

Das Meningeom-exprimierte Antigen MGEA6

Zur Molekulargenetik, Zellbiologie und Immunogenität

Dissertation

zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

vorgelegt von

Eva Christine Brunner

Saarbrücken, Dezember 2007

Institut für Humangenetik der Universität des Saarlandes,
Universitätsklinikum Homburg/Saar

Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät III, Chemie-, Pharmazie-, Bio- und
Werkstoffwissenschaften der Universität des Saarlandes

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Uli Müller

Erstgutachter: Prof. Dr. Eckart Meese

Zweitgutachter: Prof. Dr. Nikolaus Müller-Lantzsch,
Institut für Virologie, Universitätsklinikum Homburg/Saar

Vorsitzender der
Prüfungskommission: Prof. Dr. Manfred Schmitt,
Institut für Molekular- und Zellbiologie, Universität des Saarlandes

Tag der Promotion: 01. April 2008

Danksagung

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Eckart Meese für die Aufnahme in den Arbeitskreis seines Instituts für Humangenetik und die Unterstützung während meiner Arbeit.

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Müller-Lantzsch für die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Ein herzlicher Dank gilt Frau Dr. Nicole Comtesse, für die freundliche und ausgezeichnete Betreuung, ihre stete Bereitschaft zur Hilfe und Diskussion sowie für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik danke ich sehr für das gute Arbeitsklima und die ständige Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei den Problemen des Laboralltags. Besonders danken möchte ich Frau Sabrina Heisel, Frau Steffi Rheinheimer und Frau Nicole Ludwig für die kritische Durchsicht dieser Arbeit und die stets bereitwillige Hilfe.

Bei Prof. Dr. W. Feiden, Dr. Bernd Romeike und dem gesamten Team am Institut für Neuropathologie möchte ich mich herzlich für die Bereitstellung der Tumorproben und die Unterstützung bei der Durchführung der Immunhistochemie bedanken.

Frau Barbara Best gilt ein besonderer Dank für die Bereitstellung der COS-Zellkultur. Die zahlreichen methodischen Tips und Verbesserungsvorschläge waren eine große Hilfe.

Vielen Dank auch Frau Silvia Bernhardt für die Mithilfe, die hilfreichen Tips und die Unterstützung bei der Primärzellkultur.

Ein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Martin Jung, Prof. Dr. R. Zimmermann und das gesamte Team des Instituts für Biochemie und Molekulare Biologie für die enorme Hilfsbereitschaft bei verschiedensten Fragen des Laboralltags, für die Hilfe bei der Durchführung der Zellfraktionierung und für die Bereitstellung der Primärantikörper Anti-680 Ribosomal (S3)-specific und Anti-Sec61 α -Endoplasmic Reticulum-specific. Die Zusammenarbeit hat große Freude gemacht.

Bei allen Freundinnen und Freunden möchte ich mich für die seelische Unterstützung in den letzten Jahren sehr bedanken.

Mein größter Dank gilt schließlich meiner Familie, meinen Eltern und meinem Bruder, für die stete Unterstützung und das entgegengebrachte Verständnis während der letzten Jahre.

für alle Anderen

entstandene Veröffentlichungen:

- Brunner EC, Romeike BF, Jung M, Comtesse N, Meese E. Altered expression of beta-catenin/E-cadherin in meningiomas. *J Histopat.* (2006) Aug;49(2):178-87.
- Romeike BMF, Brunner EC, Jung M, Comtesse N, Meese E. Expression of E-cadherin and beta-catenin in meningiomas. *Acta Neuropathol* (2007) 114:307–332.

INHALTSVERZEICHNIS	i
TABELLENVERZEICHNIS	iv
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	v
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	13
2.1 POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)	13
2.1.1 <i>Prinzip und Standardbedingungen</i>	13
2.2 REVERSE TRANSKRIPTION	15
2.3 DNA-SEQUENZIERUNG	16
2.3.1 <i>Prinzip der DNA-Sequenzanalyse nach Sanger et al. (1977)</i>	16
2.4 AGAROSEGELELEKTROPHORESE VON DNA	18
2.4.1 <i>Elektrophorese und Nachweis von DNA in Agarosegelen</i>	18
2.4.2 <i>Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen</i>	19
2.5 KLONIERUNG VON CDNA IN PLASMIDE	20
2.5.1 <i>Ligation von DNA-Fragmenten</i>	20
2.5.2 <i>Transformation kompetenter E.coli Zellen</i>	21
2.5.3 <i>Isolierung von Plasmid-DNA</i>	22
2.5.4 <i>Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung</i>	23
2.5.5 <i>Restriktionsverdau von Plasmid-DNA</i>	23
2.6 HERSTELLUNG VON PROTEINLYSATEN	24
2.6.1 <i>Herstellung von Proteinlysaten aus Gewebe</i>	24
2.6.2 <i>Herstellung von Proteinlysaten aus Zellkulturen</i>	25
2.6.3 <i>Zellaufschluss und Zellfraktionierung aus Zellkulturen</i>	25
2.7 SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (PAGE)	27
2.7.1 <i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>	27
2.7.2 <i>Fixierung und Färbung von Proteinen im Polyacrylamidgel</i>	29
2.8 WESTERN-BLOTTING (IMMUNOBLOTTING)	30
2.8.1 <i>Elektro-Blotting zum Transfer von Proteinen auf Membranen</i>	30
2.8.2 <i>Strippen von PVDF-Membranen</i>	31
2.8.3 <i>Immunchemischer Nachweis spezifischer Proteine auf Blot-Membranen</i>	31
2.9 ZELLKULTUR	33
2.9.1 <i>Eukaryotische Zellkultur</i>	33
2.9.1.1 <i>Kultivierung von Insektenzellen</i>	33
2.9.1.2 <i>Kultivierung von COS-Zellen</i>	33

2.9.1.3	Kultivierung von TERA-Zellen.....	34
2.9.1.4	Kultivierung von HeLa-Zellen	34
2.9.1.5	Kultivierung von Primärzellkulturen aus Meningeomen	34
2.9.1.6	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	35
2.9.2	<i>Karyotypisierung</i>	35
2.10	LUZIFERASE-ASSAY/PROMOTORANALYSE MITTELS pGL3-VEKTOR-SYSTEM	36
2.10.1	<i>Amplifikation und Klonierung der Upstreamregion des MGEA6-Genlocus auf 14q21 und der Upstreamregionen der MGEA6- Pseudogene</i>	36
2.10.2	<i>Transfektion in TERA-Zellen und Herstellung von Zelllysaten</i>	40
2.10.3	<i>Luziferase-Assay</i>	42
2.11	BACULOVIRUS-EXPRESSIONSSYSTEM.....	44
2.11.1	<i>Klonierung des Fremdgens in den Transfervektor pBlueBacHis2A und Transformation von pBlueBacHis2A in kompetente E.coli DH5α</i>	45
2.11.2	<i>Transfektion von SF158 Zellen</i>	47
2.11.3	<i>Aufreinigung des rekombinanten Virus (Plaque-Assay)</i>	48
2.11.4	<i>Isolierung viraler DNA</i>	49
2.11.5	<i>PCR-Analyse von rekombinantem Virus</i>	49
2.11.6	<i>Herstellung eines hochtitrigen Virus-Stocks (P2)</i>	50
2.11.7	<i>Expression von rekombinantem Protein</i>	50
2.11.8	<i>Herstellung von Proteinlysaten Baculovirus-infizierter Insektenzellen</i>	50
2.11.9	<i>Proteinaufreinigung über Ni-NTA-Agarose (Immobilized-metal affinity chromatography: IMAC)</i>	51
2.12	UNTERSUCHUNG DES E-CADHERIN/CATENIN ZELLADHÄSIONS-KOMPLEXES: IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN AN PARAFFINGEWEBESCHNITTEN VON MENINGEOMEN	52
2.12.1	<i>Silanisierung von Objektträgern</i>	53
2.12.2	<i>Immunhistochemische Färbung</i>	53
2.13	IMMUNFLUORESZENZ	54
2.13.1	<i>Fixierung von Zellen auf Glasplättchen</i>	54
2.13.2	<i>Fluoreszenzfärbung</i>	55
2.14	ANALYSE DER PROTEININTERAKTION VON MGEA6 MIT DEN PROTEINEN BAIAP2, KIBRA UND SPTAN1 MITTELS CO-IMMUNPRÄZIPITATION.....	55
2.14.1	<i>Amplifikation und Klonierung der Fremdgene in die Expressionsvektoren p3xFLAG-CMV-10 und -14</i>	56

2.14.2	<i>Klonierung des MGEA6-HA-Fusionskonstrukts in den Expressionsvektor pSG5</i>	57
2.14.3	<i>Transformation rekombinanter Flag- bzw. pSG5-Vektoren in COS-Zellen und Expression der Proteine</i>	60
2.14.4	<i>Immunpräzipitation</i>	63
2.15	SONSTIGES	65
2.15.1	<i>Computersoftware</i>	65
2.15.2	<i>Sequenzen</i>	65
2.15.3	<i>Enzyme</i>	66
2.15.4	<i>Antikörper</i>	66
2.15.5	<i>Puffer und Lösungen/Chemikalien</i>	67
2.15.6	<i>Molekulargewichtsmarker</i>	68
2.15.7	<i>Oligonukleotide</i>	69
2.15.8	<i>Vektoren</i>	73
3	Ergebnisse	80
3.1	ANALYSE DER ANTIKÖRPERBINDUNG GEGEN MGEA6 ZUR EINGRENZUNG DER IMMUNOGENEN PROTEINREGION	80
3.2	NACHWEIS VON MGEA6-PROTEININTERAKTIONEN IN VITRO	89
3.2.1	<i>Konstruktion und Expression der HA- bzw. FLAG-Tag-Fusionsproteine</i>	89
3.2.2	<i>Co-Expression und Co-Immunpräzipitation der Fusionsproteine zur Analyse der Proteinbindung mittels Western-Blot</i>	94
3.2.3	<i>Analyse der Proteininteraktion zwischen den Proteinen BAIAP2 und MGEA6</i>	96
3.2.4	<i>Analyse der Proteininteraktion zwischen den Proteinen SPTAN1 und MGEA6</i>	97
3.2.5	<i>Analyse der Proteininteraktion zwischen den Proteinen KIBRA und MGEA6</i>	98
3.2.6	<i>Kontrollen zur Co-Expression und Immunpräzipitation</i>	99
3.3	PROMOTORCHARAKTERISIERUNG DER MGEA6-GENFAMILIE	101
3.3.1	<i>Promotorcharakterisierung des aktiven Genlocus von MGEA6 auf Chromosom 14q21</i>	102
3.3.2	<i>Analyse der Promotoraktivitäten der MGEA6-Pseudogene verschiedener Loci</i>	108

3.4	UNTERSUCHUNG DES E-CADHERIN/ β -CATENIN ZELLADHÄSIONSKOMPLEXES UND NACHWEIS EINER VERÄNDERTEN EXPRESSION DIESER ZELLADHÄSIONSPROTEINE IN MENINGEOMEN	115
3.4.1	<i>Überprüfung der Antikörper-Reaktivitäten und Nachweis der Proteine β-Catenin und E-Cadherin in Meningeom-Gewebelysaten</i>	<i>116</i>
3.4.2	<i>Immunhistochemische Analyse (IHC) der Proteine β-Catenin und E-Cadherin in Meningeom-Gewebeschnitten</i>	<i>118</i>
3.4.3	<i>Analyse der subzellulären Lokalisation von β-Catenin in Meningeomen anhand von zellfraktionierten Meningeom-Primärzellkulturen</i>	<i>123</i>
3.4.4	<i>Immunfluoreszenz-Analyse zur Lokalisation der Proteine in Meningeom-Primärzellen</i>	<i>125</i>
4	Diskussion.....	127
4.1	ANALYSE DER ANTIKÖRPERBINDUNG GEGEN MGEA6 ZUR EINGRENZUNG DER IMMUNOGENEN PROTEINREGION	127
4.2	NACHWEIS VON MGEA6-PROTEININTERAKTIONEN IN VITRO	132
4.3	PROMOTORCHARAKTERISIERUNG DER MGEA6-GENFAMILIE	143
4.4	UNTERSUCHUNG DES E-CADHERIN/ β -CATENIN ZELLADHÄSIONSKOMPLEXES UND NACHWEIS EINER VERÄNDERTEN EXPRESSION DIESER ZELLADHÄSIONSPROTEINE IN MENINGEOMEN	148
5	Zusammenfassung	153
5	Abstract	154
6	Literaturverzeichnis.....	155
	Anhang	165

Tabellenverzeichnis

Tab.1: Agarosegehalt von Gelen in Abhängigkeit von der Größe (kb) der aufzutrennenden Fragmente.	19
Tab.2: Pipettierschema für verschieden konzentrierte Trenngele und das Sammelgel.	28
Tab.3a: Amplifizierte Teilfragmente des Sequenzbereichs bis 2937bp upstream des MGEA6-Genlocus auf 14q mit Primerpaaren und Fragmentgrößen.	37
Tab.3b: Amplifizierte Fragmente der Upstream-Sequenzbereiche der <i>MGEA6</i> -Pseudogen-Loci und des <i>MGEA6</i> -Genlocus auf 14q mit Primerpaaren und Fragmentgrößen.	37
Tab.4: Sequenzen zur Klonierung in die FLAG-Vektoren p3xFLAG-CMV-10 und -14.	56
Tab.5: MGEA6-HA-Tag-Fragmente für die Klonierung in pSG5.	58
Tab.6: Analytierte Seren mit Tumorgrad und histomorphologischer Einordnung.	84
Tab.7: Immunreaktivität der Seren gegen die aufgereinigten Proteine aminoterminaler Proteinbereich (N), interner Proteinbereich (I) und carboxyterminaler Proteinbereich (C) im Western-Blot, sowie gegen das MGEA6-Volllängenprotein in Western-Blot und ELISA.	86
Tab.8: Überblick über die konstruierten Plasmide für die Expression der Fusionsproteine.	92
Tab.9: Übersicht über die Kombinationen der Plasmide zur Co-Transfektion und Co-Expression der Fusionskonstrukte.	95
Tab.10: Die <i>MGEA6</i> -homologen Pseudogensequenzen: chromosomale Lokalisation, annotierte mRNAs, Struktur und flankierende Elemente.	109
Tab.11a: Immunhistochemische Analyse von 38 Meningeomen verschiedener Tumorgrade und histomorphologischer Subtypen mit Antikörpern gegen β -Catenin und E-Cadherin.	120
Tab.11b: Zytogenetische Analyse von 38 Meningeomen verschiedener Tumorgrade und histomorphologischer Subtypen betreffend Chromosom 22-Aberrationen und Untersuchung der Invasivität der Tumoren.	121
Tab.12: Zusammenfassung der Immunhistochemischen Analyse der β -Catenin- und E-Cadherin-Expressionen in Meningeomen verschiedener Tumorgrade.	123

Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Allgemeine Darstellung der homologen Rekombination zwischen der Bac-N-Blue DNA und dem Baculovirus Transfervektor.	45
Abb.2: Plaque-Assay.....	48
Abb.3: Der Vektor pGEM [®] -T Easy.	73
Abb.4: Der Vektor pGL3-Basic.	74
Abb.5: pGL3 Vektor Multiple Cloning Region.	74
Abb.6: Der Vektor pCMV β	75
Abb.7: Der Vektor pBlueBacHis2A.	76
Abb.8: Multiple Cloning Site des des Vektors pBlueBacHis2A.....	76
Abb.9: Der p3xFLAG-CMV-10-Vektor.	77
Abb.10: Nukleotidsequenz der Multiple Cloning Site des Vektors p3xFLAG-CMV-10.	77
Abb.11: Der p3xFLAG-CMV-14-Vektor.	78
Abb.12: Nukleotidsequenz der Multiple Cloning Site des Vektors p3xFLAG-CMV-14.	78
Abb.13: Der Vektor pSG5.	79
Abb.14: Der Vektor pGBKT7.....	79
Abb.15: Gelelektrophoretische Darstellung des Vektors pBlueBacHis2A und der Fragmente für die Sequenzregionen Aminoterminus (I), interne Proteinregion (II) und Carboxyterminus (III).	81
Abb.16: Schematische Darstellung der anhand der Aminosäuresequenz vorhergesagten Domänen des MGEA6-Proteins.	81
Abb.17: Western-Blot-Nachweis der mittels Baculovirus-System exprimierten Proteine.....	83
Abb.18: Western-Blot-Analyse der Antikörperreaktivitäten des MGEA6-Proteins und des aminoterminalen (N : 35kDa), internen (I : 39kDa) und carboxyterminalen (C : 30kDa) MGEA6-Proteinbereiches (C : 30kDa) mittels Seren von Meningeompatienten.....	85
Abb.19: Charakterisierung der MGEA6-HA-Tag-Fragmente.	90
Abb.20: Restriktionsverdau der rekombinanten Klone pSG5/MGEA6-HA-Tag mit den Enzymen EcoRI und BamHI.	90
Abb.21: Agarosegelnachweis der Fragmente BAIAP2, SPTAN1 und KIBRA aus der PCR-Amplifizierung. 92	
Abb.22: Restriktionsverdau der Plasmide p3x-FLAG-CMV-10 bzw. -14 zur Charakterisierung rekombinanter Klone.	93
Abb.23: Nachweis der Expression der Fusionsproteine im Western-Blot mittels Anti-FLAG bzw. Anti-HA-Antikörper.....	94
Abb.24: Western-Blot-Analyse der Proteinlysate nach der Co-Immunpräzipitation von BAIAP2 und MGEA6. Die Proteininteraktion wurde für die Proteine FLAG-BAIAP2 und HA-MGEA6 gezeigt.	96
Abb.25: Western-Blot-Analyse der Proteinlysate nach der Co-Immunpräzipitationen von SPTAN1-FLAG/HA-MGEA6 und SPTAN1-FLAG/MGEA6-HA.....	97
Abb.26: Western-Blot-Analyse der Proteinlysate nach der Co-Immunpräzipitationen von KIBRA und MGEA6.	98
Abb.27: Western-Blot-Analyse der Co-Expression und Co-Immunpräzipitation der Fusionsproteine HA-MGEA6 und MGEA6-HA mit den leeren FLAG-Vektoren p3xFLAG-CMV-10 bzw. p3xFLAG-CMV-14 als Negativkontrollen der Immunpräzipitation.....	100

Abb.28: Sequenzbereich 4200bp upstream des <i>MGEA6</i> -Genlocus auf 14q21 mit den Bindungsstellen der für die Amplifizierung verwendeten Primer und der Promotorregion des <i>MGEA6</i> -Genlocus:.....	103
Abb.29: Charakterisierung der Fragmente aus der PCR-Amplifikation des <i>MGEA6</i> -Locus Upstreambereichs:	104
Abb.30: Restriktionsverdau der rekombinanten Klone pGL3-Basic/ <i>MGEA6</i> -Upstream-Fragmente mit den Enzymen <i>KpnI</i> und <i>BglIII</i>	105
Abb.31a und b: Ergebnisse des Luziferaseaktivitäts-Assays für die Promotorregion des <i>MGEA6</i> -Genlocus.	106
Abb.32: Agarosegelnachweis der PCR-Amplifizierung für die Sequenzen der Loci 7q34- und 13q14.3.	110
Abb.33: Restriktionsverdau der Plasmide pGEM-T Easy mit den enthaltenen Fragmenten der Loci 6q27, 7q35 und 18q11.2 zur Charakterisierung im Agarosegel	111
Abb.34: Charakterisierung der Plasmide pGL3-Basic/7q35(2) Klone 1-5 mittels Restriktionsverdau mit dem Enzym <i>NcoI</i> (NEB).	112
Abb.35a und b: Ergebnisse des Luziferaseaktivitäts-Assays für die Promotorregionen der Loci der <i>MGEA6</i> -Pseudogensequenzen.	113
Abb.36: Western-Blot Analyse von Proteinlysaten verschiedener Meningeome und Kontrollen unter Verwendung der Antikörper gegen E-Cadherin und β -Catenin.	117
Abb.37: Immunhistochemische Analyse von Paraffingewebeschnitten unter Verwendung der Antikörper gegen β -Catenin und E-Cadherin.	119
Abb.38: Zellfraktionierung von Zelllysaten aus Primärzellkultur des Meningeoms H392.	124
Abb.39: Immunfluoreszenzfärbung von Primärzellen des Meningeoms H376 (MI) mit β -Catenin-Antikörper und Golgi-Antikörper mit unterschiedlichen Sekundäntikörpern nach Methanol-Fixierung.	126
Abb.40: Referenzsequenz KIBRA (WWC1; Homo sapiens WW and C2 domain containing 1; NP_056053)	137
Abb.41: Referenzsequenz BAIAP2 (Homo Sapiens BAI1-associated protein 2 isoform 1; NP_059344).....	139
Abb.42: Referenzsequenz SPTAN1 (Homo Sapiens Spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin); NP_003118).....	141
Abb.43: Referenzsequenz <i>MGEA6</i> (Homo Sapiens Meningioma Expressed Antigen 6).	166

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
<i>AcMNPV</i>	<i>Autographa californica multiple polyhedrosis virus</i>
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
β-Gal	beta-Galaktosidase
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
cDNA	complementary DNA (Komplementäre DNA)
Da	Dalton; ein Dalton entspricht einem Zwölftel der Masse eines ¹² C-Atoms
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenyl-Indol-Dihydrochlorid
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	double stranded DNA (Doppelstrang-DNA)
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
entspr.	entspricht/entsprechend
et al.	et alii (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol

Fc	Konstante Region eines Antikörpers
FCS/FKS	fetal calf serum / fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
for	forward (vorwärts)
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{dd}	bidestilliertes Wasser
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin der Klasse G (Gamma)
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
k. A.	keine Angabe
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
lacZ	Gen für β -Galaktosidase
λ	Wellenlänge
LB	Luria Bertani-Broth (Nährmedium)
m	milli-
μ	mikro-
M	molar
mA	Milliampere
MCS	multiple cloning site
min	Minute(n)
mm	Millimeter
mRNA	messenger-RNA
n	nano
N	normal
n. a.	nicht analysiert
NCBI	National Center for Biotechnology Information (USA)
NHS	N-Hydroxysuccinimid

NP40	Nonidet P40; ein Detergenz
OD	Optische Dichte
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
p	pico-; Bezeichnung für den kurzen Arm eines Chromosoms (petit)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
pfu	plaque forming units
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PVDF	Polyvinylidenfluorid
q	Bezeichnung für den langen Arm eines Chromosoms (queue)
rev	reverse (rückwärts)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s.	siehe
s.o.	siehe oben
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
sog.	sogenannt(e)
ssDNA	single stranded DNA (Einzelstrang-DNA)
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethyldiamin
T _m	melting temperature (Schmelztemperatur)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	unit (Einheit)

u. a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt; Volumeneinheit
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
v/v	volume per volume (Volumen zu Volumen)
WB	Western-Blot
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Die körpereigene Immunabwehr und die Erkennung von Tumorantigenen durch das menschliche Immunsystem sind vielversprechende Ansatzpunkte in der aktuellen und zukünftigen Tumorforschung. Die zellbiologischen Vorgänge, die der Immunogenität von Antigenen zu Grunde liegen, sind bisher noch wenig geklärt. Die Identifizierung von Antigenen, die eine Immunreaktion im Körper von Patienten auslösen, kann einen Beitrag zur Diagnose und zu prognostischen Aussagen bezüglich der Tumorentwicklung leisten. Die Charakterisierung humaner Tumorantigene durch die Analyse der T-Zell-Antwort und die Identifizierung von spezifischen Cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) ist jedoch vergleichsweise schwierig. Der Nachweis von Antikörpern gegen Proteine im Serum von Tumorpatienten im Vergleich zu Normalseren, wie in der SEREX-Analyse (*Serological Analysis of Recombinant cDNA Expression Libraries*; Sahin et al., 1995; Chen et al., 1997; Türeci et al., 1997) durchgeführt, ist eine alternative und effektive Methode zur Identifizierung von Antigenen. Diese Methode führte auch zur Identifizierung des *Meningeom-exprimierten Antigens 6 (MGEA6)* mittels Seren von Meningeompatienten.

Meningeome sind Neoplasmen der Leptomeningen, die das Hirn und Rückenmark umgeben. Sie machen etwa 20% aller primären intrakraniellen Tumore aus und zählen somit zu den häufigsten Tumoren des menschlichen Nervensystems. Die Ätiologie der Meningeome ist bisher noch ungeklärt. Ihre jährliche Inzidenz beträgt 6 pro 100.000 Menschen. Betroffen sind Menschen in der sechsten und siebten Lebensdekade, wobei Frauen häufiger Meningeome entwickeln als Männer. Bei Kindern und Männern treten jedoch öfter Meningeome höheren Grades auf [Jaaskelainen et al., 1986; Matsuno et al., 1996]. Gemäß der World Health Organisation (WHO) werden die Meningeome nach histopathologischen Aspekten in drei Klassen eingeteilt. Diese richten sich nach dem Grad der Malignität, d. h. nach der Aggressivität des Wachstums und der Neigung zur Rezidivbildung. Im Allgemeinen handelt es sich bei Meningeomen um langsam wachsende, gutartige Tumore, die dem Grad I (WHO-I, entspr. MI) der WHO-Klassifizierung angehören. Es treten aber auch atypische Meningeome des Grades II (WHO-II, MII) auf, die durch erhöhte Zellularität und verstärkte mitotische Aktivität gekennzeichnet sind und etwa 8% der Meningeome ausmachen. Dem Grad III werden anaplastische Meningeome

zugeordnet (WHO-III, MIII), welche etwa 2% der auftretenden Meningeome darstellen. Es gibt histomorphologisch sehr unterschiedliche Formen, die verschiedenen Subtypen zugeordnet werden. Bei den häufigsten Subtypen handelt es sich um die arachnoidalen (meningothelialen), fibroblastischen, transitionalen und sekretorischen Subtypen [Burger et al., 2002; Louis et al., 2000]. Die Vollständigkeit der neurochirurgischen Resektion des Tumors ist mitbestimmend für die Prognose der durchschnittlichen Überlebenszeit eines Patienten. Auch nach vollständiger Resektion kommt es bei Meningeomen der Grade II und III häufig zur Ausbildung von Rezidiven. Die malignen Meningeome werden mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von unter zwei Jahren assoziiert. Bisher werden Voraussagen über die klinische Weiterentwicklung eines Tumors mittels Proliferationsmarkern wie BrdU, Ki67/MIB1 oder PCNA getroffen, um das proliferative Potential von Tumoren zu bestimmen. Es ist jedoch notwendig, weitere histologische Marker zu entdecken, die zur Diagnose und zur Prognose des klinischen Verhaltens von Tumoren beitragen können.

Es werden exogene und endogene Faktoren für die Ausbildung von Meningeomen verantwortlich gemacht. Zu den exogenen Faktoren zählen, neben Traumata und Viren, Strahlungen niedriger bis hoher Dosen, wobei Latenzzeiten zwischen 35 und 19 Jahren nach einer Aussetzung der Strahlung möglich sind [Sanson and Cornu, 2000; Kleinschmidt and Lillehei, 1995]. Strahlungsinduzierte Meningeome sind meist vom aggressiveren Typ, treten häufig multifokal auf und zeigen eine höhere Prävalenz für jüngere Patienten [Harrison et al., 1991; Mack and Wilson, 1993; Musa et al., 1995].

Endogene Faktoren sind beispielsweise hormonale Veränderungen. Auf Grund dessen, dass Frauen mit 60-66% der Meningeompatienten häufiger betroffen sind als Männer, wird eine Beteiligung von Geschlechtshormonen bei der Ätiologie der Meningeome vermutet. Diese Annahme ergibt sich auch aus der Beobachtung eines beschleunigten Tumorwachstums während der Schwangerschaft [Roelvink et al., 1987]. Bei Untersuchungen zu Steroid-Rezeptoren an Meningeomen konnte gezeigt werden, dass Progesteron-Rezeptoren bei etwa 2/3 der Meningeome nachweisbar sind, bei Frauen häufiger als bei Männern [Carroll et al., 1993; Hsu et al., 1997; Sanson and Cornu, 2000]. Des Weiteren ist ihre Expression in höhergradigen Tumoren geringer als in benignen. In normalen Meningen ist die Expression von Progesteron-Rezeptoren im Vergleich zu Meningeomen gering [Carroll et al., 1993; Weisman et al., 1986]. Nach verschiedenen Untersuchungen sind die Progesteron-

Rezeptoren meist im Nukleus lokalisiert. Sie sind vermutlich in der Lage, die Transkription von Genen, welche unter der Kontrolle eines Progesteron-bindenden Promotors stehen, zu induzieren [Carrol et al., 1995].

Mutationen von Onkogenen wurden in Meningeomen bisher zwar nicht gefunden, aber verschiedene Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, welche durch Onkogene kodiert werden, konnten als hochreguliert identifiziert und somit als endogene Faktoren mit der Proliferation der Tumore in Verbindung gebracht werden. Eine Beteiligung von Wachstumshormonen auf die Tumorprogression wird vermutet, so zum Beispiel für EGF (*epidermal growth factor*), IGF (*insuline like growth factor*), PDGF (*platelet derived growth factor*) und VEGF (*vascular epithelial growth factor*) [Sanson and Cornu, 2000].

Eine wachstumsfördernde Wirkung auf Meningeomzellen *in vitro* wurde sowohl für den epidermalen Wachstumsfaktor EGF nachgewiesen [Weisman et al., 1986] als auch für PDGFB, welches von den Zellen sekretiert wird und ihr Wachstum zu beschleunigen scheint [Adams et al., 1996]. Die korrespondierende Rezeptoruntereinheit PDGF-betaR wird zusammen mit PDGFB in menschlichen Meningeomen exprimiert, was die Annahme einer autokrinen oder parakrinen Stimulierung unterstützt. Die Präsenz des aktivierten Rezeptors wurde durch gegen PDGFB gerichtete Antikörper bestätigt [Shamah et al., 1997]. Für TGF- α wurde eine erhöhte Immunreaktivität in Meningeomzellen und eine mutmaßliche autokrine Stimulation festgestellt, die mit der Tumoraggressivität in Zusammenhang gebracht wird [Linggood et al., 1995; Hsu et al., 1998]. Die Beteiligung bei der Tumorprogression wurde auch für IGFII und dem IGF binding protein IGFBP vermutet [Nordquist et al., 1997]. VEGF konnte mit der Ausbildung von peritumoralen Ödemen als Folge einer vaskulären Permeabilisierung und einer damit einhergehenden Veränderung der Funktionalität der Blut-Hirn-Schranke [Kalkanis et al., 1996] in Verbindung gebracht werden. Darüber hinaus wurde VEGF eine Mitwirkung bei der Mobilisierung von (Tumor-) Zellen zugeschrieben, die zur Ausbildung von Sekundärtumoren und Rezidiven führen können [Sanson and Cornu, 2000; Zang, 2001].

Weitere endogene Faktoren wurden auf chromosomaler Ebene gefunden. Bei höhergradigen Meningeomen wurden charakteristische chromosomale Veränderungen beobachtet, wobei es sich sowohl um Chromosomenverluste als auch, in geringerem Ausmaß, um Chromosomenzugewinne handelt [Lekanne-Deprez et al., 1995; Simon et al., 1995; Weber et al., 1997; Lindblom et al., 1994; Menon et al., 1997; Rempel et al., 1993; Simon et al., 1996; Lamszus et al., 1999; Sayagues et al., 2002].

Der bedeutendste genetische Faktor, welcher für die Tumorigenese von Meningeomen bisher beschrieben wurde, wird mit der Neurofibromatose Typ 2 in Verbindung gebracht. Es handelt sich um den Verlust eines Chromosoms 22, und damit einhergehend um den Verlust der Heterozygotie für das *Neurofibromatose Typ 2-* (*NF2-*) Gen. Eine mutationsbedingte Inaktivierung des zweiten Allels von *NF2* tritt in bis zu 60% aller Meningeome auf [Dumanski et al., 1987 + 1990; Meese et al., 1987; Rutledge et al., 1994; Lekanne-Deprez, 1995]. Eine Rolle von *NF2* als Tumorsuppressorgen konnte durch Mutationsanalysen bestätigt werden [Louis et al., 1995; Gusella et al., 1996]. Bei dem *NF2*-Genprodukt handelt es sich um das Protein MERLIN (Moesin-Ezrin-Radixin-Like-Protein, auch Schwannomin), welches vermutlich eine Kontrollfunktion bei der Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion ausübt [Lallemand et al., 2003]. Es handelt sich um ein Strukturprotein, das an der Innenseite der Zytoplasmamembran mit Aktin, dem Membranprotein Beta II-Spectrin und mit mindestens fünf weiteren, bisher unbekanntenen Proteinen interagiert [Scoles et al., 1998]. In Zusammenhang mit dem chromosomalen Verlust steht die Annahme der Lokalisation von Tumorsuppressorgen auf Chromosom 22 und somit der Inaktivierung eines Allels dieser Gene. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass der chromosomale Verlust nicht obligatorisch für die Meningeomentstehung ist, da 40-50% der Tumoren keinerlei Verlust eines Chromosoms 22 oder einer Mutation des *NF2*-Gens aufweisen [Samoto et al., 1995; Wellenreuther et al., 1995] und generell zwischen 30% und 50% der Meningeome einen normalen Karyotyp besitzen. Es gibt vor allem Unterschiede bei den verschiedenen Subtypen der benignen WHO-Grad I-Meningeome, bei denen der arachnoidale (meningotheliale) Subtyp in etwa 25% der Fälle, der fibroblastische und der transitionale Subtyp in 70-80% der Fälle eine solche Mutation aufweisen. Auf Grund von Studien an Patienten, die nicht mit *NF2* assoziierte Meningeome ausbildeten, konnte gezeigt werden, dass diese im Gegensatz zu *NF2*-Patienten durchaus das *NF2*-Genprodukt bildeten, [Maxwell et al., 1998]. Es müssen folglich noch weitere, *NF2*-unabhängige Faktoren an der Entstehung vor allem der meningothelialen Meningeome beteiligt sein [Wellenreuther et al., 1995].

Die Identifizierung von Antigenen, die eine komplexe humorale Immunantwort in Meningeomen bewirken, erlaubt die Darstellung von spezifischen Reaktivitätsmustern mit Seren von Meningeompatienten. Die Identifizierung und Charakterisierung von Antigenen die zu einer Immunreaktivität führen stellt darüber hinaus einen interessanten Ansatz zur Identifizierung humaner Tumormarker dar und trägt zum Verständnis zellulärer Prozesse bei der Meningeomentstehung bei. [Comtesse et al., 2005].

Mit Hilfe des SEREX-Verfahrens (*Serological Analysis of Recombinant cDNA Expression Libraries*; Sahin et al., 1995; Chen et al., 1997; Türeci et al., 1997) gelang der Nachweis einer Antikörperantwort mittels Serum eines Patienten mit arachnoidalem Meningeom mit unauffälligem, diploidem Chromosomensatz [Heckel et al., 1997; 1998]. Die Analysen ließen die Annahme zu, dass es ein oder mehrere immunogene Antigene bei Meningeomen gibt, welche durch die humorale oder T-Zell vermittelte Immunantwort zur Generierung von Antikörpern führen.

Im weiteren Analysen wurde das *Meningeom-exprimierte Antigen 6 (MGEA6)* kloniert und eine Antikörperantwort gegen MGEA6 in Meningeompatienten nachgewiesen. Darüber hinaus wurde die vom gleichen ORF stammende Splicevariante *MGEA11* identifiziert, welche durch eine *in frame*-Deletion entsteht. Die Expression beider Varianten wurde mittels Northern-Blot-Analysen und RT-PCR-Analysen in Meningeomen, sowie in verschiedenen menschlichen Normalgeweben, wie Niere, Skelettmuskulatur und Hirngewebe, nachgewiesen und ist somit nicht meningeomspezifisch [Heckel et al., 1997; Comtesse et al., 2001]. Der Nachweis der Antigenität erfolgte jedoch nur mit Seren von Tumorpatienten. In 41,7% der analysierten Seren von Meningeompatienten wurden Antikörper gegen rekombinant exprimiertes MGEA6 und MGEA11 gefunden. Dieses Ergebnis konnte im Zuge meiner Diplomarbeit in einer weiteren Analyse mit Seren von Meningeompatienten bestätigt werden. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Antigenität nicht mit dem Tumorgrad oder dem histomorphologischen Subtyp der Tumoren korrelierte. In weitere Analysen wurde eine Antikörperantwort gegen MGEA6 mit Serum von Glioblastompatienten und eines Astrozytom-Grad II-Patienten nachgewiesen, nicht jedoch mit Seren von Patienten mit anaplastischen bzw. pilozytischen Astrozytomen und von 12 gesunden Personen. Diese Daten zeigten also die Induktion einer Antikörperantwort in Meningeompatienten und Patienten mit diffusen Gliomen.

Im Vergleich zu normalem Hirngewebe wurde eine erhöhte Expression von MGEA6 und MGEA11 in Meningeomen aller drei WHO-Grade und in diffusen Gliomen festgestellt. Dieser Nachweis erfolgte in einer Western-Blot Analyse, die auch zeigte, dass MGEA11 in den WHO-Graden I und II in etwas geringerem Ausmaß als MGEA6 exprimiert wurde. Eine Korrelation der Überexpression mit der Induktion einer Antikörperantwort in dem gleichen Gewebe konnte allerdings nicht bestätigt werden. Es wurde vermutet, dass sich die erhöhte Expression auf Tumoren neuroectodermalen Ursprungs bezieht [Comtesse et al., 2002].

Es gibt unterschiedliche Mechanismen, die zur Bildung von Antigenen und zur Erkennung dieser durch Antikörper und Zellen des Immunsystems führen können. Normalerweise differenziert das Immunsystem zwischen körpereigenen und körperfremden Proteinen oder Stoffen. Es muss aber auch in der Lage sein, fehlerhaft gewordene körpereigene Proteine und Zellen zu erkennen und abzubauen, oder die Apoptose dieser entarteten Zellen zu aktivieren. Verschiedene Mechanismen tragen zur Auslösung einer Immunreaktion bei. So zum Beispiel die tumorspezifische Expressionen von Genen oder die Überexpressionen von Genen. Durch Mutationen veränderte Gene können zur Expression von instabilen oder funktionslosen Proteinen führen. Auch von Splicevarianten exprimierte oder posttranslational modifizierte Proteine können veränderte Proteine erzeugen. All diese Proteine können eine Aktivierung des Immunsystems bewirken.

Häufiger Auslöser für Immunantworten sind Tumorantigene welche durch Genmutationen entstanden sind und nur in den individuellen Tumoren exprimiert werden. Neben spezifischen Mutationen kommen auch Genprodukte von Transkripten alternativer Transkriptionsstarts oder Leserahmen vor [Koslowski, 2002]. Nicht nur in den Tumoren eines Gewebes, sondern auch als Oberflächenmarker der Zellen des Normalgewebes finden sich die organspezifischen Differenzierungsantigene. Cancer/Testis-Antigene (CT-Antigene) kommen in Tumoren verschiedenster Histologie vor, so häufig in Melanomen, und in Testisgewebe, jedoch nicht in anderen Normalgeweben. Überexprimierte Antigene werden in einer Reihe von Normalgeweben gering exprimiert und in Tumoren überexprimiert [Renkvist et al., 2001; Novellino et al., 2005]. Durch die Überexpression kommt es zum Abbau der Proteine in der Zelle. Proteinfragmente werden ausgeschleust, aber auch an der Zelloberfläche präsentiert, und können so von Zellen des Immunsystems

gebunden werden. Durch den Nachweis der Überexpression von MGEA6 im Tumor nehmen wir bisher an, dass diese zur Auslösung einer Immunantwort führt [Comtesse et al., 2002].

Nach einer Mutationsanalyse des ORF von *MGEA6*-cDNA aus Meningeom-Tumorproben sowie aus cDNA von gesunden Kontrollpersonen konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Antikörperantwort gegen MGEA6 und einer Mutation im Exon-Bereich gefunden werden. Die hier entdeckten vier Basenaustausche traten in den cDNAs beider Gruppen gleichermaßen auf. Wir vermuteten, dass es sich um SNPs in der *MGEA6*-Sequenz handelt, oder um Mutationen, die, trotzdem der Basenaustausch in zwei Positionen zu einem Aminosäureaustausch an der betreffenden Position im Protein führt, keine Immunantwort zur Folge haben [eigene Daten, nicht veröffentlicht].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Reaktivität einzelner Proteinbereiche des MGEA6-Proteins untersucht, um die immunogene Proteinregion einzugrenzen.

Die Proteinstruktur von MGEA6 wurde anhand der Hydrophobizität der Aminosäuresequenz bestimmt. Das Protein weist eine Transmembrandomäne (TM-Domäne) am Aminoterminal auf, eine zweite TM-Domäne wird vermutet. Der Carboxyterminus ist überaus prolinreich. Der interne Proteinteil weist zwei Coiled-Coil-Domänen auf, wobei innerhalb der ersten Coiled-Coil-Domäne ein Leucin-Zipper-Motif vorhanden ist. Ein Vergleich der Proteinstruktur mit bekannten Proteinfamilien ergab eine Homologie zum C219-reactive-Peptide, einem MDR1 ähnlichen P-Glykoprotein, welches zur Gruppe der ATP-getriebenen Membranpumpen gehört, und zur V-type-ATPase 116kDa-subunit-Familie, welche als Protonenpumpen am Membrantransport beteiligt sind. Des Weiteren ergab sich eine Homologie zu einem Neuropeptid-Rezeptor mit Ähnlichkeit zu CCK-BR (Gastrin/Cholecystokinin Type B Rezeptor), der zur Myosin Tail-Familie gehört. Als membranäres Protein wäre für MGEA6 eine Rezeptorfunktion oder eine Beteiligung an der Ausbildung von Membrankanälen denkbar.

Zur Bestätigung einer membranären Lokalisation des ca. 110kDa großen MGEA6-Proteins wurden Sequenzanalysen und Zellfraktionierungsexperimente durchgeführt. Weitere Analysen mittels Immunfluoreszenzfärbungen an TX3868-Glioblastomzelllinien und primären Meningeomzelllinien, sowie Immunhistochemische Färbungen von Kry-

Gewebeschnitten von Meningeomen und Tumoren glialen Ursprungs, ergaben keine spezifischen Färbungen in Zellkernen. Hier zeigte sich ein globuläres zytoplasmatisches Muster, teilweise perinukleär und teilweise zellmembranär akzentuiert. In normalen Astrozyten und in normalen Leptomeningen konnte MGEA6 gar nicht bzw. nur schwach nachgewiesen werden [Comtesse et al., 2002].

Die Struktur von MGEA6 lässt auf Interaktionen mit anderen Proteinen schließen. Hierauf deuten z. B. die Coiled-Coil-Domänen hin, die häufig in proteinbindenden Regionen vorkommen. Auf Interaktionen mit Proteinen, die an Signaltransduktionswegen beteiligt sind, weist der prolinreiche Carboxyterminus hin. Diese Proteine weisen häufig Strukturen wie WW-, SH2- oder SH3-Domänen auf, für die Bindungen mit prolinreichen Regionen beschrieben sind [Marcias et al., 1996; Lee et al., 1998; Pawson et al., 2002].

In einem Yeast-Two-Hybrid-Screening wurden verschiedene Proteine als mögliche Bindungspartner von MGEA6 identifiziert. Um die Interaktion von MGEA6 mit anderen Proteinen zu bestätigen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Proteininteraktionen von MGEA6 mit den Proteinen BAIAP2, KIBRA und SPTAN1 analysiert.

Eine Beteiligung von MGEA6 an Signaltransduktionswegen wurde außer auf Grund der Proteinstruktur durch weitere Analysen vermutet. Eine Microarray-Analyse zur Regulierung von MGEA6 auf mRNA-Ebene zeigte die Herunterregulierung von MGEA6 nach dem Knock-Out des *TCF/LEF-1* Transkriptionsfaktors [nicht veröffentlichte Daten, Ballhausen et al., Halle]. Aus der Analyse ließ sich schließen, dass eine Regulation von MGEA6 über den WNT-Signalweg (WNT-Pathway) vorliegen könnte. Das am WNT-Signalweg entscheidend beteiligte Protein β -Catenin liegt in der Zelle zum einen zytoplasmatisch und zum anderen gebunden an E-Cadherin an der Zytoplasmamembran vor. Bei aktiviertem WNT-Signalweg wird es stabilisiert und in den Zellkern transportiert, wo es an den *TCF/LEF-1* Transkriptionsfaktor bindet und dadurch Zielgene aktiviert [Henderson and Fagotto, 2002].

Weitere Studien zum WNT-Signalweg brachten β -Catenin mit der Pathogenese verschiedenster menschlicher Krebserkrankungen in Verbindung [Lustig u. Behrens, 2003]. Neben dem WNT-Signalweg ist β -Catenin am E-Cadherin-vermittelten Zelladhäsions-system direkt beteiligt. Cadherine sind transmembranäre Glykoproteine die in der Zellmembran verankert sind. β -Catenin bindet E-Cadherin und wirkt indirekt bei der

Verknüpfung von E-Cadherin und den Aktinfilamenten des Zytoskeletts mit. Es gibt Vermutungen, dass das E-Cadherin-vermittelte Zelladhäsionssystem entscheidend an den Entstehungsprozessen menschlicher Tumoren beteiligt ist. Hierbei spielen wahrscheinlich auch veränderte Expressionen von β -Catenin eine Rolle, die für mehrere Erkrankungen, wie Tumoren des Magens und des Darms, Hepatozelluläre Tumore, Oesophagale Tumore, Melanome u. a., beschrieben sind [Hirohashi S, 1998; Hirohashi S, 2003; Van Aken et al., 2001; Maruyama et al., 2000; Polakis P, 2000]. Eine Akkumulation von β -Catenin wurde mit der Angiogenese in Hirntumoren in Verbindung gebracht. Es gibt bisher jedoch keine weiteren Studien, die sich mit der Rolle von β -Catenin und einer möglichen Destabilisierung der Zelladhäsionskomplexe in Meningeomzellen weiter befassen. Eine Fehlfunktion des E-Cadherin-Systems wurde auch mit der Invasion von Tumorzellen in Verbindung gebracht [Bracke et al., 1996]. Eine Korrelation von reduzierten funktionalen Zelladhäsionsmolekülen und einem erhöhten proliferativen Potential wurde für Meningeome postuliert [Utsuki et al., 2005]. Weitere Studien zu E-Cadherin zeigten eine stark reduzierte oder sogar absente Expression in malignen Meningeomen [Schwechheimer et al., 1998], beziehungsweise einen E-Cadherin Expressionsverlust in WHO-I-Meningeomen des fibroblastischen Subtyps [Tohma et al., 1992].

In Zusammenhang mit dem Funktionsverlust von Zelladhäsionsmolekülen steht anscheinend auch das *NF2*-Genprodukt MERLIN, welches normalerweise mit Komponenten des Adhäsionssystems interagiert, und dem bei der Kontrolle der Zellinteraktion und bei der Inhibierung des kontaktabhängigen Zellwachstums eine Rolle zugeschrieben wird. Bei *NF2*-Verlust durch Mutation wäre diese Kontrollfunktion in vielen Meningeomen somit nicht mehr gegeben [Lallemand et al., 2003].

Die bisherigen Analysen zur Regulation von MGEA6 und zu den Proteinen β -Catenin und E-Cadherin in Meningeomen und anderen Tumoren führten zur Betrachtung des WNT-Signalwegs und des Zelladhäsionskomplexes in Meningeomen. Hierzu wurde die Expression der Proteine β -Catenin und E-Cadherin untersucht.

Neben *MGEA6* und der Splicevariante *MGEA11* wurden neun verschiedene homologe Sequenzen gefunden, welche nach neueren Erkenntnissen auf den Chromosomen 2, 6, 7, 9, 10, 13 und 18 lokalisiert sind [Heckel et al., 1997; Comtesse et al., 2001]. Es handelt sich um eine Genfamilie, deren aktiver Genlocus auf Chromosom 14q lokalisiert wurde. Dieser erstreckt sich über 83 kb, weist eine Intron/Exon-Struktur mit 24 Exons auf und besitzt einen ORF mit untranslatierten, flankierenden Bereichen. *MGEA6* und einige seiner Pseudogene wurden in einer Studie an Cutanen T-Zell-Lymphomen als tumorassoziierte Antigenfamilie mit tumorspezifischem Splicing-Muster entdeckt. Eine SEREX-Analyse identifizierte *cTAGE-1* (*Cutaneous T-cell lymphoma-associated antigen-1*) als für Cutane T-Zell-Lymphome spezifisches Antigen, eine angeschlossene RT-PCR-Studie identifizierte weitere *cTAGE*-Gene, die fünf unterschiedlichen Chromosomen zugeordnet wurden. Die Genfamilie umfasst auch die Gene, die als *MGEA6* (*cTAGE-5C*) und *MGEA11* (*cTAGE5D*) schon früher identifiziert wurden. *cTAGE-1* und -5 wurde nach dieser Studie Rollen als Tumorantigene in der Keimbahnentwicklung zugeschrieben. Darüber hinaus wurde postuliert, dass das tumorspezifische Splicing-Muster der *cTAGE*-Gene zu Proteinen führen könnte, die Kandidaten für eine spezifische Immuntherapie bei Cutanen T-Zell-Lymphomen und auch anderen Krankheiten darstellen könnten [Eichmüller 2002; Eichmüller et al., 2003; Usener et al., 2003].

Bei den von Usener und Eichmüller analysierten Expressionen der *cTAGE*-Gene handelt es sich um Mitglieder der *MGEA6*-Genfamilie. Die Nomenklatur *MGEA* wurde in der vorliegenden Arbeit beibehalten. Die Expression und das Splicing-Muster verschiedener dieser *MGEA6*-homologen Sequenzen, die als teilweise tumorspezifisch gefunden wurden [Usener et al., 2003], gab Anlass zur genaueren Betrachtung dieser Sequenzen.

Die Variante *MGEA11* geht vermutlich durch alternatives Splicen unter Verlust des Exons 19 aus der *MGEA6*-Sequenz hervor. Aufgrund der Expression in verschiedenen menschlichen Geweben scheinen sowohl *MGEA6* als auch *MGEA11* eine für die Zelle relevante Rolle zu spielen. Für verschiedene *MGEA6*-homologe Sequenzen konnten bisher annotierte mRNAs in Testisgewebe und in Melanomen nachgewiesen werden. In einer Sequenzierungsanalyse von *MGEA6*-cDNA-Sequenzen aus cDNAs von Meningeompatienten konnten wir Klone identifizieren, die mit zwei dieser homologen Sequenzen übereinstimmen und von den Chromosomen 7 und 2 stammen. Nach bisherigen Analysen handelt es sich bei allen Sequenzen um Pseudogene.

Pseudogene entstehen durch Duplikation einer genomischen DNA oder durch Integration einer revers-transkribierten mRNA in das Genom (Retrotransposition) und haben in der Regel ihre Funktion verloren. Nach Integration in einen Locus der Promotorelemente aufweist kann jedoch eine Transkription dieser Pseudogene erfolgen. Für die meisten der *MGEA6*-homologen Sequenzen zeigte die Betrachtung der flankierenden Sequenzbereiche Anzeichen für Retrotranspositionereignisse, woraus diese vermutlich als prozessierte Pseudogene hervorgingen. Nach phylogenetischen Untersuchungen wurde angenommen, dass eine Abspaltung der Sequenzen von einem ursprünglichen Gen auf Grund mehrerer Retrotranspositionereignisse erfolgte. Die flankierenden Bereiche weisen verschiedene Elemente auf, wie *LINE-1*-Elemente (L1), *SINEs* (*Alu*-Elemente) und *MaLRs* (*mammalian apparent LTR-retrotransposon*), sowie AT-reiche repetitive Sequenzen [Comtesse et al., 2001], die Aktivität der *MGEA6*-homologen Sequenzen wurde bisher jedoch nicht gezeigt.

Das Vorhandensein von Promotorbereichen in der Umgebung der Sequenzen und ihre transkriptionelle Aktivität sind erste Ansatzpunkte zur Klärung der möglichen Expression und der Funktion dieser Multigenfamilie für die Zelle. Eine transkriptionelle Aktivität ist ein Nachweis für die Integration einer Sequenz in einen Locus der Promotorelemente aufweist. Die Transkription ist ein erster Hinweis für eine mögliche Expression der Sequenz. Wie für Tumorantigene beschrieben, können Genprodukte von Transkripten alternativer Transkriptionsstarts oder Leserahmen antigen wirken. Dies trifft auch für Proteine zu, die von genhomologen Sequenzen stammen. Verschiedene Studien unterstützen die Annahme, dass es doppelt so viele von proteinkodierenden Genen abstammende Pseudogene gibt, als proteinkodierende Gene selbst [Harrison et al., 2002; Torrents et al., 2003; Zhang et al., 2003 und 2004]. Die Retrotransposition von Sequenzen ist ein aktiver Prozess, der die Genevolution beeinflusst [Brosius, 1999]. Die Expression solcher Sequenzen kann zu Proteinen führen, die dem Genprodukt sehr ähnlich sein können, aber funktionell nicht aktiv sind oder toxisch wirken können. Kommt es nicht zur Expression der Transkripte, können die transkribierten Sequenzen unter Umständen antagonistische Wirkung gegen die eigentliche Gensequenz zeigen.

Die transkriptionellen Aktivitäten verschiedener *MGEA6*-homologer Sequenzen wurde in der vorliegenden Arbeit analysiert.

Die bisherigen Analysen zu MGEA6, wonach eine komplexe Immunreaktion bei Meningeompatienten durch die Bildung von Antikörpern gegen dieses Protein gezeigt wurde, lassen auf eine Veränderung des Proteins in Tumoren im Vergleich zu Normalgeweben schließen. Die antigene Wirkung von Proteinen und die Charakterisierung dieser Proteine stellt einen interessanten Ansatz zur Identifizierung humaner Tumormarker dar und dient auch zum Verständnis zellulärer Prozesse [Comtesse et al., 2005]. Die bisherigen Ergebnisse gaben Anlass zur genaueren Charakterisierung der immunogenen Proteinregion von MGEA6, um eine Eingrenzung der Reaktivität auf ein Epitop des Proteins vornehmen zu können.

Um die Funktion des Proteins charakterisieren zu können, wurden Proteininteraktionsstudien von MGEA6 mit den Proteinen BAIAP2, KIBRA und SPTAN1 durchgeführt.

Die bisherigen Analysen zur Regulation von MGEA6 und zu den Proteinen β -Catenin und E-Cadherin in Meningeomen und anderen Tumoren führten zur Betrachtung des WNT-Signalwegs und des Zelladhäsionskomplexes in Meningeomen. Hierzu wurde die Expression der Proteine β -Catenin und E-Cadherin untersucht.

