiedenen Tumorentitäten, die vermutlich aus einer genomweiten Hypomethylierung in den entarteten Geweben resultiert. CT45 wird verstärkt in Hodgkin´s-Lymphomen, Seminomen und multiplen Myelomen, aber auch in anderen Tumorentitäten angereichert. Die während verschiedener Differenzierungsstadien einsetzende Genexpression der CT-X-Antigene in den immunprivilegierten Regionen der Testis und der Placenta hat zur Folge, dass das Immunsystem keine eigene Toleranz gegen diese Proteine aufbauen kann. Die CT-X-Antigene wurden daher ursprünglich als Basis für eine gezielte Tumor-Immuntherapie gesehen. Allerdings werden bis dato nur Vakzine gegen zwei Mitglieder, NY-ESO-1 und MAGE-A1, in klinischen Studien untersucht. In bisherigen Studien konnten keine CT45-spezifischen Antikörper in Patienten detektiert werden. CT45 ist ein nukleär lokalisiertes Protein, das in den *Nuclear Speckles* akkumuliert. In publizierten Studien konnte ein Zusammenhang zwischen der CT45-Akkumulation und der Schwere des Krankheitsverlaufs in Patienten mit Hodgkin´s-Lymphom, sowie eine Korrelation mit der Lebenserwartung in Patienten mit multiplen Myelom, detektiert werden. Aus diesem Zusammenhang ergab sich für uns die Frage, ob und wenn ja welche biologische Funktion die Anreicherung von CT45 in Tumorzelllinien haben kann.

5.1 Der CT45-Minimalpromotor

Die Charakterisierung des CT45-Minimalpromotors sollte einerseits klären, ob die heterogene CT45-Genexpression in den verschiedenen Tumorentitäten auf der Fehlregulation verschiedener Transkriptionsfaktoren beruht. Andererseits sollte eine Identifizierung spezifischer CT45-induzierender Faktoren Hinweise auf die Einordnung in verschiedene Signalwege und somit die Zuordnung einer biologischen Funktion ermöglichen. Über die durchgeführte Promotoranalyse (Abschnitt 4.1) konnte der CT45-Minimalpromotor eingegrenzt werden. Für die Reporter-gen-Analyse wurde das Gen der Isoform CT45-A2 (NG_021269.1) verwendet, da nur diese Sequenz über die Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) verfügbar war. Da der Transkriptionsstart von CT45-A2 nicht bekannt war, sollte dieser im Rahmen meiner Arbeit definiert werden. Allerdings führten die

beiden verwendeten Methoden, die 5'-RACE-PCR und die Splinkerette-PCR, nicht zu dem erhofften Ergebnis. Daher wurde für die Reporter-gen-Analysen eine bereits in vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe um Dr. Heidebrecht verwendete Sequenz als Transkriptionsstart verwendet (Diplomarbeit N. Sellami). Die durchgeführten Experimente zeigten, dass sich der entscheidende Kernpromotorbereich zur Expression des CT45-A2-Gens in der Region von +54 bis +114 bzw. +176 stromaufwärts des Transkriptionsstarts (TSS) befindet. Dieser Bereich liegt außerhalb des normalerweise als Kernpromotorsequenz postulierten Sequenzabschnitts um den TSS (Smale et al., 2003; Juven-Gershon et al., 2008; Yang et al., 2007). Der Kernpromotor ist demnach von 40 bp stromabwärts bis 40 bp stromaufwärts des TSS lokalisiert. Häufige initiale Transkriptionsfaktor-bindende Elemente in diesem Bereich sind neben einer TATA-Box, ein BRE (GC-Box; TF [Transkriptionsfaktor] IIB Erkennungsmotiv)-, ein Initiator (Inr)- und ein DPE (*downstream core promotor element*)-Motiv (Smale et al., 2003; Juven-Gershon et al., 2008; Yang et al., 2007). In dem Bereich um den Transkriptionsstart von CT45-A2 konnten die Sequenzen für eine GC-Box (BRE) und ein Inr-Element identifiziert werden (Abbildung 5). Eine TATA-Box wurde 500 bp vor dem Transkriptionsstart detektiert. Die Ergebnisse aus der Reporter-gen-Analyse signalisierten allerdings, dass diese TATA-Box für die Transkription von CT45-A2 keine Bedeutung hat. Hinzu kommt die Erkenntnis, dass das Inr-Element keinen verstärkenden Effekt auf die Expression des Reportergens hat.

In zahlreichen Publikationen wird beschrieben, dass eukaryontische Promotoren auch ohne die erwähnten Elemente eine Transkription induzieren können (Smale et al., 2003; Juven-Gershon et al., 2008; Yang et al., 2007). Die Arbeitsgruppe um Yang (2007) ermittelte aus zahlreichen Datenbank-Analysen, dass TATA-Box-freie Gene signifikant häufiger von CpG-Inseln durchzogen werden. Eine Regulation über epigenetische Methylierungsreaktionen wird gestützt. Dies korreliert mit der Tatsache, dass CT-Antigene allgemein über eine Promotor-Demethylierung reguliert werden. Yang und Kollegen (2007) analysierten zudem, dass Promotoren ohne die regulären Promotormotive vor allem Gene regulieren, die basale zelluläre Prozesse wie Transport, Zellwachstum und den Protein-Metabolismus aufrechterhalten. Ob CT45 an einem dieser Prozesse mitwirkt, ist unklar. Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass CT45-A2 über einen alternativen Minimalpromotor verfügt. Dieser kann mit der Genexpression der CT-Antigene über eine globale Promotor-Demethylierung erklärt werden. Die Veränderung des Methylierungsmusters verschiedener CpG-Inseln innerhalb der Promotorregion ermöglicht die Bindung spezifischer Transkriptionsfaktoren, die eine Genexpression aktivieren können (R. Chatterjee und C. Vinson, 2012). Hierzu gehören beispielsweise die Faktoren c-Myc, AP-2, E2F, GATA, Lyf-1,

STAT-1 (Tate P.H. and A.P. Bird, 1993; Zhu et al., 2007; Uhm et al., 2012; Chang et al., 2012). Die gewebespezifische Akkumulation der so regulierten Proteine wird durch die Inhibition einer erneuten Methylierung garantiert. Beobachtet wurde z.B., dass Sp1-Erkennungssequenzen in der hypomethylierten Promotorregion des murinen Gens *aprt* (Adenin-Phosphoribosyltransferase) über die Bindung eines *Trans-Acting Factors* blockiert werden (Macleod et al., 1994). Der demethylierte Status bleibt dementsprechend auch bei Inaktivierung der Genexpression erhalten. Die methylierungsabhängige Genaktivierung scheint allerdings nicht nur auf Transkriptionsfaktoren, sondern auch auf Veränderungen in der Chromatinstruktur zurückzuführen zu sein (Rountree et al., 2001). Dass die Demethylierung einer CpG-Insel im CT45-Promotorbereich wichtig für die Transkription ist, wurde bereits in der Diplomarbeit von N. Sellami analysiert. Die angesprochene CpG-Insel ist in dem Konstrukt +54/+114 lokalisiert. Meine Ergebnisse zeigen, dass dieser Bereich einen schwachen Effekt auf die Genexpression des Reportergens haben kann. Wird der 5'-terminale Bereich auf +176 bp erweitert, wird eine starke Expression des Reportergens induziert. Dies unterstützt die Vermutung, dass nicht ein einzelner Transkriptionsfaktor für die Induktion der Genexpression entscheidend ist. Eventuell wird die DNA durch eine veränderte Chromatinstruktur markiert und aktiviert, so dass eine Bindung mehrerer Faktoren induziert wird (Rountree et al., 2001). Hier scheint der Bereich bis 176 bp stromaufwärts wichtig zu sein. In diesem Bereich befinden sich potentielle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Lyf-1, STAT-x, GATA-x und MZF1. Lyf-1, STAT-x und GATA-x. Diese Proteine binden im Bereich demethylierter CpG-Inseln, welches wiederum ein Hinweis auf eine methylierungsabhängige Genexpression ist.

Die genannten Transkriptionsfaktoren regulieren entscheidende zelluläre Prozesse und können bei einer Fehlregulation Tumorerkrankungen induzieren. Die STAT (*signal transducers and activators of transcription*)-Familie besteht aus sieben Mitgliedern und reguliert über den JAK/STAT-Signalweg die Transkription verschiedener Gene, die an nahezu allen zellulären Prozessen wie Entwicklung, Homeostase, Hämatopoese, Immunzellentwicklung, Wachstum und Apoptose beteiligt sind (Harrison, 2012). Die Mitglieder der GATA (*GATA binding factor 1-6*)-Familie regulieren vorrangig die Spezifizierung und Differenzierung von verschiedenen Organen, aber auch Proliferation und Zellüberleben (Zheng und Blobel, 2011). Lyf-1 (*lymphoid transcription factor 1*) reguliert nahezu ausschließlich die hämatopoetische Differenzierung über eine Genaktivierung, die auf einem Umbau der Chromatinstruktur beruht (Payne und Dovat, 2011). Der letzte in der analysierten Sequenz potenziell bindende Transkriptionsfaktor ist MZF1 (*myeloid zinc finger 1*). MZF1 spielt eine Rolle für die Proliferation und Differenzierung, aber auch für die

Zellmigration und Invasion (Mudduluru et al., 2010). Für MZF1 wurden bisher keine Daten zu einer methylierungsabhängigen DNA-Bindung publiziert.

Für erste weiterführende Untersuchungen war Lyf-1 interessant, da dieser Transkriptionsfaktor ein relativ eng gefasstes Wirkungsspektrum für die Zelldifferenzierung hat. Postuliert wird, dass CT-Antigene vermutlich eine Funktion in diesem Kontext haben (Simpson et al., 2006; Xiao et al., 2004). Zudem wurde publiziert, dass GATA-1 und Lyf-1 wechselwirken und zusammen mit einem dritten Faktor die Genexpression in Richtung Erythropoese lenken können (Ross et al., 2012). Dies ist insofern interessant, da auch Faktoren der GATA-Familie in dem analysierten Bereich binden können. Die Regulation ist den Autoren zur Folge abhängig von Lyf-1. In Lyf-1-defizienten Mäusen wird der Mechanismus aufgehoben, so dass die erythroide Differenzierung blockiert wird. Viele Tumorerkrankungen, wie beispielsweise die häufig CT45-positiven Hodgkin's-Lymphome oder multiplen Myelome, sind durch eine Fehldifferenzierung charakterisiert. Somit sollte der Effekt dieses Transkriptionsfaktors auf die CT45-Genexpression über RNA-Interferenz basierte Experimente untersucht werden. Es ist allerdings nicht gelungen, Lyf-1 über diese Methode oder den Einsatz publizierter Inhibitoren herunterzuregulieren (He et al., 2011). Daher können zum jetzigen Zeitpunkt keine Aussagen über die Rolle von Lyf-1 auf die CT45-Genexpression getroffen werden. Zudem sind weitere Untersuchungen, die die Bindung der angesprochenen Transkriptionsfaktoren an die analysierte Sequenz bestätigen, essentiell.

Die Erweiterung der Konstrukte im 5'-terminalen Bereich um die GC-Box (-61 bp) hatte einen eindeutigen verstärkenden Effekt auf die Expression des Reportergens. Die GC-Box interagiert häufig mit Transkriptionsfaktoren (beispielsweise mit denen der Sp-Familie), die einen positiven Effekt auf die Transkription haben. So ist für die Cdk5 (Cyclin-dependent kinase 5)-Genexpression in Neuronen eine GC-Box 17 bp vor dem TSS ausschlaggebend (Ross et al., 2002).

Weiterhin ist unklar, ob der diskutierte Bereich zwischen +54 und +176 bp alleine für die Transkription von CT45 entscheidend ist. Längere 5'-terminale Konstrukte, ab -106 bp, induzieren ebenfalls eine Promotoraktivität ohne den angesprochenen stromaufwärts gelegenen Bereich (+54/+176 bp). Eine Erklärung könnte sein, dass Bereiche der nicht-kodierenden DNA außer den Promotoren weitere cis-regulative Elemente wie *Enhancer*, *Silencer* und *Insulators* besitzen, die an der Kontrolle der Genexpression beteiligt sein können. *Enhancer* wirken positiv auf die Genexpression, während die *Silencer* eine negative regulatorische Funktion haben. *Insulators* blockieren die Bindung zwischen Promoter und

Enhancer bzw. *Silencer* (Bushey et al., 2011). Das genaue Zusammenspiel dieser Sequenzen ist zum größten Teil noch nicht im Detail verstanden. Zur Erklärung des verstärkenden Effekts auf die Reportergenaktivität stehen die *Enhancer*-Sequenzen im Vordergrund. Diese Sequenzen binden eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, die eine Genexpression induzieren oder verstärken können (Fulai et al., 2011).

Dass der Sequenzabschnitt zwischen +54 und +176 ausschlaggebend für die Transkription von CT45-A2 zu sein scheint, ist damit zu erklären, dass nur nach Depletion dieses Bereichs eine komplette Hemmung der Genexpression erreicht wurde. Es sind allerdings weitere Versuche notwendig, um dieses Ergebnis zu verifizieren. Allerdings ist die mehrfach erwähnte demethylierte CpG-Insel von wichtiger Bedeutung für die CT45-Genexpression.

5.2 CT45-Akkumulation in verschiedenen Tumorzelllinien

Im Rahmen meiner Arbeit wurden Tumorzelllinien unterschiedlichen Ursprungs auf die Akkumulation von CT45 untersucht. Aus der Literatur waren verschiedene CT45-positive Tumorentitäten bekannt. Die Arbeitsgruppen um Chen (2010) und Heidebrecht (2006) beschrieben, dass ein hoher Prozentsatz (58-60 %) der Hodgkin's-Lymphome (HL) CT45 positiv ist. Kennzeichnend für das Hodgkin's-Lymphom sind die mehrkernigen Reed-Sternberg-Zellen (RS-Zellen). Diese Zellen stammen von B-Lymphozyten aus den lymphozytären Keimzentren ab und teilen sich unkontrolliert und monoklonal. Der Tumor besteht nur zu einem geringen Anteil aus diesen Zellen (1-5 %) (Cossmann et al., 2012). Die RS-Zellen liegen eingebettet in einer Vielzahl nicht maligner Zellen. Von den vier untersuchten HL-Zelllinien waren zwei (L428 und L540) zu nahezu 100 % CT45-positiv. Die Zelllinie L428 entspricht in allen Eigenschaften weitestgehend einer malignen Hodgkin's RS-Zelle (Kirchner et al., 1983), während L540-Zellen sich in einigen Kriterien davon abgrenzen (Diehl et al., 1984). UHO-1- und KM-H2-Zellen weisen nur zu einem geringen Prozentsatz, ca. einem Prozent aller Zellen, eine CT45-Akkumulation auf. Auch diese Zelllinien entstammen RS-Zellen und teilen die typischen Merkmale mit der ursprünglichen malignen Zelle (Kamesaki et al., 1986, Mader et al., 2007).

Andere Lymphome, hervorgehend aus Vorläufer-B- oder -T-Zellen oder aus reifen B- oder T-Zellen werden als *non*-Hodgkin's-Lymphome (NHL) zusammengefasst. CT45 konnte in einer Studie von Chen und Kollegen (2010) ausschließlich in einem reifen B-Zell-Lymphom, dem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom (22 % der untersuchten Fälle positiv), detektiert werden. Allerdings liegen keine Studien zu allen genannten Klassifizierungen vor. Die aus NHL-Patienten generierten Zelllinien Ca46, DG75 und DAUDI wurden ursprünglich als

Burkitt-Lymphom klassifiziert. Dieses Lymphom ist charakterisiert durch eine Dysregulation des *MYC*-Onkogens und damit einhergehender starker Proliferation der reifen B-Lymphozyten (Bertrand et al., 2007). Die Zelllinien KARPAS-422 und GRANTA 519 entstammen ebenfalls Patienten mit reifen B-Zell-Lymphomen. KARPAS-422-Zellen sind klassifiziert als diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom und GRANTA 519 als Mantelzell-Lymphom. Das Mantelzell-Lymphom ist charakterisiert durch eine Fehlregulation von Cyclin D1 und damit des Zellzyklus (Klier, 2008). Es kommt zur uneingeschränkten Proliferation. Keine der beschriebenen NHL-Zelllinien war CT45-positiv. Dies unterstützt die bereits publizierten Befunde, wonach eine CT45-Akkumulation zu einem hohen Prozentsatz im Wesentlichen nur in HL auftritt.

Eine weitere häufig CT45-positive Krebserkrankung ist das multiple Myelom mit etwa 40 % Positivität. Die malignen Plasmazellen unterliegen einer klonalen Teilung im Knochenmark und produzieren eine große Menge monoklonaler Antikörper. Es wurde beschrieben, dass CT45-positiv multiple Myelome in den Patienten zu einem signifikant schweren Krankheitsverlauf führen (Andrade et al., 2008). Auch die von mir untersuchte Zelllinie U266 BL war CT45-positiv.

Desweiteren wurden folgende Zelllinien aus soliden Tumoren unterschiedlichen Ursprungs auf eine CT45-Akkumulation untersucht: PC-3 (Prostatakarzinom), HT-29 (Kolonkarzinom), HeLa (Cervixkarzinom) und HT1080 (Fibrosarkom). Von diesen Zellen war nur die Zelllinie HT1080 CT45-positiv. Eine CT45-Genexpressionsstudie an humanen soliden Karzinomen deutete ebenfalls an, dass nur ein geringer Prozentsatz dieser Tumore CT45 anreichert. Chen und Kollegen konnten in einer Mikroarray-basierten Studie auf mRNA-Ebene nachgewiesen, dass 37 % der getesteten Eierstock-, 13 % der Lungen- und 5 % der Brust-Karzinome CT45-positiv sind. Von Schrader und Kollegen wurde charakterisiert, dass CT45 in 11 % der untersuchten Kolonkarzinome angereichert wird. Zudem wurde ein sehr heterogenes Verteilungsmuster innerhalb des Tumors detektiert, wobei häufig nur wenige Zellen des untersuchten Gewebes CT45 akkumulierten (Daten Schrader, unveröffentlicht).

Die untersuchte embryonale Nierenzelllinie HEK293 war ebenfalls CT45-negativ. Auch in den aus gesunden Spendern gewonnenen PHA-Blasten und der immortalisierten T-Lymphozytenlinie Jurkat (Je 6.1) war keine CT45-Akkumulation detektierbar. Die analysierten Daten zeigten, dass CT45 nicht in Zelllinien angereichert wird, die aus gesundem Gewebe generiert wurden. Auch in veröffentlichten Studien analysiertes,

gesundes Gewebe zeigte keine CT45-Akkumulation, mit Ausnahme der prä-meiotischen Keimzellen (Chen et al., 2009; 2011).

Rudolph und Kollegen (1999) publizierten eine Studie, die belegt, dass CT45 in Seminomen angereichert wird, die sich aus unreifem testikularem Keimzellgewebe entwickelten. Tumore, die sich aus den im Hoden lokalisierten differenzierten Leydig- oder Sertoli-Zellen entwickeln, waren dagegen CT45-negativ (Rudolph et al., 1999). Dies deutet auf eine entwicklungsregulierte CT45-Genexpression hin. In diesem Kontext wäre zu analysieren, ob und in welchem Differenzierungsstadium humane embryonale Stammzellen (hES) CT45 anreichern. Die Theorie geht dahin, dass frühe hES zunächst insgesamt keine CT-Antigen-Gene exprimieren. Im Laufe der Differenzierung, nach Beendigung des Stammzellstadiums, wird die Genexpression verschiedener CT-Antigene, vor allem in den prä-meiotischen Keimzellgeweben, induziert (Chen et al., 2011). In Rahmen meiner Arbeit sollten erste Experimente mit der hES Linie H9 (Thomson et al., 1998) und einer aus Lungengewebe induzierten pluripotenten Zelllinie (RC 2-100-3; Somers et al., 2010) erfolgen, um die Genexpression von CT45 im Laufe der Zelldifferenzierung zu charakterisieren. Die Experimente sind bis dato nicht abgeschlossen. Erste Ergebnisse deuten allerdings darauf hin, dass CT45 in der pluripotenten Zelle und in Stadien der H9-Zelle auf mRNA-Ebene akkumuliert. Weiterführende Kenntnisse zu den CT45-positiven Differenzierungsstadien könnten Informationen zur möglichen Funktion von CT45 in der Entwicklung liefern.

5.3 Funktionelle Charakterisierung von CT45

5.3.1 Zellproliferation

Eine Dysregulation der Zellproliferation ist ein häufiges Merkmal von Tumorzellen. Verschiedene CT-Antigene, wie beispielsweise Piwil2, inhibieren die Apoptose und induzieren eine gesteigerte Zellproliferation (Lee et al., 2006; Cheng et al., 2011). Piwil2 fungiert als Onkogen und vermittelt eine gesteigerte Akkumulation von Bcl-X_L und Cyclin D. Damit wird ein positiver Effekt auf die Proliferationsrate über Aktivierung des STAT3/Bcl-X_L- und STAT3/Cyclin D-Signalwegs induziert (Lee et al., 2006). Es stellte sich die Frage, ob CT45 einen Effekt auf die Proliferation oder den Zellzyklus hat. Über verschiedene methodische Ansätze konnte allerdings eindeutig nachgewiesen werden, dass CT45 weder einen Einfluss auf die Zellviabilität, noch auf die Proliferation oder den Zellzyklus hat. Auch die Akkumulation des Proliferationsmarkers repp86 war nicht verändert. CT45 vermittelt in Tumorzellen demnach keine erhöhte Aggressivität aufgrund höherer Zellteilungsrate.

5.3.2 Kernproteine als Interaktionspartner

Über verschiedene Ansätze konnte verdeutlicht werden, dass CT45 mit verschiedenen Kernproteinen interagiert und kolokalisiert. Im Folgenden wird die Interaktion mit den einzelnen Proteinen diskutiert.

