

Aus der/dem Klinik und Poliklinik Innere Medizin C, Hämatologie und Onkologie
komm. Direktor Univ.- Prof. Dr. C. A. Schmidt
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Mutations- und Funktionsanalyse des Gens PPP2R5C in malignen T-Zell-Erkrankungen

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des akademischen
Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)
der
Universitätsmedizin
der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald
2013

vorgelegt von:
Diana Alexandra Keding
geb. am: 24.02.1987
in: Bielefeld

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reiner Biffar

1. Gutachter: Prof. Dr. A. C. Schmidt

2. Gutachter: Prof. Dr. A. Neubauer

Ort, Raum: Greifswald, Institut für Pathologie, Hörsaal Pathologie

Tag der Disputation: 24.10.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	Phosphatasen als Regulatoren des zellulären Metabolis	1
1.2	Die Struktur und Varianten der Untereinheit B56 γ	3
1.3	B56 γ als Regulator von zellulären Signalwegen	6
1.4	B56 γ als Regulator des Wnt-Signalweges	7
1.5	Kontrolliert die PP2A-B56 γ Aktivität den Zellzyklus?	7
1.6	Negativer oder positiver Regulator von p53?	9
1.7	B56 γ spielt eine Rolle in der malignen Transformation	10
1.8	Veränderung der PPP2R5C-Expression in Tumoren	12
1.9	Zielsetzung dieser Arbeit	15
2.	Material und Methoden	
2.1	Material	
2.1.1	Geräte und Maschinen	16
2.1.2	Einmalmaterialien	17
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	18
2.1.4	Arbeitskits	20
2.1.5	Enzyme und Puffer	21
2.1.6	DNA-Größenstandards und Gelbeladungspuffer	22
2.1.7	Lösungen, Puffer und Medien	22
2.1.8	Primer	24
2.1.9	Antikörper	24
2.1.10	Patientenproben	24

2.1.11 Zelllinien	25
2.1.12 Computersoftware und Internetprogramme	26
2.2 Methoden	
2.2.1 RNA-Methoden	27
2.2.2 DNA-Methoden	28
2.2.3 Klonierung	38
2.2.4 TOPO-TA Klonierung	42
2.2.5 Zellkultur	42
2.2.6 Protein-Analytik	45
2.2.7 Messungen mit FACS	47
3. Ergebnisse	
3.1 Mutationsanalyse durch DHPLC	49
3.1.1 Optimierung der PCR-Reaktion - Wahl der Primerkombination	49
3.1.2 Optimierung der PCR-Reaktion - Wahl der Polymerasen	50
3.1.3 Optimierung der PCR-Reaktion - Wahl der Magnesiumkonzentration	52
3.1.4 Optimierung der PCR-Reaktion - cDNA-Qualität	53
3.2 Mutationsanalyse durch Sequenzierung	54
3.2.1 Etablierung der Nested-PCR von PPP2R5C-cDNA	54
3.2.2 Sequenzierung der Sézary-Proben und Zelllinien	57
3.2.3 Nachweis von PPP2R5C-WT in der Sézary-Probe 1365/04	59
3.3 Nachweis einer neuen Isoform	60
3.4 Expressionsprofil der PPP2R5C-Isoformen in TALLs und gesunden Probanden	63
3.5 Funktionsanalyse des Wildtyp-Transkripts PPP2R5C im Vergleich mit dem Fusions-Transkripts TRAC	67

III	Gliederung
3.5.1 Klonierung von PPP2R5C-WT und PPP2R5C-Fusion in pMACSK ^k II	67
3.5.2 Apoptosemessung in Jurkat und huT-78 transfiziert mit PPP2R5C-WT und PPP2R5C-Fusion	69
3.5.3 Erstellung eines retroviralen Überexpressionssystems vom PPP2R5C-Fusions-Gen	71
3.5.4 Apoptosemessung in Jurkat- und huT-78 – pMIGR-PPP2R5C-Fusion	72
3.6 Analyse PPP2R5C-Fusionsproduktes auf Proteinebene	73
4. Diskussion	74
4.1 Etablierung der DHPLC für das PPP2R5C-Gen	74
4.2 Mutationsanalyse des PPP2R5C-Gens in Sézary-Proben	75
4.3 Identifikation einer neuen Isoform der B56 γ	76
4.4 Fusions-mRNA aus PPP2R5C und TRAC führt zu höheren Apoptoseraten in Jurkat und huT-78	77
4.5 Nachweis der Proteinexpression des PPP2R5C-TRAC-Fusionsproduktes durch Western Blot	81
4.6 Weiterführende Untersuchungen zur Funktion von PPP2R5C in der malignen Transformation	81
5. Zusammenfassung	83
Appendix	
I. Abbildungsverzeichnis	84
II. Tabellen- und Diagramme	84
III. Literaturverzeichnis	85
Eidesstattliche Erklärung	

1. Einleitung

1.1 Phosphatasen als Regulatoren des zellulären Metabolismus

In Tumorproben besteht oft eine unphysiologische Aktivierung von zellulären Signalwegen. Ein Beispiel hierfür ist die bei der chronisch myeloischen Leukämie typische Translokation (9; 22), die zu einem BCR-ABL Fusionsgen führt. Dieses Fusionsgen kodiert für eine ständig aktive Tyrosinkinase, was zu einer dauerhaften Stimulation der Zellteilung führt. Auch in der Adenom-Karzinom-Sequenz von Vogelstein ist das Auftreten einer onkogenen K-ras-Mutation als ein Schritt in der Karzinogenese beschrieben worden.

Die Weiterleitung extrazellulärer Signale in den Zellkern erfolgt häufig durch reversible Phosphorylierung zur Kontrolle der Aktivität von Proteinen. Dies wird als zentraler Mechanismus in der Regulation von Signalkaskaden angesehen. Daher ist es nicht verwunderlich, dass in malignen Zellen Mutationen von spezifischen Kinasen gefunden werden. So ist die RAF-Kinase, die am Anfang der MAPKinase-Kaskade steht, oft in bestimmten humanen Tumoren mutiert. Dies führt zu einem permanenten Wachstumsstimulus und bei Akkumulation weiterer genetischer Schäden zur malignen Transformation

Während Kinasen früh im Zentrum der Forschung zur Krebsentstehung standen und viele Kinasen mit onkogenem Potential oder tumorrepressiver Funktion beschrieben wurden, ist die Rolle der Phosphatasen in der malignen Transformation weniger gut verstanden und erst in den letzten zwei Jahrzehnten untersucht worden [1].

Die zelluläre Phosphatase-Aktivität wird zu einem großen Teil von zwei Proteinkomplexen erbracht: PP1 und PP2, der drei Enzyme PP2A, PP2B und PP2C umfasst [2].

Die beiden Proteinphosphatasen PP1 und PP2A umfassen zusammen 90% aller Serin-Threonin-Phosphatasen, die ubiquitär in den Zellen exprimiert werden [3]. Das insbesondere die PP2A eine wichtige Rolle in der Onkogenese spielt, zeigte sich durch Versuche mit dem PP2A-Inhibitor Okadiac Säure: Unter dessen Einfluss konnte vermehrt malignes Wachstum in Mäusen beobachtet werden [4]. Genauere Studien bewiesen, dass die PP2A eine wichtige Funktion in der Kontrolle von Entwicklung, Proliferation, Zellzyklus, Apoptose und Migration von Zellen einnimmt [5].

Innerhalb der Zelle existieren zwei verschiedene PP2A-Komplexe, die entweder aus zwei oder drei Untereinheiten aufgebaut sind. Die heterotrimere Phosphatase setzt sich aus drei verschiedenen Untereinheiten zusammen: Die A Untereinheit, bildet das aktive Zentrum und interagiert sowohl mit der C Untereinheit als auch mit der regulatorischen Untereinheit [6]. Von allen Untereinheiten existieren mehrere Varianten, so dass die PP2A wiederum eine große Gruppe heterotrimerer Serin-Threonin-Phosphatasen darstellt, die viele Signalwege und Zellfunktionen maßgeblich beeinflusst.

Untereinheiten der PP2A	Alternative Bezeichnungen
Untereinheit A	PR65
Untereinheit B	B55/PR55
Untereinheit B'	B56/PR56
Untereinheit B''	PR48/PR72/PR130
Untereinheit B'''	PR93/PR110
Untereinheit C	
<p><u>Tab.1.1 Nomenklatur der PP2A Untereinheiten</u> Die Entdeckung und Beschreibung der einzelnen Untereinheiten und Subeinheiten erstreckt sich über einen langen Zeitraum und kann auch heute noch nicht als abgeschlossen betrachtet werden. Daher besteht bisher noch keine einheitliche verbindliche Nomenklatur.</p>	

Während von der Untereinheit A und C lediglich zwei Isoformen bekannt sind, gibt es von der regulatorischen Untereinheit 4 Familien (siehe Tab.1) mit einzelnen Isoformen, die wiederum über alternative Splicevarianten verfügen. Theoretisch sind alle miteinander

kombinierbar, so dass eine sehr heterogene Enzymfamilie entsteht, die sich in ihrem Aufbau ähnelt [5]. Die Substratspezifität und Lokalisation wird durch die jeweilige regulatorischen Untereinheit bestimmt und ist Gegenstand der aktuellen Forschung [5]. Das Gen PPP2R5C kodiert für eine Isoform der regulatorischen Untereinheit B56 der PP2A und liegt auf dem Chromosom 14q32 [7].

1.2 Die Struktur und Varianten der Untereinheit B56 γ

In der vorliegenden Arbeit wurde die regulatorische Untereinheit B56 γ mit seinen verschiedenen Splicevarianten untersucht.

Yanhui Xu et al. gelang es 2006 durch Kristallographie die tertiäre und quartäre Struktur des PP2A Holoenzym (Aa/Ca/B56 γ 1) zu beschreiben und die für die Interaktion wichtigen Strukturen zu identifizieren [8].

Die zentrale A Untereinheit ist aus 15 sich wiederholenden Schleifen aufgebaut, die als HEAT (huntingtin-elongation-A subunit-TOR) Motiv bezeichnet werden und jeweils ein Paar antiparallel verlaufende α Helices beinhalten. Diese formen ein gebogenes Molekül, das über die HEAT Motive mittels Van-der-Waals Kräfte zusammen mit einer B und einer C Untereinheit das aktive Enzym bildet.

Es hat sich gezeigt, dass die HEAT Motive 11-15 als konservative Region mit der katalytischen Untereinheit interagieren, während zwei bis acht für die Bindung der Untereinheit B56 von großer Bedeutung sind. Ebenso wichtig ist der Kontakt zwischen dem carboxy-terminalen Ende der C Untereinheit mit einer Tasche, welche durch die Untereinheit A und B56 gebildet wird [9].

Durch Kristallographie konnte die genaue Tertiärstruktur der B56 γ 1 sowie das Zusammenspiel im Enzymkomplex genau untersucht werden. Dabei hat sich gezeigt, dass sie über acht dem HEAT-Motiv ähnelnde Strukturen verfügt, die für die Verbindung mit der Untereinheit A essentiell sind. Die konvexe Seite der boomerangförmigen B56 γ 1 interagiert mit dem Enzymkomplex, während die konkave Seite Bedeutung für die Substratbindung aufweist [8]. Jene Regionen, die für den Kontakt mit den anderen Untereinheiten von großer Bedeutung sind, erweisen sich als hochkonservativ wie zum Beispiel Glu214 (Verbindung zu Arg 183 Aa) oder Asp123 (Arg 268 Ca) [10].

Es stellte sich heraus, dass diese Abschnitte in den einzelnen Isoformen der B56 Familie identisch sind, so dass auf eine gleiche Formation des Holoenzym geschlossen werden kann.

Bisher umfasst die B56 Familie fünf Mitglieder: B56 α , B56 β , B56 γ , B56 δ und B56 ϵ . Trotz struktureller Gemeinsamkeiten sind sie in unterschiedliche Stoffwechselwege involviert und binden andere Substrate [11]. Auch wurde gezeigt, dass unterschiedliche Präferenzen in der subzellulären Lokalisation vorliegen. So kommen B56 α , β , ϵ häufiger im Zytoplasma vor, wohingegen B56 γ vorwiegend im Nukleus lokalisiert ist und B56 δ sowohl im Kern als auch im Zytoplasma stark vertreten ist.

Wiederum unterscheidet sich die Expression der einzelnen Splicevarianten der B56 γ , so dass häufiger B56 γ 3 und γ 2 nukleär

Tab.1.2 Lokalisation der B56 γ Splice-Varianten

B56 γ 1	Zytoplasma > Nucleus
B56 γ 2	Zytoplasma < Nucleus
B56 γ 3	Zytoplasma << Nucleus

Erkenntnisse zu den Splicevarianten e und f liegen nicht vor.

vorkommen, γ 1 jedoch stärker im Zytoplasma exprimiert wird [12]. Ob ein Zusammenhang zwischen der Lokalisation in der Zelle und der Substratspezifität besteht, ist nicht geklärt. Außerdem ist nicht bekannt ob die einzelnen Splicevarianten in ihrer Funktion äquivalent zueinander sind oder verschiedenen Aufgaben zuzuordnen sind.

Auch ist die genaue Anzahl der Splice-Möglichkeiten noch nicht hinreichend geklärt und Gegenstand aktueller Forschung. Zum jetzigen Zeitpunkt sind fünf Formen beschrieben: Isoform a (γ_3) [13], b (γ_2) [13], c (γ_1) [13], e [14], f [15]

Die Isoformen γ_1 bis γ_3 sind in den ersten 10 Exonen identisch und differieren in den Exonen 11-14. Die Isoform γ_1 endet mit dem Exon 11 und dem Exon 12 mit einer 3'-UTR, welche sie mit der Isoform d gemein haben sollte. Diese kürzeste Isoform besäße hingegen kein Exon 11, jedoch das Exon 12. Seit dem Juni 2009 wurde diese Splicevariante jedoch nicht mehr bei NCBI aufgeführt.

Alle Exone 1-14 enthält die Isoform γ_3 , welche in der 3'-UTR der Isoform γ_2 gleicht. Das Exon 13 ist jedoch nicht Bestandteil der Isoform γ_2 . Auch die erst kürzlich beschriebenen Isoformen e und f verfügen im alternativ gespleißten 3'-Ende entweder über alle Exone 11 bis 14 oder es fehlt das Exon 13. [14,15]

Alle Isoformen entstehen als alternative Splicevarianten der mRNA vom Gen PPP2R5C auf dem Chromosom 14q32.2, parallel hierzu existiert ein Pseudogen des PPP2R5C auf dem Chromosom 3p21.3 [7]. Das Pseudogen wird nicht transkribiert und hat keinen Anteil an der Expression der B56 γ -Untereinheit.

Mehrere Arbeiten zeigen, dass die regulatorische Untereinheit B56 γ an einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt ist, die die Proliferation, Differenzierung und Apoptose regulieren.

1.3 B56 γ als Regulator von zellulären Signalwegen

Die PP2A-B56 γ fungieren als negativer Regulator des RAF-MAPK-ERK-Signalwegs. Dieser für die Übertragung von Informationen von der Membran zum Zellkern zentrale Signalweg ist bei vielen malignen Erkrankungen dysreguliert [16, 17].

PP2A-B56 γ interagiert mit ERK und kann durch Dephosphorylierung die Kinase inaktivieren. Desweiteren konnte ein Zielgen von ERK identifiziert werden, IEX-1, welches wiederum einen Komplex mit ERK und PP2A-B56 γ bildet. In dieser Konstellation phosphoryliert IEX-1 B56 γ an einer konservativen Serin-Prolin Region, was zu einer Dissoziation der PP2A und damit deren Inaktivierung führt [18].

Dieses Gleichgewicht zwischen Inhibition und Aktivierung der ERK basiert auf extrazellulären Stimuli. Bei einer starken ERK-Aktivität als Antwort auf Wachstumssignale über wiegt diese die inhibitorische Wirkung von PP2A-B56 γ . Sobald die Stimuli sistieren tritt jedoch die Hemmung der ERK durch Dephosphorylierung ein. In Anwesenheit von IEX-1 bleibt die ERK auch bei geringer Stimulation über Proliferationssignale aktiv [18].

Neuere Arbeiten haben gezeigt, dass in einigen Krebsarten der endogene Inhibitor der PP2A I2PP2A(SET/PHAP-II) überexprimiert wird und es zu einer hohen Aktivität von c-JUN und ERK kommt [19]. Außerdem scheint auch das maligne Potential der Kinase BCR/ABL mit dem Effekt von I2PP2A verbunden zu sein [20]. Eine vermehrte Aktivierung von PP2A durch das Immunsuppressivum FTY720 bewirkt in CML-Zellen eine Hemmung der BCR/ABL – Tyrosinkinase [21]. Dieses macht deutlich, dass die PP2A ein wichtiger Faktor in der Leukämieentstehung ist und auch als therapeutisches Target für neue Medikamente Potential besitzt.

1.4 B56 γ als Regulator des Wnt-Signalweges

Der Wnt-Signalweg ist besonders in der embryonalen Entwicklung von zentraler Bedeutung, aber seine Dysregulation spielt auch in der Tumorentstehung eine wichtige Rolle [22]. Dieser Signalweg wird an vielen Stellen durch die PP2A-Aktivität sowohl positiv als auch negativ beeinflusst. Hierfür sind die einzelnen Untereinheiten von entscheidender Bedeutung [23, 24]. Die Aktivierung des Wnt-Signalwegs erfolgt über den Frizzled-Rezeptor, was zu einer Aktivierung des dishevelled-Proteins führt und die GSK3 β hemmt. Die aktive GSK3 β sorgt für eine Phosphorylierung von β -catenin und induziert damit den Abbau im Proteasom. Die Proteine APC und Axin sind negative Regulatoren des Wnt-Signalwegs indem sie niedrige β -catenin-Level aufrechterhalten.

Die PP2A-B56 γ bindet an Axin, wodurch der Abbau von β -catenin gefördert wird. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine B56 γ -Überexpression (und anderer B56 Untereinheiten) zu einer verminderten Aktivität des Wnt-Signalwegs in Gewebekulturen und Xenopus Zellen führt [25].

1.5 Kontrolliert die PP2A-B56 γ Aktivität den Zellzyklus?

Neben der Beeinflussung von Signalkaskaden finden sich Hinweise darauf, dass B56 γ eine wichtige Rolle in der regelrechten Zellteilung spielt. Ito et al. identifizierten in einer Maus-Melanom-Zelllinie (BL6) eine PPP2R5C-Mutation. Diese führt zu einer verkürzten Form von B56 γ 1 [26]. Eine Bestrahlung dieser Zellen in vitro resultierte in einer stärkeren Anhäufung von chromosomalen Aberrationen und geringerer Apoptose verglichen mit der

Zelllinie F10. Dieses ist mit einer Entkopplung der S und M-Phase zu erklären [26]. Zusätzlich wurde in den BL6-Tumoren ein größeres Potential zur Metastasierung beobachtet [26]. Diese Ergebnisse weisen auf eine wichtige Rolle von B56 γ für die Regulation des Zellzyklus hin.

Neuere Erkenntnisse belegen, dass die PP2A-B56 γ durch Interaktion mit Shugoshin direkt an der Teilung der Chromosomen beteiligt ist [27].

Bis zur Mitose sind die Chromatiden über Cohesin miteinander verbunden, dieses dissoziiert jedoch im phosphorylierten Zustand vom Chromosom und ermöglicht die Trennung der Chromatiden. Die Phosphorylierung übernimmt POLO, wobei die kinetochornahen Anteile erst in der Anaphase phosphoryliert werden [28]. Am Kinetochor befindet sich nun ein PP2A-Sgo1 Komplex, der diesen Prozess antagonisiert [29]. Für die Lokalisation der PP2A aus dem Zytoplasma zu den Chromosomen ist Bub1 zuständig, auch eine Beteiligung von Shugoshin 2 wird noch diskutiert [30].

Kürzlich beschrieben Dean Clift et al., dass in *S.cerevisiae* die Separase die Aktivität der PP2A^{cdc55}, welche ein Äquivalent zur humanen PP2A-B56 darstellt, herunter reguliert und damit den Schutz des Cohesins aufhebt [27]. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen, dass die humane Separase über 55 Aminosäuren mit allen B56 – Untereinheiten interagieren kann [31].

Besteht eine Bindung zwischen Separase und PP2A-B56, kommt es nicht zu einer Komplexierung mit Sgo1. Durch die autokatalytische Abspaltung dieser Region löst sich die Bindung. Eine Expression von Separase-Mutanten, welche diese Fähigkeit nicht besaßen, verursachte einen vorzeitigen Verlust des Cohesins [31].

Bereits frühere Untersuchungen zur Beeinflussung des Zellzyklus durch PP2A ergaben, dass Cyclin G2 in der Lage ist mit B56 γ sowie der C Untereinheit zu komplexieren und im

Folgendes ein Fortschreiten des Zellzyklus zu verhindern. Bennin et al. zeigten, dass eine Überexpression von Cyclin G2, welches B56 γ bindet, mit veränderten Nuclei und einem G1/S Phase Arrest einhergeht [32]. Desweiteren konnte eine p53-abhängige Funktion von Cyclin G2 und der PP2A – B56 festgestellt werden. Als Reaktion auf DNA-Schäden und wachstumshemmende Signale erscheint der Cyclin G2-PP2A Komplex am MTOC (Mikrotubuli-Organisations-Center), was eine Hemmung des dynamischen Auf- und Abbaus der Mikrotubuli ausgehend von den Zentriolen hervorruft [32]. Es kommt dadurch zu einem p53-abhängigen Zellzyklusarrest.

Hinweise darauf, dass die regulatorische Untereinheit B56 γ auch eine wichtige Funktion in der Organisation des Zytoskeletts und der Zellmigration finden sich in den BL6 Mausemelanom Zellen. Da der Wildtyp von B56 γ 1 das Protein Paxillin dephosphoryliert, wiesen Zellen, welche mit der mutierten Form transfiziert wurden, einen hohen Anteil an phosphoryliertem Paxillin auf. Dieses resultierte in einer verstärkten Rekrutierung von Paxillin zu den fokalen Kontakten und Zellmigration durch Actin-Proteine [33].

Die Fähigkeit von Zellen zur Migration ist unter anderem auch bei der Metastasierung von Tumorzellen von großer Bedeutung.

1.6 Negativer oder positiver Regulator von p53?

Neuere Forschungen belegen, dass auch eine direkte Interaktion von p53 und B56 γ besteht [34, 35]. Induziert durch DNA-Schäden bildet PP2A-B56 γ einen Komplex mit p53. Dieses führt zu einer Dephosphorylierung von p53 an Threonin 55, was zu dessen Stabilisierung beiträgt und die Zellproliferation hemmt [36]. Interessanterweise ist diese

Dephosphorylierung abhängig von der p53-Phosphorylierung an Serin15 durch ATM [37]. Damit wird die Funktion der B56 γ als Tumorsuppressor in Zusammenarbeit mit p53 deutlich. Im Gegensatz zu der erwähnten positiven Auswirkung von B56 γ auf die p53-Stabilität, existieren auch Untersuchungen, die eine negative p53-Regulation nahe legen.

So zeigten Okamoto et al. bereits 1996, dass eine Interaktion von p53, PP2A-B56 und Cyclin G1 auftritt [38]. Der Komplex aus Cyclin G1 und PP2A-B56 bindet außerdem Mdm2 in vivo und in vitro wie auch das humane Hdm2 und dephosphoryliert Mdm2 an T216 und Hdm2 an S166. In beiden Fällen entsteht daraus eine Stabilisierung des negativen p53-Regulators. Mäuse, denen Cyclin G1 fehlt, wiesen höhere p53-Level auf als ihre WT-Artgenossen. Wiederum konnte auch beobachtet werden, dass die Anwesenheit von Cyclin G1 nicht immer zu vermehrter Dephosphorylierung an S166 führt, sondern auf dem zellulären Kontext beruht [39].

Da sowohl Hdm2 als auch Cyclin G1 Zielgene von p53 sind, ist denkbar, dass in Verbindung mit PP2A-B56 γ ein Feedback-Mechanismus besteht, der die p53-Aktivität kontrolliert.