Die Expression und das Splicing-Muster verschiedener Sequenzen der MGEA6-Genfamilie, die teilweise als tumorspezifisch nachgewiesen wurden [Usener et al., 2003], gab Anlass zur genaueren Betrachtung dieser Sequenzen. Hierzu wurde die Promotorregion des aktiven *MGEA6*-Genlocus bestimmt und charakterisiert und es wurden Promotoraktivitätsanalysen für verschiedene *MGEA6*-homologe Sequenzen durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.1.1 Prinzip und Standardbedingungen

Die Polymerasekettenreaktion (PCR; Saiki et al., 1988) ist ein *in vitro* Verfahren zur selektiven Vervielfältigung definierter Nukleinsäuremoleküle. Hierbei wird mittels sequenzspezifischer kurzer Oligonukleotide, sogenannter Primer, und einer hitzestabilen DNA-Polymerase anhand einer vorgegebenen Matrize (Template) in zyklisch sich wiederholenden Schritten die Ziel-DNA spezifisch angereichert. Die Zyklenzahl betrug je nach Menge des eingesetzten Templates und Effektivität der PCR zwischen 24 und 32 Wiederholungen:

- *Denaturierung (94°C)*: Die doppelsträngige DNA wird thermisch in die beiden Einzelstränge getrennt.
- *Annealing (47-60°C)*: Die synthetisch hergestellten Primer binden an die komplementären DNA-Sequenzen.
- *Extension (72°C)*: Die DNA-Polymerase synthetisiert, an den freien 3`OH-Gruppen der Primer beginnend, unter Verwendung von dNTP's den Doppelstrang entlang des Templates.

Der PCR-Ansatz setzte sich im Allgemeinen, wie folgt zusammen:

- xµl Template (15-100ng DNA/Plasmid)
 - 5-10µl PCR-Puffer (10x, 15mM MgCl₂)
 - 0,4µl dNTP-Mix (20mM je dNTP; Roche)
 - 2,5µl forward-Primer (10µM)
 - 2,5µl reverse-Primer (10µM)
 - 0,5-0,75µl Polymerase/Enzym-Mix (5U/µl)
- auf 50µl mit H₂O_{dd} ergänzen

(Die verwendeten Polymerasen und Puffer variieren je nach PCR-System und sind inklusive Firmenangaben weiter unten aufgeführt.)

Das verwendete Programm wurde für jede PCR-Reaktion je nach Template, Primern und PCR-System angepasst.

Standardprogramm:

Denaturierung	94°C	2min
[Denaturierung	94°C	30-45sec
Annealing	T _m -5°C	45sec–1min
Extension	72°C	1min/kb] _{x24–32} Wiederholungen
Endextension	72°C	7-10min
	4°C	∞

Alternativprogramm:

Denaturierung	94°C	2min
[Denaturierung	94°C	15sec
Annealing	T _m -5°C	30sec
Extension	72°C	3min/kb] _{x10} Wiederholungen
[Denaturierung	94°C	15sec
Annealing	T _m -5°C	30sec
Extension	72°C	3min/kb] _{x17} Wiederholungen
Endextension	72°C	7-10min
	4°C	∞

Verwendet wurden der *DNA-Polymerase*-Kit Expand High Fidelity (Roche), der Triple Master Mix (Eppendorf), die *HotStarTaq DNA Polymerase* (QIAGEN) und die *Taq DNA Polymerase* (Recombinant, Invitrogen).

Bei Verwendung der *HotStarTaq DNA Polymerase* wird ein spezieller erster Schritt im PCR-Zyklus benötigt, d. h. eine Aktivierung des Enzyms durch 15-minütiges Erhitzen auf 95°C. Die Polymerase liegt vor Gebrauch in einem inaktiven Zustand vor, d. h. die Polymeraseaktivität ist bei niedrigen Temperaturen noch nicht gegeben. Dies verhindert die Ausbildung falscher Produkte durch unspezifische Primerbindung und von Primer-Dimeren

bei niedrigen Temperaturen. Die *HotStarTaq* von QIAGEN besitzt eine 5'-3' Exonuklease-Aktivität, jedoch keine in 3'-5' Richtung.

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler (PTC-100; MyResearch. Inc) durchgeführt.

2.2 Reverse Transkription

Whole Brain Total RNA (Invitrogen; DNase verdaut und Alu-PCR-getestet) wurde mittels des Omniscript Kit von QIAGEN nach dem folgenden Protokoll in cDNA umgeschrieben:

Ansatz:

- x µg RNA
- 5min bei 65°C denaturieren
- anschließend sofort auf Eis
- zur RNA hinzugeben:
 - 2 µl RT-Puffer (10x)
 - 2 µl dNTP-Mix
 - 2 µl Oligo-dT-Primer (0,1 µg/µl)
 - 1 µl RNase-Inhibitor (10U/2 µl)
 - 1 µl *Reverse Transkriptase*
- mit DEPC-H₂O auf 20 µl auffüllen
- 1h bei 37°C inkubieren
- 5min bei 93°C Denaturierung des Enzyms
- Lagerung der cDNA bei -20°C

Um die Qualität der erhaltenen cDNA zu testen wurde eine PRC mit GAPDH-Primern durchgeführt (Thermocycler PTC-100, MyResearch. Inc).

GAPDH-PCR-Ansatz:

- xµl Template (100ng cDNA)
 - 5-10µl PCR-Puffer (10x, ohne MgCl₂; Invitrogen)
 - 1,5µl MgCl₂ (15mM MgCl₂; Invitrogen)
 - 0,25µl dNTP-Mix (20mM je dNTP; Roche)
 - 0,5µl 3`GAPDH-Primer (50µM; MWG)
 - 0,5µl 5`GAPDH-Primer (50µM; MWG)
 - 0,5µl *Taq-Polymerase* (5U/µl; *TaqDNA Polymerase Recombinant*, Invitrogen)
- auf 50µl mit H₂O_{dd} ergänzen

Als Positivkontrolle wurde die gleiche PCR-Reaktion mit genomischer DNA durchgeführt.

GAPDH-PCR Programm:

Denaturierung	94°C	5min
[Denaturierung	94°C	1min
Annealing	56°C	45sec
Extension	72°C	45sec] _{x24} Wiederholungen
Endextension	72°C	10min
	10°C	∞

2.3 DNA-Sequenzierung

2.3.1 Prinzip der DNA-Sequenzanalyse nach Sanger et al. (1977)

Durch die DNA-Sequenzierung kann die Basenfolge eines DNA-Moleküls bestimmt werden. Die DNA-Sequenzanalyse der Gen-Fragmente erfolgte basierend auf der Methode von Sanger et al. (1977). Sie beruht auf der enzymatischen Synthese von DNA-Strängen, die an einem modifizierten Nukleotid abbricht. Auf diese Weise entstehen basenspezifisch terminierte DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die elektrophoretisch in einer Kapillare mit Hilfe einer Matrix, hier einem synthetischen Polymer (POP6), aufgetrennt

werden. Die Sequenzierreaktion erfolgt in einem Ansatz. Dieser enthält das zu analysierende DNA-Templete, den Sequenzierprimer, eine DNA-Polymerase und das Nukleotidgemisch. Das Nukleotidgemisch enthält alle vier Desoxynukleotide (dNTPs) und alle vier Didesoxynukleotide (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP), die sogenannten Terminatoren, welche farblich mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Wird ein Terminator in eine Kette eingebaut, so kommt es zum Abbruch der Elongationsreaktion. Eine weitere Strangverlängerung ist nicht mehr möglich, da keine freie 3'-Hydroxylgruppe vorhanden ist. Die ddNTPs blockieren so die fortlaufende enzymatische Synthese nach einem statistischen Prinzip an einer zufälligen Stelle. In einem Reaktionsansatz entstehen Produkte, die am Ende unterschiedlich markierte Basen enthalten. Je nach Base wird das selbe Fluorophor detektiert. Vor der Auftrennung der Proben über die Matrix müssen diese alkoholisch gefällt werden.

Die Auftrennung der Proben erfolgte mit dem voll automatisierten Kapillar-Sequenziergerät ABI 310 und die Auswertung mit der dazugehörigen Software der Firma Applied Biosystems. Für die Sequenzierreaktionen wurde der BigDyeTerminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben verwendet.

Sequenzierreaktion-Ansatz:

- xµl Template (300–500ng)
 - 4µl Primer (= 4µl x 0,8pmol/µl = 3,2pmol; Applied Biosystems)
 - 3µl Sequenzierpuffer (5x) (Applied Biosystems)
 - 11-xµl HPLC-H₂O
 - 2µl Reaktionsmix (=DNA-Polymerase und Nukleotidgemisch; Applied Biosystems)
- ⇒ 20µl gesamt

Programm ABI:

[Denaturierung	96°C	30sec
Primer-Annealing	50°C	45sec
Extension	60°C	4min] _{x24} Wiederholungen
	4°C	∞

Die Reaktionen wurden in einem Thermocycler (PTC-100; MyResearch. Inc) durchgeführt.

Alkoholische Fällung:

In einem Reaktionsgefäß werden folgende Komponenten zusammenpipettiert:

- 20µl Sequenzier-Reaktion
 - 20µl HPLC-H₂O
 - 100µl Ethanol abs.
 - 4µl 3M Natriumacetat (pH 4.6)
- Inkubation des Ansatzes für 30min bei RT
- Zentrifugation bei 13.000rpm für 20min bei RT
- Überstand verwerfen
- 250µl Ethanol 70% zugeben
- 1min vortexen
- Zentrifugation bei 13.000rpm für 10min bei RT
- Überstand verwerfen
- Pellet trocknen
- Pellet in 20µl HiDi-Puffer (Formamid)

Die Proben wurden nach der Aufnahme in HiDi-Puffer sofort sequenziert oder bei 4°C bis zur Sequenzierung aufbewahrt.

2.4 Agarosegelelektrophorese von DNA

2.4.1 Elektrophorese und Nachweis von DNA in Agarosegelen

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in Agarosegelen unter Verwendung von TAE-Puffer (1x) im elektrischen Feld. Die Auftrennung von linearen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten beruht auf der Tatsache, dass negativ geladene DNA in einem elektrischen Feld zur Anode wandert. Die elektrophoretische Beweglichkeit der DNA ist dabei antiproportional zum Logarithmus der Anzahl der Basenpaare (Meyers et al., 1976). Nach Färbung mit Ethidiumbromid, das in GC-Paare der DNA interkaliert, können DNA-Fragmente unter UV-Licht auf Grund der Abgabe von Fluoreszenzlicht detektiert werden.

Der Agarose-Gehalt eines Gels ist abhängig von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente. Die Poren im Gel, deren Größe durch den Gehalt an Agarose bestimmt wird, wirken als Sieb, durch das die Moleküle wandern. Hierdurch werden die Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt. Die DNA-Proben wurden zur Elektrophorese mit 1/10V DNA-Probenpuffer versetzt. Die angelegte Spannung betrug je nach Größe des Gels 90V bis 130V. Nach der Elektrophorese wurden die Gele in Ethidiumbromidlösung oder mit GelStar (BioWhittaker Molecular Applications, Konz.: 10.000x in DMSO) gefärbt und im UV-Durchlicht fotografiert.

Tab.1: Agarosegehalt von Gelen in Abhängigkeit von der Größe (kb) der aufzutrennenden Fragmente.

Agarose-Gehalt % (w/v)	0,6	0,7	0,9	1,2	1,5	2,0
Auftrennungsbereich (kb)	1,0–20	0,8–10	0,5–7	0,4–6	0,2–3	0,1–2

TAE-Puffer (50x): 2M Tris-HCl (pH 8.0)
 1M Essigsäure
 50mM EDTA

DNA-Probenpuffer (10x): TAE (1x)
 70% (v/v) Glyzerin
 40mM EDTA (pH 8.0)
 eine Spatelspitze Bromphenolblau

2.4.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) nach Herstellerangaben. Mit diesem Kit können DNA Fragmente mit Größen von 70bp bis 10kb aus Agarosegelen isoliert werden. Die Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten und in Reaktionsgefäße überführt. Durch Zugabe von 3V Puffer QG zu 1V Gelmasse und Inkubation für 10min bei 50°C wurde die Agarose gelöst. Anschließend wurde 1V Isopropanol zugegeben und die Proben gemischt. Nach Auftragung auf die QIAquick-Spin-Säulen wurde die DNA durch Zentrifugation an die Matrix der Säulen gebunden. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 0,5ml Puffer QG gewaschen, um Gelreste zu entfernen. Anschließend folgte ein

Reaktionsansatz T4-Ligase:

- xµl Vektor
 - xµl Insert
 - 5µl Ligationspuffer (2x)
 - 1µl *DNA-Ligase* (1U/µl)
 - auf 10µl mit H₂O_{dd} ergänzen
- Ligation über Nacht bei 4°C im Kühlschrank (alternativ 2-3h bei RT).

Reaktionsansatz Rapid DNA-Ligation Kit:

- in 10µl 1xDNA-Dilution Buffer aufnehmen: 100ng Vektor + 300ng Insert
 - 10µl DNA-Ligation Buffer (2x)
 - 1µl *DNA-Ligase*
- Ligation 1h bei RT

Die Ligationsansätze wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.5.2 Transformation kompetenter *E.coli* Zellen

50µl transformationskompetente Bakterien (*E.coli* JM109 bzw. *E.coli* DH5α High Efficiency Competent Cells) wurden auf Eis aufgetaut und mit 2µl Ligationsansatz vorsichtig gemischt. Nach 20min Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock (45sec bei 37°C), zur Aufnahme der DNA in die Zelle. Darauf folgte sofortiges Abkühlen des Ansatzes auf Eis und die anschließende Zugabe von 950µl antibiotikafreiem Medium zu den Zellen. Die Ansätze wurden 1h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Jeweils 200µl eines Transformationsansatzes wurden auf LB-Platten ausplattiert, die ein an den Vektor angepasstes Antibiotikum enthielten. Einzelkolonien wurden anschließend in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und ü. N. bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurde die Plasmid-DNA isoliert und sequenziert.

Bei Verwendung des Vektors pGEM-T Easy[®] (Promega; 2.15.8) wurden durch Vorbehandlung der Platten mit X-Gal (25mg/ml) (und IPTG: 200mg/ml) mittels des Blau-Weiß-Screenings gezielt rekombinante Klone identifiziert. Der Einbau des Inserts an der richtigen Stelle des Plasmids unterbricht das im Vektor vorhandene β-Galaktosidase-Gen, sodass rekombinante Kolonien eine weiße Farbe aufweisen, im Gegensatz zu nicht-rekombinanten, die einen blauen Farbstoff bilden.

2.5.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmidisolierung erfolgte mittels Plasmid Miniprep Spin Kit (Peqlab) bzw. mittels Plasmid Mini oder Midi Kit von QIAGEN nach Herstellerangaben.

Lösungen:

<u>P1(Resuspensionspuffer):</u>	50mM Tris-Cl (pH 8.0) 10mM EDTA 100µg/ml RNase
<u>P2 (Lysispuffer):</u>	200mM NaOH 1% SDS
<u>P3 (Neutralisierungsp.):</u>	3M Kaliumacetat (pH 5.5)
<u>Puffer PB (Waschpuffer):</u>	Guanidinhydrochlorid; Isopropanol
<u>Puffer PE (Waschpuffer):</u>	(k. A.)
<u>Puffer QBT (Äquibrierungsp.):</u>	750mM NaCl 50mM MOPS (pH 7.0) 15% Isopropanol 0,15% TritonX-100 100µg/ml RNase
<u>Puffer QC (Waschpuffer):</u>	1,0M NaCl 50mM MOPS (pH 7.0) 15% Isopropanol
<u>Puffer QF (Elutionspuffer):</u>	1,25M NaCl 50mM Tris-CL (pH 8.5) 15% Isopropanol

Die ü. N.-Kulturen von transformierten Bakterien wurden durch Zentrifugation (15min, 3000rpm) pelletiert. Die Bakterien-Pellets wurden nach Herstellerangaben weiter aufgearbeitet. Die jeweiligen Puffermengen richteten sich nach dem jeweils verwendeten Kit. Die Pellets wurden in *RNase*-haltigem Resuspensionspuffer gelöst und die Bakterien in Lysispuffer während einer 5-minütigen Inkubation lysiert. Durch Zugabe von

Neutralisierungspuffer wurde dieser Vorgang gestoppt und die Proteine durch 5min Inkubation auf Eis gefällt. Die Zelltrümmer wurden 10min bei 13.000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf die jeweils verwendete (wenn nach Herstellerangaben vorgesehen mit Puffer QBT äquilibrierte) Spin-, Mini- bzw. Midi-Säule pipettiert und zentrifugiert bzw. durchtropfen gelassen. Es handelt sich um Ionenaustauschersäulen, an deren Säulenmatrix die DNA bindet. Nach zwei Waschschritten mit entsprechendem Waschpuffer und erneuter Zentrifugation wurde der Durchfluss verworfen und die DNA mit 50 μ l H₂O_{dd} bzw. Elutionspuffer eluiert. Außer bei Verwendung des Spin-Kits, bei dem die Plasmide nun schon aufgereinigt vorliegen und direkt weiterverwendet werden können, folgte nun eine Fällung der DNA mit 0,7V Isopropanol bei RT und 13.500rpm in einer Zentrifuge. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 1ml 70% Ethanol gewaschen, anschließend für 5min an der Luft getrocknet und in 20 μ l H₂O_{dd} aufgenommen.

2.5.4 Photometrische Konzentrations-und Reinheitsbestimmung

Zur Bestimmung der Konzentration von DNA in wässrigen Lösungen, wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von $\lambda=260\text{nm}$ mittels eines Photometers gemessen (BioPhotometer; Eppendorf). RNA und DNA haben bei 260nm ihre Absorptionsmaxima. Eine Absorption von 1 bei 260nm entspricht für dsDNA 50 $\mu\text{g/ml}$ (RNA: 40 $\mu\text{g/ml}$).

Zur Reinheitsbestimmung der DNA betrachtet man den Quotienten der Absorptionswerte bei 260nm und 280nm. Das Verhältnis $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ (DNA zu Protein) sollte für reine DNA zwischen 1,7 und 1,9 liegen. Eine Abweichung von diesem Wert deutet auf Protein- oder Phenol-Verunreinigungen hin. Für RNA sollte dieser Wert zwischen 1,9 und 2,0 liegen. Werte über 2,0 erhält man bei denaturierter oder mit RNA verunreinigter DNA.

2.5.5 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Basensequenzen in DNA-Doppelsträngen und spalten Phosphodiesterbindungen in beiden Strängen. Die Restriktionsenzyme lassen sich anhand der Art ihrer Erkennungssequenz in der DNA in die Typen I, II und III unterteilen. Verwendet wurden hier Restriktionsenzyme des Typs II, welche identische Bindungs- und Schnittstellen an der DNA besitzen, wobei diese Enzyme entweder glatte Enden (blunt-ends) oder überhängende Enden (sticky-ends) erzeugen.

Nach der Konzentrationsbestimmung der DNA-Proben wurde ein analytischer Verdau der Plasmide mit Restriktionsenzymen durchgeführt, um Klone mit korrektem Insert zu identifizieren

Restriktionsverdau-Ansatz (20µl):

- 1µg DNA
- 1µl Enzym (10U/µl; NEB o. Roche)
- 2µl Puffer (entspr. Enzym)
- (2µl BSA (NEB, 1:10 verd.) → je nach Enzym verwendet)
- xµl H₂O

Die Restriktion erfolgte im Wasserbad für 3h bei 37°C. Durch anschließende Zugabe von 3µl Ladepuffer wurde die Reaktion gestoppt und die Proben im Agarosegel analysiert. Alle verwendeten Restriktionsenzyme sind unter 2.15.3 aufgeführt.

2.6 Herstellung von Proteinlysaten

2.6.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Gewebe

Ein erbsengroßes Stück eines Gewebes wurde in einer sterilen Petrischale mit einem Skalpell vom restlichen Gewebestück abgetrennt und sofort in 2,5ml Laemmli-puffer gegeben.

Laemmli-Probenpuffer:

- 125mM Tris (pH 6.8)
- 6% (w/v) SDS
- 10% (v/v) beta-Mercaptoethanol
- 10% (v/v) Glycerol
- (1 Spatelspitze Bromphenolblau → Zugabe sofort oder vor Auftragen der Proben auf das SDS-Gel)
- 10% Protease-Inhibitor (Complete Protease Inhibitor Cocktail; Roche)

Das Gewebe wurde im Puffer mit einem Ultraturrax homogenisiert und das Homogenat anschließend 10min bei RT inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 10min bei 4.000rpm und 4°C. Der Überstand wurde in ein neues Probengefäß umpipettiert und 7x 10min mit Ultraschall behandelt. Nach erneuter Zentrifugation für 10min bei 4.000rpm und 4°C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 5min bei 98°C gekocht. Anschließend erfolgte die erneute Zentrifugation für 30min bei 13.500rpm und 4°C. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäße überführt. Die Analyse in einem SDS-Gel erfolgte sofort oder die Proben wurden bei -70°C aufbewahrt. Vor der Analyse im SDS-Gel wurden die Proben für 5min bei 98°C aufgekocht.

2.6.2 Herstellung von Proteinlysaten aus Zellkulturen

Das Medium der Zellkultur wurde entfernt und die Zellen 3x mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in einem entspr. Volumen PBS (ca. 1ml) aufgenommen und in Probengefäße überführt. Es folgte die Pelletierung der Zellen für 5min bei 4.000rpm und 4°C. Die Zellen wurden in entspr. Volumen Probenpuffer (2.6.1) aufgenommen, für 5min bei 98°C gekocht und anschließend für 30min bei 14.000rpm und RT zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Probengefäße überführt und die Proben entweder sofort in einem SDS-Gel analysiert oder bei -70°C aufbewahrt. Vor der Analyse im SDS-Gel wurden die Proben für 5min bei 98°C aufgekocht.

2.6.3 Zellaufschluss und Zellfraktionierung aus Zellkulturen

Die Zellen wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS von Medium befreit, in einem entspr. Volumen PBS aufgenommen und in Pobengefäßen für 5min bei 4.000rpm und 4°C pelletiert. Die Zellpellets wurden in einem entspr. Volumen Lysispuffer resuspendiert.

Lysispuffer (pH 7.4, in H₂O):

- 10mM Triethanolamin
- 10mM Essigsäure
- 250mM Sucrose
- 1mM EDTA
- 1mM DTT
- 1:5.000 Proteaseinhibitor (Complete Protease Inhibitor Cocktail; Roche)

Die Zellen wurden unter Verwendung eines Glashomogenisators aufgeschlossen (ca. 15-maliges Pressen). Das Homogenat wurde anschließend durch Zentrifugation für 5min bei 2.000rpm und 2°C von großen Zellbruchstücken und den Kernen befreit. Das Pellet beinhaltet die Kerne und Zellmembranen, der Überstand wird als postnukleärer Überstand bezeichnet. Zur Abtrennung der Mitochondrien wurde der postnukleäre Überstand nochmals für 5min bei 13.000rpm und 2°C zentrifugiert. Das nun erhaltene Pellet enthält die Mitochondrien, der Überstand wird als postmitochondrialer Überstand bezeichnet. Zur Separation von Golgi-Apparat, glattem und rauem ER und Ribosomen wurde ein Sucrose-Dichtegradient verwendet. In ein Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen wurden je 0,5ml einer 2,1M, 1,75M und 1,5M Sucroselösung in Sucrose-Puffer übereinandergeschichtet.

Sucrose-Puffer in H₂O:

- 50mM Triethanolamin
- 50mM Kaliumchlorid
- 5mM Magnesiumchlorid

Der postmitochondriale Überstand wurde mit Sucrose auf 1,25M eingestellt und vorsichtig auf das Sucrosekissen pipettiert. Danach wurde eine 1,0M Sucroselösung als Überschichtung auf die Probe gegeben. Die Proben wurden in einer Ultrazentrifuge bei 45.000rpm bei 4°C ü. N. ohne Bremse zentrifugiert. Während der Zentrifugation entsteht ein linearer Sucrosegradient in dem sich die vesikulären Strukturen je nach Dichte anreichern. Nach der Zentrifugation wurden die Proben auf Eis weiterverarbeitet. Von oben herab wurden 250µl-Fractionen abgenommen und in neue Probengefäße überführt.

In einem weiteren Sucrosegradienten wurden Kerne und Membranen voneinander getrennt. Das Kern- und Membranpellet wurde in einem adäquaten Volumen 1,25M Sucrose-Probenpuffer resuspendiert und auf ein Sucrosekissen geschichtet. In ein Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen wurden je 0,3ml einer 2,52M, 2,25M und 2,15M Sucroselösung in übereinandergeschichtet.

Die Probe wurde in einer Ultrazentrifuge bei 100.000rpm bei 4°C für 30min ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation ist im oberen Bereich des Röhrchens ein Ring zu erkennen, der die Membranen beinhaltet. Die Kerne befinden sich unten. Die Proben wurden auf Eis weiterverarbeitet. Von oben herab wurden schrittweise 150µl-Fractionen abgenommen und in neue Probengefäße überführt.

TCA-Fällung

Die Fraktionen aus dem Sucrose-Dichtegradienten müssen vor der Analyse im SDS-Gel gefällt werden, um die Sucrose aus den Lysaten zu entfernen.

Zu den Proben wurde $\frac{1}{4}V$ eisgekühlte TCA (Trichloressigsäure) zugegeben und gut durchmischt (Vortexer). Anschließend wurde für 15min auf Eis inkubiert und für 15min bei 14.000rpm und 2°C zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets mit jew. 500µl eiskaltem Aceton resuspendiert. Danach wurde für 15min bei 14.000rpm und 2°C zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, die Pellets getrocknet und in Laemmli-Puffer (2x) aufgenommen. Zeigte die Lösung des Pellets im Puffer eine gelbe Färbung, wurden 2µl 1,5M Tris (pH 8.8) zugegeben, um den korrekten pH-Wert einzustellen. Vor der Analyse im SDS-Gel wurden die Proben für 5min bei 56°C erhitzt.

2.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

2.7.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese [Laemmli, 1970] können Polypeptide ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt werden. SDS ist ein anionisches Detergenz, welches sich an Proteine anlagert, wodurch die Proteine eine einheitliche anionische Ladung pro Masseneinheit erhalten. Zusätzlich denaturiert es die Proteine und zerstört Sekundär- und Tertiärstrukturen, indem Wasserstoffbrücken aufgespalten werden. Die stärkeren Schwefelbrücken zwischen Cysteinresten werden durch das reduzierend wirkende β -Mercaptoethanol oder DTT gespalten. Somit kann eine Auftrennung der SDS-Protein-Komplexe verschiedener Proteine nur noch nach ihrem Molekulargewicht erfolgen. Der Komplex wandert im elektrischen Feld zum Pluspol. Die Poren in der Polyacrylamidmatrix wirken als Molekularsieb und trennen die Proteinkomplexe auf. Es ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der jeweiligen Molekulargewichte und den relativen Wanderungsstrecken der SDS-Polypeptid-Komplexe.

Nach dem Molekulargewicht der aufzutrennenden Polypeptide verwendet man verschieden konzentrierte Polyacrylamid-Trenngele:

- 12,5%ige Trenngele für Proteine mit Molekulargewichten von 10-60kDa
- 10%ige Trenngele für Proteine mit Molekulargewichten von 30-120kDa
- 7,5%ige Trenngele für Proteine mit Molekulargewichten von 50-200kDa

Der Gehalt an Acrylamid und Bisacrylamid bestimmt die Porengröße des Gels und somit das Laufverhalten der Proteine. Das Sammelgel hat die Funktion, die in die Geltaschen pipettierten Proteine vor dem Übertritt in das Trenngel in einer scharfen Bande zu konzentrieren. Die folgende Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.

Tab.2: Pipettierschema für verschieden konzentrierte Trenngele und das Sammelgel.

a) Trenngel:

	Acrylamidkonzentration im Gel (%)		
	7,5%	10%	12%
Trenngel-Puffer (4x)	4ml		
H ₂ O _{dd}	4ml	4,58ml	6,7ml
Acrylamidlösung (30%)	1,6ml	5,30ml	2,68ml
Bisacrylamidlösung (2%)	6,4ml	2,12ml	2,62ml
Ammoniumpersulfat (10%)	140µl		
TEMED	14µl		

b) Sammelgel:

	Konzentration von Acrylamid im Gel: 4%
Sammelgel-Puffer (4x)	1,25ml
H ₂ O _{dd}	2,7ml
Acrylamidlösung (30%)	0,75ml
Bisacrylamidlösung (2%)	0,30ml
Ammoniumpersulfat (10%)	50µl
TEMED	10µl

Lösungen:

- 10%ige APS-Lösung (Ammoniumpersulfat)
- 99%iges TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, ROTH)
- 30%ige gasstabilisierte, wässrige Acrylamidlösung (ROTH)
- 2%ige gasstabilisierte Bisacrylamidlösung (ROTH)

Laufpuffer: 25mM Tris
 192mM Glycin
 0,1% (w/v) SDS

Trenngel-Puffer (4x): 1,5M Tris-HCl (pH 8.8)
 0,4% (w/v) SDS

Sammelgel-Puffer (4x): 0,5M Tris-HCl (pH 6.8)
 0,4% (w/v) SDS

Vor Auftragung der Proben ins Gel wurden diese 1:3 mit denaturierendem Probenpuffer (Roti-Load, ROTH) versetzt, bei 96°C im Wasserbad aufgekocht und auf Eis abgekühlt.

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese für große Gele erfolgte vertikal in einer Elektrophoresekammer der Firma Sigma-Aldrich, die mit Laufpuffer gefüllt wurde, bei einer konstanten Stromstärke von 25mA für 3-4h. Für kleine Gele wurde die XCell Sure Lock™ Mini-Cell (Invitrogen) (bei 125V ca. 1-1,5h) verwendet. Als Längenstandard diente der Full Range Rainbow Protein Marker (RPN800; Amersham Life Science) bzw. der Precision Plus Protein Dual Color Standard (BIO-RAD).

Nach dem Gellauf erfolgte eine Anfärbung des Gels in einer Coomassie-Färbelösung bzw. das Blotten auf eine PVDF-Membran.

2.7.2 Fixierung und Färbung von Proteinen im Polyacrylamidgel

Die im Gel befindlichen aufgetrennten Proteine wurden durch Inkubation für 1h in Coomassie-blue-R250-Färbelösung fixiert und angefärbt. Die starke Hintergrundfärbung wurde anschließend durch mehrmaliges Waschen in Entfärberlösung entfernt. Die in den Proteinen interkalierte Farbe bleibt erhalten und diese werden als blaue Banden sichtbar. Zur Dokumentation wurden die Gele in Folie eingeschweißt und am Computer eingescannt.

<u>Coomassie-Färbelösung:</u>	25% Isopropanol 10% Essigsäure Spatelspitze Coomassie Brilliant Blue R250 (ROTH) → in H ₂ O _{dd}
<u>Entfärber:</u>	10% Isopropanol 10% Essigsäure → in H ₂ O _{dd}

2.8 Western-Blotting (Immunoblotting)

2.8.1 Elektro-Blotting zum Transfer von Proteinen auf Membranen

Beim Western-Blot erfolgt der Transfer von Proteinen, die durch eine SDS-PAGE (s.o.) aufgetrennt wurden, auf eine Membran (PVDF, Hybond-P; Amersham Pharma Biotech). Durch eine angelegte Spannung wandern die negativ geladenen Proteine zum Pluspol und werden auf der Membran immobilisiert.

Das Blotting großer Membranen wurde mit einer Tank-Blotting-Apparatur der Firma Sigma-Aldrich Techware für 2h bei 500mA bzw. ü. N. bei 150mA durchgeführt. Für kleine Membranen erfolgte das Blotting mit dem XCellIII Blot-Module (Invitrogen) für 3h bei 25V. Der elektrophoretische Transfer erfolgt bei diesen Systemen in einem Puffertank [Towbin et al., 1979; Burnette, 1981]. Die Transferkassette hängt dabei zwischen zwei vertikal angeordneten Elektrodenplatten. Auf die Kathodenplatte wurden zunächst zwei in Transferpuffer getränkte Schwammtücher und darauf zwei Whattmanpapiere gelegt. Darauf folgte das Gel, auf welches eine mit Transferpuffer äquilibrierte Membran gelegt wurde. Bei Verwendung einer PVDF-Membran wurde diese zuvor mit Methanol aktiviert. Nach der Membran folgten zwei weitere Whattmanpapiere und zwei Schwammtücher. Den Abschluss bildete die Anodenplatte.

<u>Transfer-Puffer:</u>	14,4g Glycin
(1 Liter)	3,0g Tris
	200ml Methanol
	5ml 10%iges SDS

<u>TBS:</u>	10mM Tris-Cl (pH 7.5) 150mM NaCl
<u>TBS/Tween:</u>	20 mM TrisCl (pH 7.5) 500 mM NaCl 0,05% (v/v) Tween
<u>TBS/Tween/Triton:</u>	20mM TrisCl (pH 7.5) 500mM NaCl 0,05% (v/v) Tween20 0,2% (v/v) TritonX-100
<u>Blocking-Puffer:</u>	1x PBS/10% Magermilchpulver bzw. 1x TBS/5% Magermilchpulver bzw. TBS/Tween-Puffer/5% BSA

Bei Verwendung des Anti-Penta-His-Antikörpers (Mouse, QIAGEN) zum Nachweis des His-Tag wurde dieser in 1x TBS/3% BSA (Bovine Serumalbumine) 1:500 verdünnt, geblockt wurde mit 3% BSA in 1x TBS. Die Waschschrirte erfolgten hier jeweils zweimal mit 1x TBS/0,05% Tween/0,2% Triton und einmal mit 1x TBS. Der Sekundäntikörper Sheep-Anti-Mouse IgG (DIANOVA) wurde 1:30.000 in 1x TBS/10% Magermilchpulver verdünnt eingesetzt.

Die Blots der Immunpräzipitation zum Nachweis der FLAG- bzw. HA-getagten Proteine wurden mit 5% BSA in TBS/Tween-Puffer geblockt. Die Primäntikörper Anti-FLAG (SIGMA) bzw. Anti-HA (SIGMA) wurden in 3% BSA/1x TBS/0,05% Tween verdünnt eingesetzt. Die Waschschrirte erfolgten jeweils zweimal mit 1x TBS/0,05% Tween/0,2% Triton und einmal mit 1x TBS. Die entsprechenden Sekundäntikörper Sheep-Anti-Mouse IgG (DIANOVA) und Rabbit-Anti-Rat IgG (SIGMA) wurden in 1x TBS/5% BSA verdünnt eingesetzt.

Bei Verwendung von Serum, wurde dieses 1:100 in 1x PBS/1% Magermilchpulver verdünnt. Bei dem Sekundäntikörper handelte es sich um Sheep-Anti-Human

(Amersham), welcher 1:3000 in 1x PBS/2% Magermilchpulver verdünnt wurde. Alle Waschschrirte erfolgten mit 1x PBS.

Alle verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind mit Konzentrationsangaben unter 2.15.4 aufgelistet.

2.9 Zellkultur

2.9.1 Eukaryotische Zellkultur

2.9.1.1 Kultivierung von Insektenzellen

Spodoptera frugiperda Zellen der Linie SF158 wurden in TC100 Medium complete (Gibco) kultiviert, das 10% hitzeinaktiviertes Fötale Kälberserum (FKS), 40U/ml Penicillin und 50µg/ml Streptomycin enthält. Die Zellen wachsen als Monolayerkultur in Zellkulturflaschen bei 27°C und normalem CO₂-Partialdruck. Entsprechend dem Wachstum der Zellen wurden diese zweimal pro Woche mit einem Zellschaber abgelöst und zu einer Verdünnung von 1:3 oder 1:4 in frisches Medium passagiert („Splitting“).

2.9.1.2 Kultivierung von COS-Zellen

COS-Zellen (Affennierenzellkultur, African Green Monkey) wachsen als Monolayer in Zellkulturflaschen bei 37°C in 5% CO₂-Atmosphäre. Die Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, BioWhittaker) mit 10% hitzeinaktiviertem Fötalem Kälberserum (FKS) und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Entsprechend dem Wachstum der Zellen wurden diese zweimal pro Woche 1:5 bis 1:8 gesplittet. Hierzu wurde das Medium entfernt, der Zellrasen mit 1x PBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin abgelöst. Die Zellsuspension wurde dann erneut in einem entsprechenden Volumen Medium ausgesät.

2.9.1.3 Kultivierung von TERA-Zellen

Adhärenz TERA-Zellen (Teratokarzinom-Zelllinie TERA-1) wurden in McCoys Medium 5A (mit L-Glutamin; BioWhittaker) kultiviert, das 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FKS), 40U/ml Penicillin und 50µg/ml Streptomycin enthielt. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich 1:3 gesplittet. Hierzu wurde das Medium entfernt, der Zellrasen mit 1x PBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin abgelöst. Die Zellsuspension wurde dann erneut in einem entsprechenden Volumen Medium ausgesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C in 5% CO₂-Atmosphäre.

2.9.1.4 Kultivierung von HeLa-Zellen

HeLa-Zellen (Humane Cervixkarzinom-Zelllinie) wachsen als Monolayer in Zellkulturflaschen bei 37°C in 5% CO₂-Atmosphäre. Die Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, BioWhittaker) mit 10% hitzeinaktiviertem Fötalem Kälberserum (FKS) und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Entsprechend dem Wachstum der Zellen wurden diese zweimal pro Woche 1:4 bis 1:5 gesplittet. Hierzu wurde das Medium entfernt, der Zellrasen mit 1x PBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin abgelöst. Die Zellsuspension wurde dann erneut in einem entsprechenden Volumen Medium ausgesät.

2.9.1.5 Kultivierung von Primärzellkulturen aus Meningeomen

Die Primärzellkulturen aus Meningeomen wurden durch Ansetzen von frischen Tumorproben in Medium erhalten. Gewebestücke des Tumors wurden in Kulturschalen mit Nährmedium gelegt. Als Nährmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, BioWhittaker) mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS) und 1% Penicillin/Streptomycin verwendet. Die Zellen des Gewebes vermehren sich in den Schalen und bilden eine Monolayerkultur. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C in 5% CO₂-Atmosphäre. Entsprechend dem Wachstum der Zellen wurden diese ein- bis zweimal pro Woche 1:3 bis 1:5 gesplittet. Hierzu wurde das Medium entfernt, der Zellrasen mit 1x PBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin abgelöst. Die Zellsuspension wurde dann erneut in einem entsprechenden Volumen Medium ausgesät.

2.9.1.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfrieren:

Von einer T75-Zellkulturflasche wurde das alte Medium verworfen und die Zellen in 10ml frischem Zellkulturmedium abgeschabt. Die Zellsuspension wurde in ein 50ml Röhrchen überführt und die Zellen 10min bei 2200rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 3ml Einfriermedium gelöst und die Zellen in auf Eis stehende Kryo-Röhrchen verteilt. Diese wurden ü. N. bei -70°C in einer Einfrierbox gelagert und danach in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Einfriermedium: Zellkulturmedium mit 30% FKS und 10% DMSO

alternativ: FKS mit 30% DMSO

Auftauen:

Die Zellen wurden aus dem Stickstoff genommen und bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Danach wurden sie sofort in 10ml RT-warmes Zellkulturmedium gegeben und bei 2000rpm 10min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 2ml frischem Medium gelöst und anschließend jeweils 1ml in eine T25-Flasche mit 4ml frischem Medium gegeben.

2.9.2 Karyotypisierung

Die Chromosomenanalyse von Primärzellkulturen aus Meningeomen erfolgte nach Standardprotokollen [Limon et al., 1986]. Die Karyotypen wurden durch Giemsa-Trypsin (GTG)-Bänderung der Chromosomen gemäß dem International System for Human Cytogenetic Nomenclature angefertigt [Mitelman, 1995].

2.10 Luziferase-Assay/Promotoranalyse mittels pGL3-Vektor-System

Der Vektor pGL3-Basic (Promega; 2.15.8) enthält eine für Luziferase codierende Sequenz (*luc+*) und wurde als Luziferase-Reporter-Vektor für den Nachweis transkriptioneller Aktivität in eukaryotischen Zellen optimiert. Die Luziferase ist ein Enzym des nordamerikanischen Leuchtkäfers *Photinus pyralis* und katalysiert die Umsetzung von Luziferin zu Oxiluziferin, wobei Magnesium als Cosubstrat dient. Hierbei wird unter Energieverbrauch Licht frei. Dem pGL3-Basic Vektor fehlen ein eukaryotischer Promotor und Enhancer-Elemente. Die Luziferaseaktivität der pGL3-Basic-transfizierten Zellen hängt von der Insertion eines funktionellen Promotors stromaufwärts der für Luziferase codierenden Sequenz *luc+* ab. Auf diese Weise ist es möglich, potentielle Promotoraktivitäten einer inklonierten Sequenz zu überprüfen.

Mittels Luziferase-Assay wurde die Promotoraktivität des aktiven MGEA6-Genlocus auf Chromosom 14q21, sowie die Promotoraktivitäten von MGEA6-Pseudogenesequenzen auf verschiedenen Chromosomen untersucht. Hierzu wurden die 5'-flankierenden Sequenzbereiche upstream der Genloci amplifiziert, in den Reportervektor pGL3-Basic kloniert und im Luziferase-Assay analysiert. Die Upstreamregion des aktiven MGEA6-Genlocus wurde in Teilstücken analysiert, um einen Promotorbereich eingrenzen zu können.

2.10.1 Amplifikation und Klonierung der Upstreamregion des MGEA6-Genlocus auf 14q21 und der Upstreamregionen der MGEA6- Pseudogene

Mittels PCR wurden die Upstreamregion des *MGEA6*-Genlocus auf 14q21 in fünf Teilsequenzen amplifiziert und kloniert (Tab.3a). Die Promotoraktivität sollte auf einen Teilbereich eingegrenzt werden können, um den Promotorbereich des MGEA6-Locus zu charakterisieren. Gleiches erfolgte für die 5'-flankierenden Sequenzbereiche bis 3600bp upstream der Genloci, welche die vermuteten Promotorregionen beinhalten (Tab.3b). Die Sequenzen wurden im Folgenden in den Vektor pGL3-Basic kloniert und im Luziferase-Assay auf Promotoraktivität untersucht.

PCR-Amplifikation

Die Fragmente wurden zum Teil mit dem TripleMaster™PCR-System (Eppendorf) und zum Teil mit dem Expand High Fidelity PCR-System (Roche) amplifiziert. Beide Systeme enthalten Proofreading-Polymerasen, die mögliche Fehler bei der Amplifizierung verhindern sollen, um exakte Sequenzen klonieren zu können. Die Annealingtemperaturen der Primer unterscheiden sich je nach den Anforderungen des Primerpaares. Die verwendeten Primer sind unter 2.15.7 aufgeführt. Die Längen der PCR-Produkte lagen zwischen 1,3kb und 3,65kb.

Tab.3a: Amplifizierte Teilfragmente des Sequenzbereichs bis 2937bp upstream des MGEA6-Genlocus auf 14q mit Primerpaaren und Fragmentgrößen.

	Primerpaar	Fragmentgröße
14q21-Locus 3500bp upstream	14qfor_KpnI/14qrev_BglII	2747bp
	14qfor_KpnI/14qrev3_BglII	1529bp
	14qfor3_KpnI/14qrev3_BglII	817bp
	14qfor4_KpnI/14qrev_BglII	1319bp
	14qfor5_KpnI/14qrev_BglII	668bp

Tab.3b: Amplifizierte Fragmente der Upstream-Sequenzbereiche der MGEA6-Pseudogen-Loci und des MGEA6-Genlocus auf 14q mit Primerpaaren und Fragmentgrößen.

Locus	Primerpaar	Fragmentgröße
14q21	14qfor/14qrev	2747bp
18q11.2	18q11.2for/18q11.2rev	1319bp
13q14.3	13q14.3for/13q14.3rev 13q14.3for_SmaI/13q14.3rev_SmaI	3033bp
6q27	6q27for/6q27rev	2617bp
7q34	7q34for/6q23.2rev 7q34for_SmaI/6q23.2rev_SmaI	2984bp
7q35	7q35for/6q23.2rev	3337bp
7q35(2)	7q35(2)for/6q23.2rev	3646bp

Die PCR-Reaktionen erfolgten wie unter 2.1.1 aufgeführt.

Für die Amplifizierung der Teilstücke des Upstreambereichs von 14q21 aus Tab.3a wurde das Plasmid 14q21-19-3 (2.10.2) eingesetzt, welches das komplette 3500bp-Fragment des 14q21-Locus aus der Amplifizierung (Tab.3b) enthielt und für den späteren Luziferase-Assay eingesetzt wurde.

Für die in Tab.3b aufgeführten Fragmente wurde als Template genomische DNA verwendet. Es handelt sich um die 5`-flankierenden Sequenzbereiche 3500bp upstream der Genloci.

(Für die Fragmente 7q34 und 13q14.3 wurden zweite PCR-Reaktionen auf die im pGEM-T Easy Vektor enthaltenen Fragmente durchgeführt. Die Primer enthielten *SmaI*-Schnittstellen (siehe Tab.3b). Die erhaltenen Fragmente wurden mit *SmaI* verdaut und für die Ligation mit pGL3-Basic eingesetzt.). Die PCR-Produkte wurden in 1%-Agarosegelen aufgetrennt, die korrekten Fragmente ausgeschnitten und wie unter 2.4.2 beschrieben aus dem Gel reisoliert.

Ligation mit dem Vektor pGEM[®]-T Easy/Transformation in *E.coli* DH5 α

Die reisolierten Fragmente wurden mit dem Vektor pGEM[®]-T Easy (Promega) ligiert und in kompetente *E.coli* DH5 α -Zellen transformiert, wie unter 2.5.1 und 2.5.2 beschrieben. Mit Hilfe der Blau-Weiß-Screenings wurden rekombinante, weiße Kolonien in Kultur genommen und die Plasmide isoliert (2.5.3). Alle isolierten Plasmide wurden einem Restriktionsverdau unterzogen, um anhand der Größe das Vorhandensein des korrekten Fragments zu bestimmen. Die Wahl des oder der Restriktionsenzyme richtete sich nach der Sequenz des zu charakterisierenden Inserts. Plasmide mit Fragmenten der richtigen Größe wurden sequenziert (2.3) und mit der Genome Browser Datenbank abgeglichen, um die korrekte Sequenz genau bestimmen zu können und fehlerhafte Sequenzen auszuschließen.

Klonierung in den Vektor pGL3-Basic

Die Plasmide mit korrektem Insert wurden einem Restriktionsverdau mit den Enzymen *NotI* und *NaeI* unterzogen. Hierdurch wurden die Fragmente an den *NotI*-Schnittstellen der MCS des Vektors herausgeschnitten und der pGEM-Vektor zusätzlich mittels *NaeI* in ein 308bp- und ein 2707bp-großes Stück zerschnitten, um Inserts und Vektor besser voneinander unterscheiden zu können. Die Restriktionsverdau wurden wie unter 2.5.5 beschrieben angesetzt.

Auffüllen der Schnittstellen mit Pfu-Polymerase:

Die Sticky-Ends der Fragmente nach dem Restriktionsverdau wurden vor der Ligation mit dem pGL3-Basic Vektor durch Einbau von dNTPs aufgefüllt und somit Blunt-Ends erzeugt.

Ansatz (20µl):

- 1,0µg Insert
 - 2,0µl *PfuTurbo*[®]-DNA-Polymerase (2,5U/µl; Stratagene)
 - 2,0µl Pfu-DNA-Polymerase-Puffer (10x; Stratagene)
 - 2,0µl dNTPs
 - xµl H₂O_{dd}
- 30min Inkubation bei 72°C, anschließend sofort auf Eis.

Die Proben wurden nach dem Auffüllen der Sticky-Ends mit dem PCR-Purification-Kit von QIAGEN nach Herstellerangaben aufgereinigt, bevor die Ligation mit dem pGL3-Basic-Vektor erfolgte. Die Fragmente wurden anschließend in den Vektor pGL3-Basic kloniert. Dieser wurde mit *SmaI* verdaut:

Ansatz (20µl):

- 2,0µg Vektor pGL3-Basic
 - 1,0µl *SmaI*
 - 4,0µl Puffer
 - xµl H₂O_{dd}
- Inkubation bei 25°C ü. N.

Dephosphorylierung des Vektors mit *Shrimp Alkaline Phosphatase* (Roche):Ansatz (20µl):

- 1,0µg Vektor pGL3-Basic
 - 4,0µl *SAP* (1U/µl; Roche)
 - 4,0µl *SAP* Puffer (10x)
 - xµl H₂O_{dd}
- Inkubation für 1h bei 37°C und anschließend für 10min bei 65°C zur Inaktivierung des Enzyms.

Ligation:

Ansatz (20µl):

(Verhältnis Insert/Vektor: 3:1)

- 100ng Vektor pGL3-Basic (geschnitten und dephosphoryliert)
- xµl Insert
- 1,0µl *T4-Ligase*
- 10µl Ligationspuffer (2x)
- xµl H₂O_{dd}

Zusätzlich wurde ein Kontrolle, die nur den pGL3-Vektor enthielt, angesetzt. Die Ansätze wurden bei 4°C ü. N. ligiert. Die Transformation der *E.coli* DH5 erfolgte wie bereits beschrieben. Die Sequenzen und die Orientierungen *in sense* und *in frame* wurden mittels Sequenzierung überprüft.

2.10.2 Transfektion in TERA-Zellen und Herstellung von Zelllysaten

Aussaat der TERA-Zellen in 12-Well-Platten

TERA-Zellen (Teratokarzinom-Zelllinie TERA-1) wurden wie unter 2.9.1.3 beschrieben kultiviert und in einer Konfluenz von 50% in die 12-Well ausgesetzt. Das Gesamtvolumen pro Well betrug 1ml Medium, in welches $1,5 \times 10^5$ Zellen ausgesät wurden. Die Zelldichte der TERA-Zellsuspension wurde zuvor in einer Medium/Trypanblau-Verdünnung mittels einer Zählkammer bestimmt. Bis zur Transfektion wurden die Zellen 48h wachsen gelassen.

Transfektion

Die Transfektion der TERA-Zellen erfolgte unter Verwendung des FuGENE[®] 6 Transfection Reagent (Roche). Die Transfektionsansätze wurden in serumfreiem Medium Optimem 1 (GIBCO) verdünnt. Es wurden Vierfach-Ansätze für jedes zu transfizierende Plasmid hergestellt.

Die Transfektionsansätze enthielten jeweils einen rekombinanten pGL3-Basic Vektor mit dem jeweiligen Fremdgen, sowie den Normalisierungsvektor pCMV-β (2.15.8).

Bei den verwendeten rekombinanten Plasmiden handelte es sich um die Konstrukte:

- 14qfor_KpnI/14qrev_BglIII → entspr. 14q21 (for/rev) Klon 19.3
- 14qfor_KpnI/14qrev3_BglIII → entspr. for/rev3 Klone 1 und 2
- 14qfor3_KpnI/14qrev3_BglIII → entspr. for3/rev3 Klone 1 und 2
- 14qfor4_KpnI/14qrev_BglIII → entspr. for4/rev Klone 1 und 4
- 14qfor5_KpnI/14qrev_BglIII → entspr. for5/rev Klone 1 und 2
- 18q11.2 Klon 1.6
- 6q27 Klon 4.4
- 13q14.3 Klon 1.2 und 13q14.3 Klon 1.10
- 7q34 Klon 1.2
- 7q35 Klon 1.17
- 7q35(2) Klon 3.4 und 7q35(2) Klon 3.11

Transfektionsansatz für ein 12-Well:

Ratio: FuGENE Reagent : Plasmid → 3:1

- 100µl Optimem in Reaktionsgefäß vorlegen
- 2,2µl FuGENE Reagent direkt in Medium pipettieren
→ 5min Inkubation
- 750µg Plasmid (\cong 500µg pGL3 + 250µg pCMV- β) zugeben
→ vorsichtig mischen
→ 1h Inkubation

Das Medium der Zellen in den Wells wurde während der Inkubationszeit gewechselt. Nach der Inkubation wurde der Transfektionsansatz in das Medium des jeweiligen Wells gegeben. Die Inkubation erfolgte für 48h bei 37°C in 5% CO₂-Atmosphäre in einem Zellkulturschrank.

Herstellung der Zelllysate

Die Zelllysate wurden unter Verwendung des Reporter Lysis Puffers (RLB; Promega) hergestellt. Der RLB-Puffer ermöglicht die Durchführung von β -Galaktosidase-, Luziferase- und Chloramphenicol Acetyltransferase-Assays aus den selben Zelllysaten, die mit Vektoren, welche diese Gene beinhalten, co-transfiziert wurden. Der 5x RLB-Puffer wurde

mit Wasser zu 1x Puffer verdünnt. Die Zellen in den Wells wurden durch dreimaliges Waschen mit 1x PBS von Medium befreit. Das PBS wurde entfernt und pro Well 200µl RLB zugegeben und für 15min bei RT inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch mehrmaliges Einfrieren der Zellen in den Platten bei -70°C und anschließendes auftauen im Wasserbad. Danach wurden die Zellysate in Reaktionsgefäße überführt und auf Eis gestellt. Jede Probe wurde 15s gevortext und anschließend für 2min bei 13.000rpm und 4°C abzentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und die Lysate bei -70°C aufbewahrt oder sofort gemessen.

2.10.3 Luziferase-Assay

β -Galaktosidase-Assay zur Normalisierung der Messwerte

Die Messung der β -Galaktosidase-Aktivität dient zur internen Kontrolle der Transfektionseffizienz der Zellen. Die Transkription des *lacZ*-Gens führt zur Expression der β -Galaktosidase. Diese lässt sich als Reporterenzym schnell und direkt im chemilumineszenten Assay von Zellysaten nachweisen. Die endogene β -Galaktosidase-Aktivität der Zellen muss mit den Messwerten abgeglichen werden.

Der Assay wurde in 96-Well-Platten durchgeführt. Hierfür wird der Assay 2x-Puffer benötigt. Dieser enthält das farblose Substrat O-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG), welches durch das Enzym β -Galaktosidase in gelbes O-Nitrophenol hydrolysiert wird. Die Reaktion wird durch Natriumcarbonat gestoppt und die Absorption bei 420nm gemessen. Für alle Zellysate wurden Vierfach-Ansätze in 96-Well-Platten gemessen.

Assay 2x-Puffer:

- 200mM Na-Phosphat-Puffer (pH 7.3)
- 8mM MgCl_2
- 100mM β -Mercaptoethanol
- 1,33mg/ml ONPG (O-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid)

Durchführung:

- 50µl eines 1:2 mit 1x RLB verdünnten Zelllysats wurden pro 96-Well vorgelegt
 - 50µl eiskalter Assay 2x-Puffer wurden zugegeben und gemischt
 - Inkubation für 30min bei 37°C
(→ die Proben verfärben sich gelb)
 - Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 150µl 1M Natriumcarbonat
 - mischen der Proben
- Blasenbildung muss vermieden werden, um die Messung nicht zu verfälschen
- die Absorption wurde bei 420nm in einem Plate-Reader (Automated Microplate Reader; BioTek Instruments Inc. ELX 800) gemessen

Zum Abgleich des Backgrounds wurden mit Wasser transfizierte Zellen als Negativkontrollen gemessen.