Nukleophosmin

CT45 interagiert mit NPM und kolokalisiert mit pNPM in den *Nuclear Speckles*. NPM wird ubiquitär exprimiert und ist nicht nur im Zellkern angereichert, sondern transloziert Zellzyklus-abhängig als Transportprotein zwischen Nukleus und Zytoplasma. Funktionell ist NPM involviert in die Regulation der Ribosomen-Biogenese, der Zentrosomen-Duplikation, der DNA-Reparatur sowie der Reaktion auf zellulären Stress (Borer et al., 1989, Colombo et al., 2011). In verschiedenen malignen Erkrankungen konnte eine Fehlregulation detektiert werden, so dass eine Funktion als Onkogen oder Tumorsuppressor diskutiert wird (Falini et al., 2007; Colombo et al., 2011). Die zahlreichen Funktionen und die Dysregulation in verschiedenen malignen Erkrankungen macht dieses Protein zu einem interessanten Interaktionspartner. Die Funktion und auch die Lokalisation von NPM wird hauptsächlich über die Phosphorylierung von verschiedenen Kinasen reguliert. In einer Publikation von Tapapore und Kollegen (2006) wird beschrieben, dass NPM von dem Kinasekomplex CDK (*cyclin-dependent kinase*) 2/Cyclin E Zellzyklus-abhängig am Threonin 199 phosphoryliert wird. Diese posttranslationale Modifikation führt zur Akkumulation von pNPM in den *Nuclear Speckles* und zu einer erhöhten RNA-Bindeaffinität.

Da die negative Regulation von CT45 keinen Effekt auf die Phosphorylierung von NPM hatte, wäre eine funktionelle Relevanz der Interaktion nur über die Lokalisation in dem gleichen Kernkompartiment zu erklären. Die *Nuclear Speckles* sind angereichert mit Spleißfaktoren, wie snRNPs (*small nuclear Ribonucleoprotein particles*) und regulieren die Prozessierung von prä-mRNA sowie den mRNA-Export. Die Arbeitsgruppe um Tapapore (2006) konnte zeigen, dass die Lokalisation von pNPM in den *Nuclear Speckles* das Spleißen von prä-mRNA negativ reguliert. Möglicherweise beeinflusst die Interaktion mit CT45 diesen Prozess und den Export spezifischer mRNAs, so dass eine veränderte Translation bestimmter Proteine resultiert.

Analysierte Immunfluoreszenz-Färbungen deuteten eine abweichende zytoplasmatische NPM-Verteilung in CT45-regulierten Zellen an. Interessanterweise wurde in einer Veröffentlichung von Wang und Kollegen (2010) ein NPM-vermittelter Effekt auf die Stabilität des Mikrotubuli-Gerüsts publiziert. Zytoplasmatisch lokalisiertes NPM interagiert demnach

zellzyklusunabhängig mit dem Mikrotubuli-assoziierten Motorprotein Eg5 (Kinesin 5). Dies inhibiert den Eg5-vermittelten Mikrotubuliabbau durch Inaktivierung der Eg5 ATPase-Aktivität (Gardner et al., 2008; Wang et al., 2010). Vorstellbar wäre daher, dass die nach CT45-Herunterregulation resultierende veränderte Verteilung von NPM im Zytoplasma, die Interaktion mit Eg5 beeinflusst. Die Arbeitsgruppe um Wang (2010) konnte über einen *in vivo polymerized Tubulin-Assay* zeigen, dass sich das Verhältnis zwischen polymerisiertem und monomerem Tubulin (löslich) durch die Interaktion zwischen NPM und Eg5 in Richtung der polymerisierten Form verschiebt. Die negative Regulation von CT45 hatte keinen Einfluss auf die Tubulin-Polymerisation, so dass die aufgestellte Hypothese widerlegt werden konnte. *In situ*-Untersuchungen zeigten, dass Eg5 in den *Nuclear Speckles* lokalisiert ist und mit CT45 überlagert. Wahrscheinlich wurde eine indirekte Interaktion über NPM vermittelt, da Eg5 nicht mit CT45 kopräzipitiert werden konnte.

Aus der Literatur ist ein weiterer Mechanismus bekannt, für den die zytoplasmatische Lokalisation von NPM an der Plasmamembran essentiell ist. Es wurde publiziert, dass NPM an der inneren Zellmembran Nanocluster mit aktiviertem GTP-K-Ras (*rat sarcoma*) bildet und diese stabilisiert (Inder et al., 2009). Folge ist eine starke Aktivierung der MAPK (*mitogen-activated protein Kinase*)-Signalkaskade. Ras-Proteine bilden molekulare „Schalter“ an der Innenseite der Zellmembran, die die Weiterleitung extrazellulärer Signale über die phosphorylierungsabhängige Aktivierung verschiedener Kaskaden in das Zellinnere kontrollieren (Downward, 2003). Die Arbeitsgruppe um Inder (2009) konnte die NPM-vermittelte Aktivierung der Signalkaskade über eine gesteigerte Phosphorylierung von ERK (*extracellular signal-regulated kinases*) 1/2 zeigen. Die Aktivierung von ERK wurde im Western Blot nach negativer Regulation von CT45 untersucht. Es konnte kein Effekt analysiert werden (Ergebnisse nicht gezeigt), so dass die CT45-vermittelte Veränderung der NPM-Verteilung auch für diesen Mechanismus unwesentlich ist.

Aufgrund der dargestellten Zusammenhänge gehe ich davon aus, dass CT45 und NPM in den *Nuclear Speckles* wechselwirken und so ein funktioneller Komplex entsteht. Ob eine Konsequenz für das Spleißen oder die Translation eines oder einiger Proteine resultiert, wurde nicht analysiert.

SFPQ und NONO

CT45 interagiert und kolokalisiert mit SFPQ im Zellkern, so dass eine physiologische Relevanz dieser Wechselwirkung denkbar ist. SFPQ ist eine Komponente des Spleißosomen-Komplex C, aber auch ein Transkriptionsfaktor und essentiell für die DNA-

Reparatur sowie für die Interaktion zwischen Schwester-Chromatiden (Bennett et al., 1992; Gozani et al., 1994; Changanamkandath et al., 2011). Die Lokalisation von SFPQ im Zellkern ist sehr variabel, so dass SFPQ an der Kernmatrix, aber auch diffus im Nukleoplasma oder an distinkten Punkten im Zellkern (Nukleoli, *Paraspeckles* oder *Nuclear Speckles*) detektiert werden kann (Shav-Tal et al., 2001). Welche der beschriebenen Funktionen SFPQ einnimmt, hängt vermutlich von der jeweiligen Lokalisation im Zellkern ab (Shav-Tal et al., 2001).

Nach CT45-Herunterregulation zeigte sich, dass SFPQ in einer Vielzahl der Zellen an die Kernmembran transloziert. Die Proteinmenge war unverändert. Eine Reorganisation von SFPQ ist bereits von Shav-Tal und Kollegen (2001) beschrieben worden. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass sich die Verteilung von SFPQ während der Differenzierung myeloider Zellen verändert, die Proteinmenge aber erhalten bleibt (Shav-Tal et al., 2001). Die Autoren vermuteten, dass die Reorientierung von Spleißfaktoren mit einem veränderten Transkriptionsstatus und einer veränderten Chromatin-Struktur während der Differenzierung einhergeht. Ob diese Regulation auf die HT1080-Zellen nach CT45-Herunterregulation zutrifft, ist unklar. CT45 und andere CT-Antigene werden während der Keimzellentwicklung in definierten Differenzierungsstadien angereichert. In der Publikation wird erwähnt, dass auch während der Spermatogenese Wechsel innerhalb der Kernstrukturen von Spermatozyten, einhergehend mit einer veränderten Transkriptionsmaschinerie, auftreten (Shav-Tal et al., 2001). Hypothetisch vorstellbar wäre daher, dass Zellen ohne CT45 einen anderen Entwicklungsstatus einnehmen und somit das Transkriptions- und Chromatin-Muster verändert wird, welches zu einer Reorganisation von SFPQ führt.

CT45 interagiert ebenfalls mit NONO und eine Koloalisation mit GFP-NONO wurde an einigen distinkten Punkten im Zellkern visualisiert. NONO wird vor allem als Komponente der *Paraspeckles* beschrieben (Fox et al., 2010). Wie schon in der Einleitung erwähnt, unterliegen die verschiedenen Kernkompartimente einem dynamischen Gleichgewicht (Yuntao et al., 2011). Die permanente Wechselwirkung zwischen den einzelnen Strukturen sorgt für eine fehlerlose Genexpression. Veröffentlicht wurde zudem, dass *Paraspeckles* häufig zwischen Chromatin und *Nuclear Speckles* angereichert sind (Fox et al., 2010). Die auf einzelne Punkte im Kern konzentrierte Koloalisation zwischen NONO und CT45 entspricht diesem Muster. In den *Paraspeckles* kann Doppelstrang (ds)-RNA gespeichert werden. Im Anschluss steht häufig eine RNA-Retention oder ein A (Adenosin)-I (Inosin)-Editing, welches zu einem veränderten Spleißen, anderen RNA-Sekundärstrukturen oder zur Inhibition der miRNA- oder siRNA-Prozessierung führen kann (Fox et al., 2010). NONO hat eine erhöhte Affinität zur RNA, eine Funktion während des Spleißens wurde bisher nicht

nachgewiesen. Zudem wurde eine Interaktion zwischen NONO und DNA bzw. Transkriptionsfaktoren beschrieben, die die Genexpression beeinflussen kann (Shay et al., 2002). Die Bedeutung der Interaktion zwischen NONO und CT45 konnte hier nicht geklärt werden. CT45 hat keinen Einfluss auf die zelluläre Verteilung und die Anreicherung von NONO. Die vielfältigen Funktionen von NONO machen Schlussfolgerungen schwierig. Zudem existieren momentan keine Publikationen, die die Überlagerung zwischen *Paraspeckles* und *Nuclear Speckles* näher charakterisieren. Vorstellbar wäre, dass zunächst die eng mit der Genexpression in Beziehung stehenden *Nuclear Speckles* zur weiteren Prozessierung mit den transkribierten prä-mRNA's interagieren. Durch eine Wechselwirkung mit den *Paraspeckles* könnte es in diesem Zusammenhang zum Austausch von RNA kommen, die zur Retention oder zum A-I-Editing bestimmt ist.

SFPQ und NONO bilden zudem Heterodimere. Der Proteinkomplex aus SFPQ und NONO bindet nicht nur RNA, sondern auch doppelsträngige und einzelsträngige DNA und fungiert in diesem Zusammenhang als DNA-Reparaturkomplex (Li et al., 2009). Außerdem scheinen SFPQ und NONO die Transkriptionsregulation einiger Proteine zu beeinflussen und so die Tumorgenese voranzutreiben (Shav-Tal und Zipori, 2002). Ob CT45 mit beiden Proteinen eine direkte Interaktion eingeht, konnte über die durchgeführten Versuche nicht abschließend geklärt werden. Da beide Proteine *in situ* mit CT45 kolokalisieren, scheint eine direkte Wechselwirkung denkbar.

Ku80

Ein weiterer Interaktionspartner von CT45 ist Ku80. Ku80, ist zusammen mit Ku70, eine Teil des Proteins Ku. Ursprünglich ist dieses Heterodimer als Antigen in Patienten mit einer Autoimmunkrankheit (analysiert über eine Immundiffusion nach Ouchterlony) identifiziert worden (Mimori et al. 1981). Ku ist involviert in die Regulation zahlreicher nukleärer Prozesse wie der DNA-Reparatur, der Aufrechterhaltung, der Chromosomen-Vollständigkeit und dem Zell-Überleben (Jin et al., 1993; Hsu et al., 1999; Espejel et al., 2002; Gullo et al., 2006). Bei einer Fehlregulation dieses Heterodimers wird eine genomische Instabilität und folglich die Tumorgenese induziert (Wang et al., 2008).

Über *in situ*-Experimente konnte gezeigt werden, dass Ku80 hauptsächlich in den Nukleoli akkumuliert. Laut Literatur soll Ku80 vorrangig an transkriptionell aktiven Regionen im Zellkern lokalisiert sein (Yaneva et al., 1991; Koike et al., 1999). Yaneva und Kollegen (1991) publizierten, dass das Ku-Protein Zellzyklus-abhängig diffus in das Nukleoplasma transloziert. Diese Umverteilung wurde von einer weiteren Arbeitsgruppe beschrieben. Ku80

wandert demnach während der späten S- bzw. G₂-Phase in die Nukleoli. In der G₁/S-Phase befindet es sich nahezu ausschließlich im Nukleoplasma (Li & Yeh, 1992). In vielen HT1080-Zellen wurde Ku80 nach CT45-Herunterregulation verstärkt im Nukleoplasma detektiert. Ob dieser Effekt auf die jeweilige Zellzyklusphase und nicht CT45-induziert stattfindet, ist im Rahmen meiner Arbeit nicht untersucht worden.

Die genaue Lokalisation von Ku80 außerhalb der Nukleoli ist nur teilweise bekannt. Literaturdaten belegen, dass Ku80 mit der RNA-Polymerase II interagiert, was in einer veränderten Genexpression resultiert (Mo & Dynan, 2002). Die Gruppe um Mo und Dynan (2002) zeigte, dass es in Folge einer Transkriptionseinhibition über den Inhibitor α -Amanitin zur Anreicherung von Ku80 und RNA-Polymerase II in den *Nuclear Speckles* kommt. Die Akkumulation von RNA-Polymerase II in *den Nuclear Speckles* wurde vor allem während Zellzyklusphasen mit geringer Transkriptionsrate, der frühen G₁- oder späten G₂-Phase, analysiert (Zheng et al., 1997). Die Arbeitsgruppe um Zheng (1997) vermutet, dass die *Nuclear Speckles* vor allem der „Lagerung“ und dem „Recycling“ verschiedener Faktoren für die mRNA-Biogenese dienen. Ob die Interaktion zwischen CT45 und Ku80 in diesem Zusammenhang in einem funktionellen Kontext steht, bleibt durch weitere Untersuchungen zu klären.

DDX56

Zwischen CT45 und DDX56 konnte eine schwache Wechselwirkung *ex situ* detektiert werden, die aufgrund ungeeigneter Antikörper nicht durch eine Kolo-kalisation bestätigt werden konnte. DDX56 enthält eine *DExD/H-Box*-Domäne und kann daher in die Gruppe der ATP-abhängigen RNA-Helikasen eingeordnet werden (Zirwes et al., 2000). RNA-Helikasen sind involviert in die Regulation des RNA-Metabolismus. DDX56 ist in den Nukleoli lokalisiert und an dem Aufbau der 18S- und 28S-ribosomalen (r) RNA beteiligt (Zirwes et al., 2000; Henning et al., 2003). Publiziert wurde, dass eine Relokalisation von DDX56 aus den Nukleoli ins Nukleoplasma durch eine Inhibition von c-Jun (AP-1-Transkriptionsfaktor) induziert werden kann (Holmström et al., 2008). Die Autoren konnten zeigen, dass dies zu einer geringeren rRNA-Affinität führt.

Für eine funktionelle Vernetzung zwischen CT45 und DDX56 gibt es in der Literatur keinerlei Hinweise. Da eine Relokalisation ins Nukleoplasma beschrieben wurde, wäre ein ähnlicher Mechanismus, wie zuvor im Zusammenhang mit Ku80 beschrieben, denkbar. DDX56 ist, wie auch Ku80, am RNA-Metabolismus beteiligt. Allgemein wird den *DExD/H-Box*-Proteinen eine RNA-Chaperon-Funktion zugeordnet, so dass die Helikasen durch Induzieren von RNA-

Faltungsmodifikationen eine Assoziation oder Dissoziation mit Proteinen begünstigen (Fuller-Pace, 2006). Vorstellbar wäre daher, dass anknüpfend an die publizierten Daten von Holmström und Kollegen (2008) eine Genexpressionshemmung von spezifischen Transkriptionsfaktoren zur Inhibition einiger Gene führt, die die Umlagerung von DDX56 in die *Nuclear Speckles* induziert. Dort könnte DDX56 hypothetisch durch die Chaperon-Funktion die Interaktion zwischen prä-mRNA und Spleißfaktoren verändern. Eine Funktion von CT45 in diesem spekulativen Modell ist unklar. Die detektierte schwache Interaktion deutet zudem eine geringe Affinität zu CT45 an, so dass eine indirekte Interaktion wahrscheinlich ist. In der Literatur wurden bisher keine Daten zu möglichen DDX56-Interaktionspartnern publiziert, so dass keine Hinweise auf eine Bindung über ein drittes Protein existieren.

Nukleolin

Nukleolin ist aus verschiedenen strukturellen Domänen aufgebaut, so dass eine Affinität zu verschiedenen Proteinen, aber auch zu RNA oder DNA, resultiert. CT45 interagiert mit Nukleolin *ex situ*. Es konnte keine Kolo-kalisation zwischen den beiden Proteinen detektiert werden. Nukleolin wurde stark angereichert in den Nukleoli und nicht in einem *Speckle*-ähnlichen Muster visualisiert.

Für Nukleolin wurden zahlreiche Funktionen publiziert. Dieses Protein ist beteiligt an der Regulation des DNA- und RNA-Metabolismus, der Aufrechterhaltung der Chromatin-Struktur, der Transkription und Reifung ribosomaler DNA, der Zytokinese und auch der Nukleokinese (Roger et al., 2003; Ugrinova et al., 2007). Zudem ist beschrieben, dass Nukleolin einer Stress-induzierten Umverteilung aus den Nukleoli ins Nukleoplasma (Kim et al., 2005, Mi et al., 2003, Daniely et al., 2002) oder Zytoplasma unterliegt (Lindenboim et al., 2010). Nach Herunterregulation von CT45 konnte in zahlreichen Zellen eine Akkumulation von Nukleolin im Nukleoplasma detektiert werden. Die Arbeitsgruppe um Mi (2003) beobachtete, dass Nukleolin nach γ -Bestrahlung der Leukämie-Zelllinie U937 ins Nukleoplasma wandert und Apoptose induziert. Von Daniely und Kollegen (2002) wurde publiziert, dass eine Behandlung mit γ -Strahlung oder mutagenen Chemikalien eine Interaktion zwischen Nukleolin und dem Tumorsuppressor p53 induziert. Nukleolin transloziert daraufhin ins Nukleoplasma um DNA-Reparaturmechanismen oder Apoptose zu induzieren. Die Arbeitsgruppe vermutet, dass posttranslationale Modifikationen von Nukleolin die Interaktion mit p53 ermöglichen. Eine weitere Publikation berichtet, dass nach Induktion von genotoxischem Stress oder Hitzeschock, Nukleolin sowohl in den Nukleoli, aber auch im Nukleoplasma mit dem essentiellen DNA-Replikationsfaktor RPA (*replication protein A*)

komplexiert (Kim et al., 2005). Diese Interaktion führt zur Inhibition von RPA und damit zur Nukleolin-vermittelten Blockade der DNA-Replikation während des Übergangs von der G1- zur S-Phase im Zellzyklus. Die Interaktion wird von Kim und Kollegen (2005) auf post-translationale Modifikationen von Nukleolin bezogen. Dass CT45 die Relokalisation von Nukleolin über genotoxischen Stress induziert ist unwahrscheinlich. Vorstellbar wäre, dass CT45 über andere Wege eine Nukleolin-Phosphorylierung und daraufhin die Akkumulation im Nukleoplasma induziert. Hier bleibt zu klären, welche Funktion die Relokalisierung von Nukleolin in diesem hypothetischen Zusammenhang haben kann. Zudem bleibt unklar, ob CT45 und Nukleolin direkt miteinander wechselwirken, da keine Kolokalisation *in situ* gezeigt werden konnte. Publiziert wurde zudem, dass Nukleolin und NPM direkt miteinander interagieren (Li et al., 1996), so dass eine indirekte Wechselwirkung mit CT45 über NPM wahrscheinlich ist.

MEP50

MEP50 ist eine Komponente des Methylosomen-Komplex. Interessanterweise wurde in der Literatur eine nukleäre Lokalisation von MEP50 in Prostata- oder Mammakarzinomen beschrieben, durch die eine verstärkte Zellteilung und Metastasierung induziert wird (Peng et al., 2007, 2010). Zudem wurde berichtet, dass MEP50 die Entwicklung der fetalen Hoden, aber auch die Onkogenese von testikulären Tumoren beeinflusst (Liang et al., 2007). Den Autoren zur Folge befand sich MEP50 im Nukleus der gesunden adulten Testis, allerdings im Zytoplasma fetaler testikularer Gewebe und Seminome. Diese Publikationen machten MEP50 zu einem interessanten Interaktionspartner.

CT45 hat allerdings keinen Einfluss auf die beschriebene Translokation von MEP50 in den Zellkern. Die Interaktion zwischen CT45 und MEP50 war nur schwach zu detektieren und eine Kolokalisation wurde nicht beobachtet. MEP50 war in unserem Zellsystem nahezu ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert. Dies änderte sich auch nach CT45-Herunterregulation nicht.

MEP50 besitzt ein *WD* (Tryptophan-Aspartat)-Wiederholungsmotiv (Friesen et al., 2002). Dieses Motiv ermöglicht die Interaktion mit einer Vielzahl von Proteinen, so dass postuliert wurde, dass MEP50 die Interaktion zwischen dem Methylosom und anderen Proteinen vermittelt. Die hohe Affinität von MEP50 zu verschiedenen Proteinen könnte erklären, warum es zur schwachen Wechselwirkung mit CT45 im Zellsat, aber nicht zur Kolokalisation *in situ*, kommt. Die beschriebenen Zusammenhänge indizieren eine indirekte Interaktion, so dass MEP50 und CT45 vermutlich nicht in einem direkten funktionellen Kontext stehen.

