

Christin Hornung
Dr. med.

Expression und Lokalisation des zentrosomalen Proteins Cep63 in malignen und gesunden Zellen und Geweben

Promotionsfach: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)
Doktorvater: Prof. Dr. med. A. Krämer

Zentrosomen bilden nicht nur wichtige Mikrotubulus-Organisationszentren, sondern spielen auch eine bedeutende Rolle bei der Zellzyklus-Regulation und der zellulären Antwort auf DNA-Schäden. Störungen der Zentrosomenzahl oder -struktur wurden eng verknüpft mit klassischen Merkmalen maligner Tumore wie Aneuploidie und dem Verlust der normalen Zellarchitektur. Die funktionelle Beschreibung aller zentrosomalen Komponenten ist jedoch immer noch unvollständig. Cep63 wurde bei einer Analyse der Proteinkomponenten menschlicher Zentrosomen identifiziert und durch *Xenopus*-Studien mit dem mitotischen Spindelzusammenbau und der Spindelinaktivierung nach DNA-Schäden in Verbindung gebracht. Untersuchungen aus der eigenen Arbeitsgruppe identifizierten humanes Cep63 als ein bedeutendes Bindeglied zwischen dem Zentrosom und dem Zellzyklus, indem es Cdk1 bindet, zu Zentrosomen rekrutiert und dadurch den Eintritt in die Mitose reguliert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass hohe Cep63-mRNA-Expressionslevel in Neuroblastomen mit kürzeren Überlebenszeiten und einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium assoziiert waren.

Ziel des Dissertationsprojektes war die Untersuchung der endogenen Expression und Lokalisation von humanem Cep63 in gesunden und malignen Zellen und Geweben. Dieses Vorhaben wurde methodisch mit einem polyklonalen Kaninchen- und einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen Cep63, die eigens in der Arbeitsgruppe hergestellt wurden, umgesetzt. Mittels Western-Blotting wurde die Expression von Cep63 in Gesamt-Proteinlysaten verschiedener Zelllinien und mononukleärer Zellen eines gesunden Spenders und einer Patientin mit einer chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) analysiert. Hierbei zeigte sich, dass alle Zelltypen, die für den hier dargestellten Western-Blot verwendet wurden, Cep63 exprimieren, wobei sich interessanterweise deutliche Unterschiede in der Expressionsstärke zeigten, die entweder eine Zelltyp-spezifische Expression oder eine aberrante Überexpression in einigen der malignen Zelllinien nahe legten. Diese Beobachtung bestätigt in Zusammenschau mit den Ergebnissen aus der eigenen Arbeitsgruppe, dass Cep63 ein konstitutives zentrosomales Protein ist.

Trotz einer Vielzahl an ausgetesteten Versuchsbedingungen mit Variationen hinsichtlich der hitzeinduzierten Epitopenfreilegung, den Pufferlösungen und Antikörper-Konzentrationen konnte weder mit dem Maus- noch mit dem Kaninchen-Antikörper eine Cep63-Darstellung auf Paraffinschnitten mittels Immunfluoreszenzfärbung etabliert werden, obwohl sich γ -Tubulin auf Paraffinschnitten darstellen ließ. Auf Gefriergewebeschnitten gelang nach Austestung verschiedener Inkubationszeiten für die Permeabilisierung und Cep63-Antikörper-Verdünnungen eine Darstellung von Cep63 mit dem Kaninchen-Antikörper. Diese selektive Anfärbbarkeit könnte auf einer Zerstörung oder Beeinträchtigung des Epitops durch Fixierung und Paraffineinbettung beruhen.

Bei der Auswertung der Gewebeschnitte fiel die apikale Lokalisation der γ -Tubulin- und Cep63-Signale in den Epithelzellen auf, was zu der Frage führte, ob die Cep63-Expression einen Einfluss auf die Mikrotubulus-Anordnung in menschlichen Zellen ausübt. Hierfür wurde die Cep63-Expression in U-2 OS-Zellen, die in Abhängigkeit von Tetrazyklin stabil GFP-Cep63 exprimieren, induziert und mit Hilfe einer α -Tubulin-Färbung die Auswirkungen auf die Mikrotubulus-Anordnung kontrolliert. Nach Cep63-Überexpression ließ sich jedoch keine offensichtliche Störung der Mikrotubulus-Anordnung feststellen. Dies spricht gegen einen Einfluss von Cep63 auf die Mikrotubulus-Organisation.

Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie von Zytospin-Präparaten wurde untersucht, ob CLL-Patienten im Gegensatz zu gesunden Probanden eine aberrante Cep63-Expression aufweisen. Hierfür wurden CD19-positive Zellen aus peripheren Blutproben durch Dichtegradientenzentrifugation und magnetische Zellaufreinigung selektioniert. Ein Vergleich der Cep63-Signalstärke zwischen den CLL-Proben und den gesunden Kontrollen zeigte keinen signifikanten Unterschied. Stattdessen fiel auf, dass die als Kontrolle mitgefärbten U-2 OS-Zellen signifikant häufiger starke Cep63-Signale aufwiesen sowohl im Vergleich zu den Zellen der CLL-Patienten als auch im Vergleich zu den Zellen der gesunden Kontrollen.

Außerdem wurde untersucht, ob die Cep63-Expression mit bereits bekannten Prognose-Parametern der CLL korreliert. Hierfür wurden mononukleäre Zellen der CLL-Patienten verwendet, die aus dem peripheren Blut gewonnen wurden. Der Vergleich der Cep63-Signalstärke mit bekannten Prognose-Parametern zeigte keinen eindeutigen Zusammenhang. Jedoch wiesen erneut U-2 OS-Zellen signifikant häufiger starke Cep63-Signale auf im Vergleich zu den Zellen der CLL-Patienten. Die stärkere Cep63-Expression in den U-2 OS-Zellen im Gegensatz zu den CLL-Proben und den Proben der gesunden Spender legt die Vermutung nahe, dass Cep63 proliferationsabhängig exprimiert wird.

Als Ergebnis der vorliegenden Arbeit kann festgehalten werden, dass Cep63 in einer breiten Palette gesunder und maligner Zellen konstitutiv exprimiert wird und immer zentrosomal lokalisiert ist. Zudem findet sich Cep63 in polarisiertem Epithel analog zu vielen anderen zentrosomalen Proteinen apikal lokalisiert. Des Weiteren zeigten sich zumindest mittels Immunfluoreszenz keinerlei Hinweise auf eine aberrante Expression von Cep63 in CLL-Zellen, so dass ein Einsatz für diagnostische Zwecke nicht sinnvoll erscheint.