

Christine Greil
Dr. med.

Generierung und Evaluation eines Antikörpers gegen das zentrosomale Protein Microcephalin

Promotionsfach: DKFZ
Doktorvater: Prof. Dr. med. Alwin Krämer

Zentrosomale Proteine sind an vielen zellulären Prozessen beteiligt, deren Fehlregulation zu verschiedenen humanen Pathologien führen kann. Wegen ihrer wichtigen Aufgaben bei Zellzyklusregulation und Chromosomenseparation während der Mitose liegt nahe, dass zentrosomale Dysfunktion bzw. Amplifikation bei der Pathogenese humaner Malignome eine zentrale Rolle spielt. Daneben dient das Zentrosom auch als Mediator zur Aufrechterhaltung der zellulären Polarität von z. B. zilienträgenden Zellen, Neuronen und Photorezeptoren, die bei den meisten nicht-neoplastischen Zentrosomen-assoziierten Erkrankungen gestört ist.

Die zentrosomale Lokalisation des Proteins Microcephalin in humanen Zellen wird seit geraumer Zeit kontrovers diskutiert. Eine zentrosomale Lokalisation wurde vermutet, da auch andere bereits identifizierte Mikrocephalie-assoziierte Proteine zentrosomal lokalisiert sind. Außerdem wurde für aviäres Microcephalin eine Lokalisation am Zentrosom und eine Beteiligung an durch DNA-Schäden induzierten Signalwegen beschrieben. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb zunächst mit Hilfe eines neu generierten Microcephalin-spezifischen Antikörpers die subzelluläre Lokalisation des Proteins bestätigt werden, da die bisher verfügbaren Antikörper für immunzytologische Untersuchungen ungeeignet erschienen.

Es wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper generiert und evaluiert. Dazu wurden zunächst 75 im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellte Hybridomkultur-Überstände mit fluoreszenzmikroskopischen und „Western Blot“-Untersuchungen an U2OS- Zellen bzw. deren Lysaten auf kompetente Klone getestet, wobei sechs Klone identifiziert werden konnten, die Antikörper der geeigneten Spezifität produzierten. Die zentrosomale Lage des Proteins Microcephalin konnte durch Immunfluoreszenzfärbungen mit dem in diesem Screening am besten reagierenden Antikörper und einem Antikörper gegen das zentrosomale Protein γ -Tubulin an Kontroll- und *MCPHI*-defizienten lymphoblastoiden Zellen verifiziert werden. Diese Ergebnisse wurden durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an *MCPHI*-depletierten U2OS-Zellen bestätigt. Darüber hinaus konnte eine nukleäre Akkumulation des Proteins nach Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch UV-Bestrahlung von U2OS-Zellen gezeigt werden.

Desweiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass der generierte Antikörper auch für „Western Blot“-Analysen eingesetzt werden kann.

Die zellzyklusunabhängige Beteiligung des Strukturproteins Centrin1 am Zentriolenaufbau ist schon lange bekannt, es ist daher hervorragend zur Markierung der subzellulären Lokalisation von Mutter- und Tochterzentriolen in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen geeignet. Um die Evaluation der zentrosomalen bzw. zentriolären Lokalisation neuer gegen zentrosomale Proteine gerichteter Antikörper in zukünftigen Projekten zu erleichtern, wurden deswegen stabil GFP-Centrin1-exprimierende Klone der humanen Gewebekultur-Zelllinien U2OS und MCF7 generiert und fluoreszenzmikroskopisch

charakterisiert. Die zentrioläre Lage des Fusionsproteins wurde in Kofärbungen mit Antikörpern gegen Pericentrin und γ -Tubulin als Bestandteile der perizentriolären Matrix sowie gegen die zentriolären Proteine Nek2 und Cep63 bestätigt. Die stabile Expression des Proteins GFP-Centrin1 wurde auch im „Western Blot“ nachgewiesen. In einer fluoreszenzmikroskopischen Auswertung nach Färbung mit einem Anti- γ -Tubulin-Antikörper konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Transfektion von U2OS-Zellen nicht zur Induktion überzähliger Zentrosomen führt.