1.7 B56 γ spielt eine Rolle in der malignen Transformation

Die PP2A wurde bereits früh als potentieller Tumorsuppressor identifiziert, da Okadaic Säure, ein globaler PP2A-Hemmstoff, über eine tumorinduzierende Wirkung verfügt [40]. Betrachtet man die Komplexität der PP2A-Familie wird deutlich, dass nicht alle PP2A-Komplexe eine tumorsuppressive Wirkung aufweisen, sondern auch onkogen wirken können.

Welche PP2A-Komplexe für die tumorsuppressiven Eigenschaften sorgen ist noch nicht ausreichend geklärt. Es gibt Hinweise, dass die B56 γ -Untereinheit ein wichtiger Faktor bei der malignen Transformation ist.

Es wurde gezeigt, dass PP2A Zielstruktur einiger viraler Proteine ist um das Zellwachstum und damit die virale Proliferation zu fördern [41]. Insbesondere der Effekt des SV40 small tumor antigen (ST) wurde dabei untersucht, weil dieses notwendig ist um humane embryonale Nierenzellen (HEK), welche bereits hTERT (telomerase catalytic subunit) und H-Ras (onkogenes Allel von Ras) exprimieren, vollständig zu transformieren [42]. Diese Fähigkeit des ST begründet sich zum großen Teil in der Fähigkeit die regulatorische Untereinheit der PP2A zu ersetzen. Es existiert jedoch auch ein PP2A-unabhängiger Mechanismus. Von besonderer Bedeutung ist, dass der Knockdown der B56 γ -Untereinheit einen ähnlichen Effekt zeigt und damit dass ST bei der Transformation von HEK-TER Zellen ersetzen kann [43].

Dadurch wird deutlich, dass gerade PP2A-B56 γ wichtige tumorsuppressive Aufgaben erfüllt. Chen et al. untersuchten daher die Auswirkungen der ST-Expression durch den Knockdown der B56 γ -Untereinheit. Hierbei fanden sie heraus, dass 99 Gene in beiden Fällen betroffen sind. Ein starker Einfluss besteht auf Gene, die in die Regulation der Apoptose, der Transkription und der zytoskeletalen Kontrolle, involviert sind [44]. Beobachtet wurde auch eine Aktivierung von NF κ B durch die Proteinkinasen PKC ζ und PI3K. Da NF κ B ebenfalls durch PP2A reguliert wird, ist denkbar, dass deren Modulierung durch das ST zum inadäquaten Wachstumsstimulus führt [44]. Weitere Signalwege sind verändert durch Beeinflussung der AKT, MAPK (siehe 1.3) und der Cycline (siehe 1.5). Obwohl der Effekt von ST durch die Suppression von B56 γ ersetzt werden kann, bestehen auch B56 γ -unabhängige Veränderungen, die zu einer effizienteren Transformation durch ST beitragen

[45]. So ist bekannt, dass auch andere B56 Isoformen Ziel des ST sind, obwohl ausschließlich die Suppression von B56 γ in Bezug auf die Onkogenität der ST Expression gleichkommt.

1.8 Veränderung der PPP2R5C-Expression in Tumoren

Bisher sind keine Tumoren bekannt, die eine PPP2R5C-Mutation aufweisen und dadurch dem Phänotyp der Suppression der B56 γ entsprechen. Die Untersuchung der PP2A Untereinheiten in Tumoren in Hinblick auf deren Mutation zeigten, dass die Untereinheit A regelmäßig Punktmutationen aufweist. So wurde in Brustkrebs-Proben eine Glutamin zu Glycin Mutation (E64G) sowie eine Leserahmenmutation an der Stelle 652 nachgewiesen [46]. Weitere Mutationen fanden sich auch in Lungenkarzinomen und malignen Melanomen [46]. Charakteristisch für diese A α Mutanten ist, dass sie heterozygot auftreten und keine B oder C Untereinheiten mehr binden können [47].

Ebenfalls konnte eine verminderte A α -Expression in Tumoren festgestellt werden. Ein völliger A α -Verlust führt zur Apoptose der betroffenen Zelle und ist daher nicht in Krebszellen beobachtet worden [48].

Bemerkenswerter Weise scheint eine reduzierte Expression von A α Untereinheiten über onkogenes Potential zu verfügen. Chen et al. gehen davon aus, dass dieser Effekt auf die Konkurrenz zwischen den einzelnen Untereinheiten zurückzuführen ist. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass es unter nur 50% der regulären A α Expression zu einem Verlust der B56 γ -PP2A Komplexe kommt, während andere regulatorische Untereinheiten weniger betroffen sind. Äquivalent zur ST Expression und B56 γ Suppression durch siRNA

besteht auch in haploinsuffizienten A α Zellen eine übermäßige AKT Phosphorylierung durch Beeinflussung des MAPK-Signalwegs [48].

Wie bereits zuvor beschrieben, trägt der Verlust an B56 γ maßgeblich zur malignen Transformation von humanen Zellen bei. Die Reduktion von funktionellen PP2A-B56 γ Komplexen kann jedoch verschiedener Genese sein. Neben der Expression von viralem Protein, kann auch die Mutation von interagierenden Untereinheiten wie sie bereits in einigen humanen Tumoren beschrieben wurde, zu diesem onkogenen Zustand führen.

Der Verlust der B56 γ Untereinheit aufgrund der Mutation des codierenden Gens PPP2R5C in malignen Erkrankungen ist noch nicht beschrieben worden. Der Beitrag zur Onkogenese ist jedoch Gegenstand aktueller Forschung.

In einigen Tumoren wurde aber eine verringerte B56 γ -Expression nachgewiesen [49], was zum Beispiel durch heterozygote missense Mutationen hervorgerufen werden kann.

Hinweise darauf, dass die B56 γ auch in leukämischen Erkrankungen eine Rolle spielt, wurden von Fält et al. publiziert. Bei dem Vergleich der Expressionsprofile von B-CLL Proben konnte das Gen PPP2R5C als guter Marker für den Krankheitsverlauf ausgemacht werden. So korrelierten niedrige Expressionslevel mit einem aggressiven Verlauf, während klinisch günstige Verläufe der B-CLL eine höhere PPP2R5C-Expression aufwiesen [50].

Eine B56 γ -Suppression wurde in malignen Melanom-Proben im Vergleich zu benignen melanozytären Nävi festgestellt [51]. Desweiteren ist bekannt, dass charakteristische Translokationen bei T-Zell-Leukämien Gene betreffen wie das HOX11, welche ebenfalls im Zusammenhang mit der PPP2R5C Regulation stehen [52].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Untereinheit B56 γ der PP2A wahrscheinlich eine wichtige Aufgabe in der malignen Transformation in Zellen besitzen. Ob es sich hierbei um ein neues Tumorsuppressorgen handelt, muss sich erst noch in der Zukunft zeigen. Die

Tatsache, dass es an der Regulation von p53 [32, 34, 36], dem Wnt-Signalweg [25] und der ERK [17,18] beteiligt ist, macht dessen Bedeutung für die Kanzerogenese deutlich.

Auch konnte bereits belegt werden, dass die Suppression von PPP2R5C in einigen Krebsarten vorkommt. Aufgrund neuester Erkenntnisse bezüglich der Molekülstruktur und der Quartärstruktur der PP2A-B56 γ , ist es möglich jene Strukturen und Aminosäuren zu identifizieren, die essentiell für die Bildung des aktiven Komplexes sind [6, 9, 10]. Insofern ist auch die Untersuchung der A und C Untereinheit in Tumoren für die Auswirkungen auf die B56 γ -Funktion relevant. Da diese Untereinheiten regelmäßig Mutationen in Tumoren aufweisen, könnte dieses die Integrität des PP2A-B56 γ zerstören und somit einen tumorfördernden Effekt ausüben.

Die Erforschung der Phosphatasen und deren Funktion in der Kanzerogenese wird daher zukünftig eine wichtige Rolle für das Verständnis der Entstehung von malignen Erkrankungen spielen.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Der Tumorsuppressor p53 besitzt eine zentrale Rolle für Zellzyklus und Zellwachstum und ist häufig bei malignen Erkrankungen mutiert oder deletiert. Das p53 Protein wird durch zahlreiche zelluläre Moleküle, zu denen neben Kinasen auch Phosphatasen wie die Phosphatase PP2A gehören, in seiner Aktivität reguliert. Zur Veränderung dieser Proteine bei der malignen Transformation ist bislang wenig bekannt. Eine direkte Interaktion mit p53 wurde für die Untereinheit B56 γ der PP2A gezeigt. Diese Untereinheit wird durch das Gen PPP2R5C kodiert.

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zur molekularen Charakterisierung von Translokationen bei Leukämien, wurde bei einem Sézary-Syndrom ein Fusionstranskript zwischen dem Gen PPP2R5C und dem T-Zell-Rezeptor alpha entdeckt und auf mRNA – Ebene bestätigt. Um eine mögliche Bedeutung von Veränderungen des PPP2R5C-Gens bei T-Zell-Lymphomen zu erfassen, wurden in dieser Arbeit weitere Sézary-Proben sowie Zelllinien auf Mutationen untersucht. Da die PPP2R5C-Translokation zu einem verkürzten Transkript führt, sollte in eine Gen-Expressionsanalyse erfolgen und die Verteilung der einzelnen Isoformen in den klinischen Proben bestimmt werden. Zur Untersuchung einer eventuellen biologischen Bedeutung des Fusionstranskripts wurde weiterhin das PPP2R5C-Wildtyp-Gen im Vergleich mit dem PPP2R5C-Fusions-Gens durch ein retrovirales Überexpressionssystem in den Zelllinien Jurkat und huT-78 exprimiert und eine Apoptosemessung durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit ist es zu klären, ob Veränderungen des PPP2R5C-Gens und eine Alteration der Expression von B56 γ -PP2A-Untereinheiten regelmäßig in T-Zell-Leukämien auftreten und einen wichtigen Schritt in der malignen Transformation darstellen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Maschinen

Gerätetyp	Hersteller
7500 Realtime PCR System	Applied Biosystems
Abzug, BDK	Luft-Reinraumtechnik GmbH
Analysewaage, 210g	Sartorius
Analysewaage, HS-120	OHAUS
Analysewaage, Scout Pro 400g	OHAUS
Durchfluscytometer, FACSCalibur	Becton Dickinson Labware
Eisfördersystem, AF 10	Scotsman
Elektroporations System, Nucleofector II	Amaxa Biosystems
Filmkassette, Kodak X-Omatic cassette	Kodak
Fluoreszenzmikroskop, IX70-S8F2	Olympus Optical Co.
Gelelektrophoresekammer	VWR International
Gefrierschrank – 20°C	BOSCH Kältemaschine
Gefrierschrank - 80°C	HERA freeze
Heizblock, Thermoblock GEBR.	Liebisch
Heizblock, Thermomixer comfort	Eppendorf Research
Heizplatte, IKAMAG RCT	J.& K. IKA-Labortechnik
Inkubator, BBD 62220	Heraeus
Inkubator, Hera Cell 150	Heraeus
Kühlschrank	BOSCH Kältemaschine
Lichtmikroskop	Zeiss
Mikrowelle	Microstar
Mono/Bi dest. Aufbereitungsanlage, 2108	GFL
Nanophotometer	Implen
pH-Messelektrode, SenTix 97T	WTW

Gerätetyp	Hersteller
pH-Meter, pH538 MultiCal	WTW
Photographieeinheit, Geldoc 2000	Bio-Rad Laboratories
Pipetten	Eppendorf Research
Pipetten	Gilson/Pipetman
Pipettierhilfe, pipetus	Hirschmann
Laborgeräte Schüttler, PMS 1000	Grant Instruments
Schüttler und Heizgerät, OV3	Biometra
Sicherheitswerkbank, Hera safe	Heraeus
Stromversorgungsgerät, 160/1.6 Power Supply	Bio-Rad Laboratories
Stromversorgungsgerät, EV231	Consort
Thermocycler, GeneAmp 2400	Applied Biosystems
Thermocycler, GeneAmp 9600	Applied Biosystems
Thermocycler, GeneAmp 9700	Applied Biosystems
Vortex Mixer, neolab 7-2020	Neolab
Vortex Mixer, VF2	J. & K. IKA-Labortechnik
WAVE Nucleic Acid Fragment Analysis System	Transgenomic
Western Blot Tank System, Mini Protean II	Bio-Rad Laboratories
Zellzählkammer, Neubauer	Paul Marienfeld
Zentrifuge, Centrifuge 5415R	Eppendorf Research
Zentrifuge, Galaxy Mini Centrifuge	VWR International
Zentrifuge, Megafuge 1.OR	Heraeus
Zentrifuge, Varifuge 3.ORS	Heraeus

2.1.2 Einmalmaterialien

Materialbezeichnung	Hersteller
Einmalkanülen, Neoject	Dispomed WITT OHG
Gel Blotting Papier, GB 005	S. & S. Bio Science
Gewebekulturflaschen, 75cm ²	Sarstedt AG & Co.

Materialbezeichnung	Hersteller
Gewebekulturflaschen, Cellstar 25cm ²	Greiner bio-one
Glasfaserfilter	Wallac
Handschuhe, NitraTex	Ansell
Handschuhe, Preha soft Powderfree	Paul Hartmann AG
Hautdesinfektion, Softasept N	Braun Melsungen AG
Microplatten, PS Microplatte 96 well	Merck AG
optische 96 well Reaktions Platten MicroAmp	Applied Biosystems
optische adhäsive Abdeckfolie	Applied Biosystems
Parafilm	American National Can
PCR-Probenröhrchen	Becton Dickinson Labware
Pipettenspitzen, Biosphere Filter Tips	Sarstedt AG & Co.
Pipettenspitzen, ep Tips	Eppendorf Research
Pipettenspitzen, Safe Seal-Tips	Biozym Diagnostic GmbH
Pipettenspitzen, Safe Seal-Tips professionel	Biozym Diagnostic GmbH
Reagenzröhrchen, BD Falcon	Becton Dickinson Labware
Reaktionsgefäße, 0.5, 1.5, 2 ml	Eppendorf Research
Röhrchen, Tube 15, 50 ml	Sarstedt AG & Co.
Röntgenfilm	Kodak
Roti-PVDF Transfermembran T830.1	Carl Roth GmbH
Serologische Pipetten, 5-25 ml	Sarstedt AG & Co.
Skalpelle	Dahlhausen
Suspensionskulturplatte, 6 well, 12 well	Greiner bio-one
Zellkulturplatten	Greiner bio-one

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalienbezeichnung	Hersteller
[Methyl-3H]-Thymidin	Amersham Biosciences
0.1 % (w/v) Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich Chemie

Chemikalienbezeichnung	Hersteller
2-Propanol	Merck AG
Aceton	J.T.Baker
Acrylamid, Rotiphorese Gel 30	Roth
Ammoniumpersulfat	Merck AG
Aqua destillata, Aqua ad iniectabilia Braun	Braun Melsungen AG
Ampicilin (100 mg/ml)	Roth
BLOCK-iT Fluorescent Oligo	Invitrogen
Bromphenol blau	Merck AG
Chloroform	J.T.Baker
Deoxycholic Säure	Sigma-Aldrich Chemie
DEPC, RNase freies Wasser	United States Biochemicals
DNA-Größenstandard,100 bp DNA-Ladder	Invitrogen
DTT	Merck AG
Ethanol p. a.	Roth
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie
Fetales Rinder Serum	PAN Biotech GmbH
Glycin	Roth
Glykogen Merck AG	
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich
Chemie MEM Non-Essential-Amino-Acids	GIBCO Laboratories
MEM Sodium Pyruvate	GIBCO Laboratories
Methanol p.a.	Roth
Milchpulver	Roth
Natriumazid	Merck AG
Natriumchlorid	Roth
PBS, DULBECCO (1x) low Endotoxin	Biochrom AG
peqGOLDUniversal Agarose	Peqlab
Plasmocin, 2.5mg/ml	Amaya Biosystems
Prestained SDS-PAGE Standards, broad range	Bio-Rad Laboratories
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich Chemie

Chemikalienbezeichnung	Hersteller
Protease Inhibitor Mix, complete Mini	Roche
RNase	Sigma-Aldrich Chemie
RPMI 1640 Medium mit GlutaMAX	GIBCO Laboratories
SDS	Sigma-Aldrich Chemie
SOC-Medium	Invitrogen
TEMED	Roth
Tris	United States Biochemicals
TRIZOL	Invitrogen
Trypan Blau, Trypan Blue Stain	GIBCO Laboratories
Tween 20, Polyoxyethylensorbitanmonolaurat	AppliChem GmbH
WAVE Optimized Buffer A	Transgenomics
WAVE Optimized Buffer B	Transgenomics
WAVE Optimized Solution D	Transgenomics
WAVE Optimized Syringe Wash Solution	Transgenomics

2.1.4 Arbeitskits

Kit-Bezeichnung	Hersteller
Advantage 2 Polymerase PCR Kit	Clontech Laboratories
ApoAlert™ Annexin V – FITC	Clontech Laboratories
CalPhos™ Mammalian Transfection Kit	Clontech Laboratories
Cell Line Nucleofector® Kit V	Amaxa Biosystems
JETSTAR 2.0 MAXI	GENOMED
Micro BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce Biotechnology
Optimase Polymerase Premium Pack	Transgenomics
Pfu DNA Polymerase Kit	Promega
PowerScript Reverse Transkriptase	Clontech Laboratories
QIAquick Spin	Quiagen
S.N.A.P Miniprep Kit	Invitrogen

Kit-Bezeichnung	Hersteller
S.N.A.P Midiprep Kit	Invitrogen
SYBER Green PCR Kit	Applied Biosystems
T4-Ligase (3u/ μ l)	Promega
TOP 10	Invitrogen
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen
Western Blotting Luminol Reagent	Santa Cruz Biotechnology

2.1.5 Enzyme und Puffer

Enzymbezeichnung	Hersteller
<u>Polymerasen</u>	
Advantage Polymerase	Clontech Laboratories
AmpliTaq Gold Polymerase	Applied Biosystems
Optimase Polymerase	Transgenomics
Pfu Polymerase	Promega

Restriktionsenzyme von Promega

BamH I
Bgl II
EcoR I
Sal I
Spe I
XhoI

Puffer von Promega

Buffer B
Buffer D
Buffer E

2.1.6 DNA-Größenstandards und Gelbeladungspuffer

Name	Hersteller
100bp DNA Ladder	Invitrogen
1Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen
6 x Loading Dye Solution	Invitrogen

2.1.7 Lösungen, Puffer und Medien

Proteinanalytik

TBS, pH 7,5	Tris	15,76g	
	NaCl	9,00g	
	A. dest.	1000ml	
Transferpuffer, pH 8,3	Tris	3,03g	mit A. dest
	Glycin	14,4g	auf 1000ml
	Methanol	200ml	auffüllen
5x Laufpuffer	Tris	15,0g	
	Glycin	72,0g	
	SDS	5,0g	
	A. dest	1000ml	
6x Probenpuffer	0,5M Tris, pH 6,8	3,5ml	
	Glycerol	1,5ml	
	SDS	0,5g	
	DTT	465mg	
	Bromphenol blau	1,2mg	
RIPA Puffer nach	Igepal CA-630	300µl	
Santa Cruz	Desoxycholic Säure	150mg	
	SDS	30mg	
	PBS	30ml	

Protease-
Inhibitorlösung 1 Tablette complete Mini gelöst in 0,4ml A. dest
10µl pro 250µl RIPA Puffer

Gelelektrophorese

5x Gelelektrophorese- Probenpuffer	10% Bromphenol blau	50µl	
	99% Glycerol	500µl	
	1x TBE	50µl	
	A. dest	500µl	
10x TBE, pH 8,3	Tris	107,81g	
	Borsäure	55,03g	mit Borsäure auf pH 8,3 einstellen
	EDTA-Na2-Salz	7,4g	
	A. dest	1000ml	

Zellkultur

RPMI- 1640 GIBCO	FCS	10%	
	nicht essentielle AS	1%	steril filtrieren
	Natriumpyruvat	1%	
	Plasmocin	0,2%	
LB-Medium	Trypton	10g	in 950ml A.dest lösen, mit NaOH
	Hefeextrakt	5g	auf pH 7 einstellen, mit A. dest auf
	NaCl	5g	1l auffüllen und autoklavieren
DMEM GIBCO	FCS	10%	
	nicht essentielle AS	1%	
	Plasmocin	0,2%	

2.1.8 Primer

Die Synthese der Primer wurde von der Firma TIB Molbiol®, Berlin nach entsprechender Vorgabe übernommen.

Tab. 2.1 Primer

Bezeichnung	Sequenz	Orientierung	Annealingtemperatur
PPP-amp2-f1	5'- atggcat agcagagttact	forward	55,7°C
PPP-amp3-f1	5'- gtgaagatcatggaaccctc	forward	64,4°C
RT-PPP2R5C-f5	5'- tggccaaagactcacagtccaa	forward	69,8°C
RT-PPP2R5C-f6	5'- atgtaataaagcgggcagca	forward	65°C
PPPex10-f1	5'- ttctctcc ttgtaccgcaactcaaagac	forward	72,1°C
PPP-EcoRI	5'- gaattcattgctttcccgtgaagt	forward	72,1°C
PPP-amp2-r1	5'- ctccgctgcgttgcact	reverse	64,8°C
PPP-amp3-r1	5'- ccaggacggccgctag	reverse	67,1°C
RT-PPP2R5C-r1	5'- ggatcagaacaaagtcaaagagga	reverse	66,3°C
RT-PPP2R5C-r3	5'- tgtaactgattggtatggcacaggaa	reverse	69,8°C
RT-PPP2R5C-r4	5'- cgcacgttattgcctacggaac	reverse	71,2°C
RT-PPP2R5C-r5	5'- gaggggtccatgatcttcacaa	reverse	68,2°C
PPPex13-r1	5'- agcaccatgagcattccggtt	reverse	70,2°C
PPP3-BamHI	5'- ggatcctgtaactgattggtatggcacagg	reverse	72,1°C
Ca+425-EcoRI	5'- ctacagctggaccacagccgca	reverse	72,1°C
Ca+113	5'- gattctcaaacaaatgtgtcacaagtaag	reverse	67,9°C

2.1.9 Antikörper

Primärer Antikörper

TCRalpha (H-142): sc-9100; rabbit polyclonal

Hersteller

Santa Cruz

Sekundärer Antikörper

Goat Anti-Rabbit IgG

Applied Biosystems

2.1.10 Patientenproben

interne Kodierung	Diagnose
245	Sèzary-Syndrom
246	Sèzary-Syndrom
247	Sèzary-Syndrom
249	Sèzary-Syndrom
250	Sèzary-Syndrom
251	Sèzary-Syndrom
252	Sèzary-Syndrom
253	Sèzary-Syndrom

06007	Sézary-Syndrom
1365/04	Sézary-Syndrom
001	TALL
006	TALL
007	TALL
009	TALL
012	TALL
013	TALL
015	TALL
018	TALL
058	TALL
059	TALL
063	TALL
064	TALL
069	TALL
072	TALL
073	TALL
074	TALL
075	TALL
076	TALL
119	TALL
120	TALL

2.1.11 Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Referenz
293-GP	Humane embryonale Nierenzellen	Graham et al., 1977
CCRF-CEM	TALL	Foley et al., 1965
DAUDI	Burkitt Lymphom	Klein et al., 1968
DND41	kortikale TALL	Drexler et al., 1985
Granta	Mantelzell-Lymphom	Jadayel et al., 1997
HPB-ALL	TALL	Morikawa et al., 1978
huT 78	Sézary (p53 negativ)	Gazdar et al., 1980
Jurkat	TALL (p53 negativ)	Schneider et al., 1977
Karpas 299	T-Zell Lymphom	Fisher et al., 1988
KM-H2	Hodgkin Lymphom	Kamesaki et al., 1986
L1236	Hodgkin Lymphom	Wolf et al., 1996
MOLT-4	TALL	Minowada et al., 1972
PEER	TALL	Ravid et al., 1980
Raji	Burkitt Lymphom	Pulvertaft et al., 1964

REH	B-Zell Leukämie	Rosenfeld et al., 1977
SU-DHL 4	B-Zell Lymphom	Epstein et al., 1976
SU-DHL 6	B-Zell Lymphom	Epstein et al., 1978

2.1.12 Computersoftware und Internetprogramme

Software/Browser/Datenbank

Quelle

Agarose-Gel-Auswertung, Quantity-One Version 4.1

Bio-Rad Laboratories

Sequenzierung, Chromas Lite, Version 2.01

www.technelysium.com.au

FACS-Messung, Cell Quest Pro

Becton Dickinson Labware

Plattenphotometer Auswertung, Magellan Version 3.11

Tecan

Entwurf von Primern, Primer3

http://cbr-rbc.nrc-cnr.gc.ca/cgi-bin/primer3_www.cgi

Real-time PCR-Auswertung, 7500 Sequence Detection Software Version 1.3

Applied Biosystems

FACS-Auswertung, WinMDI Version 2.8

<http://facs.scripps.edu/>

Navigator Software Version 2.1.0

Transgenomic

Optimase ProtocolWriter

www.mutationdiscovery.com

Human BLAT Search
NCBI/BLAST

<http://genome.ucsc.edu/>
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

2.2 Methoden

2.2.1 RNA-Methoden

2.2.1.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellsuspensionen erfolgte mittels einer Variante der single-step Methode (Chomczynski et al., 1987) unter Verwendung der Reagenz TRIzol.