Standardkurve für 96-Well-Plate-Assay

Es wurde eine Verdünnungsreihe von β -Galaktosidase in 1x RLB hergestellt. Aus der Stocklösung (Konz. 10mU/µl) wurden jeweils 50µl Standard verdünnt und in einer 96-Well-Platte weiterbehandelt, wie zuvor für die Zelllysate beschrieben. Die Reihe enthielt die Werte für 0×10^{-3} U, 1×10^{-3} U, 2×10^{-3} U, 3×10^{-3} U, 4×10^{-3} U und 5×10^{-3} U β -Galaktosidase. Die Absorption bei 420nm wurde in einer Standardkurve gegen die β -Galaktosidase-Konzentration aufgetragen und ein linearer Verlauf erhalten.

Luziferase-Messung

In ein Messröhrchen wurden 50µl Luziferasesubstrat Luziferin vorgelegt. (Es muss darauf geachtet werden hohen Lichteinfall zu vermeiden, damit das Substrat nicht zerfällt.) Kurz vor der Messung wurden 10µl Zelllysat in das Röhrchen zum Luziferin gegeben. Die Umsetzung von Luziferin zu Oxiluziferin unter Lichtemission wurde in einem Luminometer (Lumat LB 9507; Berthold Technologies) gemessen. Jeder Messzyklus erfolgte für 10s. Für alle Zelllysate wurden Vierfach-Ansätze gemessen und der Mittelwert gebildet. Die Messwerte wurden gegen die Werte aus dem β -Galaktosidase-Assay normalisiert.

2.11 Baculovirus-Expressionssystem

Mit dem Bac-N-Blue Transfection Kit von Invitrogen wurde der ORF des *MGEA6*-Gens (Meningeom Exprimiertes Antigen 6; NM_005930, NP_005921) in drei Bereiche unterteilt in Baculoviren kloniert und exprimiert. Die Proteinregionen des Aminoterminus und des Carboxyterminus wurden schon in Vorarbeiten während meiner Diplomarbeit exprimiert und nachgewiesen. Im Folgenden wurden diese Arbeiten durch Klonierung, Expression und Detektion der internen Proteinregion vervollständigt und anschließend die Antikörperbindung der Proteine durch Meningeompatientenseren überprüft. Bei der Expression der Proteine mit dem hier verwendeten Vektor pBlueBacHis2A entstehen Fusionsproteine, die einen aminoterminalen His-Tag (Polyhistidin-Anhang) enthalten. Der Nachweis der Proteine erfolgte im Western-Blot mittels Anti-His-Antikörper, der an die histidinreiche Region der Fusionsproteine bindet (2.8 und 2.15.4).

Das Baculovirus-Expressionssystem ist ein eukaryotisches, helferunabhängiges Expressionssystem, welches die Expression eines Fremdgens in Insektenzellen über rekombinante Baculoviren ermöglicht. Das *Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus* (*AcMNPV*) ist der Prototyp der Viren der Familie *Baculoviridae*. Das *AcMNPV*-Genom besteht aus einer 129kb großen, zirkulären, doppelsträngigen DNA, die relativ große Fragmente an Fremd-DNA aufnehmen kann. Das zu exprimierende Fremdgen wird dabei in den sog. *Polyhedrin-Locus* (*PH*) eingebracht, der unter der Kontrolle eines starken Promotors steht. Die Inaktivierung des *Polyhedrin*-Gens führt dazu, dass das Virus nicht mehr in der Lage ist, Einschlusspartikel, sog. Polyhedra, zu bilden. Man spricht von „occlusion negative“ (*occ⁻*) Viren. Da das Virusgenom auf Grund seiner Größe nicht handhabbar ist, wird das Fremdgen zunächst in einen Transfervektor eingebracht. Durch homologe Rekombination des Transfervektors mit der Virus-DNA wird das Gen in das Virus-Genom integriert (Abb.1). Die Proteinexpression (s. u.) erfolgte in Insektenzellen *Spodoptera frugiperda* der Linie SF158 (2.9.1.1).

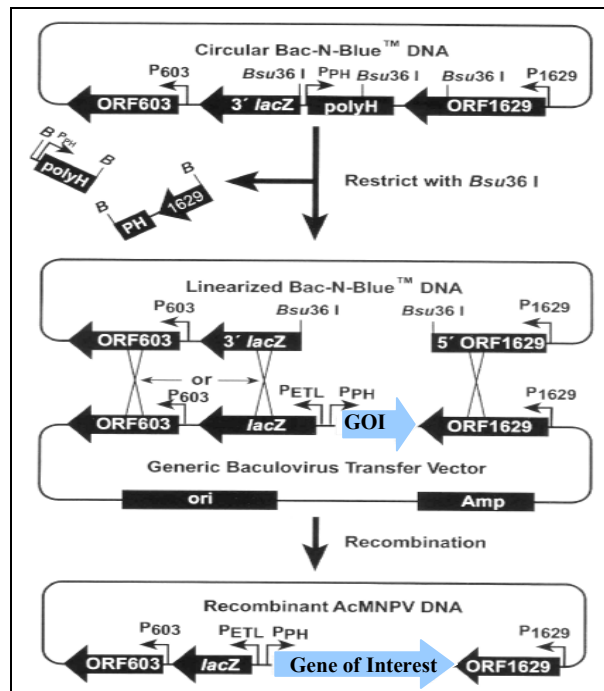


Abb.1: Allgemeine Darstellung der homologen Rekombination zwischen der Bac-N-Blue DNA und dem Baculovirus Transfervektor.

Um eine lineare DNA zu erhalten, wird diese dreifach geschnitten und der C-terminale Teil der ORF1629-Sequenz entfernt. Hierdurch ergibt sich eine erhöhte Ausbeute an rekombinantem Virus, welches bei der Kotransfektion entsteht (GOI: gene of interest).

2.11.1 Klonierung des Fremdgens in den Transfervektor pBlueBacHis2A und Transformation von pBlueBacHis2A in kompetente *E.coli* DH5 α

Die Fragmente des MGEA6-ORF zur Klonierung wurde mit dem Expand High Fidelity PCR System von Roche hergestellt. Alle Primer für die PCR sind unter 2.15.7 aufgeführt.

PCR-Ansatz:

- 5 μ l Plasmid (ca. 0,5ng/ μ l)
- 2,5 μ l forward-Primer (10 μ M)
- 2,5 μ l reverse-Primer (10 μ M)
- 0,3 μ l dNTP-Mix (20mM je dNTP; Roche)
- 5 μ l 10x Puffer Expand HF (15mM MgCl₂)
- 0,75 μ l *Enzym-Mix* High Fidelity (3,5x10³ U/ml)
- 33,95 μ l H₂O

PCR-Programm:

2min 94°C
[15sec 94°C
30sec 60°C
1min 72°C]_{x10} Wiederholungen
[15sec 94°C
30sec 60°C
1min 72°C
+5sec/Zyklus]_{x17} Wiederholungen
7min 72°C

Der Vektor pBlueBacHis2A und die mittels PCR hergestellten, und mit den gleichen Enzymen wie der Vektor verdauten Inserts, wurden zur Kontrolle im Agarosegel charakterisiert und die Banden der Fragmente aus dem Gel reisoliert (2.4.1 und 2.4.2).

Restriktionsverdau-Ansatz (20µl):

- xµl Vektor (409ng/µl) bzw. Insert
- 1µl *BamHI* (10U/µl)
- 1µl *EcoRI* (10U/µl)
- 2µl *EcoRI* Puffer (10x)
- 2µl BSA (1mg/ml)
- 12µl H₂O

Anschließend erfolgte die Ligation der Inserts mit dem Vektor unter Standardbedingungen.

Ligationsansatz:

- 5µl Ligationspuffer (2x)
 - 1µl *Ligase* (1U/µl)
 - 4µl Vektor + Insert
- (Konz. Vektor: ca. 0,5ng/µl; Konz. Insert: ca. 8ng/µl → Verhältnis: 3:1)

Die Transformation in kompetente *E.coli* DH5α Zellen erfolgte nach der unter 2.5.2 beschriebenen Methode. Es wurde 1µl des Ligationansatzes eingesetzt. Rekombinante Klone wurden angeimpft und Plasmide mittels Mini-Kit von QIAGEN isoliert (2.5.3). Zur

Überprüfung der korrekten Inserts wurden mehrere Klone sequenziert. Ein korrektes Plasmid, welches das richtige Insert enthielt, wurde für die Transfektion mit dem Bac-N-Blue Kit von Invitrogen verwendet. Hierfür wurden die Plasmide mit dem PCR Purification Kit von Quiagen gemäß dem Protokoll aufgereinigt (Transfektion s. u.).

2.11.2 Transfektion von SF158 Zellen

Zur Transfektion wurde der Bac-N-Blue Transfection Kit (Version K) von Invitrogen nach Herstellerangaben verwendet. SF158 Zellen wurden mit dem Fremdgen-tragenden Transfervektor und mit der dreifach linearisierten *AcMNPV*-DNA (Bac-N-Blue DNA, Invitrogen) unter Verwendung von Cellfectin[®] co-transfiziert. Die DNA wird dabei ionisch an die Oberfläche von Liposomen gebunden (cationic liposome mediated transfection) und nach Fusion der Liposomen mit der Zellmembran in die Zelle aufgenommen. Durch homologe Rekombination des Transfervektors und der Virus-DNA kommt es zur Ausbildung rekombinanter viraler DNA (vgl. oben). Durch den 5'-Anteil des *lacZ*-Gens im Transfervektor kommt es nach korrekter Rekombination mit der Bac-N-Blue DNA, die den 3'-Anteil enthält, zur Bildung blauer, rekombinanter Plaques bei Verwendung von X-Gal-haltigem Medium.

Etwa 2×10^6 SF158 Zellen, die sich in der logarithmischen Phase befanden, wurden in TC100-Zellkulturmedium complete (enthält 10% Fötale Kälberserum (FKS) und Penicillin/Streptomycin, 50.000U) in 60mm Platten ausgesät (50-70% konfluent) und 15min anhaften gelassen. Die Zellen sollten erst nach Ausbildung eines Monolayers, das heißt eines einschichtigen Zellrasens, weiterbehandelt werden.

zu 10µl (0,5µg) Bac-N-Blue DNATM wurden hinzugegeben:

- 4µl Transferplasmid rekombinant (1µg/µl)
- 1ml TC100 Medium (ohne FKS und Pen./Strep.)
- 20µl Cellfectin[®] Reagent

Während der 15-minütigen Inkubation des Ansatzes bei RT wurden die Zellen mit frischem Medium gewaschen, anschließend das Medium komplett entfernt und der Transfektions-Ansatz auf die Zellen gegeben. Die Platten wurden 4h bei RT auf einem Seitwärtsschüttler inkubiert. Danach wurde 1ml Medium complete zugegeben und die Platten für 72h bei 27°C inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden 2ml der Zelloesung von jeder Platte abgenommen und als Virusstock bei 4°C aufbewahrt. Zur Aufreinigung des rekombinanten Virus wurde anschließend ein Plaque-Assay durchgefuehrt.

2.11.3 Aufreinigung des rekombinanten Virus (Plaque-Assay)

Um eine moeglichst hohe Ausbeute bei der Expression des Fremdgens zu erzielen, ist es notwendig, nach der Co-Transfektion rekombinantes Virus zu isolieren und spezifisch anzureichern. Hierzu wird ein sogenannter *Plaque-Assay* durchgefuehrt. Der verwendete Vektor pBlueBacHis2A bietet die Moeglichkeit, Plaques rekombinanter Viren neben ihrer veraenderten Morphologie (occ-) zusätzlich durch Blau-Weiß-Screening zu identifizieren. Nur rekombinante Viren besitzen ein intaktes *LacZ*-Gen und koennen daher als blaue Plaques in X-Gal-haltigem Medium nachgewiesen werden (Abb.2).

SF158 Zellen wurden in 100mm Platten bis zu 50% Konfluenz ausgesaet. Die Insektenzellen wurden dann mit Verdünnungen des Virusstocks (10^{-2} – 10^{-4}) für 1h inkubiert. Nach der Infektion wurde das Medium vollständig abgenommen und mit einem X-Gal-haltigen Medium-Agarose Gemische (10ml) überschichtet. Dafür wurden 5ml 2,5%ige, flüssige (47°C) „Low-Melting“-Agarose mit 5ml 47°C warmem Medium (50mg/ml X-Gal) gemischt und vorsichtig auf die Platte gegeben. Die Platten wurden in einer feuchten Kammer bei 27°C für ca. 5-6 Tage inkubiert, bis blaue Plaques sichtbar waren.

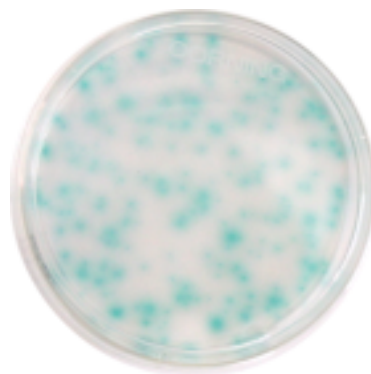


Abb.2: Plaque-Assay.

Blaue Viren-Plaques zeigen durch Vermehrung rekombinanter Baculoviren lysierte Zellen auf der Agarosefläche an.

Blaue Plaques wurden mit einer sterilen Pasteurpipette gepickt und zur Amplifikation des potentiell rekombinanten Virus verwendet. Dazu wurden SF158 Zellen in Zwölf-Loch-Platten gesplittet (ca. 5×10^5 Zellen in log-Phase) und in 2,5ml supplementiertem Medium mit je 1 Plaque infiziert. Zusätzlich zu den rekombinanten Plaques wurden nicht-rekombinante Plaques (occ+, farblos) als Kontrollen isoliert. Nach 6 Tagen wurden 750µl virushaltiger Überstand zur Isolierung von Virus-DNA abgenommen. Nach 7 Tagen (komplette Lyse der Zellen) wurde das Medium abgenommen und bei 4°C als P1-Virus-Stock aufbewahrt.

2.11.4 Isolierung viraler DNA

750µl Virus-Überstand wurden abgenommen und Zelltrümmer bei 5.000rpm 3min pelletiert. Der Überstand wurde mit 750µl 20% (w/v) PEG8000 in 1M NaCl (4°C) gemischt und 30min bei RT inkubiert. Die viralen Partikel wurden durch 10min Zentrifugation bei 13.500rpm und RT pelletiert und das Pellet in 100µl sterilem H₂O_{dd} resuspendiert. Nach Zugabe von 10µl Proteinase K (10ng/µl) wurde der Ansatz 1h bei 50°C inkubiert. Hierdurch werden die Viruspartikel lysiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 1V Phenol:Chloroform (1:1) und 5min Zentrifugation bei 13.500rpm extrahiert. Die DNA-haltige obere Phase wurde abgenommen und die DNA durch Zugabe von 1/10V 3M Natriumacetat (pH 5.2), 5µl Glykogen und 2V 100% Ethanol und Inkubation bei -20°C für 1h gefällt. Die Virus-DNA wurde anschließend pelletiert (15min, 13.500rpm, 4°C), das Pellet in 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 10µl sterilem H₂O_{dd} resuspendiert und anschließend für die PCR eingesetzt.

2.11.5 PCR-Analyse von rekombinantem Virus

Zur Überprüfung rekombinanter Viren wurde eine PCR mit isolierter Virus-DNA durchgeführt. Die Primer wurden so gewählt, dass sie den Polyhedrin-Locus flankierend binden (2.15.7; BacuPCR forward und BacuPCR reverse). Bei nicht-rekombinanter Virus-DNA wird mit diesen Primern ein 839bp Fragment (Polyhedrin-Gen) amplifiziert. Die PCR wurde unter Standardbedingungen durchgeführt und die Produkte im Agarosegel überprüft. Die Annealing-Temperatur der Primer betrug 55°C.

2.11.6 Herstellung eines hochtitrigen Virus-Stocks (P2)

Nach Identifizierung rekombinanter Viren wurde der P1-Virus-Stock zur Generierung eines hochtitrigen Virus-Stock P2 verwendet. Dazu wurden SF158 Zellen in 25cm² Zellkulturflaschen gesplittet (ca. 2x10⁶/ml Zellen in log-Phase) und mit 100µl P1-Virus-Stock infiziert. Die Flaschen wurden bei 27°C für 5 Tage inkubiert, bis ca. 90% der Zellen lysiert waren. Das die Viren enthaltende Medium wurde anschließend abgenommen und Zelltrümmer bei 3000rpm 15min pelletiert. Der Überstand (P2-Stock) wurde bei 4°C aufbewahrt (oder Aliquots mit DMSO bei -70°C eingefroren).

2.11.7 Expression von rekombinantem Protein

Zur Expression von rekombinanten Proteinen der Teilbereiche wurde zunächst die optimale Expressionsdauer ermittelt. SF158 Zellen wurden in 25cm² Zellkulturflaschen gesplittet (ca. 2x10⁶/ml Zellen in log-Phase) und mit 1ml P2-Virus-Stock infiziert. Die Zellen wurden bei 27°C inkubiert und 24, 48 bzw. 72h nach Infektion geerntet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (15min, 3000rpm) pelletiert, einmal mit kaltem PBS gewaschen und sofort bei -70°C gelagert. Nach der Lyse der Zellen (2.11.8) wurde die Protein-Expression im Western-Blot überprüft. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels Anti-His-Antikörper, der an die histidinreiche Region der Fusionsproteine bindet (2.8 und 2.15.4).

Die stärkste Proteinexpression erfolgte nach 48h.

2.11.8 Herstellung von Proteinlysaten Baculovirus-infizierter Insektenzellen

Das Zellpellet wurde in speziellem Lysispuffer resuspendiert (100µl Lysispuffer pro ml Zellkultur). Nach 60min Inkubation auf Eis wurde der Zelldebris durch Zentrifugation (20min, 13500rpm, 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde mit denaturierendem Probenpuffer (Roti-Load, Roth) gemischt und im Western-Blot analysiert.

- Lysispuffer:
- 3,2ml 50mM Natriumphosphat (pH 7.0)
 - 160µl 5M NaCl
 - 160µl NP-40 (Nonidet)
 - 3,68ml H₂O
- vortexen, sterilfiltrieren, 10min bei 3000rpm abzentrifugieren
- + 800µl Protease-Inhibitor Mini (Complete Mini, EDTA-free; Roche)

2.11.9 Proteinaufreinigung über Ni-NTA-Agarose (Immobilized-metal affinity chromatography: IMAC)

Zur Aufreinigung von Protein wurden Proteinlysate mit Lysispuffer wie unter 2.11.8 beschrieben hergestellt. Nach der Abzentrifugation des Zellschrotts wurden die Überstände der Zelllysate auf Eis weiterbehandelt. Die Proteinaufreinigung der im Baculovirus-System hergestellten rekombinanten Proteine erfolgte mittels Ni-NTA-Agarose (Nickel-Nitrilotriacetic Acid und Sepharose; QIAGEN). Es handelt sich um eine Metallionen-Affinitäts-Chromatographie-Matrix für Biomoleküle, die einen sechsfachen Histidin-Tag (Polyhistidin-Anhang) aufweisen (Immobilized-metal affinity chromatography: IMAC). Bei der Expression der Proteine mit dem Vektor pBlueBacHis2A entstehen Fusionsproteine, die einen aminoterminalen 6x-His-Tag aufweisen.

Protokoll:

- Ni-NTA-Agarose wurde mit 1x PBS gewaschen und 5min bei 3000rpm und 4°C abzentrifugiert
- zu 1ml Lysat wurden 50µl Ni-NTA-Agarose gegeben und die Proben für 2h sehr langsam bei 4°C auf einem Überkoprotator inkubiert
- die Proben wurden in Spin-Coloumns überführt und die Agarose abzentrifugiert (→ Durchfluss für die Western-Blot-Analyse aufbewahrt)
- die an den Membranen der Spin-Coloumns abzentrifugierte Agarose wurde zweimal mit jeweils 800µl Waschpuffer gewaschen (→ Durchflüsse Wash1 und Wash2 für die Western-Blot-Analyse aufbewahrt)
- die Elution der Proteine erfolgte viermal nacheinander mit jeweils 100µl Elutionspuffer; die Eluate wurden in separaten Probengefäßen aufgefangen (→ Durchflüsse Elutionen 1-4)

<u>Lysispuffer (1 Liter):</u>	50mM NaH ₂ PO ₄ (6,9g)	
	300mM NaCl (17,54g)	
	10mM imidazole (0,68g)	→ mit NaOH auf pH 8.0
<u>Waschpuffer (1 Liter):</u>	50mM NaH ₂ PO ₄ (6,9g)	
	300mM NaCl (17,54g)	
	20mM imidazole (1,36g)	→ mit NaOH auf pH 8.0
<u>Elutionspuffer (1 Liter):</u>	50mM NaH ₂ PO ₄ (6,9g)	
	300mM NaCl (17,54g)	
	250mM imidazole (17g)	→ mit NaOH auf pH 8.0

2.12 Untersuchung des E-Cadherin/Catenin Zelladhäsions-Komplexes: Immunhistochemische Färbungen an Paraffingewebeschnitten von Meningeomen

Analysen zur Regulation von MGEA6 und zu den Proteinen β -Catenin und E-Cadherin in Meningeomen und anderen Tumoren führten zur Betrachtung des WNT-Signalwegs und des Zelladhäsionskomplexes in Meningeomen. Hierzu wurde die Expression der Proteine β -Catenin und E-Cadherin untersucht.

Es wurden Schnitte von in Paraffin eingebetteten Tumorproben von 38 Meningeomen der verschiedenen WHO-Grade I-III (MI-MIII) und unterschiedlicher histomorphologischer Subtypen, von zwei Adenokarzinomen (Hirnmetastasen von Kolorektalkarzinomen) und von normalem, nicht-tumorösem arachnoidalem Gewebe als Kontrollen angefertigt und auf silanisierten Objektträgern fixiert. Die Tumorproben wurden mit Einverständnis der Patienten verwendet. Die 38 Patienten (35 mit primärem Meningeom und drei mit Rezidiven) wurden im Institut für Neurochirurgie der Medizinischen Fakultät des Saarlandes operiert. (Die Gewebeproben wurden in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet.)

2.12.1 Silanisierung von Objektträgern

Die Objektträger wurden zuerst für 30min in Ethanol abs. entfettet und anschließend für 5min in 2,5% Silan/Aceton getaucht. Die beschichteten Objektträger wurden zweimal kurz in Aceton getaucht und anschließend einmal in Wasser geschwenkt. Die Trocknung erfolgte 1h bei 40°C im Trockenschrank.

2.12.2 Immunhistochemische Färbung

Die Schnitte wurden in Xylen (abs.) deparaffinisiert und in einer Ethanol-Reihe (abs.; 95%; 89%; 80%; 72%; 65%; 60%; 52%) rehydriert. Endogene Peroxidaseaktivität wurde durch Inkubation in 1.0% H₂O₂ für 10min unterdrückt. Die Schnitte wurden für 20min bei 700W in Citrat-Puffer (pH 6.0; Verd. 1:10 in H₂O; DAKOCytomation) in einer Mikrowelle erhitzt. Hierdurch erfolgt eine hitzeinduzierte Epitopdemaskierung in den paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Der in 50µl PBS verdünnte Primärantikörper wurde auf die Schnitte gegeben und die Objektträger für 30min bei 37°C in humider Atmosphäre inkubiert. Der Sekundärantikörper war ein Biotin-markierter Rabbit-Anti-Mouse IgG Antikörper (DAKOCytomation) und wurde 1:300 in PBS verdünnt eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 20min in humider Atmosphäre bei 37°C. Anschließend wurden die Schnitte mit Streptavidin (DAKOCytomation) 1:300 verdünnt in PBS für 20min wie zuvor inkubiert. Danach folgte die Behandlung mit dem Chromogen Diaminobenzidin (DAKOCytomation) bei einer Verdünnung von 1:50 in dem dazugehörigen Puffer. Die Inkubation erfolgte für etwa 5min bei RT, bis eine Färbung der Gewebeschnitte sichtbar wurde. Es folgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin (1g/l; DAKOCytomation) und darauf die Dehydrierung mit einer Ethanol-Reihe (52%; 60%; 65%; 72%; 80%; 89%; 95%; abs.) und Xylen (100%). Die Schnitte wurden mit Entellan (Merck, Darmstadt, Germany) eingedeckt. Zwischen jedem Schritt erfolgte dreimaliges Spülen der Proben mit Puffer und anschließend mit H₂O_{dd}.

Die Auswertung erfolgte am Lichtmikroskop durch zwei unabhängige Personen.

Der affinitäts-aufgereinigte monoklonale Mouse-Anti-β-Catenin Antikörper (Zymed Laboratories, South San Francisco, USA) wurde 1:100 verdünnt in einer Konzentration von 5µg/ml verwendet, der monoklonale Mouse-Anti-E-Cadherin Antikörper (clone G-10, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) wurde 1:50 verdünnt in einer Konzentration von 4µg/ml eingesetzt. Die Spezifität der Antikörper wurde im Wester-Blot überprüft.

2.13 Immunfluoreszenz

2.13.1 Fixierung von Zellen auf Glasplättchen

Sterile Glasplättchen wurden in 60mm-Zellkulturschalen gelegt und mit Medium überschichtet. Dabei muss die Unterseite der Plättchen anhaften, damit nur die Oberseite mit Zellen bewachsen wird. Die in Zellkulturschalen gewachsenen Zellen (2.7) wurden mit PBS (RT) gewaschen und in einem entsprechenden Volumen Medium aufgenommen. Die Zellen wurden zu 30-50% Konfluenz in das Medium zu den Glasplättchen ausgesät und wachsen gelassen. Es muss beachtet werden, dass die Zellen nur bis zu einer Konfluenz von 90% wachsen, um eine Überlagerung der Zellen zu vermeiden, da sonst die Immunfluoreszenzfärbung beeinträchtigt würde.

Nach 48h wurden die Zellen auf den Glasplättchen fixiert. Je nach Versuch wurden die Zellen entweder mit Methanol oder mit Paraformaldehyd/Triton behandelt.

Methanol-Fixierung:

- dreimaliges Waschen der Zellen mit 1x PBS um Medium zu entfernen
- Überschichten der Zellen mit eiskaltem Methanol für 5min bei -20°C
- das Methanol wurde abgesaugt und verdampfen gelassen
- dreimaliges Waschen mit kaltem 1x PBS

Bis zur Färbung der Zellen wurden die auf den Plättchen fixierten Zellen mit 1x PBS überschichtet im Kühlschrank aufbewahrt.

Paraformaldehyd-Fixierung/Permeabilisierung mit 0,25% Triton-X100 :

- dreimaliges Waschen der Zellen mit 1x PBS um Medium zu entfernen
- Überschichten der Zellen mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 5min bei RT
- dreimaliges Waschen mit kaltem 1x PBS
- Überschichten der Zellen mit 0,25% Triton-X100 in PBS für 5min bei RT zur Permeabilisierung
- dreimaliges Waschen mit kaltem 1x PBS

Bis zur Färbung der Zellen wurden die auf den Plättchen fixierten Zellen mit 1x PBS überschichtet im Kühlschrank aufbewahrt.

2.13.2 Fluoreszenzfärbung

Die Glasplättchen mit den fixierten Zellen wurden erst kurz vor der Färbung aus dem Kühlschrank und aus dem Puffer genommen. Alle Inkubationsschritte erfolgten in einer feuchten Kammer, um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden. 50µl Blockinglösung wurden (PBS/5% BSA) als Tropfen auf die Zellen gegeben und 20min bei RT inkubiert. Die verwendeten Primärantikörper wurden in PBS/3% BSA verdünnt, die Zellen mit 50µl Primärantikörperverdünnung überschichtet und 1h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Plättchen dreimal 10min mit PBS gewaschen. Danach folgte die Inkubation mit dem jeweiligen Sekundärantikörper, der in PBS/3% BSA verdünnt wurde. Die Inkubation erfolgte für 40min bei RT. Danach folgte dreimal 10min Waschen mit 1x PBS. Anschließend wurde eine Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid, AppliChem) durchgeführt. Diese erfolgte 5min mit einer Konzentration von 1µg/ml DAPI in PBS. Nach dreimaligem Waschen wurden die Plättchen mit VectaShield Mounting Medium (Vector Laboratories) eingedeckt, auf Objektträgern fixiert und die Proben bis zur Auswertung am Fluoreszenz-Mikroskop (Axioplan, ZEISS) bei +4°C aufbewahrt.

2.14 Analyse der Proteininteraktion von MGEA6 mit den Proteinen BAIAP2, KIBRA und SPTAN1 mittels Co-Immunpräzipitation

Die Proteininteraktion von MGEA6 mit anderen Proteinen wurde mittels Co-Immunpräzipitation untersucht. Bei den als Bindungspartner analysierten Proteinen handelte es sich um drei Proteine, welche in einem Yeast-Two-Hybrid-Screening (durchgeführt von Fr. Dr. N. Comtesse) mehrmals positiv für eine Interaktion mit MGEA6 gefunden wurden. Bei dem Vektor für das Yeast-Two-Hybrid-Screening handelte es sich um pGBKT7 (2.15.8).

Die Analyse erfolgte für folgende Proteine:

- BAIAP2 (Homo Sapiens BAI1 (Brain Angiogenesis Inhibitor 1-) Associated Binding Protein 2, Transcript Variant 1; NP_059344: 521As; NM_017450)
- KIBRA (Homo Sapiens WW and C2 Domain Containing 1 (WWC1); NP_056053: 1113 As; NM_015238)
- SPTAN1 (Homo Sapiens Spectrin alpha, Alpha-Fodrin, non-erythrocytic 1; NP_003118: 2472 As; NM_003127)

2.14.1 Amplifikation und Klonierung der Fremdgene in die Expressionsvektoren p3xFLAG-CMV-10 und -14

PCR-Amplifikation

Die Sequenzen für die Expression wurden mit dem Expand High Fidelity PCR-System (Roche) bzw. mit dem TripleMasterTMPCR-System (Eppendorf) amplifiziert. Beide Systeme enthalten Proofreading-Polymerasen. Die Primer enthalten Schnittstellen für Restriktionsenzyme, über die die Sequenzen in den jeweiligen Vektor einkloniert wurden (Tab.4 und 2.15.7). Für die Amplifizierung der Sequenzen BAIAP2, KIBRA und SPTAN1 wurden die entsprechenden Klone aus dem Yeast-Two-Hybrid-Screening als Template verwendet.

Tab.4: Sequenzen zur Klonierung in die FLAG-Vektoren p3xFLAG-CMV-10 und -14.

Sequenzname, NM_ und NP_Nummer, Template-Plasmid, umfasster Sequenzbereich in der cDNA, Primerpaare und Fragmentgrößen, sowie Proteingrößen der exprimierten Proteine.

Sequenz	NP- und NM-Nr.	Plasmid-Klon	Primerpaar	Sequenzbereich	Fragmentgröße	Molekulargewicht
BAIAP2	NP_059344: (521As) NM_017450	52-2	BAIAP2for_EcoRI/ BAIAP2rev_BamHI	kompl. cDNA- Sequenz (As 1-521)	1566bp	64,1kDa
KIBRA	NP_056053: (1113 As) NM_015238	47-1	KIBRA471_NotIfor10/ KIBRA47-1_XbaIrev10 KIBRA47-1_NotIfor14/ KIBRA47-1_XbaIrev14	2671– 3408bp (As 869- 1113)	738bp	33,5kDa
SPTAN1	NP_003118: (2472 As) NM_003127	6-4	Spectrin6-4_NotIfor14/ Spectrin6-4_XbaIrev14	6076– 7521bp (As 1992- 2472)	1446bp	62,3kDa

Die PCR-Produkte wurden in 1%-Agarosegelen aufgetrennt, die korrekten Fragmente ausgeschnitten und aus dem Gel reisoliert.

Ligation mit dem FLAG-Vektor und Transformation

Die KIBRA-Sequenz wurde in beide FLAG-Vektoren eingebracht (2.15.8), um Proteine zu exprimieren, die einmal mit einem aminoterminalen-FLAG-Tag (p3xFLAG-CMV-10) und einmal mit einem carboxyterminalen-FLAG-Tag (p3xFLAG-CMV-14) analysiert werden können. Die Sequenz BAIAP2 konnte nur erfolgreich in den Vektor p3xFLAG-CMV-10 und die Sequenz SPTAN1 in den Vektor p3xFLAG-CMV-14 kloniert werden.

Die reisolierten Fragmente wurden einem Doppelverdau mit Restriktionsenzymen unterzogen (2.5.5). Es handelte sich jeweils um die Restriktionsenzyme, für welche Schnittstellen in die Primer für die Amplifizierung eingebaut wurden. Die Vektoren wurde mit *EcoRI/BamHI* bzw. mit *NotI/XbaI* doppelverdaut und dephosphoryliert (2.10.1). Die Fragmente und Vektoren wurden mittels PCR-Purification-Kit von QIAGEN nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Die Ligation erfolgte mittels Rapid DNA-Ligation Kit. Ligation und Transformation wurden wie beschrieben durchgeführt (2.5.1 und 2.5.2).

Plasmide wurden nach 2.5.3 isoliert und mittels Restriktionsverdau charakterisiert. Die Wahl der Restriktionsenzyme richtete sich nach der Sequenz des zu charakterisierenden Inserts. Plasmide mit Fragmenten der richtigen Größe wurden sequenziert (2.3) und mit der Genome Browser Datenbank abgeglichen.

2.14.2 Klonierung des MGEA6-HA-Fusionskonstrukts in den Expressionsvektor pSG5

PCR-Amplifikation

Die *MGEA6*-cDNA-Sequenz (*cTAGE-5C*; Referenzsequenz: NM_005930, NP_005921: 804As) wurde ohne den Bereich, der die Transmembrandomäne des Proteins codiert, mittels Expand High Fidelity PCR-System (Roche) amplifiziert. Als Template diente das Plasmid

pGBKT7-MGEA6-Klon 3 aus dem Yeast-Two-Hybrid-Screening. Der Sequenzbereich umfasst die Basen 504-2784 der Referenzsequenz.

Als Primer wurden spezielle Konstrukte verwendet, in welche die Sequenz für einen HA-Tag eingefügt wurde, sodass Fusionssequenzen aus HA-Tag und MGEA6-Sequenz erhalten wurden. Es wurden zwei verschiedene Fragmente erzeugt, die zum einen einen aminoterminalen, zum anderen einen carboxyterminalen HA-Tag enthielten. Die Primer codieren Schnittstellen für Restriktionsenzyme, über die die Sequenzen in den jeweiligen Vektor inkloniert wurden. Die verwendeten Primerpaare sind in Tab.5 zusammengestellt und die Primersequenzen unter 2.15.7 aufgeführt.

Tab.5: MGEA6-HA-Tag-Fragmente für die Klonierung in pSG5.

Sequenzname, NM_ und NP_Nummer, umfasster Sequenzbereich in der cDNA, Primerpaare und Fragmentgrößen, sowie Proteingrößen der exprimierten Proteine.

Sequenz	NP- und NM-Nr.	Plasmid (Template)	Primerpaar	Sequenzbereich	Fragmentgröße	Molekulargewichte
HA-MGEA6 (aminoterminaler Tag)	NP_005921: (804As)	pGBKT7-MGEA6-Klon 3	HA-MGEA6_EcoRI_for/ pGBKT7_MGEA6_BamHI_rev	504-2784bp (As 56-804)	2307bp	89,1kDa (Laufhöhe im Gel: 100kDa)
MGEA6-HA (carboxyterminaler Tag)	NM_005930		MGEA6_EcoRI_for/ HA-MGEA6_BamHI_rev	504-2784bp (As 56-804)		89,1kDa (Laufhöhe im Gel: 100kDa)

Es wurde zusätzlich ein pSG5-Plasmid, das nur den HA-Tag exprimiert, konstruiert:

Der pSG5-Vektor wurde inklusive der Sequenz für den Tag, mittels PCR unter Verwendung der *Pfu-Polymerase* in den pSG5-Vektor eingebracht. Die hierfür verwendeten Primer sind unter 2.15.7 aufgeführt. Als Template diente das Plasmid MGEA6-HA-for-pSG5-Klon 2. Das erhaltene Produkt hat eine Größe von 4,1kb.

Ansatz:

- xµl Plasmid (60ng)
 - 5µl PfuTurbo Puffer (10x)
 - 0,5µl Primer for (25µM)
 - 0,5µl Primer rev (25µM)
 - 0,5µl dNTP-Mix
 - 0,5µl *PfuTurbo-Polymerase*
- auffüllen auf 50µl mit H₂O_{dd}

<u>Programm:</u>	94°C	3min
	[94°C	45sec
	55°C	45sec
	72°C	6min 30sec] _{x30} Wiederholungen
	72°C	10min
	4°C	∞

Der Vektor wurde zur Kontrolle mit *DpnI* verdaut, über ein Agarosegel durch Gelextraktion aufgereinigt und zur Religierung mittels *T₄-Polynukleotid Kinase* (NEB) phosphoryliert.

T₄-Polynukleotid Kinase-Phosphorylierung:

- 39µl pSG5-HA-Vektor aus Gelextraktion
- 5µl PNK-Puffer (10x)
- 5µl ATP (10mM)
- 1µl *T₄-Polynukleotidkinase* (10U/µl; NEB)

→ im Thermocycler (PTC-100; MyResearch. Inc):

→ 37°C	30min
→ 65°C	20min
→ 8°C	∞

Es folgte die Ligation mittels Rapid DNA Ligation Kit und die Transformation in kompetente *E.coli* DH5α wie unter 2.5.1 und 2.5.2 beschrieben. Kolonien wurden kultiviert und Plasmide isoliert wie unter 2.5.3 aufgeführt.

Ligation mit dem Vektor pSG5 und Transfektion

Um die entsprechenden Überhänge für die Ligation mit dem pSG5-Vektor zu erhalten, wurden die reisolierten Fragmente mit Restriktionsenzymen einem Doppelverdau unterzogen (2.5.5). Es handelte sich jeweils um die Restriktionsenzyme *EcoRI/BamHI*, für welche Schnittstellen in die Primer für die Amplifizierung eingebaut wurden. Der Vektor pSG5 wurde ebenfalls mit den Enzymen *EcoRI/BamHI* doppelverdaut und somit für die Ligation mit den Fragmenten geschnitten. Die Fragmente und Vektoren wurden mittels PCR-Purification-Kit von QIAGEN nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Die Ligation erfolgte mittels Rapid DNA-Ligation Kit. Ligation und Transformation wurden wie beschrieben durchgeführt (2.5.1 und 2.5.2). Zur Identifizierung rekombinanter Klone wurden Kolonien kultiviert, Plasmide wie unter 2.5.3 isoliert und anschließend mittels Restriktionsverdau charakterisiert. Die Wahl der Restriktionsenzyme richtete sich nach der Sequenz des zu charakterisierenden Inserts. Plasmide mit Fragmenten der richtigen Größe wurden sequenziert (2.3) und mit der Genome Browser Datenbank abgeglichen, um die korrekte Sequenz bestimmen zu können und fehlerhafte Sequenzen auszuschließen.

2.14.3 Transformation rekombinanter Flag- bzw. pSG5-Vektoren in COS-Zellen und Expression der Proteine

Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels pEGFP

Die Transfektionseffizienz wurde mittels EGFP-Expression unter Verwendung des Plasmids pEGFP-C1 (zur Verfügung gestellt von Fr. Dr. A. Ruggieri) bestimmt.

COS-Zellen wurden in einer Konzentration von $1,5 \times 10^5$ Zellen/Well in einer 12-Well-Platte ausgesät.

Transfektionsansatz für ein 12-Well:

Ratio: FuGENE Reagent : Plasmid → 3:1

- 100µl Optimem in Reaktionsgefäß vorlegen
- 3µl FuGENE Reagent direkt in Medium pipettieren
- 5min inkubieren
- 1µg pEGFP zugeben
- Negativkontrolle: Ansatz ohne Plasmid
- vorsichtig mischen
- 1h Inkubation

Das Medium der Zellen in den Wells wurde während der Inkubationszeit gewechselt. Nach der Inkubation wurde der Transfektionsansatz in das Medium des jeweiligen Wells zugegeben. Die Expression erfolgte für 48h bei 37°C in 5% CO₂-Atmosphäre in einem Zellkulturschrank. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen dreifach mit 1x PBS gewaschen. Zur Ernte der Zellen wurden 300µl Versen (1:5.000; GIBCO) zu den Zellen

gegeben und die Proben in Röhrchen mit 300 l 1x PBS überführt. Die Messung erfolgte am FACS des Instituts für Virologie (Universitätsklinikum Campus Homburg/Saar).

Die Transfektionseffizienz betrug ca. 70%.

Transfektion und Proteinexpression

COS-Zellen wurden in 100mm Schalen in einer Dichte von $2,5 \times 10^6$ (ca. 50% Konfluenz) in DMEM-Medium complete ausgesät und 1 Tag bis zur Transfektion kultiviert.

Transfektionsansatz für eine 100mm-Schale:

Ratio: FuGENE Reagent: Plasmid \rightarrow 3:1

- 528 l DMEM-Medium ohne Zusätze in Reaktionsgefäß vorlegen
- 18 l FuGENE Reagent direkt in Medium pipettieren
- \rightarrow 5min inkubieren
- Zugabe von 6 g Plasmid
(6 g insgesamt entspr. \Rightarrow 3 g + 3 g bei Co-Transfektion)
- \rightarrow vorsichtig mischen
- \rightarrow 1h Inkubation

Das Medium der Zellen in den Wells wurde während der Inkubationszeit gewechselt. Nach der Inkubation wurde der Transfektionsansatz in das Medium des jeweiligen Wells zugegeben. Die Expression erfolgte für 48h bei 37 C in 5% CO₂-Atmosphäre in einem Zellkulturschrank.

für die Expression verwendete Plasmide:

o BAIAP2-p3xFLAG-CMV-10-Klon 1	\Rightarrow	FLAG-BAIAP2
o KIBRA-p3xFLAG-CMV-10-Klon 14	\Rightarrow	FLAG-KIBRA
o KIBRA-p3xFLAG-CMV-14-Klon 2	\Rightarrow	KIBRA-FLAG
o SPTAN1-p3xFLAG-CMV-14-Klon 6	\Rightarrow	SPTAN1-FLAG
o MGEA6-HA-for-pSG5-Klon 2	\Rightarrow	HA-MGEA6
o MGEA6-HA-rev-pSG5-Klon 6	\Rightarrow	MGEA6-HA

Bezeichnung:

Die Plasmide wurden einzeln transfiziert, um die Proteinexpressionen zu überprüfen. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels Western-Blot mit den Antikörpern Anti-FLAG bzw. Anti-HA (2.7 und 2.8).

Als Negativkontrollen wurden Zellen mit jeweils den leeren FLAG- bzw. pSG5-Vektoren transfiziert, sowie ein Transfektionsansatz der statt Plasmid H₂O enthielt. Als Positivkontrolle für den Anti-HA-Ak diente das Plasmid p73,3-HA-Tag (pCDNA; zur Verfügung gestellt aus dem Institut für Virologie, Universitätsklinikum Campus Homburg/Saar), als Positivkontrolle für den Anti-FLAG-Antikörper das FLAG-BAP-Fusionsprotein (49,3kDa; aufgetragen 150ng) aus dem Kit.

Es wurden folgende Transfektionen durchgeführt:

Co-Transfektionen:

- FLAG-BAIAP2 + HA-MGEA6
- FLAG-BAIAP2 + MGEA6-HA
- FLAG-KIBRA + HA-MGEA6
- FLAG-KIBRA + MGEA6-HA
- KIBRA-FLAG + HA-MGEA6
- KIBRA-FLAG + MGEA6-HA
- SPTAN1-FLAG + HA-MGEA6
- SPTAN1-FLAG + MGEA6-HA

Kontrollen:

- FLAG-BAIAP2 + pSG5-HA-Tag
- FLAG-KIBRA + pSG5-HA-Tag
- KIBRA-FLAG + pSG5-HA-Tag
- SPTAN1-FLAG + pSG5-HA-Tag
- HA-MGEA6 + p3xFLAG-CMV-10
- HA-MGEA6 + p3xFLAG-CMV-14
- MGEA6-HA + p3xFLAG-CMV-10
- MGEA6-HA + p3xFLAG-CMV-14

Positivkontrolle für HA-Tag:

- p73,3-HA-Tag (pCDNA)

Negativkontrolle:

- COS-Zellen + Transfektionsansatz mit H₂O

2.14.4 Immunpräzipitation

Die Isolierung der Proteine bzw. Proteinkomplexe erfolgte unter Verwendung des FLAG[®] Tagged Protein Immunoprecipitation Kit von SIGMA nach Herstellerangaben.

Ernten der Zellen und Herstellung von Proteinlysaten

Die Zellrasen in den Schalen wurden durch dreimaliges Waschen mit kaltem PBS (1x) von Medium befreit, anschließend in 2ml kaltem PBS (1x) durch Abschaben in Suspension genommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden für 4min bei 3.000rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets weiterbehandelt oder bei -70°C aufbewahrt.

Zur Lyse der abgeernteten Zellen wurde der Lysispuffer aus dem FLAG[®] Tagged Protein Immunoprecipitation Kit verwendet. Der einfach-konzentrierte und kalte Puffer wurde mit Proteaseinhibitor versehen. Hierzu wurde eine Tablette Complete Mini Cocktail EDTA-free (Roche) in 100µl H₂O (steril) gelöst und dann in einer Konzentration von 1:100 in dem Puffer verdünnt. Jeweils ein Zellpellet aus einer 100mm-Schale wurde in 600µl Lysispuffer resuspendiert (gevortext) und für 35min auf Eis inkubiert. Zwischendurch wurden die Proben mehrmals gevortext. Anschließend wurden die Proben zweimal für 10sec mit Ultraschall behandelt und danach für 15min bei 14.000rpm und 4°C zentrifugiert.

Die Überstände enthalten die gelösten Proteine und wurden in neue Probengefäße überführt. Ein Aliquot jedes Überstands wurde als bei -70°C aufbewahrt und der Rest auf Eis für die Immunpräzipitation mit der FLAG-Agarose aus dem Kit weiterbehandelt. Die Pellets nach der ersten Zentrifugation wurden in einem adäquaten Volumen Protein-Puffer (2.6.1 „Laemmli-Puffer“) aufgenommen.

Immunpräzipitation mit Anti-FLAG-Agarose

Für jedes Lysat wurden 50µl Anti-FLAG-Agarose verwendet und in ein Reaktionsgefäß überführt. Ethanol wurde durch Zentrifugation für 2min bei 5.500rpm und 4°C abgetrennt. Die Agarose wurde vierfach mit 500µl kaltem 1x Waschpuffer aus dem Kit (mit sterilem

H₂O verdünnt und gekühlt) gewaschen. Der Puffer wurde jeweils bei 5.500rpm und 4°C für 2min abzentrifugiert und durch abpipettieren entfernt.

Nach dem letzten Waschschrift und Entfernen des Waschpuffers wurde das jeweilige Proteinlysate zur Agarose in einem Reaktionsgefäß gegeben. Die Proben wurden ü. N. auf einem Überkoprotator bei 4°C und geringer Umdrehungszahl inkubiert. Nach der Inkubation folgte eine Zentrifugation für 2min bei 5.500rpm und 4°C. Die Überstände wurden abgenommen und mit Probenpuffer (Roti-Load; ROTH) versehen aufbewahrt, um als Kontrollprobe nach der Agaroseinkubation im Western-Blot getestet zu werden. Von der abzentrifugierten Agarose (vor der Elution) wurde jeweils ein Aliquot zur Analyse im Western-Blot abgenommen. Die restliche Agarose wurde dreifach mit kaltem Waschpuffer (1x) gewaschen. Der Puffer wurde jeweils bei 5.500rpm und 4°C für 2min abzentrifugiert und entfernt. Alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt.

Die Elution der Proteine erfolgte unter Verwendung des Laemmli-Probenpuffers (2.11.1) bei RT. 30µl Elutions-Probenpuffer wurden zur Agarose gegeben und die Proben 5min bei 95°C aufgekocht. Anschließend erfolgte eine kurze Abzentrifugation der Proben (1min bei 10.000rpm und RT). Die Überstände enthalten die Proteine bzw. Proteinkomplexe und wurden als Eluate deklariert. Die Agarose nach der Elution wurde jeweils mit Probenpuffer versehen und zur Analyse im Western-Blot aufbewahrt. Die Proteine wurden in 10% SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und im Western-Blot nachgewiesen. Die verwendeten Antikörper Anti-FLAG, Anti-HA und die jeweiligen Sekundärantikörper sind unter 2.15.4 aufgeführt. Als Positivkontrolle für den FLAG-Antikörper diente das FLAG-BAP-Fusionsprotein (49,3kDa; aufgetragen 150ng) aus dem Kit.

2.15 Sonstiges

2.15.1 Computersoftware

- BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)
- BLAT Search (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>)
- Sequence Alignment Editor Se-AL v2.0a11Carbon (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/>)
- GENOME (<http://genome.ucsc.edu/>)
- KEGG-Datenbank (http://www.genome.jp/en/gn_kegg.html)
- Gene2Promotor (www.genomatix.de)
- BCM-Searchlauncher (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>)
- NEBcutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>)
- Clustal W (www.ebi.ac.uk/clustalw/)
- Genecard (<http://www.genecard.org/index.shtml>)
- Amplify 3.1 (<http://engels.genetics.wisc.edu/amplify>)

2.15.2 Sequenzen

- MGEA6 (Homo Sapiens Meningioma Expressed Antigen 6 bzw. Homo Sapiens CTAGE Family Member 5 (CTAGE5), Transcript Variant 1; NM_005930, NP_005921)
- BAIAP2 (Homo Sapiens BAI1 (Brain Angiogenesis Inhibitor 1-) Associated Binding Protein 2, Transcript Variant 1; NM_017450, NP_059344)
- KIBRA (Homo Sapiens WW and C2 Domain Containing 1 (WWC1); NM_015238, NP_056053)
- SPTAN1 (Homo Sapiens Spectrin alpha, Alpha-Fodrin, non-erythrocytic 1; NM_003127, NP_003118)

2.15.3 Enzyme

- *Hot Star Taq DNA Polymerase* (QIAGEN)
- *Taq DNA Polymerase* (Recombinant, Invitrogen)
- *Reverse Transkriptase* (QIAGEN)
- *Pfu-DNA-Polymerase* (Roche)
- *T4-DNA-Ligase* (Roche)
- *Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)*; Roche)
- *Proteinase K* (Roche)
- *T4-Polynukleotid Kinase* (NEB)
- *Apal* (10.000 U/ml; Boehringer)
- *BamHI*(20.000 U/ml; NEB)
- *EcoRI*(10.000 U/ml; Roche)
- *EcoRI*(20.000 U/ml; NEB)
- *HindIII* (10.000 U/ml; NEB)
- *NaeI* (10.000 U/ml; NEB)
- *NcoI* (10.000 U/ml; NEB)
- *NotI* (10.000 U/ml; NEB)
- *PstI* (10.000 U/ml; NEB)
- *SacI* (10.000 U/ml; Roche)
- *SmaI* (10.000 U/ml; NEB)
- *SpeI* (10.000 U/ml; Roche)
- *XbaI* (20.000 U/ml; NEB)

2.15.4 Antikörper

Primäre Antikörper :

- Anti-Penta-His Antibody (Mouse; Konz.: 1:500 WB; QIAGEN)
- Anti-MGEA6-Antiserum (324; Rabbit; NAP-aufgereinigt; Konz.: 1:100 WB)
- Anti-HA Antibody (3F10; monoclonal, Rat; Konz.: 1:50 WB; Roche)
- Anti-FLAG-M2 Antibody (monoclonal, Mouse; Konz.: 1:1.000 WB; SIGMA)
- Anti- β -Catenin Antibody (clone CAT-5H10; monoclonal, Mouse; Konz.: 1:1.000 WB; 1:100 IHC; 1:100 IF; Zytomed)

- Anti-E-Cadherin Antibody (clone G-10; monoclonal, Mouse; Konz.: 1:100 WB; 1:50 IHC; 1:50 IF; Santa Cruz)
- Anti- α -Tubulin Antibody (clone DM1A; monoclonal, Mouse; Konz.: 1:1.000 IF; 1:5.000 WB; SIGMA)
- Anti-Golgi-58K-Protein Antibody (clone 58K-9; monoclonal, Mouse; Konz.: 1:1.000 WB; 1:50 IF; SIGMA)
- Anti-ER 61 α Antibody (polyclonal, Rabbit; 4. Blut; Konz.: 1:1.000 WB; Biochemie und Molekulare Biologie, Universitätsklinikum Homburg/Saar; Prof. Dr. M. Jung)
- Anti-680 Ribosomen Antibody (polyclonal, Rabbit; 5. Blut; Konz.: 1:1.000 WB; Biochemie und Molekulare Biologie, Universitätsklinikum Homburg/Saar; Prof. Dr. M. Jung)

Sekundäre Antikörper :

- Goat-Anti-Rabbit IgG (Konz.: 1:2.500 WB; DIANOVA)
- Sheep-Anti-Human IgG (Amersham; Konz.: 1:3.000 WB; DIANOVA)
- Sheep-Anti-Mouse IgG (conjugated to peroxidase, Konz.: 1:30.000 WB; DIANOVA)
- Rabbit-Anti-Rat IgG (Konz.: 1:5.000 WB; SIGMA)
- Rabbit-Anti-Goat IgG (Konz.: 1:5.000 WB; SIGMA)
- Alexa Flour 488-conjugated Goat-Anti-Mouse IgG (Konz.: 1:800 IF; Alexa Fluor)
- Alexa Flour 594-conjugated Goat-Anti-Mouse IgG (Konz.: 1:1000 IF; Alexa Fluor)
- Alexa Flour 594-conjugated Goat-Anti-Rabbit IgG (Konz.: 1:1000 IF; Alexa Fluor)
- Alexa Flour 546-conjugated Goat-Anti-Mouse IgM (Konz.: 1:1000 IF; Alexa Fluor)

2.15.5 Puffer und Lösungen/Chemikalien

- LB-Medium: 10 g NaCl
(1 Liter) 10 g Bacto-Trypton
 5 g Hefeextrakt → autoklavieren
(→ für Platten: + 7,5 g Agar auf ½ l LB-Medium)
- Ampicillin: 50 mg/ml in H₂O_{dd}
- APS: 0,1 g Ammoniumpersulfat in 1 ml H₂O_{dd}
- X-Gal: 25 mg/ml in DMF (N,N-Dimethylformamid)
- IPTG: 200 mg/ml in H₂O_{dd}

-
- Silan/Aceton: 2,5% 3-(Triethoxysilyl)-propylamin in Aceton
 - FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche)
 - Complete Mini: EDTA-free Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche)
Gebrauchslsg.: 1 Tablette in 1 ml H₂O gelöst
 - GelStar: Nucleic Acid Gel Stain (BioWhittaker MolecularApplications)
 - DAPI: 4',6'-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid (Applichem)
 - VectaShield Mounting Medium (Vector Laboratories)
 - Ni-NTA-Agarose Nickel-Nitrilotriacetic Acid an Sepharose CL-6B (QIAGEN)
 - (NAP Sephadex-Affinity-Column Pharmacia Biotech)

Alle weiteren verwendeten Lösungen, Chemikalien und Kits sind bei der jeweiligen Methode angegeben.