EML4

CT45 interagiert mit dem N-terminalen Bereich von EML4 und kolokalisiert mit der phosphorylierten Form in den *Nuclear Speckles*. EML4 besitzt eine C-terminale *WD*-Domäne und eine aminoterminal hydrophobe *HELP*-Domäne. Die Phosphorylierung erfolgt Zellzyklus-abhängig und die hyperphosphorylierte Form ist mit der mitotischen Spindel assoziiert. Es konnte gezeigt werden, dass der aminoterminal Bereich unabhängig von der *HELP*-Domäne mit den Mikrotubuli interagiert (Pollmann et al., 2006). Zudem stellte die Arbeitsgruppe um Pollmann fest, dass EML4 essentiell für die Zellproliferation und den Aufbau des Mikrotubuli-Gerüsts ist. pEML4 akkumuliert in Interphase-Zellen in den *Nuclear Speckles* und kolokalisiert mit CT45. Die Interaktion findet über den N-terminalen Bereich statt, der nach Pollmann und Kollegen auch für die Assoziation mit den Mikrotubuli verantwortlich ist. Ob die *HELP*-Domäne für die Bindung mit CT45 wichtig ist, wurde im Rahmen meiner Arbeit nicht untersucht. Allerdings ist die C-terminale *WD*-Domäne nicht an der Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen beteiligt.

Das Verteilungsmuster und die Akkumulation von EML4 wurden nicht durch CT45 beeinflusst. Die Bedeutung der Interaktion zwischen den beiden Proteinen ist daher unklar. Die Literaturdaten zu EML4 konzentrieren sich größtenteils auf ein onkogenes Fusionsprotein mit ALK (*anaplastic lymphoma kinase*) in NSCLC (*non-small cell lung cancer*) (Soda et al., 2007). Ansonsten stehen keinerlei Information zur Verfügung.

Die diskutierten Daten deuten eine hypothetische Funktion von CT45 auf den mRNA-Metabolismus an. Zum einen sind die *Nuclear Speckles* entscheidend für die mRNA-Prozessierung und zum anderen sind die als direkte Interaktionspartner vermuteten Proteine NPM, SFPQ, NONO und Ku80 essentiell für Regulationen in diesem Kontext.

5.3.3 CT45-induzierte negative Regulation von Syncrin

Über die differentielle 2D-Gelelektrophorese (2D-DIGE) sollten durch CT45-induzierte Unterschiede in der Proteinregulation detektiert werden. Die differentielle 2D-Gelelektrophorese bietet eine Möglichkeit, Unterschiede im Gesamtproteom zu analysieren. Über den „DyeSwap“ wurden unterschiedliche Färbeartefakte der Fluorochrome ausgeschlossen. Probleme, die durch die individuellen Laufeigenschaften der Gele auftreten könnten, wurden durch fünf parallele, unabhängige Experimente pro Fragestellung minimiert. Die Vorteile dieser Methode liegen zudem in der Detektion einzelner Protein-Isoformen und posttranslationaler Modifikationen. Die Proteine können anhand der Molekulargewichte und der isoelektrischen Punkte charakterisiert werden.

CT45 wurde in zwei Zelllinien, den adhären HT1080-Zellen und der in Suspension wachsenden Zelllinie L428 herunterreguliert. In einem zweiten Modell wurde CT45 in HeLa-Zellen überexprimiert. Es sollte gezielt nach Proteinen gesucht werden die gleichermaßen in allen Zelllinien reguliert werden. Unser Fokus lag zudem auf der Analyse von Kernproteinen, da CT45 als Bestandteil der *Nuclear Speckles* im Nukleus aktiv sein sollte. Im Vergleich zu zytoplasmatischen Proteinen, wie den Zytoskelett-Proteinen oder den metabolischen Enzymen, haben Transkriptionsfaktoren oder auch andere nukleäre Proteine eine geringe Abundanz in der Zelle. Um einer Überlagerung der für uns interessanten Proteine durch stark abundante zytoplasmatische Bestandteile zu umgehen, wurden grob aufgereinigte Kernlysate analysiert.

In den durchgeführten Analysen nach CT45-Herunterregulation konnte parallel in HT1080- und L428-Zellen nur das mit mRNA interagierende Protein Syncrip (Isoform CRA_e) als gleichermaßen differentiell reguliert detektiert werden. Diese Isoform wurde 2001 über ein genomweites *Screening* identifiziert (Venter et al., 2001) und scheint nach einer Sequenz-Überlagerung (www.ebi.ac.uk/web_clustalw) der humanen Isoformen ein Hybrid aus Variante 2 und 3 zu sein. In der Literatur sind nur Funktionen von Syncrip 1-3 charakterisiert. In der 2D-DIGE wurden diese Varianten in einigen Gelen identifiziert, allerdings waren die entsprechenden Proteinspots nicht in allen Gelen detektierbar. Die Volumenänderung der im Ergebnisteil vorgestellten Syncrip-Proteinspots war zudem in beiden Zelllinien mit ungefähr 1,2-fach, nur sehr schwach. Über das Western Blot-Verfahren konnte vor allem die Bande bei 70 kDa (Syncrip 3) in beiden untersuchten Zelllinien als reguliert bestätigt werden. Die Herunterregulation von Syncrip 3 (70 kDa) konnte zudem in U266 BL-Zellen nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). In CT45-überexprimierenden HeLa-Zellen konnte diese Regulation nicht bestätigt werden.

Auf welchem Weg CT45 die Anreicherung von Syncrip beeinflusst, wurde im Rahmen meiner Arbeit nicht charakterisiert. Festgestellt wurde allerdings, dass über eine Koimmunpräzipitation keine Interaktion zwischen Syncrip und CT45 detektiert werden konnte (Ergebnisse nicht gezeigt). Da der verwendete Syncrip-Antikörper im Western Blot hauptsächlich die 70 kDa Form detektiert, ist fraglich, ob eine Interaktion mit den beiden anderen Varianten über diesen Weg darstellbar ist. Interessanterweise zeigte Syncrip in entsprechenden Immunfluoreszenz-Färbungen neben der zytoplasmatischen Lokalisation eine punktförmige Verteilung im Zellkern. Diese könnte auf eine Akkumulation in den *Nuclear Speckles* hindeuten. Der Antikörper erkennt demnach *in situ* alle Isoformen. Von Mourelatos und Kollegen (2001) wurde publiziert, dass Syncrip (vor allem die humanen Isoformen 1 + 2)

das prä-mRNA Spleißen reguliert, so dass die Lokalisation in den *Nuclear Speckles* und damit eine Überlagerung mit CT45 vorstellbar ist. In der Literatur wird die zytoplasmatisch lokalisierte murine Syncrip-Isoform 1 (humane Isoform 3) als mRNA-interagierendes Protein beschrieben, das die Beladung und den Transport von mRNA-enthaltenen Granula reguliert (Bannai et al., 2004; Chen et al., 2012, Xing et al., 2012).

Die ebenfalls schwache differentielle Regulation (Volumenänderung der Proteinspots bis zum Faktor 1,8) von Annexin 1 in HT1080-Zellen konnte im Western Blot verifiziert werden und schien daher anfänglich interessant. Allerdings ergab die Literaturrecherche das B-Zell-Lymphome und Myelome das Gen für Annexin 1 nicht exprimieren (Vishwanatha et al., 2004; Falini et al., 2004). Auch in den Zelllinien L428 und U266 BL konnte Annexin 1 nicht detektiert werden (Ergebnisse nicht gezeigt). In den Versuchen nach CT45-Überexpression in HeLa-Zellen wurde Annexin 1 ebenfalls nicht als differentiell reguliert dargestellt. Daher ist ein grundsätzlicher CT45-beeinflusster Signalweg über dieses Protein unwahrscheinlich, obwohl es ein interessanter Kandidat für die Analyse CT45-induzierter Veränderungen in der Zelle gewesen wäre. Annexin 1 ist ein multifunktionelles an Phospholipide bindendes Protein und wird assoziiert mit der Tumorentwicklung, Progression und Metastasierung in invasiven epithelialen Krebserkrankungen (Babbin et al., 2006).

Ein weiteres Protein, das in HeLa- und L428-Zellen als differentiell reguliert detektiert wurde, war NPM. Allerdings konnte dieses Ergebnis nicht verifiziert werden, wie bereits im Zusammenhang mit den Interaktionsstudien diskutiert wurde. Alle anderen identifizierten Proteine wurden nicht in mehreren Zelllinien differentiell reguliert und/oder konnten nicht im Western Blot verifiziert werden. Hier zu nennen sind Ezrin (HT1080), EFF1 (HeLa) und EEF2 (L428), TCP-1 (HeLa), TRAP-1 (HeLa), VDAC2 (HeLa). Eine CT45-induzierte Regulation dieser Proteine wäre durchaus interessant, da einige mit verschiedenen charakteristischen Tumoreigenschaften im Zusammenhang genannt werden.

Hier werden einige Limitierungen dieser Methode sichtbar, die vor allem die Analyse der weniger abundanten (Kern-) Proteine betreffen. Wie im Ergebnisteil dargestellt, konnte auch CT45 nicht im 2D-Gel über eine Gesamtproteinfärbung detektiert werden. Allgemein kann nur eine begrenzte Zahl an Proteinen dargestellt werden, wobei sehr große (> 200 kDa) oder kleine (< 10 kDa) bzw. extrem saure oder basische Proteine nicht detektiert werden. Auch Proteine mit einem hohen hydrophoben Teil sind aufgrund ihrer geringen Löslichkeit im wässrigen Milieu schwierig darzustellen. In der Literatur wird angegeben, dass ca. 2000 Proteine (10-20 % aller in einer Zelle angereicherten Proteine) aufgetrennt und dargestellt

werden können. Man kann für die Analyse differentiell regulierter Proteine zudem, je nach Auswertungssoftware davon ausgehen, dass ungefähr 5 % der detektierten Proteine als falsch positiv identifiziert werden (Berth et al., 2007).

Einige der genannten Nachteile können herangezogen werden, um die geringe Ausbeute an differentiell regulierten Proteinen in den durchgeführten Versuchsmodellen zu erklären. Das Problem der gering abundanten Kernproteine wurde bereits angesprochen. Über die Minimierung der zytoplasmatischen Fraktion wurde der Anteil an Kernproteinen im Lysat erhöht. Es wurden trotzdem keine nur im Kern lokalisierten Proteine als differentiell reguliert identifiziert. Dass diese Proteine aufgetrennt wurden, lässt sich am Beispiel von CT45 demonstrieren. Über die Sybro Ruby-Färbung des 2D-Gels konnten die entsprechenden Spots nicht visualisiert werden, wohingegen der spezifische Antikörper im Western Blot zu einer starken Färbung führte. Die einzigen mehrfach detektierten Proteine, die sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma akkumulieren, waren Syncrin und NPM. Allerdings wurden, wie bereits angesprochen, nicht alle Isoformen von Syncrin gleichermaßen gut detektiert. Dies signalisiert die geringe Abundanz der Proteine. Alle anderen analysierten Proteine können im Zytoplasma lokalisiert werden. Es wurden hoch abundante Proteine wie Aktin oder Albumin als differentiell reguliert detektiert, aber auch andere Zytoskelett- oder Stoffwechselproteine, wie Vimentin, Ezrin oder Hitzeschockproteine (Hsp70; Hsp90). Nur im Fall von Ezrin (HT1080) war eine Regulation über alle angefertigten Gele detektierbar, aber eine Verifikation im Western Blot war nicht möglich.

Die durchgeführte 2D-DIGE-Analyse war demnach nur bedingt geeignet, um CT45-induzierte differentielle Proteinakkumulationen in der Zelle zu analysieren. Eine weitere Optimierung der Methode hätte eventuell bessere Ergebnisse, vor allem bezogen auf die Kernproteine, liefern können. Die Analyse stark aufgereinigter Kernlysate wäre hier eine sinnvolle Möglichkeit. Zudem besteht die Möglichkeit, dass CT45 die Proteinregulation allgemein nur wenig beeinflusst.

5.3.4 CT45 beeinflusst die Zelladhäsion, Invasion und Migration

In einer Vielzahl von präparierten Immunfluoreszenz-Färbungen wurde nach CT45-Herunterregulation eine Veränderung der Zellmorphologie detektiert. Deutlich zu beobachten war dieser Effekt vor allem nach Färbung von β -Aktin, β -Tubulin, EML4 und Vimentin. Diese Proteine sind Bestandteile der drei wesentlichen Zytoskelett-Komponenten.

β -Tubulin bildet zusammen mit α -Tubulin ein Heterodimer, das den Bestandteil der Mikrotubuli darstellt. Diese Zytoskelett-Struktur wird zentral über die Zentrosomen organisiert und ist essentiell an der Zellmigration und Polarisation, aber auch der Zellteilung beteiligt (De Forges et al., 2011). Mikrotubuli sind zudem für den „Langstreckentransport“ von Vesikeln verantwortlich. Diese Filamente transportieren aber auch die Chromatiden während der Zellteilung durch Ausbildung des Spindelapparats zu den Zellpolen. Das Mikrotubuli-assoziierte Protein EML4 wurde bereits vorgestellt und als Interaktionspartner von CT45 identifiziert. Die CT45-induzierte Veränderung der Mikrotubuli-Struktur ist nicht mit einem Effekt auf die Zellteilung oder den Zellzyklus verbunden, wie bereits im Abschnitt 4.3 gezeigt werden konnte. Somit sollte kein genereller Defekt im Aufbau einer intakten Tubulin-Struktur bestehen. Zudem konnte über die Analyse des zellulären Anteils an polymerisierten und monomeren α -Tubulin gezeigt werden, dass CT45 das Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der Filamente nicht beeinflusst. Eine CT45-vermittelte Regulation der Tubulin-Struktur über den Interaktionspartner EML4 ist ebenfalls unwahrscheinlich. Die Immunfluoreszenz-Aufnahmen zeigen deutlich, dass EML4 unabhängig von CT45 mit den Filamenten interagiert, so dass die Funktion von EML4 erhalten bleibt. Demnach konnte die Frage nach der Ursache für die veränderte Tubulin-Struktur mit dem derzeitigen Ergebnisstand nicht beantwortet werden.

Eine weitere ergänzende Zytoskelett-Komponente wird als Intermediär-Filament bezeichnet. Die Intermediär-Filamente (IF) können aus einer Reihe verschiedener Proteine aufgebaut sein und werden in sechs Untergruppen klassifiziert. Eine Untergruppe, die Typ III IF, besteht größtenteils aus Vimentin und ist im Besonderen für die Aufrechterhaltung der Zellarchitektur verantwortlich (Satelli & Li, 2011). Eine Kondensation und Rückbildung von Vimentin ist laut Literatur essentiell, damit die Bildung von Lamellipodien und Podosomen induziert werden kann (Helfant et al., 2010; Pan et al., 2010). Die periphere Lokalisation von Vimentin ist hingegen wesentlich für das invasive Wachstum von Invadopodien (Schoumacher et al., 2010). Ein Effekt der CT45-Herunterregulation war die starke Kondensation des Vimentin-Gerüsts im Bereich des Zellkerns. Literaturdaten deuten an, dass dieses zu einer verbesserten Möglichkeit zur Lamellipoden- und Podosomen-Generierung führt. Die in den Kontrollzellen dargestellte periphere und verzweigte Vimentin-Struktur würde dementsprechend einen positiven Effekt auf das Invadopodien-Wachstum vermitteln. Die angefertigten Präparate liefern keine Information zu invasiv wachsenden Zellfortsätzen. CT45 scheint zudem hauptsächlich einen Effekt auf die Filopodien-Struktur zu vermitteln. Daher ist unklar in wie weit die publizierten Daten auf diesen Kontext projizierbar sind. Zudem bleibt fraglich, ob die visualisierte Vimentin-Struktur in den Kontrollzellen nicht auch

einen hohen Anteil an kondensiertem Vimentin im Bereich des Zellkerns enthält. Die genaue Ursache für die veränderte Vimentin-Struktur muss daher durch weitere Experimente geklärt werden.

Weitere essentielle Zytoskelett-Strukturen sind die Mikro- oder Aktinfilamente. Diese Filamente bestehen aus polymerisiertem F-Aktin, stabilisieren die Zelle und bilden die verschiedenen Zellmembranausstülpungen wie Filopodien, Lamellipodien, Invadopodien und Podosomen. Diese ermöglichen die zielgerichtete Migration oder Invasion der Zellen (Arjonen et al., 2011, Albriges-Rizo et al., 2009). Mikrofilamente sind kurze Fragmente, die Vesikel von den Mikrotubuli übernehmen und zur Plasmamembran transportieren. In verschiedenen β -Aktin-Färbungen wurden nach CT45-Herunterregulation weitaus weniger Membranausstülpungen detektiert. Dieses signalisiert eine veränderte Aktin-Polymerisation an den Wachstumszonen der Zellmembran. Der Anteil an polymerisiertem bzw. monomerem Aktin veränderte sich allerdings nach CT45-Herunterregulation nicht (Ergebnisse nicht gezeigt). Der Auf- und Abbau der Aktin-Filamente ist ein stark regulierter Prozess, der über eine Vielzahl verschiedener Signalwege induziert werden kann. Die durch Depolymerisation entstehenden monomeren Fragmente werden an anderer Stelle erneut polymerisiert, so dass im Regelfall keine Verschiebung des Gleichgewichts entstehen sollte. CT45 hat keinen Einfluss auf die grundsätzliche Regulation der Polymerisation. Allerdings scheint die Bildung von Membranfortsätzen in irgendeiner Art verändert zu sein. Anhand dieser Färbungen ist die Art der Fortsätze und der dahinter stehende Mechanismus nicht zu charakterisieren. Allerdings scheinen die nadelförmigen Filopodien am Stärksten betroffen.

Da zusätzlich eine veränderte Adhäsion, also ein verstärktes Ablösen der Zellen, nach CT45-Herunterregulation zu beobachten war, wurden Proteine der fokalen Adhäsionspunkte in weiteren Immunfluoreszenz-Färbungen analysiert. FAK ist wesentlich an der Ausbildung der zellulären Adhäsionspunkte beteiligt und reguliert die erneute Anheftung bzw. das Ablösen der Zelle (Owen et al., 2007, Iwanicki et al., 2008). Die genannten Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass FAK die Aktin-Organisation und/oder -Polarisation über einen phosphorylierungsabhängigen Signalweg reguliert, der zur Aktivierung von Rho-GTPasen wie Rac oder Cdc42, führt. Über diesen Mechanismus wird unter anderem die über Integrine vermittelte und gerichtete Zellmigration gesteuert. FAK reguliert das Zytoskelett zudem über weitere Proteine wie N-WASP und den Arp2/3-Komplex. Es wird vermutet, dass FAK über die Interaktion mit dem Arp2/3-Komplex die Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien steuert (Serrels et al. 2007). In den untersuchten HT1080-Zellen konnte nach CT45-

Herunterregulation weniger aktiviertes FAK Y397 detektiert werden. Dies könnte die geringere Zahl an Membranfortsätzen, aber auch die veränderte Zelladhärenz, erklären.

Die Analyse von α -Parvin sollte diese Erkenntnisse festigen. α -Parvin ist ebenfalls an den fokalen Adhäsionspunkten lokalisiert und beeinflusst die Adhäsion, Motilität aber auch die Zellausbreitung. Über die Interaktion mit der *Integrin-linked Kinase* (ILK) bildet α -Parvin eine direkte Verbindung zwischen den Integrinen und F-Aktin. Dies resultiert unter anderem in der Regulation von Lamellipodien oder induziert über die Bindung mit Paxilin die Signalweiterleitung an das Aktin-Zytoskelett (Rony & Streil, 2011). Die Immunfluoreszenz-Aufnahmen nach CT45-Herunterregulation zeigten in vielen Zellen eine diffuse Verteilung von α -Parvin über das gesamte Zytoplasma. In den Kontrollzellen konnte hingegen häufig die distinkte Akkumulation dieses Proteins an den fokalen Adhäsionspunkten beobachtet werden. In der Literatur wird beschrieben, dass α -Parvin in Folge des Kontakts zwischen Zelle und ECM (*extracellular Matrix*) über einen Integrin-vermittelten Signalweg an die fokalen Adhäsionspunkte transloziert und dort mit anderen Proteinen zur Signalweiterleitung komplexiert (Sepulveda & Wu, 2006). Demnach signalisiert die geringere CT45-vermittelte Akkumulation von α -Parvin eine schwächere Adhäsion oder Motilität der Zellen, die eventuell über einen veränderten Integrin-basierten Kontakt nach außen resultiert.

Die beschriebenen Daten deuten auf einen CT45-vermittelten Effekt auf die Zelladhärenz und/oder Zellmigration hin. Um mögliche Effekte quantifizieren zu können, wurde zunächst ein Adhäsions-Assay etabliert. Über dieses Verfahren konnten allerdings keine signifikanten CT45-induzierten Veränderungen nachgewiesen werden. Zudem war die Standardabweichung relativ hoch. Es kristallisierte sich heraus, dass der Einfluss von CT45 eher gering ist und daher sensitivere Methoden ein besseres Ergebnis liefern könnten. Zu diesem Zweck wurde das xCelligence System der Firma Roche verwendet. Wie bereits im Ergebnisteil ausführlich beschrieben, ermöglicht dieses System eine sehr genaue Echtzeitanalyse der Zellimpedanz, so dass die vermutete Veränderung der Zelladhäsion detektiert werden kann. Mit dieser Methode konnte nach CT45-Herunterregulation in HT1080-Zellen eine 20 %ige Reduktion der Zellimpedanz festgestellt werden. Dass der Effekt nicht auf die Zellproliferation zurückzuführen ist, wurde über verschiedene Ansätze in Abschnitt 4.3 beschrieben. Die Reduktion der fokalen Adhäsionspunkte wäre die wahrscheinlichste Erklärung für den CT45-induzierten Effekt auf die Zellimpedanz. Der gemessene Wechselstromwiderstand ist empfindlich für jeglichen Kontakt mit der Goldfilm-Elektrode. Weniger Adhäsionspunkte erklären somit einen geringeren Widerstand. Aber

auch eine insgesamt veränderte Morphologie der CT45-regulierten Zellen könnte den Effekt hervorrufen.