Die gewaschenen Zellsuspensionen wurden 5min bei 5rcf zentrifugiert und in 800µl Trizol lysiert. Nach einer Inkubationszeit von 5min erfolgte die Zugabe von 200µl Chloroform und eine Zentrifugation von 15min bei 4°C mit 12200rcf. Es entstand eine obere wässrige Phase, welche die RNA beinhaltet, eine Interphase mit Proteinen und die untere Phenol/Chloroform-Phase. Die in der wässrigen Phase abgenommene RNA wurde mit 500 µl Isopropanol gefällt, 10min inkubiert und zentrifugiert. Durch die Zugabe von Glycogen wurde das RNA-Pellet sichtbar, welches anschließend mit 70% Ethanol gewaschen wurde. Nach der Trocknung des Pellet wurde die RNA in 20µl DEPC-Wasser gelöst. Die gewonnene RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.1.2 Kontrolle der gewonnenen RNA

Die in der RNA-Isolierung gewonnene RNA wird hinsichtlich ihrer Qualität und Quantität kontrolliert, indem man 5µl des RNA-Aliquots zusammen mit 3µl A.dest und 2µl 6 x GBP auf ein 1,5% Agarosegel aufträgt und eine Elektrophorese durchführt.

Auf dem Gel zeigt sich bei gelungener RNA-Isolierung ein typisches Bild. Sehr gut sichtbar sind die Banden der 18S- und 28S-rRNA, während die Poly-A⁺-RNA als Schmier erscheint. Daraufhin kann die RNA in cDNA umgeschrieben werden.

2.2.1.3 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Unter der reversen Transkription versteht man das Umschreiben von RNA in cDNA (complementary DNA) mittels einer Reversen Transkriptase. Als Startpunkt für das Enzym

dienen Hexamerprimer (random hexamers), welche nach dem Zufallsprinzip an der RNA hybridisieren, so dass die cDNA - Synthese nicht mRNA spezifisch ist, sondern die Gesamt-RNA umfasst.

Die Reverse Transkription erfolgte mit Hilfe der Superscript II Reversen Transkriptase von invitrogen.

Für einen Ansatz von 5,5µl RNA

Reagenzien	Volumen
5x First-Strand-Buffer	2,0µl
dNTP Mix (10mM each)	1,0µl
DTT	1,0µl
PowerScript RT	0,5µl

Die cDNA-Synthese beginnt mit einer initialen Denaturierung bei 65°C zur Aufschmelzung der Sekundärstrukturen der RNA. Erst im nächsten Schritt wird der Buffer und der RNase Inhibitor hinzu gegeben. Durch die Abkühlung auf 25°C kommt es zum Annealing der Primer, woraufhin nun die Reverse Transkriptase hinzugefügt wird. Es folgt eine Inkubation nach folgendem Schema:

10min bei 25°C, 50min bei 42°C , 15min bei 70°C

2.2.2 DNA-Methoden

2.2.2.1 Gelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese diente zum Auftrennen der DNA-Fragmente aus PCR-Ansätzen, Restirktionsansätzen und ähnlichem. Die Trennung erfolgt nach der Größe der Produkte, da diese im elektrischen Feld verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten haben.

Die Konzentration der Gele variierte mit der Größe der DNA-Fragmente von 1 bis 2 %. Durch die Zusetzung von Ethidiumbromid, welches mit der DNA (und auch RNA) interkaliert, konnten die Produkte unter UV-Licht als Banden sichtbar gemacht werden. Parallel zu den Fragmenten wird ein Größenmarker aufgetragen, der die Bestimmung der

Anzahl an Basenpaaren ermöglicht. Für kleine Produkte wurde der 100bp-Marker und für größere Fragmente den 1kb plus-Marker jeweils von invitrogen verwendet.

Tab. 2.2 Gele

Agarosekonzentration (w/v)	Fragmentlänge
1,0% 1,0g Agarose/100ml TBE	0,5 bis 7 kb
1,5% 1,5g Agarose/100ml TBE	0,2 bis 3 kb
2,0% 2,0g Agarose/100ml TBE	0,1 bis 2 kb

2.2.2.2 Herstellung von Agarosegelen

Für die Gele wurde 0,5%ige TBE-Lösung mit der entsprechenden Menge Agarose in einer Mikrowelle erhitzt und dann mit Ethidiumbromid versetzt. Die flüssige Masse wird in Gelkammern gegossen und erstarrt durch das Abkühlen bei Raumtemperatur.

Als Puffer für die Elektrophorese diente eine 0,5%ige TBE-Lösung

Die Proben wurden mit einem 6-fachen Gelbeladungspuffer in die Taschen der Gele aufgetragen und wanderten im elektrischen Feld bei einer Stromstärke von 15W und einer Spannung von 120V. Anschließend wurden die Bande durch UV-Licht sichtbar und mit dem UV-Transluminator von BIORAD fotografiert.

2.2.2.3 DNA-Gelextraktion

Zur Aufreinigung der DNA aus den Agarosegelen wurde das Kit von Qiagen gebraucht.

Die gewünschten Banden wurden mit einem sterilen Skalpel ausgeschnitten, mit 300µl GQ-Puffer versetzt und anschließend 10min bei 50°C erwärmt. Dem gelösten Gel werden 100µl Isopropanol hinzu gegeben, gemischt und auf eine Säule gegeben. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 13000rcf werden 750µl PE-Puffer auf die Säule gegeben. Es folgt nach einer Einwirkzeit von 5min eine erneute Zentrifugation von 1 Minute bei 13000rcf. Anschließend wird die Säule in ein neues 1,5ml Eppendorfgefäß gestellt und die letzte Zentrifugation wiederholt. Um die DNA zu eluieren werden zum Schluss 30µl destilliertes Wasser von Braun auf die Säule gegeben und in ein 1,5ml Eppendorfgefäß gestellt. Nach 1 Minute wird zum Schluss 1 Minute bei 13000rcf zentrifugiert und die Säule danach entfernt. Das Eluat enthält nun die DNA.

Es werden 5µl des Eluats zusammen mit 3µl Aqua dest. und 2µl GBP auf ein Gel aufgetragen um die Effizienz der Gelextraktion zu überprüfen. Die Quantifizierung der DNA-Menge erfolgt mit einem DNA High Mass Ladder (in vitro).

2.2.2.4 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase – Kettenreaktion ist seit 1985 eine unentbehrliche Methode in der molekularbiologischen Forschung und wird ständig weiterentwickelt.

Das Prinzip

Ziel der Standard-PCR ist es von einem beliebigen DNA-Fragment unbegrenzt viele Kopien herzustellen. Dabei ist diese Methode äußerst sensitiv und kann heutzutage in einem Gefäß automatisiert ablaufen.

Das Prinzip der Reaktion beruht auf drei Schritten, welche einen Zyklus darstellen und der theoretisch beliebig oft wiederholt werden kann. Der erste Schritt ist die Denaturierung, bei dem sich das DNA-Template durch Erhitzen auf 94°C in zwei Stränge trennt. Im nächsten Schritt, Annealing genannt, wird die Temperatur abgesenkt um den Primern die Möglichkeit zugeben sich an die Einzelstränge anzulagern. Die Annealingtemperatur wird durch die Sequenz der Primer bestimmt und liegt etwa 5-10°C niedriger als die Schmelztemperatur, welche sich z.B. durch folgende Gleichung ermitteln lässt.

$$T_m = 4 \times (\text{Anzahl G bzw. C}) + (\text{Anzahl T bzw. A})$$

In der anschließenden Elongationsphase wird die Temperatur wieder erhöht (68°C) um optimale Bedingungen für die thermostabile DNA-Polymerase zu schaffen. Sie setzt an den Primern an und synthetisiert den komplementären zweiten Strang. Dieser Ablauf wiederholt sich zwischen 25x und 40x.

Eingangs erfolgt jedoch zunächst eine initiale Denaturierung von 5min bei 94°C und auch nach der Beendigung der Zyklen schließt noch eine fünfminütige Phase von 68°C an um eine Beendigung der Elongation zu gewährleisten. Die Abkühlung auf 4°C sorgt für die reversible Inaktivierung der DNA-Polymerase.

Die Reagenzien

Für die Durchführung der PCR benötigt man, äquivalent zur in vivo DNA-Synthese, Desoxynukleotide (dNTPs). Für die Reaktionen wurden die dNTPs mit einer Konzentration

von 100µM verwendet. Sie konnten unabhängig von der jeweiligen Polymerase eingesetzt werden.

Die Puffer-Lösungen mussten in ihrer Zusammensetzung auf die Polymerase abgestimmt werden, damit optimale Aktivitätsbedingungen erreicht werden. Die Advantage-Taq-Polymerase arbeitete mit dem zugehörigen Puffer. PCR-Ansätze mit der Optimase-Polymerase von Invitrogen wurden mit dem beigefügtem Puffer versehen. Die Amplifikation mit der Pfu-Polymerase erfolgte mit dem vom Hersteller empfohlenem Puffer.

Die genutzten thermostabilen Polymerasen unterschieden sich hauptsächlich in ihrer Fähigkeit zur Korrekturaktivität. Während die Pfu und die Optimase über eine hohe 3'-5'-Exonuclease-Aktivität verfügen, was die Synthese bedingten Mutationen reduziert, ist die Taq-Polymerase nicht zur Korrektur befähigt. Die überwiegend eingesetzte Advantage-Taq-Polymerase ist bereits ein Gemisch aus der herkömmlichen Taq-Polymerase mit einem geringen Anteil einer Polymerase mit Korrekturaktivität. Diese Kombination nutzt die hohe Syntheserate der Taq-Polymerase und verbessert das Ergebnis der Synthese in Hinblick auf die Mutationen. Dennoch waren die entstandenen PCR-Produkte nicht von ausreichender Reinheit um sie für die DHPLC oder zur Klonierung zu gebrauchen. Zu diesen Zwecken kamen die Proof-reading-Polymerasen zum Einsatz.

Das Design der PPP2R5C-spezifischen Primer geschah mit der Internet-Software . Hierbei wurde beachtet, dass die Primersequenz ausschließlich für das PPP2R5C spezifisch ist, was jedoch auch für das Pseudogen zutrifft. In der Tabelle (2.1) befindet sich eine Übersicht aller Primer und ihren Eigenschaften. Die Annealingtemperatur wurde mittels eines Kalkulators von Molbiol errechnet und im Temperatur-Zeit-Schema der PCR berücksichtigt. Die Primerkonzentration betrug stets 10µM.

Als Template für eine PCR können DNA-, RNA- oder Plasmid – abschnitte dienen. Für die Mutationanalyse wurde die cDNA aus Zelllinien oder aus Buffy Coats von Leukämie-Proben oder von gesunden Spendern genutzt. Dadurch konnte vermieden werden, dass das Pseudogen amplifiziert wurde. Dies beschränkt die Analyse auf die, für die Amniosauresequenz essentiellen Genabschnitte, die Exone.

2.2.2.5 Nested PCR von PPP2R5C

Die Nested PCR erfolgt in zwei aufeinander folgenden PCRs (auch erste Runde; zweite Runde), wobei das Template des zweiten Ansatzes aus dem verdünnten PCR-Ansatz der 1. Runde besteht. Die Primer in der ersten Runde liegen jeweils vor bzw. hinter dem zu amplifizierenden DNA-Abschnitt. In der zweiten Runde binden die Primer zwischen denen des ersten Durchgangs, so dass man nun ein kleineres Fragment erhält.

Der Vorteil der Nested PCR besteht in der Möglichkeit mit geringen Templatemengen zu arbeiten und die Spezifität der Reaktion deutlich zu erhöhen. Daher ist es möglich die gewünschte cDNA des Gens PPP2R5C aus der gesamten exprimierten DNA in den Zellen zu vervielfältigen.

Sowohl der Forward als auch der Reverse Primer der 1. Runde lagen in den UTRs, welche die Exone flankieren. In der 2. Runde entstanden mit verschiedenen Kombinationen der inneren Primern kurze Fragmente zur Analyse. Als Template in der zweiten Runde diente 1µl des 1:100 verdünnten PCR-Produktes der ersten Runde. Aufgrund der höheren Spezifität konnte die Anzahl der Zyklen in der zweiten Runde von 35 auf 30 reduziert werden.

Alle Reagenzien wurden bei -20°C in einem separaten Raum, der ausschließlich für das Pipettieren der PCR-Ansätze genutzt wurde, gelagert. Die Überprüfung der Kontamination eines PCR-Ansatzes erfolgte durch Mitführung einer negativen Probe (destilliertes Wasser).

Pipettier-Schema der PCR-Ansätze

PCR-Pipettierschema

25µl-Ansatz, 1µl Probe mit Aqua dest. Kontrolle

Advantage-Polymerase

	x	2
H ₂ O	18	36,0
10xBD Advantage 2PCR Buffer	2,5	5,0
dNTP Mix (each 2,5mM)	2	4,0
Primer forward (10µM)	0,5	1,0
Primerreverse (10µM)	0,5	1,0
50x BD Advantage 2Polymerase Mix	0,2	0,4
Summe	23,7	47,4

25µl-Ansatz, 1µl Probe mit Aqua dest. Kontrolle

Optimase-Polymerase

	x	2
H ₂ O	16,4	32,8
10x Reaction Buffer	2,5	5,0
dNTP Mix (each 2,5mM)	2	4,0
MgSO ₄	1,6	3,2
Primer forward (10µM)	0,5	1,0
Primer reverse (10µM)	0,5	1,0
50xOptimase Polymerase	0,5	1,0
Summe	24	48,0

25µl-Ansatz, 1µl Probe mit Aqua dest. Kontrolle

Pfu-Polymerase

	x	2
H ₂ O	18,25	36,5
10x Pfu Puffer	2,5	5,0
dNTP Mix (each 2,5mM)	0,5	1,0
Primer forward (10µM)	1,25	2,5
Primer reverse (10µM)	1,25	2,5
50x Pfu Polymerase Mix	0,25	0,5
Summe	24	48,0

Zeit-Temperatur-Verlauf Advantage-Polymerase

I.Runde Nested-PCR

94°C-5,0min

(94°C- 30sec, 60°C-30sec, 68°C- 2,0min) x35

68°C- 5,0min, 4°C -∞

II.Runde Nested-PCR

94°C-5,0min

(94°C- 30sec, 60°C-30sec, 68°C- 1,5min) x30

68°C- 5,0min, 4°C -∞

Zeit-Temperatur-Verlauf Optimase-Polymerase

I.Runde Nested-PCR

95°C-2,0min

(95°C- 30sec, 61,2°C decrease 0,5°C per cycle – 30sec, 72°C – 3,0min) x14

(95°C- 30sec, 54,2°C – 30sec, 72°C – 3,0min) x19

72°C- 5,0min, 4°C -∞

II.Runde Nested-PCR

95°C-2,0min

(95°C- 30sec, 55,7°C – 30sec, 72°C – 40sec) x 30

72°C- 5,0min, 4°C -∞

Zeit-Temperatur-Verlauf Pfu-Polymerase

I.Runde Nested-PCR

94°C-5,0min

(94°C- 30sec, 62°C-30sec, 68°C- 4min.) x 35

68°C- 5,0min, 4°C -∞

II.Runde Nested-PCR

94°C-5,0min

(94°C- 30sec, 62°C-30sec, 68°C-4min.) x 30

68°C- 5,0min, 4°C -∞

(Die Annealing-Temperatur wurde auf die verwendeten Primer abgestimmt.)

2.2.2.6 Real-time quantitative PCR

Bei der RTQ-PCR möchte man an Stelle der absoluten Menge des PCR-Produktes eine Aussage über die Kinetik der Reaktion machen.

Um den Verlauf der Reaktion „sichtbar“ zu machen, werden fluoreszierende Moleküle genutzt, die über ein spezifisches Anregungs- und Emissionsspektrum verfügen. Das von uns verwendete Kit SYBER green enthält Fluoreszenzfarbstoffe, die unspezifisch in die DNA eingebaut werden und dann bei entsprechender Anregung Licht emittieren. Die Emission ist also proportional zur synthetisierten DNA – Menge. Die Vermehrung der DNA-Fragmente erfolgt in der frühen Phase exponentiell, geht in eine lineare Phase über bis sich der Prozess dem Stillstand annähert. Der Rückgang der Amplifikation ist auf die Akkumulation von Pyrophosphat, Nukleotid – Mangel und weitere Einflüsse zurückzuführen. Der Threshold liegt zu Beginn des linearen Kurvenverlaufs, die Anzahl der Kopien wächst hier exponentiell an. Theoretisch wäre ein Rückschluss auf die eingesetzte DNA-Menge möglich, der Vergleich mit einem House-keeping Gen wie z.B. β -Mikroglobulin, welches parallel gemessen wird, ist aber aussagekräftiger. Als Ergebnis erhält man die Anzahl an cDNA-Stränge des gemessenen Gens in Bezug auf das House-keeping Gen.

2.2.2.7 Sequenzierung

Die verwendete Methode der Sequenzierung geht auf Sanger et al. zurück. Das Prinzip ähnelt der Durchführung einer PCR mit der DNA-Polymerase I unter Zugabe von einem

Primer und Didesoxynukleotiden. Den Didesoxynukleotiden fehlt am dritten C-Atom eine Hydroxyl-Gruppe, welche normalerweise die Phosphorsäurediesterbrücke mit bildet. Wird ein solches Molekül in die DNA eingebaut, kommt es zum Kettenabbruch. Äquivalent zu jedem Desoxynukleotid (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) wird dem Ansatz ein Didesoxynukleotid hinzugefügt. In den Anfängen der Sequenzierung wurden daher vier verschiedene Ansätze benötigt um nachvollziehen zu können, welches ddNTP zum Kettenabbruch geführt hat. Heute werden die ddNTP mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die durch einen Laser detektiert werden können, so dass ein Ansatz ausreicht.

Der Kettenabbruch erfolgt nach dem Zufallsprinzip wodurch DNA-Stränge aller denkbaren Größen entstehen. Diese können elektrophoretisch getrennt werden und die Sequenz Base für Base ermittelt werden. Daher ist die Reichweite einer Sequenzierung begrenzt, im Allgemeinen auf etwa 1000bp, da die Laufzeiten bei großen Fragmenten nur geringfügig durch eine zusätzliche Base beeinflusst werden.

Mutationsanalyse durch Sequenzierung

Die PCR-Amplifikate der PPP2R5C-cDNA wurden mittels Gelextraktion aufgereinigt und mit den Primern der PCR sequenziert. Die Sequenzierung wurde von der Firma AGOWA in Berlin übernommen. Mit der Software „Chromas lite 2.01“ wurden die Ergebnisse ausgewertet. Die einzelnen Nukleotide stellten sich als verschieden farbige Peaks dar, welche automatisch in die entsprechende Sequenz umgesetzt wurden. Bevor die Sequenz übernommen wird, muss eine Prüfung des Chromatogramms hinsichtlich seiner Aussagekraft erfolgen.

Enthält eine Probe verschiedene DNA-Fragmente so überlagern sich die Chromatogramme und eine Auswertung ist nicht möglich. Auch zu geringe DNA-Konzentrationen erschweren die einwandfreie Sequenzierung. Desweiteren ist zu beachten, dass heterozygote Mutationen sich als doppelter Peak darstellen, wodurch diese Mutationen nicht immer die ermittelte Sequenz verändern und in Folge dessen übersehen werden können.

Die Sequenz wurde darauf mit dem humanen Genom in den Datenbanken BLAT und BLAST verglichen. Durch dieses Side-by-Side Aligement sind einzelne Basenabweichungen genau zu identifizieren und lokalisieren.

2.2.2.8 Mutationsanalyse mit DHPLC

Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC)

Die DHPLC wurde 1995 von Oefner & Underhill als ein neues Verfahren zur Mutationsdetektion beschrieben. Es beruht im wesentlichen auf Trennung von Hetero- und Homoduplices, welche sich aus PCR-Produkten eines Gens von zwei Allelen bilden können [53]. Neben den genetischen Polymorphismen werden ebenfalls heterozygote Mutationen des Gens detektiert.

PCR-Amplikons werden durch eine initiale Denaturierung in Einzelstränge aufgetrennt, welche sich durch die folgende Abkühlung auf Raumtemperatur wieder zu Doppelsträngen zusammen lagern. Die Paarung erfolgt hierbei nach dem Zufallsprinzip.

Liegt nun in einem Strang eine Mutation vor, d.h. sind die antiparallel laufenden Basensequenzen nicht komplementär zueinander, kommt es zu einem mismatch von einzelnen Basen. Die Doppelstränge, welche jene Fehlpaarungen aufweisen werden als Heteroduplexe bezeichnet. Erfolgt die Hybridisierung regelrecht, so entstehen Homoduplexe. Durch das Vorliegen einer Mutation entstehen zwei Arten von Heteroduplices, sowie zwei Homoduplices.

Aufgrund unterschiedlicher physikalischer Eigenschaften lassen sich die entstandenen Doppelstränge mittels Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie [54] voneinander trennen. Als stationäre Phase dient eine aus nicht-porösen alkylierten, hydrophoben Polystyren-Divinylbenzol Partikeln bestehende Säule [55]. Die flüssige Phase enthält das positiv geladene Triethylammoniumacetat (TEAA), welches sowohl hydrophilie als auch hydrophobe Anteile besitzt. Mittels der positiven Ladungen kommt es zur Interaktion mit den negativen Phosphatgruppen der DNA, während die hydrophoben Anteile sich mit den Partikeln der stationären Phase verbinden. Die DNA-Fragmente haften nun an der Säule und werden mit einer linear ansteigenden Acetonitrilkonzentration (ACN) gelöst. Die Bindungsstärke zwischen dem TEAA und der DNA sinkt mit steigendem ACN-Gradienten, wodurch zunächst die Heteroduplices von der Säule eluiert werden, gefolgt von den Homoduplices. Zur Detektion wird UV-Licht eingesetzt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 254 nm in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Die Auswertung wird durch die zugehörige Computer-Software (hier Navigator Software) durchgeführt und die Ergebnisse in einem Absorptions-Zeit-Chromatogramm dargestellt.

Beeinflusst wird das Aussehen der Heteroduplex-Peaks im Chromatogramm durch die verschiedenen Schmelzeigenschaften der Basenfolge, bzw. der Mutation. Daher ist die sichere Detektion stark von der Analysetemperatur abhängig.

Jene kann heutzutage automatisch für jedes PCR-Fragment, basierend auf der Länge und dem Guanin-Cytosin-Anteil, berechnet werden. Für ideale Trennergebnisse sollten bei der Analysetemperatur noch 50% der DNA als Doppelstrang vorliegen, dadurch kann eine Sensitivität von bis zu 96% erreicht werden [56].

Die Bestimmung der Analysetemperatur übernahm die Wavemaker-Software von Transgenomic, welche durch die graphische Darstellung der Schmelzeigenschaften eine Bearbeitung der vorgeschlagenen Temperatur ermöglicht, sowie die einzelnen Schmelzdomänen berücksichtigt.

Ein weiteres Programm zur Bestimmung der Temperatur ist die Melt-Software, deren

Effizienz jedoch nach Klein et al. unter der Wavemaker-Software liegt.