2.15.6 Molekulargewichtsmarker

DNA-Längenstandards:

- DNA-Längenstandard III (Roche): Fragmentgemisch aus der Spaltung von Lambda-DNA mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *HindIII*; enthält Fragmente folgender Länge: 21.126bp, 5.148bp, 4.973bp, 4.268bp, 3.530bp, 2.027bp, 1.904bp, 1.584bp, 1.375bp, 947bp, 831bp, 564bp, 125bp.
- DNA-Längenstandard VI (Roche): Fragmentgemisch aus der Spaltung von pBR328-DNA mit den Restriktionsendonukleasen *BglI* bzw. *HinfI*; enthält Fragmente folgender Länge: 2.176bp, 1.766bp, 1.230bp, 1.033bp, 653bp, 517bp, 453bp, 394bp, 298bp, 234bp, 220bp, 154bp.
- 100bp-extended Längenstandard (ROTH); enthält Fragmente folgender Länge: 5.000bp, 4.000bp, 3.000bp, 2.500bp, 2000bp, 1.500bp, 1.000bp, 900bp, 800bp, 700bp, 600bp, 500bp (x2), 400bp, 300bp, 200bp, 150bp, 100bp.

Protein-Molekulargewichtsmarker:

- Full Range Rainbow Recombinant Protein Marker (Amersham): enthält verschiedenfarbige rekombinante Proteine folgenden Molekulargewichts:
250, 160, 105, 75, 50, 35, 30, 25, 10 kDa
- Precision Plus Protein Dual Color Standard (BIORAD): enthält Proteine folgenden Molekulargewichts zweifarbig dargestellt:
250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10 kDa

2.15.7 Oligonukleotide

GAPDH-PCR

GAPDH-5` - GGA AGG TGA AGG TCG GAG T – 3`

GAPDH-3` - ATC ACG CCA CAG TTT CCC – 5`

Primer für Klonierung Baculo-System:

Bacu-6 for1: CCA GGG ATC CGA GGA GCC CGG GGC TAC CC
BamHI

Bacu-6 for2: CCA GGG ATC CCA CAT CAA GAC TCT GAC TG

Bacu-6 for3: CCA GGG ATC CCA TCA GAT TAC CAA TGA AAG

Bacu-6 rev1: CTC CGA ATT CGT TAT TCT CCA AGC ATA GCA GC
EcoRI

Bacu-6 rev2: CTC CGA ATT CGT TAA GGA TCG GTT AAC CTA TC

Bacu-6 rev3: CTC CGA ATT CCC TAA ACT GAA AAT GAG A

Primer Baculovirus-PCR:

Bacu PCR forward: TTT ACT GTT TTC GTA ACA GTT TTG

Bacu PCR reverse: CAA CAA CGC ACA GAA TCT AGC

Primer für Klonierung HA- bzw. FLAG-Vektor:

MGEA6-HA-Tag:

HA_MGEA6_EcoRI_for: CTC CGA ATT CAG GCC ACC ATG [TAC CCA TAC GAC
EcoRI *Kozak* *HA-Tag*
GTC CCA GAC TAC GCT] AGA TCG GTT AGG AGT CGG C

pGBKT7_MGEA6_BamHI_rev : CCA GGG ATC CCT TAA ACT GAA AAT GAG ATC
BamHI

MGEA6_EcoRI_for: CTC CGA ATT CAG GCC ACC ATG AGA TCG GTT AGG AGT
EcoRI *Kozak*
CGG C

HA_MGEA6_BamHI_rev: CCA GGG ATC C TCA [AGC GTA GTC TGG GAC GTC
BamHI *HA-Tag*
GTA TGG GTA] GGT TTC TTG CTG TGG TTC TGG ATG

BAIAP2: (Plasmid 52-2)

BAIAP2for_EcoRI: GGC GAA TTC ATC TCT GTC TCG CTC AGA GGA G

BAIAP2rev2_BamHI: GGC GGA TCC CTA ACT CTA GTC AGG CGG CTC AGA

KIBRA: (Plasmid 47-1)

KIBRA47-1_NotIfor10: TAA GCG GCC GCA GAT GTT TTC ACC GAG AAA GCC

KIBRA47-1_XbaIrev10: CCG TCT AGA TTA GAC GTC ATC TGC AGA GAG

KIBRA47-1_NotIfor14: TAA GCG GCC GCA ATG GAT GTT TTC ACC GAG AAA
GCC

KIBRA47-1_XbaIrev14: CCG TCT AGA GAC GTC ATC TGC AGA GAG

SPTAN1: (Plasmid 6-4)Spectrin6-4_NotIfor14: TAA GCG GCC GCA ATG ATC GGT GAA AAG GAG AAC
AGC

Spectrin6-4_XbaIrev14: CCG TCT AGA GTT CAC GAA AAG CGA GCG

HA-Tag-Amplifizierung in pSG5-Vektor:

HAtagSTOP_for: TGA CAA TAT TTT TGC TCT CTT CAA

HAtag_rev: AGC GTA GTC TGG GAC GTC GTA TGG GTA CAT

Primer für Klonierung in den pGL3-Basic Vektor (3500 bp Upstream-Regionen der Loci):MGEA6-14q-Locus:

14qfor: CAA TTG AGG AGC CTC TTT GAG TTC

14qrev: CCC ATC CCG ACC CTC TTG TTA TAC

6q27: 6q27for : TCA GAG ATT CTC CCT GTG TGC TTG

6q27rev : CAG CCA CAA CAA GTC GTG GAC AAC

7q34: 7q34for : CAC TAT GAC TGT CTC ATG CAG ACC

6q23.2rev: ATA CCA CCA GTT CCG ATG GAA AAC

7q34for_SmaI: TCC CCC GGG CAC TAT GAC TGT CTC ATG CAG ACC

6q23.2rev_SmaI: GTT CCC GGG ATA CCA CCA GTT CCG ATG GAA AAC

7q35: 7q35for : TGT TAC AGT GAG TGA GGG TCT AAG
6q23.2rev: ATA CCA CCA GTT CCG ATG GAA AAC

7q35(2): 7q35(2)for: GCA TCT ACA GTC TCT CTT CCA GCC
6q23.2rev: ATA CCA CCA GTT CCG ATG GAA AAC

13q14.3: 13q14.3for: CAA CTG CAT TCC ACA CGA AGC GTT
13q14.3rev: CTG CCA TCA CCT CAT CTT GTT CAG
13q14.3for_SmaI: TCC CCC GGG CAA CTG CAT TCC ACA CGA AGC GTT
13q14.3rev_SmaI: GTT CCC GGG CTG CCA TCA CCT CAT CTT GTT CAG

18q11.2: 18q11.2for: CTT CAC ACA AGG TGA CCA AGG TTC
18q11.2rev: ATC GGG TCT CAT ACC TTC AGT CAG

**Primer für Klonierung der Promotorregion 3500 bp upstream des MGEA6-14q-Locus
in fünf Teilsequenzen in den pGL3-Vektor:**

14qfor_KpnI (68°C): GGG GTA CCC AAT TGA GGA GCC TCT TTG AGT TC

14qfor3_KpnI (62°C): GGG GTA CCC CTG TAG CAC CCC TTT ACC A

14qfor4_KpnI (66°C): GGG GTA CCC CTC AGG CTG ATG TGG CAA AAG

14qfor5_KpnI (64°C): GGG GTA CCG ACG CCT TCC TGT CTA AAG TC

14qrev_BglIII (66°C): GAA GAT CTC ATC CCG ACC CTC TTG TTA TAC

14qrev3_BglIII (66°C): GAA GAT CTG GCC CAA GTT CAC AGC AAG TG

Sequenzierprimer:

M13 uni: TGT AAA ACG ACG GCC AGT

M13 rev: CAG GAA ACA GCT ATG ACC

pBlueBacHis for: AAA TGA TAA CCA TCT CGC

pBlueBacHis rev: ACT TCA AGG AGA ATT TCC

GL primer 2 : CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC CA

RV primer 3: CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC

N-CMV-30: AAT GTC GTA ATA ACC CCG CCC CGT TGA CGC

C-CMV-24: TAT TAG GAC AAG GCT GGT GGG CAC

T7: TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

Insertscreen_for: CTA TTC GAT GAT GAA GAT ACC CCA AAC CC

Insertscreen_rev: GTG AAC TTG CGG GGT TTT TCA GTA TCT AGG AT

MGEA6_Sequ-for2: GGA AAG AAC AAG TGA GTG

MGEA6_Sequ-for3: GGA GAC CTA TAG AAA GCG AGC

MGEA6_Sequ-for4: GAG AAA TGT CTA TCC ACC GAG

MGEA6_Sequ-rev: CTT AAA CTG AAA ATG AGA TC

MGEA6_Sequ-rev2: CAG AAT TGG ACC TGT TCA GC

BAIAP2_for2: GTG TCC GAC GGC TAC AAG ACC

BAIAP2_rev2: CTA ACT CTA GTC AGG CGG CTC AGA

KIBRA_for2: GCA GTT CAA AGA GCG TGG

KIBRA_for3: GAG ATG CGC TTC ATC AGC CCC

KIBRA_for4: GAT GCC TTC CTC AAC TCC TTG

KIBRA_for5: GAG AGG TCG ACT CGC TGG TAC

KIBRA_rev2: TTA GAC GTC ATC TGC AGA

Spectr_Sequfor: GAG ACC TGG AGG CTA C

2.15.8 Vektoren

- pGEM[®]-T Easy (Promega):

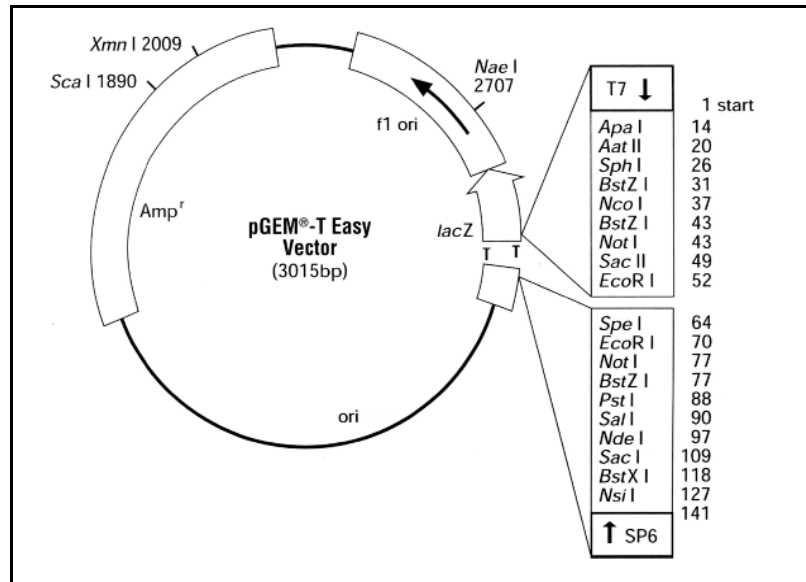


Abb.3: Der Vektor pGEM[®]-T Easy.

Der Vektor pGEM[®]-T Easy enthält das Gen für Ampicillin-Resistenz, eine MCS mit der Schnittstelle *EcoRI*, Bindungsstellen für die Sequenzierprimer M13 forward und reverse und das *lacZ*-Gen für das Blau-Weiß-Screening. Der Vektor wird mit *EcoRV* geschnitten und an die Enden wird jeweils ein Thymidin angehängt. Diese 3'-T-Überhänge an den Insertionsstellen für das Insert erhöhen die Ligationseffizienz für PCR-Produkte, die durch die Polymerase ein einzelnes überhängendes Desoxyadenosin an das 3'-Ende angehängt bekommen und verhindern die Rezirkulation des Vektors.

○ pGL3-Basic (Promega):

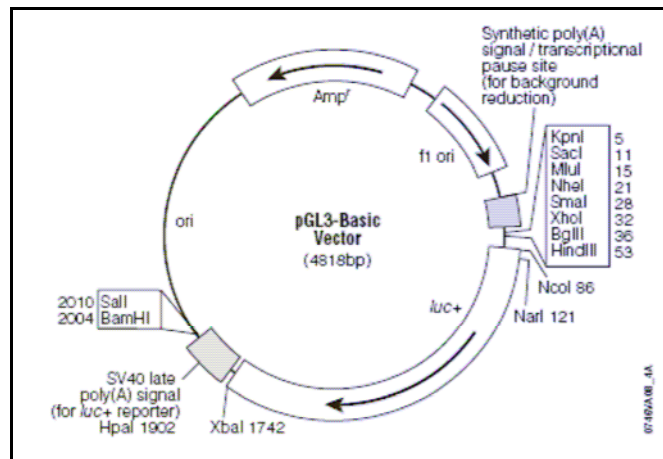


Abb.4: Der Vektor pGL3-Basic.

Der Vektor pGL3-Basic (4818bp) weist eine Multiple Cloning Site auf, ein Ampicillinresistenzgen (Amp^r), einen Filamentous Phage Origin of Replication (f1 ori) und einen Origin of replication in *E. coli* (ori). Er enthält eine für Luziferase codierende Sequenz (luc+) und wird als Luziferase Reporter Vektor bezeichnet. Die Luziferase ist ein Enzym des nordamerikanischen Leuchtkäfers *Photinus pyralis* und katalysiert die Umsetzung von Luziferin zu Oxiluziferin, wobei Magnesium als Cosubstrat dient. Hierbei wird unter Energieverbrauch Licht frei. Dem pGL3-Basic Vektor fehlen eukaryotische Promotor- und Enhancer-Elemente. Die Luziferaseaktivität der pGL3-Basic-transfizierten Zellen hängt von der Insertion eines funktionellen Promotors stromaufwärts der für Luziferase codierenden Sequenz luc+ ab. Auf diese Weise ist es möglich, potentielle Promotoraktivitäten einer inklonierten Sequenz zu überprüfen.

- pGL3 Multiple Cloning site:

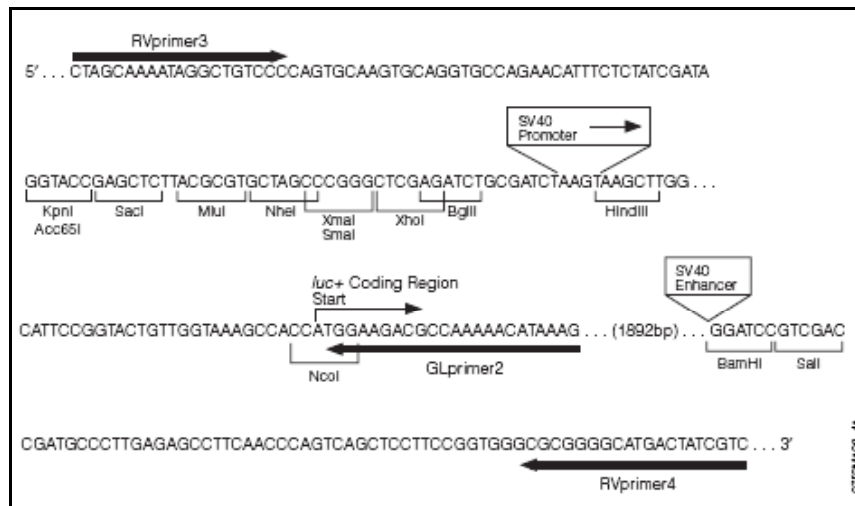


Abb.5: pGL3 Vektor Multiple Cloning Region.

Es werden die upstream- und Downstream Cloning Sites und die Bindungsstellen der Sequenzierprimer GLprimer2, RVprimer3 und RVprimer4 gezeigt. Die großen, schwarzen Pfeile geben die Richtung der Sequenzierung an.

○ pCMV β (Clontech):

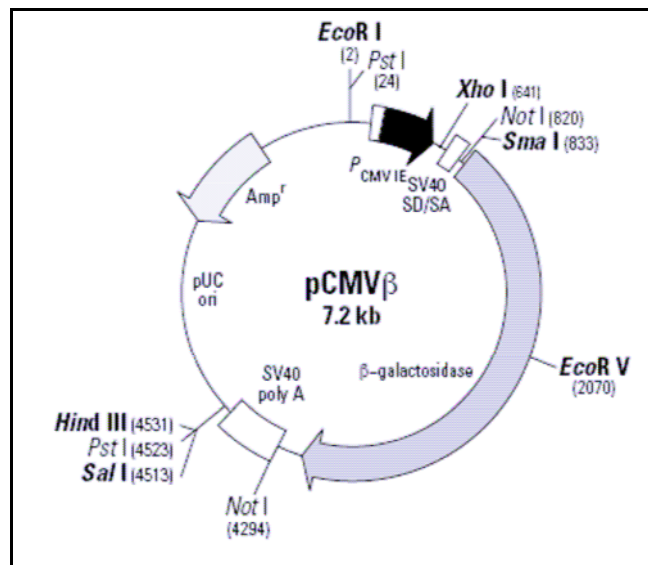


Abb.6: Der Vektor pCMV β .

Der Vektor pCMV β ist ein Mammalian Reporter Vektor, der für die Expression der β -Galaktosidase unter der Kontrolle des CMV-Promotors in Säugerzellen konstruiert wurde. Der Vektor weist ein Intron mit Splice-Donor/Splice-Acceptor-Signalen und Polyadenylierungssignal von SV40 auf, anschließend die Sequenz für die Vollängen-*E.coli*- β -Galaktosidase mit eukaryotischen Translations-Initiations-Signalen. Er ist ausgelegt für eine High-Level Expression von β -Galaktosidase und kann als Referenz- (Kontroll-) Plasmid bei Transfektionen mit anderen Reporter-Gen-Konstrukten eingesetzt werden, um zur Optimierung von Transfektionen als Standard verwendet zu werden.

o pBlueBacHis2A (Invitrogen)

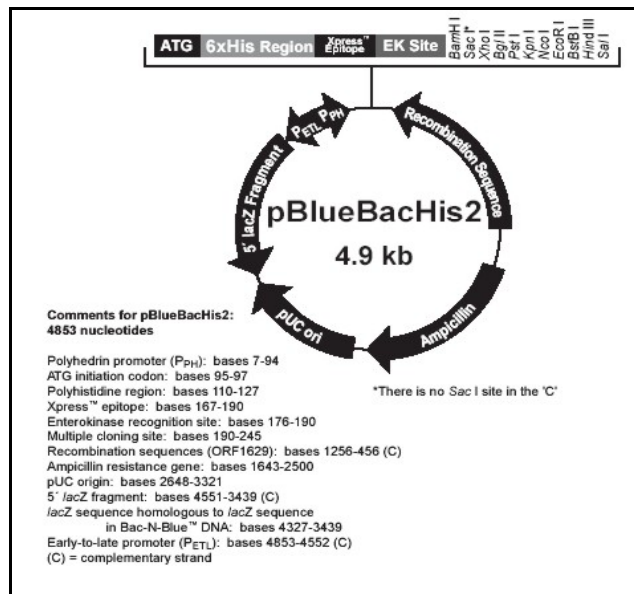


Abb.7: Der Vektor pBlueBacHis2A.

Der Vektor pBlueBacHis2A enthält das Gen für Ampicillin-Resistenz, eine Multiple Cloning Site (MCS, s.u.) und einen Polyhedrin-Promotor. Die Sequenz für den 6x-His-Tag liegt vor der MCS.

- Multiple Cloning Site des des Vektors pBlueBacHis2A:

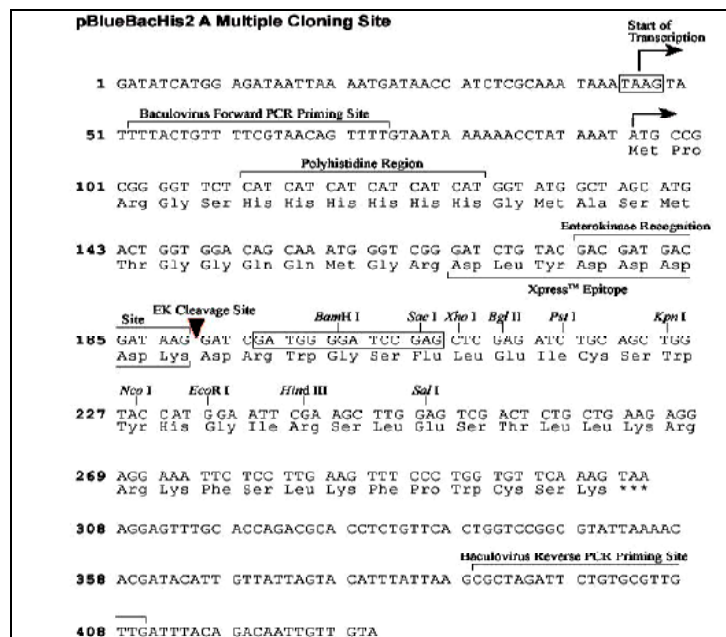


Abb.8: Multiple Cloning Site des des Vektors pBlueBacHis2A.

Mit den Schnittstellen *EcoRI* und *BamHI*, den Primer-Bindungsstellen Bacu PCR forward und reverse und der histidinreichen Region.

○ p3xFLAG-CMV-10 (SIGMA):

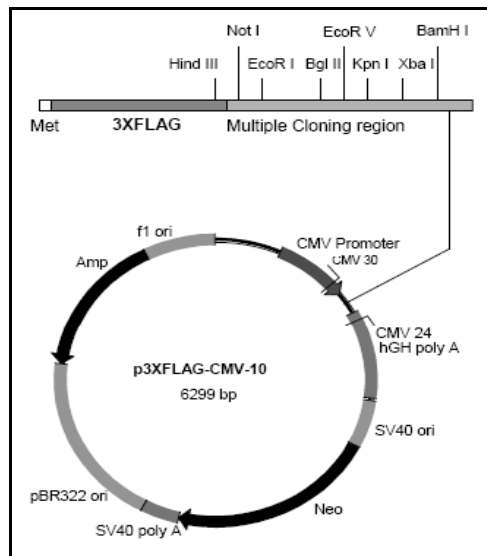


Abb.9: Der p3xFLAG-CMV-10-Vektor.

Der p3xFLAG-CMV-10-Vektor (6.3kb) ist ein Shuttle-Vektor für *E.coli*- und Säugerzellen. Er ist als Expressionsvektor ein Derivat des pCMV5 und wurde konstruiert um transiente oder stabile intrazelluläre Expressionen von Fusionsproteinen, die einen N-terminalen 3x-FLAG-Tag (bestehend aus drei aufeinanderfolgenden Epitopen: Asp-Tyr-Lys-Xaa-Xaa-Asp) aufweisen, in Säugerzellen zu gewährleisten. Die Sequenz für den FLAG-Tag ist upstream der Multiple Cloning Site lokalisiert. Die Detektion des Tags ist optimal mit dem Anti-FLAG M2-Antibody. Das dritte FLAG-Epitop enthält eine Enterokinase-Erkennungssequenz, die ein Abtrennen des 3xFLAG-Peptids vom Protein ermöglicht. Seine Replikationseffizienz ist optimal in Wirtszellen, die SV40 T-Antigen exprimieren, wie COS-Zellen. Die Transkription des FLAG-Fusionskonstrukts wird durch den CMV-Promotor reguliert.

- Multiple Cloning Site des des Vektors p3xFLAG-CMV-10 :

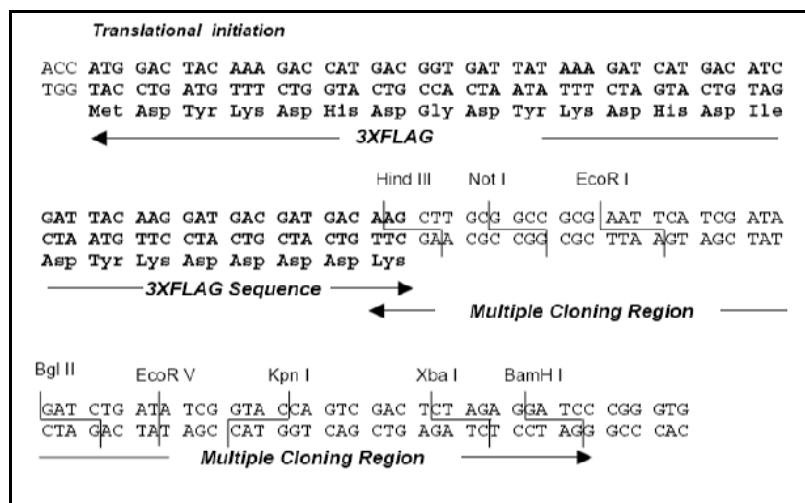


Abb.10: Nukleotidsequenz der Multiple Cloning Site des Vektors p3xFLAG-CMV-10.

Die Sequenz umfasst die Basen 925 bis 1061.

○ p3xFLAG-CMV-14 (SIGMA):

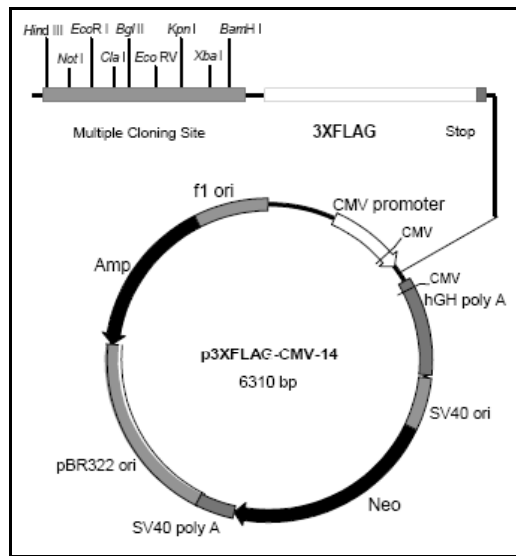


Abb.11: Der p3xFLAG-CMV-14-Vektor.

Der p3xFLAG-CMV-14-Vektor (6.3kb) ist ein Shuttle-Vektor für *E.coli*- und Säugerzellen. Er ist als Expressionsvektor ein Derivat des pCMV5 und wurde konstruiert um transiente oder stabile intrazelluläre Expressionen von Fusionsproteinen, die einen C-terminalen 3x-FLAG-Tag (bestehend aus drei aufeinanderfolgenden Epitopen: Asp-Tyr-Lys-Xaa-Xaa-Asp) aufweisen, in Säugerzellen zu gewährleisten. Die Sequenz für den FLAG-Tag ist downstream der Multiple Cloning Site lokalisiert. Die Detektion des Tags ist optimal mit dem Anti-FLAG M2-Antibody. Das dritte FLAG-Epitop enthält eine Enterokinase-Erkennungssequenz, die ein Abtrennen des 3xFLAG-Peptids vom Protein ermöglicht. Seine Replikationseffizienz ist optimal in Wirtszellen, die SV40 T-Antigen exprimieren, wie COS-Zellen. Die Transkription des FLAG-Fusionskonstrukts wird durch den CMV-Promotor reguliert.

- Multiple Cloning Site des des Vektors p3xFLAG-CMV-14 :

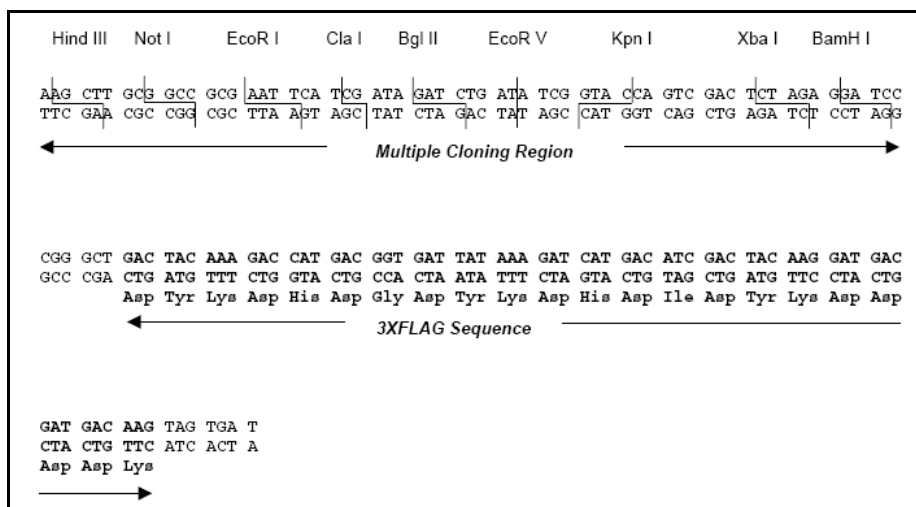


Abb.12: Nukleotidsequenz der Multiple Cloning Site des Vektors p3xFLAG-CMV-14.

Die Sequenz umfasst die Basen 924 bis 1065.

- pSG5 (Stratagene)

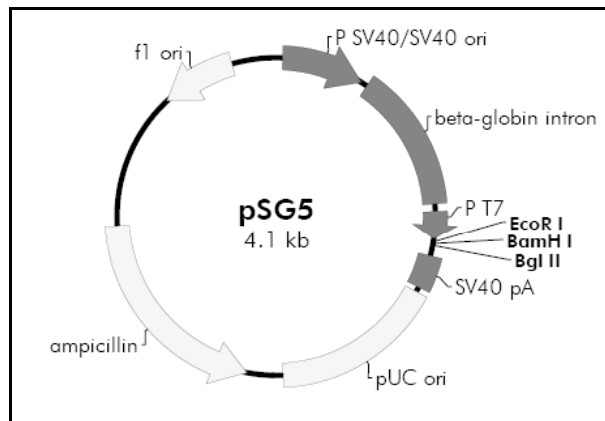


Abb.13: Der Vektor pSG5.

Der Vektor pSG5 ist ein eukaryotischer Expressionsvektor und wurde aus den Vektoren pKCR2 und pBS (Stratagene) konstruiert. Als High-copy-Plasmid kann eine hohe Anzahl dsDNA erhalten werden. Der Vektor eignet sich für *in vitro*- und *in vivo*-Expressionen. Die höchste Expressionsrate wird in Zelllinien erreicht, die das T-Antigen exprimieren. Der SV40 Early Promoter, Polyadenylierungssignale und der T7-Bakteriophagen-Promotor erleichtern die *in vitro*-Transkription inklonierter Inserts. Das β -Globin Intron II ermöglicht das Splicen exprimierter Transkripte. Des Weiteren weist der Vektor einen f1-origen auf. Die Ligation von Introns erfolgt über die Restriktionsstellen *EcoR* I, *BamH* I, and *Bgl* II downstream vom Promotor.

- pGBKT7 (Clontech)

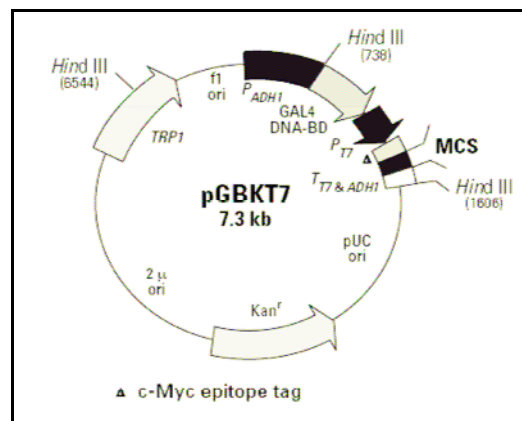


Abb.14: Der Vektor pGBKT7.

Der pGBKT7 Vektor wird eingesetzt um Proteine zu exprimieren, die an die Aminosäuren 1–147 der GAL4 DNA Binding Domain (DNA-BD) fusioniert wurden. In Hefen werden die Fusionsproteine in großer Menge über den *ADH1* promoter (*PADH1*) exprimiert. Die Transkription wird durch die T7 und *ADH1* Transcriptions Terminations Signale (*TT7 & ADH1*) beendet. Der Vektor enthält außerdem einen T7 Promotor, einen c-Myc Epitop-Tag und eine MCS. pGBKT7 repliziert sich autonom in sowohl *E. coli* als auch *S. cerevisiae* ausgehend vom pUC und 2 μ ori. Er weist ein Kanamycin-Resistenzgen zur Selektion in *E. coli* und den *TRP1* Nutritional Marker für die Selektion in Hefen auf.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Antikörperbindung gegen MGEA6 zur Eingrenzung der immunogenen Proteinregion

Die Antikörperreaktion gegen rekombinant exprimiertes MGEA6 wurde mit Seren von Meningeompatienten bereits nachgewiesen. Um eine Eingrenzung der Reaktivität auf ein bestimmtes Epitop des MGEA6-Proteins vorzunehmen, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Antikörper bevorzugt eine bestimmte Region des MGEA6-Proteins binden. Hierzu wurde der ORF der *MGEA6*-cDNA-Sequenz (Referenzsequenz: NM_005930) in drei Sequenzbereiche unterteilt und diese exprimiert. Vorarbeiten zu dieser Analyse betreffend die aminoternale und carboxyterminale Proteinregion wurden bereits während meiner Diplomarbeit von mir erbracht. Die Expression der Proteine erfolgte mittels der hergestellten rekombinanten Baculoviren in Insektenzellen *Spodoptera frugiperda* der Linie SF158. Das Baculovirus-Expressionssystem ist unter 2.11 beschrieben.

Die Sequenzen der drei Bereiche wurden mittels PCR unter Verwendung der Primerpaare Bacu-6 for/rev 1, 2 und 3 amplifiziert und in den Transfervektor pBlueBacHis2A (2.15.7, 2.15.8) inkloniert. Die Sequenz der *MGEA6*-cDNA (Referenzsequenz NM_005930) ist mit den eingezeichneten Primern für die Amplifizierung im Anhang aufgeführt (Abb.43).

Die folgende Abbildung (Abb.15) zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der drei Fragmente der *MGEA6*-Sequenz aus der PCR-Amplifizierung und den Verdau des Transfervektors pBlueBacHis2A.

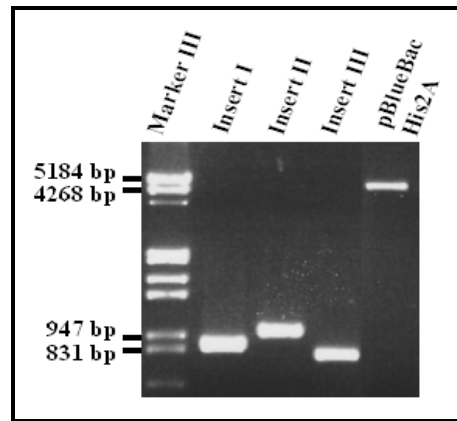


Abb.15: Gelelektrophoretische Darstellung des Vektors pBlueBacHis2A und der Fragmente für die Sequenzregionen Aminoterminus (**I**), interne Proteinregion (**II**) und Carboxyterminus (**III**). Größen der Fragmente für die Klonierung: Insert **I**: 846 bp (Basen 340-1185), Insert **II**: 969 bp (Basen 1123-2091) und Insert **III**: 766 bp (Basen 2038-2804). Der Vektor hat eine Größe von 4,9 kb.

Anhand der Aminosäuresequenz wurden die Domänen des MGEA6-Proteins vorhergesagt. Diese Strukturvorhersage wurde von Frau Dr. Nicole Comtesse als Teil ihrer Doktorarbeit erstellt [Comtesse et al., 2002]. Die Proteinstruktur weist verschiedene Domänen auf. Es handelt sich um eine Transmembran-Domäne (TM) am Aminoterminus (As 41-61), zwei Coiled-Coil-Domänen (CC) in der internen Proteinregion (As 115-261 bzw. 322-496), wovon die erste zusätzlich ein Leucin-Zipper-Motiv (L) beinhaltet, sowie die prolinreiche carboxyterminale Proteinregion. Die folgende Abbildung 16 zeigt eine schematische Darstellung der Proteindomänen von MGEA6.

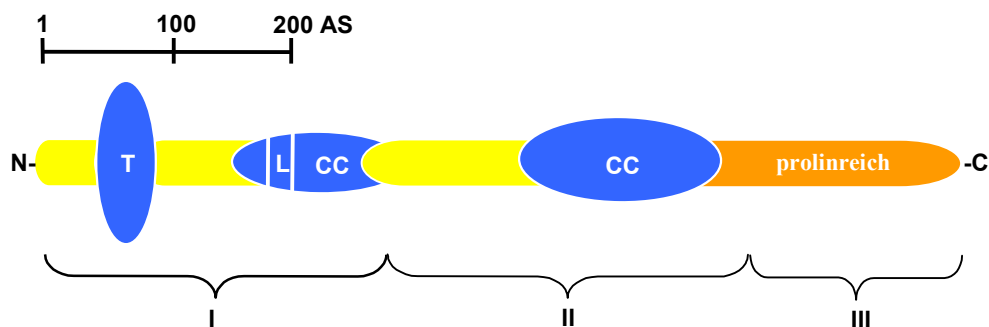


Abb.16: Schematische Darstellung der anhand der Aminosäuresequenz vorhergesagten Domänen des MGEA6-Proteins.

Die MGEA6-Proteinsequenz umfasst 866As und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 100kDa. Die Sequenzbereiche für die Klonierung besitzen die Größen: **I**: Basen 340-1185; 283As \Rightarrow 35,09kDa, **II**: Basen 1123-2091; 343As \Rightarrow 39,06kDa und **III**: Basen 2038-2804; 237As \Rightarrow 30,14kDa. Die mit den Klammern markierten Abschnitte geben in etwa die von den Sequenzen umfassten Bereiche des Proteins an. T: Transmembran-Domäne (As 41-61); L: Leucin-Zipper-Motiv; CC: Coiled-Coil-Domäne (As 115-261; As 322-496); (Comtesse et al., 2002)

Zur Expression wurden die Plasmide zusammen mit der Baculovirus-DNA *AcMNPV* in Insektenzellen transfiziert (2.11.2). Rekombinantes Virus wurde mittels Plaque-Assay identifiziert (2.11.3, Abb.2) und durch PCR-Analyse bestätigt (2.11.4 und 2.11.5). Ein hochtitriger Virus-Stocks wurde für die Proteinexpression in den Insektenzellen eingesetzt. Die Überprüfung der Proteinexpression ergab die höchste Expression in den Zellen nach 48h (2.11.7 und 2.11.8).

Als Kontrolle für eine erfolgreiche Proteinexpression diente ein Virusstock, der das ursprüngliche Wildtyp-Virus enthielt. Wildtyp-Viren exprimieren sogenannte Polyhedra, die als Einschlusspartikel in den Zellen sichtbar werden (occlusion positive: occ⁺-Zellen). Rekombinante Viren bilden keine Polyhedra mehr (occlusion negative: occ⁻-Zellen). Der starke Promotor des Polyhedrin-Locus wird nun zur Expression des Fremdgens genutzt.

Bei der Expression der Proteine mit dem Vektor pBlueBacHis2A entstehen Fusionsproteine, die einen aminoterminalen His-Tag (Polyhistidin-Anhang) enthalten. Der Nachweis der Proteine erfolgte im Western-Blot mittels Anti-His-Antikörper, der an die histidinreiche Region der Fusionsproteine bindet (2.8 und 2.15.4). Zusätzlich zum Nachweis mit dem Anti-His-Antikörper wurde die Expression des carboxyterminalen Proteins mit einem Antiserum (Anti-MGEA6/11-Antiserum; Comtesse et al., 2002) überprüft (o.Abb.). Es handelt sich um einen polyklonalen Antikörper, welcher das MGEA6-Protein am Carboxyterminus (As 776-795) bindet. Abbildung 17 zeigt den Western-Blot-Nachweis der Expressionen des MGEA6-Proteins (100kDa) und der aminoterminalen (35kDa), internen (39kDa) und carboxyterminalen MGEA6-Proteinregionen (30kDa) mittels Anti-His-Antikörper.

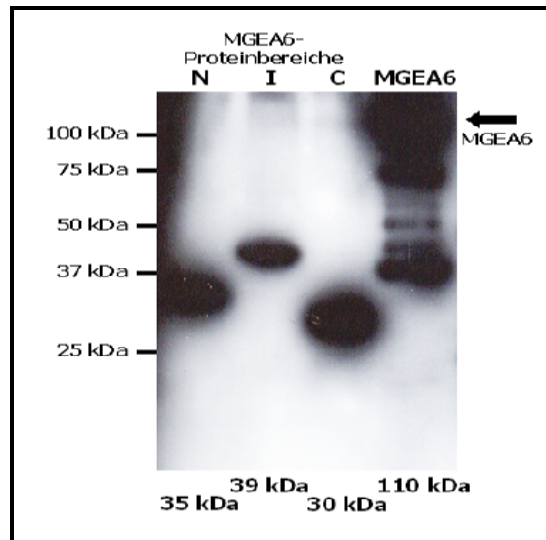


Abb.17: Western-Blot-Nachweis der mittels Baculovirus-System exprimierten Proteine MGEA6 (100kDa) sowie der aminoterminalen (N: 35kDa), internen (I: 39kDa) und carboxyterminalen (C: 30kDa) MGEA6-Proteinbereiche mittels Anti-His-Antikörper. Die Expression erfolgte für 48h.

Vor der Analyse der Antikörperbindung im Western-Blot wurden die Proteine mittels Ni-NTA-Agarose aufgereinigt (2.11.9). Um gleiche Proteinmengen zu analysieren, wurden die aufgereinigten Proteine im SDS-Gel mit Coomassie-Blau gefärbt (2.7.2) und die Mengen abgeglichen. Parallel hierzu wurden die aufgereinigten Proteine im Blot mit dem Anti-His-Antikörper detektiert und die Proteinmengen angeglichen. Als Positivkontrolle für die Antikörperbindung und für den Western-Blot diente die Reaktivität von MGEA6-Volllängenprotein. Als Negativkontrolle wurde Zelllysate aus mit Wildtyp-Virus infizierten Zellen verwendet.

Es wurden 17 Seren von Meningeompatienten auf ihre Antikörperreaktivität gegen die Proteine untersucht, die zuvor in einer ELISA-Analyse auf Immunreaktivität gegen MGEA6-Volllängenprotein getestet wurden (Dr. N. Comtesse). Die verwendeten Seren stammten von Patienten mit Meningeomen der Tumorgade MI (WHO-I) und MII (WHO-II). Die MI-Meningeome gehörten histomorphologisch überwiegend dem arachnothelialen und, in je einem Fall, dem transitionalen bzw. sekretorischen Subtyp an. Ein Patient wies ein Rezidiv eines MI-Meningeoms vom arachnothelialen Subtyp auf. Neben den Meningeompatientenseren wurden drei Seren von Patienten mit *Zerebralem Insult* (ZI; Schlaganfall) getestet, die in der ELISA-Analyse eine Antikörperreaktivität gegen das MGEA6-Volllängenprotein zeigten. Als Positivkontrolle diente neben dem stark reaktiven

Meningeompatientenserum H4 das ebenfalls gegen MGEA6 stark reaktive Serum G57 eines Glioblastompatienten. Die folgende Tabelle 6 gibt einen Überblick über die analysierten Seren.

Tab.6: Analyierte Seren mit Tumorgrad und histomorphologischer Einordnung.

MI: Grad I-Meningeom; MII: Grad II-Meningeom; WHO: Grading nach World Health Organization; GBM: Glioblastom; ZI: Zerebraler Insult; ara.: arachnoidal; trans.: transitional; sekr.: sekretorisch; atyp.: atypisch; R.: Rezidiv;

Serum-Nummer	Tumorgrad	histologische Einordnung
H4	MI/WHO I	ara.
H362	MI/WHO I	ara.
H368	MI/WHO I	ara.
H370	MI/WHO I	ara.
H372	MI/WHO I	ara.
H374	MI/WHO I	ara.
H375	MI/WHO I	ara.
H376	MI/WHO I	trans.
H387	MI/WHO I	ara.
H395	MI/WHO I	ara.
H413	MI/WHO I	ara. R.
H445	MI/WHO I	sekr.
H448	MI/WHO I	ara.
H416	MII/WHO II	atyp.
H421	MII/WHO II	atyp.
H449	MII/WHO II	atyp.
H500	MII/WHO II	atyp.
G57	WHO IV	GBM
ZI29		ZI
ZI39		ZI
ZI62		ZI

Abbildung 18 zeigt beispielhaft die Reaktivität der internen Proteinregion (I) mit dem Meningeompatientenserum H372 und der aminoterminalen Proteinregion (N) mit dem Meningeompatientenserum H449. Beide Seren zeigten Antikörperreaktivitäten gegen das MGEA6-Vollängenprotein.

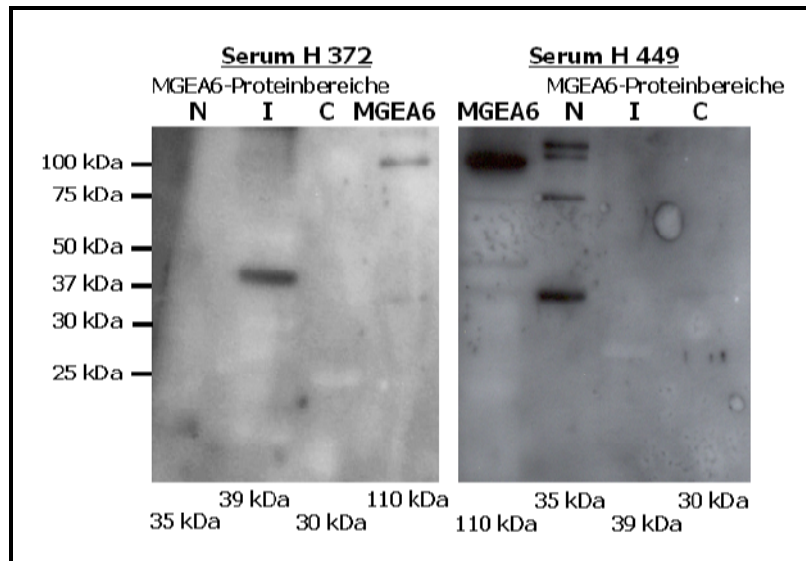


Abb.18: Western-Blot-Analyse der Antikörperreaktivitäten des MGEA6-Proteins und des aminoterminalen (N: 35kDa), internen (I: 39kDa) und carboxyterminalen (C: 30kDa) MGEA6-Proteinbereiches (C: 30kDa) mittels Seren von Meningeompatienten.

Nachweis des internen Proteinbereiches (I) mit Serum H372 und des aminoterminalen Proteinbereiches (N) mit Serum H449, sowie des MGEA6-Proteins mit beiden Seren.

Die Ergebnisse der Immunreaktivitätsanalyse der Proteine aus Western-Blot und ELISA sind in Tab.7 zusammengefasst.

Tab.7: Immunreaktivität der Seren gegen die aufgereinigten Proteine aminoterminaler Proteinbereich (N), interner Proteinbereich (I) und carboxyterminaler Proteinbereich (C) im Western-Blot, sowie gegen das MGEA6-Volllängenprotein in Western-Blot und ELISA.

+: stark; ++: sehr stark; (+): sehr schwach; -: negativ; n.a.: nicht analysiert; ZI: Serum-Nummer Zerebraler Insult; H: Serum-Nummer der Meningeomseren; G: Serum-Nummer Glioblastomserum

Serum-Nr.	Immunreaktivität im Western-Blot gegen Proteinbereiche			Immunreaktivität im Western-Blot gegen MGEA6-Volllängenprotein	Immunreaktivität im ELISA mit MGEA6-Volllängenprotein
	N	I	C		
H4	+	+	-	+	++
H362	-	(+)	-	+	++
H368	-	(+)	-	(+)	-
H370	-	-	-	-	-
H372	-	(+)	-	(+)	-
H374	(+)	-	-	+	+
H375	-	-	-	+	+
H376	-	-	-	-	-
H387	-	(+)	-	+	+
H395	-	-	-	(+)	+
H413	-	-	-	-	-
H416	+	+	-	+	+
H421	(+)	-	-	(+)	-
H445	-	-	-	(+)	n
H448	-	+	-	+	n
H449	+	-	-	+	(-)
H500	-	-	-	(+)	-
ZI29	-	-	-	+	+
ZI39	-	-	-	+	+
ZI62	(+)	-	-	+	+
G57	+	+	-	+	n.a.

Alle Seren, die im ELISA eine Antikörperreaktivität gegen MGEA6 zeigten, waren auch im Western-Blot positiv. Die Immunreaktivitäten der Seren gegen das MGEA6-Volllängenprotein wurde somit in zwei verschiedenen Immunassays nachgewiesen. Fünf Seren zeigten eine schwache Reaktivität im Immunoblot bei negativer Reaktivität im ELISA. Für zwei Meningeompatientenseren, die positive Reaktivitäten im Immunoblot zeigten, und für das Glioblastompatientenserum lagen keine ELISA-Ergebnisse vor. Die drei Seren von Patienten mit Zerebralem Insult (ZI) zeigten starke Antikörperreaktivitäten gegen MGEA6 sowohl im Blot als auch im ELISA.

Betrachtet man die Serumreaktivität gegen die MGEA6-Teilproteine, so fällt auf, dass keines der untersuchten Seren eine Antikörperreaktivität gegen den carboxyterminalen Proteinbereich zeigte. Dieser Proteinbereich umfasst den prolinreichen Carboxyterminus des MGEA6-Proteins und endet noch vor der zweiten Coiled-Coil-Domäne (Abb.16). Die Immunreaktivitäten der 10 positiven Meningeomseren richteten sich gleichermaßen gegen den aminoterminalen Proteinbereich, welcher die Transmembrandomäne und die Coiled-Coil-Domäne1 umfasst, und den internen Proteinbereich, welcher die Coiled-Coil-Domäne2 beinhaltet. Die gegen das MGEA6-Volllängenprotein stark reaktiven Seren H4 und H416 (Meningeomseren) und das Serum G57 (Glioblastomserum) waren gleichermaßen gegen den aminoterminalen und internen Proteinbereich reaktiv. Bei den Meningeomseren wurde für fünf Seren Reaktivitäten gegen die aminoterminalen Proteinregion und für sieben Seren gegen die interne Proteinregion nachgewiesen. Die Seren zeigten jedoch unterschiedlich starke Reaktivitäten. Während die Meningeomseren H449 und H448 gegen den aminoterminalen bzw. gegen den internen Proteinbereich starke Immunreaktivitäten zeigten, waren die Reaktivitäten der weiteren positiven Seren nur schwach. Alle Seren, die Antikörperreaktivitäten gegen die Teilproteine zeigten, waren auch gegen das Volllängenprotein reaktiv. Umgekehrt wiesen die vier Seren H375, H395, H445 und H500 sowie zwei der drei ZI-Seren trotz Reaktivität gegen das Volllängenprotein keine Reaktivität gegen die Teilproteine auf. Das Serum ZI62 zeigte eine schwache Antikörperreaktivität gegen die aminoterminalen Proteinregion. Auffallend war, dass die Antikörperreaktivitäten der analysierten Seren im Allgemeinen gegen die MGEA6-Teilproteine schwächer waren, als die Reaktivitäten gegen das Volllängenprotein.

Zusammenfassend lässt sich aus der vorliegenden Analyse zur Eingrenzung der immunogenen Region des MGEA6-Proteins schließen, dass die Bindung der Antikörper nicht nur gegen ein bestimmtes lineares Epitop, sondern gleichermaßen gegen Epitope des aminoterminalen und des internen Proteinbereichs gerichtet ist. Eine Rolle linearer Epitope des Carboxyterminus für die Antigenität kann ausgeschlossen werden, da keines der analysierten Seren, weder der Meningeompatienten, noch des Glioblastompatienten oder der Patienten mit Zerebralem Insult, eine Immunreaktivität gegen diesen Proteinbereich zeigten.

Es kann angenommen werden, dass die Antikörperantwort gegen mehrere Epitope oder ein Konformationsepitop des MGEA6-Proteins gerichtet ist.

3.2 Nachweis von MGEA6-Proteininteraktionen in vitro

Die vorliegende Analyse beschäftigte sich mit der Identifizierung von Bindungspartnern des MGEA6-Proteins. In einem Yeast-Two-Hybrid-Screening wurden verschiedene Proteine als putative Interaktionspartner des MGEA6-Proteins nachgewiesen (N. Comtesse, 2005). Die Proteininteraktionen von MGEA6 mit drei Kandidatenproteinen wurden im Folgenden mittels Co-Immunpräzipitation überprüft. Bei den Bindungspartnern handelte es sich um die Proteine BAIAP2 (Brain Angiogenesis Inhibitor 1-Associated Binding Protein 2, Transcript Variant 1, IRSp53), KIBRA (WW and C2 Domain Containing 1, WWC1) und SPTAN1 (Spectrin alpha, Alpha-Fodrin, non-erythrocytic 1).

3.2.1 Konstruktion und Expression der HA- bzw. FLAG-Tag-Fusionsproteine

Die *MGEA6*-cDNA-Sequenz (*cTAGE-5C*; Referenzsequenz: NM_005930, NP_005921) wurde ohne die Sequenz für die Transmembrandomäne, so wie sie auch im Yeast-Two-Hybrid-Screening verwendet wurde, mit einer angehängten HA-Tag-Sequenz in den Expressionsvektor pSG5 einkloniert und als HA-Fusionsprotein exprimiert. Amplifiziert wurde die Sequenz unter Verwendung des Plasmids pGBKT7-MGEA6-Klon3 als Template, welches auch im Screening eingesetzt wurde (2.14.2). Der Sequenzbereich umfasst die Basen 504-2784 der Referenzsequenz und ist im Anhang in Abb.43 markiert (grüne Pfeilen). Die Domänen des MGEA6-Proteins sind in Abb.16 im vorherigen Abschnitt 3.1 schematisch dargestellt.

Es wurden Plasmide für zwei verschiedene MGEA6-HA-Tag-Fusionsproteine erzeugt, die zum einen einen aminoterminalen, zum anderen einen carboxyterminalen HA-Tag exprimieren.

Die folgende Abbildung 19 zeigt den Agarosegelnachweis der amplifizierten MGEA6-HA-Tag-Sequenzen. HA-MGEA6 entspricht der Sequenz mit aminoterminalen HA-Tag, MGEA6-HA der Sequenz mit carboxyterminalen HA-Tag. Diese Bezeichnung wird im folgenden Kapitel verwendet.

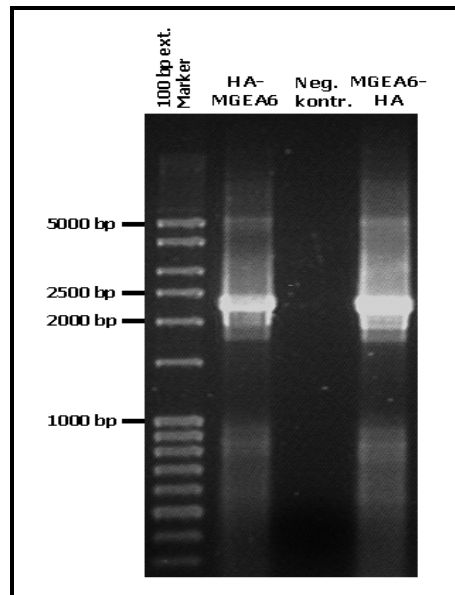


Abb.19: Charakterisierung der MGEA6-HA-Tag-Fragmente.

