

Tobias Christian Baumbusch
Dr. med.

Expression des glycogen branching enzyme-Gens in Mäuseascitestumorzellen

Geboren am 04.01.1973 in Eberbach
Reifeprüfung am 26.05.1992 in Eberbach
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1993/1994 bis SS 2000
Physikum am 29.08.1995 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heidelberg
Staatsexamen am 10.05.2000 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Promotionsfach: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)
Doktorvater: Prof. Dr. med. C. Granzow

Im Verlauf der letzten Dekade hatten mehrere Arbeitsgruppen gezeigt, dass für das nuclear assembly in befruchteten *Xenopus*-Eiern (neben einem DNA-Template und cytosolischen sowie Membranfraktionen) Glykogen absolut unverzichtbar ist. Angesichts der zellbiologischen Bedeutung des nuclear assembly interessiert es ganz besonders, wie das hierfür benötigte Glykogen im nukleären Zellkompartiment entsteht. Das Polysaccharid kommt zwar vor allem unter pathologischen Gegebenheiten (z. B. Hepatitis, Tumoren und Glykogen-Speicherkrankheiten) häufig im Zellkern vor, eine nukleäre Synthese von Glykogen wurde aber unter in vivo-Bedingungen bislang nur bei Zellen der Mutante HD33 des Ehrlich-Lettréschen Mäuseascitestumors nachgewiesen. Unter in vitro-Bedingungen erfolgt die Glykogensynthese bei diesen Asciteszellen ausschließlich im Cytoplasma.

Unterschiede zwischen nukleärer und cytoplasmatischer Glykogensynthese konnten in diesen Zellen bisher nicht festgestellt werden. Jedoch zeigen ausgeprägte molekulare Unterschiede zwischen Glykogenen nukleärer und cytoplasmatischer Herkunft an, dass es sich beim nukleären glycogen branching enzyme um eine Mutante bzw. eine Isoform des cytoplasmatisch aktiven Enzyms handeln dürfte. Möglicherweise ist diese Tatsache bedeutsam für die ektopische Expression des für die Glykogensynthese essentiellen Verzweigungsenzyms im Zellkern.

Zur Klärung dieser Problematik wird die Isolierung und Sequenzierung des Gens für branching enzyme aus den Asciteszellen angestrebt. Da leider keine entsprechende Genprobe zugänglich war, wurden alternativ in der vorliegenden Arbeit zunächst nicht selektierte, transfizierte Bakterien aus einer kommerziell erhältlichen Stabkultur kloniert. Die Bakterienklone wurden auf Kopienzahl der Plasmide und Länge der darin enthaltenen Inserts analysiert. Das längste (960 bp) Insert enthielt eine 477 bp Sequenz, die einem Teil der cDNA für Maus glycogen branching enzyme entspricht. Dieses Insert wurde als Genprobe zum Studium der Expression des branching enzyme Gens in Asciteszellen eingesetzt. Autoradiographisch ergab mRNA aus (durch Zentrifugal-Elutriation von normalen Mäusezellen befreiten) Reinkulturen von in vivo gewachsenen, glykogenspeichernden Ascitestumorzellen nach Northern Transfer und Hybridisierung mit der Genprobe starke Signale. Interessanterweise exprimieren auch glykogenfreie Zellen des glykogenfreien Tumor-Wildtyps das Gen. Maximale Expression des glycogen branching enzyme-Gens wurde in in vitro wachsenden, glykogenspeichernden Asciteszellen registriert.

Polyadenylierte mRNA aus solchen Zellen wurde zur cDNA-Synthese verwendet und die ligierte cDNA in Phagen verpackt. Damit sind nun alle Voraussetzungen für eine erfolgreiche, spätere Isolierung und Sequenzierung des glycogen branching enzyme-Gens aus relevanten Ascitestumorzellstämmen gegeben.