Möglichkeiten der DHPLC

Die Mutationsanalyse mittels der DHPLC ermöglicht es innerhalb von 2-3 Minuten Substitutionen, Deletionen und Insertionen kenntlich zu machen. Als Ausgangsmaterial können nicht-aufgereinigte PCR-Amplikate von bis zu 1,5 Kb genutzt werden. [57]. Klein et al. erzielten mit der DHPLC durch Wave Nucleic Acid Fragment Analysis 13 von 14 Keimbahnmutationen (93%) beim von-Hippel-Lindau-Syndrom [57]. Detektionsraten von 100% erreichten Gross et al. bei der Mutationsanalyse des BRCA1 1999, während im Vergleich dazu nur 94% durch Single-strang conformation polymorphism (SSCP) entdeckt wurden [58].

Da die DHPLC jedoch auf die Bildung von Heteroduplices angewiesen ist, werden homozygote Mutationen, bzw. Anlagen nicht erkannt. Zu diesem Zweck müsste ein Wildtyp-Standard mitgeführt werden um auch hier die Bildung von Heteroduplices zu gewährleisten [55].

Eine sichere Detektion bietet stets die Direkt-Sequenzierung, weshalb sie immer noch der „Gold-Standard“ in der Mutationsanalyse ist. Im Gegensatz zu der DHPLC ist es möglich eine genaue Lokalisation und Art der Mutation anzugeben, auch Substitutionen von Cytosin mit Guanin, welche bei der DHPLC unbemerkt bleiben, werden auf diese Weise erkannt [56]. Der Vorteil der DHPLC liegt in der in der Zeit- und Kostenersparnis. So können

innerhalb eines Tages um die 200 Proben automatisch analysiert werden [59], wenn die Methode für das jeweilige Gen etabliert wurde. Der eigentliche Analysevorgang beträgt pro Probe lediglich 7 Minuten mit geringen Kosten. Außerdem können durch die DHPLC selbst kleinste Mengen von mutierter DNA (1,6%), z.B. in Biopsiematerial angezeigt werden, während in der Direkt-Sequenzierung 30% nötig sind [60].

Dieses macht deutlich, dass sich die DHPLC besonders als Screening-Methode eignet, deren Ergebnisse durch die Direkt-Sequenzierung noch ergänzt werden können.

Für über 100 humane Gene wurde die Analyse mittels DHPLC bereits etabliert. (<http://insertion.stanford.edu/pub.html>)

2.2.3 Klonierung

2.2.3.1 Restriktionsverdau

Der Vektor pMACSKkII sowie das zuklonierende Insert müssen mit den selbigen Restriktionsenzymen geschnitten werden, so dass klebrige Enden entstehen, welche komplementär zueinander sind. Die Reaktion wurde nach folgendem Schema angesetzt.

Ansatz für den Restriktionsverdau

PPP2R5C-WT	PPP2R5C-Fusion	Insert
1µl (1ng/µl)DNA	1µl (1ng/µl)DNA	
3µl Buffer E	3µl Buffer	
1µl BamH	1µl SalI	
1µl EcoRI	1µl SpeI	
24µl A.dest	24µl A.dest	
pMACSK kII	pMACSK kII	Plasmid
1µl (1ng/µl)DNA	1µl (1ng/µl)DNA	
3µl Buffer E	3µl Buffer E	
1µl BamH	1µl SalI	
1µl EcoRI	1µl SpeI	
24µl A.dest	24µl A.dest	

PPP2R5C-Fusion	pMIGR
1µl (1ng/µl) DNA	1µl (1ng/µl) DNA
3µl Buffer B	3µl Buffer D
1µl BamHI	1µl Bgl II
1µl XhoI	1µl XhoI
24µl A.dest	24µl A.dest

Die Ansätze wurden bei 37°C für 4 Stunden im Cycler inkubiert. Anschließend erfolgt die Auftrennung durch Gelelektrophorese und die Reinigung mittels Gelextraktion.

Aufgrund der unterschiedlichen Schnittstellen ist eine Selbstligation des Vektors unwahrscheinlich, weshalb auf eine Dephosphorylierung verzichtet wurde.

2.2.3.2 Ligation

Bei der Ligation lagern sich die klebrigen Enden von Plasmid und Insert aneinander und gehen Wasserstoffbrückenbindungen ein. Insert und Plasmid werden durch die Ligase fest verbunden unter Ausbildung von Phosphorsäurediester-Verbindungen.

Das Rapid Ligation System von Promega kommt mit einer Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur aus. Alternativ dazu kann die Liagtion bei 16°C über Nacht erfolgen.

Ansätze für die Ligation

Rapid Ligation	standard Ligation
1µl Vektor	1µl Vektor
3µl Insert	3µl Insert
1µl T4-Ligase	1µl T4-Ligase
5µl 2xLigase Puffer	1µl 10xLigase Puffer
	4µl A.dest

2.2.3.3 Transfromation

Die kompetenten E.coli Bakterien (One Shot, Invitrogen) werden auf Eis aufgetaut und mit der Ligation versetzt. Nach einer Inkubation von 20min auf Eis, erfolgt ein Hitzeschock von

90sec bei 42°C im Wasserbad. Daraufhin werden 250µl SOC-Medium hinzugegeben und die Kultur für eine Stunde bei 37°C mit 250 rpm geschüttelt.

Die Bakteriensuspension wird auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C angezüchtet.

2.2.3.4 Herstellung von Agarplatten

Auf 100ml LB-Medium werden 1,5g LB-Agar gegeben und in einer Mikrowelle erhitzt. Sobald die Lösung sich auf etwa Handwärme abgekühlt hat, werden 1µl Ampicillin/ml zugefügt und im Medium verteilt. Der Agar wird an einer sterilen Werkbank in die vorgesehenen Platten (15ml/Platte) gegossen.

2.2.3.5 Kolonie-PCR

Mit dieser PCR werden die Bakterienkolonien auf das Plasmid, welches das Insert enthält, überprüft. Dazu werden die einzelnen Kolonien mit einer Pipettenspitze von der Agarplatte gepickt und damit 250µl LB geimpft. Die entstandene Suspension dient als Template für die PCR. Als positive Kontrolle dient eine Verdünnung (1:1000) des Inserts.

Ansatz und Temperatur-Zeit-Verlauf der Kolonie-PCR

	x 3	
H ₂ O	7,05	21,2
10x Reaction Buffer (Mg ²⁺)	1	3,0
dNTP Mix (each 2,5mM)	0,25	0,8
Primer forward (10µM)	0,25	0,8
Primer reverse (10µM)	0,25	0,8
50x BD Advantage 2Polymerase Mix	0,2	0,6
Summe	9	27,0

10µl-Ansatz, 1µl Probe mit Aqua dest. Kontrolle und positiver Kontrolle

95°C-5,0min

(95°C- 30sec, 57°C – 30sec, 68°C – 40sec) x 25

68°C- 5,0min, 4°C -∞

2.2.3.6 Plasmidisolierung

S.N.A.P. Miniprep/Midiprep Kit von invitrogen/Jetstar Maxi-Prep von Genomed

Das Verfahren dient zur Isolierung von Plasmiden aus kleinen, mittleren und großen Bakterienkulturen.

Konnte man mit der Kolonie-PCR positive Klone nachweisen, werden diese über Nacht bei 37°C angezüchtet. Hierzu werden 2ml LB+Ampicillin mit der Bakteriensuspension beimpft. 1,5ml dieser Übernachtskultur dienen als Material für die Plasmidisolierung. Die restlichen 0,5ml können für weitere Kulturansätze verwendet werden. Für die Herstellung eines Midi-Preps werden 100ml LB+Ampicillin beimpft.

Die einzelnen Schritte zur Plasmidisolierung wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Trotz unterschiedlicher Anleitungen für die Kits ist das Prinzip der Plasmidisolierung identisch.

Zunächst wird die Kultur abzentrifugiert und das Zellpellet lysiert. Durch die Zugabe von gekühltem Präzipitationssalz fällt die DNA aus. Nachdem Bindepuffer hinzugefügt wurde, wird der Ansatz auf Säulen pipettiert. Das Plasmid bindet nun an der Säule, während andere Bestandteile durch mehrere Waschschrte entfernt werden. Zum Schluss wird das Plasmid mit A.dest eluiert.

2.2.3.7 Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA

Die Konzentration der isolierten Plasmide wurde mit dem Nano Photometer von Implen bestimmt. Hierzu wird die Absorbtion bei einer Wellenlänge von 260nm gemessen und mit dem Leerwert (A.dest.) verglichen. Die Reinheit der DNA wird durch den 260/280 Quotienten angegeben. Eine Absorbtion bei 280nm erfolgt größtenteils durch aromatische Aminosäuren und entspricht daher dem Proteinanteil. Eine für die Eletroporation ausreichende Reinheit liegt ab einem Quotienten von 1,8 vor.

2.2.4 TOPO-TA-Klonierung

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurde das TOPO TA Cloning® Kit von Invitrogen genutzt. Dieses beinhaltet einen bereits linearisierten TA-Klonierungsvektor, der an den 3'-Enden jeweils ein überhängendes Desoxythymidin aufweist und dadurch mit PCR-Produkten, die mit der Taq-Polymerase amplifiziert wurden, ligieren kann.

Die Taq-Polymerase fügt am 3'-Ende des PCR-Produktes ein einzelnes Desoxyadenosinmonophosphat an, welches komplementär zu dem Desoxythymidinrest ist. Zusätzlich ist eine Topoisomerase I mittels einer Phospho-tyrosin-Brücke an den Vektor gebunden. Diese Bindung entsteht dadurch, dass die Topoisomerase den Vektor an spezifischen Stellen (5'-CCCTI) schneidet und mit dem freien 3'Phosphat in Verbindung tritt. Hierdurch steht der Ligation die nötige Energie zur Verfügung, wenn die Hydroxyl-Gruppe des PCR-Produktes seinerseits eine kovalente Bindung mit dem Phosphat eingeht und die Topoisomerase entlässt.

Benötigt werden für den Ligationsansatz folgende Reagenzien:

4µl PCR-Produkt 1µl Salzlösung 1µl TOPO®Vektor
--

Der Ansatz wird für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zu kompetenten E.coli (One Shot, Invitrogen) gegeben. Es folgt die Transformation durch einen Hitzeschock.

2.6 Zellkultur

2.6.1 Kultivierung von Zellen

Die verwendeten Zelllinien werden bei 5% CO₂, 95% relativer Luftfeuchte und 37°C im RPMI-Medium mit 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) nicht essentieller Aminosäuren, 1% (v/v) Natriumpyruvat und 0,2% (v/v) Plasmocin kultiviert und im Schnitt zwei- bis dreimal wöchentlich passagiert. Dabei wird die Zelldichte der Suspension mittels einer herkömmlichen Neubauer-Zählkammer ermittelt.

$$\text{Zellen/ml} = \frac{N_z \times D_f \times V_f}{Q}$$

Es wird nun das nötige Zellvolumen mit neuem angewärmtem Medium aufgefüllt und kann weiter unter angegebenen Bedingungen kultiviert werden.

2.6.2 Transiente Transfektion durch Elektroporation

Die Transfektion der Zellkulturen mit der Plasmid-DNA PPP-WT und PPP-Fusion erfolgte durch Elektroporation mit dem Nucleofector II- und dem Cell Line Nucleofector® Kit V nach den Empfehlungen der Firma Amaxa Biosystems.

Vor der Transfektion werden die Zellkulturen passagiert und für ca. 2 Tage kultiviert, so dass zur Transfektion Zellzahlen von 4 bis 5×10^5 Zellen/ml vorliegen, da für jeden Transfektionsansatz und die Kontrollen 1 mio. Zellen benötigt werden. Die Zellzahl wird in der Neubauer-Zählkammer ermittelt und das entsprechende Volumen der Zellsuspension für 10min mit 12000rcf bei RT pelletiert. Die Resuspension erfolgt mit 100µl Nucleofector V Solution. Den zu transfizierenden Vektor (2µg) gibt man hinzu und überführt die Suspension in eine Transfektionsküvette. Die Elektroporation erfolgt mit dem geeigneten Programm: X-001

Unmittelbar danach werden 500µl warmes Zellmedium in die Küvetten gegeben, deren Inhalt daraufhin in 3ml warmes Zellmedium in einer Well-Platte pipettiert wird. Die Zellen werden nun erneut kultiviert und analysiert. Eine Expression des transfizierten Gens ist nach ca. 8 Stunde zu erwarten.

2.7 Retrovirales Überexpressionssystem

Diese Methode dient zur Integration beliebiger Gene und DNA-Fragmente in das Wirtsgenom. Genutzt werden dazu Retroviren, die mit der Zelllinie GP-293 erzeugt werden. Diese Zelllinie verfügt über die notwendigen Gene (Moloney gag und pol-gag) zur Virusreplikation und dient damit als Verpackungszelllinie.

Durch die Calcium-Phosphat-Transfektion wird der retrovirale Expressionvektor in die GP-293 eingebracht. Um zu verhindern, dass replikationskompetente Viren entstehen, wird der pMD2.G Vektor, der das Verpackungssignal beinhaltet, separat transfiziert.

Nach 48h erhält man ein infektiöses Medium, welches bei -80°C gelagert werden kann.

Zur Transduktion werden 10ml der gewünschten Zellsuspension pelletiert um anschließend mit 10ml des infektiösen Mediums und $1\mu\text{l}/\text{ml}$ Polybene resuspendiert zu werden.

Nach einer Inkubation über Nacht erfolgt ein Wechsel des Mediums und nach 48h die Überprüfung der Transduktionseffizienz anhand der Fluoreszenz-Mikroskopie.

2.7.1 Calcium-Phosphat-Transfektion

Bei der Calcium-Phosphat-Transfektion wird die zu transfizierende DNA mit Calciumchlorid und Phosphatpuffer gemischt, wodurch Kopräzipitate entstehen, die von den Zellen durch Endozytose aufgenommen werden. Die DNA kann darauf in den Zellkern gelangen und in das Wirtsgenom integriert werden.

Es wurde das CalPhos™ Mammalian Transfektion Kit von Clontech verwendet. Am Tag vor der Transfektion werden 293-GP-Zellen ausplattiert, so dass sie eine Konfluenz von 30 bis 40% erreichen. Für das weitere Vorgehen werden zwei Lösungen A und B präpariert:

Lösung A

$10\mu\text{l}$ pMIGR-PPP2R5C-Fusion

$10\mu\text{l}$ pMD2.G ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

$62,5\mu\text{l}$ CaCl_2

$418\mu\text{l}$ A.dest

Lösung B

$500\mu\text{l}$ 2xHBS

Die Lösung A wird tropfenweise der Lösung B, welche bei 600-800rpm gevortext wird, zugefügt. Nach einer Inkubation von ca. 20min wird das Gemisch zu den 293-GP-Zellen hinzu gegeben um diese anschließend zu kultivieren.

Die Effizienz der Transfektion lässt sich durch die Messung der GFP-Fluoreszenz unterm Mikroskop ermitteln.

2.8 Protein-Analytik

2.8.1 Protein-Isolierung

In Vorbereitung auf einen Western Blot müssen zunächst die Proteine aus den Zellen gewonnen werden.

Dazu werden die Zellen pelletiert, welches bei 5min für 310g und 4°C geschieht. Das entstehende Zellpellet sollte etwa $5-10 \times 10^6$ Zellen enthalten, welches vom Überstand befreit mit 20ml PBS resuspendiert wird. Es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt von 5min bei 310g und 4°C, der zweimal wiederholt wird. Der letzte Waschschritt erfolgt nur mit 1ml PBS. Das gereinigte Zellpellet wird mit 50-100µl RIPA Puffer (enthält Protease-Inhibitoren) versetzt und durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren lysiert. Es folgt eine fünfzehnminütige Inkubation auf Eis mit gelegentlichem Vortexen. In einem terminalen Zentrifugationsschritt (10000g, 10min, 4°C) werden die Zellrümer von den Proteinen separiert. Die Proteine können bei -80°C gelagert werden.

2.8.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration der isolierten Proteine wird mit dem Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit von Pierce Biotechnology durchgeführt. Die Proben wurden in den Verhältnissen 1:250, 1:500 sowie 1:1000 verdünnt und mit den Standards von 1,25µl/ml bis 80µl/ml auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Nach einer zweistündigen Inkubation im Dunkeln bei 37°C wurden die Ergebnisse mit der Software V3.11 Tecan ausgewertet. Details sind den Instruktionen des Herstellers zu entnehmen.

2.8.3 Western Blot

Bei Western Blot werden Proteine auf eine Trägermembran übertragen um anschließend durch unterschiedliche Verfahren sichtbar gemacht zu werden. Dadurch können spezifische Proteine sowohl qualitativ als auch semiquantitativ nachgewiesen werden.

SDS-PAGE

Verwendet wurden Precise™ Protein Gele mit unterschiedlicher Konzentration.

Für die folgende Elektrophorese werden 50µg Protein mit 6-fachem Probenpuffer versetzt und mit A.dest auf ein Volumen von 20µl aufgefüllt. Die Probenansätze dann bei 95°C für 5min denaturiert und auf Eis abgekühlt. Dieser Hitzeschock bricht die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine auf, so dass sie im elektrischen Feld wandern können.

Nach einer Zentrifugation von 300g für 30sec können die Proben auf das Gel aufgetragen werden. Zusätzlich wird ein Protein-Größenstandard mitgeführt für die spätere Auswertung des Western Blots.

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden die Proteine im Sammelgel bei 120V fixiert und erst im Trenngel als definierte Proteinbanden separiert (200V).

Proteintransfer

Vor dem Blotten müssen Trenngel, Fiberpads, Gel Blotting Papier und die Polyvinylidenfluorid Membran (PVDF) im Transferpuffer für 30min inkubieren. Die PVDF Membran sollte außerdem eine Minute in Methanol quellen. Dann wird das Trenngel zweimal für 10min im Transferpuffer gewaschen um Salze zu entfernen.

Das eigentliche Blotten erfolgt durch das Wet-Blot Verfahren bei dem die einzelnen Komponenten von Kathode zur Anode wie folgt angeordnet sind: Schwamm, Gel Blot Papier, Trenngel, PVDF Membran, Gel Blot Papier, Schwamm

Dadurch, dass das elektrische Feld senkrecht zum Trenngel anliegt, transferieren die Proteine bei 100V innerhalb von einer Stunde auf die Membran.

Die Proteine auf der Membran können wieder renaturieren.

Blocken

Dem Blot folgt die Färbung mit Poinceaulösung der transferierten Proteine um die Effizienz des Blottings zu überprüfen.

Die Membran wird nun für eine Stunde in TBS mit 5% (w/v) Milchpulver geblockt und anschließend gespült.

Proteindetektion

Um spezifische Proteine zu detektieren werden primäre Antikörper verwendet, die antigenspezifisch sind und mit dem Fab-Teil am Epitop binden. An den Fc-Teilen dieser Antikörper können nun wiederum Sekundärantikörper binden, die mit der Meerrettich-Peroxidase gekoppelt sind. Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form wodurch Chemilumineszenz entsteht, die einen Film belichtet.

Als Standard wird ein Antikörper gegen β -Actin eingesetzt um die aufgetragene Proteinmenge zu kontrollieren. Bei identischer Proteinmenge sollte die β -Actin Bande in allen Proben die gleiche Intensität aufweisen. Dadurch ist gesichert, dass die Ergebnisse für das untersuchte Protein nicht durch verschiedene Proteinmengen verfälscht sind.

Die Inkubation der Membran mit den primären Antikörpern (Rabbit polyclonal TCR α) erfolgt schüttelnd über Nacht bei 4°C. Es schließen sich 3 Waschschritte mit TBS und 0,05% (v/v) Tween-20 für jeweils 10min an. Daraufhin wird die Membran für eine Stunde mit den HRP konjugierten sekundären Antikörpern (Goat Anti-rabbit IgG) versetzt. Ungebundene Antikörper werden durch dreimaliges Waschen entfernt. Die Membran wird nun mit jeweils 5ml der Western Blotting Luminol Reagenz A und B behandelt, die für 1min auf die Membran einwirkt. Unmittelbar danach ist die Membran in einer Klarsichtfolie innerhalb einer Filmkassette zu fixieren und in einer Dunkelkammer mit einem Film zu exponieren. Die anschließende Entwicklung des Films wird ebenfalls in der Dunkelkammer durchgeführt.

2.9 Messungen mit FACS

2.9.1 Überprüfung der Transfektionseffizienz

Um festzustellen wie hoch die Transfektionsrate der Zellen ist, wird der Vektor mit einem entsprechenden FITC-Antikörper markiert, so dass transfizierte Zellen im FACS detektiert werden können.

Hierzu werden die Zellen zweimal mit 2ml PBS gewaschen (12000rcf, 10min, RT) und anschließend mit 10 μ l des Antikörpers Mouse H-2Kk-FITC von Miltenyi Biotec sowie 90 μ l PBS versetzt. Die Messung kann nach 15min Inkubation und kurzem Vortexen erfolgen.

2.9.2 Apoptose-Messung

Die Apoptose einer Zelle geht mit charakteristischen Veränderungen der Zellstruktur einher wie die Kondensation des Chromatins, DNA-Fragmentierung, freiem Cytochrom-c sowie die Translokation von Phosphatidylserin in die äußere Schicht der Zellmembran.

Die Veränderungen erlauben eine qualitative Erfassung und Differenzierung von apoptotischen, nekrotischen und vitalen Zellen *in vitro*.

Das verwendete Annexin V (MG 36kDa) verfügt über eine hohe Affinität gegenüber Phospholipidmembranen mit Phosphatidylserin, welche besonders in der frühen Phase der Apoptose auftreten. Durch die Fluoreszenzmarkierung mit FITC (Fluoresceinisocyanat) des Annexin Vs lassen sich daher Zellen im frühen und mittleren Stadium der Apoptose identifizieren. Für die Markierung der Zellen wurde das Kit BD ApoAlert™ Annexin V genutzt. Dazu werden zunächst ca. 5×10^5 Zellen mit 310g bei RT für 5min zentrifugiert und das Pellet unter gleichen Bedingungen mit PBS gewaschen. Das Pellet wird anschließend in 50µl eines Master Mixs aus Binding Buffer (50µl), Annexin V BD Pharmingen (2,5µl) und 7-AAD BD Pharmingen (2,5µl) resuspendiert. Nach einer Inkubation für 10min in Dunkelheit wird der Ansatz mit 300µl PBS aufgefüllt und kurz gevortext. Die Zellen sind nun bereit für eine Messung am Durchflusszytometer (FACS) bei einer Wellenlänge von 488nm. Die Auswertung geschieht mit der Analyse-Software Cell Quest Pro.

Die graphische Darstellung erfolgt mit der Software WinMD 2

3. Ergebnisse

3.1 Mutationsanalyse durch DHPLC

Die Mutationsanalyse des Gens PPP2R5C erfolgte mit zwei Verfahren, der DHPLC und der Sequenzierung. Da die DHPLC eine sensitive Methode zur Detektion von Mutation ist, wurden die Proben zunächst mit dem WAVE-System gesichtet um anschließend die Proben mit vermuteter Mutation mit der Sequenzierung zu bestätigen und genauer zu charakterisieren.

3.1.1 Optimierung der PCR-Reaktion - Wahl der Primerkombination

Zu diesem Zweck erfolgt das Verfahren auf cDNA – Ebene. Neben dem exprimierten Gen PPP2R5C existiert auch ein Pseudogen auf dem Chromosom drei, welches bei der Verwendung von genomischer DNA auch als Template fungieren würde. Dieses Risiko wird durch die Verwendung von cDNA als Template herabgesetzt.

Die cDNA wurde mittels reverser Transkription von zuvor isolierter RNA hergestellt.

Die Spezifität der PCR-Produkte konnte zudem durch die Amplifikation des Gens in zwei PCR-Runden, dem Nested-Verfahren, gesteigert werden. In der ersten Runde vervielfältigte sich die gesamte cDNA-Länge des Gens PPP2R5C, welche ca. 1800bp entspricht abhängig von der jeweiligen Isoform. Die hierfür verwendeten äußeren Primer RT-PPP2R5C-f6 sowie RT-PPP2R5C-r4 liegen in der UTR und hatten sich als effizient heraus gestellt. In der zweiten Runde wurden vier innere Primerpaare verwendet, so dass die cDNA-Sequenz letztlich in vier Amplikons aufgeteilt wurde um diese mit der DHPLC zu analysieren.