Charakterisierung der MGEA6-HA-Tag-Fragmente im Agarosegel nach PCR-Amplifizierung der Sequenzen HA-MGEA6 (aminoterminaler HA-Tag) bzw. MGEA6-HA (carboxyterminaler HA-Tag). Fragmentgröße jeweils 2307bp.

Die Charakterisierung rekombinanter Plasmide erfolgte mittels Restriktionsverdau. Die folgende Abbildung 20 zeigt den Restriktionsverdau von jeweils acht Klonen beider Konstrukte.

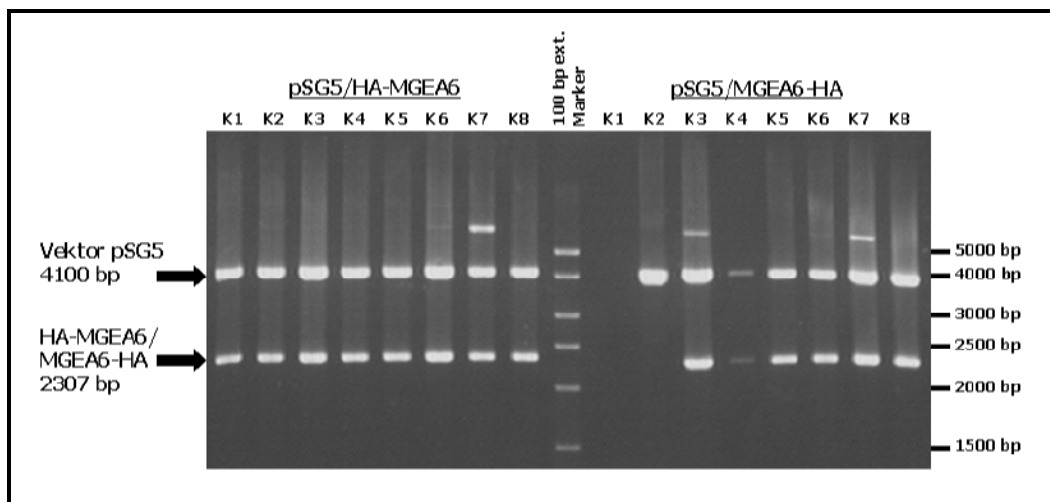


Abb.20: Restriktionsverdau der rekombinanten Klone pSG5/MGEA6-HA-Tag mit den Enzymen EcoRI und BamHI.

Zur Expression verwendete Plasmide: pSG5/HA-MGEA6-Klon 2; pSG5/MGEA6-HA-Klon 6. Fragmentgrößen: Vektor pSG5: 4100bp; HA-MGEA6 bzw. MGEA6-HA: 2307bp.

Für die Expression wurden die Plasmide pSG5/HA-MGEA6-Klon 2 und pSG5/MGEA6-HA-Klon 6 verwendet.

Bei den als Bindungspartner untersuchten Proteinen handelte es sich um drei im Yeast-Two-Hybrid-Screening mehrmals positiv für eine Interaktion mit MGEA6 gefundene Proteine.

Im Einzelnen wurden die Proteine der folgenden Gensequenzen untersucht:

- BAIAP2 (Homo Sapiens BAI1 (Brain Angiogenesis Inhibitor 1-Associated Binding Protein 2, Transcript Variant 1; NM_017450; NP_059344)
- KIBRA (Homo Sapiens WW and C2 Domain Containing 1 (WWC1); NM_015238; NP_056053)
- SPTAN1 (Homo Sapiens Spectrin alpha, Alpha-Fodrin, non-erythrocytic 1; NM_003127; NP_003118)

Die Sequenzen wurden in einen Expressionsvektor einkloniert, der FLAG-Tag-Fusionsproteine erzeugt. Für die Amplifizierung der Sequenzen BAIAP2, KIBRA und SPTAN1 wurden die entsprechenden Plasmide aus dem Yeast-Two-Hybrid-Screening als Template verwendet. Die entstehenden Fragmente und Fragmentgrößen sind der Tabelle 4 zu entnehmen, die Primersequenzen für die PCR-Amplifizierung sind unter 2.15.7 aufgeführt.

Die folgenden Abbildung 21 zeigt den Agarosegelnachweis der Fragmente aus der PCR-Amplifizierung.

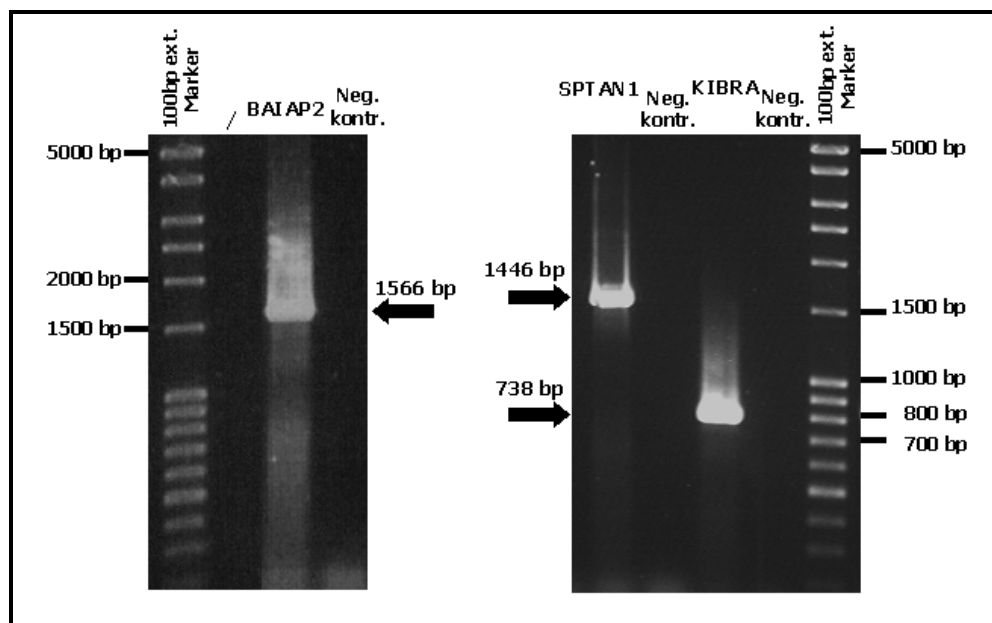


Abb.21: Agarosegelnachweis der Fragmente BAIAP2, SPTAN1 und KIBRA aus der PCR-Amplifizierung. links: BAIAP2: 1566bp; rechts: SPTAN1: 1446bp und KIBRA: 738bp.

Als Expressionsvektoren wurden die FLAG-Vektoren p3x-FLAG-CMV-10 und p3x-FLAG-CMV-14 verwendet (2.14.1). Mittels des Vektors p3x-FLAG-CMV-10 werden Fusionsproteine exprimiert, die einen aminoterminalen FLAG-Tag aufweisen, die Expression des Vektors p3x-FLAG-CMV-14 erzeugt Proteine mit carboxyterminalem Tag. Die Sequenz KIBRA wurden in beide Vektoren kloniert. Die Klonierung von BAIAP2 erfolgte nur in den Vektor p3x-FLAG-CMV-10, die Klonierung von SPTAN1 erfolgte nur in den Vektor p3x-FLAG-CMV-14.

Tabelle 8 gibt einen Überblick über die verschiedenen konstruierten Plasmide.

Tab.8: Überblick über die konstruierten Plasmide für die Expression der Fusionsproteine.

Die Bezeichnung richtet sich nach der Position des FLAG-Tags im Fusionsprotein: FLAG vor dem Proteinnamen (FLAG-): aminoterminaler Tag, FLAG nach dem Proteinnamen (-FLAG): carboxyterminaler Tag.

Sequenz	konstruierte Plasmide	Bezeichnung
BAIAP2	BAIAP2/p3x-FLAG-CMV-10	FLAG-BAIAP2
KIBRA	KIBRA/p3x-FLAG-CMV-10	FLAG-KIBRA
	KIBRA/p3x-FLAG-CMV-14.	KIBRA-FLAG
SPTAN1	SPTAN1/p3x-FLAG-CMV-14.	SPTAN1-FLAG

Die folgende Abbildung 22 zeigt den Restriktionsverdau zur Charakterisierung rekombinanter Plasmide von jeweils mehreren Klonen der Konstrukte.

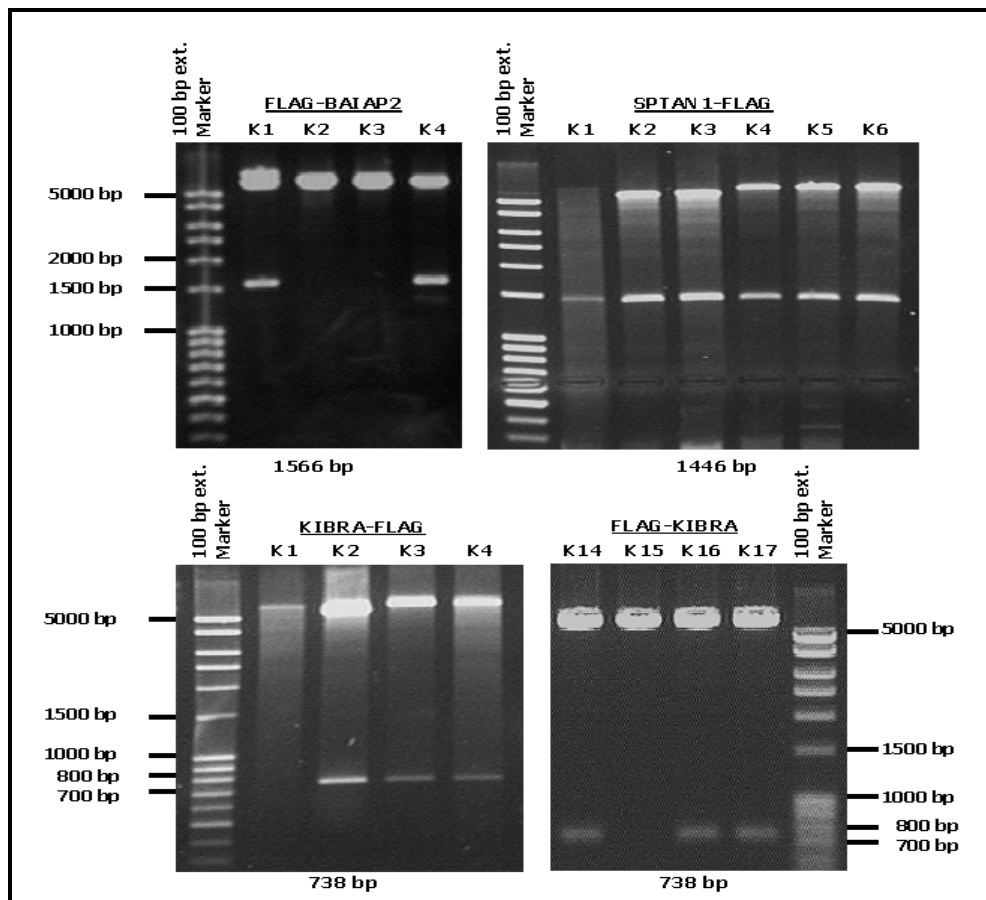


Abb.22: Restriktionsverdau der Plasmide p3x-FLAG-CMV-10 bzw. -14 zur Charakterisierung rekombinanter Klone.

Zur Expression verwendete Klone: FLAG-BAIAP2 Klon 1; SPTAN1-FLAG Klon 6, KIBRA-FLAG Klon2
FLAG-KIBRA Klon 14. Fragmentgröße Vektor p3x-FLAG-CMV-10 bzw. -14: 6.3kb. Verwendete
Restriktionsenzyme und Fragmentgrößen:

oben: links: FLAG-BAIAP2: EcoRI/BamHI; Größe 1566bp; rechts: SPTAN1-FLAG: NotI/XbaI; Größe
1446bp

unten: links KIBRA-FLAG: NotI/XbaI; Größe 738bp; rechts: FLAG-KIBRA: NotI/XbaI; Größe 738bp.

Die zur Expression verwendeten Plasmide sind: FLAG-BAIAP2 Klon 1; SPTAN1-FLAG
Klon 6, KIBRA-FLAG Klon2 und FLAG-KIBRA Klon 14.

3.2.2 Co-Expression und Co-Immunpräzipitation der Fusionsproteine zur Analyse der Proteinbindung mittels Western-Blot

Die Expression der Proteine erfolgte in COS-Zellen. Die Transfektionseffizienz wurde mittels EGFP-Expression unter Verwendung des Plasmids pEGFP-C1 bestimmt und lag bei ~70%. Zur Bestätigung der Proteinexpression wurden zuerst Einzeltransformationen und Einzelexpressionen aller Proteine durchgeführt. Nach einer Expressionszeit von 48h wurden die Fusionsproteine im Western-Blot mittels Anti-FLAG- bzw. Anti-HA-Antikörper überprüft (2.14.3).

Abbildung 23 zeigt den Nachweis der Expression der Fusionsproteine im Western-Blot mittels der Antikörper Anti-FLAG und Anti-HA. Die Molekulargewichte der Proteine werden in der Abbildung aufgeführt.

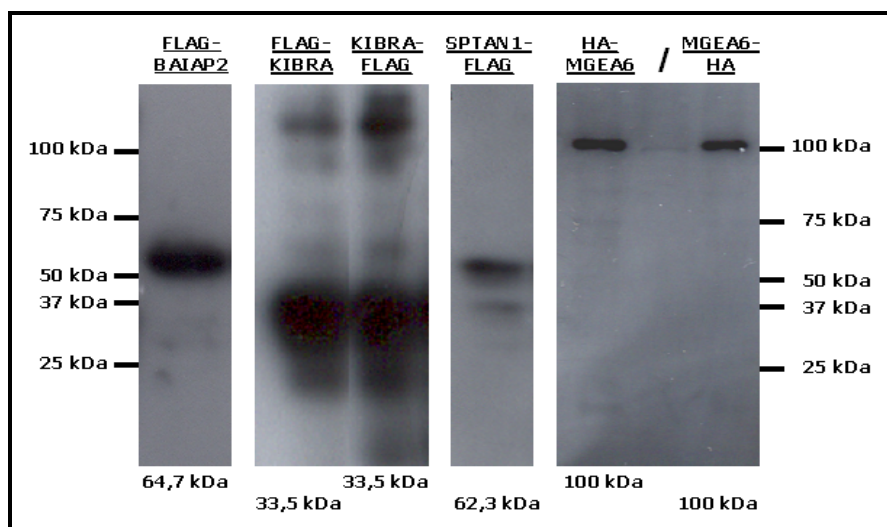


Abb.23: Nachweis der Expression der Fusionsproteine im Western-Blot mittels Anti-FLAG bzw. Anti-HA-Antikörper.

Fusionsproteine von links nach rechts: FLAG-BAIAP2 (64,7 kDa), FLAG-KIBRA, KIBRA-FLAG (33,5kDa), SPTAN1-FLAG (62,3kDa), HA-MGEA6, MGEA6-HA (100kDa).

Die Expressionen aller analysierten Fusionsproteine wurden im Western-Blot bestätigt.

Da die Proteine mit aminoterminalen bzw. carboxyterminalen Tag konstruiert wurden, wurden verschiedenen Kombinationen der Plasmide co-transfiziert und exprimiert.

Einen Überblick über die Plasmidkombinationen gibt die folgende Tabelle 9.

Tab.9: Übersicht über die Kombinationen der Plasmide zur Co-Transfektion und Co-Expression der Fusionskonstrukte.

	KIBRA		BAIAP2	SPTAN1
	FLAG-KIBRA	KIBRA-FLAG	FLAG-BAIAP2	SPTAN1-FLAG
HA-MGEA6	HA-MGEA6/ FLAG-KIBRA	HA-MGEA6/ KIBRA-FLAG	HA-MGEA6/ FLAG-BAIAP2	HA-MGEA6/ SPTAN1-FLAG
MGEA6-HA	MGEA6-HA/ FLAG-KIBRA	MGEA6-HA/ KIBRA-FLAG	MGEA6-HA/ FLAG-BAIAP2	MGEA6-HA/ SPTAN1-FLAG

Nach 48-stündiger Co-Expression der Proteine wurden die Proteinlysate mittels Immunpräzipitation analysiert (2.14.4). Der Nachweis der Proteine erfolgte mit den Antikörpern Anti-HA und Anti-FLAG im Western-Blot. Als Positivkontrollen für den Anti-HA-Ak diente das Plasmid p73,3-HA-Tag, für den Anti-FLAG-Ak das FLAG-BAP-Fusionsprotein (49,3kDa; 150ng) aus dem Kit. Als Negativkontrollen wurden Lysate aus Zellen verwendet, die jeweils mit leeren FLAG- bzw. pSG5-Vektoren transfiziert wurden.

3.2.3 Analyse der Proteininteraktion zwischen den Proteinen BAIAP2 und MGEA6

Die Ergebnisse der Proteininteraktionsstudie für BAIAP2 und MGEA6 nach Co-Immunpräzipitation (IP) werden in Abb.24 veranschaulicht. Die Negativkontrollen sind in Abb.27 unter 3.2.6 dargestellt.

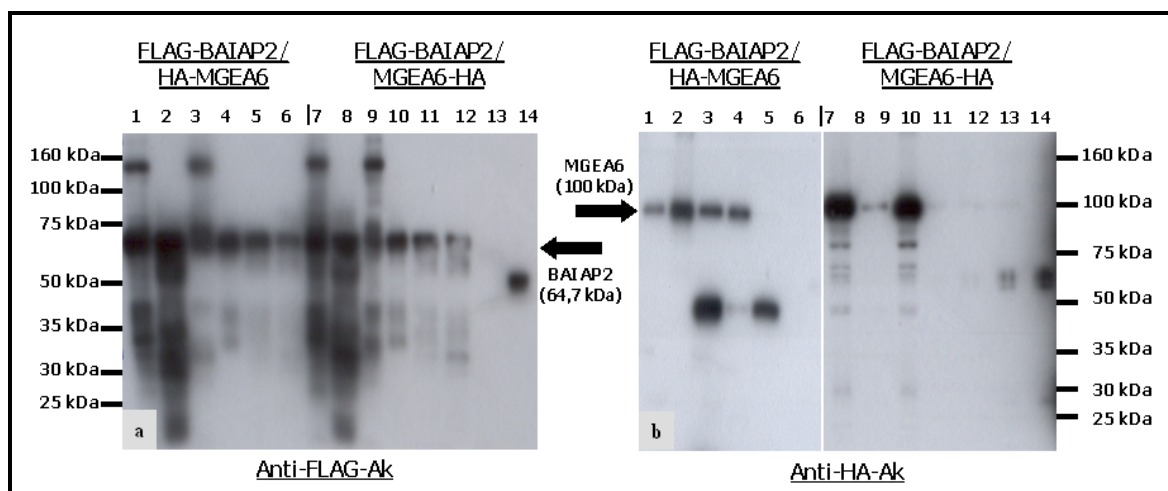


Abb.24: Western-Blot-Analyse der Proteinlysate nach der Co-Immunpräzipitation von BAIAP2 und MGEA6. Die Proteininteraktion wurde für die Proteine FLAG-BAIAP2 und HA-MGEA6 gezeigt.

a: Nachweis mit Anti-FLAG-Ak: Nachweis von FLAG-BAIAP2 in Gesamtlysat und Eluat (64,7kDa).

b: Nachweis mit Anti-HA-Ak: Nachweis von HA-MGEA6 im Eluat nach der IP (Tasche 2). MGEA6-HA wurde nach der IP mit FLAG-BAIAP2 kaum eluiert (Tasche 8).

Taschen 1-6: FLAG-BAIAP2/HA-MGEA6; *1:* Gesamtproteinlysat; *2:* Eluat; *3:* Überstand nach Inkubation der Lysate mit der Anti-FLAG-Agarose; *4:* Überstand nach dem Waschen; *5:* Agarose vor der Elution; *6:* Agarose nach der Elution;

Taschen 7-14: FLAG-BAIAP2/MGEA6-HA; *7:* Gesamtproteinlysat; *8:* Eluat; *9:* Überstand nach Inkubation mit der Anti-FLAG-Agarose; *10:* Überstand nach dem Waschen; *11:* Agarose vor der Elution; *12:* Agarose nach der Elution; *13:* Negativkontrolle COS-Zelllysat; *14a:* Positivkontrolle FLAG-BAP-Fusionsprotein (49,3kDa); *14b:* Positivkontrolle p73,3-HA (73,3kDa).

Der Nachweis der Interaktion erfolgte für die Proteine FLAG-BAIAP2 und HA-MGAE6. Das MGEA6-Protein ist nach der IP im Eluat vorhanden und hat somit an BAIAP2 gebunden.

Das Protein BAIAP2 (Abb.24a; 64,7kDa) wurde im Gesamtproteinlysat (Taschen 1 und 7) und auch im Eluat (Taschen 2 und 8) nachgewiesen, d. h. es bindet mit seinem angehängten FLAG-Tag an die Anti-FLAG-Agarose (Taschen 5 und 11). In den Überständen nach der Inkubation mit der Anti-FLAG-Agarose (Taschen 3 und 9) ist noch BAIAP2-Protein zu finden, welches nicht gebunden hat und ausgewaschen wurde. Auch war die Elution der

Proteine nicht vollständig, so dass noch Protein an der eluierten Agarose gebunden ist (Taschen 6 und 12). MGEA6 (100kDa) war im Eluat nachweisbar (Abb.24b: Tasche 2), wonach es im Komplex mit BAIAP2 präzipitiert wurde. Dies bestätigt die Bindung des MGEA6-Proteins an BAIAP2. Die spezifische Bindung des Anti-FLAG-Antikörpers wurde durch den Nachweis des FLAG-BAP-Fusionsproteins (49,3kDa) bestätigt (a: Tasche 14). Die Spezifität des Anti-HA-Antikörpers wurde mit dem Nachweis des Fusionsproteins p73,3-HA-Tag (73,3kDa) gezeigt (b: Tasche 14).

Die Interaktion von MGEA6 mit BAIAP2 wurde in der vorliegenden Analyse mittels Co-Immunpräzipitation nachgewiesen.

3.2.4 Analyse der Proteininteraktion zwischen den Proteinen SPTAN1 und MGEA6

Die Ergebnisse der Interaktionsanalyse von SPTAN1 und MGEA6 werden in der folgenden Abb.25 dargestellt.

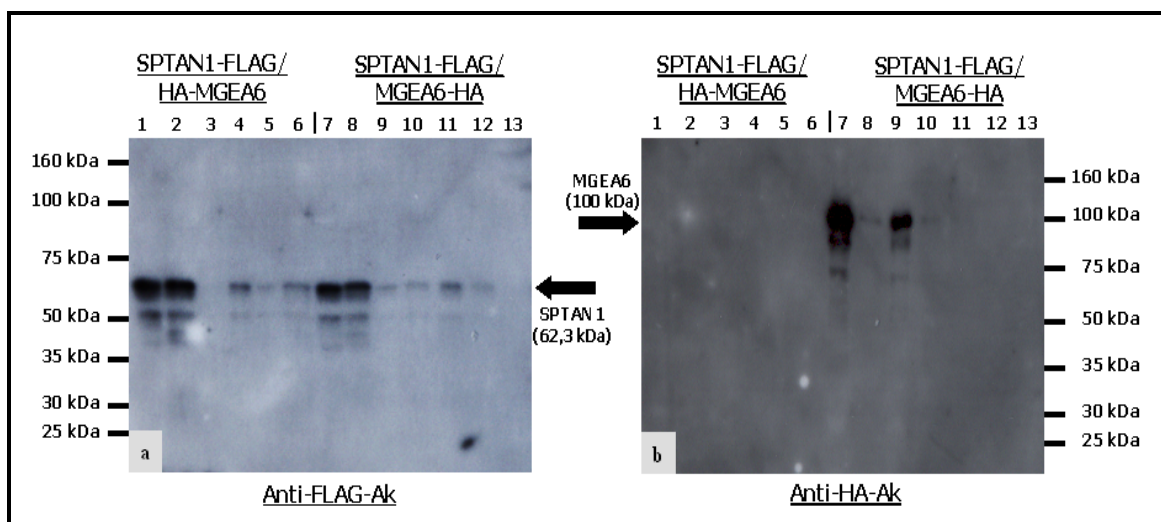


Abb.25: Western-Blot-Analyse der Proteinlysate nach der Co-Immunpräzipitationen von SPTAN1-FLAG/HA-MGEA6 und SPTAN1-FLAG/MGEA6-HA.

a: Nachweis mit Anti-FLAG-Ak: Nachweis von SPTAN1-FLAG in Gesamtlysate und Eluat (62,3kDa).

b: Nachweis mit Anti-HA-Ak: Nachweis von HA-MGEA6 im Gesamtlysate (Tasche 1) und in der Waschfraktion nach der IP (Tasche 3). MGEA6-HA wurde nach der IP mit SPTAN1-FLAG nicht eluiert (Tasche 8). HA-MGEA6 wurde in der Co-Expression mit SPTAN1-FLAG nicht exprimiert.

Taschen 1-6: 1: Gesamtproteinlysate; 2: Eluat; 3: Überstand nach Inkubation der Lysate mit der Anti-FLAG-Agarose; 4: letzter Überstand nach dem Waschen; 5: Agarose vor der Elution; 6: Agarose nach der Elution;

Taschen 7-13: 7: Gesamtproteinlysate; 8: Eluat; 9: Überstand nach Inkubation der Lysate mit der Anti-FLAG-Agarose; 10: letzter Überstand nach dem Waschen; 11: Agarose vor der Elution; 12: Agarose nach der Elution; 13: Negativkontrolle COS-Zelllysate.

Die Western-Blot-Analyse zeigte, dass nach der Immunpräzipitation der Proteine kein MGEA6-Protein im Eluat vorhanden war. Daraus kann geschlossen werden, dass nach der Expression der Proteine keine Bindung aneinander erfolgte.

Die Expression von SPTAN1 wurde im Gesamtproteinlysate und im Eluat nachgewiesen (Abb.25a: Taschen 1 und 7). HA-MGEA6 wurde mit SPTAN1 nicht co-exprimiert. Die Expression von MGEA6-HA wurde im Gesamtproteinlysate nachgewiesen (Abb.25b: Tasche 7). Da MGEA6 im Eluat nicht nachgewiesen wurde (b: Tasche 8), aber im Überstand nach Inkubation der Lysate mit der Anti-FLAG-Agarose vorhanden war (b: Tasche 9), kann eine Bindung des Proteins an SPTAN1 ausgeschlossen werden.

Die Interaktion von MGEA6 mit SPTAN1 wurde nach der vorliegenden Analyse mittels Co-Immunpräzipitation ausgeschlossen.

3.2.5 Analyse der Proteininteraktion zwischen den Proteinen KIBRA und MGEA6

Die folgende Abbildung 26 gibt die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse für die Proteininteraktion zwischen KIBRA und MGEA6 wieder.

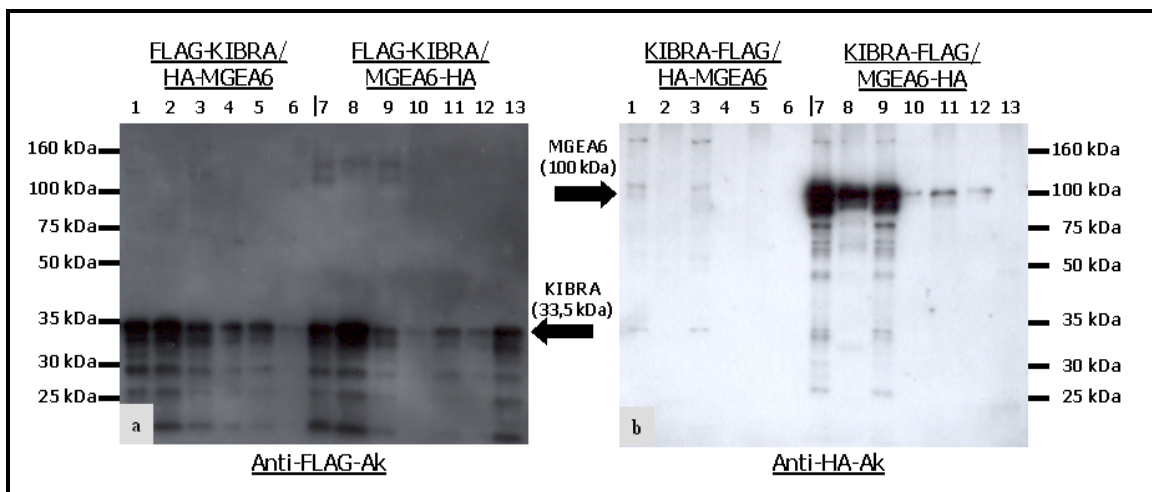


Abb.26: Western-Blot-Analyse der Proteinlysate nach der Co-Immunpräzipitationen von KIBRA und MGEA6.

a: Nachweis mit Anti-FLAG-Ak: Nachweis von KIBRA in Gesamtlysaten und Eluaten (33,5kDa).

b: Nachweis mit Anti-HA-Ak: Nachweis von MGEA6-HA im Eluat nach der IP (Tasche 8). HA-MGAE6 wurde mit KIBRA-FLAG nicht co-exprimiert (Taschen 1-6).

Taschen 1-6: 1: Gesamtproteinlysate; 2: Eluat; 3: Überstand nach Inkubation der Lysate mit der Anti-FLAG-Agarose; 4: letzter Überstand nach dem Waschen; 5: Agarose vor der Elution; 6: Agarose nach der Elution;

Taschen 7-13: 7: Gesamtproteinlysate; 8: Eluat; 9: Überstand nach Inkubation der Lysate mit der Anti-FLAG-Agarose; 10: letzter Überstand nach dem Waschen; 11: Agarose vor der Elution; 12: Agarose nach der Elution; 13: Negativkontrolle COS-Zelllysate.

Der Nachweis der Interaktion erfolgte für die Proteine KIBRA-FLAG- und MGAE6-HA. Das MGEA6-Protein ist nach der IP im Eluat vorhanden und hat somit an KIBRA gebunden (Abb.26b).

Die Expression von KIBRA (33,5kDa) wurde in den Gesamtproteinlysaten (Taschen 1 und 7) und Eluaten (Taschen 2 und 8) nachgewiesen (Abb.26a). Die Überstände nach der Inkubation mit der Anti-FLAG-Agarose (Taschen 3 und 9) und nach dem Waschen (Taschen 4 und 10) wiesen ungebundenes und ausgewaschenes Protein auf. Der Nachweis von MGEA6-HA-Protein im Eluat aus der Co-Expression mit KIBRA-FLAG weist die Bindung der Proteine nach. Die Proteine wurden im Komplex an die Anti-FLAG-Agarose gekoppelt und anschließend eluiert (Abb.26b: Tasche 8).

Die Interaktion von MGEA6 mit KIBRA wurde in der vorliegenden Analyse mittels Co-Immunpräzipitation nachgewiesen.

3.2.6 Kontrollen zur Co-Expression und Immunpräzipitation

Um auszuschließen, dass das Protein MGEA6 statt an die putativen Bindungspartner-Proteine an deren FLAG-Tag bindet oder an die FLAG-Agarose selbst, wurden die MGEA6-HA-Tag-Fusionsproteine jeweils in Kombination mit den leeren FLAG-Vektoren, welche dann nur die FLAG-Sequenz exprimieren, transfiziert und exprimiert. Anschließend wurden wie zuvor Gesamtproteinlysate hergestellt und eine Immunpräzipitation mittels FLAG-Agarose durchgeführt. Es folgen die Ergebnisse der Negativkontrollen zur Analyse der Proteininteraktion und Immunpräzipitation zusammengefasst in Abbildung 27.

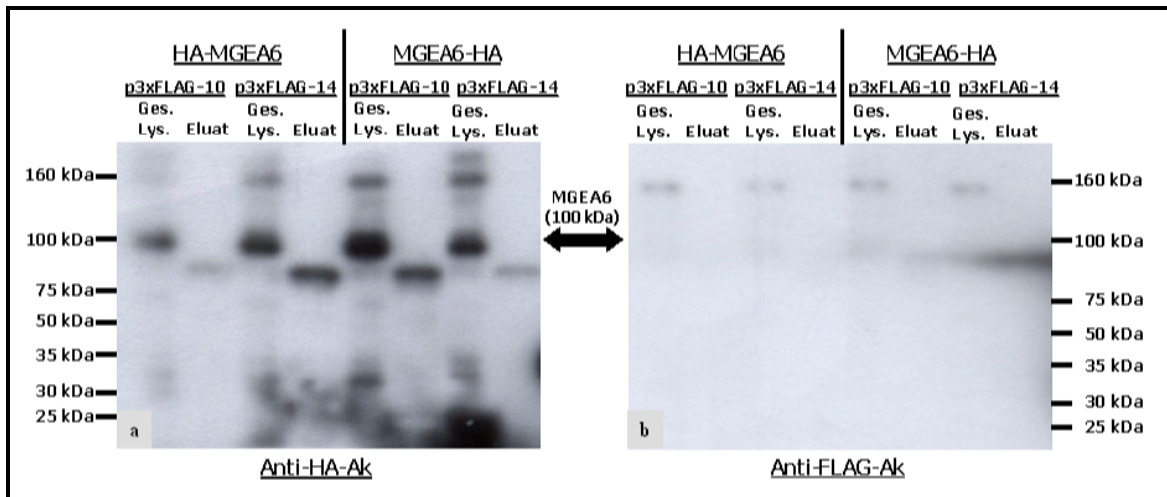


Abb.27: Western-Blot-Analyse der Co-Expression und Co-Immunpräzipitation der Fusionsproteine HA-MGEA6 und MGEA6-HA mit den leeren FLAG-Vektoren p3xFLAG-CMV-10 bzw. p3xFLAG-CMV-14 als Negativkontrollen der Immunpräzipitation.

Aufgetragen wurden jeweils im Wechsel das Gesamtproteinlysate nach der Expression und das Eluat aus der Immunpräzipitation mittels Anti-FLAG-Agarose.

a: Nachweis der Expression der Fusionsproteine HA-MGEA6 und MGEA6-HA (100kDa) mittels Anti-HA-Antikörper in allen Gesamtproteinlysaten nach Co-Expressionen mit den FLAG-Vektoren. In den Eluaten nach der IP über die Anti-FLAG-Agarose ist MGEA6 nicht vorhanden.

b: Kontrolle mittels Anti-FLAG-Antikörper

Die Plasmide HA-MGEA6- und MGEA6-HA wurden in Kombination mit jeweils einem der beiden FLAG-Vektoren co-transfiziert und co-exprimiert. In den Gesamtproteinlysaten wurde die Expression von MGEA6 (100kDa) mit dem HA-Antikörper nachgewiesen. Die Negativkontrollen zeigen, dass MGEA6 nach Inkubation mit der Anti-FLAG-Agarose nicht eluiert wurde. Somit haben die MGEA6-Proteine nicht unspezifisch an die Anti-FLAG-Agarose oder an den FLAG-Tag gebunden.

Als Ergebnis der Proteininteraktionsanalyse kann abschließend gesagt werden, dass die Interaktion von MGEA6 mit den Proteinen BAIAP2 und KIBRA *in-vitro* mittels Co-Immunpräzipitation bestätigt wurde. Die Proteinbindung zwischen MGEA6 und SPTAN1 wurde nach den Ergebnissen der vorliegenden Analyse ausgeschlossen.

3.3 Promotorcharakterisierung der MGEA6-Genfamilie

Das *Meningeom-exprimierte Antigen MGEA6 (cTAGE-5C)* wurde in einem SEREX-Screening mittels Seren von Meningeompatienten als immunogenes Antigen identifiziert. Der aktive Genlocus ist auf Chromosom 14q21 lokalisiert und umfasst eine Länge von 83kb. Er weist eine Intron/Exon-Struktur mit 24 Exons auf und besitzt einen ORF mit untranslatierten flankierenden Bereichen. Neben MGEA6 wurde die Splicevariante *MGEA11 (cTAGE-5D)* identifiziert, welche eine 129bp *In-Frame*-Deletion aufweist und vermutlich durch alternatives Splicen unter Verlust des Exons 19 aus der *MGEA6*-Sequenz hervorgeht. Die Expression beider Varianten konnte nicht nur in Meningeomen, sondern auch in anderen menschlichen Geweben nachgewiesen werden und ist somit nicht meningeomspezifisch. Eine zellbiologisch relevante Rolle von MGEA6/11 wird auf Grund der Expression beider Proteine in verschiedenen menschlichen Geweben unterstützt. Auf unterschiedlichen Chromosomen wurden neun zur *MGEA6*-Sequenz homologe Sequenzen lokalisiert [Heckel et al., 1997; Comtesse et al., 2001]. Es handelt sich um die Chromosomen 2, 6, 7, 9, 10, 13 und 18. Für verschiedene dieser Sequenzen wurden bisher mRNA-Sequenzen in Testisgewebe und in Melanomen nachgewiesen. Die Untersuchung der flankierenden Sequenzbereiche und phylogenetische Untersuchungen deuteten darauf hin, dass es sich bei den *MGEA6*-homologen Sequenzen um prozessierte Pseudogene handelt [Comtesse et al., 2001]. In einer von mir durchgeführten Sequenzierungsanalyse von *MGEA6*-cDNA-Sequenzen von Meningeompatienten wurden die Pseudogensequenzen der Chromosomen 2 und 7 identifiziert. Auf Grund dieser Daten stellte sich die Frage nach der transkriptionellen Aktivität der *MGEA6*-homologen Sequenzen und deren Funktion im Rahmen der *MGEA6*-Multigenfamilie. Einen Überblick über die *MGEA6*-Pseudogensequenzen gibt Tab.8 Kapitel 3.3.2.

Die vorliegende Analyse befasste sich zum einen mit der Charakterisierung des Promotorbereichs des aktiven *MGEA6*-Genlocus, zum anderen mit der Identifizierung von Promotorbereichen in der Umgebung verschiedener der *MGEA6*-homologen Sequenzen und der Überprüfung ihrer transkriptionellen Aktivitäten.

Die Promotoraktivitätsanalysen erfolgten mittels Luziferase-Assay unter Verwendung des pGL3-Basic-Vektor-Systems. Die genaue Durchführung erfolgte wie unter 2.10 beschrieben.

Die Upstreamregion des aktiven *MGEA6*-Genlocus wurde in Teilstücken analysiert, um einen Promotorbereich eingrenzen zu können.

Die 5'-flankierenden Sequenzbereiche der Pseudogenloci, je nach Sequenz bis zu 3600bp upstream der Genloci, wurden amplifiziert, in den Reportervektor pGL3-Basic kloniert und im Luziferase-Assay auf Promotoraktivität untersucht.

3.3.1 Promotorcharakterisierung des aktiven Genlocus von *MGEA6* auf Chromosom 14q21

Mit dem Programm *Gene2Promotor* (www.genomatix.de) wurde eine Vorhersage der Promotorregion für den *MGEA6*-Genlocus getroffen. Die Promotorregion erstreckt sich auf dem Plus-Strang über eine Länge von 1072bp. Sie beginnt 1286bp upstream des Startcodon und endet 214 Basen vor Beginn des ORF. Ein TATA-Repeat befindet sich 1199bp upstream des ORF, 88bp nach Beginn der Promotorregion. Die Transkriptions-Start-Site (TSS) befindet sich mit dem Cytosin 315 Basen vor Beginn des ORF.

Der Sequenzbereich bis 2937bp upstream des *MGEA6*-Genlocus auf Chromosom 14q21 wurde in fünf Sequenzbereiche eingeteilt und amplifiziert. Die verwendeten Primerpaare und die sich daraus ergebenden Fragmentgrößen der Sequenzen sind in Tab.3a (2.10.1) zusammengefasst. Das aus dem Primerpaar 14qfor_KpnI/14qrev_BglIII (kurz: Fragment for/rev) resultierende Fragment mit 2747bp Länge umfasst den gesamten Bereich der vorhergesagten Promotorregion. Die weiteren Primerpaare erzeugten Teilfragmente dieses Bereichs, die sich gegenseitig überlappen. Abbildung 28 gibt die Lage der Promotorregion (blau), des TATA-Repeats (violett), der Transkriptions-Start-Site (rot), sowie die Bindungsstellen der für die Amplifizierung verwendeten Primer wieder.



Abb.28: Sequenzbereich 4200bp upstream des MGEA6-Genlocus auf 14q21 mit den Bindungsstellen der für die Amplifizierung verwendeten Primer und der Promotorregion des *MGEA6*-Genlocus:
 Primer: 14qfor, 14qrev, 14qfor3, 14qfor4 und 14qfor5; Promotorregion (blau), Transkriptions-Start-Site (rot), Startcodon ATG des ORF.

Neben dem von den Primern 14qfor und 14qrev amplifizierten Bereich, der die komplette Promotorregion ab dem 14qrev-Primer bis 2937bp upstream des ORF umfasst, wurde mit dem Primerpaar 14qfor/14qrev3 der Bereich 2937bp upstream bis zum Beginn der

Promotorregion 1432bp upstream (Länge 1529bp) amplifiziert. Mit dem Primerpaar 14qfor3/14qrev3 wurde ein kürzerer Bereich, der die Region 2226bp upstream bis zum Beginn der Promotorregion (Länge 817bp) beinhaltet, amplifiziert. Die Primerpaare 14qfor4/14qrev und 14qfor5/14qrev umfassen die vorhergesagte Promotorregion. Mit den Primern 14qfor4/14qrev wurde ein Fragment erzeugt, das die komplette Promotorregion bis einschließlich der Transkriptions-Start-Site und inklusive einer vorhergesagten TATA-Box enthält (Länge 1319bp). Mit den Primern 14qfor5/14qrev wurde die zweite Hälfte der Promotorregion inklusive Transkriptions Start Site aber exklusive der vermuteten TATA-Box amplifiziert (668bp). Der Nachweis der PCR-Fragmente im Agarosegel ist in Abbildung 29 wiedergegeben.

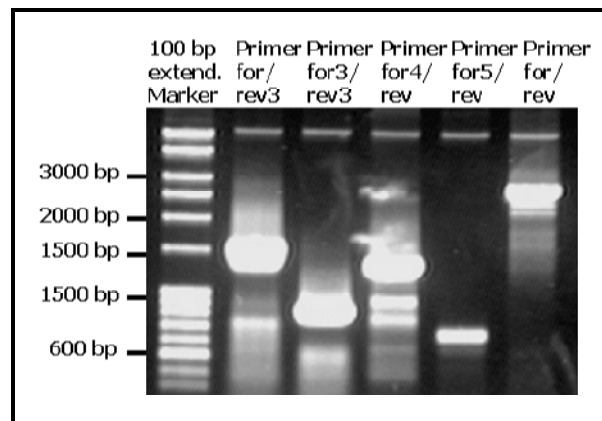


Abb.29: Charakterisierung der Fragmente aus der PCR-Amplifikation des *MGEA6*-Locus Upstreambereichs: MGEA6-for/rev3 (1529bp), MGEA6-for3/rev3 (817bp), MGEA6-for4/rev (1319bp) und MGEA6-for5/rev (668bp).

Die Sequenzen wurden in den Luziferase-Reportervektor inkloniert. Rekombinante Klone wurden selektiert und die Orientierung der Sequenzen durch Sequenzabgleich überprüft (2.10.1). Abbildung 30 zeigt den doppelten Restriktionsverdau der rekombinanten Klone mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *BglII*. Es wurden jeweils zwei Plasmide für die weitere Analyse verwendet (s. u.).

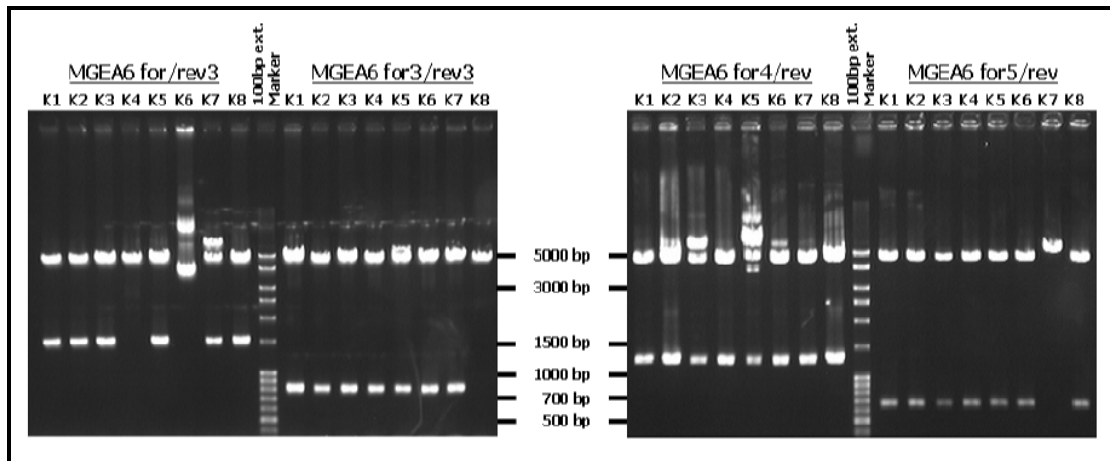


Abb.30: Restriktionsverdau der rekombinanten Klone pGL3-Basic/MGEA6-Upstream-Fragmente mit den Enzymen *KpnI* und *BglIII*.

Fragmentgrößen: Vektor pGL3-Basic: (4818bp); *for/rev3*: 1529bp; *for3/rev3*: 817bp; *for4/rev*: 1319bp; *for5/rev*: 668bp. Im Luziferase-Assay verwendete Klone: *for/rev3*: Klone 1 und 2; *for3/rev3*: Klone 1 und 2; *for4/rev*: Klone 1 und 4; *for5/rev*: Klone 1 und 2.

Für den Nachweis der transkriptionellen Aktivität wurden die rekombinanten Vektoren zusammen mit dem Normalisierungsvektor pCMV- β in TERA-1-Zellen co-transfiziert. Die Expression erfolgte für 48h. Durch die Messung der β -Galaktosidase-Aktivität wurde die Transfektionseffizienz der Zellen kontrolliert. Die endogene β -Galaktosidase-Aktivität der Zellen wurde mit den Messwerten abgeglichen. Die Luziferaseaktivität der pGL3-Basic-transfizierten Zellen im Luziferase-Assay hängt von der Insertion eines funktionellen Promotors stromaufwärts der für Luziferase codierenden Sequenz *luc+* im Vektor ab, da dieser keinen eukaryotischen Promotor und keine Enhancer-Elemente aufweist. Die potentielle Promotoraktivität einer einklonierten Sequenz kann somit überprüft werden.

Für alle Konstrukte wurden Vierfachansätze analysiert und der Mittelwert der Meßwerte gebildet. Darüber hinaus wurden jeweils zwei unterschiedliche Klone der Konstrukte analysiert: *for/rev3*: Klone 1 und 2; *for3/rev3*: Klone 1 und 2; *for4/rev*: Klone 1 und 4; *for5/rev*: Klone 1 und 2 (siehe Abb.30).

Die Ergebnisse der Analyse für die Promotorregion des 14q21-Locus sind in den Abbildungen 31a und 31b dargestellt.

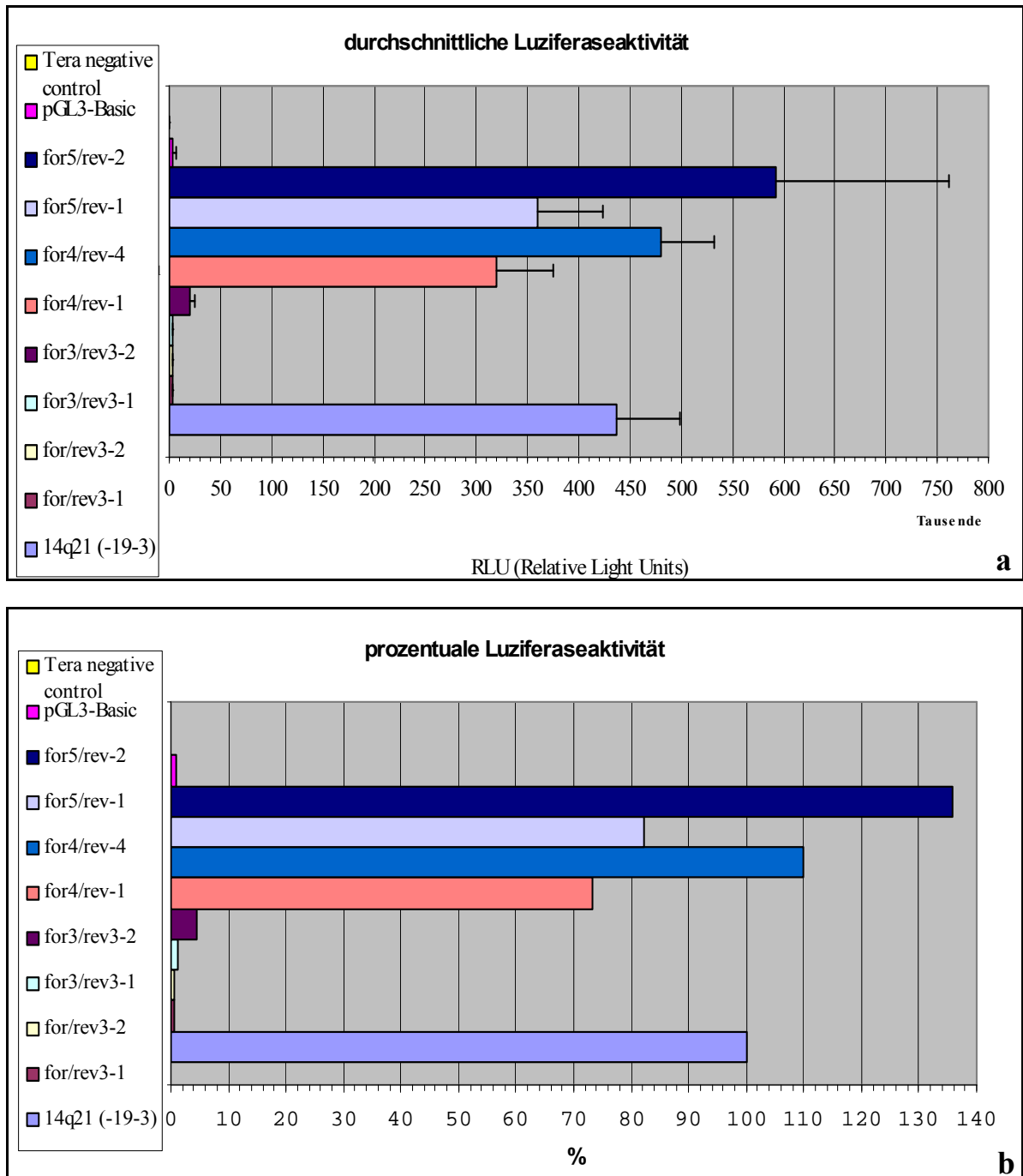


Abb.31a und b: Ergebnisse des Luziferaseaktivitäts-Assays für die Promotorregion des *MGEA6*-Genlocus.

Die Messwerte ergeben sich aus dem Mittelwert von Vierfachansätzen der Konstrukte.

Referenz: analysierter 14q21-Upstreambereich (Sequ. for/rev): 14q21 Klon-19-3 (ganz unten).

Negativkontrollen: TERA-Lysat (ganz oben) und leerer pGL3-BasicVektor (zweite von oben). Für jedes Konstrukt der Teilfragmente wurden zwei unterschiedliche Klone analysiert: *for/rev3*: Klone 1 und 2; *for3/rev3*: Klone 1 und 2; *for4/rev*: Klone 1 und 4; *for5/rev*: Klone 1 und 2.

a: Durchschnittliche Luziferaseaktivität der 14q21-Fragmente im Vergleich zu der Aktivität des analysierten 14q21-Upstreambereichs. Die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

b: Prozentuale Luziferaseaktivität der 14q21-Fragmente im Vergleich zu der Aktivität des kompletten analysierten 14q21-Upstreambereich (100%).

Die Fragmente 14qfor4/14qrev und 14qfor5/14qrev, welche die vorhergesagte Promotorregion und die Transkriptions-Start-Site beinhalten, zeigten deutliche Promotoraktivitäten. Keine Promotoraktivitäten zeigten die Fragmente 14qfor/14qrev3 und 14qfor3/14qrev3, welche die Sequenz upstream der Promotorregion umfassen. Es konnte somit bestätigt werden, dass die vorhergesagte Region die Promotorelemente enthält. In der Expressionsstärke konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, je nachdem ob die analysierte Sequenz die vorhergesagte TATA-Box enthielt (for4/rev) oder diese nicht enthielt (for5/rev). Klon 1 des Fragments for5/rev zeigte zwar gegenüber den for4/rev-Fragmenten eine deutlich höhere Aktivität, die Standardabweichung ist im Verhältnis zu den anderen untersuchten Fragmenten aber zu groß, um einen relevanten Effekt darzustellen. Die Aktivität der vorhergesagten TATA-Box kann somit ausgeschlossen werden. Die vorliegende Analyse der Konstrukte wurde mehrmals wiederholt und zeigte immer die gleiche Tendenz.

Die Promotorregion des MGEA6-Locus wurde auf den Bereich 1510bp upstream des ORF eingegrenzt.

3.3.2 Analyse der Promotoraktivitäten der MGEA6-Pseudogene verschiedener Loci

Phylogenetische Analysen zur Charakterisierung der *MGEA6*-homologen Sequenzen verschiedener Loci ließen darauf schließen, dass es sich um prozessierte Pseudogene handelt, die durch mehrere Retrotranspositionereignisse aus einem ursprünglichen Gen hervorgingen. In den flankierenden Sequenzbereichen sind Anzeichen hierfür zu finden. So weisen die flankierenden Bereiche verschiedene Elemente, wie *LINE-1*-Elemente (*LI*), *SINEs* (Alu-Elemente) und *MaLRs* (*mammalian apparent LTR-retrotransposon*), sowie AT-reiche repetitive Sequenzen auf [Comtesse et al., 2001]. In der Regel besitzen prozessierte Pseudogene keine 5'-Promotorsequenz oder Introns mehr, flankierende repetitive Sequenzen und 3'-Polyadenylierung finden sich häufig. Die Integration dieser Pseudogensequenzen in einen Locus der Promotorelemente aufweist, kann zu deren Transkription führen. Tabelle 10 gibt einen Überblick über die chromosomale Lokalisation und Struktur der *MGEA6*-homologen Pseudogensequenzen, sowie über die bisher bekannten mRNA-Sequenzen dieser Loci.

Tab.10: Die *MGEA6*-homologen Pseudogensequenzen: chromosomale Lokalisation, annotierte mRNAs, Struktur und flankierende Elemente.