Ob nicht nur die Adhäsion, sondern auch die Zellmigration durch CT45 beeinflusst wird, wurde ebenfalls in HT1080-Zellen untersucht. Im 2D-System konnte allerdings kein CT45-induzierter Effekt beobachtet werden. In der Literatur wird diskutiert, dass Mitglieder der WASP-Familie (WASP- und WAVE-Proteine) eine Schlüsselfunktion für die Aktin-Polymerisation während der Zellmigration und -invasion einnehmen (Takenawa and Suetsugu, 2007). Die generelle ungerichtete Migration wird über die WAVE-abhängige Bildung von Lamellipodien reguliert. Veröffentlicht wurde, dass N-WASP die Generierung von ECM-degradierenden Invadopodien vermittelt (Li et al., 2010; Yamaguchi et al., 2005). In einer Publikation von Gligorijevic und Kollegen (2012) wurde beschrieben, dass eine negative Regulation von N-WASP keinen Effekt auf das Lamellipodien-induzierte Migrationsverhalten im 2D-System vermittelt. Allerdings wird die invasive und gerichtete Zellwanderung durch eine 3D-Struktur stark eingeschränkt. Die Autoren begründen dieses mit der essentiellen Beteiligung von N-WASP am Aufbau von Invadopodien. Diese Zellfortsätze vermitteln die chemotaktische Invasion. In einem *Transwell*-System der Firma BioCat wurde festgestellt, dass CT45 die Migration und Invasion gegen einen FKS-Konzentrationsgradienten durch eine Matrix beeinflusst. Die untersuchte adhärente, als auch die Suspensions-Zelllinie, zeigten als Folge der CT45-Herunterregulation eine um 20 % reduzierte invasive Zellwanderung. Vor dem Hintergrund der zitierten Daten wird vermutet, dass CT45 die Ausbildung der gerichteten N-WASP-vermittelten Invadopodien in irgendeiner Weise beeinträchtigt.

CT45 ist nicht das erste CT-Antigen, das in einen funktionellen Kontext mit der Regulation der Zellmotilität gebracht wird. Bereits 2006 wurde beschrieben, dass ein Mitglied dieser Proteinfamilie, CAGE (*cancer-associated gene*), die Phosphorylierung von FAK positiv beeinflusst. CAGE induziert so eine gesteigerte Migration und Invasion von Leberkrebszellen (Shim et al., 2006). Ein weiteres CT-Antigen, SSX (*synovial sarcoma X*), vermittelt eine verstärkte Metastasierung über die Induktion einer gesteigerten MMP-2 (*Matrix metalloproteinase 2*)-Akkumulation und die Verschiebung des E-Cadherin-Levels auf der Zelloberfläche (Cronweight et al. 2005).

5.3.5 Syncrip als Regulator zwischen CT45 und dem Zytoskelett

Hinweise zur Beantwortung der Frage, wie CT45 als Kernprotein die Regulation des Zytoskeletts vermitteln kann, kamen über die bereits vorgestellten Daten, die im

Zusammenhang mit der zytoplasmatischen murinen Isoform 1 von Syncrip (mSyncrip 1) postuliert wurden. Aus der Literatur ist zum einen bekannt, dass die Interaktion mit mSyncrip 1 regulierend auf die Translation der RhoA-mRNA wirkt (Xing et al., 2012). Aktiviertes RhoA vermittelt die Phosphorylierung von Cofilin (Ser-3) und induziert die Depolymerisation der Aktin-Filamente (Sumi et al., 1999). Da die Regulation von Cofilin über eine Vielzahl von Mechanismen erfolgt, kann die Phosphorylierung verschiedene Effekte induzieren. Die Arbeitsgruppe um Xing (2012) setzt unter anderem eine veränderte Migration in einem *Transwell*-System in diesen Zusammenhang. Außerdem gewährleistet die Wechselwirkung zwischen mSyncrip 1 und der mRNA von Cdc42, N-WASP und dem Arp2/3-Komplex die Transport-Stabilisierung bis in die Spitzen der murinen Neuriten (Chen et al., 2012). Dieser Mechanismus ist essentiell für das weitere Aktin-vermittelte Nervenzellwachstum. Inwieweit dieser Prozess in Fibroblasten induziert wird, war fraglich. Zellfortsätze, wie Filopodien oder Invadopodien, sind nicht so lang wie Neuriten, allerdings werden die beschriebenen Proteine auch an den Enden dieser Strukturen für die Aktin-Polymerisation und das damit verbundene invasive Wachstum benötigt.

In ersten initialen Experimenten aus L428- und HT1080-Zellen konnte analysiert werden, dass die humane Syncrip-Isoform 3 mit den mRNAs von Cdc42, Arp2/3 und N-WASP interagiert, allerdings nicht mit GAPDH mRNA. Zudem war nach Herunterregulation von CT45, zusätzlich zu der negativen Regulation von Syncrip, eine Reduktion der präzipitierten mRNAs detektierbar. Dieser Effekt war in den L428-Zellen stärker detektierbar als in den HT1080-Zellen. Die im Gesamtzelllysat analysierte Anreicherung von Cdc42, N-WASP und Arp2 wurde nicht durch CT45 verändert. Die Ergebnisse von Chen und Kollegen (2012) konnten somit weitestgehend auf das humane System übertragen werden. Die Arbeitsgruppe hatte die Möglichkeit, die Neuriten vom Soma, dem Zellkörper, zu trennen. Über diese Methode wurde analysiert, dass nach Herunterregulation von mSyncrip 1 die präzipitierte mRNA-Menge und die Anreicherung des Cdc42/N-WASP/Arp2/3-Komplex in den Neuriten verringert wird. Eine Reduktion der genannten Proteine bzw. der präzipitierten mRNAs in der gesamten Zelle konnte nicht detektiert werden. Somit bleibt fraglich, ob der CT45-vermittelte Effekt auf die mit Syncrip kopräzipitierte mRNA real ist. Diese Versuche sind bis dato erst zweimal durchgeführt worden, eine Standardabweichung kann daher nicht angegeben werden und eine weitere Überprüfung ist unbedingt notwendig.

Die Arbeitsgruppe um Chen (2012) publizierte zudem, dass sich in Folge der mSyncrip 1-Herunterregulation die Anreicherung der Proteine N-WASP, Cdc42 und Arp2/3 in den Spitzen der Neuriten reduziert. Begründet wurde dieser Effekt mit dem unzureichenden

mSyncrin 1-vermittelten Transport der entsprechenden mRNAs und der damit verbundenen reduzierten Translation an den Zellfortsätzen. Über diesen Mechanismus erklärten die Autoren die morphologischen Defekte und die verringerte Migrationsbereitschaft der Neuriten. In ersten Versuchen nach CT45-Herunterregulation konnte ebenfalls eine reduzierte Akkumulation von Syncrin, Cdc42 und N-WASP an den Wachstumszonen der Zellen detektiert werden. Weitere Experimente zur Bestätigung dieser Befunde sind unbedingt notwendig.

In der Veröffentlichung von Xing und Kollegen (2012) wurde postuliert, dass mSyncrin 1 über die Interaktion mit dem 3'-UTR der RhoA-mRNA die Translation des Proteins negativ reguliert. Demnach resultiert die negative Regulation von mSyncrin 1 in einer Zunahme der RhoA-Proteinmenge. Dieses induziert die Aktivierung der LIM-Kinase und folglich die Phosphorylierung von Cofilin am Ser-3. Über diese posttranslationale Modifikation wird die Interaktion zwischen Cofilin und Aktin blockiert, so dass eine verstärkte Depolymerisation der Aktin-Filamente induziert wird (Xing et al., 2012). Cofilin hat somit eine entscheidende Funktion für die Generierung freier Aktin-Enden. Diskutiert wird allerdings, dass der Aktivierungsgrad von Cofilin, aufgrund der zahlreichen Regulationsmechanismen, nicht über den Phosphorylierungsstatus analysiert werden kann (Oser et al., 2009). Da die Arbeitsgruppe um Xing (2012) ebenfalls einen Effekt auf die Migration durch Matrixstrukturen beobachtet hat, scheint diese in irgendeiner Art und Weise über diesen Weg beeinflusst. Die negative Regulation von CT45 führt in den HT1080-Zellen zu einer Zunahme der RhoA-Proteinmenge und folglich zu der publizierten Zunahme der Cofilin-Phosphorylierung. In den L428-Zellen war dieser Effekt geringer oder gar nicht zu beobachten. Hier scheint ein Unterschied zwischen der adhärennten und der Suspensions-Zelllinie zu bestehen.

Zusammenfassend sind die für murine Neuronen beschriebenen Befunde, zumindest teilweise, auf das humane System übertragbar. Die CT45-induzierte Regulation von Syncrin könnte über die publizierten Wege das Zytoskelett beeinflussen. Dies könnte die reduzierte Migrations- und Invasionsfähigkeit nach CT45-Herunterregulation begründen. 3D-Experimente zur spezifischen Charakterisierung der Lokalisation der beschriebenen Proteine an den Wachstumszonen der Zellen müssten herangezogen werden, um diese vorläufigen Ergebnisse zu verifizieren.

5.3.6 Biologische Bedeutung von CT45

CT45 wird wahrscheinlich kein interessantes Target für eine immunbasierte Tumorthherapie sein, da bis dato keine CT45-spezifischen Antikörper in Patienten mit entsprechenden

Tumoren analysiert wurden. Als Erklärung könnte die generell in Tumorpatienten zu detektierende Suppression von anti-Tumorantikörpern herangezogen werden. Bekannt ist, dass Tumor-infiltrierende Lymphozyten, vor allem in den häufig CT45-positiven Hodgkin's-Lymphomen, größtenteils aus Typ2 T-Helferzellen und aus CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*)-positiven regulatorischen T-Zellen bestehen. Die zytotoxischen T-Zellen stellen eher eine Minderheit dar. Dieser Zusammenhang wird in der Literatur als Begründung für das signifikant geringere Symptom-freie Überleben der Patienten herangezogen (Schreck et al., 2009). CTLA-4 ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie und ist zugleich der Rezeptor für B7-Proteine auf aktivierten antigenpräsentierenden Zellen. Eine Interaktion zwischen CTLA-4 auf regulatorischen T-Zellen und seinem Liganden B7 führt zur Inhibition der T-Zellaktivität. Die Signalkaskaden, die die Immunantwort aktivieren und die Produktion von Antikörpern induzieren sollen, werden blockiert (Korman et al. 2007). Daher wird postuliert, dass eine CT45-vermittelte Immunantwort induziert werden könnte, wenn die CTLA-4-positiven regulatorischen T-Zellen in den betroffenen Patienten durch anti-CTLA-4 spezifische Antikörper supprimiert werden (Chen et al., 2010).

In der Literatur wird zudem diskutiert, ob CT-Antigene generell eine Funktion während der Tumorgenese haben, oder ob sie nur ein irrelevantes Nebenprodukt der zellulären Transformation darstellen, beispielsweise induziert durch globale Chromatin-Restrukturierungen und/oder Demethylierungen (Simpson et al., 2005). Krebs ist eine genetisch bedingte Erkrankung, die aus einzelnen oder mehreren Mutationen resultiert. Vorrangig sind die auch im gesunden Gewebe vorhandenen Onkogene oder Tumorsuppressoren betroffen. Die Akkumulation von CT-Antigenen wird in der Regel nicht in somatischen Zellen induziert. Möglicherweise ist die Reprogrammierung auf ein gametogenes Differenzierungsprogramm nötig, um die Genexpression zu aktivieren. Die Autoren um Simpson (2005) postulieren, dass die untypisch exprimierten Keimzell-spezifischen Gene für somatische Zellen schädlich sind. Aufgrund der Parallele zwischen Gametogenese und Tumorgenese wird allerdings diskutiert, dass für einen Tumor Vorteile durch die Aktivierung dieser Gene resultieren. Vermutlich entarten die Zellen initial aufgrund verschiedener onkogener Mutationen, die beispielsweise eine Inhibition der Zellzyklus-Kontrolle induzieren. Im Rahmen der Transformation kommt es zur Reprogrammierung und unter anderem zur Genexpression von CT-Antigenen wie CT45, die dem Tumor einen zusätzlichen Vorteil vermitteln können. Aufgrund der vorgestellten Daten trägt CT45 hypothetisch zu einer verstärkten Metastasierung bei.

Die Metastasierung wird initial über die Separierung einiger Zellen vom primären Tumor induziert. Die Zellen wandern invasiv durch die extrazelluläre Matrix und die umliegenden Gewebe, bis ein Blutgefäß erreicht wird. Ein in der Literatur diskutierter, für die invasive Migration wichtiger Schritt ist die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) der entarteten Zellen (Bravo-Cordero et al., 2012). Eine resultierende Verschiebung der Genexpression mobilisiert die Zellen durch die Generierung von invasiven Strukturen mit neuen proteolytischen Eigenschaften. Die Wanderung durch die Basalmembran wird ermöglicht (Bravo-Cordero et al., 2012). Die Arbeitsgruppe um Gligorijvic (2012) konnte zeigen, dass Brustkrebszellen einem chemotaktischen EGF (*epidermal growth factor*)-Gradienten invasiv folgen und so den Weg zum Blutgefäß finden. Für diese transendotheliale Migration werden von der Arbeitsgruppe die Invadopodien als entscheidende Struktur hervorgehoben. Diese formieren sich erst in Folge des erwähnten chemotaktischen Gradienten.

In der Literatur wurde beschrieben, dass N-WASP als essentielles Molekül die Regulation der Invadopodien vermittelt (Yamaguchi et al., 2005; Li et al., 2010). Zudem demonstrieren publizierte Daten, analysiert über RNA-Interferenz-basierte Experimente und Studien an dominant-negativen Mutanten, die Wichtigkeit von Cdc42 und Arp2/3 für die Invadopodienbildung (Yamaguchi et al., 2005). Mit den hier vorgestellten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass CT45 keinen Einfluss auf die ungerichtete Migration im 2D-System hat, allerdings die invasive Wanderung von adhärenenten als auch Suspensions-Zellen in Richtung eines FKS-Gradienten um 20 % reduziert. Wie bereits erwähnt, wird N-WASP über Cdc42 aktiviert und reguliert anschließend die Funktion des Arp2/3-Komplex. Dies induziert die Polymerisation und Verzweigung von Aktin-Filamenten. Demnach ergibt sich ein hypothetisches Modell, wonach CT45 über die Regulation der Syncrip-Akkumulation positiv auf die Stabilität und den Transport und damit auf die Translation des Cdc42/N-WASP/Arp2/3-Komplex an den Enden der Invadopodien wirkt. Dies induziert wiederum eine verstärkte invasive Migration (Abbildung 44). Die Anreicherung der Proteine innerhalb der gesamten Zelle wird nicht verändert, so dass der Effekt nur auf die weit peripheren invasiven Strukturen bezogen werden kann.

Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass CT45 die Akkumulation von RhoA über Syncrip negativ reguliert. Dies verhindert die andernfalls resultierende RhoA-vermittelte Zunahme der Cofilin Ser-3-Phosphorylierung und die damit verbundene Dissoziation von den Aktin-Filamenten (Abbildung 44). Somit bleibt der positive Effekt auf die Aktin-Polymerisation erhalten. Cofilin wird über zahlreiche Mechanismen reguliert. Im Zusammenhang mit der Invadopodien-Bildung und Reifung wurde publiziert, dass die Aktivierung von Cofilin über

eine Wechselwirkung mit dem Protein Cortactin und nicht über eine Phosphorylierung reguliert wird (Oser et al., 2009). Cofilin wird nicht nur mit den Invadopodien in Verbindung gebracht, sondern auch mit den Filopodien. Postuliert wird, dass Cofilin über die Wechselwirkung mit Fascin in den Spitzen der Filopodien die Aktin-Depolymerisation beeinflusst (Breitschneider et al., 2011). Inwiefern die Phosphorylierung von Cofilin für diesen Mechanismus essentiell ist und welche weiteren Regulationsmechanismen hier wichtig sind, wurde nicht untersucht.

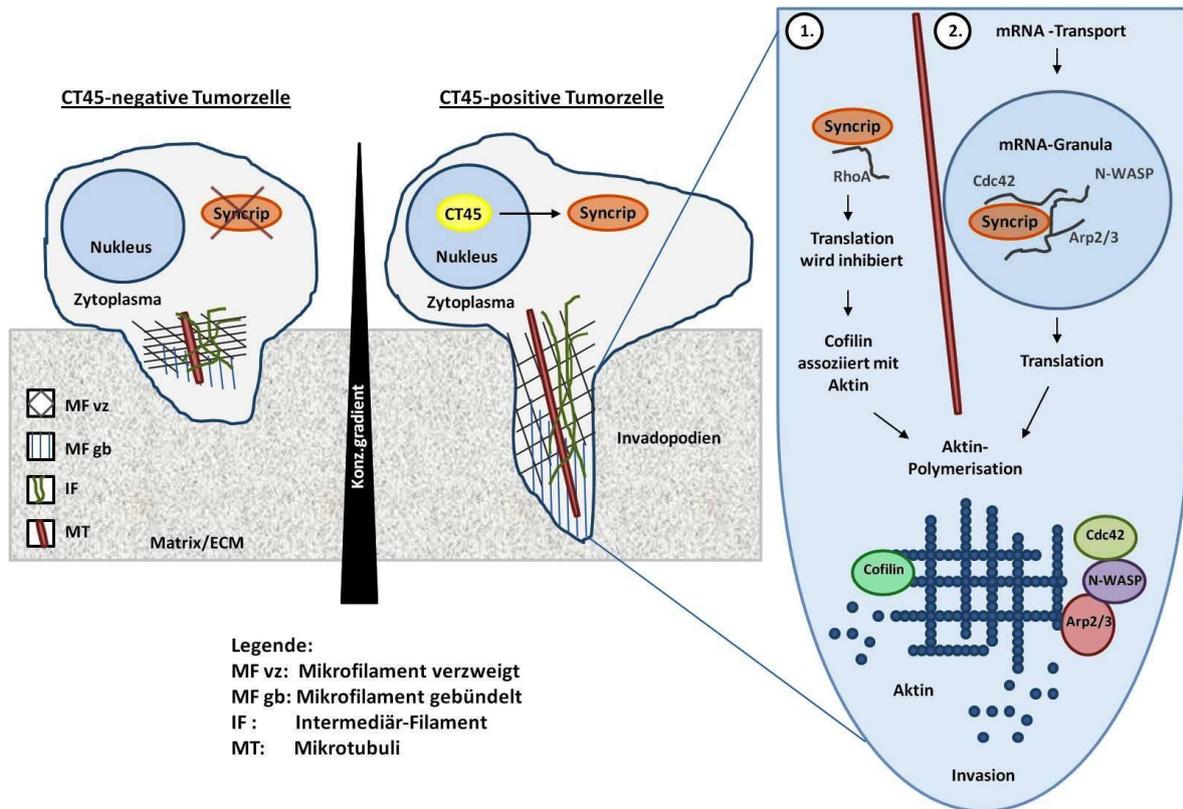


Abbildung 44: Hypothetisches Modell zur Regulation der CT45-vermittelten invasiven Wanderung gegen einen Konzentrationsgradienten. In CT45-exprimierenden Tumorzelllinien wird vermutlich die Generierung der Invadopodien über die verstärkte Translation von Syncrip positiv beeinflusst, so dass in den Zellen eine um 20 % verstärkte invasive Migration resultiert. Um die transendotheliale Wanderung voranzutreiben, ist das Mikrofilament-basierte Invadopodien-Wachstum an den zellulären Wachstumszonen essentiell. Aber auch die Intermediär-Filamente und Mikrotubuli tragen zur Funktionsfähigkeit der invasiven Fortsätze bei. Es wurden zwei Wege in murinen Neuronen publiziert, über die die zytoplasmatische Syncrip-Isoform die Zellmorphologie und die invasive Migration positiv beeinflussen kann. Weg 1: mSyncrip 1 interagiert mit der 3'-UTR der RhoA-mRNA. Durch diese Wechselwirkung wird die Translation blockiert, so dass eine Phosphorylierung von Cofilin verhindert wird. Die Assoziation zwischen Cofilin und Aktin bleibt bestehen, so dass eine Aktin-Polymerisation und damit einhergehend das Wachstum der Invadopodien vermittelt wird (Xing et al., 2012). Weg 2: mSyncrip 1 ist essentiell für die Transport-Stabilisierung der Cdc42/N-WASP/Arp2/3-Komplex-mRNA. Diese mRNA-Granula wird entlang der Mikrotubuli bis in die Spitzen der Invadopodien transportiert. Dort vermitteln die translatierten Proteine die Aktin-Polymerisation, so dass die Zellinvasion verstärkt wird (Chen et al., 2012). Wird die Akkumulation von CT45 gehemmt, resultiert die beschriebene negative Regulation von Syncrip. Die postulierten Wege werden vermutlich nur noch eingeschränkt induziert. Das Invadopodien-Wachstum wird verzögert, da die Aktin-Polymerisation an den Spitzen der invasiven Zellfortsätze reduziert wird.

Diskutiert wird allerdings, dass diese Strukturen Vorläufer der Invadopodien sind. Als Hinweis wird die starke Akkumulation von Fascin in den invasiven Ausläufern gesehen (Schoumacher et al., 2012). Dieser Mechanismus könnte einerseits die reduzierte Anzahl an Filopodien nach CT45-Herunterregulation erklären. Entwickeln sich aus den Filopodien die Invadopodien, könnte andererseits die eingeschränkte Invasion über diesen Weg begründet werden.

Vor der Zellinvasion steht die häufig über Integrine vermittelte Adhäsion an einer Oberfläche oder der extrazellulären Matrix. Die Anzahl der fokalen Adhäsionspunkte bzw. die Stärke der Adhäsion wird vermutlich ebenfalls durch CT45 beeinflusst. Ein möglicher Erklärungsansatz liegt auch hier in der veränderten peripheren Verteilung von Cdc42, N-WASP und Arp2/3. Die Interaktionen zwischen der Integrin-vermittelten Adhäsionsstelle und dem Zytoskelett werden bidirektional reguliert, so dass einerseits starke Adhäsionspunkte die Aktin-Polymerisation positiv beeinflussen. Auf der anderen Seite kann ebenfalls ein gut ausgebildetes Filamentgerüst die Adhäsion verstärken (Geiger et al., 2009). Diese Tatsache lässt die Vermutung zu, dass die über CT45-vermittelte geringere Konzentration von Cdc42/N-WASP und Arp2/3 in Regionen der Zellmembran die Bildung der fokalen Adhäsionskomplexe verzögert und/oder diese weniger stark ausgebildet werden. Das entscheidende Protein für die Bildung dieser Komplexe ist FAK. In Versuchen konnte gezeigt werden, dass nach Herunterregulation von CT45 weniger aktiviertes FAK Y397 induziert wird. Zudem wird in der Literatur diskutiert, dass FAK das invasive Zellwachstum begünstigen kann. FAK wird zwar nicht in den Invadopodien lokalisiert, aber eine starke Aktivierung führt über eine Phosphorylierungskaskade zur Src-vermittelten Regulation verschiedener Faktoren in den Invadopodien (Vitale et al., 2008). Die genaue Funktion ist unklar, allerdings konnte gezeigt werden, dass FAK die Matrixdegeneration über die Src-abhängige Rekrutierung von MT1-MMP (Membran Typ 1- Metalloproteinase) positiv beeinflusst (Wang und McNiven, 2012). Demnach wäre eine verminderte Aktivität von FAK nach CT45-Herunterregulation ein weiterer Faktor, der die Invasion negativ beeinflussen könnte.