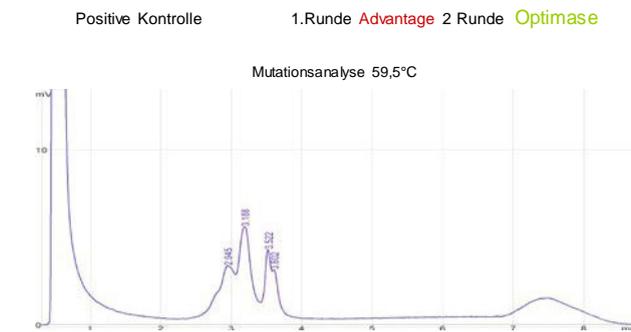
3.1.2 Optimierung der PCR-Reaktion – Auswahl der Polymerasen

Eine weitere notwendige Bedingung für die DHPLC war eine mutationsarme Amplifikation, weil bereits die Synthese-Fehler der Polymerase als Mutation in der Analyse mit dem WAVE –System erscheinen.

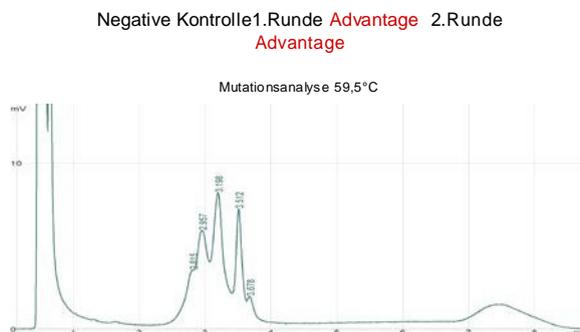
Die Optimierung der Nested-PCR beschränkte sich auf das erste Amplikon mit der Primerkombination RT-PPP2R5C-f2 / PPP-amp1-r1. Dazu wurden die Ergebnisse der DHPLC von Produkten der Advantage-Polymerase sowie der Optimase-Polymerase verglichen, welche über verschiedene Proof-reading-Aktivität verfügen. Als positive Kontrolle für eine Mutation diente cDNA der Zelllinie huT-78. Sie ist heterozygot für eine Basenaustausch-Mutation im ersten Amplikon, was durch Sequenzierung bestätigt worden war. Die negative Kontrolle, sie wies keine Mutation auf, war die cDNA einer gesunden Person. Jeweils die erste Runde und zweite Runde wurde mit der Advantage –Polymerase und der Optimase-Polymerase durchgeführt.

Letztendlich ergaben sich Produkte, die mit der Kombination Advantage/Advantage, Advantage/Optimase, Optimase/Advantage und Optimase/Optimase generiert wurden. Die Produkte der PCR wurden mittels der DHPLC analysiert.

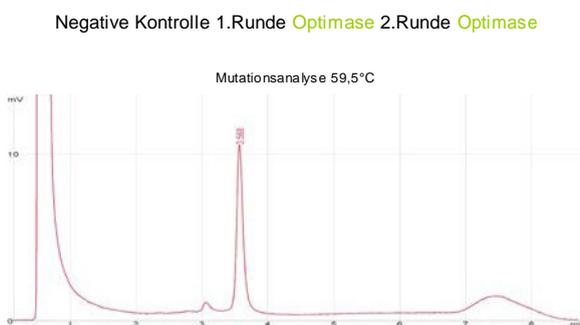
Es stellte sich jedoch heraus, dass die Amplifikation mit der Optimase-Polymerase nicht adäquat funktionierte, so konnte die positive Kontrolle in der ersten Runde mit der Optimase nicht vervielfältigt werden.



a)



b)



c)

Abb.3.1.a) Schmelzkurve der positiven Kontrolle Advantage/Optimase in der DHPLC

Die Kurve zeigt vier voneinander trennbare Peaks, welche die jeweiligen Heteroduplexe darstellen. Es liegt also eine Mutation vor. Die positive Kontrolle wurde bestätigt. Die Schmelztemperatur lag bei 59,5°C. Durch Veränderung der Temperatur würden sich die späteren Peaks klarer trennen.

Abb.3.1.b) Schmelzkurve der negativen Kontrolle Advantage/Advantage in der DHPLC

Die Kurve beinhaltet mindestens drei Peaks, welche auf Heteroduplexe hinweisen. Da es sich um die negative Kontrolle handelt, sollte nur ein Peak sichtbar sein. Die Mutationen sind daher PCR-Artefakte.

Abb.3.1.c) Schmelzkurve der negativen Kontrolle Optimase/Optimase

Der dominante Peak ist charakteristisch für das Vorliegen von Homoduplexen. Dieses entspricht dem erwarteten Ergebnis und stimmt mit der Sequenzierung überein. Verglichen mit den Abb.3.1.a),b) zeigt sich ein deutlicher Unterschied der Kurven, welcher auf die verwendeten Polymerasen zurückzuführen ist.

Anhand der Schmelzkurven der negativen Kontrolle zeigte sich, dass bei der Verwendung der Advantage Polymerase Mutationen während der PCR entstehen, welche die DHPLC-Auswertung behindern. Eine ursprünglich mutationsfreie DNA-Sequenz erscheint nun mutiert, was sich durch die Ausbildung von Heteroduplexen zeigt. Dem gegenüber ergibt das

mit der Optimase-Polymerase hergestellte PCR-Produkt, ein mutationsfreies Ergebnis mit nur einem Peak in der DHPLC. Die negative Kontrolle ist bestätigt. Die Kombination der beiden Polymerasen brachte keinen Vorteil gegenüber der alleinigen Nutzung der Advantage-Polymerase. Daher sollte die Optimase-Polymerase sowohl in der ersten wie auch in der zweiten Runde der Nested-PCR genutzt werden, um die Mutationsanalyse mit der DHPLC fortsetzen zu können.

Die Amplifikation von PPP2R5C erfolgte zunächst unter Standardbedingungen, jedoch ohne reproduzierbare Produkte, so dass die PCR-Reaktion mit der Optimase-Polymerase zu optimieren war.

3.1.3 Optimierung der PCR-Reaktion - Auswahl der Magnesiumkonzentration

Zunächst erfolgte die Modifizierung der Magnesium-Konzentration im PCR-Ansatz: 1mM; 1,5mM; 2mM; 2,5mM; 3,0mM und 3,5mM. Es gelang bei keiner Konzentration die Amplifikation des Fragments.

Da die Reaktion bereits vereinzelt positive Ergebnisse erbracht hatte, wäre auch eine zu geringe Anzahl an Kopien in der cDNA möglich gewesen. Daher wurde als nächster Schritt die Konzentration des Templates variiert: 1µl, 3µl und 5µl je PCR-Ansatz.

Dennoch kam es in keinem Ansatz zu optimalen reproduzierbaren Ergebnissen mit der Optimase-Polymerase.

3.1.4 Optimierung der PCR-Reaktion – cDNA-Qualität

Als nächster Schritt erfolgte die Überprüfung der Qualität der verwendeten cDNA mittels einer Real-time PCR.

Im Vergleich mit dem house-keeping Gen $\beta 2$ – Mikroglobulin, enthielt die cDNA 6728 Kopien der mRNA von PPP2R5C auf 100000 $\beta 2$ -Mikroglobulin-Kopien. Die hinreichende Qualität und Quantität der positiven Kontrolle war damit bestätigt.

Im nächsten Schritt wurde die Nested-PCR mit verschiedenen Polymerasen durchgeführt um die Ergebnisse zwischen den einzelnen Enzymen zu vergleichen. Es wurde zusätzlich zu der Advantage Polymerase und der Optimase, die Pfu, welche ebenfalls über hohe Proof-reading – Aktivität verfügt, gewählt. Als positive Kontrolle diente $\beta 2$ -Mikroglobulin.

Die zweite Runde der Nested-PCR wurde auf das Amplikon 1 beschränkt. Bei Verwendung der Advantage Polymerase, welche über die geringste Proof-reading-Aktivität verfügt, gelang die Nested-PCR, während unter Gebrauch der anderen Polymerasen lediglich die Reaktion für $\beta 2$ -Mikroglobulin erfolgreich verlief.

Da für die Mutationsanalyse mittels der DHPLC jedoch die Amplifikation durch eine Polymerase mit geringer Fehlerrate obligat ist (siehe 3.1.2), ist es nicht möglich diese Methode zur Analyse des Gens PPP2R5C zu verwenden.

Dieser Umstand hatte zum Nachteil, dass die Proben stets direkt sequenziert werden mussten, da das Screening auf Mutationen mit Hilfe der DHPLC im Folgendem nicht angewendet wurde.

3.2 Mutationsanalyse durch Sequenzierung

3.2.1 Etablierung der Nested-PCR von PPP2R5C-cDNA

Das Gen PPP2R5C umfasst insgesamt 14 Exone, welche alle in der längsten Isoform $\gamma 3$ exprimiert werden (siehe 1.1). Aufgrund dessen sollte die Sequenzierung von eben jener Isoform erfolgen um alle eventuellen Mutationen erfassen zu können.

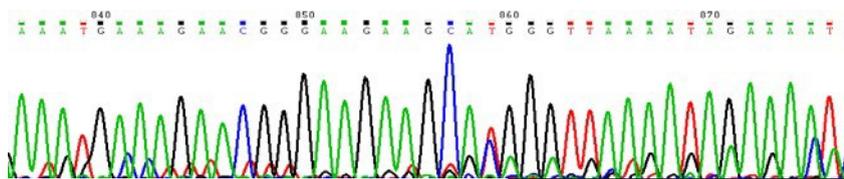
Die Primer binden daher in der UTR, welche bei den beiden längsten Isoformen $\gamma 3$ und $\gamma 2$ beschrieben wurde. Als besonders effektiv erwiesen sich die Kombinationen von RT-PPP2R5C-f6 mit RT-PPP2R5C-r3 sowie RT-PPP2R5C-f6 mit RT-PPP2R5C-r4.

Die vollständige cDNA des Gens PPP2R5C umfasst 1573bp exklusive der UTR. Das zu amplifizierende Fragment beinhaltet 1691bp. Um neben einer hohen Spezifität auch eine ausreichende Quantität zu erreichen, wurde ein Nested-Verfahren angewandt. Hierbei verwendeten wir in der ersten Runde die Primer RT-PPP2R5C-f6/RT-PPP2R5C-r4 und in der zweiten Runde RT-PPP2R5C-f6 mit RT-PPP2R5C-r3.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mittels der Gelelektrophorese identifiziert, anschließend aus dem Gel extrahiert und im folgendem sequenziert. Die Etablierung dieses Verfahrens erfolgte unter Verwendung von Zelllinien-cDNA, die zu diesem Zwecke gewonnen worden war.

Die Sequenzierung erfolgte mit der Methode nach Sanger durch die Firma Agowa unter Verwendung der spezifischen Primer RT-PPP2R5C-f6 und RT-PPP2R5C-r3. Da die Sequenzierung somit in 5'-3'- Richtung und in 3'-5'- Richtung erfolgte, wurde ein 200bp langer Abschnitt der Fragmente doppelt erfasst. Mutationen in diesem Bereich hätten daher durch die jeweils andere Sequenzierung bestätigt werden können.

Die Sequenzierung der Zelllinien MOLT-4, CCRF-CEM und HBP-ALL zeigte, dass die Ergebnisse von hinreichender Qualität waren, jedoch beinhaltete die Sequenzierung mit dem reversen Primer in der Darstellung durch Chromas Lite 2.1 (siehe Abb. 3.2) in einem etwa 150bp großem Abschnitt in 3'-Richtung vor dem Exon 14 eine erhebliche Anzahl doppelter Peaks. Jene Doppelung weist auf die Existenz eines signifikanten Sequenzunterschieds in der Probe hin. In diesem Fall handelte es sich jedoch nicht um Mutationen, sondern um den Nachweis der zwei Isoformen γ_3 und γ_2 . Trotz der Trennung der zwei Isoformen mittels Gelelektrophorese, waren die Proben nicht von ausreichender Reinheit.



Isoform γ_2

5'-3' aatgaaa gaacgggaag aagcatgggt taaatagaa aatc

Isoform γ_3

5'-3' atggcct tatttgaag atgtgcagat gctgagaaag acag

Abb.3.2 Chromatogramm von 2 Isoforme Die Isoformen γ_3 & γ_2 verfügen über die gleiche Sequenz einschließlich Exon 12, danach folgt entweder Exon 13 (γ_3) oder Exon 14 (γ_2). Die Doppelpeaks im Chromatogramm sind durch die Varianten bedingt. Dominant ist die Isoform γ_2 .

Durch den Vergleich der verschiedenen Sequenzen war es möglich die Doppelpeaks den beiden Isoformen zu zuordnen. Das Vorhandensein von Mutationen war dennoch nicht vollständig ausgeschlossen, weil eine Punktmutation, welche mit der Basenfolge der jeweils anderen Isoform übereinstimmt, im Chromatogramm nicht sichtbar wäre.

Daher ist die Isolierung beider Isoformen für eine sensitive Mutationsanalyse von Nöten.

Um dieses zu erreichen, wurde das Gen in zwei Teilabschnitten amplifiziert, von welchen einer in den Isoformen differiert. Da die Isoform γ_2 das Exon 13 nicht beinhaltet, ist sie um 117bp kürzer. Dieser Unterschied ist bei kleineren Fragmenten von 615bp bzw. 498bp eindeutiger in der Gelelektrophorese darstellbar, so dass sich die Banden der PCR-Fragmente besser voneinander trennen.

Die Primer-Kombination von RT-PPP2R5C-f6 mit PPP-amp2-r1 erbrachte ein Fragment von 1118bp, welches die gemeinsamen Exone 1-10 enthielt.

```

ATTGCCTTT CCCGCTGAAG TCTAGATGTT
GACATGTAAT AAAGCGGGCA GCAGGATGGT GGTGGATGCG GCCAACTCCA 50 exon 1
ATGGGCCTTT CCAGCCCGTG GTCCTTCTCC ATATTGCA 100
GCTGATCAAG AGAAGCTTTT TATCCAGAAG TTACGTCAGT GTTGCCTCCT 150 exon 2
CTTTGACTTC GTTCTGATC CACTAAGTGA CTTAAAGTGG AAGGAAGTAA 200
AACGAGCTGC TTTAAGTGAA ATGGTAGAAT ATATCACCCA TAATCGGAAT 250
GTGATCACAG AGCCTATTTA CCCAGAAGTA GTCCATATCT TTGCAGTTAA 300
CATGTTTCCA ACATTACCAC CTTCTCCAA TCCTACGGGA GCGGAATTTG 350 exon 3
ACCCGGAGGA AGATGAACCA ACCTTAGAAG CAGCCTGGCC CATCTACATA 400
CTTGTTTATG AATTTTCTT AAGATTTTGA GAGTCTCCAG ATTTCCAACC 450 exon 4
TAATATAGCG AAGAAATATA TTGATCAGAA GTTGTATTG CAGCTTTTATG 500
AGCTCTTTGA CAGTGAAGAT CCTCGGGAGA GAGATTTTCT TAAAACCACC 550 exon 5
CTTCACAGAA TCTATGGGAA ATTCTAGGC TTGAGAGCTT ACATCAGAAA 600
ACAGATAAAT AATATATTTT ATA 650 exon 6
ATGGCATAGC AGAGTTACTG GAAATATTGG GAACTATAAT TAATGGATTT 700
GCCTTACCAC TAAAAGAAGA GCACAAGATT TTCATTATGA AGGTGTTACT 750 exon 7
ACCTTTGCGA AAGTGAACCA CTTGAGTGT CTACCATGCC CATTTGGCAT 800 exon 8
ACTGTGTAGT GCAGTTTTTA GAAAAGGACA GCACCCTCAC GGAACCAATG 850
GTGATGGCAC TTCTCAAATA CTGGCCAAAG ACTCACAGTC CAAAAGAAGT 900 exon 9
AATGTTCTTA AACGAATTAG AAGAGATTTT AGATGTCATT GAACCATCAG 950
AATTTGTGAA GATCATGGAA CCCCTCTCC GGCAGTTGGC CAAATGTGTC 1000
TCCAGCCAC ACTTCCA 1050 exon 10
TGAATACATC ATGAGTTTAA TCAGTGACAA

```

Abb.3.3 a) Sequenzierung der PPP2R5C cDNA -

Erstes Fragment

Genutzt wurde zur Sequenzierung der Primer RT-PPP2R5C-f6, wodurch die ersten 9 Exone erfasst werden konnten.

Der Primer PPPamp2-r1 ermöglichte eine Sequenzierung in 3'-5' Richtung, so dass Mutationen bestätigt werden können.

Die folgenden Exone 11-14, die alle ausschließlich in der längsten Isoform γ_3 exprimiert werden, konnten mit den Primern PPP-amp3-f1 und PPP-amp3-r1 amplifiziert werden. Auf diese Weise sollten die verschiedenen 3'-Enden der Isoformen aufgetrennt werden.

cDNA Isoform γ_3

```

exon 9 AT GTGTCTCCAG CCCACACTTC CA 50
CTATTACTGG AATAATGAAT ACATCATGAG TTTAATCAGT GACAACGCAG 100 exon 10
CGAAGATTCT GCCCATCATG TTTCTTCTCT TGTACCGCCA CTCAAAGACC 150
CATTGGAACA ACAATACA TGGCTTGATA TACAACGCC TGAAGCTCTT 200 exon 11
CATGGAGATG AACCAAAAGC TATTTGATGA CTGTACACAA CAGTTCAAAAG 250
CAGAGAAACT AA 300 exon 12
GTTAAAATAG AAAATCTAGC CAAAGCCAAT CCCCACA CAGTGTATAG 350
TCAAGCCAGC ACCATGAGCA TTCCGTTGTC AATGGAGACA GATGGGCCTT 400 exon 13
TATTTGAAGA TGTGCAGATG CTGAGAAAGA CAGTGAAGGA CGAGGCTCAT 450
CA 500
CGAGCTGCCT CAGGACCCCC ACACCAAGAA AGCCTTGGA GCTCACTGCA 550 exon 14
GGGCCGATGA GCTGGCCTCC CAGGACGGCC GCTAC

```

cDNA Isoform γ_2

```

exon 9 A TGTGTCTCCA GCCCACACTT CCA 50
TCTATTACTG GAATAATGAA TACATCATGA GTTTAATCAG TGACAACGC 100 exon 10
GCGAAGATTG TGCCCATCAT GTTCTCTTCC TTGTACCGCCA ACTCAAAGAC 150
CCATTGGAAC ACAATAC ATGGCTTGAT ATACAACGCC CTGAAGCTCT 200 exon 11
TCATGGAGAT GAACCAAAAG CTATTTGATG ACTGTACACA ACAGTTCAAA 250
GCAGAGAAAC TAA 300 exon 12
GGTTAAAATA GAAAATCTAG CCAAAGCCAA TCCCAGCA CAGAAAAGATC 350
CGAAGAAGGA CCGTCTCTT GCACGCGCCA AGTCCGAGCT GCCTCAGGAC 400 exon 14
CCCCACACCA AGAAAGCCTT GGAAGCTCAC TGCAGGGCCG ATGAGCTGGC 450
CTCCAGGAC GGCCGCTA

```

Abb.3.3b) Sequenzierung der PPP2R5C cDNA -

Zweites Fragment

Jener Abschnitt der cDNA, in welchem sich die Isoformen unterscheiden, wurde mit den Primern PPPamp3-f1 und PPPamp3-r1 vervielfältigt bzw. sequenziert. Die mRNA der Isoform gamma2 verliert das Exon 13 durch alternatives Splicing. Es ist kein Rückschluss auf die genomische Sequenz für dieses Exon möglich.

Es sind daher zwei Banden zu erwarten, eine von 615bp und eine von 498bp. Aufgrund der genutzten Primerkombinationen ist die Detektierung der anderen Isoformen (siehe 1.2) theoretisch auszuschließen, da diese erstens, nach aktueller Datenlage nicht über die gleiche 5'UTR, in welcher der Primer RT-PPP2R5C-r4 bindet, verfügen wie die längsten Isoformen. Zweitens exprimieren sie kein Exon 14, in dem die komplementäre Sequenz für den Primer PPP-amp3-r1 liegt.

Die Nested-PCR mit jener Primerkombination lieferte qualitative wie auch quantitative gute Ergebnisse, so dass die Patientenproben auf diese Weise amplifiziert, sequenziert und auf Mutationen untersucht wurden.

Neben den Patienten Proben (245, 246, 247, 249, 250, 251, 252, 253, 06007 und 1365/04), welche ausschließlich von Sèzary-Syndromen stammten, wurden auch einige Zelllinien von T-ALLs bzw. B-Zelllymphomen mit in die Untersuchung eingeschlossen.

3.2.2 Sequenzierung der Sèzary-Proben und Zelllinien

Das Abgleich der Sequenzen der Patientenproben mit dem humanen Genom in den Datenbanken BLAT und BLAST zeigte in den Proben 245, 246, 249, 250, 251 und 252 eine vollständige Übereinstimmung. Fehler am Anfang und am Ende der Sequenzen waren methodisch bedingt. Das Gen PPP2R5C war in diesen Proben nicht mutiert.

In der Patientenprobe 247 konnten wir einen heterozygoten Basenaustausch im Exon 2 feststellen, an der Stelle der Base 273 war im Chromatogramm ein Doppelpeak sichtbar. Es überlagerte sich das Signal von Thymin und Cytosin, was für eine heterozygote Mutation spricht. Diesen Basenaustausch konnten wir sowohl mit dem forward- als auch mit dem reversen-Primer bestätigen. Die Mutation liegt an der dritten Stelle im Codon, so dass der

Wildtyp „TTC“ zu „TTT“ verändert wurde. Allerdings hat dieser Basenaustausch keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz der Untereinheit B56gamma, denn beide Triplets codieren für die Aminosäure Phenylalanin.

Die gleiche Mutation konnten wir auch in den Zelllinien CCRF-CEM und HUT nachweisen.

```
000000185 tttgacttcgtttctgat 000000203
>>>>>>> ||||| ||||| >>>>>>>
101392838 tttgacttcgtttctgat 101392855
```



Abb.3.4 Sequenzierung mit dem forward Primer RT-PPP2R5C-f6

Die zwei übereinander liegenden Peaks zeigen an, dass die Base 194 in einem Teil der cDNA Thymin entspricht und im anderen Teil Cytosin. Das Thymin des Wildtyps wurde hier gegen Cytosin ausgetauscht. Es besteht der Verdacht auf eine Mutation

Aufgrund des mehrfachen Vorkommens dieser identischen „stillen“ Mutation ist ein physiologischer Polymorphismus wahrscheinlich.

Auch die Sequenzanalyse der Zelllinien unterschiedlichster Leukämien und Lymphome zeigt keine Mutationen in der cDNA von PPP2R5C.

Unstimmigkeiten in der Sequenzierung ergaben sich bei den Patientenproben 253 und 06007, die das große Fragment betrafen. Es kam zu einem Abbruch der Sequenzierung ohne offensichtliche Ursache. Die Sequenz in 06007 endete sowohl mit dem forward Primer als auch mit dem reverse Primer im Exon 7, so dass eine Lücke von 15bp von 839 bis 854 blieb. Auch die Sequenz des forward Primers endete in der Probe 253 im Exon 7 und wurde von dem reverse Primer erst im Exon 9 weitergeführt.

Diese Komplikationen verhinderten eine vollständige Mutationsanalyse der Patientenproben. Um die Analysen zu vervollständigen wurde die PCR mittels einer neuen Primerkombination wiederholt. Die PCR mit den Primern PPPamp2-f1 und RT-PPP2R5C-

r5 sollte ein Fragment von 325bp ergeben, das dem noch fehlenden cDNA-Abschnitt entspricht.

An Hand dieser Sequenzierung konnte eine hundertprozentige Übereinstimmung mit dem Wildtyp bestätigt werden. Womit auch die Patientenproben 253 und 06007 keine Mutation aufwiesen.