LINE: Long Interspersed Nuclear Element (Non-LTR Retrotransposon); *SINE*: Short Interspersed Nuclear Element (Non-LTR Retrotransposon); *Alu*: Short Interspersed Nuclear Element, nach Restriktion mit Restriktionsenzym *Alu* aus *Arthrobacter luteus*; *LTR*: Long Terminal Repeat; *SAT*: Simple Repeat Satellite; *MaLR*: Mammalian apparent LTR-retrotransposon; *DNA MER1*: Medium frequency repetitive sequences, nonautonomous DNA transposon; *ERV1*: Endogenous Retrovirus Like Elements. Die in der vorliegenden Analyse untersuchten Gensequenzen unterschiedlicher Loci sind grün unterlegt.

Sequenz/ Chromosom	annotierte mRNAs	Exon/Intron Struktur	poly-A Region am 3- Ende	3' flankierende Sequenzen	5' flankierende Sequenzen
MGEA6 14q21		+	-		
2q24.3	/	-	+	low com +; LINE L1 +	low com +
6q23.2	Melanoma; CTAGE-4	-	+	LINE L1 +; LINE L1	low com +; LINE L1 +; LINE L1 +
6q27	/	-	+	simple +; MaLR -	
7q34	Melanoma; Testis	-	+	LINE L1 +	LINE L1 +; snRNA +; LINE L1 +
7q34(2)	Melanoma; Testis	-	+	LINE L1 +	LINE L1 +; snRNA +; LINE L1 +
7q35	Melanoma; CTAGE-4	-	+	LINE L1 +	low com +; LINE L1 +; LINE L1 +
7q35(2)	Melanoma; CTAGE-4	-	+	LINE L1 +	low com +; LINE L1 +; LINE L1 +
9p21.2	/	-	+	LINE L1 +	low com +; LINE L1 +; SINE Alu +
10q26.3	Testis	-	+	SINE Alu -; SINE MIR +; SINE Alu +; simple +	LINE L2 +; simple +; LTR MaLR +
13q14.2	Testis	-	+	SINE Alu -; scRNA -; DNA MER2 +	LTR ERV1 -; Satellite SATR2 +
13q14.3	Testis; CTAGE-3	-	+	LINE L2 -; LTR MaLR -	LTR ERV1 -; LTR MaLR -
13q21.1	/	-	+	SINE Alu -; scRNA -; DNA MER2 +	LTR ERV1 -; Satellite SATR2 +; LTR ERV1 -
13q22.2	testis	-	+	LINE L1 +; LINE L1 +	DNA MER1 -; LINE L2 +
18q11.2	Testis; CTAGE-1; CTAGE-2	-	+	LTR MaLR -	low com +

Die *MGEA6*-homologen Sequenzen weisen mehrere Anzeichen auf, die sie als prozessierte Pseudogene ausweisen. Für die Loci der Chromosomen 6, 7, 10, 13 und 18 wurden annotierte mRNAs in Testisgewebe und/oder Melanoma-Gewebe nachgewiesen. Die Sequenzen 7q34 und 7q34(2) bzw. 7q35 und 7q35(2) stammen jeweils von dem selben Locus, unterscheiden sich aber in der Länge ihrer Sequenzen voneinander. So ist die

Sequenz 7q34 mit einer Länge von 2984bp um nur sechs Basen kürzer, als 7q34(2) mit der Länge 2991bp. Die Sequenz 7q35 ist mit einer Länge von 3337bp um 309 Basenpaare kürzer, als 7q35(2) mit 3646bp.

Die Amplifizierung und Klonierung der Bereiche upstream der *MGEA6*-Pseudogensequenzen erfolgte für die Loci 6q27; 7q34; 7q35; 7q35(2); 13q14.3 und 18q11.2 wie bereits erläutert. Die Primerpaare und die sich ergebenden Fragmentgrößen sind in Tabelle 3b aufgelistet, die verwendeten Primersequenzen sind unter 2.15.7 aufgeführt. Abbildung 32 zeigt den Agarosegelnachweis der Fragmente 7q34 (2984bp) und 13q14.3 (3033bp) aus der PCR-Amplifizierung.

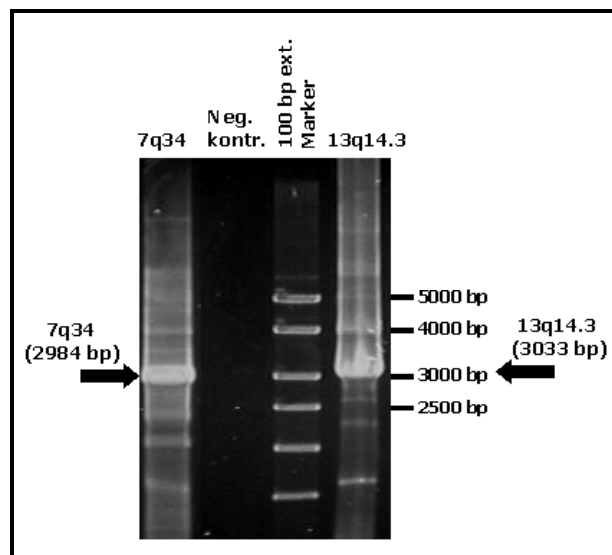


Abb.32: Agarosegelnachweis der PCR-Amplifizierung für die Sequenzen der Loci 7q34- und 13q14.3. Charakterisierung der Fragmente im Agarosegel für die anschließende Reisolierung und Klonierung. Fragmentgrößen: 7q34: 2984bp; 13q14.3: 3033bp.

Die Fragmente für 6q27, 7q35 und 18q11.2 mussten auf Grund sehr geringer Konzentrationen aus der PCR-Amplifizierung zur Insertvermehrung in den Vektor pGEM-T Easy kloniert werden. Rekombinante Plasmide wurden isoliert und wie in Abbildung 33 veranschaulicht mittels Restriktionsverdau charakterisiert.

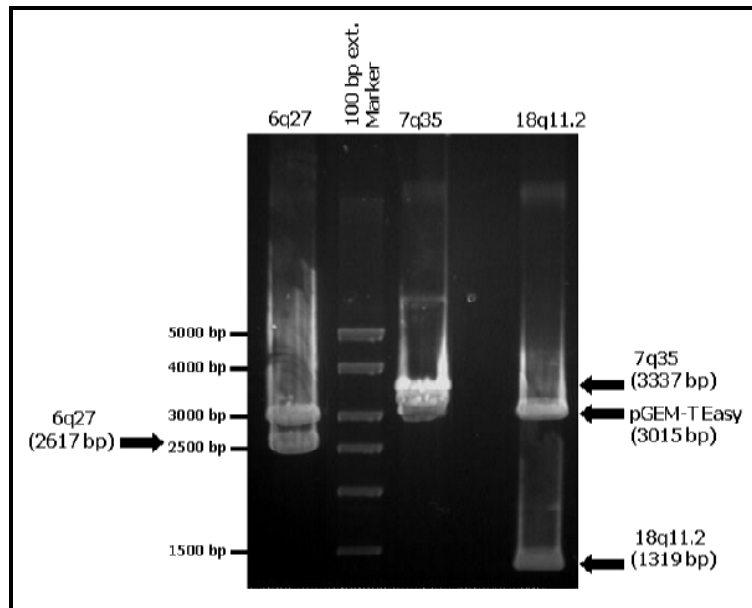


Abb.33: Restriktionsverdau der Plasmide pGEM-T Easy mit den enthaltenen Fragmenten der Loci 6q27, 7q35 und 18q11.2 zur Charakterisierung im Agarosegel
 Fragmentgrößen: 6q27: 2617bp; 7q35: 3337bp; 18q11.2: 1319bp.

Nach der Charakterisierung wurden die Fragmente in den Luziferase-Reportervektor einkloniert und rekombinante Klone mittels Restriktionsverdau selektiert. Abbildung 34 zeigt beispielhaft für 7q35(2) den Restriktionsverdau von fünf Klonen. Die Plasmide wurden mit dem Enzym *NcoI* (NEB) verdaut. Das Enzym schneidet einmal in der Sequenz des Inserts und einmal in der Vektorsequenz. Je nachdem ob das Insert im Vektor in der richtigen Orientierung für die Expression (*sense*) oder in umgekehrter Orientierung (*antisense*) vorliegt, ergeben sich durch die Restriktion zwei unterschiedliche Fragmentgrößenpaare. Liegt das Insert *in sense* vor, entstehen die Fragmente mit den Größen 2873bp und 5591bp. Bei *antisense*-Orientierung entstehen die Fragmente mit den Größen 945bp und 7519bp.

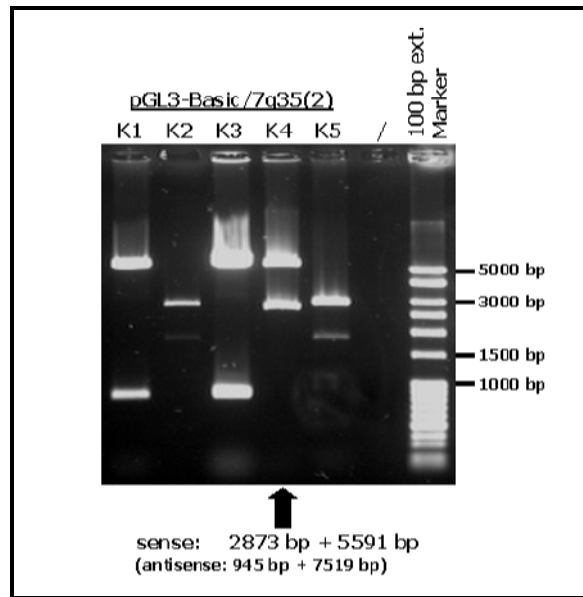


Abb.34: Charakterisierung der Plasmide pGL3-Basic/7q35(2) Klone 1-5 mittels Restriktionsverdau mit dem Enzym *NcoI* (NEB).

Größen: sense-Orientierung: 2873bp + 5591bp; antisense-Orientierung: 945bp + 7519bp. Klon 4 (Pfeil) wurde als rekombinanter Vektor mit der korrekten Orientierung des Inserts 7q35(2) identifiziert.

Abbildung 34 zeigt, dass Klon 4 des Plasmids pGL3-Basic/7q35(2) als rekombinanter Vektor mit dem Insert in *sense*-Orientierung identifiziert wurde. Die Charakterisierung der anderen Plasmide ist hier nicht gezeigt. Die Orientierung der Sequenzen *in sense* und der offene Leserahmen wurden durch Sequenzierung und Sequenzabgleich bestätigt.

Nach Transfektion der Plasmide und Expression in TERA1-Zellen wurden die Promotoraktivitäten der Konstrukte mittels Luziferase-Assay bestimmt. Die endogene β -Galaktosidase-Aktivität der Zellen wurde mit den Messwerten abgeglichen. Als Referenz für die Promotoraktivität diente die Aktivität des Plasmids 14q21 (Klon 19-3) aus der vorangehenden Analyse des Promotorbereichs des aktiven *MGEA6*-Genlocus.

Die Messwerte ergeben sich aus Vierfachansätzen aus denen der Mittelwert gebildet wurde. Die Ergebnisse der Analysen der *MGEA6*-Pseudogen-Promotorregionen sind in den Abbildungen 35a und 35b dargestellt.

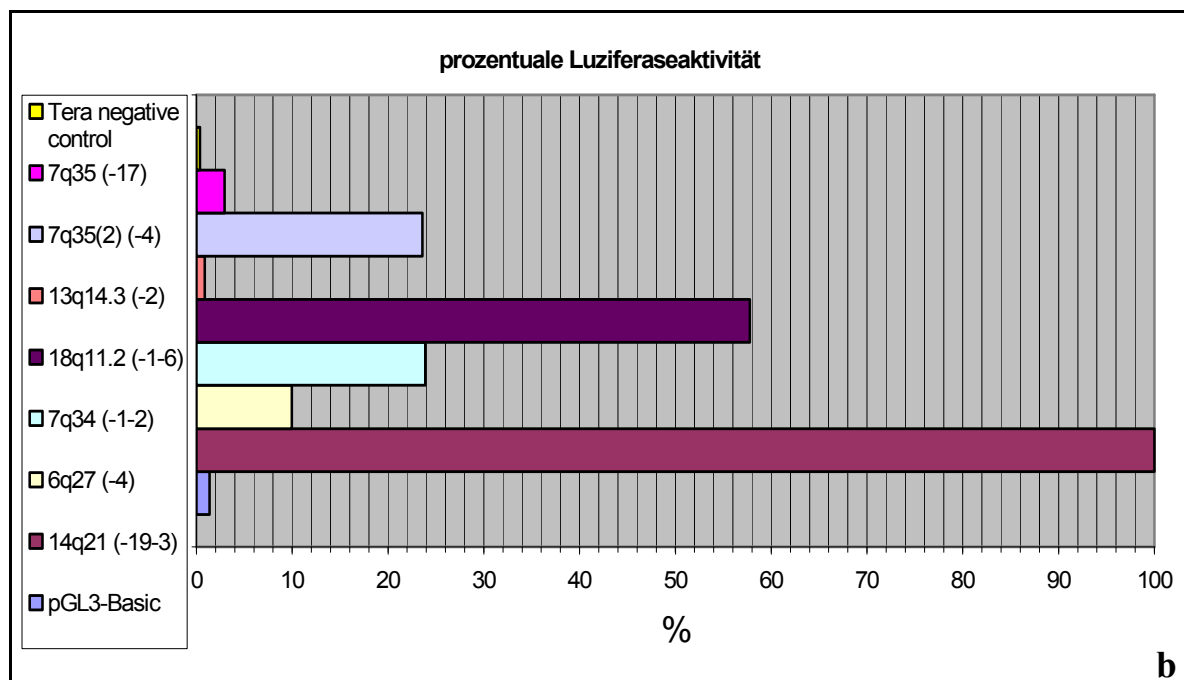
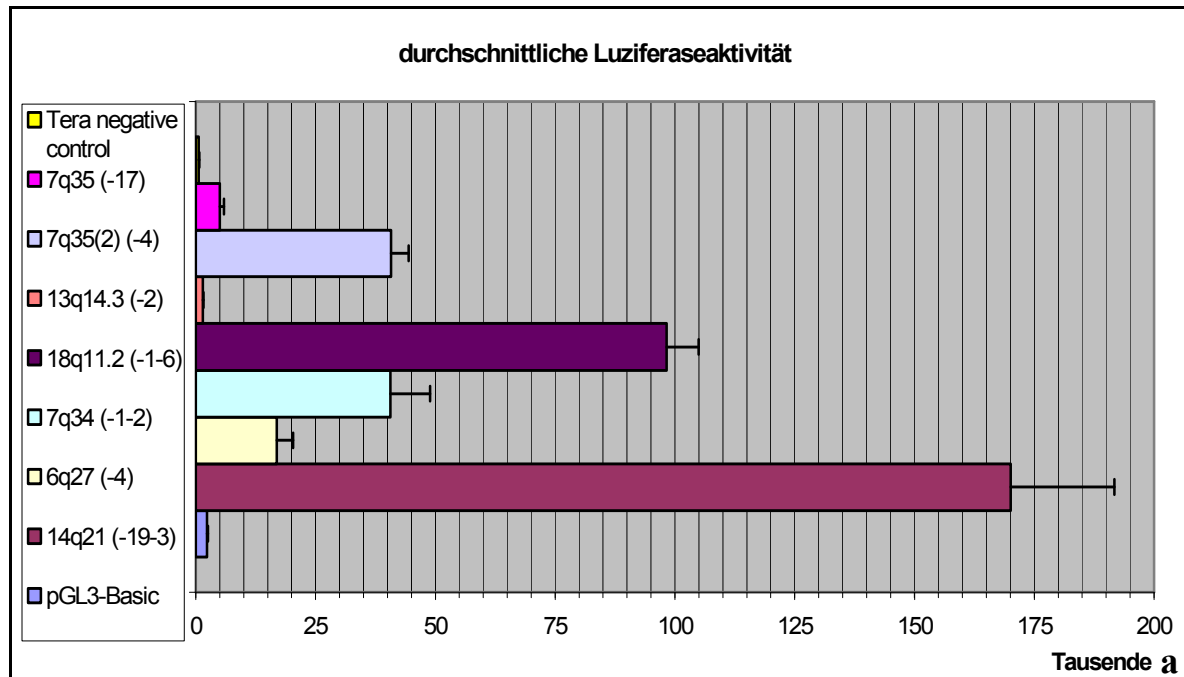


Abb.35a und b: Ergebnisse des Luziferaseaktivitäts-Assays für die Promotorregionen der Loci der *MGEA6*-Pseudogensequenzen.

Die Messwerte ergeben sich aus dem Mittelwert von Vierfachansätzen der Konstrukte.

Referenz: analysierter 14q21-Upstreambereich (zweite von unten). Negativkontrollen: TERA-Lysat (ganz oben) und leerer pGL3-BasicVektor (ganz unten). Analyisierte Klone: *14q21*: Klon 19-3; *6q27*: Klon 4; *7q34*: Klon 1-2; *18q11.2*: Klon 1-6; *13q14.3*: Klon 2; *7q35(2)*: Klon 4 und *7q35*: Klon 17.

a: Durchschnittliche Luziferaseaktivität der *MGEA6*-Pseudogensequenzen im Vergleich zu der Aktivität des analysierten 14q21-Upstreambereichs. Die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

b: Prozentuale Luziferaseaktivität der *MGEA6*-Pseudogensequenzen im Vergleich zu der Aktivität des kompletten analysierten 14q21-Upstreambereich (100%).

Im Verhältnis zur Promotoraktivität der *MGEA6*-Promotorregion wurden mittels Luziferase-Assay für die analysierten Sequenzen upstream der *MGEA6*-Pseudogenloci 7q34, 7q35(2) und 18q11.2 Promotoraktivitäten festgestellt. Die höchste Aktivität zeigte der 18q11.2-Locus mit 58% im Verhältnis zur Aktivität des aktiven *MGEA6*-Genlocus. Gleichstarke Aktivitäten von 24% wurden für die Sequenzen der Loci 7q34 und 7q35(2) gemessen. Darüber hinaus zeigte die Sequenz des 6q27-Locus eine mit 10% geringe Aktivität. Gar keine Promotoraktivitäten wiesen die Sequenzen der Pseudogenloci 7q35 und 13q14.3 auf. Die geringen Messwerte für 13q14.3 unterscheiden sich kaum von denen des leeren pGL3-Vektors, der als Negativkontrolle verwendet wurde. Für die Sequenzen der Loci 7q34 sind in Melanoma und Testis, für 7q35(2) in Melanoma und für 13q14.3 und 18q11.2 in Testis mRNA-Sequenzen nachgewiesen worden. Für 6q27 sind bisher keine mRNA-Sequenzen bekannt. Der Locus 6q27 zeigte im Vergleich zu den anderen Loci eine geringere Promotoraktivität. Der Nachweis transkriptioneller Aktivität wurde für die Pseudogensequenzen der Loci 18q11.2, 7q34, 7q35(2) und 6q27 bestätigt.

Nach Voraussage der Promotorregion und Promotoraktivitätsanalysen wurde die Promotorregion des aktiven *MGEA6*-Genlocus bestimmt und charakterisiert. Des Weiteren wurden die *MGEA6*-Pseudogene der Loci 6q27; 7q34; 7q35; 7q35(2); 13q14.3 und 18q11.2 auf Promotoraktivität untersucht. Für die Pseudogenloci 18q11.2, 7q34, 7q35(2) und 6q27 wurden Promotoraktivitäten nachgewiesen. Außer für die Sequenz des Locus 6q27 korreliert der Nachweis der Promotoraktivitäten mit den bisherigen Nachweisen von mRNA-Sequenzen der Loci.

3.4 Untersuchung des E-Cadherin/ β -Catenin Zelladhäsions-Komplexes und Nachweis einer veränderten Expression dieser Zelladhäsionsproteine in Meningeomen

Die Struktur von MGEA6 lässt eine Beteiligung des Proteins an Signaltransduktionswegen vermuten. Eine Microarray-Analyse zur Regulierung von MGEA6 auf mRNA-Ebene zeigte die Herunterregulierung von MGEA6 nach dem Knock-Out des *TCF/LEF-1* Transkriptionsfaktors [nicht veröffentlichte Daten, Ballhausen et al., Halle]. Die Analyse ließ darauf schließen, dass MGEA6 über den WNT-Signalweg reguliert wird. In der vorliegenden Analyse wurde die Aktivität des WNT-Signalwegs in Meningeomgewebe untersucht. Darüber hinaus ist die Betrachtung der Zelladhäsion und der daran beteiligten Proteine in Meningeomen auf Grund verschiedener bisheriger Studien interessant. Da β -Catenin eine entscheidende Rolle beim WNT-Signalweg spielt und darüber hinaus die Komplexbildung aus β -Catenin und E-Cadherin für die funktionierende Zell-Zell-Adhäsion bedeutend ist, wurde die Expression der Proteine β -Catenin und E-Cadherin in Meningeomgeweben untersucht.

Im Folgenden wurde die Expression und subzelluläre Lokalisation von β -Catenin und E-Cadherin in menschlichen Meningeomen verschiedener WHO-Grade und unterschiedlicher histomorphologischer Subtypen analysiert.

Es wurden Immunhistochemische Färbungen (IHC) an Schnitten von in Paraffin eingebetteten Tumorproben angefertigt. Die Anfertigung der Schnitte, die Immunhistochemischen Färbungen sowie die Verwendung der Antikörper erfolgten wie unter 2.12 beschrieben. Untersucht wurden Tumorproben von 38 Meningeomen (35 primäre Meningeome und drei Rezidive). Als Kontrollen wurden zwei Adenokarzinome (Hirnmastasen von Kolorektalkarzinomen) und nicht-tumoröses arachnoidales Gewebe untersucht. Die Patienten wurden am Institut für Neurochirurgie der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes operiert und die Tumoren am Institut für Neuropathologie klassifiziert. Das Durchschnittsalter der 24 weiblichen und 13 männlichen Patienten (zwischen 31 und 86 Jahren) lag zum Zeitpunkt der Resektion bei 58 Jahren. Die 38

untersuchten Meningeome umfassten 18 Common Type (MI), 16 atypische (MII) und vier anaplastische (MIII) Meningeome. Die Gruppe der MI-Tumoren bestand aus neun Meningeomen des arachnoidalen Subtyps, drei des fibroblastischen Subtyps, drei des transitionalen Subtyps und drei des sekretorischen Subtyps. Die WHO-Grade und histomorphologischen Subtypen der analysierten Meningeome sind in Tab.9 aufgeführt. Neben der IHC wurden Western-Blot Analysen (WB) mit Zelllysaten aus fraktionierten Meningeom-Primärzellkulturen und Immunfluoreszenzfärbungen (IF) an fixierten Meningeom-Primärzellkulturen durchgeführt.

3.4.1 Überprüfung der Antikörper-Reaktivitäten und Nachweis der Proteine β -Catenin und E-Cadherin in Meningeom-Gewebelysaten

Die Reaktivität der Antikörper wurde an Meningeom-Gewebelysaten mittels Western-Blot Analysen bestätigt. Die Gewebeproben wurden unmittelbar nach der Resektion in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -70°C bis zur Herstellung der Lysate gelagert. Die Herstellung von Proteinlysaten aus Tumorgewebe erfolgte wie unter 2.6.1 aufgeführt, die Durchführung der Western-Blot Analysen ist unter 2.8 beschrieben. Abbildung 36 gibt die Resultate dieser Analysen wieder.

Die Expression von E-Cadherin (124kDa) wurde in den Meningeomen H403 (MI), H444, H449, H457, H469 and H492 (MII) nachgewiesen, das Gewebe des Tumors H386 zeigte keine E-Cadherin-Expression (Abb.36a). In Zelllysaten aus Primärzellkulturen der Meningeome H374 und H392 wurde keine E-Cadherin-Expression nachgewiesen (Abb.36c). Als Positivkontrolle wurde die Reaktivität des E-Cadherin-Antikörpers in HeLa-Zelllysaten bestätigt. Als Kontrolle für die Proteinisolation wurde jeweils α -Tubulin verwendet (Abb.36a).

Die Expression von β -Catenin konnte für alle untersuchten Meningeome im Western-Blot gezeigt werden. Auch für β -Catenin wurde die Reaktivität des Antikörpers im HeLa-Zelllysate bestätigt (Abb.36b).

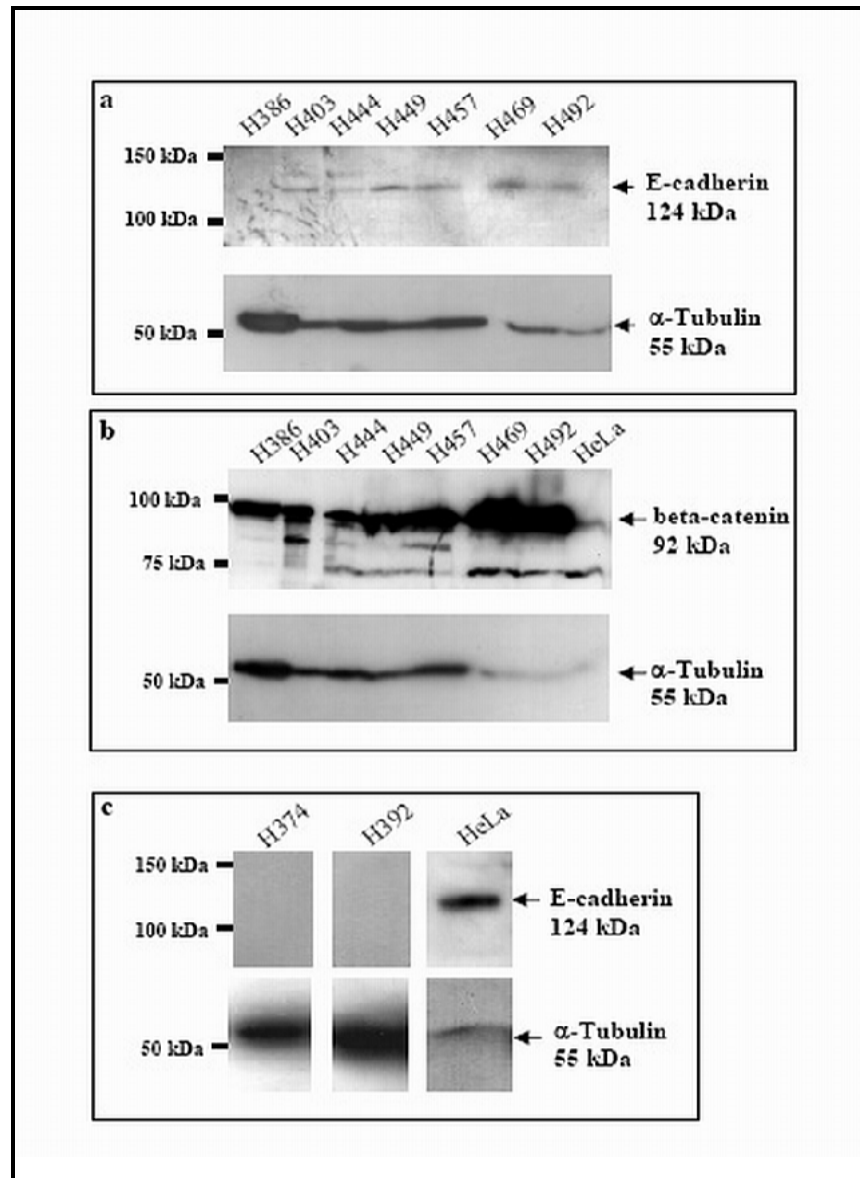


Abb.36: Western-Blot Analyse von Proteinlysaten verschiedener Meningeome und Kontrollen unter Verwendung der Antikörper gegen E-Cadherin und β -Catenin.

- a.** Die Expression von E-Cadherin (124kDa) in den Meningeomen H403 (MI), H444, H449, H457, H469 und H492 (MII). Das Meningeom H386 (MIII) zeigte keine E-Cadherin Expression. α -Tubulin wurde als Kontrolle verwendet.
- b.** Die Expression von β -Catenin (92kDa) wurde für alle der Meningeome und in HeLa-Zellen gezeigt. Niedrigere Banden stellen vermutlich Degradationsprodukte dar. α -Tubulin wurde als Kontrolle verwendet.
- c.** Fehlende E-Cadherin Expression in Primärzellkulturen der Meningeome H374 and H392. In HeLa-Zellen konnte E-Cadherin nachgewiesen werden. α -Tubulin wurde als Kontrolle verwendet.

3.4.2 Immunhistochemische Analyse (IHC) der Proteine β -Catenin und E-Cadherin in Meningeom-Gewebeschnitten

Bezüglich β -Catenin zeigte die Immunhistochemische Färbung (IHC) der Adenokarzinome kräftige fokal auftretende Immunreaktivitäten der Zellmembranen, des Zytoplasmas und der Zellkerne (Abb.37a). Nicht-tumoröse Arachnoidzellen zeigten den β -Catenin-Nachweis an den Zellmembranen (Abb.37c).

Bei den untersuchten Meningeomen konnte die Expression von β -Catenin in allen Proben (38/38) festgestellt werden. Normalerweise wird β -Catenin in Zellen mit intakter Zelladhäsion an der Zellmembran gefunden. Nukleäre Immunreaktivität wird detektiert, wenn im Zusammenhang mit dem WNT-Pathway eine Translokation von β -Catenin in den Nukleus erfolgt ist. Die IHC-Analyse zur subzellulären Lokalisation von β -Catenin zeigte keine nukleären Anfärbungen in den Zellen der Meningeome. Durch das Fehlen von β -Catenin im Zellkern wurde eine Aktivität des WNT-Pathways in Meningeomzellen ausgeschlossen. MGEA6 wird somit nicht über den WNT-Pathway reguliert.

Eine typische Anfärbung der Zellmembranen mittels β -Catenin-Antikörper wurde nur in acht der 38 Meningeome (21%) gefunden und war nicht homogen in allen Zellen einer Gewebesektion zu erkennen (Abb.37g). An der Zellmembran wurde β -Catenin in zwei von 18 MI-Meningeomen (11%), in fünf von 16 MII-Meningeomen (31%) und in einem der vier MIII-Meningeome (25%) nachgewiesen (Tab.12). Bei der Mehrheit der Meningeom-Gewebeschnitte wurde β -Catenin als granuläre, zytoplasmatische Anfärbung detektiert. In den meisten Fällen war ein auffälliger, kräftig gefärbter, granulärer Cluster nahe dem Zellkern (perinukleär) zu erkennen (Abb.37e + Tab.12). Bei den perinukleären Anfärbungen handelt es sich um Akkumulationen von Protein in zytoplasmatischen Kompartimenten.

β -Catenin ist ein Bindungspartner des integralen Membranglykoproteins E-Cadherin und bindet dessen zytoplasmatische Domäne. Die Immunhistochemische Analyse von E-Cadherin zeigte in den Adenokarzinomen fokale Zellmembranfärbungen (Abb.37b). Die Immunreaktivität in den Meningeomen erfolgte für 25 der 38 Meningeome (66%) ebenfalls membranär (Abb.37f, 37h + Tab.12). Hierbei stand die Membranfärbung nicht in Korrelation mit einem bestimmten Tumorgrad oder einem histomorphologischen Subtyp der Tumoren. Sieben der untersuchten Meningeome zeigten gar keine Färbung (darunter fünf

MI- und zwei MII-Tumoren) und sechs Fälle zeigten eine Färbung des Zytoplasmas ohne membranäre Akzentuierung (drei MI-, zwei MII- und ein MIII-Tumor).

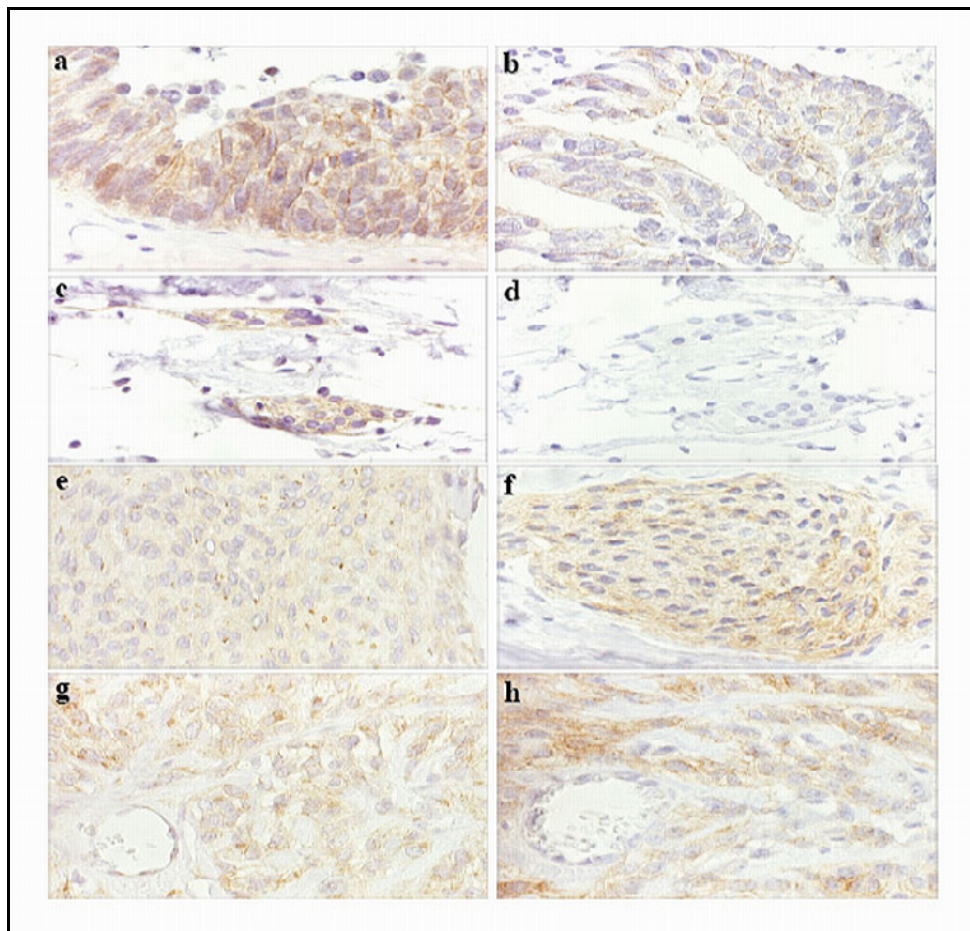


Abb.37: Immunhistochemische Analyse von Paraffingewebeschnitten unter Verwendung der Antikörper gegen β -Catenin und E-Cadherin.

Immunoperoxidase/Diaminobenzidin-Methode mit Hämatoxylin Gegenfärbung. 400-fache Vergrößerung.

- a. β -Catenin-Expression im Zellkern, an der Zellmembran und im Zytoplasma eines Adenokarzinoms (N955/02; Hirnmetastase eines Kolorektalkarzinoms).
- b. E-Cadherin-Expression an der Zellmembran der selben Tumorprobe wie in Abb.a.
- c. β -Catenin-Expression an der Zellmembran von nicht-tumorösen Arachnoidzellen.
- d. Fehlende E-Cadherin Expression in nicht-tumorösen Arachnoidzellen.
- e. Zytoplasmatische β -Catenin-Expression mit granulären Clustern in dem Meningeom H374.
- f. Membranäre Expression von E-Cadherin in dem Meningeom H374.
- g. Membranäre und zytoplasmatische Expression von β -Catenin in dem Meningeom H469.
- h. Membranäre Expression von E-Cadherin in der gleichen Region des Meningeoms H469 wie in Abb. g.

Die Tabellen 11a und 11b geben einen Überblick über die IHC-Analyse und die zytogenetische Analyse der 38 Meningeome betreffend Chromosom 22-Aberrationen sowie die Untersuchung der Invasivität der Tumoren.

Tab.11a: Immunhistochemische Analyse von 38 Meningeomen verschiedener Tumorgrade und histomorphologischer Subtypen mit Antikörpern gegen β -Catenin und E-Cadherin.

+: positive Immunreaktivität; -: negative Immunreaktivität; (+): schwache Färbung; *: fokal angefärbte Zellareale in den Gewebeschnitten; MI: Grad I-Meningeom; MII: Grad II-Meningeom; Rez.: Rezidiv; ara.: arachnoidal; fibro.: fibroblastisch; sekr.: sekretorisch; trans.: transitional; n.: normal; n.a.: nicht analysiert; del: Deletion; /: nicht invasiv.

Identifizierungsnummer der Meningeome	Tumorgrad / histomorphologischer Subtyp	IHC-Färbung mit β -Catenin Antikörper			IHC-Färbung mit E-Cadherin Antikörper	
		Zellmembran	Zytoplasma ohne Zellmembran	granuläre Cluster perinukleär und im Zytoplasma	Zellmembran	Zytoplasma ohne Zellmembran
H355	MI ara.	-	+	-	-	+
H362	MI ara.	-	+*	+	-	-
H372	MI ara.	-	+	+	+*	-
H374	MI ara.	-	+	+	+	-
H375	MI ara.	+*	-	+	+*	-
H403	MI ara.	-	+	+	+*	-
H413 (Rez.)	MI ara.	-	+	-	+	-
H446	MI ara.	-	+	+	-	+
H448	MI ara.	-	+	-	+*	-
H392	MI fibro.	-	+*	-	-	-
H395	MI fibro.	-	+	+	-	-
H398	MI fibro.	-	+*	-	-	(+)
H445	MI sekr.	+	-	+	+*	-
H497	MI sekr.	-	+*	-	+	-
H521	MI sekr.	-	+*	-	+	-
H376	MI trans.	-	+	+	+*	-
H480	MI trans.	-	+	+	-	-
H514	MI trans.	-	+	+	-	-
H350	MII	-	+	+	-	-
H365	MII	-	+*	+*	+*	-
H416	MII	-	+	-	+*	-
H419	MII	-	+	-	+*	-
H421	MII	-	+	+	+*	-
H427 (Rez.)	MII	+*	-	+	+	-
H429	MII	-	+	+	-	+
H444	MII	-	+	+	-	-
H449	MII	-	+	+	+*	-
H457	MII	+*	-	-	+	-
H469	MII	+	-	-	+	-
H490	MII	-	+	-	+*	-
H492	MII	-	+	+	+*	-
H500	MII	-	+	+	+	-
H526	MII	+	-	-	-	+
H533	MII	+	-	+	+	-
H386	MIII	-	+	-	-	+
H386 (Rez.)	MIII	+	-	+	+*	-
H451	MIII	-	+	+	+	-
H588	MIII	-	+*	+*	+*	-

Tab.11b: Zytogenetische Analyse von 38 Meningeomen verschiedener Tumorgrade und histomorphologischer Subtypen betreffend Chromosom 22-Aberrationen und Untersuchung der Invasivität der Tumoren.

MI: Grad I-Meningeom; MII: Grad II-Meningeom; Rez.: Rezidiv; ara.: arachnoidal; fibro.: fibroblastisch; sekr.: sekretorisch; trans.: transitional; n.: normal; n.a.: nicht analysiert; del: Deletion; / : nicht invasiv.

Identifizierungsnummer der Meningeome	Tumorgrad / histomorphologischer Subtyp	zytogenetische Aberrationen betreffend Chr. 22	Invasivität
H355	MI ara.	n.a.	/
H362	MI ara.	n.	/
H372	MI ara.	n.a.	/
H374	MI ara.	n.	/
H375	MI ara.	n.	/
H403	MI ara.	n.	/
H413 (Rez.)	MI ara.	n.a.	/
H446	MI ara.	n.a.	/
H448	MI ara.	n.	/
H392	MI fibro.	-22	/
H395	MI fibro.	n.a.	/
H398	MI fibro.	del(22)(q11) or -22	Ossale Invasion
H445	MI sekr.	-22	Dura-Invasion
H497	MI sekr.	n.a.	/
H521	MI sekr.	n.	/
H376	MI trans.	-22	/
H480	MI trans.	n.	/
H514	MI trans.	del(22)(q13)	/
H350	MII	-22	/
H365	MII	-22	Ossale Invasion
H416	MII	n.a.	Dura-Invasion
H419	MII	n.	/
H421	MII	-22	Ossale und Weichgewebe-Invasion
H427 (Rez.)	MII	-22	/
H429	MII	-22	/
H444	MII	-22	/
H449	MII	n.a.	Dura-Invasion
H457	MII	-22	/
H469	MII	n.	Dura-Invasion
H490	MII	-22	/
H492	MII	n.	/
H500	MII	n.	Dura-Invasion
H526	MII	-22	/
H533	MII	-22	/
H386	MIII	n.a.	Dura-Invasion
H386 (Rez.)	MIII	n.	Hirngewebe- Invasion
H451	MIII	-22	Hirngewebe- Invasion
H588	MIII	-22	Hirngewebe- Invasion

Alle sieben Meningeome ohne membranäre E-Cadherin-Immunreaktivität zeigten auch keinen β -Catenin-Nachweis an der Zellmembran. Hierzu zählten alle Fälle vom fibroblastischen Subtyp. Sieben von acht Meningeomen, die eine β -Catenin-Expression an der Zellmembran zeigten, wiesen auch membranäres E-Cadherin auf. Darüber hinaus war in 17 Meningeomen E-Cadherin ohne einen β -Catenin-Nachweis an der Zellmembran vorhanden.

Die zytogenetischen Analysen der Tumoren betreffend Aberrationen des Chromosoms 22 und der Neigung zur Invasivität sind in Tab.11b zusammengefasst. Die zytogenetische Analyse von Primärzellkulturen zur Identifizierung der Tumore mit Verlust eines Chromosoms 22 erfolgte für die Mehrheit der untersuchten Meningeome. Es gab keinen Hinweis auf eine Korrelation zwischen einem Chromosom 22-Verlust, welcher den Verlust eines Allels von *NF2* einschließt, und einer Veränderten Lokalisierung von β -Catenin und/oder E-Cadherin in Meningeomzellen.

Neben der Typisierung der Meningeome wurde das invasive Potential der Meningeome untersucht. Eine Invasion des umliegenden Hirngewebes war nur in drei der MIII-Meningeome vorhanden. Eine Korrelation der Invasivität mit einer spezifischen Färbung bezüglich β -Catenin/E-Cadherin ist nicht zu erkennen.

Zusammengefasst zeigten nur sieben der 38 Meningeome (18%) eine Expression von sowohl β -Catenin als auch E-Cadherin an der Zellmembran, und somit eine intakte Konstellation dieser für die Zell-Zell-Interaktion wichtigen Proteine. Es handelte sich um zwei der 18 MI-Meningeome, vier der 16 MII- und eines der vier MIII-Meningeome.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen der Meningeome zeigten das Fehlen von E-Cadherin an der Zellmembran in 34% der untersuchten Meningeome unterschiedlicher Tumorgade. Das Fehlen von membranärem β -Catenin wurde bei 79% der analysierten Meningeome festgestellt. Darüber hinaus lassen die Daten darauf schließen, dass ein Fehlen von membranärem β -Catenin häufiger bei MI-Meningeomen, als bei höhergradigen Meningeomen vorzukommen scheint. Die folgende Tabelle 12 gibt die Ergebnisse der Immunhistochemischen Analyse in einer Zusammenfassung wieder.

Tab.12: Zusammenfassung der Immunohistochemischen Analyse der β -Catenin- und E-Cadherin-Expressionen in Meningeomen verschiedener Tumorgrade.

	β-Catenin-Expression		E-Cadherin-Expression		
	positiv an der Zellmembran	positiv im Zytoplasma ohne Zellmembran	positiv an der Zellmembran	positiv im Zytoplasma ohne Zellmembran	negativ
Anteil an der Gesamtanzahl der analysierten Meningeome (38)	21% (8/38)	79% (30/38)	66% (25/38)	16% (6/38)	18% (7/38)
Anteil an den analysierten MI-Meningeomen (18)	11% (2/18)	89% (16/18)	56% (10/18)	16% (3/18)	28% (5/18)
Anteil an den analysierten MII-Meningeomen (16)	31% (5/16)	69% (11/16)	75% (12/16)	12% (2/16)	13% (2/16)
Anteil an den analysierten MIII-Meningeomen (4)	25% (1/4)	75% (3/4)	75% (3/4)	25% (1/4)	0% (0/4)

3.4.3 Analyse der subzellulären Lokalisation von β -Catenin in Meningeomen anhand von zellfraktionierten Meningeom-Primärzellkulturen

Die subzelluläre Lokalisation von β -Catenin wurde durch Western-Blot Analysen von zellfraktionierten Meningeom-Primärzellkulturen untersucht. Es wurde nur die Expression von β -Catenin untersucht. Die Expression von E-Cadherin wurde in Zelllysaten aus Primärzellkulturen nicht nachgewiesen (s. o.). Die Primärzellkultur erfolgte wie unter 2.9.1.5 beschrieben. Die Primärzellen wurden nicht länger als vier Passagen kultiviert, um den Charakter der Meningeomzellen zu bewahren. Es wurden Zellkulturen verwendet, die in möglichst niedriger Passage (P1 oder P2) gut angewachsen und in guter Verfassung weiter kultivierbar waren. Die Herstellung der Proteinlysate und die Durchführung der Zellfraktionierung mit anschließenden Analysen im Western-Blot erfolgten wie aufgeführt (siehe 2.6.1-2.6.3). Die verwendeten Antikörper, sowohl primäre, als auch entsprechende sekundäre, und die eingesetzten Verdünnungen sind unter 2.15.4 aufgelistet. Bei den

untersuchten Proben handelte es sich um Gesamtproteinlysate, postnukleären Überstand (Zytosol) der das Lysat ohne Kerne und Zellmembranen umfasst, Mitochondrien und Lysosomen, postmitochondrialen Überstand der das Lysat nach Abtrennung der Mitochondrien und Lysosomen umfasst, Nukleus- und Zellmembranfraktionen, sowie im Sukroedichtegradienten in die Zellorganellen Golgi, ER und Ribosomen aufgetrennten postmitochondrialen Überstand.

In den Western-Blot Analysen nach der Fraktionierung wurde β -Catenin in den Zellfraktionen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und des Golgi-Apparates nachgewiesen. Dies lässt auf die Lokalisation von β -Catenin in Kompartimenten des ER/Golgi Intermediate Compartment (ERGIC) schließen. Die Ergebnisse aus der Zellfraktionierung sind beispielhaft am Western-Blot der Proben des Meningeoms H392 dargestellt (Abb.38).

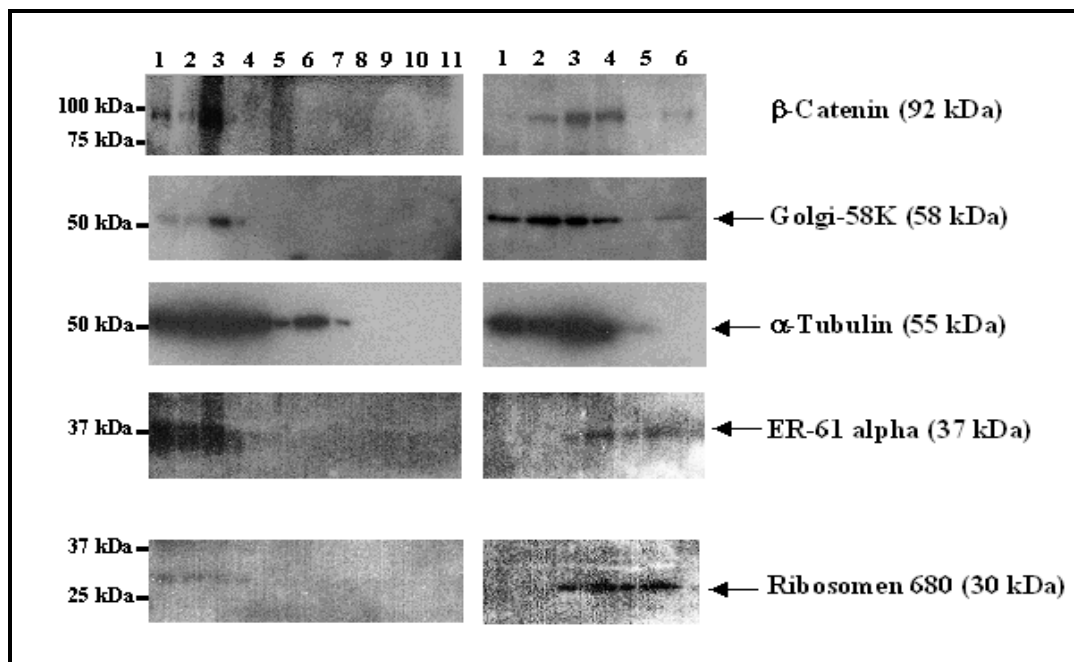


Abb.38: Zellfraktionierung von Zelllysaten aus Primärzellkultur des Meningeoms H392.

linke Seite: Tasche 1: Gesamtproteinlysate; Tasche 2: postnukleärer Überstand; Tasche 3: Mitochondrien, Lysosomen; Tasche 4: postmitochondrialer Überstand, Taschen 5-11: Nukleus- und Zellmembranen nach Fraktionierung durch Sucrosegradient;

rechte Seite: Taschen 1-6: postmitochondrialer Überstand, Fraktionen nach Sucrosegradient. Die Zellfraktionen wurden unter Verwendung von Antikörper gegen die folgenden Zellkomponenten detektiert: Golgi-, ER- (Endoplasmatisches Retikulum) und Ribosomen-Fractionen. α -Tubulin wurde als Kontrolle verwendet.

3.4.4 Immunfluoreszenz-Analyse zur Lokalisation der Proteine in Meningeom-Primärzellen

Es wurde eine Immunfluoreszenz-Analyse zur subzellulären Lokalisation der Proteine β -Catenin und E-Cadherin durchgeführt, um die Ergebnisse aus IHC und Zellfraktionierung zu bestätigen.

Primärzellen aus acht Meningeomen, darunter vier des Grades MI und vier des Grades MII, und HeLa-Zellen als Positivkontrollen wurden auf Deckgläsern kultiviert. Die Fixierung der Zellen und die Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgten wie unter 2.13 beschrieben.

Die vermutete Akkumulation von β -Catenin im Bereich des ER/Golgi Intermediate Compartment (ERGIC) wurde durch die IF überprüft. Die IF-Färbungen mit dem β -Catenin-Antikörper ließen auf eine Lokalisation des Proteins im Bereich der Golgi-Vesikel schließen. Ein zweiter Ansatz mit einem Golgi-Antikörper zeigte das gleiche Muster der Färbung. Doppelfärbungen der Zellen mit dem β -Catenin- und dem Golgi-Antikörper zeigten die Überlagerung der gefärbten Kompartimente.

Die Immunfluoreszenzfärbungen mit dem E-Cadherin-Antikörper zeigten keine spezifischen Anfärbungen der Zytoplasmamembranen, sondern Immunreaktivitäten im Zytoplasma der Meningeom-Primärzellen.

Abbildung 39 gibt als Beispiel die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen der Primärzellkultur des Meningeoms H376 mit den Antikörpern Anti- β -Catenin und Anti-Golgi wieder.

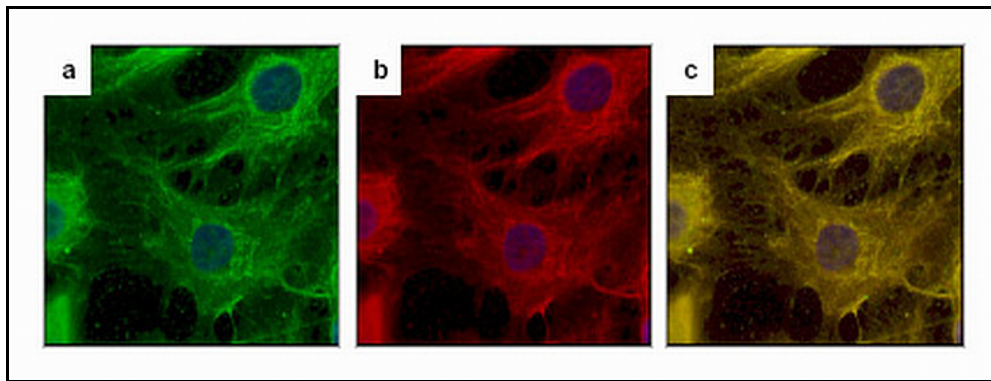


Abb.39: Immunfluoreszenzfärbung von Primärzellen des Meningeoms H376 (MI) mit β -Catenin-Antikörper und Golgi-Antikörper mit unterschiedlichen Sekundäntikörpern nach Methanol-Fixierung.

600-fache Vergrößerung.

- a. Immunreaktivität des β -Catenin-Antikörpers und eines grün fluoreszierenden Sekundäntikörpers.
- b. Immunreaktivität des Golgi-Antikörpers und eines rot fluoreszierenden Sekundäntikörpers.
- c. Doppelfärbung mittels β -Catenin- und Golgi-Antikörper zur Co-Lokalisation der Immunreaktivitäten.

Zusammenfassend zeigte die vorliegende Studie an Meningeomen für keinen der untersuchten Tumoren eine Lokalisation von β -Catenin im Zellkern. Das Fehlen von β -Catenin im Zellkern zeigt, dass der WNT-Signalweg in Meningeomzellen nicht aktiviert ist. Die Regulation der MGEA6-Expression über den WNT-Pathway wird daher ausgeschlossen.

Sowohl Immunfluoreszenz- als auch Western-Blot-Analysen lokalisierten β -Catenin überwiegend im Golgi-Apparat und im Endoplasmatic Reticulum/Golgi Intermediate Compartment (ERGIC).

Es konnte gezeigt werden, dass in etwa 80 % aller untersuchten Meningeome die Expression der Proteine β -Catenin und/oder E-Cadherin an der Zellmembran nicht vorhanden ist. Die fehlende Lokalisation dieser für das Zelladhäsionssystem bedeutenden Proteine lässt die Vermutung zu, dass hierdurch die Interaktion der Meningeomzellen untereinander unabhängig eines NF2-Verlusts und unabhängig vom Tumorgrad beeinflusst wird.

4 Diskussion

4.1 Analyse der Antikörperbindung gegen MGEA6 zur Eingrenzung der immunogenen Proteinregion

Die zellbiologischen Vorgänge, die der Immunogenität von Antigenen zu Grunde liegen, sind bisher noch wenig geklärt. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, warum Proteine vom körpereigenen Immunsystem als Antigene erkannt werden und zu einer Immunreaktion führen. Unter den Antigenen gibt es die folgenden Gruppen:

Die *organspezifischen Differenzierungsantigene* finden sich nicht nur in den Tumoren eines Gewebes, sondern auch als Oberflächenmarker der Zellen des Normalgewebes. Eine Überexpression im Tumorgewebe im Vergleich zum entsprechenden Normalgewebe wäre ein Ansatz für Immuntherapien mit Differenzierungsantigenen als Zielantigene.

Häufiger Auslöser für Immunantworten sind *Tumorantigene* welche durch Genmutationen entstanden sind. Diese Antigene werden auf Grund der spezifischen Lokalisation der Mutation nur in den individuellen Tumoren exprimiert. Es können jedoch auch Genprodukte von Transkripten alternativer Transkriptionsstarts oder Leserahmen erkannt werden [Koslowski, 2002].