Welche dieser diskutierten Mechanismen tatsächlich über CT45 beeinflusst werden, bleibt spekulativ und ist in Zukunft weiter zu untersuchen. Sicher ist allerdings, dass die Akkumulation von Syncrin negativ reguliert wird. Die Frage, wie CT45 die Anreicherung von Syncrin reguliert, bleibt ebenfalls fraglich. Da CT45 mit verschiedenen Kernproteinen interagiert, wären zahlreiche Möglichkeiten denkbar. Eine Hypothese ist, dass CT45 die mRNA-Prozessierung und damit die Translation von Syncrin beeinflusst (Abbildung 45).

Bisher wurde kein Transkriptionsfaktor beschrieben, der direkt durch CT45 reguliert wird. Zudem wird Akkumulation von Syncrip nur schwach über CT45 beeinflusst. Ein Effekt auf die Transkription ist daher unwahrscheinlich. Ein Großteil der CT45-Interaktionspartner ist mit dem RNA-Metabolismus, wie dem Spleißen (NPM, SFPQ), der RNA-Retention und dem Editing (NONO), dem mRNA-Export (NPM) oder der Ribosomen-Biogenese (DDX56, Nukleolin) verbunden.

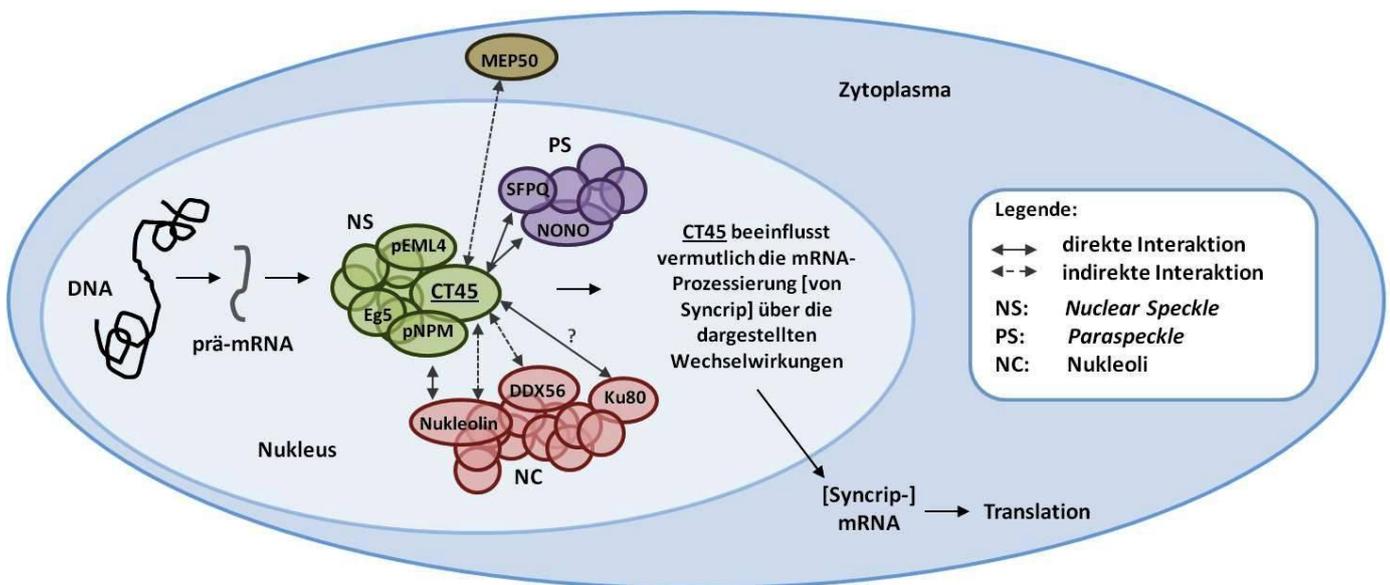


Abbildung 45: Hypothetisches Modell zur möglichen Funktion von CT45 im Zellkern. CT45 geht vermutlich eine direkte Wechselwirkung mit pNPM, pEML4, SFPQ und NONO ein. Für diese Proteine wurde die Interaktion sowohl *ex situ* als auch *in situ* bestätigt. Ku80 bindet vermutlich ebenfalls direkt an CT45, wobei aufgrund fehlender Koloalisationsstudien ein Fragezeichen stehen bleibt. Die Wechselwirkung mit den anderen Proteinen ist vermutlich aufgrund der fehlenden Überlagerung *in situ* eher indirekt. Eg5 und Nukleolin interagieren wahrscheinlich über den gemeinsamen Interaktionspartner NPM mit CT45. Die Wechselwirkung mit MEP50 ist aufgrund der zytoplasmatischen Lokalisation in jedem Fall indirekt. Die Untersuchungen zu DDX56 indizieren ebenfalls eine indirekte Interaktion. CT45 beeinflusst hypothetisch über die Wechselwirkung mit den aufgeführten Interaktionspartnern die mRNA-Prozessierung von Syncrip, da alle genannten Proteine, sowie die abgebildeten Kernkompartimente, essentiell an der Regulation des mRNA-Metabolismus beteiligt sind. Generell findet die Prozessierung (Spleißen, Editing, *Capping*, Polyadenylierung) und damit einhergehend die Modifizierung der prä-mRNA im Anschluss an die Transkription der DNA statt. Diese Vorgänge sind essentiell für den späteren Transport der reifen mRNA in das Zytoplasma und die dort stattfindende Translation. Ein verändertes Spleißen (in den *Nuclear Speckles*) oder Editing (in den *Paraspeckles*) kann die Translation unmöglich machen oder die Generierung eines funktionell anderen Proteins induzieren, als ursprünglich von der Zelle in „Auftrag“ gegeben wurde. Für die Zelle können schwerwiegende Effekte resultieren. CT45 ist vermutlich in die Regulation der Syncrip-mRNA-Prozessierung involviert, so dass eine Herunterregulation von CT45 hypothetisch die Translation von Syncrip negativ beeinflusst. Dies resultiert vermutlich in den bereits diskutierten Veränderungen der Zelladhäsion, Migration und Invasion (Abbildung 44).

Dies unterstützt ein hypothetisches Modell, wonach CT45 die mRNA-Prozessierung über die Wechselwirkung mit den genannten Proteinen beeinflusst. Beispielsweise könnte ein verändertes Spleißen in den *Nuclear Speckles* oder die Retention in den *Paraspeckles* resultieren. Denkbar wäre auch eine Regulation der miRNA- oder siRNA-Prozessierung an den *Paraspeckles*. Wie genau die Reifung der Syncrip-mRNA durch CT45 in diesem

spekulativem Modell beeinträchtigt wird, bleibt allerdings unklar und durch zukünftige Versuche zu analysieren.

Ein weiterer Aspekt, der im Zusammenhang mit CT-Antigenen diskutiert werden kann, ist die Genexpression in Tumor-Stammzellen. In der Literatur wird aufgrund der heterogenen CT-Antigen-Akkumulation im Tumorgewebe und der Assoziation mit der Zelldifferenzierung eine Verbindung zu Tumor-Stammzellen gezogen (Costa et al., 2007). Tumor-Stammzellen befinden sich in einem undifferenzierten Stadium und haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und unbegrenzter Proliferation. Es wird postuliert, dass die abweichende Genexpression von CT-Antigenen in den wenigen positiven Tumorzellen die Zelldifferenzierung inhibiert, so dass der Stammzell-Status erhalten bleibt. Tumor-Stammzellen werden in der Literatur mit metastasierenden Zellen und Rezidiven in Verbindung gebracht (Costa et al., 2007), so dass rein spekulativ ein Kontext mit dem gezeigten CT45-induzierten Effekt auf die Zellinvasion hergestellt werden könnte.

5.4. Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass CT45-positive Tumorzelllinien ein um 20 % erhöhtes Adhäsions-, Invasions- und Migrationsverhalten zeigen. Überträgt man diese im Zellsystem analysierten Erkenntnisse auf Tumorpatienten, könnte eine erhöhte Aggressivität CT45-positiver Tumore durch ein verstärktes Metastasierungspotential resultieren. Um diese These zu verifizieren, müssten in Zukunft Metastasen von CT45-positiven Tumoren genauer untersucht werden. Obwohl CT45 keinen für das Tumorwachstum entscheidenden Regulationsmechanismus, wie bsp. die Zellproliferation beeinflusst, stellt eine verbesserte Metastasierung, aus Sicht des Tumors, einen wichtigen Vorteil dar.

Die in der Literatur diskutierten Fragen, ob CT-Antigene grundsätzlich eine Funktion während der Tumorgenese haben oder nur ein irrelevantes Nebenprodukt darstellen, könnte dahingehend beantwortet werden, dass die Genexpression von CT45 einen eindeutigen Vorteil für den Tumor darstellt. Rückschlüsse auf die biologische Bedeutung der CT45-Akkumulation während der Keimzelldifferenzierung können aus diesen Experimenten meines Erachtens nicht gezogen werden. Ein bisher wenig untersuchter Aspekt der Bedeutung von CT45 ist die Genexpression in embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen.

Die Untersuchung der Bedeutung von CT45 bleibt auch zukünftig wegen der vielen offenen Fragen ein interessantes und wichtiges wissenschaftliches Anliegen.

6. Zusammenfassung

CT45 kann einer heterogenen Proteinfamilie, die als CT-X-Antigene bezeichnet wird, zugeordnet werden. Kennzeichnend für diese Proteine ist neben der Lokalisation des Genlocus auf dem X-Chromosom, eine ausschließliche Genexpression in den prämeiotischen Keimzellen des Hodens und der Placenta. Diese resultiert aufgrund einer genomweiten Hypomethylierung, die während der Keimzeldifferenzierung stattfindet. Die für die Tumorgenese wichtige zelluläre Transformation ist ebenfalls mit einer weitläufigen Demethylierung der DNA verbunden. Diese kann die Genexpression der CT-X-Antigene im Tumorgewebe induzieren. Die ersten CT-X-Antigene sind aufgrund der Detektion gegen sie gerichteter, spezifischer Antikörper in betroffenen Tumorpatienten in den Fokus der Wissenschaft gerückt. Interessant war die mögliche Entwicklung einer selektiven Tumor-Immuntherapie. Obwohl die ersten CT-X-Antigene bereits vor zwanzig Jahren beschrieben wurden, ist die Funktion dieser Proteine sowohl in Keimzellen, als auch in entsprechenden Tumoren, noch weitgehend unbekannt.

CT45 akkumuliert überwiegend in den *Nuclear Speckles* im Zellkern. In der pathologischen Diagnostik konnte gezeigt werden, dass CT45 zu einem hohen Prozentsatz in Hodgkin's-Lymphomen und Seminomen angereichert wird. Bisher konnten im Patienten keine CT45-spezifischen Antikörper detektiert werden. Allerdings wurde für Hodgkin's Lymphome eine Korrelation zwischen der Genexpression und der Schwere des Krankheitsverlaufs beschrieben. Zudem zeigten Patienten mit CT45-positiven multiplen Myelom eine signifikant geringere Lebenserwartung. Zu Beginn meiner Arbeit waren keinerlei Informationen über die zelluläre Relevanz dieses Proteins bekannt. Vor diesem Hintergrund ergab sich die Frage, welche Funktion CT45 in entarteten Zellen haben kann.

Grundlage meiner Untersuchungen war die Möglichkeit, die CT45-Proteinkonzentration über RNA-Interferenz zuverlässig in verschiedenen Modellzelllinien herunterzuregulieren. Zudem wurde eine Promotoranalyse zur Charakterisierung des Minimalpromotors durchgeführt. Im Rahmen meiner Arbeit wurden folgende Resultate erzielt:

- Der CT45-Minimalpromotor unterliegt vermutlich einer methylierungsabhängigen Genexpression, was durch frühere Arbeiten bestätigt wird.
- CT45 hat keinen Effekt auf die Regulation der Zellproliferation und des Zellzyklus.

- CT45 interagiert mit verschiedenen nukleären Proteinen, wie NPM, NONO, Syncrip, Ku80 und EML4.
- CT45 reguliert die Akkumulation des mRNA-assoziierten Proteins Syncrip.
- CT45 beeinflusst die Zellimpedanz und damit die Zelladhäsion und/oder Zellmorphologie.
- CT45 beeinflusst die gerichtete Invasion und Migration von Zellen in einem 3D-System.

Aus diesen Ergebnissen möchte ich schlussfolgern, dass CT45 eine negative Regulation von Syncrip, vermutlich über eine veränderte mRNA-Prozessierung, die über die Wechselwirkung mit den nukleären Interaktionspartnern resultiert, induziert. In der Literatur wird postuliert, dass Syncrip (hnRNP Q1) zum einen die Cdc42/N-WASP/Arp2/3-Komplex-vermittelte, zum anderen die RhoA/Cofilin-abhängige Regulation der Aktin-Dynamik in murinen Neuronen beeinflusst. Auf Grundlage meiner Ergebnisse kann vermutet werden, dass CT45 über die Regulation der Syncrip-Akkumulation die Zelladhäsion, Migration und Invasion in den untersuchten Tumorzelllinien positiv beeinflusst. Das erhöhte Invasions- und Migrationspotential könnte die höhere Aggressivität einiger CT45-positiver Tumore verschiedenen Ursprungs erklären.

7. Summary

The cancer/testis antigen 45 (CT45) is classified as a CT-X antigen. Characteristic for this heterogeneous group of proteins are (testicular) germ- and tumor cell-restricted gene expression patterns in the adult and the localization of the respective gene loci on the X-chromosome. The germ cell gene expression of CT-X antigens is believed to depend on a genome-wide hypomethylation. Therefore, the heterogeneous gene expression of CT antigens in different tumors might be due to demethylation of otherwise silent genes during cellular transformation. The first CT-X antigens were identified as targets of unusual antibodies in cancer patients. The apparent immunogenicity of some CT-X antigens in cancer patients and their selective gene expression in normal tissues indicated that CT-X antigens might serve as putative targets for cancer immunotherapy without affecting healthy normal tissue. However, although the first CT-X antigens have been identified two decades ago, in most cases, the physiological function of these proteins remains widely unknown.

For CT45, earlier studies revealed a nuclear localization of the antigen in Hodgkin's-Lymphoma and seminoma patients. More precisely, CT45 is specifically associated with so-called nuclear speckles. So far, however, anti-CT45 antibodies could not be isolated from Hodgkin's lymphoma patients or other patients with CT45-positive tumors. Nonetheless, CT45 gene expression in Hodgkin's-Lymphoma and multiple myeloma seems to be correlated to severe disease progression and poorer prognosis. As for many other CT-X antigens, the function of CT45 in normal and transformed cells is completely unknown.

During the present work, a promoter study was performed and CT45 accumulation was modulated in different cellular systems to get first insights into a possible function of this CT-antigen. Based on the obtained results, the following statements can be made:

- In line with earlier observations of our group, the CT45 minimal promoter is most probably regulated by transformation- dependent changes in DNA methylation.
- CT45 has no influence on cell proliferation and cell cycle regulation.
- CT45 interacts with several nuclear proteins, including pNPM, SFPQ, NONO, Ku80 and EML4.
- CT45 regulates the accumulation of the mRNA-interacting protein syncrip.
- CT45 affects adhesion and impairs invasion and migration in 3D-systems.

Based on the different experimental approaches, I would like to conclude that CT45 modulates the accumulation of syncrip presumably by influencing mRNA processing events through the interaction with several nuclear proteins involved in splicing and mRNA processing. It has been shown, that syncrip (hnRNP Q1) controls the Cdc42/N-WASP/Arp2/3 complex and RhoA/cofilin mediated actin dynamics in murine neuronal cells. Based on my results, we assume that CT45 influences the accumulation of syncrip and thereby alters cell adhesion, migration and invasion properties of the investigated tumor cells. The elevated invasive migratory capacity might explain why CT45-positive tumors of different origin were considered more aggressive.

8. Literaturverzeichnis

- Akerfeld M., E. Henriksson, A. Laiho, A. Vihervaara, K. Rautoma, N. Kotaja, L. Sistonen.** 2008. Promotor CHIP-ChIP analysis in mouse testis reveals Y chromosome occupancy by HSF2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 11224-29.
- Albriges-Rizo C., O. Destaing, B. Fourcade, E. Planus, M.R. Block.** 2009. Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesion. *J. Cell Science* 122: 3037-49.
- Algarra I., A. Garcia-Lora, T. Cabrera, F. Ruiz-Cabello, F. Garrido.** 2004. The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer immunol. Immunother.* 53: 904-10.
- Alldridge L.C., Bryant C.E.** 2003. Annexin I regulates cell proliferation by disruption of cell morphology and inhibition of cyclin D1 expression through sustained activation of the ERK1/2 MAPK signal. *Exp. Cell Res.* 290, 93-107.
- Ameyar M., M. Wisniewska, J.B. Weitzmann.** 2003. A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. *Biochemistry* 85: 747-52.
- Andrade V.C., A.L. Vettore, M.R. Regis Silva, R.S. Felix, M.S.S. Almeida, F. de Carvalho, M.A. Zago, O.L. Caballero, A.J. Simpson, G.W.B. Colleoni.** 2009. Frequency and prognostic relevance of cancer testis antigen 45 expression in multiple myeloma. *Exp. Hematol.* 37: 446-49.
- Arjonen A., R. Kaukonen, J. Ivaska.** 2011. Filopodia and adhesion in cancer motility. *Cell Adhesion & Migration* 5: 421-30.
- Babbin B.A., W.Y. Lee, C.A. Parkos, L.M. Winfree, A. Akyildiz, M. Perretti, A. Nusrat.** 2006. Annexin 1 regulates SKCO-15 cell invasion by signaling through formyl peptide receptors. *J. Biol. Chem.* 281: 19588-99.
- Balkwill F., A. Mantonani.** 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet Oncol.* 357: 539-45.
- Bannai H., K. Fukatsu, A. Mizutani, T. Natsume, S. Iemura, T. Ikegami, T. Inoue, K. Mikoshiba.** 2004. An DNA-interacting protein, SYNCRIP (heterogeneous nuclear ribonucleic protein Q1/NSAP1) is a component of mRNA granule transported with inositol 1,4,5-triphosphate receptor type 1 mRNA in neuronal dendrites. *J. Biol. Chem.* 279: 53427-34.
- Barker P.A., A. Salehi.** 2002. The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease. *J. of Neuro Science Research.* 67: 705-12.
- Bavisotto L., K. Kaushansky, N. Lin, R. Hromas.** 1991. Antisense oligonucleotides from the stage-specific myeloid zinc finger gene MZF-1 inhibit granulopoiesis in vitro. *J. Exp. Med.* 174: 1097-101.
- Bennett M., S. Michaud, J. Kingston, R. Reed.** 1992. Protein components specifically associated with pre spliceosome and spliceosome complexes. *Genes Dev.* 6: 1986-2000.
- Berth M., F.M. Moser, M. Knolle, J. Bernhardt.** 2007. The state of art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 1223-43.
- Bertrand P., C. Bastard, C. Maingonnat, F. Jardin, C. Maisonneuve, M.N. Courel, P. Ruminy, et al.,** 2007. Mapping of MYC breakpoints in 8q24 rearrangements involving non-immunoglobulin partners in B-cell lymphomas. *Leukemia.* 21: 515-23.
- Borer R.A., C.F. Lehner, H.M. Eppenberger, E.A. Nigg.** 1989. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 56: 379-90.
- Bravo-Cordero J.-J., L. Hodgson, J. Condeelis.** 2012. Directed cell invasion and migration during metastasis. *Cur. Op. Cell Biol.* 24: 277-83.
- Breitschneider D., S.A. Koestler, I. Chizhov, M. Nemethova, J. Mueller, B.L. Goode, J.V. Small, K. Rottner, J. Felix.** 2011. Cofilin cooperates with fascin to disassemble filopodial actin filaments. *J. Cell Sci.* 124: 3305-18.