3.2.3 Nachweis von PPP2R5C-WT in der Sézary-Probe 1365/04

In der Probe 1365/04 wurde bereits zuvor eine Translokation, die das Gen PPP2R5C betrifft, detektiert. Die Translokation fand zwischen dem konstanten Teil des TCR alpha und dem Exon 1 von PPP2R5C statt. Zusätzlich konnte die Expression einer Fusions-mRNA nachgewiesen werden. Trotzdem sollte ebenso der Wildtyp exprimiert werden solange ausschließlich ein Allel von der Translokation betroffen ist. Um zu überprüfen ob auch der Wildtyp von PPP2R5C exprimiert und mutationsfrei ist, wird die Primerkombination RT-PPP2R5C-f6 und RT-PPP2R5C-r3 verwendet, dadurch wird eine Amplifikation des Fusionsproduktes ausgeschlossen. Die Gelelektrophorese des PCR-Produktes zeigt die Isoform $\gamma 2$. Die Sequenzierung der Amplifikate erfolgte mit den für die PCR verwendeten Primern.

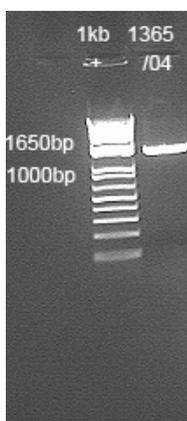


Abb. 3.5 Isoform $\gamma 2$ exprimiert in der Probe 1365/04

Mittels PCR konnte nur die zweite Isoform nachgewiesen werden. Sie wurde in ganzer Länge amplifiziert und entspricht einer Länge von etwa 1650bp.

Anhand der Sequenzierung und dem Vergleich mit den Datenbanken BLAT und BLAST ließ sich keine Mutation nachweisen, so dass das zweite

Allel in der Probe 1365/04 dem Wildtyp von PPP2R5C entspricht. Es erfolgte aber keine Analyse des Exons 13, weil hierzu die Isoform γ_3 exprimiert werden muss.

3.3. Nachweis einer neuen Isoform

Auffällig war jedoch, dass bei den Zelllinien Raji und Karpas mit dem forward Primer eine weitere Sequenz detektiert wurde, welche bereits nach dem Exon 11 in das Exon 14 überging. Eine solche Splicevariante sollte nicht existieren, was Anlass für weitere Untersuchungen gab. Die Amplifizierung des alternativ gespleißten Endes der cDNA in den Zelllinien Karpas 299 und Raji wurde mit der Primerkombination PPPex10-f1 und PPPamp3-r1 wiederholt wodurch neben den Isoformen γ_3 und γ_2 noch eine bisher unbekannte Splicevariante bestätigt wurde. Diese neue Splicevariante enthält im alternativen Ende lediglich Exon 11 und 14.

```

TTT CCTTCCTTGT ACCGCAACTC exon 10
AAAGACCCAT TGGAACAATA CAATACATGG CTTGATATAC AACGCCCTGA
AGCTCTTCAT GGAGATGAAC CAAAAGCTAT TTGATGACTG TACACAACAG exon 11
TTCAAAGCAG AGAAACTAATA GCACAGAAAG ATCCGAAGAA GGACCGTCCT
CTTGACAGCC GCAAGTCCGA GCTGCCTCAG GACCCCCACA CCAAGAAAGC exon 14
TCACTGCAGG GCCGATGAGC TGGCCTCCCA GGACGGCCGC TAG

```

Abb.3.6 cDNA – Abschnitt amplifiziert mit den Primern PPPex10-f1 und PPPamp3-r1
Die Darstellung zeigt die Sequenzierung der neudektierten „alternativen“ Splicevariante in den Zelllinien Raji und Karpas 299. Exon 12 und 13 wurden aus der mRNA entfernt.

Auch die Isoformen γ_1 bis γ_3 sind in den ersten 10 Exonen identisch und differieren in den Exonen 11-14. Die Isoform γ_1 endet mit dem Exon 11 und dem Exon 12 mit einer 3'-UTR, welche sie mit der Isoform d gemein haben sollte. Diese kürzeste Isoform besäße hingegen kein Exon 11, jedoch das Exon 12. Seit dem Juni 2009 wurde diese Splicevariante jedoch nicht mehr bei NCBI aufgeführt (siehe 1.2).

Alle Exone 1-14 enthält die Isoform γ_3 , die sich mit der Isoform γ_2 in der 3'-UTR gleicht. Das Exon 13 ist jedoch nicht Bestandteil der Isoform γ_2 . Auch die erst kürzlich beschriebenen Isoformen e und f verfügen im alternativ gespleißten 3'-Ende entweder über alle Exone 11 bis 14 oder es fehlt das Exon 13.

Eine Variante, welche nur aus den Exonen 1 bis 11 und dem Exon 14 besteht, wie sie in den Zelllinien Raji und Karpas 299 neben den Isoformen 2 und 3 nachgewiesen wurde, ist daher keiner beschriebenen Splicing-Möglichkeit zuzuordnen.

Inwieweit die Expression einer neuen Splicingvariante nur auf diese Zelllinien beschränkt ist, oder ob sich diese Form auch in gesunden Zellen finden lässt, ist Bestandteil eingehender Experimente. Zu diesem Zweck wurde die cDNA von 20 gesunden Probanden mit der gleichen Nested-PCR amplifiziert, wie sie zur Mutationsanalyse eingesetzt wurde.

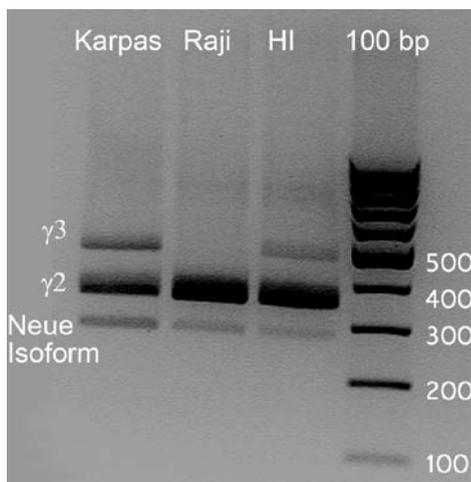


Abb. 3.7 Neue Isoform von PPP2R5C

Alle drei sichtbaren Banden repräsentieren alternative-gespleißten Enden der PPP2R5C-mRNA. Die Bande von etwa 280bp stellt eine bisher unbekannte Isoform dar, die in den Zelllinien Karpas, Raji und bei einem gesunden Probanden detektiert werden konnte. Die Isoform γ_2 entspricht der 360bp-Bande und γ_3 der 500bp-Bande.

Interessanterweise ließ sich auch die „neue Isoform“ in einer Probe einer gesunden Person bestätigen. Zusätzlich manifestierte sich eine weitere Bande, welche von der Größe (400bp) zwischen der den Isoformen 3 und 2 lag. Um die Ergebnisse der Gelelektrophorese zu verifizieren, erfolgte die Sequenzierung dieser zwei DNA-Fragmente.

Die Sequenzierung bestätigte, dass es sich bei dem kurzen PCR-Produkt um die neue Splice-Möglichkeit handelte. Die Identifikation des anderen Produktes gelang nicht aufgrund zu geringer Quantität.

Um auch die Sequenz der unbekanntes Bande zu klären, wurde das PCR-Produkt, welches alle vier Fragmente beinhaltet, kloniert, so dass theoretisch Klone von jeder Isoform entstehen können. Hierzu diente das TOPO-Klonierungssystem mit dem zugehörigen Vektor pCR 2.1 von Invitrogen®.

Entgegen der Erwartungen konnten durch eine PCR nur 4 von 40 Klonen als positiv identifizieren. Hiervon enthielten zwei das 3'-Ende der neuen Isoform und weitere zwei hatten Plasmide mit dem 3'-Ende von $\gamma 2$ aufgenommen. Da das gesuchte PCR-Produkt länger und in geringerer Konzentration neben den anderen Isoformen vorliegt, entstehen seltener Plasmide mit diesem Fragment.

Um die relative Konzentration des unbekanntes PCR-Produktes zu steigern, wurde eine neue Primerkombination: PPPex10-f1 / PPPex13r verwendet.

Bei der 400bp-Bande könnte es sich ebenfalls um ein alternativ gesplictes 3'-Ende von PPP2R5C handeln. Die in dieser Arbeit nachgewiesenen Isoformen endeten stets mit dem Exon 14, so dass es sich nicht um die Isoform $\gamma 1$ handeln konnte, welche mit dem Exon 12 und einer alternativen 3'-UTR endet.

Aufgrund der in der Gelelektrophorese ermittelten Größe wäre ein Zusammenschluss der Exone 11, 13 und 14 denkbar. Der reverse Primer PPPex13r bindet spezifisch im Exon 13, so dass ausschließlich die Isoform $\gamma 3$ sowie die mögliche Variante zu erfassen wäre.

Es zeigte sich jedoch, dass nur die bekannte Isoform zu amplifizieren war (siehe Abb.3.6). Bei der unbekanntes Bande handelt es sich demnach nicht um eine von uns vermutete weitere Isoform (Abb.3.8), sondern wahrscheinlich um ein PCR-Artefakt. Dieses wird

wahrscheinlicher durch den Umstand, dass jene Bande nicht mit den Polymerasen AmpliTaq Gold und der PlatinumPolymerase reproduziert werden konnte.

Abschließend lässt sich sagen, dass wir eine bis dato unbekannte Splicevariante der Gens PPP2R5C auf cDNA-Ebene von gesunden Personen und Zelllinien nachgewiesen haben.

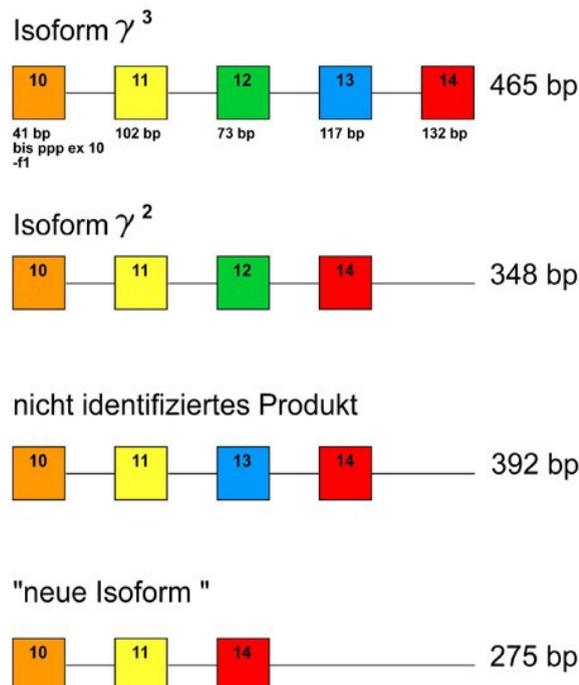


Abb.3.8 3'-Enden der untersuchten Isoformen

Die Isoformen differieren in der Zusammensetzung der Exone 12 bis 14. Die von uns neu beschriebene Isoform ist in ihrem Endstück mit 275bp am kürzesten. Jenes bisher nicht identifizierbare Produkt liegt bei einer Länge von 400bp, was der dargestellten Exonkombination entsprechen könnte.

Das Exon 10 ist hier nur mit 41bp angegeben, da der forward Primer PPPex10-f1 41bp vor dem Übergang zum Exon 11 bindet.

3.4. Expressionsprofil der PPP2R5C-Isoformen in TALLs und gesunden Probanden

Im Zuge der Mutationsanalyse ist aufgefallen, dass die einzelnen Zellproben in der Expression der Isoformen Unterschiede aufweisen, wenn auch keine Systematik erkennbar war.

In der Probe 249 konnte lediglich die kürzere Isoform γ^2 nachgewiesen werden, während in 245 und 247 zwei Isoformen exprimiert wurden. Auffällig ist außerdem die verschiedene Expressionsstärke. Die Isoform γ^3 war stark in 247 vertreten, aber nicht in 245, hier überwog eindeutig die zweite Isoform.

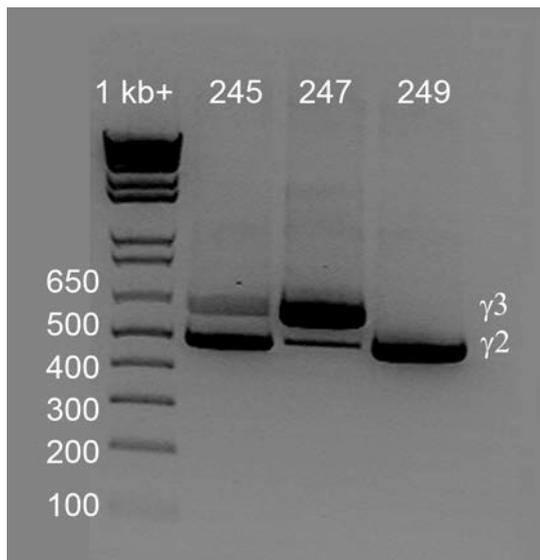


Abb.3.9 Isoformen von 245, 247 und 249

Die Isoform γ_2 präsentiert sich als 500bp-Bande, amplifiziert mit den Primern PPPamp3-f1/r1. Die längere Isoform γ_3 liegt bei 650bp. Marker: 1kb+ von Invitrogen®.

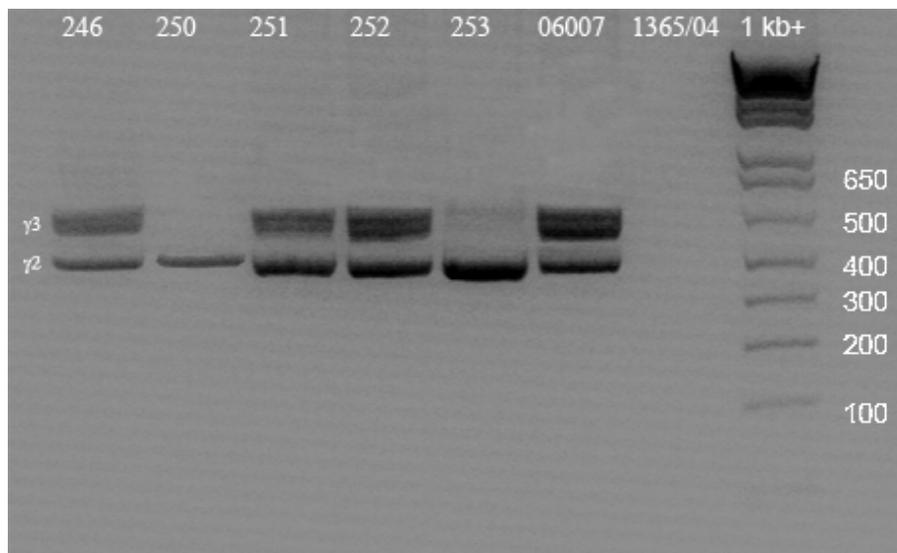


Abb.3.10 Isoformen von 246, 250, 251, 252, 253, 06007 und 1365/04

Die Isoform γ_2 wird hier als 360bp-Bande sichtbar, da sie mit den Primern PPPex10-f1 und PPPamp3-r1 amplifiziert wurde. Äquivalent dazu ist auch die Isoform γ_3 kürzer und liegt bei etwa 500bp. Marker: 1kb+ von Invitrogen®.

Ein ähnliches Bild erhielten wir nach der Amplifizierung der Patientenproben (246, 250, 251, 252, 253, 06007, 1365/04). Während in der Probe 250 nur eine schwache Bande der Isoform γ_2 ausgemacht werden konnte und in 253 die Isoform γ_3 nur in geringem Maße sichtbar war, zeigte sich in den übrigen Proben eine Existenz beider Isoformen. (Zur Probe 1365/04 siehe 3.2.3)

Daher erschien die Untersuchung der Expression der einzelnen Isoformen sinnvoll, um eventuelle Unterschiede in Leukämieproben zu denen von gesunden Probanden aufzudecken. Dazu wurden TALL-Proben hinsichtlich des Expressionsprofils mit dem von gesunden Probanden verglichen.

Die Untersuchung der Proben von gesunden Personen ergab, dass die Expression der Isoformen in gleicher Weise variierte wie in den Leukämie-Proben.

So kam bei 15 der 20 Proben der gesunden Probanden sowohl die Isoform $\gamma 3$ als auch $\gamma 2$ und bei vier Proben nur die zweite Isoform vor. Ebenfalls nur in einer Probe konnte die singuläre Expression von $\gamma 3$ gezeigt werden. Außerdem wurde in zwei Proben die „neue Isoform“ exprimiert.

In 3 der 20 Proben konnten wir keine Expression von PPP2R5C nachweisen, was auf einer schlechten Qualität der cDNA beruhte, welche mittels RT-PCR bestätigt wurde. Diese wurden durch drei weitere Proben ersetzt.

Zum Vergleich der Expressionsprofile analysierten wir die cDNA von zwanzig T-ALLs. Zunächst amplifizierten wir den gesamten cDNA-Abschnitt von PPP2R5C um mit einer zweiten PCR unter Verwendung von inneren Primern (PPPex10-f1/PPPamp3-r1) die alternativ gesplicten 3'-Enden nachzuweisen.

Es zeigte sich ein heterogenes Verteilungsmuster der einzelnen Isoformen, das sich nicht signifikant von dem der gesunden Personen unterscheidet. In 14 der 20 Proben wurden die zwei Isoformen $\gamma 2$ und $\gamma 3$ exprimiert. Lediglich in einer Probe bestand die alleinige Expression von $\gamma 3$ sowie in vier Proben nur $\gamma 2$. Nur die neu beschriebene Isoform (siehe 3.3.) war nicht zu detektieren.

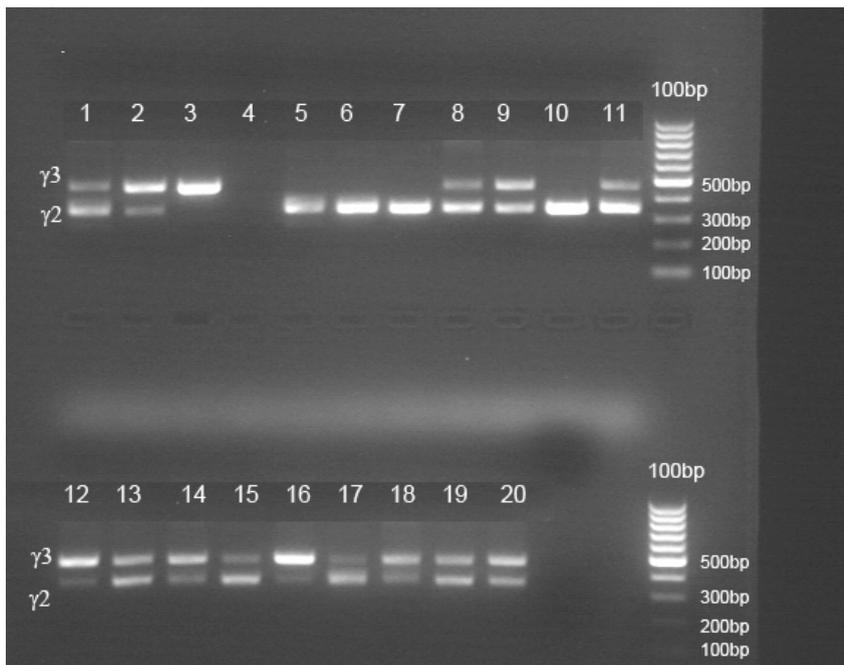


Abb.3.11 Isoformen der TALLs

Die Isoform γ_2 entspricht etwa 360bp und γ_3 der 500bp-Bande. In der Probe 4 ist eine ungenügende cDNA – Qualität Ursache für das Fehlen eines Produktes. Marker: 100bp von Invitrogen®

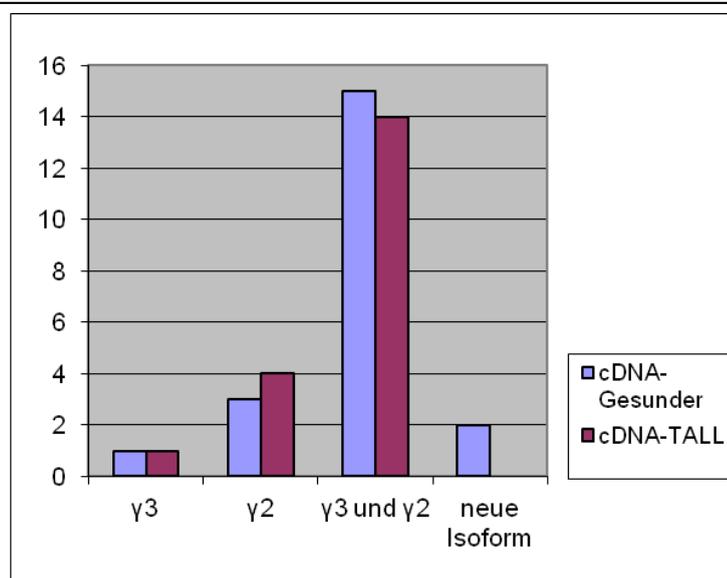


Diagramm 3.1.; Expression der Isoformen in gesunden Buffy Coats und Buffy Coats von TALLs

Die Expression der Isoformen weicht nur in geringem Maße von einander ab. Die neue Isoform ist selten, so dass auch hier der Unterschied von zwei zwischen der cDNA Gesunder und der TALL-cDNA keine relevante Bedeutung haben muss. cDNA-Gesunder – Buffy Coats von gesunden Personen
TALL-cDNA – Buffy Coats von TALLs

Ein Zusammenhang zwischen dem Expressionsprofil der PPP2R5C-Isoformen und der Dignität der Zellen konnte nicht gezeigt werden. Jedoch handelt es sich hierbei um eine rein qualitative und keine quantitative Analyse.

3.5 Funktionsanalyse des Wildtyp-Transkripts PPP2R5C im Vergleich mit dem Fusions-Transkript

In der Probe eines Sézary-Syndroms wurde im Rahmen einer Translokationsanalyse eine Fusion des Gens PPP2R5C mit dem T-Cell-Rezeptor alpha detektiert. Die Bruchpunktanalyse ergab, dass es zu einer Insertion eines 470kb Fragmentes aus der Region 14q11 in das Gen PPP2R5C (14q32) zwischen dem ersten und zweiten Exon kam. Das Fragment besteht aus den ersten sieben joining Regionen des T-Zell-Rezeptors sowie der konstanten Region (TRAC). In der cDNA konnte das Fusionstranskript mit einer PCR unter Verwendung der Primer RT-PPP2R5C-f6 und Ca+425-EcoRI bestätigt werden. Während der Primer RT-PPP2R5C-f6 in 3'- Richtung aufwärts des Exons 1 von PPP2R5C bindet, liegt der Primer Ca+425-EcoRI in 5'- Richtung des Exons 1 in der Sequenz des T-Zell-Rezeptors.

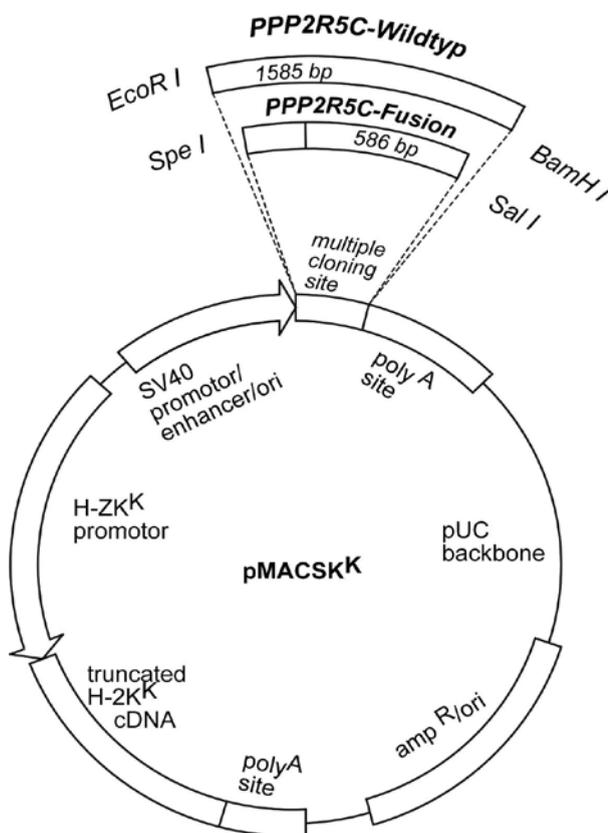
3.5.1 Klonierung von PPP2R5C-WT und PPP2R5C-Fusion in pMACSK^kII

Zur Funktionsanalyse wurden die Zelllinien Jurkat und HUT mit dem PPP2R5C-WT und dem PPP2R5C-Fusionstranskript transfiziert. Der Expressionsvektor pMACSK^kII mit dem entsprechenden Insert wurde mit dem AMAX-System in die Zellen transfiziert.