Im Vergleich zu Tumorantigenen werden *Cancer/Testis-Antigene* (CT-Antigene) in Tumoren verschiedenster Histologie, so häufig in Melanomen, und in Testisgewebe exprimiert, jedoch nicht in anderen Normalgeweben. Die Expression in Testisgewebe lässt sich darauf zurückführen, dass hier keine MHC Klasse-I und -II Moleküle vorliegen, wodurch die Zellen für eine Immunantwort über T-Zellen nicht disponiert sind. Die Gruppe der CT-Antigene umfasst unter anderem bekannte Vertreter aus den Genfamilien *MAGE* (Melanoma-Associated Antigen) [Lucas et al., 2000] und *GAGE* (G Antigen) [De Backer et al., 1999], das B-Melanoma Antigen *BAGE* [Boel et al., 1995] oder das autoimmunogene CT-Antigen *NY-ESO-1* [Jaeger et al., 1998 und 2000; Smith and Cerundolo, 2001; Scanlan et al., 2002 und 2004; Eichmüller et al., 2002 und 2003].

In einer SEREX-Analyse wurde das *Meningeom-exprimierte Antigen 6 (MGEA6)* identifiziert [Heckel et al., 1997 + 1998]. Der Nachweis der Antikörperantwort wurde mit Serum eines Patienten, der ein arachnoidales Meningeom mit unauffälligem, diploidem Chromosomensatz aufwies, erbracht. In Serum von Gesunden und von Patienten mit anderen Tumoren, wie Glioblastomen, pilozytischen Astrozytomen, Neurinomen und Squamous Cell Lungenkarzinomen, wurden keine Antikörper gegen MGEA6 gefunden. Dies ließ die Annahme eines oder mehrerer immunogener Antigene bei Meningeomen zu, welche durch die humorale Immunantwort zur Generierung von Antikörpern führen.

Eine Antikörperantwort gegen MGEA6 eindeutig auf eine Mutation im Exon-Bereich zurückzuführen wurde in einer Mutationsanalyse des ORF von MGEA6-cDNA aus Meningeom-Tumorproben sowie aus cDNA von gesunden Kontrollpersonen ausgeschlossen werden. Die hier gefundenen vier Basenaustausche traten in den cDNAs beider Gruppen gleichermaßen auf. Es handelt sich vermutlich um noch nicht niedergelegte SNPs in der MGEA6-Sequenz oder um Mutationen, die trotz Basenaustausch in zwei Positionen und daraus folgendem Aminosäureaustausch keine Immunantwort zur Folge haben [eigene Daten, nicht veröffentlicht].

Im Falle von MGEA6 besteht eine Möglichkeit darin, dass eine humorale Immunantwort durch dieses auch in unterschiedlichen Normalgeweben exprimierte Protein dadurch ausgelöst wird, dass es im Tumor überexprimiert wird [Comtesse et al., 2002]. *Überexprimierte Antigene* werden in einer Reihe von Normalgeweben gering exprimiert und in Tumoren überexprimiert [Renkvist et al., 2001; Novellino et al., 2005]. Die Transkription von MGEA6, seiner Splicevariante MGEA11 und weiteren MGEA6-homologen Sequenzen dieser Genfamilie wurde in Meningeomgeweben sowie in verschiedenen menschlichen Geweben, wie Niere, Skelettmuskulatur und Hirngewebe, mittels Northern-Blot-Analysen und RT-PCR-Analysen nachgewiesen [Heckel et al., 1997; Comtesse et al., 2001]. Es handelt sich somit nicht um ein meningeomspezifisches Protein, jedoch wurde eine Antigenität nur in Tumorpatienten nachgewiesen. Antikörper gegen die rekombinant exprimierten Proteine MGEA6 und MGEA11 wurden in einer Studie in 41,7% der untersuchten Seren von Meningeompatienten gefunden. Eine zweite, davon unabhängige Studie, bestätigte dieses Ergebnis mit einem Wert von 38,5% [Daten nicht veröffentlicht]. Die Antigenität korreliert nicht mit dem Tumorgrad oder dem histomorphologischen Subtyp der Tumoren. Darüber hinaus wurden auch Antikörper in

Seren von Glioblastompatienten und einem Astrozytom Grad II-Patienten, nicht jedoch in Seren von Patienten mit anaplastischen- bzw. pilozytischen Astrozytomen und von 12 gesunden Personen nachgewiesen. Diese Daten zeigten die Induktion einer Antikörperantwort in Meningeom-Patienten und Patienten mit diffusen Gliomen. Eine Korrelation der Überexpression mit der Induktion einer Antikörperantwort in dem gleichen Gewebe kann allerdings nicht bestätigt werden. Des Weiteren wurde mittels Western-Blot-Analysen und IHC-Analysen an Gefrierschnitten von Meningeomen eine erhöhte Expression dieser Proteine in Meningeomen aller drei WHO-Grade und in diffusen Gliomen im Vergleich zu normalem Hirngewebe gezeigt. Die erhöhte Expression könnte sich auf Tumoren neuroectodermalen Ursprungs beziehen [Comtesse et al., 2002].

Die vorliegende Analyse befasste sich mit der Eingrenzung der antigenen Proteinregion von MGEA6 und umfasst Ergebnisse aus Western-Blot- und ELISA-Immunassays zur Antikörperbindung gegen MGEA6 und MGEA6-Teilproteine.

Die positiven Antikörperreaktionen von Meningeomseren im ELISA wurden im Western-Blot bestätigt. Die Analyse zeigte, dass die Serumantikörper den Aminoterminus und den internen Proteinbereich in gleichem Maße binden. Keines der untersuchten Seren, weder der Meningeompatienten, noch des Glioblastom- oder der Schlaganfallpatienten zeigte eine Antikörperbindung an den carboxyterminalen Proteinbereich. Im Vergleich zur Antikörperreaktivität gegen das MGEA6-Volllängenprotein, war die Reaktivität der aminoterminalen und der internen Proteinregion jedoch wesentlich schwächer. Eine Rolle linearer Epitope des Carboxyterminus für die Antigenität kann ausgeschlossen werden. Dies bedeutet, dass die Bindung der Antikörper nicht nur gegen ein bestimmtes lineares Epitop, sondern gegen mehrere Epitope oder ein Konformationsepitop des Proteins gerichtet ist.

Dieses Ergebnis wird durch methodische Faktoren beeinflusst. Die verwendeten Methoden wurden gewählt, um durch die Anlagerung der Antikörper an die lineare Proteinsequenz spezifisch eine Sequenzregion eingrenzen zu können. Die Methoden haben verschiedene technische Aspekte, die im Folgenden genauer betrachtet werden.

Als Western-Blot (Immunoblot) wird die Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran unter nativen oder denaturierenden Bedingungen bezeichnet. Unter nativen Bedingungen wird das Laufverhalten der Proteine durch ihre Sekundär- und Tertiärstrukturen beeinflusst. Unter Verwendung von denaturierenden und reduzierenden

Agenzien werden Sekundär- und Tertiärstrukturen aufgelöst. Im SDS-Polyacrylamid-Gel werden die Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und denaturiert auf eine Membran übertragen. Das in Gel und Puffer vorhandene SDS kann durch Waschen der Membranen zum Großteil wieder entfernt werden, wodurch die Proteine renaturieren und ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wiedererlangen. Eine Quartärstruktur kann durch das Auftrennen der denaturierten Proteine jedoch nicht wieder erreicht werden [Renart et al., 1979]. Mittels denaturierendem Western-Blot, wie er in der vorliegenden Analyse durchgeführt wurde, werden somit Antikörperbindungen gegen linearisierte Proteinsequenzen (Primärstruktur) nachgewiesen.

Der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Proteine werden über Antikörper oder mittels eines angehängten Tags an die Trägermatrix fixiert. Die Proteine werden von Antikörpern, beispielsweise aus Serum, gebunden. An diese primären Antikörper binden enzymgekoppelte Sekundärantikörper. Nach Zugabe eines Chromogens erfolgt eine enzymatische Farbreaktion, welche mittels eines Photometers gemessen wird. Der Vorteil dieses Assays besteht darin, dass die Intensität der entstehenden Farbe proportional zu der Konzentration des zu bestimmenden Antikörpers in der Probe ist. Aber auch mit dieser Methode können Konformationsepitope der Proteine nicht gebunden werden.

Es stellt sich bisher die Frage, ob MGEA6 über MHC-Klasse-I bzw. MHC-Klasse-II-Komplexe an der Zelloberfläche präsentiert und durch die zellvermittelte Immunabwehr erkannt wird, oder ob das Protein im Zuge von apoptotischen oder nekrotischen Prozessen abgebaut und aus der Zelle geschleust wird, um von Antikörpern gebunden zu werden. Weitere Untersuchungen zur Definierung der immunogenen Proteinregion und der MGEA6-Struktur könnten durch FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)- oder BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer)-Analysen erfolgen. Bei diesen Verfahren wird Energie eines angeregten Fluoreszenzfarbstoffs (Donor-Fluorophor) strahlungsfrei über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf einen zweiten Fluoreszenzfarbstoff (Akzeptor-Fluorophor) übertragen. Die Intensität des Energietransfers hängt unter anderem vom Abstand der beiden Fluorophore ab und kann somit als „optisches Nanometermaß“ dienen. Die Detektion kann im Fluoreszenzmikroskop oder einem Fluorimeter erfolgen und erlaubt auch die Untersuchung von Proteinen in lebenden Zellen. Gemessen wird zum einen die reduzierte Emissionsintensität des Donor-Fluorophors und zum anderen die entsprechend

erhöhte Emissionsintensität des Akzeptor-Fluorophors. Aus den gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten kann der Abstand der beiden Fluorophore berechnet werden. Durch die Kopplung von Donor- und Akzeptor-Fluorophor an das selbe Molekül kann eine Veränderung des FRET-Signals Aufschluss über die Änderung der Schwingungsebenen und damit der Lage beider Fluorophore zueinander geben. Hierdurch ist die Vermessung von Konformationsänderungen unter Erhalt der Quartärstruktur von Proteinen möglich. Dies ermöglicht zum einen die genaue Lokalisation von MGEA6 in der Zelle, zum anderen die Detektion von an das Protein bindenden Antikörpern. Bindungsstellen und immunogene Epitope in der Gesamtstruktur könnten somit genauer untersucht und ein Vergleich von Meningeomzellen zu normalen Zellen (z. B. Fibroblasten) durchgeführt werden. Dies würde durch eine Co-Färbung von MGEA6 und der gegen MGEA6 gerichteten humanen endogenen Antikörper erfolgen. Durch diese Art der Lokalisation könnte auch die Frage nach dem Ort der Erkennung der Proteine durch die Antikörper analysiert werden.

Zusammenfassend lässt sich aus der vorliegenden Analyse schließen, dass die Bindung der Antikörper nicht nur gegen ein bestimmtes lineares Epitop, sondern gleichermaßen gegen Epitope des aminoterminalen und des internen Proteinbereichs gerichtet ist. Eine Rolle linearer Epitope des Carboxyterminus für die Antigenität kann ausgeschlossen werden. Es kann angenommen werden, dass die Antikörperantwort gegen mehrere Epitope oder ein Konformationsepitop des Proteins gerichtet ist.

4.2 Nachweis von MGEA6-Proteininteraktionen *in vitro*

Die im Yeast-Two-Hybrid-Screening identifizierten Proteininteraktionen zwischen MGEA6 und drei putativen Bindungspartnern wurden mittels Co-Immunpräzipitation überprüft. Bei den Bindungspartnern handelte es sich um die Proteine BAIAP2 (Brain Angiogenesis Inhibitor 1-Associated Binding Protein 2, Transcript Variant 1, IRSp53), KIBRA (WW and C2 Domain Containing 1, WWC1) und SPTAN1 (Spectrin alpha, Alpha-Fodrin, non-erythrocytic 1). Die vorliegende Proteininteraktionsanalyse bestätigte die Proteinbindungen von MGEA6 mit den Proteinen BAIAP2 und KIBRA. Die Interaktionen dieser Proteine wurden somit mit zwei unabhängigen Verfahren *in vitro* nachgewiesen. Die Interaktion von MGEA6 mit SPTAN1 wurde in der vorliegenden Analyse nicht verifiziert.

Die Methode der Immunpräzipitation (IP) ermöglicht nahezu *in vivo*-ähnliche Versuchsbedingungen, da die Expression der Proteine in eukaryotischen Zellen erfolgt und somit posttranslationale Modifikationen, wie z. B. Glykosilierungen oder Proteinfaltung der Proteine ermöglicht werden.

Um genauere Aussagen über die Wahrscheinlichkeit von Interaktionen zwischen Proteinen machen zu können, ist die Betrachtung der Proteinstruktur von enormer Bedeutung. Durch Strukturanalysen und Vorhersagen von Proteindomänen sind bisher schon eine Vielzahl Domänen identifiziert worden, die bei der Interaktion von Proteinen eine Rolle spielen. Zu ihnen gehören z. B. WW-, SH2 oder SH3-Domänen [Lee et al, 1998; Pawson et al., 2002]. Der Nachweis solcher Proteinstrukturen kann Hinweise über die Wahrscheinlichkeit geben, ob ein Protein in der Lage ist an andere Proteine zu binden, und ist somit ein verlässliches Mittel, um Proteine die an Zellstrukturen und Transduktionswegen beteiligt sind zu erkennen.

Die in der vorliegenden Analyse untersuchten Proteine weisen alle solche für Proteininteraktionen wichtigen Strukturen auf und werden im Folgenden genauer betrachtet.

Die Struktur von MGEA6 wurde mittels Hydrophobizitäts-Analysen der Aminosäuresequenz von Comtesse et al. [2002] untersucht. Auf Grund dieser Ergebnisse

konnte eine Transmembrandomäne (TM-Domäne) am Aminoterminus des Proteins lokalisiert werden (As 41-61), eine zweite TM-Domäne wurde vermutet. Der mittlere Proteinteil weist zwei Coiled-Coil-Domänen auf, wobei die erste (As 115-261) zusätzlich eine Leucin-Zipper-Struktur aufweist (zweite Coiled-Coil-Domäne: As 322-496). Der Carboxyterminus ist sehr prolinreich.

Der Vergleich der Proteinstruktur mit bekannten Proteinfamilien ergab eine Homologie zum C219-reactive-Peptide, einem MDR1 ähnlichen P-Glykoprotein, welches zur Gruppe der ATP-getriebenen Membranpumpen gehört, und zur V-type-ATPase116kDA-subunit-Familie, welche als Protonenpumpen am Membrantransport beteiligt sind. Weitere Homologien bestehen zu Neuropeptid-Rezeptoren mit Ähnlichkeit zu CCK-BR (Gastrin/Cholecystokinin Type B Rezeptor), der zur Myosin Tail-Familie gehört.

Betrachtet man also die Strukturvorhersage von MGEA6, so ergibt sich die Vermutung einer Rezeptorfunktion als membranäres Protein oder eine Beteiligung an der Ausbildung von Membrankanälen. Da Coiled-Coil-Strukturen bekanntermaßen an proteinbindenden Regionen beteiligt sind, lässt dies auf eine Interaktion mit anderen Proteinen schließen. Die prolinreiche Region weist auf eine mögliche Beteiligung an Signaltransduktionswegen hin, für die Interaktionen mit verschiedenen Strukturen, wie z. B. WW-Domänen, beschrieben sind [Macias et al., 1996 und 2002]. Die membranäre Lokalisation von MGEA6 wurde durch Sequenzanalysen und Zellfraktionierungsexperimente überprüft und bestätigt. Sowohl Analysen an TX3868-Glioblastom- und primären Meningeomzelllinien mittels Immunfluoreszenzfärbungen als auch Immunhistochemische Färbungen von Meningeom-Kryogewebeschnitten und Tumoren glialen Ursprungs ergaben keine spezifischen Färbungen in Zellkernen. Die Färbungen zeigten ein teilweise perinukleäres und teilweise zellmembranäres globuläres Muster. Nur schwach bzw. gar nicht konnte MGEA6 in normalen Astrozyten und Leptomeningen detektiert werden [Comtesse et al., 2002].

Die Struktur von MGEA6 weist auf eine mögliche Beteiligung an Signaltransduktionswegen hin, woraus sich die Frage nach Bindungspartnern und Proteineninteraktionen von MGEA6 stellt. Bisher sind die Kenntnisse der Zusammenhänge die Meningeomentstehung, Tumorwachstum und Gewebeeinfiltration beeinflussen, wie z. B. wachstumsregulierende Signaltransduktionswege und anti-apoptotische Signalwege, sehr unvollständig [Johnson and Toms, 2005]. So ist auch für MGEA6 noch keine Proteininteraktion oder ein Signalweg an dem dieses Protein beteiligt ist beschrieben.

Bisherige Studien unterstreichen die Bedeutung von Proteinen, die Coiled-Coil-Motive aufweisen. Vermutlich weisen etwa 10 % der Proteine eines Organismus solche Strukturen auf [Liu and Rost, 2001], die in kurze und lange Coiled-Coil-Domänen unterschieden werden. Kurze Coiled-Coil-Domänen werden häufig in Transkriptionsfaktoren gefunden. Es handelt sich um sogenannte Leucin-Zipper-Motive, die aus sechs oder sieben Heptaden-Wiederholungen bestehen und als Homo- oder Heterodimere vorliegen [Burkhard et al., 2001; Jakoby et al., 2002; Vinson et al., 2002]. Langen Coiled-Coil-Domänen wird eine entscheidende Bedeutung für die räumliche Struktur von Zellen und für den Ablauf von zellulären Prozessen zugeschrieben. Sie sind an den verschiedensten zellulären Prozessen beteiligt, führen Funktionen des Proteintransports und der Lokalisierung von Proteinen in der Zelle aus oder wirken bei der Regulation von Signaltransduktionswegen mit. Ihre Länge kann bis zu mehrere hundert Aminosäuren betragen. Zu ihnen gehören Golgine, Myosine, Lamine, Dyneine, Kinesine und Filament-Proteine [Strelkov et al., 2003; Schliwa and Woehlke, 2003; Barr and Short, 2003]. Sie sind weitgehend am Aufbau von Zellstrukturen wie Mikrotubuli, Zentrosomen, Zentromeren oder der Kernhülle beteiligt. Ihre Funktionen umfassen die Beteiligung an der Proteinfaltung, am Aufbau des Spindelapparates und an der Stabilisierung von Komponenten der Signaltransduktion wie Calmodulin, Proteinkinasen A und C [Fava et al., 1999; Takahashi et al., 1999, 2000, 2002; Witczak et al., 1999; Flory et al., 2000; Li et al., 2000; Moiso et al., 2002; Sillibourne et al., 2002]. Zytoplasmatische Coiled-Coil-Proteine spielen eine Rolle bei der Organisation und dem Aufbau von Membransystemen.

Die prolinreiche Region des Carboxyterminus unterstreicht ebenfalls die Wahrscheinlichkeit von Proteininteraktionen des MGEA6-Proteins mit anderen Proteinen. Analysen von Proteinen, die WW-Domänen aufweisen, zeigten eine Affinität dieser Strukturen zu prolinreichen Aminosäuresequenzen [Macias et al., 1996 und 2002; Ranganathan et al., 1997].

Bei WW-Domänen handelt sich um 30-40 As umfassende Sequenzen, die zwei konservierte Tryptophanreste mit einem bestimmten Abstand zueinander aufweisen [Sudol, 1996]. Sie kommen in Proteinen unterschiedlicher Funktionalitäten vor, wie z. B. in Proteinen die bei der Proteindegradierung, der Transkriptionsregulation, dem Splicen von RNA oder der Proteinaggregation eine Rolle spielen. Hierbei handelt es sich sowohl um im Zytoplasma als auch in der Kernmembran lokalisierte Proteine. Von Bedeutung ist die Charakterisierung

solcher WW-Strukturen aufweisender Proteine deshalb, weil für einige dieser Proteine die direkte oder indirekte Mitwirkung an Signaltransduktionswegen nachgewiesen wurde. Für manche dieser Pathways konnten Veränderungen der Signaltransduktion festgestellt werden, so z. B. bei der Alzheimer Erkrankung, der Muskeldystrophie oder Krebs [Einbond et al., 1996; Sudol et al., 2001; Ilsley et al., 2002]. Aus der Struktur und Funktionalität von WW-Domänen ergibt sich eine funktionelle Ähnlichkeit zu SH3-Domänen (Src-homology 3) [Ren et al., 1993; Chen and Sudol, 1995; Chan et al., 1996; Macias et al., 2002]. Es handelt sich um 50-60 As lange Domänen, die eine prolinreiche Sequenz enthalten. SH3-Domänen sind in verschiedenen Proteinen des Zytoskeletts enthalten. Es wird vermutet, dass es sich um Moleküle handelt, die für unterschiedliche Funktionen wichtig sind, wie die intrazelluläre Signaltransduktion, Membran-Zytoskelett-Interaktionen, die subzelluläre Lokalisation von Proteinen oder die Zellpolarisation [Musacchio et al., 1992; Cohen et al., 1995; Pawson et al., 1995].

Die in dieser Analyse als Bindungspartner von MGEA6 untersuchten Proteine weisen verschiedene dieser Proteinerkennungssequenzen auf und werden im Folgenden genauer betrachtet:

Das Protein KIBRA (WWC1), dessen Gensequenz auf Chromosom 5q34 lokalisiert ist, wurde von Kremerskothen et al. [2003] als ein neues Protein mit WW-Domänen-Struktur charakterisiert. Es beinhaltet zwei WW-Domänen im aminoterminalen Proteinbereich (As 7-39 und As 54-86). Die cDNA dieses Proteins wurde in einem Yeast-Two-Hybrid-Screening identifiziert und als Bindungspartner des humanen Dendrin (KIAA0749) nachgewiesen. Seine Struktur weist neben den WW-Domänen eine interne C2-ähnliche Domäne (As 726-787) und eine glutaminreiche Sequenz (As 845-868) des Carboxyterminus auf (Abb.40). Bei C2-Domänen handelt es sich um Calcium-abhängige Bindungsmotive von Lipiden oder Proteinen, die häufig bei Proteinen der Signaltransduktion und des Membrantransports vorkommen [Rizo and Sudhof, 1998]. Es wurden weitere Untersuchungen zur Struktur und Lokalisierung des Proteins gemacht. Die Ergebnisse von Interaktionsstudien zeigten, dass die Bindung über die erste der beiden WW-Domänen an PPxY-Motive erfolgt. Bei PPxY handelt es sich um ein Motiv aus zwei Prolinen (P), einem Tyrosin (Y) und einer beliebigen Aminosäure (x) [Einbond et al., 1996]. Die Expression von KIBRA wurde mittels einer Northern-Blot-Studie überwiegend für Niere und

Hirngewebe nachgewiesen. Da das etwa 125kDa große, hydrophile Protein weder längere hydrophobe Regionen noch Signalsequenzen aufweist, die es als Membranprotein erkennbar machen würden, wurde es als zytoplasmatisches Protein deklariert. Die zytoplasmatische Lokalisierung in der Zelle und der Nachweis perinukleärer Ansammlungen des Proteins erfolgte durch den Nachweis des Myc-getagten Volllängenproteins in Affennierenzellen (CV1) und den Nachweis des endogenen KIBRA-Proteins in Western-Blot-Analysen von Zytosolextrakten bzw. in Immunfluoreszenz-Analysen. Die Untersuchung eines verkürzten Proteins ohne die Region der WW-Sequenzen ergab keine veränderte Lokalisation des Proteins. Die WW-Domänen und auch die Interaktion mit Liganden über sie scheinen für die Proteinlokalisierung somit keine Rolle zu spielen. Kremerskothen et al. vermuteten auf Grund der Bindung an das Zytoskelett-bindende Dendrin eine strukturelle Rolle für KIBRA. Weitere Funktionen von KIBRA zeigten bisherige Analysen zu Interaktionspartnern. Kremerskothen et al. (2004) zeigten die Bindung an die Proteinkinase C zeta (PKCzeta), welche für die Synapsenplastizität eine Rolle spielt. KIBRA wird in diesen Studien als Substrat der PKCzeta nachgewiesen und scheint über deren Phosphorylierung reguliert zu werden. Nach weiteren Studien konnte KIBRA als Bindungspartner des Proteins Dynein Light Chain 1 (DLC1) eine wichtige Funktion als Co-Aktivator dieses Proteins zugeordnet werden. Dieser Proteinkomplex ist vermutlich entscheidend an der Estrogenrezeptor alpha (ER)-Transaktivierung in Brustkrebszellen beteiligt [Rayala et al., 2006].

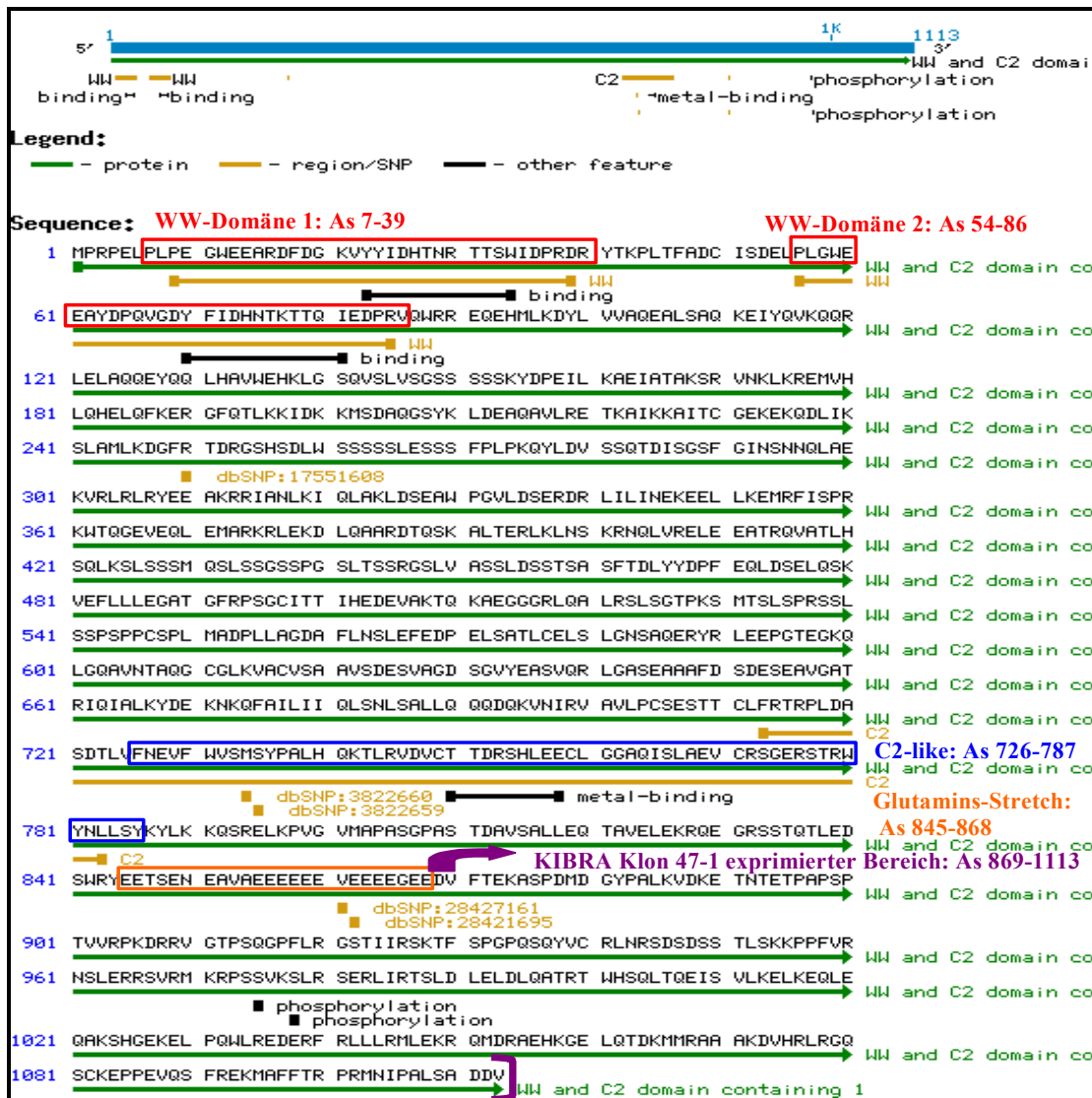






Abb.40: Referenzsequenz KIBRA (WWC1; Homo sapiens WW and C2 domain containing 1; NP_056053)

-  : exprimierter Bereich KIBRA Klon 47-1; As 869-1113;
-  : WW-Domänen: 1: As 7-39; 2: 54-86  : C2-ähnliche Domäne: As 726-787
-  : Glutaminsäure-Stretch: As 845-868

Der in der vorliegenden Analyse exprimierte Sequenzbereich, entsprechend dem im Yeast-Two-Hybrid-Screening verwendeten Klon 47-1, enthält nur das carboxyterminale KIBRA-Protein (violetter Pfeil, Abb.40). Wie in der Abbildung dargestellt, enthält dieser Proteinbereich keine der erwähnten Domänen des KIBRA-Proteins. Die erste Aminosäure die exprimiert wird (As 869) beginnt genau nach der letzten Aminosäure des Glutaminsäurestretches (As 868). Die Proteininteraktion zwischen KIBRA und MGEA6 scheint somit weder über eine der WW-Domänen, noch über die Strukturen der C2-

ähnlichen Region oder den Glutaminsäure-Stretch zu erfolgen. Die zellulären Lokalisationen der Proteine MGEA6 und KIBRA, welche beide zytoplasmatisch und perinukleär in der Zelle lokalisiert wurden, unterstützen die Interaktion beider Proteine. Die Beteiligung an Signaltransduktionswegen und ob MGEA6 in Verbindung mit KIBRA ebenfalls eine strukturelle Rolle in der Zelle spielt, ist noch offen. Für die Beantwortung dieser Fragen bieten sich weitere Analysen in Meningeomzellen als auch in gesunden Kontrollzellen, z. B. Fibroblasten, an. Die Lokalisierung der Proteine in Zellkulturen *in vivo* ist hierfür erforderlich. Die Analyse mittels FRET unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen MGEA6 und KIBRA könnte genauere Aussagen ermöglichen. Für die Immunfluoreszenz-Analysen ist bisher jedoch kein verwendbarer Antikörper gegen KIBRA vorhanden. Der von Kremerskothen et al. hergestellte Antikörper gegen das KIBRA-Vollängenprotein zeigte nur Reaktivitäten im Western-Blot, nicht jedoch in der IF.


BAIAP2 (IRSp53) als Zweites der Proteine, für welches die Bindung mit MGEA6 bestätigt wurde, weist ebenfalls eine der beschriebenen Proteinstrukturen auf. Es handelt sich um eine SH3-Domäne (As 378-435) im carboxyterminalen Bereich, welche strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zu Coiled-Coil-Domänen aufweist. Das in der vorliegenden Studie exprimierte Protein entspricht dem Klon 52-2 aus dem Yeast-Two-Hybrid-Screening. Es handelt sich um das Vollängenprotein der BAIAP2 Transkriptvariante 1 (As1-521; Abb.41).

Oda et al. (1999) identifizierten BAIAP2, dessen Gensequenz auf Chromosom 17q25 lokalisiert ist, als Interaktionspartner von BAI1 (Brain Angiogenesis Inhibitor 1) und wiesen die Bindung über die SH3-Domäne an das prolinreiche zytoplasmatische Fragment von BAI1 *in vitro* nach.



Abb.41: Referenzsequenz BAIAP2 (Homo Sapiens BAI1-associated protein 2 isoform 1; NP_059344).

 : exprimierter Bereich BAIAP2 Klon 52-2; As 1-521;

 : SH3-Domäne: 1: As 378-435.

BAI1 wurde ursprünglich als p53-Zielgen nachgewiesen und überwiegend in Hirngewebe exprimiert. Funktionsstudien seiner extrazellulären Domänen führten zum Nachweis, dass es die Angiogenese hemmt. Es wurde vermutet, dass es sich um ein multifunktionales Protein handelt, dass extrazelluläre Signale an interzelluläre Signaltransduktionskaskaden weiterleitet [Nishimori et al., 1997]. Es weist eine sehr hohe Homologie zur Hamster Insulinrezeptor-Kinase IRSp53/58 auf und wurde in Northern-Blot-Analysen als hauptsächlich in Neuronen aktiv nachgewiesen. Darüber hinaus zeigten IF-Analysen, dass BAIAP2 an der Zytoplasmamembran lokalisiert vorliegt, wenn es mit BAI1 in COS-7-Zellen co-exprimiert wurde und komplexiert ist. Ungebunden kommt es diffus in Zytoplasma und Nukleus vor. Dies unterstreicht die Ergebnisse, dass BAIAP2 mit BAI1 in intakten Zellen interagiert [Oda et al., 1999]. Weitere Studien zeigten die Interaktion des Proteins mit dem Genprodukt des Dentatorubral-Pallidolusian Atrophy-Gens (DRPLA)

und entdeckten vier verschiedene Isoformen des Proteins, welche unterschiedliche Phosphorylierungen und Gewebeverteilungen zeigten [Okamura-Oho et al., 1999 und 2001; Miyahara et al., 2003].

Darüber hinaus wurde es als Regulator des Aktin-Zytoskeletts nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass es über die Verbindung von Rac (GTPase der Rho-Familie) und WAVE2 (Wiskott-Aldrich syndrome family Verprolin-homologous Protein 2) an der Ausbildung von Lamellipodien und über die Interaktion mit Cdc42 (GTPase der Rho-Familie) und Mena (Mammalian Enabled) an der Ausbildung von Filopodien in Zellen beteiligt ist [Miki et al., 2002; Yamagishi et al., 2004; Millard et al., 2005; Suetsugu et al., 2006; Mattila et al., 2007]. Über die Interaktion mit Rac und WAVE ist eine Funktion zur Stabilisierung von Zellkontakten gegeben. Die Zusammenhänge sind in den Pathways der KEGG-Datenbank anschaulich dargestellt.

Für BAIAP2 sind bisher Beteiligungen an folgenden Pathways bekannt:

- Adherens junction (KEGG pathway: 04520)
- Regulation of actin cytoskeleton (KEGG pathway: 04810)
- Dentatorubropallidolusian atrophy (DRPLA) (KEGG pathway: 05050)

Auch für die Interaktion von BAIAP2 mit MGEA6 ist die Verifizierung der Proteinbindung *in vivo* erforderlich. Die Proteininteraktion mit diesem BAI1-interagierenden Protein und seine vermutlichen Funktionen bei der Signaltransduktion unterstreichen jedoch die möglichen Funktionen von MGEA6, eine Beteiligung an Signaltransduktionswegen, Membrankanälen oder eine Rezeptorfunktion dieses Proteins.

Die Proteininteraktion mit Spectrin alpha (SPTAN1; alpha Fodrin, non-erythrocytic 1; chromosomale Lokalisation: 9q33-q34) wurde in der vorliegenden Studie nicht bestätigt.

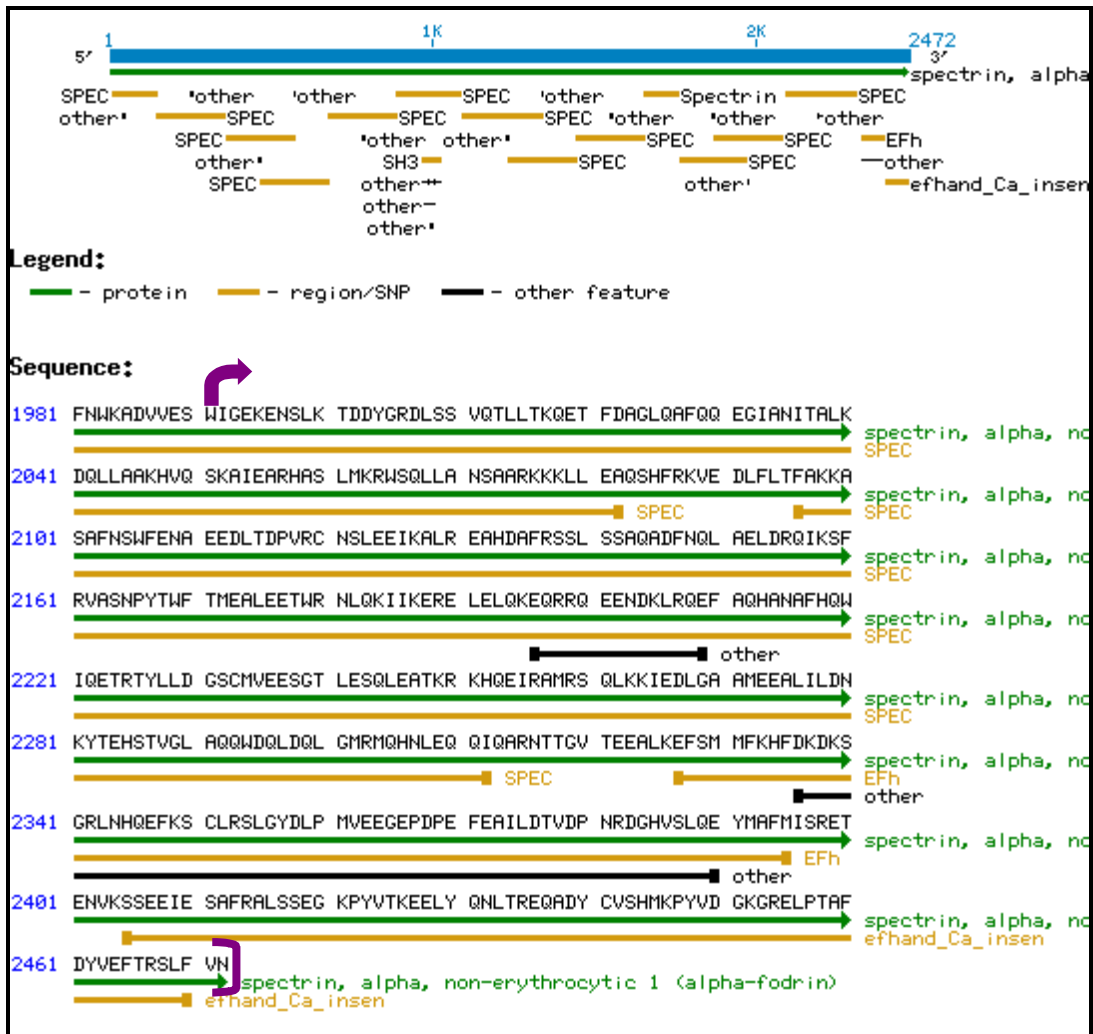


Abb.42: Referenzsequenz SPTAN1 (Homo Sapiens Spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin); NP_003118)

 : exprimierter Bereich SPTAN1 Klon 6-4; As 1992-2472.

Bei SPTAN1 handelt es sich um ein Strukturprotein, welches im Zellkern identifiziert wurde und an der DNA-Reparatur beteiligt ist. Darüber hinaus wird ihm eine Beteiligung am Tight junction-Pathway (KEGG pathway: 04530) zugeschrieben, wo es bei der Stabilisierung von Zellkontakten und bei der stabilen Verankerung von Transmembranproteinen und Zelladhäsionsmolekülen eine Rolle spielt. Diese Funktion wurde durch Studien zur Bindungsstärke und zur Tetramerisierung der Spectrine alpha und beta-I sowie alpha und beta-II bekräftigt. Die nicht-erythrozytischen Spectrine alpha und beta-II in Hirngewebe formen besonders stabile Tetramerkomplexe, die für die Zell-Zell-

Interaktion und die Stabilisierung der Zellbindung sorgen [Benett et al., 1982; Bignone and Baines, 2003]. Weitere Analysen zeigten die genaue Interaktion der Proteine und die Bildung von Dimeren aus alpha und beta-II-Spectrinen, die anschließend zu Tetrameren angeordnet werden [Bignone et al., 2007].

Eine Unterexpression dieses Proteins ist an der Entstehung der Fanconi Anämie beteiligt [McMahon et al., 1999]. Auch spielt es eine Rolle als Autoantigen beim Primären Sjögren Syndrom, wo es zur Spaltung des Proteins kommt [Hayashi et al., 2003; Miyazaki et al., 2005]. Sridharan et al. (2006) schreiben dem nonerythroiden alpha-Spectrin eine Rolle als Kernprotein zu, welche sie durch ihre Studien untermauern. Sie identifizierten mehrere Proteine verschiedenster Funktionen aus nuklearen Extrakten von humanen lymphoblastoiden Zellen und HeLa-Zellen als Interaktionspartner von Spectrin alpha.

Für die Entstehung von Meningeomen konnte eine Beteiligung veränderter Signaltransduktionswege bisher nicht gezeigt werden. Es stellt sich die Frage, ob MGEA6 als Protein eine direkte oder indirekte Rolle in einem zellulären Pathway spielt. Auch diese Frage wurde bisher nicht untersucht. Der Nachweis von Proteininteraktionen spielt für die Analysierung dieser Fragen eine relevante Rolle. Über die Funktionen und Lokalisationen der Proteininteraktionspartner von MGEA6 kann der Funktion von MGEA6 für die Zelle und für die Tumorentstehung möglicherweise entscheidend näher gekommen werden. Aus diesem Grund sollte die *in vivo*-Untersuchung der Interaktion von MGEA6 mit den Proteinen BAIAP2 und KIBRA in Betracht gezogen werden.

Zusammenfassend wurden in der vorliegenden Analyse mittels Co-Immunpräzipitation die Proteininteraktionen zwischen MGEA6 und den Proteinen BAIAP2 und KIBRA bestätigt. Die Interaktionen der Proteine konnten somit in zwei unabhängigen Verfahren *in vitro* nachgewiesen werden.

4.3 Promotorcharakterisierung der MGEA6-Genfamilie

Die Rolle von MGEA6 und seiner Genfamilie für die Zelle und ihre mögliche Beteiligung bei der Meningeomentstehung sind noch weitgehend ungeklärt. Die biologische Relevanz der Proteine MGEA6 und MGEA11 wird durch deren Expression in verschiedenen menschlichen Geweben unterstrichen. Für verschiedene der *MGEA6*-homologen Sequenzen konnten bisher annotierte mRNAs in Testisgewebe und in Melanomen nachgewiesen werden, die Expression dieser Transkripte wurde jedoch noch nicht gezeigt. Die Charakterisierung der homologen Sequenzen der verschiedenen Chromosomen als prozessierte Pseudogene erfolgte bereits durch Comtesse et al. [2001].

Neben der Identifizierung von Bindungspartnern des MGEA6-Genproduktes und dessen Funktion und Interaktion in Signal-Pathways der Zelle, müssen auch Auftreten und Funktion der Pseudogene als weitere Mitglieder der *MGEA6*-Genfamilie betrachtet werden.

In einer Studie an Cutanen T-Zell-Lymphomen wurden *MGEA6* und einige seiner Pseudogene als tumorassoziierte Antigenfamilie mit tumorspezifischem Splicemuster entdeckt. Eichmüller et al. identifizierten *cTAGE-1* in einer SEREX-Analyse als spezifisches Antigen cutaner T-Zell-Lymphome und entdeckten in einer angeschlossenen RT-PCR-Studie die sogenannte *cTAGE-Familie*. Die identifizierten *cTAGE*-Gene wurden Loci auf verschiedenen Chromosomen zugeordnet, welche die Chromosomen 6, 7, 13, 14 und 18 umfassen. Die Mitglieder *cTAGE-1/2* und *cTAGE-5* der Genfamilie werden differentiell gespliced und bringen auch die bereits bekannten Sequenzen *MGEA6* (*cTAGE-5C*) und *MGEA11* (*cTAGE-5D*) hervor. Beide Sequenzen wurden auch in dieser Studie auf dem Chromosom 14 lokalisiert. *cTAGE-3* zeigte Similarität zu der *MGEA6*-homologen Sequenz auf Chr.13, *cTAGE-4* zu den Sequenzen auf den Chr.6, 7 bzw. 7q35. Die Sequenzen *cTAGE-1*, *1B*, *1C*, *2* und *2s* wurden alle Chr.18 zugeordnet. Es wurde gezeigt, dass sich die Expression von *cTAGE-1*, *-1B* und *-5A* auf Testisgewebe und Tumorgewebe beschränkt, wohingegen die weiteren *cTAGE*-Gene auch in verschiedenen anderen Normalgeweben gefunden wurden. Eine tumorspezifische Proteinexpression von *cTAGE-1*, *-4* und *-5* wurde in Western-Blot- und Serumreaktivitäts-Assays bestätigt. Mit Seren von CTCL-Patienten und Melanompatienten wurden Antikörperreaktivitäten gegen rekombinant

exprimierte Proteine *cTAGE-1*, -3, -4, -5A und -5B nachgewiesen. Usener et al. schreiben *cTAGE-1* und -5 eine mögliche Rolle als Tumorantigene in der Keimbahnentwicklung zu und vermuten, dass das tumorspezifische Splicing-Muster der *cTAGE*-Gene zu Proteinen führen könnte, die Kandidaten für eine spezifische Immuntherapie bei Cutanen T-Zell-Lymphomen und auch anderen Krankheiten darstellen könnten [Eichmüller 2001; Usener et al., 2003]. In diesem Zusammenhang steht damit die noch ungeklärte Frage nach der Funktion dieser Genfamilie und deren Proteine für die Zelle.

Im Allgemeinen lässt sich die Entstehung von Pseudogenen auf die Duplikation einer genomischen DNA oder auf Retrotranspositionsereignisse zurückführen. Durch letzteres entstandene Pseudogene heißen prozessierte Pseudogene oder Retropseudogene. Hier erfolgte die Integration einer revers-transkribierten mRNA in das Genom, in der Regel unter Verlust ihrer Funktion und Verlust von 5'-Promotorsequenzen und Introns. Dagegen sind häufig flankierende repetitive Sequenzen und 3'-Polyadenylierung zu finden. Zur Transkription dieser Pseudogene kann es jedoch nach Integration in einen Locus der Promotorelemente aufweist kommen. Das Vorhandensein von sogenannten *LTRs* (*Long Terminal Repeats*) bestimmt die Einteilung der Retrotransposons in LTR- bzw. Nicht-LTR-Retrotransposons. Das menschliche Genom umfasst eine große Anzahl solcher Pseudogene. LTR-Retrotransposons, wie zum Beispiel *ERV*-Elemente, umfassen etwa 8% der menschlichen DNA, Non-LTR-Retrotransposons, wie *LINEs* (*Long Interspersed Nuclear Elements*) oder Retroposons wie *SINEs* (*Short Interspersed Nuclear Elements*), machen zwischen 17 und 20% der menschlichen DNA aus [Mighell et al., 2000; Rogers, 1985; Vanin, 1985]. Es wird mittlerweile angenommen, dass es doppelt so viele Pseudogene abstammend von proteinkodierenden Genen gibt, als proteinkodierende Gene selbst [Harrison et al., 2002; Torrents et al., 2003; Zhang et al., 2003 und 2004]. Die Retrotransposition von Sequenzen ist ein aktiver Prozess, der die Genevolution beeinflusst [Brosius, 1999]. Dass duplizierte oder prozessierte Pseudogene als transkribierte Pseudogene funktionell aktiv werden und die Transkription von proteinkodierenden Genen beeinflussen, wurde in zwei Studien deutlich. Bei der Spitzschlamm Schnecke *Lymnea stagnalis* wurde nachgewiesen, dass die Transkription des Stickstoffoxidsynthase-Gens durch ein zur Gensequenz homologes Pseudogen vermindert wird. Dies geschieht durch die Bildung von RNA-Duplices mittels einer revers-komplementären Sequenz lokalisiert am 5'-Ende der Pseudogensequenz [Korneev et al., 1999]. Die Transkription des transkribierten

prozessierten Pseudogens *makorin1-p1* wurde als wichtig für die Stabilisierung der mRNA des dazu homologen Gens *makorin-1* in der Maus nachgewiesen. Diese regulative Wirkung wurde auf ein Element, welches sich in der 5`Region sowohl der Gensequenz als auch der Pseudogensequenz befindet, zurückgeführt [Hirotsune et al., 2003]. Eine weitere Analyse führte zu der Annahme, dass die Expression des *rac1*-Pseudogens bei der Tumorigenese in Hirngewebe eine Rolle spielen könnte. Die Überexpression der *rac1*-homologen Sequenz im Vergleich zur *rac1*-Expression wurde auf RNA-Ebene in mehreren Meningeomen, Astrozytomen und Hypophysenadenomen nachgewiesen [Hwang et al., 2005]. Eine Studie zu Pseudogenen zeigte, dass im Gegensatz zu prozessierten Genen und anderen Pseudogenen, die große Mehrheit der transkribierten prozessierten Pseudogene (ca. 95%) im Vergleich zum Mausgenom im Menschen spezifisch vorkommen. Der Vergleich zeigte auch, dass es wahrscheinlich einen evolutionären Druck im menschlichen Genom gibt, diese prozessierten Pseudogensequenzen zu deletieren [Harrison et al., 2005].

Neben dem Nachweis von mRNA-Transkripten verschiedener *MGEA6*-homologer Sequenzen in Testisgewebe und in Melanomen konnten wir zwei dieser Sequenzen, die mit Loci auf den Chromosomen 7 und 2 übereinstimmen, in einer Sequenzierungsanalyse von *MGEA6*-cDNA-Sequenzen aus cDNAs von Meningeompatienten identifizieren.

Aus diesem Grund befasste sich die vorliegende Analyse mit dem Nachweis transkriptioneller Aktivitäten verschiedener *MGEA6*-homologer Sequenzen. Weiterhin wurde eine Charakterisierung des Promotorbereichs des aktiven *MGEA6*-Genlocus vorgenommen. Die Analysen erfolgten mittels Luziferaseaktivitäts-Assay.

Zur Eingrenzung des Promotorbereichs des aktiven *MGEA6*-Genlocus wurde die Upstreamregion des aktiven *MGEA6*-Genlocus in Teilstücken betrachtet. Es wurde eine Vorhersage der Promotorregion für das *MGEA6*-Gen getroffen. Die Promotorregion erstreckt sich auf dem Plus-Strand über eine Länge von 1072bp. Die Ergebnisse des Luziferase-Assays bestätigten eindeutig, dass die vorhergesagte Region die Promotorelemente enthält. Die Promotorregion des *MGEA6*-Locus konnte auf den Bereich 1510bp upstream des ORF eingegrenzt werden. Sie beginnt 1286bp upstream des Startcodon und endet 214 Basen vor Beginn des ORF. Die Aktivität einer TATA-Box wurde nicht bestätigt. Die Transkriptions-Start-Site befindet sich mit dem Cytosin 315 Basen vor Beginn des ORF.

Die transkriptionellen Aktivitäten wurden für die *MGEA6*-Pseudogensequenzen der Loci 6q27; 7q34; 7q35; 7q35(2); 13q14.3 und 18q11.2 untersucht. Für die analysierten Upstreamsequenzen der *MGEA6*-Pseudogenloci 18q11.2, 7q34, 7q35(2) und 6q27 konnten Promotoraktivitäten im Verhältnis zur Promotoraktivität der *MGEA6*-Promotorregion mittels Luziferase-Assay festgestellt werden. Die höchste Aktivität zeigte der 18q11.2-Locus mit 58% im Verhältnis zur Aktivität des aktiven *MGEA6*-Genlocus. Keine Promotoraktivitäten zeigten die Sequenzen der Pseudogenloci 7q35 und 13q14.3. Für die Loci 7q34 sind in Melanoma und Testis, für 7q35(2) in Melanoma und für 13q14.3 und 18q11.2 in Testis annotierte mRNAs niedergelegt. Der Nachweis von Promotoraktivitäten korreliert, außer für den Locus 6q27, mit dem Nachweis von mRNA-Sequenzen für diese Loci.

Die Betrachtung der flankierenden Sequenzbereiche der *MGEA6*-homologen Sequenzen zeigte für die meisten Vertreter der Genfamilie Anzeichen für Retrotranspositionereignisse, woraus diese wahrscheinlich als prozessierte Pseudogene hervorgingen. Nach phylogenetischen Untersuchungen ergab sich vermutlich eine Abspaltung der Sequenzen von einem ursprünglichen Gen auf Grund mehrerer Retrotranspositionereignisse. Die flankierenden Bereiche weisen verschiedene Elemente auf, wie *LINE-1-Elemente (LI)*, *SINEs (Alu-Elemente)* und *MaLRs (mammalian apparent LTR-retrotransposon)*, sowie AT-reiche repetitive Sequenzen [Comtesse et al., 2001]. Nach genomischen Analysen von Usener und Eichmüller beschrieben diese die *cTAGE*-Sequenzen jedoch nicht als prozessierte Pseudogene, sondern als transkribierte intronlose Gene. Ausnahmen bilden *cTAGE-1C*, welches ein Intron in der Sequenz aufweist, und die Gensequenz *cTAGE-5* auf Chromosom 14, für die verschiedene Splicevarianten beschrieben wurden [Usener et al., 2003].

Die Aktivität der *MGEA6*-homologen Sequenzen wurde bisher nicht gezeigt. Das Vorhandensein von Promotorbereichen in der Umgebung der Sequenzen und ihre transkriptionelle Aktivität sind erste Ansatzpunkte zur Klärung der Funktion dieser Multigenfamilie für die Zelle. Die Ergebnisse der vorliegenden Analyse unterstreichen eine transkriptionelle Aktivität der untersuchten *MGEA6*-homologen Sequenzen, welche eine Relevanz für die Zelle oder sogar eine tumorrelevante Rolle vermuten lässt. Weitere

Analysen zur Vorhersage von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen upstream der Regionen, die Promotoraktivität zeigten, sind ein möglicher Ansatz zur genaueren Charakterisierung der Pseudogensequenzen. Darüber hinaus werden der Nachweis der Transkription und der Expression dieser Sequenzen in Tumorgewebe sowie im Vergleich dazu in Normalgewebe die nächsten Schritte der weiteren Analyse zur Klärung der Relevanz dieser Gensequenzen für die Zelle sein.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Analyse die Promotorregion des aktiven *MGEA6*-Genlocus bestimmt und charakterisiert. Weiterhin zeigten Promotoranalysen Aktivitäten für die *MGEA6*-Pseudogenloci 18q11.2, 7q34, 7q35(2) und 6q27. Der Nachweis von Promotoraktivitäten korreliert, außer für den Locus 6q27, mit dem Nachweis von mRNA-Sequenzen für diese Loci.