- Bresnick E.H., M.L. Martowicz, S. Pal, K.D. Johnson.** 2005. Development control via GATA factor interplay at chromatin domains. *J. Cell Physiol.* 205: 1-9.
- Bürglein T.R.** 1997. Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Res.* 25: 4173-80.
- Bushey A.M., Dorman E.R., Corces V.G.** 2011. Chromatin insulators: regulatory mechanisms and epigenetic inheritance. *Mol. Cell.* 32: 1-9.
- Caballero O.L., Y.T. Chen.** 2009. Cancer/Testis (CT) antigens: Potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci.* 11: 2014-21.
- Camargo A.A., D.N. Nunes, H.B. Samaia, L. Liu, V.P. Collins, A.J.G. Simpson, E. Dias-Neto.** 2001. Molecular characterization of DDC26, a human DEAD-box RNA helicase, located on chromosome 7p12. *Braz. J. Med. Res.* 34: 1237-45.
- Cavallo F., C. De Giovanni, P. Nanni, G. Forni, P.-L. Lollini.** 2011: the immune hallmarks of cancer. *Cancer immune. immunother.* 60: 319-26.
- Cavallo F., R.A. Calogero, G. Forni.** 2007. Are oncoantigens suitable targets for anti-tumor therapies? *Nat. Rev. Cancer* 7: 707-13.
- Celis E., J. Fikes, P. Wentworth, J. Sidney, S. Southwood, A. Maewal, M.F. Del Guercio, A. Sette and B. Livingston.** 1994. Cytotoxic T lymphocytes that recognize decameric peptide sequences of retinoblastoma binding protein 1 (RBP-1) associated with human breast cancer. *Mol. Immunol.* 18: 1423-30.
- Cerveira N., C. Meyer, J. Santos, L. Torres, S. Lisboa., M. Pinheiro, S. Bizarro, C. Correia, L. Norton, R. Marschalek, M.R. Teixeira.** 2010. A novel splice fusion of MLL with CT45-A2 in a pediatric biphenotypic acute leukemia. *BMC Cancer* 10: 518-27.
- Changanamkandath R., D.K. Baker, A.J. Pierce, D.L. Pittmann.** 2010. The splicing-factor related protein SFPQ/PSF interacts with RAD51D and is necessary for homology-directed repair and sister chromatid cohesion. *Nucleic Acids Res.* 39: 132-45.
- Charron F., M. Nemer.** 1999. GATA transcription factors and cardiac development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10: 85-91.
- Chen H.H., H.I. Yu, W.C. Chiang, Y.D. Lin, B.C. Shia, W.Y. Tarn.** 2012. hnRNP-Q1 regulates Cdc42-mediated neuronal morphogenesis. *Mol. Cell Biol.* 32: 2224-38.
- Chen M.C., Y.C. Chiang, C.M. Ho, Y.L. Chen, W.F. Cheng, C.Y. Chou.** 2012. New primers for methylation specific polymerase chain reaction enhance specificity of detecting STAT1 methylation. *Taiwan J. Obstet. Gynecol.* 51: 43-49.
- Chen Y.T., A. Chadburn, P. Lee, M. Hsu, E. Ritter, A. Chiu, S.Gnjatic, M. Pfreundschuh, D.M. Knowles and L.I. Old.** 2009. Expression of cancer testis antigen CT45 in classical Hodgkin's-Lymphoma and other B-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107: 3093-98.
- Chen Y.T., M. Hsu, P. Lee, S.J. Shin, P. Mhawech-Fauceglia, K. Odunsi, N.K. Altorki, C.J. Song, B.Q. Jin, A.J. Simpson and L.I. Old.** 2009. Cancer/testis antigen 45: Analysis of mRNA and Protein expression in human cancer. *Int. J. Cancer* 124: 2893-98.
- Chen Y.T., M.J. Scanlan, C.A. Venditti.** 2005. Identification of cancer/testis antigen genes by massively parallel signature sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 7940-45.
- Chen Y.T., M.J. Scanlan, U. Sahin, Ö. Türeci, A.-O. Gure, S. Tsang, B. Williamson, E. Stockert, M. Pfreundschuh, Lloyd J.** 1997. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancer detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 1914-18.
- Chen Y.T., R. Chiu, P. Lee, D. Beneck, B. Jin, L.I. Old.** 2011. Chromosom X encoded cancer/testis antigen show distinctive expression patterns in developing gonads and testicular seminoma. *Human Reprod.* 26: 3232-43.
- Cheng Y.H., E.W.P. Wong, C.Y. Cheng.** 2011. Cancer/Testis (CT) antigens, carcinogenesis and spermatogenesis. *Landes BioScience* 3:209-20.

- Cirinio G., C. Cicala, L. Sorrentino, G. Ciliberto, G. Arpaia., M. Perretti, R.J. Flower.** 1993. Anti-inflammatory actions of an N-terminal peptide from human lipocortin 1. *Br. J. Pharmacol.* 108: 573-74.
- Colombo E., M. Alcalay, P.G. Pelicci.** 2011. Nucleophosmin and its complex network: a possible therapeutic target in hematological diseases. *Oncogene* 30: 2595-609.
- Colombo M.P., S. Piconese.** 2007. Regulatory T-cell inhibition versus depletion: the right choice in cancer immunotherapy. *Nat. rev. Cancer* 7: 880-87.
- Cossmann J., C.M. Annunziata, S. Barash, L. Staudt., P. Dillon, W.W. He.** 1999. Reed-Sternberg cell genome expression supports a B-cell lineage. *Blood* 94: 411-16.
- Costa F.F., K. LeBlanc, B. Brodin.** 2007. Concise Review: Cancer/Testis Antigens, Stem Cells, and Cancer. *Stem Cells* 25: 707-11.
- Costello J.F., M.C. Fruhwald, D.J. Smiraglia, L.J. Rush, G.P. Robertson, X. Gao., F.A. Wright, J.D. Feramisco, P. Peltomaki, J.C. Lang et al.** 2000. Aberrant CpG-Island methylation has non-random and tumor-specific patterns. *Nat. Genet.* 24: 132-38.
- Coussens L.M., Z. Werb.** 2002. Inflammation and Cancer. *Nature* 420: 860-67.
- Cronwright G., K. LeBlanc, C. Götherstörn, P. Darcy, M. Ehnman, B. Brodin.** 2005. Cancer/Testis Antigen expression in human mesenchymal stem cells: Down regulation of SXX impairs cell migration and matrix metalloproteinase 2 expression. *Cancer Res.* 65: 2207-15.
- Curzick J., F. Otto, J.A. Baron, P.H. Brown, J. Burn, P. Greenwald, J. Jankowski, C. La Vecchia, F. Meyskens, H.J. Senn, M. Thun.** 2009. Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: an international consensus statement. *Lancet Oncol.* 10: 501-7.
- Daniely Y., D.D. Dimitrova, J.A. Borowiec.** 2002. Stress-dependent nucleolin mobilization mediated by p53-nucleolin complex formation. *Mol. Cell Biol.* 22: 6014-22.
- De Forges H., A. Bouissou, F. Perez.** 2012. Interplay between microtubule dynamics and intracellular organization. *Biochem. & Cell Biology* 44: 266-74.
- De Smet C., C. Lurquin, B. Lethe, V. Martelange, T. Boon.** 1999. DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol. Cell. Biol.* 19: 7327-35.
- Diehl V., H. Burcher, M. Schaadt, H.H. Kirchner, C. Fonatsch, H. Stein, J. Gerdes, W. Heit, A. Ziegler.** 1984. Hodgkin's Disease cell lines: Characteristics and biological activities. *Hämatol Bluttransf.* 28: 411-7
- Downward J.,** 2003. Targeting RAS signaling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 3: 11-22.
- Dunn G.P., A.T. Bruce, H. Ikeda, L.J. Old, R.D. Schreiber.** 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. immunol.* 3: 991-98.
- Dunn G.P., L.J. Old, R.D. Schreiber.** 2004. The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* 22: 329-60.
- Eferl R., E. Wagner.** 2003. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 3: 859-68.
- Ehrlich P.** 1909. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 5: 273-90.
- Espejel S., S. Franco, S. Rodriguez-Perales, S.D. Bouffler, J.D. Cigudosa, M.A. Blasco.** 2002. Mammalian Ku86 mediates chromosomal fusions and apoptosis caused by critically short telomeres. *EMBO J.* 21: 2207-19.
- Ezratty. E.J., M.A. Partridge, G.G. Gundersen.** 2005. Microtubule-induced focal-adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nat. Cell Biol.* 7: 581-90.
- Falini B., E. Tiacci, A. Liso, K. Basso, E. Sabbatini, R. Pacini, R. Foa, A. Pulsoni, R. Dalla Favera, S. Pileri.** 2004. Simple diagnostic assay for hairy cell leukemia by immunocytochemical detection of annexin A1 (ANXA1). *Lancet Oncol.* 363: 1869-70.
- Falini B., I. Nicoletti, N. Bolli, M.P. Martelli, A. Liso, P. Gorello.** 2007. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica* 92: 519-32.

- Felts S.J., B.A. Owen, P. Nguyen, J. Trepel, D.B. Donner, D.O. Toft.** 2000. The hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties. *J. Bio. Chem.* 275: 3305-12.
- Finn O.J.** 2003. Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nat. rev. immunol.* 3: 630-41.
- Fiszer D., M. Kurpiz.** 1998. Major histocompatibility complex expression on human, male germ cells: a review. *Am. J. Reproductive Immunology* 40: 172-76.
- Fox A.H., A.I. Lamond.** 2010. Paraspeckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2:a000687.
- Frank D.A.** 2003. STAT signaling in cancer: Insights into pathogenesis and treatment strategies. *Cancer Treat. Res.* 115: 267-91.
- Frehlick L.J., J.M. Eirin-Lopez, J. Ausio.** 2007. New insights into the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones. *Bioessays* 29: 49-59.
- Friesen W.J., A. Wyce, S. Paushkin, L. Abel, J. Rappsilber, M. Mann, G. Dreyfuss.** 2002. A novel WD repeat protein component of the methylosome binds Sm proteins. *J. Biol. Chem.* 277: 8243-47.
- Fulai J., Y. Li., B. Ren., R. Natarajan.** 2011. Enhancers: Multi-dimensional signal integrators. *Transcription* 5: 226-230.
- Fuller-Pace F.V.** 2006. DExD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation. *J. Cell Sci.* 112: 761-72.
- Garcia P., J.M. Fernandez, M.P. Morgan, R.O. Herrero, A. Zapatero, M.V. Gonzalez. C. Suarez Nieto, J.P. Rodrigo.** 2004. Annexin A1 down-regulation in head and neck cancer is associated with epithelial differentiation status. *Am. J. Pathol.* 164: 73-79.
- Gardner M.K., D.C. Bouck, L.V. Paliulis, J.B. Meehl, E.T. O'Toole, J. Haase, A. Soubry et al.** 2008. Chromosome congression by Kinesin-5 motor-mediated disassembly of longer kinetochore microtubules. *Cell* 135: 894-906.
- Garrido F., I. Algarra.** 2001. MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv. Cancer Res.* 83: 117-58.
- Gavins F.N., S. Yona, A. Kamal, R.J. Flower, M. Perreti.** 2003. Leukocyte anti adhesive actions of annexin I: ALXR- and FPR-related anti-inflammatory mechanisms. *Blood* 101: 4140-47.
- Geiger B., J.P. Spatz, A. D. Bershadsky.** 2009. Environmental sensing through focal adhesion. *Nat. reviews* 10: 21-33.
- Ghafouri-Fard S., M.H. Modarressi.** 2009. Cancer-testis antigens: potential targets for cancer immunotherapy. *Arch. Iranian. Med.* 12: 395-404.
- Glauber B., B. van den Eynde and P. van der Bruggen.** 1994. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 179: 921-30.
- Gligorijevic, B., J. Wyckoff, H. Yamaguchi, Y. Wang, E.T. Roussos, J. Condeelis.** N-WASP mediated invadopodium formation is involved in intravasation and lung metastasis of mammary tumors. *J. Cell Science* 125: 724-34.
- Goelz S.E., B. Vogelstein, S.R. Hamilton, A.P. Feinberg.** 1985. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science* 228: 187-90.
- Gozani O., J.G. Patton, R. Reed.** 1994. A novel set of spliceosome-associated proteins and the essential splicing factor PSF bind stably to pre-mRNA prior to catalytic step II of the splicing reaction. *EMBO J.* 13: 3356-67.
- Gronostajski R.M.** 2000. Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development. *Gene* 249: 31-45.
- Guan J.L., Shalloway D.** 1992. Regulation of focal-adhesion associated protein tyrosin kinase by both cellular adhesion and oncogenic transformation. *Nature* 358: 690-92.
- Gullo, C., M. Au, G. Feng, G. Teoh.** 2006. The biology of Ku and its potential oncogenic role in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1765: 223-34.
- Hanahan D., R.A. Weinberg.** 2000. The hallmark of cancer. *Cell* 100: 57-70.

- Harries C.E., R.A. Boden, C.R. Astell.** 1999. A novel heterogenous nuclear ribonucleoprotein-like protein interacts with NS1 of the minute virus of mice. *J. Virol.* 73: 72-80.
- Harrison D.A.** 2012. The JAK/STAT Pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4 pii: a011205.
- He L.C., Z.M. Gu, C.X. Liu, G.Q. Chen, Y.F. Wang, D.H. Wen, Y.L. Wu.** 2011. Ikaros is degraded by proteasome-dependent mechanism in the early phase of apoptosis induction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 406: 430-4.
- Hessens S., M. Fornerod.** 2007. The inner nuclear envelope as a transcription factor resting place. *EMBO Reports* 8: 914-919.
- Heidebrecht H.-J., A. Claviez, M.L. Kruse, M. Pollmann, F. Buck, S. Harder, M. Tiemann, W. Dörffel, R. Parwaresch.** 2006. Characterization and expression of CT45 in Hodgkin's-Lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 12: 4804-11.
- Heidebrecht H.J., F. Buck, J. Steinmann, R. Sprenger, H.H. Wacker, R. Parwaresch.** 1997. P100: A novel proliferation-associated nuclear protein specifically restricted to cell cycle phases S, G₂ and M. *Blood* 90: 226-33.
- Helfand B.T., M.G. Mendez, S.N. Prasanna Murthy, D.K. Shumaker, B.G. Saleemulla-Mahammad, U. Aebi, T. Wedig et al.,** 2011. Vimentin organization modulates the formation of lamellipodia. *Mol. Biol. Cell.* 22: 1274-89.
- Hening D., B.R. So, R. Jin, L.F. Lau, B.C. Valdez.** 2003. Silencing of RNA helicase II/Gu alpha inhibits mammalian ribosomal RNA production. *J. Biol. Chem.* 278: 52307-14.
- Hess J., P. Angel, M. Schropp-Kristner.** 2004. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J. Cell Sci.* 117: 5965-73.
- Higgs H.N. and T.D. Pollard.** 2001. Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by diverse array of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 649-76.
- Hisang C.H., T. Tunoda, Y.E. Whang, D.R. Tyson, D.K. Ornstein.** 2006. The Impact of altered annexin I protein levels on apoptosis and signal transduction pathways in prostate cancer cells. *Prostate* 66: 1413-24.
- Holmström T.H., A. Mialon, M. Kallio, Y. Nymalm, L. Mannermaa, T. Holm, H. Johansson, E. Black, D. Gillespie et al.,** 2008. C-Jun supports ribosomal RNA processing and nucleolar localization of RNA helicase DDX21. *J. Bio. Chem.* 283: 7046-53.
- Houtman S.H., M. Rutteman, C.I. De Zeeuw, P.J. French.** 2007. Echinoderm microtubule-associated protein like protein 4, a member of the echinoderm microtubule-associated protein family, stabilizes microtubules. *NeuroScience* 144: 1373-82.
- Howard A., S.R. Pelc.** 1953. Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity* 6: 261-73.
- Hrebicek T., K. Durrschmid, N. Auer, K. Bayer, A. Rizzi.** 2007. Effect of CyDye minimum labeling in differential gel electrophoresis on the reliability of protein identification. *Electrophoresis* 28: 1161-1169.
- Hsu H.L., D. Gilley, E.H. Blackburn, D.J. Chen.** 1999. Ku is associated with the telomere in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 12454-58.
- Inder K.L., C. Lau, D. Loo, N. Chaudhary, A. Goodall, S. Martin, A. Jones, D. v.D.Hoeven, R.G. Parton et al.,** 2009. Nucleophosmin and nucleolin regulate K-Ras plasma membrane interactions and signal transduction. *J. Biol. Chem.* 284: 28410-19.
- Iwanicki M.P., T. Vomastek, R.W. Tilghman, K.H. Martin, J. Banerjee, P.B. Wedegaertner, J.T. Parsons.** 2008. FAK, PDZ-RhoGEF and ROCKII cooperate to regulate adhesion movement and tailing-edge retraction in fibroblasts. *J. Cell Sci.* 121: 895-905.
- Jacobo P., V.A. Guazzone, M. S. Theas, L. Lustig.** 2011. Testicular autoimmunity. *Autoimmun. Reviews* 10: 201-4.
- Javahery R., A. Khachi, K. Lo, B. Zenzie-Gregory, S.T. Smale.** 1994. DNA Sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 14: 116-17.
- Jin S., D.T. Weaver.** 1997. Double-strand break repair by Ku70 requires heterodimerization with Ku80 and DNA binding functions. *EMBO J.* 16: 6874-85.

- Juven-Gershon T., J.-Y. Hsu, J. Theisen, J.T. Kadonaga.** 2008. The RNA polymerase II core promoter—the gateway to transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20: 253-59.
- Kallio M., Y. Chang, M. Manuel, T.P. Alastalo, M. Rallu, Y. Gitton, L. Pirkkala, M.T. Loones, L. Paslaru, S. Larney et al.** 2002. Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice. *EMBO J.* 21: 2591-601.
- Kamesaki H., S. Fukuhara, E. Tatsumi, H. Uchino, H. Yamabe, H. Miwa, S. Shirakawa, et al.,** 1986. Cytochemical, immunologic, chromosomal, and molecular genetic analysis of a novel cell line derived from Hodgkin's disease. *Blood* 68: 285-92.
- Karf A.R.** 2006. A potential role for epigenetics modulatory drugs in the enhancement of cancer/germ-line antigen vaccine efficacy. *Epigenetics* 3: 116-20.
- Kashimada K., P. Koopmann.** 2010. Sry: the master switch in mammalian sex determination. *Development* 137: 3921-30.
- Katasuma M., T. Okudaira, A. Samanta, D.P. Clark, J.A. Drebin, P. Jolicoeur and M.I. Greene.** 1995. Prevention of breast tumor development in vivo by down regulation of the p185neu receptor. *Nat. Med.* 1: 644-48.
- Kaur K.J., L. Ruben.** 1994. Protein translation elongation factor-1 from Trypanosoma brucei binding calmodulin. *J. Biol. Chem.* 269: 23045-50.
- Kerppola T.K.** 2009. Polycomb group complexes—many combinations, many functions. *Trends Cell Biol.* 19: 692-704.
- Khong T.H. and N.P. Restifo.** 2006. Natural selection of tumor variants in the generation of 'tumor escape' phenotypes. *Nat. Immunol.* 3: 999-1005.
- Kim K., D.D. Dimitrova, K.M. Carta, A. Saxena, M. Daras, J.A. Borowiec.** 2005. Noval checkpoint response to genotoxic stress mediated by nucleolin-replication protein a complex formation. *Mol. Cell Biol.* 25: 2463-74.
- Kimmins S., P. Sassons Corsi.** 2005. Chromatin remodeling and epigenetic features of germ cells. *Nature* 434: 583-89.
- Kircher H.H., H. Burrichter, H. Stein, Ch. Fonatsch, M. Schaadt, A. Ziegler, W. Heit, V. Diehl.** 1983. Characteristics of Hodgkin's cell lines. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 108: 936-44.
- Klier M.** 2008. Beeinflussung der Expression von Cyclin D1 in Mantelzell Lymphom Zelllinien durch lentiviral produzierte siRNA. *Dissertation FU Berlin.*
- Koike M., T. Awaji, M. Kataoka, G. Tsujimoto, T. Kartasova, A. Koike, T. Shiomi.** 1999. Differential subcellular localization of DNA-dependent protein kinase components Ku and DNA-PKcs during mitosis. *J. Cell Sci.* 112: 4031-39.
- Korman A.J., K.S. Peggs J.P.** 2006. Checkpoint blockade in cancer immunotherapy. *Adv. Immunol.* 90:297-339.
- Kuper H., H.O. Adami, D. Trichopoulos.** 2000. Infection as a major preventable cause of human cancer. *J. Intern. Med.* 248: 171-83.
- Lee J.H., D. Schütte, G. Wulf, L. Füresi, H.J. Radzun, S. Schweyer, W. Engel, K. Nayerina.** 2006. Stem-cell protein Piwil2 is widely expressed in tumors and inhibits apoptosis through activation of STAT3/BCL-X_L pathway. *Human Molecular Genetics* 15: 201-11.
- Li A., J.C. Dawson, M. Forero-Vargas, H.J. Spence, X. Yu, I. Konig, K. Anderson, L.M. Machesky.** 2010. The actin-bundling protein fascin stabilizes actin in invadopodia and protrusive invasion. *Curr. Biol.* 20: 339-45.
- Li L.L. und N.H. Yeh.** 1992. Cell cycle-dependent migration of DNA-binding protein Ku80 into nucleoli. *Exp. Cell Res.* 199: 262-68.
- Li S., W.W. Kuhne, A. Kulharya, F.Z. Hudson, K. Ha, Z. Cao, W.S. Dynan.** 2009. Involvement of p54(nrb), a PSF partner protein, in DNA double strand break repair and radioresistance. *Nucleic Acids Res.* 37: 6746-53.
- Li Y.P., R.K. Busch, B.C. Valdez, H. Busch.** 1996. C23 interacts with B23, a putative nucleolar-localization-signal-binding protein. *Eur. J. Biochem.* 237: 153-8.