Zu diesem Zweck klonierten wir die PCR-Produkte mittels der TOPO-Clonierung in pCR 2.1 Vektoren und vermehrten das DNA-Fragment in transformierten E.coli Bakterien. Nach der Kultur positiver Klone mit anschließender Plasmidisolierung wurde das Insert durch eine Sequenzierung auf Mutationen überprüft.

Sowohl im klonierten Fusionstranskript als auch in der WT-Sequenz waren keinerlei relevante Mutationen feststellbar. Der WT wies lediglich den bereits bekannten Polymorphismus im Exon 2 auf, der die Struktur des Proteins allerdings nicht beeinflusst.

Die Klonierung in den Vektor pMACSK^k.II erfolgte für die PPP2R5C-WT-cDNA mit EcoRI und für das PPP2R5C-TRAC-Fusionstranskript mit SpeI / SalI. Kontrolliert wurden die Klone mittels PCR und die positiven PPP2R5C-WT wurden zusätzlich durch einen Restriktionsverdau (HindIII; XhoI) auf ihre Orientierung des Inserts überprüft.



Die Klonierung des Wildtyps-PPP2R5C war von geringer Effizienz. Daraufhin erfolgte die Klonierung mit dem Enzymen EcoRI und BamHI um eine Selbstligation des Vektors zu vermeiden. Hierzu amplifizierten wir den Wildtyp mit den Primern PPPf6-EcoRI und PPPr3-BamHI, so dass die Enden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoRI und BamHI besaßen. Anschließend wurde dieses Insert mit pMACSK^k.II ligiert, in E.coli

Abb. 3.12 pMACSK^k.II mit PPP2R5C-WT und PPP2R5C-Fusionstranskript

transformiert und das Insert PPP2R5C-WT durch eine PCR bestätigt. Die positiven Klone wurden standardmäßig auf die Orientierung des Inserts im Vektor überprüft. Desweiteren

musste die Mutationsfreiheit des klonierten PCR-Produktes durch eine Sequenzierung mit den Primern PPPamp2-f1 und PPPamp2-r1 nachgewiesen werden.

Die mutationsfreien Klone wurden mit Midi-Prep bzw. Maxi-Prep expandiert und das Plasmid isoliert. Die Transfektion erfolgte mit dem AMAXA-System™ durch Elektroporation. Dazu wurden jeweils 1×10^6 Zellen der Zelllinien huT-78 und Jurkat mit dem Plasmid PPP2R5C-WT bzw. PPP2R5C-Fusion und dem Vektor pMACSK^kII transfiziert. In die FACS-Messung wurden zusätzlich unbehandelte Zellen (n.t.) mit eingeschlossen. Die Effizienz der Transfektion wurde nach 24h mit dem FACS ermittelt.

Die Effizienz ließ sich trotz mehrfacher Durchführung nicht steigern und lag stets zwischen 26% und 36%. Die Apoptosemessung fand ebenfalls 24h nach der Transfektion statt.

3.5.2 Apoptosemessung in Jurkat und huT-78 transfiziert mit PPP2R5C-WT und PPP2R5C-Fusion

Die Messung der AnnexinV-positiven Zellen, die apoptotisch sind, ergab bei Jurkat, transfiziert mit PPP2R5C-WT, einen Anteil von 50%. Im Vergleich hierzu lag der Anteil an apoptotischen Zellen mit 69% nach der Transfektion mit PPP2R5C-Fusion deutlich höher. (Abb.3.12). In der Zelllinie huT-78 war die Apoptoserate insgesamt höher, da diese sensibler auf die Transfektion reagierte. Es ließ sich ebenfalls eine Differenz im Anteil der apoptotischen Zellen, welche entweder mit PPP2R5C-WT oder PPP2R5C-Fusion transfiziert wurden, feststellen. Die Differenz war mit 8% (huT-PPP2R5C-WT 71%; huT-PPP2R5C-Fusion 79%) geringer verglichen mit den Ergebnissen in der Zelllinie Jurkat (Abb.3.12)

Diese Tendenz konnte durch wiederholte Transfektion und Apoptosemessung bestätigt werden. Jurkat-PPP2R5C-WT wies 44% an apoptotischen Zellen auf und damit 8% weniger als Jurkat-PPP2R5C-Fusion (52%). (Abb.3.13)

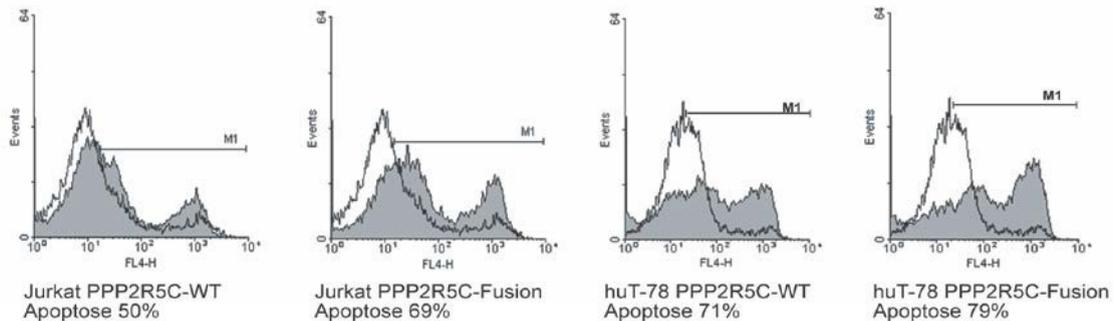


Abb.3.13 Apoptosemessung in Jurkat und huT-78, transfiziert mit PPP2R5C-WT und PPP2R5C-Fusion
X-Achse/FL4-H: AnnexinV-positive Zellen; durchscheinende Fläche: n.t.; graue Fläche: transfizierte Zellen; M1: Marker1

Ähnlich verhielt es sich mit huT-PPP2R5C-WT und huT-PPP2R5C-Fusion, die 60% bzw.75% apoptotische Zellen aufwiesen. (Abb.3.14)

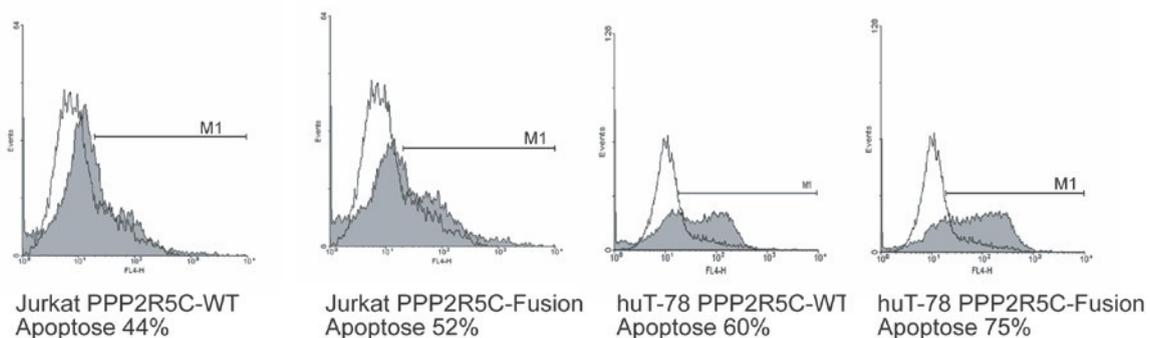


Abb.3.14 Apoptosemessung in Jurkat und huT-78, transfiziert mit PPP2R5C-WT und PPP2R5C-Fusion
X-Achse/FL4-H: AnnexinV-positive Zellen; durchscheinende Fläche: n.t.; graue Fläche: transfizierte Zellen; M1: Marker 1

Im weiteren Verlauf stellte sich heraus, dass bereits die Transfektion mit dem leeren Vektor pMACSKkII einen starken Einfluss auf die Vitalität der Zellen ausübte und dieser Effekt mit der Transfektion von PPP2R5C-WT vergleichbar war.

Die Ergebnisse zeigen erstens, dass bereits die Methode zum Tod eines relevanten Anteils der Zellen führt. Zweitens liegt der Anteil an apoptotischen Zellen, die PPP2R5C-Fusion exprimieren, stets über dem der Zellen mit alleiniger PPP2R5C-WT-Expression.

3.5.3 Erstellung eines retroviralen Überexpressionssystems vom PPP2R5C-Fusions-Gen

Um den apoptotischen Effekt des PPP2R5C-Fusionstranskripts eindeutig von der methodenbedingten Apoptose abgrenzen zu können, wurde ein retrovirales Transfektionssystem genutzt.

Hierzu wurde PPP2R5C-Fusion mit BamHI und XhoI verdaut, so dass eine Ligation mit den BglII- und XhoI-Schnittstellen des pMIGR-Vektors möglich war. Es erfolgte die Klonierung und Überprüfung der Klone mittels PCR unter Verwendung der Primer PPP2R5C-f6 und Ca+113. Die positiven Klone wurden anschließend mit dem Maxi-Prep-Kit von Stratagen™ expandiert und das Plasmid isoliert. Der erstellte Vektor wurde mittels der Calcium-Phosphat-Methode in 293-GP Zellen transfiziert. Nach 48h wurde das Medium, das nun die infektiösen Viren enthielt, gesammelt und damit Jurkat und huT-78 transduziert.

Die Effizienz der Transduktion wurde nach 48h am FACS-Gerät bestimmt. Sie

lag mit 55% für Jurkat und mit 65% für huT-78 signifikant höher im Vergleich zur Elektroporation. Es gelang jedoch nicht ein retrovirales Überexpressionssystem für

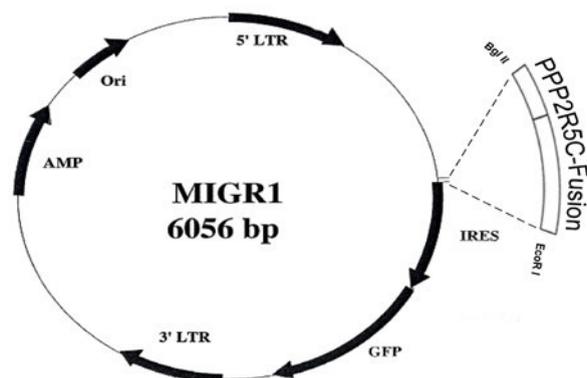


Abb.3.15 pMIGR-PPP2R5C-Fusion

PPP2R5C-WT herzustellen. Als Kontrolle wurde selbige Transfektion und Transduktion auch für den leeren Vektor pMIGR durchgeführt.

3.5.4 Apoptosemessung in Jurkat- und huT-78 – pMIGR-PPP2R5C-Fusion

Die Apoptoserate wurde durch Ermittlung der AnnexinV-positiven Zellen im FACS-Gerät bestimmt.

Während Jurkat-pMIGR nur 18% apoptotische Zellen aufwies, waren 24% von Jurkat-pMIGR-PPP2R5C-Fusion apoptotisch. (Abb.3.14)

Die transduzierten huT-78 Zellen zeigten erneut generell höhere Apoptoseraten, aber auch hier war ein signifikanter Unterschied zwischen huT-pMIGR mit 30% Apoptose und huT-pMIGR-PPP2R5C-Fusion mit 40% AnnexinV – positiven Zellen festzustellen. (Abb.3.14)

Dadurch wurden die vorhergegangenen Ergebnisse bekräftigt, da Jurkat und huT-78 unter Expression von PPP2R5C-Fusion höhere Apoptoseraten aufwiesen.

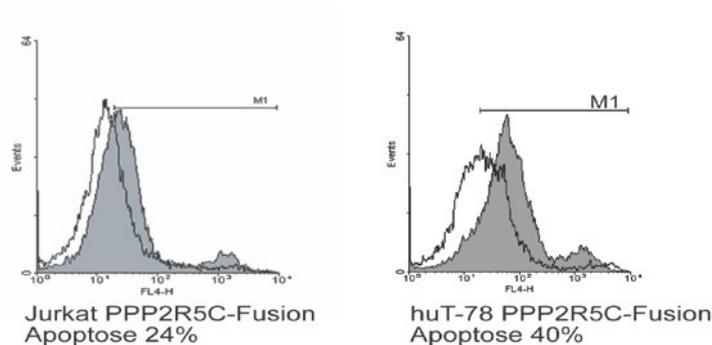


Abb.3.16 Apoptosemessung in Jurkat und huT-78 transduziert mit pMIGR-PPP2R5C-Fusion
 X-Achse/FL4-H: AnnexinV-positive Zellen; durchscheinende Fläche: pMIGR; graue Fläche: pMIGR-PPP2R5C-Fusion
 Marker: M1

3.6 Nachweis des PPP2R5C-Fusionsproduktes auf Proteinebene

Der Nachweis, dass das PPP2R5C-Fusionstranskript nicht nur exprimiert sondern auch translatiert wurde, geschah mittels Western Blot.

Hierzu wurde ein primärer Antikörper gegen die konstante Region des T-Zell-Rezeptors alpha gewählt, der den größeren Anteil des Fusionsproduktes stellt. Aufgrund der Länge von 585bp ist ein Fusions-Protein von etwa 22kDa zu erwarten, neben dem normal exprimiertem T-Rezeptor alpha mit einer Größe von 34kDa.

Analysiert wurde die Proteine von Jurkat und huT-78, transfiziert durch die Elektroporation mit pMACSKkII und PPP2R5C-Fusion, sowie mit dem retroviralen Vektor pMIGR-PPP2R5C-Fusion. Außerdem dienten die Proteine normaler T-Zellen als positive Kontrolle für den Antikörper.

Das PPP2R5C-TRAC-Fusionsprodukt konnte nicht als Protein nachgewiesen werden und auch der physiologisch exprimierte T-Zellrezeptor alpha, bildete sich nur als eine schwache Bande bei 34kDa ab.

4. Diskussion

Eine tumorsuppressive Funktion ist für das PPP2R5C-Protein, das Teil des PP2A-Phosphatase-Komplexes ist, in der Literatur beschrieben. So wurde die Interaktion der Untereinheit mit dem zentralen Tumorsuppressor p53 nachgewiesen und seine Funktion in der negativen Regulation von Signalwegen (Wnt-; Ras/Raf/MAPK-Signalweg) gezeigt. Auch konnte der Suppression der B56 γ -Untereinheit ein wichtiger Beitrag zur malignen Transformation zugeschrieben werden (siehe 1.1-1.8). Unklar ist, ob Mutationen des PPP2R5C-Gens in Sézary-Syndrom-Zellen (cutanes T-Zell-Lymphom) vorkommen und diese zur malignen Entartung der T-Zellen beitragen. Hinweisend auf die Beteiligung von PPP2R5C ist eine Translokation des TRAC mit PPP2R5C und der Nachweis dieser als Fusions-mRNA in einer Sézary-Probe. Auch die Auswirkungen der Expression dieser mRNA sollten in dieser Arbeit geklärt werden.

4.1 Etablierung der DHPLC für das PPP2R5C-Gen

Die DHPLC erwies sich für die Mutationsanalyse von vielen Genen als besonders sensitiv und effektiv, daher sollte diese Methode zum Screening der Patientenproben auf Mutationen für PPP2R5C etabliert werden. Voraussetzung hierfür war die Amplifikation des Gens durch eine Polymerase mit hoher Proof-reading-Aktivität um adäquate Ergebnisse zu erzielen. Es gelang aber nicht diese Reaktion zu etablieren und im Folgenden die DHPLC durchzuführen.

Eine mögliche Ursache könnte die komplexe Sekundärstruktur des PPP2R5C-Gens sein, das über viele C-G-reiche Regionen verfügt, die eine Amplifikation durch eine reine Proof-

reading Polymerase behindern. Substanzen, die zur Lösung solcher Strukturen beitragen, wie DMSO konnten wegen deren mutagenen Eigenschaften sowie der äußersten Sensitivität der Methode nicht verwendet werden.

Auch zeigte sich, dass Polymorphismen von PPP2R5C existieren (siehe 3.2.2), was die Aussagekraft der einfachen Mutationsanalyse mit der DHPLC einschränkt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Etablierung der DHPLC für das Gen PPP2R5C nur von geringer Relevanz ist, da in den untersuchten Proben keine pathologischen Mutationen festgestellt werden konnten und somit die Vorteile der DHPLC bei Screening-Untersuchungen entfallen.

4.2 Mutationsanalyse des PPP2R5C-Gens in Sézary-Proben

Das PPP2R5C-Gen wurde in zehn Sézary-Proben und zehn Zelllinien sequenziert und auf Mutationen untersucht. In keiner Probe war eine Mutation der codierenden Sequenz des PPP2R5C nachweisbar. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass in anderen Leukämien Mutationen existieren, wenn dieser Umstand aufgrund dieser Untersuchung auch nicht als wahrscheinlich angesehen werden kann. Denn inwiefern Mutationen in anderen Leukämien und Krebsarten vorkommen, ist nicht bekannt.

Interessanterweise wurden allerdings charakteristische Mutationen der Untereinheit A α und β in Lungen- und Brustkrebsgewebe identifiziert [46], so dass Mutationen der B56 γ nicht generell auszuschließen sind. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, dass die heterozygote Mutation von A α zur Suppression der B56 γ führt und dadurch onkogen wirken könnte [48]. Dieses macht deutlich, dass die B56 γ -Untereinheit nicht nur isoliert betrachtet werden sollte, sondern auch die interagierenden Untereinheiten, da diese an der

Funktionsfähigkeit beteiligt sind. So konnte in malignen Melanomen eine Suppression von PPP2R5C bestätigt werden [51]. Ein suppressiver Effekt kann nicht nur Mutationen der codierenden Sequenz, sondern auch durch Veränderungen in den regulatorischen Abschnitten wie z.B. dem Promotor erfolgen. Die Untersuchung von veränderter Expression und deren Regulation wäre daher ein weiterer Ansatzpunkt.

Dieser Aspekt könnte insbesondere für die Entstehung von Leukämien von Interesse sein, weil hier Translokationen mit Antikörpercodierenden Abschnitten, welche die Regulation beeinträchtigen, eine zentrale Rolle spielen. Dieses wird dadurch bestätigt, dass bereits einige Fusionsproteine identifiziert worden sind, die die Aktivität der PP2A herunter regulieren [52].

4.3 Identifikation einer neuen Isoform der B56 γ

Für die onkogene Aktivität können neben Mutationen auch die Expressionsstärke sowie die Verteilung der Isoformen von Bedeutung sein. In diesen Untersuchungen wurde gezeigt, dass nicht alle Isoformen von PPP2R5C gleich stark und zur selben Zeit exprimiert werden. Bemerkenswerterweise wurde im Rahmen dieser Arbeit eine bisher unbekannte Isoform beschrieben.

Durch den Vergleich der PPP2R5C-Expressionsmuster in Proben von 20 gesunden Spendern und 20 TALLs wurde, untersucht ob ein Zusammenhang zwischen den Expressionsprofilen und der Malignität der Zellen besteht.

Eine Korrelation zwischen der Verteilung der Isoformen γ_2 und γ_3 und der Dignität der Zellen wurde nicht beobachtet. Anzumerken ist aber, dass noch mindestens vier weitere Isoformen existieren [13, 14, 15], von denen eine in dieser Arbeit neu beschrieben worden

ist. Über die genaue Funktion der einzelnen Isoformen oder ob ihre Aufgaben redundant sind, liegen aktuell keine Informationen vor. Bekannt ist, dass sich die hinsichtlich ihres Vorkommens Isoformen in den verschiedenen Zellkompartimenten unterscheiden, weshalb die Beteiligung an anderen Reaktionen und Signalwegen denkbar wäre. Die Isoformen $\gamma 2$ und $\gamma 3$ kommen beide verstärkt im Nucleus vor [12]. Daher wäre eine äquivalente Funktion möglich, so dass die Beeinträchtigung einer Isoform durch die andere kompensiert werden könnte.

Durch die qualitative Analyse der Isoformexpression konnte eine bisher unbekannt Variante identifiziert werden, die sowohl bei gesunden als auch in Zelllinien vorkommt. Dieses zeigt, dass noch weitere Studien nötig sind um eindeutig alle Isoformen des Gens PPP2R5C zu identifizieren und deren Aufgaben für den zellulären Stoffwechsel zu ergründen.

4.4 Fusions-mRNA aus PPP2R5C und TRAC führt zu höheren Apoptoseraten in Jurkat und huT-78

Um die biologische Relevanz der Fusions-mRNA, die aus einer Translokation des Exons1 von PPP2R5C (14q32.2) mit TRAC (14q11) resultiert, zu untersuchen sowie deren Bedeutung für die maligne Transformation von T-Zellen, wurden die Zelllinien Jurkat und huT-78 einmal mit dem PPP2R5C-Wildtyp und dem PPP2R5C-Fusionsprodukt transfiziert. Anschließend wurde die Anzahl der apoptotischen Zellen mittels FACS gemessen. Es zeigte sich, dass Jurkat-PPP2R5C-Fusion und huT-PPP2R5C-Fusion stets höhere Apoptoseraten aufwiesen als die korrespondierenden Wildtyp-Varianten. Sowohl bei Jurkat als auch bei huT-78 lag die Anzahl der apoptotischen Zellen nach der Transfektion mit PPP2R5C-Fusion

im Schnitt um circa 10% höher (Jurkat 9%; huT-78 12%), während die Apoptoserate bei PPP2R5C-WT vergleichbar mit der Transfektion des leeren Vektors pMACSKkII war. Im Allgemeinen war die Apoptoserate bei huT-78 höher, da sie empfindlicher auf die Elektroporation reagierten. Der durch den Elektroschock bedingte zelluläre Stress verursacht generell verstärkte Apoptose bei den transfizierten Zellen.

Durch den Einsatz eines retroviralen Überexpressionssystems wird dieser Stress vermieden, was sich durch eine durchgehend geringere Apoptose der transduzierten Zellen bestätigte.

Da es nicht gelang ein retrovirales Überexpressionssystem für PPP2R5C-WT zu erstellen, ist kein direkter Vergleich der Apoptoseraten von PPP2R5C-Fusion und dem Wildtyp möglich. Stellvertretend kann die Apoptose unter dem leeren Vektor pMIGR betrachtet werden, weil in vorherigen Messungen kein zusätzlicher Effekt des PPP2R5C-WT beobachtet werden konnte.

Erneut lagen die Apoptoseraten mit PPP2R5C-Fusion in Jurkat um 6% und in huT-78 um circa 10% höher, verglichen mit dem leeren Vektor.

Obwohl die Transfektionseffizienz der Elektroporation nicht über 36% lag, konnten die Ergebnisse im retroviralem Expressionssystem, mit einer Effizienz von über 50%, bestätigt werden.

Die Expression des PPP2R5C-TRAC-Fusionsprodukts führt damit zu verstärkter Apoptose in Jurkat und huT-78, während bei PPP2R5C-Wildtyp keine Auswirkungen beobachtet werden konnten.

Obwohl B56 γ in die Regulation von Zellzyklus [32, 33] und Zellteilung [29, 30, 31] involviert ist, konnte keine Auswirkung der PPP2R5C-WT Überexpression festgestellt werden. Trotz der Fähigkeit von B56 γ zur Induktion eines Zellzyklusarrest [32, 33] und zur

Proliferationshemmung [17, 18, 24, 25], konnte kein Einfluss auf die Apoptose beobachtet werden.

Dieses könnte erstens dadurch bedingt sein, dass unter normalen Wachstumsbedingungen eine Überexpression von PPP2R5C nicht mit einer verstärkten Aktivierung der PP2A-B56 γ einhergeht. Zweitens ist es denkbar, dass die PP2A-B56 γ nicht direkt in die Apoptose involviert ist, sondern nur zur Wachstumshemmung führt [32, 33]. Drittens ist dieser Effekt unter anderem durch die Interaktion mit p53 beschrieben worden [32, 36, 37, 38]. Diese Funktion der B56 γ könnte daher in p53-negativen Zellen wie Jurkat und huT-78 eingeschränkt sein.

Um die Auswirkung der PPP2R5C-Überexpression intensiv zu untersuchen, sollten p53-positive Zellen gewählt, sowie deren Reaktion auf induzierte Apoptose erfasst werden.

In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung ob der tumorsuppressive Effekt auch in p53-negativen Zellen besteht.