4.4 Untersuchung des E-Cadherin/ β -Catenin Zelladhäsions-Komplexes und Nachweis einer veränderten Expression dieser Zelladhäsionsproteine in Meningeomen

Die Struktur von MGEA6 lässt eine Beteiligung des Proteins an Signaltransduktionswegen vermuten. Eine Microarray-Analyse zur Regulierung von MGEA6 auf mRNA-Ebene zeigte die Herunterregulierung von MGEA6 nach dem Knock-Out des TCF-Faktors [nicht veröffentlichte Daten, Ballhausen et al., Halle]. Die Analyse ließ darauf schließen, dass MGEA6 über den WNT-Signalweg (WNT-Pathway) reguliert wird und führte zur Betrachtung dieses Signalwegs in Meningeomen. Die Rolle von β -Catenin ist für den WNT-Signalweg bedeutend, welcher mit der Pathogenese verschiedenster menschlicher Krebserkrankungen in Verbindung gebracht wurde [Lustig u. Behrens, 2003]. β -Catenin liegt in der Zelle zytoplasmatisch und, gebunden an E-Cadherin, an der Zytoplasmamembran vor. Darüber hinaus ist es bei aktiviertem WNT-Signalweg stabilisiert im Zellkern zu finden. Zur zellulären Lokalisation von β -Catenin in Meningeomgeweben wurden IHC-, IF- und Western-Blot-Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten keine β -Catenin-Ansammlung in den Zellkernen und das Fehlen von β -Catenin in 79% der analysierten Meningeome an der Zytoplasmamembran. Die IHC-Analyse wies β -Catenin als kräftige, granuläre, perinukleäre Ansammlungen und diffus im Zytoplasma nach. Diese Resultate deuten darauf hin, dass der Verlust von β -Catenin an der Zellmembran ein häufiges Ereignis in Meningeomen, vor allem des Grades MI (WHO I), darstellt.

Das Fehlen von β -Catenin im Zellkern zeigt, dass der WNT-Signalweg in Meningeomzellen nicht aktiviert ist. Die Regulation der MGEA6-Expression über den WNT-Pathway wurde daher ausgeschlossen.

Da jedoch die Komplexbildung aus β -Catenin und E-Cadherin im Verbund mit α -Catenin für die funktionierende Zell-Zell-Adhäsion bedeutend ist, führte dieses Ergebnis zur Betrachtung der Expression von E-Cadherin in Meningeomgeweben. Die immunhistochemischen Färbungen zeigten das Fehlen von E-Cadherin an der Zellmembran in 34% der untersuchten Meningeome unterschiedlicher Tumorgrade. Nur 18% der untersuchten Meningeome zeigten Expressionen von sowohl β -Catenin als auch E-Cadherin an der Zellmembran.

Meningeome sind Neoplasmen der Leptomeningen, die das Hirn und Rückenmark umgeben. Im Allgemeinen handelt es sich um langsam wachsende, gutartige Tumoren, die dem Grad I der World Health Organisation- (WHO-) Klassifizierung angehören (entspr. MI). Es treten aber auch atypische Meningeome des Grades II (WHO-Grad II, MII) auf, die durch erhöhte Zellularität und verstärkte mitotische Aktivität gekennzeichnet sind und etwa 8% der Meningeome ausmachen. Sowie anaplastische Meningeome, die dem Grad III zugeordnet werden (WHO-Grad III, MIII) und ungefähr 2% der auftretenden Meningeome darstellen. Des Weiteren machen Meningeome etwa 20% aller primären intrakraniellen Tumoren aus und zählen somit zu den häufigsten Tumoren des menschlichen Nervensystems. Es gibt histomorphologisch sehr unterschiedliche Formen, die verschiedenen Subtypen zugeordnet werden. Bei den häufigsten handelt es sich um die arachnoidalen (meningothelialen), fibroblastischen, transitionalen und sekretorischen Subtypen [Burger et al., 2002; Louis et al., 2000].

Bisher hat sich der Verlust eines Chromosoms 22 und damit einhergehend der Verlust der Heterozygotie für das *Neurofibromatose Typ 2- (NF2-)* Gen bei Meningeomen als häufigste Auffälligkeit gezeigt, die mit der Tumorigenese in Verbindung gebracht wurde [Meese et al., 1987; Dumanski et al., 1990; Rutledge et al., 1994]. Eine mutationsbedingte Inaktivierung des zweiten Allels von *NF2* tritt in bis zu 60% aller Meningeome auf. Bei dem *NF2*-Genprodukt handelt es sich um das Protein MERLIN, welchem eine Rolle als Tumorsuppressorgen zugeschrieben wird. Diese Rolle übt es vermutlich durch eine Kontrollfunktion bei der Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion aus [Lallemand et al., 2003]. Cadherine sind transmembranäre Glykoproteine, die in der Zytoplasmamembran verankert sind. Über ihre zytoplasmatischen Komponenten interagieren sie mit Cateninen, so auch β -Catenin, welches eine indirekte Verknüpfung von Cadherin mit den Aktin-Filamenten herstellt. Zum einen wird dem E-Cadherin-Zelladhäsionssystem eine signifikante Rolle bei der mehrstufigen Entstehung menschlicher Tumoren zugeschrieben. Zum anderen wurden veränderte Expressionen für β -Catenin bei einer Reihe von Tumoren, wie Kolonkarzinomen, gastralen Karzinomen, hepatozellulären und oesophagalen Tumoren, beschrieben [Maruyama et al., 2000; Van Aken et al., 2001]. Bisherige Studien an Meningeomen wiesen E-Cadherin eine mögliche Rolle bei der Morphogenese dieser Tumoren zu [Figarella-Banger et al., 1994]. In benignen Meningeomen wurde E-Cadherin unabhängig vom histomorphologischen Subtyp nachgewiesen, während in malignen Meningeomen kein E-Cadherin detektiert werden konnte [Schwechheimer et al., 1998].

Andere Studien zeigten E-Cadherin an den Zellmembranen von Meningeomen der syncytialen und transitionalen Subtypen, nicht jedoch vom fibroblastischen Subtyp, und wiesen somit auf Unterschiede der Expression bei den verschiedenen histomorphologischen Meningeomsubtypen hin [Tohma et al., 1992].

Die vorliegende Immunhistochemische Analyse zeigte eine E-Cadherin-Expression in 25 der 38 untersuchten Meningeome (66%). Bei den sieben Tumoren die keine E-Cadherin-Expression zeigten handelte es sich um fünf MI- und zwei MII-Meningeome. Frühere Studien beschrieben reduzierte E-Cadherin-Expressionen in undifferenzierten Krebszellen und fehlende Expressionen in differenzierteren Tumoren [Figarella-Branger et al., 1994. Schwechheimer et al., 1998]. In unserer Studie zeigte nicht-tumoröses Arachnoid-Gewebe keine spezifische E-Cadherin-Expression. Dies stimmt mit den Resultaten von Yamashima et al. (1992) überein, die E-Cadherin nicht an den Zellmembranen lokalisieren konnten. Ihre Untersuchungen zeigten allerdings E-Cadherin im Zytoplasma von Arachnoid Villi.

Betrachtet man die unterschiedlichen Auffassungen über den Zusammenhang zwischen E-Cadherin-Expression und dem Tumorgrad von Meningeomen, so sprechen unsere Daten eher gegen die Annahme, dass erhöhte Malignität mit dem Verlust von E-Cadherin in Meningeomen zusammen hängt. Im Gegensatz hierzu unterstützen die vorliegenden Ergebnisse vielmehr frühere Studien, die membranäres E-Cadherin unabhängig vom Tumorgrad oder vom histomorphologischen Subtyp beschreiben [Tohma et al., 1992].

Die Komplexbildung aus E-Cadherin und β -Catenin im Verbund mit α -Catenin ist für die funktionierende Zell-Zell-Adhäsion ausschlaggebend. β -Catenin bindet an seine Bindungsstelle an der zytoplasmatischen Domäne von E-Cadherin und sorgt über den Komplex mit α -Catenin für eine Verknüpfung zu den Aktinfilamenten des Zytoskellets. In unserer Studie konnten wir β -Catenin an der inneren Zellmembran nur in 21% der untersuchten Meningeome identifizieren, wobei unter diesen mehr MII- als MI-Tumoren zu finden waren. Am häufigsten war bei den β -Catenin-Färbungen eine kräftige, granuläre, perinukleär lokalisierte Immunreaktivität zu erkennen, ohne eine Färbung der Zellkerne selbst.

Diese Resultate deuten darauf hin, dass der Verlust von β -Catenin an der Zellmembran ein häufiges Ereignis in Meningeomen darstellt. Die Immunfluoreszenzuntersuchungen an Primärzellkulturen von Meningeomen zeigten die Ansammlung von β -Catenin-Protein in Vesikeln des Golgi-Apparates, als auch in anderen Zellkompartimenten. Diese

Beobachtungen wurden durch die Western-Blot Analysen an fraktionierten Zelllysaten aus Primärzellkulturen bestätigt, welche β -Catenin in zytoplasmatischen Kompartimenten, im speziellen im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat, bzw. dem ER/Golgi Intermediate Compartment (ERGIC), nachwiesen.

Bei der Betrachtung der Invasivität der Tumoren, welche nicht Gegenstand des WHO-Grading-Systems ist [Louis et al., 2000], zeigten die drei unterschiedlichen MIII-Meningeome in zwei Fällen keine β -Catenin-Färbung an der Zellmembran. Eine Korrelation der Invasivität mit einem spezifischen Färbemuster in den untersuchten Tumoren konnte nicht festgestellt werden.

Untersucht haben wir auch die möglichen Zusammenhänge mit dem Chromosom 22- und damit verbunden dem Heterozygotitätsverlust des *Neurofibromatose Typ2- (NF2-)* Gens. Dieser Genverlust tritt, wie bereits erwähnt, sehr häufig in Meningeomen auf. Frühere Studien schreiben dem von *NF2* kodierten Genprodukt MERLIN eine Rolle als Tumorsuppressor durch die Kontrolle des Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Kontakts zu [Lallemand et al., 2003]. Die Frequenz von auffallenden *NF2*-Mutationen variiert jedoch in Meningeomen mit dem histomorphologischen Subtyp. Während in Meningeomen der fibroblastischen und der transitionalen Subtypen Mutationen dieses Gens in 70–80% der Tumoren auftreten, zeigen sich diese nur in 25 % der Meningeome des arachnoidalen Subtyps. Dies führte zu der Annahme, dass arachnoidale Meningeome einen anderen genetischen Ursprung besitzen [Wellenreuther et al., 1995]. Darüber hinaus konnte eine verminderte Expression von *NF2* nur in wenigen arachnoidalen Meningeomen nachgewiesen werden. Für andere Subtypen zeigte sich diese Unterexpression jedoch als ein häufig auftretendes Ereignis [Lee et al., 1997]. In diesem Zusammenhang wurden zytogenetische Analysen für die meisten Meningeome der Studie gemacht, um die Chromosom 22-Verluste zu identifizieren. Unsere zytogenetische Analyse der Primärzellkulturen von Meningeomen zeigte keine Korrelation zwischen dem Verlust eines Chromosom 22 und der zellulären Lokalisation der Proteine β -Catenin und E-Cadherin in den Tumorzellen. Dieses Ergebnis macht eine Verbindung zwischen dem Verlust der *NF2*-Expression und der veränderten Lokalisation der Proteine β -Catenin und E-Cadherin in Meningeomzellen unwahrscheinlich.

Es gibt weitere Faktoren des Zelladhäsionssystems, für die eine Involvierung bei der Entstehung von Meningeomen angenommen wird. So zum Beispiel das CD44-Antigen, ein transmembranäres Glykoprotein, das an der Zelladhäsion und der Stoffmigration beteiligt ist, und dem eine Rolle bei der Tumorprogression und der Zellmotilität zugeschrieben wird. Die CD44-vermittelte Signaltransduktion führt zur Aktivierung der GTPasen Rac1 und Rho, und somit zur Reorganisation des Aktin-Zytoskellets [Lee und Spicer, 2000]. CD44 fungiert darüber hinaus als Rezeptor für die Hyaluronsäure, welche eine Rolle für die extrazelluläre Matrix des Gehirns spielt. In vorausgegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Hyaluronidase MGEA5 in Meningeomen eine humorale Immunantwort hervorruft [Heckel et al., 1998], und dies möglicherweise auf eine Beteiligung dieses Enzyms und seines Substrats bei der Meningeomentstehung hindeutet.

Abschließend lässt sich sagen, dass es mehrere Hinweise gibt, die auf eine veränderte Zell-Zell-Interaktion in Meningeomen hindeuten. Diese schließen ein: die Verminderung oder den Verlust der Expression des *NF2*-kodierte Proteins MERLIN, die veränderten Expressionen und Lokalisationen der membranär lokalisierten Proteine β -Catenin und E-Cadherin in etwa 80% der Meningeome, sowie Veränderungen in der extrazellulären Matrix, worauf die humorale Immunantwort gegen Hyaluronidase hinweist.

Zusammenfassend zeigte die vorliegende Studie an Meningeomen für keinen der untersuchten Tumoren eine Lokalisation von β -Catenin im Zellkern. Das Fehlen von β -Catenin im Zellkern zeigt, dass der WNT-Signalweg in Meningeomzellen nicht aktiviert ist. Die Regulation der MGEA6-Expression über den WNT-Pathway wird daher ausgeschlossen.

Es wurde gezeigt, dass in etwa 80 % aller untersuchten Meningeome die Expression der Proteine β -Catenin und/oder E-Cadherin an der Zellmembran nicht vorhanden ist. Die fehlende Lokalisation dieser für das Zelladhäsionssystem bedeutenden Proteine lässt die Vermutung zu, dass hierdurch die Interaktion der Meningeomzellen untereinander unabhängig eines *NF2*-Verlusts und unabhängig vom Tumorgrad beeinflusst wird.

5 Zusammenfassung

Gegen das *Meningeom-exprimierte Antigen 6 (MGEA6)* wurde eine Antikörperreaktion mittels Seren von Meningeompatienten nachgewiesen. Die vorliegende Analyse zur Eingrenzung der immunogenen Region des Proteins zeigte, dass die Serumantikörper den Aminoterminus und den internen Proteinbereich gleichermaßen binden, nicht jedoch den Carboxyterminus. Die Bindung der Antikörper ist somit nicht nur gegen ein bestimmtes lineares Epitop, sondern gegen mehrere Epitope oder ein Konformationsepitop des MGEA6-Proteins gerichtet.

Mittels Co-Immunpräzipitation wurden die Proteininteraktionen zwischen MGEA6 und den Proteinen BAIAP2 und KIBRA, welche in einem Hefescreening als Bindungspartner identifiziert wurden, bestätigt. Die Interaktionen der Proteine konnten somit in zwei unabhängigen Verfahren *in vitro* nachgewiesen werden.

Die Promotorregion des aktiven *MGEA6*-Genlocus wurde bestimmt und charakterisiert. Promotoranalysen zeigten Aktivitäten für die *MGEA6*-Pseudogenloci 18q11.2, 7q34, 7q35(2) und 6q27. Der Nachweis von Promotoraktivitäten korreliert, außer für den Locus 6q27, mit dem Nachweis von mRNA-Sequenzen für diese Loci.

Nach Analysen zum WNT-Signalweg wurde dessen Aktivität in Meningeomzellen ausgeschlossen. Demnach wird die Expression von MGEA6 nicht über den WNT-Pathway reguliert. Es wurde nachgewiesen, dass in ~80% der untersuchten Meningeome die für das Zelladhäsionssystem bedeutenden Proteine β -Catenin und/oder E-Cadherin nicht an der Zytoplasmamembran lokalisiert sind.

5 Abstract

The Meningioma-expressed Antigen 6 (MGEA6) On molecular genetics, cell biology and immunogenicity

The *meningioma-expressed antigen-6 (MGEA6)* was identified as an immunoreactive antigen in meningioma patients. In order to narrow down the immunogenic protein region our analysis showed, that antibodies bind the aminoterminal and the internal region of the MGEA6 protein equally. There was no binding of the carboxyterminal region. Thus antibody binding is not directed against a specific linear epitope, but against several epitopes or a conformational structure.

Using co-immunoprecipitation we confirmed protein interaction between MGEA6 and the proteins BAIAP2 and KIBRA, which were formerly identified as binding partners in a Yeast-Two-Hybrid screening. Thus the interactions were demonstrated by two different *in vitro* assays.

The promoter region of the active *MGEA6* genomic locus was determined and characterized. Analysis to detect promoter regions demonstrated promoter activity for the *MGEA6*-pseudogenes located on 18q11.2, 7q34, 7q35(2) and 6q27. Except for 6q27, these results are in correlation with published mRNA sequences for these loci.

Analysis of The WNT-pathway in meningioma cells showed that this pathway is not active in meningiomas. This implies that MGEA6 expression is not regulated by the WNT-pathway. In addition we detected the absence of membranous localization of the proteins β -Catenin and E-Cadherin, which play an important role for the cellular adhesion-system, in about 80% of the analyzed meningiomas.

6 Literaturverzeichnis

Adams EF, Fahlbusch R, Dingermann T, Werner H (1996). Autocrine growth stimulation of human meningioma cells by platelet-derived growth factor. *J Neurosurg* 84:852-858.

Barr FA, Short B (2003). Golgins in the structure and dynamics of the golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* 15: 405–413.

Bennett V, Davis J, Fowler WE (1982). Brain spectrin, a membrane-associated protein related in structure and function to erythrocyte spectrin. *Nature (London)* 299:126–131.

Berditchevski F (2001). Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Sci* 114(Pt 23):4143-51.

Bignone PA, Anthony J, Baines AJ (2003). Spectrin α II and β II isoforms interact with high affinity at the tetramerization site. *Biochem J* 374:613–624.

Bignone PA, King MD, Pinder JC, Baines AJ (2007). Phosphorylation of a threonine unique to the short C-terminal isoform of betaII-spectrin links regulation of alpha-beta spectrin interaction to neuritogenesis. *J Biol Chem* 282(2):888-96.

Boel P, Wildmann C, Sensi ML, Brasseur R, Renauld JC, Coulie P, Boon T, van der Bruggen P (1995). BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity* 2:167-75.

Boucheix and Rubinstein (2001). Tetraspanins. Review. *CMLS Cell Mol Life Sci* 58:1189-1205.

Bracke ME, Van Roy FM, Mareel MM (1996). The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis; *Curr Op Microbiol Immunol* 213:123-161.

Brandis A, Mirzai S, Tatagiba M, Walter GF, Samii M, Ostertag H (1993). Immunohistochemical detection of female sex hormone receptors in meningiomas: correlation with clinical and histological features. *Neurosurgery* 33:212-217.

Brosius J (1999). Genomes were forged by massive bombardments with retroelements and retrosequences. *Genetica* 107:209-238.

Büther K, Plaas C, Barnekow A, Kremerskothen J (2004). KIBRA is a novel substrate for protein kinase C ζ . *Biochem Biophys Res Commun* 317(3):703-7.

Burger PC, Scheithauer BW, Vogel SW. Meningioma. *Surgical pathology of the nervous system and its coverings*. 4th ed. New York: Churchill Livingstone, 2002;49-71.

Burkhard P, Stetefeld J, Strelkov SV (2001). Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* 11: 82–88.

Carroll RS, Glowacka D, Dashner K, Black PM (1993). Progesterone receptor expression in meningiomas. *Cancer Res* 53:1312-1316.

Carroll RS, Zhang J, Dashner K, Black PM (1995). Progesterone and glucocorticoid receptor activation in meningiomas. *Neurosurgery* 37:92-97.

- Carroll RS, Black PM, Zhang J, Kirsch M, Percec I, Lau N, Guha A (1997). Expression and activation of epidermal growth factor receptors in meningiomas. *J Neurosurg* 87: 315-323.
- Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Tureci O, Gure AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old LJ (1997). A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:1914-1918.
- Cohen GB, Ren R, Baltimore D (1995). Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* 80:237-48.
- Comtesse N, Reus K, Meese E (2001). The MGEA6 Multigene Family Has an Active Locus on 14q and at Least Nine Pseudogenes on Different Chromosomes. *Geno* 75:1-3.
- Comtesse N, Niedermayer I, Glass B, Heckel D, Maldener E, Nastainczyk W, Feiden W, Meese E (2002). MGEA6 is tumor-specific overexpressed and frequently recognized by patient-serum antibodies. *Oncogene* 21:239-247.
- Comtesse N, Zippel A, Walle S, Monz D, Backes C, Fischer U, Mayer J, Ludwig L, Hildebrandt A, Keller A, Steudel WI, Lenhof HP, Meese E (2005). Complex humoral immune response against a benign tumor: Frequent antibody response against specific antigens as diagnostic targets. *PNAS* 102:27)9601-9606.
- De Backer O, Arden KC, Boretti M, Vantomme V, De Smet C, Czekay S, Viars CS, De Plaen E, Bresseur F, Chomez P, Van den Eynde B, Boon T, van der Bruggen P (1999). Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis. *Cancer Res* 59:3157-65.
- Dumanski JP, Carlom E, Collins VP, Nordenskjold M (1987). Deletion mapping of a locus on human chromosome 22 involved in the oncogenesis of meningioma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84:9275-9279.
- Dumanski JP, Rouleau GA, Nordenskjold M, Collins VP (1990). Molecular genetic analysis of chromosome 22 in 81 cases of meningioma. *Cancer Res* 50:5863-7.
- Eichmüller S (2002). Towards Defining Specific Antigens for Cutaneous Lymphomas. *Onkologie* 25:448-454.
- Eichmüller S, Usener D, Thiel D, Schadendorf D (2003). Tumor-specific antigens in cutaneous T-cell lymphoma: expression and sero-reactivity. *Int J Cancer* 104(4):482-7.
- Einbond A and Sudol M (1996). Towards prediction of cognate complexes between the WW domain and prolin-rich ligands. *FEBS lett* 384:1-8.
- Engelhardt B (2003). Development of the blood-brain barrier. *Cell Tissue Res* 314(1):119-29.
- Fava F, Raynaud-Messina B, Leung-Tack J, Mazzolini L, Li M, Guillemot JC, Cachot D, Tollon Y, Ferrara P, Wright M (1999). Human 76p: a new member of the γ -tubulin-associated protein family. *J Cell Biol* 147:857-868.
- Figarella-Branger D, Pellissier JF, Bouillot P *et al* (1994). Expression of neural cell-adhesion molecule isoforms and epithelial cadherin adhesion molecules in 47 human meningiomas: correlation with clinical and morphological data. *Mo Pathol* 7:752-61.
- Flory MR, Moser MJ, Monnat RJ Jr, Davis TN (2000). Identification of a human centrosomal calmodulin-binding protein that shares homology with pericentrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5919-5923.

- Gusella JF, Ramesh V, MacCollin M, Jacoby LB (1996). Neurofibromatosis 2: loss of merlin's protective spell. *Curr Opin Genet Dev* 6:87-92.
- Harrison MJ, Wolfe DE, Lau TS, Mitnick RJ, Sachdev VP (1991). Radiation-induced meningiomas: experience at the Mount Sinai Hospital and review of the literature. *J Neurosurg* 75:564-574.
- Harrison PM, Hegyi H, Balasubramanian S, Luscombe NM, Bertone P, Echols N, Johnson T, Gerstein M (2002). Molecular Fossils in the Human Genome: Identification and Analysis of the Pseudogenes in Chromosomes 21 and 22. *Genome Research* 12:272-280.
- Harrison PM, Zheng D, Zhang Z, Carriero N, Gerstein M (2005). Transcribed processed pseudogenes in the human genome: an intermediate form of expressed retrosequence lacking protein-coding ability. *Nucleic Acids Research* 33(8):2374-2383.
- Hayashi Y, Arakaki R, Ishimaru N (2003). The role of caspase cascade on the development of primary Sjögren's syndrome. *J Med Invest* 50(1-2):32-8.
- Heckel D, Brass N, Fischer U, Blin N, Steudel I, Türeci Ö, Fackler O, Zang KD, Meese E (1997). cDNA cloning and chromosomal mapping of a predicted coiled-coil proline-rich protein immunogenic in meningioma patients. *Hum Mol Genet* 6:2031-2041.
- Heckel D, Comtesse N, Brass N, Blin N, Zang D, Meese E (1998). Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma. *Hum Mol Genet* 7:1859-1872.
- Henderson and Fagotto, 2002. The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport. *EMBO reports* 3(9):834-839.
- Hirohashi S (1998). Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J of Path* 153:2.
- Hirohashi S, Kanai Y (2003). Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci* 94(7):575-581.
- Hirotsune S, Yoshida N, Chen A, Garrett L, Sugiyama F, Takahashi S, Yagami K, Wynshaw-Boris A, Yoshiki A (2003). An expressed pseudogene regulates the messenger-RNA stability of its homologous coding gene. *Nature* 423:91-96.
- Hsu DW, Efird JT, Hedley-Whyte ET (1997). Progesterone and estrogen receptors in meningiomas: prognostic considerations. *J Neurosurg* 86:113-120.
- Hsu DW, Efird JT, Hedley-Whyte ET (1998). MIB-1 (Ki-67) index and transforming growth factor-alpha (TGF alpha) immunoreactivity are significant prognostic predictors for meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24(6):441-52.
- Hwang SL, Chang JH, Cheng CY, Howng SL, Sy WD, Lieu AS, Lin CL, Lee KS, Hong YR (2005). The Expression of *rac1* Pseudogene in Human Tissues and in Human Brain Tumors. *Eur Surg Res* 37:100-104.
- Isley JL, Sudol M, Winder SJ (2002). The WW domain: linking cell signaling to the membrane cytoskeleton. *Cell Signal* 14:183-189.
- Jaaskelainen J, Haltia M, Servo A (1986). Atypical and anaplastic meningiomas: radiology, surgery, radiotherapy, and outcome. *Surg Neurol* 25: 233-242.

- Jager E, Stockert E, Zidianakis Z, Chen YT, Karbach J, Jager D, Arand M, Ritter G, Old LJ, Knuth A (1999). Humoral immune responses of cancer patients against 'cancer-testis' antigen NY-ESO-1: correlation with clinical events. *Int J Cancer* 84:506-10.
- Jaeger E, Chen Y-T, Drijfhout JW, Karbach J, Ringhoffer M, Jäger D, Arand M, Wada H, Noguchi Y, Stockert E, Old LJ, Knuth A (1998). Simultaneous Humoral and Cellular Immune Response against Cancer-Testis Antigen NY-ESO-1: Definition of Human Histocompatibility Leucocyte Antigen (HLA)-A2-binding Peptide Epitopes. *J Exp Med* 187:265-270.
- Jaeger E, Nagata Y, Gnjatic S, Wada H, Stockert E, Karbach J, Dunbar PR, Lee SY, Jungbluth A, Jager D, Arand M, Ritter G, Cerundolo V, Dupont B, Chen YT, Old LJ, Knuth A (2000). Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:4760-4765.
- Jaeger E, Jager D, Karbach J, Chen YT, Ritter G, Nagata Y, Gnjatic S, Stockert E, Arand M, Old LJ, Knuth A (2000). Identification of NY-ESO-1 epitopes presented by human histocompatibility antigen (HLA)-DRB4*0101-0103 and recognized by CD4(+) T lymphocytes of patients with NY-ESO-1-expressing melanoma. *J Exp Med* 191:625-630.
- Jakoby M, Weisshaar B, Droge-Laser W, Vincente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 7: 106–111.
- Johnson M, Toms S (2005). Mitogenic signal transduction pathways in meningiomas: novel targets for meningioma chemotherapy? *J Neuropathol Exp Neurol* 64(12):1029-36.
- Kalkanis SN, Carroll RS, Zhang J, Zamani AA, Black PM (1996). Correlation of vascular endothelial growth factor messenger RNA expression with peritumoral vasogenic cerebral edema in meningiomas. *J Neurosurg* 85:1095-1101.
- Kleinschmidt D, Lillehei KO (1995). Radiation-induced meningioma with a 63-year latency period. Case report. *J Neurosurg* 82:487-488.
- Korneev SA, Park JH, O'Shea M (1999). Neuronal expression of neural nitric oxide synthase (nNOS) protein is suppressed by an antisense RNA transcribed from an NOS pseudogene. *J Neurosci* 19:7711–7720.
- Koslowski M, Türeci Ö, Bell C, Krause P, Lehr HA, Brunner J, Seitz G, Nestle FO, Huber C, Sahin U (2002). Multiple splice variants of lactate dehydrogenase C selectively expressed in human cancer. *Cancer Res* 15:6750-5.
- Lallemand D, Curto M, Saotome I, Giovannini M, McClatchey AI (2003). NF2 deficiency promotes tumorigenesis and metastasis by destabilizing adherens junctions. *Genes and Dev* 17:1090-1100.
- Lamszus K, Kluwe L, Matschke J, Meissner H, Laas R, Westphal M (1998). Allelic losses at 1p, 9q, 10q, 14q, and 22q in the progression of aggressive meningiomas and undifferentiated meningeal sarcomas. *Cancer Genet Cytogenet* 110:103-110.
- Lantos PL, VandenBerg SR, Kleihues P (1996). Tumours of the Nervous System. In: *Greenfield's Neuropathology*, Graham DI, Lantos OL (eds), 6th ed. Arnold: London. pp. 583-879.
- Lee CH, Cowburn D, Kuriyan J (1998). Peptide recognition mechanisms of eukaryotic signaling modules. *Methods Mol Biol* 84:3-31.
- Lee JH, Sundaram V, Stein DJ, Kinney SE, Stacey DW, Golubic M (1997). Reduced expression of schwannomin/merlin in human sporadic meningiomas. *Neurosurgery* 40:578-87.

- Lee JY, Spicer AP (2000). Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr Opin Cell Biol* 12:581-6.
- Lekanne-Deprez RH, Riegmann PH, van Drunen E, Warringa UL, Groen NA, Stefanko SZ, Koper JW, Avezaar CJ, Mulder PGH, Zwarthoff EC, Hagemeyer A (1995). Cytogenetic, molecular genetic and pathological analyses in 126 meningiomas. *J Neuropath Exp Neurol* 54:224-235.
- Li Q, Hansen D, Killilea A, Joshi HC, Palazzo RE, Balczon R (2000). Kendrin/pericentrin-B, a centrosome protein with homology to pericentrin that complexes with PCM-1. *J Cell Sci* 114: 797-809.
- Limon J, Dal Cin P, Sandberg A (1986). Application of long-term collagenase disaggregation for the cytogenetic analysis of human solid tumours. *Cancer Genet. Cytogenet* 23:305-313.
- Lindblom A, Ruttledge M, Collins VP, Nordenskjold M, Dumanski JP (1994). Chromosomal deletions in anaplastic meningiomas suggest multiple regions outside chromosome 22 as important in tumor progression. *Int J Cancer* 56:354-357.
- Linggood RM, Hsu DW, Efird JT, Pardo FS (1995). TGF alpha expression in meningioma - tumor progression and therapeutic response. *J Neurooncol* 26(1):45-51.
- Liu J, Rost B (2001). Comparing function and structure between entire genomes. *Protein Sci* 10: 1970-1979.
- Louis DN, Ramesh V, Gusella JF (1995). Neuropathology and molecular genetics of neurofibromatosis 2 and related tumors. *Brain Pathol* 5:163-172.
- Louis DN, Scheithauer BW, Budka H, von Deimling A, Kepes JJ (2000). Meningiomas. In: Kleihues P, Cavenee WK, eds. *Pathology & Genetics of Tumours of the Nervous System*. Lyon, France: IARC Press;176-84.
- Lucas S, De Plaen E, Boon T (2000). MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C2, and MAGE-C3: four new members of the MAGE family with tumor-specific expression. *Int J Cancer* 87:55-60.
- Lustig, Behrens (2003). The Wnt signaling pathway and its role in tumor development.
- Macias MJ, Hyvonen M, Baraldi E, Schultz J, Sudol M, Saraste M and Oschkinat H (1996). Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide. *Nature* 382:646-649.
- Macias MJ, Wiesner S, Sudol M (2002). WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Letters* 513:30-37.
- Mack EE, Wilson CB (1993). Meningiomas induced by high-dose cranial irradiation. *J Neurosurg* 79:28-31.
- Maruyama K, Ochiai A, Akimoto S et al. (2000). Cytoplasmic betacatenin accumulation as a predictor of hematogenous metastasis in human colorectal cancer. *Oncology* 59:302-309.
- Matsuno A, Fujimaki T, Sasaki T, Nagashima T, Ide T, Asai A, Matsuura R, Utsunomiya H, Kirino T (1996). Clinical and histopathological analysis of proliferative potentials of recurrent and non-recurrent meningiomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 91: 504-510.
- Mattila PK, Pykäläinen A, Saarikangas J, Paavilainen VO, Vihinen H, Jokitalo E, Lappalainen P (2007). Missing-in-metastasis and IRSp53 deform PI(4,5)P2-rich membranes by an inverse BAR domain-like mechanism. *J Cell Biol* 176(7):953-64.

- McMahon LW, Walsh CE, Lambert MW (1999). Human alpha spectrin II and the Fanconi anemia proteins FANCA and FANCC interact to form a nuclear complex. *J Biol Chem* 274(46):32904-8.
- Meese E, Blin N, Zang KD (1987). Loss of heterozygosity and the origin of meningioma. *Hum Genet* 77:349-351.
- Meese E, Comtesse N (2002). Cancer Genetics and Tumor Antigens: Time For a Combined View? *Gene, Chromosomes and Cancer* 33:107-113.
- Menon AG, Rutter JL, von Sattel JP, Synder H, Murdoch C, Blumenfeld A, Martuza RL, von Deimling A, Gusella JF, Houseal TW (1997). Frequent loss of chromosome 14 in atypical and malignant meningioma: Identification a putative `tumor progression` locus. *Oncogene* 14:611-616.
- Mighell AJ, Smith NR, Robinson PA, Markham AF (2000). Vertebrate Pseudogenes. *FEBS Lett* 468 (2-3):109-14.
- Miki H, Tadaomi T (2002). WAVE2 serves a functional partner of IRSp53 by regulating its interaction with Rac. *Biochem Biophys Res Commun* 293:93-99.
- Millard TH, Bompard G, Heung MY, Dafforn TR, Scott DJ, Machesky LM, Fütterer K (2005). Structural basis of filopodia formation induced by the IRSp53/MIM homology domain of human IRSp53. *EMBO J* 24(2):240-50.
- Mitelman F (1995). *ISCN Guidelines for cancer cytogenetics. Supplement to an international system for cytogenetic nomenclature*. Basel: S. Karger.
- Miyahara A, Okamura-Oho Y, Miyashita T, Hoshika A, Yamada M (2003). Genomic structure and alternative splicing of the insulin receptor tyrosine kinase substrate of 53-kDa protein. *J Hum Genet* 48(8):410-4.
- Miyazaki K, Takeda N, Ishimaru N, Omotehara F, Arakaki R, Hayashi Y (2005). Analysis of in vivo role of alpha-fodrin autoantigen in primary Sjogren's syndrome. *Am J Pathol* 167(4):1051-9.
- Moisoi N, Erent M, Whyte S, Martin S, Bayley PM (2002). Calmodulin containing substructures of the centrosomal matrix released by microtubule perturbation. *J Cell Sci* 115: 2367-2379.
- Musa BS, Pople IK, Communis BH (1995). Intracranial meningiomas following irradiation - a growing problem? *Br J Neurosurg* 9:629-637.
- Musacchio A, Gibson T, Lehto VP, Saraste M(1992). SH3-an abundant protein domain in search of a function. *FEBS Lett* 307:55-61.
- Nishimori H, Shiratsuchi T, Urano T, Kimura Y, Kiyono K, Tatsumi K, Yoshida S, Ono M, Kuwano M, Nakamura Y, Tokino T (1997). A novel brain-specific p53-target gene, BAI1, containing thrombospondin type 1 repeats inhibits experimental angiogenesis. *Oncogene* 15:2145-2150.
- Nordqvist AC, Peyrard M, Pettersson H, Mathiesen T, Collins VP, Dumanski JP, Schalling M (1997). A high ratio of insulin-like growth factor II/insulin-like growth factor binding protein 2 messenger RNA as a marker for anaplasia in meningiomas. *Cancer Res* 57:2611-2614.
- Novellino L, Castelli C, Parmiani G (2005). A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol Immunother* 54(3):187-207.
- Oda K, Shiratsuchi T, Nishimori H, Inazawa J, Yoshikawa H, Taketani Y, Nakamura Y, Tokino T (1999). Identification of BAIAP2 (BAI-associated protein 2), a novel human homologue of hamster

IRSp53, whose SH3 domain interacts with the cytoplasmic domain of BAI1. *Cytogenet Cell Genet* 84:75-82.

Okamura-Oho Y, Miyashita T, Ohmi K, Yamada M (1999). Dentatorubral-pallidoluysian atrophy protein interacts through a proline-rich region near polyglutamine with the SH3 domain of an insulin receptor tyrosine kinase substrate. *Hum Mol Genet* 8(6):947-57.

Okamura-Oho Y, Miyashita T, Yamada M (2001). Distinctive tissue distribution and phosphorylation of IRSp53 isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 289(5):957-60.

Pawson T (1995). Protein modules and signaling networks. *Nature* 373:573-80.

Pawson T, Raina M, Nash P (2002). Interaction domains: from simple binding events to complex cellular behaviour. *FEBS Lett* 513:2-10.

Persidsky Y (1999). Model systems for studies of leukocyte migration across the blood - brain barrier. *J Neurovirol* 5(6):579-90.

Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD (2006). Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol* 1(3):223-36.

Polakis P (2000). Wnt signaling in cancer. *Genes and Dev* 14:1837-1851.

Rayala SK, den Hollander P, Manavathi B, Talukder AH, Song C, Peng S, Barnekow A, Kremerskothen J, Kumar R (2006). Essential role of KIBRA in co-activator function of dynein light chain 1 in mammalian cells. *J Biol Chem* 281(28):19092-9.

Rempel SA, Schwechheimer K, Davis RL, Cavenee WK, Rosenblum ML (1993). Loss of heterozygosity for loci on chromosome 10 is associated with morphologically malignant meningioma progression. *Cancer Res* 53:2386-2392.

Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P, Baltimore D (1993). Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* 259:1157-1161.

Renart J, Reiser J, Stark GR (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 76(7):3116-3120.

Renkvist N, Castelli C, Robbins PF, Parmiani G (2001). A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother* 50:3-15.

Rizo J, Sudhof TC (1998). C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J Biol Chem* 273:15879-15882.

Roelvink NC, Kamphorst W, van Alphen HA, Rao BR (1987). Pregnancy-related primary brain and spinal tumors. *Arch Neurol* 44:209-215.

Rogers JH (1985). The origin and evolution of retroposons. *Int Rev Cytol* 93:187-279.

Rubinstein AB, Loven D, Geier A, Reichenthal E, Gadoth N (1994). Hormone receptors in initially excised versus recurrent intracranial meningiomas. *J Neurosurg* 81:184-187.

Ruttledge MH, Xie YG, Han FY, Peyrard M, Collins VP, Nordenskjold M, Dumanski JP (1994). Deletions on chromosome 22 in sporadic meningioma. *Genes, Chromosomes and Cancer* 10:122-130.

- Ruttledge MH, Sarrazin J, Rangaratnam S et al. (1994). Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas. *Nat Genet* 6:180-4.
- Sahin U, Türeci Ö, Pfreundschuh M (1997). Serological identification of human tumor antigens. *Current Opinion in Immunology* 9:706-716.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Samoto K, Ikezaki K, Ono M, Shono T, Kohno K, Kuwano M, Fukui M (1995). Expression of vascular endothelial growth factor and its possible relation with neovascularization in human brain tumors. *Cancer Res* 55:1189-1193.
- Sanger F, Nicklein S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467.
- Sanson M, Cornu P (2000). Biology of meningiomas. *Acta Neurochir (Wien)* 142:493-505.
- Sayagues JM, Taberero MD, Maillo A, Diaz P, Rasillo A, Bortoluci A, Gomez-Moreta J, Santos-Briz A, Morales F, Orfao A (2002). Incidence of Numerical Chromosome Aberrations in Meningioma Tumors as Revealed by Fluorescence In Situ Hybridization Using 10 Chromosome-Specific Probes. *Cytometry (Clinical Cytometry)* 50:153-159.
- Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, Old LJ, Chen YT (2002). The cancer/testis genes: An expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunological Reviews* 188:22-32.
- Scanlan MJ, Simpson AJG, Old LJ (2004). The cancer/testis genes: Review, standardization, and commentary. *Cancer Immunity* 4:1.
- Schliwa M, Woehlke G (2003). Molecular motors. *Nature* 422: 759-765.
- Schwechheimer K, Zhou L, Birchmeier W (1997). E-Cadherin in human brain tumours: loss of immunoreactivity in malignant meningiomas. *Virchows Arch* 432:163-167.
- Shamah SM, Alberta JA, Giannobile WV, Guha A, Kwon YK, Carroll RS, Black PM, Stiles CD (1997). Detection of activated platelet-derived growth factor receptors in human meningioma. *Cancer Res* 57:4141-4147.
- Simon M, Kokkino AJ, Warnick RE, Tew JM, Jr., von Deimling A, Menon AG (1996). Role of genomic instability in meningioma progression. *Genes, Chromosomes and Cancer* 16:265-269.
- Simon M, von Deimling A, Larson JJ, Wellenreuther R, Kaskel P, Waha A, Warnick RE, Tew JM Jr, Menon AG (1995). Allelic losses on chromosomes 14, 10, and 1 in atypical and malignant meningiomas: a genetic model of meningioma progression. *Cancer Res* 55:4696-4701.
- Sillibourne JE, Milne DM, Takahashi M, Ono Y, Meek DW (2002). Centrosomal anchoring of the protein kinase CK1_γ mediated by attachment to the large, coiled-coil scaffolding protein CG-NAP/AKAP450. *J Mol Biol* 322: 785-797.
- Smith C, Cerundolo V (2001). Immunotherapy of melanoma. *Immunology* 104:1-7.
- Sridharan DM, McMahon LW, Lambert MW (2006). alphaII-Spectrin interacts with five groups of functionally important proteins in the nucleus. *Cell Biol Int* 30(11):866-78.

Strelkov SV, Herrmann H, Aebi U (2003). Molecular architecture of intermediate filaments. *Bioessays* 25: 243–251.

Sudol M (1996). Structure and function of the WW domain. *Prog Biophys Mol Biol* 65:113-132.

Sudol M, Sliwa K, Russo T (2001). Functions of WW domains in the nucleus. *FEBS lett* 490:190-195.

Suetsugu S, Murayama K, Sakamoto A, Hanawa-Suetsugu K, Seto A, Oikawa T, Mishima C, Shirouzu M, Takenawa T, Yokoyama S (2006). The RAC binding domain/IRSp53-MIM homology domain of IRSp53 induces RAC-dependent membrane deformation. *J Biol Chem* 281(46):35347-58.

Suetsugu S, Kurisu S, Oikawa T, Yamazaki D, Oda A, Takenawa T (2006). Optimization of WAVE2 complex-induced actin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP(3), and Rac. *J Cell Biol* 173(4):571-85.

Takahashi M, Mukai H, Oishi K, Isagawa T, Ono Y (2000). Association of immature hypophosphorylated protein kinase C_γ with an anchoring protein CG-NAP. *J Biol Chem* 275: 34592–34596.

Takahashi M, Shibata H, Shimakawa M, Miyamoto M, Mukai H, Ono Y (1999). Characterization of a novel giant scaffolding protein, CG-NAP, that anchors multiple signaling enzymes to centrosome and the golgi apparatus. *J Biol Chem* 274: 17267–17274.

Takahashi M, Yamagiwa A, Tamako N, Mukai H, Ono Y (2002). Centrosomal proteins CG-NAP and kendrin provide microtubule nucleation sites by anchoring γ -tubulin ring complex. *Mol Biol Cell* 13: 3235–3245.

Thuring RW, Sanders JB, Borst PA (1975). A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels. *Anal Biochem* 66:213–220.

Tohma Y, Yamashita T, Yamashita J (1992). Immunohistochemical localisation of cell adhesion molecule epithelial cadherin in human arachnoid villi and meningiomas. *Cancer Res* 52:1981–1987.

Torrents D, Suyama M, Zdobnov E, Bork P (2003). A genomewide survey of human pseudogenes. *Genome Res* 13:2559–2567.

Usener D, Schadendorf D, Koch J, Dubel S, Eichmueller S (2003). cTAGE: a cutaneous T cell lymphoma associated antigen family with tumor-specific splicing. *J Invest Dermatol* 121:198-206.

Utsuki S, Oka H, Sato Y, Kawano N, Tsuchiya B, Kobayashi I, Fujii K (2005). Invasive meningioma is associated with a low expression of E-cadherin and beta-catenin. *Clin Neuropathol* 24(1):8-12.

Van Aken E, De Wever O, Correia da Rocha AS, Mareel M (2001). Defective E-cadherin / catenin complexes in human cancer. *Virchows Arch* 439:725–751.

Vanin EF(1985). Processed pseudogenes: characteristics and evolution. *Annu Rev Genet* 19:253-272.

Vinson C, Myakishev M, Acharya A, Mir AA, Moll JR, Bonovich M (2002). Classification of human B-ZIP proteins based on dimerization properties. *Mol Cell Biol* 22: 6321–6335.

Weber RG, Bostrom J, Wolter M, Baudis M, Collins VP, Reifenberger G, Lichter P (1997). Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: toward a genetic model of meningioma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14719-14724.

- Weisman AS, Villemure JG, Kelly PA (1986). Regulation of DNA synthesis and growth of cells derived from primary human meningiomas. *Cancer Res* 46:2545-2550.
- Weisman AS, Raguette SS, Kelly PA (1987). Characterization of the epidermal growth factor receptor in human meningioma. *Cancer Res* 47:2172-2176.
- Wellenreuther R, Kraus JA, Lenartz D, Menon AG, Schramm J, Louis DN, Ramesh V, Gusella JF, Wiestler OD, von Deimling A (1995). Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. *Am J Pathol* 146:827-832.
- Witczak O, Skålhegg BS, Keryer G, Bornens M, Tasken K, Jahnsen T, Ørstavik S (1999.) Cloning and characterization of a cDNA encoding an A-kinase anchoring protein located in the centrosome, AKAP450. *EMBO J* 18: 1858–1868.
- Yamagishi A, Masuda M, Ohki T, Onishi H, Mochizuki N (2004). A novel actin bundling/filopodium-forming domain conserved in insulin receptor tyrosine kinase substrate p53 and missing in metastasis protein. *J Biol Chem* 279(15):14929-36.
- Yamashita T, Tohma Y, Yamashita J (1992). Expression of cell adhesion molecule E-cadherin in human arachnoid villi. *J Neurosurg* 77:749-756.
- Zang KD (2001). Meningioma: a cytogenetic model of a complex benign human tumor, including data on 394 karyotyped cases. *Cytogenet Cell Genet* 93:207-220.
- Zhang Z, Harrison P, Liu Y, Gerstein M (2003). Millions of years of evolution preserved: a comprehensive catalog of the processed pseudogenes in the human genome. *Genome Res* 13:2541–2558.
- Zhang Z, Carriero N, Gerstein M (2004). Comparative analysis of processed pseudogenes in the mouse and human genomes. *Trends Genet* 20,:62–67.

Anhang

Sequence:

1 CGCCTCCCGC CCTTCTCGC GTCGCCCGC CGAACCCAA CCGAGGGGTG GGTGCGCG GACACGGTAC GTCGCGGT TGTGCGGTC GGGCTCGGC CTAGE5

101 CTGCGCTGCC TCGGATGTA AAGTATACA AGAGGTCGG GATGGGCGC GTAGCCCTGT GAGGCTGCG GGTGCCCTG TCCCCAGCT CCCCCCGAC CTAGE5

201 CCGGCTCCGC AGTGTCCAC TCCGTTGCC GGGTCCGAT TCGGTTCCG GACCCAGGC TGTGTCTCT CCGCCGTTA TTGTGCCCC GACAGCCCG CTAGE5

301 GGTTACTGTG CGCACCACA GAGCAGCTT GCGCCTATG AGGAGCCCG GTTTACCTC CACCCTATT TGGGCTGCT CTTGGAGGAG CTACGCGAG CTAGE5

401 TTGTGCGAC ACTGCCTGAA GGTATGAGC CAGATTCTA TCITATGCT TTCCATGGG AATTGCTGT ATGTGCGCT GTTGTGAT TTTTGTCT CTAGE5

501 TCTCTTTTT TTGTGGAGA GTTTAGATC GGTAGGAGT CCGCTTATG TCGGACGAA GAAAGAGCT GCTCTATGC TTTCTGGAT AATTGAGAA CTAGE5

601 AAAAGTAAAC TACTTGAAA ATTTAGCCT GTTCAAAAG AGTATGAGC CTATGAGTA GAGTATCTT TAAGGATGC CAGCTTTGAG AAGGAGGCA CTAGE5

701 CAGAGCACA AAGTTTGGG GCACCTGTG AAGAGCTGA CAGTCCCAT TCTGACTTG AGGATGAAT ACTCTGCTA GAAAGAGCT TAAAGAGCA CTAGE5

801 GAATCCAAA CATTCTGAC AAGATGATT GATGCCGAT ATTTCAAAA GGATACAGC TTAGAGAT GACTCAAAAT CCTCAATC ACRAGTACT CTAGE5

901 GAGCCAAA TGACCTTCA GATATTTCA ATGATGAGC AGCAGTGA GATAGCAATA AAGATGCTT TGATGAAA TTCTCACTT CAGGAAAGC CTAGE5

1001 AGAAGACCT TTTCCAGAA GCTGAGTAT GGAAGACA ACTGAGTGA CTATTAAC AGAAGTAACT ATTTGAGC TCCAACTAC ATCCAGACA CTAGE5

1101 AGTCTAAT GATAGAAA GTACATCAA GACTCTGACT CACCGCTGT TAAGATGAA AGATTGCTC GCTATGCTG GAGAGACAT AACCAGTAT CTAGE5

1201 GATACTTG AATTAGAAT GACAGTGA TCGGAATG GTGCTACTT AGATATCTT CCAAGAGG CTTTGAAGA ACTGATCAT GCTGCTAAT CTAGE5

1301 TAATGCTT TTTAAAAC TTAGAGGAG AAGAAACA ATTTATATT CAGTGTCTG AAGTGTATA AACAAAGA GAGCTTACG AGCATTTAA CTAGE5

1401 AATCTTCAG ACTGACAGC CATCTTCCA GTCAGAAC ACACATTTT AATAGAGAA TCAGAGCTT CACAGAAC TTAAGTAA GACTGATTA CTAGE5

1501 TATCAGAAA ATGAATGAA ACTCCACAG AATTACAG TAGAGGAAA TTATCGTTA CAGAACAGC AGAATCTT TAAGTATG CAAAGATCA CTAGE5

1601 GCCATGCCA TCAGAGCTG GAGACCTATA GAAGCGAGC CAAGATCTT GAGAGAGAT TCGAGAAC TATTCATCT TATCAGGGC AGATTATTT CTAGE5

1701 CCATGAGAA AAGCACATG ATATTGGTT GCGAGCTCG AATGCTGAA GAACCTCAA TGATTTAGG AAGAAATG CTCACACAG ACAAARATTA CTAGE5

1801 ACTGACAGC ACCTTAATT GAACCTTTA GAAAGATC CTATGCACT CGATGTTCA ATACAGCAT TTGGCAGAA GCATTCCCA TATGGTCCCT CTAGE5

Bacu-6 for1

MGEA6-504

Bacu-6 for2

Bacu-6 rev1

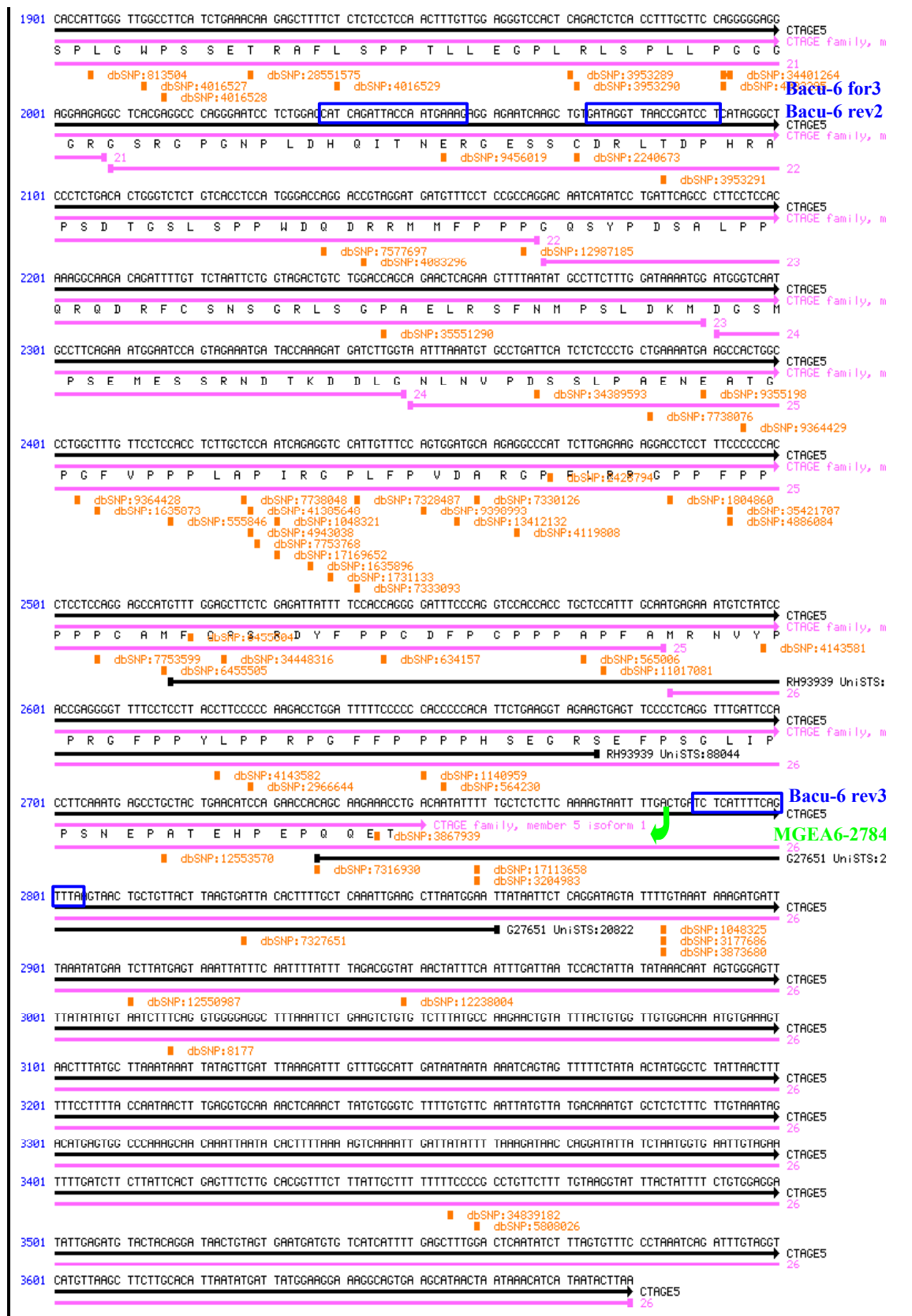


Abb.43: Referenzsequenz *MGEA6* (Homo Sapiens Meningioma Expressed Antigen 6).

MGEA6 bzw. Homo Sapiens CTAGE Family Member 5 (CTAGE5), Transcript Variant 1; NM_005930) mit den Bindungsstellen der Primer HA_MGEA6_EcoRI_for (Base 504)/pGBKT7_MGEA6_BamHI_rev (Base 2784) bzw. Bacu-6 for und rev 1, 2 und 3.