- Liang J.J., Z. Wang, L. Chiriboga, M.A. Greco, E. Shapiro, H. Huang, X.J. Xang, J. Huang, Y. Peng, J. Melamed, M.J. Garabedian, P. Lee.** 2007. The expression and function of androgen receptor coactivator p44 and protein arginine methyltransferase 5 in the developing testis and testicular tumors. *J. Urol.* 177: 1918-22.
- Liao G., B. Simone, G. Liu.** 2011. Localization of Arp2 mRNA impairs persistence of directional cell migration. *Exp. cell Res.* 317: 812-22.
- Lindenboim L., E. Blacher, C. Borner, R. Stein.** 2010. Regulation of stress induced nuclear protein redistribution: a new function of Bax and Bak uncoupled from Bcl-X_L. *C. Death. Diff.* 17: 346-59.
- Linder S., K. Hufner, U. Wintergerst, M. Äpfelbacher.** 2000. Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. *J. Cell Sci.* 113: 4165-76.
- Link P.A., O. Gangisetty, S.R. James.** 2009. Distinct roles for histon methyltransferases G9a and GLP in cancer germ-line antigen gene regulation in human cancer cells and murine embryonic stem cells. *Mol. Cancer Res.* 6: 851-62.
- Lloyd J. Old, Yao-Tseng Chen.** New paths in human cancer serologie. 1998. *J. Exp. Med.* 187: 1163-67.
- Lollini P.L., G. Nicoletti, L. Landuzzi, F. Cavallo, G. Forni, C. De Giovanni, P. Nanni.** 2011. Vaccines and other immunological approaches for cancer immunoprevention. *Curr. Drug Targets* 12: 1957-73.
- Macleod D., J. Charlton, J. Mullins, A.P. Bird.** 1994. Sp1 sites in the mouse aprt gene promoter are required to prevent methylation of the CpG islands. *Genes Dev.* 8: 2282-92.
- Mader A., S. Brüderlein, S. Wagner, I. Melzner, S. Popov, H.K. Müller-Hermelink T.F. Barth, A. Viardot, P. Möller.** 2007. U-HO1, a new cell line derived from a primary refractory classical Hodgkin's-Lymphoma. *Cytogenetic & Genome Research* 119: 204-10.
- Madesh M., G. Hajnoczky.** 2001. VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release. *J. Cell Biol.* 155: 1003-15.
- Maeda H., T. Akaika.** 1998. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation and cancer. *Biochemistry* 63: 854-65.
- Meissner M., T. Dechat, C. Gerner, R. Grimm, R. Foisner, G. Saueremann.** 2000. Differential nuclear matrix association of splicing factors PSF and PTB. *J. Cell. Biochem.* 76: 559-66.
- Mimori T., M. Akizuki, H. Yamagata, S. Inada, S. Yoshida, M. Homma.** 1981. Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J. Clin. Invest.* 68: 611-20.
- Mo X., W.S. Dynan.** 2002. Subnuclear localization of Ku Protein: Functional association with RNA polymerase II elongation sites. *Mol. Cell Biol.* 22: 8088-99.
- Molnár A., K. Georgopoulos.** 1994. The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol. Cell Biol.* 14: 8292-303.
- Moriya S., K. Tanaka, M. Ohkuma, S. Sugano, T. Kudo.** 2001. Diversification of the microtubule system in the early stage of eukaryote evolution: elongation factor 1 α and α -tubulin protein phylogeny of termite symbiotic oxymonad and hypermastigote protists. *J. Mol. Evol.* 52: 6-16.
- Mourelatos Z., L. Abel, J. Yong, N. Kataoka, G. Dreyfuss.** 2001. SMN interacts with noval family of hnRNP and spliceosomal proteins. *EMBO J.* 20: 5443-52.
- Mudduluru G., P. Vajkoczy, H. Allgayer.** 2010. Myeloid Zinc Finger 1 induces migration, invasion, and in vivo metastasis through Axl gene expression in solid cancer. *Mol. Cancer Res.* 8: 159-69.
- Murphy D.A., S.A. Courtneidge.** 2011. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat. Reviews* 12: 413-26.
- Nanni P., G. Nicoletti, C. De Giovanni, L. Landuzzi, C.E. Di, F. Cavallo, S.M. Pupa, I. Rossi, M.P. Colombo, et al.,** 2001. Combined allogenic tumor cell vaccination and systemic interleukin 12 prevents mammary carcinoma in HER-2/neu transgenic mice. *J. Exp. Med.* 194: 1195-205.

- Nicholaou T., L.M. Ebert, I.D. Davis, G.A. McArthur, H. Jackson, N. Dimopoulos, B. Tan, E. Maraskovsky, L. Miloradovic et al.** 2009. Regulatory T-cell-mediated attenuation of T-cell responses to the NY-ESO-1 ISCOMATRIX vaccine in patients with advanced malignant melanoma. *Clin. Cancer Res.* 15: 2166-73.
- Nicoletti G., C. De Giovanni, P.L. Lollini, G.P. Bagnara, K. Scotlandi, L. Landuzzi, B. Del Re., G. Zauli, G. Prodi, P. Nanni.** 1989. In vivo and in vitro production of haemopoietic colony-stimulating activity by murine cell lines of different origin: a frequent finding. *Eur. J. Cancer clin. Oncol.* 25: 1281-86.
- Nilsson K., H. Bennich, S.G.O. Johansson, J. Ponten.** 1970. Established immunoglobulin producing myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from IgE myeloma patient. *Clin. Exp. Immunol.* 1970: 477-89.
- Nizami Z., S. Deryusheva, J.G. Gall.** 2010. The Cajal body and histone locus body. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000653.
- Nourse J., J. Melletntin, N. Galili, J. Wilkinson, E. Stanbridge, S. Smith, M. Cleary.** 1990. Chromosomal translocation t(1;19) results in synthesis of a homeobox fusion mRNA that codes for a potential chimeric transcription factor. *Cell* 60: 535-45.
- Old Lloyd J.** 2005. Cancer/Testis (CT) antigens – a new link between gametogenesis and cancer. *Cancer Immunity* 1: 1-7.
- Orkin S.H.** 1992. GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* 80: 575-81.
- Oser M., H. Yamaguchi, C.C. Mader, J.J. Bravo-Cordero, M. Arias, X. Chen, V. Desmarais, van Rheenen J., A.J. Koleske, Condeelis J.** 2009. Cortactin regulates cofilin and N-WASP activities to control the stage of invadopodium assembly and maturation. *J. Cell Biol.* 186: 571-87.
- Oser M., A. Dovas, D. Cox, J. Condeelis.** 2012. Nck1 and Grb2 localization patterns can distinguish invadopodia from podosomes. *Eur. J. Cell Biol.* 90: 181-18.
- Owen K.A., F.J. Pixley, K.S. Thomas, M. Vicente-Manzanares, B.J. Ray, A.F. Horwitz, J.T. Parsons, H.E. Beggs et al.,** 2007. Regulation of lamellipodia persistence, adhesion turnover, and motility in macrophages by focal adhesion kinase. *J. Cell Biol.* 179: 1275-87.
- Palazzo A.F., C.H. Eng, D.D. Schlaepfer, E.E. Marcantonio, G.G. Gundersen.** 2004. Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling. *Science* 303: 836-39.
- Pan Y.R., C.L. Chen, H.C. Chen.** 2010. FAK is required for assembly of podosome rosettes. *J. Cell Biol.* 195: 113-29.
- Patton J.G., E.B. Porro, J. Galceran, P. Tempst, B. Nadal-Ginard.** 1993. Cloning and characterization of PSF, a novel pre-mRNA splicing factor. *Genes Dev.* 7: 393-406.
- Paukku K., O. Silvennoinen.** 2004. STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from STAT5. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15: 435-55.
- Payne K-J., S. Dovat.** 2011. Ikaros and tumor suppression in acute lymphoblastic leukemia. *Crit. Rev. Oncog.* 16: 3-12.
- Pederson T.** 1998. The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res.* 16: 3871-6.
- Peng Y., F. Chen, J. Melamed, L. Chiriboga, J. Wei, X. Kong, M. Mcleod, Y. Li, C.X. Li, A. Feng, M.J. Garabedian, Z. Wang, R.G. Roeder, P. Lee.** 2007. Distinct nuclear and cytoplasmic functions of androgen receptor cofactor p44 and association with androgen receptor-independent prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 5236-41.
- Peng Y., L.L. Gellert, X. Zou, J. Wang, B. Singh., R. Xu, L. Chiriboga, R. Pan, D.Y. Zhang, M.J. Garabedian, R.J. Schneider, Z. Wang, P. Lee.** 2010. Androgen receptor coactivator p44/MEP50 in breast cancer growth and invasion. *J. Cell Mol. Med.* 14: 2780-9.
- Perner S., P.L. Wagner, F. Demichelis, R. Mahre, C.J. Lafargue, B.J. Moss S. Arbogast et al.** 2008. EML4-ALK fusion lung cancer: a rare acquired event. *Neoplasia* 10: 298-302.

- Perrotti D., P. Melotti, T. Skorski, I. Casella, C. Peschle, B. Calabretta.** 1995. Overexpression of the zinc finger protein MZF1 inhibits hematopoietic development from embryonic stem cells: correlation with negative regulation of CD34 and c-myc promoter activity. *Mol. Cell Biol.* 15: 6075-87.
- Peterson T.** 2010. The Nucleolus. *Cold Spring Harb. Perspect. Bio.* 3, a000638.
- Pikkala L., P. Nykanen, L. Sistinen.** 2001. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASB J.* 5: 1118-31.
- Pollmann M., Parwaresch R., S. Adam-Klages, M.L. Kruse, F. Buck, H.J. Heidebrecht.** 2006. Human EML4, a novel member of EMAP family, is essential for microtubule formation. *Exp. Cell Res.* 312: 3241-51.
- Poukkula M., E. Kremneva, M. Serlachius, P. Lappalainen.** 2011. Actin-depolymerizing factor homology domain: a conserved fold performing diverse roles in cytoskeletal dynamics. *Cytoskeleton* 68: 471-90.
- R. Chatterjee, C. Vinson.** 2012. CpG methylation recruits sequence specific transcription factors essential for tissue specific gene expression *Biochemica et Biophysica Acta* 1819: 763-70.
- Rasheed S., W.A. Nelson-Rees, E.M. Toth, P. Arnstein, M.B. Gardner.** 1974. Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT1080). *Cancer* 33: 1027-33.
- Riis B., S.I. Rattan, B.F. Clark, W.C. Merrick.** 1990. Eukaryotic protein elongation factors. *Trends Biochem. Sci.* 15: 420-24.
- Roeder R.C.** 1996. The role of general initiation factors in transcription by RNA Polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* 21: 327-35.
- Roger B., A. Moisand, F. Amalric, P. Bouvet.** 2003. Nucleolin provides a link between RNA polymerase I transcription and pre-ribosome assembly. *Chromosoma* 111: 399-407.
- Rosenberg S.A.** 2001. Progress in human tumor immunology and immunotherapy. *Nature* 411:380-84.
- Ross J., L. Mavoungou, E.H. Bresnick, E. Milot.** 2012. GATA-1 utilizes Ikaros and the polycomb repressive complex 2 to suppress Hes1 and to promote erythropoiesis. *Mol. Cell Biol.* 32: 163-12.
- Ross S., A. Tienhaara, M.S. Lee., L.H. Tsai, G. Gill.** 2002. GC box-binding transcription factors control the neuronal specific transcription of the cyclin-dependent kinase 5 regulator p35. *J. Biol. Chem.* 277: 4455-64.
- Rountree M.R., K.E. Bachmann, J.G. Herman, S.B. Baylin.** 2001. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene* 20: 3156-65.
- Rudolph P., U. Kellner, D. Schmidt, V. Kirchner, A. Talerman, D. Harms, R. Parwaresch.** 1999. Ki-A10, a germ cell nuclear antigen retained in a subset of germ cell-derived tumors. *Am. J. Pathol.* 154: 795-803.
- Sahin U., Ö. Türeci, H. Schmitt, B. Cochlovius, T. Johannes, R. Schmits, F. Stenner, G. Luo, I. Schobert, M. Pfreudenschuh.** 1995. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 11810-13.
- Satelli A., S. Li.** 2011. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol. Life Sci.* 68: 3033-46.
- Sato N., N. Funayama, A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita.** 1992. A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. Its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites. *J. Cell Sci.* 103: 131-43.
- Schoumacher M., R.D. Goldmann, D. Louvard, D.M. Vignjevnik.** 2010. Actin, microtubules, and vimentin filaments cooperate for elongation of invadopodia. *J. Cell Biol.* 189: 541-56.
- Schreck S., D. Friebel, M. Beuttner, L. Distel, G. Grabenbauer, L.S. Young, G. Niedobitek.** 2009. Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin's lymphoma. *Hematol. Oncol.* 27: 31-9.
- Schwartz R.H.** 2005. Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nature Immunology* 6: 327-30.

- Scott D.M., P.J. Dyson, E. Simpson.** 1992. A new approach to the cloning of genes encoding T-cell epitopes. *Immunogenetics* 36: 86-94.
- Seliger B.** 2008. Molecular mechanisms of MHC class I abnormalities and AMP components in human cancers. *Cancer Immunol. Immunother.* 57:1719-26.
- Sellami N.** 2008. Funktionelle Charakterisierung und epigenetische Regulation des Cancer/Testis-Antigens 45. *Diplomarbeit CAU-Kiel.*
- Sepulveda J.L., C. Wu.** 2006. The parvins. *Cell Mol. Life Sci.* 63: 25-35.
- Serrels B., A. Serrels, V.G. Brunton, M. Holt, G.W. McLean, C.H. Gray, G.E. Jones, M.C. Frame.** 2007. Focal adhesion kinase controls actin assembly via a FERM-mediated interaction with the Arp2/3 complex. *Nat. Cell Biol.* 9: 1046-56.
- Shav-Tal Y., D. Zipori.** 2002. PSF and p54/NONO-multi-functional nuclear proteins. *FEBS Lett.* 531: 109-14.
- Shav-Tal Y., L. Byeong-Chel, B.H. Shay, S. Hadas, D. Zaipori.** 2001. Reorganization of nuclear factors during myeloid differentiation. *J. Cell Biochem.* 81: 379-92.
- Shim H., H. Lee, D. Jeoung.** 2006. Cancer/Testis antigen cancer-associated gene (CAGE) promotes motility of cancer cells through activation of focal adhesion kinase (FAK). *Biotechnol. Lett.* 28: 2057-63.
- Shopland L.S., C.V. Johnson, J. McNeil and J.B. Lawrence.** 2003. Clustering of multiple specific genes and gene-rich R-bands around SC-35 domains. *J. Cell Biol.* 163: 981-90.
- Simpson A.J.G., O.L. Caballero, A. Jungbluth, Y.-T. Chen, L.I. Old.** 2005. Cancer/Testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nature reviews* 5: 615-25.
- Sinclair A.H., P. Berta, M.S. Palmer, J.R. Hawkins, B.L. Griffith, M.J. Foster, A.M. Frischauf, R. Lovell-Badge, P. Goodfellow.** 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-44.
- Smale S.T., Kadonaga J.** 2003. The RNA Polymerase II core promotor. *Biochemistry* 72: 449-79.
- Smyth M.J., K.Y. Thia, S.E. Street, E. Cretney, J.A. Trapani.** 2000. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J. Exp. med.* 191: 661-68.
- Smyth M.P., G.P. Dunn, R.D. Schreiber.** 2006. Cancer Immunosurveillance and Immunoediting: The Roles of Immunity in suppressing tumor development and shaping immunogenicity. *Cancer Immunotherapy* 90: 1-50.
- Soda M., Y.L. Choi, M. Enomoto, S. Takada, Y. Yamashita, S. Ishikawa, S. Fujiwara et al.** 2007. Identification of a transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448: 561-6.
- Somers A., J.C. Jean, C.A. Sommer, A. Omari, C.C. Ford, J.A. Mills, L. Ying, A.G. Sommer, J. M. Jean, B. W. Smith et al.,** 2010. Generation of transgene-free lung disease-specific human induced pluripotent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* 28: 1728-40.
- Spector D.L., A.I. Lamond.** 2010. Nuclear Speckles. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3: 000646.
- Sternlicht H., G.W. Farr, M.L. Sternlicht, J.K. Driscoll, K. Willison, M.B. Yaffe.** 1993. The t-complex polypeptide 1 is a chaperonin for tubulin and actin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 9422-26.
- Stirling P.C., M. Srayko, K.S. Takhar, A. Pozinakovsky, A.A. Hyman, M.R. Leroux.** 2007. Functional interaction between phosphocysteine-like protein 2 and cytosolic chaperonin is essential for cytoskeletal protein function and cell cycle progression. *Mol. Biol. Cell* 18: 2336-45.
- Sumi T., K. Matusmoto, Y. Takai, T. Natamura.** 1999. Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2. *J. Cell Biol.* 147: 1519-32.
- Suzuki Y., Tsunoda T., J. Sese, H. Taira, J. Mizushima-Sugano, H. Hata, T. Ota, T. Isogai, T. Tanaka, et al.,** 2001. Identification and characterization of the potential promoter regions of 1031 kinds of human genes. *Genome Research* 11: 677-84.
- Suzuki Y., R. Yamashita, K. Nakai, S. Sugano.** 2002. DBTSS: Database of human transcriptional start sites and full-length cDNAs. *Nucleic Acids Res.* 30: 328-31.

- Takenawa T., S. Suetsugu.** 2007. The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 37-48.
- Tarapore P., K. Shinmura, H. Suzuki, Y. Tokuyama, S.H. Mayeda, K. Fukasawa.** 2006. Thr199 phosphorylation targets nucleophosmin to nuclear speckles and represses pre-mRNA processing. *FEBS Lett.* 580: 399-409.
- Tate P.H., A.P. Bird.** 1993. Effects of DNA methylation and DNA binding proteins and gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3: 226-31.
- Teoh G., M. Urashima, E.A. Greenfield, K.A. Nguyen, J.F. Lee, D. Chauhan, A. Ogata, S.P. Treon, K.C. Anderson.** 1998. The 86-kD subunit of Ku autoantigen mediates homotypic and heterotypic adhesion of multiple myeloma cells. *J. Clin. Invest.* 101: 1379-88.
- Thomas L.** 1959. Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states. *H. Lawrence, Ed Hoeber-Harper, New York.*
- Thomson J.A., J. Itskovitz-Eldor, S.S. Shapiro, M.A. Waknitz, J.J. Swiergiel, V.S. Marshall, J.M. Jones.** 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocytes. *Science* 282: 1145-47.
- Uehira K., R. Amakawa, T. Ito, T. Uehira, Y. Ozaki, T. Shimizu, M. Fujimoto, M. Inaba, S. Fukuhara.** 1999. A Hodgkin's disease cell line, KM-H2, shows biphenotypic features of dendritic cells and B cells. *Int. J. Hematol.* 73: 236-44.
- Ugrinova I., K. Monier, C. Ivaldi, M. Thiry, S. Storck, F. Mongelard et al.** 2007. Inactivation of nucleolin leads to nuclear disruption, cell cycle arrest and defects in centrosome duplication. *BMC Mol. Biol.* 8: 66.
- Uhm T.G., S.K. Lee, B.S. Kim, J.H. Kang, C.S. Park, T.Y. Rhim, H.S. Chang, D.J. Kim, I.Y. Chung.** 2012. CpG methylation at GATA elements in the regulatory region of CCR3 positively correlates with CCR3 transcription. *Exp. Mol. Med.* 44:268-80.
- Van der Bruggen, P.C., P. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plean, B. Van den Eynde, A. Knith, T. Boon.** 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254: 1643-7.
- Vesely M.D., M.H. Kershaw, R.D. Schreiber, M.J. Smyth.** 2011. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annual. Review of Immunology* 29: 235-71.
- Vishwanatha J.K., E. Salazar, V.K. Gopalakrishnan.** 2004. Absence of annexin 1 expression in B-cell non-Hodgkin's-Lymphomas and cell lines. *BMC Cancer* 8: 4-8.
- Vitale S., E. Avizienyte, V.G. Brunton, M.C. Frame.** 2008. Focal adhesion kinase is not required for Src-induced formation of invadopodia in Km12C colon cancer cells and can interfere with their assembly. *Eur.J. Cell Biol.* 87: 569-79.
- Wang G., X. Xiao, Y. Huang, Z. Yao, Q. Shi, M. Wu.** 2010. Nucleophosmin/B23 inhibits Eg5-mediated microtubule depolymerization by inactivating its ATPase activity. *J. Biol. Cancer* 285: 19060-7.
- Wang S., M. Wang, S. Yin, G. Fu, C. Li, R. Chen, A. Li, J. Zhou, Z. Zhang, Q. Liu.** 2008. A novel variable number of tandem repeats (VNTR) polymorphism containing SP1 binding elements in the promoter of XRCC5 is a risk for human bladder cancer. *Mutat. Res.* 638: 26-36.
- Wang V., M.A. McNiven.** 2012. Invasive matrix degradation at focal adhesions occurs via protease recruitment by a FAK-p130Cas complex. *J. Cell Biol.* 196: 375-85.
- Wang Z., J. Zhang, Y. Zhang, S.H. Lim.** 2006a. SPAN-Xb expression in myeloma cells is dependent on promoter methylation and can be up regulated pharmacologically. *International Journal of Cancer* 118: 1436-44.
- Weber J., M. Salgaller, D. Samid, B. Johnson, M. Herlyn, N. Lassam, J. Treisman, S.A. Rosenberg.** 1994. Expression of the MAGE-1 tumor antigen is up regulated by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* 54: 1766-71.
- Winandy S., P. Wu, K. Georgopoulos.** 1995. A dominant mutation in the Ikaros gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma. *Cell* 83: 289-99.
- Xiao C., B. Lachance, G. Sunahara, J. Luong.** 2002. An In-Depth analysis of Electric Cell-Substrate impedance sensing to study the attachment and spreading of mammalian cells. *Anal. Chem.* 74: 1333-39.