Im Gegensatz zur Wildtypexpression führte die Expression des Fusionsprodukts, isoliert aus einer Sézary-Probe, zu vermehrter Apoptose. Die Induktion der Apoptose widerspricht zwar zunächst der Entstehung einer malignen, proliferativen Erkrankung, kann jedoch einen Selektionsdruck ausüben. Zellen, die trotz der Expression des Fusionsprodukts überleben, werden so selektioniert und verfügen über einen Proliferationsvorteil. Die selektionierten Zellen sind damit einen Schritt weiter in der malignen Transformation, da sie fähig sind sich dem programmierten Zelltod zu entziehen. Auf diese Weise könnte die Translokation zwischen PPP2R5C und TRAC Einfluss auf die Entstehung des Sézary-Syndroms gehabt haben.

Auf welchen Effekt die beobachtete erhöhte Apoptoserate zurückzuführen ist, kann nur vermutet werden. Es besteht die Möglichkeit, dass allein durch die Überexpression des nicht-

physiologischen Fusionsproduktes den Zelltod zur Folge hat. Das fehlerhafte mRNA-Konstrukt muss in der Zelle abgebaut werden und kann durch die Überexpression akkumulieren. In diesem Fall würde es sich um einen durch die Methode bedingten artifiziellen Effekt handeln, der keine biologische Relevanz besitzt.

Da der B56 γ -Untereinheit eher proliferative Eigenschaften zugeschrieben worden sind [11, 43], ist bei einem heterozygoten Verlust des PPP2R5C mit wachstumshemmenden Effekt zurechnen. Es hat sich aber auch am Beispiel des p53 oder von ERK gezeigt, dass PP2A-B56 γ als positiver und als negativer Regulator basierend auf dem extrazellulären Stimulus agieren kann [18, 36, 37]. Daher kann eine Interferenz in dem sensiblen Gleichgewicht unerwartete Auswirkungen haben.

Boudreau et al. fanden heraus, dass durch die Hemmung von PP2A durch Okadaic Säure p38 MAPK-abhängige - Apoptose in Jurkat induziert werden kann [61]. Jedoch konnte auch beobachtet werden, dass eine PP2A-Inhibition durch das Protein I²PP2A in U937 promonozytären Leukämiezellen zur Resistenz gegenüber der TNF α -induzierten Apoptose führt [62]. Eine Beeinträchtigung von PP2A kann daher gegensätzliche Auswirkungen basierend auf verschiedenen Umweltbedingungen auf die Apoptose haben. Käme es zu einer Beeinträchtigung der B56 γ -Untereinheit und von PP2A aufgrund der Expression der Fusions-mRNA und hätte dieses hemmende Effekte auf die PP2A, so wäre eine Apoptose-Induktion denkbar.

4.5 Nachweis der Proteinexpression des PPP2R5C-TRAC-Fusionsproduktes durch Western Blot

Entgegen der Erwartung ist es nicht gelungen das PPP2R5C-TRAC-Fusionsprodukt mit einem TCR alpha-Antikörper nachzuweisen. Dadurch ist die Umsetzung der mRNA in ein Protein fraglich. Jedoch war auch der Nachweis des physiologisch-exprimierten T-Zell-Rezeptors alpha schwierig. Dieses könnte dadurch begründet sein, dass es sich um ein membranständiges Protein handelt und in Folge dessen bei der Proteinisolierung teilweise entfernt wird.

Das Fusionsprotein ist wahrscheinlich instabil, was den Nachweis deutlich erschwert. Auch ist die Sensitivität des Western Blots bereits auf den, in den positiven Kontrollen stark exprimierten, T-Zell-Rezeptor alpha nicht ausreichend.

Um eine eindeutige Aussage über die Expression und Translation des Fusionsproduktes machen zu können, wäre die Verbindung mit einer Myc-Tag-Sequenz am c-Terminus möglich, um es mit spezifischen Antikörpern nachzuweisen. Durch ein solches Verfahren kann eine höhere Sensitivität erreicht werden.

4.6 Weiterführende Untersuchungen zur Funktion von PPP2R5C in der Entstehung von Leukämien

Durch die vorliegende Arbeit wurde gezeigt, dass Mutationen der codierenden Sequenz von PPP2R5C in keinem relevanten Umfang in Sézary-Syndrom-Proben auftreten. Interessanterweise begünstigt eine Translokation von PPP2R5C und TRAC und deren Fusionsprodukt aus einer Sézary-Probe jedoch einen proapoptotischen Effekt. In Angesicht

dessen sollte die Expression von PPP2R5C und deren Beeinträchtigung durch Translokationen sowie Fusionsproteine in Leukämien weiter untersucht werden. Eine Beeinflussung der Entwicklung von chronisch lymphatischen B-Zell-Leukämien durch die verringerte Expression des PPP2R5C wurde bereits nachgewiesen [50]. Auch konnten bereits Translokationen, welche eine hohe Frequenz in Leukämien aufweisen, identifiziert werden, die über eine PP2A-Inhibition ihr onkogenes Potential entfalten [19, 20]. Eine Suppression oder ein Funktionsverlust der PP2A-B56 γ durch homo- und heterozygote Mutationen des Gens PPP2R5C konnte durch die vorliegende Arbeit relativiert werden.

Andere Studien belegten, dass die Mutation von PPP2R1B ($A\beta$) in ALLs auftritt, welches die Interaktion mit der B56 γ verhindert [63]. Die Integrität des PP2A-B56 γ -Komplexes erscheint daher eine wichtige Rolle für die Verhinderung der malignen Transformation in verschiedenen Krebsformen zu spielen. In diesem Zusammenhang sollten besonders Mechanismen untersucht werden, die eine eventuelle Suppression des PPP2R5C in Leukämien zur Folge haben könnten und damit an der malignen Transformation beteiligt sind.

5. Zusammenfassung

Das Verständnis der zellulären Funktion und der Beteiligung der Phosphatasen an der malignen Transformation hat in den letzten Jahren stark zugenommen. So konnte die regulatorische Untereinheit B56 γ der PP2A als Interaktionspartner von p53 und potentieller Tumorsuppressor identifiziert werden [34-39]. Weitere Studien haben den Nachweis von Mutationen der Gene PPP2R1A und PPP2R1B, die für die Untereinheit A der PP2A codieren, in verschiedenen malignen Erkrankungen erbracht [63].

In dieser Arbeit wurde zunächst das PPP2R5C-Gen auf Mutationen in malignen T-Zell Erkrankungen untersucht. Weiter wurde der Einfluss der Expression des PPP2R5C-Wildtyps im Vergleich mit einer Fusions-mRNA aus PPP2R5C und der konstanten Region des T-Zell Rezeptors α in Jurkat- und huT-78 – Zellen auf die Apoptoserate bestimmt.

Entgegen der Annahme wurde keine Mutation des Gens PPP2R5C festgestellt. Es gelang jedoch im Rahmen der Mutationsanalyse die Beschreibung einer neuen PPP2R5C-Isoform. Die Expression dieser Isoform korreliert jedoch nicht mit einem malignen Phänotyp. Die Transfektion des PPP2R5C-TRAC-Fusionstranskripts ergab im Vergleich mit dem Wildtyp eine höhere Apoptoserate, die auch in einem retroviralem Überexpressionssystem bestätigt werden konnte.

Eine direkte Beteiligung des PPP2R5C-TRAC-Fusionstranskripts an der malignen Transformation wurde damit nicht gezeigt. Wahrscheinlicher ist das Entstehen eines Selektionsdrucks, wodurch apoptoseresistente Zellen einen Wachstumsvorteil erhielten. Diese Arbeit belegt, dass direkte Mutationen des PPP2R5C-Gens in malignen T-Zell-Erkrankungen nicht in hoher Frequenz vorkommen. Die tumorsuppressive Funktion der PP2A-B56 γ vermittelt über p53 bedarf noch weiterer Forschung.

I. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 3.1a) Schmelzkurve der positiven Kontrolle Advantage/Optimase in der DHPLC
- Abb.3.1b) Schmelzkurve der negativen Kontrolle Advantage/Advantage in der DHPLC
- Abb.3.1c) Schmelzkurve der negativen Kontrolle Optimase/Optimase
- Abb.3.2 Chromatogramm von 2 Isoformen
- Abb.3.3a) Sequenzierung der PPP2R5C cDNA - Erstes Fragment
- Abb.3.3b) Sequenzierung der PPP2R5C cDNA - Zweites Fragment
- Abb.3.4 Sequenzierung mit dem forward Primer RT-PPP2R5C-f6
- Abb.3.5 Isoform $\gamma 2$ exprimiert in der in der Probe 1365/04
- Abb.3.6 cDNA – Abschnitt amplifiziert mit den Primern PPPex10-f1 und PPPamp3-r1
- Abb.3.7 Neue Isoform von PPP2R5C
- Abb.3.8 3'-Enden der untersuchten Isoformen
- Abb.3.9 Isoformen von 245, 247 und 249
- Abb.3.10 Isoformen von 246, 250, 251,252, 253,06007 und 1365/04
- Abb.3.11 Isoformen der TALLs
- Abb.3.12 pMACSKkII mit PPP2R5C-WT und PPP2R5C-Fusionstranskript
- Abb.3.13 Apoptosemessung in Jurkat und huT-78 transfiziert mit PPP2R5C-WT und PPP2R5C-Fusion
- Abb.3.14 Apoptosemessung in Jurkat und huT-78 transfiziert mit PPP2R5C-WT und PPP2R5C-Fusion
- Abb.3.15 pMIGR-PPP2R5C-Fusion
- Abb.3.16 Apoptosemessung in Jurkat und huT-78 transduziert mit pMIGR-PPP2R5C-Fusion

II. Tabellen- und Diagrammverzeichnis

- Tab.1.1 Nomenklatur der PP2A Untereinheiten
- Tab.1.2 Lokalisation der B56 γ Splicevarianten
- Diagr.3.1 Expression der Isoformen in gesunden Buffy Coats und Buffy Coats von TALLs

III.Literaturverzeichnis

1. Yigong Shi (2009) Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. Cell 139, 30
2. T.S. Ingebritsen, P. Cohen (1983) The protein phosphatase involved in cellular regulation. Classification and substrate specificities. Eur. J. Biochem. 132, 255-261
3. A.H. Schonthal (1998) Role of PP2A in intracellular signal transduction pathways. Front Biosci. 3 D, 1262-1273
4. H. Fujiki, M. Suganuma, (1993) Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A: the okadaic acid class of compounds. Adv. Cancer Res. 61, 143-194
5. Veerle Janssens and Jozef Goris (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. Biochem. J. 353, 417-439
6. Uhn Soo Cho, Wenging Xu (2007) Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme. Nature Vol.445/4
7. Sabeeha Muneer, Vivek Ramalingam, Robert Wyatt, Roger A. Schultz, John D. Minna, Craig Kamibayashi (2002) Genomic Organization and Mapping of the Gene Encoding the PP2A B56 γ Regulatory Subunit. doi:10.1006/geno.2002.6721
8. Yanhui Xu, Yongna Xing, Yu Chen, Yang Chao, Zheng Lin, Eugene Fan, Jong W. Yu, Stefan Strack, Philip D. Jeffrey, Yigong Shi (2006) Structure of the protein phosphatase 2A holoenzyme. Cell 127(6), 1239-51
9. SHI YiGong (2009) Assembly and structure of protein phosphatase 2A. Sci China Ser C-Life vol 5 no 2, 135-146
10. Wang baijing, Zhang Peng, Wie Qun (2008) Recent progress on the structure of Ser/Thr protein Phosphatases. Sci China Ser C-Life Sci vol. 51 no. 6, 487-494
11. Marc Mumby (2007) PP2A: Unveiling a reluctant tumor suppressor. Cell 130, DOI 10.1016
12. Brent McCright, Ann M. Rivers, Scott Audlin, and David M. Virshup (1996) The B56 family of protein phosphatase 2A (PP2A) regulatory subunits encodes differentiation-induced phosphoproteins that target PP2A to both nucleus and cytoplasm. Journal of biological chemistry vol. 271, no. 36, 22081–22089

13. Brent McCright, David M. Virshup (1995) Identification of a New Family of Protein Phosphatase 2A Regulatory Subunits. *Journal of biological chemistry* vol. 270, no.44, 26123–26128
14. NCBI Reference Sequence NM_001161725.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5527>; Juli 2009)
15. NCBI Reference Sequence NM_001161726.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5527>; Juli 2009)
16. Melissa R. Junttila, Song-Ping Li, Jukka Westermarck (2008) Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J.* 22, 954-965
17. Claire Letourneux, Géraldine Rocher, Françoise Porteu (2006) B56-containing PP2A dephosphorylate ERK and their activity is controlled by the early gene *IEX-1* and ERK. *The EMBO Journal* 25, 727–738
18. Géraldine Rocher, Claire Letourneux, Philippe Lenormand, and Françoise Porteu (2007) Inhibition of B56-containing protein phosphatase 2As by the early response gene *IEX-1* leads to control of Akt activity. *Journal of biological chemistry* vol. 282, no. 8, 5468–5477
19. Mei Li, Anthony Makkinje, Zahi Damuni (1996) The Myeloid Leukemia associated protein SET is a potent inhibitor of protein phosphatase 2a. *Journal of biological chemistry* Vol. 271, no. 19, 11059–11062
20. P.Nevaiani, R. Santhanam, R. Trotta, M. Notari, B.W. Blaser, S. Liu, H. Mao, J.S. Caliguri, J.S. Chang, A. Galiotta, A. Uttam, D.C. Roy, M. Valtieri, R. Bruner-Klisovic, C.D. Bloomfield, G. Marcucci, D.Perrotti, (2005) The Tumorsuppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein. *Cancer Cell* 8, 355-368
21. Qing Liu, Xiaobin Zhao, Frank Frizzera, Yihui Ma, R. Santhanam, D.Jarjoura, A. Lehman, D. Perrotti, C.-S. Chen, J.T. Dalton, N. Muthusamy, J.C. Bryd (2008) FTY720 demonstrates promising preclinical activity for chronic lymphocytic leukemia and lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Blood* 111(1):275-284
22. N. Barker, H. Clevers (2000) Wnt signaling and cancer. *Bioessays* 22, 961-965
23. J.M. Seeling, J.R. Miller, R. Gil, R.T. Moon, R. White, D.M. Virshup (1999) Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A. *Science* 283, 2089-2091
24. H. Yamamoto, T. Hinoi, T. Michiue, A. Fukui, H. Usui, V.Janssens, C. Van Hoof, J. Goris, M. Asashima, A. Kikuchi (2001) Inhibition of the Wnt signaling pathway by the PR61 subunit of protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* 276, 26875-26882

25. Xinghai Li, H. Joseph Yost, David M. Virshup, Joni M. Seeling (2001) Protein phosphatase 2A and its B56 regulatory subunit inhibit Wnt signaling in *Xenopus*. *The EMBO Journal* Vol. 20 No. 15, 4122-4131
26. Akihiko Ito, Tatsuki R. Kataoka, Masafumi Watanabe, Kazutaka Nishiyama, Yuichi Mazaki, Hisataka Sabe, Yukihiko Kitamura, Hiroshi Nojima (2000) A truncated isoform of the PP2A B56 subunit promotes cell motility through paxillin phosphorylation. *The EMBO Journal* Vol. 19 No. 4, 562–571
27. Dean Clift, Farid Bizzari, Adele L. Marston (2009) Shugoshin prevents cohesin cleavage by PP2A^{Cdc55} – dependent inhibition of separase. *Genes&Development* 23, 766-780
28. Teresa Rivera, Ana Losada (2006) Shugoshin and PP2A, shared duties at the centromere. *BioEssays* 28, 775-779
29. CG Riedel, VL Katis, Y Katou, S Mori, T Itoh (2006) Protein phosphatase 2A protects centromeric localization of Sgo1 and proper chromosome segregation. *Dev. Cell* 10, 575-997
30. TS Kitajima, T Sakuno, K Ishiguro, S Iemura, T Natsume (2006) Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature* 441, 46-52
31. Andrew J. Holland, Franziska Böttger, Olaf Stemmann, and Stephen S. Taylor (2007) Protein phosphatase 2A and separase form a complex regulated by separase autocleavage. *Journal of biological chemistry* Vol. 282, No. 34, 24623–24632
32. Aruni S. Arachchige Don, Robert F. Dallapiazza, David A. Bennin, Tiffany Brake, Colleen E. Cowan, and Mary C. Horne (2006) Cyclin G2 is a centrosome-associated nucleocytoplasmic shuttling protein that influences microtubule stability and induces a p53-dependent cell cycle arrest. *Exp Cell Res.* 312(20), 4181–4204
33. Akihiko Ito, Yu-ichiro Koma, Kenji Watabe, Teruaki Nagano, Yuichi Endo, Hiroshi Nojima, Yukihiko Kitamura (2003) A truncated isoform of the protein phosphatase 2A B56 γ regulatory subunit may promote genetic instability and cause tumor progression. *American Journal of Pathology*, Vol. 162, No. 1
34. Koma YI, Ito A, Watabe K, Kimura SH, Kitamura Y (2004) A truncated isoform of the PP2A B56 γ regulatory subunit reduces irradiation-induced Mdm2 phosphorylation and could contribute to metastatic melanoma cell radioresistance. *Histol Histopathol* 19(2), 391-400
35. KM Dohoney, C. Guillermin, C. Whiteford, C. Elbi, PF Lambert, GI Hager, JN Brady (2004) Phosphorylation of p53 at serine 37 is important for transcriptional activity and regulation in response to DNA damage. *Oncogene* 23, 49-57

36. Heng-Hong Li, Xin Cai, Geoffrey P Shouse, Landon G Piluso and Xuan Liu (2007) A specific PP2A regulatory subunit, B56 γ , mediates DNA damage-induced dephosphorylation of p53 at Thr55. *The EMBO Journal* 26, 402–411
37. Geoffrey P. Shouse, Xin Cai, and Xuan Liu (2008) Serine 15 phosphorylation of p53 directs its interaction with B56 γ and the tumor suppressor activity of B56 γ -specific protein phosphatase 2A *Molecular and Cellular Biology* Vol. 28, No. 1., 448–456
38. Koji Okamoto, Craig Kamibayashi, Manuel Serrano, Carol Prives, Marc C. Mumby, David Beach (1996) p53-Dependent Association between Cyclin G and the B56 γ Subunit of Protein Phosphatase 2A. *Molecular and Cellular Biology*, 6593–6602
39. Koji Okamoto, Hongyun Li, Michael R. Jensen, Tingting Zhang, Yoichi Taya, Snorri S. Thorgeirsson, Carol Prives (2002) Cyclin G Recruits PP2A to Dephosphorylate Mdm2. *Molecular Cell*, Vol. 9, 761–771
40. Estelle Sontag (2001) Protein phosphatase 2A: the Trojan Horse of cellular signaling. *Cellular Signalling* 13 /16
41. DC Pallas, LK Shahrik, BL Martin (1990) Polyoma small and middle T antigen and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell* 60, 167-176
42. Wen Chen, Richard Possemato, K. Thirza Campbell, Courtney A. Plattner, David C. Pallas, William C. Hahn (2004) Identification of specific PP2A complexes involved in human cell transformation. *Cancer Cell* Vol.5, 127-136
43. Carlos S. Moreno, Sumathi Ramachandran, Danita G. Ashby, Noelani Laycock, Courtney A. Plattner, Wen Chen, William C. Hahn, David C. Pallas (2004) Signaling and transcriptional changes critical for transformation of human cells by simian virus 40 small tumor antigen or protein phosphatase 2A B56 γ knockdown. *Cancer Research* 64, 6978–6988
44. Estelle Sontag, Jean-Marie Sontag, Alphonse Garcia (1997) Protein phosphatase 2A is a critical regulator of protein kinase C ζ signaling targeted by SV40 small t to promote cell growth and NF- κ B activation. *The EMBO Journal* Vol.16 No.18, 5662–5671
45. R Rüdiger, D Röckel, J Fait, A Bergqvist, G Magnusson, G Walter (1992) Identification of binding sites on the regulatory A subunit of protein phosphatase 2A for the catalytic C subunit and for tumor antigens of simian virus 40 and polyomavirus. *Mol. Biol. Cell* 12, 4872-82
46. GA Calin, MG di Iasio, E Caprini (2000) Low frequency of alliterations of the α (PPP2R1A) and β (PPP2R1B) isoforms of the subunit A of the serine-threonine phosphatase 2A in human neoplasmas. *Oncogene* 19, 1191-5

47. R Rüdiger, HT Pham, G Walter (2001) Disruption of protein phosphatase 2A subunit interaction in human cancers with mutations in the A α subunit gene. *Oncogene* 20, 10-5
48. Wen Chen, Jason D. Arroyo, Jamie C. Timmons, Richard Possemato, William C. Hahn (2005) Cancer-associated PP2A A α subunits induce functional haploinsufficiency and tumorigenicity *Cancer Res* 2005; 65, 18
49. Pieter J.A. Eichhorn , Menno P. Creyghton , René Bernards (2009) Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1795, 1–15
50. Susann Fälta, Mats Merup^b, Gösta Gahrton^b, Bo Lamberta, and Anders Wennborg (2005) Identification of progression markers in B-CLL by gene expression profiling. *Experimental Hematology* 33, 883–893
51. M. Deichmann, M. Polychronidis, J. Wacker, M. Thome and H. NaÈher (2001) The protein phosphatase 2A subunit B γ gene is identified to be differentially expressed in malignant melanomas by subtractive suppression hybridization. *Melanoma Research* 11, 577-585
52. Irene Riz and Robert G. Hawley (2005) G1/S transcriptional networks modulated by the *HOX11/TLX1* oncogene of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene*. 25; 24(36), 5561–5575
53. Bonn GK, Huber CG, Oefner PJ. (1996) Verfahren zur Trennung von Nucleinsäuren, Austrian patent A 2285, 92
54. Huber CG, Oefner PJ, Bonn GK (1993) High-resolution liquid chromatography of oligonucleotides on nonporous alkylated styrene-divinylbenzene copolymers. *Anal Biochem.* 212, 351-358.
55. Jones AC, Austin J, Hansen N, Hoogendoorn B, Oefner PJ, Cheadle JP, O'Donovan MC. (1999) Optimal Temperature Selection for Mutation Detection by Denaturing HPLC and Comparison to Single-Stranded Conformation Polymorphism and Heteroduplex Analysis. *Clinical Chemistry.* 45, 1133-1140.
56. Xiao W, Oefner PJ. (2001) Denaturing High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *Hum Mutat.* 17, 439-474.
57. Klein B, Weirich G, Brauch H.(2001) DHPLC-based germline mutation screening in the analysis of the VHL tumor suppressor gene: usefulness and limitations. *Hum Genet.* 108, 376-384
58. Gross E, Arnold N, Goette J, Schwarz-Boeger U, Kiechle M.(1999) A comparison of BRCA1 mutation analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC. *Hum Genet.* 105, 72-74

-
59. Kuklin A, Davis AP, Hecker KH, Gjerde DT, Taylor PD. (1999) A novel technique for rapid genotyping of DNA polymorphisms in the mouse. *Mol Cell Probes*. 13, 239–242
 60. Marchetti A, Martella C, Felicioni L et al. (2005) EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol*. 23, 857-865
 61. Robert T.M. Boudreau, David M. Conrad, David W. Hoskin (2007) Apoptosis induced by protein phosphatase 2A (PP2A) inhibition in T leukemia cells is negatively regulated by PP2A-associated p38 mitogen-activated protein kinase. *Cellular Signalling* 19, 139–151
 62. Ann-Sofi Härmälä -Brasken, Andrey Mikhailov, Thomas Söderström, Annika Meinander, Tim H Holmström, Zahi Damuni, John E Eriksson (2003) Type-2A protein phosphatase activity is required to maintain death receptor responsiveness. *Oncogene* 22, 7677–7686
 63. Edward D. Esplin, Purita Ramos, Bobbie Martinez, Gali E. Tomlinson, Marc C. Mumby, Glen A. Evans (2006) The Glycine 90 to Aspartate Alteration in the A β subunit of PP2A (PPP2R1B) associates with breast cancer and causes a deficit in protein function. *Genes, Chromosomes & Cancer* 45, 182-190

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Bielefeld, den 22.01.2013

Diana Alexandra Keding