- Xiao J., H.S. Chen.** 2004. Biological functions of melanoma-associated antigens. *World J. Gastroenterol.* 10: 1849-53.
- Xin W., D.R. Rhodes, C. Ingold, A.M. Chinnaiyan, M.A. Rubin.** 2003. Dysregulation of the annexin family is associated with prostate cancer progression. *Am. J. Pathol.* 162: 255-61.
- Xing L., X. Yao, S.R. Williams, G.J. Bassell.** 2012. Negative regulation of RhoA translation and signaling by hnRNP-Q1 affects cellular morphogenesis. *Mol. Biol. Cell.* 23: 1500-9.
- Xu Z., R. Anderson, T.C. Hobmann.** 2011. The capsid-binding nucleolar helicase DDX56 is important for infectivity of West Nile virus. *J. Virol.* 85: 5571-80.
- Yamaguchi H., M. Lorenz, S. Kempiak, C. Sarmiento., S. Coniglio, M. Symons, J. Segall, R. Eddy, H. Mikki, T. Takenawa.** 2005. Molecular mechanisms of invadopodia formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *J. Cell Biol.* 168: 441-52.
- Yaneva M., S. Jhiang.** 1991, Expression of the Ku protein during cell proliferation. *Biochemica et Biophysica Acta* 1090: 181-87.
- Yang C., E. Bolotin, T. Jiang, F.M. Sladek, E. Martinez.** 2007. Prevalence of the Initiator over TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA less promoters. *Genes* 389: 52-65.
- Yang Y.S., J.H. Hanke, L. Charayannopoulos, C.M. Craft, J.D. Capra, P.W. Tucker.** 1993. Nono, a non POU-domain containing, octamer-binding protein, is the mammalian homolog of Drosophila non Adiss. *Mol. Cell Biol.* 13: 5593-603.
- Yuntao S. Mao, B. Zhang, D. L. Spector.** 2011. Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends in Genetics* 27: 295-306.
- Zhang Z., G.G. Carmichael.** 2001. The fate of dsRNA in the nucleus: a p54(nrb)-containing complex mediates the nuclear retention of promiscuously A-and-I edited RNA. *Cell* 106: 465-75.
- Zhao R. M.S. Bodnar, D.L. Spector.** 2009. Nuclear neighborhoods and gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19: 172-79.
- Zhao X., J.L. Guan.** 2011. Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Advanced drug delivery reviews.* 63: 610-15.
- Zheng C., E. Kim, S.L. Warren, S. Berget.** 1997. Dynamic relocation of splicing factors dependent upon transcriptional activity. *EMBO J.* 16: 1401-12.
- Zheng R., G.A. Blobel.** 2011. GATA transcription factors and cancer. *Genes & Cancer.* 1: 1178-88.
- Zhu X., S.L. Asa, S. Ezzat.** 2007. Ikaros is regulated through multiple histone modifications and deoxyribonucleic acid methylation in the pituitary. *Mol. Endocrin.* 21: 1205-15.
- Zirwes R.F., J. Eilbracht, S. Kneissel, M.S. Schmidt-Zachmann.** 2000. A novel helicase-type protein in the nucleolus: protein NOH61. *Mol. Biol. Cell.* 11: 1153-67.
- Zou W.** 2006. Regulatory T cell, tumor immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 295-307.

9. Anhang

Sequenzalignment der humanen Syncrip-Isoformen 1-3 (AAK59705.1; AAK59704.1, AAK59703.1) mit der murinen Variante 1 (NP_062640.2) (rot markiert sind die homologen Sequenzen, gelb markiert die variierenden Sequenzbereiche).

```
hSyncrip1 MATEHVNGNGTEEPMDTTSAVIHSENFQTLDDAGLPQKVAEKLDEIYVAGLVVHSDLLDER 60
mSyncrip1 MATEHVNGNGTEEPMDTTSAVIHSENFQTLDDAGLPQKVAEKLDEIYVAGLVVHSDLLDER 60
hSyncrip2 MATEHVNGNGTEEPMDTTSAVIHSENFQTLDDAGLPQKVAEKLDEIYVAGLVVHSDLLDER 60
hSyncrip3 MATEHVNGNGTEEPMDTTSAVIHSENFQTLDDAGLPQKVAEKLDEIYVAGLVVHSDLLDER 60
*****

hSyncrip1 AIEALKEFNEDGALAVLQQFKDSDLSHVQNKSAFLCGVMKTYRQREKQGTKVADSSKGPD 120
mSyncrip1 AIEALKEFNEDGALAVLQQFKDSDLSHVQNKSAFLCGVMKTYRQREKQGTKVADSSKGPD 120
hSyncrip2 AIEALKEFNEDGALAVLQQFKDSDLSHVQNKSAFLCGVMKTYRQREKQGTKVADSSKGPD 120
hSyncrip3 AIEALKEFNEDGALAVLQQFKDSDLSHVQNKSAFLCGVMKTYRQREKQGTKVADSSKGPD 120
*****

hSyncrip1 EAKIKALLERTGYTLDVTTGQRKYGGPPDSVYSGQQPSVGTETIFVVGKIPRDLFEDELVP 180
mSyncrip1 EAKIKALLERTGYTLDVTTGQRKYGGPPDSVYSGQQPSVGTETIFVVGKIPRDLFEDELVP 180
hSyncrip2 EAKIKALLERTGYTLDVTTGQRKYGGPPDSVYSGQQPSVGTETIFVVGKIPRDLFEDELVP 180
hSyncrip3 EAKIKALLERTGYTLDVTTGQRKYGGPPDSVYSGQQPSVGTETIFVVGKIPRDLFEDELVP 180
*****

hSyncrip1 LFEKAGPIWDLRLMMDPLTGLNRGYAFVTFCTKEAAQEAVKLYNNHEIRSGKHIGVCISV 240
mSyncrip1 LFEKAGPIWDLRLMMDPLTGLNRGYAFVTFCTKEAAQEAVKLYNNHEIRSGKHIGVCISV 240
hSyncrip2 LFEKAGPIWDLRLMMDPLTGLNRGYAFVTFCTKEAAQEAVKLYNNHEIRSGKHIGVCISV 240
hSyncrip3 LFEKAGPIWDLRLMMDPLTGLNRGYAFVTFCTKEAAQEAVKLYNNHEIRSGKHIGVCISV 240
*****

hSyncrip1 ANNRLFVGSIPKSKTKEQILEEFQSKVTEGLTDVILYHQPDKKKRNRSFCFLEYEDHKATA 300
mSyncrip1 ANNRLFVGSIPKSKTKEQILEEFQSKVTEGLTDVILYHQPDKKKRNRSFCFLEYEDHKATA 300
hSyncrip2 ANNRLFVGSIPKSKTKEQILEEFQSKVTEGLTDVILYHQPDKKKRNRSFCFLEYEDHKATA 300
hSyncrip3 ANNRLFVGSIPKSKTKEQILEEFQSKVTEGLTDVILYHQPDKKKRNRSFCFLEYEDHKATA 300
*****

hSyncrip1 QARRRLMSGKVKVWGNVGTVEWADPIEDPDPEVMAKVKVLFVRNLANVTVEEILEKAFSQ 360
mSyncrip1 QARRRLMSGKVKVWGNVGTVEWADPIEDPDPEVMAKVKVLFVRNLANVTVEEILEKAFSQ 360
hSyncrip2 Q-----VKVLFVRNLANVTVEEILEKAFSQ 325
hSyncrip3 QARRRLMSGKVKVWGNVGTVEWADPIEDPDPEVMAKVKVLFVRNLANVTVEEILEKAFSQ 360
* *****

hSyncrip1 FGKLERVKKLDYAFIHFDERDGAVKAMEEMNGKDLEGENIEIVFAKPPDQKRKERKAQR 420
mSyncrip1 FGKLERVKKLDYAFIHFDERDGAVKAMEEMNGKDLEGENIEIVFAKPPDQKRKERKAQR 420
hSyncrip2 FGKLERVKKLDYAFIHFDERDGAVKAMEEMNGKDLEGENIEIVFAKPPDQKRKERKAQR 385
hSyncrip3 FGKLERVKKLDYAFIHFDERDGAVKAMEEMNGKDLEGENIEIVFAKPPDQKRKERKAQR 420
*****

hSyncrip1 QAAKNQMYDDYYYGPPHMPPTTRGRGRGGGGYGYPPDYGYEDYDYDYGYDYHNYRGG 480
mSyncrip1 QAAKNQMYDDYYYGPPHMPPTTRGRGRGGGGYGYPPDYGYEDYDYDYGYDYHNYRGG 480
hSyncrip2 QAAKNQMYDDYYYGPPHMPPTTRGRGRGGGGYGYPPDYGYEDYDYDYGYDYHNYRGG 445
hSyncrip3 QAAKNQMYDDYYYGPPHMPPTTRGRGRGGGGYGYPPDYGYEDYDYDYGYDYHNYRGG 480
*****

hSyncrip1 YEDPYYGYEDFQVGARGRGGRGARGAAPSRRGAAPPRGRAGYSQRGGPGSARGVARGARG 540
mSyncrip1 YEDPYYGYEDFQVGARGRGGRGARGAAPSRRGAAPPRGRAGYSQRGGPGSARGVARGARG 540
hSyncrip2 YEDPYYGYEDFQVGARGRGGRGARGAAPSRRGAAPPRGRAGYSQRGGPGSARGVARGARG 505
hSyncrip3 YEDPYYGYEDFQVGARGRGGRGARGAAPSRRGAAPPRGRAGYSQRGGPGSARGVARGARG 540
*****

hSyncrip1 GAQQQRGRGVKGEAG-----PDLLQ----- 561
mSyncrip1 GAQQQRGRGVARGG RGGNVGGRKADGYNQPDTKRRQTNNQNWGSQPIAQQPLQGGDH 600
hSyncrip2 GAQQQRGRGVARGG RGGNVGGRKADGYNQPD SKRRQTNNQNWGSQPIAQQPLQGGDH 565
hSyncrip3 GAQQQRGRGVARGG RGGNVGGRKADGYNQPD SKRRQTNNQNWGSQPIAQQPLQGGDH 600
*****:*. . . * ** :

hSyncrip1 -----
mSyncrip1 SGNYGKSENQEFYQDTFGQQWK 623
hSyncrip2 SGNYGKSENQEFYQDTFGQQWK 588
hSyncrip3 SGNYGKSENQEFYQDTFGQQWK 623
```

Darstellung eines Teils der genomischen Sequenz von CT45-A2 (NG_021269.1) zur Visualisierung der Primer-Bindesequenzen und der potentiellen Sequenzen von TATA-Box, GC-Box und Inr-Element.

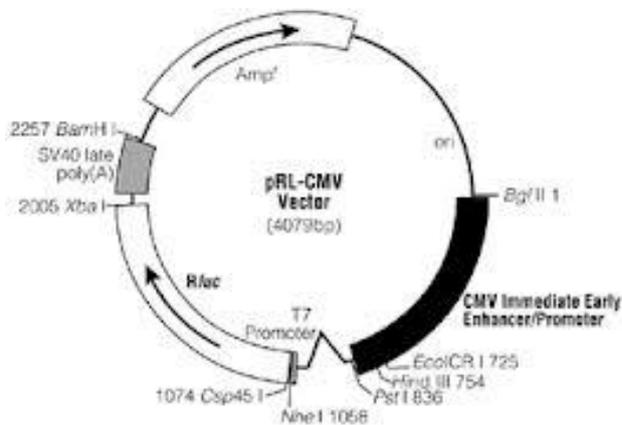
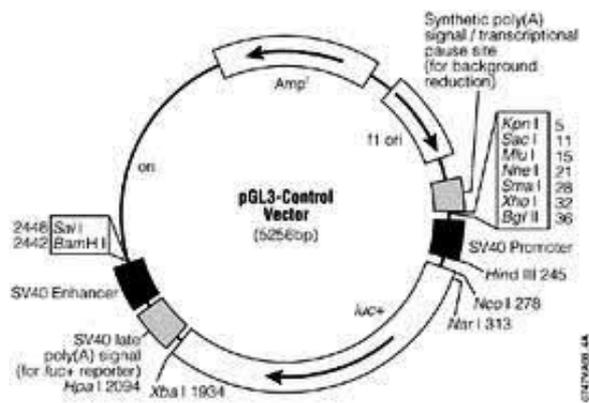
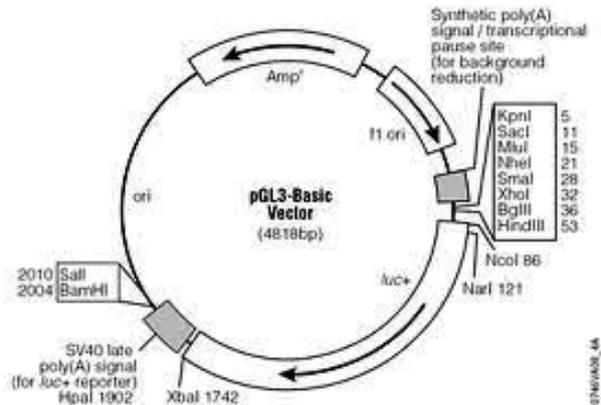
bp

```
3841 tctttctttc tttctttttt tttgtagaca gtcttactct gtcaccacag ctatagtgca
3901 atgggtgcgaa caaagggtcaa tgcagcctca acctcctggg gtcaagcctc ccgagcagct
3961 gggaccacag ttacacgctc agctaatttt tgtattttgt gttaagatgg ggtttcacca -1031
4021 tgctgccag gctgctcttg aactcctggg ctcaaggaat ccaccctctc tggctccca
4081 aattgctggg attacagacg tgagcgaccg cactggggcc ctcatTTTTc ttatcaatta
4141 acaataatgg ttacctttaa cagatagagg ttgactttat ttattgattg attgattttt
4201 attttttagac agagtctcac tctgttacc aggctggagt gcagtggcat gatctcagct
4261 cactgcaa at tctgacctgcc cggttcaagc gattctccag cctcagcctc ccaagtagct
4321 ggtgggatta taggtgcatg ccaccacgcc cggtaatttt ctgtattttt agcagagacg
4381 ggattcacca tgttggtcag acagactggg ctcgaactcc tgacctcagg tggccagcc
4441 ccttcggcct cccaaagtgt tgagattaca ggcgtgagcc actgtggcgg gtcgggggtg
4501 acTTTAAAc acaacccct caaatgaaaa ttgcagtttg ttggtgttct tttctttttt
4561 cttttctttt ccttctttct ttctttcttt tttttttttt ttctgagggtg ggtctcctc
4621 taccgcctgg gctggagtgc agtggtcac tgctacctc acctccggg ttcaagccat
4681 cctcccacct caacttcccg agtagttggg accacaggtg cgaggccact agGCCAGCT -254
4741 aatttggtg tttctttctt tctttctttc ttttttgatt agttggttgc tttgtagagc
4801 cggggtctca ctatgttacc caggcgattt catcccgtg ggtgagaagg ttctgcattc
4861 ctacgcatac gttgctgtgc agttggTact gaaggTcgcc tgtagagggc gccagagtca -106
4921 gcgaagggga gggctgcgct tcttggTtct ctggggcacg aggttctcc tcagcactct -61
4981 ggcgccc cca acaggttccc agtgttcggc tggggcaggc acgctgtggc tggctacttc +6
5041 ccttctctcc atcccccttg ggcCAAacgg gatcggtgct tctggtgaga cgcctccccA +54
5101 tgacatcac tccaggtgc cctagggggc acatttccca caactcccag agggcaggtt +114
5161 tctagaaagt gccaccagtg gggaggcgcc acaacttcac tgccattttg tgaggTgccg +176
5221 ccgtctctcc tccagcaagg tcaggacttc aggactgtga gtgggcagtt tttccctgga
5281 tgctttaatt tcgccctgga aagtgtcctt tttcctcaga aagagtcttt tctgtggtgt
5341 tctctgtccg gtgtgtggga gggctccctt ggggaagtgg cttagctctg gggacactgc
5401 catgggcgcc tgtgtcagcc gggggggagc gttttccttg ggcaccccg ctcggtatg
5461 ttgtggggcc agggggcttt tcttgggggc tcttcttggg ggctccctgt cggtgatgga
5521 aaaggcgact tttctgctg aaatgacctg agcccggggg gtgggggcca tgccttggtt
5581 gcctgtgtcg gcctcgggtg cggcggtgtt tctttccgc tcagtgcctg tctgagggg
```

Legende:

- TATA-Box
- GC-Box
- Inr-Element
- verwendete Primer-Sequenzen
-  Transkriptionsstart

Darstellung der Vektoren (Promega), die für die Reporteragen-Analyse zur Identifizierung des CT45-Minimalpromotors verwendet wurden.



10. Danksagung

Danken möchte ich zunächst Herrn Prof. Dr. Dietrich Kabelitz, für die Möglichkeit, die vorliegende Doktorarbeit am Institut für Immunologie (UK-SH Campus Kiel) durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Ottmar Janssen danke ich für die Betreuung mit den vielen kritischen Denkanstößen und vor allem für das aufmerksame Korrekturlesen meiner Dissertation.

Das größte Dankeschön gilt Herrn Dr. Hans-Jürgen Heidebrecht für die wissenschaftliche Betreuung meines Themas mit den vielen anregenden Ideen, Diskussionen, Kommentaren und aufbauenden Worten, sowie das hilfreiche korrigieren meiner Arbeit. Seine permanente Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Prof. Karin Krupinska danke ich herzlich für die Übernahme des Referats meiner Arbeit vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Desweiteren Danke ich Prof Dr. Matthias Leippe für die Möglichkeit der Proteinanalyse am MALDI-TOF/TOF-MS der Zoophysiologie und Dr. Christof Gelhaus für die Durchführung der MALDI-Analysen. Der größte Dank in diesem Zusammenhang gilt Dr. Hendrik Schmidt und Melanie Nebendahl für die großartige Unterstützung bei der Durchführung der 2D-DIGE-Analysen und der anschließenden MALDI-Datenauswertung.

Ein weiteres herzliches Dankeschön geht an Signe Valentin, Alyn Gerneth, Melanie Nebendahl, Maren Paulsen, Henriette Oberdörster, Benjamin Schönbeck und Marcus Lettau für die herzliche und angenehme Arbeitsatmosphäre, ohne die der Laboralltag nicht so angenehm gewesen wäre. Marcus Lettau danke ich zusätzlich für die entgegengebrachte Unterstützung am konfokalen Lasermikroskop.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie, einschließlich jener hier nicht Genannten, möchte ich für jedwede Unterstützung und die Vermittlung einer freundschaftlichen und angenehmen Arbeitsatmosphäre danken.

Zudem Danke ich im Besonderen meiner Familie, für ihre weit über diese Arbeit hinausgehende Unterstützung in allen Lebenslagen. Ein großer Dank gilt meiner Schwester Elisabeth für das aufmerksame korrigieren meiner Arbeit.

Zu guter Letzt möchte ich meinem Freund Ludger von ganzem Herzen für das andauernde Verständnis, die mentale Unterstützung, die vielen aufbauenden und motivierenden Worte und vor allem für die stetige Hilfe bei allen Computerfragen danken.

Die Arbeiten zur Charakterisierung von CT45 wurden von der Wilhelm-Sander Stiftung (München) finanziell unterstützt.

11. Curriculum vitae

Anja Koop
Lutherstr. 8
24114 Kiel
e-mail: koop_anja@web.de

Geburtsdatum: 03.05.1982
Geburtsort: Haselünne
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Hochschulausbildung

07/2009-09/2012 Promotion bei Prof. Dr. Ottmar Janssen am Institut für Immunologie und Dr. Hans-Jürgen Heidebrecht am Institut für Pathologie, UK-Schleswig-Holstein, Campus Kiel

06/2009 Diplom Biochemie und Molekularbiologie

10/2008-05/2009 Diplomarbeit bei Prof. Dr. Sabine Adam-Klages zum Thema: Untersuchungen zur Charakterisierung von IKK ϵ Spleiß-Varianten.

10/2004-06/2009 Studium der `Biochemie und Molekularbiologie´ (BCM) an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Hauptstudium BCM mit den Nebenfächern:
Pharmazeutische Chemie, molekulare Infektionsmedizin und Immunologie

Berufsausbildung

07/2004 Abschluss der Berufsausbildung

08/2001-07/2004 Berufsausbildung zur Biologielaborantin an der Landwirtschaftskammer Weser-Ems in Oldenburg

Schulbildung

07/2001 Abitur: Copernicus-Gymnasium Lönigen

Stipendien

2011 Reisestipendium der DGZ
2010 Reisestipendium der DGZ

12. Publikationsliste

Originalarbeiten

Koop A., Lepenis I., Braum O., Davarnia P., Scherer G., Fickenscher H., Kabelitz D., Adam-Klages S. 2011. Novel splice variants of human IKK ϵ negatively regulate IKK ϵ -induced IRF3 and NF- κ B activation. *Eur J Immunol.* 41: 224-34.

In Vorbereitung

Koop A., Sellami N., Adam-Klages S., Lettau M., Janssen O., Heidebrecht H.-J. 2013. Downregulation of Cancer/Testis Antigen 45: no effect on cell proliferation but altered cell morphology, cell adhesion and cell migration.

Veröffentlichte Tagungsbeiträge

Koop A., Oberg H.-H., Janssen O., Heidebrecht H.-J. Down regulation of Cancer/Testis Antigen 45 (CT45) in HT1080 cells results in altered cell adhesion demonstrated by real time measurements of cellular impedance. *Posterbeitrag Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie (DGZ) Dresden 2012.*

Koop A., Janssen O., Heidebrecht H.-J. Down regulation of Cancer/Testis Antigen 45 (CT45) in HT1080 cells results in altered distribution of nucleolin. *Posterbeitrag Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie (DGZ) Dresden 2012.*

Koop A., Lettau M., Kruse M.L., Janssen O., Heidebrecht H.J. Down regulation of Cancer/Testis Antigen 45 (CT45) in HT1080 cells results in altered cell morphology and cell adhesion. *Posterbeitrag Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie (DGZ) Bonn 2011.*

Koop A., Schmidt H., Nebendahl M., Gelhaus C., Leippe M., Janssen O., H.-J. Heidebrecht. Protein changes upon down regulation of the Cancer/Testis Antigen 45 (CT45) in L428 (Hodgkin's-Lymphoma) and HT1080 (Fibrosarcoma) cells. *Signal Transduction 2010 (Abstract).*

Koop A., Schmidt H., Nebendahl M., Gelhaus C., Leippe M., Janssen O., H.-J. Heidebrecht. Down regulation of Cancer/Testis Antigen 45 (CT45) in human HT1080 cells analyzed by proteomic screening. *Posterbeitrag Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Cancer Immunotherapy Mainz 2010.*

Koop A., Lettau M., Kruse M.L., Janssen O., Heidebrecht H.-J. Identification of the microtubule associated protein EML4 as a Cancer/Testis Antigen 45 (CT45) interacting protein. *Posterbeitrag Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie (DGZ) Regensburg 2010.*

13. Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß § 9 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, dass ich die vorliegende Arbeit unter der wissenschaftlichen Leitung von Prof. Dr. Ottmar Janssen und Dr. Hans-Jürgen Heidebrecht selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Zum Zeitpunkt der Abgabe wurden Teile der zugrundeliegenden Dissertation in Form von Posterbeiträgen auf verschiedenen Kongressen vorgestellt. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Universität zur Begutachtung vorgelegt.

Kiel, den

Anja Koop